

**Biochemische und physiologische Untersuchungen  
zum Einsatz von Mikroalgen  
zur Entfernung des Antiepileptikums Carbamazepin  
aus Abwässern**

---

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Sandra Mareike Haase, M.Sc.

geboren am 21.06.1985 in Göttingen

**2017**

Referent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Rath

Korreferentin: Prof. Dr. Jutta Papenbrock

Tag der Promotion: 01.12.2016

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Bernhard Huchzermeyer, für die intensive Betreuung meiner Arbeit und die langjährige Förderung meiner akademischen Laufbahn.

Für die Übernahme des Korreferates und des Prüfungsvorsitzes danke ich Herrn Professor Dr. Thomas Rath, Frau Professorin Dr. Jutta Papenbrock und Frau Professorin Dr. Traud Winkelmann.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Maxwell Moncao, Karthik Nadendla, Gayatri J. Pahapale, Ana Vega de Armas, Patricia Freire, Yelena Churakova, Hoai Thuong Tran und Mouna Dammak, die mich während ihres Praktikums an der Leibniz Universität Hannover tatkräftig in der theoretischen und praktischen Arbeit unterstützt haben.

Nils Orth, Silke Braams, Paweł Panas und Vidhya Bommaiyaamy möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken, da sie in ihren Abschlussarbeiten wichtige Fragestellungen zur CBZ-Problematik bearbeitet und dadurch einen sehr großen Anteil an der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit haben. Till-Tobias von Elsner danke ich für die Durchsicht des englischen Beitrages in dieser Arbeit. Für die vielen Gespräche und Hilfestellungen von Frederik-Matti Bartels bin ich sehr dankbar!

Weiterhin möchte ich Birgit Lippmann danken, die durch ihre Unterstützung, ihre Geduld und ihre herzliche Art unseren Laboralltag erheblich aufgewertet hat!

Herrn Dr. Rudolf Schneider, Herrn Dr. Andreas Lehmann und Frau Kristin Hoffmann danke ich für die Durchführung der CBZ-Analytik an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Berlin.

Für die Betreuung und Unterstützung vor Ort auf dem Klärwerk in Hannover-Herrenhausen möchte ich Herrn Omar Gameh herzlich danken.

### **Allen BGTlern und Alganern möchte ich für die unvergessliche Zeit danken!**

Ich möchte mich bei Dir, Serge, für Deine Unterstützung, Nähe und auch Geduld in den letzten Jahren, sowohl privat als auch beruflich, bedanken.

Meinen Eltern und meinem Bruder gilt ein ganz besonderer Dank. Ihr habt mich in den letzten Jahren begleitet und meine „Algengeschichten“ ertragen. Danke, dass es Euch gibt!



***Meinen Großeltern***



## **Vorwort**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen von B.Sc.- und M.Sc.-Arbeiten erarbeitet, die von mir betreut wurden (Orth 2013; Bommaiyaamy 2014; Braams 2015; Panas 2015; Orth 2016). Von Dritten übernommene Daten sind im Folgenden gekennzeichnet.

## **Veröffentlichungen**

Verschiedene Themenbereiche wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung vorgesehen.

Haase, S.M.; Orth, N.; Lehmann, A.; Hoffmann, K.; Schneider, R.; Huchzermeyer, B. (in Vorb.) Self-cleaning capacity of the river Leine towards Carbamazepine (in Vorbereitung)

Haase, S.M.; Braams, S.; Bommaiyaamy, V.; Rath, T.; Huchzermeyer, B. (2016) Effect of Carbamazepine-induced oxidative stress on two microalgae species and their capacity to detoxify Carbamazepine. Environmental Science and Pollution Research (eingereicht)

Haase, S.M.; Grade, S.; Huchzermeyer, B. (2015a) Selbstreinigungskraft von Flüssen: Algen als Biofilter. Technologie-Informationen (TI), Klimawandel – Folgen und Maßnahmen. 3:11

Haase, S.M.; Panas, P.; Rath, T.; Huchzermeyer, B. (2015b) Effects of Carbamazepine on two microalgae species differing in stress resistance. Water, Air, & Soil Pollution. 226(10) (10.1007/s11270-015-2562-8)

Haase, S.M.; Rath, T.; Huchzermeyer, B. (2014) Einfluss pharmazeutischer Substanzen auf *Coccomyxa* sp. am Beispiel von Carbamazepin. DGG Proceedings. 4(8):1-5.

## Abstract

Pharmaceutically active compounds are often undesirably released into the water ecosystem, because of their high persistence and insufficient cleaning efficiency in wastewater treatment plants.

Carbamazepine (CBZ) can be considered as an example of highly persistent compounds in wastewater. CBZ limits are already exceeded in parts of German surface water (PNEC:  $0.42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; EQS-proposal:  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ). According to the assessment of the German Working Group on water issues of the Federal States and the Federal Government (Länderarbeitsgemeinschaft, LAWA) a long term impairment of the aquatic environment can be expected (Aksu und Tunç 2005). Therefore, corresponding to the European Directive 2013/39/EU, there is a need for developing a concept for the improvement of water quality in surface waters concerning pharmaceutical compounds.

In the scope of this work, biochemical and physiological basics for a long time use of unicellular microalgae as a biological filter for the bioremediation of CBZ were investigated. In consideration, the concentration profile of CBZ was determined in the city area of Hanover, Germany, depending on the season. Parallel to this, the microalgae population was identified in summer and in winter.

Climatic effects and CBZ tolerances of the dominant algae species were subsequently analyzed on the laboratory scale. Finally, the occurrence of CBZ degradation products was determined. Steps of CBZ degradation were investigated in selected algae cultures on the laboratory scale.

In the context of this study, one microalgae (*Parachlorella* sp.) with high tolerance towards climatic and CBZ-induced effects was identified. Furthermore, a degradation rate of CBZ at 44.7 % was achieved.

Therefore, the use of *Parachlorella* sp. can be recommended as a long time approach for the improvement of water quality in terms of the CBZ-load.

**Keywords:** pharmaceuticals, carbamazepine, microalgae, biological filters



## Kurzfassung

Arzneistoffe werden häufig aufgrund ihrer hohen Persistenz und nicht ausreichender Reinigungskapazitäten kommunaler Kläranlagen in die aquatische Umwelt eingetragen.

Als Beispiel für persistente Verbindungen im Abwasser wurde die Modellsubstanz Carbamazepin (CBZ) ausgewählt. In einigen Abschnitten der deutschen Oberflächengewässer wurden die für CBZ ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen (PNEC:  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; UQN-Vorschlag:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) bereits überschritten. Entsprechend der Einschätzung der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), muss daher langfristig mit einer Beeinträchtigung der aquatischen Umwelt gerechnet werden (Aksu und Tunç 2005). Daraus ergibt sich nach europäischer Richtlinie 2013/39/EU die Notwendigkeit, ein Konzept zur Verbesserung der Wasserqualität in Oberflächengewässern hinsichtlich pharmazeutischer Substanzen zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die biochemischen und physiologischen Grundlagen für einen ganzjährigen Einsatz von Mikroalgen als biologische Filter in der CBZ-Bioremediation untersucht. Hierzu wurde zunächst der Konzentrationsverlauf von CBZ in der Leine im Stadtgebiet von Hannover in Abhängigkeit von der Jahreszeit bestimmt. Parallel dazu wurde die Mikroalgenpopulation im Sommer und im Winter ermittelt.

Klimatische Effekte sowie CBZ-Toleranzen der dominanten Algenspezies wurden anschließend im Labor untersucht. Abschließend wurde das Auftreten von CBZ-Abbauprodukten bestimmt. Die Wege des CBZ-Abbaus wurden an ausgewählten Algenkulturen untersucht.

Im Mikroalgen-Screening konnte eine Mikroalge (*Parachloralla* sp.) mit hoher Toleranz gegenüber klimatischen und CBZ-induzierten Effekten identifiziert werden. In Kulturen mit dieser Mikroalge konnte eine CBZ-Gesamtreduktion von bis zu 44,7 % erzielt werden.

Als ganzjähriges Konzept zur Verbesserung der Wasserqualität im Hinblick auf die CBZ-Belastung in Oberflächengewässern kann somit der Einsatz der Mikroalge *Parachlorella* sp. empfohlen werden.

**Schlagwörter:** Arzneimittel, Carbamazepin, Mikroalgen, Biologische Filter



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Kurzfassung</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XXII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2 Stand des Wissens</b> .....	<b>- 3 -</b>
2.1 Pharmazeutische Wirkstoffe.....	- 3 -
2.1.1 Begriffsbestimmung .....	- 3 -
2.1.2 Eintrag in die aquatische Umwelt.....	- 4 -
2.1.3 Gefährdung der aquatischen Umwelt.....	- 6 -
2.1.4 Gesetzesgrundlage.....	- 8 -
2.2 Carbamazepin (CBZ) .....	- 10 -
2.2.1 Vorstellung von CBZ.....	- 10 -
2.2.2 CBZ-Metabolismus .....	- 10 -
2.2.3 Therapeutische Wirkung von CBZ .....	- 16 -
2.2.4 CBZ-Konzentration in der Umwelt.....	- 17 -
2.2.4.1 Gesetzesrahmen für CBZ in der aquatischen Umwelt .....	- 19 -
2.2.4.2 CBZ-Humantoxikologie .....	- 19 -
2.2.5 Methoden zur Entfernung von CBZ aus Abwasser.....	- 21 -
2.3 Mikroalgen .....	- 26 -
2.3.1 Überblick.....	- 26 -
2.3.2 CBZ-Ökotoxikologie.....	- 28 -
2.3.2.1 CBZ-Gefahrenabschätzung.....	- 28 -
2.3.2.2 CBZ-induzierter oxidativer Stress.....	- 31 -
2.3.2.3 Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress .....	- 34 -
2.3.3 CBZ-Wirkung auf Mikroalgen .....	- 38 -
2.4 Untersuchungsgebiet .....	- 39 -
2.4.1 Fluss Leine .....	- 39 -
2.4.2 Pharmazeutische Belastung der Leine.....	- 40 -
<b>3 Zielsetzung</b> .....	<b>- 42 -</b>

<b>4</b>	<b>Material &amp; Methoden.....</b>	<b>- 44 -</b>
4.1	Grundlegende Messungen.....	- 44 -
4.1.1	Anzuchtbedingungen.....	- 44 -
4.1.2	Wachstumsmessung.....	- 45 -
4.1.3	Zellaufschluss.....	- 45 -
4.2	Mikroalgen aus der Leine.....	- 46 -
4.2.1	Untersuchungsgebiet.....	- 46 -
4.2.2	Isolierung der Mikroalgen.....	- 46 -
4.2.3	Typisierung isolierter Mikroalgen.....	- 47 -
4.2.4	Saisonale Häufigkeitsverteilung isolierter Mikroalgen.....	- 49 -
4.3	Messparameter.....	- 51 -
4.3.1	Pigmentbestimmung.....	- 51 -
4.3.2	Protein.....	- 51 -
4.3.3	Aminosäuren.....	- 51 -
4.3.4	Zucker.....	- 52 -
4.3.5	Chlorophyllfluoreszenz.....	- 52 -
4.3.6	Photosynthetische Aktivität.....	- 53 -
4.3.7	Lichtkompensationspunkt.....	- 53 -
4.3.8	Phasenverteilung.....	- 54 -
4.3.9	Glutathion.....	- 54 -
4.3.9.1	Reduziertes Glutathion.....	- 54 -
4.3.9.2	Oxidiertes Glutathion.....	- 55 -
4.3.10	Glutathion-Reduktase.....	- 55 -
4.3.11	Superoxid-Dismutase.....	- 55 -
4.3.12	Katalase.....	- 56 -
4.3.13	Lipidperoxidation.....	- 56 -
4.3.14	Cytochrom P450-Komplex.....	- 57 -
4.3.15	Glutathion S-Transferase.....	- 57 -
4.4	Analytische Messverfahren.....	- 58 -
4.4.1	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (ELISA).....	- 58 -
4.4.2	Chromatographisches Nachweisverfahren (HPLC-ESI-MS/MS).....	- 60 -
4.5	Datenauswertung.....	- 63 -
4.5.1	Vergleichbarkeit der Ergebnisse.....	- 63 -
4.5.2	Wachstumsraten.....	- 63 -
4.5.3	Statistische Auswertung.....	- 63 -

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>- 64 -</b>
5.1	Mikroalgen aus der Leine .....	- 64 -
5.1.1	Typisierung isolierter Mikroalgen .....	- 64 -
5.1.2	Saisonale Häufigkeitsverteilung isolierter Mikroalgen .....	- 68 -
5.1.3	Klimatische Effekte auf die Zellteilung und die Photosynthese.....	- 68 -
5.1.3.1	Wachstum unter saisonalen Bedingungen .....	- 68 -
5.1.3.2	Pigmente der Photosynthese .....	- 69 -
5.1.3.1	Energieverwertung während der Photosynthese .....	- 70 -
5.1.3.2	Produkte der Photosynthese .....	- 72 -
5.1.4	Algenauswahl Part I.....	- 73 -
5.2	CBZ-Konzentration in der Leine .....	- 74 -
5.3	CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat .....	- 76 -
5.3.1	Wachstum unter CBZ-Einfluss .....	- 76 -
5.3.2	Pigmente der Photosynthese .....	- 78 -
5.3.2.1	Chlorophyll a .....	- 78 -
5.3.2.2	Chlorophyll b .....	- 80 -
5.3.2.3	Carotinoide .....	- 81 -
5.3.3	Messparameter zur Energieverwertung .....	- 83 -
5.3.3.1	Nicht-photochemisches Quenching (NPQ).....	- 83 -
5.3.3.2	Apparente Elektronentransportrate (ETR).....	- 84 -
5.3.4	Produkte der Photosynthese.....	- 86 -
5.3.4.1	Protein .....	- 86 -
5.3.4.2	Aminosäuren.....	- 88 -
5.3.4.3	Zucker.....	- 88 -
5.3.5	Phasenverteilung .....	- 89 -
5.4	Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung .....	- 90 -
5.4.1	Glutathion-Schutzsystem .....	- 90 -
5.4.1.1	Reduziertes Glutathion.....	- 90 -
5.4.1.2	Oxidiertes Glutathion.....	- 92 -
5.4.1.3	Glutathion-Reduktase .....	- 93 -
5.4.2	Enzymatisches Schutzsystem.....	- 95 -
5.4.2.1	Superoxid-Dismutase.....	- 95 -
5.4.2.2	Katalase.....	- 97 -
5.4.1	Lipidperoxidation.....	- 98 -
5.5	Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme.....	- 100 -

5.5.1	Cytochrom P450-Komplex.....	- 100 -
5.5.2	Glutathion S-Transferase.....	- 101 -
5.5.3	Algenauswahl Part II.....	- 102 -
5.6	Stressantwort ausgewählter Mikroalgen.....	- 103 -
5.7	CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen .....	- 105 -
5.7.1	CBZ-Metabolisierung unter simulierten Sommerbedingungen .....	- 105 -
5.7.1.1	Antikörperbasiertes CBZ-Nachweisverfahren .....	- 105 -
5.7.1.2	Chromatographisches CBZ-Nachweisverfahren .....	- 107 -
5.7.2	CBZ-Metabolisierung unter simulierten Winterbedingungen .....	- 112 -
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 115 -</b>
6.1	Mikroalgen aus der Leine.....	- 115 -
6.1.1	Typisierung isolierter Mikroalgen .....	- 115 -
6.1.2	Saisonale Häufigkeitsverteilung der isolierten Mikroalgen .....	- 116 -
6.1.3	Klimatische Effekte auf die Zellteilung und die Photosynthese.....	- 116 -
6.1.3.1	Wachstum unter saisonalen Bedingungen.....	- 118 -
6.1.3.2	Pigmente der Photosynthese.....	- 118 -
6.1.3.3	Energieverwertung während der Photosynthese.....	- 119 -
6.1.3.4	Produkte der Photosynthese.....	- 120 -
6.1.4	Zwischenfazit zum Abschnitt „Mikroalgen aus der Leine“.....	- 122 -
6.2	CBZ-Konzentrationen in der Leine.....	- 124 -
6.3	CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat.....	- 128 -
6.3.1	Wachstum unter CBZ-Einfluss.....	- 128 -
6.3.2	Pigmente der Photosynthese.....	- 130 -
6.3.2.1	Chlorophyll a und b.....	- 130 -
6.3.2.2	Carotinoide .....	- 133 -
6.3.3	Messparameter zur Energieverwertung.....	- 133 -
6.3.4	Produkte der Photosynthese .....	- 137 -
6.3.4.1	Protein .....	- 137 -
6.3.4.2	Aminosäuren .....	- 139 -
6.3.4.3	Zucker .....	- 140 -
6.3.5	Phasenverteilung.....	- 141 -
6.3.6	Zwischenfazit zum Abschnitt „CBZ-Einfluss auf den Photosynthese- apparat“.....	- 143 -
6.4	Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung.....	- 144 -
6.4.1	Antioxidatives Schutzsystem (Glutathion, Carotinoide).....	- 144 -
6.4.2	Enzymatisches Schutzsystem .....	- 146 -

6.4.2.1	Superoxid-Dismutase.....	- 147 -
6.4.2.2	Katalase.....	- 148 -
6.4.3	Lipidperoxidation.....	- 149 -
6.4.4	Zwischenfazit zum Abschnitt „Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung“ .....	- 151 -
6.5	Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme.....	- 153 -
6.5.1	Cytochrom P450-Komplex .....	- 154 -
6.5.2	Glutathion S-Transferase.....	- 155 -
6.5.3	Zwischenfazit zum Abschnitt „Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme“ .....	- 156 -
6.6	CBZ-Stress, -Schutzmechanismen und -Metabolisierungsstrategien .....	- 158 -
6.7	Stressantwort ausgewählter Mikroalgen.....	- 173 -
6.8	CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen .....	- 177 -
6.8.1	CBZ-Metabolisierung unter simulierten Sommerbedingungen .....	- 178 -
6.8.1.1	Antikörperbasiertes CBZ-Nachweisverfahren.....	- 178 -
6.8.1.2	Chromatographisches CBZ-Nachweisverfahren.....	- 179 -
6.8.2	CBZ-Metabolisierung unter simulierten Winterbedingungen .....	- 187 -
6.8.3	Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen.....	- 190 -
6.8.4	Zwischenfazit zum Abschnitt „CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen“ .....	- 192 -
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>- 195 -</b>
<b>8</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>- 199 -</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>- 200 -</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>- 204 -</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>- 227 -</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Eintrag und Verbleib der Arzneistoffe in der Umwelt (Bildnachweis: LANUV (2007) und ergänzt u.a. nach Baron <i>et al.</i> (2014)).....	- 6 -
Abbildung 2.2: Carbamazepin-Strukturformel (Bildnachweis: SRC (2016)).....	- 10 -
Abbildung 2.3: Allgemeine Metabolisierungsreaktion des CYP-Komplexes im glatten Endoplasmatischen Retikulum; Zeichnung angefertigt nach Spektrum (1999).....	- 11 -
Abbildung 2.4: Ausscheidungsgrad des Carbama-zepins als Ausgangsstoff sowie in Form von Metaboliten, zusammengefasst durch Zhang <i>et al.</i> (2008); Zeichnung angefertigt nach Zhang <i>et al.</i> (2008).....	- 12 -
Abbildung 2.5: CBZ-Metabolismus (GSH: Glutathion, NAC: N-acetylcystein); Zeichnung angefertigt nach Kerr <i>et al.</i> (1994), Pearce <i>et al.</i> (2002), Pearce <i>et al.</i> (2005), Bu <i>et al.</i> (2007), Pearce <i>et al.</i> (2008) und Li <i>et al.</i> (2013b).....	- 14 -
Abbildung 2.6: Mögliche pharmazeutische Wirkung von CBZ in Pflanzen- und Algenzellen.....	- 32 -
Abbildung 2.7: Mögliche Wege der ROS-Entstehung (rot) und -Entgiftung (grün) im Chloroplasten; Zeichnung angefertigt nach López-Huertas <i>et al.</i> (1999), Sharma <i>et al.</i> (2012) und Gallie (2013).....	- 36 -
Abbildung 2.8: Mögliche Wege der ROS-Entstehung (rot) und -Entgiftung (grün) im Peroxisomen; Zeichnung angefertigt nach Yamaguchi <i>et al.</i> (1995), Schindelin <i>et al.</i> (2001), del Río <i>et al.</i> (2006), Hänsch <i>et al.</i> (2007), Byrne <i>et al.</i> (2009), Werner und Witte (2011), Sharma <i>et al.</i> (2012), Gallie (2013) und Halliwell und Gutteridge (2015).....	- 37 -
Abbildung 2.9: Mögliche Wege der ROS-Entstehung (rot) und -Entgiftung (grün) im Mitochondrium; Zeichnung angefertigt nach Guidot <i>et al.</i> (1995), Andreyev <i>et al.</i> (2005) und Sharma <i>et al.</i> (2012).....	- 37 -
Abbildung 2.10: Gewässergütekarte für die Stadt Hannover (Bildnachweis: Schmidt (2012)).....	- 39 -
Abbildung 4.1: Teilabschnitt der Leine (Untersuchungsgebiet) mit den eingezeichneten Stellen der Probeentnahme und Abwassereinleitung des Klärwerks in Herrenhausen.....	- 46 -
Abbildung 4.2: Versuchsaufbau zur Filtration definierter Wasservolumina.....	- 50 -
Abbildung 4.3: Prinzip des durchgeführten kompetitiven ELISA.....	- 59 -
Abbildung 5.1: DNA-Marker Auf-spaltung (Bildnachweis: Thermo Scientific™).....	- 64 -
Abbildung 5.2: Visualisierung der DNA Fragmente der Kulturen I bis IV (n=12) in einem 2 % Agarosegel aufgetragen; verwendet wurden 10 µL DNA sowie 5 µL Ladepuffer; DNA-Marker: 1 kb.....	- 64 -
Abbildung 5.3: Visualisierung der DNA Fragmente der Kulturen V bis XIV als Mehrfachbestimmung in einem 2 % Agarosegel; verwendet wurden 10 µL DNA sowie 5 µL Ladepuffer; DNA-Marker: 1 kb.....	- 64 -
Abbildung 5.4: Die aufgereinigten Plasmide alle Kulturen (I-XIV) wurden als 3-fach Bestimmung in einem 1 % Agarosegel aufgetragen (Plasmidgröße: 3956 bp); verwendet wurden 1 µL DNA, 6 µL ddH <sub>2</sub> O und 3 µL Ladepuffer; Größe des DNA-Markers: 1 kb; anhand der Bandenstärke wurden die Proben zur Sequenzierung ausgewählt.....	- 65 -
Abbildung 5.5: Mikroskopische Aufnahmen isolierter Mikroalgen in 400-facher Vergrößerung.....	- 67 -
Abbildung 5.6: Photosynthetische O <sub>2</sub> -Entwicklung pro 10 <sup>6</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Lichtintensität und saisonalen Bedingungen für die Mikroalge <i>Chlorella</i> sp. (n=3), logarithmisch gefittet.....	- 71 -
Abbildung 5.7: Konzentrationen von Carbamazepin (CBZ) und den wichtigsten Metaboliten CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ an drei Messpunkten im <b>Januar 2014</b> (BAM, Deutschland).....	- 74 -
Abbildung 5.8: Konzentrationen von Carbamazepin (CBZ) und den wichtigsten Metaboliten CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 3-OH CBZ und 2-OH CBZ an den drei Messpunkten im <b>Juli 2014</b> (BAM, Deutschland).....	- 75 -
Abbildung 5.9: Die gesamte Oxidaseaktivität des CYP-Komplexes wurde als Änderung der optischen Dichte min <sup>-1</sup> bestimmt und auf 10 <sup>6</sup> Zellen normiert; die Aktivität wurde für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp., <i>Ignatius</i> sp., <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration untersucht (n=3).....	- 101 -
Abbildung 5.10: Beispiel einer Kalibrierkurve für CBZ-Standards; aufgetragen sind die getesteten CBZ-Konzentrationen in µg L <sup>-1</sup> gegenüber der optischen Dichte bei 450 nm; der Kurvenfit erfolgte 4-parametrisch sigmoidal nach Hill mit einem r <sup>2</sup> =0,999.....	- 105 -



Abbildung 5.11: CBZ-Konzentration in $\mu\text{g L}^{-1}$ im Kontrollmedium zum Versuchsstart und am Versuchsende nach einer 4-wöchigen Kultivierungsdauer unter Sommerbedingungen; zusätzlich zur CBZ-Konzentration wurden am Versuchsende die Konzentrationen der Metabolite CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ in $\text{ng L}^{-1}$ gemessen (n=1).....	- 107 -
Abbildung 5.12: CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen (n=3).....	- 108 -
Abbildung 5.13: CBZ 10,11-epoxid-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalgen <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen (n=3).....	- 109 -
Abbildung 5.14: CBZ-diol-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen (n=3).....	- 110 -
Abbildung 5.15: 2-OH CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen (n=3).....	- 111 -
Abbildung 5.16: 3-OH CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen (n=3).....	- 112 -
Abbildung 5.17: CBZ-Konzentration in $\mu\text{g L}^{-1}$ im Kontrollmedium zum Versuchsstart und am Versuchsende nach einer 4-wöchigen Kultivierungsdauer unter Winterbedingungen; zusätzlich zur CBZ-Konzentration wurden am Versuchsende die Konzentrationen der Metabolite CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ in $\text{ng L}^{-1}$ gemessen (n=1).....	- 113 -
Abbildung 5.18: Die Konzentrationen von CBZ und den wichtigsten Metaboliten CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ wurden chromatographisch im Kontrollmedium (n=1), im Überstand (n=3) und in der intrazellulären Fraktion der Mikroalge <i>Parachlorella</i> sp. (n=3) nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen unter Winterbedingungen bestimmt.....	- 114 -
Abbildung 6.1: Vereinfachtes Schema der Photosynthese .....	- 130 -
Abbildung 6.2: Vereinfachtes Schema zur Energieverwertung in der Photosynthese.....	- 134 -
Abbildung 6.3: Vereinfachtes Schema zur Produktbildung in der Photosynthese.....	- 137 -
Abbildung 6.4: Mögliche CBZ-Entgiftungswege in Mikroalgen in Anlehnung an die menschliche CBZ-Metabolisierung (X: CBZ/Metabolit, XGS: Glutathion-Konjugat, Cys: Cysteinrest, Glu: Glutamatrest, GST: Glutathion S-Transferase); Zeichnung angefertigt nach (Kreuz <i>et al.</i> 1996; Schröder 1997; Coleman <i>et al.</i> 1997).....	- 153 -
Abbildung 6.5: Vergleich der gemessenen Konzentrationen von CBZ und den wichtigsten Metaboliten CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ in Kulturen von <i>Parachlorella</i> sp. unter Sommer- und Winterbedingungen (n=3) .....	- 189 -
Abbildung 6.6: Synergistischer Effekt einer Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierung; Zeichnung angefertigt nach Muñoz und Guieysse (2006).....	- 191 -
Abbildung A-1 Chromatographische Auswertung zur Bestimmung der Konzentrationen von CBZ, CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ im Ablauf der Kläranlage Herrenhausen (BAM, Berlin).....	- 227 -

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1: Tabellarische Übersicht der genotypisierten Mikroalgen (Kulturnummer), angegeben mit der Sequenzhomologie (BLAST) .....	67 -
Tabelle 5.2: Übersicht der durchschnittlichen Zellzahlen an den Messpunkten (a) Domröschenbrücke in Linden-Nord, oberhalb des Klärwerks Herrenhausen (b) in der Nähe der Einleitstelle des Klärwerks Herrenhausen (c) ungefähr 3 km unterhalb des Klärwerks; dokumentiert wurden die Zellzahlen in der Winterperiode (Januar 2014) und Sommerperiode (Juli 2014) .....	68 -
Tabelle 5.3: Auflistung des durchschnittlichen Wachstums in Zellen $d^{-1}$ über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen; die Mikroalgen wurden in 24-Well Platten bei Winter- sowie Sommerbedingungen unter Laborbedingungen kultiviert (n=6); Wachstum wurden über die Messung der optischen Dichte bei 850 nm bestimmt .....	69 -
Tabelle 5.4: Dokumentierte Pigmentgehalte (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotinoide) wurden in Mikroalgenkulturen, kultiviert unter simulierten Winterbedingungen, bestimmt; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen (n=3) .....	69 -
Tabelle 5.5: Dokumentierte Pigmentgehalte (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotinoide) wurden in Mikroalgenkulturen, kultiviert unter simulierten Sommerbedingungen, bestimmt; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen (n=3).....	70 -
Tabelle 5.6: Gemessene photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung der Mikroalgenkulturen, kultiviert unter saisonalen Bedingungen, in einer Sauerstoffelektrode (Hansatech, Typ Oxygraph 10002); angegeben ist die $O_2$ -Entwicklung in $nmol\ min^{-1}$ pro $10^6$ Zellen als Mittelwert (n=3) $\pm$ STABW .....	70 -
Tabelle 5.7: Auflistung der Lichtintensitäten am Kompensationspunkt in $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ für die untersuchten Mikroalgen, die Berechnung erfolgte anhand gemessener photosynthetischer Aktivitäten in $nmol\ min^{-1}$ pro $10^6$ Zellen bei verschiedenen Lichtintensitäten zwischen 10 und $120\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ; es wurden die Temperaturen entsprechend der Kultivierung eingestellt (4 °C; 20 °C); die Messwerte dreier biologischer Wiederholungen dienten als Datengrundlage für den logarithmischen Kurvenfit. ....	72 -
Tabelle 5.8: Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte unter saisonalen Kultivierungsbedingungen; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt (n=3) $\pm$ STABW in $\mu g$ pro $10^6$ Zellen (n=3) .....	72 -
Tabelle 5.9: Die Bestimmung des Zuckergehalts erfolgte unter saisonalen Kultivierungsbedingungen; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt (n=3) $\pm$ STABW in ng pro $10^6$ Zellen (n=3) .....	73 -
Tabelle 5.10: Trend der durchschnittlichen Wachstumsraten für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Neochloris</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ) (n=3) .....	77 -
Tabelle 5.11: Trend der durchschnittlichen Wachstumsraten für <i>Ignatius</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ) (n=3) .....	77 -
Tabelle 5.12: Trend der durchschnittlichen Wachstumsraten für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (0 bis $10\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ); (n=3) .....	78 -
Tabelle 5.13: Aufgeführt ist der Chlorophyll a-Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ) .....	79 -
Tabelle 5.14: Aufgeführt ist der Chlorophyll a-Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ) .....	79 -
Tabelle 5.15: Aufgeführt ist der Chlorophyll a-Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ) .....	80 -
Tabelle 5.16: Aufgeführt ist der Chlorophyll b-Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrations-messreihen (erste Messreihe: 0 bis $10\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000\ \mu g\ L^{-1}$ CBZ) .....	80 -
Tabelle 5.17: Aufgeführt ist der Chlorophyll b-Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	81 -

Tabelle 5.18: Aufgeführt ist der Chlorophyll b-Gehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) ...	81 -
Tabelle 5.19: Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ) .....	82 -
Tabelle 5.20: Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	82 -
Tabelle 5.21: Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ) .....	83 -
Tabelle 5.22: Zusammengefasst ist das NPQ-Niveau $\pm$ STABW für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ); die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben .....	83 -
Tabelle 5.23: Zusammengefasst ist das NPQ-Niveau $\pm$ STABW für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben .....	84 -
Tabelle 5.24: Zusammengefasst ist das NPQ-Niveau $\pm$ STABW für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben.....	84 -
Tabelle 5.25: Dargestellt ist die apparente Elektronentransportrate (ETR) $\pm$ STABW in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	85 -
Tabelle 5.26: Dargestellt ist die apparente Elektronentransportrate (ETR) $\pm$ STABW in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	85 -
Tabelle 5.27: Dargestellt ist die apparente Elektronentransportrate (ETR) $\pm$ STABW in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	86 -
Tabelle 5.28: Dargestellt ist der Proteingehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ) .....	86 -
Tabelle 5.29: Dargestellt ist der Proteingehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	87 -
Tabelle 5.30: Dargestellt ist der Proteingehalt $\pm$ STABW in mg pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3).....	87 -
Tabelle 5.31: Dokumentiert sind die Gehalte an freien Aminosäuren $\pm$ STABW in $\mu\text{mol}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration .....	88 -
Tabelle 5.32: Dargestellt ist der Zuckergehalt $\pm$ STABW in $\mu\text{g}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	89 -
Tabelle 5.33: Dargestellt ist der Phasenverteilungsindex ( $I_{435}$ ) $\pm$ STABW für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	89 -
Tabelle 5.34: Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) $\pm$ STABW ist in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	90 -
Tabelle 5.35: Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) $\pm$ STABW ist in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3) .....	91 -
Tabelle 5.36: Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) $\pm$ STABW ist in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3) .....	91 -

Tabelle 5.37: Der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG) $\pm$ STABW ist in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	- 92 -
Tabelle 5.38: Der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG) $\pm$ STABW ist in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3) .....	- 93 -
Tabelle 5.39: Der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG) $\pm$ STABW ist in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3).....	- 93 -
Tabelle 5.40: Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) $\pm$ STABW wurde über die Bildung des Substrats 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) in $\text{nmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration bestimmt; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	- 94 -
Tabelle 5.41: Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) $\pm$ STABW wurde über die Bildung des Substrats 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) in $\text{nmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration bestimmt.....	- 94 -
Tabelle 5.42: Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) $\pm$ STABW wurde über die Bildung des Substrats 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) in $\text{nmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration bestimmt.....	- 95 -
Tabelle 5.43: Die Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt indirekt über die Hemmung der Autooxidation des Substrats Pyrogallol. Änderungen der SOD-Aktivität $\pm$ STABW sind in U pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) angegeben; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	- 95 -
Tabelle 5.44: Die Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt indirekt über die Hemmung der Autooxidation des Substrats Pyrogallol. Änderungen der SOD-Aktivität $\pm$ STABW sind in U pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) angegeben .....	- 96 -
Tabelle 5.45: Die Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt indirekt über die Hemmung der Autooxidation des Substrats Pyrogallol. Änderungen der SOD-Aktivität $\pm$ STABW sind in U pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) angegeben .....	- 96 -
Tabelle 5.46: Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von $\text{H}_2\text{O}_2$ gemessen; angegeben ist die CAT-Aktivität $\pm$ STABW in $\text{mmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	- 97 -
Tabelle 5.47: Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von $\text{H}_2\text{O}_2$ gemessen; angegeben ist die CAT-Aktivität $\pm$ STABW in $\text{mmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3).....	- 97 -
Tabelle 5.48: Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von $\text{H}_2\text{O}_2$ gemessen; angegeben ist die CAT-Aktivität $\pm$ STABW in $\text{mmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	- 98 -
Tabelle 5.49: Dargestellt sind die MDA-Gehalte als Produkte der Lipidperoxidation $\pm$ STABW in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ; zweite Messreihe: 0 bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ).....	- 99 -
Tabelle 5.50: Dargestellt sind die MDA-Gehalte als Produkte der Lipidperoxidation $\pm$ STABW in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3).....	- 99 -
Tabelle 5.51: Dargestellt sind die MDA-Gehalte als Produkte der Lipidperoxidation $\pm$ STABW in nmol pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	- 99 -
Tabelle 5.52: Die Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST) $\pm$ STABW ist in $\text{nmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Neochloris</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration aufgezeigt (n=3).....	- 102 -

Tabelle 5.53: Die Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST) $\pm$ STABW ist in $\text{nmol min}^{-1}$ pro $10^6$ Zellen für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration aufgezeigt (n=3) .....	- 102 -
Tabelle 5.54: Trend der Stressantworten für <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. nach einer Kultivierungsdauer von drei Tagen in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) .....	- 104 -
Tabelle 5.55: Wachstumsveränderungen in Kulturen der Mikroalgen <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. über die Kultivierungsdauer von vier Wochen (Sommerbedingungen) in Kontrollkulturen ohne CBZ und mit Einfluss von $1 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ... -	106 -
Tabelle 5.56: CBZ-Gesamtreduktion der Mikroalgen <i>Chlorella</i> sp., <i>Parachlorella</i> sp. und <i>Scenedesmus</i> sp. unter Sommerbedingungen; Die Bestimmung der CBZ-Konzentrationen erfolgte im Überstand der Mikroalgenkulturen mittels ELISA nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen .....	- 106 -
Tabelle 5.57: Wachstumsveränderungen in Kulturen der Mikroalge <i>Parachlorella</i> sp. über die Kultivierungsdauer von vier Wochen (Winterbedingungen) in Kontrollkulturen ohne CBZ und mit Einfluss von $1 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ .....	- 113 -
Tabelle 6.1: Zusammenfassung erzielter Messergebnisse für <i>Chlorella</i> sp. und <i>Parachlorella</i> sp. ....	- 159 -
Tabelle 6.2: Zusammenfassung erzielter Messergebnisse für <i>Neochloris</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. und <i>Ignatius</i> sp. ....	- 164 -
Tabelle 6.3: Zusammenfassung erzielter Messergebnisse für <i>Pedinomonas</i> sp. und <i>Coccomyxa</i> sp. ....	- 169 -

## Abkürzungsverzeichnis

·OH	Hydroxyl-Radikal	LHC	(engl.: <i>light-harvesting complex</i> ), Lichtsammelkomplex
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff	LOEC	(engl.: <i>lowest observed effect concentration</i> ), niedrigste Konzentration ohne signifikante Wirkung
2-OH CBZ	2-Hydroxy CBZ	Log K <sub>ow</sub>	Verteilungskoeffizient Octanol-Wasser
3-OH CBZ	3-Hydroxy CBZ	MDAR	Monodehydroascorbat-Reduktase
ADI	(engl.: <i>acceptable daily intake</i> ), zulässige Tagesdosis	MDHA	Monodehydroascorbat
AMG	Arzneimittelgesetz	MEC	(engl.: <i>measured environmental concentration</i> ), gemessene Umweltkonzentration
AOB	Ammonium oxidirende Bakterien	MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
APX	Ascorbat-Peroxidase	n.d.	(engl.: <i>not detectable</i> ), unter der Nachweisgrenze
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung	NOEC	(engl.: <i>no observed effect concentration</i> ), Höchste Konzentration ohne signifikante Wirkung
BSA	Serumalbumin	NPQ	nicht-photochemisches Quenching
CAT	(engl.: <i>catalase</i> ), Katalase	NWG	Niedersächsisches Wassergesetz
CBZ	Carbamazepin	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxid-Radikal
CBZ10,11-epoxid	10,11-Dihydro-10,11-epoxy CBZ	OD	optische Dichte
CBZ-diol	trans 10,11-dihydro-10,11 dihydroxy CBZ	OD <sub>850</sub>	optische Dichte bei 850 nm
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	OGewV	Oberflächengewässerverordnung
Cu/ZnSOD	Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase	PAM	Puls Amplituden Modulation
CYP	Cytochrom P450	PAR	(engl.: <i>photosynthetically active radiation</i> ), photosynthetisch aktive Strahlung
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure	PEC	(engl.: <i>predicted environmental concentration</i> ), vorhergesagte Umweltkonzentration
EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub>	(engl.: <i>half maximal effective concentration</i> ), mittlere Hemmkonzentration, die bei 50 % der Testorganismen das Wachstum hemmt	PNEC	(engl.: <i>predicted no effect concentration</i> ), vorhergesagte Konzentration ohne signifikante Wirkung
EG-WRRL	EG-Wasserrahmenrichtlinie	qE	(engl.: <i>energy-dependent quenching</i> ), Energie-abhängiges Quenching
ELISA	(engl.: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ), antikörperbasiertes Nachweisverfahren	qI	(engl.: <i>photoinhibitory quenching</i> ), Photoinhibitions-Quenching
ER	Endoplasmatisches Retikulum	qT	(engl.: <i>quenching associated with a state transition</i> ), Zustandübergangs-Quenching
ESI	Elektrospray-Ionisation	RCF	(engl.: <i>relative centrifugal force</i> ), relative Zentrifugalbeschleunigung
ETR	apparente Elektronentransportrate	ROS	(engl.: <i>reactive oxygen species</i> ), reaktive Sauerstoffspezies
FeSOD	Eisen-Superoxid-Dismutase	SOD	(engl.: <i>superoxide dismutase</i> ), Superoxid-Dismutase
F <sub>m</sub>	maximale Fluoreszenz (Dunkeladaption)	TBA	Thiobarbitursäure
F <sub>m</sub> '	maximale Fluoreszenz (Lichtadaption)	TCA	Trichloressigsäure
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
GABA	γ-Aminobuttersäure	TrinkwV	Trinkwasserverordnung
GOW	gesundheitlicher Orientierungswert	UQN/EQS	(engl.: <i>environmental quality standard (EQS)</i> , Umweltqualitätsnorm
GPX	Glutathion-Peroxidase	WHG	Wasserhaushaltsgesetz
GR	Glutathion-Reduktase	Y(II)	effektive PS II Quantenausbeute
GSH	Glutathion <sub>reduziert</sub>		
GSSG	Glutathion <sub>oxidiert</sub>		
GST	Glutathion S-Transferase		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid		
HPLC-MS/MS	(engl.: <i>high-performance liquid chromatography with mass spectrometry</i> ), Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit doppelter Massenspektrometrie-Kopplung		
I <sub>435</sub>	Phasenverteilungsindex		
LAWA	Länderarbeitsgemeinschaft Wasser		
LC <sub>50</sub>	(engl.: <i>half maximal lethal concentration</i> ), mittlere akute Letalkonzentration, die bei 50 % der Testorganismen zum Tod führt		

# 1 Einleitung

Jedes Jahr wird eine große Anzahl pharmazeutischer Wirkstoffe in biologisch aktiven Konzentrationen in die aquatische Umwelt eingetragen. Die Diskussion über mögliche Auswirkungen auf die Umwelt und die Qualität des Trinkwassers erregt zunehmend die Besorgnis der Öffentlichkeit. Dennoch ist der Eintrag pharmazeutischer Wirkstoffe in die Umwelt kein neues Problem. Heutzutage können diese Verbindungen jedoch aufgrund der stetigen Verbesserungen der Nachweisanalytik mit zunehmender Genauigkeit detektiert werden (Tchobanoglous *et al.* 2003; Contardo-Jara *et al.* 2011).

Arzneistoffe werden zur Beeinflussung spezifischer metabolischer und molekularer Stoffwechselwege in Menschen gezielt eingesetzt. Eingebracht in die Umwelt, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Stoffe - soweit die gleichen Stoffwechselwege vorhanden sind - in Tieren, Bakterien und weiteren Organismen ähnliche Ziele angreifen und Effekte bewirken (Fent 2013; Kümmerer 2003). Der Eintrag von Arzneistoffen in die Umwelt ist somit ein Risiko für die Artenvielfalt und Nahrungsketten des Ökosystems Oberflächengewässer.

Viele pharmazeutische Verbindungen sind biologisch schwer abbaubar, um ihr Ziel im menschlichen Körper zu erreichen. Das bewirkt aber auch, dass sie sowohl im Einstrom als auch im Abfluss der Kläranlagen mit nahezu gleichbleibend hohen Konzentrationen gemessen werden können. Die Reinigungskapazität konventioneller Anlagen ist diesbezüglich sehr gering. Ohne zusätzliche Reinigungsstufen in den Kläranlagen gelangen diese Verbindungen aufgrund ihrer geringen Abbauraten sowie Adsorptionsfähigkeit unverändert in den Vorfluter bzw. in die Umwelt.

Bislang wurde allerdings eine zufriedenstellende Lösung der Abwasserproblematik noch nicht gefunden, da weitergehende Reinigungsmethoden für die gezielte Eliminierung von Arzneistoffen entweder finanziell oder ökologisch nicht vertretbar oder technisch nicht mit den herkömmlichen Reinigungsstufen kombinierbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Carbamazepin (CBZ) exemplarisch als Modellsubstanz untersucht. Dieses Medikament sowie seine Abbauprodukte zeigen die kritischen Eigenschaften der Stoffklasse persistenter pharmazeutischer Verunreinigungen im Wasserkreislauf auf, wie zum Beispiel die geringe biologische Abbaubarkeit, photochemische Stabilität und die geringen Adsorptionseigenschaften an Biomasse.

CBZ-Konzentrationen wurden bereits in Oberflächengewässern, Grund- und Trinkwasser detektiert. In einigen Abschnitten der deutschen Oberflächengewässer wurden die für CBZ ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen (PNEC: 0,42 µg L<sup>-1</sup> CBZ; UQN-

Vorschlag: 0,5 µg L<sup>-1</sup> CBZ) bereits überschritten. Nach europäischer Richtlinie 2013/39/EU ergibt sich daher die Notwendigkeit, ein Konzept zur Verbesserung der Wasserqualität in Oberflächengewässern zu entwickeln.

Das Potential der Mikroalgen zur Metabolisierung von CBZ ist bislang nicht bekannt. Mikroalgen zeigen allerdings ein großes experimentell bewiesenes Potential der Metabolisierung komplexer toxischer Substanzen von Phenolen bis hin zu Schwermetallen (u.a. zusammengefasst in de-Bashan und Bashan (2010)). Zudem wurde bereits eine CBZ-Reduktion mit Mikroalgen aufgezeigt (Andreozzi *et al.* 2002). Ein Einsatz ausgewählter Mikroalgen als biologisches Reinigungssystem zur Entfernung des Antiepileptikums Carbamazepin ist erfolgsversprechend.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher erstmalig die Möglichkeit geprüft werden, Mikroalgen als ganzjährige biologische Filter in der CBZ-Bioremediation einzusetzen. Der Fokus lag hierbei auf den CBZ-induzierten physiologischen und biochemischen Effekten, den Zellantworten sowie der Kompartimentierung und biochemischen Umsetzung von CBZ.



## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Pharmazeutische Wirkstoffe

#### 2.1.1 Begriffsbestimmung

Die Begriffsbestimmung von Arzneimitteln ist im Arzneimittelgesetz (AMG) geregelt. Arzneimittel sind demnach beim Menschen oder Tier eingesetzte Stoffe, die der Heilung oder Linderung von Krankheiten dienen. Auch werden Stoffe, deren Wirkungen auf physiologische Funktionen abzielen oder deren Verabreichung der Erstellung medizinischer Diagnosen dient, der Gruppe der Arzneimittel zugeschrieben (AMG 2005). Allgemeine Wirkziele sind hierbei unter anderem Enzyme, Rezeptoren, Ionenkanäle und Transporter (Ashburner *et al.* 2000; Gunnarsson *et al.* 2008).

Arzneistoffe lassen sich nach ihrem Anwendungsbereich und ihrem pharmazeutischen Wirkstoff in verschiedene Gruppen einteilen. Die Hauptgruppen belaufen sich dabei auf Lipidsenker, Analgetika, Betablocker, Antiepileptika, Antibiotika und Röntgenkontrastmittel (Andreozzi *et al.* 2003; Bergmann *et al.* 2011).

Derzeit ist keine vollständige Datengrundlage zum weltweiten Arzneistoffverbrauch verfügbar. Vor dem Hintergrund, dass Patienten Arzneistoffe auf vielen Wegen erhalten, ist es schwierig, verlässliche Daten zu sammeln. Während der Verbrauch verschreibungspflichtiger Arzneistoffe dokumentiert ist, gestaltet sich eine Datensammlung zum Verbrauch frei zugänglicher Medikamente durchaus schwieriger (Zhang *et al.* 2008). Auch sind in Verbrauchsangaben häufig keine Krankenhausanwendungen berücksichtigt worden (Scheytt *et al.* 2005a). Noch schwieriger wird es durch verschiedene Markennamen, unter denen Medikamente verkauft werden können. Das Antiepileptikum **Carbamazepin** (CBZ) ist zum Beispiel unter vielen verschiedenen Namen auf dem Arzneistoffmarkt verfügbar: Biston, Calepsin, Carbatrol, Epitol, Equetro, Finlepsin, Sirtal, Stazepine, Tegretol, Telesmin, Timonil, etc. (Zhang *et al.* 2008).

Vom Umweltbundesamt wurden Verbrauchszahlen für einige Arzneistoffgruppen zusammengefasst (Bergmann *et al.* 2011). Im Jahr 2001 wurde für 2.671 zugelassene Wirkstoffe ein Verkauf von 37.915.499 kg dokumentiert. Die Zunahme zum Vorjahr betrug 16,4 %.

Zu den meistverkauften Arzneistoffgruppen gehörten im Jahr 2001 die Antirheumatika (633.125 kg), die Antibiotika (496.438 kg), die Antiepileptika (204.363 kg) und die  $\beta$ -Rezeptorenblocker (160.216 kg). Zwischen 2002 und 2009 sind die Verbrauchsmengen der Arzneistoffe um insgesamt 28 % gestiegen. Je nach Wirkstoffgruppe konnten sowohl

Zu- als auch deutliche Abnahmen verzeichnet werden. Allein für Antibiotika und Antiepileptika sind die Verbräuche noch einmal um 30 % bzw. 43 % gestiegen (Bergmann *et al.* 2011).

### 2.1.2 Eintrag in die aquatische Umwelt

Der Nachweis pharmazeutischer Wirkstoffe in der aquatischen Umwelt kann heutzutage aufgrund verbesserter Messtechniken und höherer Messgenauigkeit bei deutlich niedrigeren Konzentrationen erfolgen (Tchobanoglous *et al.* 2003; Contardo-Jara *et al.* 2011).

Problematisch ist jedoch die Vielzahl der im Wasser vorkommenden Verbindungen, die aufgrund des medizinischen und industriellen Bedarfs ständig weiter ansteigt. Allein in Deutschland wurden mehr als 156 verschiedene humanpharmazeutische Wirkstoffe in der Umwelt nachgewiesen (Bergmann *et al.* 2011).

Die Eintragspfade in die Umwelt sind sehr vielfältig. So können Humanarzneistoffe über den Produktions- und Entsorgungsweg, sowie über den Weg belasteter Abwasserströme mit pharmazeutischen Ausscheidungsprodukten in das Abwasser eingetragen werden (Aksu und Tunç 2005; LANUV 2007). Teilabwasserströme von z. B. Krankenhäusern oder Pflegeheimen können dabei sehr hoch belastet sein (Al-Ahmad *et al.* 1999; Kümmerer *et al.* 2000, Kümmerer 2003).

Nach Verabreichung werden Arzneimittel nur zu einem geringen Teil metabolisiert, so dass ein hoher Anteil gebildeter Metabolite und der unveränderten Ausgangsstoffe über Urin und Fäkalien ausgeschieden und in das Abwassersystem eingetragen werden (Ternes 1998, Zhang *et al.* 2008). Auch ist die falsche Entsorgung der Arzneimittel über die Toilette mitentscheidend für die erhöhten Konzentrationen im Abwasser (Daughton und Ternes 1999; LANUV 2007).

In das Abwassersystem eingetragen, unterliegen die pharmazeutischen Rückstände den Abbauprozessen in Kläranlagen. Hierbei entscheidet ausschließlich der Stand der Technik über den Reinigungsgrad von Arzneistoffen (LANUV 2007). Viele pharmazeutische Verbindungen sind biologisch nur schwer abbaubar, so dass sie sowohl im Einstrom als auch im Abfluss der Kläranlagen mit gleichbleibend hohen Konzentrationen gemessen werden können und deren Reinigungskapazität somit sehr gering ist. Ohne zusätzliche Reinigungsstufen in den Kläranlagen gelangen diese Verbindungen unverändert in den Vorfluter bzw. in die Umwelt (Kümmerer 2013a).

Die in die Oberflächengewässer eingetragenen Arzneistofffrachten korrelieren dabei stark mit den Verbrauchsmengen (Bergmann 2011). Aufgrund der unvollständigen Datengrundlage (Zhang *et al.* 2008), ist eine umfangreiche Bewertung der Belastungssitua-

tion oft nicht durchführbar. Stoffe, die aufgrund ihrer Persistenz und Mobilität im Grundwasser bzw. im Trinkwasser nachweisbar sind, werden als potentiell umweltrelevant eingestuft (EMEA 2006; Bergmann 2011). Eingebracht in das Ökosystem, besteht die Gefahr der Arzneistoffakkumulation im pflanzlichen Uferbereich sowie in aquatischen Organismen.

Neben Humanarzneistoffen sind auch Veterinärarzneistoffe in der Umwelt nachweisbar. Durch ihren Einsatz in der landwirtschaftlichen Tierproduktion gelangen sie über die Ausbringungen tierischer Ausscheidungen auf landwirtschaftliche Nutzflächen und können auf diesem Weg ebenfalls in die Oberflächengewässer sowie das Grundwasser eingetragen werden (LANUV 2007).

Das pflanzliche Potential Arzneistoffe aufzunehmen ist sehr hoch (Matamoros und Bayona 2006). Insgesamt ist die Datengrundlage zur Arzneistoffaufnahme in Nutzpflanzen noch gering (LANUV 2007). Einen zusammenfassenden Überblick bieten die Studien von Carvalho *et al.* (2014) und Zhang *et al.* (2014). Pflanzen agieren generell als wichtige Senke für viele umweltgefährdende Stoffe. In vielen Fällen sind sie zudem in der Lage Xenobiotika zu entgiften. Jedoch werden diese Stoffe oft nicht vollständig in Pflanzen abgebaut, sondern es werden Intermediate des Abbaus in Form unlöslicher Konjugate eingelagert (Sandermann 1992).

Auch ist die Bioakkumulation verschiedener Arzneistoffe in aquatischen Organismen bereits beschrieben (Vernouillet *et al.* 2010; Contardo-Jara *et al.* 2011). Man kann davon ausgehen, dass die Stoffaufnahme durch aquatische Organismen (z. B. Mikroalgen) ähnlichen Regeln folgt, wie sie für Höhere Pflanzen beschrieben wurden. Problematisch hierbei ist ein möglicher Eintrag in die Nahrungsketten von Mensch und Tier (LANUV 2007; Baron *et al.* 2014).

Eine detaillierte Übersicht über den Eintrag und Verbleib von Arzneistoffen in der Umwelt ist in Abbildung 2.1 gegeben.

Seit einigen Jahren ist das Interesse der Bevölkerung an dem Arzneistoffeintrag in die Umwelt und den damit verbundenen Gefahren für die Menschheit und das Ökosystem stark gestiegen (Kümmerer 2003; Khetan und Collins 2007). Die Kontamination der Umwelt ist keineswegs als lokales Problem zu sehen. Pharmazeutische Wirkstoffe wurden bereits weltweit in Abwasser-, Oberflächen-, Grund- und Trinkwasserproben detektiert (Suárez *et al.* 2005).

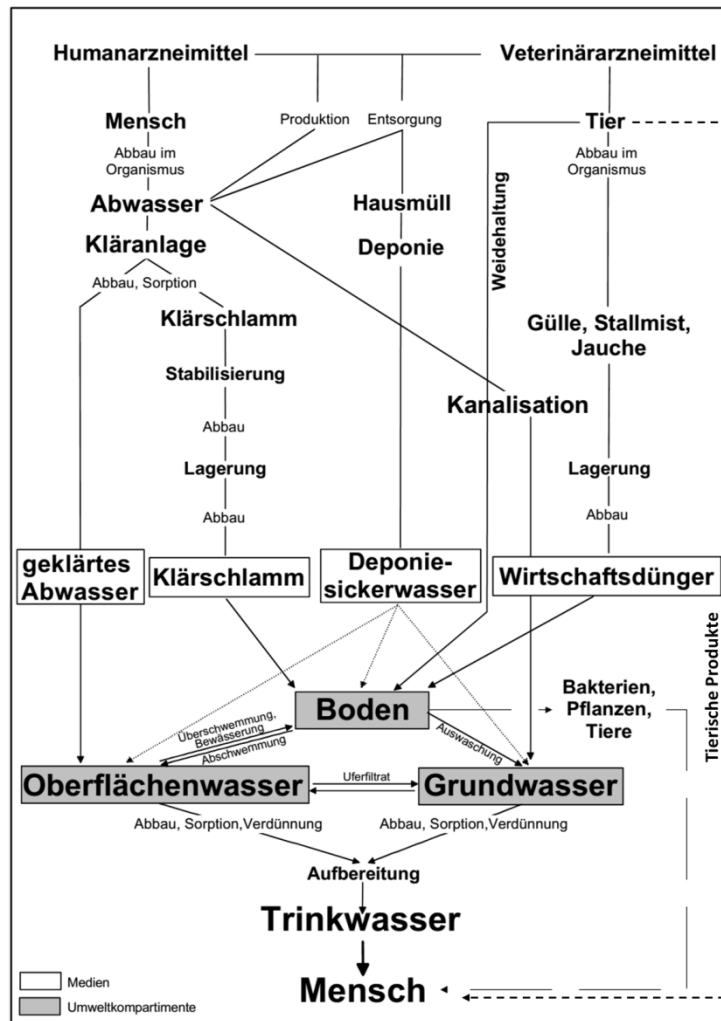


Abbildung 2.1: Eintrag und Verbleib der Arzneistoffe in der Umwelt (Bildnachweis: LANUV (2007) und ergänzt u.a. nach Baron *et al.* (2014))

### 2.1.3 Gefährdung der aquatischen Umwelt

In Deutschland sind ungefähr 2.700 Arzneiwirkstoffe in der Humanmedizin zugelassen. Die Beurteilung der potenziellen Umweltgefährdung dieser Wirkstoffe erfolgt nach den Kriterien Verkaufsmenge, Umweltkonzentration, Umweltwirkung und Umweltverhalten.

Studien zeigten, dass von insgesamt 29 Wirkstoffen aus der Humanmedizin eine potentielle Gefährdung der Umwelt ausgeht. Eine eindeutige Umweltrelevanz konnte wiederum bei sieben humanmedizinischen Wirkstoffen (Ciprofloxacin, Clarithromycin, Erythromycin, Sulfamethoxazol, Diclofenac, **Carbamazepin** und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol) aufgezeigt werden. Problematisch war die häufig fehlende Datengrundlage, so dass viele Stoffe nicht abschließend bewertet werden konnten (LANUV 2007). Leider sind die Wirkungsweisen vieler Arzneistoffe nicht abschließend bekannt, wodurch spezifische toxische Analysen erschwert werden (Fent 2013).

Arzneistoffe werden gezielt zur Regulation spezifischer metabolischer und molekularer Stoffwechselwege in Menschen eingesetzt. Beim Eintrag in die Umwelt ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Stoffe - soweit die gleichen Stoffwechselwege vorhanden sind - in Tieren, Bakterien und weiteren Organismen ähnliche Ziele angreifen und Effekte bewirken (Fent 2013; Kümmerer 2003).

Das Risiko aquatischer Organismen durch den Einfluss von Arzneistoffen beeinträchtigt zu werden, ist ausführlich bei Crane *et al.* (2006) zusammengefasst. Unter anderem wurde bereits der Einfluss von Estrogenen auf die aquatischen Organismen in einigen Studien untersucht. So zeigten *in vitro*-Versuche, dass bereits  $0,1 \text{ ng l}^{-1}$   $17\alpha$ -Ethinylestradiol (Purdom *et al.* 1994) und  $1 - 10 \text{ ng l}^{-1}$   $17\beta$ -Estradiol (Routledge *et al.* 1998) eine Feminisierung männlicher Fischarten bewirken können. Kidd *et al.* (2007) dokumentierten eine hohe Anzahl an Estrogenen und vergleichbaren Stoffe, die sich auf die Fortpflanzung von Fischen auswirken und einen Einfluss auf den Erhalt der Populationen haben können. Auch zeigten Schmidt *et al.* (2011) deutliche Stressantworten auf umweltrelevante Arzneistoffkonzentrationen in Organismen auf.

Neben akuten oder chronischen Effekten rufen viele Arzneistoffe, bedingt durch eine lange Lebensdauer und damit verbundener potentieller Akkumulationserscheinung, mikrobielle Resistenzen in Organismen hervor oder wirken sich lethal auf Organismen aus. Besonders gefährdet sind hierbei Organismen, die entscheidend für den Reinigungsprozess in Kläranlagen sind (Kümmerer 2001; Aksu und Tunç 2005). Wang und Gunsch (2011) dokumentierten einen hemmenden Effekt des getesteten Arzneistoffes Naproxon auf die Ammonium oxidierenden Bakterien (AOB). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass hemmende Effekte aufgrund von synergistischen Effekten mit anderen Arzneistoffen bereits unter dem jeweiligen NOEC-Wert (engl.: *no observed effect concentration*) erfolgen können. Auch kann der Arzneistoffeintrag zu einer Ausbildung resistenter Bakterienstämme führen, die ein deutliches Umweltrisiko darstellen. Resistente Bakterien wurden bereits in der aquatischen Umwelt (Kümmerer 2004; Watkinson *et al.* 2007; Kümmerer 2013), in Bodenproben (Schmitt und Römbke 2013) sowie im Trinkwasser (Armstrong *et al.* 1981) detektiert.

Unklar bleibt, welchen Einfluss die Exposition geringer bioaktiver Arzneistoffmengen über einen langen Zeitraum auf die Umwelt hat (Khetan und Collins 2007). Es ist allerdings zu erwarten, dass der kontinuierliche Eintrag von Arzneistoffen zukünftig zu einem Verschmutzungsgrad führen wird, der das ökologische Gleichgewicht zerstört (Aksu und Tunç 2005).

Weiterführende Konzepte zur Verbesserung der Wasserqualität und zur Reduzierung des Eintrages pharmazeutischer Substanzen gewinnen aufgrund der Umweltgefährdung immer mehr an Bedeutung (2013/39/EU). Strategien sollten hierbei sowohl auf das Vorsorgeprinzip (Früherkennung von Schadstoffen) sowie auf die Anwendung im Bedarfsfall beim Stoffnachweis in der aquatischen Umwelt abzielen (Bergmann 2011).

### 2.1.4 Gesetzesgrundlage

Die gemeinschaftliche Wasserpolitik wird über die EG-Wasserrahmenrichtlinie (EG-WRRRL, Richtlinie 2000/60/EG) geregelt, um einen einheitlichen Ordnungsrahmen für den Schutz der Gewässer zu schaffen. Das Hauptziel hierbei sollte das Erlangen eines guten chemischen und ökologischen Zustands aller Gewässer bis 2015, spätestens bis 2027 sein. Zum Erreichen der Umweltziele wurde die Richtlinie 2003 in das Wasserhaushaltsgesetz des Bundes (WHG) und 2004 in die Wassergesetze der Länder aufgenommen. Im Niedersächsischen Wassergesetz (NWG) sind die Bewirtschaftungsziele in §64 aufgezeigt (Leineverband 2006). Bewirtschaftungspläne und Erfolge in der Umsetzung der geforderten Maßnahmen sind für Teilbereiche der Leine in verschiedenen Berichten dokumentiert (Leineverband 2006; Leineverband 2007; Leineverband 2008; Leineverband 2009).

Die EG-WRRRL enthält eine Liste prioritärer Stoffe, die mit erheblichem Risiko für die aquatische Umwelt klassifiziert wurden. Die gesetzlich geregelte Überprüfung der Liste prioritärer Stoffe alle vier Jahre führte bereits zu novellierten Fassungen der Richtlinie (2008/105/EG; 2013/39/EU). Die Mitgliedstaaten sind nach diesen Richtlinien verpflichtet Umweltqualitätsnormen (UQN, engl.: *environmental quality standard*) für die prioritären Stoffe festzulegen. Die Ermittlung der UQN erfolgt über die rechtlich geregelten PNEC-Konzentrationen (engl.: *predicted no effect concentration*), die als Umweltkriterium zur Bewertung des Gefährdungspotentials herangezogen werden.

Die Messung prioritärer Stoffe dient hierbei der Beurteilung des chemischen Oberflächengewässerzustandes. Zudem müssen UQN-Angaben zu flussgebietspezifischen Schadstoffen gemacht werden, die der Überprüfung des guten ökologischen Oberflächengewässerzustandes dienen sollen. Die Umweltqualitätsnorm gibt dabei die Konzentration eines Stoffes an, die zum Schutz der Gesundheit und der Umwelt nicht überschritten werden darf (LAWA 2003; OGewV 2011). Auf nationaler Ebene werden die UQN u.a. in der Oberflächengewässerverordnung (OGewV 2011) und in der Musterverordnung der Länderarbeitsgemeinschaft (LAWA 2003) gesetzlich geregelt. Insgesamt wurden bislang 162 flussgebietspezifische Stoffe zur Überprüfung des guten Zustandes der Oberflächengewässer in die Regelwerke aufgenommen (Anlage 5, OGewV). Angaben zu priori-

tären Stoffen sind in Anlage 7 der OGewV dokumentiert. Eine überarbeitete Liste prioritärer Stoffe mit strengeren UQN sowie Ergänzungen neuer Stoffe sind in der Richtlinie 2013/39/EU zu finden. Insgesamt sind 45 prioritäre Stoffe aufgelistet.

In der Richtlinie 2013/39/EU wird zudem zum ersten Mal der Umgang mit pharmazeutischen Substanzen geregelt. So wurden bereits drei Stoffe mit erheblichem Risiko für die aquatische Umwelt in eine Beobachtungsliste aufgenommen (Diclofenac, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol und 17 $\beta$ -Estradiol). Für diese Stoffe lagen bislang keine Überwachungsdaten vor (BMLFUW 2015). Für alle drei Stoffe wurden allerdings bereits eindeutige Umweltrelevanzen bzw. negative Effekte auf aquatische Organismen aufgezeigt (LANUV 2007) (siehe Abschnitt 2.1.3).

Erstmalig sind auch strategische Ansätze gegen eine Gewässerverschmutzung durch pharmazeutische Substanzen sowie gegebenenfalls die Angabe geeigneter Maßnahmen gefordert (Umsetzungsfrist: 14.09.2017) (Europäische Kommission 2013).

## 2.2 Carbamazepin (CBZ)

### 2.2.1 Vorstellung von CBZ

Das Antiepileptikum Carbamazepin (CBZ) wird weltweit zur Behandlung von Epilepsie und psychischen Störungen, einschließlich Demenz, eingesetzt (Clara *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2008; Zhang und Geissen 2010).

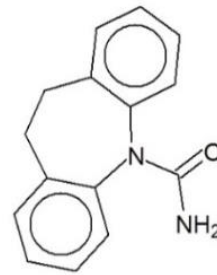


Abbildung 2.2: Carbamazepin-Strukturformel (Bildnachweis: SRC (2016))

CBZ ist ein hydrophiler Stoff mit einer Molekülgröße von 236,27 Dalton (Zhang *et al.* 2008; Carter *et al.* 2014; Li *et al.* 2015b). Die Strukturformel von CBZ ist in Abbildung 2.2 aufgezeigt.

Aufgrund der zu behandelnden Krankheitsbilder bedingt CBZ eine kontinuierliche Einnahme. Durch die Einstufung als persistente Verbindung identifizierten Clara *et al.* (2004) CBZ als anthropogenen Marker in der aquatischen Umwelt. Der Verbrauch lag im Jahre 2001 in Deutschland bei 87.605 kg CBZ (Rohweder 2003). In demselben Jahr entfielen 40 % der verschriebenen Antiepileptika auf CBZ (Matthias 2012). Weltweit liegt der geschätzte Verbrauch von CBZ bei 1.014.000 kg pro Jahr (Zhang *et al.* 2008).

### 2.2.2 CBZ-Metabolismus

Organismen sind befähigt toxische Verbindungen zum Schutz der eigenen Zellen zu metabolisieren. Toxische Verbindungen können hierbei zelleigene sekundäre Metabolite oder zellfremde Stoffe wie z. B. Xenobiotika sein.

Die Prozesse der Metabolisierung und Entgiftung chemischer Verbindungen in Säugtieren sind denen in Pflanzen sehr ähnlich. Sie lassen sich in drei Phasen einteilen (Sandermann 1992):

- Phase I: chemische Transformation
- Phase II: Konjugation
- Phase III: interne Kompartimentierung und Export

Der Metabolismus von CBZ erfolgt in der menschlichen Leber. In der **Phase I** werden an den chemischen Verbindungen durch funktionelle Gruppen (z. B. Hydroxyl- oder Carboxylgruppen) reaktionsfähige Stellen geschaffen (Coleman *et al.* 1997). Durch die chemische Transformation haben die Produkte oft bereits eine geringere Toxizität und eine höherer Hydrophilie als die Ausgangsverbindung. Katalysiert werden diese Prozesse u.a. von Cytochrom P450-Monooxygenasen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesam-



te Oxidaseaktivität des Cytochrom P450 (CYP)-Komplexes untersucht, und ist daher im Folgenden näher beschrieben.

Der CYP-Komplex ist eine Familie von Hämoproteinen mit fünf Liganden, die u. a. gebunden an der inneren Membran des glatten Endoplasmatischen Retikulums (ER) gefunden wurden (Coleman *et al.* 1997; Durst *et al.* 1997). Die Proteine benötigen eine CYP-Reduktase, die NADPH als Substrat zur Bereitstellung von Elektronen nutzt. Bei der Oxidation von Xenobiotika wird zudem Sauerstoff zu H<sub>2</sub>O reduziert (Schuler 1996) (Abbildung 2.3).

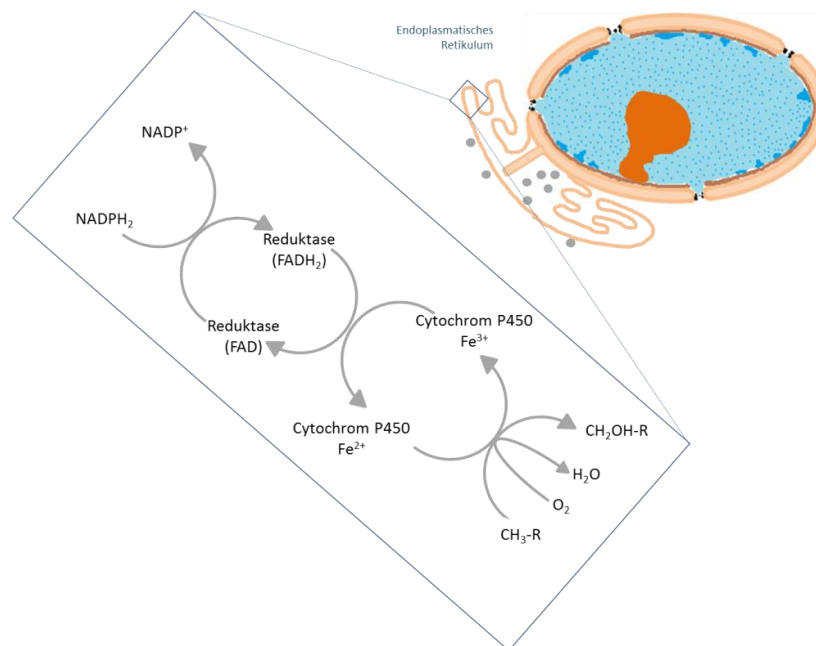


Abbildung 2.3: Allgemeine Metabolisierungsreaktion des CYP-Komplexes im glatten Endoplasmatischen Retikulum; Zeichnung angefertigt nach Spektrum (1999)

Die Angriffspunkte der chemischen Transformation können sehr unterschiedlich sein. Unter anderem ist die Doppelbindung am zentralen heterozyklischen Ring als Angriffspunkt im Molekül denkbar. Der Angriff führt somit zur Ringöffnung und zu einer Reihe von organischen Oxidationsprodukten (Hu *et al.* 2009). An der Bildung von CBZ-Metaboliten sind verschiedene Enzyme des CYP-Komplexes beteiligt. Hauptaktivität wird dem Enzym CYP3A4 zugeschrieben (Cytochrom P450, Familie 3, Unterfamilie A, Polypeptide 4) (Guengerich 2007). Weitere Enzymfamilien (CYP3A5, 2A6, 2B6, 2C19 etc.) sind ebenfalls beteiligt und zusammenfassend bei Thorn *et al.* (2011) aufgelistet. Für das katalytisch aktivste Enzym CYP3A4 sowie für CYP2C19 dient der Ausgangsstoff CBZ als Induktor (Schmitt 2011).

CBZ wird vom Menschen zu 29 % unverändert und zu 71 % in Form von Metaboliten ausgeschieden (Abbildung 2.4). Die Angaben beruhen auf mehreren Forschungsarbeiten, die bei Zhang *et al.* (2008) zusammengefasst sind. Insgesamt konnten bislang un-

gefähr 30 Metabolite von Carbamazepin in der Literatur beschrieben werden, die in der Phase I der CBZ-Metabolisierung gebildet werden.

Der Hauptabbauweg von CBZ beinhaltet die Oxidation zum aktiven 10,11-Dihydro-10,11-epoxy CBZ-Metabolit (CBZ 10,11-epoxid) und die anschließende Hydratisierung zum nicht mehr wirksamen trans 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy CBZ-Metabolit (CBZ-diol) (Bernus *et al.* 1995; Reith *et al.* 2000). CBZ-diol ist das Metabolit mit der höchsten detektierbaren Konzentration, da 30 % der zugeführten Carbamazepinmenge in Form von CBZ-diol ausgeschieden werden.

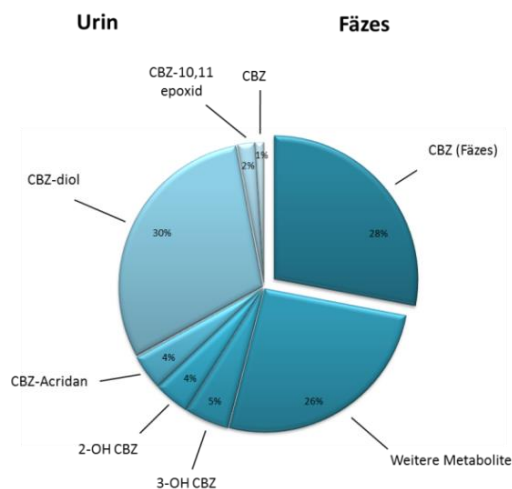


Abbildung 2.4: Ausscheidungsgrad des Carbamazepins als Ausgangsstoff sowie in Form von Metaboliten, zusammengefasst durch Zhang *et al.* (2008); Zeichnung angefertigt nach Zhang *et al.* (2008)

CBZ 10,11-epoxid ist das Hauptmetabolit während des Abbaus in der Leber (Kerr *et al.* 1994). CBZ 10,11-epoxid ist, wie der Ausgangsstoff, biologisch aktiv und steht im Verdacht neurotoxische Effekte zu bedingen (Bourgeois und Wad 1984; Zhang *et al.* 2008).

Weitere Metbolite sind 3-Hydroxy CBZ (3-OH CBZ) und 2-Hydroxy CBZ (2-OH CBZ), wobei 3-OH CBZ mit einem deutlich höheren Anteil gebildet wird. Beide fungieren als Vorstufe zur Komplexbildung mit Proteinen. Lu und Uetrecht (2008) dokumentierten „im Labor Menschen“ eine erhöhte Bildungsrate freier Radikale durch die Oxidation von 3-OH CBZ mittels Peroxidasen (Myeloperoxidase) im Vergleich zu 2-OH CBZ und CBZ als Ausgangssubstanz. Neben diesen Metaboliten werden zudem Acridin und Acridon gebildet, die, ähnlich wie CBZ 10,11-epoxid, eine hohe Toxizität aufweisen (Donner *et al.* 2013).

Die Aufnahme von CBZ in aquatische Organismen konnte bereits in mehreren Studien dokumentiert werden (Quinn *et al.* 2008; Lajeunesse *et al.* 2009; Vernouillet *et al.* 2010; Contardo-Jara *et al.* 2011). Zudem gibt es Hinweise, dass der CBZ-Metabolismus in Mikroalgen dem Entgiftungsprozess im Menschen sehr ähnlich ist (Vernouillet *et al.* 2010). Aufgrund der Ähnlichkeit der ablaufenden Entgiftungsprozesse gegenüber Säugetieren werden Pflanzen auch als „grüne Leber“ bezeichnet (Sandermann 2012). Enzyme des CYP-Komplexes konnten bereits in Pflanzen und Mikroalgen nachgewiesen werden (Schuler 1996; Vernouillet *et al.* 2010). Vernouillet *et al.* (2010) untersuchten in ihrer Studie die Aktivität des in Menschen beschriebenen Hauptenzym CYP3A4 in der

Mikroalge *Pseudokirchneriella subcapitata*. Da sie allerdings eine signifikante Aktivitätsabnahme gegenüber den Kontrollkulturen ohne CBZ dokumentieren konnten, ist es denkbar, dass weitere Enzyme des CYP-Komplexes an der CYP-Metabolisierung in Phase I in Mikroalgen beteiligt sind. Offenbar unterscheiden sich Organismen in ihrer Ausstattung mit Enzymen dieser Familie (Lin und Lu 1998), so dass es zur Bildung unterschiedlicher Metabolite kommen kann (DrugBank 2016). Weiterführende Untersuchungen zur Messung der gesamten Oxidaseaktivität des CYP-Komplexes untermauern diese These (Vernouillet *et al.* 2010). Unklar ist derzeit, wie viele der pflanzlichen CYP-Proteine einen signifikanten Beitrag zur Metabolisierung und Entgiftung von Xenobiotika leisten (Hatzios 1997b).

In der **Phase II** der Metabolisierung werden Intermediate des Stoffwechsels zur Konjugation der in der Phase I strukturell veränderten Xenobiotika verwendet. Falls die Xenobiotika bereits eine funktionelle Gruppe zur weiterführenden Metabolisierung aufweisen, kann der Abbau auch direkt mit Phase II beginnen bzw. Reaktionen der Phase II können neben Phase I-Reaktionen stattfinden (Coleman *et al.* 1997). Die für Säugetiere typische Entgiftung über Sulfatkonjugate konnte in Pflanzen bislang nicht identifiziert werden. Auch wurden Konjugate mit Glucuronsäure nur selten dokumentiert. In Pflanzen werden neben Glutathion (GSH) hauptsächlich Zucker (z. B. Glukose) und N-Acetylcystein zur Xenobiotika-Konjugation eingesetzt (Cole 1994; Schröder 1997; Blake-Kalff *et al.* 1997; Pearce *et al.* 2005).

In dieser Arbeit wurde die Aktivität des Enzyms Glutathion S-Transferase (GST) als Enzym der Phase II in der Metabolisierung von Xenobiotika gemessen, da die Konjugation mit GSH durch GST eine der wichtigsten und effektivsten Mechanismen der Entgiftung ist (Cole 1994; Schröder 1997; Blake-Kalff *et al.* 1997; Foyer *et al.* 1997). GST katalysiert eine nucleophile Substitutionsreaktion zwischen GSH und den funktionellen Gruppen des CBZ (C=O) [CBZ= (R-N-CO-NH<sub>2</sub>)] (McGonigle *et al.* 1997; Vernouillet *et al.* 2010). Die Konjugate unterscheiden sich daher chemisch von der Ausgangsverbindung (Blake-Kalff *et al.* 1997). Veränderungen sind in der Wasserlöslichkeit, Reaktivität, Kompartimentierbarkeit sowie den biologischen Eigenschaften messbar (Cole *et al.* 1997; Livingstone 2001). Gebildet werden die Glutathion-Konjugate hauptsächlich im Cytosol (Blake-Kalff *et al.* 1997).

Wichtige CBZ-Metabolisierungsschritte der Phase I und II sind in Abbildung 2.5 dargestellt.

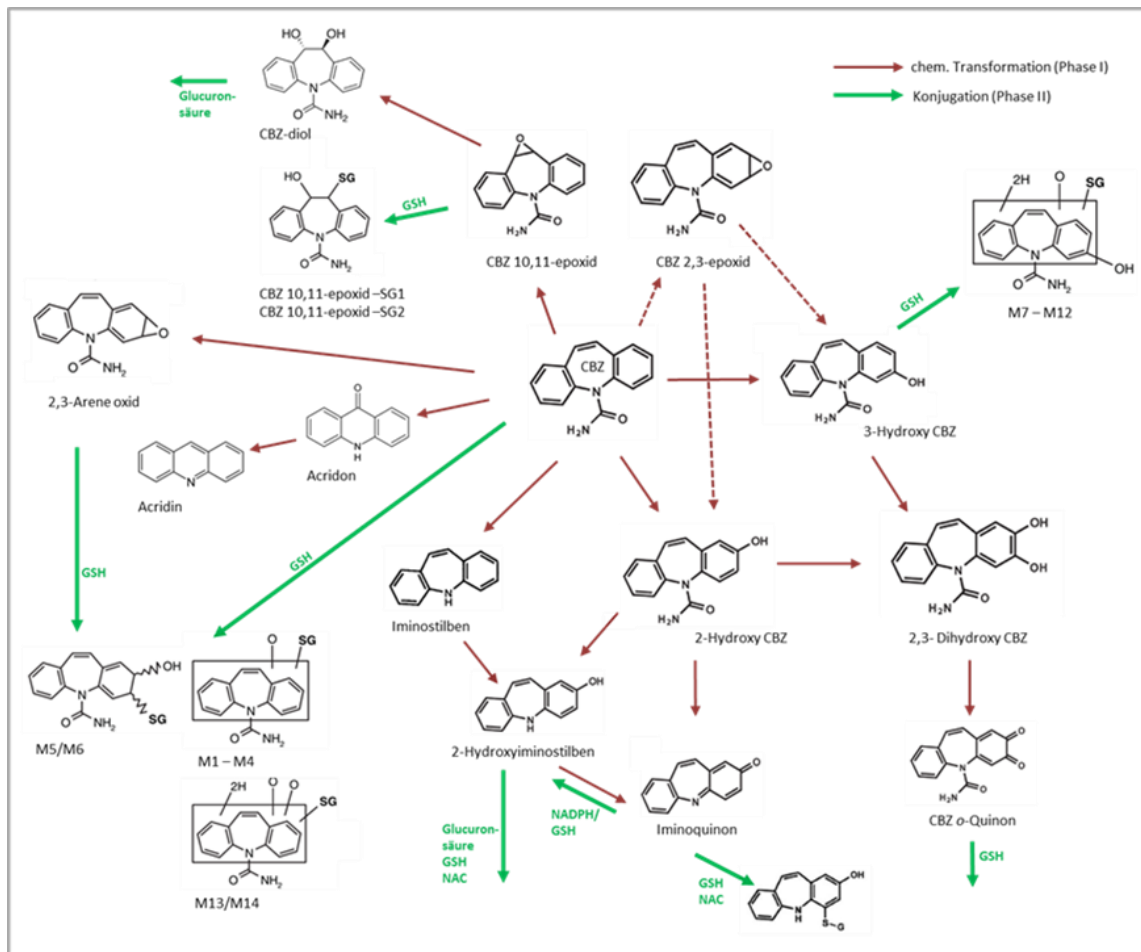


Abbildung 2.5: CBZ-Metabolismus (GSH: Glutathion, NAC: N-acetylcystein); Zeichnung angefertigt nach Kerr *et al.* (1994), Pearce *et al.* (2002), Pearce *et al.* (2005), Bu *et al.* (2007), Pearce *et al.* (2008) und Li *et al.* (2013b)

CBZ als Ausgangsstoff kann neben den Aktivierungswegen über Metabolite auch direkt konjugiert werden. Insgesamt wurden acht Glutathion-Addukte dokumentiert (M1-M6, M13/M14). Zwei Addukte (M5/M6) wurden zudem über den Aktivierungsweg mit dem Metabolit 2,3-Arene oxid nachgewiesen. Die Bildung von 2,3-Dihydroxy CBZ über die Umwandlung in CBZ  $\alpha$ -Quinon führt ebenfalls zu einem Konjugat mit Glutathion. Zudem sind sechs Glutathion-Addukte von 3-OH CBZ bekannt sowie der Aktivierungsweg über 2-OH CBZ zu 2-Hydroxyiminostilben und Iminoquinon, der ebenfalls u.a. zu Glutathion-Konjugaten führt. Weitere Glutathion-Konjugate entstehen über den Entgiftungsweg des Metabolits CBZ 10,11-epoxid zu CBZ 10,11-epoxid-SG1 und SG2.

Die Konjugation ist ein wichtiger Prozess, bei dem die toxische Wirkung der Verbindungen sehr stark oder sogar völlig aufgehoben wird (Coleman *et al.* 1997). Trotz reduzierter Toxizität ist eine Kompartimentierung dieser Konjugate in der **Phase III** aus dem Cytosol ein entscheidender Prozess in der Metabolisierung von Xenobiotika zur Reduzierung der biologischen Verfügbarkeit der Rückstände.

Im Gegensatz zu Säugetieren sind Pflanzen auf den Export in Vakuole und Apoplast angewiesen (Cole 1994; Coleman *et al.* 1997). Auch wurden bereits weiterführende Prozesse bis hin zur Volatilization in die Atmosphäre beschrieben (Schröder 1997). Die Prozesse der Kompartimentierung in Mikroalgen wurden bislang noch nicht umfangreich untersucht. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Prozesse denen in Höheren Pflanzen entsprechen (intrazelluläre Verlagerung in die Vakuole bzw. der Export aus den Zellen). Die Phase III der CBZ-Metabolisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Unterschiedliche Konjugationsprozesse der Phase II sind bekannt. Da im Rahmen dieser Arbeit die Konjugation mit Glutathion untersucht wird, stehen in diesem Abschnitt die intrazelluläre Kompartimentierung sowie Exportstrategien für GSH-Konjugate im Vordergrund.

In Pflanzenzellen wird hauptsächlich die Vakuole als Speichermedium verwendet (Schröder 1997). Die während der chemischen Transformation in der Phase I gebildeten funktionellen Gruppen sind für den weiteren Weg der Entgiftung entscheidend. Hierbei fungiert Malonsäure z. B. als Signal für den Transport in die Vakuole über einen spezifischen ATP-abhängigen Transporter (Mackenbrock *et al.* 1992), der strukturelle Ähnlichkeiten mit den Exportpumpen in der Säugetierleber für GSH-Konjugate aufweist (Martinoia *et al.* 1993). Daneben wurden weitere membrangebundene ATP-abhängige Transporter identifiziert, wie z. B. Anionen- und Glucosid-Transporter (Coleman *et al.* 1997; Hatzios 1997b). An die Vakuoleneinlagerung schließen sich weiterführende Abbauprozesse an (Coleman *et al.* 1997; Schröder 1997). So werden GSH-Konjugate innerhalb weniger Stunden nach ihrer Bildung zu Cystein-Konjugate und Glutamat metabolisiert (Lamoureux *et al.* 1991).

Gebildete Konjugate weisen häufig nur eine geringe Toxizität auf. Allerdings ist es möglich, dass in Abhängigkeit vom Konjugat Spaltungsprozesse erneut toxische Zwischenprodukte freisetzen (Sandermann 1994). Schröder *et al.* (2007) zeigten, dass bei der Spaltung von Glykosyl-Konjugaten reaktive Verbindungen entstehen können. Die Produkte, die bei der Spaltung von GSH-Konjugaten entstehen, haben in der Regel eine geringere Toxizität als die Ausgangsverbindung, da bei der Konjugation (Substitutionsreaktion) die funktionelle Gruppe der Verbindung entfernt wird. Allerdings kann es zur Bildung toxischer Zwischenprodukte kommen (Koob und Dekant 1991).

Während lösliche Konjugate bevorzugt in der Vakuole eingelagert werden, erfolgt die Entfernung unlöslicher Konjugate hauptsächlich durch Einbau in die Zellwand Höherer Pflanzen (Sandermann 1992). Während der Phase I der Entgiftung wird allerdings die Wasserlöslichkeit der Stoffe erhöht, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Einlagerung in

die Zellmembranen verringert wird. Auch wird hierdurch die biologische Halbwertszeit der Stoffe sowie die Fähigkeit in der Zelle bzw. Pflanze zu akkumulieren vermindert (Coleman *et al.* 1997).

Die Prozesse der internen Kompartimentierung verringern das Risiko einer cytosolischen Akkumulation der GSH-Konjugate, die zu einer Produkthemmung der Glutathion S-Transferase führen kann (Schröder 1997). Eine Kompartimentierung wirkt folgenden Eigenschaften entgegen: der geringen Stabilität der Konjugate, Hemmung der Enzyme der Glutathionbiosynthese (z. B.  $\gamma$ -Glutamyltransferase) sowie der Hemmung der Glutathion-Reduktase (Schröder 1997), die im Glutathion-Schutzsystem aktiv ist (siehe Abschnitt 2.3.2.3).

Neben der intrazellulären Kompartimentierung besitzen die Zellen auch Ausscheidungsstrategien für Glutathion-Konjugate in Form gebildeter Cystein-Konjugate oder N-Acetylcystein-Konjugate (Pritchard und James 1982).

### 2.2.3 Therapeutische Wirkung von CBZ

Die generelle Wirkung antiepileptischer Wirkstoffe bei Menschen beruht auf einer Reduzierung der Erregbarkeit der Nervenzellen durch Interaktionen mit spannungsabhängigen Ionenkanälen (Rogawski und Porter 1990; Porter und Rogawski 1992; Ambrosio *et al.* 2002) und mit Neurotransmittern in synaptischen Übertragungswegen (Rogawski und Porter 1990; Waldmeier *et al.* 1996).

Ionenkanäle können unter anderem von intrazellulären Botenstoffen, externen Reizen oder spannungsabhängig über das Membranpotential gesteuert werden. Spannungsabhängige Natriumkanäle sind hierbei das Hauptangriffsziel von CBZ (Ambrosio *et al.* 2002; Fent 2013). Natriumkanäle können in drei Zuständen vorliegen ((i) geschlossen und aktivierbar (ii) offen (Kanal lässt selektiv  $\text{Na}^+$  Ionen passieren) (iii) geschlossen und inaktiv (refraktär)) (Anonym 2015).

CBZ blockiert die Natriumkanäle in ihrer geschlossenen/inaktiven Konformation und verhindert die Rückwandlung in den geschlossenen/aktivierbaren Zustand. Die Refraktärzeit als Übergangszeit zwischen dem inaktiven und aktivierbaren Zustand wird verlängert (Courtney und Etter 1983; Tolou-Ghamari *et al.* 2013) und der  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle somit unterbrochen. Folglich ist die Depolarisation und die Reizweiterleitung verzögert und die Erregbarkeit in den Nervenzellen vermindert. Einige Wirkungen von CBZ werden mit der Vermutung erklärt, dass CBZ auf zwei weitere Ionenkanäle (Kalium- und Calciumkanäle) wirkt (Ambrosio *et al.* 2002).

Durch die Blockade der Ionenkanäle, bewirkt CBZ Veränderungen im Ionengleichgewicht, die wiederum zu Änderungen des Membranpotentials führen. Als Folge sind Auswirkungen auf Neurotransmitter (Botenstoff) in den Zellen messbar. So konnte bereits die Hemmung der Ausschüttung der Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Tolou-Ghamari *et al.* 2013) und Glutamat (Waldmeier *et al.* 1996; Ambrosio *et al.* 2001; Tolou-Ghamari *et al.* 2013) dokumentiert werden. Auch Adenosinrezeptoren, über die ebenfalls die neuronale Erregbarkeit gesteuert werden kann, können betroffen sein (Skerritt *et al.* 1983; Gasser *et al.* 1988; Rogawski und Porter 1990; Weir *et al.* 1990; van Calker *et al.* 1991; Tolou-Ghamari *et al.* 2013)

Die pharmakologische Wirkung von CBZ auf aquatische Organismen wurde bislang noch nicht vollständig untersucht. Ionenkanäle ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) als Angriffsziele von CBZ sind auch in Pflanzen bzw. Algenspezies beschrieben (Corratgé-Faillie *et al.* 2010; Hedrich 2012; Yamaguchi *et al.* 2013). Untersucht wurden dabei die Membranen der Kompartimente Chloroplast, Peroxisom, Mitochondrium, Vakuole sowie die Zellmembran (Blumwald *et al.* 1984; Gunter und Pfeiffer 1990; Katz *et al.* 1992; Wang *et al.* 1993; Jung *et al.* 1995; Blumwald *et al.* 2000; Bölter und Soll 2001; Grunau *et al.* 2009; Santo-Domingo und Demaurex 2010; Kronzucker und Britto 2011; Yamaguchi *et al.* 2013). Es ist denkbar, dass nach einer CBZ-Aufnahme auch die intrazellulären Ionenkanäle blockiert und somit in einzelnen Kompartimenten gezielte Wirkungen ausgelöst werden können. Aufgrund der Sequenz- und Strukturvergleiche pflanzlicher und tierischer Ionenkanäle kann erwartet werden, dass CBZ gleiche bzw. ähnliche Reaktionen und somit auch vergleichbare Wirkungsmechanismen in Algen auslöst. Die ersten Nachweise zur CBZ-Aufnahme bzw. -Akkumulation in Mikroalgen (*Pseudokirchneriella subcapitata*) wurden von Lajeunesse *et al.* (2009) und Vernouillet *et al.* (2010) durchgeführt.

#### 2.2.4 CBZ-Konzentration in der Umwelt

Bedingt durch die geringen Entfernungsraten für CBZ in kommunalen Kläranlagen können hohe CBZ-Konzentrationen im Abwasser gemessen werden. So dokumentierten Hummel *et al.* (2006) maximale CBZ-Konzentrationen im Einlauf der Kläranlagen von  $2.000 \text{ ng L}^{-1}$  und  $1.900 \text{ ng L}^{-1}$  im Auslauf der Kläranlagen. Durchschnittlich konstante CBZ-Konzentrationen mit  $700 \text{ ng L}^{-1}$  wurden auch im Zu- und Ablauf der Göttinger Kläranlage gemessen (Nödler *et al.* 2013). Maximale CBZ-Konzentrationen im Ablauf deutscher Kläranlagen lagen im Bereich von  $1.640 \text{ ng L}^{-1}$  (Nödler *et al.* 2013) bis  $6.300 \text{ ng L}^{-1}$  (Ternes 1998). In der Studie von Zhang *et al.* (2008) sind mittlere CBZ-Konzentrationen im Auslauf von Kläranlagen verschiedener Studien dargestellt. In den Kläranlagenausläufen lag die CBZ-Konzentration durchschnittlich bei  $3.000 \text{ ng L}^{-1}$ .

In deutschen Oberflächengewässern werden geringere Konzentrationen gemessen. Heberer *et al.* (2002) detektierten CBZ-Konzentrationen von 25 bis zu  $1.075 \text{ ng L}^{-1}$  im Oberflächenwasser in Berlin. Die maximale CBZ-Konzentration, ermittelt in Studien von Terneš (1998), lag bei  $1.100 \text{ ng L}^{-1}$ . Nödler *et al.* (2013) dokumentierten eine mittlere CBZ-Konzentration im Oberflächengewässer von  $58 \text{ ng L}^{-1}$ . Maximal wurden  $762 \text{ ng L}^{-1}$  gemessen. Zhang *et al.* (2008) dokumentierten eine über Deutschland gemittelte Konzentration von ungefähr  $500 \text{ ng L}^{-1}$  im Oberflächengewässer.

Untersuchungen ausgewählter Grundwasserproben ergaben in Halle an der Saale eine Kontamination von CBZ je nach Messstelle im zweistelligen  $\text{ng L}^{-1}$ -Bereich (Osenbrück *et al.* 2007). Sacher *et al.* (2001) dokumentierten sogar maximale CBZ-Konzentration von  $900 \text{ ng L}^{-1}$  in Grundwasserproben in Baden-Württemberg.

Auch im Trinkwasser konnten bereits Kontaminationen mit CBZ nachgewiesen werden. So dokumentierten Hummel *et al.* (2006) an drei deutschen Wasserwerken CBZ-Konzentrationen im Bereich von  $20 \text{ ng L}^{-1}$ . Auch konnte CBZ-diol mit  $13 \text{ ng L}^{-1}$  nachgewiesen werden. Die Wasserproben wurden vorab im Wasserwerk nicht mit Ozon, Aktivkohlefiltern, Nanofiltration oder Umkehrosmose vorbehandelt. Der gesundheitliche Orientierungswert (GOW) für CBZ im Trinkwasser beträgt  $0,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , der Vorsorgewert für die Trinkwasserhygiene liegt hingegen bei  $\leq 0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Bergmann 2011). Der GOW wurde als humantoxikologischer Vorsorgewert vom Umweltbundesamt eingeführt, um das Risiko neuer Stoffe im Trink- bzw. Rohwasser bewerten zu können, die bislang nicht in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) geregelt werden (UBA 2003).

Eine zusammenfassende Darstellung der Umweltkonzentrationen verschiedener Arzneistoffe ist in einer Datenbank des Umweltbundesamtes gegeben. Für CBZ wurden im Oberflächengewässer durchschnittliche Konzentrationen bis  $2.000 \text{ ng L}^{-1}$  gemessen. Maximale Konzentrationen lagen bei  $6.000 \text{ ng L}^{-1}$ . Im Grundwasser lagen die CBZ-Konzentrationen im Bereich bis  $1.000 \text{ ng L}^{-1}$ . Auch im Trinkwasser konnten Verunreinigungen mit CBZ nachgewiesen werden. CBZ wurde an 26 Messstellen in Deutschland mit Konzentrationen  $< 100 \text{ ng L}^{-1}$  detektiert (Bergmann *et al.* 2011).

Dass die Gewässerkontaminationen mit CBZ kein lokales Problem sind, zeigen internationale Studien. In Arizona und Südkalifornien wurde Carbamazepin bereits in wasserführenden Schichten und Grundwassermessstellen in Konzentrationen bis zu  $610 \text{ ng L}^{-1}$  nachgewiesen (Drewes *et al.* 2002). Auch in Südaustralien wurde für CBZ ein hoher Gefahrenquotient von 4,69 ermittelt (Ying *et al.* 2009). Die Berechnung des Gefahrenquotienten basierte in dieser Studie auf dem Verhältnis der höchsten gemessenen Konzentration MEC-Wert (engl.: *measured environmental concentration*) und dem PNEC-Wert.



Studien in Deutschland und Frankreich, zusammengefasst von Ferrari *et al.* (2003), dokumentieren Gefahrenquotienten von 47 bzw. 29,2. Hierbei wurde der PEC-Wert (engl.: *predicted environmental concentration*) als Grundlage zur Berechnung des Gefahrenquotienten verwendet. Somit ist von einer Gefährdung der aquatischen Organismen auszugehen (Ying *et al.* 2009). Die berechnete CBZ-Gefährdung ist jedoch ausschließlich in der beprobten Region gültig und nicht übertragbar.

#### 2.2.4.1 Gesetzesrahmen für CBZ in der aquatischen Umwelt

Die allgemeine Gesetzesgrundlage für Arzneistoffe wurde bereits in Abschnitt 2.1.4 erörtert. In diesem Abschnitt wird der Gesetzesrahmen explizit für CBZ beschrieben.

Die Überprüfung der Belastungssituation ausgewählter Oberflächengewässer erfolgt anhand der in der EG-WRRL geforderten Umweltqualitätsnormen (UQN). Für CBZ sind Umweltqualitätsnormen bislang sowohl auf nationaler als auch europäischer Ebene nicht gesetzlich geregelt (UBA 2015). Gemäß der Richtlinien 67/548/EEC und 1999/45/EC ist CBZ als „sehr giftig für Wasserorganismen“ eingestuft. Zudem kann CBZ in der aquatischen Umwelt längerfristig weitere schädliche Wirkungen haben. Gekennzeichnet ist diese Einstufung mit „R52/53“ (EDQM und Europarat 2013). Eine Gefährdung der Umwelt besteht (LANUV 2007) (siehe Abschnitt 2.1.3).

Dennoch wird CBZ nicht bei der Bewertung des chemischen Zustandes von Oberflächengewässern berücksichtigt (LAWA 2003). Bislang wurden ausschließlich UQN-Vorschläge für CBZ vom LAWA erarbeitet (NLWKN 2013; UBA 2015). Danach wird für CBZ ein UQN von  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  vorgeschlagen. Ermittelte PNEC-Konzentrationen in Oberflächengewässern liegen bei  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (PNEC) (Ferrari *et al.* 2003).

Die PNEC-Konzentrationen stellen dabei hauptsächlich eine Hilfsgröße für die Risikobewertung dar, während die UQN verbindliche Schwellenwerte sind, die nicht überschritten werden dürfen. Allerdings kann auch beim Überschreiten der PNEC-Konzentration davon ausgegangen werden, dass ein Erreichen der gesetzten Umweltziele nicht mehr gewährleistet werden kann (UBA 2012).

Der UQN-Vorschlag sowie der ermittelte PNEC-Grenzwert für CBZ liegen in einem gleichen Größenbereich. Allerdings ist auch der UQN-Vorschlag ohne Aufnahme in entsprechende Regelwerke nicht bindend.

#### 2.2.4.2 CBZ-Humantoxikologie

In einigen Abschnitten der deutschen Oberflächengewässer wurden die für CBZ ermittelten aquatischen Unbedenklichkeitskonzentrationen (PNEC:  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; UQN-

Vorschlag:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (Ferrari *et al.* 2003; NLWKN 2013)) bereits überschritten. Entsprechend der Einschätzung der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), muss daher langfristig mit einer Beeinträchtigung der aquatischen Umwelt gerechnet werden (Aksu und Tunç 2005).

CBZ hat somit ein hohes Potential sich negativ auf die ökologische Umwelt auszuwirken (Zhang *et al.* 2008). Allerdings ist eine Gefährdung des Menschen durch den Eintrag von CBZ in die aquatische Umwelt zunächst nicht zu erwarten. Die minimale therapeutische CBZ-Dosis liegt bei  $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Bruce *et al.* 2010; Shenker *et al.* 2011). Die tägliche CBZ-Dosis für einen erwachsenen Menschen mit einem Körpergewicht von 70 kg beträgt somit 70 mg CBZ. Geht man nun davon aus, dass die Oberflächengewässer durchschnittlich mit  $500 \text{ ng L}^{-1}$  belastet sind (Zhang *et al.* 2008), liegt zwar eine Gefährdung der aquatischen Organismen vor (CBZ-Konzentration > PNEC), allerdings müsste der erwachsene Mensch  $140 \text{ m}^3$  Oberflächenwasser zu sich nehmen, um die tägliche therapeutische Dosis zu überschreiten.

Eine Gefährdung durch den Verzehr belasteten Trinkwassers ist ebenfalls gering. Allerdings werden CBZ-Grenzwerte bislang nicht in der Trinkwasserverordnung geregelt. Dennoch sollte zum Schutz der Menschheit das Vorsorgeprinzip greifen, so dass trotz fehlender Regularien immer eine CBZ-Entfernung durchgeführt wird, die so hoch wie möglich ist (Ternes *et al.* 2002).

Eine humantoxikologische Gefährdung durch die Aufnahme arzneistoffbelasteter Nutzpflanzen ist eher unwahrscheinlich, da die bisher gemessenen Konzentrationen weit unterhalb des ADI (engl.: *acceptable daily intake*) liegen (Carter *et al.* 2014). Allerdings sollten bei Nutzpflanzen partielle Akkumulationserscheinungen innerhalb des Pflanzengewebes berücksichtigt werden (Wu *et al.* 2010; Shenker *et al.* 2011; Carter *et al.* 2014). Eine erhöhte CBZ-Akkumulation in reifen Pflanzen bzw. älteren Blättern wurde bereits unter umweltrelevanten CBZ-Konzentrationen ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dokumentiert. Hingegen wurden im Stängel und in den Wurzeln nur geringe Konzentrationen detektiert. In der Gefährdungsbeurteilung sollte der Fokus daher verstärkt auf die CBZ-Akkumulation in Nutzpflanzen gelegt werden, insbesondere wenn die essbaren Teile der Pflanzen erhöhte Akkumulationserscheinungen aufweisen (Shenker *et al.* 2011). Neben dieser „unerwünschten“ Bioakkumulation in Nutzpflanzen, wird im Abschnitt 2.2.5 die Möglichkeit des Einsatzes von Pflanzen als potentielle CBZ-Entfernungsmethode näher vorgestellt.

Untersuchungen synergistischer und additiver Effekte anderer Wirkstoffen sind häufig sehr komplex (Green 1997). Aufgrund fehlender Datengrundlage können diese Effekte nicht abgeschätzt werden und sollten daher kritisch gewertet werden. Vor dem Hinter-

grund, dass CBZ zwar in sehr geringen Konzentrationen detektiert wird, aber bereits den Weg in die Nahrungskette und das Trinkwasser gefunden hat, ist beim Verzehr belasteter Lebensmittel eine Wirkungssteigerung zu erwarten.

### 2.2.5 Methoden zur Entfernung von CBZ aus Abwasser

Die Notwendigkeit, Stoffeinträge in die aquatische Umwelt zu reduzieren, wurde bereits aufgezeigt (Bergmann 2011; Europäische Kommission 2013). Im Folgenden sind diesbezüglich etablierte bzw. getestete Techniken zur Arzneistoffentfernung im Zuge der Abwasserbehandlung zusammengefasst und auf ihr Einsatzpotential zur CBZ-Entfernung bewertet worden.

In den meisten Kläranlagen wird die bakterienbasierte Belebtschlammtechnik verwendet, die eine effektive Reinigung von Kohlenstoff und Stickstoff erzielt (Suárez *et al.* 2005). In diesen Prozessen unterliegt der Abbau von Arzneistoffen (i) den Prozessen der Biodegradation zu Wasser und Kohlendioxid, (ii) einer Schlammsorption und (iii) dem photochemischen Abbau (Zhang *et al.* 2008). Herkömmliche Kläranlagen sind allerdings nicht dafür ausgelegt persistente Verbindungen vollständig aus dem Abwasser zu entfernen (Stumpf *et al.* 1999; Ying *et al.* 2009).

Die Entfernungsrates von CBZ in Kläranlagen üblicher Bauart (mit Belebtschlammtechnik) ist sehr gering. Sie liegt zwischen 1 und 10 % (Ternes 1998; Heberer 2002; Suárez *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2008). Mehrere Studien berichten, dass durch den Behandlungsprozess die Metabolit-Konzentrationen im Wasser erhöht wurden. Ein unvollständiger Abbau von CBZ führte zu einer dreimal höheren Konzentration an CBZ-diol im Vergleich zu CBZ. Zudem konnte keine Entfernung der untersuchten Metabolite dokumentiert werden (Miao *et al.* 2005). Tran *et al.* (2009) konnten die CBZ-Entfernung im Belebtschlammverfahren durch den Einsatz nitrifizierender Bakterien verbessern. Es konnte eine Entfernung von 35 % erzielt werden. Dieses lässt darauf schließen, dass die Nitrifikation die Biotransformation von Carbamazepin verbessert (Tran *et al.* 2009).

Im Anschluss an die biologischen Reinigungsstufe der Kläranlagen können Adsorptionsprozesse an Belebtschlamm zur Entfernung umweltschädlicher Verbindungen beitragen (Jianlong *et al.* 2000). Belebtschlamm enthält zahlreiche Mikroorganismen, die aufgrund ihrer Zellwandstruktur erhöhte Adsorptionseigenschaften für organische Schmutzstoffe aufweisen (Aksu und Yener 1998). Weiterführende Reinigungsprozesse über Adsorption beinhalten z. B. den Einsatz von Aktivkohlefiltern. Aktivkohlefilter werden sehr oft eingesetzt und erzielen eine effektive Reinigungsleistung (Lièvrement *et al.* 1998; Ternes *et al.* 2002; Aksu und Tunç 2005;). Allerdings ist deren Einsatz aufgrund der notwendigen Regeneration mit hohen Kosten verbunden (Aksu und Yener 1998). Aufgrund der porösen

Struktur und der damit verbundenen hohen Oberfläche bietet Aktivkohle grundsätzlich gute Adsorptionseigenschaften für organische Moleküle (Aksu und Tunç 2005). Für die Entfernung von Arzneistoffen sind hingegen nur wenige Studien bekannt (Dutta *et al.* 1999; Aitcheson *et al.* 2000; Sotelo *et al.* 2002). Generell ist die Adsorption von Arzneistoffen in Anwesenheit von organischen Stoffen, die um die Bindungsstellen konkurrieren, limitiert (Ternes *et al.* 2002). Bioadsorption als Prozess der Bioremediation ist effektiv und eignet sich hervorragend als Alternative für herkömmliche Adsorptionsprozesse wie Aktivkohle (Benoit *et al.* 1998; Aksu und Yener 1998; Lièvremonet *et al.* 1998; Daughney und Fein 1998; Jianlong *et al.* 2000; Rao und Viraraghavan 2002; O'Mahony *et al.* 2002).

Algen und Bakterien sowie Hefen und Myzel bildende Pilze sind aufgrund ihrer speziellen Oberflächeneigenschaften in der Lage sowohl organische als auch anorganische Stoffe durch Adsorption zu entfernen. Bei der Bioadsorption kann sowohl lebende als auch tote Biomasse eingesetzt werden (Volesky 1987; Aksu und Tunç 2005). CBZ weist allerdings aufgrund seines hydrophilen Charakters nur äußerst geringe Adsorptionseigenschaften an Schlamm auf. Auch eine Verlängerung der Schlammretentionszeit und die damit verbundene Erhöhung der Artenvielfalt, bedingt durch eine Begünstigung langsam wachsender Bakterien, wirkt sich nicht positiv auf die Entfernung von CBZ aus (Zhang *et al.* 2008). Der überwiegende Teil des CBZ verbleibt in der Wasserphase (Miao *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2008).

Eine hohe CBZ-Entfernungsrate von 50 % durch Adsorptionsprozesse konnte von Paxéus (2004) dokumentiert werden. Als Ursache hierfür führte er den erhöhten Anteil an Silikonöl im Abwasser an, wodurch das Adsorptionsvermögen von CBZ an Schlamm erhöht wurde. Die Adsorption in Bodenpassagen ist ebenfalls nicht zur Aufbereitung von CBZ-haltigem Abwasser geeignet (Drewes *et al.* 2002; Ternes *et al.* 2002; Laws *et al.* 2011; Williams und McLain 2012).

Bioakkumulation als weiterer Prozess der Bioremediation dient der aktiven Aufnahme und Konzentrierung im Organismus (Volesky 1987). Diese Prozesse werden u.a. in Bodenfilteranlagen genutzt (Matamoros und Bayona 2006). Die Akkumulation von Arzneistoffen in Pflanzengewebe konnte bereits aufgezeigt werden (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Die Effektivität einer passiven Stoffaufnahme in die Pflanzen wird über den Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) beschrieben (Burken und Schnoor 1998). Verbindungen mit einem  $\log K_{ow}$  zwischen 0,5 und 3 werden verstärkt in die Pflanzen aufgenommen (Trapp und Karlson 2001). Das Aufnahmeoptimum bei Verbindungen liegt bei 1,8. Sehr polare Stoffe sowie stark lipophile Verbindungen ( $\log K_{ow} > 4,5$ ) werden deutlich schlechter aufgenommen (Briggs *et al.* 1982), da sie die Zellmemb-

ranen nicht passieren können. Zudem spielen die Konzentration und die Säurekonstante eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme in Pflanzen (Trapp 2003). Entsprechend der obigen Erwartungen korreliert die relativ hohe CBZ-Aufnahme in Pflanzen mit dem niedrigen  $\log K_{ow}$  (Scheytt *et al.* 2005b). Angaben zum Koeffizienten variieren in der Literatur zwischen 1,5 (Scheytt *et al.* 2005b) und 2,5 (Carter *et al.* 2014). Die CBZ-Aufnahme wird als passiver Prozess beschrieben (Shenker *et al.* 2011). Aufgrund des hydrophilen Charakters ist für CBZ ein Transportweg über integrale Membrankomponenten denkbar. Zwar sind die Prozesse der Arzneistoffakkumulation bei Nutzpflanzen als „unerwünscht“ einzustufen (siehe Abschnitt 2.2.4.2), dennoch bieten Pflanzen - unter kontrollierten Anbau- und Entsorgungsbedingungen - ein großes Potential zur Phytoremediation.

CBZ scheint photochemisch stabil mit einer Halbwertszeit von 121,6 h in doppelt destilliertem Wasser zu sein (Andreozzi *et al.* 2002). In Anwesenheit von Huminsäuren erhöhte sich die Halbwertszeit auf 233,7 h. Es ist anzunehmen, dass die Huminsäuren aufgrund eines ähnlichen UV-Absorptionsspektrum den photochemischen Abbau des CBZ verzögern (Andreozzi *et al.* 2002; Andreozzi *et al.* 2003). Auch  $O_2$  führte zu einem verringerten photochemischen Abbau (Calisto *et al.* 2011). Die Zugabe von steigenden Nitrat-Konzentrationen setzte hingegen die Halbwertszeit von CBZ auf 11,2 h herab (Andreozzi *et al.* 2002). Der photochemische Abbau unterliegt natürlichen und sensitivierten Prozessen. In Prozessen der natürlichen Photolyse erfolgt der CBZ-Abbau direkt über die Absorption von Photonen. In Prozessen der sensitivierten Photolyse beruht der Stoffabbau auf Wechselwirkungen mit reaktiven Sauerstoffspezies (Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), Hydroxyl-Radikal ( $\cdot OH$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) etc.) (Deng *et al.* 2013; Dong *et al.* 2015). In beiden Fällen ist die Entfernungskapazität von möglichen Störstoffen, vom pH-Wert sowie der Arzneistoffkonzentration abhängig. Mit Blick auf eine technische Anwendung ist zu bedenken, dass durch den Einsatz von Oxidantien zusätzliche Kosten entstehen (Deng *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015).

Weitergehende Abwasserbehandlungsprozesse wie z. B. Ozonbehandlung erreichen einen hohen Abbau auch bei persistenten Verbindungen (Ternes *et al.* 2002; Snyder *et al.* 2007; Senta *et al.* 2011). Bei der Behandlung mit Ozon werden die chemischen Strukturen so verändert, dass vermehrt polare Gruppen auftreten und sich die Wasserlöslichkeit der Metabolite erhöht (Ternes *et al.* 2002; Senta *et al.* 2011). Besonders im Fall von CBZ ist die Bildung von Metaboliten als kritisch zu bewerten, da Studien zeigten, dass einige Metabolite eine höhere Toxizität als CBZ aufweisen (Zhang *et al.* 2008; Calisto *et al.* 2011; Donner *et al.* 2013).

Weitere Methoden zur Entfernung von Arzneistoffen sind Filtrations- und Membrantechnologien, bei denen die Stoffe physikalisch abgetrennt werden (Vílchez *et al.* 1997; Ter-

nes *et al.* 2002; Reif *et al.* 2008; Beier *et al.* 2010; Röhricht *et al.* 2010; Tambosi *et al.* 2010; Senta *et al.* 2011; Heberer *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2015). Im Falle von CBZ ist die Entfernung mittels Filtrations- bzw. Membrantechnologien oft nicht effektiv genug (Röhricht *et al.* 2010). Durch Verknüpfung der Membrantechnologie mit Bioreaktoren können hingegen hohe CBZ-Entfernungen realisiert werden. Eingesetzt wurde Klärschlamm mit einem Feststoffanteil von  $10,5 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ , um die Entfernung von CBZ ( $750 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aus synthetischem Abwasser zu untersuchen. Durch den Einsatz von Membran-Bioreaktoren, die unter anoxischen Bedingungen im Labormaßstab betrieben wurden, konnten eine bakterienbasierte CBZ-Entfernung von 68 % erzielt werden (Gehalt an gelöstem Sauerstoff:  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ ). Dieses Ergebnis verschlechterte sich unter aeroben Bedingungen auf 12 % (Gehalt an gelöstem Sauerstoff:  $> 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ ) (Hai *et al.* 2011). Metabolit-Messungen wurden allerdings nicht durchgeführt, so dass keine Aussagen über toxische Zwischenprodukte getroffen werden können.

Der Einsatz von *Pseudomonas* sp. CBZ-4 in Schüttelkulturen erzielte in Laborversuchen einen Abbau von 46,6 %. Getestet wurden CBZ-Konzentrationen zwischen 10 und  $160 \text{ mg L}^{-1}$  (Li *et al.* 2013a). Unter den Bedingungen in der Studie von Popa Ungureanu *et al.* (2015) wurde durch Einsatz von *Streptomyces* MIUG 4.89 eine CBZ-Reduzierung von 30 % erzielt.

Das Potential zum Abbau von CBZ wurde ebenfalls für Pilze aufgezeigt. Der Einsatz des Pilzes *Trametes versicolor* erzielte eine Abbaurate von 43 %. Als Substrat diente getrockneter Klärschlamm (10 % Wassergehalt) mit einer CBZ-Konzentration von  $25,6 \text{ ng g}^{-1}$  (Rohschlamm) (Rodríguez-Rodríguez *et al.* 2011). Marco-Urrea *et al.* (2010) konnten unter Einsatz von *T. versicolor* und einer CBZ-Startkonzentration von  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine CBZ-Entfernung von 80 % beobachten. Andere Studien zeigten in diesem umweltrelevanten Konzentrationsbereich ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) eine Entfernrungsrate von 61 % auf. Höhere CBZ-Startkonzentrationen ( $9 \text{ mg L}^{-1}$  CBZ) führten zu höheren Entfernrungsraten von 94 %. Zusätzlich wurden in dieser Studie umweltrelevante Metabolite (Acridon, Acridin, CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol) nachgewiesen (Jelic *et al.* 2012). Weitere Studien zum Einsatz von Pilzen dokumentierten eine CBZ-Entfernung von 60 % bis 80 % mit dem Pilz *Phanerochaete chrysosporium* bei einer CBZ-Konzentration von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Zhang und Geissen 2012; Li *et al.* 2015b).

Beim Einsatz im Kläranlagenbetrieb muss allerdings beachtet werden, dass Pilze im Kläranlagenbetrieb einen negativen Einfluss auf die Sedimentbildung haben und zur Blähschlamm-Bildung führen können (Hu und Strom 1991; Matos *et al.* 2012).

Eine CBZ-Reduktion in Mikroalgen wurde von Andreozzi *et al.* (2002) untersucht. Sie dokumentierten eine Verringerung der CBZ-Konzentration in Flüssigkulturen der Mikroalge *Ankistrodesmus braunii* (CCAP 202-7a) um 50 %. Zelldefekte oder signifikante CBZ-Konzentrationen in der Algenbiomasse wurden nicht erkannt, so dass eine Metabolisierung vermutet wurde. In dieser Studie wurde allerdings ausschließlich die Ausgangssubstanz CBZ betrachtet, so dass keine Aussagen über Metabolitbildung oder Metabolisierungsgrad von CBZ getroffen werden können.

Das in Höheren Pflanzen entdeckte Konzept der "grüner Leber" (Sandermann 2012) konnte ansatzweise auch in Algen nachgewiesen werden. Metabolisierungsenzyme wie z. B. Cytochrom P450 wurden für verschiedene Algenspezies dokumentiert (Thies *et al.* 1996; Pflugmacher und Sandermann 1998). Auch Glutathion S-Transferasen konnte bereits nachgewiesen werden (Hiltonen *et al.* 1996; Tang *et al.* 1998).

Zusammenfassend lässt sich anhand der Übersicht möglicher Entfernungsmethoden für CBZ zeigen, dass biologische Methoden vor dem wirtschaftlichen und ökologischen Hintergrund ein hohes Einsatzpotential bieten.

## 2.3 Mikroalgen

### 2.3.1 Überblick

Der Begriff „Algen“ ist eine Bezeichnung für eine heterogene Gruppe, die Blaualgen bis hin zu Grünalgen beinhaltet. Bei Blaualgen handelt es sich um Cyanobakterien (Prokaryoten) (Radmer 1996). Cyanobakterien besitzen im Vergleich zu Eukaryoten keinen Zellkern, sind aber in der Lage Photosynthese zu betreiben. Grünalgen sind dagegen Eukaryoten wie die Höheren Pflanzen. Die phylogenetische Artenvielfalt ist bei Radmer (1996) detailliert aufgezeigt. Algen können in ungefähr 1.800 verschiedene Stämme mit 23.000 bis 30.000 Spezies unterteilt werden (Trevan und Mak 1988).

Algen leben hauptsächlich photoautotroph. Dennoch gibt es einige Algen, die für ihr Wachstum Zusatzstoffe, wie z. B. Vitamine benötigen (Trevan und Mak 1988). Genauso wie Pflanzen nutzen Algen die Sonnenenergie zum Aufbau von Biomasse, betreiben Photosynthese und Photorespiration und assimilieren anorganischen Stickstoff und Schwefel (Vílchez *et al.* 1997). Aufgrund ihrer Fähigkeit photosynthetischen Sauerstoff zu produzieren, werden Pflanzen auch als „grüne Lunge“ bezeichnet (Sandermann 1992). Allerdings ist die Photosyntheseleistung bei Mikroalgen effizienter als bei Landpflanzen. Während bei Algen der Großteil der Biomasse photosynthetisch aktiv ist, sind viele Teile der Pflanzen (Wurzeln, Stamm etc.) nicht an der Photosynthese beteiligt (Rooke *et al.* 2011). Generell werden mehr als 60 % des Kohlenstoffs in Süßwasserökosystemen durch Mikroalgen fixiert, wobei deren Anteil in Meeresökosystemen sogar bei über 90 % liegt (Mohapatra 2006).

Photosynthese ist der grundlegende Mechanismus für die Freisetzung von Sauerstoff aus Wasser und für den Aufbau organischen Materials. Es ist der wichtigste Prozess, bei dem Energie in einer für lebende Organismen verfügbaren Form gespeichert werden kann (Oswald *et al.* 1957). Durch Photosynthese werden jährlich  $10^{11}$  Tonnen Kohlenstoff und  $2 \cdot 10^{10}$  Tonnen Stickstoff fixiert (Vílchez *et al.* 1997). Phototrophe Organismen wie z. B. Diatomeen, Grünalgen und Cyanobakterien sind hauptsächlich an der Kohlenstofffixierung beteiligt und versorgen das System mit organischen Substraten und Sauerstoff (Roeselers *et al.* 2008).

Die strukturelle Vielfalt der Algen variiert von einzelligen (z. B. Chlorella), koloniebildenden (z. B. Volvox) bis hin zu vielzelligen Organismen (z. B. Laminaria) (Trevan und Mak 1988; Radmer 1996). Ökologisch gesehen können Algen verschiedene Plätze besiedeln, die vom Süß- bzw. Salzwasser bis hin zu Felsspalten reichen. Je nach Algenart kann auch die Metabolit- bzw. Produktbildung deutlich variieren (Radmer 1996; Moreno-



Garrido 2008). So können zum Beispiel Aminosäuren (Brown und Jeffrey 1995), Lipide (Elenkov *et al.* 1996), pharmazeutische Wirkstoffe (Radmer 1996), Pigmente (Harker *et al.* 1995), Polysaccharide (Lahaye und Ray 1996) oder Vitamine (Brown 1995) gewonnen werden.

Der Einsatz der Algen erfolgt in vielen verschiedenen biotechnologischen Prozessen, wie z. B. in der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie oder in der Reinigung von kommunalem und industriellem Abwässern (Noüe *et al.* 1990; Leenen *et al.* 1996; Mallick 2002; Soltmann 2010; Mahan und Holcombe 1992). Auch wird der Einsatz in Entsalzungsprozessen (El-Sayed und Abdel-Maguid 2010) und in der Biodieselproduktion (Lam und Lee 2012) erforscht.

Für den Anwendungsbereich der Entfernung von Kontaminationen sind in den Arbeiten von Moreno-Garrido (2008) und de-Bashan und Bashan (2010) Daten umfangreich zusammengefasst. Im Laufe der Jahre hat der Einsatz von Mikroalgen in der Bioremediation immer mehr an Bedeutung gewonnen. Der Einsatz von Mikroalgenspezies in der Bioremediation wurde erstmals von Oswald *et al.* (1957) empfohlen. Zahlreiche Forschungsarbeiten zeigen das Potential der Mikroalgen zur Abwasserreinigung aufgrund ihrer hohen Entfernungsraten für anorganische Verbindungen sowie Schadstoffe (z. B. Schwermetalle) auf (Chevalier und de la Nolle 1985; Proulx und de la Nove 1988; Robinson *et al.* 1989; Garbisu *et al.* 1991; Vilchez *et al.* 1997; Khattar *et al.* 1999; Semple *et al.* 1999; Perales-Vela *et al.* 2006; Moreno-Garrido 2008; de-Bashan und Bashan 2010; Zamani *et al.* 2012). Genutzt wird das Potential der Mikroalgen zur Abwasserreinigung bereits weltweit in Kläranlagen. Algenbasierte Kläranlagen findet man z. B. im Bundesstaat Alabama, USA (Algae Systems LLC, USA ; IHI Corp., Japan) (Kotrba 2015), im Bundesstaat Victoria, Australien (Algae Enterprises 2016), in Cambridge, Neuseeland (NIWA 2014), in Nordisrael (AQUANOS LTD., Israel) (Schuster und Phillips 2015), in Cádiz, Spanien (Aqualia, Spanien) (Buczynski 2013) und in Paris, Frankreich (OriginOil Inc., USA; Ennesys, Frankreich) (Casey 2013).

Im Gegensatz zu chemischen Methoden der weitergehenden Abwasserreinigung weist der Einsatz von Mikroalgen hohes Potential als kostengünstige und biologische Methode ohne zusätzliche Energiekosten aufgrund der Nutzung des reichlich vorhandenen Sonnenlichts auf. Zudem kann die Biomasse und gebildete sekundäre Metabolite in den meisten Fällen weiterverwendet werden (Vilchez *et al.* 1997). Mikroalgen wandeln die organischen Komponenten entweder direkt um, oder verbessern das Abbaupotential der mikrobiellen Gemeinschaft. Einige Algenspezies sind dazu befähigt direkt auf organischen Kohlenstoffquellen zu wachsen und diese zu verstoffwechseln. Als Beispiel ist *Ochromonas danica* zu nennen, die mit Phenol und p-Kresol als Kohlenstoffquelle

wächst (Semple 1997). Weiterhin konnten Mikroalgen mit hoher Mineralisierungskapazität für Pentachlorphenol identifiziert werden (Tikoo *et al.* 1997).

Aufgrund ihrer stark negativen Oberflächenladung haben Algen eine hohe Affinität für polyvalente Kationen, und sind daher in der Lage Metalle durch Ad- und Absorptionsprozesse aus Abwässern zu binden (Oswald 1988; de-Bashan und Bashan 2010).

Einige Schwermetalle wie z. B. Kupfer und Zink sind in kleinen Konzentrationen essentiell für das Algenwachstum, da sie als Co-Faktoren für verschiedene Enzyme fungieren (Cobbett und Goldsbrough 2002; de-Bashan und Bashan 2010). Allerdings wirken Schwermetalle in hohen Konzentrationen zelltoxisch (Cobbett und Goldsbrough 2002). Hohe Metall-Entfernungsraten sind für die Gattungen *Chlorella* und *Scenedesmus* dokumentiert (de-Bashan und Bashan 2010).

Zusätzlich spielen Algen eine wichtige Rolle in der Desinfektion von Abwässern. Durch pH-Wert Erhöhungen aufgrund der Metabolisierung von Bicarbonationen werden die Bedingungen für Bakterien und Krankheitserregern verschlechtert und die Keimzahl drastisch reduziert (Oswald 1988).

Nicht zuletzt ist die Funktion der Algen in der Selbstreinigung von Fließgewässern zu erwähnen, die zum Abbau von Schadstoffen beiträgt (Haase *et al.* 2015a). Die Selbstreinigung der Flüsse beruht auf photosynthetisch aktiven Organismen, dem Phytoplankton. Dieses umfasst eine Gruppe aus Grünalgen, Diatomeen, Cyanobakterien, Cryptophyceen und Dinoflagellaten (Mohapatra 2006). Grünalgen stellen den größten Anteil am Phytoplankton und leisten daher einen hohen Beitrag zur Selbstreinigungskapazität. Die Funktion der Algen in der Selbstreinigung von Fließgewässern wurde jedoch bisher kaum untersucht.

### 2.3.2 CBZ-Ökotoxikologie

#### 2.3.2.1 CBZ-Gefahrenabschätzung

Die Ermittlung der CBZ-Toxizität erfolgt über Risikoanalysen. Ökotoxikologische Risikoanalysen stellen die Grundlage für die UQN-Ermittlung dar und dienen somit der Gefahrenabschätzung für Kontaminationen, die in die Umwelt eingebracht werden (Schmidt *et al.* 2011).

Im Rahmen ökotoxikologischer Risikoanalysen werden Effekte ausgewählter Arzneistoffe auf aquatischen Organismen bestimmt. Unterschieden wird hierbei zwischen akuten Wirkungen in Kurzzeit- und chronischen Wirkungen in Langzeit-Studien. CBZ-Toxizitäten

wurden bereits an Bakterien, Algen, Krebstieren und Fischen untersucht (LANUV 2007; LfU 2013).

Die Bewertung des ökotoxikologischen Risikos eines Stoffes erfolgt über den Vergleich von Exposition und Wirkung anhand der bereits vorgestellten Parameter PEC und PNEC. Grundlagen für die PEC-Konzentrationen sind die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Stoffe (Cunningham *et al.* 2006). Der PNEC-Wert ist die entscheidende Größe in der Risikoanalyse (Bergmann 2011). Für die Berechnung werden die in Toxizitätstests ermittelten  $EC_{50}$ - (engl.: *half maximal effective concentration*),  $LC_{50}$ - (engl.: *half maximal lethal concentration*), NOEC- (engl.: *no observed effect concentration*) und LOEC-Konzentrationen (engl.: *lowest observed effect concentration*) verwendet (Ferrari *et al.* 2003; Ferrari *et al.* 2004). Ist das Verhältnis PEC/PNEC < 1, besteht kein Umweltrisiko. Ist der Verhältniswert hingegen  $\geq 1$  müssen Maßnahmen zur Risikominimierung getroffen werden (Cunningham *et al.* 2006). Detaillierte Angaben zum Ablauf einer Risikoanalyse sind bei Straub (2002), Koschorreck und Knecht (2004) und EMEA (2006) aufgezeigt.

In chronischen Toxizitätstests untersuchten Forscher NOEC-Konzentrationen für CBZ. Die Werte lagen für *Ceriodaphnia dubia* (Wasserfloh) bei  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (nach 7 Tage), für *Brachionus calyciflorus* (Rädertierchen) bei  $377 \mu\text{g L}^{-1}$  (nach 2 Tagen) und für *Danio rerio* (Zebrafisch) bei  $25 \text{mg L}^{-1}$  (Ferrari *et al.* 2003).

Die Konzentrationen, die in chronischen Toxizitätstestverfahren physiologische Effekte erzielen, liegen oft deutlich unter den Grenzwerten für akute Toxizitäten (Donner *et al.* 2013). Auch in der Studie von Ferrari *et al.* (2003) zeigte sich, dass physiologische Effekte in akuten Toxizitätstests erst bei deutlich höheren CBZ-Konzentrationen gemessen wurden. So dokumentierten sie für *C. dubia* eine akute Toxizität von  $EC_{50} = 77,7 \text{mg L}^{-1}$  CBZ, während eine chronische Toxizität bereits bei  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  beobachtet werden konnte (Ferrari *et al.* 2003). Jos *et al.* (2003) ermittelten in ihrer Studie keine akute Gefährdung der aquatischen Umwelt durch den Eintrag von CBZ. Aber auch sie konnten chronische und synergistische Effekte mit anderen Arzneistoffen nicht ausschließen.

Der Fokus standardisierter Toxizitätstests liegt auf einzelnen Arzneistoffen, wobei Arzneistoffe in der Umwelt überwiegend in Kombination mit anderen Verbindungen (Arzneistoffe, Metabolite, Schadstoffe) vorliegen (Escher *et al.* 2005). Da einige Wirkstoffgemische toxischer sind als die Addition der Wirkung einzelner Substanzen vermuten lässt, werden reale Effekte auf die Umwelt daher meistens unterschätzt (Khetan und Collins 2007).

Cleuvers (2003) testete in seiner Studie Kombinationseffekte von CBZ und Clofibrinsäure an aquatischen Organismen. Diese Effekte können auf einer Wirkungssteigerung beruhen aber auch eine unabhängige Wirkungsweise der Substanzen widerspiegeln. Während das Stoffgemisch CBZ und Clofibrinsäure bei Daphnien als Testorganismen eine höhere Wirkung erzielte als die einzelnen Komponenten, zeigte sich eine unabhängige Wirkungsweise beider Stoffe auf die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* (Cleuvers 2003). Die Datengrundlage zu anderen Wirkstoffgemischen mit CBZ ist jedoch noch gering und bedarf weitergehender Forschung. Vor diesem Hintergrund sollten besonders die im Wasser auftretenden Wirkstoffgemische auf ihre ökotoxikologischen Effekte untersucht werden (Cleuvers 2003).

Ein wichtiger Punkt in der Bewertung des Gefährdungspotentials von CBZ ist die Berücksichtigung gebildeter Metabolite. Unter den ersten Studien waren diejenigen von Miao und Metcalfe (2003) und Miao *et al.* (2005). Sie konnten CBZ-Metabolite sowohl im Auslauf von Kläranlagen als auch im Oberflächengewässer detektieren. Miao und Metcalfe (2003) dokumentierten eine CBZ-diol-Konzentration, die ungefähr 3-mal so hoch war wie die Konzentration der CBZ-Ausgangssubstanz.

Dass einige Metabolite von CBZ sogar als umweltgefährdender als die Ausgangsform eingestuft werden müssen, belegten Donner *et al.* (2013) in toxischen Gefahrenanalysen mit der Mikroalgen *Pseudokirchneriella subcapitata*. Während für CBZ-Toxizitätswerte von 27,4 mg L<sup>-1</sup> (NOEC) bzw. 40 mg L<sup>-1</sup> (LOEC) ermittelt wurden, zeigten die Metabolite CBZ-Acridin und CBZ-Acridon deutlich höhere Toxizitäten. Die akute Toxizität für CBZ-Acridin lag bei EC<sub>50</sub> = 0,61 mg L<sup>-1</sup>. Im Falle von CBZ-Acridon betrug die chronische Toxizität 0,69 mg L<sup>-1</sup> (NOEC) bzw. 1,09 mg L<sup>-1</sup> (LOEC).

Die Ergebnisse der Risikoanalysen sollten allerdings kritisch bewertet werden, da die in den Risikoanalysen verwendeten Versuchszeiträume häufig deutlich unter den realen Expositionszeiten in der Umwelt liegen. Bedingt durch einen kontinuierlichen Arzneistoffeintrag, sind aquatische Organismen häufig ihr ganzes Leben lang anthropogenen Stoffen ausgesetzt. Die beobachteten chronischen Effekte können sich daher deutlich von den ermittelten akuten Kurzeffekten unterscheiden. Dieses verdeutlicht die Notwendigkeit der Aufnahme von Langzeiteffekten durch den kontinuierlichen Eintrag geringer Arzneistoffkonzentrationen in Risikoanalysen (Boxall 2004).

Das Maß einer Arzneistofftoxizität wird im Vergleich der gemessenen Konzentrationen mit vorhandenen ökotoxikologischen Daten bewertet (Zhang *et al.* 2008). Vor dem Hintergrund der geringen Datengrundlage für chronische Toxizitäten, sowie Langzeittoxizitäten, ist eine Gefährdungsabschätzung schwierig.

Für CBZ ist bereits aufgrund der nachgewiesenen Konzentrationen in der Umwelt, der Wirkung auf Organismen und dem schlechten Abbauverhalten eine eindeutige Umweltrelevanz sowie Forschungsbedarf aufgezeigt (LANUV 2007).

### 2.3.2.2 CBZ-induzierter oxidativer Stress

Während eine humantoxikologische Gefährdung bislang nicht beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 2.2.4.2), besteht eine ökotoxikologische Gefährdung aufgrund des Potentials zur CBZ-Akkumulation in aquatischen Organismen (Lajeunesse *et al.* 2009; Vernouillet *et al.* 2010; Contardo-Jara *et al.* 2011).

Durch die Blockade der Ionenkanäle bewirkt CBZ Veränderungen im Ionengleichgewicht, wodurch Signalkaskaden ausgelöst werden, die wiederum Genexpressionen steuern können. So können gezielt stressspezifische Gene exprimiert werden, durch die es zu Veränderungen in der Protein- und Pigmentsynthese sowie in der Stoffregulation von Lipiden und Zucker kommen kann. Das Membranpotential entsteht durch die asymmetrische Ionenverteilung zwischen dem Zellinneren und -äußeren. Veränderungen im Membranpotential resultieren in Veränderungen der Ionendiffusion durch die Membran (Taiz und Zeiger 2007). Das Membranpotential ist eine entscheidende Kraft für den Transport von Stoffen. Die Abhängigkeit des Zuckertransports vom Membranpotential wurde von Komor und Tanner (1976) aufgezeigt. Ist die Proteinsynthese betroffen, sind Veränderungen direkt im Gehalt der Enzyme, Transportmoleküle, Rezeptoren oder Ionenkanäle messbar (Williams und Cook 2007). Es ist außerdem wahrscheinlich, dass CBZ ähnlich auf die pflanzlichen Glutamat-Rezeptoren wirkt, wie für den menschlichen Organismus beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.3) (Davenport 2002; Price *et al.* 2012; Tapken *et al.* 2013; Forde und Roberts 2014).

Das Membranpotential kann durch Veränderungen zudem Einfluss auf den pH-Wert im Cytosol nehmen, wodurch sich die optimalen Bedingungen intrazellulärer Enzymaktivität verändern. So kann es zu Hemmungen oder Aktivierungen von Enzymen kommen, die in den einzelnen Kompartimenten sowie im Cytosol Prozesse steuern (Arunakumara und Zhang 2008). Welche Enzyme in welcher Form betroffen sind, ist bislang nicht bekannt. Über Veränderungen der Enzymaktivitäten erhält man erste Hinweise über die intrazelluläre CBZ-Wirkung bzw. mögliche CBZ-Metabolisierungswege. Generell kann gesagt werden, dass alle Kompartimente auf enzymatischer Ebene betroffen sind. In Abbildung 2.6 ist ein mögliches Wirkungsszenario anhand der gesammelten Informationen (siehe Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3) vereinfacht dargestellt.



führen hingegen zur Oxidation von Protein, Lipiden und Nukleinsäuren (Ivanov und Khorobrykh 2003), und daraus folgend zur Schädigung der Zellen.

Unter normalen Bedingungen besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der ROS-Bildung und -Entgiftung (Sharma *et al.* 2012). Potentielle Angriffspunkte der ROS in den Zellen sind unter anderem die Pigmente (Chlorophyll a, b; Carotinoide) und Fettsäuren. Die Höhe der ROS-Produktion wird in aquatischen Organismen stark durch Stoffe wie Xenobiotika beeinflusst (Livingstone 2001). Kann das Gleichgewicht zwischen der ROS-Entstehung und -Entgiftung nicht mehr gehalten werden, kommt es zu zellschädigenden Prozessen, die unter dem Begriff „oxidativer Stress“ zusammengefasst werden (Turrens 2003). In der Studie von Tsiaka *et al.* (2013) zeigte sich, dass das Antiepileptikum CBZ dieses Gleichgewicht zwischen der ROS-Bildung und -Entgiftung stört und in der Lage ist, oxidativen Stress in Algen auszulösen.

In Abbildung 2.7 bis Abbildung 2.9 sind die Entstehungswege einiger Radikale ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  und  $\cdot OH$ ) für die Kompartimente Chloroplast, Peroxisom und Mitochondrium beschrieben.

Unabhängig vom Kompartiment spielen die Elektronentransportketten eine wichtige Rolle in der Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  (Mehler Reaktion) (Arora *et al.* 2002; Turrens 2003; Blokhina und Fagerstedt 2010; Sharma *et al.* 2012; del Río *et al.* 2006). Zudem ist die Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  während des Purin-Stoffwechsels (Werner und Witte 2011; Halliwell und Gutteridge 2015) und bei Abbauprozessen schwefelhaltiger Verbindungen beschrieben (Schindelin *et al.* 2001; Hänsch *et al.* 2007; Byrne *et al.* 2009). Als weiteren  $O_2^{\cdot-}$ -Entstehungsweg sind die Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus zu nennen. Fehlt das Substrat zur Ascorbatregeneration, reduziert das entsprechende Enzym Monodehydroascorbat-Reduktase (MDAR)  $O_2$  zu  $O_2^{\cdot-}$  (Miyake *et al.* 1998). Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus ist im folgenden Abschnitt zur ROS-Entgiftung beschrieben.

$O_2^{\cdot-}$  hat nur eine kurze Halbwertszeit, und wird enzymatisch (Superoxid-Dismutase (SOD)) oder nicht enzymatisch bzw. spontan in  $H_2O_2$  und  $O_2$  umgewandelt (Guidot *et al.* 1995; López-Huertas *et al.* 1999; Andreyev *et al.* 2005; del Río *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2012; Gallie 2013). Als Hauptquelle der  $H_2O_2$ -Bildung wird das Peroxisom beschrieben (Sharma *et al.* 2012). Als weiterer Bildungswege von  $H_2O_2$  sind die  $\beta$ -Oxidation und Photorespiration beschrieben (Yamaguchi *et al.* 1995). So zeigten Studien von Foyer und Noctor (2003) während der Photorespiration im Peroxisom eine im Vergleich zum Chloroplasten 2,5-fach erhöhte  $H_2O_2$ -Bildungsrate sowie eine 50-fach erhöhte  $H_2O_2$ -Bildung im Vergleich zum Mitochondrium auf. Als weiterer Entstehungsweg wird der Purin Stoffwechsel beim Abbau von Urat zu Allantoin genannt (Werner und Witte 2011). Bedingt

der Tatsache, dass  $O_2^{\cdot-}$  Radikale schnell in  $H_2O_2$  umgewandelt werden, kann ein Anstieg in der  $H_2O_2$ -Konzentration somit als Ergebnis stressiger Situationen gewertet werden (del Río *et al.* 1996).

Hydroxylradikale ( $\cdot OH$ ) ist ein weiteres, reaktives Sauerstoff-Metabolit, welches durch die katalytische Wirkung von zweiwertigen Metallionen (Fenton Reaktion) oder als Endprodukt der gemeinsamen Redoxreaktion von  $H_2O_2$  und  $O_2^{\cdot-}$  (Haber-Weiss Reaktion) entsteht (Sharma *et al.* 2012).

### 2.3.2.3 Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress

Ein erhöhter Gehalt an ROS kann durch eine verstärkte Aktivierung antioxidativer Schutzmechanismen reguliert werden (Gill und Tuteja 2010). Pflanzen und Algen haben zur Entgiftung der ROS sowohl enzymatische als auch nicht enzymatische Strategien (Foyer und Noctor 2009). Das antioxidative Schutzsystem ist besonders in den Chloroplasten sehr aktiv. Viele Pigmente (z. B. Carotinoide und Xanthophylle) sind als nicht-enzymatisches Schutzsystem beschrieben. Carotinoide haben eine wichtige Rolle im Wachstum und Überleben der Zellen (Tsiaka *et al.* 2013). Auch Vitamin E, Ascorbat und GSH sind bei der Entgiftung von ROS beteiligt (Halliwell 1987). Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten antioxidativen Schutzstrategien über Glutathion, Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (CAT) beschrieben.

GSH hat verschiedene Funktionen im Erhalt der Redoxstabilität, in der Regulierung der stressinduzierten Genexpression, als Signalmolekül sowie in der Entgiftung von Schadstoffen und ROS (Gill und Tuteja 2010). In pflanzlichen Zellen liegt Glutathion hauptsächlich in der reduzierten Form (GSH) vor. Neben gebildeten Zwischenprodukten ist auch ein geringer Anteil der oxidierten Form (GSSG) messbar.

Die Funktion des Glutathions in der **Entgiftung von Schadstoffen** (z. B. CBZ) liegt in der Bildung von GSH-Konjugaten begründet. Die GST-katalysierte Bildung von GSH-Konjugaten wurde bereits in Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Es ist zudem beschrieben, dass GSH-Konjugate auch nicht-enzymatisch gebildet werden können. Allerdings ist die Effizienz dieser Reaktion im Vergleich zur enzymatischen Konjugation mit GST deutlich vermindert (Schröder 1997).

Das **Glutathion-Schutzsystem** zur ROS-Entgiftung ist im Chloroplast, Peroxisom, Mitochondrium sowie im Cytosol beschrieben. Beim Elektronenübertrag auf ROS werden zwei GSH-Moleküle oxidiert, die sich über eine Disulfidbrücke zu einem Dimer verbinden (GSSG). In Stresssituationen kann es durch erhöhte ROS-Entgiftung zu einer Anreicherung von GSSG und weiteren Zwischenprodukten kommen. Es ist aber auch eine ver-



stärkte GSH-Synthese als antioxidatives Schutzsystem denkbar (Foyer *et al.* 1997). Die GSH-Regeneration erfolgt über die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase (GR). Das Enzym GR liegt im Chloroplasten in einer hohen Konzentration vor. So konnten Edwards *et al.* (1990) zeigen, dass durchschnittlich 67 % der GR-Aktivität auf die chloroplastidäre Isoform zurückzuführen ist. Eine GR-Aktivität wurde zudem im Mitochondrium ( $\bar{X} = 2,5 \%$ ) und im Cytosol ( $\bar{X} = 31 \%$ ) gemessen. Auch in Peroxisomen konnte eine geringe GR-Aktivität nachgewiesen werden.

Als Hauptwege der ROS-Entgiftung über Glutathion sind der Ascorbat-abhängige und Ascorbat-unabhängige Schutzmechanismus beschrieben.

(i) Ascorbat-abhängige Schutzmechanismus

Im Ascorbat-Glutathion-Zyklus wird GSH als Reduktionsäquivalent für die Aufrechterhaltung des Ascorbatpools genutzt. GSSG entsteht als Entgiftungsprodukt.

Das Enzym Ascorbat-Peroxidase (APX) nutzt zwei Moleküle Ascorbat, um  $H_2O_2$  zu Wasser zu entgiften. Dabei entstehen zwei Moleküle Monodehydroascorbat (MDHA). MDHA ist ein Radikal mit einer kurzen Halbwertszeit, und kann entweder spontan in Dehydroascorbat (DHA) und Ascorbat umgewandelt werden, oder enzymatisch zu Ascorbat über die NADPH-abhängige MDAR reduziert werden (Ushimaru *et al.* 1997). Das im Ascorbat-Glutathion-Zyklus gebildete DHA ist ebenfalls sehr instabil, und kann schnell in andere Metabolite zerfallen (Washko *et al.* 1992). Zur Aufrechterhaltung des Ascorbatpools wird DHA daher schnell zu Ascorbat reduziert. Diese Reaktion wird von dem Enzym Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR) mit GSH als Reduktionsäquivalent katalysiert (Ushimaru *et al.* 1997; Gallie 2013). Zusätzlich liegen im Cytosol zwei Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus (APX und MDAR) in gebundener Form in der Peroxisomenmembran vor.

(ii) Ascorbat-unabhängige Schutzmechanismus

Glutathion ist auch in einem Ascorbat-unabhängigen antioxidativen Schutzmechanismus beteiligt. Über diesen Glutathion-Entgiftungsweg katalysiert das Enzym Glutathion-Peroxidase (GPX) unter Nutzung von GSH die Reduzierung von  $H_2O_2$  zu  $H_2O$ . Auch entsteht GSSG als ROS-Entgiftungsprodukt, das zu GSH reduziert wird. Beschrieben ist dieser Weg für Mitochondrien (Andreyev *et al.* 2005) und Vakuolen (Asada 1992).

Als **enzymatisches Schutzsystem** sind die Funktionen der Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (CAT) einzuordnen. Die Entgiftung des Superoxid-Radikals  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$  wird durch die **SOD** katalysiert. Im Stroma der Chloroplasten sind an der enzymatischen Umwandlung zwei Isoformen der SOD beteiligt, Eisen-SOD (FeSOD) und Kupfer-

fer/Zink-SOD (Cu/ZnSOD) (Sharma *et al.* 2012). Unterschieden werden die Isoformen anhand der Metallionen im katalytischen Zentrum sowie anhand der Größe des Zentrums (Schmidt 2007b). Im Mitochondrium findet die Umwandlung zu  $H_2O_2$  über die Mangan-SOD Isoform (MnSOD) statt, die ausschließlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (Andreyev *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2012). Eine weitere Isoform, Cu/ZnSOD, ist für die Umwandlung im Intermembranraum zuständig.

An der Entgiftung des gebildeten  $H_2O_2$  zu Wasser und  $O_2$  sind unter anderem die Enzyme APX, GPX sowie **CAT** beteiligt (Gallie 2013). CAT ist das einzige Enzym, das keine reduzierende Äquivalente zur Umsetzung von  $H_2O_2$  benötigt, allerdings spielt es im Entgiftungskomplex des Chloroplastens eine untergeordnete Rolle, da das Enzym eine geringere Substrataffinität für  $H_2O_2$  aufweist als die APX (Sharma *et al.* 2012). Eine erhöhte CAT-Aktivität konnte bislang hauptsächlich in den Peroxisomen nachgewiesen werden (Hänsch *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2012). 10-25 % des peroxisomalen Proteins kann dem Enzym CAT zugerechnet werden (Tolbert 1980). Entsprechend der hohen Konzentration an CAT, weist das Enzym eine sehr hohe Aktivität in den Peroxisomen auf. Hierbei wird  $H_2O_2$  während der Glykolatoxidation als Substrat bereitgestellt (Huang *et al.* 1983). Daher wird CAT häufig auch als Indikatorenzym für Peroxisomen gewertet (Frederick *et al.* 1973).

Im Folgenden sind die beschriebenen ROS-Entstehungs- und Entgiftungswege für ausgewählte Kompartimente dargestellt.

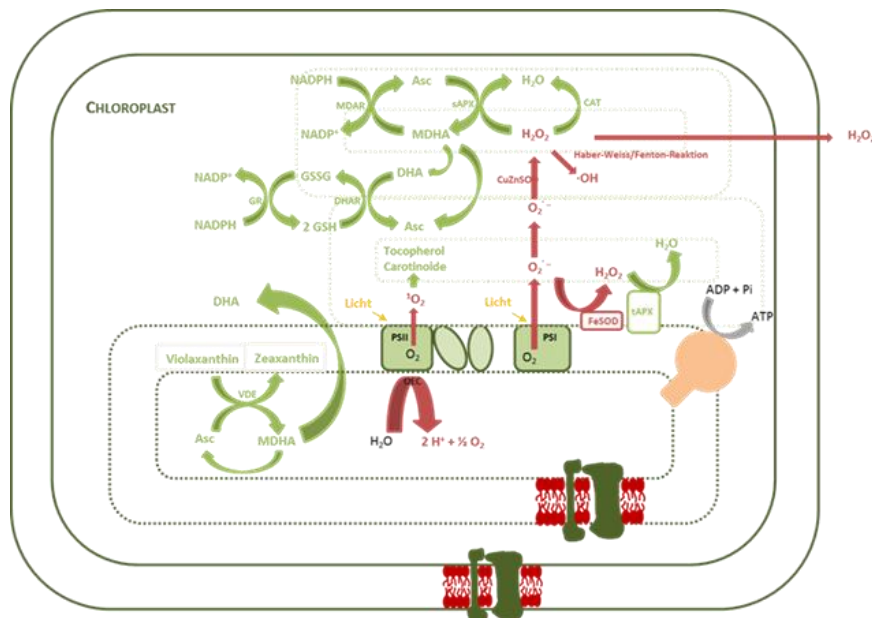


Abbildung 2.7: Mögliche Wege der ROS-Entstehung (rot) und -Entgiftung (grün) im Chloroplasten; Zeichnung angefertigt nach López-Huertas *et al.* (1999), Sharma *et al.* (2012) und Gallie (2013)



Abbildung 2.8: Mögliche Wege der ROS-Entstehung (rot) und -Entgiftung (grün) im Peroxisomen; Zeichnung angefertigt nach Yamaguchi *et al.* (1995), Schindelin *et al.* (2001), del Río *et al.* (2006), Hänsch *et al.* (2007), Byrne *et al.* (2009), Werner und Witte (2011), Sharma *et al.* (2012), Gallie (2013) und Halliwell und Gutteridge (2015)

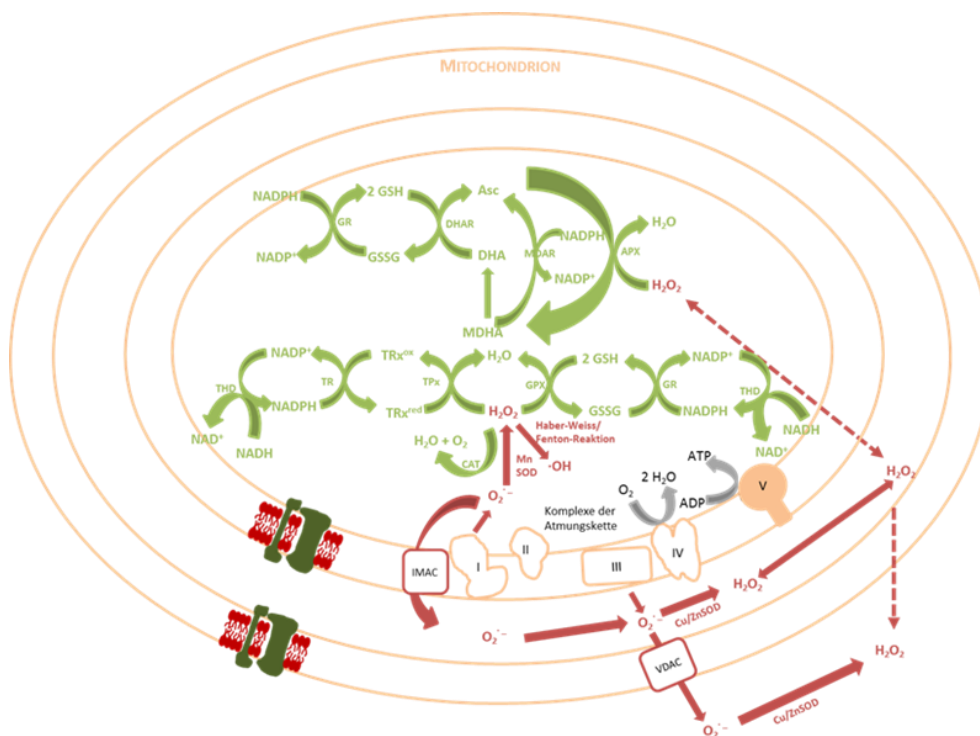


Abbildung 2.9: Mögliche Wege der ROS-Entstehung (rot) und -Entgiftung (grün) im Mitochondrium; Zeichnung angefertigt nach Guidot *et al.* (1995), Andreyev *et al.* (2005) und Sharma *et al.* (2012)

Gebildete Sauerstoff-Radikale verbleiben selten an ihrem Entstehungsort, sondern werden aus den Kompartimenten ins Cytosol transportiert. Bedingt durch die hohe Stabilität, diffundiert besonders häufig  $\text{H}_2\text{O}_2$  frei durch die Membranen der Kompartimente ins Cytosol (Willekens *et al.* 1997). Aber auch andere Radikale ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) werden für weitere Entgiftungsprozesse ins Cytosol transportiert. Die Prozesse decken sich hierbei mit den Entgiftungsstrategien der Kompartimente. Der Unterschied beim Transport der Radikale ins Cytosol ist die Transportform. So werden  $\text{O}_2^{\cdot-}$  Radikale aktiv,  $\text{H}_2\text{O}_2$  hingegen passiv transportiert.

### 2.3.3 CBZ-Wirkung auf Mikroalgen

Wie bereits in Abschnitt 2.2.5 aufgezeigt wurde, haben biologische Systeme ein hohes Potential für Bioremediationsprozesse. Der Einsatz von Mikroalgen zur Entfernung von CBZ wurde bislang nur in wenigen Studien untersucht. Die meisten Ergebnisse wurden im Rahmen ökotoxikologischer Risikoanalysen erzielt.

In akuten Toxizitätsanalysen konnten für die Grünalgen *Desmodesmus subspicatus* ( $\text{EC}_{50}$ :  $85 \text{ mg L}^{-1}$ ), *Dunaliella tertiolecta* ( $\text{EC}_{50}$ :  $>80 \text{ mg L}^{-1}$  in 96 h), *Scenedesmus obliquus* ( $\text{EC}_{50}$ :  $54,6 \text{ mg L}^{-1}$  in 144 h), und *Chlorella pyrenoidosa* ( $\text{EC}_{50}$ :  $33,1 \text{ mg L}^{-1}$  in 144 h) hohe CBZ-Toleranzen aufgezeigt werden (Cleuvers 2002; DeLorenzo und Fleming 2008; Zhang *et al.* 2012).

Weiterhin werden einige Cyanobakterien, insbesondere *Synechococcus leopoliensis* sowie die Kieselalge *Cyclotella meneghiniana* im Zusammenhang mit einer hohen Toleranz genannt (Ferrari *et al.* 2004). Nachgewiesen ist die Bioakkumulation von CBZ bereits in der Biomasse der Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* (Lajeunesse *et al.* 2009; Vernouillet *et al.* 2010). Es wird jedoch keine Metabolisierung organischer Wirkstoffe beschrieben, sondern es wurde vielmehr eine gezielte Entfernung von Carbamazepin durch Bindung der Substanz an die Biomasse, ohne Bildung reaktiver ökotoxischer Metaboliten erreicht.

Generell zeigen Mikroalgen ein großes experimentell bewiesenes Potential bei der Metabolisierung komplexer toxischer Substanzen von Phenolen bis hin zu Schwermetallen. Die Studie von Andreozzi *et al.* (2002) zeigte zudem das Potential der Mikroalgen auf, CBZ zu entfernen (siehe Abschnitt 2.2.5).

Der Versuch, Mikroalgen als biologisches Reinigungssystem zur Entfernung des Pharmazeutikums CBZ einzusetzen, scheint daher erfolgsversprechend und soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

## 2.4 Untersuchungsgebiet

### 2.4.1 Fluss Leine

Als Untersuchungsgebiet wurde der Fluss Leine im Raum Hannover ausgewählt. Die Quelle liegt in Thüringen, von wo aus der Fluss nordwestlich durch Hannover fließt und in der Aller mündet. Die Leine ist das größte Fließgewässer in der Stadt Hannover. Zum Schutz der Innenstadt vor Hochwasser wurde ein Teil des Flusses in den Ihme-Fluss abgeleitet. Die dadurch deutlich verkleinerte Leine (auch als Stadtleine bezeichnet) fließt durch die Innenstadt und gewinnt durch den Zufluss der Ihme in Linden-Nord oberhalb der Dornröschenbrücke wieder seine Ursprungsgröße.

Die Leine diente der Stadt Hannover lange Zeit zur Trinkwassergewinnung. Bedingt durch starke Verschmutzungen des Flusses im 19. Jahrhundert, ausgehend von der Alfelder Papierfabrik, war eine Nutzung zur Trinkwassergewinnung nicht mehr möglich. In dieser Zeit wurde die Leine als „schmutzigster Fluss Niedersachsen“ bezeichnet. Die Wasserqualität im Raum Hannover verbesserte sich allerdings im Laufe der Jahre, so dass eine Einstufung in die Güteklasse II (mäßig belastet) erfolgen konnte. Maßgeblich verantwortlich für den heutigen Zustand der Leine ist die gute Reinigungsleistung der Kläranlagen (Landeshauptstadt Hannover 2012). Die Gewässergütekarte für die Stadt Hannover ist in Abbildung 2.10 aufgezeigt.

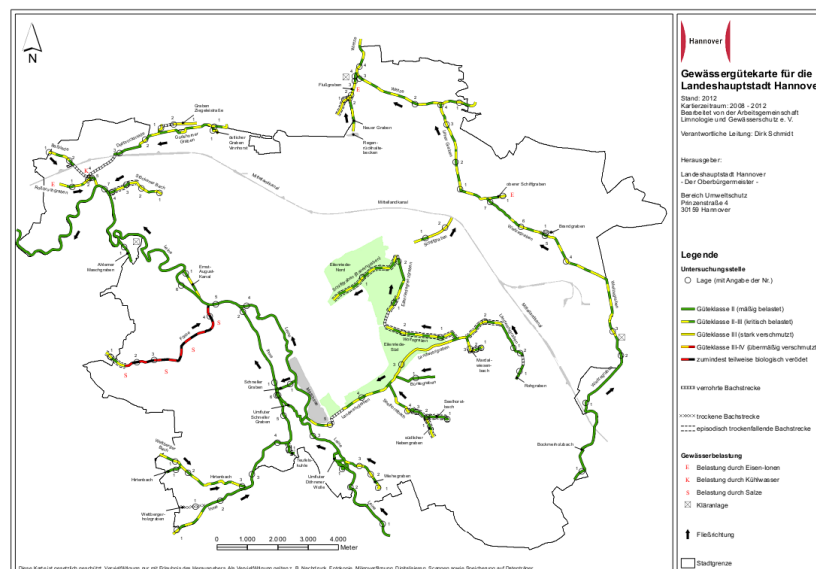


Abbildung 2.10: Gewässergütekarte für die Stadt Hannover (Bildnachweis: Schmidt (2012))

Aufgrund des hohen Wasserreservoirs in Niedersachsen, erfolgt die Trinkwassergewinnung hauptsächlich aus dem Grundwasser (Schmidt 2007a). In der Region Hannover

stehen für die Trinkwasserförderung und -verteilung insgesamt drei Wasserwerke (Elze-Berkhof (Bereitstellung von 45 % des benötigten Wassers), Fuhrberg (43 % Wasserbereitstellung), Grasdorf (5 % Wasserbereitstellung)) zur Verfügung.

Abwassereinleitungen in die Leine in der Region Hannover erfolgen durch die Kläranlage Wennigsen-Evestorf über die Ihme, durch die KÄranlagen Pattensen und Bennisen über den Fuchsbach, der in die Alte Leine mündet, sowie durch die Kläranlagen Springe und Eldagsen über die Haller, die bei Nordstemmen in die Leine mündet. Im Stadtgebiet befinden sich zudem das Klärwerk Herrenhausen und die Kläranlage der Firma Honeywell, die ausschließlich Produktionsabwässer einleitet. Gewässerabwärts gibt es ein weiteres Klärwerk (Gümmerwald). Ausserhalb der Region wird das Abwasser u.a. aus Sarstedt, Hildesheim und Elze indirekt über Seitenflüsse in die Leine eingeleitet. Als direkter Vorfluter dient die Leine u.a. den Kläranlagen in Nordstemmen, Gronau und Wettersen (Alfeld) (Heidtmann 2016).

### 2.4.2 Pharmazeutische Belastung der Leine

In Studien des Niedersächsischen Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (NLWKN) wurden die Umweltqualitätsnormen der prioritären und flussgebietspezifischen Schadstoffen in deutschen Gewässern überprüft (NLWKN 2013; NLWKN 2014). Die Untersuchungen im Fluss Leine wurden an vier Messstellen (Neustadt, Poppenburg, Reckershausen und Leineturm) durchgeführt.

In einer ersten Studie wurde das Auftreten ausgewählter flussgebietspezifischer Schadstoffe (CBZ, Diclofenac und Sulfanethoxazol) untersucht. Da für diese drei Arzneistoffe bislang keine gesetzlichen Umweltqualitätsnormen vorlagen, wurde mit UQN-Vorschlägen der LAWA gearbeitet (CBZ:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Diclofenac:  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Sulfamethoxazol:  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Die CBZ-Konzentrationen lagen an allen Messstellen unterhalb des UQN-Vorschlages (Neustadt:  $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Poppenburg:  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Leineturm:  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ , Reckershausen:  $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Diclofenac wurde hingegen an allen Messstellen mit erhöhter Konzentration ( $0,13$ - $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) gemessen. Für Sulfamethoxazol wurde eine UQN-Überschreitung nur an einer Messstelle (Neustadt) dokumentiert (NLWKN 2013). CBZ-Analysen im Grundwasser der Region Hannover ergaben maximale CBZ-Konzentrationen im Bereich von  $26 \text{ ng L}^{-1}$  (Nödler *et al.* 2013).

Im Rahmen einer weiteren Studie des NLWKN wurden die gesetzlich geregelten UQN in einem Schadstoffmonitoring überprüft. Die Messstellen wurden je nach Befund in unterschiedliche Klassen eingeteilt, wobei die Klassen 1-2 einen guten chemischen Zustand, und die Klassen 3-4 einen schlechten chemischen Zustand repräsentieren.

Die Messung flussgebietsspezifischer Schadstoffe zur Beurteilung des ökologischen Zustandes nach Anlage 5 OGeWV dokumentierte eine erhöhte Konzentration des Schadstoffes Dibutylzinn an der Messstelle Reckershausen (UQN:  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  (OGeWV 2011)). Für die anderen Messstellen konnte ein guter ökologischer Zustand bestätigt werden.

Die Messungen prioritärer Stoffe zur Beurteilung des chemischen Zustandes (Anlage 7, OGeWV) zeigten eine Überschreitung der UQN mit Benzo[ghi]perylen und Indeno[1,2,3-cd]pyren ( $\Sigma\text{UQN: } 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ ) an den Messstellen Neustadt und Leineturm. Eine Bewertung des Flusses mit überarbeiteten UQN-Angaben nach der Richtlinie 2013/39/EU offenbarte weitere Belastungen mit den Stoffen Benzo[a]pyren (UQN:  $1,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$ ) und Fluoranthen (UQN:  $0,0063 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Für die anderen beiden Messstellen konnte unabhängig des Regelwerks ein guter chemischer Zustand beschrieben werden.

Im Rahmen eines Gesamtmonitoringprogramms der Stadtwerke Hannover wurden die Wasserschutz- und Trinkwassergewinnungsgebiete Grasdorf und Fuhrberg hinsichtlich prioritärer und flussgebietsspezifischer Schadstoffe untersucht. Beprobte wurden zum einen der Zufluss der Alten Leine sowie die Leine als Hauptfluss. Angaben zur Belastung können nur für CBZ gegeben werden, da es sich um bislang unveröffentlichte Ergebnisse handelt. Die Analysen von CBZ belegen eine hohe Belastung der Alten Leine mit  $0,81 \mu\text{g L}^{-1}$ . Die Belastung der Leine lag bei  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Raue 2016).

Trotz eines CBZ-Eintrages in die Leine scheint eine ökotoxikologische Gefährdung gering. Allerdings wurden -bezogen auf alle untersuchten deutschen Oberflächengewässer- maximale CBZ-Konzentrationen gemessen, die in der Größenordnung des UQN-Vorschlags von  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  lagen (NLWKN 2013). Die auch in anderen Studien aufgezeigten erhöhten CBZ-Konzentrationen sowie das bereits dokumentierte Umweltrisiko (siehe Abschnitt 2.2.4) zeigen erhöhten Forschungsbedarf zum Schutz der aquatischen Umwelt auf.

Da detaillierte Kenntnisse über die Wirkungsweise von CBZ in der aquatischen Umwelt fehlen, ist eine Beurteilung der Toxizität schwierig. Daher ist es notwendig, fehlende Daten zu erheben und in weiterführenden Schritten darauf aufbauend Konzepte zur Verbesserung der Wasserqualität zu entwickeln (Europäische Kommission 2013).

### 3 Zielsetzung

In einigen Abschnitten der deutschen Oberflächengewässer wurden die für Carbamazepin (CBZ) ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen in Oberflächengewässern bereits überschritten (PNEC:  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; UQN-Vorschlag:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (Ferrari *et al.* 2003; NLWKN 2013)). Es ist daher langfristig mit einer Beeinträchtigung der aquatischen Umwelt zu rechnen (Aksu und Tunç 2005). Zum Schutz der Gewässer ist es somit zwingend erforderlich, Konzepte zur Verbesserung der Wasserqualität hinsichtlich pharmazeutischer Substanzen zu entwickeln (Europäische Kommission 2013).

Das Antiepileptikum CBZ wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, da es als Modellsubstanz persistenter Kontaminationen gewertet werden kann. Zudem ist für CBZ bereits eine Umweltgefährdung dokumentiert (EDQM und Europarat 2013).

In der Literatur sind bereits einige Methoden beschrieben, durch die Arzneistoffkonzentrationen verringert werden können. Bislang wurde allerdings eine zufriedenstellende Lösung der Abwasserproblematik noch nicht gefunden, da ihre Anwendung aufgrund technischer, finanzieller und ökologischer Aspekte oft nicht vertretbar ist. Daher ist die Entwicklung effizienter und biologischer Reinigungsmethoden ein entscheidender Punkt (Zhang *et al.* 2015).

Für Mikroalgen konnte bereits ein hohes Potential für den Einsatz in Bioremediationsprozessen komplexer toxischer Substanzen aufgezeigt werden. Auch wird Mikroalgen ein hoher Beitrag zur Selbstreinigungskapazität von Flüssen zugeschrieben (siehe Abschnitt 2.3.1).

Im Rahmen dieser Arbeit soll erstmalig die Einsatzmöglichkeit von Mikroalgen zur Entfernung von CBZ als biologische und kostengünstige Alternative zu den herkömmlichen Entfernungsmethoden geprüft werden. Daher ist es das Ziel, die biochemischen und physiologischen Grundlagen der Mikroalgen sowie ihre CBZ-Metabolisierungs- und Entgiftungskapazität für einen ganzjährigen Einsatz zur CBZ-Entfernung zu untersuchen. Insgesamt werden sechs Teilziele gesetzt, die im Folgenden vorgestellt werden.

**(i) Saisonaler Einfluss auf die Mikroalgenpopulationen im Untersuchungsgebiet Leine**

Hierzu werden zunächst die Mikroalgenpopulationen im Untersuchungsgebiet der Leine im Raum Hannover in Abhängigkeit von der Jahreszeit isoliert und genotypisch identifiziert. Ein ganzjähriges Einsatzpotential soll anhand klimatischer Zelleffekte im Labor untersucht werden (siehe Abschnitt 5.1).



**(ii) CBZ-Konzentration im Untersuchungsgebiet**

Parallel dazu wird der Konzentrationsverlauf von CBZ im Untersuchungsgebiet ermittelt (siehe Abschnitt 5.2). Anhand der Untersuchungen in der Leine soll eine Aussage über die natürliche Kapazität der Leine, CBZ zu entgiften, getroffen werden (Selbstreinigungskapazität).

**(iii) CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat**

Zur Untersuchung des Einflusses von CBZ auf den Photosyntheseapparat werden die Pigmente und Produkte der Photosynthese sowie die Energieverwertung unter Laborbedingungen analysiert (siehe Abschnitt 5.3).

**(iv) Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung**

Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf den CBZ-induzierten Zellreaktionen gegenüber oxidativem Stress. Hierbei werden nicht-enzymatische sowie enzymatische Schutzsysteme untersucht (siehe Abschnitt 5.4).

**(v) Strategien der CBZ-Metabolisierung**

Zudem wird der CBZ-Metabolismus untersucht. Hierfür werden die Entgiftungsstrategien der jeweiligen Mikroalgen über Aktivitätsmessungen typischer Reaktionsmechanismen identifiziert (siehe Abschnitt 5.5).

**(vi) CBZ-Metabolisierungskapazität**

Abschließend wird die CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen unter verschiedenen klimatischen Bedingungen über antikörperbasierte und chromatographische Analysen ermittelt und das Auftreten spezifischer CBZ-Abbauprodukte (Metabolite) bestimmt (siehe Abschnitt 5.7).

Es soll abschließend bewertet werden, ob durch den Einsatz ausgewählter Mikroalgen das Prinzip der Selbstreinigung im Fließgewässer auf weitere Anwendungsbereiche übertragen werden kann.

Die erzielten Ergebnisse können als Grundlage weiterführender Studien dienen, um ein mikroalgenbasiertes Konzept zur Entfernung persistenter Arzneistoffe nach Vorgaben der Richtlinie 2013/39/EU zu entwickeln. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, den Eintrag von CBZ in die aquatische Umwelt aufgrund der bestehenden Umweltgefährdung zu minimieren und damit einen Beitrag zum Umweltschutz zu leisten.

## 4 Material & Methoden

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, und Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, mit dem jeweils höchsten verfügbaren Reinheitsgrad bezogen.

### 4.1 Grundlegende Messungen

#### 4.1.1 Anzuchtbedingungen

Die Mikroalgenkulturen wurden in 200 mL Erlenmeyerkolben kultiviert. Als Kultivierungsmedium wurde ein Standardmedium mit 2 % Dünger (Max Bahr, Universaldünger) gewählt (Zusammensetzung des Düngers: 0,2 % Guano, 7 % Gesamtstickstoff, 5 % Phosphat, 6 % Kaliumoxid, 0,01 % Bor, 0,02 % Eisen, 0,01 % Mangan, and 0,001 % Molybdän). Um bakterielle und pilzliche Kontaminationen in den Stammkulturen zu minimieren wurde das Medium mit 0,01 mg L<sup>-1</sup> Tetracyclin, und 0,15 % Previcur versetzt. Zum Erhalt der Kulturen wurden Verdünnungsausstriche auf Agarplatten durchgeführt, die zusätzlich zum beschriebenen Medium 2 % Agar enthielten.

Um ausreichende Mengen an Biomasse zu generieren, wurden Schüttelkulturen angelegt, die in regelmäßigen Abständen kontrolliert und umgesetzt wurden.

Die Anzuchtbedingungen der Mikroalgenkulturen im Labor wurden an die saisonalen Bedingungen der Leine angepasst. Es wurde auf ideale Wachstumsbedingungen verzichtet (u.a. zusätzliche CO<sub>2</sub> Begasung), um die Umweltbedingungen realitätsnah abbilden zu können. Eine Schüttelintensität von 120 U min<sup>-1</sup> wurde gewählt (Labortechnik, Typ KS 15A), um die Fließgeschwindigkeit im Fluss nachstellen zu können.

Um die saisonalen Unterschiede im Labor abbilden zu können, wurde die Anzucht in unterschiedlichen Temperaturbereichen (4 und 20 °C) und bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (40 und 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durchgeführt. Die Lichtintensitäten wurden durch eine Mischung der Leuchtstofflampen Master TL-D 18W/830 (warmweiß) und Master TL D 18 W/865 (kaltweiß) (Philips, Niederlande) realisiert. Die Lichtintensität wurde jeweils auf Höhe der Algenkulturen mit einem PAR-Meter (LI-COR Biosciences) gemessen und durch Änderung des Lampenabstandes eingestellt. Die Belichtungszeit wurde auf 9 h Tag/15 h Nacht bzw. 16 h Tag/8 h Nacht eingestellt. Im Folgenden sind diese simulierten Anzuchtbedingungen als „Winterbedingungen“ und „Sommerbedingungen“ gekennzeichnet.

Für die Versuche, in denen die Medien CBZ enthielten, wurden zwei Konzentrationsmessreihen getestet (erste Messreihe: 0, 0,1, 1, 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0, 10, 100, 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ). Die Konzentrationseinstellung erfolgte über eine CBZ-Verdünnungsreihe mit Ethanol (99,8 %). Auch die Kontrollmedien ohne CBZ wurden im gleichen Verhältnis mit Ethanol versetzt. Die Ethanolkonzentrationen in den Medien lagen unter 1 % (v/v). Die Forschungsgruppe von Zhang *et al.* (2012) konnte in früheren Studien aufzeigen, dass diese Ethanolkonzentration keine toxischen Effekte bewirkt. Alle Versuche wurden mit drei biologischen und fünf technischen Wiederholungen durchgeführt.

#### 4.1.2 Wachstumsmessung

Wachstumsmessungen erfolgten durch tägliche Messung der optischen Dichte (OD) bei 850 nm ( $\text{OD}_{850}$ ) in 24-Well Mikrotiterplatten (662102, Greiner, Deutschland) in einem Mikrotiterplatten Spektralphotometer, Typ Epoch, (Biotek, Deutschland). Die Kulturen wurden hierfür entweder direkt in den 24-Well Mikrotiterplatten kultiviert oder es wurden Schüttelkolbenkulturen täglich beprobt. Die optische Dichte wurde anschließend direkt in Zellzahl  $\text{mL}^{-1}$  umgerechnet. Hierfür wurden Kalibriergraden eingesetzt, die im Vorfeld für jede Algenspezies bestimmt wurden.

#### 4.1.3 Zellaufschluss

Für die im Folgenden beschriebenen intrazellulären Messungen wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Methode wurde in Anlehnung an Vernouillet *et al.* (2010) modifiziert. Algenpellets wurden mit einer definierten Menge (0,28 g) an Keramikkügelchen (Matrix Green,  $\varnothing$  1,4 mm) (MP Biomedicals LLC, Amerika) versetzt und 4 min bei  $30 \text{ U s}^{-1}$  in einer Kugelmühle MM400 (Retsch, Deutschland) geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 1,8 mL eines Puffers (0,1 M Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7.0). Der Schüttelschritt wurde wiederholt. Zur Gewinnung des Überstandes wurden die Proben 20 min bei 15.000 RCF bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird im Folgenden als S15 bezeichnet. Der Zellaufschluss mit Keramikkügelchen bietet den Vorteil der vollständigen Freisetzung des intrazellulären Proteins (López *et al.* 2010).

## 4.2 Mikroalgen aus der Leine

### 4.2.1 Untersuchungsgebiet

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroalgenspezies wurden aus Wasserproben des Flusses Leine in der Region Hannover isoliert. Wasserproben wurden an drei definierten Messpunkten entnommen (Abbildung 4.1):

- (1) an der Dornröschenbrücke in Linden-Nord, 200 m unterhalb der Vereinigung der beiden Gewässerstränge Ihme-Fluss und Stadtleine
- (2) in der Nähe der Einleitstelle des Klärwerks Herrenhausen
- (3) ungefähr 3 km unterhalb des Klärwerks (Klappenburgbrücke)

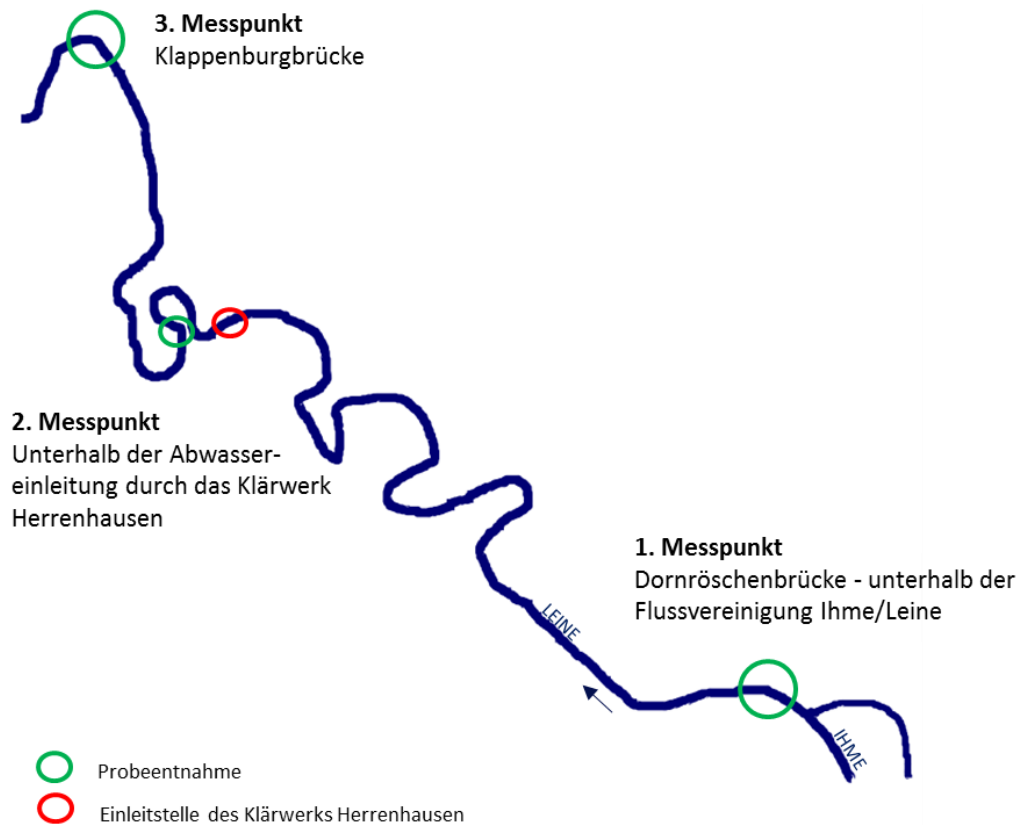


Abbildung 4.1: Teilabschnitt der Leine (Untersuchungsgebiet) mit den eingezeichneten Stellen der Probeentnahme und Abwassereinleitung des Klärwerks in Herrenhausen

### 4.2.2 Isolierung der Mikroalgen

Die entnommenen Wasserproben wurden im Labor in Airliftreaktoren bei 20 °C und einer Lichtintensität von  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belüftet, um eine Anreicherung der Zellen zu erzielen. Von diesen belüfteten Wasserproben wurden in regelmäßigen Abständen Verdünnungsausstriche auf Agarplatten vorgenommen. Von diesen Ausstrichen wurden einzelne Ko-

lonien gepickt und so oft erneut ausgestrichen, bis isolierte Kulturen im Mikroskop als homogen identifiziert werden konnten. Isolierte Kulturen wurden auf dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Standardmedium gehalten. Verdünnungsausstriche wurden in regelmäßigen Abständen wiederholt, um Reinkulturen für alle folgenden Versuche garantieren zu können. Im Vorfeld wurden weitere Medien (Leinewasser; ESP Medium (EPSAG 2014)) für die Kultivierung der Algen getestet. Die besten Wachstumsbedingungen wurden allerdings mit dem bereits beschriebenen Düngermedium erzielt.

#### 4.2.3 Typisierung isolierter Mikroalgen

Zur ersten Einschätzung der Mikroalgenspezies wurden die Reinkulturen der isolierten Mikroalgen anhand ihrer Merkmalsausprägung phänotypisch mit bereits klassifizierten Mikroalgen internationaler Datenbanken (EPSAG, Deutschland; UTEX, USA) verglichen.

Vor Versuchsbeginn wurden die isolierten Mikroalgen genotypisiert. Als Vorbereitung wurden die Zellen mittels Keramikkügelchen aufgeschlossen. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte über eine Chloroform/Isopropanol Methode (Haase *et al.* 2015b), die im Folgenden kurz beschrieben ist: 500 µL DNA Extraktion Puffer (200 mM TRIS HCL, pH 8.0; 240 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8.0; 1 % SDS) wurden auf die aufgeschlossenen Zellen pipettiert und intensiv geschüttelt. Anschließend wurden 75 µL Chloroform zupipettiert und die Proben für 10 min bei 1.000 rpm auf einem Rotationsschüttler geschüttelt (IKA®, Typ VIBRAX VXR basic, Deutschland). Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 RCF bei Raumtemperatur, um die Chloroform- und Wasserphase zu trennen. 75 µL des Überstandes wurden in 2 mL Reaktionsgefäße pipettiert, in denen sich bereits jeweils 75 µL kaltes Isopropanol befanden. Die Proben wurden vermengt und erneut für 20 min bei 13.000 RCF (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen. Nachdem das Ethanol vollständig entfernt war, wurde das Pellet in 75 µL destilliertem Wasser aufgenommen.

Im Anschluss wurde eine Phusion-PCR mit zwei Grünalgenprimern p23SrV\_f1 (5' GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA 3') und p23SrV\_r1 (5' TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG 3') durchgeführt (Sherwood and Presting 2007). Weitere getestete Primer aus den Forschungsarbeiten von Medlin *et al.* (1988), Nübel *et al.* (1997) und del Campo *et al.* (2010) lieferten in unserer Studie keine verlässlichen Ergebnisse und wurden daher nicht weiter betrachtet.

Die PCR Proben (20 µL) enthielten jeweils 1 µL der beiden Primer, 4 µL Phusion-PCR Puffer (5x), 0,4 µL dNTP und 0,2 µL Phusion Hot Start Polymerase II. Zudem wurden 2 µL der aufgereinigten DNA Probe (10-20 ng) zugegeben. Die Konzentration der aufge-

reinigten DNA wurde vorab im Spektrometer (Biotek, Typ Synergy Mx, Deutschland) bestimmt.

Die PCR-Reaktion erfolgte nach einem standardisierten, dreistufigen Programm. Nach einer anfänglichen Erwärmung auf 98 °C für 30 s, durchliefen die Proben einen 35-fachen Zyklus, in dem zunächst bei 98 °C für 10 s die doppelsträngige DNA getrennt, bei 58 °C für 30 s die Primer hybridisiert und bei 72 °C für 30 s die DNA Stränge elongiert wurden. Eine abschließende Elongation wurde bei 72 °C für 10 min durchgeführt, gefolgt von einer Retention bei 4 °C.

Nach der DNA-Replikation wurden die Proben über ein Kit aufgereinigt (MSB® Spin PCRapace Kit (Invitex, Deutschland)) und weiterbehandelt, um die PCR-Produkte für eine TOPO-TA Klonierung in einen spezifischen Vektor einzubauen. Für den Einbau sind T- und A-Überhänge am PCR-Produkt notwendig. Allerdings wurden die PCR-Produkte während der Phusion-PCR nur mit einem T-Überhang ausgestattet, so dass in einer weiteren PCR-Reaktion der A-Überhang nachträglich eingebaut wurde. Hierfür wurden 5 µL des PCR-Produktes, 2,5 µL Dream Taq Puffer, 0,12 µL Dream Taq Polymerase und 0,5 µL dNTP, insgesamt auf 25 µL aufgefüllt, 10 min bei 72 °C in der PCR Maschine inkubiert. Anschließend erfolgten ein weiterer Aufreinigungsschritt, sowie eine Konzentrationsbestimmung im Spektrometer Typ Synergy Mx (Biotek, Deutschland).

Für die eigentliche TOPO-TA Klonierung wurde ebenfalls ein Kit benutzt (TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Deutschland)). Das Prinzip der Klonierung basiert auf dem Einbau der PCR-Produkte in einen spezifischen pENTR/TA-TOPO Vektor. Hierfür wurde der Reaktionsansatz (0,5 µL Vektor, 1 µL PCR-Produkt (5 ng), 0,5 µL Salzlösung und 1 µL dest. Wasser) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Vektor mittels Hitzeschocktransformation zur Vermehrung in TOP10 Zellen (*E.coli*) eingebracht, um das gewünschte Produkt in großer Menge zu vervielfältigen. Hierfür wurde der gesamte Reaktionsansatz vorsichtig mit *E.coli* vermischt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend kurz für 30 s bei 42 °C im Wasserbad erwärmt. Die Proben wurden direkt auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 250 µL LB Medium (Zusammensetzung des LB-Mediums: 10 g Trypton, 5 g Hefe, 5 g NaCl, pH 7.0) 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Folgenden wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf Agarplatten, bestehend aus LB Medium und einer Kanamycin-Konzentration von 50 µg mL<sup>-1</sup>, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des Resistenzgens gegenüber Kanamycin auf dem Vektor, können erfolgreich transformierte *E.coli* Zellen anhand ihres Wachstums identifiziert werden.

Um zu überprüfen, ob die gewachsenen *E.coli* Kolonien das PCR Fragment enthielten, wurde am folgenden Tag eine Colony-PCR durchgeführt. Hierfür wurden Kolonien gepickt und in 30 µL dest. Wasser gelöst. Der Reaktionsansatz umfasst 3 µL der gepickten Zellen sowie jeweils 0,5 µL der Primer (M13f: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3', M13r: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), 0,5 µL dNTP, 2,5 µL Dream Taq buffer und 0,15 µL Dream Taq Polymerase. Mit destilliertem Wasser wurde der Ansatz auf 25 µL gebracht.

Bei der Colony-PCR wurde die Erwärmung am Anfang bei 95 °C für 5 min gehalten. Auch bei dieser PCR-Reaktion wurde ein 35-facher Zyklus genutzt, mit einer Denaturierung bei 95 °C für 30 s, einer Primerhybridisierung bei 58 °C für 30 s sowie einer Elongationsphase bei 72 °C für 90 s. Die abschließende Elongation wurde bei 72 °C 5 min durchgeführt und die Proben anschließend gekühlt.

Mit den PCR-Produkten wurde anschließend eine Gelelektrophorese (2 % Agarose (w/v)) durchgeführt, um die Proben auf die gewünschte Bandenlänge von ca. 580 bp (Primerlänge 170 bp, Fragmentlänge 410 bp) zu überprüfen. Hierfür wurden 10 µL des Produkts mit 5 µL Ladebuffer aufgetragen. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker (1 kb) verwendet.

Mit den Proben, die sich im Gel als positiv erwiesen haben, wurde eine Flüssigkultur (LB Medium + Kanamycin (50 µg mL<sup>-1</sup>)) über Nacht bei 37 °C gestartet. Hierfür wurde die restliche Probenmenge aus der Colony-PCR mit 5 mL des Mediums vermengt.

Am folgenden Tag wurde der Vektor aufgereinigt (GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Deutschland) und in einem 1 % Agarosegel überprüft. Hierfür wurde ein Gemisch aus 3 µL Ladebuffer, 6 µL ddH<sub>2</sub>O und 1 µL des aufgereinigten Plasmids aufgetragen. Die Plasmidgröße wurde mit einem DNA-Marker (1 kb) überprüft. Die Plasmidgröße betrug 3956 bp. Die Sequenz ausgewählter PCR-Produkte/DNA wurden bestimmt (Seqlab, Deutschland).

Die Datenbank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurde genutzt, um die isolierten DNA-Sequenzen der Mikroalgen auf Nukleotidhomologie zu überprüfen.

#### 4.2.4 Saisonale Häufigkeitsverteilung isolierter Mikroalgen

Für die Häufigkeitsbestimmung der isolierten Zellen wurden definierte Wasservolumina (50 mL) aus dem Fluss Leine zweifach filtriert. Hierfür wurde zunächst eine Vorfiltration mit einem Membranfilter (Porendurchmesser: 30 µm) durchgeführt, um Feststoffe in diesem Größenbereich zu entfernen. Anschließend folgte ein Filtrationsschritt mit 2 µm Cyclopore Polycarbonatmembranen (GE Healthcare Europe GmbH, Germany), auf denen

die Mikroalgen zurückgehalten wurden (Abbildung 4.2). Die Mikroalgenspezies auf den Membranen wurden in einem Laserscanning Mikroskop (Keyence, VK 9710, Germany) identifiziert, in dem sie mit den genotypisch bestimmten Spezies verglichen wurden.

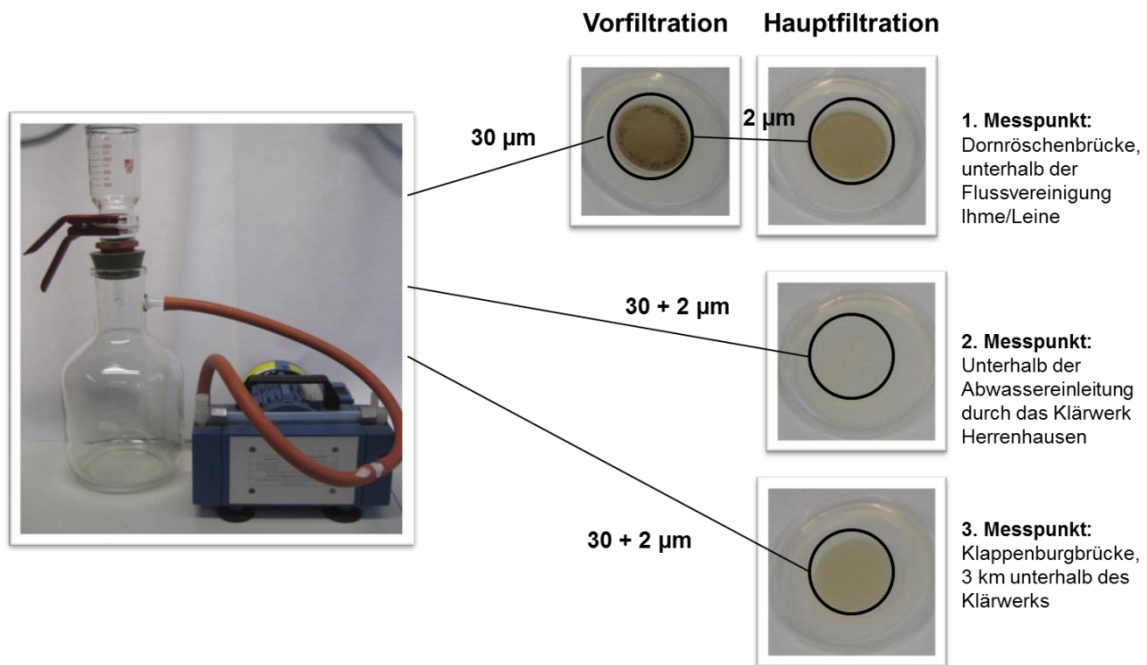


Abbildung 4.2: Versuchsaufbau zur Filtration definierter Wasservolumina; die Vorfiltration wurde mit einem Membranfilter (Porendurchmesser: 30 µm) durchgeführt; Polycarbonat-Membranen wurden für die Hauptfiltration (2 µm) eingesetzt; die Detektion der Mikroalgenspezies erfolgte mittels Laserscanning Mikroskop



## 4.3 Messparameter

### 4.3.1 Pigmentbestimmung

Zur Bestimmung des Pigmentgehalts wurde eine definierte Menge an Algensuspension 5 min bei 8.700 RCF abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 mL 80 % Aceton resuspendiert und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Zellrückstände sowie denaturierte Proteine wurden mittels erneuter Zentrifugation für 5 min bei 8.700 RCF entfernt. Die optische Dichte des Überstandes wurde bei 663 nm, 644 nm und 452,5 nm gemessen. Als Berechnungsgrundlage für den Chlorophyll- sowie Carotinoidgehalte dienten, die von Röbbelen (1957) publizierten, Extinktionskoeffizienten. Die Gehalte sind in mg pro  $10^6$  Zellen angegeben.

### 4.3.2 Protein

Die Bestimmung des Proteingehalts im S15 wurde nach Lowry *et al.* (1951) durchgeführt. Für die Proteinbestimmung wurden vier Lösungen vorbereitet (Lösung A: 0,8 g NaOH, 4 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,04 g K-Na-Tartrat in 200 mL dest.  $\text{H}_2\text{O}$ ; Lösung B: 0,5 % (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; Lösung C: 100 Volumenteile der Lösung A + 2 Volumenteile der Lösung B (frisch hergestellt); Lösung D: 50% Folinreagenz, verdünnt mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$ ).

0,4 mL S15 wurden mit 2 mL der Lösung C vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden 0,2 mL der Lösung D zugegeben und vermischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min zur Pelletbildung wurden 300  $\mu\text{L}$  des Überstandes bei 750 nm vermessen. Als Proteinreferenz diente Serumalbumin (BSA). Die Gehalte sind abhängig vom Versuch in  $\mu\text{g}$  bzw. mg pro  $10^6$  Zellen angegeben.

### 4.3.3 Aminosäuren

Freie Aminosäuren können durch Reaktion mit Ninhydrin als violette Verbindung photometrisch bestimmt werden. Hierfür wurde die Methode nach Yemm *et al.* (1955) wie folgt modifiziert: Das Ninhydrin-Reagenz wurde für jede Messung frisch hergestellt, indem 0,3 g Hydrindantin und 2 g Ninhydrin in 75 mL DMSO gelöst wurden. Bis zur Verwendung wurde es dunkel gelagert. Kurz vor der Durchführung des Aminosäurentest wurden 25 mL Natriumacetatpuffer (4 M, pH 5,2) zugegeben. Für den Test wurden 600  $\mu\text{L}$  S15 mit 450  $\mu\text{L}$  des Ninhydrin-Reagenz gemischt und 30 min bei 80 °C inkubiert. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden 600  $\mu\text{L}$  Ethanol (50 %) zugegeben und gemischt. Es wurden 275  $\mu\text{L}$  eingesetzt, die bei 570 nm vermessen wurden. Als Referenz diente Glycin. Die Gehalte freier Aminosäuren sind in  $\mu\text{mol}$  pro  $10^6$  Zellen angegeben.

### 4.3.4 Zucker

Der Zuckergehalt wurde in Anlehnung an die Methode von Dubois *et al.* (1956) bestimmt. 2 mL Pellets wurden in 2 mL 80 % Ethanol resuspendiert, um das Chlorophyll zu entfernen. Das farblose Pellet wurde anschließend in 2 mL 10 % Ethanol homogenisiert. Die Proben wurden 5 min auf 60 °C erwärmt und nach Abkühlen 2 min bei 8.700 RCF zentrifugiert. 250 µL des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen Phenols (5 %) vermischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1,25 mL konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und die Proben nach direkter Vermischung für 10 min bei 80 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 480 nm gemessen. Als Referenz für die Zuckeranalyse diente Glukose. Die Gehalte sind abhängig vom Versuch in ng bzw. mg pro 10<sup>6</sup> Zellen angegeben.

### 4.3.5 Chlorophyllfluoreszenz

Die Chlorophyllfluoreszenz wurde in 96-Well Mikrotiterplatten mit einem PAM (Puls Amplituden Modulation) Fluorometer (Walz, Deutschland) gemessen. Aus den Fluoreszenzparametern dunkel adaptierter Algensuspensionen wurde der Anteil des nicht-photochemischen Quenchings (NPQ) bestimmt. Zur Berechnung wurde Gleichung 1 nach Bilger und Björkman (1990) verwendet. Die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten aufgezeigt (Stuhlfauth *et al.* 1988).

$$NPQ = \frac{(F_m - F_m')}{F_m'} \quad (Gl. 1)$$

mit

NPQ: nicht photochemisches Quenching [rel. Einheit]

F<sub>m</sub>: maximale Fluoreszenz bei Dunkeladaption [rel. Einheit]

F<sub>m</sub>': maximale Fluoreszenz bei Lichtadaption [rel. Einheit]

Die apparente Elektronentransportrate (ETR) wurde nach Gleichung 2 berechnet (Walz 2009). Hierfür erfolgte eine Berechnung der effektiven PS II Quantenausbeute (Y(II)) (Gleichung 3) nach Genty *et al.* (1989).

$$\text{ETR} = Y(\text{II}) \cdot \text{PAR} \cdot 0,5 \cdot 0,84 \quad (\text{Gl. 2})$$

mit

ETR: apparente Elektronentransportrate [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]

Y(II): effektiven PS II Quantenausbeute [rel. Einheit]

PAR: photosynthetisch aktive Strahlung [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]

0,5: 50 % der absorbierten PAR-Strahlung (PS II)

0,84: PAR-Absorptionskoeffizient

$$Y(\text{II}) = \frac{(F_m' - F)}{F_m'} \quad (\text{Gl. 3})$$

mit

Y(II): effektiven PS II Quantenausbeute [rel. Einheit]

$F_m'$ : maximale Fluoreszenz bei Lichtadaption [rel. Einheit]

F: Grundfluoreszenz [rel. Einheit]

#### 4.3.6 Photosynthetische Aktivität

Für die Bestimmung der photosynthetischen Aktivität in  $\text{nmol min}^{-1}$  wurden die Algen-suspensionen auf  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  verdünnt. 1 mL der Suspensionen wurde in einer Sauerstoffelektrode (Hansatech, Typ Oxygraph 10002) mit rotem Licht (RG-630 Filter, Schott) belichtet. Die Elektrode wurde durch einen Wassermantel, verbunden mit einem Wasserbad (Julabo, Typ F10), temperiert, um die Anzuchtsbedingungen der Kulturen auf  $\pm 0,2$  °C konstant zu halten. Die Lichtintensität in der Elektrode wurde aus technischen Gründen als Mittelwert der Lichtintensität vor und hinter der befüllten Elektrode berechnet. Die Messungen erfolgten unter den definierten Anzuchtbedingungen (Winterbedingungen: 4 °C,  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Sommerbedingungen: 20 °C,  $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

#### 4.3.7 Lichtkompensationspunkt

Für die Berechnung des Lichtkompensationspunkts in  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  der Algenspezies wurde die photosynthetische Aktivität, wie im vorherigen Abschnitt 4.3.6 beschrieben, bestimmt. Die photosynthetische Aktivität wurde bei Lichtintensitäten von 10 bis  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gemessen. Unterschiedliche Lichtintensitäten wurden durch Veränderungen des Lampenabstandes zur Elektrode erzielt. Die photosynthetischen Aktivitäten wurden für alle Algenspezies bei 4 und 20 °C als 3-fache Bestimmung erhoben und loga-

rhythmisch gefittet. Die logarithmische Kurvengleichung diente der Berechnung der Lichtintensität, bei welcher die Aufnahme und Freisetzung von CO<sub>2</sub> identisch sind.

### 4.3.8 Phasenverteilung

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an den standardisierten Phasenverteilungstest bei Bakterien (BATH) (Rosenberg 1984). 1 mL Algensuspension wurde 5 min bei 3.500 RCF zentrifugiert und das Sediment zweimal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen. Das Pellet wurde in 1,6 mL Puffer (100 mM Kaliumphosphat, 1mM Magnesiumsulfat Heptahydrat, 30 mM Harnstoff, pH 7,0) für 2 min inkubiert und anschließend bei 435 nm photometrisch vermessen (OD<sub>435/Start</sub>). Die gemessenen Proben wurden in Eppendorf Gefäße pipettiert und nach Zugabe von 400 µL Hexan (20 % (v/v)) für 1 min geschüttelt. Zur Trennung der wässrigen und organischen Phase wurden die Proben 5 min bei 3.500 RCF bei 4 °C zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde vorsichtig entfernt, bevor die Proben erneut gemischt und bei 435 nm (OD<sub>435/Ende</sub>) vermessen wurden. Effekte einer unspezifischen Absorption wurden minimiert, indem gegen einen Kontrollwert (OD<sub>678</sub>) gemessen wurde.

Der Phasenverteilungsindex (I<sub>435</sub>) wurde nach Borghi *et al.* (2011) (Gleichung 4) bestimmt.

$$I_{435} = 100 \cdot \frac{(OD_{435/Start} - OD_{435/Ende})}{OD_{435/Start}} \quad (\text{Gl. 4})$$

mit

I <sub>435</sub> :	Phasenverteilungsindex [-]
OD <sub>435/Start</sub> :	optische Dichte bei 435 nm (Versuchsstart)
OD <sub>435/Ende</sub> :	optische Dichte bei 435 nm (Versuchsende)

### 4.3.9 Glutathion

#### 4.3.9.1 Reduziertes Glutathion

Der Glutathiongehalt, als Summe des oxidierten (GSSG) und reduzierten Glutathions (GSH) wurde nach der Methode von Rahman *et al.* (2006) bestimmt.

Das Prinzip der Mesung beruht auf der Reaktion von GSH mit 5,5`-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer nicht-enzymatischen Reaktion unter Bildung von GSSG und 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB). In Anwesenheit von NADPH wird GSSG erneut zu GSH umgewandelt. Diese Reaktion wird durch die Glutathion-Reduktase (GR)

katalysiert. Die Bildungsrate von TNB ist proportional zur GSH-Konzentration und kann photometrisch bei 412 nm im 20-sek Intervall für 2 min gemessen werden.

Zur Bestimmung des GSH-Gehalts wurden 20  $\mu\text{L}$  S15 mit 120  $\mu\text{L}$  der DTNB-GR-Stamm-lösung gemischt. Zum Start der Reaktion wurden 60  $\mu\text{L}$  NADPH zugegeben. Der GSH-Gehalt wurde anschließend über eine Kalibriergrade ermittelt und ist in nmol pro  $10^6$  Zellen angegeben.

#### 4.3.9.2 Oxidiertes Glutathion

Für die Bestimmung oxidierten Glutathiongehalts (GSSG) in nmol pro  $10^6$  Zellen wurde das vorhandene GSH in den Proben vorab derivatisiert und eine enzymatische Rückbildung von GSSG zu GSH durch Zugabe von 2-Vinylpyridin unterbunden (Griffith 1980). Es wurden 150  $\mu\text{L}$  S15 mit 3  $\mu\text{L}$  2-Vinylpyridin vermengt, für 1 h inkubiert, und anschließend mit Triethanolamin neutralisiert. Die Bestimmung des GSSG-Gehalts entspricht der bereits beschriebenen Durchführung zur GSH Messung.

#### 4.3.10 Glutathion-Reduktase

Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) wurde in Anlehnung an Vernouillet *et al.* (2010) bestimmt. 100  $\mu\text{L}$  S15 wurden mit 400  $\mu\text{L}$  eines Reaktionsgemisches (200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,5 mM DTNB, 0,1 mM NADPH) vermengt und 40 min inkubiert. Anschließend wurde zum Start der Reaktion 1 mM GSSG zugegeben. Die TNB Bildung wurde über einen Zeitraum von 16 min photometrisch bei 412 nm verfolgt. Die GR-Aktivität wurde über den Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon=14.150 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt (Sigma-Aldrich 2014a; Sigma-Aldrich 2014b) und ist in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen angegeben.

#### 4.3.11 Superoxid-Dismutase

Die Superoxid-Dismutase (SOD) Aktivität wurde indirekt über die Hemmung der Autooxidation von Pyrogallol gemessen. Die verwendete Methode wurde in Anlehnung an Marklund und Marklund (1974), Ahmed *et al.* (2003) und Correa-Reyes *et al.* (2007) eingesetzt. 180  $\mu\text{L}$  Puffer (50 mM Kaliumphosphat; 0,1 mM Pyrogallollösung; pH 8,24) wurden mit 20  $\mu\text{L}$  S15 in 96-Well Mikrotiterplatten gemischt. Zur Herstellung der Pyrogallollösung wurden 20 mM Pyrogallol in 10 mM HCl gemischt. Die Zunahme der Oxidationsprodukte von Pyrogallol wurde bei 25 °C für 1 h im 5-min Intervall photometrisch bei 405 nm gemessen.

Eine Identifizierung der gebildeten Oxidationsprodukte ist aufgrund überlagernder Absorptionsspektren nicht möglich (Abrash *et al.* 1989). Daher wurde die SOD-Aktivität in Units pro  $10^6$  Zellen angegeben. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach Gleichung 5.

$$\text{SOD} = \frac{(\Delta\text{OD}_{\text{Blank}} - \Delta\text{OD}_{\text{Probe}}) \cdot V}{v \cdot \frac{\Delta\text{OD}_{\text{Blank}}}{2}} \quad (\text{Gl. 5})$$

mit

SOD: Aktivität der Superoxid-Dismutase [U]

V: Ansatzvolumen [ $\mu\text{L}$ ]

v: Probevolumen [ $\mu\text{L}$ ]

$\Delta\text{OD}$ : Änderung der optischen Dichte [ $\text{min}^{-1}$ ]

### 4.3.12 Katalase

Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gemessen als Abnahme im UV Bereich, bestimmt (Zhang *et al.* 2004). 1  $\mu\text{L}$  S15 wurde mit 300  $\mu\text{L}$  eines Puffers (0,16 mL 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgefüllt auf 100 mL mit 0,067 M Kaliumphosphatpuffer; pH 7,0) vermischt. Die photometrische Messung erfolgte bei 250 nm für 3 min im 10-sek Intervall. Die Berechnung der Aktivität erfolgte über den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon=26,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und ist in  $\text{mmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen angegeben.

### 4.3.13 Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation wurde über den Gehalt von Malondialdehyd (MDA), als Produkt der Lipidperoxidation, ermittelt. MDA gilt als Indikator für ROS-bedingte Zellschäden. Die Methoden nach Heath und Packer (1968) und Bidlack *et al.* (1973) wurde hierfür modifiziert:

2 mL Algensuspension wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 8.700 RCF pelletiert, in Puffer (25 mM TRIS, 150 mM KCL, pH 7,4) resuspendiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Trichloressigsäure (TCA) (20 %) zugegeben und nach Vermischung für 10 min bei 2.000 RCF zentrifugiert. Ein definiertes Volumen des Überstandes wurde mit dem gleichen Volumen Thiobarbitursäure (TBA) (0,75 %) gemischt und für 20 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben bei 532 nm vermessen. Im Falle einer Probenentrübung wurden die gemessenen Extinktionen bei 532 nm um die Extinktion bei 600 nm korrigiert. Für die Umrechnung auf den MDA-Gehalt wurde der Extinktionskoeffizient

$\epsilon = 155 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet (Heath und Packer 1968). Angegeben ist der Gehalt in nmol pro  $10^6$  Zellen.

#### 4.3.14 Cytochrom P450-Komplex

Die gesamte Oxidaseaktivität wurde über die Oxidation von Benzidin bestimmt. 50  $\mu\text{L}$  S15 wurden mit 140  $\mu\text{L}$  Natriumphosphatpuffer (0,2 M, pH 5) gemischt. Der Puffer enthielt zusätzlich 0,1 mM Benzidin, 0,15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 0,1 % Triton X-100. Das oxidierte Benzidin wurde bei 30 °C über 60 min in einem 30-sek Intervall photometrisch bei 620 nm gemessen (Quinn *et al.* 2004). Für den Cytochrom P450-Komplex sind in der Literatur keine Extinktionskoeffizienten beschrieben. Daher wurden die Aktivität über die Änderung der optischen Dichte in  $\Delta\text{OD min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen kenntlich gemacht.

#### 4.3.15 Glutathion S-Transferase

Die Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST) wurde in Anlehnung an die Methode von Habig *et al.* (1974) bestimmt. 165  $\mu\text{L}$  Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,5), 10  $\mu\text{L}$  Glutathionlösung (6,2 mg GSH gelöst in 1 mL 0,1 M Kaliumphosphatpuffer(pH 6,5)), 5  $\mu\text{L}$  1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene (CDNB)-Lösung (16,24 mg CDNB in 2 mL Ethanol) wurden mit 20  $\mu\text{L}$  S15 gemischt. Die Bildung von Konjugaten zwischen GSH und CDNB wurden über einen Zeitraum von 3 min photometrisch bei 340 nm detektiert. Die GST Aktivität wurde über den Extinktionskoeffizienten von  $9,6 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt (Habig *et al.* 1974) und ist in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen angegeben.

## 4.4 Analytische Messverfahren

Die analytischen Messverfahren, die im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der CBZ- und Metabolit-Konzentrationen eingesetzt wurden, sind im Folgenden beschrieben.

Die in diesen Verfahren erzielten Ergebnisse spiegeln die CBZ-Reduktion und Metabolitbildung pro Versuchsansatz der jeweiligen Alge wider. Als Bezugsgröße wurden die entsprechenden Gesamtzellzahlen am Ende des Versuches gewählt, um trotz algenspezifischer unterschiedlicher Zellteilungen eine vergleichbare Basis zu schaffen (siehe Abschnitt 5.7).

### 4.4.1 Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (ELISA)

Für die Bestimmung der CBZ-Konzentration wurde ein kompetitiver ELISA (engl.: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) verwendet, der von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, entwickelt und durchgeführt wurde. In Abbildung 4.3 ist das Prinzip des durchgeführten Tests dargestellt.

Im Folgenden ist die Methode verkürzt zusammengefasst. Zunächst wurden 96-Well Mikrotiterplatten mit hoher Bindungsaffinität (655081, Greiner, Deutschland) für 18 h mit einem sekundären Antikörper (R1256P, Acris Antibodies, Deutschland) inkubiert. Es wurden 200  $\mu\text{L}$  mit einer Endkonzentration von 1  $\text{mg L}^{-1}$  eingesetzt.

Nach der Inkubation folgte ein Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener Antikörper, bei dem die Platten 3-mal mit 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer in einem Microplate Washer (Typ 405 TS, Biotek, Deutschland) gewaschen wurden. Anschließend wurde mit 200  $\mu\text{L}$  des primären Antikörpers (mAK-CE2, BAM, Deutschland) für 1 h inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift, bevor die Proben (150  $\mu\text{L}$ ) zusammen mit einer definierten Menge eines enzymmarkierten Analytderivates als Tracer-Lösung (50  $\mu\text{L}$ , CBZ-T-01, BAM, Deutschland) (E) zur gleichen Zeit inkubiert wurden. Das Antigen in den Proben konkurrierte mit dem enzymmarkierten Antigen um freie Bindungsstellen. Bei dem Tracer handelt es sich um ein Derivat von CBZ gekoppelt über einen Spacer an Meerrettichperoxidase. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 200  $\mu\text{L}$  einer TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Substratlösung (S) zugegeben und für 30 min inkubiert. Die Umsetzung des Substrats durch die gebundenen Enzymmoleküle resultierte in einer Blaufärbung. Anschließend wurde das Enzym mittels Schwefelsäure (1 M, 100  $\mu\text{L}$ ) inaktiviert und die Blaufärbung gestoppt. Die Zugabe der Schwefelsäure erzeugte einen gelben Farbumschlag, der photometrisch in einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer Typ Eon (Biotek, Deutschland) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen wurde. CBZ-

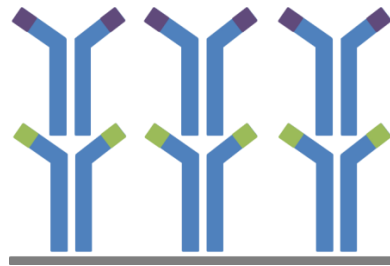


Konzentrationen wurden über Kalibrierkurven berechnet. Hierfür wurde die Datenanalyse-Software GEN 5, Version 2.04 verwendet.

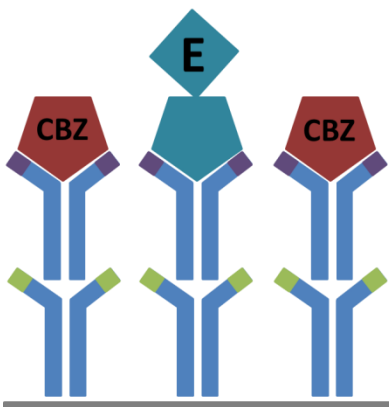
1. Beschichtung der Platten über Nacht bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper „R1256P“ (Acris Antibodies, Deutschland) (Inkubationszeit: 18 h).



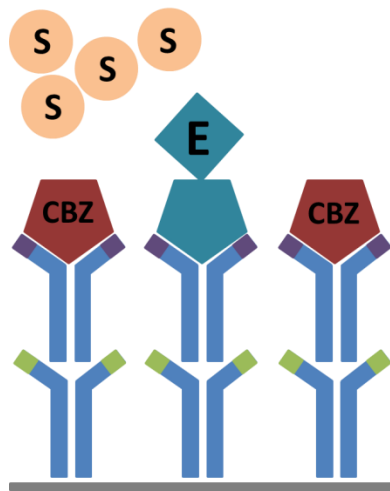
2. Nachdem die Platten mehrfach mit Waschpuffer gewaschen wurden, wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper „mAK-CE2“ (BAM, Deutschland) durchgeführt (Inkubationszeit: 1 h).



3. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die CBZ-haltigen Proben zeitgleich mit dem CBZ-Tracer „CBZ-T-01“ (E) aufgetragen (Inkubationszeit: 0,5 h).  
E= CBZ-Tracer (BAM, Deutschland);  
CBZ gekoppelt an Meerrettichperoxidase



4. Nach einem letzten Waschschrift folgte die Zugabe der  $H_2O_2$ /TMB-Substratlösung (S) (Inkubationszeit: 0,5 h).  
Anschließend wurden die Enzyme durch Zugabe von  $H_2SO_4$  inaktiviert, Die blaue Farbreaktion gestoppt.



5. Photometrische Messung  $OD_{450}$

6. Kalibrierreihen mit CBZ Standards dienen der Berechnung der CBZ-Konzentrationen;  
das gemessene Signal ist proportional zur Menge an gebundenem Enzym und umgekehrt proportional zur Menge an Antigen aus der Probe

Abbildung 4.3: Prinzip des durchgeführten kompetitiven ELISA

### Probenvorbereitung für die ELISA-Messungen

Drei Mikroalgen (*Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp.) wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben für einen Kultivierungszeitraum von vier Wochen als dreifache Bestimmung unter Sommerbedingungen angezogen. Als Kultivierungsmedium diente das Düngermedium (60 mL) mit  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Kontrollkulturen wurden ohne CBZ angezogen.

Die ELISA Messungen erfolgten im abzentrifugierten Überstand der Algensuspensionen. Dafür wurden einmal wöchentlich 5 mL entnommen und für 10 min bei 2.000 RCF und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.4.2 Chromatographisches Nachweisverfahren (HPLC-ESI-MS/MS)

Für die Konzentrationsbestimmung der Grundverbindung CBZ sowie der Hauptmetabolite 10,11-Dihydro-10,11-epoxy CBZ (CBZ 10,11-epoxid), 10,11-dihydro-10,11 dihydroxy CBZ (CBZ-diol), 2-Hydroxy CBZ (2-OH CBZ) und 3-Hydroxy CBZ (3-OH CBZ) wurde ein chromatographisches Nachweisverfahren (HPLC-ESI-MS/MS (engl.: *high-performance liquid chromatography with mass spectrometry*)) durchgeführt. Die Analysen wurden von Mitarbeitern am BAM durchgeführt. Die Methode ist im Folgenden zusammengefasst.

HPLC-ESI-MS/MS-Messungen wurden mit einem Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent Technologies, USA) durchgeführt. Das System bestand aus einer Binärpumpe, Entgaser, Probengeber, Säulenheizung und einem UV-Detektor, der an ein Triple Quad™ 6500 Massenspektrometer (AB Sciex, Deutschland) gekoppelt war. Für die Messungen wurde eine Kinetex C18 Vorsäule (Phenomenex) und eine Kinetex XB-C18 core/shell Säule (150 mm x 3 mm,  $2,6 \mu\text{m}$ ) eingesetzt.  $20 \mu\text{L}$  der Proben wurden auf die Säule aufgebracht. Die Säulentemperatur wurde auf  $55^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Die Fließgeschwindigkeit lag bei  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ . Ein binärer Gradient wurde mit zwei Lösungsmitteln erzielt: (i) Wasser und (ii) Methanol. Beide Lösungsmittel enthielten 10 mM Ammonium Acetat und 0,1 % (v/v) Essigsäure. Der binäre Gradient wurde, wie im Folgenden beschrieben, verwendet. Es wurden 20 % Methanol eingesetzt und eine 2-minütige isokratische Auftrennung erzielt. Es folgte ein linearer Anstieg auf 95 % Methanol innerhalb der nächsten 13 min. Die Methanolkonzentration von 95 % wurde für 8 min gehalten. Innerhalb der nächsten 0,5 min wurden die Ausgangsbedingungen für Methanol wieder hergestellt (20 %) und für 7,5 min gehalten.

Eine Elektrospray-Ionisation wurde unter Bildung positiver Ionen (ESI+) bei einer Temperatur von  $400^{\circ}\text{C}$  und einer Spannung von 4.500 V durchgeführt. Die folgenden Parame-

ter wurden für den Betrieb des Massenspektrometers benötigt: curtain gas: 35 psi, collision Gas: 6 psi, nebulizer gas (GS1): 62 psi, turbo gas (GS2): 62 psi, entrance potential: 10 V.

Für die Quantifizierung des CBZ wurde eine massenspektrometrische Methode zur gezielten Analyse kleiner Verbindungen (SRM Selected Reaction Monitoring) verwendet. Die Trennung der Ionen wurde mit einem Masse zu Ladungsverhältnis  $m/z$  237→194 durchgeführt. Die Kollisionsenergie (CE) lag bei 30 V, das Zellenausgangspotential (CXP) betrug 14 V, das Declustering-Potential (DP) 60 V und die Verweilzeit umfasste 75 ms. Die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Analyst® 1.6.2 (AB Sciex, Deutschland).

Im Rahmen der ersten Leinewasser-Analysen (Januar 2014) wurde das API 4000 als Massenspektrometer eingesetzt. Die Empfindlichkeit war 10-fach niedriger als die des API 6500, so dass eine Festphasenextraktion (SPE) vorgeschaltet werden musste. Alle weiteren Analysen wurden, wie oben beschrieben, mit dem API 6500 durchgeführt.

Mit der eingesetzten Messtechnik wurden ausschließlich „freie“ Metabolite analysiert. Gebildete CBZ-Metabolite, die im Zuge der intrazellulären Entgiftung für weiterführende Prozesse der Kompartimentierung konjugiert wurden, wurden nicht erfasst.

#### Probenvorbereitung für die HPLC-ESI-MS/MS-Analysen

HPLC-ESI-MS/MS-Messungen wurden zur Konzentrationsbestimmung von CBZ sowie gebildeter Metabolite in Wasserproben aus der Leine sowie in Mikroalgenkulturen eingesetzt.

Die Wasserproben aus der Leine wurden vorab über Rotilabo®-Faltenfilter Typ 113P (Carl Roth, Deutschland) gefiltert, um Feststoffe als Störsubstanzen für die Konzentrationsbestimmung zu reduzieren.

In den Mikroalgenkulturen wurden die Konzentrationsbestimmung im Überstand und in der Fraktion des Algen-Sedimentes durchgeführt, um gebildete Metabolite identifizieren zu können. Die Mikroalgen wurden hierfür sowohl unter Sommer- als auch unter Winterbedingungen in 500 mL Erlenmeyerkolben für eine Kultivierungsdauer von vier Wochen als dreifache Bestimmung angezogen. Die Kultivierung erfolgte auf Düngermedium (250 mL) mit  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Das Zellwachstum wurde zu Beginn und am Ende des Versuches photometrisch gemessen. Die CBZ-Metabolisierungskapazität wurde ausschließlich am Versuchsende analysiert. Hierfür wurde der bereits im Abschnitt 4.1.3 beschriebene Zellaufschluss verändert, um mögliche Störfaktoren für die chromatographische Messung zu minimieren. Der für den Zellaufschluss benötigte Puffer wurde mit einer

geringeren Natriumphosphatkonzentration von 5 mM eingesetzt. Zudem wurde auf eine Zugabe von EDTA verzichtet. Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden die Proben für 20 min bei 15.000 RCF und 4 °C abzentrifugiert. Da dieser Schritt nicht ausreichte, um das Chlorophyll aus den Proben zu entfernen, wurde der Überstand erneut für 10 min bei 4.000 RCF und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

## 4.5 Datenauswertung

### 4.5.1 Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt werden, wurden in unterschiedlichen Versuchsreihen erzielt. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu schaffen, wurden alle Messparameter auf  $10^6$  Zellen bezogen. Ausschließlich die Ergebnisse zur CBZ-Reduktion und Metabolitbildung wurde auf die Zellzahl im gesamten Versuchsansatz bezogen, um trotz algenpezifischer unterschiedlicher Zellteilungen eine vergleichbare Basis zu schaffen (siehe Abschnitt 5.7).

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die CBZ-Anpassungsreaktionen der Mikroalgen gelegt. Vor dem Hintergrund einer längerfristigen Kultivierung zur Entfernung von CBZ sind die Reaktionen zum Ende der gewählten Kultivierungsdauer von 14 Tagen von großem Interesse. Zusätzlich wurden für ausgewählte Mikroalgen die Stressantworten zu Beginn der Messungen am 3. Messtag in CBZ-haltigem Medium dokumentiert, um algen spezifische stressinduzierte Strategien zu identifizieren.

### 4.5.2 Wachstumsraten

Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden die ermittelten  $OD_{850}$  Werte über algen spezifische Kalibriergraden in Zellen pro mL umgerechnet und linear aufgetragen. Die durchschnittlichen Wachstumsraten ( $d^{-1}$ ) während einer Versuchsperiode wurden linear zwischen dem ersten und letzten Messtag bestimmt.

### 4.5.3 Statistische Auswertung

Die Versuche wurden mit drei biologischen Replikaten durchgeführt ( $n=3$ ). Alle Berechnungen beruhen zusätzlich auf fünf technischen Replikaten. In Wachstumsversuchen, in denen die Kultivierung der Mikroalgen in 24-Well Mikrotiterplatten erfolgte, wurde mit sechs bis acht biologischen Replikaten gearbeitet ( $n=6$  bzw.  $n=8$ ).

Um Ausreißer in den technischen Replikaten identifizieren zu können, wurde der Grubbs-Test angewendet (Grubbs 1969). Die statistische Vergleichbarkeit der Daten zur jeweiligen Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) wurde über eine Kruskal-Wallis Varianzanalyse nach Rängen erreicht. Da dieser Test nur anzeigt, ob es einen signifikanten Unterschied gibt, wurde im Folgenden mit Hilfe eines Dunn`s Tests (Post Hoc) die signifikante Versuchsvariante ermittelt ( $p=0,05$ ). Signifikante Veränderungen zur Kontrolle sind in den entsprechenden Abschnitten gekennzeichnet („\*“). Konnte keine eindeutige Signifikanz bestimmt werden, wurden die entsprechenden Ergebnisse markiert („1“).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Mikroalgen aus der Leine

In diesem Abschnitt wurden die isolierten Mikroalgenpezies ohne CBZ kultiviert, um klimatische Effekte auf die Häufigkeitsverteilung, das Wachstum, die photosynthetischen Parameter sowie die metabolische Aktivität zu untersuchen. Die Mikroalgen wurden im Sommer 2012 und im Winter 2012 isoliert und unter entsprechenden simulierten Sommer- ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $120\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) und Winterbedingungen ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) kultiviert.

#### 5.1.1 Typisierung isolierter Mikroalgen

Die isolierten Mikroalgen wurden als Reinkulturen angezogen und nach der Methode in Abschnitt 4.2.3 genotypisch bestimmt. Insgesamt wurden 14 Mikroalgenpezies untersucht, deren Kulturen im Mikroskop als homogen identifiziert wurden. Alle Kulturen wurden in einer Mehrfach-Bestimmung untersucht. Die Kulturen sind von I bis XIV durchnummeriert und in den folgenden Abbildungen gekennzeichnet.

Die aus den Algen isolierte DNA wurde in Vektoren eingebracht, die in *E.coli* kloniert wurden. Über eine anschließende Colony-PCR konnte überprüft werden, ob die gepickten *E.coli* Zellen das DNA-Fragment enthielten. Das zu detektierende Fragment hatte eine Länge von 580 bp. Der bildliche Nachweis erfolgte auf 2 % Agarosegelen (Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3). Die Bandenlänge wurde mit einem DNA-Marker (1 kb) überprüft (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Deutschland) (Abbildung 5.1).

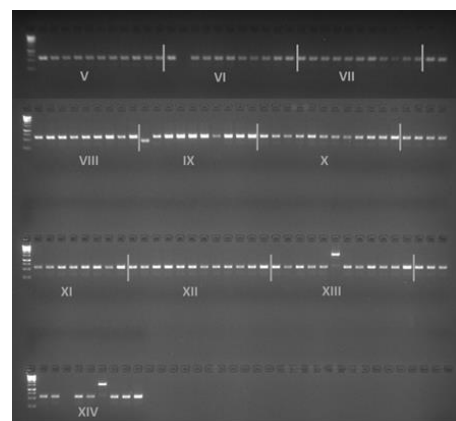
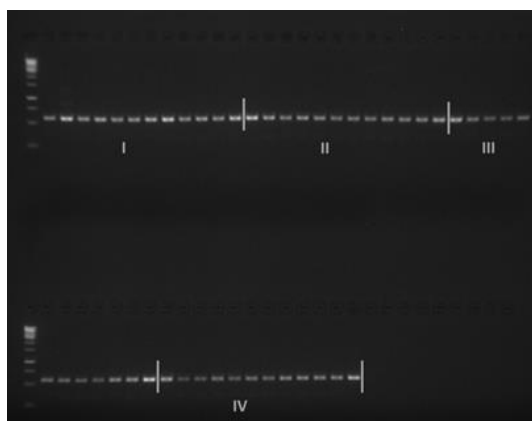
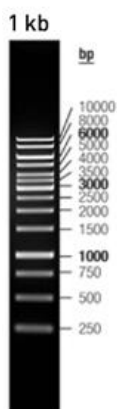


Abbildung 5.1: DNA-Marker Aufspaltung (Bildnachweis: Thermo Scientific<sup>TM</sup>)

Abbildung 5.2: Visualisierung der DNA Fragmente der Kulturen I bis IV (n=12) in einem 2 % Agarosegel; verwendet wurden 10  $\mu\text{L}$  DNA sowie 5  $\mu\text{L}$  Ladepuffer; DNA-Marker: 1 kb

Abbildung 5.3: Visualisierung der DNA Fragmente der Kulturen V bis XIV als Mehrfachbestimmung in einem 2 % Agarosegel; verwendet wurden 10  $\mu\text{L}$  DNA sowie 5  $\mu\text{L}$  Ladepuffer; DNA-Marker: 1 kb

Im Anschluss an die Colony-PCR wurden mit den Proben, die im Gel die entsprechende Bandenlänge aufwiesen, Flüssigkulturen gestartet. Nach der Plasmidaufreinigung am folgenden Tag wurden im 1 % Agarosegel die Proben für die Sequenzierung ausgewählt (Abbildung 5.4).

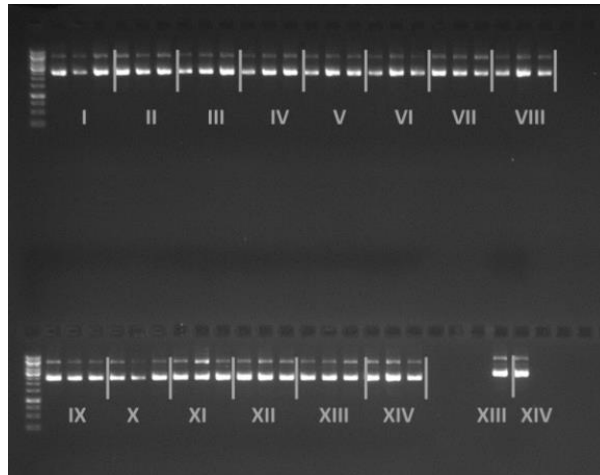


Abbildung 5.4: Die aufgereinigten Plasmide aller Kulturen (I-XIV) wurden als 3-fach Bestimmung in einem 1 % Agarosegel aufgetragen (Plasmidgröße: 3956 bp); verwendet wurden 1 µL DNA, 6 µL ddH<sub>2</sub>O und 3 µL Ladepuffer; Größe des DNA-Markers: 1 kb; anhand der Bandenstärke wurden die Proben zur Sequenzierung ausgewählt

Die Sequenzierung der aufgereinigten Proben erfolgte als Doppelbestimmung. Anschließend wurden die Sequenzen in der Datenbank BLAST auf Nukleotidhomologie überprüft und sind im Folgenden zusammengefasst. Kulturen mit gleicher Sequenz wurden zusammengefasst.

Sequenz für die Kulturen I und VIII:

```
TAAC TTTT ATCC GTT GAG CGAC GGC CCTTCC ACATGGA ACCGTC GGATCA-
CTAAGGCC GGCTTT CGCCCTGCTCGACTTGTAGGTCTTG CAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTT-
TACACTCTCCGGCTGATTTCCGTCCAGCCTGAGGGAACCTTTGCACACCTCCGTTACCTTT-
TAGGAGGTGACCGCCCAAGTCAAACCTGCCACCTGAAACTGTCAAGCGTCCTGCTTCAAG-
GAACGCCATTAGAATTCTAGCTCTCCAGAGTGGTCTCTCACTGTTGGCTCCAGTTT-
CCCCGAAAGAAAACCTTCAAAGCCTCCACCTAGGCTGCGCAAGAAGAGCCCGAACCCAATTCCAAGCTACAGTCAAGC
```

Sequenz für die Kultur II:

```
TAAC TTTT ATCC GATAAGCGACGGCCCTTCCACTCGGCACCGTCGGATCA-
CTAAGGCCGACTTTCTGCCCTGCTCGACTTGTGGTCTTG CAGTCAAGCTCCCTTCTGCCT-
TACACTCTCCAAGTATTCCCCTGCTCGACTGAGGGAACCTTTGCACGCCTCATTACTCTTT-
GGGAGGCCCTGCCCCAGAGAACTGTCTGCCTGGCACGGTTCGACGCCTATTG-
TAGGGCGCCGGTTAAGGATCTTAGCCCTTCCAGGGTGGTCTCTCACGGAT-
GGCTCTGCCCTCCCGGAGAGGGGCTTCTGTGCCTCCACCTAGGCTGCGCAGG-
GAGGGCCGAGACCCAATGCCAGGGAACAGTAAAGC
```

Sequenz für die Kultur III:

```
TAAC TTTT ATCC GTT TAGCGACGGCCCTTCCACACGGA ACCGTC GGATCA-
CTAAGGCC GGCTTT CGCCCTGCTCGACTTGTAGGTCTTG CAGTCAAGCTCCCTTTTGCCTT-
TACACTCTACGGCTGATTTCCGTCCAGCCTGAGGGAACCTTTGCACACCTCCGTTACCTTT-
TAGGAGGTGACCGCCCAAGTCAAACCTGCCACCTGAAACTGTCAAGCGTCCTGCTTCAAG-
GAACGCCATTAGAATTCTAGCTCTCCAGAGTGGTCTCTCACTGTTGGCTCCAGTAAAC-
CCAAAAGTTTACCTTCATAGCCTCCACCTAGGCTGCGCAAGAAGAGCCCGAACCCAATTCCAAGCTACAGTCAAGC
```

## Sequenz für die Kultur V:

GTAAC TTTTATCCGTTGAGCGACGGCCCTTCCACATGGAACCGTCGGATCA-  
CTAAGGCCGGCTTTCCGCCCTGCTCGACTTGTAGGTCTTGCAAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTT-  
TACACTCTACGGCTGATTTCCTGCCAGCCTGAGGGAACCTTTGCACACCTCCGTTACCTTT-  
TAGGAGGTGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCACCTGAAAATGTCAAGCGTCTGCTTCAAG-  
GAACGCCATTAGAATTCTAGCTCCTCCAGAGTGGTCTCTCACTGTTGGCTCCAGTTT-  
CCCCGAAAGAAAAC TTTCAACGCCTCCACCTAGGCTGCGCAAGAAGAGCCCGAACCCAATTCCAAGCTACAGTCAAGC

## Sequenz für die Kultur IX:

AGCTTGACTGTATCTTGGAAATGGGTTCCGGCTTTTCTTGCGCAGACTAGGTGGGAGGCTAT-  
GAAGATCTTCTCCGGGAAGGTTGGAGCCAACAGTGAGAGACCACTCTGGAGAGGCTAG-  
AATCCTAATGGTGATCCTTGAATCAGGACACTTGACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTTT-  
CTGGGGCGGAAGCCTCATAAAAGGTAAGTGAAGCGCGCAAAAGTCCCTCAGTCTGGACG-  
GAAATCAGACACTGAGTGTAAAGGCAAAAGGGGGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCTGAGCAG-  
GAGCGAAAGCTGGCCTTAGTGATCCGACGGTGTGAGTGAAAGGCCGTCGCTCAACGAATAAAAGTTA

## Sequenz für die Kultur X:

AGTAACTTTTATTCGTTGAGCGACGGCCCTTCCACTCAGCACCGTCGGATCA-  
CTAAGGCCAGCTTTCCGCTCTGCTCGACTTGTAGGTCTTGCAAGTCAAGCCCCCTTTTGCCTT-  
TACACTCAGTGTCTGATTTCCTGCCAGACTGAGGGGACCTTTGCGCGCTCAGTTACCTTT-  
TATGAGGCTTCCGCCCCAGAAAACTGCCACCTGAAACTGTCAAGTCTCTGATTCAAGGAT-  
CACCATTAGGATTCTAGCCTCTCCAGAGTGGTCTCTCACTGTTGGCTCCAACCTTCCCG-  
GAAGAAGATCTTCATAGCCTCCACCTAGTCTGCGCAAGAAAAGCCCGAACCCAATTCCAAGATACAGTCAAGC

## Sequenz für die Kultur XI:

GCTTGACTGTAGCTTGGAAATGGGTTCCGGCTCTTCTTGCGCAGCCTAGGTGGGAGGCTTT-  
GAAAGTTTTCTTTCCGGGAAACTGGAGCCAACAGTGAGAGACCACTCTGGAGGAGCTAG-  
AATTCTAATGGCGTTCCCTGAAGCAGGACGCTTGACAGTTTCAGGTGGGCAGTTT-  
GACTGGGGCGGTACCTCCTAAAAGGTAACGGAGGTGTGCAAAAGTTCCCTCAGGCTGGACG-  
GAAATCAGCCGAGAGTGTAAAGGCAGAAAGGGAGCTTGACTGCAAGAC-  
CTACAAGTCTGAGCAGGGGCGAAAGCCGGCCTTAGTGATCCGACGGTTCATGTGGAAGGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAGTTA

## Sequenz für die Kultur XII:

GCTTGACTGTAGCTTGGAAATGGGTTCCGGCTCTTCTTGCGCAGCCTAGGTGGGAGGCGTT-  
GAAAGTTTTCTTTCCGGGAAACTGGAGCCAACAGTGAGAGACCACTCTGGAGGAGCTG-  
GAATTCTAATGGCGTTCCCTGAAGCAGGACGCTTGACATTTTCAGGTGGGCAGTTT-  
GACTGGGGCGGTACCTCCTAAAAGGTAACGGAGGTGTGCAAAAGTTCCCTCAGGCTGGACG-  
GAAATCAGCCGAGAGTGTAAAGGCAGAAAGGGAGCTTGACTGCAAGAC-  
CTACAAGTCTGAGCAGGGGCGAAAGCCGGCCTTAGTGATCCGACGGTTCATGTGGAAGGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAGTTA

## Sequenz für die Kultur XIII:

AGCTTGACTGTAGCTTGGAAATGGGTTCCGGCTCTTCTTGCGCAGCCTAGGTGGGAGGCGTT-  
GAAAGTTTTCTTTGGGAAAAC TAGAGCCAACAGTGAGAGACCACTCTGGAGGAGCTAG-  
AATTCTAATGGCGTTCCCTGAAGCAGGACGCTTGACATTTTCAGGTGGGCAGTTT-  
GACTGGGGCGGTACCTCCTAAAAGGTAACGGAGGTGTGCAAAAGTTCCCTCAGGCTGGACG-  
GAAATCAGCCGAGAGTGTAAAGGCAGAAAGGGAGCTTGACTGCAAGAC-  
CTACAAGTCTGAGCAGGGGCGAAAGCCGGCCTTAGTGATCCGACGGTTCATGTGGAAGGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAGTTAC

## Sequenz für die Kulturen IV, VII und XIV:

GTAAC TTTTATCCGTTGAGCGACGGCCCTTCCACATGGAACCGTCGGATCA-  
CTAAGGCCGGCTTTCCGCCCTGCTCGACTTGTAGGTCTTGCAAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTT-  
TACACTCTACGGCTGATTTCCTGCCAGCCTGAGGGAACCTTTGCACACCTCCGTTACCTTT-  
TAGGAGGTGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCACCTGAAAATGTCAAGCGTCTGCTTCAAG-  
GAACGCCATTAGAATTCTAGCTCCTCCAGAGTGGTCTCTCACTGTTGGCTCCAGTTT-  
CCCCGAAAGAAAAC TTTCAAGCCTCCACCTAGGCTGCGCAAGAAGAGCCCGAACCCAATTCCAAGCTACAGTCAAGCT



Von den getesteten 14 Kulturen konnten acht Mikroalgen mit hoher Sequenzhomologie identifiziert werden (Tabelle 5.1). Zwei Kulturen konnten der Mikroalge *Chlorella* sp., drei Kulturen *Parachlorella* sp. und drei Kulturen der Mikroalgespezies *Coccomyxa* sp. zugeordnet werden. Eine Sequenz konnte nicht ausgewertet werden.

Tabelle 5.1: Tabellarische Übersicht der genotypisierten Mikroalgen (Kulturnummer), angegeben mit der Sequenzhomologie (BLAST)

Mikroalgen (isoliert im Sommer 2012)	Sequenz- homologie [%]	Mikroalgen (isoliert im Winter 2012)	Sequenz- homologie [%]
<i>Chlorella</i> sp. (XII)	99	<i>Chlorella</i> sp. (XI)	98
<i>Parachlorella</i> sp. (III)	94	<i>Parachlorella</i> sp. (I, VIII)	96
<i>Scenedesmus</i> sp. (IX)	96	<i>Klebsormidium</i> sp. (II)	97
<i>Neochloris</i> sp. (X)	90	<i>Pedinomonas</i> sp. (XIII)	92
<i>Ignatius</i> sp. (V)	92	<i>Coccomyxa</i> sp. (IV, VII, XIV)	93

Insgesamt konnten acht Mikroalgenpezies identifiziert werden: *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Klebsormidium* sp., *Pedinomonas* sp., *Coccomyxa* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp.. Die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. wurden sowohl im Sommer als auch im Winter isoliert (Abbildung 5.5).

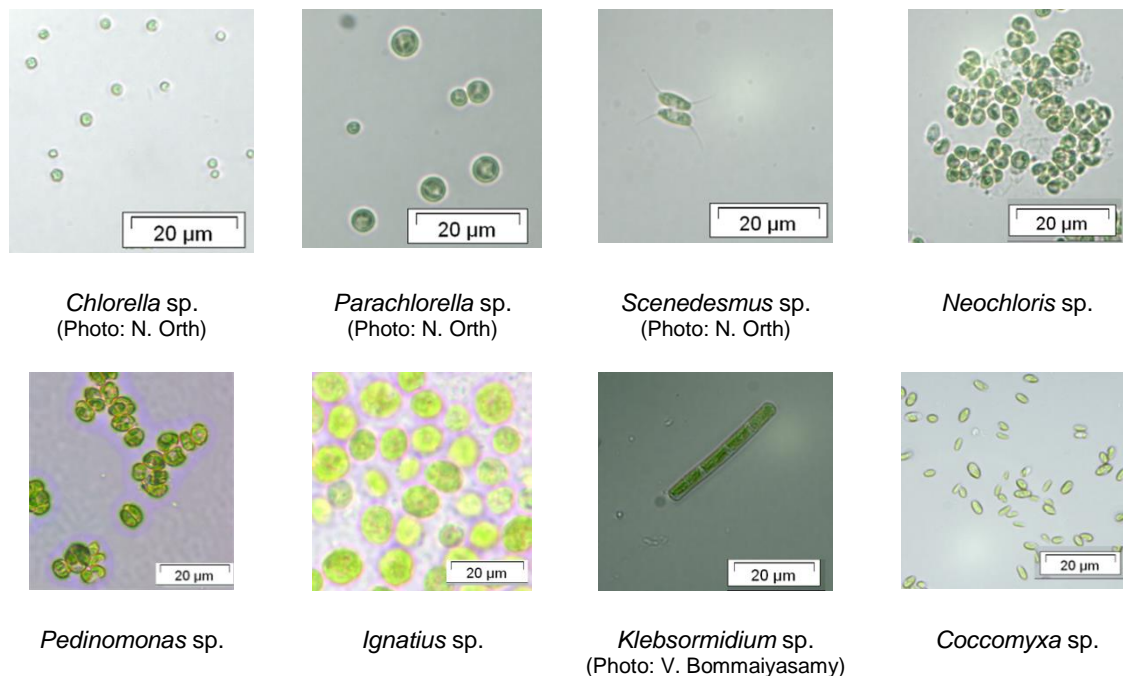


Abbildung 5.5: Mikroskopische Aufnahmen isolierter Mikroalgen in 400-facher Vergrößerung

### 5.1.2 Saisonale Häufigkeitsverteilung isolierter Mikroalgen

Zur Bestimmung der saisonalen Häufigkeit wurden gefilterte Wasserproben der drei Standorte im Januar 2014 und Juli 2014 mikroskopisch auf phänotypische Übereinstimmung mit den genotypisierten Mikroalgen überprüft (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Übersicht der durchschnittlichen Zellzahlen an den Messpunkten (a) Dornröschenbrücke in Linden-Nord, oberhalb des Klärwerks Herrenhausen (b) in der Nähe der Einleitstelle des Klärwerks Herrenhausen (c) ungefähr 3 km unterhalb des Klärwerks; dokumentiert wurden die Zellzahlen in der Winterperiode (Januar 2014) und Sommerperiode (Juli 2014)

Mikroalgen	Zellzahl [L <sup>-1</sup> ] an den Beprobungsorten			durchschnittliche Zellzahl [L <sup>-1</sup> ]
	a	b	c	
<b>Winter- periode</b>				
<i>Chlorella</i> sp.	1.427	960	4.440	<b>2.276</b>
<i>Parachlorella</i> sp.	1.827	1.000	3.840	<b>2.222</b>
<i>Klebsormidium</i> sp.	307	107	440	<b>284</b>
<i>Pedinomonas</i> sp.	1.493	853	3.240	<b>1.862</b>
<i>Coccomyxa</i> sp.	400	120	1.000	<b>507</b>
<b>Sommer- periode</b>				
<i>Chlorella</i> sp.	21.200	10.400	7.333	<b>12.978</b>
<i>Parachlorella</i> sp.	22.000	10.240	4.333	<b>12.191</b>
<i>Scenedesmus</i> sp.	10.960	7.040	4.667	<b>7.556</b>
<i>Neochloris</i> sp.	14.000	7.120	8.000	<b>9.707</b>
<i>Ignatius</i> sp.	20.560	9.680	4.733	<b>11.658</b>

Die Mikroalgenspezies *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. stellten sowohl im Sommer als auch im Winter einen großen Anteil der Algenpopulation dar. Daher konnten diese Mikroalgen im Folgenden genutzt werden, um klimatische Effekte zu dokumentieren.

### 5.1.3 Klimatische Effekte auf die Zellteilung und die Photosynthese

#### 5.1.3.1 Wachstum unter saisonalen Bedingungen

Die isolierten Mikroalgenspezies wurden unter Sommer- sowie Winterbedingungen in 24-Well Mikrotiterplatten mit sechs biologischen Wiederholungen (n=6) kultiviert. Je nach Mikroalgenspezies lag die Versuchsdauer zwischen 8 und 14 Tagen. Die berechneten Wachstumsraten in Tabelle 5.3 verdeutlichten einen Klimaeffekt, so dass unter Sommerbedingungen signifikant höhere Zellzunahmen pro Tag erreicht wurden (254.000 – 7.759.020 Zellen d<sup>-1</sup>). Unter Winterbedingungen lagen die durchschnittlichen Raten im Bereich von 32.000 – 962.651 Zellen d<sup>-1</sup>.

Tabelle 5.3: Auflistung des durchschnittlichen Wachstums in Zellen  $d^{-1}$  über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen; die Mikroalgen wurden in 24-Well Platten bei Winter- sowie Sommerbedingungen unter Laborbedingungen kultiviert (n=6); Wachstum wurde über die Messung der optischen Dichte bei 850 nm bestimmt

Mikroalgen	Zellzunahme [ $d^{-1}$ ]	
	Winterbedingungen	Sommerbedingungen
<i>Chlorella</i> sp.	645.778	7.759.020
<i>Parachlorella</i> sp.	962.651	4.676.501
<i>Klebsormidium</i> sp.	32.000	254.000
<i>Pedinomonas</i> sp.	366.667	1.178.889
<i>Coccomyxa</i> sp.	237.879	789.444
<i>Scenedesmus</i> sp.	133.111	1.001.111
<i>Neochloris</i> sp.	153.736	3.912.541
<i>Ignatius</i> sp.	138.103	383.154

### 5.1.3.2 Pigmente der Photosynthese

Die Bestimmung der photosynthetischen Pigmente erfolgte nach einer Versuchsdauer von vier Tagen. Alle isolierten Mikroalgen wurden sowohl unter Winter- als auch Sommerbedingungen im Labor kultiviert (Tabelle 5.4 und Tabelle 5.5).

Deutliche klimatische Effekte auf den Pigmentgehalt konnten in der Mikroalge *Klebsormidium* sp. beobachtet werden. Eine Kultivierung unter simulierten Winterbedingungen führte zu einer Reduzierung des Pigmentgehaltes um annähernd 50 %.

In den anderen Mikroalgen wurden keine bzw. ausschließlich geringe Unterschiede dokumentiert.

Tabelle 5.4: Dokumentierte Pigmentgehalte (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotinoide) wurden in Mikroalgenkulturen, kultiviert unter simulierten Winterbedingungen, bestimmt; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen (n=3)

Mikroalgen	Pigmentgehalte pro $10^6$ Zellen [mg]		
	- simulierte Winterbedingungen -		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotinoide
<i>Chlorella</i> sp.	0,62 $\pm$ 0,11	0,21 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,03
<i>Parachlorella</i> sp.	0,54 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01
<i>Klebsormidium</i> sp.	2,54 $\pm$ 0,34	0,79 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,14
<i>Pedinomonas</i> sp.	0,85 $\pm$ 0,13	0,28 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,02
<i>Coccomyxa</i> sp.	0,92 $\pm$ 0,10	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,04
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,99 $\pm$ 0,16	0,20 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,05
<i>Neochloris</i> sp.	0,85 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01
<i>Ignatius</i> sp.	0,79 $\pm$ 0,15	0,25 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,06

Tabelle 5.5: Dokumentierte Pigmentgehalte (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotinoide) wurden in Mikroalgenkulturen, kultiviert unter simulierten Sommerbedingungen, bestimmt; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen (n=3)

Mikroalgen	Pigmentgehalte pro $10^6$ Zellen [mg]		
	- simulierte Sommerbedingungen -		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotinoide
<i>Chlorella</i> sp.	0,51 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01
<i>Parachlorella</i> sp.	0,58 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02
<i>Klebsormidium</i> sp.	5,79 $\pm$ 0,72	2,20 $\pm$ 0,30	1,75 $\pm$ 0,22
<i>Pedinomonas</i> sp.	1,03 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02
<i>Coccomyxa</i> sp.	0,36 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,02
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,61 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,04
<i>Neochloris</i> sp.	0,90 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02
<i>Ignatius</i> sp.	0,56 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01

### 5.1.3.1 Energieverwertung während der Photosynthese

Um den Einfluss saisonaler Unterschiede auf die photosynthetische Aktivität der Mikroalgenspezies dokumentieren zu können, wurden entsprechende Reinkulturen vier Tage unter Sommer- bzw. Winterbedingungen im Labor angezogen. Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Kulturen auf  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  verdünnt und die Sauerstoffentwicklung unter den definierten Anzuchtsbedingungen in einer Sauerstoffelektrode gemessen.

In allen Mikroalgenkulturen wurden unter Sommerbedingungen höhere photosynthetische Aktivitäten gemessen (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Gemessene photosynthetische Sauerstoffentwicklung der Mikroalgenkulturen, kultiviert unter saisonalen Bedingungen, in einer Sauerstoffelektrode (Hansatech, Typ Oxygraph 10002); angegeben ist die  $\text{O}_2$ -Entwicklung in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen als Mittelwert (n=3)  $\pm$  STABW

	Photosynthetische Aktivität pro $10^6$ Zellen [ $\text{nmol min}^{-1}$ ]	
	Winterbedingungen	Sommerbedingungen
<i>Chlorella</i> sp.	3,07 $\pm$ 0,13	13,0 $\pm$ 0,60
<i>Parachlorella</i> sp.	2,56 $\pm$ 0,11	9,53 $\pm$ 0,65
<i>Scenedesmus</i> sp.	2,99 $\pm$ 0,04	6,69 $\pm$ 0,51
<i>Neochloris</i> sp.	1,92 $\pm$ 0,27	8,61 $\pm$ 0,54
<i>Ignatius</i> sp.	1,98 $\pm$ 0,12	5,08 $\pm$ 0,14
<i>Klebsormidium</i> sp.	1,97 $\pm$ 0,17	7,26 $\pm$ 0,55
<i>Pedinomonas</i> sp.	3,26 $\pm$ 0,27	5,38 $\pm$ 0,48
<i>Coccomyxa</i> sp.	2,45 $\pm$ 0,11	13,5 $\pm$ 0,46

Zusätzlich zur photosynthetischen Aktivität wurden die Lichtkompensationspunkte der Mikroalgen bestimmt. Hierfür wurde die photosynthetische Aktivität der Mikroalgen bei unterschiedlichen Lichtintensitäten von 10 bis 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gemessen und logarithmisch gefittet. Die Messungen erfolgten zudem unter den definierten Sommer- und Winterbedingungen. Die logarithmische Kurvengleichung diente der Berechnung der Lichtintensität, bei welcher die Aufnahme und Freisetzung von  $\text{CO}_2$  identisch sind.

Die photosynthetische Aktivität in Abhängigkeit von der Lichtintensität sowie der saisonalen Bedingungen ist beispielhaft für die Mikroalge *Chlorella* sp. aufgezeigt (Abbildung 5.6). Zusätzlich ist der logarithmische Kurvenfit eingetragen.

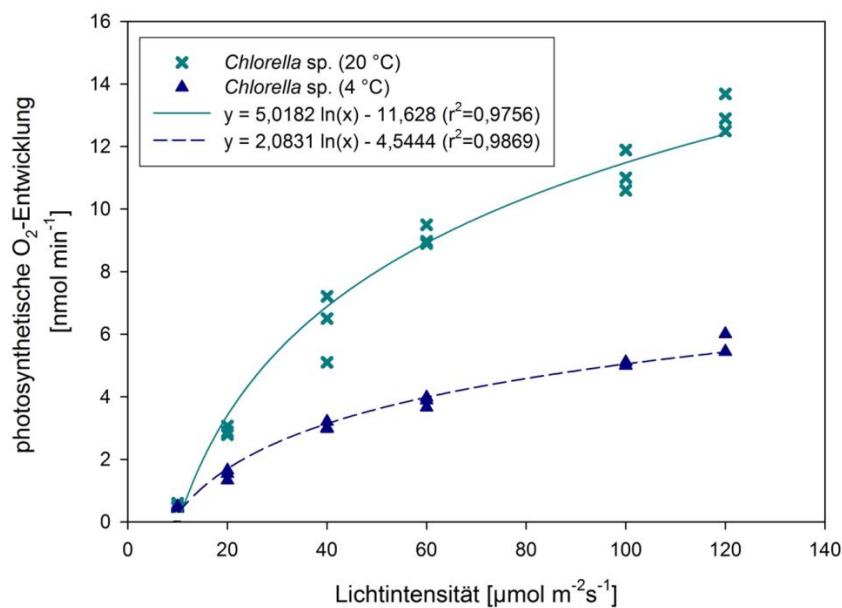


Abbildung 5.6: Photosynthetische  $\text{O}_2$ -Entwicklung pro  $10^6$  Zellen in Abhängigkeit von der Lichtintensität und saisonalen Bedingungen für die Mikroalge *Chlorella* sp. ( $n=3$ ), logarithmisch gefittet

Eine Übersicht der Lichtintensitäten in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  am Kompensationspunkt für die Mikroalgen bietet Tabelle 5.7. Es wird deutlich, dass die Kulturen, die unter Sommerbedingungen kultiviert wurden, höhere Lichtkompensationspunkte im Vergleich zu den Mikroalgen, kultiviert unter Winterbedingungen erreichten.

Tabelle 5.7: Auflistung der Lichtintensitäten am Kompensationspunkt in  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  für die untersuchten Mikroalgen, die Berechnung erfolgte anhand gemessener photosynthetischer Aktivitäten in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen bei verschiedenen Lichtintensitäten zwischen 10 und  $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; es wurden die Temperaturen entsprechend der Kultivierung eingestellt ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ); die Messwerte dreier biologischer Wiederholungen dienten als Datengrundlage für den logarithmischen Kurvenfit.

	Lichtkompensationspunkt pro $10^6$ Zellen [ $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ]	
	Winterbedingungen	Sommerbedingungen
<i>Chlorella</i> sp.	8,86	10,2
<i>Parachlorella</i> sp.	8,45	8,89
<i>Klebsormidium</i> sp.	5,83	6,68
<i>Pedinomonas</i> sp.	6,90	9,49
<i>Coccomyxa</i> sp.	8,65	9,88
<i>Scenedesmus</i> sp.	5,99	8,60
<i>Neochloris</i> sp.	7,50	7,84
<i>Ignatius</i> sp.	6,66	8,30

### 5.1.3.2 Produkte der Photosynthese

Die isolierten Mikroalgen wurden unter simulierten Sommer- und Winterbedingungen für vier Tage kultiviert, um den klimatischen Einfluss auf den Protein- und Zuckergehalt untersuchen zu können.

Die Proteingehalte in Tabelle 5.8 sind in  $\mu\text{g}$  pro  $10^6$  Zellen angegeben. In allen Kulturen wurden unter Winterbedingungen höhere Proteingehalte gemessen. Die gemessenen Proteingehalte lagen im Bereich von  $5,96$  bis  $52,2 \mu\text{g}$ . Hingegen wurden in den Sommerkulturen Proteingehalte zwischen  $2,23$  und  $35,3 \mu\text{g}$  dokumentiert.

Tabelle 5.8: Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte unter saisonalen Kultivierungsbedingungen; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt ( $n=3$ )  $\pm$  STABW in  $\mu\text{g}$  pro  $10^6$  Zellen ( $n=3$ )

	Proteingehalt pro $10^6$ Zellen [ $\mu\text{g}$ ]	
	Winterbedingungen	Sommerbedingungen
<i>Chlorella</i> sp.	$5,96 \pm 0,40$	$2,23 \pm 0,07$
<i>Parachlorella</i> sp.	$7,85 \pm 0,56$	$5,92 \pm 0,57$
<i>Klebsormidium</i> sp.	$52,2 \pm 2,79$	$35,3 \pm 0,76$
<i>Pedinomonas</i> sp.	$8,52 \pm 2,24$	$5,83 \pm 0,79$
<i>Coccomyxa</i> sp.	$13,8 \pm 1,33$	$5,53 \pm 0,52$
<i>Scenedesmus</i> sp.	$15,5 \pm 5,77$	$5,85 \pm 0,62$
<i>Neochloris</i> sp.	$9,41 \pm 0,33$	$7,02 \pm 0,39$
<i>Ignatius</i> sp.	$10,5 \pm 1,87$	$3,90 \pm 0,36$

Die Zuckeranalysen wiesen deutliche Streuungen in den biologischen Wiederholungen auf. Die Gehalte wurden in ng pro  $10^6$  Zellen berechnet und sind in Tabelle 5.9 aufgelistet. In den Kulturen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Coccomyxa* sp., *Scenedesmus* sp. und *Neochloris* sp. wurden unter Sommerbedingungen höhere Zuckergehalte gemessen. Dokumentiert wurden Zuckergehalte zwischen 76,5 und 139,4 ng. In den Kulturen der Mikroalgen *Klebsormidium* sp., *Pedinomonas* sp. und *Ignatius* sp. wurden hingegen höhere Zuckergehalte unter Winterbedingungen (43,9 - 220,3 ng) analysiert.

Tabelle 5.9: Die Bestimmung des Zuckergehalts erfolgte unter saisonalen Kultivierungsbedingungen; angegeben ist der durchschnittliche Gehalt ( $n=3$ )  $\pm$  STABW in ng pro  $10^6$  Zellen ( $n=3$ )

	Zuckergehalt pro $10^6$ Zellen [ng]	
	Winterbedingungen	Sommerbedingungen
<i>Chlorella</i> sp.	66,7 $\pm$ 33,6	83,8 $\pm$ 36,7
<i>Parachlorella</i> sp.	61,4 $\pm$ 36,3	107,5 $\pm$ 45,4
<i>Klebsormidium</i> sp.	55,9 $\pm$ 29,3	26,3 $\pm$ 19,2
<i>Pedinomonas</i> sp.	43,9 $\pm$ 27,7	40,9 $\pm$ 36,4
<i>Coccomyxa</i> sp.	33,6 $\pm$ 18,7	139,4 $\pm$ 67,9
<i>Scenedesmus</i> sp.	25,1 $\pm$ 14,7	102,8 $\pm$ 63,2
<i>Neochloris</i> sp.	56,6 $\pm$ 40,7	76,5 $\pm$ 36,4
<i>Ignatius</i> sp.	220,3 $\pm$ 55,4	51,2 $\pm$ 27,4

#### 5.1.4 Algenauswahl Part I

Die Analysen in diesem Abschnitt dienen der Dokumentation saisonaler Effekte auf die Mikroalgenpopulationen. Anhand der erzielten Ergebnisse wurden geeignete Mikroalgen für weitergehende Analysen ausgewählt. Im Hinblick auf einen ganzjährigen Einsatz der Mikroalgen in der CBZ-Bioremediation lag der Fokus bei der Auswahl geeigneter Kandidaten auf der saisonalen Unempfindlichkeit (gutes Wachstumsverhalten unter Sommer und Winterbedingungen). Für weitere Analysen wurden die Mikroalgenpezies *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. ausgewählt.

Nicht weiter untersucht wurde die Mikroalge *Klebsormidium* sp., da für diese Mikroalge negative klimatische Effekte auf die photosynthetischen Parameter aufgezeigt werden konnte. Am stärksten betroffen war der Pigmentgehalt, so dass auf eine Hemmung der photosynthetischen Leistung unter Winterbedingungen geschlossen werden konnte.

## 5.2 CBZ-Konzentration in der Leine

Die Konzentrationen von CBZ sowie der wichtigsten Metabolite in der Leine wurden im Winter (Januar 2014) und im Sommer (Juli 2014) gemessen.

Die mittlere CBZ-Konzentration lag sowohl im Winter (Abbildung 5.7) als auch im Sommer (Abbildung 5.8) im Bereich von  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Die Konzentrationen gebildeter Metabolite variierten jedoch in Abhängigkeit von der Jahreszeit und deuten auf höhere Abbauraten unter Sommerbedingungen hin. Die Konzentrationen des Metabolits CBZ 10,11-epoxid variierten im Sommer zwischen  $0,003$  und  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ . Im Winter wurde ein Konzentrationsbereich von  $0,018$  bis  $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Das Metabolit CBZ-diol wurde unabhängig der Jahreszeit in höherer Konzentration als die Ausgangsverbindung CBZ gemessen. Im Sommer lag die Konzentration im Bereich von  $0,12$  bis  $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ . Entsprechende Konzentrationen im Winter lagen im Bereich von  $0,27$  bis  $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$ . Die gemessenen Konzentrationen weiterer Metabolite waren signifikant reduziert gegenüber der Ausgangssubstanz CBZ.

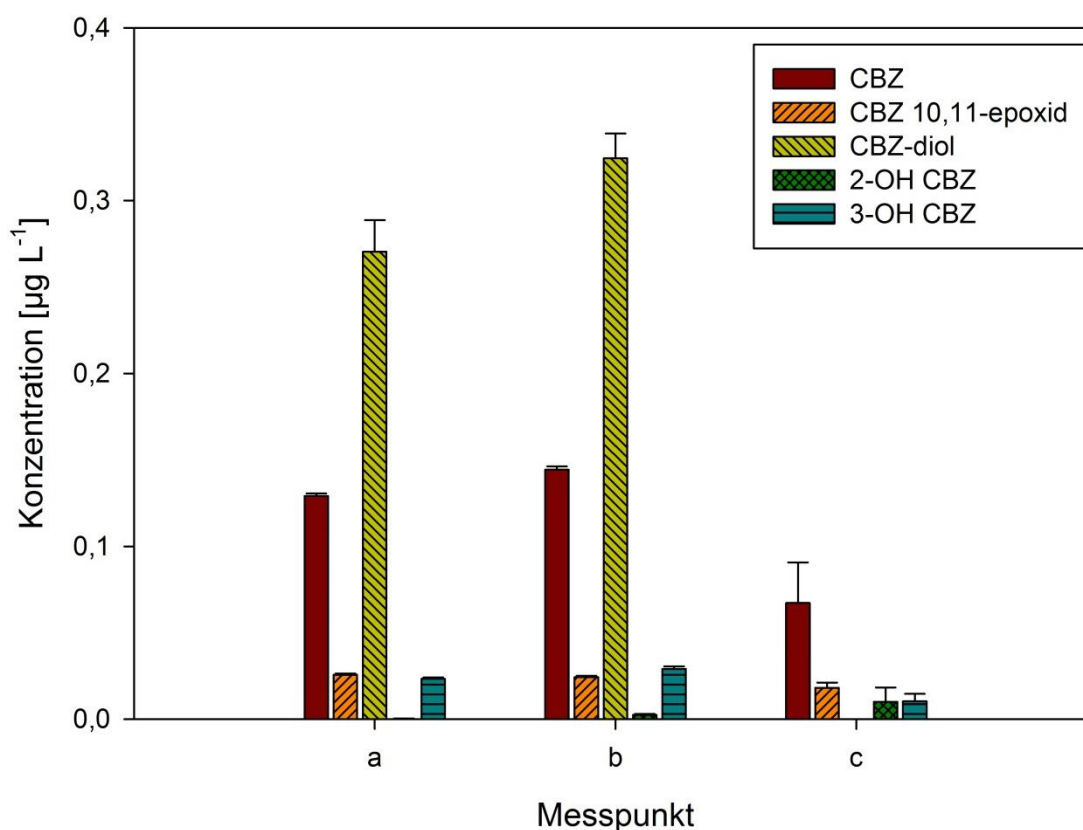


Abbildung 5.7: Konzentrationen von Carbamazepin (CBZ) und den wichtigsten Metaboliten 10,11-Dihydro-10,11-epoxy CBZ (CBZ 10,11-epoxid), 10,11-dihydro-10,11 dihydroxy CBZ (CBZ-diol), 2-Hydroxy CBZ (2-OH CBZ) und 3-Hydroxy CBZ (3-OH CBZ) an drei Messpunkten im **Januar 2014**; (a) Dornröschenbrücke in Linden-Nord, oberhalb des Klärwerks Herrenhausen (b) in der Nähe der Einleitstelle des Klärwerks Herrenhausen (c) ungefähr 3 km unterhalb des Klärwerks; die Messungen erfolgten in der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM, Deutschland)



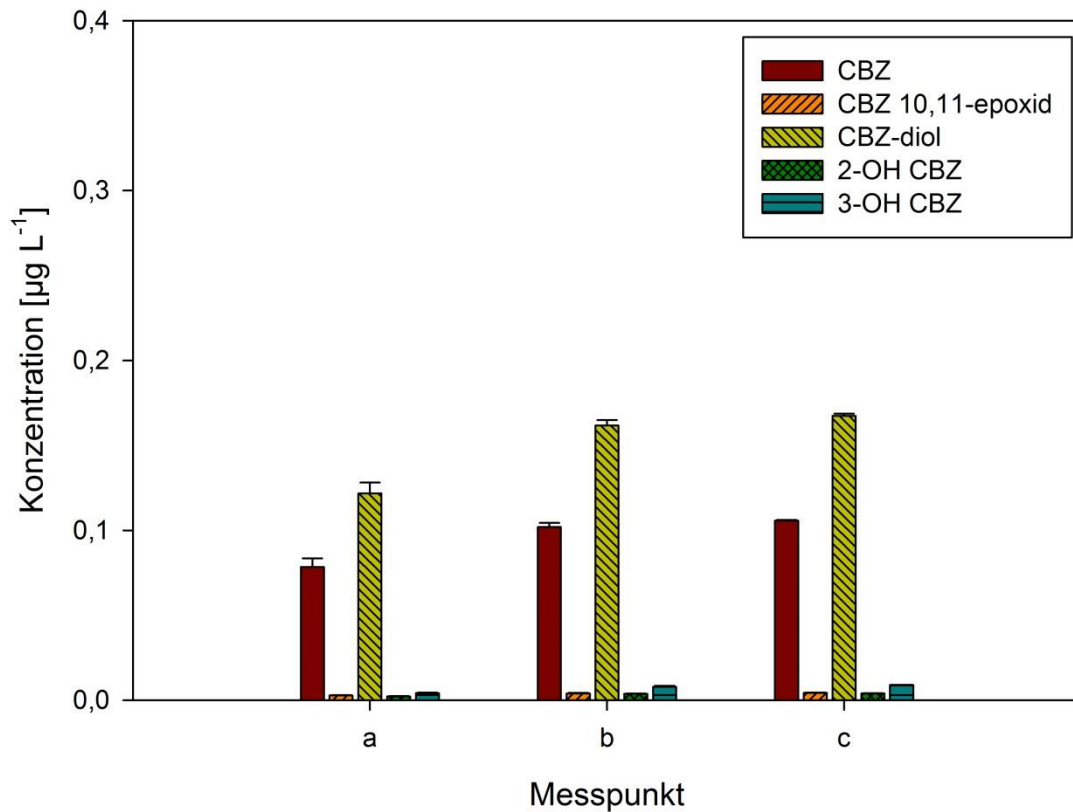


Abbildung 5.8: Konzentrationen von Carbamazepin (CBZ) und den wichtigsten Metaboliten 10,11-Dihydro-10,11-epoxy CBZ (CBZ 10,11-epoxid), 10,11-dihydro-10,11 dihydroxy CBZ (CBZ-diol), 3-Hydroxy CBZ (3-OH CBZ) und 2-Hydroxy CBZ (2-OH CBZ) an drei Messpunkten im **Juli 2014**; (a) Dornröschenbrücke in Linden-Nord, oberhalb des Klärwerks Herrenhausen (b) in der Nähe der Einleitstelle des Klärwerks Herrenhausen (c) ungefähr 3 km unterhalb des Klärwerks; die Messungen erfolgten in der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM, Deutschland)

### 5.3 CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat

Der Einfluss von CBZ auf die Photosynthese der im Abschnitt 5.1 ausgewählten Mikroalgen wurde in diesem Abschnitt getestet (Haase *et al.* 2015b). Die dargestellten Ergebnisse sollen einen detaillierten Einblick in die CBZ-Wirkung auf Mikroalgen unter simulierten Sommerbedingungen geben. Die Messdaten für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp. und *Ignatius* sp. in der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe von 0 bis 1000 µg L<sup>-1</sup> wurden im Rahmen der Masterarbeit von Panas (2015) erhoben. In einer weiteren Studie wurden in der ersten CBZ-Konzentrationsmessreihe Wachstumsmessungen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. durchgeführt sowie die photosynthetischen Parameter für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. bestimmt (Bommaiyasamy 2014). Die Auswertung erfolgte am Ende der Kulturdauer von 14 Tagen, um physiologische Anpassungseffekte beurteilen zu können. Zur Schaffung einer Vergleichbarkeit der Daten, wurden die Pigment- und Produktgehalte der Photosynthese auf 10<sup>6</sup> Zellen bezogen. Weitere Messparameter sind als Verhältniswerte angegeben.

#### 5.3.1 Wachstum unter CBZ-Einfluss

In unabhängigen Versuchen wurden die durchschnittlichen Wachstumsraten über den gesamten Versuchszeitraum der Mikroalgenpopulation unter Einfluss von 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ getestet (Tabelle 5.10 bis Tabelle 5.12). Die Mikroalgen wurden als Schüttelkultur unter Sommerbedingungen 14 Tage kultiviert.

Für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp. und *Scenedesmus* sp. wurden die Wachstumsraten in verschiedene Konzentrationsmessreihen ermittelt (erste Messreihe: 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ; zweite Messreihe: 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ). Da die Wachstumsraten in den Kontrollkulturen in den einzelnen Bestimmungen variierten, ist für die Mikroalgen der entsprechende Trend aufgezeigt ((+) erhöhte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle; (-) reduzierte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle; (/) keine Veränderungen im Wachstumsverhalten).

Tabelle 5.10: Trend der durchschnittlichen Wachstumsraten für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Neochloris* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ; zweite Messreihe: 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (+) erhöhte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle; (-) reduzierte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle; (/) keine Veränderungen im Wachstumsverhalten (n=3)

Trend der Wachstumsraten						
CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.
0,1	+		/		+	
1	+		/		+	
10	+	+	+	+	+	+
100		+		+		+
1.000		+		+		+

Tabelle 5.11: Trend der durchschnittlichen Wachstumsraten für *Ignatius* sp. und *Scenedesmus* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ; zweite Messreihe: 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (+) erhöhte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle; (-) reduzierte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle (n=3)

Trend der Wachstumsraten				
CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	<i>Ignatius</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.
0,1	+		+	
1	+		+	
10	+	+	+	+
100		+		+
1.000		+		+

Für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp. und *Scenedesmus* sp. wurde in beiden Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ; zweite Messreihe: 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ) ein gesteigertes Wachstum gemessen. CBZ-Konzentrationen bis 1 µg L<sup>-1</sup> hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von *Parachlorella* sp.. Höhere CBZ-Konzentrationen führten zu einem verstärkten Wachstum.

In Tabelle 5.12 sind die durchschnittlichen Wachstumsraten von *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. für die erste Konzentrationsmessreihe (0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ) aufgezeigt. In den Kulturen von *Pedinomonas* sp. hatten die getesteten CBZ-Konzentrationen 0,1 und 10 µg L<sup>-1</sup> einen hemmenden Effekt auf das durchschnittliche Wachstum der Populationen. Ausschließlich 1 µg L<sup>-1</sup> zeigte einen wachstumsstimulierenden Effekt. Auf die Populationen von *Coccomyxa* sp. hatte CBZ in allen CBZ-Konzentrationen einen hemmenden Effekt.

Aufgrund der dokumentierten Wachstumshemmung bereits in der ersten Konzentrationsmessreihe, wurde auch in den folgenden Versuchen der CBZ-Effekt ausschließlich in der ersten Konzentrationsmessreihe getestet.

Tabelle 5.12: Trend der durchschnittlichen Wachstumsraten für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (+) erhöhte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle; (-) reduzierte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle (n=3)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	Trend der Wachstumsraten	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0,1</b>	-	-
<b>1</b>	+	-
<b>10</b>	-	-

### 5.3.2 Pigmente der Photosynthese

#### 5.3.2.1 Chlorophyll a

Die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. wurden in beiden Konzentrationsmessreihen auf den Chlorophyll a-Gehalt getestet (Tabelle 5.13).

In Kulturen von *Chlorella* sp. konnten in der ersten Messreihe signifikant erhöhte Chlorophyll a-Gehalte bei 0,1 und 1 µg L<sup>-1</sup> CBZ gemessen werden. Eine Konzentration von 10 µg L<sup>-1</sup> bewirkte keine signifikanten Veränderungen. Der Trend bei 10 µg L<sup>-1</sup> konnte in der zweiten Messreihe nicht bestätigt werden. In dieser Konzentrationsmessreihe führte eine CBZ-Konzentration von 10 µg L<sup>-1</sup> zu einem reduzierten Chlorophyll a-Gehalt, während eine erneute Steigerung des Gehalts mit 100 µg L<sup>-1</sup> CBZ erzielt wurde. Höhere Konzentrationen führten zu keinen signifikanten Veränderungen.

In Kulturen von *Parachlorella* sp. wurden mit steigender CBZ-Konzentration eine Abnahme des Chlorophyll a-Gehaltes in beiden CBZ-Konzentrationsmessreihen gemessen. Die reduzierten Chlorophyll a-Gehalte unter Einfluss von 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ wurde in beiden Konzentrationsmessreihen dokumentiert.

Tabelle 5.13: Aufgeführt ist der Chlorophyll a-Gehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Chlorophyll a-Gehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Chlorophyll a-Gehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	1,31 $\pm$ 0,11	0,86 $\pm$ 0,07	<b>0</b>	0,77 $\pm$ 0,04	1,17 $\pm$ 0,07
<b>0,1</b>	<b>1,67*</b> $\pm$ 0,10	<b>0,58*</b> $\pm$ 0,05			
<b>1</b>	<b>1,52*</b> $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,06			
<b>10</b>	1,13 $\pm$ 0,11	<b>0,68*</b> $\pm$ 0,08	<b>10</b>	<b>0,50*</b> $\pm$ 0,04	<b>0,83*</b> $\pm$ 0,05
			<b>100</b>	<b>0,95*</b> $\pm$ 0,10	<b>0,91*</b> $\pm$ 0,14
			<b>1.000</b>	0,76 $\pm$ 0,08	<b>0,80*</b> $\pm$ 0,03

Der CBZ-Einfluss auf den Chlorophyll a-Gehalt wurde für die Mikroalgen *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in der zweiten Konzentrationsmessreihe gemessen (Tabelle 5.14). Eine signifikante Verringerung des Chlorophyll a-Gehalts in Kulturen von *Scenedesmus* sp. konnte bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ gemessen werden. Steigende CBZ-Konzentrationen zeigten keinen Effekt bzw. der Effekt konnte nicht statistisch abgesichert werden. In Kulturen von *Neochloris* sp. führt eine CBZ-Konzentration von  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  zu einem signifikant erhöhten Chlorophyll a-Gehalt. Weitere CBZ-Konzentrationen erzielten keinen Effekt. Ein möglicher Effekt bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ konnte nicht statistisch abgesichert werden. Auf den Chlorophyll a-Gehalt der Mikroalge *Ignatius* sp. hatte CBZ keinen Einfluss.

Tabelle 5.14: Aufgeführt ist der Chlorophyll a-Gehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (<sup>1</sup>) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Chlorophyll a-Gehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	0,28 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,09	2,33 $\pm$ 0,36
<b>10</b>	<b>0,22*</b> $\pm$ 0,04	0,76 <sup>1</sup> $\pm$ 0,08	2,35 $\pm$ 0,21
<b>100</b>	0,29 <sup>1</sup> $\pm$ 0,06	<b>1,01*</b> $\pm$ 0,05	2,34 $\pm$ 0,16
<b>1.000</b>	0,28 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,10	2,39 $\pm$ 0,32

In der ersten Messreihe wurde eine signifikante Verringerung des Chlorophyll a-Gehalts mit steigender CBZ-Konzentration in den Mikroalgenpopulationen von *Pedinomonas* sp. gemessen. In Kulturen von *Coccomyxa* sp. führte  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ zu einer Abnahme im

Chlorophyll a-Gehalt. Weitere CBZ-Konzentrationen zeigten keinen Effekt bzw. der Effekt konnte nicht statistisch abgesichert werden (Tabelle 5.15).

Tabelle 5.15: Aufgeführt ist der Chlorophyll a-Gehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (<sup>1</sup>) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Chlorophyll a-Gehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	1,61 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,07
<b>0,1</b>	<b>1,40*</b> $\pm$ 0,10	0,94 <sup>1</sup> $\pm$ 0,07
<b>1</b>	<b>1,38*</b> $\pm$ 0,06	<b>0,54*</b> $\pm$ 0,15
<b>10</b>	<b>1,27*</b> $\pm$ 0,11	0,97 $\pm$ 0,14

### 5.3.2.2 Chlorophyll b

In Kulturen von *Chlorella* sp. wurde bei  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine signifikante Steigerung des Chlorophyll b-Gehalts beobachtet.  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ führte in beiden Konzentrationsmessreihen zu einer Abnahme im Chlorophyll b-Gehalt. Weitere getestete Konzentrationen erzielten keinen signifikanten Effekt. In den Populationen der Mikroalge *Parachlorella* sp. bewirkte CBZ in allen Konzentrationsstufen eine signifikante Abnahme des Chlorophyll b-Gehalts. Die Gehalte beider Mikroalgen sind in Tabelle 5.16 aufgelistet.

Tabelle 5.16: Aufgeführt ist der Chlorophyll b-Gehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (<sup>1</sup>) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Chlorophyll b-Gehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Chlorophyll b-Gehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	0,70 $\pm$ 0,24	0,40 $\pm$ 0,05	<b>0</b>	0,28 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,03
<b>0,1</b>	<b>1,14*</b> $\pm$ 0,28	<b>0,28*</b> $\pm$ 0,12			
<b>1</b>	0,76 $\pm$ 0,15	<b>0,28*</b> $\pm$ 0,07			
<b>10</b>	<b>0,49*</b> $\pm$ 0,10	<b>0,24*</b> $\pm$ 0,07	<b>10</b>	<b>0,15*</b> $\pm$ 0,02	<b>0,24*</b> $\pm$ 0,02
			<b>100</b>	0,34 <sup>1</sup> $\pm$ 0,07	<b>0,26*</b> $\pm$ 0,04
			<b>1.000</b>	0,24 $\pm$ 0,04	<b>0,23*</b> $\pm$ 0,01

10 und 100 µg L<sup>-1</sup> CBZ führten zu reduzierten Chlorophyll b-Gehalten in *Scenedesmus* sp.. Höhere Konzentrationen erzielten keinen Effekt. In Kulturen von *Neochloris* sp. wurden signifikant erhöhte Werte ab einer Konzentration von 100 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Es wurde kein CBZ-Effekt in den Kulturen von *Ignatius* sp. gemessen (Tabelle 5.17).

Tabelle 5.17: Aufgeführt ist der Chlorophyll b-Gehalt ± STABW in mg pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	Chlorophyll b-Gehalt pro 10 <sup>6</sup> Zellen [mg]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	0,08±0,02	0,19±0,03	0,58±0,19
<b>10</b>	<b>0,05*±0,01</b>	0,20±0,02	0,53±0,06
<b>100</b>	<b>0,06*±0,02</b>	<b>0,25*±0,02</b>	0,52±0,06
<b>1.000</b>	0,06±0,01	<b>0,23*±0,01</b>	0,53±0,09

CBZ hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Chlorophyll b-Gehalt in *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. (Tabelle 5.18).

Tabelle 5.18: Aufgeführt ist der Chlorophyll b-Gehalt ± STABW in mg pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	Chlorophyll b-Gehalt pro 10 <sup>6</sup> Zellen [mg]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	0,56±0,15	0,37±0,09
<b>0,1</b>	0,71±0,08	0,53±0,19
<b>1</b>	0,68±0,20	0,49±0,32
<b>10</b>	0,67±0,21	0,63±0,34

### 5.3.2.3 Carotinoide

In Kulturen von *Chlorella* sp. wurde ein verringerter Carotinoidgehalt in beiden CBZ-Messreihen mit 10 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Höhere CBZ-Konzentrationen (100 µg L<sup>-1</sup>) führten zu einem signifikanten Anstieg des Carotinoidgehalts. Ein Anstieg des Carotinoidgehalts bei niedrigeren CBZ-Konzentrationen konnte nicht statistisch abgesichert werden. In den Populationen der Mikroalge *Parachlorella* sp. bewirkte CBZ in allen Konzentrationsstufen eine signifikante Abnahme des Carotinoidgehalts. Die Carotinoidgehalte sind für beide Mikroalgen in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration in Tabelle 5.19 aufgezeigt.

## ERGEBNISSE

Tabelle 5.19: Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (<sup>1</sup>) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Carotinoidgehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Carotinoidgehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	0,66 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,04	<b>0</b>	0,16 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02
<b>0,1</b>	0,75 $\pm$ 0,07	<b>0,42*</b> $\pm$ 0,06			
<b>1</b>	0,74 <sup>1</sup> $\pm$ 0,06	<b>0,44*</b> $\pm$ 0,07			
<b>10</b>	<b>0,52*</b> $\pm$ 0,06	<b>0,41*</b> $\pm$ 0,08	<b>10</b>	<b>0,10*</b> $\pm$ 0,02	<b>0,23*</b> $\pm$ 0,02
			<b>100</b>	<b>0,21*</b> $\pm$ 0,02	<b>0,26*</b> $\pm$ 0,04
			<b>1.000</b>	0,17 $\pm$ 0,03	<b>0,22*</b> $\pm$ 0,01

In Kulturen von *Scenedesmus* sp. bewirkten  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine Abnahme des Carotinoidgehalts. Höhere Konzentrationen erzielten keinen signifikanten Effekt. In Kulturen von *Neochloris* sp. wurden signifikant erhöhte Werte bei CBZ-Konzentrationen von 100 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Es wurde kein CBZ-Effekt in den Kulturen von *Ignatius* sp. gemessen. Zusammengefasst sind die Ergebnisse dieser Mikroalgen in Tabelle 5.20.

Tabelle 5.20: Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (<sup>1</sup>) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Carotinoidgehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	0,08 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,09
<b>10</b>	<b>0,06*</b> $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,05
<b>100</b>	0,08 <sup>1</sup> $\pm$ 0,01	<b>0,34*</b> $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,06
<b>1.000</b>	0,09 $\pm$ 0,02	<b>0,28*</b> $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,10

Der Carotinoidgehalt in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration ist für die Mikroalgen *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Tabelle 5.21 zusammengefasst. Der Carotinoidgehalt in Kulturen von *Pedinomonas* sp. nahm mit steigender CBZ-Konzentration ab. Signifikant reduzierte Werte wurden bei CBZ-Konzentrationen von 0,1 und  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Auch in Kulturen von *Coccomyxa* sp. wurden verringerte Carotinoidgehalte gemessen. Signifikante Veränderungen wurden unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ dokumentiert. CBZ-Effekte bei  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  konnten nicht statistisch abgesichert werden.



Tabelle 5.21: Aufgeführt ist der Carotinoidgehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden.

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Carotinoidgehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
0	0,83 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,04
0,1	<b>0,72*</b> $\pm$ 0,09	0,52 <sup>1</sup> $\pm$ 0,14
1	0,78 $\pm$ 0,08	<b>0,33*</b> $\pm$ 0,15
10	<b>0,71*</b> $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,10

### 5.3.3 Messparameter zur Energieverwertung

#### 5.3.3.1 Nicht-photochemisches Quenching (NPQ)

In Kulturen von *Chlorella* sp. bewirkten CBZ-Konzentrationen von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  ein signifikant erhöhtes NPQ-Niveau.  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  zeigte keinen Effekt bzw. der Effekt konnte nicht statistisch abgesichert werden. Zunehmende CBZ-Konzentrationen führten zu erhöhten Werten, die bei  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  mit einer Signifikanz abgesichert werden konnten. Ein signifikanter CBZ-Effekt konnte in Kulturen von *Parachlorella* sp. in der zweiten Konzentrationsmessreihe dokumentiert werden. In der niedrigeren CBZ-Konzentrationsmessreihe konnte ein Effekt statistisch nicht abgesichert werden (Tabelle 5.22).

Tabelle 5.22: Zusammengefasst ist das NPQ-Niveau  $\pm$  STABW für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	NPQ [rel. Einheit]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	NPQ [rel. Einheit]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
0	0,96 $\pm$ 0,13	0,44 $\pm$ 0,10	0	0,74 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,02
0,1	1,04 $\pm$ 0,11	0,42 <sup>1</sup> $\pm$ 0,08			
1	<b>1,23*</b> $\pm$ 0,11	0,51 $\pm$ 0,08			
10	1,00 <sup>1</sup> $\pm$ 0,16	<b>0,66*</b> $\pm$ 0,13	10	0,80 <sup>1</sup> $\pm$ 0,13	<b>0,35*</b> $\pm$ 0,02
			100	0,86 $\pm$ 0,06	<b>0,36*</b> $\pm$ 0,02
			1.000	<b>0,92*</b> $\pm$ 0,11	<b>0,34*</b> $\pm$ 0,02

In Kulturen von *Scenedesmus* sp. nahmen die NPQ-Niveaus bei hohen Konzentrationen ( $100$  und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ab. Der gleiche Effekt wurde in Kulturen von *Ignatius* sp. gemessen.

sen. Der CBZ-Effekt bei 1.000 µg L<sup>-1</sup> konnte statistisch nicht abgesichert werden. Keine Veränderungen wurden in Mikroalgenpopulationen von *Neochloris* sp. beobachtet. Die Veränderungen des NPQ-Niveaus für die Mikroalgen *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. sind in Tabelle 5.23 aufgelistet.

Tabelle 5.23: Zusammengefasst ist das NPQ-Niveau ± STABW für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	NPQ [rel. Einheit]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	2,09±0,16	0,59±0,08	1,62±0,10
<b>10</b>	2,26±0,34	0,62±0,11	1,71±0,13
<b>100</b>	<b>1,51*±0,12</b>	0,63±0,05	<b>1,28*±0,15</b>
<b>1.000</b>	<b>1,79*±0,23</b>	0,65±0,11	1,59 <sup>1</sup> ±0,13

Signifikant steigende NPQ-Niveaus wurden mit zunehmender CBZ-Konzentration für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. ermittelt (Tabelle 5.24).

Tabelle 5.24: Zusammengefasst ist das NPQ-Niveau ± STABW für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); die Messgrößen sind in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	NPQ [rel. Einheit]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	0,47±0,05	1,07±0,18
<b>0,1</b>	<b>1,04*±0,11</b>	<b>1,54*±0,17</b>
<b>1</b>	<b>1,07*±0,13</b>	<b>1,50*±0,25</b>
<b>10</b>	<b>1,08*±0,17</b>	<b>1,35*±0,11</b>

### 5.3.3.2 Apparente Elektronentransportrate (ETR)

In den beiden Messreihe von *Chlorella* sp. wurde eine signifikante Veränderung in der apparenten Elektronentransportrate (ETR) bei 1 µg L<sup>-1</sup> CBZ gemessen. Effekte bei niedrigen CBZ-Konzentrationen konnten nicht statistisch abgesichert werden (Tabelle 5.25). Für *Parachlorella* sp. wurden signifikante Abnahmen in der ETR bei 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> bestimmt. Auch in Kulturen von *Parachlorella* sp. konnten Effekte bei niedrigen CBZ-Konzentrationen nicht statistisch abgesichert werden (Tabelle 5.25).

Tabelle 5.25: Dargestellt ist die apparente Elektronentransportrate (ETR)  $\pm$  STABW in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ETR [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ETR [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
0	12,5 $\pm$ 1,37	21,3 $\pm$ 2,33	0	6,43 $\pm$ 1,12	12,8 $\pm$ 0,56
0,1	11,2 <sup>1</sup> $\pm$ 2,00	19,6 <sup>1</sup> $\pm$ 3,53			
1	<b>8,66*</b> $\pm$ 2,58	19,1 $\pm$ 5,30			
10	11,2 $\pm$ 2,18	<b>16,8*</b> $\pm$ 1,03	10	5,32 $\pm$ 0,78	<b>11,3*</b> $\pm$ 0,38
			100	5,82 $\pm$ 1,23	12,5 $\pm$ 0,69
			1.000	5,96 $\pm$ 0,84	<b>11,8*</b> $\pm$ 0,58

Ein signifikanter Anstieg in der ETR wurde in Kulturen von *Scenedesmus* sp. bei der höchsten CBZ-Konzentration ( $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) gemessen. Ein Effekt in der niedrigeren CBZ-Konzentrationsmessreihe konnte statistisch nicht abgesichert werden. Die Effekte, die in Kulturen von *Neochloris* sp. erzielt wurden, konnten ebenfalls nicht statistisch abgesichert werden. Ein CBZ-Effekt in Populationen von *Ignatius* sp. wurde bei  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  ermittelt. Für andere CBZ-Konzentrationen konnte keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die Ergebnisse sind für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. sind Tabelle 5.26 zusammengefasst.

Tabelle 5.26: Dargestellt ist die apparente Elektronentransportrate (ETR)  $\pm$  STABW in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ETR [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
0	5,24 $\pm$ 0,97	7,26 $\pm$ 2,40	7,61 $\pm$ 0,50
10	4,00 <sup>1</sup> $\pm$ 1,94	5,61 <sup>1</sup> $\pm$ 2,18	7,06 $\pm$ 1,40
100	6,12 $\pm$ 1,02	7,47 <sup>1</sup> $\pm$ 1,45	<b>10,1*</b> $\pm$ 1,31
1.000	<b>6,57*</b> $\pm$ 0,83	5,25 $\pm$ 1,53	7,80 <sup>1</sup> $\pm$ 1,53

Mit steigenden CBZ-Konzentrationen in den Kulturen von *Pedinomonas* sp. wurden in der ersten Messreihe signifikant reduzierte Werte ermittelt. CBZ hatten hingegen keinen Einfluss auf die ETR von *Coccomyxa* sp. (Tabelle 5.27).

Tabelle 5.27: Dargestellt ist die apparente Elektronentransportrate (ETR)  $\pm$  STABW in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ETR [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	19,8 $\pm$ 1,92	10,2 $\pm$ 2,62
<b>0,1</b>	<b>13,0*</b> $\pm$ 1,59	8,95 $\pm$ 2,73
<b>1</b>	<b>11,1*</b> $\pm$ 2,31	9,09 $\pm$ 2,18
<b>10</b>	<b>10,6*</b> $\pm$ 2,56	9,84 $\pm$ 1,64

### 5.3.4 Produkte der Photosynthese

#### 5.3.4.1 Protein

In Kulturen von *Chlorella* sp. wurde in beiden Messreihen eine Abnahme des Proteingehalts bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Alle anderen CBZ-Konzentrationen bewirkten eine signifikante Steigerung des Gehalts. Der Proteingehalt in Populationen von *Parachlorella* sp. wurde mit zunehmender CBZ-Konzentration signifikant reduziert. In der ersten Messreihe bewirkten  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine Verringerung des Proteingehalts. Dieser Effekt konnte allerdings nicht statistisch abgesichert werden. Die Proteingehalte in den Kulturen von *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. sind in Tabelle 5.28 zusammengefasst.

Tabelle 5.28: Dargestellt ist der Proteingehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Proteingehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Proteingehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	25,2 $\pm$ 0,57	29,7 $\pm$ 2,22	<b>0</b>	8,61 $\pm$ 1,19	22,9 $\pm$ 0,48
<b>0,1</b>	<b>26,8*</b> $\pm$ 1,06	<b>17,3*</b> $\pm$ 1,75			
<b>1</b>	<b>27,9*</b> $\pm$ 1,31	<b>18,1*</b> $\pm$ 1,54			
<b>10</b>	<b>21,9*</b> $\pm$ 0,78	22,5 $\pm$ 1,55	<b>10</b>	<b>6,07*</b> $\pm$ 1,02	<b>15,3*</b> $\pm$ 1,89
			<b>100</b>	<b>10,4*</b> $\pm$ 0,81	<b>13,6*</b> $\pm$ 0,84
			<b>1.000</b>	<b>10,5*</b> $\pm$ 1,46	<b>10,1*</b> $\pm$ 0,28

Der Proteingehalt in Populationen von *Scenedesmus* sp. war unter Einfluss von CBZ signifikant reduziert. In Kulturen von *Neochloris* sp. stieg der Proteingehalt mit steigender CBZ-Konzentration an. Signifikant erhöht waren die Werte bei 100 und 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Bei *Ignatius* sp. führten die CBZ-Konzentrationen 10 und 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  zu einem signifikanten Anstieg, während bei höheren Konzentrationen keine Veränderungen mehr gemessen werden konnten (Tabelle 5.29).

Tabelle 5.29: Dargestellt ist der Proteingehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ).

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Proteingehalt pro $10^6$ Zellen [mg]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	6,25 $\pm$ 0,23	9,81 $\pm$ 0,77	57,9 $\pm$ 3,38
<b>10</b>	<b>4,94*<math>\pm</math>0,50</b>	10,8 $\pm$ 2,13	<b>70,5*<math>\pm</math>6,21</b>
<b>100</b>	<b>4,57*<math>\pm</math>0,62</b>	<b>17,2*<math>\pm</math>0,98</b>	<b>65,9*<math>\pm</math>5,14</b>
<b>1.000</b>	<b>5,17*<math>\pm</math>0,30</b>	<b>15,7*<math>\pm</math>1,95</b>	57,6 $\pm$ 2,46

Signifikant reduzierte Proteingehalte traten in den Kulturen von *Pedinomonas* sp. bei CBZ-Konzentrationen von 0,1 und 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  auf.

Der Proteingehalt in Kulturen von *Coccomyxa* sp. zeigte den gleichen Trend wie bei *Ignatius* sp. auf. CBZ-Konzentrationen 10 und 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  führten zu einem signifikanten Anstieg, während bei höheren Konzentrationen keine Veränderungen mehr gemessen werden konnten. Die Ergebnisse beider Mikroalgen sind in Tabelle 5.30 aufgelistet.

Tabelle 5.30: Dargestellt ist der Proteingehalt  $\pm$  STABW in mg pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Proteingehalt pro $10^6$ Zellen [mg]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	26,6 $\pm$ 0,39	30,3 $\pm$ 1,82
<b>0,1</b>	<b>22,9*<math>\pm</math>0,63</b>	<b>42,6*<math>\pm</math>1,86</b>
<b>1</b>	27,6 $\pm$ 0,98	<b>42,2*<math>\pm</math>0,83</b>
<b>10</b>	<b>14,3*<math>\pm</math>0,56</b>	33,0 $\pm$ 1,09

### 5.3.4.2 Aminosäuren

Ein CBZ-Effekt auf den Aminosäuregehalt wurde ausschließlich in den Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in der zweiten Konzentrationsmessreihe (0-1.000 µg L<sup>-1</sup>) gemessen (Tabelle 5.31).

Die Gehalte an freien Aminosäuren nahm in den Kulturen von *Chlorella* sp. mit steigender CBZ-Konzentration ab. Signifikante Veränderungen wurden bei 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> gemessen. In Kulturen von *Parachlorella* sp. führten steigende Konzentrationen zu einer signifikanten Anhäufung der freien Aminosäuren. Ein gegenläufiger Trend wurde in *Scenedesmus* sp. beobachtet. In diesen Kulturen nahm der Gehalt an freien Aminosäuren signifikant mit steigender CBZ-Konzentration ab. Die CBZ-Konzentrationen von 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> führten in den Kulturen von *Neochloris* sp. zu einer erhöhten Akkumulation freier Aminosäuren. Kein Effekt konnte in Kulturen von *Ignatius* sp. gemessen werden.

Tabelle 5.31: Dokumentiert sind die Gehalte an freien Aminosäuren ± STABW in µmol pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	Gehalt freier Aminosäuren [µmol]				
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	58,5±4,34	150,7±9,18	36,6±1,66	69,7±4,51	530,5±214,8
<b>10</b>	<b>49,5*±5,21</b>	<b>173,4*±13,8</b>	<b>33,2*±2,07</b>	74,1±7,12	433,5±40,6
<b>100</b>	56,1±3,77	<b>199,0*±21,1</b>	<b>33,0*±1,66</b>	<b>101,6*±14,4</b>	401,8±108,7
<b>1.000</b>	<b>50,0*±4,77</b>	<b>179,7*±10,8</b>	<b>29,8*±2,12</b>	<b>100,0*±12,0</b>	425,6±32,8

### 5.3.4.3 Zucker

Ein CBZ-Effekt auf den Zuckergehalt wurde ausschließlich in den Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in der zweiten Konzentrationsmessreihe (0-1.000 µg L<sup>-1</sup>) gemessen (Tabelle 5.32).

Der Zuckergehalt in *Chlorella* sp. nahm mit steigender CBZ-Konzentration ab. Signifikante Veränderungen wurden bei 100 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Der gleiche Trend konnte für *Neochloris* sp. aufgezeigt werden. Die Konzentrationen 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ führten in den Kulturen von *Parachlorella* sp. zu einem Anstieg der Zuckergehalte. Auf den Zuckergehalt in *Scenedesmus* sp. hatte CBZ keinen Einfluss. In den Kulturen von *Ignatius* sp. nahm der Zuckergehalt mit steigender CBZ-Konzentration signifikant ab.

Tabelle 5.32: Dargestellt ist der Zuckergehalt  $\pm$  STABW in  $\mu\text{g}$  pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration ( $n=3$ ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Zuckergehalt pro $10^6$ Zellen [ $\mu\text{g}$ ]				
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	4,45 $\pm$ 0,56	6,50 $\pm$ 2,15	0,21 $\pm$ 0,05	5,47 $\pm$ 0,92	21,3 $\pm$ 4,54
<b>10</b>	3,82 $\pm$ 0,46	<b>10,2*</b> $\pm$ 0,53	0,17 $\pm$ 0,13	4,92 $\pm$ 0,57	<b>10,1*</b> $\pm$ 1,38
<b>100</b>	<b>3,32*</b> $\pm$ 0,38	8,13 $\pm$ 0,74	0,17 $\pm$ 0,07	<b>3,79*</b> $\pm$ 1,16	<b>11,7*</b> $\pm$ 1,69
<b>1.000</b>	<b>2,22*</b> $\pm$ 0,26	<b>15,2*</b> $\pm$ 2,24	0,37 $\pm$ 0,31	<b>3,24*</b> $\pm$ 0,50	<b>9,40*</b> $\pm$ 2,29

### 5.3.5 Phasenverteilung

CBZ-induzierte Veränderungen der Zelloberflächeneigenschaften wurden im Phasenverteilungstest untersucht. Der Phasenverteilungsindex diente als Maß für die Sensitivität der Zellen. Getestet wurde eine wässrige und organische Phase. Je höher der Anteil der Zellen in der wässrigen Phase war, desto stärker war die Präsentation hydrophiler Komponenten in der Zellmembran. Entsprechend dokumentierte ein erhöhter Zellanteil in der organischen Phase eine verstärkte Präsentation hydrophober Komponenten.

In Kulturen von *Chlorella* sp. und *Neochloris* sp. wurde unter Einfluss von 10 und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ ein erhöhter Zellanteil in der wässrigen Phase dokumentiert. Zellen von *Parachlorella* sp. zeigten in der CBZ-Konzentrationsmessreihe bis  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  eine verstärkte Präsentation hydrophiler Komponenten. In Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurde hingegen eine verstärkte Präsentation hydrophober Komponenten dokumentiert. Keine signifikanten Veränderungen wurden für *Ignatius* sp. aufgezeigt (Tabelle 5.33).

Tabelle 5.33: Dargestellt ist der Phasenverteilungsindex ( $I_{435}$ )  $\pm$  STABW für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration ( $n=3$ ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Phasenverteilungsindex ( $I_{435}$ ) [-]				
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	-0,13 $\pm$ 0,07	-0,26 $\pm$ 0,13	-0,13 $\pm$ 0,07	-0,10 $\pm$ 0,06	-0,01 $\pm$ 0,80
<b>10</b>	<b>-0,24*</b> $\pm$ 0,03	<b>-0,49*</b> $\pm$ 0,19	<b>-0,06*</b> $\pm$ 0,05	<b>-0,20*</b> $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,41
<b>100</b>	-0,21 $\pm$ 0,05	<b>-0,55*</b> $\pm$ 0,26	-0,15 <sup>1</sup> $\pm$ 0,03	-0,12 $\pm$ 0,05	0,06 <sup>1</sup> $\pm$ 0,50
<b>1.000</b>	<b>-0,25*</b> $\pm$ 0,07	-0,37 $\pm$ 0,24	-0,08 $\pm$ 0,60	<b>-0,20*</b> $\pm$ 0,08	-0,52 <sup>1</sup> $\pm$ 0,31

## 5.4 Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung

Studien zeigen, dass CBZ oxidativen Stress in Mikroalgen auslösen kann (Tsiaka *et al.* 2013). Als Zellantwort werden verschiedene antioxidative Schutzsysteme aktiviert, die die Zellen vor erhöhter ROS-Bildung schützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Schutzmechanismen durch CBZ-induziert werden (Haase *et al.* 2016). Die Messdaten für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp. und *Ignatius* sp. wurden im CBZ-Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 µg L<sup>-1</sup> in der Masterarbeit von Braams (2015) erhoben. In einer weiteren Studie wurden die Parameter für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. im Bereich von 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ analysiert (Bommaiyasamy 2014). Die Messwerte wurden auch in diesem Abschnitt am Ende der Kulturdauer von 14 Tagen ausgewertet, um physiologische Anpassungseffekte beurteilen zu können. Zur Schaffung einer Vergleichbarkeit der Daten, wurden alle Messparameter auf 10<sup>6</sup> Zellen bezogen.

Es wurden nicht-enzymatische (Glutathion) als auch enzymatische Schutzsysteme (SOD, CAT, GR) unter simulierten Sommerbedingungen untersucht. Carotinoide, als weiteres nicht-enzymatisches Schutzsystem, wurden bereits in Abschnitt 5.3.2.3 vorgestellt.

### 5.4.1 Glutathion-Schutzsystem

#### 5.4.1.1 Reduziertes Glutathion

Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) ist für die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Tabelle 5.34 aufgelistet.

Tabelle 5.34: Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) ± STABW ist in nmol pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ; zweite Messreihe: 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden; (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	GSH-Gehalt pro 10 <sup>6</sup> Zellen [nmol]		CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	GSH-Gehalt pro 10 <sup>6</sup> Zellen [nmol]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	0,06±0,03	n.d.	<b>0</b>	4,51±0,57	9,83±0,90
<b>0,1</b>	0,05±0,03	n.d.			
<b>1</b>	0,05±0,02	n.d.			
<b>10</b>	0,06±0,03	n.d.	<b>10</b>	4,01±0,39	10,9±1,58
			<b>100</b>	4,95 <sup>1</sup> ±0,38	10,0±1,50
			<b>1.000</b>	4,56 <sup>1</sup> ±0,69	<b>7,67*±0,66</b>



In Kulturen von *Chlorella* sp. wurden keine signifikanten Veränderungen im GSH-Gehalt gemessen bzw. die Veränderungen konnten nicht statistisch abgesichert werden. In Abhängigkeit von der Versuchsreihe wurden allerdings unterschiedliche Gehalte erzielt.

Der GSH-Gehalt in Kulturen von *Parachlorella* sp. wurde ebenfalls in beiden CBZ-Konzentrationsmessreihen getestet. In der ersten Messreihe (0-10 µg L<sup>-1</sup>) konnte GSH nicht nachgewiesen werden. In der zweiten Messreihe wurde eine signifikante Abnahme im GSH-Gehalt bei der höchsten CBZ-Konzentration ermittelt.

Ein verminderter GSH-Gehalt konnte auch in Kulturen von *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. gemessen werden (Tabelle 5.35). Einen signifikanten Einfluss auf den GSH-Gehalt in *Scenedesmus* sp. hatten 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup>. Bei *Ignatius* sp. führte nur die höchste CBZ-Konzentration zu einer Abnahme. In Kulturen von *Neochloris* sp. resultierten alle CBZ-Konzentrationen in einer Abnahme des GSH-Gehalts.

Tabelle 5.35: Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) ± STABW ist in nmol pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	GSH-Gehalt pro 10 <sup>6</sup> Zellen [nmol]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	1,89±0,33	2,19±0,76	7,65±1,03
<b>10</b>	<b>1,24*±0,20</b>	<b>1,22*±0,12</b>	7,71±1,05
<b>100</b>	1,81±0,27	<b>1,35*±0,21</b>	8,51±0,72
<b>1.000</b>	<b>1,20*±0,24</b>	<b>1,04*±0,21</b>	<b>6,06*±0,94</b>

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. wurde eine signifikante Abnahme bei 0,1 und 1 µg L<sup>-1</sup> gemessen. CBZ hatte hingegen keinen Einfluss auf den GSH-Gehalt von *Coccomyxa* sp. (Tabelle 5.36).

Tabelle 5.36: Der Gehalt des reduzierten Glutathions (GSH) ± STABW ist in nmol pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	GSH-Gehalt pro 10 <sup>6</sup> Zellen [nmol]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	0,77±0,07	0,07±0,03
<b>0,1</b>	<b>0,67*±0,05</b>	0,07±0,02
<b>1</b>	<b>0,64*±0,03</b>	0,07±0,02
<b>10</b>	0,78±0,06	0,08±0,02

### 5.4.1.2 Oxidiertes Glutathion

In Tabelle 5.37 sind die Gehalte des oxidierten Glutathions (GSSG) für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. aufgelistet. In den Kulturen von *Chlorella* sp. führten niedrige CBZ-Konzentrationen ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) zu einer signifikanten Abnahme im GSSG-Gehalt. Dokumentierte Effekte bei steigenden CBZ-Konzentrationen konnten nicht statistisch abgesichert werden. In Kulturen von *Parachlorella* sp. wurden sowohl in der niedrigen als auch hohen Messreihe in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration reduzierte GSSG-Gehalte gemessen.

Tabelle 5.37: Der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG)  $\pm$  STABW ist in nmol pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GSSG-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GSSG-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	0,017 $\pm$ 0,007	0,013 $\pm$ 0,002	<b>0</b>	0,07 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,04
<b>0,1</b>	<b>0,011*<math>\pm</math>0,005</b>	<b>0,007*<math>\pm</math>0,003</b>			
<b>1</b>	0,018 <sup>1</sup> $\pm$ 0,006	<b>0,005*<math>\pm</math>0,003</b>			
<b>10</b>	0,015 $\pm$ 0,005	0,013 $\pm$ 0,006	<b>10</b>	0,09 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,05
			<b>100</b>	0,10 <sup>1</sup> $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,05
			<b>1.000</b>	0,06 <sup>1</sup> $\pm$ 0,03	<b>0,06*<math>\pm</math>0,03</b>

Die GSSG-Gehalte für die Mikroalgen *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. sind in Tabelle 5.38 zusammengefasst.

Signifikant erhöhte GSSG-Gehalte wurden in den Populationen von *Scenedesmus* sp. bei 100 und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. In Kulturen von *Neochloris* sp. nahm der GSSG-Gehalt mit steigender CBZ-Konzentration ab. Signifikante Veränderungen wurden bei 10 und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  beschrieben. *Ignatius* sp. reagierte auf CBZ mit einer signifikanten Abnahme im GSSG-Gehalt bei  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Effekte bei niedrigeren CBZ-Konzentrationen wurden nicht gemessen, oder konnten nicht statistisch abgesichert werden.

Tabelle 5.38: Der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG)  $\pm$  STABW ist in nmol pro  $10^6$  Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GSSG-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	0,26 $\pm$ 0,18	0,44 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,23
<b>10</b>	0,06 $\pm$ 0,02	<b>0,19*</b> $\pm$ 0,09	0,76 <sup>¹</sup> $\pm$ 0,19
<b>100</b>	<b>0,96*</b> $\pm$ 0,14	0,24 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,17
<b>1.000</b>	<b>0,78*</b> $\pm$ 0,09	<b>0,10*</b> $\pm$ 0,06	<b>0,57*</b> $\pm$ 0,13

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. wurde mit  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine signifikante Zunahme der GSSG-Gehalte erzielt, die mit steigender CBZ-Konzentration erneut abnahmen. Gemessene GSSG-Gehalte in *Coccomyxa* sp. zeigten signifikant erhöhte Werte bei  $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ, sowie eine signifikante Abnahme bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (Tabelle 5.39). In beiden Kulturen durchlief der GSSG-Gehalt in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration ein Maximum, dessen Lage mit dem gewählten Versuchsansatz nicht genauer bestimmt werden konnte.

Tabelle 5.39: Der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG)  $\pm$  STABW ist in nmol pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration angegeben (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GSSG-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	54,6 $\pm$ 3,36	49,6 $\pm$ 7,3
<b>0,1</b>	47,22 $\pm$ 2,71	<b>65,4*</b> $\pm$ 9,6
<b>1</b>	<b>73,42*</b> $\pm$ 3,35	<b>61,0*</b> $\pm$ 5,7
<b>10</b>	<b>31,3*</b> $\pm$ 4,62	<b>37,4*</b> $\pm$ 5,3

#### 5.4.1.3 Glutathion-Reduktase

Die GR-Aktivitäten der Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. sind in Tabelle 5.40 zusammengefasst. Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) nahm in Kulturen von *Chlorella* sp. mit steigender CBZ-Konzentrationen ab. Signifikante Effekte wurden bei  $0,1$ ,  $10$  und  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  dokumentiert. Reduzierte GR-Aktivitäten wurden ebenfalls in Populationen von *Parachlorella* sp. bei  $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. In der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe konnten keine Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 5.40: Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR)  $\pm$  STABW wurde über die Bildung des Substrats 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration bestimmt; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GR-Aktivität pro $10^6$ Zellen [ $\text{nmol min}^{-1}$ ]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GR-Aktivität pro $10^6$ Zellen [ $\text{nmol min}^{-1}$ ]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
0	216,0 $\pm$ 23,8	183,7 $\pm$ 19,0	0	13,2 $\pm$ 1,11	n.d.
0,1	<b>187,8*</b> $\pm$ 28,7	<b>133,1*</b> $\pm$ 12,1			
1	211,8 $\pm$ 12,3	<b>134,3*</b> $\pm$ 32,7			
10	<b>162,9*</b> $\pm$ 35,5	173,0 $\pm$ 13,1	10	<b>8,95*</b> $\pm$ 1,35	n.d.
			100	<b>7,93*</b> $\pm$ 1,80	n.d.
			1.000	15,5 $\pm$ 3,14	n.d.

CBZ-Konzentrationen von 10 und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  führten in Kulturen von *Neochloris* sp. zu einer erhöhten GR-Aktivität. Für *Ignatius* sp. wurden signifikante Effekte bei 10 und  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  dokumentiert. Keine GR-Aktivität wurde in Kulturen von *Scenedesmus* sp. nachgewiesen (Tabelle 5.41).

Tabelle 5.41: Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR)  $\pm$  STABW wurde über die Bildung des Substrats 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration bestimmt; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GR-Aktivität pro $10^6$ Zellen [nmol min <sup>-1</sup> ]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
0	n.d.	32,7 $\pm$ 11,7	45,9 $\pm$ 13,6
10	n.d.	<b>49,2*</b> $\pm$ 8,80	<b>18,6*</b> $\pm$ 6,13
100	n.d.	25,7 $\pm$ 12,3	<b>11,4*</b> $\pm$ 4,32
1.000	n.d.	<b>55,5*</b> $\pm$ 8,10	43,5 $\pm$ 7,82

Für *Pedinomonas* sp. wurden reduzierte GR-Aktivitäten bei 0,1 und  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Erhöhte Aktivitäten wurden für *Coccomyxa* sp. bei 0,1 und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  dokumentiert (Tabelle 5.42).

Tabelle 5.42: Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR)  $\pm$  STABW wurde über die Bildung des Substrats 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration bestimmt; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GR-Aktivität pro $10^6$ Zellen [ $\text{nmol min}^{-1}$ ]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	536,4 $\pm$ 42,4	199,5 $\pm$ 17,8
<b>0,1</b>	<b>423,1*<math>\pm</math>19,0</b>	<b>261,2*<math>\pm</math>10,2</b>
<b>1</b>	522,7 $\pm$ 31,4	<b>236,3*<math>\pm</math>37,3</b>
<b>10</b>	<b>238,5*<math>\pm</math>56,5</b>	198,5 $\pm$ 26,5

## 5.4.2 Enzymatisches Schutzsystem

### 5.4.2.1 Superoxid-Dismutase

Die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) wurde in Kulturen von *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. bestimmt und ist für beide CBZ-Konzentrationsmessreihen in Tabelle 5.43 zusammengefasst.

Tabelle 5.43: Die Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt indirekt über die Hemmung der Autooxidation des Substrats Pyrogallol. Änderungen der SOD-Aktivität  $\pm$  STABW sind in U pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration ( $n=3$ ) angegeben; getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (<sup>1</sup>) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	SOD-Aktivität pro $10^6$ Zellen [U]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	SOD-Aktivität pro $10^6$ Zellen [U]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	164,3 $\pm$ 31,0	144,9 $\pm$ 32,0	<b>0</b>	6,93 $\pm$ 4,40	5,05 $\pm$ 0,33
<b>0,1</b>	<b>187,6*<math>\pm</math>37,1</b>	129,9 $\pm$ 28,0			
<b>1</b>	189,7 <sup>1</sup> $\pm$ 43,6	126,5 <sup>1</sup> $\pm$ 24,8			
<b>10</b>	188,6 $\pm$ 33,0	<b>86,6*<math>\pm</math>16,9</b>	<b>10</b>	5,90 $\pm$ 3,96	<b>4,71*<math>\pm</math>0,18</b>
			<b>100</b>	4,09 $\pm$ 2,81	4,96 $\pm$ 0,42
			<b>1.000</b>	5,94 $\pm$ 6,07	5,03 $\pm$ 0,22

Signifikant erhöhte SOD-Aktivitäten wurden in Kulturen von *Chlorella* sp. ausschließlich in der niedrigen CBZ-Konzentrationsmessreihe von  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  ermittelt. Mit steigenden CBZ-Konzentrationen wurden keine Veränderungen in der SOD-Aktivität gemessen bzw. konnten nicht statistisch abgesichert werden. In Kulturen von *Parachlorella* sp. wurden

signifikant reduzierte SOD-Aktivitäten bei 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ dokumentiert. Andere CBZ-Konzentrationen zeigten keine Aktivitätsveränderungen. Effekte bei 1 µg L<sup>-1</sup> CBZ konnten statistisch nicht ausgewertet werden. Auffällig sind die unterschiedlichen Aktivitätsniveaus, die auf unterschiedliche CBZ-Versuchsreihen zurückzuführen waren.

In Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurden mit 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> signifikant erhöhte SOD-Aktivitäten erreicht. 100 µg L<sup>-1</sup> CBZ erzielten eine signifikante Aktivitätserhöhung bei *Ignatius* sp., während kein CBZ-Effekt auf *Neochloris* sp. gemessen werden konnte. Zusammengefasst sind die SOD-Aktivitäten in Tabelle 5.44.

Tabelle 5.44: Die Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt indirekt über die Hemmung der Autooxidation des Substrats Pyrogallol. Änderungen der SOD-Aktivität ± STABW sind in U pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) angegeben; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle(0 µg L<sup>-1</sup> CBZ)

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	SOD-Aktivität pro 10 <sup>6</sup> Zellen [U]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	9,51±0,49	4,39±0,48	24,4±2,29
<b>10</b>	<b>11,6*±0,42</b>	3,83±0,73	26,3±1,96
<b>100</b>	9,39±0,21	4,22±0,87	<b>27,3*±1,78</b>
<b>1.000</b>	<b>10,9*±0,22</b>	4,46±0,70	25,2±2,19

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. konnte keine SOD-Aktivität gemessen werden. Steigende CBZ-Konzentrationen führten bei *Coccomyxa* sp. zu einer Abnahme der SOD-Aktivität (Tabelle 5.45).

Tabelle 5.45: Die Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt indirekt über die Hemmung der Autooxidation des Substrats Pyrogallol. Änderungen der SOD-Aktivität ± STABW sind in U pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) angegeben; (n.d.) nicht nachweisbar; (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle(0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	SOD-Aktivität pro 10 <sup>6</sup> Zellen [U]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	n.d.	522,3±225,3
<b>0,1</b>	n.d.	<b>177,6*±38,7</b>
<b>1</b>	n.d.	<b>180,8*±42,5</b>
<b>10</b>	n.d.	<b>176,7*±52,4</b>

### 5.4.2.2 Katalase

Die Katalase (CAT)-Aktivität ist für die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Tabelle 5.46 zusammengefasst. Für *Chlorella* sp. konnte in der ersten Konzentrationsmessreihe ein zunehmender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch mit steigender CBZ-Konzentration gemessen werden. Ein erhöhter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch entspricht einer erhöhten CAT-Aktivität. In der zweiten Messreihe konnte keine CAT-Aktivität ermittelt werden. In Kulturen von *Parachlorella* sp. wurde eine verstärkte CAT-Aktivität ausschließlich bei 10 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Andere CBZ-Konzentrationen erzielten keine Veränderungen.

Tabelle 5.46: Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen; angegeben ist die CAT-Aktivität ± STABW in mmol min<sup>-1</sup> pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ; zweite Messreihe: 0 bis 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	CAT-Aktivität pro 10 <sup>6</sup> Zellen [mmol min <sup>-1</sup> ]		CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	CAT-Aktivität pro 10 <sup>6</sup> Zellen [mmol min <sup>-1</sup> ]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	-0,42±0,17	-0,40±0,17	<b>0</b>	n.d.	-0,17±0,03
<b>0,1</b>	<b>-0,74*</b> ±0,40	-0,33±0,14			
<b>1</b>	<b>-0,91*</b> ±0,50	-0,50±0,27			
<b>10</b>	<b>-1,34*</b> ±0,59	<b>-0,74*</b> ±0,25	<b>10</b>	n.d.	<b>-0,25*</b> ±0,06
			<b>100</b>	n.d.	-0,20±0,10
			<b>1.000</b>	n.d.	-0,17±0,04

In Kulturen von *Neochloris* sp. wurde keine Aktivitätsänderungen gemessen. Für *Ignatius* sp. wurden bei 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ erhöhte CAT-Aktivitäten ermittelt. Keine CAT-Aktivität wurde in Kulturen von *Scenedesmus* sp. gemessen (Tabelle 5.47).

Tabelle 5.47: Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen; angegeben ist die CAT-Aktivität ± STABW in mmol min<sup>-1</sup> pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3) (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	CAT-Aktivität pro 10 <sup>6</sup> Zellen [mmol min <sup>-1</sup> ]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	n.d.	-0,06±0,04	-0,20±0,14
<b>10</b>	n.d.	-0,05±0,03	<b>-0,43*</b> ±0,15
<b>100</b>	n.d.	-0,09±0,02	-0,24±0,17
<b>1.000</b>	n.d.	-0,04±0,03	<b>-0,66*</b> ±0,17

Für *Pedinomonas* sp. konnte in der ersten CBZ-Konzentrationsmessreihe keine CAT-Aktivität nachgewiesen werden. Hingegen stieg in Kulturen von *Coccomyxa* sp. die Aktivität in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration an (Tabelle 5.48).

Tabelle 5.48: Die Aktivität der Katalase (CAT) wurde direkt über den Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen; angegeben ist die CAT-Aktivität ± STABW in mmol min<sup>-1</sup> pro 10<sup>6</sup> Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (n.d.) unter der Nachweisgrenze

CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	CAT-Aktivität pro 10 <sup>6</sup> Zellen [mmol min <sup>-1</sup> ]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
0	n.d.	-0,03±0,17
0,1	n.d.	<b>-0,37*±0,23</b>
1	n.d.	<b>-0,73*±0,27</b>
10	n.d.	<b>-0,48*±0,33</b>

#### 5.4.1 Lipidperoxidation

Die ermittelten Malondialdehyd (MDA)-Gehalte sind für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Tabelle 5.49 zusammengefasst. Für beide Kulturen wurden abhängig von der CBZ-Messreihe unterschiedliche MDA-Niveaus ermittelt. In Kulturen von *Chlorella* sp. wurden in der niedrigen CBZ-Konzentrationsmessreihe von 0,1 bis 1 µg L<sup>-1</sup> erhöhte MDA-Gehalte festgestellt. Ein weiterer Effekt wurde erst bei der höchsten CBZ-Konzentration von 1.000 µg L<sup>-1</sup> ermittelt. Der MDA-Gehalt war erneut signifikant erhöht. Für *Parachlorella* sp. wurde ein signifikanter CBZ-Effekt ausschließlich bei 1 µg L<sup>-1</sup> erzielt. Die MDA-Gehalte waren im Vergleich zur Kontrollkultur erhöht. Ein weiterer Effekt bei 10 mg L<sup>-1</sup> konnte nicht statistisch abgesichert werden.

In Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurden bei einer hohen CBZ-Konzentration von 100 µg L<sup>-1</sup> erhöhte MDA-Gehalte gemessen. 100 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> führten auch bei *Ignatius* sp. zu einem erhöhten MDA-Gehalt. Ein signifikant geringerer MDA-Gehalt wurde bei 10 µg L<sup>-1</sup> für *Neochloris* sp. gemessen (Tabelle 5.50).

Eine CBZ-Konzentration von 1 µg L<sup>-1</sup> führte bei *Pedinomonas* sp. zu einem verringerten MDA-Gehalt. Effekte bei 0,1 µg L<sup>-1</sup> konnten nicht statistisch abgesichert werden. In Kulturen von *Coccomyxa* sp. wurden erhöhte MDA-Gehalte bei 10 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Auch hier konnte ein Effekt bei 0,1 µg L<sup>-1</sup> nicht bestätigt werden (Tabelle 5.51).



Tabelle 5.49: Dargestellt sind die MDA-Gehalte als Produkte der Lipidperoxidation  $\pm$  STABW in nmol pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); getestet wurden zwei CBZ-Konzentrationsmessreihen (erste Messreihe: 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; zweite Messreihe: 0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden.

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	MDA-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]		CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	MDA-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.
<b>0</b>	75,0 $\pm$ 4,81	56,8 $\pm$ 5,48	<b>0</b>	4,60 $\pm$ 1,41	6,63 $\pm$ 2,35
<b>0,1</b>	<b>79,1*</b> $\pm$ 3,74	62,8 $\pm$ 4,31			
<b>1</b>	<b>79,3*</b> $\pm$ 3,53	<b>76,0*</b> $\pm$ 5,16			
<b>10</b>	77,1 $\pm$ 2,91	60,3 <sup>1</sup> $\pm$ 7,32	<b>10</b>	5,28 $\pm$ 0,87	8,65 $\pm$ 0,85
			<b>100</b>	3,21 $\pm$ 1,11	7,65 $\pm$ 2,82
			<b>1.000</b>	<b>8,16*</b> $\pm$ 1,36	7,98 $\pm$ 1,82

Tabelle 5.50: Dargestellt sind die MDA-Gehalte als Produkte der Lipidperoxidation  $\pm$  STABW in nmol pro  $10^6$  Zellen für *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	MDA-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
<b>0</b>	12,9 $\pm$ 2,16	12,9 $\pm$ 3,29	42,3 $\pm$ 8,47
<b>10</b>	14,2 $\pm$ 2,90	<b>8,42*</b> $\pm$ 1,16	47,6 $\pm$ 5,88
<b>100</b>	<b>16,5*</b> $\pm$ 2,99	10,1 $\pm$ 3,56	<b>60,2*</b> $\pm$ 9,45
<b>1.000</b>	12,8 $\pm$ 2,86	15,1 $\pm$ 4,20	<b>57,9*</b> $\pm$ 5,55

Tabelle 5.51: Dargestellt sind die MDA-Gehalte als Produkte der Lipidperoxidation  $\pm$  STABW in nmol pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	MDA-Gehalt pro $10^6$ Zellen [nmol]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>0</b>	62,3 $\pm$ 5,58	75,2 $\pm$ 4,9
<b>0,1</b>	65,9 <sup>1</sup> $\pm$ 5,21	77,9 <sup>1</sup> $\pm$ 7,5
<b>1</b>	<b>54,4*</b> $\pm$ 4,44	82,5 $\pm$ 7,5
<b>10</b>	67,5 $\pm$ 6,22	<b>92,7*</b> $\pm$ 6,3

## 5.5 Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme

CBZ-Effekte sowie ROS-Schutzreaktionen wurden in den vorangestellten Kapiteln untersucht. In diesem Kapitel soll darauf aufbauend das Potential einer intrazellulären CBZ-Metabolisierung untersucht werden. Hierfür wurden Enzymaktivitäten der ersten beiden Metabolisierungsphasen überprüft (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Möglichkeit einer chemischen Transformation während der Phase I wurde anhand der Aktivität des Cytochrom P450-Komplexes untersucht. Als Komponenten der Phase II wurden das Enzym Glutathion S-Transferase und das Peptid Glutathion analysiert. Mögliche Metabolisierungs- und Entgiftungswege der Phase I und II sind in Abbildung 2.5 aufgezeigt (siehe Abschnitt 2.2.2).

Die Ergebnisse des Glutathiongehalts wurden bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben und werden daher an dieser Stelle nicht weiter thematisiert.

Die Enzymmessungen erfolgten in diesem Kapitel in der ersten CBZ-Konzentrationsmessreihe (0-10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), da CBZ-induzierte Aktivitätsänderungen in diesem Bereich aufgrund des umweltrelevanten Bezugs von großem Interesse sind (Haase *et al.* 2016). Die Messdaten für *Parachlorella* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. wurden im Rahmen der Masterarbeit von Bommaiyyasamy (2014) erhoben. Alle Ergebnisse wurden unter simulierten Sommerbedingungen erzielt. Zur Schaffung einer Vergleichbarkeit der Daten, wurden alle Messparameter auf  $10^6$  Zellen bezogen.

### 5.5.1 Cytochrom P450-Komplex

Die CBZ-induzierten Aktivitäten des Cytochrom P450 (CYP)-Komplex sind in Abbildung 5.9 als Änderung der optischen Dichte pro Minute ( $\Delta\text{OD min}^{-1}$ ) dargestellt.

Signifikant erhöhte Enzymaktivitäten konnten in Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Coccomyxa* sp. mit 0,1 und 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ gemessen werden. 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ bewirkten in Kulturen von *Scenedesmus* sp. signifikant erhöhte Enzymaktivitäten. In Kulturen von *Neochloris* sp. wurde dieser Effekt mit 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ erreicht. Kein CBZ Effekt konnte in Kulturen von *Ignatius* sp. und *Pedinomonas* sp. beobachtet werden.

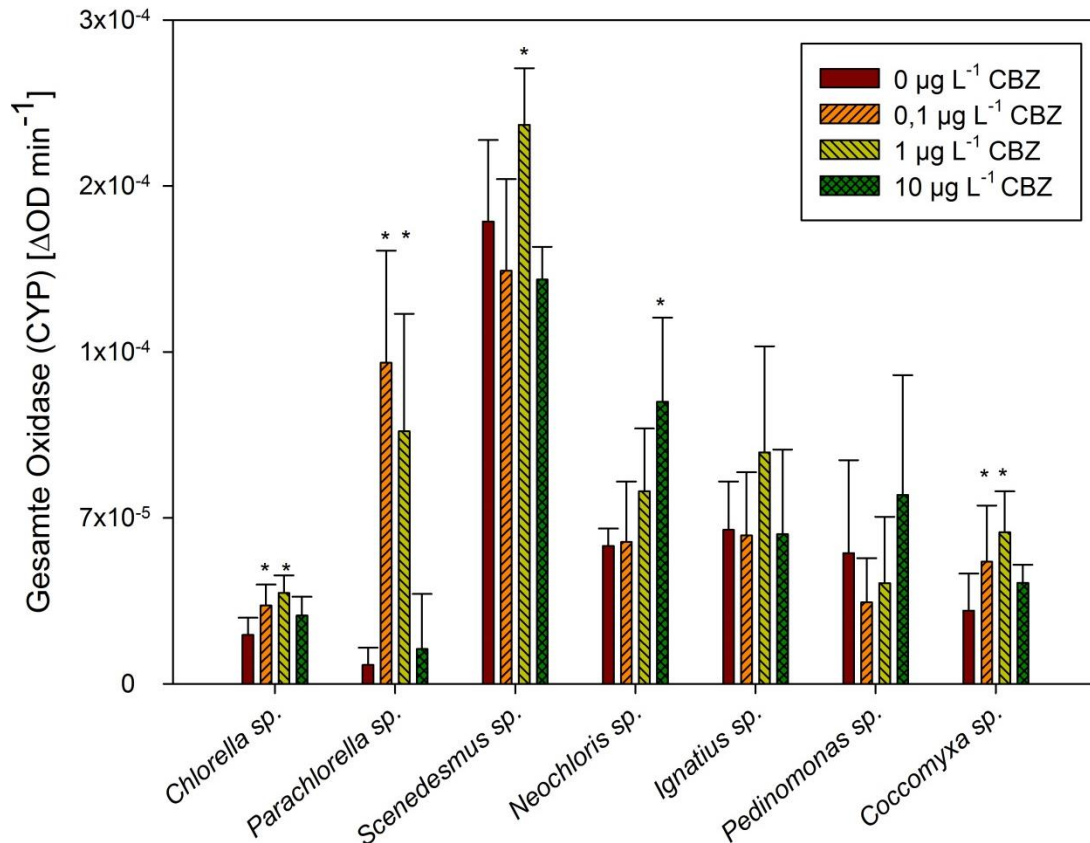


Abbildung 5.9: Die gesamte Oxidaseaktivität des CYP-Komplexes wurde als Änderung der optischen Dichte  $\text{min}^{-1}$  bestimmt und auf  $10^6$  Zellen normiert; die Aktivität wurde für *Chlorella sp.*, *Parachlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Neochloris sp.*, *Ignatius sp.*, *Pedinomonas sp.* und *Coccomyxa sp.* in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration untersucht (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle (0  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

### 5.5.2 Glutathion S-Transferase

Die gemessenen Aktivitäten der Glutathion S-Transferase (GST) sind für die Mikroalgen *Chlorella sp.*, *Parachlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Neochloris sp.* und *Ignatius sp.* in Tabelle 5.52 aufgezeigt. In Kulturen von *Chlorella sp.* wurden signifikante Veränderungen mit  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ erreicht. Effekte bei höheren CBZ-Konzentrationen konnten statistisch nicht abgesichert werden. In Kulturen von *Scenedesmus sp.* wurden signifikant erhöhte GST-Aktivitäten mit  $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ gemessen.

Keine Veränderung der GST-Aktivität in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration wurde in Kulturen von *Parachlorella sp.* und *Ignatius sp.* gemessen. CBZ Effekte, die in Kulturen von *Neochloris sp.* gemessen wurden, konnten statistisch nicht abgesichert werden.

Tabelle 5.52: Die Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST)  $\pm$  STABW ist in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration aufgezeigt (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ); (¹) eine Signifikanz kann nicht eindeutig bestimmt werden

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GST-Aktivität [ $\text{nmol min}^{-1}$ ]				
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Parachlorella</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Neochloris</i> sp.	<i>Ignatius</i> sp.
0	0,08 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,13	1,91 $\pm$ 0,93	0,26 $\pm$ 0,15	2,32 $\pm$ 1,39
0,1	0,06 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,13	<b>5,80*</b> $\pm$ 1,24	0,11 $\pm$ 0,08	2,70 $\pm$ 2,50
1	<b>0,26*</b> $\pm$ 0,15	0,13 $\pm$ 0,09	<b>4,70*</b> $\pm$ 1,31	0,35 <sup>1</sup> $\pm$ 0,23	3,16 $\pm$ 1,94
10	0,09 <sup>1</sup> $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,10	2,65 $\pm$ 3,06	0,26 <sup>1</sup> $\pm$ 0,13	1,53 $\pm$ 1,92

Die GST-Aktivitäten der Mikroalgen *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. sind in Tabelle 5.53 zusammengefasst. In Kulturen von *Pedinomonas* sp. wurden ab  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ erhöhte Enzymaktivitäten gemessen. Keine Veränderungen der Enzymaktivität wurden in Kulturen von *Coccomyxa* sp. dokumentiert.

Tabelle 5.53: Die Aktivität der Glutathion S-Transferase (GST)  $\pm$  STABW ist in  $\text{nmol min}^{-1}$  pro  $10^6$  Zellen für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration aufgezeigt (n=3); (\*) Signifikante Veränderungen zur Kontrolle ( $0 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ)

CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	GST-Aktivität [ $\text{nmol min}^{-1}$ ]	
	<i>Pedinomonas</i> sp.	<i>Coccomyxa</i> sp.
0	1,02 $\pm$ 0,62	0,78 $\pm$ 0,57
0,1	1,44 $\pm$ 2,24	1,24 $\pm$ 1,14
1	<b>2,56*</b> $\pm$ 1,34	0,61 $\pm$ 0,48
10	<b>3,14*</b> $\pm$ 2,13	0,48 $\pm$ 0,47

### 5.5.3 Algenauswahl Part II

Die Analysen in den Abschnitten 5.2 bis 5.5 dienten der Dokumentation des CBZ-Effektes auf die Mikroalgenpopulationen. Für die folgenden Versuche zur CBZ-Metabolisierung wurden drei Mikroalgen ausgewählt: *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp..

Die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. wurden ausgewählt, da sie sowohl im Sommer als auch im Winter die dominanten Spezies in der Leine repräsentierten. Zudem wiesen alle drei Mikroalgen eine hohe CBZ-Stresstoleranz sowie eine hohe Aktivität enzymatischer Entgiftungssysteme unter umweltrelevanten CBZ-Konzentrationen auf.

## 5.6 Stressantwort ausgewählter Mikroalgen

Zusätzlich zu den aufgezeigten Ergebnissen der CBZ-Anpassungsreaktionen unter simulierten Sommerbedingungen am Ende der Versuchsdauer, wurden in den Kulturen der ausgewählten Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. Stressantworten am ersten Messtag analysiert und auf  $10^6$  Zellen berechnet. Die Stressantworten wurden ausschließlich in der zweiten CBZ-Messreihe ausgewertet, um nicht-spezifische CBZ-Effekte ausschließen und mögliche CBZ-Angriffsziele identifizieren zu können. Die Messwerte wurden im Rahmen der Masterarbeiten von Braams (2015) und Panas (2015) erhoben. Die Ergebnisse der Stressantworten sind in Tabelle 5.54 zusammengefasst. Signifikante Veränderungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet (↑: signifikante Zunahme gegenüber der Kontrolle; ↓: signifikante Abnahme gegenüber der Kontrolle), Veränderungen, die nicht statistisch abgesichert werden konnten, sind mit „1“ gekennzeichnet und Tests, die nicht ausgewertet werden konnten bzw. die Aktivitäten unter der Nachweisgrenze lagen, sind mit „n.d.“ (engl.: *not detectable*) gekennzeichnet.

Der CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat kann anhand des Pigmentgehaltes sowie der Gehalte an Protein, Aminosäuren und Zucker als Produkte der Photosynthese beschrieben werden.

In Kulturen von *Chlorella* sp. hatte CBZ mit  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  einen signifikant negativen Effekt auf die Pigmente der Photosynthese. Höhere Konzentrationen erzielten keinen signifikanten Effekt auf den Pigmentgehalt. In Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurden signifikante Abnahmen zudem bei  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ dokumentiert. Ab  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  wurde ein stimulierender Effekt auf den Pigmentgehalt von *Parachlorella* sp. gemessen.

Die Produkte der Photosynthese (Protein, Aminosäuren, Zucker) zeigten in allen Mikroalgen unterschiedliche Trends auf. In Kulturen von *Chlorella* sp. wurde unter dem Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ nur ein signifikant erhöhter Effekt auf den Zuckergehalt dokumentiert. Mit steigender CBZ-Konzentration wurde für alle Parameter ein signifikanter Anstieg beobachtet. In Kulturen von *Parachlorella* sp. wurde ein erhöhter Zuckergehalt bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ, ein erhöhter Proteingehalt bei  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ und ein erhöhter Aminosäuregehalt bei  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Der Zucker- und Proteingehalt von *Scenedesmus* sp. konnte nicht ausgewertet werden bzw. die Gehalte lagen unter der Nachweisgrenze. Signifikante Veränderungen konnten jedoch für den Aminosäuregehalt dokumentiert werden. So führten  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  zu einem reduzierten Gehalt.

Im antioxidativen Glutathion-Schutzsystem wurden unterschiedliche Trends dokumentiert. In Kulturen von *Chlorella* sp. wurde ein erhöhter GSH-Gehalt bei  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  festge-

stellt. Die GSSG-Gehalte waren bei 10 µg L<sup>-1</sup> und 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ signifikant reduziert. Aktivitäten der GR konnten nur für *Chlorella* sp. nachgewiesen werden. In allen CBZ-Konzentrationsstufen wurden signifikant reduzierte Aktivitäten gemessen. In *Parachlorella* sp. konnten für den GSH- und GSSG-Gehalt gleiche Trends aufgezeigt werden. Beide Gehalte waren bei 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> signifikant reduziert. Während in Kulturen von *Scenedesmus* sp. der GSH-Gehalt bei 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> reduziert war, wurden erhöhte GSSG-Gehalte bei 100 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> gemessen.

Als enzymatisches Schutzsystem wurden CAT und SOD gemessen. In allen Mikroalgen lag die CAT-Aktivität unter der Nachweisgrenze. SOD-Aktivitäten wurden nur in Kulturen von *Scenedesmus* sp. gemessen. Signifikante Veränderungen der Aktivität wurden unter Einfluss von 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ bestimmt. Als Folge oxidativen Stresses wurde die Lipidperoxidation über den Gehalt an MDA bestimmt. Signifikante Veränderungen wurden nur in Zellen von *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. beobachtet. In Kulturen von *Chlorella* sp. führten 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ zu einer Abnahme des MDA-Gehalts. Bei *Parachlorella* sp. bewirkte ausschließlich die höchste CBZ-Konzentration (1.000 µg L<sup>-1</sup>) eine Abnahme des MDA-Gehalts.

Tabelle 5.54: Trend der Stressantworten für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. nach einer Kultivierungsdauer von drei Tagen in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration (n=3); (↑) signifikante Zunahme gegenüber der Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (↓) signifikante Abnahme gegenüber der Kontrolle (0 µg L<sup>-1</sup> CBZ); (1) Effekte können nicht statistisch abgesichert werden; (n.d.) unter der Nachweisgrenze

	<i>Chlorella</i> sp.			<i>Parachlorella</i> sp.			<i>Scenedesmus</i> sp.		
	CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]			CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]			CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]		
	10	100	1.000	10	100	1.000	10	100	1.000
<b>CBZ EINFLUSS AUF DEN PHOTOSYNTHESEAPPARAT</b>									
Chlorophyll a	↓	1			↑	↑	↓		↓
Chlorophyll b	↓		1	1	↑		↓		↓
Carotinoide	↓	1		1	↑		↓		↓
Protein		↑	↑	1	↑		n.d.	n.d.	n.d.
Aminosäuren		↑	1		1	↑	↓		↓
Zucker	↑	↑	↑	↑	1		n.d.	n.d.	n.d.
<b>SCHUTZMECHANISMEN GEGEN CBZ-INDUZIERTER ROS-BILDUNG</b>									
Glutathion <sub>reduziert</sub>		↑	1	↓		↓	↓		↓
Glutathion <sub>oxidiert</sub>	↓		↓	↓		↓		↑	↑
GR	↓	↓	↓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CAT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SOD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	↓		↓
Lipidperoxidation	↓		↓		1	↓	n.d.	n.d.	n.d.

## 5.7 CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen

Aufbauend auf den Ergebnissen zu den enzymatischen CBZ-Entgiftungssystemen im Abschnitt 5.5 werden an dieser Stelle die Untersuchungen zur CBZ-Metabolisierung vorgestellt (Haase *et al.* (in Vorb.)).

### 5.7.1 CBZ-Metabolisierung unter simulierten Sommerbedingungen

#### 5.7.1.1 Antikörperbasiertes CBZ-Nachweisverfahren

Die CBZ-Metabolisierung wurde mit drei Mikroalgen (*Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp.) unter den simulierten Sommerbedingungen getestet. Als Bezugsgröße wurde die entsprechende Zellzahl am Versuchsende verwendet, um trotz algenspezifischer unterschiedlicher Zellteilungen eine vergleichbare Basis zu schaffen (siehe Abschnitt 4.5.1).

Als Messgrundlage zur Bestimmung der CBZ-Konzentration diente eine CBZ-Kalibrierkurve, die durch einen 4-parametrischen sigmoidalen Kurvenfit der Standards erstellt wurden (Abbildung 5.10).

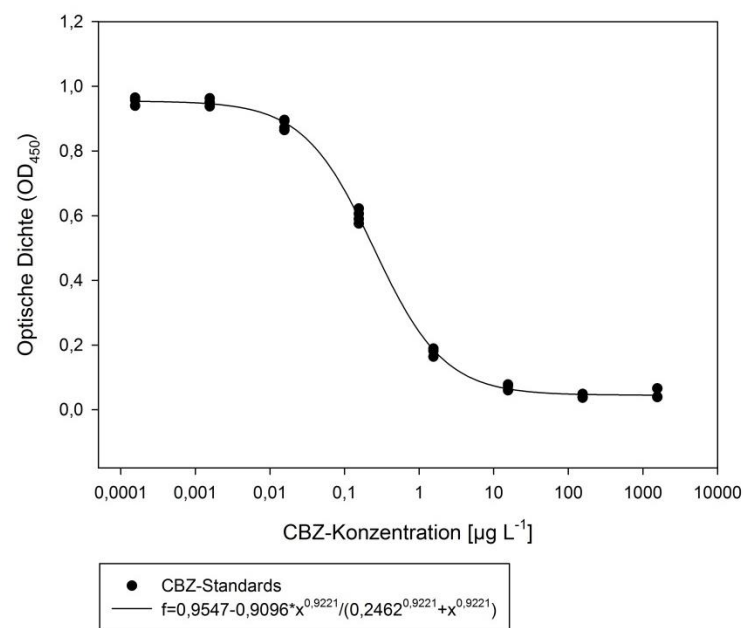


Abbildung 5.10: Beispiel einer Kalibrierkurve für CBZ-Standards; aufgetragen sind die getesteten CBZ-Konzentrationen in  $\mu\text{g L}^{-1}$  gegenüber der optischen Dichte bei 450 nm; der Kurvenfit erfolgte 4-parametrisch sigmoidal nach Hill mit einem  $r^2=0,999$

Das ELISA-Verfahren wurde eingesetzt, um Veränderungen der CBZ-Konzentration im Überstand nach einer 1-wöchigen Kultivierung zu dokumentieren. Die ermittelten Konzentrationsunterschiede waren jedoch nicht groß genug, um bei statistischen Analysen

signifikante Ergebnisse zu liefern, so dass der Versuchszeitraum auf vier Wochen erweitert wurde.

Die Zelldichte am Versuchsende (Zellzahl mL<sup>-1</sup>) wurde als Bezugsgröße für die ermittelten CBZ-Reduktionen gewertet. Hierfür wurden im 1-wöchigen Abstand die Zelldichten photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 4.1.2).

Eine hohe Zunahme der Zelldichte wurde nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen in Kulturen von *Chlorella* sp. erzielt (32,9-fach). Eine Kultivierung in CBZ-haltigem Medium führte hingegen zu einer Wachstumshemmung. In Kulturen von *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurden unter Einfluss von CBZ höhere Zelldichten im Vergleich zur Kontrolle erzielt (Tabelle 5.55).

Tabelle 5.55: Wachstumsveränderungen in Kulturen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. über die Kultivierungsdauer von vier Wochen (Sommerbedingungen) in Kontrollkulturen ohne CBZ und mit Einfluss von 1 µg L<sup>-1</sup> CBZ

	Zellwachstum					
	<i>Chlorella</i> sp.		<i>Parachlorella</i> sp.		<i>Scenedesmus</i> sp.	
	0 µg L <sup>-1</sup> CBZ	1 µg L <sup>-1</sup> CBZ	0 µg L <sup>-1</sup> CBZ	1 µg L <sup>-1</sup> CBZ	0 µg L <sup>-1</sup> CBZ	1 µg L <sup>-1</sup> CBZ
Versuchsstart <sub>Zellzahl</sub> [mL <sup>-1</sup> ]	20.000.000	20.000.000	20.000.000	20.000.000	20.000.000	20.000.000
Versuchsende <sub>Zellzahl</sub> [mL <sup>-1</sup> ]	658.576.682	459.179.120	203.824.390	220.412.618	63.014.724	64.427.886
Wachstum (Faktor)	<b>32,9</b>	<b>23,0</b>	<b>10,2</b>	<b>11,0</b>	<b>3,15</b>	<b>3,22</b>

Im Überstand dieser Kulturen sowie im Kontrollmedium wurde nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen die CBZ-Konzentration bestimmt (Tabelle 5.56). Die prozentuale CBZ-Gesamtreduktion reichte von 18,2 % (*Scenedesmus* sp.) bis 20,9 % (*Parachlorella* sp.) in Bezug auf die jeweiligen Zelldichten am Versuchsende (Tabelle 5.56).

Tabelle 5.56: CBZ-Gesamtreduktion der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. unter Sommerbedingungen; Die Bestimmung der CBZ-Konzentrationen erfolgte im Überstand der Mikroalgenkulturen mittels ELISA nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen

Mikroalge	CBZ-Konzentration <sub>Kontrollmedium</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) (n=3)	CBZ-Konzentration <sub>Mikroalge</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) (n=3)	Entfernungsrate (%)	Versuchsende <sub>Zellzahl</sub> [mL <sup>-1</sup> ]
<i>Chlorella</i> sp.	1,01±0,18	0,81±0,09	19,5	459.179.120
<i>Scenedesmus</i> sp.	1,01±0,18	0,82±0,08	18,2	220.412.618
<i>Parachlorella</i> sp.	1,01±0,18	0,80±0,07	20,9	64.427.886



### 5.7.1.2 Chromatographisches CBZ-Nachweisverfahren

Die Bildung möglicher CBZ-Metabolite wurde zunächst unter simulierten Sommerbedingungen in 3-facher Bestimmung durchgeführt. CBZ sowie gebildete Metabolite wurden nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen chromatographisch bestimmt. Die Messungen erfolgten im Überstand sowie in der intrazellulären Fraktion. Metabolitkonzentrationen, die nur in einer biologischen Wiederholung detektiert wurden, wurden in weiteren Darstellungen vernachlässigt. Zur Verdeutlichung der Messgenauigkeit sind im Anhang die chromatographischen Ergebnisse zur Bestimmung von CBZ und der wichtigsten Metabolite für eine Beispielprobe aufgezeigt (Abbildung A-1).

#### (i) Überprüfung der CBZ-Stabilität

Die Beurteilung der CBZ-Stabilität erfolgt anhand dokumentierter Veränderungen der CBZ-Konzentration zwischen Versuchsbeginn und -ende im Kontrollmedium. Die Startkonzentration lag bei  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. In Abbildung 5.11 ist die CBZ-Konzentration zum Versuchsstart der Konzentration am Versuchsende gegenübergestellt. Zusätzlich sind am Versuchsende gebildete Metabolite aufgezeigt. Die CBZ-Konzentration verringerte sich über die Kultivierungsdauer von vier Wochen um 19,7 % auf  $0,803 \mu\text{g L}^{-1}$ . Die Konzentrationen gebildeter Metabolite lagen bei  $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ 10,11-epoxid,  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$  2-OH CBZ und  $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$  3-OH CBZ. Das Metabolit CBZ-diol wurde im Kontrollmedium nicht nachgewiesen.

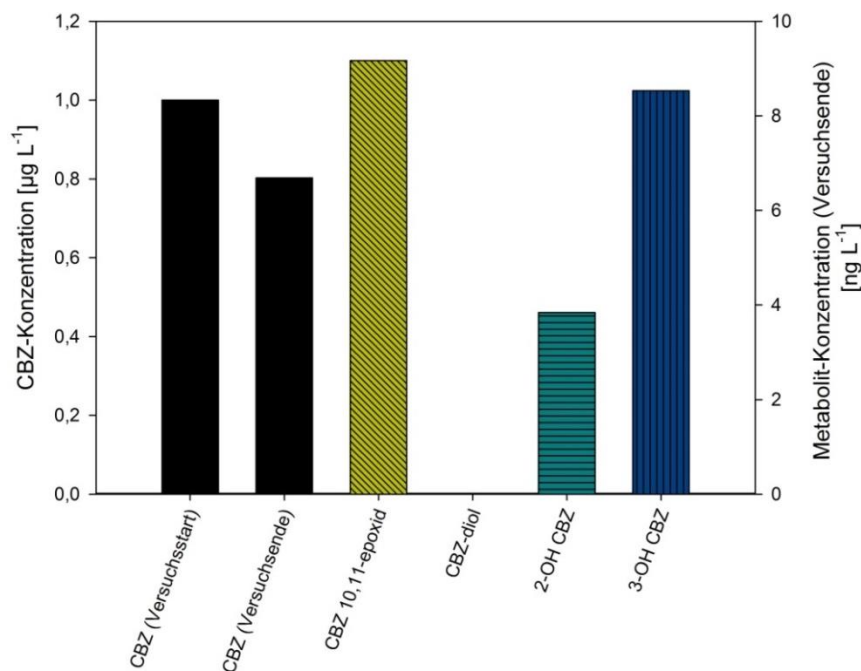


Abbildung 5.11: CBZ-Konzentration in  $\mu\text{g L}^{-1}$  im Kontrollmedium zum Versuchsstart und am Versuchsende nach einer 4-wöchigen Kultivierungsdauer unter Sommerbedingungen; zusätzlich zur CBZ-Konzentration wurden am Versuchsende die Konzentrationen der Metabolite CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ in  $\text{ng L}^{-1}$  gemessen (n=1)

(ii) Untersuchung des Einflusses verschiedener Mikroalgen auf die CBZ-Gesamtreduktion

Die CBZ-Metabolisierung wurde in Bezug auf die entsprechenden Gesamtzellzahlen am Ende des Versuches angegeben, um trotz algenpezifischer unterschiedlicher Zellteilungen eine vergleichbare Basis zu schaffen (siehe Abschnitt 4.5.1). Die Startzellzahl lag in allen Versuchen bei  $2 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Bezugsgröße für die Konzentrationsmessungen nach vier Wochen in den Kulturen mit einer CBZ-Startkonzentration von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  waren  $1,40 \cdot 10^{11}$  Zellen (*Chlorella* sp.),  $4,25 \cdot 10^{10}$  Zellen (*Parachlorella* sp.) und  $8,18 \cdot 10^9$  Zellen (*Scenedesmus* sp.).

Die Messungen wurden im zentrifugierten Überstand der Mikroalgen sowie in der intrazellulären Fraktion der Mikroalgen durchgeführt. Für die Messung in der intrazellulären Fraktion wurden die Mikroalgen pelletiert und aufgeschlossen (siehe Abschnitt 4.1.3 und Abschnitt 4.4.2). Die gemessenen intrazellulären Konzentrationen wurden daher auf die jeweils eingesetzte Zellzahl bezogen.

In Abbildung 5.12 sind die CBZ-Konzentrationen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. im Überstand der Kulturen sowie in der intrazellulären Fraktion der Mikroalgen nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen in  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ aufgetragen. Zum Vergleich ist die entsprechende Konzentration im Kontrollmedium ( $0,803 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aufgezeigt.

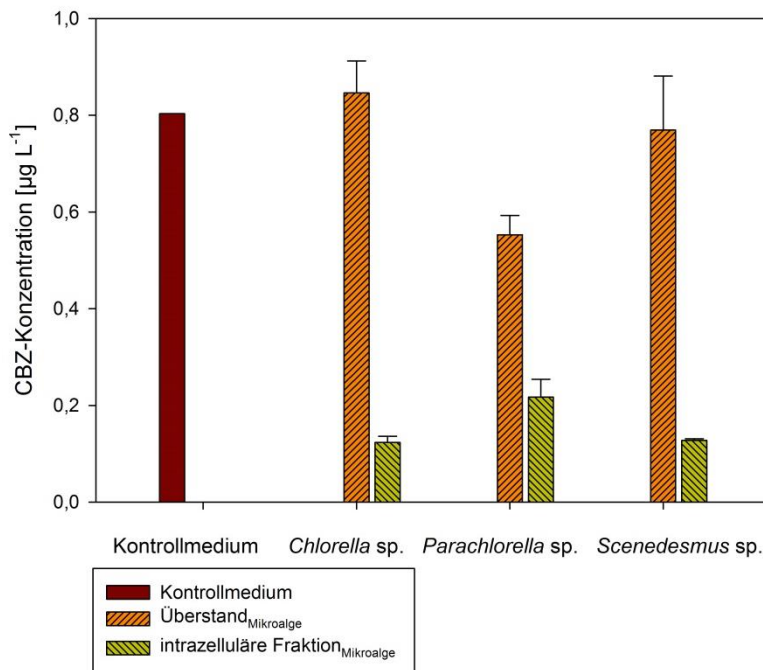


Abbildung 5.12: CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen ( $n=3$ ); die Konzentrationen der intrazellulären Fraktion wurden nach einem Aufschluss von  $1,40 \cdot 10^{11}$  Zellen (*Chlorella* sp.),  $4,25 \cdot 10^{10}$  Zellen (*Parachlorella* sp.) und  $8,18 \cdot 10^9$  Zellen (*Scenedesmus* sp.) gemessen

Die durchschnittlichen CBZ-Konzentrationen lagen für *Chlorella* sp. im Überstand bei  $0,846 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (-15,4 %) und bei  $0,123 \mu\text{g L}^{-1}$  in der intrazellulären Fraktion. Für *Parachlorella* sp. wurden mittlere CBZ-Konzentration im Überstand von  $0,553 \mu\text{g L}^{-1}$  (-44,7 %) und intrazellulär von  $0,217 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Die Konzentrationen für die Kulturen von *Scenedesmus* sp. lagen bei  $0,769$  (Überstand) (-23,1 %) und  $0,128 \mu\text{g L}^{-1}$  (intrazelluläre Fraktion).

In Abbildung 5.13 sind die CBZ 10,11-epoxid-Konzentrationen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. im Überstand der Kulturen sowie in der intrazellulären Fraktion der Mikroalgen nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen in  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ aufgetragen. Als Vergleich dient die entsprechende Konzentration im Kontrollmedium ( $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aufgezeigt.

Im Überstand lag die Konzentration des gebildeten CBZ 10,11-epoxid bei  $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Chlorella* sp.),  $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Parachlorella* sp.) und  $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Scenedesmus* sp.). Intrazellulär wurden geringere Konzentrationen von  $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Chlorella* sp.),  $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Parachlorella* sp.) und  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Scenedesmus* sp.) gemessen.

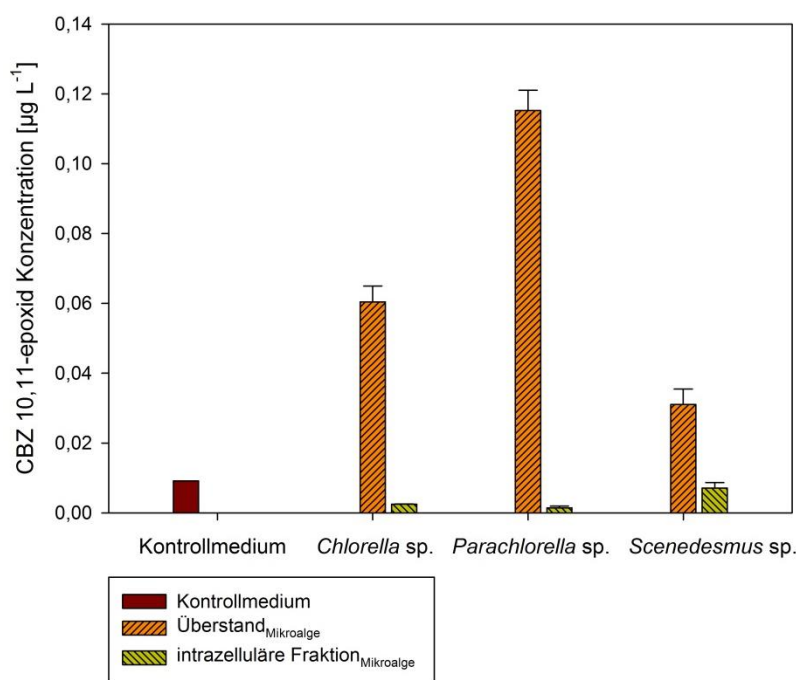


Abbildung 5.13: CBZ 10,11-epoxid-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen (n=3); die Konzentrationen der intrazellulären Fraktion wurden nach einem Aufschluss von  $1,40 \cdot 10^{11}$  Zellen (*Chlorella* sp.),  $4,25 \cdot 10^{10}$  Zellen (*Parachlorella* sp.) und  $8,18 \cdot 10^9$  Zellen (*Scenedesmus* sp.) gemessen

In Abbildung 5.14 sind die CBZ-diol-Konzentrationen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. im Überstand der Kulturen sowie in der intrazellulären Fraktion der Mikroalgen nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen in  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ aufgetragen. Das Metabolit CBZ-diol wurde im Kontrollmedium nicht nachgewiesen

Die durchschnittlichen Konzentrationen lagen im Überstand bzw. in der intrazellulären Fraktion bei  $0,011 \mu\text{g L}^{-1}$  bzw.  $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Chlorella* sp.), bei  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$  bzw.  $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Parachlorella* sp.) und bei  $0,011 \mu\text{g L}^{-1}$  bzw.  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$  (*Scenedesmus* sp.).

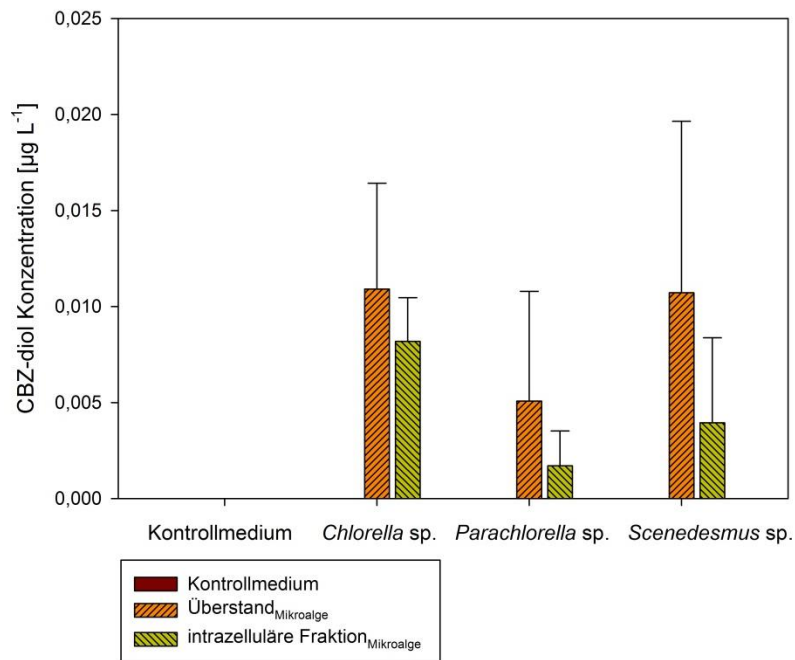


Abbildung 5.14: CBZ-diol-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen ( $n=3$ ); die Konzentrationen der intrazellulären Fraktion wurden nach einem Aufschluss von  $1,40 \cdot 10^{11}$  Zellen (*Chlorella* sp.),  $4,25 \cdot 10^{10}$  Zellen (*Parachlorella* sp.) und  $8,18 \cdot 10^9$  Zellen (*Scenedesmus* sp.) gemessen

Die durchschnittlichen Konzentrationen des Metabolits 2-OH CBZ wurden im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. gemessen. Die Ergebnisse nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen sind in  $\mu\text{g L}^{-1}$  in Abbildung 5.15 dargestellt.

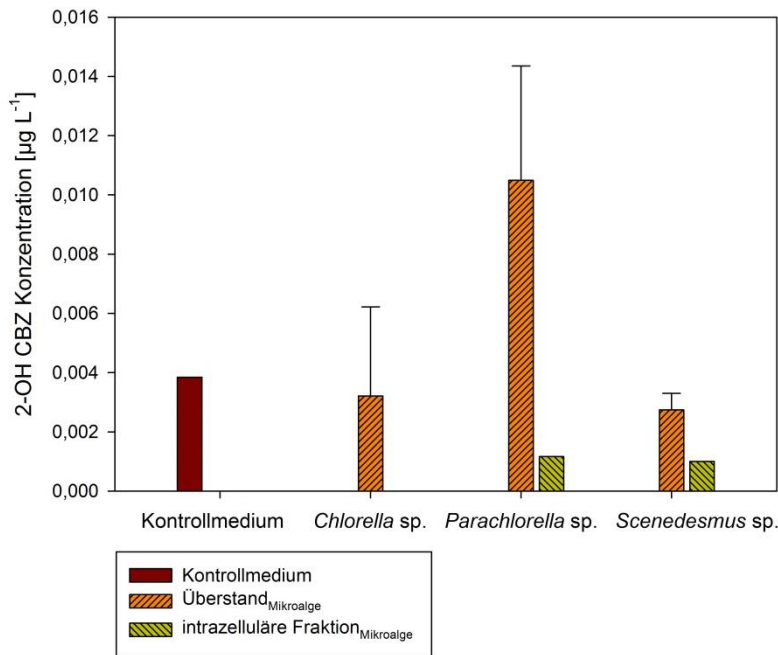


Abbildung 5.15: 2-OH CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen ( $n=3$ ); die Konzentrationen der intrazellulären Fraktion wurden nach einem Aufschluss von  $1,40 \cdot 10^{11}$  Zellen (*Chlorella* sp.),  $4,25 \cdot 10^{10}$  Zellen (*Parachlorella* sp.) und  $8,18 \cdot 10^9$  Zellen (*Scenedesmus* sp.) gemessen

Im Kontrollmedium wurde eine durchschnittliche Konzentration des Metabolits 2-OH CBZ von  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Für *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. lag die Konzentration im Überstand bei  $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$  2 OH CBZ. Im Überstand von *Parachlorella* sp. wurden  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. In den intrazellulären Fraktionen dieser Mikroalgen konnten keine 2-OH CBZ-Konzentration nachgewiesen werden (Abbildung 5.15).

In Abbildung 5.16 sind die 3-OH CBZ-Konzentrationen der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. im Überstand der Kulturen sowie in der intrazellulären Fraktion der Mikroalgen nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen in  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ aufgetragen. Zusätzlich ist die entsprechende Konzentration im Kontrollmedium ( $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aufgezeigt. Für Kulturen von *Chlorella* sp. wurde im Überstand eine durchschnittliche 3-OH CBZ-Konzentration von  $0,0008 \mu\text{g L}^{-1}$  ermittelt. Die Konzentration in der intrazellulären Fraktion lag bei  $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ . Im Überstand der Mikroalge *Parachlorella* sp. wurden  $0,0119 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen. Die Konzentration in der intrazellulären Fraktion betrug  $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ . In Kulturen der Mikroalge *Scenedesmus* sp. wurde eine 3-OH CBZ-Konzentration ausschließlich im Überstand mit  $0,0004 \mu\text{g L}^{-1}$  gemessen.

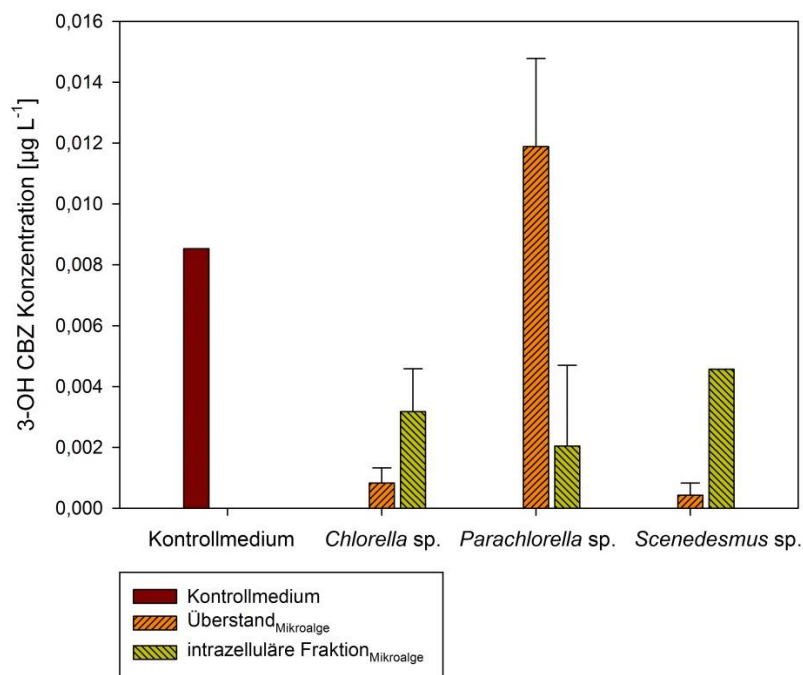


Abbildung 5.16: 3-OH CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium sowie im Überstand und in der intrazellulären Fraktion in Kulturen der Mikroalge *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen ( $n=3$ ); die Konzentrationen der intrazellulären Fraktion wurden nach einem Aufschluss von  $1,40 \cdot 10^{11}$  Zellen (*Chlorella* sp.),  $4,25 \cdot 10^{10}$  Zellen (*Parachlorella* sp.) und  $8,18 \cdot 10^9$  Zellen (*Scenedesmus* sp.) gemessen

Die höchste CBZ-Entfernung (-44,7 %) wurden im Überstand der Mikroalge *Parachlorella* sp. unter Sommerbedingungen erzielt. Ein ganzjähriger Einsatz der Mikroalgen in der Bioremediation bedarf einer CBZ-Metabolisierung ebenfalls unter Winterbedingungen. Daher wurde in einem weiteren Versuch die Entfernungskapazität der Mikroalge *Parachlorella* sp. zusätzlich unter Winterbedingungen analysiert.

### 5.7.2 CBZ-Metabolisierung unter simulierten Winterbedingungen

Die Untersuchung der CBZ-Gesamtreduktion unter den simulierten Winterbedingungen wurde aufbauend auf den im Abschnitt 5.8.2 erzielten Ergebnissen in Kulturen von *Parachlorella* sp. getestet. Die Bestimmung der Konzentrationen von CBZ und gebildeter Metabolite erfolgte ausschließlich über chromatographische Nachweisverfahren.

Auch unter simulierten Winterbedingungen wurde ein Wachstumsanstieg in Kulturen von *Parachlorella* sp. nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen gemessen. Während in der Kontrollkultur ohne CBZ die Zelldichte um das 3,22-fache anstieg, wurde in Kulturen mit CBZ das 3,45-fache erzielt (Tabelle 5.57).

Die Zellzahl zum Versuchsbeginn lag bei  $0,4 \cdot 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Die Zellzahl am Ende der Kultivierungsdauer von vier Wochen in CBZ-haltigem Medium ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) lag bei  $3,1 \cdot 10^{10}$  Zellen im gesamten Versuchsansatz bzw.  $1,3 \cdot 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Die Gesamtzellzahl diente als Bezugsgröße für die im Folgenden aufgezeigten Konzentrationsmessungen.

Tabelle 5.57: Wachstumsveränderungen in Kulturen der Mikroalge *Parachlorella* sp. über die Kultivierungsdauer von vier Wochen (Winterbedingungen) in Kontrollkulturen ohne CBZ und mit Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ

	Zellwachstum	
	<i>Parachlorella</i> sp.	
	$0 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ	$1 \mu\text{g L}^{-1}$ CBZ
Versuchsstart <sub>Zellzahl</sub> [ $\text{mL}^{-1}$ ]	32.838.726	36.801.748
Versuchsende <sub>Zellzahl</sub> [ $\text{mL}^{-1}$ ]	105.626.099	126.941.804
Wachstum (Faktor)	<b>3,22</b>	<b>3,45</b>

Die Konzentrationen von CBZ sowie der Metabolite CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ, die im Kontrollmedium nach vier Wochen unter Winterbedingungen gemessen wurden, sind in Abbildung 5.17 aufgetragen. Als Vergleich dient die CBZ-Konzentration von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  zu Versuchsbeginn. Unter Winterbedingungen ist nur ein geringer photochemischer CBZ-Abbau von 5,1 % auf  $0,95 \mu\text{g L}^{-1}$  erkennbar. Die detektierbaren Metabolit-Konzentrationen lagen bei  $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ 10,11-epoxid,  $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$  2-OH CBZ und  $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$  3-OH CBZ. Das Metabolit CBZ-diol konnte nicht nachgewiesen werden.

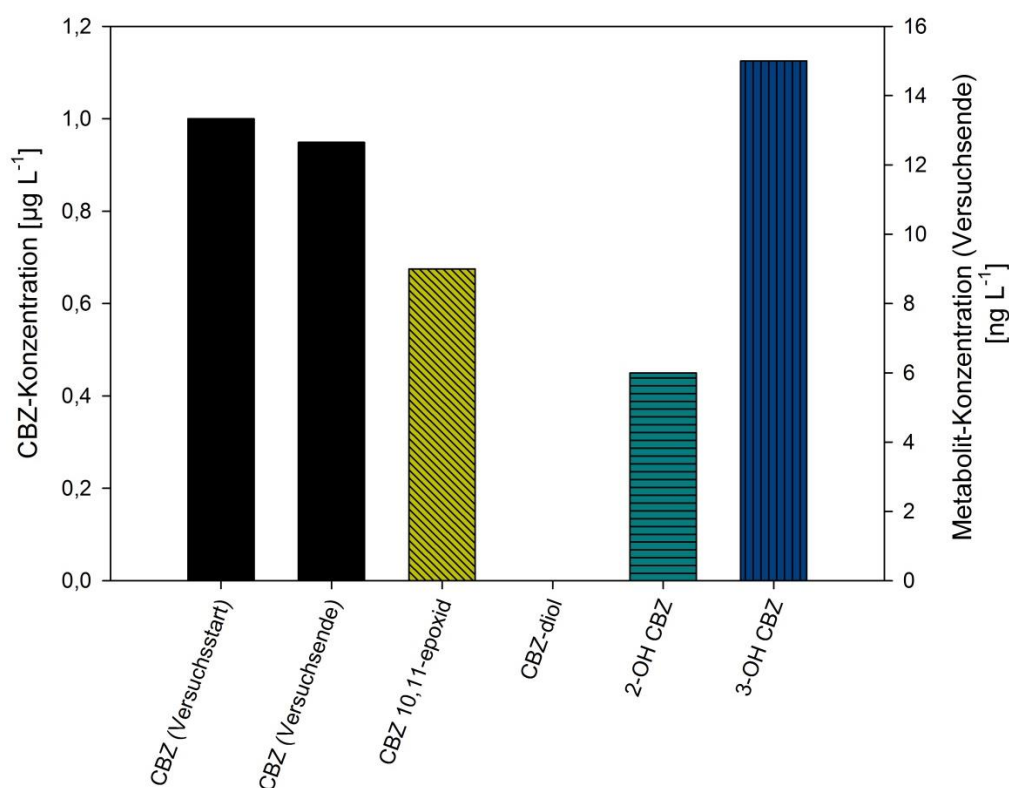


Abbildung 5.17: CBZ-Konzentration in  $\mu\text{g L}^{-1}$  im Kontrollmedium zum Versuchsstart und am Versuchsende nach einer 4-wöchigen Kultivierungsdauer unter Winterbedingungen; zusätzlich zur CBZ-Konzentration wurden am Versuchsende die Konzentrationen der Metabolite CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ in  $\text{ng L}^{-1}$  gemessen (n=1)

Die Untersuchungen zur Bestimmung der CBZ-Metabolisierungskapazität unter Winterbedingungen wurden mit der Mikroalge *Parachlorella* sp., aufgrund der bereits erzielten hohen CBZ-Entfernungsrates unter Sommerbedingungen, durchgeführt (Abbildung 5.18). Die CBZ- und Metabolit-Konzentrationen wurden im zentrifugierten Überstand der Kulturen sowie in der intrazellulären Fraktion der Mikroalge bestimmt.

Zusätzlich zu den Messungen im Überstand und in der intrazellulären Fraktion sind die entsprechenden CBZ-Konzentrationen im Kontrollmedium aufgezeigt (Abbildung 5.18). Im Überstand der Kulturen wurde eine durchschnittliche CBZ-Konzentration von  $0,95 \mu\text{g L}^{-1}$  (-5,1 %) gemessen. Intrazellulär lag die Konzentration bei  $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Die Metabolit-Konzentrationen im Überstand lagen bei  $0,013 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ 10,11-epoxid,  $0,012 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ-diol und  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  2-OH CBZ. Das Metabolit 3-OH CBZ wurde nur in einer biologischen Wiederholung nachgewiesen und wurde somit in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Intrazellulär wurden geringere Metabolit-Konzentrationen gemessen:  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ 10,11-epoxid und  $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$  3-OH CBZ. Die Metabolite CBZ-diol und 2-OH CBZ wurden intrazellulär nur in jeweils 1 Probe detektiert.

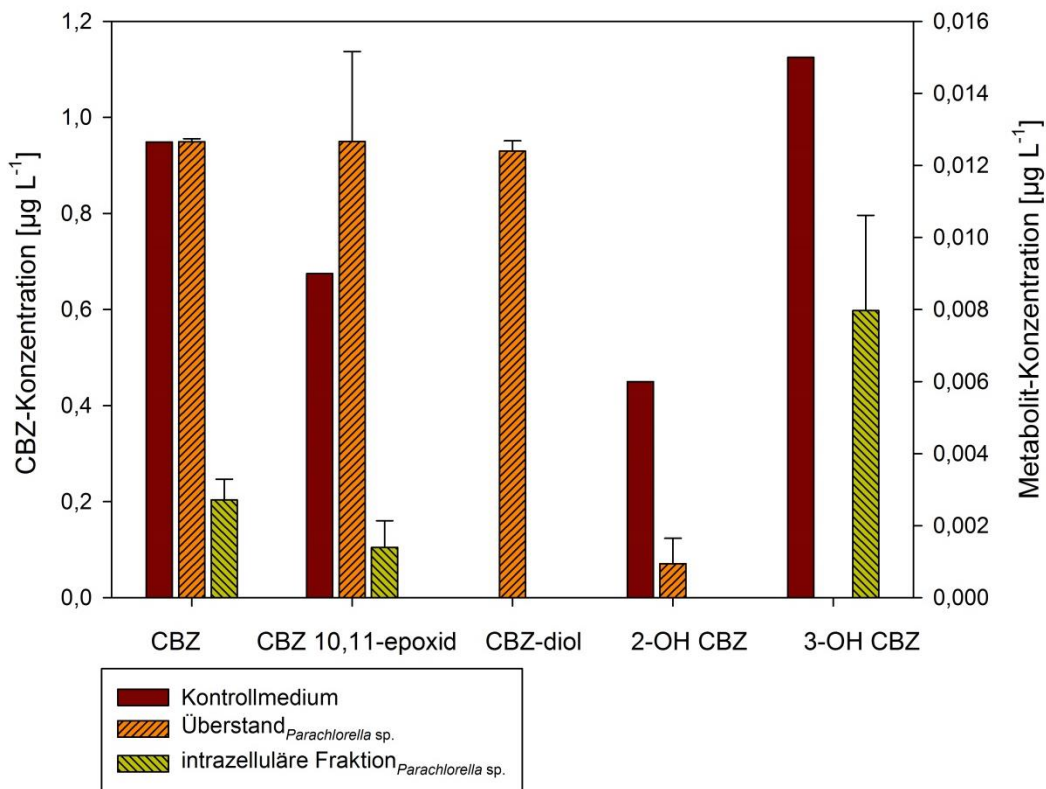


Abbildung 5.18: Die Konzentrationen von CBZ und den wichtigsten Metaboliten CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ wurden chromatographisch im Kontrollmedium (n=1), im Überstand (n=3) und in der intrazellulären Fraktion der Mikroalge *Parachlorella* sp. (n=3) nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen unter Winterbedingungen bestimmt; die Konzentrationen der intrazellulären Fraktion wurden nach einem Aufschluss von  $1,3 \cdot 10^8$  Zellen (*Parachlorella* sp.) gemessen



## 6 Diskussion

### 6.1 Mikroalgen aus der Leine

Der Einfluss klimatischer Effekte auf Mikroalgen wird in diesem Abschnitt diskutiert. Hierfür wurden Mikroalgen aus der Leine im Sommer und im Winter isoliert und unter den saisonalen Bedingungen im Labor kultiviert. Es wurden klimatische Effekte auf das Wachstum, die Pigmente der Photosynthese (Chlorophyll a und b, Carotinoide), die Energieverwertung während der Photosynthese ( $O_2$ -Entwicklung) und die Produkte der Photosynthese (Zucker, Protein) untersucht (siehe Abschnitt 5.1).

Mikroalgen leisten einen hohen Beitrag zur Selbstreinigungskapazität der Flüsse. Die Selbstreinigungskapazität wird allerdings stark durch klimatische Effekte beeinflusst. Die Größe und Zusammensetzung der Algenpopulationen sowie ihre metabolische Aktivität hängen somit von der Fließgeschwindigkeit, der Temperatur, vom Nährstoffeintrag und der Lichtintensität ab. Abhängig vom Klima sind daher unterschiedliche Algendichten für die Entfernung von Arzneistoffen aus der aquatischen Umwelt notwendig (Haase *et al.* 2015a).

#### 6.1.1 Typisierung isolierter Mikroalgen

Die im Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Schritte der Genotypisierung wurden an Reinkulturen durchgeführt. Hierfür wurden mehrfache Verdünnungsausstriche auf Agarplatten angefertigt, einzelne Kolonien gepickt und in eine Flüssigkultur überführt. Mikroskopische Untersuchungen dienten hierbei der Überprüfung der Vereinzlungsschritte. Aufgrund der Isolierungsmethode, die im Rahmen dieser Arbeit gewählt wurde, ist davon auszugehen, dass nicht alle Algenzellen der entnommenen Wasserprobe erfasst wurden. Es wurden ausschließlich die Mikroalgen, die sich in der Anreicherungsphase durchgesetzt haben, genotypisch bestimmt.

Die isolierte DNA wurde über PCR-Schritte amplifiziert, wobei universelle Primer nach Sherwood und Presting (2007) eingesetzt wurden. Hierbei handelte es sich um Plastid 23S rRNA Primer, die bereits erfolgreich bei der Amplifizierung von Mikroalgen eingesetzt wurden (Sherwood und Presting 2007). Pallokat (2011) testete in seiner Studie sowohl universelle als auch spezifische Primer zur Sequenzierung einzelliger eukaryotischer Lebewesen. Die Hauptschwierigkeit beim Einsatz spezifischer Primer schien in der Herstellung zu liegen. So können die Primer-Länge sowie die Primer-Bindestellen einen entscheidenden Einfluss auf die Primer-Reaktivität haben. Im Rahmen dieser Studie

wurden ausschließlich universelle Primer eingesetzt. Dadurch bedingte mögliche Ungenauigkeiten in der Sequenzierung lagen in einem akzeptablen Bereich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Methode zur Vervielfältigung des PCR-Fragments die Vektor-Klonierung in *E.coli* gewählt. Mit Hilfe dieser Methode kann das gewünschte DNA-Fragment in großem Umfang kloniert und mit höherer Genauigkeit sequenziert werden. Eine in Vorversuchen durchgeführte direkte Sequenzierung der PCR-Produkte ohne Vektor-Klonierung lieferte keine verlässlichen Ergebnisse, so dass diese Methode nicht weiter verfolgt wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genotypisierung als Teilstudie durchgeführt. Der eigentliche Fokus der Arbeit lag hingegen auf den Effekten, die in den isolierten Mikroalgen durch CBZ induziert wurden. Daher beruht die Durchführung der Genotypisierung ausschließlich auf bereits bestehenden Methoden und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend optimiert.

### 6.1.2 Saisonale Häufigkeitsverteilung der isolierten Mikroalgen

Die Bestimmung der saisonalen Häufigkeitsverteilung erfolgte als Momentaufnahme im Januar und Juli 2014, um einen Einblick in den Größenbereich der Zelldichten zu erhalten.

Wie in den Versuchen gezeigt wurde, veränderte sich die Zusammensetzung der Mikroalgenpopulationen im Fluss Leine abhängig von der Temperatur (siehe Tabelle 5.2). Im Sommer als auch im Winter wurden jeweils fünf Mikroalgenspezies isoliert und identifiziert. Ausschließlich zwei Mikroalgenspezies wurden unter beiden saisonalen Bedingungen mit hoher Zelldichte detektiert (*Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp.). Das saisonal-unabhängige Auftreten der Mikroalge *Chlorella* sp. ist in der erhöhten Konkurrenzfähigkeit zur Lichtabsorption begründet (Huisman *et al.* 1999). Neben der Zusammensetzung der Population variierten auch die Zelldichten saisonal-bedingt. Durchschnittlich lag die Zelldichte im Sommer achtmal höher. Die Häufigkeit weiterer identifizierter Spezies variierte ebenfalls stark. Vermutlich sind die Mikroalgen in der Leine an spezielle Umweltbedingungen wie Temperatur und Licht angepasst, so dass die Anzahl der Zellen dieser Mikroalgen zu bestimmten Jahreszeiten unter der Detektionsgrenze unserer Analysen lag.

### 6.1.3 Klimatische Effekte auf die Zellteilung und die Photosynthese

Niedrige Temperaturen können sowohl in Pflanzen als auch in Grünalgen essentielle Prozesse der Photosynthese hemmen. Betroffen sind u.a. der Elektronentransport oder

der Calvin-Benson-Zyklus. Wird die absorbierte Energie nicht verwertet, erhöht sich die Gefahr des oxidativen Stresses für die Photosysteme und es führt zur Schädigung des Photosyntheseapparats. In Kombination mit hoher Lichtintensität können niedrige Temperaturen eine chronische Photoinhibition des PS II hervorrufen (Allen und Ort 2001). Die erhöhte Thermosensitivität des PS II wurde ebenfalls von Armond *et al.* (1980) und Morgan-Kiss *et al.* (2002) dokumentiert.

Temperaturen haben einen großen Einfluss auf verschiedene zelluläre Komponenten und Stoffwechselprozesse. Extreme Temperaturbereiche bewirken intrazellulären Stress mit unterschiedlichem Schweregrad abhängig von der Höhe der Temperaturveränderung, der Intensität und der Dauer. Allgemein wird zwischen „Kühlstress“ (chilling) ( $> 0\text{ °C}$ ) und „Gefrierstress“ (freezing) ( $< 0\text{ °C}$ ) unterschieden (Sung *et al.* 2003). Niedrige Temperaturen im Bereich von 0 bis 15 °C sind für unsere Breitengrade im Winter typisch. Niedrige Temperaturen gelten als abiotische Umweltstressfaktoren (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 2000; Krasensky und Jonak 2012; Miura und Furumoto 2013), indem sie sich negativ auf wichtige physiologische Funktionen (z. B. Photosynthese) auswirken (Ruelland und Zachowski 2010; Lange 2012; Theocharis *et al.* 2012). Durch das Ungleichgewicht zwischen der Fähigkeit Licht aufzunehmen und diese Energie über metabolische Prozesse abzubauen, kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommen (übermäßige Anregung des PS II) (Miura und Furumoto 2013).

In Pflanzen können in diesem Temperaturbereich Toleranzeffekte beobachtet werden, die als „cold acclimation“ bezeichnet werden (Theocharis *et al.* 2012). Die Pflanze erreicht eine höhere Toleranz gegenüber kalten Temperaturen, indem sie als Antwort auf diese Temperaturen Veränderungen in ihrer Physiologie und Biochemie vornimmt (Gilmore *et al.* 1998; Miura und Furumoto 2013). So können Zellen ihre Membranstrukturen und die Zusammensetzung der Zellwandkomponenten anpassen und Veränderungen im Zellzyklus und der Zellteilung vornehmen (Krasensky und Jonak 2012). Eine Verringerung der Membranfluidität ist von Allen und Ort (2001) beschrieben worden. Zusätzlich ist die Anreicherung von Calciumionen als Signalmolekül belegt (Sanders *et al.* 2002; Theocharis *et al.* 2012).

In Pflanzen sind verschiedene Wege für die kälteregulierte Genexpression bekannt (Gilmore *et al.* 1998), wobei sich die Spezies in ihrem Anpassungsmechanismus unterscheiden (Thomashow 1998). Auch einige Mikroalgen sind in der Literatur für ihre Stresstoleranz gegenüber kalten Temperaturen beschrieben (z. B. *Dunaliella*) (Larcher 2003; Haghjou und Shariati 2007).

### 6.1.3.1 Wachstum unter saisonalen Bedingungen

Verfügbarkeit von Nährstoffen, Lichtintensitäten und Temperatur sind wichtige Faktoren, die sich auf physiologische Funktionen in den Zellen auswirken (Oswald *et al.* 1953).

In dieser Studie wurde zunächst der klimatische Einfluss auf das Wachstum untersucht (siehe Tabelle 5.3). Hierfür wurden die isolierten Mikroalgen im Labor unter den Temperatur- und Lichtbedingungen am Tag der Isolierung kultiviert (simulierte Sommer- und Winterbedingungen).

Das Wachstum wurde in einem definierten Standardmedium (Düngermedium) gemessen. Die Wachstumsraten von Mikroalgen sind sehr stark von der Zusammensetzung des Mediums abhängig. Ruiz-Marin *et al.* (2010) verglichen das Wachstum von *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. in zwei abwasserhaltigen Medien. Die Kultivierung in künstlichem Abwasser erzielte in beiden Populationen deutlich höhere Wachstumsraten im Vergleich zu kommunalem Abwasser. In der Studie konnte mit Düngermedium das höchste Wachstum der Mikroalgen erzielt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Kultivierung nicht unter Optimalbedingungen durchgeführt wurde, da auf zusätzliche CO<sub>2</sub>-Anreicherung verzichtet wurde.

Die beschriebenen Kultivierungsbedingungen (Schüttelintensität, Lichtintensität und -dauer, Temperatur) wurden dennoch gewählt, um die Umweltbedingungen in der Leine realitätsnah im Labor abbilden zu können. Der Fokus lag demnach nicht auf einem maximalen Wachstum, sondern auf der Etablierung einer stabilen Kultur für einen Einsatz in der Umwelt.

Eine verringerte Wachstumsrate unter Winterbedingungen konnte für alle Mikroalgen beobachtet werden. Dagegen sind die Prozesse der Photosynthese weniger temperaturanfällig als die Wachstumsprozesse (Pollock *et al.* 1983). Der klimatische Einfluss auf die physiologischen Funktionen wird im Folgenden beschrieben.

### 6.1.3.2 Pigmente der Photosynthese

Klimatische Effekte auf den Pigmentgehalt als photosynthetischer Parameter wurden im Hinblick auf einen ganzjährigen Einsatz der Mikroalgen in der CBZ-Bioremediation untersucht.

Die Pigmente Chlorophyll a und b sind als Bestandteile des Photosyntheseapparats an der Lichtabsorption beteiligt. Die Lichtsammelkomplexe (LHC; engl.: *light-harvesting complex*) am PS I (LHC I) und PS II (LHC II) absorbieren Licht und leiten die Energie zu den Reaktionszentren weiter. Die Reaktionszentren wandeln die Lichtenergie durch

Übertragung von Elektronen aus der Wasserspaltung auf  $\text{NADP}^+$  in elektrochemische Energie um. Die Reaktionszentren enthalten nur Chlorophyll a, während Chlorophyll b ausschließlich in den Lichtsammelkomplexen vorhanden ist (Thornber *et al.* 1987).

Eine Studie dokumentierte, dass 95-98 % des Gesamt-Chlorophylls gebunden an Protein vorliegt. 40 % des Gesamt-Chlorophylls sind im LHC I gebunden, 10 % im LHC II (Noben *et al.* 1983). Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass alle photosynthetischen Pigmente Höherer Pflanzen mit Protein komplexiert vorliegen (Anderson *et al.* 1978).

Eine Hemmung der Photosynthese bedingt durch induzierten Kältestress kann zu Veränderungen im Pigmentgehalt führen. Die antioxidative Wirkung des Chlorophyll a und der Carotinoide ist in der Literatur beschrieben (Lanfer-Marquez *et al.* 2005; Gill und Tuteja 2010). Eine Steigerung der Gehalte an Chlorophyll a und Carotinoiden unter Stressbedingungen kann daher als Zellantwort zur Verbesserung der Stresstoleranz und als Schutz vor erhöhter ROS-Gefahr gewertet werden. Erhöhte Chlorophyll b-Gehalte wurden zudem bei Höheren Pflanzen als Antwort auf schattige Kultivierungsbedingungen gemessen (Hess und Tolbert 1967). Gegensätzliche Reaktionen (z. B. Abnahme des Chlorophyllgehalts) sind in der Literatur auch als Anpassungsreaktion auf kalte Bedingungen sowie als Reaktion auf oxidativen Stress beschrieben worden. Ein erhöhtes Verhältnis von Carotinoiden zu Chlorophyll ist jedoch entscheidend, um kalte Bedingungen zu tolerieren (Haghjou und Shariati 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deutliche klimatische Effekte auf den Pigmentgehalt ausschließlich in der Mikroalge *Klebsormidium* sp. beobachtet. Simulierte Winterbedingungen führten zu einer Reduzierung der Pigmentgehalte um annähernd 50 %, so dass auf eine Hemmung der photosynthetischen Leistung unter Winterbedingungen geschlossen werden konnte. In den anderen Mikroalgen wurden keine bzw. nur sehr geringe Unterschiede dokumentiert (siehe Tabelle 5.4 und Tabelle 5.5). Die Ergebnisse lassen eine erhöhte Stresstoleranz vermuten, die im Folgenden anhand weiterer Untersuchung zum klimatischen Einfluss auf die Produkte der Photosynthese und Energieverwertung überprüft werden soll.

#### 6.1.3.3 Energieverwertung während der Photosynthese

Es wird beschrieben, dass „Kühlstress“ die Kapazität der  $\text{CO}_2$ -Assimilation reduziert und dadurch den Verbrauch von NADPH hemmt (Kingston-Smith *et al.* 1997). Wie bereits in Experimenten mit Höheren Pflanzen gezeigt werden konnte, ist die Hemmung der Photosynthese, bedingt durch Kühlstress, mit einer hohen Lichtsensitivität verbunden (Powles *et al.* 1983). Daher ist zu vermuten, dass gestresste Mikroalgen einem erhöhten ROS-Risiko unterliegen, sobald ein Überschuss an angeregter Lichtenergie zu einer

übermäßigen Anregung der der Elektronentransportkette führt (Melis 1999; Miura und Furumoto 2013).

In Pflanzen konnten verschiedene Strategien zum Schutz vor niedrigen Temperaturen identifiziert werden. Das nicht-photochemische Quenching (NPQ) ist ein wichtiger Schutzmechanismus, bei dem im Falle einer Hemmung der Photosynthese Elektronen verbraucht werden (Savitch *et al.* 2000; Ivanov *et al.* 2003; Ivanov *et al.* 2008; Theodoridis *et al.* 2012). Der Violaxanthinzyklus ist der wichtigste Bestandteil des NPQ. Er dient dem Schutz des PS II durch Umwandlung überschüssiger Energie in Wärme (Adams *et al.* 1995).

In dieser Studie konnte eine reduzierte photosynthetische Aktivität, gemessen anhand der Sauerstoffentwicklung, unter niedrigen Temperaturen dokumentiert werden (Tabelle 5.6). Dies ist ein Indikator für eine verringerte CO<sub>2</sub>-Assimilation. Unter günstigeren Kultivierungsbedingungen (Sommerbedingungen) zeigten alle getesteten Mikroalgen eine höhere photosynthetische Aktivität auf.

In Übereinstimmung mit Experimenten an Höheren Pflanzen sind niedrige Lichtintensitäten ausreichend, um den Lichtsättigungspunkt unter kalten Stressbedingungen zu erreichen, da ebenfalls die CO<sub>2</sub>-Assimilation verringert ist. Der Lichtkompensationspunkt charakterisiert die Lichtintensität, bei welcher die Aufnahme und Freisetzung von CO<sub>2</sub> identisch sind.

In dieser Studie wurden unter Sommerbedingungen deutlich höhere Lichtkompensationspunkte erreicht (siehe Tabelle 5.7) als unter Winterbedingungen. Als Ursache für die geringeren Lichtkompensationspunkte unter Winterbedingungen ist eine Reduktion der oben beschriebenen Schutzmechanismen zu sehen. Verringerte Aktivität z. B. des Violaxanthinzyklus erhöht die Effektivität der Photosynthese. Somit benötigen die Mikroalgen unter Sommerbedingungen eine höhere Lichtmenge für die Stoffwechselprozesse. In Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Coccomyxa* sp., *Scenedesmus* sp. und *Neochloris* sp. kann zudem vermutet werden, dass eine stressbedingte, verstärkte Zuckerveratmung unter simulierten Winterbedingungen einen Einfluss auf den Lichtkompensationspunkt hatte.

### 6.1.3.4 Produkte der Photosynthese

Weiterhin wurden klimatischbedingte Veränderungen im Produktgehalt (Protein, Zucker) untersucht.

Der Proteingehalt wurde in Algenkulturen gemessen, die unter Sommer- und Winterbedingungen kultiviert wurden. Messungen im Labor dokumentierten in allen getesteten

Mikroalgen höhere Proteingehalte unter Winterbedingungen (siehe Tabelle 5.8). Pflanzenzellen sind, als Antwort auf abiotischen Stress, in der Lage verschiedene Aminosäuren zu akkumulieren (Lugan *et al.* 2010). Durch die in unserer Studie eingesetzte Bestimmungsmethode konnten neben Proteinen auch freie Aminosäuren nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der erhöhte Proteingehalt auf eine Akkumulation freier Aminosäuren und der Synthese von Speicherproteinen zurückzuführen.

Während in einigen Arbeiten die Anhäufung von Aminosäuren mit einem Zellschaden in Verbindung gebracht wurde (Widodo *et al.* 2009), beschreiben Krasensky und Jonak (2012) den positiven Effekt verstärkt gebildeter Aminosäuren (z. B. Prolin, GABA) auf den Prozess der Anpassungsreaktionen in Stresssituationen.

Als Ursache für eine erhöhte Akkumulation freier Aminosäuren in Pflanzen ist entweder ein verstärkter Proteinabbau (Krasensky und Jonak 2012) oder eine stressinduzierte, verstärkte Aminosäuresynthese zu nennen. Veränderungen in der Genexpression und damit verbunden eine Veränderung der Proteinzusammensetzung unter Kältestress in grünen Mikroalgen konnten auch von Choi und Lee (2012) nachgewiesen werden. Denkbar ist auch eine erhöhte Proteinsynthese zur Bildung ROS-entgiftender Enzyme. Dieser Zusammenhang wurde bisher aber noch nicht durch experimentelle Ergebnisse belegt.

Der Zuckergehalt wurde ebenfalls in Algenkulturen gemessen, die unter beiden klimatischen Bedingungen kultiviert wurden (siehe Tabelle 5.9). Die Bestimmung des Gesamtzuckers erfolgte nach Dubois *et al.* (1956). Als Referenz diente Glukose, als Hauptprodukt der Photosynthese und als Vorstufe für weitere Verbindungen.

Zucker können als intrazelluläre Osmolyten fungieren. Daneben spielen sie eine wichtige Rolle im Schutz gegen oxidativen Stress (Madden *et al.* 1985; Kaplan *et al.* 2004).

In dieser Arbeit führten simulierte Winterbedingungen zu einer intrazellulären Zuckeranreicherung in Kulturen von *Klebsormidium* sp., *Pedinomonas* sp. und *Ignatius* sp. gemessen. Paul *et al.* (1992) dokumentierten ebenfalls unter niedrigen Temperaturen eine erhöhte Akkumulation löslicher Kohlenhydrate. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass die Enzyme der Stärkesynthese im Vergleich u.a. zu den Enzymen der Saccharosesynthese kälteempfindlicher sind (Pollock und Lloyd 1987). Auch kann ein reduzierter Kohlenhydratexport eine intrazelluläre Akkumulation bedingen. Zusätzlich zum Einfluss des Kältestresses auf die Proteinzusammensetzung in grünen Mikroalgen dokumentierten Choi und Lee (2012) Veränderungen in der Zucker und Lipidzusammensetzung. Pflanzen akkumulieren Kohlenhydrate, um während Phasen mit geringer Energieversorgung

oder verstärktem Energiebedarf die Versorgung der Zellen aufrecht zu halten (Krasensky und Jonak 2012).

In Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Coccomyxa* sp., *Scenedesmus* sp. und *Neochloris* sp. führten hingegen abiotische Stressbedingungen aufgrund niedriger Temperaturen und geringer Lichtintensitäten zu einer Abnahme des Zuckergehalts. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die photosynthetische Zuckerproduktion nicht den Zuckerverbrauch in Stressbedingungen kompensieren kann. Möglicherweise ist die Abnahme im Zuckergehalt auf eine Hemmung der CO<sub>2</sub>-Assimilation und auf eine daraus resultierende Hemmung der Zuckerbildung zurückzuführen (Strand *et al.* 1997; Sage und Kubien 2007). Zudem kann ein stressbedingter erhöhter Energiebedarf eine verstärkte Zuckerveratmung bedingen. Allgemein weist der Kohlenhydratmetabolismus eine erhöhte Sensitivität gegenüber niedrigen Temperaturen auf, so dass bei niedrigen Temperaturen eine Beeinträchtigung der Photosynthese erwartet werden kann (Leegood und Edwards 2006).

### 6.1.4 Zwischenfazit zum Abschnitt „Mikroalgen aus der Leine“

Niedrige Temperaturen bewirken eine Hemmung wichtiger Stoffwechselprozesse. In Laborversuchen wurden im Rahmen dieser Studie klimatische Effekte definierter Sommerbedingungen (20 °C, 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 16 h Tag/8 h Nacht) und Winterbedingungen (4 °C, 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 9 h Tag/15 h Nacht) verglichen.

In Abhängigkeit von den saisonalen Bedingungen wurden daher Effekte auf (i) die Mikroalgenpopulation, (ii) das Wachstum der Mikroalgen, und (iii) den Photosyntheseapparat erwartet.

#### (i) Mikroalgenpopulation in der Leine unter saisonalen Bedingungen

Ein klimatischer Effekt auf die Mikroalgenpopulation in der Leine konnte bestätigt werden. So variierten abhängig von den saisonalen Bedingungen sowohl die Zusammensetzung der Algenpopulationen als auch die dokumentierten Zelldichten der identifizierten Spezies (siehe Tabelle 5.2).

Zwei Mikroalgenspezies wurden unter beiden saisonalen Bedingungen mit einer hohen Zelldichte identifiziert (*Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp.). Dieses deutet auf eine erhöhte Toleranz der Mikroalgen gegenüber klimatischer Veränderungen hin. Weitere klimatische Effekte werden daher zusammenfassend an diesen beiden Mikroalgen diskutiert.



## (ii) Klimatische Effekte auf das Wachstum der Mikroalgen in Laborversuchen

Es konnte ebenfalls ein klimatischer Effekt auf das Wachstum aufgezeigt werden. Das Wachstum war unter Winterbedingungen limitiert, dennoch lassen die Wachstumsraten unter saisonalen Bedingungen vermuten, dass die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. den Kältestress kompensieren und geeignete Schutzsysteme aktivieren können (siehe Tabelle 5.3).

## (iii) klimatische Effekte auf den Photosyntheseapparat in Laborversuchen

Es wurden keine kälteinduzierten Veränderungen im Pigmentgehalt der Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. festgestellt. Allerdings wurde trotz des konstanten Pigmentgehalts eine reduzierte Energieverwertung, gemessen als photosynthetische Aktivität, unter Winterbedingungen gemessen. Die verringerte, photosynthetische Aktivität war vermutlich auf eine limitierte CO<sub>2</sub>-Fixierung zurückzuführen.

Die limitierte CO<sub>2</sub>-Fixierung könnte auch die Ursache für die reduzierte Zuckerbildung sein. Der Kohlenhydratmetabolismus weist eine erhöhte Sensitivität gegenüber niedrigen Temperaturen auf. Übersteigt die Rate der Lichtabsorption den Verbrauch an Reduktionsäquivalenten, besteht die Gefahr Elektronen auf Sauerstoff zu übertragen. Damit verbunden ist die erhöhte Gefahr vor ROS-Bildung, oxidativem Stress und einer Schädigung des Photosyntheseapparats.

Der Proteingehalt war im Gegensatz zum Zuckergehalt unter Winterbedingungen erhöht. Es ist somit wahrscheinlich, dass sich unter Winterbedingungen der Energiefluss der Photosynthese zu Gunsten der Nitratreduktion und nachgeschalteter Aminosäuresynthese verschiebt. Da Kältestress offenbar keinen Einfluss auf Pigmente und die Ausstattung an Photosystemen hat, erhöht sich mit Hemmung der CO<sub>2</sub>-Assimilation die Gefahr der ROS-Bildung. Dieses Risiko wird durch Stimulierung der Aminosäuresynthese reduziert, weil Elektronen in die Nitratreduktion abfließen können. Die beiden Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. müssen aber noch über weitere Schutzmechanismen verfügen. Dieses wurde z. B. durch Analyse der Chlorophyllfluoreszenz und Untersuchung entsprechender Enzymsysteme im Folgenden getestet.

Schlussfolgernd kann für die Mikroalgen ***Chlorella* sp.** und ***Parachlorella* sp.** eine hohe Stresstoleranz erwartet werden. Die Ergebnisse zeigen für beide Mikroalgen die Möglichkeit eines ganzjährigen Einsatzes als Biofilter für die CBZ-Bioremediation auf.

Ebenfalls wurden die Mikroalgen ***Scenedesmus* sp.**, ***Neochloris* sp.**, ***Ignatius* sp.**, ***Pedinomonas* sp.** und ***Coccomyxa* sp.** für weitere Versuche ausgewählt (siehe Abschnitt 5.1.4).

## 6.2 CBZ-Konzentrationen in der Leine

CBZ-Konzentrationen wurden bereits in Oberflächengewässern, im Grund- und Trinkwasser detektiert (siehe Abschnitt 2.2.4). Umfangreiche Analysen zur CBZ-Belastung in der Leine im gewählten Untersuchungsgebiet wurden bislang jedoch nicht durchgeführt.

Die Konzentrationen von CBZ sowie der wichtigsten Metabolite (CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ) wurden in der Leine an drei Standorten untersucht. Das Untersuchungsgebiet wurde so ausgewählt, dass ein Teilabschnitt der Leine abgebildet werden konnte (siehe Abbildung 4.1). Anhand der gesetzten Messpunkte sollte die Selbstreinigungskapazität des Flusses abgebildet werden.

Es wurde erwartet, dass (i) die Konzentrationen von CBZ und gebildeter Metabolite am **1. Messpunkt** (Dornröschenbrücke in Linden-Nord) die Grundbelastung im Raum Hannover widerspiegeln. (ii) Weiterhin sollten die Analysen am **2. Messpunkt** unterhalb der Einleitstelle des Klärwerks Herrenhausen den Arzneistoffeintrag über das kommunale Klärwerk in Hannover-Herrenhausen dokumentieren. Weitere Einleitstellen gibt es im Untersuchungsgebiet nicht. Es wurde daher ein Anstieg der CBZ-Belastung an diesem Messpunkt erwartet. Der **3. Messpunkt** wurde 3 km flussabwärts des Klärwerks gesetzt, um (iii) einen möglichen CBZ-Abbau über die Selbstreinigung des Flusses beurteilen zu können. Erwartet wurde, dass sich die Konzentrationen von CBZ und der gebildeten Metabolite im letzten Abschnitt wieder der Grundkonzentrationen annähern.

### (i) Grundbelastung (1. Messpunkt)

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Belastung am 1. Messpunkt die Grundbelastung widerspiegelt, da oberhalb dieses Messpunktes die nächsten Einleitstellen erst 15-20 km flussaufwärts liegen (Kläranlagen Wennigsen-Evestorf, Pattensen und Bennigsen). Die durchschnittliche Grundbelastung im Sommer lag bei  $0,078 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ,  $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ 10,11-epoxid,  $0,122 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ-diol,  $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$  2-OH CBZ und  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$  3-OH CBZ. Die Momentaufnahme im Winter offenbarte eine höhere Belastung von  $0,129 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ,  $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ 10,11-epoxid,  $0,270 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ-diol,  $0,0002 \mu\text{g L}^{-1}$  2-OH CBZ und  $0,023 \mu\text{g L}^{-1}$  3-OH CBZ (siehe Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8).

Studien von Braeutigam *et al.* (2012) zeigten, dass der Abbau von CBZ unter kalten Temperaturen reduziert war. Diese Beobachtungen konnten auch in dieser Studie in Versuchen mit Mikroalgen bestätigt werden (siehe Abschnitt 5.7).

Die in der Leine dokumentierten überwiegend höheren Metabolit-Konzentrationen im Winter im Vergleich zum Sommer sind somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Einleitungen kommunaler Kläranlagen und reduzierter metabolischer Aktivität zurückzuführen.

(ii) Arzneistoffeintrag über das kommunale Klärwerk in Herrenhausen

Erwartungsgemäß konnte ein CBZ-Eintrag unterhalb des Klärwerks am **2. Messpunkt** unabhängig der saisonalen Bedingungen bestätigt werden. Die CBZ-Konzentrationen am 2. Messpunkt wurden im Sommer bedingt der Einleitung des Klärwerks um 23,1 % erhöht, im Winter waren es 10,6 %. Im Sommer waren zudem alle gemessenen Metabolite gegenüber dem 1. Messpunkt erhöht (CBZ 10,11-epoxid: +30,5 %; CBZ-diol: +24,6 %; 2-OH CBZ: +39,9 %; 3-OH CBZ: +47,2 %). Im Winter lagen die Konzentrationsveränderungen zwischen diesen Messpunkten bei +6,7 % für CBZ-diol, +92,1 % für 2-OH CBZ und +19,8 % für 3-OH CBZ. Für CBZ 10,11-epoxid wurde eine Konzentrationsverringering (-5,22 %) dokumentiert.

(iii) Selbstreinigungskapazität der Leine

Weiterhin wurde flussabwärts erwartet, dass sich nach der Einleitung durch das kommunale Klärwerk die Arzneistoffbelastung aufgrund von Abbauprozessen wieder der Grundbelastung (1. Messpunkt) annähert. Zu den Abbauprozessen zählen u.a. die metabolische Aktivität aquatischer Organismen sowie photochemische Abbauprozesse.

Die Erwartung der Selbstreinigungskraft des Flusses konnte im Sommer nicht bestätigt werden. Zwischen Messpunkt 2 und 3 wurden in allen Fällen Konzentrationssteigerungen gemessen (CBZ: +3,59 %; CBZ 10,11-epoxid: +6,43 %; CBZ-diol: +3,47 %; 2-OH CBZ: +5,32 %; 3-OH CBZ: +12,9 %). Dieses ist vermutlich auf die Flusslänge zwischen Messpunkt 2 und 3 zurückzuführen. Die gewählte Strecke von 3 km scheint für eine Selbstreinigung nicht ausreichend zu sein. Auch wenn man davon ausgeht, dass der Arzneistoffeintrag in die Leine im Sommer nahezu konstant ist, können tageszeitliche Schwankungen Ursache für die gemessenen Konzentrationsveränderungen sein.

Da bereits unter Sommerbedingungen keine Konzentrationsreduktionen aufgezeigt werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass auch im Winter die Selbstreinigungskapazität des Flusses durch photosynthetisch aktive Organismen nicht zur Erreichung der Grundbelastung ausreicht. Allerdings zeigten die Analysen der CBZ-Konzentration unter Winterbedingungen einen gegenläufigen Effekt auf. So wurde zwischen Messstelle 2 und 3 eine CBZ-Reduktion von 53,6 % erzielt. Auch in den Konzentrationen der gemessenen Metabolite (außer 2-OH CBZ) spiegelten sich erhöhte Abbauprozesse wieder. Die Reduktion lag zwischen 25,7 % (CBZ 10,11-epoxid) und 64,2 % (3-OH CBZ). Konzentrationen von CBZ-diol lagen an der Nachweisgrenze. Nur 2-OH CBZ wurde mit einer höhe-

ren Konzentration detektiert (+74,7 %). Aufgrund der erwarteten reduzierten metabolischen Aktivität im Winter, sind die höheren Metabolit-Konzentrationen im Vergleich zum Sommer auf unterschiedliche Temperaturempfindlichkeiten des primären und sekundären CBZ-Abbaus zurückzuführen.

Zusammenfassend lieferten die Messergebnisse einen ersten Einblick in die CBZ-Belastung der Leine im Untersuchungsgebiet. Allerdings handelt es sich bei den Messergebnissen um eine Momentaufnahme. Für eine Beurteilung der Selbstreinigungskapazität sind weitere Messstellen flussabwärts zu setzen und kontinuierlich zu überprüfen. Hierfür sind weitere Einleitungen durch das Klärwerk Gümmerwald zu beachten. Eine zusätzliche CBZ-Belastung durch die Industriekläranlage Honeywell in Seelze ist ausgeschlossen, allerdings birgt das Abwasser der Chemikalienproduktion anderweitige Belastungsquellen. Flussaufwärts sind Arzneistoffeinträge ausschließlich auf die Einleitungen von Kläranlagen zurückzuführen (siehe Abschnitt 2.4.1).

Die rechtliche Einordnung der Belastungssituation erfolgt ausschließlich anhand der CBZ-Konzentration. Im Untersuchungsgebiet reichten die CBZ-Konzentrationen im Sommer von 0,08 bis 0,11  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Im Winter lagen die Konzentrationen im Bereich von 0,07 bis 0,14  $\mu\text{g L}^{-1}$  (siehe Abschnitt 5.2). Im Gesamtmonitoringprogramm der Stadtwerke Hannover wurde im Leineabschnitt auf Höhe von Grasdorf eine durchschnittlich CBZ-Belastung von 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  dokumentiert (Raue 2016). Untersuchungen an längeren Flussabschnitten (Süd-niedersachsen (Reckershausen) bis Neustadt am Rübenberge) zeigten ebenfalls die geringe CBZ-Belastung der Leine auf. Im Durchschnitt lag die Belastung bei 0,11  $\mu\text{g L}^{-1}$  (NLWKN 2013) und deckt sich somit mit unseren Messergebnissen im Raum Hannover.

Rechtlich wird die CBZ-Belastung der Leine im Hinblick auf die ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen (PNEC: 0,42  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; UQN-Vorschlag: 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (Ferrari *et al.* 2003; NLWKN 2013)) nicht als Umweltgefährdung gewertet. Allerdings ist an einigen Stellen in der Leine die CBZ-Konzentration deutlich erhöht (Ablauf des Klärwerks in Hannover-Herrenhausen: 0,49  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (nicht veröffentlichte Daten)), so dass lokal eine erhöhte Gefährdung vor dem Hintergrund einer Überschreitung des PNEC-Wertes von 0,42  $\mu\text{g L}^{-1}$  vorliegt. In Zuflüssen der Leine (Alte Leine) wurden aufgrund der Abwassereinleitung der Kläranlagen Pattensen und Bennigsen (siehe Abschnitt 2.4.1) deutlich höhere Konzentrationen (0,81  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) gemessen (Raue 2016), die sogar den UQN-Vorschlag von 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  überschreiten. Auch wurde CBZ gemäß der Richtlinien 67/548/EEC und 1999/45/EC als „sehr giftig für Wasserorganismen“ eingestuft und seine Wirkung auf die aquatische Umwelt als „langfristig schädlich“ beschrieben (EDQM und

Europarat 2013). Es besteht nach den Angaben der LANUV (2007) eine eindeutige Umweltrelevanz (siehe Abschnitt 2.3.2).

Da in Teilabschnitten der Leine erhöhte CBZ-Konzentrationen vorliegen und direkte Effekte auf die Populationen der Mikroalgen aufgrund der Einschätzung der Richtlinien 67/548/EEC und 1999/45/EC erwartet werden können, ist es somit zwingend erforderlich, Konzepte zur Verbesserung der Wasserqualität hinsichtlich persistenter Arzneistoffe wie CBZ zu entwickeln. Auch aus humantoxikologischer Sicht ist es notwendig zusätzliche Aufbereitungstechniken zu entwickeln, die den Eintrag der Schadstoffe in die Leine bzw. in das Grundwasser minimieren, da in der Region das Grundwasser zur Trinkwassergewinnung genutzt wird. Im kleinsten Wasserwerk (Grasdorf) wird das Grundwasser vor der Entnahme zudem mit Flusswasser aus der Leine angereichert.

Die Berücksichtigung gebildeter Metabolite wird bei der Entwicklung geeigneter Konzepte zur Verbesserung der Wasserqualität dringend empfohlen. Besonders im Fall von CBZ sind Metabolite aufgrund ihrer Bildungsrate als sehr kritisch zu bewerten. In der Studie lag die Summenkonzentration aller untersuchten Metabolite im Durchschnitt im Winter 2,6-mal höher als die entsprechende CBZ-Konzentration (außer an Messstelle 3). Im Sommer war der Faktor 1,7. Untersucht wurden in dieser Studie nur vier der bereits bekannten 30 CBZ-Metabolite. Die CBZ-Metabolisierungsstrategien aquatischer Organismen sind bislang nicht bekannt. Es ist also davon auszugehen, dass die eigentlichen Summenkonzentrationen der Metabolite deutlich höher liegen. Andere Studien zeigten die Gefährlichkeit gebildeter Metabolite anhand ihrer im Vergleich zu CBZ erhöhten Toxizität auf (Zhang *et al.* 2008; Calisto *et al.* 2011; Donner *et al.* 2013).

Das Metabolit CBZ 10,11-epoxid wird als besonders gefährlich eingestuft, da es biologisch aktiv ist und im Verdacht steht neurotoxische Effekte zu bedingen (Bourgeois und Wad 1984; Zhang *et al.* 2008). Die erhöhten Konzentrationen dieses Metabolits im Winter sind sehr kritisch zu werten, da umfangreiche Effektanalysen auf aquatische Organismen bislang nicht vorliegen. Die weiterführende Metabolisierung von CBZ 10,11-epoxid zum nicht mehr wirksamen Metabolit CBZ-diol gibt dabei einen Einblick in Metabolisierungsstrategien. Miao und Metcalfe (2003) zeigten im Vergleich zu CBZ eine 3-fach erhöhte CBZ-diol-Konzentration auf. In dieser Arbeit lag der Faktor im Vergleich bei 1,6 (Sommer) und 2,1 (Winter). Am 3. Messpunkt wurde CBZ-diol im Winter nicht detektiert. Möglicherweise war die Metabolisierung von CBZ 10,11-epoxid zu CBZ-diol geblockt. Im menschlichen Körper ist CBZ-diol das Hauptmetabolit mit einer Bildungsrate von 30 % (Zhang *et al.* 2008). Aufgrund der hohen Bildungsrate in dieser Studie scheint es ebenfalls ein wichtiges Produkt der CBZ-Metabolisierung in Mikroalgen zu sein. Eine Umweltgefährdung kann bei diesem Metabolit ausgeschlossen werden.

### 6.3 CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat

Aufgrund der eindeutigen Umweltrelevanz sowie der zu erwartenden Effekte auf aquatische Organismen (siehe Abschnitt 2.3.2), wurden CBZ-Effekte auf Mikroalgen untersucht, da sie als photosynthetische Organismen die Grundlage vieler Selbstreinigungsprozesse in Fließgewässern darstellen.

Der Einfluss von CBZ auf den Photosyntheseapparat unter Sommerbedingungen wird in diesem Abschnitt diskutiert (siehe Abschnitt 5.3).

Schadstoffe können sowohl primäre als auch sekundäre Effekte bewirken. In dieser Arbeit wurden Parameter untersucht, die an das Wachstum der Mikroalgen gekoppelt sind. Um den Einfluss möglicher Effekte, ausgelöst durch CBZ-Stressreaktionen, ausschließen zu können, wurden die erhobenen Messdaten zum Ende der 14-tägigen Kultivierung ausgewertet. Die Umweltbedingungen in der Leine bedingen einen permanenten Stress für Mikroalgen. Um permanente Stressbedingungen realitätsnah im Labor abbilden und daraus resultierende Anpassungsmechanismen analysieren zu können, sind Labormessungen über einen längeren Zeitraum notwendig.

Getestet wurden die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp.. Das Wachstumverhalten wurde in beiden CBZ-Konzentrationsmessreihen (0 bis 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) untersucht. In Kulturen von *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. erfolgten die Messungen in der ersten Konzentrationsmessreihe.

#### 6.3.1 Wachstum unter CBZ-Einfluss

Die lineare Darstellungsform der Zelldichte erlaubt die Beurteilung der durchschnittlich erreichbaren Wachstumsraten im gesamten Versuchszeitraum unter definierten Leinebedingungen. Es wurde keine logarithmische Auftragung gewählt, da die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate ( $\mu_{\text{max}}$ ) in der exponentielle Phase für den Fokus dieser Arbeit nicht aussagekräftig ist. Die Darstellung unserer Daten in logarithmischer Form ergaben exponentielle Wachstumsphasen von maximal drei Tagen. Die Berechnung von  $\mu_{\text{max}}$  für diesen kurzen Zeitraum ist somit nicht ausreichend. Vielmehr bedingt ein längerfristiger Einsatz eine durchschnittliche Rate ( $\mu$ ) in den Algenpopulationen unter Leinebedingungen über den gesamten Versuchszeitraum. CBZ-Effekte während der Kulturdauer werden in der durchschnittlichen Wachstumsrate nicht berücksichtigt.

Vor dem Hintergrund, dass Mikroalgen die Grundlage der Nahrungskette aquatischer Organismen repräsentieren (Carvalho *et al.* 2004), haben Veränderungen in den Popula-

tionen aufgrund umwelttoxischer Kontaminationen einen großen Einfluss auf das Ökosystem.

In dieser Studie wurde für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp. und *Scenedesmus* sp. in der gesamten CBZ-Konzentrationsmessreihe (0 bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) eine Wachstumssteigerung beobachtet. Ausschließlich die Konzentrationen  $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ erzielten in den Kulturen von *Parachlorella* sp. keinen Effekt (siehe Tabelle 5.10 und Tabelle 5.11).

Der stimulierende Effekt einer geringer Dosis toxischer Verbindungen wird in der Literatur als Hormesis-Effekt beschrieben (Calabrese und Baldwin 2003). Einen weiteren Beweis für diesen Effekt erbrachten Lüring *et al.* (2006) in ihrer Studie. Sie konnten aufzeigen, dass eine CBZ-Konzentration von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  einen stimulierenden Effekt auf die Fortpflanzung von *Daphnia pulex* hatte. Chronische Effekte (Wachstumshemmung, verzögerte Reife etc.) wurden erst bei  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  beobachtet. Auch Lawrence *et al.* (2005) konnten einen wachstumsstimulierenden Effekt von CBZ dokumentieren. Unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ konnten sie eine Zunahme der Algenbiomasse auf Kosten der bakteriellen Biomasse in Biofilmen dokumentieren. In dieser Studie führten Konzentrationen bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ zu einer Wachstumsstimulierung. Es ist somit zu vermuten, dass die Wachstumsstimulierung teilweise auf den Hormesis-Effekt zurückzuführen war. Auch eine CBZ-induzierte ROS-Bildung scheint wahrscheinlich (Kim *et al.* 2009).

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. wurden bereits in der ersten CBZ-Konzentrationsmessreihe deutliche Wachstumseinschränkungen beobachtet, so dass höhere CBZ-Konzentrationen nicht getestet wurden (siehe Tabelle 5.12). Zhang *et al.* (2012) konnten ebenfalls einen hemmenden CBZ-Effekt auf das Algenwachstum beobachten. Vermutlich ist die Wachstumshemmung auf einen Anstieg stressbedingter Effekte (z. B. Lipidperoxidation) zurückzuführen (Tsiaka *et al.* 2013).

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. führte eine CBZ-Konzentration von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  zu einem gegenläufigen CBZ-Effekt (Wachstumssteigerung). Die biphasische wachstumsstimulierende Reaktion lässt sich mit einer verbesserten Nährstoffaufnahme aufgrund einer stressinduzierten Hemmung von Ionenkanälen erklären. Die anschließende Wachstumshemmung bei höheren CBZ-Konzentrationen lässt vermuten, dass Zellschäden nicht mehr mit der erhöhten Nährstoffaufnahme kompensiert werden können. Auch kann die biphasische Reaktion auf die Akkumulation unterschiedlicher ROS-Gehalte zurückzuführen sein. So führen niedrige Konzentrationen zu Signalwirkungen, regulierender Funktionen in biologischen Prozessen sowie zu Wachstumsstimulierungen, während

höhere ROS-Gehalte bei nicht ausreichender ROS-Kompensation zellschädigend wirken (siehe Abschnitt 2.3.2.2).

Aufgrund des reduzierten Wachstums in Kulturen von *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. wurden auch in den folgenden Versuchen CBZ-Effekte ausschließlich in der ersten Konzentrationsmessreihe getestet.

### 6.3.2 Pigmente der Photosynthese

Verschiedene Stresssituationen können sich auf den Pigmentgehalt auswirken. So wurden unter Einfluss von Xenobiotika (Dias *et al.* 2014), Schwermetallen (De Filippis und Pallaghy 1976; Clijsters und van Assche 1985) aber auch durch Salzstress (Kirrolia *et al.* 2011) reduzierte Pigmentgehalte gemessen.

Pigmente der Photosynthese können direkt oder indirekt Angriffsziel von CBZ sein. In dieser Studie wurde der Einfluss von CBZ auf die Pigmente der Photosynthese in verschiedenen Mikroalgen untersucht. Ein vereinfachtes Schema der Photosynthese ist in Abbildung 6.1 aufgezeigt.

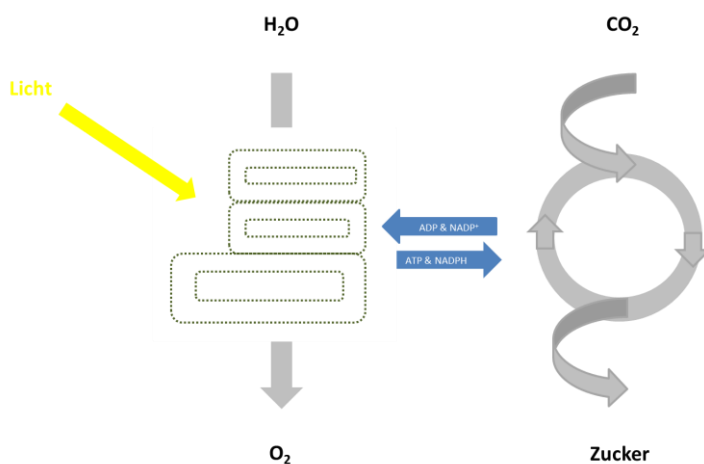


Abbildung 6.1: Vereinfachtes Schema der Photosynthese

#### 6.3.2.1 Chlorophyll a und b

Die photosynthetische Aktivität korreliert mit der Absorption der Lichtenergie über Chlorophylle. Die Reaktionszentren der Photosysteme enthalten nur Chlorophyll a, während Chlorophyll b ausschließlich in den Lichtsammelkomplexen vorhanden ist (Thorner *et al.* 1987). Somit können anhand der Pigmentgehalte Rückschlüsse auf die photosynthetische Aktivität getroffen werden.

Chlorophylle können zwei Funktionen haben: (i) sie absorbieren Lichtenergie und führen sie der Photosynthese zu, und (ii) sie wirken als Antioxidantien und entgiften ROS. Übersteigt die Rate der Lichtabsorption den Bedarf, z. B. wenn die CO<sub>2</sub>-Fixierung ge-



hemmt ist, besteht die Gefahr der ROS-Bildung. Eine Senkung des Chlorophyllgehalts kann in diesem Fall als Schutzreaktion vor übermäßiger Absorption von Lichtenergie gewertet werden. Verfügt die Mikroalge jedoch über ausreichende Möglichkeiten überschüssige Energie in Wärme zu überführen, z. B. durch den Violaxanthinzyklus, können Chlorophylle auch als Antioxidantien zum Schutz vor anderorts gebildeter ROS genutzt werden und sollten unter Stress erhalten bleiben.

In Abhängigkeit von den Mikroalgenspezies wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche CBZ-Effekte auf den Pigmentgehalt dokumentiert (siehe Tabelle 5.13 und Tabelle 5.18). CBZ hatte einen stimulierenden Effekt auf den Pigmentgehalt der Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Neochloris* sp.. Dieses korreliert mit der Wachstumsrate (siehe Abschnitt 5.3.1). Allerdings konnte nicht für alle Konzentrationen ein signifikanter Effekt dokumentiert werden. In Kulturen von *Chlorella* sp. wurde in der niedrigen Konzentrationsmessreihe ein signifikanter Anstieg im Chlorophyll a- und b-Gehalt gemessen. Steigende CBZ-Konzentrationen führten hauptsächlich zu einer Chlorophyll a-Synthese. Die Ausstattung der Reaktionszentren mit Lichtsammelkomplexen wird vermutlich verringert. Die maximale Photosyntheseleistung (gerechnet pro Pigmentmolekül) steigt. Die Effektivität der Lichtabsorption sinkt jedoch. Diese Beobachtungen macht man z. B. bei Algen im Starklicht.

Der erhöhte Pigmentgehalt kann daher als antioxidative Schutzreaktion vor Stressbedingungen und einer damit verbundenen, verstärkten ROS-Gefahr gewertet werden. Die antioxidative Wirkung von Chlorophyll a (Lanfer-Marquez *et al.* 2005; Gill und Tuteja 2010) unterstützt diese Vermutung. Unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ waren sowohl der Chlorophyll a- als auch der Chlorophyll b-Gehalt signifikant reduziert. Es ist denkbar, dass  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine Schwellenkonzentration darstellen. Dieses gilt es anhand der weiteren Parameter zu überprüfen.

In Kulturen von *Neochloris* sp. verschob sich der stimulierende Effekt auf den Pigmentgehalt hin zu einer erhöhten Chlorophyll b-Synthese. Die Reaktionszentren werden vermehrt mit Lichtsammlern ausgestattet, um eine erhöhte Lichtabsorption gewährleisten zu können. Dieses deutet auf eine Anpassung an reduzierte Lichtbedingungen hin. Denkbar ist eine verstärkte Anreicherung der LHC-Komplexe (Chlorophyll b) im Vergleich zu den Komplexen der Reaktionszentren (Kura-Hotta *et al.* 1987), um Schattierungseffekte zum Ende der Kulturdauer auszugleichen.

Ein reduzierter Pigmentgehalt ist möglicherweise auf eine CBZ-induzierte Hemmung der Chlorophyllbiosynthese zurückzuführen (Zhang *et al.* 2012). So kann CBZ eine Hemmung der Proto-Chlorophyllsynthese und der anschließenden Umwandlung zu Chloro-

phyll bedingen. Auch kann sich erhöhter oxidativer Stress auf die Chlorophyllbiosynthese auswirken (Zhang *et al.* 2012; Tsiaka *et al.* 2013). Ein erhöhter enzymatischer Abbau der Chlorophylle ist ebenfalls denkbar. Chlorophyll a und b sind Bestandteile des Photosyntheseapparats. Somit führt die Abnahme des Pigmentgehalts zu einer verringerten Lichtabsorption und erlaubt ein Wachstum in Gegenwart erhöhter Lichtintensität ohne ein erhöhtes Stressrisiko durch ROS-Bildung.

Eine Abnahme der Pigmentgehalte wurde zudem in Kulturen von *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. ( $< 100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) beobachtet. Der negative Effekt von CBZ auf den Chlorophyll a-Gehalt in Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurde bereits bei Zhang *et al.* (2012) beschrieben. Es ist somit eine verringerte photosynthetische Kapazität zu erwarten. Da das Wachstum nicht betroffen war, diente die erhöhte Teilungsrate möglicherweise der Stresskompensation (siehe Abschnitt 6.3.1).

In zwei Kulturen (*Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp.) wurde ausschließlich eine CBZ-induzierte Hemmung des Chlorophyll a-Gehalts dokumentiert. Im Chlorophyll b-Gehalt wurde kein Effekt gemessen. Dieses deutete somit daraufhin, dass die Reaktionszentren der Mikroalgen betroffen waren. Durch eine verringerte Anzahl an Reaktionszentren wird bei gehemmter  $\text{CO}_2$ -Fixierung die Gefahr vor ROS-Bildung reduziert. Eine Abnahme des Chlorophyll a-Gehalts konnte somit als Schutzreaktion gewertet werden. Eine Aussage zur  $\text{CO}_2$ -Assimilation kann allerdings nicht getroffen werden, da in beiden Kulturen die Zuckersynthese nicht in der niedrigen CBZ-Konzentrationsmessreihe gemessen wurde.

Es konnte bereits in Stresssituationen aufgezeigt werden, dass Chlorophyll a oft stärker betroffen ist als Chlorophyll b (Baccouch *et al.* 1998; Vajpayee *et al.* 2000). Dieses ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Komplexe der Reaktionszentren empfindlicher gegenüber Abbauerscheinungen sind als die LHCs (Kura-Hotta *et al.* 1987).

Da Chlorophyll a Hauptbestandteil der Reaktionszentren ist, ist für beide Mikroalgenpezies eine CBZ-induzierte Hemmung der maximalen photosynthetischen Kapazität wahrscheinlich. Dieses deckt sich mit dem hemmenden Effekt auf die Zellteilung.

Das absorbierte Licht über die Chlorophyll b-haltigen Lichtsammelkomplexe wird bei Abnahme der Reaktionszentren als Wärme abgegeben. Durch eine verringerte Anzahl an Reaktionszentren wird die Gefahr vor ROS-Bildung reduziert.

Kein CBZ-Effekt konnte in der getesteten Konzentrationsmessreihe auf den Pigmentgehalt in Kulturen von *Ignatius* sp. beobachtet werden. Damit ist in diesem Fall kein Einfluss auf die photosynthetische Kapazität zu erwarten. Das verstärkte Wachstum der Mikroalge war somit auf eine Zunahme der photosynthetischen Leistung zurückzuführen (siehe Abschnitt 6.3.1).

### 6.3.2.2 Carotinoide

Carotinoide dienen der Zelle als antioxidatives Schutzsystem. Carotinoide sind essentiell für photosynthetische Organismen (Cogdell und Frank 1987). Sie steigern die Effizienz der Photosynthese, indem sie blau-grünes Licht absorbieren und auf Chlorophylle übertragen (Telfer 2002). Zudem haben sie eine wichtige Funktion im Schutz des photosynthetischen Apparats, indem sie als Antioxidant  $^1\text{O}_2$  entgiften und Chlorophylltriplets ( $3\text{Chl}^*$ ) und angeregte Chlorophyllmoleküle ( $\text{Chl}^*$ ) quenchen, um die Bildung von  $^1\text{O}_2$  zu verhindern (Sharma *et al.* 2012). Diese Reaktionswege sind besonders im PS II als Quelle für Sauerstoff relevant (van Gorkom und Schelvis 1993). Zudem sind Carotinoide Vorstufen für Signalmoleküle (Sharma *et al.* 2012) und als Xanthophylle an der Umwandlung überschüssiger Energie in Wärme beteiligt (Adams *et al.* 1995).

In der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe hatte CBZ einen stimulierenden Effekt auf den Carotinoidgehalt in Kulturen von *Chlorella* sp. und *Neochloris* sp.. Der Carotinoidgehalt in *Parachlorella* sp. wurde in allen CBZ-Konzentrationsstufen gehemmt. Für *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. wurden bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  in einigen CBZ-Konzentrationsstufen reduzierte Gehalte gemessen. Kein CBZ-Effekt wurde für den Carotinoidgehalt in *Ignatius* sp. gemessen (siehe Tabelle 5.19 bis Tabelle 5.21).

Ein Anstieg im Carotinoidgehalt ist, bedingt durch die antioxidative Wirkung, als Schutzreaktion gegenüber ROS zu sehen. Tsiaka *et al.* (2013) zeigten in ihrer Studie, dass CBZ das Gleichgewicht zwischen der ROS-Bildung und -Entgiftung stören kann und in der Lage ist, oxidativen Stress in Algen auszulösen. Eine Abnahme im Carotinoidgehalt lässt einen Anstieg in der ROS-Konzentration vermuten. Weitere antioxidative Schutzmechanismen werden im Abschnitt 6.4 diskutiert.

Unter Berücksichtigung der weiteren Pigmentmessungen, ist in den Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. im niedrigen CBZ-Konzentrationsbereich ( $0$  bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) eine erhöhte ROS-Gefahr denkbar. Ausschließlich in Kulturen von *Chlorella* sp. und *Neochloris* sp. steigt der Carotinoidgehalt mit steigenden CBZ-Konzentrationen (in der zweiten Messreihe) an, so dass in diesem Bereich mit einem Anstieg des Carotinoidgehalts und der Chlorophyll a-Pigmente ein erhöhter Schutz gegenüber ROS vorliegt.

### 6.3.3 Messparameter zur Energieverwertung

Mit Messungen der Chlorophyllfluoreszenz kann der Zustand des Photosyntheseapparats beurteilt werden. Chlorophyllfluoreszenz dient somit als Maß für die photosynthetische Kapazität. Kann das absorbierte Licht nicht mehr vollständig genutzt werden,

kommt es zu einer erhöhten Energiedissipation z. B. in Form von Wärme oder Fluoreszenz oder die überschüssige Energie wird zur Reduktion von  $O_2$  zu ROS genutzt (Abbildung 6.2). Durch Messung der Chlorophyllfluoreszenz kann die Stressanfälligkeit der Mikroalgen bewertet werden (Grimme 2006).

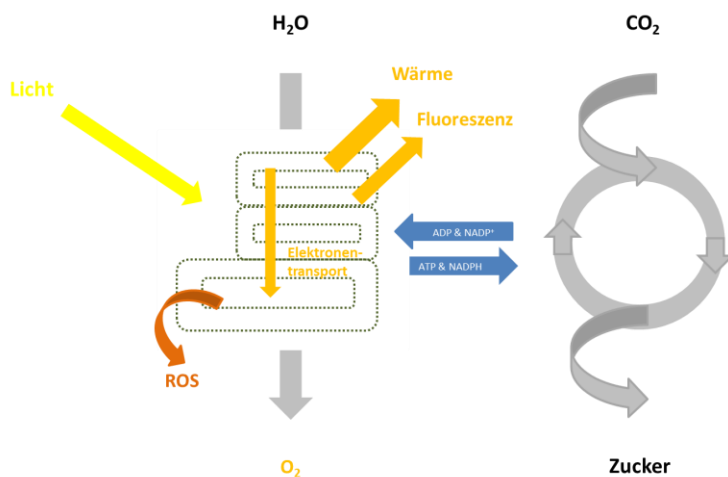


Abbildung 6.2: Vereinfachtes Schema zur Energieverwertung in der Photosynthese

Zum Schutz vor ROS kann die Energie als Wärme abgegeben werden. Prozesse, bei denen Energie als Wärme abgegeben wird, werden als nicht-photochemisches Quenching (NPQ) bezeichnet. NPQ besteht aus drei Komponenten ( $qE$  (engl.: *energy-dependent quenchung*),  $qI$  (engl.: *photoinhibitory quenchung*),  $qT$  (engl.: *quenching associated with a state transition*)). Die Komponente  $qE$  umfasst das energieabhängige Quenching und stellt den größten Anteil dar (Müller *et al.* 2001; Krause und Jahns 2010). In Höheren Pflanzen korreliert  $qE$  mit der Aktivität des Violaxanthinzyklus (Havaux *et al.* 2007; Dall'Osto *et al.* 2012).

Der Violaxanthinzyklus dient, wie bereits erwähnt, dem Schutz des PS II durch Umwandlung überschüssiger Energie in Wärme (Adams *et al.* 1995). Zeaxanthin, als Hauptprodukt des Violaxanthinzyklus, hat eine photoprotektive Funktion (Demmig *et al.* 1987; Adams *et al.* 1995). Eine zunehmende Toleranz gegenüber Photoinhibition wurde mit steigender Zeaxanthinmenge gemessen (Demmig *et al.* 1987). Dementsprechend führte eine Hemmung der Zeaxanthinsynthese zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber Photoinhibition (Bratt *et al.* 1995).

Ascorbat dient als Co-Faktor für die Violaxanthin Deepoxidase (VDE) im Violaxanthinzyklus im Thylakoidlumen (Yamamoto 1979). Die Ascorbatoxidation erfolgt in zwei Stufen über Monodehydroascorbat (MDHA) zu Dehydroascorbat (DHA). Ascorbat ist eine niedermolekulare Verbindung, die Elektronen für eine Vielzahl an enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen bereitstellt. Ascorbat ist das am häufigsten detektierte Antioxidant in Pflanzenzellen, 90 % davon im Cytoplasma (Sharma *et al.* 2012). So

konnte in *Arabidopsis* eine erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress mit steigendem Ascorbatgehalt aufgezeigt werden.

Im Thylakoidlumen gibt es kein System zum Ascorbatrecycling, so dass das im Lumen gebildete MDHA nicht-enzymatisch in Ascorbat und DHA disproportioniert. Das gebildete DHA wird ins Stroma transportiert, wo es direkt zu Ascorbat reduziert wird (Ushimaru *et al.* 1997). Ist der Gehalt an Ascorbat limitiert (u.a. Einsatz in ROS-Entgiftung), kann der Violaxanthinzyklus nicht ablaufen (Müller-Moulé *et al.* 2002). Dieses bedingt eine Limitierung der Fluoreszenzkomponente qE und somit des nicht-photochemischen Quenchings.

Erhöhte Niveaus an NPQ sind häufig mit dem Auftreten verschiedener Stressfaktoren verbunden und werden als Schutzreaktion für das Photosystem gewertet (Dias *et al.* 2014). Prozesse, die besonders empfindlich gegenüber Stressfaktoren sind, sind die ATPase-Reaktion und der Calvin-Benson-Zyklus (Schreiber und Klughammer 2008). Diese Prozesse werden wiederum für weitere intrazelluläre Prozesse (Transport, Einlagerung etc.) genutzt, so dass eine Hemmung dieser Prozesse zu einem Energiestau und möglicherweise zu einem erhöhten NPQ-Niveau führen würde. Auch kann ein limitierter Elektronenfluss zwischen PS II und PS I ein erhöhtes NPQ-Niveau bedingen. Unwahrscheinlich ist in den hier gezeigten Experimenten hingegen der Einfluss einer zu hohen Lichtintensität, da maximal  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für die Kultivierung genutzt wurden. Kann die aufgenommene Energie in der Photosynthese nicht genutzt werden, muss sie als Wärme abgeführt werden, um keine Zellschäden zu verursachen. Erhöhte NPQ-Niveaus können somit daraufhin deuten, dass zellerhaltende Funktionen in den Mikroalgen aktiv sind. Aufgrund der erhöhten Umwandlung überschüssiger Energie in Wärme wird die Gefahr vor ROS-Bildung reduziert. Zudem geht ein Anstieg im NPQ-Niveau mit einer verringerten Elektronentransportrate einher (Verhoeven *et al.* 1997). CBZ kann durch seine Wirkung auf Ionenkanäle das Membranpotential verändern und damit den Elektronentransport hemmen.

Erhöhte NPQ-Niveaus wurden in Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. gemessen (siehe Tabelle 5.22 und Tabelle 5.24). Eine Korrelation zwischen einem Anstieg im NPQ-Niveau und einer Abnahme des Pigmentgehalts bzw. der Elektronentransportrate (Verhoeven *et al.* 1997) konnten in dieser Arbeit für die Kulturen von *Parachlorella* sp. und *Pedinomonas* sp. bestätigt werden. Für Kulturen von *Coccomyxa* sp. konnte hingegen aufgezeigt werden, dass es auch ohne Beeinträchtigung des Elektronentransports zu einer Energieabgabe in Form von Wärme kommen kann (siehe Tabelle 5.25 und Tabelle 5.27). Reduzierte Chlorophyll a-Gehalte wurden ebenfalls in diesen Kulturen erzielt (außer für *Chlorella* sp.). Eine reduzierte Nut-

zungseffizienz der Lichtenergie sowie eine reduzierte photosynthetische Leistung waren in diesen Kulturen somit zu erwarten. In Zellen der Mikroalge *Chlorella* sp. wurden erhöhte NPQ-Niveaus und eine entsprechend reduzierte ETR trotz stimulierter Chlorophyll a-Synthese gemessen ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ). Dieses deutet auf eine erhöhte Stresssituation hin (siehe Abschnitt 6.3.2.1).

Sind die NPQ-Niveaus reduziert, ist möglicherweise die Energieverwertung über den Violaxanthinzyklus gestört. Ursache kann eine verringerte Ascorbatsynthese sein. Die Synthese des Ascorbats findet in den Mitochondrien statt und das Ascorbat gelangt von dort in andere Zellkompartimente (Shao *et al.* 2008). Die Durchlässigkeit der Thylakoidmembran für Ascorbat ist hierbei ein entscheidender Punkt, da der Violaxanthinzyklus im Thylakoidlumen lokalisiert ist, der Ascorbat-Glutathion-Zyklus hingegen im Stroma der Chloroplasten. Neubauer und Yamamoto (1994) zeigten auf, dass durch kompetitive Prozesse (u. a. Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ein entstehender Ascorbatmangel das Enzym VDE hemmt, da das Ascorbat bevorzugt von der Ascorbat-Peroxidase zur Entgiftung im Ascorbat-Glutathion-Zyklus genutzt wird. Demnach würde ein verringertes NPQ-Niveau mit einer erhöhten ROS-Gefahr korrelieren. Weitere Ursachen für einen gestörten Violaxanthinzyklus können CBZ-induzierte pH-Veränderungen sein. Mit steigendem pH im Innenraum der Thylakoide sinkt die Rate der Zeaxanthinsynthese. Das pH-Optimum für die VDE liegt zwischen 4 und 5 (Bratt *et al.* 1995). Die Aktivität des Enzyms ist stark von der Ascorbat-Konzentration und dem pH-Wert abhängig (Bratt *et al.* 1995).

Verringerte NPQ-Niveaus wurden in Kulturen von *Scenedesmus* sp. ( $> 100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) und *Ignatius* sp. dokumentiert (siehe Tabelle 5.23). Den Annahmen von Verhoeven *et al.* (1997) entsprechend, wurden bei einigen CBZ-Konzentrationen erhöhte Elektronentransportraten gemessen (siehe Tabelle 5.26). Einen Zusammenhang mit dem Chlorophyllgehalt konnte nicht hergestellt werden. Bedingt durch die erhöhten Elektronentransportraten können die verringerten NPQ-Niveaus ebenfalls auf eine erhöhte photosynthetische Leistung zurückzuführen sein.

In Kulturen von *Neochloris* sp. zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im NPQ-Niveau (siehe Tabelle 5.23) und in der Elektronentransportrate (siehe Tabelle 5.26). Die Stimulierung der Pigmentsynthese deutet allerdings auf eine Verbesserung der Lichtabsorption (siehe Tabelle 5.14 und Tabelle 5.17) und somit auf eine gesteigerte photosynthetische Leistung hin.

### 6.3.4 Produkte der Photosynthese

Zwei weitere mögliche Angriffsziele für CBZ sind die (i) Protein- und (ii) Zuckersynthese. Einflussfaktoren auf die Photosynthese bewirken Veränderungen in den Gehalten dieser Produkte. Ein vereinfachtes Schema der Produktbildung in der Photosynthese ist in Abbildung 6.3 dargestellt.

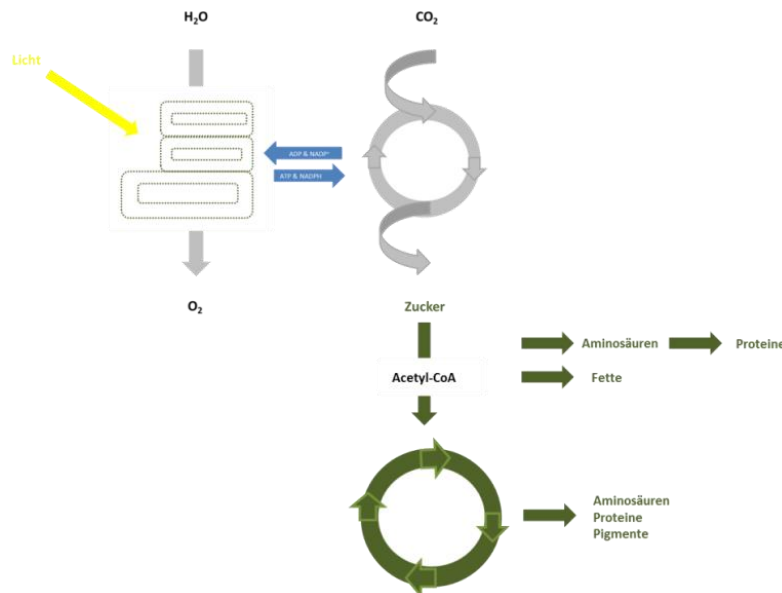


Abbildung 6.3: Vereinfachtes Schema zur Produktbildung in der Photosynthese

#### 6.3.4.1 Protein

Proteine sind wichtige Zellkomponenten, die sowohl strukturelle als auch katalytische Funktionen übernehmen können. Der Anteil der Proteine in Zellen ist sehr hoch, so dass sie je nach Zelltyp ungefähr die Hälfte der gesamten Trockenmasse stellen (Milo 2013). Proteine fungieren als Enzyme, sind Bestandteil des Cytoskeletts, dienen in der Zellmembran als Rezeptoren und Ionenkanäle, sind am Transport von Molekülen im Cytosol beteiligt und haben ihre Funktion in der DNA-Replikation, Signalweiterleitung und Stressbekämpfung. Stresssituationen können über die Genaktivierung zur Bildung stressinduzierter Proteine und Enzyme intrazelluläre Proteinmuster verändern.

Die in dieser Studie eingesetzte Methode zur Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry wird durch einige Komponenten (z. B. Tris, EDTA, Kohlenhydrate etc.) gestört (Olson und Markwell 2007). Eine Zusammenfassung der störenden Substanzen sowie der maximal einsetzbaren Konzentrationen ist bei Noble und Bailey (2009) aufgezeigt. In dieser Studie wurden die Algenpellets nach dem Aufschluss in einem Puffer (0,1 M Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7) aufgenommen. Die maximale EDTA-Konzentration im Lowry-Test, bei der keine signifikante Veränderung im Ergebnis gemessen wurde, lag

bei 1 mM (Noble und Bailey 2009). Somit ist auszuschließen, dass EDTA einen störenden Einfluss auf die Proteinbestimmung hatte. Ein mögliches Auftreten von Fällungsprodukten ist auf Kaliumionen oder Natriumphosphat zurückzuführen (Noble und Bailey 2009). In unseren Proben wurden keine Präzipitate beobachtet.

Die Vorteile der Proteinbestimmung nach Lowry liegen in der Empfindlichkeit und Genauigkeit des Tests. Im Test kann ein Proteingehalt im Größenbereich von 10 bis 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nachgewiesen werden (Johnson 2012).

Es konnten signifikante Veränderungen im Proteingehalt durch den Einfluss von CBZ gemessen werden. So wurden in Kulturen von *Chlorella* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp. und *Coccomyxa* sp. erhöhte Gehalte detektiert. Signifikante Veränderungen wurden allerdings nicht bei allen CBZ-Konzentrationen dokumentiert. In Kulturen von *Chlorella* sp. zeigte sich erneut der bereits angesprochene hemmende Effekt bei der Schwellenkonzentration von 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Einen gegenteiligen Effekt zeigten die Kulturen *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp. und *Pedinomonas* sp. mit einer CBZ-induzierten Abnahme im Proteingehalt (siehe Tabelle 5.28 bis Tabelle 5.30).

Ein Anstieg im Proteingehalt kann auf eine Stresssituation hindeuten (Yan *et al.* 1997). Aufgrund des CBZ-induzierten oxidativen Stresses in Mikroalgen (Tsiaka *et al.* 2013), kann die Synthese stressinduzierter Proteine und ROS-entgiftender Enzyme gesteigert werden (Haase *et al.* 2014). Dies bedeutet, dass Pflanzen gezielt die Biosynthese notwendiger Enzyme als Schutz- und Anpassungsreaktion vor Stresssituationen verstärken können.

Auch ist es denkbar, dass CBZ die Proteinsynthese bzw. die RNA-Synthese in Mikroalgen stimulieren kann, so wie es bereits für andere Verbindungen aufgezeigt werden konnte (Yan *et al.* 1997). Eine gehemmte Biosynthese der Proteasen kann ebenfalls zu einer intrazellulären Anreicherung von Proteinen führen (Yan *et al.* 1997).

In der Studie von Yan *et al.* (1997) konnte neben einem erhöhten Proteingehalt auch ein erhöhter Chlorophyll a-Gehalt gemessen werden. Dieses konnte auch in dieser Studie in Kulturen von *Chlorella* sp. und *Neochloris* sp. aufgezeigt werden. In Kulturen von *Ignatius* sp. korrelierten die erhöhten Proteingehalte nicht mit den Chlorophyll a-Gehalten. Zwar wurden erhöhte Chlorophyll a-Gehalte gemessen, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden.

Für *Coccomyxa* sp. wurden in der niedrigen CBZ-Konzentrationsmessreihe erhöhte Protein- jedoch reduzierte Chlorophyll a-Gehalte gemessen. Dieses deutet auf die bereits beschriebene erhöhte Empfindlichkeit der Chlorophyll a-Pigmente gegenüber Stressfak-



toren hin (Baccouch *et al.* 1998; Vajpayee *et al.* 2000) und belegt die unterschiedlichen Muster der Stressantworten in den verschiedenen Algenspezies.

Ein reduzierter Proteingehalt unter Einfluss von CBZ deutet auf eine gehemmte Protein-Biosynthese hin. Denkbar ist eine Störung des Transkriptions- und Translationsapparats. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wurde ebenfalls bereits dokumentiert: In gestressten Zellen (Cyanobakterien) wurden erhöhte Hydrolyseraten bedingt durch verstärkte Proteaseaktivitäten dokumentiert (Bhunja *et al.* 1991). Gebildete ROS können sich zudem negativ auf die Proteinstrukturen auswirken und die katalytische Aktivität von Enzymen hemmen. Neben der Abnahme des Proteingehalts kann vermutet werden, dass sich auch das Proteinmuster ändert.

Entsprechend der Studie von Yan *et al.* (1997) ist ebenfalls eine Abnahme im Proteingehalt zusammen mit einer Abnahme im Chlorophyll a-Gehalt denkbar. Chlorophyll a bildet zusammen mit mehreren Proteinen ein photosynthetisches Reaktionszentrum. Stressbedingungen, die zu einer Abnahme dieser Komponenten führen, können einen negativen Effekt auf die Anzahl der Reaktionszentren und somit auf die Lichtabsorption und Photosynthesleistung haben. Zusätzlich zum reduzierten Proteingehalt in Kulturen von *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp. und *Pedinomonas* sp. wurden ebenfalls reduzierten Chlorophyll a-Gehalt gemessen. Für *Parachlorella* sp. und *Pedinomonas* sp. konnte zudem eine Korrelation mit einer erhöhten Energieabgabe als Wärme (NPQ) und einer verringerten Elektronentransportrate gefunden werden.

#### 6.3.4.2 Aminosäuren

Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle im pflanzlichen Stoffwechsel und in der Entgiftung von ROS (Hatzios 1997a; Hayat *et al.* 2012).

Verschiedene abiotische Stressfaktoren führen zur intrazellulären Anreicherung von Aminosäuren (Lugan *et al.* 2010). Prolin ist eine sehr wichtige Aminosäure mit zahlreichen Funktionen als Osmolyt, im Schutz der zellulären Struktur, im Erhalt der Redoxstabilität, als Signalmolekül und in der Entgiftung gebildeter ROS (Verslues und Sharma 2010). Eine erhöhte Prolinsyntheserate in den Chloroplasten (Szabados und Saviouré 2010) kann daher als wichtiger Faktor in der Stressadaptation gewertet werden. Ashraf und Foolad (2007) dokumentierten eine steigende Stresstoleranz mit zunehmender Prolinakkumulation. Auch in Algen wurde bereits eine erhöhte Prolinsynthese als Reaktion auf erhöhten Stress beschrieben (Schobert 1977).

In unserer Studie wurde ausschließlich der gesamte Aminosäuregehalt der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. getestet (siehe Tabelle 5.31).

In *Scenedesmus* sp. wurden sowohl verringerte Protein- als auch Aminosäuregehalte gemessen. Es ist eine reduzierte Photosyntheseleistung zu erwarten, allerdings kann die Hypothese nicht mit anderen Messparametern abgesichert werden. Die erhöhte ETR und die verringerten NPQ-Niveaus deuten eher auf einen Anstieg der photosynthetischen Leistung hin. Die Mikroalge *Chlorella* sp. zeigte ebenfalls verringerte Gehalte an freien Aminosäuren auf, während der Proteingehalt anstieg. Im Zuge der Entgiftungsmechanismen werden Konjugate mit Aminosäuren gebildet (Cole 1994). Möglicherweise korreliert der verringerte Gehalt an Aminosäuren somit mit einer erhöhten CBZ-Entgiftung über Konjugationsprozesse. Dieser Diskussionspunkt wird im Abschnitt 6.5 „Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme“ näher betrachtet. Für *Parachlorella* sp. wurden dagegen neben einem reduzierten Proteingehalt erhöhte freie Aminosäuregehalte gemessen. Auch in Kulturen von *Neochloris* sp. wurden erhöhte Aminosäuregehalte gemessen. Ein erhöhter Gehalt an Aminosäuren könnte mit gehemmter Proteinsynthese erklärt werden, aber auch auf eine erhöhte CBZ-Entgiftungskapazität hindeuten. Rückschlüsse auf eine verstärkte Prolinsynthese konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht gezogen werden. Beide Mikroalgen scheinen allerdings eine hohe Stresstoleranz gegenüber CBZ zu haben.

### 6.3.4.3 Zucker

Als Antwort auf abiotischen Stress können neben Aminosäuren auch Zucker intrazellulär akkumulieren (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 2000).

Die Vorstufe des Zuckers (Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P)) wird im Calvin-Benson-Zyklus gebildet. Hierfür werden ATP und NADPH aus der lichtabhängigen Reaktion verwendet. Zwei Moleküle G3P dienen zum Aufbau eines Glukose-Moleküls, welches wiederum als Vorstufe zum Aufbau von Stärke oder Cellulose als Speicherstoff dient.

In dieser Studie wurden die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. getestet (siehe Tabelle 5.32). In Kulturen von *Parachlorella* sp. konnten erhöhte Aminosäure- und Zuckergehalte gemessen werden. CBZ scheint in dieser Kultur einen verstärkenden Einfluss auf die Zuckersynthese zu haben. In den Mikroalgen *Chlorella* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp. wurden reduzierte Zuckergehalte gemessen. Ein negativer Einfluss von CBZ auf die photosynthetische Leistung dieser Mikroalgen ist demnach wahrscheinlich. Der erhöhte Proteingehalt in Kulturen von *Chlorella* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. deuteten ebenfalls auf eine

CBZ-induzierte Stresssituation hin. Denkbar ist auch, dass die erhöhte Zellteilung zu Lasten der freien cytosolischen Zucker abläuft und dass somit mehr Zucker verbraucht als gebildet wird. Daher ist ein erneuter Anstieg des Zuckergehalts mit abnehmender Wachstumsrate zu erwarten.

Eine weitere Erklärung für die Abnahme im Zuckergehalt trotz intakter Photosynthese könnte die Verwendung des Zuckers als Konjugat im Zuge der CBZ-Entgiftung sein (Cole 1994). Auch ein erhöhter Zuckerverbrauch durch Atmung zur Kompensation eines NADPH- oder ATP-Verbrauchs für die CBZ-Entgiftung bzw. Kompartimentierung können die Ursachen für eine Abnahme im Zuckergehalt sein. ATP dient auch dem Aufbau von u. a. Proteinen, die für eine CBZ-Konjugation benötigt werden. Durch die Abnahme des ATP-Pools sinkt ebenfalls die apparente Zuckerproduktionsrate. NADPH wird zudem als Co-Faktor für die CBZ-metabolisierenden Enzyme des CYP-Komplexes P450 eingesetzt (Schuler 1996).

CBZ hatten keinen Effekt auf den Kohlenhydratmetabolismus in Kulturen der Mikroalge *Scenedesmus* sp.. Eine erhöhte Stresstoleranz ist daher zu vermuten.

### 6.3.5 Phasenverteilung

Der Phasenverteilungstest (BATH) ist eine schnelle und einfache Methode, um Veränderungen in den Eigenschaften der Zelloberfläche zu untersuchen (Rosenberg 1984). In diesem Test wurden zwei Phasen (wässrige und organische) genutzt, um Veränderungen der Häufigkeit präsentierter hydrophober Komponenten durch Anreicherung in der organischen Phase bestimmen zu können (Rosenberg 1984). Ein hoher Zellanteil in der organischen Phase bedeutete somit eine verstärkte Präsentation hydrophober Zellkomponenten, während ein hoher Zellanteil in der wässrigen Phase die Zunahme hydrophiler Membranteile präsentiert. Die beobachtete Zellhydrophobie kann somit als Maß der Zellaffinität/Sensitivität für hydrophobe Stoffe beschrieben werden (Zhang und Miller 1994). Veränderungen der Zelloberfläche wirken sich stark auf das Membranpotential aus. Das Membranpotential ist ein wichtiger Faktor für zahlreiche Prozesse im Rahmen der Signalweiterleitung, Stofftransport und Energieweiterleitung. Veränderungen im Membranpotential haben wiederum einen großen Einfluss auf zahlreiche biologische Prozesse (Grinvald *et al.* 1982). Auch wird eine verstärkte Präsentation hydrophober Membranbestandteile mit einer erhöhten Zellschädigung in Verbindung gebracht (Mackey 1983). Eine gegenseitige Beeinflussung der genannten Parameter kann zu einer Potenzierung der beobachteten Effekte führen.

Verschiedene Substanzen können einen Einfluss auf die Eigenschaften der Zelloberfläche haben. So dokumentierten Zhang und Miller (1994) eine verstärkte Präsentation

hydrophober Zellbestandteile durch die Zugabe von Rhamnolipiden. Der pH-Wert der Lösungen kann ebenfalls einen Einfluss auf die Oberflächenladung haben, so dass die Aufnahme von Substanzen verändert sein kann (Simon *et al.* 2013). Zudem bewirkten Stresssituationen Veränderungen in der Häufigkeit präsentierter hydrophober Komponenten gegenüber hydrophilen Komponenten. Mackey (1983) testeten den Einfluss verschiedener Antibiotika auf die Eigenschaften der Zelloberflächen. Sie konnten anhand struktureller Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit zeigen, dass die Stressbehandlungen einen negativen Einfluss auf die äußere Membran hatten. Eine verstärkte Präsentation hydrophober Membranteile resultierte in einer erhöhten Sensitivität für hydrophobe Stoffe.

In dieser Studie wurde der Einfluss von CBZ auf die Eigenschaften der Zelloberflächen getestet (siehe Tabelle 5.33). In Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Neochloris* sp. wurden unter CBZ-Einfluss erhöhte Zellanteile in der wässrigen Phase gemessen. Ausschließlich für Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurde eine verstärkte Präsentation hydrophober Membranbestandteile bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ dokumentiert. Zellen der Mikroalge *Ignatius* sp. zeigten keine Veränderungen in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration auf und ließen eine hohe Toleranz erwarten. In allen Kulturen konnten die Veränderungen in der Zellmembran als erhöhte Sensitivität gegenüber CBZ gesehen werden. Die Zellantworten unterscheiden sich jedoch abhängig von der Spezies.

Die erhöhten Zellanteile in der wässrigen Phase deuten auf eine verstärkte Präsentation hydrophiler Membrankomponenten hin. CBZ ist eine hydrophile Verbindung, die die Membran möglicherweise über Membrankanäle aufgrund des niedrigen  $\log K_{ow}$  passieren kann (siehe Abschnitt 2.2.5). Diese Aufnahme könnte durch eine verstärkte Präsenz hydrophiler Komponenten der Membranoberfläche erleichtert werden.

Dieser Argumentation folgend kann die CBZ-induzierte Zunahme der Häufigkeit präsentierter hydrophober Komponenten gegenüber hydrophilen Komponenten in Kulturen von *Scenedesmus* sp. bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ als Abwehrreaktionen der Zelle gegenüber CBZ gewertet werden. Ein zunehmender Anteil hydrophober Membrankomponenten erschwert die Aufnahme hydrophiler Verbindungen. Bei steigenden CBZ-Konzentrationen wurden keine Veränderungen der Membranstruktur mehr detektiert. In Kulturen von *Scenedesmus* sp. sind in dieser CBZ-Konzentrationsmessreihe Veränderungen im Membranpotential zu erwarten, die sich auf die physiologischen Funktionen in der Zelle auswirken können. Wie bereits aufgezeigt, bedingt CBZ durch seine Wirkung auf Ionenkanäle Veränderungen des intrazellulären Gleichgewichts und somit auch auf das Membranpotential (siehe Abschnitt 2.2.3).

Hydrophobie ist ebenfalls ein wichtiger Faktor für das Adhäsionsverhalten von Organismen auf Oberflächen (Hamadi *et al.* 2008). Somit erzielt eine verstärkte Präsenz hydrophober Membranbestandteile einen hohen Anhaftungsgrad für organische Phasen (Kupfer und Zusman 1984). Im Hinblick auf die im Rahmen dieser Studie getesteten Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen spielt auch die Hydrophobie eine entscheidende Rolle. Negative Auswirkungen auf die biofilmbildenden Eigenschaften der Partner sind zu vermeiden. Verstärktes Potential für einen Einsatz in einer Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierung zeigte ausschließlich *Scenedesmus* sp. aufgrund der verstärkten Präsentation hydrophober Membranbestandteile.

### 6.3.6 Zwischenfazit zum Abschnitt „CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat“

CBZ-Effekte auf den Photosyntheseapparat in Mikroalgen wurden bislang noch nicht im Detail untersucht. Aufgrund der beschriebenen Umweltrelevanz von CBZ, wurden inhibitorische Effekte auf (i) das Wachstum sowie (ii) Parameter des Photosyntheseapparats der Mikroalgen erwartet.

#### (i) CBZ-induzierte Wachstumshemmung

Untersucht wurde das durchschnittliche Wachstum der Mikroalgen über einen Kultivierungszeitraum von 14 Tagen. Für die Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. wurden entgegen der Erwartungen ein CBZ-induzierter wachstumsstimulierender Effekt dokumentiert. Die Wachstumseinschränkungen in Kulturen von *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. bestätigten hingegen die Erwartungen. Möglicherweise war die Wachstumshemmung auf stressbedingte Effekte zurückzuführen.

#### (ii) Inhibitorische Effekte auf Parameter des Photosyntheseapparats

Die Zellantworten auf CBZ variierten je nach Mikroalgenspezies. In Kulturen von *Chlorella* sp., *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp. ( $> 100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) und *Ignatius* sp. konnte in einigen Konzentrationen ein stimulierender Effekt auf die photosynthetische Leistung dokumentiert werden. Auch lassen die Ergebnisse eine Zunahme der Stresstoleranz aufgrund möglicher Entgiftungsstrategien über Aminosäure- bzw. Zucker-Konjugate erwarten. Die Erwartung des gehemmten Photosyntheseapparats unter Einfluss von CBZ deckten sich mit den Ergebnisse, die in den Kulturen von *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp. ( $< 100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ), *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. erzielt wurden.

Eine zusammenfassende Diskussion aller gemessenen Parameter der Abschnitte 5.3 bis 5.5 ist abschließend im Abschnitt 6.6 aufgezeigt.

## 6.4 Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung

In den vorangegangenen Abschnitten konnte ein Einfluss von CBZ auf die Photosynthese aufgezeigt werden. Auch konnte weiterhin gezeigt werden, dass CBZ oxidativen Stress in Mikroalgen bedingt. Die Beobachtungen von Tsiaka *et al.* (2013) können somit bestätigt werden.

Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen der ROS-Entstehung und -Entgiftung nicht mehr aufrechterhalten werden kann (Turrens 2003). Es ist zu vermuten, dass die Prozesse der ROS-Bildung und -Entgiftung, die ROS-Funktionen sowie die Zellantworten auf hohe ROS-Konzentrationen in Pflanzen und Algen gleich sind (siehe Abschnitt 2.3.2.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SOD, CAT, GSH, GSSG, GR sowie Carotinoide als Parameter der ROS-Entgiftung näher betrachtet. Die Versuche wurden unter Sommerbedingungen durchgeführt.

### 6.4.1 Antioxidatives Schutzsystem (Glutathion, Carotinoide)

Die ROS-Entgiftung über Glutathion umfasst die beiden Hauptwege des Ascorbat-abhängigen und Ascorbat-unabhängigen Schutzmechanismus. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 5.4.1 aufgezeigt.

In Kulturen von *Chlorella* sp. deutete der reduzierte GSSG-Gehalt bei niedrigen CBZ-Konzentrationen darauf hin, dass keine CBZ-induzierte verstärkte Aktivierung des Glutathion-Schutzsystems erfolgte. Vielmehr hatte der CBZ-Stress eine hemmende Wirkung auf die Genexpression des Enzyms GR. Die extrahierbare GR-Aktivität nahm mit steigender CBZ-Konzentration ab. Da keine Veränderungen im GSH-Gehalt sowie im Carotinoidgehalt (siehe Tabelle 5.19) in beiden CBZ-Konzentrationsmessreihen dokumentiert werden konnten, ist es denkbar, dass durch den CBZ-induzierten oxidativen Stress weitere antioxidative Schutzmechanismen aktiviert werden.

Auch in Kulturen von *Parachlorella* sp. ließen der reduzierte GSSG-Gehalt und die verringerte GR-Aktivität in der ersten CBZ-Konzentrationsmessreihe vermuten, dass der Glutathion-Schutzweg durch CBZ-induzierten ROS-Stress beeinträchtigt wurde. Der GSH-Gehalt konnte in diesem Bereich allerdings nicht ausgewertet werden. Somit können keine Rückschlüsse auf einen GSH-Verbrauch für weitere Prozesse, wie z. B. Bildung von GSH-Konjugaten, gezogen werden. Erst deutlich höhere CBZ-Konzentrationen ( $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) zeigten den GSH-Einsatz für weiterführende Schadstoff-Entgiftungswege auf. Eine mögliche Bildung von GSH-Konjugaten über die Glutathion S-Transferase wird

im Folgenden ausführlich diskutiert (siehe Abschnitt 6.5 und 6.6). Eine Schutzwirkung von Carotinoiden konnte in dieser Mikroalge ausgeschlossen werden.

In Kulturen von *Neochloris* sp. legten signifikant reduzierte GSH- und GSSG-Gehalte die Annahme nahe, dass keine CBZ-induzierte ROS-Entgiftung über das Glutathion-Schutzsystem erfolgte. Die reduzierten Glutathiongehalte korrelierten mit einer erhöhten GR-Aktivität. Studienarbeiten zeigten, dass ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) die GR-Synthese stimulieren können (Pastori und Trippi 1992). Auch wurden in anderen Studien erhöhte GR-Aktivitäten (+40 %) unter Einfluss von CBZ in Mikroalgen (*Pseudokirchneriella subcapitata*) gemessen (Vernouillet *et al.* 2010). Im Rahmen dieser Studie war ein Einsatz von GSH eher in der Schadstoff-Entgiftung von CBZ in Form von GSH-Konjugaten zu erwarten. Als weitere nicht-enzymatische Schutzsysteme konnten Carotinoide ( $100$  und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) identifiziert werden (siehe Tabelle 5.20).

In Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurden unter Einfluss von  $100$  und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ signifikant erhöhte GSSG-Gehalte gemessen. Ein Anstieg im GSSG-Gehalt kann als Zeichen erhöhten Stresses gewertet werden (Foyer *et al.* 1997). GSSG als ROS-Entgiftungsprodukt im Ascorbat-abhängigen und Ascorbat-unabhängigen Schutzsystem deutete auf eine CBZ-induzierte Aktivierung des Glutathion-Schutzsystems hin. Eine GR-Aktivität konnte für diese Mikroalge nicht nachgewiesen werden. Mikroalgen mit verringerter photosynthetischer Leistung produzieren geringere Mengen an NADPH. Hierdurch kann es zur Hemmung NADPH-verbrauchender Prozesse kommen. Die GSH-Regeneration aus GSSG über GR ist als Beispiel hierfür zu nennen, so dass GSH schneller verbraucht als GSSG reduziert wird. Allerdings kann GSSG auch einen hemmenden Effekt auf die Proteinsynthese haben (Ernst *et al.* 1978). In dieser Studie wurde in Kulturen von *Scenedesmus* sp. dieses bestätigt (siehe Tabelle 5.29). Eine erhöhte Schutzwirkung über Carotinoide konnte hingegen nicht dokumentiert werden (siehe Tabelle 5.20).

CBZ-Stress bewirkte in der zweiten Konzentrationsmessreihe ( $10$  bis  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) einen hemmenden Effekt auf das Glutathion-Schutzsystem von *Ignatius* sp.. Während zunächst ausschließlich die Genexpression des Enzyms GR betroffen war, wurden unter Einfluss von  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ reduzierte Glutathiongehalte detektiert. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass GSH verstärkt in der Schadstoff-Entgiftung von CBZ zur Bildung von GSH-Konjugaten eingesetzt wurde.

Die Ergebnisse lassen zudem vermuten, dass andere ROS-Entgiftungswege aktiviert wurden (z. B. Anstieg der enzymatischen Schutzsysteme bedingt durch einen erhöhten Proteingehalt). Veränderungen im Carotinoidgehalt, als weiteres nicht-enzymatisches

Schutzsystem, wurden nicht gemessen (siehe Tabelle 5.20). Eine ROS-Entgiftung auf diesem Wege ist somit nicht vorherrschend.

Für *Pedinomonas* sp. deuteten ausschließlich die Messergebnisse unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ auf eine CBZ-induzierte verstärkte Aktivierung des Glutathion-Schutzsystems hin, die mit einem erneuten Anstieg im Wachstum korrelierte (siehe Tabelle 5.12). Auch ein verstärkter GSH-Einsatz in der Schadstoff-Entgiftung kann aufgrund der erhöhten GST-Aktivität (siehe Abschnitt 5.5.2) bestätigt werden. Sowohl bei niedrigeren CBZ-Konzentrationen ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) als auch bei höheren Konzentrationen ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) schien eine Kompensation des ROS-Stresses nicht auszureichen, so dass es zu einer Wachstumshemmung kam. Signifikante Steigerungen weiterer antioxidativer Schutzsysteme (z. B. Carotinoide) wurden auch in dieser Mikroalge nicht gemessen (siehe Tabelle 5.21).

CBZ-Konzentrationen von  $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  steigerten den GSSG-Gehalt in *Coccomyxa* sp.. Die GR-Aktivität war in dieser Konzentrationsmessreihe ebenfalls erhöht. Die erhöhte Aktivität ( $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) kann auf eine Stimulierung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückgeführt werden (Pastori und Trippi 1992). Die Messergebnisse ließen einen verstärkten Einsatz von Glutathion in der ROS-Entgiftung vermuten. Da keine Veränderungen im GSH-Gehalt gemessen wurden, war anzunehmen, dass der Glutathionbedarf durch erhöhte Neusynthese kompensiert werden kann. Es ist denkbar, dass GSSG durch die Bildung von Zwischenprodukten einen hemmenden Effekt auf Enzyme hat (Foyer *et al.* 1997) und sekundären Stress bewirkt. Höhere CBZ-Konzentrationen ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) führten zu einer Reduzierung des GSSG-Gehalts. Das deutete darauf hin, dass mit steigenden CBZ-Konzentrationen die Neusynthese von Glutathion den erhöhten Bedarf nicht mehr kompensieren kann; das Schutzsystem bricht zusammen. Ein hoher ROS-Stress unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ wirkte sich auch negativ auf die GR-Aktivität und somit auf die GSH-Regeneration aus, so dass eine Stresskompensation über das Glutathion-Schutzsystem nicht mehr gedeckt werden konnte. Diese Effekte wurden ebenfalls in der Mikroalge *Pedinomonas* sp. beobachtet. Carotinoide konnten nicht als zusätzliches Schutzsystem identifiziert werden (Tabelle 5.21).

#### 6.4.2 Enzymatisches Schutzsystem

Im enzymatischen Schutzmechanismus sind zahlreiche Enzyme, unter anderem die des Ascorbat-Glutathion-Zyklus, involviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Enzymreaktionen der Superoxid-Dismutase (SOD) (siehe Abschnitt 5.4.2.1) und Katalase (CAT) (siehe Abschnitt 5.4.2.2) untersucht.



#### 6.4.2.1 Superoxid-Dismutase

In dieser Studie wurden erhöhte SOD-Aktivitäten in Kulturen der Mikroalgen *Chlorella* sp. ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), *Scenedesmus* sp. (10 und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und *Ignatius* sp. ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) gemessen. Für *Chlorella* sp. und *Ignatius* sp. korrelierte die erhöhte SOD-Aktivität zudem mit einem Anstieg im Proteingehalt (Tabelle 5.28 und Tabelle 5.29). Erhöhte Aktivitäten enzymatischer Schutzsysteme deuten auf CBZ-induzierten oxidativen Stress hin. Während in Kulturen von *Chlorella* sp. bereits niedrige CBZ-Konzentrationen einen Stressfaktor für die Zelle darstellen, sind *Scenedesmus* sp. und *Ignatius* sp. erst bei deutlich höheren CBZ-Konzentrationen betroffen. Eine erhöhte SOD-Aktivität in *Scenedesmus* sp. unter Einfluss von CBZ wurde bereits von Zhang *et al.* (2012) beschrieben. Allerdings deutet die erhöhte SOD-Aktivität auf eine erhöhte Toleranz gegenüber Stressbedingungen hin (Sharma *et al.* 2012).

Reduzierte SOD-Aktivitäten wurden in *Parachlorella* sp. ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) gemessen. Auch wurde kein Anstieg der nicht-enzymatischen Schutzmechanismen (Glutathion) gemessen (siehe Abschnitt 5.4.1). Da diese Mikroalge kein eingeschränktes Wachstum zeigt, ist davon auszugehen, dass weitere Schutzmechanismen in Kulturen von *Parachlorella* sp. greifen.

In Kulturen von *Coccomyxa* sp. führten alle getesteten CBZ-Konzentrationen zu einer Abnahme der SOD-Aktivität. Zeitgleich wurden in der getesteten CBZ-Konzentrationsmessreihe erhöhte Gehalte des Produktes des Ascorbat-Zyklus (GSSG) gemessen (außer  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (siehe Abschnitt 5.4.1). Der negative Einfluss von GSSG auf Enzyme wurde bereits beschrieben. So zeigten Foyer *et al.* (1997) in ihrer Studie auf, dass GSSG durch die Bildung oxidativer Zwischenprodukten Enzymhemmungen bewirken kann. Möglicherweise werden ab CBZ-Konzentrationen von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  andere Schutzmechanismen aktiviert.

Nicht auswertbar war die enzymatische Aktivität in Kulturen von *Pedinomonas* sp.. Denkbar war eine spontane  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung, die keiner SOD-Aktivität bedarf (Sharma *et al.* 2012).

Kein CBZ-Effekt auf die SOD-Aktivität wurde in *Neochloris* sp. dokumentiert. Die Abnahme im Glutathiongehalt deutet zudem daraufhin, dass die Zellen andere Schutzmechanismen aktivieren können. So wurden ab  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ erhöhte Carotinoidgehalte als antioxidatives Schutzsystem gemessen (siehe Tabelle 5.20).

#### 6.4.2.2 Katalase

Im Rahmen dieser Studie wurden abhängig von der Spezies unterschiedliche CAT-Reaktionsmuster ermittelt (siehe Abschnitt 5.4.2.2).

Die CAT-Aktivität in Kulturen von *Chlorella* sp. war ausschließlich in der ersten Konzentrationsmessreihe erhöht. Ausschließlich bei  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  korrelierte die CAT-Aktivität mit der SOD-Aktivität. Bei höheren CBZ-Konzentrationen ist eine gesteigerte CAT-Aktivität möglicherweise auf eine spontane Umwandlung von  $\text{O}_2^{\cdot -}$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückzuführen (Sharma *et al.* 2012). Die in der Studie von Huang *et al.* (1983) aufgezeigte erhöhte CAT-Aktivität in *Chlorella* sp. konnte auch in dieser Studie bestätigt werden. Ursache hierfür war die Bereitstellung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Glykolatoxidation über Glycolat-Oxidasen.

In Kulturen von *Parachlorella* sp. führten ausschließlich  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ zu einer Steigerung der CAT-Aktivität. Die gleiche CBZ-Konzentration führte zu einer Hemmung der SOD-Synthese. Möglicherweise hat das Enzym CAT neben weiteren Schutzmechanismen eine wichtige Rolle im Schutz der Mikroalge *Parachlorella* sp. vor oxidativem Stress.

CBZ hatte keinen Effekt auf die CAT-Aktivität in Kulturen von *Neochloris* sp.. Auch bereits auf die SOD-Aktivität konnte kein Effekt festgestellt werden. Die Ergebnisse lassen somit vermuten, dass die Zellen bevorzugt nicht-enzymatische Schutzmechanismen aktivieren.

In Kulturen von *Scenedesmus* sp. und *Pedinomonas* sp. wurde keine CAT-Aktivität gemessen. Im Peroxisomen, als Hauptquelle für CAT, wird während der Glykolatoxidation zu Oxalat über das Enzym Glycolat-Oxidase  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat für die Katalase bereitgestellt. In einigen Algen wird dieser Schritt von der Glykolat-Dehydrogenase katalysiert, die allerdings kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  bildet und somit die Anwesenheit von CAT überflüssig macht (Huang *et al.* 1983). Es ist somit denkbar, dass die Glykolatoxidation in den Mikroalgen *Scenedesmus* sp. und *Pedinomonas* sp. durch die Glykolat-Dehydrogenase katalysiert wird. Auch kann sich die Anwesenheit der Peroxisomen oder die CAT-Kompartimentierung in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium verändern (Huang *et al.* 1983). Moore und Beevers (1974) dokumentierten die maximale CAT-Aktivität beim Eintritt in die stationäre Phase und konnten eine anschließende Abnahme der Aktivität aufzeigen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte in dieser Studie nach 14 Tagen. Eine altersbedingte Abnahme der Aktivität ist daher möglich. Auch ist es aufgrund der geringen CAT-Affinität zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  denkbar, dass andere Enzyme (z. B. APX, GPX) an der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Entgiftung beteiligt sind. Die in der Studie von Zhang *et al.* (2012) gemessene erhöhte

CAT-Aktivität in Kulturen von *Scenedesmus* sp. unter CBZ-Stress konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden.

Durch die Bildung von Zwischenprodukten kann GSSG Enzyme hemmen (Foyer *et al.* 1997). In Kulturen von *Coccomyxa* sp. ist eine Hemmung der SOD-Aktivität messbar und somit vermutlich auf sekundären Stress zurückzuführen. Auf die CAT-Aktivität in Kulturen von *Coccomyxa* sp. hatte GSSG allerdings keinen hemmenden Effekt. Die CAT-Aktivität war in allen CBZ-Konzentrationen erhöht. Diese unterstreicht eine mögliche CBZ-induzierte oxidative Wirkung auf die Zellen von *Coccomyxa* sp.

In Kulturen von *Ignatius* sp. wurden erhöhte CAT-Aktivitäten bei 10 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit einer möglichen SOD-Aktivität. Ähnlich wie in Kulturen von *Chlorella* sp. ist die gesteigerte CAT-Aktivität möglicherweise auf eine spontane Umwandlung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückzuführen (Sharma *et al.* 2012).

#### 6.4.3 Lipidperoxidation

Als Folge des oxidativen Stresses ist die Peroxidation von Lipiden beschrieben. Die Lipidperoxidation kann somit als Biomarker für Zellschäden gewertet werden (Schmidt *et al.* 2011). Phospholipide sind essentielle Bestandteile der Zellmembranen. Durch ihren Anteil an ungesättigten Fettsäuren können sie die Membranstruktur beeinflussen. So bewirkt ein hoher Anteil gesättigter Fettsäuren eine starre geordnete Struktur, während ein hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren die Fluidität der Membranen erhöht.

Eine Oxidation von Lipiden in der Membran erfolgt über den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren. Es ist beschrieben, dass das Sauerstoffradikal <sup>1</sup>O<sub>2</sub> die Oxidation der Membranlipide beschleunigt (Halliwell 1987). Auch das Superoxid O<sub>2</sub><sup>-</sup> ist an der Ausbreitung oxidativer Kettenreaktionen beteiligt (Turrens 2003). Als oxidative Zwischenprodukte bei den Kettenreaktionen entstehen häufig Peroxid-Radikale (ROO·) (Gill und Tuteja 2010). Die entstehenden Lipidperoxide können wiederum eine Vielzahl cytotoxischer Produkte wie z. B. Malonaldehyd (MDA) bilden (Halliwell 1987). Die Oxidation von Lipiden in biologischen Membranen führt zur Beeinträchtigung der normalen Membranfunktionen (Halliwell 1987), reduzierten Membranfluidität, Inaktivierung membrangebundener Rezeptoren und Enzyme sowie einer erhöhten nicht-spezifischen Membrandurchlässigkeit für Ionen (z. B. Ca<sup>2+</sup>) (Gutteridge und Halliwell 1990).

Die Lipidperoxidation wurde mit der TBA-Methode nach Heath und Packer (1968) bestimmt. Im TBA-Test wird die Konzentration an MDA, als Produkt der Lipidperoxidation, gemessen. Das Testergebnis wird somit als Maß für eine erfolgte Lipidperoxidation ge-

nutzt. Der Vorteil des TBA-Tests liegt in der Analysensensitivität, bedingt durch die Verstärkung des Oxidationsprozesses im Reaktionsgemisch (Gutteridge und Halliwell 1990).

In Kulturen von *Chlorella* sp. (0,1, 1, 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ), *Parachlorella* sp. (1 µg L<sup>-1</sup> CBZ), *Coccomyxa* sp. (10 µg L<sup>-1</sup> CBZ), *Scenedesmus* sp. (100 µg L<sup>-1</sup> CBZ) und *Ignatius* sp. (100 und 1.000 µg L<sup>-1</sup> CBZ) wurden erhöhte Gehalte an MDA gemessen (siehe Tabelle 5.49 bis Tabelle 5.51). Verstärkte Lipidperoxidation bedingt durch oxidativen Stress ging häufig mit einer Steigerung des antioxidativen Schutzsystems einher. Die Zellen detektierten also ROS und erhöhten die Genexpression. Die gesteigerte Schutzleistung reichte aber nicht aus, um ROS zu entgiften und somit Lipidperoxidation zu verhindern. Tsiaika *et al.* (2013) konnten in ihrer Studie erstmals aufzeigen, dass CBZ Lipidperoxidationen in Algen auslösen kann. Oxidativer Stress, der durch CBZ verstärkt wird, kann hierbei u.a. auf eine CBZ-Aufnahme in die Zelle (Andreozzi *et al.* 2002) sowie auf eine erhöhte Bildung oxidativer Zwischenprodukte während der CBZ-Metabolisierung (Vernouillet *et al.* 2010) zurückgeführt werden.

Trotz der CBZ-induzierten Lipidperoxidation wurde für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. und *Ignatius* sp. keine Wachstumshemmung aufgezeigt (siehe Abschnitt 5.3.1). Diese Mikroalgen können auftretende Lipidperoxidation somit kompensieren.

Auch in Kulturen von *Coccomyxa* sp. zeigte sich ein Einfluss der Lipidperoxidation auf das Wachstum. So wurde eine Korrelation zwischen einer Wachstumshemmung und verstärkter Lipidperoxidation beobachtet. Auch in Kulturen von *Parachlorella* sp. blieb ein wachstumsstimulierender CBZ-Effekt aufgrund verstärkter Lipidperoxidation aus.

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. (1 µg L<sup>-1</sup> CBZ) und *Neochloris* sp. (10 µg L<sup>-1</sup> CBZ) wurden verringerte MDA-Gehalte gemessen (siehe Tabelle 5.50 und Tabelle 5.51). In Gegenwart von CBZ wurde also das System zur Entgiftung von ROS derart aktiviert, dass auch ROS abgefangen werden konnten, die unter Kontrollbedingungen entstehen. Da ROS auch als Botenstoff fungieren, hat diese Überreaktion Auswirkungen auf die Kontrolle von Genexpression und metabolischer Aktivität. Als deutlichster Effekt wurde eine Wachstumsstimulierung detektiert.

Eine erhöhte Akkumulation oxidativer Zwischenprodukte ist somit in diesen Mikroalgen nicht zu erwarten. Möglicherweise bilden die Zellen erhöhte Mengen an Tocopherol. In Mikroalgen ist die ROS-Entgiftung über Oxidationsprozesse durch Tocopherol beschrieben (Kruk *et al.* 2005). Die Möglichkeit des Schutzes durch Tocopherol wird durch eine Abnahme des GSH-Gehalts (GSH = Regeneration von Tocopherol) verstärkt. Auch der GSH-Einsatz im Ascorbat-Glutathion-Zyklus wäre denkbar. In Kulturen, in denen der Carotinoidgehalt hochreguliert wurde, wurden keine Veränderungen im MDA-Gehalt

(Lipidperoxidation) dokumentiert. Verringerte sich der Carotinoidgehalt oder waren keine Veränderungen zur Kontrollkultur trotz CBZ-Stress messbar, führte dieses in einigen Kulturen zu einer verstärkten Lipidperoxidation. Die antioxidative Wirkung von Carotinoiden in den Mikroalgen kann daher bestätigt werden. Dass allerdings eine Abnahme im Carotinoidgehalt nicht in allen Kulturen zwangsläufig zu einer Lipidperoxidation führte, ist anderen antioxidativen Schutzmechanismen zuzuschreiben. Wie bereits beschrieben, entgiften Glutathion-Peroxidasen (GPX) die Produkte der Lipidperoxidation (Eshdat *et al.* 1997). Enzymaktivitäten der GPX wurden in dieser Studie nicht gemessen. Eine Aktivierung dieser Enzyme würde bedeuten, dass CBZ selbst die Synthese notwendiger ROS-Entgiftungsenzyme induziert.

#### 6.4.4 Zwischenfazit zum Abschnitt „Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung“

Die in den Abschnitten 2.2.3 beschriebene Wirkung von CBZ auf Ionenkanäle lässt Effekte auf biochemische Stoffwechselwege erwarten. Zudem wurde bereits aufgezeigt, dass CBZ oxidativen Stress in Mikroalgen auslösen kann (Tsiaka *et al.* 2013). CBZ-induzierter Stress ist über Zellschäden sowie die Aktivierung enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen messbar.

Erwartet wurde daher (i) CBZ-induzierter oxidativer Stress sowie (ii) die Aktivierung algenspezifischer antioxidativer Schutzsysteme.

##### (i) CBZ-induzierter oxidativer Stress

Die in Abschnitt 2.3.2.2 beschriebene ROS-Entstehung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen. Gemessen wurde der CBZ-induzierte oxidative Stress als Folge einer erhöhten ROS-Bildung über die Lipidperoxidation als Biomarker für Zellschäden.

Eine verstärkte Lipidperoxidation, bedingt durch oxidativen Stress, wurde in Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Ignatius* sp. und *Coccomyxa* sp. unter Einfluss von 0 bis 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ gemessen. Als Ursache wurde eine erhöhte Bildung und Akkumulation oxidativer Zwischenprodukte vermutet. Ein CBZ-induzierter oxidativer Stress kann für diese Algen somit bestätigt werden.

Für die Mikroalgen *Neochloris* sp. und *Pedinomonas* sp. wurde eine Abnahme im MDA-Gehalt gemessen. Dies bedeutet, dass die Mikroalgen ein erhöhtes Entgiftungssystem für die Produkte der Lipidperoxidation als Antwort auf CBZ-Stress entwickeln (z. B. Carotinoide, Tocopherol, GPX).

Wie in Abschnitt 2.3.2.2 aufgezeigt, sind ROS an der Genregulation beteiligt und kontrollieren auch das Wachstum (Kim *et al.* 2009). Möglicherweise sind die in Abschnitt 5.3.1 aufgezeigten erhöhten Wachstumsraten auf ROS-bedingten Stress zurückzuführen.

(ii) Schutzsysteme für ROS-Entgiftung

Parallel zu auftretenden Zellschäden in Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Ignatius* sp. und *Coccomyxa* sp. beobachtet man eine Steigerung der extrahierbaren ROS-Schutzsysteme. CBZ wird von den Zellen also als Stressor wahrgenommen und löst eine Antwort (Aktivierung von Schutzsystemen) aus. Diese Antwort reicht aber offensichtlich nicht aus, um die beobachteten Schäden zu verhindern. Durch die Schutzsysteme sind die Algen allerdings in der Lage ein neues physiologisches Gleichgewicht zu finden und weiter zu wachsen (außer *Coccomyxa* sp.). Es zeigte sich, dass abhängig der CBZ-Konzentration sowie der Algenspezies unterschiedliche antioxidative Schutzstrategien aktiviert wurden. In der Mikroalge *Neochloris* sp. konnten nicht-enzymatische Schutzsysteme über Glutathion und Carotinoide in der ROS-Entgiftung identifiziert werden. Für *Pedinomonas* sp. wurde ausschließlich das Glutathion-Schutzsystem als ROS-Entgiftungssystem gemessen.

Eine zusammenfassende Diskussion aller gemessenen Parameter der Abschnitte 5.3 bis 5.5 ist abschließend im Abschnitt 6.6 aufgezeigt.

## 6.5 Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme

Im Abschnitt 2.2.2 wurden die Prozesse der CBZ-Metabolisierung ausführlich beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Phase I (chemische Transformation über den CYP-Komplex) und Phase II (GSH-Konjugation über das Enzym GST) der CBZ-Metabolisierung unter simulierten Sommerbedingungen untersucht. Diese beiden Phasen der Metabolisierung und Entgiftung von Xenobiotika wurden ebenfalls bereits in Pflanzen und Mikroalgen identifiziert (Coupland 1991; Sandermann 1992; Cole 1994; Hiltonen *et al.* 1996; Pflugmacher und Sandermann 1998).

Diese Prozesse der Metabolisierung sind in Abbildung 6.4 zusammenfassend mit weiterführenden Metabolisierungsschritten in Phase III dargestellt.

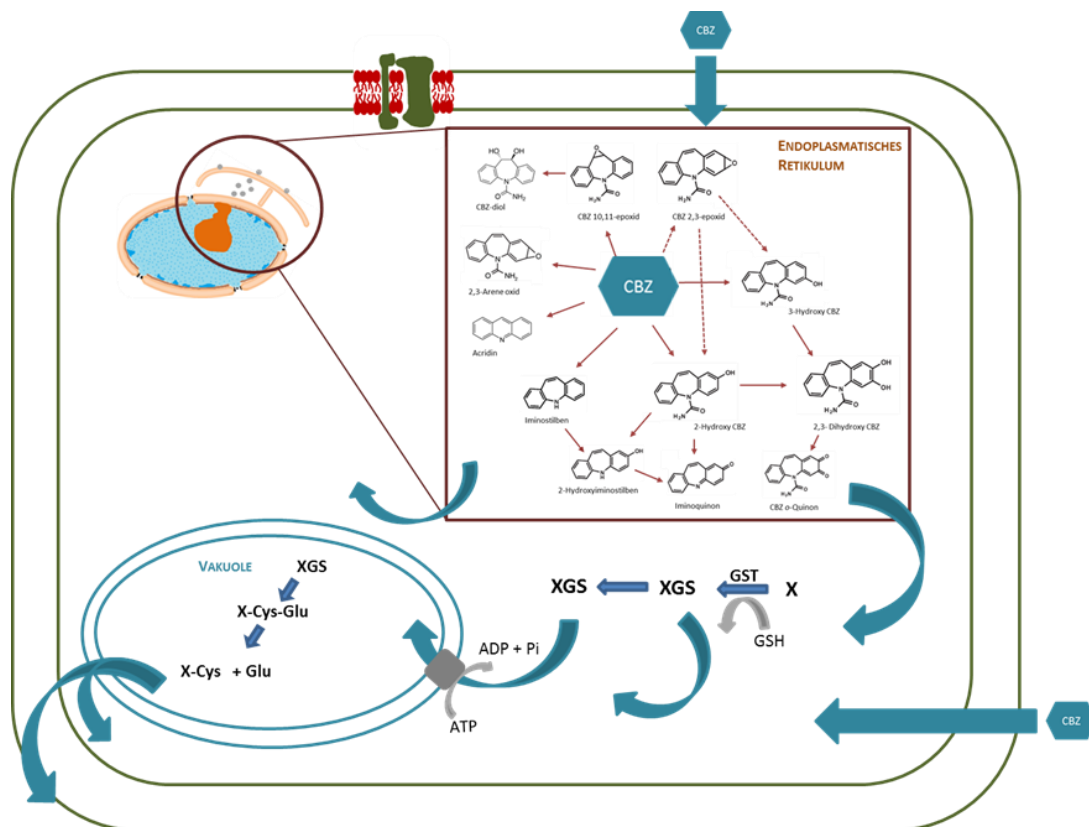


Abbildung 6.4: Mögliche CBZ-Entgiftungswege in Mikroalgen in Anlehnung an die menschliche CBZ-Metabolisierung (X: CBZ/Metabolit, XGS: Glutathion-Konjugat, Cys: Cysteinrest, Glu: Glutamatrest, GST: Glutathion S-Transferase); Zeichnung angefertigt nach Kreuz *et al.* (1996), Schröder (1997) und Coleman *et al.* (1997)

Die enzymatischen Strategien der CBZ-Metabolisierung wurden für eine Konzentrationsmessreihe von 0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  untersucht, da eine hohe Enzymaktivität bei umweltrelevanten CBZ-Konzentrationen für diese Arbeit von großem Interesse war.

### 6.5.1 Cytochrom P450-Komplex

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte Oxidaseaktivität des Komplexes untersucht, da nicht bekannt ist, welche Enzyme des CYP in Algen am CBZ-Metabolismus der Phase I beteiligt sind (siehe Abschnitt 2.2.2).

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass alle getesteten Mikroalgen ein aktives CYP-Schutzsystem haben, welches allerdings in Abhängigkeit von der Spezies unterschiedlich stark durch CBZ stimuliert werden kann (siehe Abschnitt 5.5.1).

In den Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Coccomyxa* sp. führte die Genexpression, als Antwort auf CBZ-Stress, zu einer gesteigerten CYP-Aktivität. In den meisten Fällen bewirkten jedoch höhere CBZ-Konzentrationen ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) eine Aufhebung des stimulierenden Effekts auf den CYP-Komplex. Der gewählte Versuchsansatz erlaubte nicht zu unterscheiden, ob hohe CBZ-Konzentrationen den CYP-Komplex direkt oder indirekt über z. B. einen Substratmangel (NADPH) hemmen.

Für die Metabolisierung von CBZ über den CYP-Komplex wird NADPH benötigt. Um einen genügend großen Pool an NADPH bereitzustellen, können NADPH-verbrauchende Prozesse herunterreguliert werden. Ein Prozess mit hohem NADPH-Verbrauch ist der Aufbau von Zucker. Weitere NADPH-verbrauchende Prozesse laufen im antioxidativem Schutzsystem ab. So wird NADPH für die Regeneration von GSH über die GR, sowie im Ascorbat-Glutathion-Zyklus für die MDAR benötigt. In Kulturen von *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp. wurde ein Zusammenhang zwischen einer verringerten GR-Aktivität und einer erhöhte CYP-Aktivität gemessen (siehe Tabelle 5.40). Für *Coccomyxa* sp. wurde in der gleichen CBZ-Messreihe, in der ein Anstieg der CYP-Aktivität gemessen wurde, ebenfalls ein Anstieg der GR-Aktivität gemessen (siehe Tabelle 5.42). Das Wachstum war in diesem Bereich reduziert. Dieses deutet daraufhin, dass das Wachstum zur Bereitstellung der Energie, die dem Schutz der Zelle dient, reduziert wurde. In den Kulturen von *Ignatius* sp. und *Pedinomonas* sp. wurde keine Stimulierung der CYP-Aktivität gemessen. Unklar bleibt, ob diese Stimulierung bei höheren CBZ-Konzentrationen ausgelöst wird.

Der CYP-Komplex kann durch bestimmte Verbindungen sowohl gehemmt als auch induziert werden. Diese Verbindungen haben somit einen großen Einfluss auf die Arzneistoffaufnahme, -metabolisierung sowie -eliminierung (Koe *et al.* 2014). Als induzierende Verbindung ist u.a. CBZ beschrieben (Zanger und Schwab 2013). Carotinoide können sowohl induzierende (Gradelet *et al.* 1997; Astorg *et al.* 1997; Breinholt *et al.* 2000; Ohno *et al.* 2011;) als auch hemmende Wirkungen (Wang und Leung 2010; Liu



*et al.* 2012; Koe *et al.* 2014) auf bestimmte CYP-Familien haben. Bedingt durch die Tatsache, dass die Enzymmuster für den Abbau von Xenobotika bislang noch nicht vollständig identifiziert sind, kann ein möglicher Einfluss der Carotinoide nicht abschließend beurteilt werden.

In dieser Studie wurde die Aktivität des CYP-Komplexes in der ersten Konzentrationsmessreihe bestimmt. In diesem Bereich wurden ebenfalls für *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. Carotinoidgehalte gemessen. In allen Kulturen waren die Carotinoidgehalte reduziert bzw. es wurden keine Veränderungen in den CBZ-gestressten Zellen gefunden (siehe Tabelle 5.19 bis Tabelle 5.21). Signifikant reduzierte CYP-Aktivitäten wurden nicht dokumentiert. Eine induzierende oder hemmende Wirkung von Carotinoiden auf den CYP-Komplex kann daher in unserer Studie nicht bestätigt werden. Denkbar ist allerdings, dass die Zellen bewusst den Carotinoidgehalt herunterregulieren, um die Metabolisierungskapazität zu steigern.

### 6.5.2 Glutathion S-Transferase

Prozesse der GSH-Konjugation in Phase II wurde über die GST-Aktivität gemessen, die als Biomarker für Stressantworten gewertet werden kann (Vernouillet *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2011). Eine aktuelle Arbeit zeigte den Einfluss von CBZ auf die GST-Aktivierung in Mikroalgen auf (Bommaiyasamy 2014).

In dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit von der Mikroalge unterschiedliche Ergebnisse zur GST-Induktion dokumentiert (siehe Abschnitt 5.5.2). Durch die Prozesse der Phase I steigt das Risiko der Bildung toxischer Metabolite. Um dieses Risiko zu reduzieren, werden die Enzyme der Phase II oft zeitgleich induziert (Lin und Lu 1998).

In *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurden bei  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  GST als Enzym der Phase II co-induziert, um eine Gefährdung durch gebildete Metabolite zu reduzieren. Pearce *et al.* (2005) konnten einen Anstieg der GST-Aktivität aufgrund der Bildung von Thiol-Metaboliten während der CBZ-Oxidation messen. Der Aktivitätsanstieg im Entgiftungssystem (CYP, GST) korrelierte in Kulturen von *Chlorella* sp. mit einem erhöhten Proteinaufbau (siehe Tabelle 5.28). Ein erhöhter Energiebedarf in Form von ATP für den Proteinaufbau konnte in diesen Kulturen möglicherweise über die Bereitstellung von Zucker gedeckt werden. Wie bereits im vorangestellten Abschnitt beschrieben, kann die Rolle der Zuckerbildung für das enzymatische CBZ-Entgiftungssystem nicht abschließend geklärt werden.

Die erhöhte GST-Aktivität deutet allerdings in beiden Kulturen auf eine verstärkte GSH-Konjugation sowie weiterführende Prozesse einer Kompartimentierung in Phase III hin.

Ein Einfluss von CBZ auf die Verlagerung gebildeter Konjugate ist nicht zu erwarten, da der Einstrom gebildeter Konjugate in Kompartimente, unabhängig der möglicherweise betroffenen Ionenkanäle, über ATP-abhängige Transporter erfolgt (Schröder 1997; Martinioia *et al.* 2007) (siehe Abschnitt 2.2.2).

In den anderen getesteten Kulturen konnte die Aussage von Lin und Lu (1998) zur Co-Aktivierung der Enzyme aus Phase I und II nicht bestätigt werden. In Kulturen von *Pedinomonas* sp. ( $1, 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sowie *Scenedesmus* sp. ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) wurde eine erhöhte GST-Aktivität ohne vorherige CYP-Aktivität gemessen. Möglicherweise sind in der Phase I weitere Enzyme an der chemischen Transformation beteiligt, oder CBZ wird ohne weiterführende Metabolisierungsprozesse direkt mit GSH konjugiert (Coleman *et al.* 1997). In Kulturen von *Parachlorella* sp., *Coccomyxa* sp. und *Neochloris* sp. wurde trotz erhöhter CYP-Aktivität keine Veränderung der GST-Aktivität gemessen. Es ist daher denkbar, dass andere Transport- und Eliminierungsprozesse aktiviert werden. Auch ist bereits beschrieben, dass GSH ohne enzymatische Aktivität Konjugate ausbilden kann. Allerdings ist die Effizienz dieser Reaktion im Vergleich zur enzymatischen Konjugation mit GST deutlich vermindert (Schröder 1997).

Für *Ignatius* sp. konnten weder Veränderungen einer CYP- noch GST-Aktivität dokumentiert werden. Es ist anzunehmen, dass in dieser Mikroalge andere Prozess aktiviert wurden bzw. keine CBZ-Metabolisierung stattfand. Denkbar sind zudem die bereits beschriebenen nicht-enzymatischen Prozesse der GSH-Konjugationen (Schröder 1997).

### 6.5.3 Zwischenfazit zum Abschnitt „Enzymatische CBZ-Entgiftungssysteme“

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten CBZ-Effekte auf die Zellphysiologie (siehe Abschnitt 5.3) sowie die CBZ-induzierten ROS-Schutzsysteme (siehe Abschnitt 5.4) zeigten in Abhängigkeit von der Mikroalgenpezies unterschiedliche Reaktionsmuster auf. Daher wurde erwartet, dass eine Induktion der enzymatischen CBZ-Entgiftungssysteme ebenfalls in Abhängigkeit von der Spezies erfolgte.

Getestet wurden die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp., *Ignatius* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. im umweltrelevanten CBZ-Messbereich (0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Die enzymatischen CBZ-Entgiftungssysteme wurden nachfolgend für  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ zusammengefasst, da weiterführende Versuche zur CBZ-Metabolisierungskapazität in Abschnitt 5.7 ebenfalls in dieser Konzentrationsmessreihe getestet wurden.

Im umweltrelevanten CBZ-Konzentrationsbereich von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  konnten zwei Mikroalgen mit erhöhter CYP- und GST-Aktivität identifiziert werden (*Chlorella* sp. und *Scenedes-*

*mus* sp.). Es ist somit eine erhöhte CBZ-Metabolisierung sowie gesteigerte Kompartimentierung gebildeter Metabolite über GSH-Konjugate zu erwarten.

Für die Mikroalge *Pedinomonas* sp. wurde nur eine erhöhte GST-Aktivität gemessen. So scheint eine Induktion anderer Phase I-Enzyme bzw. eine direkte CBZ-Konjugation mit GSH wahrscheinlich. Diese Alge schützt sich also vor toxischen Effekten, indem sie aufgenommenes CBZ aktiv exportiert. Für alle drei Mikroalgen ist eine weiterführende Entgiftung von CBZ durch Kompartimentierung gebildeter Konjugate zu erwarten.

Für die Mikroalgen *Parachlorella* sp. und *Coccomyxa* sp. wurde ausschließlich eine CYP-Aktivität gemessen.

Die primäre Entgiftungsstrategie dieser Algen besteht also im Umsatz von CBZ.

Keine Veränderungen der Enzymaktivitäten der Phasen I und II wurden in Zellen der Mikroalgen *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. gemessen. Die Expression der entsprechenden Enzymaktivitäten wurde also nicht im Rahmen der Stressantwort reguliert. Eine für unsere Fragestellung relevante CBZ-Metabolisierung war in Populationen dieser beiden Mikroalgen somit nicht zu erwarten.

Eine zusammenfassende Diskussion aller gemessenen Parameter der Abschnitte 5.3 bis 5.5 ist abschließend in einer zusammenfassenden Diskussion im Abschnitt 6.6 aufzeigt.

## 6.6 CBZ-Stress, -Schutzmechanismen und -Metabolisierungsstrategien

### - Zusammenfassende Diskussion -

In diesem Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse zum CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat (siehe Abschnitt 5.3), zum Schutzmechanismus gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung (siehe Abschnitt 5.4) sowie zum enzymatischen CBZ-Entgiftungssystem (siehe Abschnitt 5.5) übergreifend diskutiert.

Die zusammenfassende Diskussion soll darüber hinaus der Auswahl geeigneter Kandidaten für weiterführende Experimente zur Untersuchung der CBZ-Metabolisierungskapazität dienen.

Die Messdaten sind für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp., *Ignatius* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in der Tabelle 6.1, Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3 zusammengefasst. Die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp. und *Ignatius* sp. wurden in beiden CBZ-Konzentrationsmessreihen (0 bis 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) getestet. Die Mikroalgen *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. wurden aufgrund des hemmenden CBZ-Einflusses auf das Wachstum nur in der ersten CBZ-Konzentrationsmessreihe (0 bis 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) getestet.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung erzielter Messergebnisse für *Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp.

Mikroalge	CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Wachstum	Hydrophilie	Pigmente		Energie		Produkte der Photosynthese			Glutathion Schutzsystem			Schutzsystem (enzy.)		Lipidperoxidation		Entgiftung	
				Chl. a	Caro	NPQ	ETR	Protein	AS	Zucker	GSH	GSSG	GR	SOD	CAT	CYP	GST		
<i>Chlorella</i> sp.	0,1	+		↑				↑							↑		↑		
	1	+		↑		↓	↓	↑							↑		↑		↑
	10	+	↑	↓				↓											
	100	+	↑	↑				↑			↓								
	1.000	+	↑		↑			↑			↓								
<i>Parachlorella</i> sp.	0,1			↓	↓					↓			na					↑	
	1				↓					↓			na	↓				↑	
	10	+		↓	↓		↓	↑		↓	↑		na						
	100	+	↑	↓	↓		↓	↑		↓	↑		na						
	1.000	+	↑	↓	↓		↓	↑		↓	↑		↓						

Markierte CBZ-Konzentrationen wurden nicht getestet

Für die Mikroalge ***Chlorella sp.*** sind die Ergebnisse dieser Studie in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Das verstärkte Algenwachstum der Mikroalge *Chlorella sp.* war auf eine Zunahme der photosynthetischen Leistung zurückzuführen (außer  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). CBZ zeigte einen wachstumsstimulierenden Effekt.

Die CBZ-Konzentration  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  stellte zwischen beiden Konzentrationsmessreihen eine Schwellenkonzentration dar, die vermutlich zu Veränderungen der Zellphysiologie führte. Die photosynthetische Leistung schien unter diesen Bedingungen reduziert. Dennoch war das Wachstum nicht beeinträchtigt. Dieses kann als Zellreaktion auf erhöhten oxidativen Stress gedeutet werden. Die Abnahme der Leistung kann somit als Versuch gewertet werden, eine ROS-Gefahr zu minimieren. Auch das erhöhte Wachstum kann als Stressantwort gesehen werden. ROS fungieren auch als Botenstoffe und sind an der Regulation der Zellteilung beteiligt. Dieser Effekt könnte auch bei *Chlorella sp.* eine Rolle spielen, wurde für diese Mikroalge aber noch nicht eindeutig bewiesen.

Durch die verstärkte Aktivierung der enzymatischen Schutzsysteme konnte der Level der Stresstoleranz für diese Mikroalge erhöht werden. Auffällig für diese Mikroalge waren die Veränderungen im Schutzsystem in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration. Wie bereits erwähnt, scheint bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ein Schwellenwert der CBZ-Konzentration vorzuliegen. Oberhalb des Wertes können Schadwirkungen nicht mehr durch stimulierte Schutzreaktionen kompensiert werden. In der ersten Konzentrationsmessreihe ( $0-10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) deutete die verstärkte Lipidperoxidation auf eine erhöhten oxidativen Stress hin. Eine Zunahme des antioxidativen Schutzsystems konnte diese Lipidperoxidation nicht komplett vermeiden. In der zweiten Konzentrationsmessreihe (ab  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) führte der CBZ-induzierte Stress zu einer Aktivierung anderer Schutzsysteme, da in dieser Konzentrationsmessreihe keine Steigerungen im enzymatischen Schutzsystem sowie im Glutathiongehalt detektiert werden konnten. Dass Carotinoide eine wichtige Funktion im Zellschutz haben, wurde bei hohen CBZ-Konzentrationen deutlich. Ein Anstieg im Carotinoidgehalt bei  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ schien eine Lipidperoxidation zu begrenzen, während eine Abnahme des Carotinoidgehalts auf das Niveau in den Kontrollkulturen durch Schädigung dieses Schutzsystems bei höheren CBZ-Konzentrationen ( $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) eine Peroxidation der Membranlipide bedingte. Es ist zu erwarten, dass durch den schrittweisen Ausfall von Schutzsystemen Schäden vermehrt auftreten und die Algenkultur relativ plötzlich zusammenbricht.

Das CBZ-Entgiftungspotential über den CYP-Komplex sowie weiterführende Konjugationsprozesse über das Enzym GST wurden in der ersten Konzentrationsmessreihe gemessen. Eine CBZ-induzierte Stimulierung der Genexpression führte zu erhöhter En-

zymaktivität unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Konzentrationen von  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ führten ausschließlich zu einer Stimulierung des CYP-Komplexes. Die erhöhte CYP-Aktivität kann neben CBZ auch andere Moleküle angreifen und zu erhöhtem ROS-Stress führen. Dies wurde in einer Stimulierung der Lipidperoxidation deutlich. Da keine Wachstums- hemmung beobachtet wurde, ist allerdings davon auszugehen, dass die Zellen in der Lage waren den Schaden zu kompensieren.

Bereits bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  konnte keine signifikante Veränderung in der CYP- und GST- Aktivität mehr gemessen werden. Ein erneuter Anstieg in der Enzymaktivität bei höheren Konzentrationen ist daher nicht zu erwarten. Vielmehr wird das Schutzsystem zuneh- mend stärker gehemmt werden und schließlich nicht mehr zur Verfügung stehen. Weite- re mögliche Entgiftungsenzyme wurden im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Es ist zwar möglich, dass CBZ weitere Metabolisierungsenzyme induziert. Hemmungen der Algenphysiologie werden mit steigenden CBZ-Konzentrationen aber immer deutlicher. Da keine Veränderungen im GSH-Gehalt dokumentiert wurden, ist der GSH-Einsatz für Konjugationsprozesse nicht verstärkt ausgeprägt. Die Messergebnisse lassen daher bei steigenden CBZ-Konzentrationen ( $10$  bis  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) eine direkte CBZ-Konjugation mit Aminosäuren und Zuckern vermuten, da auch in diesem Konzentrationsbereich noch eine CBZ-Toleranz beobachtet wurde.

Eine CBZ-Aufnahme in die Zelle war wahrscheinlich. Die Veränderungen der Zellober- fläche durch verstärkte Präsentation hydrophiler Membrankomponenten ermöglichten eine bessere Aufnahme von CBZ. Diese Messergebnisse liegen ausschließlich für die zweiten Konzentrationsmessreihe vor, sind allerdings auch in der ersten Messreihe zu erwarten (erhöhte Entgiftungsaktivität).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CBZ oxidativen Stress in *Chlorella* sp. auslöst. Allerdings schien die Mikroalge im umweltrelevanten Konzentrationsbereich die Stresssi- tuationen durch steigende Entgiftungsaktivität und verstärkte Zellteilung kompensieren zu können. Zusammen mit der erhöhten Entgiftungsaktivität im umweltrelevanten Kon- zentrationsbereich, scheint diese Mikroalge ein geeigneter Kandidat für einen längerfris- tigen Einsatz als biologischer Filter für die CBZ-Bioremediation zu sein.

In Kulturen von *Parachlorella sp.* konnte in der ersten Konzentrationsmessreihe eine CBZ-induzierte Hemmung der photosynthetischen Leistung dokumentiert werden (Tabelle 6.1). Ein für *Chlorella sp.* beobachteter wachstumsstimulierender Effekt von CBZ blieb aus. Zudem konnte erhöhter Lipidperoxidation bedingt durch oxidativen Stress dokumentiert werden.

In der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe wurde ebenfalls eine CBZ-induzierte Hemmung der photosynthetischen Leistung beobachtet, dennoch war das Wachstum nicht beeinträchtigt. Dieses kann als Zellreaktion auf erhöhte Konzentration von ROS gewertet werden, die als Botenstoffe fungieren können. Da keine Lipidperoxidation gemessen wurde, kann die Abnahme der Photosyntheseleistung somit als Beitrag gewertet werden, eine ROS Gefahr zu minimieren. Auch die erhöhte Zellteilung kann als Stressantwort gesehen werden. Die intrazelluläre ROS-Konzentration hat also kein toxisches Niveau erreicht.

Als antioxidatives Schutzsystem war ausschließlich die enzymatische ROS-Entgiftung über CAT unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ nachweisbar. Ein Einfluss der Carotinoide auf die ROS-Entgiftung konnte in dieser Studie nicht dokumentiert werden. Aufgrund der bereits aufgezeigten Stimulierung des Wachstums in der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe scheint eine verstärkte Aktivierung weiterer Schutzsysteme wahrscheinlich, die *Parachlorella sp.* erlaubte, Stress zu tolerieren und toxische Intermediate zu entgiften. Veränderungen im Glutathiongehalt bei deutlich höheren CBZ-Konzentrationen von  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  zeigten einen möglichen GSH-Einsatz für weiterführende Schadstoff-Entgiftungswege auf. Dies zeigt, dass die Mikroalge bis zu dieser CBZ-Konzentration in der Lage ist, ihr Schutzsystem weiter zu verstärken.

Die Experimente der CBZ-Entgiftungssysteme offenbarten eine CBZ-induzierte Stimulierung der CYP-Aktivität als Stressantwort unter Einfluss von  $0,1$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Diese trägt wahrscheinlich zu der zellulären ROS-Synthese bei. Darauf weist auch die beobachtete Lipidperoxidation in dieser Konzentrationsmessreihe hin. Es ist denkbar, dass die gemessene Abnahme der photosynthetischen Leistung der Zelle in der niedrigen Konzentrationsmessreihe auf einen Verbrauch von Redoxäquivalenten für die ROS Entgiftung sowie CBZ-Metabolisierung zurückzuführen ist. Somit könnte die apparente reduzierte photosynthetische Leistung der Stresskompensation gedient haben.

Die CBZ-Entgiftungsenzyme wurden ausschließlich in der ersten Konzentrationsmessreihe gemessen. Da jedoch bereits bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  keine Aktivitätsänderung mehr nachgewiesen werden konnte, ist eine erhöhte Entgiftung über CYP bei höheren CBZ-Konzentrationen nicht zu erwarten. In der GST-Aktivität wurden keine signifikanten Ver-



änderungen zur Kontrollkultur gemessen. Dieses System wird also im Rahmen der Stressantwort nicht reguliert. Es ist auch möglich, dass weitere Transport- und Eliminationsprozesse aktiviert wurden. Dazu ist bereits beschrieben worden, dass GSH ohne enzymatische Aktivität Konjugate ausbilden kann. Allerdings ist die Effizienz dieser Reaktion im Vergleich zur enzymatischen Konjugation mit GST deutlich vermindert (Schröder 1997). Die Akkumulationen von Aminosäuren und Zucker zeigten zudem eine erhöhte Menge an konjugatfähigem Material auf. Daher kann der CBZ-Entgiftungsweg in dieser Mikroalge nicht abschließend geklärt werden.

Eine CBZ-Aufnahme in die Zelle ist wahrscheinlich. Die Veränderungen der Zelloberfläche durch verstärkte Präsentation hydrophiler Membrankomponenten deuteten auf eine verstärkte CBZ-Aufnahme in der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe hin. Allerdings lässt auch in dieser Mikroalge die erhöhte Aktivität der Entgiftungsenzyme eine CBZ-Aufnahme in der niedrigen Messreihe vermuten.

Die messbaren Stressantworten deuteten darauf hin, dass CBZ in *Parachlorella* sp. oxidativen Stress auslöst. Vermutet wurde eine Aktivierung weiterer Schutzsysteme, die ebenfalls an der Stresskompensation beteiligt waren. Die verstärkte Zellteilung mit steigendem CBZ-Stress sowie die erhöhte CYP-Aktivität im umweltrelevanten CBZ-Konzentrationsbereich unterstreichen trotz dokumentierter CBZ-Effekte auf die Zellphysiologie die Möglichkeit eines längerfristigen Einsatzes als biologischer Filter für die CBZ-Bioremediation.

Tabelle 6.2: Zusammenfassung erzielter Messergebnisse für *Neochloris* sp., *Scenedesmus* sp. und *Ignatius* sp.

Mikroalge	CBZ-Konzentration [µg L <sup>-1</sup> ]	Wachstum	Hdrophilie	Pigmente		Energie		Produkte der Photosynthese			Glutathion Schutzsystem			Schutzsystem (enzy.)		Lipidperoxidation		Entgiftung	
				Chl. a	Caro	NPQ	ETR	Protein	AS	Zucker	GSH	GSSG	GR	SOD	CAT	→	←	CYP	GST
<i>Neochloris</i> sp.	0,1	+																	
	1	+																	
	10	+	↑															←	
	100	+	↑	↑	↑	↑	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	1.000	+	↑	↑															↑
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,1	+																	
	1	+																	
	10	+	→																←
	100	+																	
	1.000	+																	←
<i>Ignatius</i> sp.	0,1	+																	
	1	+																	
	10	+																	
	100	+																	
	1.000	+																	

Markierte CBZ-Konzentrationen wurden nicht getestet

Für die Kulturen der Mikroalge ***Neochloris sp.*** wurden die CBZ-induzierten Veränderungen der Zellphysiologie in der zweiten Konzentrationsmessreihe analysiert (Tabelle 6.2). Entgiftungsenzyme wurden ausschließlich im Bereich von 0 bis 10 µg L<sup>-1</sup> CBZ gemessen. Das verstärkte Wachstum der Mikroalge ist auf eine Zunahme der photosynthetischen Leistung zurückzuführen.

Die verstärkte Synthese von Carotinoiden als antioxidatives Schutzsystem verbessert die Stresstoleranz der Mikroalge. Carotinoide spielen somit eine wichtige Rolle im Schutz der Zelle vor ROS. Eine CBZ-induzierte ROS-Entgiftung über das Glutathion-Schutzsystem war nicht zu erwarten. Enzymatische Mechanismen zum Schutz der Zellen wurden nicht detektiert. Der erhöhte Zellschutz korreliert mit einer Abnahme ROS-bedingter Lipidperoxidation. Da von einer Bildung oxidativer Zwischenprodukte ausgegangen werden konnte, zeigte dieser Befund, dass durch CBZ-Stress eine Überreaktion ausgelöst wird: Die Rate der ROS-Entgiftung übersteigt die Bildungsrate.

Eine gesteigerte CBZ-Metabolisierung konnte in Kulturen von *Neochloris sp.* im umweltrelevanten Konzentrationsbereich (0,1-1 µg L<sup>-1</sup> CBZ) nicht nachgewiesen werden. Der CYP-Komplex wird also im Rahmen der Stressantwort in diesem Konzentrationsbereich nicht reguliert. Eine erhöhte Aktivität des CYP-Komplexes wurde erst ab 10 µg L<sup>-1</sup> gemessen. Es ist zu vermuten, dass auch höhere CBZ-Konzentrationen die Enzyme des CYP-Komplexes induzieren. Auch das Enzym GST für weiterführende Konjugationsprozesse wurde im Rahmen der Stressantwort nicht reguliert. Die enzymatische Bildung möglicher GSH-Konjugate mit CBZ bzw. toxischen Metaboliten spielt in dieser Mikroalge eine untergeordnete Rolle. Allerdings deutete die verstärkte Abnahme im GSH-Gehalt in der zweiten Konzentrationsmessreihe auf einen verstärkten Einsatz in der Schadstoff-Entgiftung hin. Als weiteres Konjugatmaterial bieten sich die nachgewiesenen Zucker an. Die Mikroalge verfügt offensichtlich über verschiedene Strategien zum Zellschutz, da im gesamten Messbereich keine Wachstumshemmung beobachtet wurde.

Eine CBZ-Aufnahme in die Zelle ist aufgrund der verstärkten Präsentation hydrophiler Membrankomponenten in der Zellmembran wahrscheinlich. Die Veränderungen der Zelloberfläche wurden allerdings erst in der zweiten CBZ-Konzentrationsmessreihe analysiert. Die Zellphysiologie in der ersten Konzentrationsmessreihe ist jedoch schwierig zu beurteilen, da die ersten deutlichen Veränderungen in der Aktivität der CBZ-Entgiftungsenzyme erst bei 10 µg L<sup>-1</sup> gemessen wurden.

Aufgrund der aufgezeigten Stresstoleranz eignet sich auch *Neochloris sp.* als Kandidat für die CBZ-Bioremediation. Allerdings wurde eine Entgiftung erst in einem nicht mehr umweltrelevanten Bereich induziert (10 µg L<sup>-1</sup> CBZ). Bei niedrigen CBZ-Konzentrationen

unterliegt die CYP-Aktivität offenbar nicht der Regulation im Rahmen einer Stressantwort. Möglicherweise wurden andere metabolisierende Enzyme aktiviert. Allerdings konnten aufgrund der Datengrundlage keine weiteren Schlussfolgerungen gezogen werden. Ein Einsatz dieser Mikroalge bedarf weiterer Analysen. Für folgende Experimente zur Ermittlung der CBZ-Metabolisierungskapazität (siehe Abschnitt 5.7) wurde *Neochloris* sp. nicht weiter berücksichtigt.

Kulturen der Mikroalge **Scenedesmus sp.** wurden ebenfalls überwiegend in der zweiten Konzentrationsmessreihe untersucht (Tabelle 6.2). Die gemessenen Parameter deuteten in der CBZ-Konzentrationsmessreihe ( $< 100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) auf eine CBZ-induzierte Abnahme der photosynthetischen Leistung hin - vermutlich als Zellreaktion auf erhöhten oxidativen Stress. Die signifikanten Abnahmen im Pigment- sowie Produktgehalt unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  sind möglicherweise auf die Veränderungen des Membranpotentials in dieser CBZ-Konzentrationsmessbereich zurückzuführen. Höhere CBZ-Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) führten vermutlich zu einem erneuten Anstieg der photosynthetischen Leistung.

Oxidativer Stress konnte anhand des Anstiegs im GSSG-Gehalt vermutet werden. Parallel dazu war eine Stimulation der beteiligten Enzymaktivitäten zu verzeichnen. Da das Wachstum nicht betroffen war, war die Mikroalge offenbar in der Lage unter CBZ-Stress einen neuen Gleichgewichtszustand anzunehmen. Dabei führte der intrazelluläre ROS-Gehalt zur Stimulierung der Zellteilung. Eine erhöhte Lipidperoxidation wurde nur bei  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ gemessen. Bis zu dieser Schadstoffkonzentration war die Aktivität enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzsysteme zum Schutz vor ROS-Schäden offenbar ausreichend. Dieser CBZ-Effekt deutete darauf hin, dass die ROS-Entgiftung über Glutathion und SOD eine wichtige Rolle in *Scenedesmus* sp. spielte. Auch die Aktivierung weiterer Schutzsysteme wäre denkbar.

Die Untersuchungen zur CBZ-Entgiftung über CYP und GST dokumentierten in der niedrigen CBZ-Konzentrationsmessreihe ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) ausschließlich eine Stimulierung der GST-Aktivität. In der Aktivität des CYP-Komplexes wurde keine CBZ-induzierte Stimulierung nachgewiesen. Dies deutet auf eine GST-katalysierte direkte CBZ-Konjugation hin. Es könnte aber auch sein, dass weitere Enzyme an der CBZ-Metabolisierung beteiligt sind. Eine erhöhte Aktivität enzymatischer CBZ-Entgiftungssysteme konnte im umweltrelevanten Konzentrationsbereich ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) dokumentiert werden. Unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ konnte keine Stimulierung der Entgiftungs- und Konjugationsaktivität mehr nachgewiesen werden. Vermutlich ist daher auch bei höheren CBZ-Konzentrationen keine gesteigerte Entgiftung über CYP zu erwarten. Die reduzierten Aminosäuregehalte deuten auf einen verstärkten Einsatz zur Konjugation in Phase II hin.

Die Veränderungen der Zelloberfläche bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ aufgrund einer verstärkten Präsentation hydrophober Membranbestandteile ließen eine veränderte Membranphysiologie erwarten. Diese konnte allerdings erst bei höheren CBZ-Konzentrationen ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) belegt werden. Die erhöhte CYP-Aktivität deutet auf eine CBZ-Aufnahme bereits in der niedrigen Konzentrationsmessreihe hin.

Kulturen von *Scenedesmus* sp. scheinen den CBZ-induzierten oxidativen Stress durch die Aktivierung verschiedener Schutzsysteme kompensieren zu können, so dass sie eine steigende Stressabwehr aufweisen. Ein längerfristiger Einsatz in der CBZ-Bioremediation kann aufgrund des erhöhten Wachstums sowie einer gesteigerten Aktivität der CBZ-Entgiftungsenzyme im umweltrelevanten Bereich befürwortet werden.

Veränderungen der Zellphysiologie wurden für *Ignatius* sp. in der zweiten Konzentrationsmessreihe analysiert und sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst. Das verstärkte Wachstum der Mikroalge war auf eine Zunahme der photosynthetischen Leistung zurückzuführen. Zeitgleich war eine Abnahme im Zuckergehalt messbar. Als Ursache kann eine Runterregulierung NADPH verbrauchender Prozesse zur Bereitstellung von NADPH genannt werden. Ferner ist ein Zuckerabbau durch Atmung zur Bereitstellung von ATP für eine erhöhte Protein- bzw. Enzymsynthese möglich. In dieser Studie konnten erhöhte Proteingehalte und Enzymaktivitäten gemessen werden. Denkbar ist auch, dass die erhöhte Zellteilung zu Lasten der freien cytosolischen Zucker abläuft.

Lipidperoxidation durch oxidativen Stress wurden erst bei sehr hohen CBZ-Konzentrationen (ab  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) gemessen. Lipidperoxidation wurde messbar, obwohl auch eine verstärkte Aktivierung enzymatischer Schutzsysteme zu beobachten war. Offenbar konnten die Schutzsysteme den ROS-Stress, der durch höhere CBZ-Konzentrationen erzeugt wurde, nicht mehr kompensieren.

CBZ-Metabolisierungs- und Entgiftungssysteme wurden im Rahmen der Stressantwort nicht reguliert. Eine CBZ-induzierte Stimulierung blieb aus. Möglicherweise sind noch weitere CBZ-induzierte Enzyme an der Metabolisierung beteiligt. Die Abnahme im Zuckergehalt trotz erhöhter photosynthetischer Leistung lässt eine erhöhte Entgiftung, durch Bildung von CBZ-Konjugation mit Zucker, vermuten. Der reduzierte GSH-Gehalt bei  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  lässt einen verstärkten Einsatz in der Schadstoff-Entgiftung über die enzymatische und nicht-enzymatische Konjugatbildung vermuten.

Während in einigen getesteten Mikroalgen eine Veränderung der Oberfläche dokumentiert wurde, konnten in der Mikroalge *Ignatius* sp. unter CBZ-Einfluss keine Veränderungen der Oberfläche gemessen werden. Die aktivierten Schutzmechanismen ließen vermuten, dass CBZ-Stress von den Zellen wahrgenommen wurde. Da aber auch keine

Regulation der Entgiftungsenzyme gemessen wurde, ist es ebenfalls denkbar, dass CBZ durch Blockade bestimmter Ionenkanäle von außen diese Stressantworten hervorruft. Zur Absicherung dieser Hypothese sind jedoch weitere Analysen notwendig. Da nicht abschließend geklärt werden konnte, ob CBZ in die Zellen von *Ignatius* sp. aufgenommen wurde bzw. eine CBZ-Metabolisierung erfolgte, wurde auf weitergehende Analysen zur Ermittlung der CBZ-Metabolisierungskapazität in Abschnitt 5.7 verzichtet.

Tabelle 6.3: Zusammenfassung erzielter Messergebnisse für *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp.

Mikroalge	CBZ-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Wachstum	Hydrophilie	Pigmente		Energie	Produkte der Photosynthese			Glutathion Schutzsystem			Schutzsystem (enzy.)		Lipidperoxidation	Entgiftung		
				Chl. a	Caro		NPQ	ETR	Protein	AS	Zucker	GSH	GSSG	GR		SOD	CAT	CYP
<i>Pedinomonas</i> sp.	0,1	-		↓	↓	↑	↓	↓				↓	n.d.					
	1	+		↓		↑	↓					↑	n.d.					↑
	10	-		↓	↓	↑	↓	↓				↓	n.d.					↑
	100																	
	1.000																	
<i>Coccomyxa</i> sp.	0,1	-				↑		↑				↑					↑	
	1	-				↑		↑				↑					↑	
	10	-				↑						↓						
	100																	
	1.000																	

Markierte CBZ-Konzentrationen wurden nicht getestet

Die Kulturen von *Pedinomonas sp.* wurden ausschließlich in der ersten Konzentrationsmessreihe (0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) untersucht (Tabelle 6.3), da bereits in diesem Bereich deutliche Wachstumseinschränkungen gemessen wurden. Die Abnahme des Pigmentgehalts, der Proteinsynthese sowie die Zunahme des NPQ-Niveaus lassen auf eine Abnahme der photosynthetischen Leistung, bedingt durch oxidativen Stress, schließen.

In *Pedinomonas sp.* führten alle getesteten CBZ-Konzentrationen zu oxidativem Stress. Allerdings löste CBZ in der Mikroalge unterschiedliche Reaktionen aus. So zeigten CBZ-Konzentrationen von  $0,1$  und  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  einen wachstumshemmenden Effekt, während  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ einen wachstumsstimulierenden Effekt auslöste.

Diese biphasische wachstumsstimulierende Reaktion lässt sich mit einer verbesserten Nährstoffaufnahme aufgrund einer stressinduzierten Hemmung von Ionenkanälen erklären. Die anschließende Wachstumshemmung bei höheren CBZ-Konzentrationen lässt vermuten, dass Zellschäden nicht mehr durch die verbesserte Nährstoffaufnahme kompensiert werden konnten. Es war ebenfalls zu vermuten, dass die Akkumulation unterschiedlicher ROS-Gehalte zu dieser biphasischen Reaktion führte. In niedrigen Konzentrationen fungieren ROS als Botenstoffe und sind an der Regulation der Zellteilung beteiligt. Allerdings führen erhöhte ROS-Gehalte durch Oxidationsprozesse zu einer Schädigung der Zellen.

Für die Mikroalge *Pedinomonas sp.* wurde die ROS-Entgiftung im Ascorbat-Glutathion-Zyklus unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ als einziger Weg identifiziert. Die Abnahme im MDA-Gehalt bei dieser CBZ-Konzentration bestätigte eine verstärkte Aktivierung von Schutzsystemen zur Entgiftung von ROS. In Gegenwart von CBZ wurde also das System zur Entgiftung von ROS derart aktiviert, dass auch ROS abgefangen werden konnten, die unter Kontrollbedingungen entstehen. Allerdings schien sowohl bei niedrigeren CBZ-Konzentrationen ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) als auch bei höheren Konzentrationen ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) eine Kompensation des Stresses nicht auszureichen, so dass es zu einer Wachstumshemmung kam. Enzymatische Schutzsysteme konnten nicht nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Messungen eine Abnahme des Proteingehalts mit steigender CBZ-Konzentration auf.

Es konnte keine Stimulierung der CYP-Aktivität durch CBZ nachgewiesen werden. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass in der Mikroalge der CYP-Komplex als NADPH-verbrauchender Prozess aufgrund des NADPH-Mangels ebenfalls gehemmt wurde. Eine signifikante Steigerung der GST-Aktivität unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ korrelierte mit einer Abnahme des GSH-Gehalts und deutete auf eine erhöhte Schadstoff-Entgiftung über GSH-Konjugate hin.



Die aktivierten Schutzsysteme und CBZ-Entgiftungsmechanismen lassen vermuten, dass CBZ in die Zellen aufgenommen wurde. Allerdings wurden Veränderungen der Zelloberfläche im Rahmen dieser Arbeit für *Pedinomonas* sp. nicht untersucht.

Aufgrund der Datengrundlage kann für *Pedinomonas* sp. keine Entgiftung über CYP im umweltrelevanten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Daher wurde diese Mikroalge in folgenden Experimenten zur Ermittlung der CBZ-Metabolisierungskapazität im Abschnitt 5.7 nicht weiter berücksichtigt.

Die Mikroalge **Coccomyxa sp.** wurde wie die Mikroalge *Pedinomonas* sp. ausschließlich in der ersten Konzentrationsmessreihe (0 bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) untersucht (Tabelle 6.3).

Die Abnahme des Wachstums sowie die Zunahme des NPQ-Niveaus lassen eine Abnahme der photosynthetischen Leistung bedingt durch CBZ-induzierten oxidativen Stress vermuten. Gegensätzlich zur reduzierten photosynthetischen Leistung verhält sich der Anstieg im Proteingehalt. So scheint eine verstärkte Synthese stressinduzierter Proteine und ROS-entgiftender Enzyme wahrscheinlich.

Trotz einer CBZ-induzierten Wachstumshemmung unabhängig von der Konzentration wurde erst bei der höchsten getesteten Konzentration ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) eine Lipidperoxidation nachweisbar. Es war somit zu vermuten, dass das ROS-Entgiftungssystem ab dieser CBZ-Konzentration nicht mehr zur Kompensation des oxidativen Stresses ausreichte, so dass folglich oxidative Zwischenprodukte akkumulierten. Als Entgiftungssystem identifiziert wurden Glutathion und CAT.

CBZ-Stress führte zu einer Stimulierung des CYP-Komplexes unter Einfluss von 0,1 und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Eine CBZ-Konzentration von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  bewirkte eine Aufhebung des stimulierenden Effekts. Ab dieser Konzentration ist also eine Hemmung dieses Entgiftungsweges zu erwarten. Die Genexpression des Enzyms GST wurde nicht durch CBZ verstärkt induziert. Die CBZ-Entgiftung über Konjugatbildung erfolgte also mit konstanter Rate unabhängig von der CBZ-Konzentration. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Strategien der Phase II in dieser Mikroalge verfolgt werden, um toxische Metabolite aus der Zelle zu entfernen. Wahrscheinlich ist aber die Anhäufung toxischer Metabolite die Ursache für eine Wachstumshemmung.

Eine CBZ-Aufnahme ist aufgrund der beobachteten CYP-Aktivität zu vermuten. Die Messungen der Zelloberflächenbeschaffenheit zeigten allerdings unabhängig von der CBZ-Konzentration keine Änderungen.

Durch die CBZ-Sensitivität ist die Mikroalge *Coccomyxa* sp. nicht als Kandidat für einen längerfristigen Einsatz in der CBZ-Entfernung geeignet und wurde daher in folgenden

Experimenten zur Ermittlung der CBZ-Metabolisierungskapazität (siehe Abschnitt 5.7) nicht weiter berücksichtigt.

Für weitere Entgiftungsversuche wurden folgende Mikroalgen aufgrund ihrer gezeigten Eigenschaften ausgewählt: ***Chlorella sp.***, ***Parachlorella sp.*** und ***Scenedesmus sp.*** (siehe Abschnitt 5.5.3). Für diese Mikroalgen konnte die Einsatzmöglichkeit für die CBZ-Bioremediation aufgezeigt werden.

Für die Mikroalgen *Chlorella sp.* und *Parachlorella sp.* wurde zudem bereits im Abschnitt 6.1 aufgrund ihres Nachweises sowohl unter Sommer- als auch unter Winterbedingungen die Einsatzmöglichkeit als ganzjähriger Filter für die CBZ-Bioremediation vorgeschlagen. Zellen der Mikroalge *Scenedesmus sp.* wurden ausschließlich unter Sommerbedingungen nachgewiesen. Die Wachstumsmessungen unter beiden saisonalen Bedingungen zeigten allerdings die Möglichkeit einer Kultivierung auch unter Winterbedingungen auf. Alle drei Mikroalgen zeigen zudem eine hohe CBZ-Toleranz sowie eine verstärkte Aktivierung der CBZ-Entgiftungsenzyme auf.

## 6.7 Stressantwort ausgewählter Mikroalgen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Anpassungsstrategien der Algen gegenüber CBZ nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen unter simulierten Sommerbedingungen beschrieben. Die Anpassungsreaktionen unterscheiden sich oft stark von den Stressantworten, die in den ersten Tagen nach Umsetzung auf das CBZ-haltige Medium erzeugt wurden. Auch weitere Studien zeigten, dass CBZ-induzierte Veränderungen enzymatischer Stressantworten erst nach einer Anlaufphase messbar waren (Contardo-Jara *et al.* 2011).

Die Anpassungsreaktionen zum Ende einer 14-tägigen Kultivierungsdauer zeigten für die in den vorangestellten Abschnitten ausgewählten Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. eine hohe Stresstoleranz sowie eine hohe Aktivität enzymatischer Entgiftungsenzyme auf. Der Fokus der Untersuchungen lag auf dem späten Zeitpunkt, da Algen in der Leine einem permanenten Stress ausgesetzt sind. Plötzlich auftretender Stress durch Überführung der Mikroalgen in CBZ-haltiges Medium kann als Stressantwort unter Laborbedingungen gemessen werden. Um einen Eindruck zu bekommen, inwieweit sich die Reaktionen zu Beginn des Stresses von denen in der Anpassungsphase unterscheiden, wurden die getesteten Parameter für diese drei Algen zusätzlich zu Beginn des Versuches ausgewertet (siehe Tabelle 5.54). Die Stressantworten wurden ausschließlich in der zweiten CBZ-Messreihe ( $0-1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ausgewertet, um nicht spezifische CBZ-Effekte ausschließen und mögliche CBZ-Angriffsziele identifizieren zu können. In Abhängigkeit von der Mikroalge und Kultivierungsdauer konnte in den durchgeführten Versuchen CBZ-induzierte Stress- und Anpassungsreaktion identifiziert werden, die die Notwendigkeit längerfristiger Studien belegen.

In Kulturen von ***Chlorella* sp.** konnte am Ende der Kulturdauer die CBZ-Konzentration  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  als Schwellenkonzentration für Veränderungen der Zellphysiologie identifiziert werden. Auch zu Beginn der Kulturdauer wurden vergleichbare Reaktionen gemessen. So bewirkte ausschließlich  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine Abnahme des Pigmentgehalts, die vermutlich auf eine CBZ-induzierte Hemmung der Chlorophyllbiosynthese zurückzuführen war (Zhang *et al.* 2012). Diese Konzentration führte am Ende der Kultivierung zu einer reduzierten photosynthetischen Aktivität. Aufgrund des reduzierten Pigmentgehalts war diese Reaktion auch zu Beginn der Kultivierung wahrscheinlich.

CBZ-induzierter oxidativer Stress äußerte sich ebenfalls in der Proteinsynthese. ROS können sich negativ auf die Proteinstrukturen auswirken und die katalytische Aktivität von Enzymen hemmen. Neben der allgemeinen Abnahme des Proteingehalts kann sich auch das Proteinmuster ändern, indem Proteine, die im Abbau des CBZ bzw. in der Ent-

giftung von ROS beteiligt sind, verstärkt gebildet werden. Höhere CBZ-Konzentrationen bewirkten ähnlich der Anpassungsreaktion am Ende der Kultivierung eine Stimulierung der Proteinsynthese. Auch in diesem Fall werden Enzyme der verschiedenen Stoffwechselwege unterschiedlich stark exprimiert.

Die beobachtete Zuckeranreicherung zu Beginn des Versuches im gesamten CBZ-Konzentrationsbereich deutete darauf hin, dass die Akkumulation als Antwort auf abiotischen Stress erfolgt (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 2000). Sie kann als vermehrte Bildung konjugatfähigen Materials für die Entgiftung von CBZ gewertet werden. Zum Ende der Kulturdauer war ein erhöhtes Konjugationspotential mit Zucker und Aminosäuren anzunehmen, um die beobachtete Akkumulation zu erklären.

Im Schutzsystem zeigten sich allerdings unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Veränderungen im Glutathion-Schutzsystem waren ausschließlich zu Beginn als Stressreaktion messbar. Während die Aktivitäten der SOD und CAT zu Beginn des Versuches unter der Nachweisgrenze lagen, wurde am Ende der Kultivierung eine erhöhte Aktivität der CAT als Anpassungsreaktion detektiert. Am Ende führte der CBZ-induzierte Stress vermutlich zu einer Aktivierung anderer Schutzsysteme, um den CBZ-induzierten oxidativen Stress zu kompensieren. So konnte die wichtige Rolle der Carotinoide als antioxidatives Schutzsystem der Zelle aufgezeigt werden.

Zu Beginn des Stressexperimentes wurde oxidativer Stress beobachtet. Dies führte z. B. in Gegenwart von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ zur Hemmung der Chlorophyllsynthese als primäre Stressantwort. ROS-Stress kann als sekundärer Stress beschrieben werden, der durch CBZ ausgelöst wird. Die Stressantworten führten zu einer Überkompensation des ROS-Stresses. ROS wurden nach der Adaptionsphase durch verschiedene Schutzmechanismen schneller abgebaut als gebildet. Dies Phänomen wurde dadurch dokumentiert, dass CBZ zu einer Abnahme der Lipidperoxidation führte. In den Experimenten wird dies durch MDA-Gehalte dokumentiert, die unter den Werten der Kontrollen liegen.

Die Stressantworten der Mikroalge *Parachlorella* sp. zum Kultivierungsbeginn unterscheiden sich deutlich von den dokumentierten Anpassungsreaktionen zum Versuchsende. Während zum Versuchsende neben einer verringerten photosynthetischen Leistung erhöhter oxidativer Stress beobachtet wurde, war zu Beginn eine Steigerung der photosynthetischen Leistung und eine signifikante Zunahme des Pigmentgehalts festzustellen (ab  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ). Niedrigere CBZ-Konzentrationen zeigten nur wenige signifikante Effekte auf. Zum Versuchsende trat neben einer verstärkten Hemmung des photosynthetischen Apparats ein reduzierter Proteingehalt auf. Zu Beginn wurden in Abhän-

gigkeit von der CBZ-Konzentration nur signifikant gesteigerte Produktgehalte der Photosynthese gemessen.

Auch im ROS-Schutzsystem der Zellen von *Parachlorella* sp. zeigten sich unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Veränderungen im Glutathion-Schutzsystem wurden an beiden Messtagen dokumentiert. Auch bei dieser Mikroalge konnten keine Aktivitäten der SOD und CAT zu Beginn des Versuches nachgewiesen werden. Am Ende des Versuches wurden Veränderungen in den Aktivitäten beider Enzyme unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ dokumentiert. Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren Aktivierung der antioxidativen Schutzsysteme. Es ist zu vermuten, dass die Zellen weitere Schutzstrategien als Anpassungsreaktion verfolgen.

Der bereits beschriebene oxidative Stress am Ende des Versuches konnte zu Beginn nicht eindeutig bestätigt werden. Die gegenüber anderen Spezies erhöhte Stresstoleranz beruhte auf einer permanenten Präsenz von Schutzsystemen. Dies reichte offenbar aus, um in Gegenwart geringer CBZ-Konzentrationen ohne signifikante Stressantworten wachsen zu können.

Zu den ersten Stressantworten gehörte offenbar die Überexpression von Komponenten des ROS-Schutzes. Die verringerten MDA-Gehalte zeigten, dass unter geringem Stress die Rate der ROS-Entgiftung z. B. durch Tocopherol schneller verläuft als die ROS-Bildung. Die Möglichkeit des Schutzes durch Tocopherol wurde durch eine Abnahme des GSH-Gehalts (GSH = Regeneration von Tocopherol) verstärkt. Auch war eine Aktivierung weiterer Enzyme (GPX) zum Abbau gebildeter Produkte der Lipidperoxidation denkbar (Eshdat *et al.* 1997). Gesteigerte Carotinoidgehalte bei niedrigeren CBZ-Konzentrationen wirkten ebenfalls einer Lipidperoxidation entgegen.

Es ist zu vermuten, dass die Zellen der Mikroalge *Parachlorella* sp. den CBZ-induzierten oxidativen Stress sowohl durch permanent vorhandene als auch durch stressinduzierte Schutzsysteme kompensieren können.

In Kulturen von ***Scenedesmus* sp.** waren die Stressantworten zu Beginn den Anpassungsreaktionen am Ende der Kultivierungsdauer sehr ähnlich. In beiden Zeiträumen trat eine Abnahme der photosynthetischen Leistung aufgrund des u.a. reduzierten Pigmentgehalts auf. Insbesondere in Gegenwart von 10 und  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ wurde eine deutliche primäre Stressantwort beobachtet.

Das antioxidative Schutzsystem beruht offenbar primär auf einer ROS-Entgiftung über Glutathion. Dieses System wurde allerdings erst als Antwort auf detektierten Stress aufgebaut und lag nicht permanent vor. Ein möglicher Entgiftungsweg über Glutathion kann-

te allerdings bereits zu Versuchsbeginn detektiert werden. Zu Beginn war eine Lipidperoxidation nicht nachweisbar.

Am Versuchsende wurde nach 14 Tagen neben Glutathion auch ein enzymatisches Schutzsystem über SOD als Anpassungsreaktion auf oxidativen Stress detektiert. Dieses ließ vermuten, dass die Mikroalge während des andauernden Kontakts mit CBZ Mechanismen zur Erhöhung der Stresstoleranz und zur Vermeidung eines Zellschadens entwickelte.

Somit konnte auch für die Mikroalge *Scenedesmus* sp. gezeigt werden, dass auftretender ROS-Stress über Schutzmechanismen entgiftet werden kann. Allerdings mussten die Systeme erst im Rahmen einer Stressantwort exprimiert werden. In Abwesenheit von Stress lagen sie nur in geringer Aktivität vor.

## 6.8 CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für Mikroalgen das Einsatzpotential in der CBZ-Bioremediation untersucht werden. Um die Effektivität des untersuchten CYP-Komplexes einordnen zu können (siehe Abschnitt 5.5), wurden weiterführende Untersuchungen zur CBZ-Metabolisierungskapazität der Mikroalgen unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ durchgeführt (siehe Abschnitt 5.7). In dieser Arbeit wurden ein antikörperbasiertes (ELISA) sowie ein chromatographisches Messverfahren (HPLC-ESI-MS/MS) eingesetzt. Untersucht wurde die CBZ-Metabolisierungskapazität der Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp.. Die CBZ-Reduktion und Metabolitbildung wurden auf die Gesamtzellzahl am Ende des Versuches bezogen, um trotz algenspezifischer unterschiedlicher Zellteilungen eine vergleichbare Basis zu schaffen.

Es wurden vier Produkte der CBZ-Metabolisierung untersucht (CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ, 3-OH CBZ). Insgesamt sind bereits 30 Metabolite beschrieben worden. Es ist nicht bekannt, welche Enzyme des CYP-Komplexes in Algen am CBZ-Metabolismus der Phase I beteiligt sind (siehe Abschnitt 2.2.2). Je nachdem welche Enzyme aktiviert werden, werden unterschiedliche Metabolite gebildet (DrugBank 2016). Die Bildung weiterer Metabolite ist daher nicht abschätzbar, wohl aber wahrscheinlich.

Die in Phase II gebildeten Glutathion-Konjugate sind Zwischenprodukte, die während der Phase III weiter detoxifiziert werden können (Schröder 1997) (siehe Abschnitt 2.2.2.). Die Konjugate werden innerhalb weniger Stunden nach ihrer Bildung zu Cystein-Konjugate und Glutamat metabolisiert (Lamoureux *et al.* 1991). Die Cystein-Konjugate stellen hierbei entweder die letzte Stufe der Metabolisierung dar oder es folgt eine teilweise oder vollständige Metabolisierung (Schröder 1997).

Entgiftungsstrategien der Phase III belaufen sich u.a. auf der Kompartimentierung in der Vakuole bzw. auf dem Export aus den Zellen ins Medium (siehe Abschnitt 2.2.2).

Konjugierte und kompartimentierte Metabolite wurden in den untersuchten Fraktionen der Mikroalgen nicht erfasst. Über die eingesetzte Messtechnik wurden ausschließlich „freie“ Metabolite erfasst. Ob die Mikroalgen Ausscheidungsstrategien für gebildete „freie“ Metabolite haben, kann experimentell u.a. über die Freisetzung in die Kulturlösung gemessen werden (Sandermann *et al.* 1977).

## 6.8.1 CBZ-Metabolisierung unter simulierten Sommerbedingungen

### 6.8.1.1 Antikörperbasiertes CBZ-Nachweisverfahren

Die CBZ-Konzentrationen, gemessen mit ELISA, können aufgrund der Kreuzreaktionen mit CBZ-Metaboliten überbewertet werden. Die höchste Kreuzreaktivität wurde für das CBZ-Metabolit CBZ 10,11-epoxid unabhängig vom pH mit 63-68 % dokumentiert. Die Kreuzreaktivität von 2-OH CBZ nahm mit steigendem pH ab (pH 4,5;  $14 \pm 1$  %; pH: 10,5;  $0,81 \pm 0,15$  %). Weitere CBZ-Metabolite (z. B. 3-OH CBZ, CBZ-diol) zeigten nur geringe Kreuzreaktivitäten ( $< 3$  %). Die für das Metabolit CBZ 10,11-epoxid dokumentierte konstante Kreuzreaktivität ohne Bezug zum pH-Wert ist auf gleichbleibende Polaritäten zurückzuführen. Für die meisten Metabolite wurden die höchsten Kreuzreaktionen bei niedrigen pH-Werten gemessen (pH 4,5). Es ist somit davon auszugehen, dass die Spezifität des Antikörpers gegenüber CBZ in diesem pH-Bereich reduziert ist (Bahlmann 2012).

Bahlmann *et al.* (2011) testeten zudem weitere Substanzen mit einer hohen Kreuzreaktivität, die in Wasserproben gefunden wurden (z. B. Cetirizin). Da die hier vorgestellten ELISA-Versuche mit einem Standardmedium durchgeführt wurden, sind diese Substanzen als Kreuzreaktanden auszuschließen. Das Detektionslimit für CBZ im ELISA-Verfahren liegt bei  $30 \text{ ng L}^{-1}$  (Bahlmann 2012). Bei chromatographischen Messungen liegt die Nachweisgrenze für CBZ, in Abhängigkeit von der eingesetzten Matrix, bei  $10 \text{ ng L}^{-1}$  (Lehmann 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ELISA-Analysen zur Bestimmung der CBZ-Konzentration als Grundverbindung im Überstand der Kulturen eingesetzt. Die Ergebnisse in Abschnitt 5.7.1.1 dokumentieren die CBZ-Gesamtreduktion über die Kulturdauer von vier Wochen. Mit den eingesetzten Zelldichten (siehe Tabelle 5.56) wurden CBZ-Reduktionen von 18,2 % ( $\hat{=} 0,18 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) für *Scenedesmus* sp., 19,5 % ( $\hat{=} 0,20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) für *Chlorella* sp. und 20,9 % ( $\hat{=} 0,21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) für *Parachlorella* sp. erreicht.

Verglichen mit den Ergebnissen der HPLC-Messung zeigte sich, dass die kreuzreaktiven Metabolite CBZ 10,11-epoxid und 2-OH CBZ in allen Kulturen messbar waren (siehe Abbildung 5.13 und Abbildung 5.15). Überschätzungen der CBZ-Konzentration bzw. Unterschätzungen der CBZ-Entfernung sind somit wahrscheinlich.

Auch die CBZ-Konzentration im Kontrollmedium (Blank) variierte in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode (siehe Abbildung 5.11 und Tabelle 5.56). Durch den Einsatz des ELISA-Verfahrens zeigten sich keine Veränderungen der CBZ-Konzentration im Kontrollmedium. Die Ergebnisse der HPLC-Messungen dokumentierten für das Kontrollmedium mit  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ im gleichen Kulturzeitraum eine CBZ-Reduktion von 19,7 % sowie



eine Bildung des Metaboliten 2-OH CBZ, welches im ELISA-Verfahren mögliche Kreuzreaktionen hervorrufen und einer Überschätzung der CBZ-Konzentration bedingen konnte.

Die Bestimmung der CBZ-Konzentration über das ELISA-Verfahren liefert einen ersten Einblick in die CBZ-Metabolisierungskapazität der Mikroalgen. In der Studie von Andreozzi *et al.* (2002) wurde mit der Mikroalge *Ankistrodesmus braunii* innerhalb von 60 Tagen eine CBZ-Entfernung von 50 % erzielt. CBZ-Startkonzentration lag bei  $19 \text{ mg L}^{-1}$  CBZ, die Zellzahl zu Beginn des Versuches betrug  $10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ . Unterschätzungen der CBZ-Entfernung sind aufgrund der eingesetzten Messmethode (HPLC) auszuschließen. Im Rahmen unserer Analysen wurden deutlich höhere Zelldichten von  $2 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingesetzt, allerdings waren die CBZ-Startkonzentration ( $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) sowie die Kultivierungsdauer (28 d) deutlich reduziert. Unterschiede in der CBZ-Entfernung sind somit auf die Mikroalgenpezies, CBZ-Konzentration sowie Kultivierungsdauer zurückzuführen.

Da keine signifikanten CBZ-Konzentrationen intrazellulär gefunden wurden, vermuteten Andreozzi *et al.* (2002) eine Metabolisierung nach Aufnahme in die Zelle. Jedoch wurde im Rahmen dieser Studie eine Metabolisierung nicht überprüft, so dass keine Einordnung hinsichtlich toxischer Metabolite getroffen werden kann.

Da für CBZ erhöhtes Potential zur Metabolisierung über den CYP-Komplex aufgezeigt wurde (siehe Abschnitt 2.2.2), entsprechende Aktivitäten in den untersuchten Mikroalgen messbar waren (siehe Abschnitt 5.5) und ein Einsatz in der CBZ-Bioremediation Kenntnisse über die Bildung toxischer Metabolite bedingt, ist es dringend erforderlich, zusätzlich zur Messung der Ausgangsverbindung die Bildung von Metaboliten zu überprüfen.

#### 6.8.1.2 Chromatographisches CBZ-Nachweisverfahren

Zur Überprüfung der Metabolitbildung bzw. Entgiftungsstrategien wurden zusätzliche HPLC-Messungen durchgeführt. Die Kulturbedingungen entsprachend denen im ELISA-Versuch. Die erzielten Ergebnisse sind daher vergleichbar.

Die Reduzierung der eingesetzten CBZ-Konzentration beruht hauptsächlich auf Prozessen des photochemischen Abbaus sowie der algenpezifischen intrazellulären Metabolisierung. Beide Prozesse werden im Folgenden anhand der Ergebnisse im Abschnitt 5.7 diskutiert.

Die Ergebnisse der chromatographischen Messungen zur CBZ-Reduktion zeigten deutliche Abweichungen im Vergleich zur ELISA-Analyse auf. Wie im vorherigen Abschnitt vermutet, kann es bei der ausschließlichen Betrachtung der ELISA-Ergebnisse zu Fehlinterpretationen kommen. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die

CBZ-Konzentrationen für *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. im ELISA-Verfahren unterschätzt, während die Entfernung in Kulturen von *Chlorella* sp. überschätzt wurde.

Die höchste CBZ-Gesamtreduktion wurde in Populationen der Mikroalge von *Parachlorella* sp. mit 44,7 % ( $\hat{=}$  0,45  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) erzielt. Hiervon wurden 0,22  $\mu\text{g L}^{-1}$  in die Zellen eingelagert. In Kulturen von *Scenedesmus* sp. wurde im Überstand eine Reduktion von 23,1 % ( $\hat{=}$  0,23  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) erzielt. Hiervon wurden 0,13  $\mu\text{g L}^{-1}$  in die Zellen eingelagert. Für *Chlorella* sp. lag die CBZ-Gesamtreduktion bei 15,4 % ( $\hat{=}$  0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Eingelagert wurden 0,12  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Wie bereits im Diskussionsteil zur ELISA-Analyse aufgezeigt wurde, lag der photochemische Abbau bei 19,7 %  $\hat{=}$  0,20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Die CBZ-Entfernung in den Kulturen von *Scenedesmus* sp. war daher im Vergleich zum photochemischen Abbau nur geringfügig höher. Im Überstand der Kulturen von *Chlorella* sp. wurde sogar im Vergleich zum Kontrollmedium eine höhere CBZ-Konzentration gemessen (siehe Abbildung 5.12).

Der photochemische Abbau kann sowohl auf natürlichen als auch sensitivierten Prozessen beruhen (Dong *et al.* 2015) (siehe Abschnitt 2.2.5). Im Labor sind photochemische Prozesse bedingt der Einstrahlung von UV-Licht limitiert, da beim Einsatz von Leuchtstofflampen unter Laborbedingungen der Anteil der in die Kulturgefäße abgegebenen UV-Strahlung gering ist. Unter natürlicher Sonneneinstrahlung ist aufgrund der erhöhten UV-Strahlung eine Steigerung des photochemischen Abbaus zu erwarten (Andreozzi *et al.* 2003). Dong *et al.* (2015) erzielten in Experimenten zur natürlichen Photolyse unter Laborbedingungen eine CBZ-Entfernung von 9 % in Reinstwasser. Der photochemische Abbau im Abwasser unter realen Bedingungen in Kläranlagen beruht neben der direkten Photolyse auch auf Prozessen der sensitivierten Photolyse und erreichte eine CBZ-Reduktion um 67 bis 98 % innerhalb von fünf Tagen (Dong *et al.* 2015). Hingegen zeigten Messungen zum photochemischen CBZ-Abbau im Bold's Basalmedium eine nahezu konstante CBZ-Konzentration über einen Zeitraum von 60 Tagen auf (Andreozzi *et al.* 2002). Abweichungen zwischen den Labor- und Feldergebnissen lassen sich auf die Zusammensetzung der Wasserproben zurückführen, da sich Komponenten im Wasser auf die Halbwertszeit von CBZ auswirken können (siehe Abschnitt 2.2.5). Eine Steigerung des photochemischen CBZ-Abbaus durch anorganische Medienkomponenten kann auch in dieser Studie vermutet werden. Ein Einfluss natürlicher sowie sensitivierter Prozesse auf den photochemischen CBZ-Abbau (19,7 %) ist daher wahrscheinlich.

Die Kultivierung photosynthetischer Organismen erschwert die Unterscheidung zwischen einem photochemischen und metabolischen CBZ-Abbau. Aus diesem Grund wurde in der Ergebnisdarstellung im Abschnitt 5.7.1 auf eine Bereinigung der Daten um den pho-

tochemischen CBZ-Abbau verzichtet. Dies trifft ebenfalls auf die gemessenen Metabolit-Konzentrationen zu. Zu beachten ist, dass die gemessenen Metabolit-Konzentrationen im Überstand photochemisch gebildete Metabolite beinhalten können.

Um eine hohe CBZ-Abbaurrate in den Kulturen erzielen zu können, muss die Lichtenergie in alle Schichten des Mediums eindringen. Je nach Trübung des Wassers in Kläranlagen ist die Eindringtiefe des Lichts und somit die photochemische Abbaurrate reduziert. Daher ist hauptsächlich in den obersten Wasserschichten sowie in flachen Nachklärbecken ein photochemischer Abbau zu erwarten (Zhang *et al.* 2008). Die Trübung in Klärbecken ist mit Lichtabsorption durch eine Kultivierung von Mikroalgen gleichzusetzen. Möglicherweise waren in den Schüttelkolben aufgrund der steigenden Zellzahl und der Durchmischung die Eindringtiefe des Lichts und somit auch der Abbau von CBZ reduziert.

Deutlich wird die Schwierigkeit der Unterscheidung eines photochemischen bzw. metabolischen CBZ-Abbaus in Kulturen von *Chlorella* sp., da die gemessene CBZ-Reduktion im Überstand mit 15,4 % niedriger als der photochemische Abbau im Kontrollmedium war.

Ein Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten antikörperbasierten (siehe Abschnitt 5.7.1.1) und chromatographischen Analysen in dieser Arbeit verdeutlicht höhere CBZ-Reduktionsraten (max. 44,7 %) beim Einsatz der chromatographischen Messmethode. Andreozzi *et al.* (2002) erzielten in ihrer Studie eine mikroalgenbasierte CBZ-Entfernung von 50 %. Die Unterschiede in der CBZ-Reduktion liegen in folgenden Faktoren begründet (vorliegende Arbeit / (Andreozzi *et al.* 2002)).

- Algenspezies (*Parachlorella* sp. / *A. braunii*)
- Kulturdauer (28 d / 60 d)
- Medienkomposition (Düngermedium / Bold's Basalmedium)
- CBZ-Konzentration zum Versuchsbeginn ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  /  $19 \text{mg L}^{-1}$ )
- Zelldichte der Mikroalgen ( $2 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  /  $10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ )

Einen Einfluss des Kultivierungsmediums auf die CBZ-Reduktion konnte auch innerhalb der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden. Durch eine Kultivierung der im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. auf ESP-Medium (Basalmedium mit Pepton) im gleichen Versuchszeitraum wurde eine maximale CBZ-Entfernung von 53,4 % in Kulturen von *Scenedesmus* sp. erzielt (Orth 2016). Die Analyse der CBZ-Konzentrationen erfolgte über antikörperbasierte Messungen. Allerdings sind aufgrund der Testungenauigkeit bedingt möglicher Kreuz-

reaktionen Überschätzung der CBZ-Konzentration als sehr wahrscheinlich anzusehen. Eine chromatographische Überprüfung der erzielten Ergebnisse ist für einen weiteren Vergleich notwendig. Im Vergleich zu der Studie von Orth (2016) wurde mit Populationen der Mikroalge *Scenedesmus* sp. in der vorliegenden Arbeit ausschließlich eine CBZ-Reduktion von 23,1 % erreicht. Die Kultivierungsbedingungen bzw. die Messmethode scheinen daher einen großen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse zu haben.

Auch Matamoros *et al.* (2016) testeten die CBZ-Reduktion mit Mikroalgen. In ihrem Versuchsansatz wurde ein Konsortium aus den Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. (insgesamt 90 % der Biomasse) und Bakterien eingesetzt. Angeimpft wurden Reaktoren mit einer Trockenmasse von  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Eingesetzt wurde eine Stoffmischung aus Koffein, Ibuprofen, Galaxolid, Tributylphosphat, 4-Octylphenol, tris(2-Chloroethyl)phosphat und Carbamazepin mit einer Gesamtkonzentration von  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Die mikroalgenbasierte Stoffentfernung wurde innerhalb einer Kultivierung von 10 Tagen auf zwei Medien getestet ((i) verdünntes Abwasser (75 % Grundwasser + 25 % kommunales Abwasser; (ii) Nährstofflösung). Unabhängig vom eingesetzten Medium konnten keine signifikanten CBZ-Reduktionen dokumentiert werden. Möglicherweise wirkte sich der kurze Kultivierungszeitraum negativ auf den CBZ-Abbau aus. Auch sind negative Effekte durch die Co-Kultivierung mit weiteren Verbindungen wahrscheinlich, so dass zunächst der Abbau leichter abbaubarer Stoffe erfolgte (z. B. Ibuprofen, Koffein). Die in der Studie gewählte Messmethode der Gaschromatographie könnte ebenfalls einen Einfluss auf das Ergebnis gehabt haben, da aufgrund der hohen Temperaturen bei der chromatographischen Trennung Abbauprodukte wieder zu CBZ oxidieren können und somit der CBZ-Abbau unterschätzt wird.

Die CBZ-Metabolisierung, die im Rahmen dieser Arbeit mit der Mikroalge *Parachlorella* sp. erzielt wurden, liegen im Größenbereich der Entfernung mit Pilzen und Bakterien (siehe Abschnitt 2.2.5). In einigen Studien wurden auch deutlich höhere CBZ-Reduktionen dokumentiert, die, wie bereits aufgezeigt wurde, auf die jeweiligen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sind (Li *et al.* 2013b). Entscheidende Einflussfaktoren hierbei sind: Zelldichte bzw. Inokulumsvolumina, eingesetzte Spezies, CBZ-Startkonzentration, Temperatur, Medium, Kultivierungsdauer.

So wurden alleine beim Einsatz der Pilze *Trametes versicolor* und *Phanerochaete chrysosporium* CBZ-Entfernungsraten mit einer breiten Spanne von 43 % bis 94 % erzielt. Eine CBZ-Entfernung von 43 % wurde in der Studie von Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2011) bei einer Kultivierungsdauer von 42 Tagen erreicht. Als Substrat für den Pilz diente getrockneter Klärschlamm (10 % Wassergehalt). Der Pilz *T. versicolor* wurden vorab auf Pellets angezogen mit 0,65 ml pro g getrocknetem Pellet und sieben Tagen bei 25°C

kultiviert. Das Inokulumsvolumen in den Versuchen lag bei 38 % (w/w dry basis). Die CBZ-Konzentration lag im Rohschlamm bei 25,6 ng g<sup>-1</sup>. Die Studie von Marco-Urrea *et al.* (2010) zeigte eine CBZ-Entfernung von 80 % unter Einsatz von *T. versicolor* innerhalb von sechs Stunden auf. In dieser Studie wurden die Pilze im Gegensatz zur Studie von Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2011) in Flüssigkultur angezogen. Hierbei wurde 1 mL Myzelsuspension in 250 mL Malzextraktmedium für fünf Tagen bei 25 °C angezogen. Die gebildeten Pilzpellets wurden geerntet und für die folgenden CBZ-Entfernungsversuche als Schüttelkultur (50 µg L<sup>-1</sup> CBZ zum Versuchsbeginn, pH 5, 25 °C, 130 rpm) eingesetzt. Die Pilzkonzentration lag bei 3,8±0,1 mg Trockengewicht mL<sup>-1</sup> (w/v). Eine weitere Studie zeigte in diesem umweltrelevanten Konzentrationsbereich (50 µg L<sup>-1</sup> CBZ) eine Entfernrungsrate von 61 % innerhalb von sieben Tagen. Die Kultivierung erfolgte als Schüttelkultur im Dunkeln bei 25 °C, 135 rpm, pH 4,5 und 0,48 g Trockengewicht in 50 mL Kirk-Medium. Eine Erhöhung der CBZ-Startkonzentration auf 9 mg L<sup>-1</sup> CBZ führten zu höheren Entfernrungsraten von 94 % innerhalb von sechs Tagen (Jelic *et al.* 2012).

Beim Einsatz des Pilzes *Phanerochaete chrysosporium* wurden bei CBZ-Konzentrationen von 1 mg L<sup>-1</sup> Abbauraten zwischen 60 % bis 80 % gemessen (Zhang und Geissen 2012; Li *et al.* 2015b). Zhang und Geissen (2012) konnten in ihrer Studie ebenfalls einen Einfluss des Kultivierungsmediums auf die CBZ-Entfernung mit *P. chrysosporium* aufzeigen. Die Kultivierung auf einem synthetischen Abwasser erzielte nach sieben Tagen einen Abbau von 80 %. Mit Umstellung des Systems auf kommunales Abwasser verringerte sich die Abbaurate auf 60 %. Deutlich aufgezeigt wurde in dieser Studie zudem, dass die Adsorption einen großen Anteil an der CBZ-Entfernung hatte. Die Analyse der Batchkulturen ergab in 75 % der Kulturen eine Adsorption von > 50 %. In der Studie von Li *et al.* 2015b wurden ähnliche CBZ-Entfernrungsraten erzielt. Eine erhöhte CBZ-Reduktion erfolgte in den ersten 14 Tagen von durchschnittlich 75 %. Eine anschließende drastische Abnahme in der Entfernrungsrate auf < 20 % wurde auf eine Bakterienkontamination der Reaktoren zurückgeführt. Die Ursache der hohen CBZ-Entfernung lag in der Immobilisierung der Pilze begründet. Beim Einsatz suspendierter Zellen verringerten sich die Entfernrungsraten um 30 %. Einen Einfluss der CBZ-Adsorption auf die Entfernrungsrate konnte zu Versuchsbeginn ebenfalls bestätigt werden, allerdings wurde bei längerer Kultivierung der intrazelluläre enzymatische Abbau als Hauptprozess identifiziert.

Der Einsatz des Bakterienstammes *Streptomyces* MIUG 4.89 in Schüttelkulturen erzielte unter den Bedingungen in der Studie von Popa Ungureanu *et al.* (2015) (200 µg L<sup>-1</sup> CBZ

zum Versuchsbeginn, 7-tägige Kultivierung, pH 6.0, 25 °C, 150 rpm Schüttelfrequenz und 7 % (v/v) Inokulumsvolumen) eine CBZ-Reduzierung von 30 %.

In Rahmen dieser Arbeit wurde die CBZ-Reduktion von 44,7 % in Kulturen von *Parachlorella* sp. mit einer Zelldichte  $1,74 \cdot 10^8$  Zellen mL<sup>-1</sup> im Kultivierungsansatz (Endvolumen 243 mL) erzielt. Bei einer definierten Ausgangskonzentration von 1 µg L<sup>-1</sup> CBZ kann die CBZ-Konzentration somit auf 0,55 µg L<sup>-1</sup> CBZ reduziert werden. Im Hinblick auf den UQN-Vorschlag von maximal 0,5 µg L<sup>-1</sup> CBZ (NLWKN 2013) reicht die Metabolisierungskapazität der Mikroalge unter den in dieser Arbeit aufgezeigten Kultivierungsbedingungen nicht aus, um die Belastung unter die Schwellenkonzentration zu senken.

Denkbar beim Einsatz der Mikroalgen ist eine Steigerung der Abbaurrate bei höheren Zelldichten. Dieses kann allerdings nicht abschließend bewertet werden, da die Kultivierung ausschließlich mit einer Zelldichte durchgeführt wurde. Empfohlen wird die Untersuchung der Abbaurrate in Abhängigkeit der Zelldichte, um die optimale Zelldichte zu identifizieren. Effekte der Schattierung, Nährstoffmangel etc. bei höheren Dichten sind zu beachten. Die in der Literatur aufgezeigten CBZ-Reduktionen wurden bereits nach kurzer Kultivierungszeit erzielt. Die CBZ-Reduktion mit *Parachlorella* sp. wurde hingegen nach einer Kultivierungszeit von vier Wochen gemessen. Interessant hierfür sind Messungen der CBZ-Konzentration in kürzeren Abständen, um die Metabolisierungskapazität der Alge über den gesamten Kultivierungszeitraum abbilden und folglich optimale Kultivierungszeiten identifizieren zu können. Da ebenfalls die CBZ-Startkonzentration einen großen Einflussfaktor in der Reinigungseffizienz darstellt, sollte die Metabolisierungskapazität der Mikroalge zusätzlich bei unterschiedlichen CBZ-Konzentrationen getestet werden. Durch den Vergleich mit Literaturangaben wird deutlich, dass viele Faktoren einen Einfluss auf die CBZ-Entfernungsrate haben. Ein direkter Vergleich der erzielten Ergebnisse ist daher nur unter Berücksichtigung der jeweiligen Kultivierungsbedingungen möglich.

Wie bereits erwähnt, ist die ausschließliche Betrachtung der CBZ-Konzentration als Ausgangsstoff zur Bestimmung und Beurteilung der CBZ-Metabolisierungskapazität nicht ausreichend. Zur Identifizierung wichtiger Metabolisierungsschritte ist eine Bestimmung gebildeter Metabolite notwendig.

Daher wurden im Rahmen dieser Studie zusätzlich zu CBZ die Metabolite CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ bestimmt. CBZ kann direkt zu CBZ 10,11-epoxid, 3-OH CBZ und 2-OH CBZ metabolisiert werden. Im menschlichen Organismus wurden diese Komponenten mit 2, 5 und 4 % gebildet (Zhang *et al.* 2008).

Diese drei Metabolite wurden als Produkte des photochemischen Abbaus von CBZ identifiziert (siehe Abbildung 5.11). Die Messungen des photochemischen Abbaus im Kontrollmedium deuten auf zwei Hauptmetabolisierungswege über CBZ 10,11-epoxid und 3-OH CBZ hin. Beide Metabolite wurden in gleicher Konzentration gebildet. Die Bildung von 2-OH CBZ war im Vergleich geringer. Eine weiterführende Metabolisierung des CBZ 10,11-epoxid zu CBZ-diol konnte nicht nachgewiesen werden.

Für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurde in den vorangegangenen Versuchen eine CBZ-Aufnahme in die Zelle erwartet. Diese Annahme wird gestützt durch die beobachtete, erhöhte Metabolitbildung, die auf intrazelluläre Stoffwechselaktivität zurückzuführen ist. Eine erhöhte CYP-Aktivität wurde in der getesteten CBZ-Konzentrationsmessreihe von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ für alle Mikroalgen aufgezeigt (siehe Abbildung 5.9). Als Beweis für eine Aufnahme und intrazelluläre Metabolisierung kann die Bildung des Metabolits CBZ-diol gewertet werden, da es im Kontrollmedium nicht detektiert wurde.

Für andere Mikroalgen wurde eine CBZ-Aufnahme bereits dokumentiert (Lajeunesse *et al.* 2009; Vernouillet *et al.* 2010) (siehe Abschnitt 2.3.3). Für die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. kann eine CBZ-Aufnahme nun ebenfalls bestätigt werden.

In Kulturen von *Parachlorella* sp. wurden im Überstand erhöhte Konzentrationen der Metabolite (CBZ 10,11-epoxid, 3-OH CBZ und 2-OH CBZ) gefunden (Abbildung 5.13, Abbildung 5.15 und Abbildung 5.16). Intrazellulär wurden diese Metabolite mit verringerter Konzentration im Vergleich zum Kontrollmedium gemessen. Eine weiterführende Metabolisierung des CBZ 10,11-epoxid zu CBZ-diol wurde sowohl im Überstand als auch intrazellulär nachgewiesen (Abbildung 5.14). Diese weiterführende Metabolisierung zum unwirksamen Metabolit CBZ-diol ist besonders vor dem Hintergrund der erhöhten Toxizität des Metabolits CBZ 10,11-epoxid sehr wichtig. CBZ-10,11 epoxid ist wie der Ausgangsstoff biologisch aktiv und steht im Verdacht neurotoxische Effekte zu verursachen (Bourgeois und Wad 1984; Zhang *et al.* 2008) (siehe Abschnitt 2.2.2).

Bedingt durch die erhöhte Akkumulation der Metabolite im Überstand der Mikroalge *Parachlorella* sp. ist eine Abgabe ins Medium nach einer intrazellulären Metabolisierung denkbar. In der GST-Aktivität wurden keine Veränderungen im Vergleich zum Kontrollmedium gemessen. Wie bereits im Abschnitt 6.5 diskutiert, ist eine Aktivierung anderer Prozesse der Phase II denkbar. Allerdings deutet die erhöhte Messung der Metabolite CBZ 10,11-epoxid, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ im Überstand im Vergleich zu den anderen Mikroalgen daraufhin hin, dass Prozesse der Phase II limitiert sind. Konjugierte Me-

tabolite werden nämlich mit der eingesetzten chromatographischen Bestimmungsmethode nicht erfasst. Bei den gemessenen Metabolit-Konzentrationen handelt es sich ausschließlich um „freie“ Metabolite.

Exportstrategien ins Medium zum Schutz der Zelle vor toxischen Metaboliten (z. B. CBZ-10,11 epoxid) sind sehr wahrscheinlich. Eine erhöhte Bildung und Akkumulation oxidativer Zwischenprodukte führte in Populationen der Mikroalge *Parachlorella* sp. vermutlich zu einer verstärkten Lipidperoxidation. Dieser Effekt diente als Erklärung für den ausbleibenden wachstumsstimulierenden Effekt unter Einfluss von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ während einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen (siehe Abschnitt 6.6). Die Betrachtung des durchschnittlichen Wachstums nach einer Kultivierung von vier Wochen in den jüngsten Experimenten dokumentierte erneut einen wachstumsstimulierenden Effekt (siehe Tabelle 5.55). Die Aktivierung weiterer ROS-Entgiftungsstrategien sowie der Export toxischer Metabolite scheinen daher in Kulturen der Mikroalge *Parachlorella* sp. eine CBZ-Toleranz zu bedingen. Aufgrund der hohen CBZ-Reduzierung wurde diese Mikroalge auch unter Winterbedingungen auf ihre Metabolisierungskapazität getestet. Eine Diskussion zu möglichen Metabolisierungsstrategien der Mikroalge *Parachlorella* sp. ist im Vergleich saisonaler Kultivierungsbedingungen in Abschnitt 6.8.2 aufgeführt.

In den beiden Kulturen von *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. war die CBZ-Reduktion über den CYP-Komplex im Vergleich zu *Parachlorella* sp. verringert. Daraus resultierend wurde ein geringerer Gehalt gebildeter Metabolite gemessen. Da für die beiden Mikroalgen im Gegensatz zu *Parachlorella* sp. eine erhöhte GST-Aktivität in der getesteten Konzentrationsmessreihe ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ) dokumentiert wurde (siehe Abschnitt 5.5.2), ist eine erhöhte Konjugationsrate mit Glutathion zu erwarten. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Abnahme in der Konzentration von 2-OH CBZ und 3-OH CBZ im Vergleich zum Kontrollmedium (siehe Abbildung 5.15 und Abbildung 5.16). Auch konnte als Entgiftungsstrategie die weiterführende Metabolisierung von CBZ 10,11-epoxid zu CBZ-diol im Überstand dokumentiert werden (siehe Abbildung 5.13 und Abbildung 5.14). Das Metabolit CBZ-10,11 epoxid nimmt hierbei aufgrund des bereits aufgezeigten Gefährdungspotentials eine wichtige Stellung ein. Toxische Effekte auf die Mikroalgen können nicht ausgeschlossen werden, so dass eine Abgabe in den Überstand als Schutzreaktion auch für die Mikroalgen *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. denkbar scheint.

Es ist nicht eindeutig differenzierbar, ob der verringerte Gehalt gebildeter Metabolite auf eine Konjugation (kein Nachweis konjugierter Metabolite) oder auf die verringerte CBZ-Metabolisierung zurückzuführen ist. Durch der Konjugation folgende intrazelluläre Kompartimentierungserscheinungen kann die Toxizität der Verbindungen deutlich reduziert werden und ist in vielen Pflanzen als wichtigster Entgiftungsweg aufgezeigt. Allerdings



können Kompartimentierungen auch kritisch gewertet werden, da in Abhängigkeit von dem eingesetzten Konjugatmaterial es erneut zur Freisetzung der Ausgangsverbindungen kommen kann (siehe Abschnitt 2.2.2). Auch können durch weiterführende Abbauprozesse z. B. in der Vakuole toxische Metabolite bzw. Zwischenprodukte gebildet werden (Sandermann 1994), die im Rahmen dieser Untersuchungen nicht dokumentiert wurden.

Möglicherweise führten diese toxischen Zwischenprodukte auch zu einer Wachstumshemmung bei *Chlorella* sp.. Während innerhalb der Kultivierungszeit von 14 Tagen unter Sommerbedingungen eine Wachstumsstimulierung erzielt wurde (siehe Tabelle 5.10), führte eine längere Kultivierung (vier Wochen) unter gleichen Bedingungen zu einem veränderten Wachstumsverhalten (siehe Tabelle 5.55). So war das durchschnittliche Wachstum im Vergleich zu Kulturen mit Mikroalgen ohne CBZ in Kulturen von *Chlorella* sp. reduziert. Für die Mikroalge *Chlorella* sp. war die Wachstumskapazität unter den aufgezeigten Bedingungen erreicht. Möglicherweise war dieses auf toxische Zwischenprodukte zurückzuführen. Für *Scenedesmus* sp. wurde hingegen über den Zeitraum von vier Wochen ein verstärktes Wachstum dokumentiert. Strategien der Entgiftung scheinen somit eine erhöhte CBZ-Toleranz zu bedingen.

Grenni *et al.* (2013) vermuteten, dass mikrobielle Lebensgemeinschaften in den aquatischen Ökosystemen ihre Fähigkeit zum Schadstoffabbau über kontinuierliche Expositionen erlangt haben. In den vorliegenden Laborversuchen sind mögliche Anpassungsmechanismen in den Mikroalgen auszuschließen, da sie seit ihrer Isolierung aus der Leine als Stammkultur ohne CBZ gehalten und kontinuierlich umgesetzt wurden. Diese Stammkulturen dienten der Animpfung aller Versuche.

### 6.8.2 CBZ-Metabolisierung unter simulierten Winterbedingungen

Im Hinblick auf die erhöhte Belastung der Leine mit CBZ sowie gebildeter bzw. eingetragener Metabolite (siehe Abschnitt 5.2) ist die Entwicklung eines saisonal-unabhängigen Entfernungskonzepts entscheidend.

Unter Sommerbedingungen zeigten die Mikroalgen *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. erhöhte CBZ-Toleranzen trotz längerfristiger Kultivierung auf. Längerfristige Kultivierungen sind hierbei vor dem Hintergrund des Einsatzes in der CBZ-Bioremediation ein entscheidender Faktor. Aufgrund der gesteigerten CBZ-Metabolisierungskapazität von *Parachlorella* sp., wurde diese Mikroalge hinsichtlich ihres Potentials zur CBZ-Reduktion unter Winterbedingungen untersucht. Eingesetzt wurde in diesem Versuchsabschnitt ebenfalls  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Die Kultivierung erfolgte entsprechend der im Abschnitt 4.1.1 definierten Winterbedingungen. Auch wurde bei der Ergebnisauswertung unter

Winterbedingungen auf eine Datenbereinigung um den photochemischen CBZ-Abbau verzichtet, da ein Einfluss photochemischer und metabolischer Prozesse nicht differenziert betrachtet werden kann.

Der gemessene photochemische CBZ-Abbau im Kontrollmedium war unter Winterbedingungen mit einem CBZ-Abbau von 5,1 % deutlich geringer. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Halbwertszeit von CBZ im Winter höher als im Sommer ist (Andreozzi *et al.* 2003). Der Metabolisierungsweg schien unabhängig der saisonalen Bedingungen gleich zu sein. So wurden unter Winterbedingungen ebenfalls die Metabolite CBZ 10,11-epoxid, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ identifiziert. Die Konzentrationen von 2-OH CBZ und 3-OH CBZ lagen hierbei geringfügig höher.

Die im Überstand der Mikroalgenkultur gemessene CBZ-Gesamtreduktion nach einer Kultivierungszeit von vier Wochen entsprach dem photochemischen Abbau im Kontrollmedium von 5,1 %. Ein Einfluss der Mikroalge auf die CBZ-Metabolisierung unter Winterbedingungen konnte allein über die Betrachtung der CBZ-Konzentration nicht bestätigt werden. Allerdings deutete die Auswertung der gebildeten Metabolite auf eine intrazelluläre Metabolisierung in *Parachlorella* sp. hin. So konnte auch unter simulierten Winterbedingungen die Bildung des Metabolits CBZ-diol nachgewiesen werden, die ausschließlich auf Metabolisierungsaktivität der Mikroalge zurückzuführen ist. Ein direkter Vergleich der Metabolisierungskapazität der Mikroalge *Parachlorella* sp. unter Sommer- und Winterbedingungen zeigt saisonal-unabhängige Metabolisierungsstrategien und ist in Abbildung 6.5 aufgezeigt. So scheint der Metabolisierungsweg über CBZ-diol zu CBZ 10,11-epoxid induziert zu sein. Diese Metabolisierungsschritte konnten ebenfalls unter Sommerbedingungen gemessen werden. Unter Sommerbedingungen wurde ebenfalls eine Abgabe der Metabolite CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ ins Medium beobachtet. Unter Winterbedingungen wurde nur CBZ-diol und 2-OH CBZ im Überstand detektiert. Der fehlende Nachweis in der intrazellulären Fraktion lässt einen vollständigen Export aus der Zelle vermuten. Das Metabolit 2-OH CBZ wurde auch unter Sommerbedingungen intrazellulär nicht nachgewiesen, was auf einen verstärkten Export hindeutet. Exportstrategien scheinen in dieser Mikroalge somit auch unter Winterbedingungen eine CBZ-Toleranz zu bedingen. Umgekehrt verhält es sich mit dem Metabolit 3-OH CBZ unter Winterbedingungen. Das Metabolit konnte ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden. Eine Abgabe ins Medium konnte nicht aufgezeigt werden.

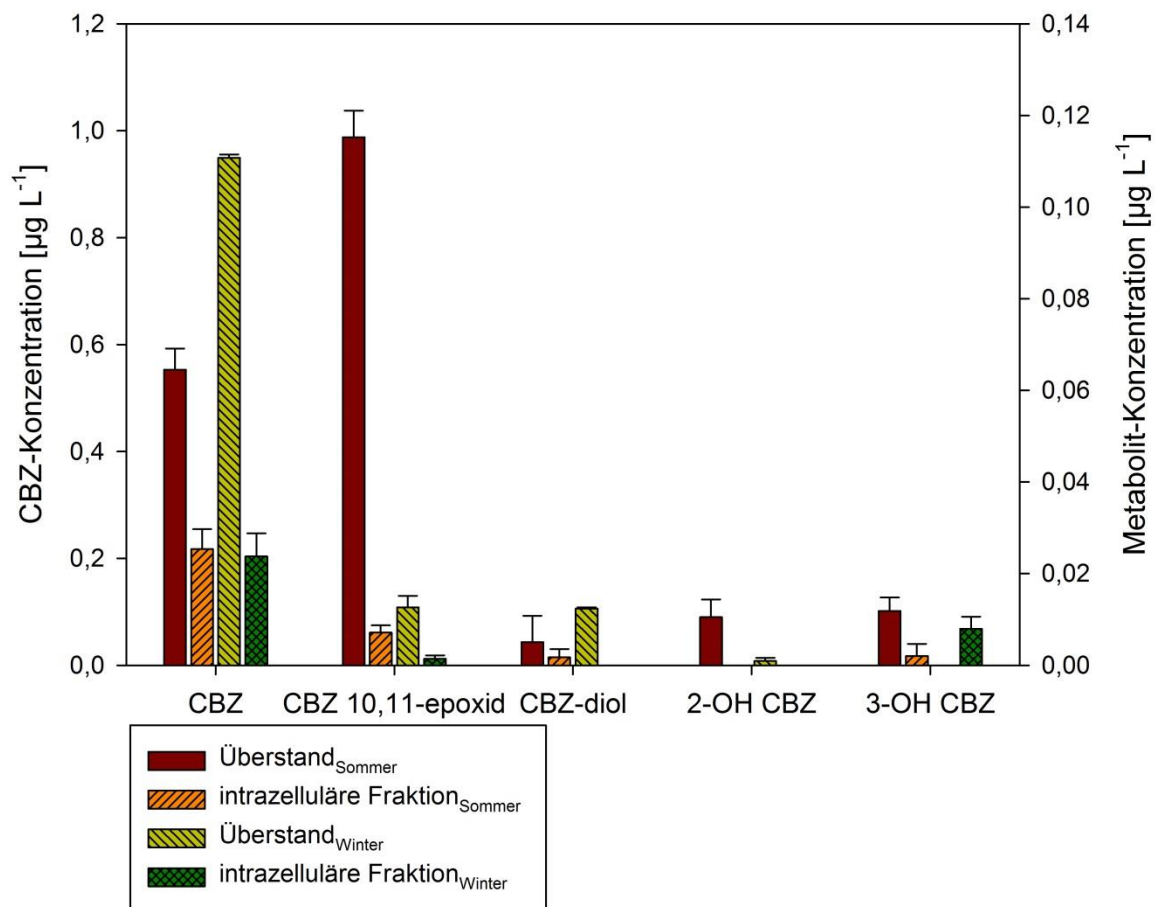


Abbildung 6.5: Vergleich der gemessenen Konzentrationen von CBZ und den wichtigsten Metaboliten CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ in Kulturen von *Parachlorella* sp. unter Sommer- und Winterbedingungen; aufgetragen sind die Ergebnisse jeweils für den Überstand der Kulturen sowie der intrazellulären Fraktion (n=3)

Allgemein konnte belegt werden, dass die CBZ-Reduktion bzw. die Metabolitbildung unter Winterbedingungen deutlich reduziert waren und somit eine verringerte Selbstreinigungskapazität in der Leine in diesem Temperaturbereich zu erwarten ist.

Eine CBZ-Reduktion bei niedrigen Temperaturen wurde in der Studie von Li *et al.* (2013a) untersucht. Eingesetzt wurde der Bakterienstamm *Pseudomonas* sp. CBZ-4, der als Schüttelkultur unter Laborbedingungen einen Abbau von 46,6 % innerhalb von sechs Tagen bei pH 7, 150 rpm, 10 °C und einem Inokulumvolumen von 13 % (v/v) erzielte. Getestet wurden CBZ-Konzentrationen zwischen 10 und 160 mg L<sup>-1</sup> (Li *et al.* 2013a). Vergleichende Studien zur CBZ-Metabolisierung mit Mikroalgen unter Winterbedingungen liegen bislang nicht vor.

Im Abschnitt 6.1.3 wurden klimatische Effekte auf die Zellteilung und Photosynthese diskutiert. Das reduzierte Wachstum der Mikroalge *Parachlorella* sp. unter Winterbedingun-

gen (siehe Tabelle 5.57) im Vergleich zu den Sommerbedingungen (siehe Tabelle 5.55) lässt demnach eine entsprechende Hemmung photosynthetischer Stoffwechselprozesse vermuten. Stressantworten folgten allerdings unter beiden Wachstumsbedingungen dem gleichen Muster. So konnte auch unter Winterbedingungen eine Wachstumsstimulierung durch CBZ dokumentiert werden. Bedingt durch die niedrigen Temperaturen ist zu erwarten, dass Stressantworten weniger deutlich ausfallen als im Sommer. Entsprechende Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die im Abschnitt 4.1.1 definierten Winterbedingungen wurden gewählt, um die saisonalen Bedingungen in der Leine realitätsnah im Labor abbilden zu können. In den im Ausblick (siehe Abschnitt 9) vorgestellten Anwendungsgebieten für einen Einsatz mikroalgenbasierter Bioremediationsprozesse liegen die Anwendungen in vor-, zwischen- bzw. nachgeschalteten Reinigungsstufen, in denen diese klimatischen Extrembedingungen aufgrund der Speisung mit Abwasser gewöhnlich nicht erreicht werden. Je nach Anwendungsbereich gilt es die saisonalen Kultivierungsbedingungen zu erörtern und den Einfluss auf die Entfernungskapazität im Labor zu untersuchen, um eine effiziente und effektive Reinigung gewährleisten zu können.

### 6.8.3 Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen

In einer weiteren, dem Projekt zugeordneten Masterarbeit, wurde aufbauend auf den erzielten Ergebnissen in Abschnitt 5.7 die Möglichkeit einer gesteigerten CBZ-Metabolisierungskapazität der Mikroalgen durch eine Co-Kultivierung mit Bakterien untersucht (Orth 2016).

Der vielseitige Einsatz von Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen zum Abbau von Schadstoffen ist zusammenfassend in Subashchandrabose *et al.* (2011) beschrieben. Der Vorteil des Einsatzes ausgewählter Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen ist der synergistische Effekt zwischen den Organismen. Der Sauerstoff, der während der Photosynthese in Algen gebildet wird, kann von den Bakterien als Elektronenakzeptor im Abbau von organischem Material verwendet werden. Das im bakteriellen Stoffwechsel gebildete CO<sub>2</sub> kann wiederum für die Photosynthese verwendet werden (Oswald *et al.* 1953; Subashchandrabose *et al.* 2011) (Abbildung 6.6).

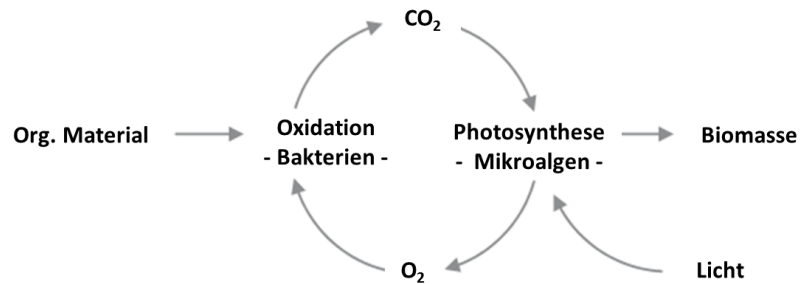


Abbildung 6.6: Synergistischer Effekt einer Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierung; Zeichnung angefertigt nach Muñoz und Guieysse (2006)

Wie bereits mit Pflanzen gezeigt werden konnte (Bashan und Holguin 1997), sind Co-Immobilisierungen mit Bakterien eine gute Erweiterung, um die Entfernungsraten persistenter Stoffe durch Mikroalgen zu erhöhen. Erst in der Co-Immobilisierung können Bakterien durch z. B. wachstumsfördernde Eigenschaften das Entfernungspotential von Mikroalgen deutlich steigern (Ogbonna *et al.* 2000; de-Bashan *et al.* 2002; Moreno-Garrido 2008). Bakterien alleine wird aufgrund der schlechten CBZ-Entfernungsraten in Kläranlagen nur ein geringer Beitrag zum CBZ-Abbau zugeschrieben. Allerdings wurden bereits negative CBZ-Effekte auf Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen dokumentiert. So konnten Lawrence *et al.* (2005) unter Einfluss von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ eine signifikante Abnahme der bakteriellen Biomasse in Biofilmen messen.

Die Arbeit von Orth (2016) wurde als Teilstudie durchgeführt. Daher wurden ebenfalls die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. unter den im Abschnitt 4.1.1 definierten Sommerbedingungen getestet. Bakterien-schlamm wurde im Klärwerk Hannover-Herrenhausen geerntet und vom Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik (ISAH) zur Verfügung gestellt. Für die Analyse der CBZ-Konzentration wurde das in Abschnitt 4.4.1 beschriebene ELISA-Verfahren verwendet.

Die Ergebnisse zeigten für die Mikroalgenkulturen sowie für die Kulturen, die mit Bakterien co-kultiviert wurden, ähnliche CBZ-Abbauraten nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen auf. Eine erhöhte CBZ-Gesamtreduktion in Co-Kultivierungen konnte im Rahmen dieser Masterarbeit nicht aufgezeigt werden. Lediglich in Kulturen von *Chlorella* sp. wurden gegensätzliche Ergebnisse dokumentiert. Hier bewirkte eine zusätzliche Kultivierung mit Bakterien einen hemmenden Effekt auf die CBZ-Reduktion (für eine detaillierte Ergebnisübersicht siehe Orth (2016)). In der vorliegenden Arbeit konnte für *Scenedesmus* sp. ein verstärktes Potential für einen Einsatz in Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen aufgrund des Anstiegs hydrophober Membranbestandteile aufgezeigt werden (siehe Abschnitt 5.3.5).

Metabolitbildungen wurden im Rahmen der Studie nicht überprüft. Kreuzreaktionen im Testverfahren, die zu einer möglichen Über-/Unterinterpretation führen konnten, können daher nicht beurteilt werden. Für die abschließende Bewertung des Nutzens einer Co-Kultivierung zum gesteigerten CBZ-Abbau bedarf es daher weitergehender Untersuchungen.

In der Studie von Nödler *et al.* (2014) wurde das CBZ-Entfernungspotential natürlicher Mikrokosmen, die ebenfalls auf dem Mikroalgen-Bakterien Konzept beruhen, untersucht. Die Mikrokosmen spiegeln hierbei einen Ausschnitt des Ökosystems im Fließgewässer wider, mit dem man u.a. Prozessabläufe simulieren und Effekte verschiedener Einflussfaktoren untersuchen kann. In der Studie wurden Mikrokosmen aus der Leine in der Region Göttingen isoliert und im Labor auf ihr CBZ-Entfernungspotential untersucht. Die Ergebnisse offenbarten keine signifikanten CBZ-Umsetzungsprozesse innerhalb einer Kultivierungsdauer von 30 Tagen. Im Vergleich zu dem erzielten CBZ-Abbau in der Arbeit von Orth (2016) sind die ausbleibenden Umsetzungsprozesse vermutlich auf die geringere Zelldichte der Mikrokosmen zurückzuführen.

Gegensätzlich der Zelldichten einzelliger Mikroalgen im Ökosystem werden Laborversuche mit deutlich höheren Zelldichten durchgeführt. Orth (2016) setzte in seinen Versuchen Mikroalgen mit einer Zelldichte zum Versuchstart von  $2 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  in einem Kultivierungsansatz von 30 mL ein. Im Vergleich zu den gemessenen Zellzahlen  $\text{L}^{-1}$  in der Leine (siehe Tabelle 5.2), liegt der Nachweis des CBZ-Abbaus somit in einer höheren Zellzahl begründet. Es ist daher zu vermuten, dass eine längere Kultivierungsdauer bei niedriger Zelldichte in Mikrokosmen notwendig ist, um Selbstreinigungsprozesse der Leine abbilden zu können.

Auch können die von Orth (2016) aufgezeigten inhibitorischen Effekte der Bakterien auf die mikroalgenbasierte CBZ-Umsetzung nicht ausgeschlossen werden. Interessant wären daher weitere Kenntnisse über die Zusammensetzung der Mikrokosmen, um Rückschlüsse auf metabolisierende Organismen treffen zu können. Eine Effizienzsteigerung der Selbstreinigungskapazität könnte durch gezielte Anreicherung dieser Organismen erreicht werden.

#### 6.8.4 Zwischenfazit zum Abschnitt „CBZ-Metabolisierungskapazität ausgewählter Mikroalgen“

Um mögliche Unterschiede in der CBZ-Metabolisierungskapazität aufzeigen zu können, wurden zwei Mikroalgen (*Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp.) mit erhöhter CYP und GST-Aktivität im umweltrelevanten CBZ-Konzentrationsbereich gewählt, sowie eine Mikroalge (*Parachlorella* sp.), bei der ausschließlich eine erhöhte CYP-Aktivität gemessen

sen wurde (siehe Abschnitt 5.5). Getestet wurde die CBZ-Metabolisierung in Gegenwart von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ. Erwartet wurden unter Sommerbedingungen (i) eine erhöhte Rate der CBZ-Reduktion aller Algen, sowie weiterführende Metabolisierungsschritte zur Entgiftung toxischer Metabolite aufgrund der signifikant erhöhten CYP-Aktivität in Phase I bei  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ, (ii) eine Steigerung der CBZ-Reduktion durch die Co-Kultivierung mit Bakterien, (iii) Entgiftungsstrategien der Metabolisierungsprodukte und (iv) eine reduzierte CBZ-Abbaurrate unter Winterbedingungen aufgrund der kälteinduzierten Limitierung wichtiger Stoffwechselprozesse.

(i) CBZ-Metabolisierungskapazität unter simulierten Sommerbedingungen

Eine erhöhte CBZ-Metabolisierungskapazität konnte für alle Algen unter Sommerbedingungen bestätigt werden. Die höchste CBZ-Reduktion wurde in Kulturen von *Parachlorella* sp. erzielt (-44,7 %). In allen Kulturen konnte die Entgiftungsstrategie des toxischen Metabolits CBZ 10,11-epoxid über das nicht mehr wirksame Metabolit CBZ-diol nachgewiesen werden. Dieser Metabolisierungsschritt ist für die CBZ-Detoxifizierung entscheidend. Da im Kontrollmedium das Metabolit CBZ-diol nicht detektiert werden konnte, sind gemessene CBZ-diol-Konzentrationen im Überstand auf eine algenspezifische Metabolisierung zurückzuführen. Somit konnte erstmalig in den getesteten Mikroalgen eine CBZ-Metabolisierung umfangreich nachgewiesen werden.

(ii) CBZ-Metabolisierungskapazität in Mikroalgen-Bakterien Co-Kultivierungen

Eine gesteigerte algenspezifische CBZ-Reduktion durch eine Co-Kultivierung mit Bakterien konnte nicht bestätigt werden. Eine abschließende Bewertung des Nutzens einer Co-Kultivierung zum gesteigerten CBZ-Abbau bedarf weitergehender Untersuchungen.

(iii) Entgiftung gebildeter Metabolite

In vorherigen Untersuchungen zeigten Kulturen von *Parachlorella* sp., dass als Stressantwort vorwiegend der Metabolismus von CBZ aktiviert wird (siehe Abschnitt 5.5). Diese Beobachtung wird dadurch bestätigt, dass in Überständen von *Parachlorella* sp. die höchsten CBZ-Metabolitgehalte gefunden wurden. Da der Entgiftungsweg über GSH-Konjugate nicht detektiert werden konnte, muss für den Export ein anderer Weg angenommen werden, der nicht identifiziert wurde. Konjugierte Metabolite wurden im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht gemessen.

In Kulturen von *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurden zusätzlich Transportsysteme (Konjugatbildung) aktiviert. Diese beiden Spezies schützen sich also indem sie gebildete Metabolite kompartimentieren.

### (iv) CBZ-Metabolisierungskapazität unter simulierten Winterbedingungen

Aufgrund der erhöhten CBZ-Reduktion unter Sommerbedingungen wurde die Mikroalge *Parachlorella* sp. auch unter definierten Winterbedingungen auf ihrer CBZ-Metabolisierungskapazität getestet. Die Versuche erfolgten im Hinblick auf einen ganzjährigen Einsatz als biologische Filter in der CBZ-Bioremediation.

Wie erwartet, war die CBZ-Metabolisierung aufgrund der niedrigen Temperaturen reduziert. Allerdings konnte eine saisonal-unabhängige Entgiftungsstrategie dokumentiert werden. So war die für *Parachlorella* sp. unter Sommerbedingungen beschriebene Entgiftung toxischer Metabolite über die Bildung von CBZ-diol auch unter Winterbedingungen messbar.

Genau wie unter Sommerbedingungen konnte auch für das reduzierte Wachstum im Winter eine CBZ-induzierte Wachstumsstimulierung im Vergleich zur Kontrollkultur dokumentiert werden. Weiterer Forschungsbedarf wird für den Einsatz der Mikroalge zur CBZ-Entfernung unter Winterbedingungen aufgezeigt. Je nach Anwendungsfall gilt es die saisonalen Kultivierungsbedingungen zu erörtern und den Einfluss auf die Entfernungskapazität im Labor zu untersuchen, um eine effiziente und effektive Reinigung gewährleisten zu können. Weitere Versuchsvarianten wie z. B. eine längere Kultivierungsdauer, scheinen notwendig, um auch bei niedrigen Temperaturen eine effektive Abbauleistung zu erzielen. Auch sind aufbauende Forschungsarbeiten zur Steigerung der Entfernerungsrate gebildeter Metabolite empfehlenswert.

Zusammenfassend zeigt sich für *Parachlorella* sp. eine erhöhte CBZ-Stresstoleranz sowie erhöhtes Potential für einen saisonal-unabhängigen Einsatz in der Bioremediation. Damit einhergehend konnte eine hohe CBZ-Metabolisierungskapazität sowie eine saisonal-unabhängige Entgiftungsstrategie dokumentiert werden. Für weiterführende Studien kann die Toleranz als Marker für ein CBZ-Entfernungspotential in Betracht gezogen werden.



## 7 Zusammenfassung

Jährlich wird eine große Anzahl pharmazeutisch aktiver Verbindungen in die aquatische Umwelt eingetragen, da sie eine hohe Persistenz aufweisen und aufgrund fehlender zusätzlicher Reinigungsstufen in kommunalen Kläranlagen nicht eliminiert werden können.

Untersucht wurde exemplarisch Carbamazepin (CBZ) als Modellsubstanz persistenter pharmazeutischer Verunreinigungen im Wasserkreislauf. In Teilabschnitten der Leine wurden die für CBZ ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen (PNEC:  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ; UQN-Vorschlag:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (Ferrari *et al.* 2003; NLWKN 2013)) bereits überschritten, so dass eine Gefährdung durch direkte Effekte auf Algenpopulationen erwartet werden kann. Nach europäischer Richtlinie 2013/39/EU ergibt sich daher die Notwendigkeit, ein Konzept zur Verbesserung der Wasserqualität in Oberflächengewässern zu entwickeln.

Konzepte zur CBZ-Entfernung sind vorhanden. Allerdings sind sie entweder vor dem finanziellen und ökologischen Aspekt nicht vertretbar oder aber technisch nicht mit den herkömmlichen Reinigungsstufen der kommunalen Kläranlagen kombinierbar. Für biologische Entfernungsmethoden wurde bereits ein hohes Einsatzpotential aufgezeigt. Eine technische Umsetzung ist aber noch nicht ausreichend erprobt.

Mikroalgen weisen ein hohes Potential für Bioremediationsprozesse auf. Als wesentlicher Bestandteil des Phytoplanktons leisten sie einen hohen Beitrag zur Selbstreinigung der Flüsse. Dieser Aspekt wurde durch Beprobung der Leine an drei Standorten untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem erstmalig die Einsatzmöglichkeit von Mikroalgen zur CBZ-Entfernung in Prozessen der Bioremediation untersucht.

Das Ziel war es, die biochemischen und physiologischen Grundlagen der Mikroalgen sowie ihre CBZ-Metabolisierungs- und Entgiftungskapazität für einen ganzjährigen Einsatz zur CBZ-Entfernung zu untersuchen. Die im Abschnitt 3 gesetzten Teilziele (i) bis (vi) wurden im Folgenden anhand der erzielten Ergebnisse zusammenfassend beantwortet.

### **(i) Saisonaler Einfluss auf die Mikroalgenpopulationen im Untersuchungsgebiet Leine**

Um sicherzustellen, dass ausschließlich heimische Algen im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, wurden die verwendeten Mikroalgen vorab aus dem Fluss Leine im Raum Hannover isoliert und genotypisch bestimmt. Insgesamt wurden acht Mikroalgen identifiziert (*Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Klebsormidium* sp., *Pedinomonas* sp., *Coccomyxa* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp.).

Unterschiede in der Zusammensetzung und Zelldichte der Mikroalgenpopulation in der Leine im Raum Hannover konnten in Abhängigkeit von der Jahreszeit aufgezeigt werden. Zwei Mikroalgen wurden unabhängig der klimatischen Bedingungen in hoher Zelldichte identifiziert (*Chlorella* sp. und *Parachlorella* sp.).

Die Möglichkeit eines ganzjährigen Einsatzes wurde in einer Teilstudie zur Auswirkung klimatischer Effekte analysiert. Es konnten klimatische Effekte auf das Wachstum, die Pigmente und Produkte der Photosynthese sowie die Energieverwertung dokumentiert werden (siehe Abschnitt 5.1).

### **(ii) CBZ-Konzentration im Untersuchungsgebiet**

Die Konzentrationen von CBZ sowie gebildeter Metabolite wurden im Untersuchungsgebiet an drei Standorten gemessen ((1) Dornröschenbrücke in Linden-Nord, oberhalb des Klärwerks Herrenhausen, (2) in der Nähe der Einleitstelle des Klärwerks und (3) 3 km unterhalb des Klärwerks), um die Selbstreinigungskapazität des Flusses abbilden zu können. Die Selbstreinigungskapazität umfasst dabei die metabolische Aktivität aquatischer Organismen sowie photochemische Abbauprozesse.

Gemessene CBZ-Konzentrationen lagen im Sommer zwischen 0,08 und 0,11  $\mu\text{g L}^{-1}$  und im Winter zwischen 0,07 und 0,14  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Die CBZ-Belastung in der Leine war unabhängig der klimatischen Bedingungen gleich, allerdings wurde im Winter eine durchschnittlich höhere Konzentration gebildeter Metaboliten gemessen (Abschnitt 5.2).

### **(iii) CBZ-Einfluss auf den Photosyntheseapparat**

Der CBZ-Einfluss wurde auf den Photosyntheseapparat der Mikroalgenpezies *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp., *Ignatius* sp., *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. in der gesamten CBZ-Konzentrationsmessreihe von 0 bis 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  untersucht.

Für die Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp. wurden ein CBZ-induzierter wachstumsstimulierender Effekt dokumentiert. Dieser Effekt ging in einigen Kulturen mit einer Stimulierung der photosynthetischen Leistung einher (*Chlorella* sp., *Neochloris* sp. und *Ignatius* sp.).

In Kulturen von *Pedinomonas* sp. und *Coccomyxa* sp. bewirkte CBZ hingegen eine Wachstumseinschränkung sowie eine Hemmung des Photosyntheseapparats. Eine Hemmung der photosynthetischen Leistung wurde trotz Wachstumsstimulierung auch in Kulturen von *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. beobachtet.

In Abhängigkeit von der Mikroalgenspezies sowie Kultivierungsdauer wurden unterschiedliche CBZ-induzierte Effekte dokumentiert, anhand derer das Angriffsziel von CBZ jedoch noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte (Abschnitt 5.3).

#### **(iv) Schutzmechanismen gegen CBZ-induzierte ROS-Bildung**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass CBZ oxidativen Stress auslöst.

In Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration sowie der Algenspezies konnte die Induktion unterschiedlicher antioxidativer Schutzstrategien gemessen werden. So wurde sowohl ein verstärktes Glutathion-Schutzsystem als auch eine Aktivierung enzymatischer ROS-Entgiftungsstrategien über SOD bzw. CAT detektiert.

Als Folge des oxidativen Stresses ist die Peroxidation von Lipiden beschrieben. Die Lipidperoxidation kann daher als Biomarker für das Risiko von Zellschäden gewertet werden. Eine erhöhte Lipidperoxidation, bedingt durch oxidativen Stress, wurde in Kulturen von *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Ignatius* sp. und *Coccomyxa* sp. unter Einfluss von 0 bis 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  CBZ gemessen. Parallel wurde häufig ein erhöhtes antioxidatives Schutzsystem gemessen. Für die Mikroalgen *Neochloris* sp. und *Pedinomonas* sp. wurde aufgrund eines verstärkten Systems zur Entgiftung von ROS ein verringerter MDA-Gehalt gemessen (Abschnitt 5.4).

#### **(v) Strategien der CBZ-Metabolisierung**

Unterschiedliche CBZ-Metabolisierungsstrategien wurden in Abhängigkeit von der Mikroalgenspezies identifiziert. In der umweltrelevanten CBZ-Konzentration von 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  konnten zwei Mikroalgen mit erhöhter CYP- und GST-Aktivität identifiziert werden (*Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp.). Für die Mikroalge *Pedinomonas* sp. wurde eine GST-Aktivität der Phase II dokumentiert. Für die Mikroalgen *Parachlorella* sp. und *Coccomyxa* sp. wurde ausschließlich eine CYP-Aktivität gemessen (Abschnitt 5.5).

#### **(vi) CBZ-Metabolisierungskapazität**

Die Mikroalgen *Chlorella* sp., *Parachlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurden aufgrund ihrer CBZ-Metabolisierungsstrategien sowie ihrer hohen Stresstoleranz, aufgezeigt durch die verstärkte Zellteilung, auf ihre CBZ-Metabolisierungskapazität hinsichtlich der CBZ-Reduktion und Bildung toxischer Metabolite untersucht (Abschnitt 5.7). Eingesetzt wurden antikörperbasierte sowie chromatographische Nachweismethoden.

Eine erhöhte Kapazität, um CBZ aus dem Kulturmedium zu entfernen, konnte für alle Algen unter simulierten Sommerbedingungen bestätigt werden. Die höchste CBZ-Reduktion wurde in Kulturen von *Parachlorella* sp. erzielt (-44,7 %). In Kulturen von *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurde die CBZ-Konzentration um 15,4 % bzw.

23,1 % reduziert. In allen Kulturen konnte eine CBZ-Metabolisierung über das toxische Metabolit CBZ 10,11-epoxid zu dem nicht mehr wirksamen Metabolit CBZ-diol nachgewiesen werden.

In vorherigen Untersuchungen zeigten Kulturen von *Parachlorella* sp., dass als Stressantwort vorwiegend der Metabolismus von CBZ aktiviert wird. Diese Beobachtung wird dadurch bestätigt, dass in Überständen von *Parachlorella* sp. die höchsten CBZ-Metabolitgehalte gefunden wurden. In Kulturen von *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. wurden zusätzlich Transportsysteme (Konjugatbildung) aktiviert. Diese beiden Spezies schützen sich also indem sie gebildete Metabolite kompartmentieren. Konjugierte und kompartmentierte Metabolite wurden in den untersuchten Fraktionen der Mikroalgen mit der eingesetzten Messmethode nicht erfasst. Eine Steigerung der CBZ-Metabolisierung durch eine Co-Kultivierung mit Bakterien konnte im Rahmen dieser Studie nicht aufgezeigt werden.

Aufgrund der erzielten CBZ-Reduktion unter Sommerbedingungen, wurde die Metabolisierungskapazität der Mikroalge *Parachlorella* sp. ebenfalls unter definierten Winterbedingungen geprüft. Erzielt wurde eine CBZ-Gesamtreduktion von 5,1 %. Zudem konnte eine saisonal-unabhängige Entgiftungsstrategie dokumentiert werden.

## 8 Schlussfolgerung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, den Eintrag von CBZ in die aquatische Umwelt zu minimieren.

Untersuchungen zu biochemischen und physiologischen Grundlagen zeigten, dass abhängig von der Mikroalgenart unterschiedliche Strategien zur Kompensation oxidativen Stresses aktiviert wurden. Zudem konnte erstmalig eine CBZ-Metabolisierung in den getesteten Mikroalgen bestätigt werden.

Die erzielte CBZ-Reduktion mit der Mikroalge *Parachlorella* sp. lag unter Sommerbedingungen bei 44,7 %. Die definierte CBZ-Ausgangskonzentration von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ konnte somit auf  $0,55 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ reduziert werden. Die für CBZ ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen liegen bei  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (PNEC) bzw.  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ (UQN-Vorschlag) (Ferrari *et al.* 2003; NLWKN 2013)).

Ausschließlich durch den Einsatz der Mikroalge *Parachlorella* sp. unter den in dieser Arbeit aufgezeigten Kultivierungsbedingungen kann die CBZ-Belastung nicht unter die Schwellenkonzentrationen gesenkt werden. Zur Steigerung der saisonal-unabhängigen CBZ-Metabolisierung sowie der Reduzierung gebildeter Metabolite sind weitere Detailuntersuchungen notwendig.

Rechtlich wird die CBZ-Belastung im gewählten Untersuchungsgebiet der Leine von  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  CBZ nicht als Umweltgefährdung gewertet, dennoch konnte anhand der gemessenen Effekte im Rahmen dieser Arbeit ein eindeutiger Handlungsbedarf für die Konzeptentwicklung einer effizienten CBZ-Entfernungsmethode aufgezeigt werden. Die erzielten Ergebnisse können als Grundlage weiterführender Studien dienen, um ein mikroalgenbasiertes Konzept zu entwickeln.

## 9 Ausblick

Im Hinblick auf einen Einsatz von Mikroalgen in CBZ-Bioremediationsprozessen sind weiterführende Forschungsarbeiten zur Unterschreitung der für CBZ ermittelten Unbedenklichkeitskonzentrationen in deutschen Oberflächengewässern notwendig.

### (i) Lösungsansätze zur Steigerung der CBZ-Reduktion

In weiteren Forschungsarbeiten sollte die Steigerung der CBZ-Reduktion mit der Mikroalge *Parachlorella* sp. im Vordergrund stehen, um einen Einsatz in der CBZ-Bioremediation gewährleisten zu können. Eine Metabolitbildung muss hierbei ebenfalls in Betracht gezogen werden.

#### Untersuchung weiterer Kultivierungsbedingungen

Die Versuche zur Untersuchung der CBZ-Metabolisierungskapazität wurden mit  $2 \cdot 10^7$  Zellen mL<sup>-1</sup> (Sommerbedingungen) bzw.  $3,3 \cdot 10^7$  Zellen mL<sup>-1</sup> (Winterbedingungen) gestartet. Weitere Versuche mit höheren Zelldichten sind zu empfehlen, um eine mögliche Steigerung der CBZ-Reduktion zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CBZ-Metabolisierung nach einer Kultivierungszeit von vier Wochen analysiert. Da es in Kulturen von *Parachlorella* sp. zu keiner Wachstumshemmung kam, ist eine Verlängerung der Kultivierungszeit möglich. Auch sind Messungen in kürzeren Abständen notwendig, um die Metabolisierungskapazität der Alge über den gesamten Kultivierungszeitraum abbilden zu können. Zudem sollten mögliche Veränderungen der Metabolisierungskapazität in Abhängigkeit von der CBZ-Konzentration in weitere Untersuchungen einfließen.

Weitere Kultivierungsbedingungen (Zelldichte, Kultivierungsdauer, Temperatur etc.) sollten insbesondere für den Einsatz der Mikroalge unter kalten Bedingungen für eine Optimierung der CBZ-Reduktion getestet werden, um einen ganzjährigen Einsatz in der CBZ-Bioremediation gewährleisten zu können.

#### Mono- und Mischkultur

Neben dem Einsatz als Monokultur wäre darüber hinaus der Einsatz von Mischkulturen zur Erhöhung der Entfernungskapazität interessant. In mehreren Studien wurde bislang der Einsatz von Monokulturen zur Abwasserreinigung untersucht (Ogbonna *et al.* 2000). Die Datengrundlage für Mischkulturen ist hingegen gering (Gantar *et al.* 1991) und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

Beim Einsatz von Mischkulturen müssen vorab weitere Mikroalgenpezies auf biochemische und physiologische CBZ-Effekte untersucht werden. Für detailliertere Aussagen zu

CBZ-induzierten Effekten werden weitere Analysen, aufbauend auf den in dieser Arbeit untersuchten Messparametern, empfohlen.

#### Co-Kultivierung mit Bakterien

Untersucht wurde eine Co-Kultivierung der Mikroalgen mit Bakterien zur Stärkung des Mikroalgenwachstums (Mouget *et al.* 1995) und der CBZ-Metabolisierung. In dieser Arbeit konnte mit der Co-Kultivierung von Bakterien keine signifikante Steigerung der CBZ-Metabolisierung erzielt werden. Allerdings bietet eine Co-Kultivierung den Mehrwert der zusätzlichen Phosphat- und Stickstoffentfernung und ist daher ein vielversprechender Ansatz zur weiterführenden Abwasserreinigung. Besonders der häufig beschriebene wachstumsstimulierende Effekt der Co-Kultivierung ist insbesondere im Hinblick auf das reduzierte Wachstum bei niedrigen Temperaturen und folglich dem ganzjährigen Einsatz der Mikroalgen in der Bioremediation ein wichtiger Aspekt. Dazu wird weiterer Forschungsbedarf in der Arbeit von Orth (2016) aufgezeigt.

#### **(ii) Ausweitung des Untersuchungsschwerpunkts auf weitere Arzneistoffe**

Untersucht wurde CBZ als Modellsubstanz persistenter Verbindungen der Arzneistoffgruppe Antiepileptika. Im kommunalen Abwasser ist die Belastung mit Arzneistoffgemischen sehr hoch. Daher sollten weitere persistente Verbindungen der Arzneistoffgruppen (Lipidsenker, Antibiotika, Röntgenkontrastmittel etc.) über Modellsubstanzen auf ihre mikroalgenbasierte Entfernung getestet sowie synergistische Wirkungseffekte verschiedener Arzneistoffe auf die Mikroalgen untersucht werden. Wie Matamoros *et al.* (2016) in ihrer Studie zeigten, konnte bei zeitgleicher Kultivierung mehrerer Arzneistoffe keine signifikante CBZ-Reduktion erzielt werden. Inwieweit die Arzneistoffmischung einen Einfluss auf die mikroalgenbasierte CBZ-Reduktion hatte, gilt es in weiteren Studien zu überprüfen.

#### **(iii) Anwendungsgebiete für den Einsatz biologischer Filter**

Aufbauend auf der Arzneistoff-Gesetzesgrundlage (siehe Abschnitt 2.1.4), ist die Reduktion des Arzneistoffeintrages an der Quelle sowie bei Einleitung in die Vorfluter von großer Bedeutung.

Vorgeschlagen wird der Einsatz von Mikroalgen zur Behandlung von Teilabwasserströmen, um eine effektive Reinigungsleistung erzielen und den Eintrag der Schadstoffe in die aquatische Umwelt minimieren zu können. Die separate Behandlung belasteter Abwasserströme ist insbesondere vor dem Hintergrund der hohen Arzneistoffkonzentrationen als vorteilhaft einzustufen (Zhang *et al.* 2008). Eine Erhöhung der Verweildauer zur Steigerung der CBZ-Metabolisierungskapazität sollte hierbei ebenfalls getestet wer-

den. Dies kann an Teilabwasserströmen leichter realisiert werden als in einer zentralen Anlage. Im Folgenden werden mögliche Anwendungsgebiete aufgezeigt.

(i) Behandlung belasteter Abwasserströme direkt an der Quelle

Die Behandlung belasteter Abwasserströme am Entstehungsort ist beim Eintrag hoher Stofffrachten entscheidend. Auf diesem Weg kann die hohe Belastung mit Arzneistoffen in Teilabwasserströmen und somit der Eintrag in die aquatische Umwelt drastisch reduziert werden (Bergmann 2011). Denkbar wäre der gezielte Einsatz in Krankenhausabläufen (Boxall 2004) oder anderen Abläufen, die mit Arzneistoffen belastet sind (Pflegeheime etc.). Im Raum Hannover sind die Krankenhäuser und Pflegeheime als Indirekteinleiter an das öffentliche Abwassernetz angeschlossen. Durch vorgeschaltete Behandlungsstufen können die Belastung des kommunalen Abwassers sowie erwartete Effekte auf den Kläranlagenprozess minimiert werden (Heidtmann 2016). Bei der Umsetzung vorgeschalteter Reinigungsstufen für Krankenhausabflüsse ist die räumliche Situation allerdings ein entscheidender Faktor. Der Platzmangel im Stadtgebiet steht daher einer Umsetzung oft kritisch gegenüber (Bergmann 2011).

(ii) Einsatz bei getrennter Erfassung von Urin und Fäkalien in Haushalten

Der Eintrag der pharmazeutischen Produkte bzw. gebildeter Abbauprodukte erfolgt hauptsächlich über die Urinausscheidung (siehe Abbildung 2.4). Daher ist eine separate Urinbehandlung ebenfalls eine gute Alternative, um den Arzneistoffeintrag in die Umwelt zu reduzieren (Escher *et al.* 2006).

Eine Trennung beider Abwasserströme hat den Vorteil einer gezielteren Behandlung. Folglich würde es zur Bildung hoch belasteter Teilabwasserströme kommen, da eine Verdünnung durch anderes Wasser wegfiel. Eine separate Behandlung der hochbelasteten Abwasserströme würde das Problem des Eintrages drastisch verringern. Allerdings steht der erhöhte technische und finanzielle Aufwand der Umsetzung entgegen. Erste Forschungsschritte auf diesem Gebiet der getrennten Erfassung von Urin und Fäkalien wurden in Pilotprojekten von Peter-Fröhlich *et al.* (2004) realisiert.

(iii) Reinigung in Rezirkulationsprozessen

Wie in dieser Studie aufgezeigt wurde, ist die Reinigungsleistung entscheidend von der Verweildauer abhängig. Durch eine Rezirkulation von Teilabwasserströmen durch verschiedene Behandlungsstufen, die auf Mikroalgen basieren, ist eine effizientere und effektivere Reinigung hinsichtlich CBZ sowie gebildeter Metabolite möglicherweise in kürzerer Zeit erzielbar (de-Bashan *et al.* 2002). Der Anwendungsbereich der Rezirkulati-



onsprozesse scheint sehr vielversprechend und sollte in weiteren Studien überprüft werden.

(iv) Reinigung kommunaler Kläranlagenabläufe

Der Einsatz biologischer Filter im Ablauf von Kläranlagen ist kritisch zu werten. Bedingt durch das hohe Wasseraufkommen und der damit verbundenen Verdünnungseffekte, wird die Einsatzmöglichkeit der Mikroalgen erschwert. Über die Führung des Abwasser-netzes als Trennkanalisation können Verdünnungseffekte verringert werden. Zur Einhaltung der benötigten Verweildauern für die Arzneistoffentfernung müsste das gesamte Wasservolumen jedoch zwischengespeichert werden. Die hohen Abwasserströme pro Tag ( $65.000 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ ) im kommunalen Klärwerk Herrenhausen (Stadtentwässerung Hannover 2014) eignen sich somit nicht für einen mehrtägigen Rückhalt. Möglichkeiten einer vierten Reinigungsstufe in kommunalen Kläranlagen müssen vor Ort geprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass ein Konzept zur Verbesserung der Wasserqualität in Oberflächengewässern hinsichtlich persistenter Verbindungen wie CBZ nach europäischer Richtlinie 2013/39/EU entwickelt werden sollte.

Eine CBZ-Reduktion durch die Mikroalge *Parachlorella* sp. konnte aufgezeigt werden. Der Einsatz mikroalgenbasierter Systeme ist vielversprechend, bedarf allerdings weiterer Forschung, um eine effektive Reduktion von CBZ sowie gebildeter Metabolite gewährleisten zu können.

## Literaturverzeichnis

- Abrash, H.I., Shih, D., Elias, W., Malekmehr, F. (1989) A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*. 2:465–476.
- Adams, W.W., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A.S., Barker, D.H. (1995) 'Photoinhibition' During Winter Stress: Involvement of Sustained Xanthophyll Cycle-Dependent Energy Dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22(2):261.
- Ahmed, H., Schott, E.J., Gauthier, J.D., Vasta, G.R. (2003) Superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Analytical Biochemistry*. 318(1):132–141.
- Aitchison, S.J., Arnett, J., Murray, K.R., Zhang, J. (2000) Removal of aquaculture therapeutants by carbon adsorption: 1. Equilibrium adsorption behaviour of single components. *Aquaculture*. 183(3–4):269–284.
- Aksu, Z. und Tunç, Ö. (2005) Application of biosorption for penicillin G removal: comparison with activated carbon. *Process Biochemistry*. 40(2):831–847.
- Aksu, Z. und Yener, J. (1998) Investigation of the biosorption of phenol and monochlorinated phenols on the dried activated sludge. *Process Biochemistry*. 33(6):649–655.
- Algae Enterprises (2016) Advanced Algae Bioremediation System. <http://www.algaeenterprises.com/wastewater-treatment>. Zuletzt geprüft am 27.06.2016.
- Allen, D.J. und Ort, D.R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*. 6(1):36–42.
- Ambrosio, A.F., Silva, A.P., Malva, J.O., Soares-da-Silva, P., Carvalho, A.P. *et al.* (2001) Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. *Biochemical Pharmacology*. 61(10):1271–1275.
- Ambrosio, A.F., Soares-Da-Silva, P., Carvalho, C.M., Carvalho, A.P. (2002) Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochemical research*. 27(1-2):121–130.
- AMG (2005) Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz). Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz.
- Anderson, J.M., Waldron, J.C., Thorne, S.W. (1978) Chlorophyll—protein complexes of spinach and barley thylakoids: Spectral characterization of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. *FEBS Letters*. 92(2):227–233.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, A. (2002) Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*. 36(11):2869–2877.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*. 50(10):1319–1330.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial Metabolism of Reactive oxygen species. *Biochemistry*. 70(2):200–214.
- Anonym (2015) Action! - Das Aktionspotential. <http://online-media.uni-marburg.de/biologie/tierphysiologie/nerven/HTML-Dokumente/aktionspotential.htm>. Zuletzt geprüft am 18.09.2015.
- Apel, K. und Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55(1):373–399.
- Armond, P.A., Björkman, O., Staehelin, L. (1980) Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 601(3):433–442.
- Armstrong, J.L., Shigeno, D.S., Calomiris, J.J., Seidler, R.J. (1981) Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 42(2):277–283.

- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82(10):1227–1238.
- Arunakumara, K. und Zhang, X. (2008) Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University of China*. 7(1):60–64.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85(2):235–241.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H. *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*. 25(1):25–29.
- Ashraf, M. und Foolad, M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59(2):206–216.
- Astorg, P., Gradelet, S., Leclerc, J., Siess, M.H. (1997) Effects of provitamin A or non-provitamin A carotenoids on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in mice. *Nutrition and Cancer*. 27(3):245–249.
- Baccouch, S., Chaoui, A., Ferjani, E.E. (1998) Nickel toxicity: Effects on growth and metabolism of maize. *Journal of Plant Nutrition*. 21(3):577–588.
- Bahlmann, A. (2012) Entwicklung und Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) für die Quantifizierung von Carbamazepin in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin. Berlin.
- Bahlmann, A., Falkenhagen, J., Weller, M.G., Panne, U., Schneider, R.J. (2011) Cetirizine as pH-dependent cross-reactant in a carbamazepine-specific immunoassay. *The Analyst*. 136(7):1357–1364.
- Baron, P.A., Love, D.C., Nachman, K.E. (2014) Pharmaceuticals and personal care products in chicken meat and other food animal products: a market-basket pilot study. *The Science of the Total Environment*. 490(1):296–300.
- Bashan, Y. und Holguin, G. (1997) Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 43:103–121.
- Beier, S., Köster, S., Veltmann, K., Schröder, H., Pinnekamp, J. (2010) Treatment of hospital wastewater effluent by nanofiltration and reverse osmosis. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 61(7):1691–1698.
- Benoit, P., Barriuso, E., Calvet, R. (1998) Biosorption characterization of herbicides, 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium. *Chemosphere*. 37(7):1271–1282.
- Bergmann, A. (2011) Organische Spurenstoffe im Wasserkreislauf. *acatech Materialien - Nr. 12. Diskussionspapier für die acatech Projektgruppe „Georessource Wasser – Herausforderung Globaler Wandel“*. Deutsche Akademie der Technikwissenschaften (acatech).
- Bergmann, A., Fohrmann, R., Weber, F.-A. (2011) Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Umweltbundesamt.
- Bernus, I., Hooper, W.D., Dickinson, R.G., Eadie, M.J. (1995) Metabolism of carbamazepine and co-administered anticonvulsants during pregnancy. *Epilepsy Research*. 21(1):65–75.
- Bhunja, A.K., Basu, N.K., Roy, D., Chakrabarti, A., Banerjee, S.K. (1991) Growth, chlorophyll a content, nitrogen-fixing ability, and certain metabolic activities of *Nostoc muscorum*: Effect of methylparathion and benthocarb. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 47(1):43–50.
- Bidlack, W.R., Okita, R.T., Hochstein, R. (1973) The role of NADPH-cytochrome b5 reductase in microsomal lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical research communications*. 53(2):459-465.
- Bilger, W. und Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*. 25(3):173–185.
- Blake-Kalff, M., Randall, R.A., Coleman, J. (1997) Compartmentation of detoxified xenobiotics in plant cells. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;245–259.

- Blokhina, O. und Fagerstedt, K.V. (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*. 138(4):447–462.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P. (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1465(1–2):140–151.
- Blumwald, E., Wolosin, J.M., Packer, L. (1984) Na<sup>+</sup>/H exchange in the cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 122(1):452–459.
- BMLFUW (2015) Richtlinien betreffend Oberflächengewässerqualität (2008/105/EG, 2006/11/EG, 76/464/EWG, 2013/39/EU). [https://www.bmlfuw.gv.at/wasser/wasser-eu-international/eu\\_wasserrecht/OFG-Qualitaet-RL.html](https://www.bmlfuw.gv.at/wasser/wasser-eu-international/eu_wasserrecht/OFG-Qualitaet-RL.html). Zuletzt geprüft am 03.04.2016.
- Bölter, B. und Soll, J. (2001) Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *The EMBO Journal*. 20(5):935–940.
- Bommaiyaamy, V. (2014) Investigation on carbamazepine mitigation by micro algae species native to the river leine - potential involvement of cytochrom P450 and glutathion-S transferase. Masterarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität. Hannover.
- Borghi, E., Sciota, R., Biassoni, C., Cirasola, D., Cappelletti, L. *et al.* (2011) Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates? *Journal of Medical Microbiology*. 60(5):689–690.
- Bourgeois, B.F. und Wad, N. (1984) Individual and combined antiepileptic and neurotoxic activity of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 231(2):411–415.
- Boxall, A.B. (2004) The environmental side effects of medication. How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? *EMBO Reports*. 5(12):1110–1116.
- Braams, S. (2015) Untersuchung der physiologischen Zellantwort unterschiedlicher Mikroalgen auf den Arzneistoff Carbamazepin. Masterarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität. Hannover.
- Braeutigam, P., Franke, M., Schneider, R.J., Lehmann, A., Stolle, A. *et al.* (2012) Degradation of carbamazepine in environmentally relevant concentrations in water by Hydrodynamic-Acoustic-Cavitation (HAC). *Water Research*. 46(7):2469–2477.
- Bratt, C.E., Arvidsson, P.O., Carlsson, M., Akerlund, H.E. (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynthesis Research*. 45(2):169–175.
- Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Daneshvar, B., Jakobsen, J. (2000) Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Letters*. 154(2):201–210.
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A. (1982) Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science*. 13(5):495–504.
- Brown, M.R. (1995) Effects of storage and processing on the ascorbic acid content of concentrates prepared from *Chaetoceros calcitrans*. *Journal of Applied Phycology*. 7(5):495–500.
- Brown, M.R. und Jeffrey, S.W. (1995) The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture. *Journal of Applied Phycology*. 7(6):521–527.
- Bruce, G.M., Pleus, R.C., Snyder, S.A. (2010) Toxicological relevance of pharmaceuticals in drinking water. *Environmental Science and Technology*. 44(14):5619–5626.
- Bu, H.-Z., Zhao, P., Dalvie, D.K., Pool, W.F. (2007) Identification of primary and sequential bioactivation pathways of carbamazepine in human liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*. 21(20):3317–3322.
- Buczynski, B. (2013) Toilet Power? Aqualia Grows Biofuel Algae In Wastewater. <http://earthtechling.com/2013/08/toilet-power-aqualia-grows-biofuel-algae-in-wastewater/>. Zuletzt geprüft am 27.06.2016.
- Burken, J.G. und Schnoor, J.L. (1998) Predictive Relationships for Uptake of Organic Contaminants by Hybrid Poplar Trees. *Environmental Science and Technology*. 32(21):3379–3385.

- Byrne, R.S., Hänsch, R., Mendel, R.R., Hille, R. (2009) Oxidative half-reaction of arabidopsis thaliana sulfite oxidase: generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 284(51):35479–35484.
- Calabrese, E.J. und Baldwin, L.A. (2003) Toxicology rethinks its central belief. Hormesis demands a reappraisal of the way risks are assessed. *Nature*. 421(6924):691–692.
- Calisto, V., Domingues, M Rosário M, Erny, G.L., Esteves, V.I. (2011) Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Research*. 45(3):1095–1104.
- Carter, L.J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J.J., Kookana, R.S. *et al.* (2014) Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(4):816–825.
- Carvalho, A.M., Neto, Ana M P, Tonon, A.P., Pinto, E., Cardozo, K.H.M. *et al.* (2004) Circadian Protection against Oxidative Stress in Marine Algae. *Hypnos*. 1(1):142–157.
- Carvalho, P.N., Basto, M Clara P, Almeida, C Marisa R, Brix, H. (2014) A review of plant-pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research International*. 21(20):11729–11763.
- Casey, T. (2013) Voilà! US Algae Company turns sewage into biofuel, in France. Zuletzt geprüft am 26.06.2016.
- Chevalier, P. und de la Nolle, J. (1985) Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters*. 7(6).
- Choi, K.-M. und Lee, M.-Y. (2012) Effect of freezing stress on the proteome expression of Antarctic green microalga. *Molecular and Cellular Toxicology*. 8(2):163–169.
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N. (2004) Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research*. 38(4):947–954.
- Clevers, M. (2002) Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. 14(2):85–89.
- Clevers, M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 142(3):185–194.
- Clijsters, H. und van Assche, F. (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*. 7(1):31–40.
- Cobbett, C. und Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 53:159–182.
- Cogdell, R.J. und Frank, H.A. (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*. 895(2):63–79.
- Cole, D.J. (1994) Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science*. 42(3):209–222.
- Cole, D.J., Cummins, I., Hatton, P.J., Dixon, D., Edwards, R. (1997) Glutathione transferases in crops and major weeds. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;139–154.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., Davies, E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*. 2(4):144–151.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W. *et al.* (2011) Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*. 105(3-4):428–437.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnoute, M., Zimmermann, S., Véry, A.-A., Fizames, C. *et al.* (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 67(15):2511–2532.
- Correa-Reyes, G., Viana, M.T., Marquez-Rocha, F.J., Licea, A.F., Ponce, E. *et al.* (2007) Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. *Chemosphere*. 68(4):662–670.

- Coupland, D. (1991) The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. In: Caseley J.C., Cussans G.W., Atkin R.K. (ed) *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*, John Wiley, New York;263–278.
- Courtney, K.R. und Etter, E.F. (1983) Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. *European Journal of Pharmacology*. 88(1):1–9.
- Crane, M., Watts, C., Boucard, T. (2006) Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *The Science of the Total Environment*. 367(1):23–41.
- Cunningham, V.L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N. *et al.* (2006) Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps. *Environmental Science and Technology*. 40(11):3456–3462.
- Dall'Osto, L., Holt, N.E., Kaligotla, S., Fuciman, M., Cazzaniga, S. *et al.* (2012) Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(50):41820–41834.
- Daughney, C.J. und Fein, J.B. (1998) Sorption of 2,4,6-Trichlorophenol by *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Technology*. 32(6):749–752.
- Daughton, C.G. und Ternes, T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*. 107( 6):907–938.
- Davenport, R. (2002) Glutamate Receptors in Plants. *Annals of Botany*. 90(5):549–557.
- De Filippis, L. F. und Pallaghy, C.K. (1976) The Effect of Sub-Lethal Concentrations of Mercury and Zinc on *Chlorella*: II. Photosynthesis and Pigment Composition. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 78(4):314–322.
- de-Bashan, L.E. und Bashan, Y. (2010) Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*. 101(6):1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernandez, J.-P., Bashan, Y. (2002) Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36(12):2941–2948.
- del Campo, E. M., del Hoyo, A., Royo, C., Casano, L.M., Alvarez, R. *et al.* (2010) A single primer pair gives a specific ortholog amplicon in a wide range of Cyanobacteria and plastid-bearing organisms: applicability in inventory of reference material from collections and phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57(3):1323–1328.
- del Río, L. A., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Pastori, G.M. *et al.* (1996) Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*. 24:434–438.
- del Río, L. A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*. 141(2):330–335.
- DeLorenzo, M.E. und Fleming, J. (2008) Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 54(2):203–210.
- Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., Czygan, F.C. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiology*. 84(2):218–224.
- Deng, J., Shao, Y., Gao, N., Xia, S., Tan, C. *et al.* (2013) Degradation of the antiepileptic drug carbamazepine upon different UV-based advanced oxidation processes in water. *Chemical Engineering Journal*. 222:150–158.
- Dias, M.C., Figueiredo, P., Duarte, I.F., Gil, A.M., Santos, C. (2014) Different responses of young and expanded lettuce leaves to fungicide Mancozeb: chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation, pigments and proline content. *Photosynthetica*. 52(1):148–151.
- Dong, M.M., Trenholm, R., Rosario-Ortiz, F.L. (2015) Photochemical degradation of atenolol, carbamazepine, meprobamate, phenytoin and primidone in wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 282:216–223.
- Donner, E., Kosjek, T., Qualmann, S., Kusk, K.O., Heath, E. *et al.* (2013) Ecotoxicity of carbamazepine and its UV photolysis transformation products. *The Science of the Total Environment*. 443:870–876.

- Drewes, J.E., Heberer, T., Reddersen, K. (2002) Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse. *Water Science and Technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 46(3):73–80.
- DrugBank (2016) Carbamazepine. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00564>. Zuletzt geprüft am 30.04.2016.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3):350–356.
- Durst, F., Benveniste, I., Lesot, A., Salaün, J.-P., Werck-Reichhart, D. (1997) Induction of plant cytochrome P450. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;19–34.
- Dutta, M., Dutta, N.N., Bhattacharya, K.G. (1999) Aqueous phase adsorption of certain beta-lactam antibiotics onto polymeric resins and activated carbon. *Separation and Purification Technology*. 16(3):213–224.
- EDQM und Europarat (2013) Carbamazepine Safety Data Sheet.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*. 180(2):278–284.
- Elenkov, I., Stefanov, K., Dimitrova-Konaklieva, S., Popov, S. (1996) Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. *Phytochemistry*. 42(1):39–44.
- El-Sayed, A.B. und Abdel-Maguid, A.A. (2010) Immobilized-microalga *Scenedesmus* sp. for Biological Desalination of Red Sea Water: II. Effect on Macronutrients Removal. *Journal of American Science*. 6(9):637–643.
- EMA (2006) Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Committee for medicinal products for human use (CHMP).
- EPSAG (2014) Experimental Phycology and Culture Collection of Algae. <http://www.uni-goettingen.de/en/culture-media/186262.html>. Zuletzt geprüft am 25.11.2014.
- Ernst, V., Levin, D.H., London, I.M. (1978) Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione: activation of a protein kinase that phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75(9):4110–4114.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Eggen, Rik I. L., Richter, M. (2005) In Vitro Assessment of Modes of Toxic Action of Pharmaceuticals in Aquatic Life. *Environmental Science and Technology*. 39(9):3090–3100.
- Escher, B.I., Pronk, W., Suter, M.J.-F., Maurer, M. (2006) Monitoring the Removal Efficiency of Pharmaceuticals and Hormones in Different Treatment Processes of Source-Separated Urine with Bioassays. *Environmental Science and Technology*. 40(16):5095–5101.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G. (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum*. 100(2):234–240.
- Europäische Kommission (2013) Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik.
- Fent, K. (2013) Effects of pharmaceuticals on aquatic organisms. In: Kümmerer K. (ed) *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer Berlin Heidelberg;175–203.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxeus, N. *et al.* (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(5):1344–1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J. (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55(3):359–370.
- Forde, B.G. und Roberts, M.R. (2014) Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Reports*. 6(37).
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 92(4):696–717.

- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*. 100(2):241–254.
- Foyer, C.H. und Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 119:355–364.
- Foyer, C.H. und Noctor, G. (2009) Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11(4).
- Frederick, S.E., Gruber, P.J., Tolbert, N.E. (1973) The Occurrence of Glycolate Dehydrogenase and Glycolate Oxidase in Green Plants: An Evolutionary Survey 1. *Plant Physiology*. 52(4):318–323.
- Gallie, D.R. (2013) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*. 64(2):433–443.
- Gantar, M., Obreht, Z., Dalmacija, B. (1991) Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresource Technology*. 36(2):167–171.
- Garbisu, C., Gil, J.M., Bazin, M.J., Hall, D.O., Serra, J.L. (1991) Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *Journal of Applied Phycology*. 3:221–234.
- Gasser, T., Reddington, M., Schubert, P. (1988) Effect of carbamazepine on stimulus-evoked Ca<sup>2+</sup> fluxes in rat hippocampal slices and its interaction with A1-adenosine receptors. *Neuroscience Letters*. 91(2):189–193.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica acta*. 990(1):87–92.
- Gill, S.S. und Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*. 48(12):909–930.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M. *et al.* (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Cell*. 16(4):433–442.
- Gradelet, S., Astorg, P., Pineau, T., Canivenc, M.-C., Siess, M.-H. *et al.* (1997) Ah receptor-dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and  $\beta$ -apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochemical Pharmacology*. 54(2):307–315.
- Green, J.M. (1997) Defining and characterizing synergism and antagonism for xenobiotic mixtures. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;263–274.
- Grenni, P., Patrolecco, L., Ademollo, N., Tolomei, A., Barra Caracciolo, A. (2013) Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem. *Microchemical Journal*. 107:158–164.
- Griffith, O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*. 106(1):207–212.
- Grimme, E. (2006) Abiotischer Stress [zig] in Weizenblättern: Reaktionen im Photosynthese-Apparat in Relation zum Stressmetabolismus. Georg-August-Universität. Göttingen.
- Grinvald, A., Hildesheim, R., Farber, I.C., Anglister, L. (1982) Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential. *Biophysical Journal*. 39(3):301–308.
- Grubbs, F.E. (1969) Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*. 11(1):1–21.
- Grunau, S., Mindthoff, S., Rottensteiner, H., Sormunen, R.T., Hiltunen, J.K. *et al.* (2009) Channel-forming activities of peroxisomal membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS Journal*. 276(6):1698–1708.
- Guengerich, F.P. (2007) Drug Metabolism as Catalyzed by Human Cytochrom P450 Systems. In: Sigel A., Sigel H., Sigel, Roland K. O (ed) *The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins*, John Wiley, Chichester, England;561–589.



- Guidot, D.M., Repine, J.E., Kitlowski, A.D., Flores, S.C., Nelson, S.K. *et al.* (1995) Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. 96(2):1131–1136.
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D. G. Joakim (2008) Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environmental Science and Technology*. 42(15):5807–5813.
- Gunter, T.E. und Pfeiffer, D.R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *The American journal of physiology* 258:755-786.
- Gutteridge, John M. C. und Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 15(4):129–135.
- Haase, S.M., Rath, T., Huchzermeyer, B. (2014) Einfluss pharmazeutischer Substanzen auf *Coccomyxa* sp. am Beispiel von Carbamazepin. *DGG Proceedings*. 4(8).
- Haase, S.M., Grade, S., Huchzermeyer, B. (2015a) Selbstreinigungskraft von Flüssen: Algen als Biofilter. *Technologie-Informationen Klimawandel - Folgen und Maßnahmen*. 3:11.
- Haase, S.M., Panas, P., Rath, T., Huchzermeyer, B. (2015b) Effects of Carbamazepine on Two Microalgae Species Differing in Stress Resistance. *Water, Air, & Soil Pollution*. 226(10) (10.1007/s11270-015-2562-8).
- Haase, S.M., Braams, S., Bommaiysamy, V., Rath, Thomas, Huchzermeyer, Bernhard (2016) Effect of Carbamazepine-induced oxidative stress on Two Microalgae Species and Their Capacity to Detoxify Carbamazepin. *Environmental Science and Pollution Research* (eingereicht).
- Haase, S.M., Orth, N., Lehmann, A., Hoffmann, K., Schneider, R. *et al.* ((in Vorb.)) Self-cleaning capacity of the river Leine towards Carbamazepine (in Vorbereitung).
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974) Gluthatione S-transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 249(22):7130–7139.
- Haghjou, M.M. und Shariati, M. (2007) Photosynthesis and Respiration under Low Temperature Stress in Two *Dunaliella* Strains. *World Applied Sciences Journal*. 2(4):276–282.
- Hai, F.I., Li, X., Price, W.E., Nghiem, L.D. (2011) Removal of carbamazepine and sulfamethoxazole by MBR under anoxic and aerobic conditions. *Bioresource Technology*. 102(22):10386–10390.
- Halliwell, B. (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44(2-4):327–340.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M. (2015) *Free radicals in biology & medicine*. Oxford University Press. Oxford.
- Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Elghmari, A., Timinouni, M. *et al.* (2008) The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39(1):10–15.
- Hänsch, R., Lang, C., Rennenberg, H., Mendel, R.R. (2007) Significance of plant sulfite oxidase. *Plant Biology*. 9(5):589–595.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. (1995) Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*. 7(4):399–406.
- Hatzios, K.K. (1997a) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*. Springer. Niederlande.
- Hatzios, K.K. (1997b) Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants: a brief overview and directions of future research. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;1–5.
- Havaux, M., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PS II antennae. *Plant Physiology*. 145(4):1506–1520.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. *et al.* (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior*. 7(11):1456–1466.

- Heath, R.L. und Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1):189–198.
- Heberer, T. (2002) Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol* 266(3-4):175-189. *Journal of Hydrology*. 266(3-4):175–189.
- Heberer, T., Feldmann, D., Reddersen, K., Altmann, H.-J., Zimmermann, T. (2011) Removal of Pharmaceutical Residues and Other Persistent Organics From Municipal Sewage and Surface Waters Applying Membrane Filtration. *Journal of Contemporary Water Research and Education*. 120(1).
- Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A. (2002) From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology*. 46(3):81–88.
- Hedrich, R. (2012) Ion channels in plants. *Physiological Reviews*. 92(4):1777–1811.
- Heidtmann, F. (2016) Kläranlagen an der Leine. Region Hannover, Fachbereich Umwelt - Gewässerschutz. Persönliche Mitteilung per E-Mail; informiert am 22.04.2016.
- Hess, J.L. und Tolbert, N.E. (1967) Changes in Chlorophyll a/b Ratio and Products of  $^{14}\text{CO}_2$  Fixation by Algae Grown in Blue or Red Light 1. *Plant Physiology*. 42(8):1123–1130.
- Hiltonen, T., Clarke, A.K., Karlsson, J., Samuelsson, G. (1996) A cDNA coding for glutathione S-transferase from the unicellular green algae *Coccomyxa* sp.. *Gene*. 176(1-2):263–264.
- Hu, L., Martin, H.M., Arce-Bulted, O., Sugihara, M.N., Keating, K.A. *et al.* (2009) Oxidation of Carbamazepine by Mn(VII) and Fe(VI): Reaction Kinetics and Mechanism. *Environmental Science and Technology*. 43(2):509–515.
- Hu, P. und Strom, P.F. (1991) Effect of pH on Fungal Growth and Bulking in Laboratory-Activated Sludges. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*. 63(3):276–277.
- Huang, A., Trelease, R.N., Moore, T.S. (1983) *Plant peroxisomes*. Academic Press. New York.
- Huisman, J., Jonker, R.R., Zonneveld, C., Weissing, F.J. (1999) Competition for Light between Phytoplankton Species: Experimental Tests of Mechanistic Theory. *Ecology*. 80(1):211–222.
- Hummel, D., Löffler, D., Fink, G., Ternes, T.A. (2006) Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology*. 40(23):7321–7328.
- Ivanov, A.G., Sane, P., Hurry, V., Krol, M., Sveshnikov, D. *et al.* (2003) Low-temperature modulation of the redox properties of the acceptor side of photosystem II: photoprotection through reaction centre quenching of excess energy. *Physiologia Plantarum*. 119(3):376–383.
- Ivanov, A.G., Sane, P.V., Hurry, V., Oquist, G., Huner, Norman P A (2008) Photosystem II reaction centre quenching: mechanisms and physiological role. *Photosynthesis Research*. 98(1-3):565–574.
- Ivanov, B. und Khorobrykh, S. (2003) Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5(1):43–53.
- Jelic, A., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Perez, S. *et al.* (2012) Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research*. 46(4):955–964.
- Jianlong, W., Yi, Q., Horan, N., Stentiford, E. (2000) Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. *Bioresource Technology*. 75(2):157–161.
- Johnson, M. (2012) Protein Quantitation. *Mater Methods* 2(115).
- Jos, A., Repetto, G., Rios, J.C., Hazen, M.J., Molero, M.L. *et al.* (2003) Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 17(5-6):525–532.
- Jung, D.W., Baysal, K., Brierley, G.P. (1995) The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(2):672–678.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C. *et al.* (2004) Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 136(4):4159–4168.

- Katz, A., Pick, U., Avron, M. (1992) Modulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*. 100(3):1224–1229.
- Kerr, B.M., Thummel, K.E., Wurden, C.J., Klein, S.M., Kroetz, D.L. *et al.* (1994) Human liver carbamazepine metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 47(11):1969–1979.
- Khattar, J., Sarma, T.A., Singh, D.P. (1999) Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 25(7):564–568.
- Khetan, S.K. und Collins, T.J. (2007) Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chemical Reviews*. 107(6):2319–2364.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E. *et al.* (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(21):8897–8901.
- Kim, H.-S., Kim, Y.-S., Hahn, K.-W., Joung, H., Jeon, J.-H. (2009) Reactive Oxygen Species: Regulation of Plant Growth and Development. In: Jacquot J.-P. (ed) *Advances in Botanical Research, Oxidative Stress and Redox Regulation in Plants*, Academic Press, Burlington;25–46.
- Kingston-Smith, A.H., Harbinson, J., Williams, J., Foyer, C.H. (1997) Effect of Chilling on Carbon Assimilation, Enzyme Activation, and Photosynthetic Electron Transport in the Absence of Photoinhibition in Maize Leaves. *Plant Physiology*. 114(3):1039–1046.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N.R., Singh, N. (2011) Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2(4):28–34.
- Koe, X.F., Tengku Muhammad, Tengku Sifzizul, Chong, A.S.-C., Wahab, H.A., Tan, M.L. (2014) Cytochrome P450 induction properties of food and herbal-derived compounds using a novel multiplex RT-qPCR in vitro assay, a drug-food interaction prediction tool. *Food Science & Nutrition*. 2(5):500–520.
- Komor, E. und Tanner, W. (1976) The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*. Evidence for electrogenic sugar transport. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 70(1):197–204.
- Koob, M. und Dekant, W. (1991) Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates. *Chem.-Biol. Interactions*. 77(2):107–136.
- Koschorreck, J. und Knecht, J. de (2004) Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals in the EU — A Regulatory Perspective. In: Kümmerer K. (ed) *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg;289–310.
- Kotrba, R. (2015) State-of-the-Art Algae PBRs. <http://biomassmagazine.com/articles/12173/state-of-the-art-algae-pbrs>. Zuletzt geprüft am 27.06.2016.
- Krasensky, J. und Jonak, C. (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. 63(4):1593–1608.
- Krause, G.H. und Jahns, P. (2010) Non-photochemical Energy Dissipation Determined by Chlorophyll Fluorescence Quenching: Characterization and Function. In: Papageorgiou G.C. und Govindjee (ed) *Chlorophyll a fluorescence*, Springer, Dordrecht;463–495.
- Kreuz, K., Tommasini, R., Martinoia, E. (1996) Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiology*. 111(2):349–353.
- Kronzucker, H.J. und Britto, D.T. (2011) Sodium transport in plants: a critical review. *The New Phytologist*. 189(1):54–81.
- Kruk, J., Holländer-Czytko, H., Oettmeier, W., Trebst, A. (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology*. 162(7):749–757.
- Kümmerer, K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*. 45(6-7):957–969.
- Kümmerer, K. (2003) Significance of antibiotics in the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(1):5–7.

- Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54(2):311–320.
- Kümmerer, K. (2013b) Effects of antibiotics and virustatics in the environment. In: Kümmerer K. (ed) *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer Berlin Heidelberg;223–244.
- Kümmerer, K. (2013a) *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer Berlin Heidelberg.
- Kupfer, D. und Zusman, D.R. (1984) Changes in Cell Surface Hydrophobicity of *Myxococcus xanthus* Are Correlated with Sporulation-Related Events in the Developmental Program. *Journal of Bacteriology*. 159(2):776–779.
- Kura-Hotta, M., Satoh, K., Katoh, S. (1987) relationship between Photosynthesis and Chlorophyll Content during Leaf Senescence of Rice Seedlings. *Plant and Cell Physiology* 28(7):1321–1329.
- Lahaye, M. und Ray, B. (1996) Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta)--NMR analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 283:161–173.
- Lajeunesse, A., Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Gagnon, C., Juneau, P. *et al.* (2009) Determination of carbamazepine in aquatic organisms by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*. 11(4):723–725.
- Lam, M.K. und Lee, K.T. (2012) Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*. 191:263–268.
- Lamoureux, G.L., Rusness, D.G., Schröder, P., Rennenberg, H. (1991) Diphenyl ether herbicide metabolism in a spruce cell suspension culture: The identification of two novel metabolites derived from a glutathione conjugate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 39(3):291–301.
- Landeshauptstadt Hannover (2012) *Gewässergütekarte der Landeshauptstadt Hannover 2012*.
- Lanfer-Marquez, U.M., Barros, R.M., Sinnecker, P. (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*. 38(8-9):885–891.
- Lange, O.L. (2012) *Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation*. Springer Berlin Heidelberg.
- LANUV (2007) *Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie LANUV- Fachbericht 2*. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen.
- Larcher, W. (2003) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- LAWA (2003) *Musterverordnung zur Umsetzung der Anhänge II und V der Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik (Entwurf)*.
- Lawrence, J.R., Swerhone, George D W, Wassenaar, L.I., Neu, T.R. (2005) Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Canadian Journal of Microbiology*. 51(8):655–669.
- Laws, B.V., Dickenson, Eric R V, Johnson, T.A., Snyder, S.A., Drewes, J.E. (2011) Attenuation of contaminants of emerging concern during surface-spreading aquifer recharge. *The Science of the Total Environment*. 409(6):1087–1094.
- Leegood, R.C. und Edwards, G.E. (2006) Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to other environmental factors. In: Baker N.R. (ed) *Photosynthesis and the Environment*, Springer Netherlands;191–221.
- Leenen, Emily J. T. M., Dos Santos, Vítor A. P., Grolle, Katja C. F., Tramper, J., Wijffels, R. (1996) Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research*. 30(12):2985–2996.
- Lehmann, A. (2016) *Detektionsgrenze von CBZ und gebildeter Metabolite im HPLC-MS/MS-Verfahren*. telefonische Mitteilung; informiert 29.04.2016.
- Leineverband (2006) *Modellprojekt: Umsetzung der EG Wasserrahmenrichtlinie im Teilgebiet 18 Leine/Ilme, Zwischenbericht 2005/2006, Projektphase 1*.

- Leineverband (2007) Modellprojekt: Umsetzung der EG Wasserrahmenrichtlinie im Teilgebiet 18 Leine/Ilme, Zwischenbericht 2007, Projektphase II.
- Leineverband (2008) Modellprojekt: Umsetzung der EG-Wasserrahmenrichtlinie im Teilgebiet 18 Leine/Ilme, Zwischenbericht 2008, Projektphase III A.
- Leineverband (2009) Modellprojekt: Umsetzung der EG-Wasserrahmenrichtlinie im Teilgebiet 18 Leine/Ilme, Schlussbericht 2009.
- LfU (2013) Chemikalien in Gewässern. Risikoanalyse - Exposition und Wirkung. [http://www.lfu.bayern.de/analytik\\_stoffe/chemikalien\\_gewaesser/index.htm](http://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/chemikalien_gewaesser/index.htm).
- Li, A., Cai, R., Di Cui, Qiu, T., Pang, C. *et al.* (2013a) Characterization and biodegradation kinetics of a new cold-adapted carbamazepine-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. CBZ-4. *Journal of Environmental Sciences*. 25(11):2281–2290.
- Li, J., Dodgen, L., Ye, Q., Gan, J. (2013b) Degradation kinetics and metabolites of carbamazepine in soil. *Environmental Science and Technology*. 47(8):3678–3684.
- Li, F., Liang, Z., Zheng, X., Zhao, W., Wu, M. *et al.* (2015a) Toxicity of nano-TiO<sub>2</sub> on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology*. 158:1–13.
- Li, X., de Toledo, R. A., Wang, S., Shim, H. (2015b) Removal of carbamazepine and naproxen by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile condition. *New Biotechnology*. 32(2):282–289.
- Lièvreumont, D., Seigle-murandi, F., Benoit-guyod, J.-I. (1998) Removal of PCNB from aqueous solution by a fungal adsorption process. *Water Research*. 32(12):3601–3606.
- Lin, J.H. und Lu, A.Y. (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*. 35(5):361–390.
- Liu, C.-L., Lim, Y.-P., Hu, M.-L. (2012) Fucoxanthin attenuates rifampin-induced cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and multiple drug resistance 1 (MDR1) gene expression through pregnane X receptor (PXR)-mediated pathways in human hepatoma HepG2 and colon adenocarcinoma LS174T cells. *Marine Drugs*. 10(1):242–257.
- Livingstone, D.R. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42(8):656–666.
- López, C., García, María del Carmen Cerón, Fernández, Francisco Gabriel Acién, Bustos, C.S., Chisti, Y. *et al.* (2010) Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*. 101(19):7587–7591.
- López-Huertas, E., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Del Río, L A (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal*. 337(3):531–536.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265–275.
- Lu, W. und Uetrecht, J.P. (2008) Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals* 36(8):1624–1636.
- Lugan, R., Niogret, M.-F., Lepout, L., Guégan, J.-P., Larher, F.R. *et al.* (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*. 64(2):215–229.
- Lürling, M., Sargant, E., Roessink, I. (2006) Life-history consequences for *Daphnia pulex* exposed to pharmaceutical carbamazepine. *Environmental Toxicology*. 21(2):172–180.
- Mackenbrock, U., Vogelsang, R., Barz, W. (1992) Isoflavone and Pterocarpan Malonylglucosides and  $\beta$ -1,3-Glucanase and Chitin-Hydrolases are Vacuolar Constituents in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Zeitschrift für Naturforschung*. 47:815–822.
- Mackey, B.M. (1983) Changes in antibiotic sensitivity and cell surface hydrophobicity in *Escherichia coli* injured by heating, freezing, drying or gamma radiation. *FEMS Microbiology Letters*. 20:395–399.

Madden, T.D., Bally, M.B., Hope, M.J., Cullis, P.R., Schieren, H.P. *et al.* (1985) Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: retention of vesicle contents. *Biochimica et Biophysica acta*. 817(1):67–74.

Mahan, C.A. und Holcombe, J.A. (1992) Immobilization of algae cells on silica gel and their characterization for trace metal preconcentration. *Analytical Chemistry*. 64(17):1933–1939.

Mallick, N. (2002) Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals : an International Journal on the role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. 15(4):377–390.

Marco-Urrea, E., Radjenović, J., Caminal, G., Petrović, M., Vicent, T. *et al.* (2010) Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibrac acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Research*. 44(2):521–532.

Marklund, S. und Marklund, G. (1974) Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47(3):469–474.

Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N. (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*. 364(6434):247–249.

Martinoia, E., Maeshima, M., Neuhaus, H.E. (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 58(1):83–102.

Matamoros, V. und Bayona, J.M. (2006) Elimination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Subsurface Flow Constructed Wetlands. *Environmental Science and Technology*. 40(18):5811–5816.

Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., Bayona, J.M. (2016) Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*. 301:197–205.

Matos, M., Pereira, M.A., Nicolau, A., Rodrigues, A.L., Brito, A.G. *et al.* (2012) Influence of the organic loading rate on the growth of *Galactomyces geotrichum* in activated sludge. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*. 47(4):565–569.

Matthias, W. (2012) Bioverfügbarkeit und toxische Wirkung von ausgewählten Arzneimitteln unter limnischen, Brackwasser und marinen Bedingungen im Algentest. Bachelorarbeit. Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg. Hamburg.

McGonigle, B., Lau, S.-M.C., O'Keefe, D.P. (1997) Endogenous reactions and substrate specificity of herbicide metabolizing enzymes. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;9–18.

Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L. (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*. 71(2):491–499.

Melis, A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photo-damage in vivo? *Trends in Plant Science*. 4(4):130–135.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., van Breusegem, F. *et al.* (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61(15):4197–4220.

Miao, X.-S. und Metcalfe, C.D. (2003) Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 75(15):3731–3738.

Miao, X.-S., Yang, J.-J., Metcalfe, C.D. (2005) Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science and Technology*. 39(19):7469–7475.

Milo, R. (2013) What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 35(12):1050–1055.

- Miura, K. und Furumoto, T. (2013) Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(3):5312–5337.
- Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S., Asada, K. (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology*. 39(8):821–829.
- Mohapatra, P.K. (2006) *Textbook of Environmental Biotechnology*. I.K. International Publishing House Pvt. Limited.
- Moore, T.S. und Beevers, H. (1974) Isolation and Characterization of Organelles from Soybean Suspension Cultures 1. *Plant Physiology*. 53(2):261–265.
- Moreno-Garrido, I. (2008) Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 99(10):3949–3964.
- Morgan-Kiss, R., Ivanov, A.G., Williams, J., Mobashsher Khan, Huner, Norman P. A. (2002) Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and a mesophilic alga. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1561(2):251–265.
- Mouget, J.-L., Dakhama, A., Lavoie, M.C., de la Noüe, Joël (1995) Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiology Ecology*. 18(1):35–43.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*. 125(4):1558–1566.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P.L., Niyogi, K.K. (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology*. 128(3):970–977.
- Muñoz, R. und Guieysse, B. (2006) Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*. 40(15):2799–2815.
- Murchie, E.H. und Horton, P. (1998) Contrasting patterns of photosynthetic acclimation to the light environment are dependent on the differential expression of the responses to altered irradiance and spectral quality. *Plant, Cell and Environment*. 21(2):139–148.
- Neubauer, C. und Yamamoto, H.Y. (1994) Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research*. 39(2):137–147.
- NIWA (2014) NIWA advances wastewater treatment processes. <https://www.niwa.co.nz/freshwater-and-estuaries/freshwater-and-estuaries-update/freshwater-update-62-september-2014/niwa-advances-wastewater-treatment>. Zuletzt geprüft am 27.06.2016.
- NLWKN (2013) Untersuchung niedersächsischer Oberflächengewässer auf bestimmte Humanarzneimittel (Carbamazepin, Diclofenac und Sulfamethoxazol).
- NLWKN (2014) Schadstoffmonitoring niedersächsischer Oberflächengewässer entsprechend der EG-WRRL. Ergebnisse der Bestandsaufnahme 2010 - 2013.
- Noben, J.P., Valcke, R., van Poucke, M., Clijsters, H. (1983) Reinvestigation of the chlorophyll distribution among the chlorophyll-proteins and chlorophyll-protein complexes of *Hordeum vulgare* L. *Photosynthesis Research*. 4(1):129–136.
- Noble, J.E. und Bailey, M.J. (2009) Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*. 463:73–95.
- Nödler, K., Hillebrand, O., Idzik, K., Strathmann, M., Schiperski, F. *et al.* (2013) Occurrence and fate of the angiotensin II receptor antagonist transformation product valsartan acid in the water cycle--a comparative study with selected  $\beta$ -blockers and the persistent anthropogenic wastewater indicators carbamazepine and acesulfame. *Water Research*. 47(17):6650–6659.
- Nödler, K., Tsakiri, M., Licha, T. (2014) The impact of different proportions of a treated effluent on the biotransformation of selected micro-contaminants in river water microcosms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11(10):10390–10405.

- Noüe, Joel de la, Chevalier, P., Proulx, D. (1990) Effluent treatment with immobilized microalgae and cyanobacteria. A critical assessment. *Wastewater Treatment by Immobilized Cells*. In: Tyagi R.D. und Vembu K. (ed) *Wastewater treatment by immobilized cells*, CRC Press, Boca Raton;143–152.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8):3327–3332.
- O'Mahony, T., Guibal, E., Tobin, J.M. (2002) Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 31(4):456–463.
- Ogbonna, J.C., Yoshizawa, H., Tanaka, H. (2000) Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*. 12(3/5):277–284.
- OGewV (2011) Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz.
- Ohno, M., Darwish, W.S., Ikenaka, Y., Miki, W., Ishizuka, M. (2011) Astaxanthin can alter CYP1A-dependent activities via two different mechanisms: induction of protein expression and inhibition of NADPH P450 reductase dependent electron transfer. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 49(6):1285–1291.
- Olson, B.J. und Markwell, J. (2007) Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Chapter 3:Unit 3.4*.
- Orth, N. (2013) Einfluss unterschiedlicher Carbamazepin-Konzentrationen auf das Wachstum ausgewählter Mikroalgen. Bachelorarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität. Hannover.
- Orth, N. (2016) Entwicklung und Anwendung von Algen-Bakterien Co-Kulturen im Bereich der Arzneistoff-Entfernung aus Oberflächenwasser am Beispiel von Carbamazepin. Masterarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität. Hannover.
- Osenbrück, K., Gläser, H.-R., Knöller, K., Weise, S.M., Möder, M. *et al.* (2007) Sources and transport of selected organic micropollutants in urban groundwater underlying the city of Halle (Saale), Germany. *Water Research*. 41(15):3259–3270.
- Oswald, W.J. (1988) Micro-algae and waste-water treatment. In: Borowitzka M.A. und Borowitzka L.J. (ed) *Micro-algal biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge [Cambridgeshire], New York;305–328.
- Oswald, W.J., Asce, A.M., Gotaas, H.B., Asce, M. (1957) Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions of the American Society of Civil Engineers*. 122:73–105.
- Oswald, W.J., Gotaas, H.B., Ludwig, H.F., Lynch, V. (1953) Algae symbiosis in oxidation ponds, III. photosynthetic oxygenation. *Sewage and Industrial Wastes*. 25(6):692–705.
- Pallokat, P. (2011) Bestimmung von unbekanntem Flagellaten anhand von REM-Untersuchungen und 18S rDNA-Sequenzanalysen. Bachelorarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität. Hannover.
- Panas, P. (2015) Effect of carbamazepine on the photosynthetic efficiency of different algae. Masterarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität. Hannover.
- Pastori, G.M. und Trippi, V.S. (1992) Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought resistant maize strain. *Plant and Cell Physiology*. 33(7):957–961.
- Paul, M.J., Driscoll, S.P., Lawlor, D.W. (1992) Sink-Regulation of Photosynthesis in Relation to Temperature in Sunflower and Rape. *Journal of Experimental Botany*. 43(2):147–153.
- Paxéus, N. (2004) Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine,  $\beta$ -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Science and Technology*. 50(5):253–260.
- Pearce, R.E., Lu, W., Wang, Y., Uetrecht, J.P., Correia, M.A. *et al.* (2008) Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro. III. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2,3-dihydroxycarbamazepine. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. 36(8):1637–1649.
- Pearce, R.E., Uetrecht, J.P., Leeder, J.S. (2005) Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro: II. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2-hydroxyiminostilbene. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. 33(12):1819–1826.



- Pearce, R.E., Vakkalagadda, G.R., Leeder, J.S. (2002) Pathways of Carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2- and 3-hydroxylated metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*. 30(11):1170–1179.
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*. 64(1):1–10.
- Pérez-Pérez, M.E., Lemaire, S.D., Crespo, J.L. (2012) Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiology*. 160(1):156–164.
- Peter-Fröhlich, A., Kraume, I., Lesouëf, A. (2004) Separate Ableitung und Behandlung von Urin, Fäkalien und Grauwasser – ein Pilotprojekt. *KA Korrespondenz Abwasser, Abfall*. 51(1).
- Pflugmacher, S. und Sandermann, H. (1998) Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotics in Marine Macroalgae<sup>1</sup>. *Plant Physiology*. 117(1):123–128.
- Pollock, C.J. und Lloyd, E.J. (1987) The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. *Annals of Botany*. 60(2):231–235.
- Pollock, C.J., Lloyd, E.J., Stoddart, J.L., Thomas, H. (1983) Growth, photosynthesis and assimilate partitioning in *Lolium temulentum* exposed to chilling temperatures. *Physiologia Plantarum*. 59(2):257–262.
- Popa Ungureanu, C., Favier, L., Bahrim, G., Amrane, A. (2015) Response surface optimization of experimental conditions for carbamazepine biodegradation by *Streptomyces MIUG 4.89*. *New Biotechnology*. 32(3):347–357.
- Porter, R.J. und Rogawski, M.A. (1992) New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery. *Epilepsia*. 33(1):S1-6.
- Powles, S.B., Berry, J.A., Björkman, O. (1983) Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants\*. *Plant, Cell and Environment*. 6:117–123.
- Price, M.B., Jelesko, J., Okumoto, S. (2012) Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Frontiers in Plant Science*. 3:235.
- Pritchard, J.B. und James, M.O. (1982) Metabolism and urinary excretion. In: Jakoby W.B., Bend J.R., Caldwell J. (ed) *Metabolic basis of detoxification.*, Academic Press, New York;339–357.
- Proulx, D. und de la Nove, J. (1988) Removal of macronutrients from waste water by immobilized microalgae. In: Moo-Young M. (ed) *Bioreactor immobilized enzymes and cells*, Elsevier Applied Science, London, New York;301–310.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V. V. J., Eno, N.C., Tyler, C.R. *et al.* (1994) Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*. 8(4):275–285.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2004) Oxidative metabolism activity in *Hydra attenuata* exposed to carbamazepine. *Fresenius Environmental Bulletin*. 13(8):783–788.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2008) An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *The Science of the Total Environment*. 389(2-3):306–314.
- Radmer, R.J. (1996) Algal Diversity and Commercial Algal Products. *BioScience*. 46(4):263–270.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 1(6):3159–3165.
- Rao, J.R. und Viraraghavan, T. (2002) Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. *Bioresource Technology*. 85(2):165–171.
- Raue, W. (2016) Gesamtmonitoringprogramm im Wasserschutz/Gewinnungsgebiet Grasdorf und Fuhrberger Feld. Stadtwerke Hannover, Fachgebiet Wasserwirtschaft und technisches Büro. Persönliche Mitteilung per E-Mail; informiert am 26.04.2016.
- Reif, R., Suárez, S., Omil, F., Lema, J.M. (2008) Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage. *Desalination*. 221(1-3):511–517.
- Reith, D.M., Appleton, D.B., Hooper, W., Eadie, M.J. (2000) The effect of body size on the metabolic clearance of carbamazepine. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. 21(3):103–111.

- Röbbelen, G. (1957) Untersuchungen An Strahleninduzierten Blattfarbmutanten Von *Arabidopsis Thaliana* (L) Heynh. *Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre*. 88(2):189–252.
- Robinson, P.K., Reeve, J.O., Goulding, K.H. (1989) Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous-flow culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 11(9):590–596.
- Rodríguez-Rodríguez, C.E., Jelić, A., Llorca, M., Farré, M., Caminal, G. *et al.* (2011) Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresource Technology*. 102(10):5602–5608.
- Roeselers, G., Loosdrecht, M. C. M. van, Muyzer, G. (2008) Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of Applied Phycology*. 20(3):227–235.
- Rogawski, M.A. und Porter, R.J. (1990) Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 42(3):223–286.
- Röhricht, M., Krisam, J., Weise, U., Kraus, U.R., Düring, R.-A. (2010) Elimination of pharmaceuticals from wastewater by submerged nanofiltration plate modules. *Desalination*. 250(3):1025–1026.
- Rohweder, U. (2003) Arzneimittel in der Umwelt Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC).
- Rooke, J.C., Léonard, A., Sarmiento, H., Meunier, C.F., Descy, J.-P. *et al.* (2011) Novel photosynthetic CO<sub>2</sub> bioconverter based on green algae entrapped in low-sodium silica gels. *Journal of Materials Chemistry*. 21(4):951–959.
- Rosenberg, M. (1984) Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 22:289–295.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. *et al.* (1998) Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science and Technology* 32(11):1559–1565.
- Ruelland, E. und Zachowski, A. (2010) How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*. 69(3):225–232.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T. (2010) Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. 101(1):58–64.
- Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Blankenhorn, I. (2001) Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography. A* 938(1-2):199–210.
- Sage, R.F. und Kubien, D.S. (2007) The temperature response of C(3) and C(4) photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*. 30(9):1086–1106.
- Sander mann, H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*. 17(2):82–84.
- Sander mann, H. (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics and Genomics*. 4(5):225–241.
- Sander mann, H. (2012) Plant metabolism of organic xenobiotics. Status and Prospects of the green liver concept. In: Altman A., Ziv M., Izhar S. (ed) *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century: Proceedings of the IXth International Congress of the International Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology Jerusalem, Israel, 14–19 June 1998*, Springer Netherlands;321–328.
- Sander mann, H., Diesperger, H., Scheel, D. (1977) Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. In: Barz W., Reinhard E., Zenk M.H. (ed) *Plant tissue culture and its bio-technological application*, Springer-Verlag, Berlin, New York;178–196.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002) Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell*. 14:401-417.
- Santo-Domingo, J. und Demaurex, N. (2010) Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica acta*. 1797(6-7):907–912.

- Savitch, L.V., Massacci, A., Gray, G.R., Huner, Norman P. A. (2000) Acclimation to low temperature or high light mitigates sensitivity to photoinhibition: roles of the Calvin cycle and the Mehler reaction. *Functional Plant Biology*. 27(3):253.
- Scandalios, J.G. (1997) Molecular biology of the antioxidant defense genes encoding catalase and superoxide dismutases in maize. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;97–108.
- Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstadt, R., Heberer, T. (2005a) Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere*. 60(2):245–253.
- Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., Heberer, T. (2005b) 1-octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, and propylphenazone. *Water, Air, & Soil Pollution*. 165(1-4):3–11.
- Schindelin, H., Kisker, C., Rajagopalan, K.V. (2001) Molybdopterin from molybdenum and tungsten enzymes. *Advances in Protein Chemistry*. 58:47–94.
- Schmidt, D. (2007a) Gewässergütekarte der Landeshauptstadt Hannover. *Schriftreihe kommunaler Umweltschutz*.
- Schmidt, D. (2012) Gewässergütekarte für die Landeshauptstadt Hannover.
- Schmidt, M. (2007b) Ein funktionelles Biomimetikum für die Nickel-Superoxiddismutase. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität. Jena.
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., Quinn, B. (2011) Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*. 62(7):1389–1395.
- Schmitt, H. und Römbke, J. (2013) The ecotoxicological effects of pharmaceuticals (antibiotics and antiparasitics) in the terrestrial environment-a review. In: Kümmerer K. (ed) *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer Berlin Heidelberg;285–303.
- Schmitt, M. (2011) Metabolismus I. Seminar zum Praktikum pharmazeutische Chemie III. Powerpointpräsentation. Albert-Ludwigs-Universität. Freiburg.
- Schobert, B. (1977) Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *Journal of Theoretical Biology*. 68(1):17–26.
- Schreiber, U. und Klughammer, C. (2008) Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields in PS I and PS II: Analysis of heat-induced limitations using Maxi-ImagingPAM and Dual-PAM-100. *PAM Application Notes*. 1:15–18.
- Schröder, P. (1997) Fate of Glutathione S-conjugates in plants. In: Hatzios K.K. (ed) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Springer, Niederlande;233–244.
- Schröder, P., Scheer, C.E., Diekmann, F., Stampf, A. (2007) How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research*. 14(2):114–122.
- Schuler, M.A. (1996) The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiology*. 112(4):1411–1419.
- Schuster, R. und Phillips, N. (2015) Israeli Startup Harnesses Algae to Treat Wastewater in Developing World Israel Startup harnesses algae to treat wastewater in developing world. <http://www.haaretz.com/israel-news/1.681223>. Zuletzt geprüft am 27.06.2016.
- Semple, K.T. (1997) Biodegradation of phenols by a eukaryotic alga. *Research in Microbiology*. 148(4):365–367.
- Semple, K.T., Cain, R.B., Schmidt, S. (1999) Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*. 170(2):291–300.
- Senta, I., Matošić, M., Jakopović, H.K., Terzić, S., Curko, J. *et al.* (2011) Removal of antimicrobials using advanced wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*. 192(1):319–328.

- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Lu, Z.-H., Kang, C.-M. (2008) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*. 4(1):8–14.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 2012(1):1–26.
- Shenker, M., Harush, D., Ben-Ari, J., Chefetz, B. (2011) Uptake of carbamazepine by cucumber plants – A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere*. 82(6):905–910.
- Sherwood, A.R. und Presting, G.G. (2007) Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 43(3):605–608.
- Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:217–223.
- Sigma-Aldrich (2014a) 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (D8130) - Product Information Sheet. Zuletzt geprüft am 04.2014.
- Sigma-Aldrich (2014b) Glutathione Reductase Assay Kit (GRSA) - Technical Bulletin. Zuletzt geprüft am 04.2014.
- Simon, A., Price, W.E., Nghiem, L.D. (2013) Changes in surface properties and separation efficiency of a nanofiltration membrane after repeated fouling and chemical cleaning cycles. *Separation and Purification Technology*. 113:42–50.
- Skerritt, J.H., Johnston, G.A., Chow, S.C. (1983) Interactions of the anticonvulsant carbamazepine with adenosine receptors. 2. Pharmacological studies. *Epilepsia*. 24(5):643–650.
- Snyder, S.A., Wert, E.C., Lei, H., Westerhoff, P., Yoon, Y. (2007) Removal of EDCs and Pharmaceuticals in Drinking and Reuse Treatment Processes. Awwa Research Foundation.
- Soltmann, U. (2010) Algae-Silica Hybrid Materials for Biosorption of Heavy Metals. *Journal of Water Resource and Protection*. 2(2):115–122.
- Sotelo, J.L., Ovejero, G., Delgad, J.A., Martínez, I. (2002) Comparison of adsorption equilibrium and kinetics of four chlorinated organics from water onto GAC. *Water Research*. 36(3):599–608.
- Spektrum (1999) Lexikon der Biologie: Endoplasmatisches Retikulum. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/endoplasmatisches-reticulum/21267>. Zuletzt geprüft am 30.04.2016.
- SRC (2016) Scientific databases. <http://esc.syrres.com/fatepointer/results.asp?CAS=3564736>. Zuletzt geprüft am 07.04.2016.
- Stadtentwässerung Hannover (2014) Das Klärwerk Herrenhausen.
- Strand, A., Hurry, V., Gustafsson, P., Gardestrom, P. (1997) Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*. 12(3):605–614.
- Straub, J.O. (2002) Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001. *Toxicology Letters*. 131(1-2):137–143.
- Stuhlfauth, T., Sültemeyer, D.F., Weinz, S., Fock, H.P. (1988) Fluorescence Quenching and gas exchange in a water stressed C3 Plant, *Digitalis lanata*. *Plant Physiology*. 86(1):246–250.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.-D., Silvana Vianna Rodrigues, Baumann, W. (1999) Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*. 225(1–2):135–141.
- Suárez, S., Ramil, M., Omil, F., Lema, J.M. (2005) Removal of pharmaceutically active compounds in nitrifying-denitrifying plants. *Water Science and Technology*. 52(8):9–14.
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R. (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnology Advances* 29(6):896–907.

- Sung, D.-Y., Kaplan, F., Lee, K.-J., Guy, C.L. (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*. 8(4):179–187.
- Szabados, L. und Savouré, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15(2):89–97.
- Taiz, L. und Zeiger, E. (2007) *Plant physiology*. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Tambosi, J.L., de Sena, Rênio Felix, Favier, M., Gebhardt, W., José, H.J. *et al.* (2010) Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. *Desalination*. 261(1-2):148–156.
- Tang, J., Siegfried, B.D., Hoagland, K.D. (1998) Glutathione-S-Transferase and in Vitro Metabolism of Atrazine in Freshwater Algae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 59(3):155–161.
- Tapken, D., Anschütz, U., Liu, L.-H., Huelsken, T., Seebohm, G. *et al.* (2013) A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Science Signaling*. 6(279):47.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D. (2003) *Wastewater engineering*. McGraw-Hill. Boston.
- Telfer, A. (2002) What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 357:1431–1440.
- Ternes, T.A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 32(11):3245–3260.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.-J. *et al.* (2002) Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology*. 36(17):3855–3863.
- Theocharis, A., Clément, C., Barka, E.A. (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235(6):1091–1105.
- Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B., Grimme, L.H. (1996) Xenobiotic Biotransformation in unicellular green algae. *Plant Physiology*. 112:361–370.
- Thomashow, M.F. (1998) Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiology*. 118:1–7.
- Thorn, C.F., Leckband, S.G., Kelsoe, J., Leeder, J.S., Müller, Daniel J.Klein, Teri E. *et al.* (2011) PharmGKB summary: carbamazepine pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 21(12):906–910.
- Thorner, J.P., Peter, G.F., Nechushtai, R. (1987) Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants. *Physiologia Plantarum*. 71(2):236–240.
- Tikoo, V., Scragg, A.H., Shales, S.W. (1997) Degradation of Pentachlorophenol by Microalgae. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 68(4):425–431.
- Tolbert, N.E. (1980) Microbodies - Peroxisomes and Glyoxysomes. In: Stumpf P.K. und Conn E.E. (ed) *The Biochemistry of plants*, Academic Press, New York;359–388.
- Tolou-Ghamari, Z., Zare, M., Habibabadi, J.M., Najafi, M.R. (2013) A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 18(1):81-85.
- Tran, N.H., Urase, T., Kusakabe, O. (2009) The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *Journal of Hazardous Materials*. 171(1-3):1051–1057.
- Trapp, S. (2003) Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*. 11(1):33–39.
- Trapp, S. und Karlson, U. (2001) Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *Journal of Soils and Sediments*. 1(1):37–43.
- Trevan, M.D. und Mak, A.L. (1988) Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*. 6(3):68–73.

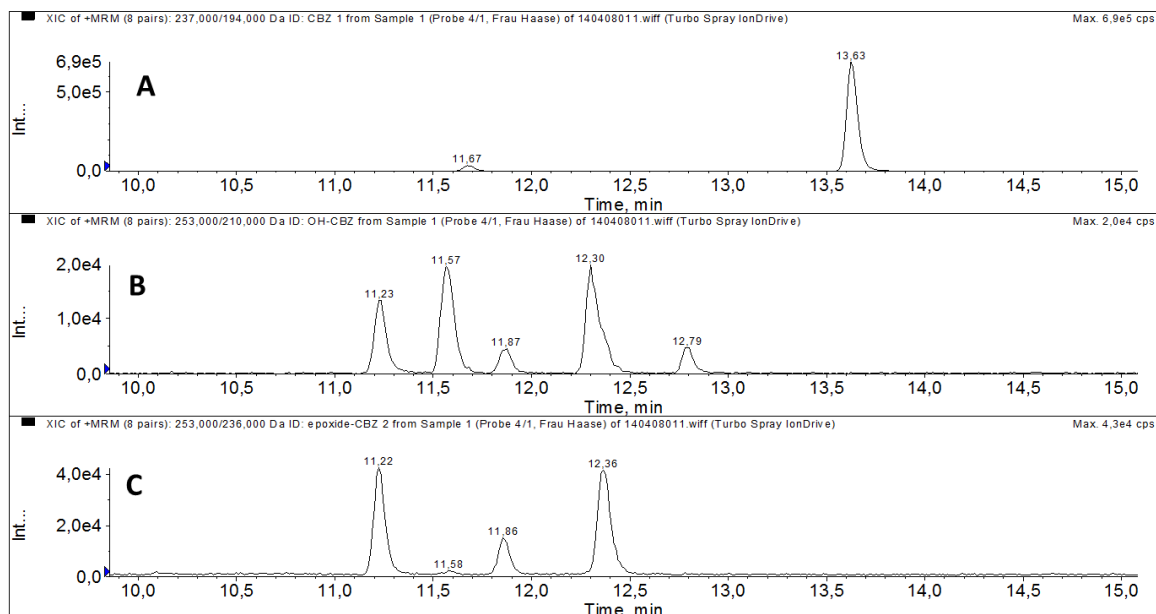
- Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G. *et al.* (2013) Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*. 22(8):1208–1220.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552(2):335–344.
- UBA (2003) Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht. Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission beim Umweltbundesamt. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 46:249–251.
- UBA (2012) Bestimmung von stoffbezogenen Umweltqualitätskriterien Texte 38/2012.
- UBA (2015) Revision der Umweltqualitätsnormen der Bundes-Oberflächengewässerverordnung nach Ende der Übergangsfrist für Richtlinie 2006/11/EG und Fortschreibung der europäischen Umweltqualitätsziele für prioritäre Stoffe. Umweltbundesamt. Texte 47/2015.
- Ushimaru, T., Maki, Y., Sano, S., Koshiba, K., Asada, K. *et al.* (1997) Induction of Enzymes Involved in the Ascorbate-Dependent Antioxidative System, Namely, Ascorbate Peroxidase, Monodehydroascorbate Reductase and Dehydroascorbate Reductase, after Exposure to Air of Rice (*Oryza sativa*) Seedlings Germinated under Water. *Plant and Cell Physiology*. 38(5):541–549.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B., Singh, S.N. (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*. 41(7):1075–1082.
- van Calker, D., Steber, R., Klotz, K.N., Greil, W. (1991) Carbamazepine distinguishes between adenosine receptors that mediate different second messenger responses. *European Journal of Pharmacology*. 206(4):285–290.
- van Gorkom, H.J. und Schelvis, J. (1993) Kok's oxygen clock: What makes it tick? The structure of P680 and consequences of its oxidizing power. *Photosynthesis Research*. 38:297–301.
- Verhoeven, A.S., Demmig-Adams, B., Adams III, W. W. (1997) Enhanced Employment of the Xanthophyll Cycle and Thermal Energy Dissipation in Spinach Exposed to High Light and N Stress. *Plant Physiology*. 113(3):817–824.
- Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A., Blaise, C., Gagné, F. *et al.* (2010) Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere*. 80(9):1062–1068.
- Verslues, P.E. und Sharma, S. (2010) Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*.
- Vílchez, C., Garbayo, I., Lobato, M.V., Vega, J. (1997) Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology*. 20(8):562–572.
- Volesky, B. (1987) Biosorbents for metal recovery. *Trends in Biotechnology*. 5(4):96–101.
- Waldmeier, P.C., Martin, P., Stocklin, K., Portet, C., Schmutz, M. (1996) Effect of carbamazepine, oxcarbazepine and lamotrigine on the increase in extracellular glutamate elicited by veratridine in rat cortex and striatum. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of Pharmacology*. 354(2):164–172.
- Walz (2009) IMAGING PAM Chlorophyll Fluorometer.
- Wang, H. und Leung, L.K. (2010) The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutrition*. 26(11-12):1181–1187.
- Wang, S. und Gunsch, C.K. (2011) Effects of selected pharmaceutically active compounds on the ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere*. 82(4):565–572.
- Wang, X., Berkowitz, G.A., Peters, J.S. (1993) K<sup>+</sup>-conducting ion channel of the chloroplast inner envelope: functional reconstitution into liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(11):4981–4985.
- Washko, P.W., Welch, R.W., Dhariwal, K.R., Wang, Y., Levine, M. (1992) Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples. *Analytical Biochemistry*. 204(1):1–14.

- Watkinson, A.J., Micalizzi, G.B., Graham, G.M., Bates, J.B., Costanzo, S.D. (2007) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(17):5667–5670.
- Weir, R.L., Anderson, S.M., Daly, J.W. (1990) Inhibition of N6-3Hcyclohexyladenosine binding by carbamazepine. *Epilepsia*. 31(5):503–512.
- Werner, A.K. und Witte, C.-P. (2011) The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science*. 16(7):381–387.
- Widodo, Patterson, J.H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A. *et al.* (2009) Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 60(14):4089–4103.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C. *et al.* (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*. 16(16):4806–4816.
- Williams, C.F. und McLain, J E T (2012) Soil persistence and fate of carbamazepine, lincomycin, caffeine, and ibuprofen from wastewater reuse. *Journal of Environmental Quality*. 41(5):1473–1480.
- Williams, R.T. und Cook, J.C. (2007) Exposure to Pharmaceuticals Present in the Environment. *Drug Information Journal*. 41(2):133–141.
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Czajkowski, K.P. (2010) Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environmental Science and Technology*. 44(16):6157–6161.
- Yamaguchi, K., Mori, H., Nishimura, M. (1995) A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology*. 36(6):1157–1162.
- Yamaguchi, T., Hamamoto, S., Uozumi, N. (2013) Sodium transport system in plant cells. *Frontiers in Plant Science*. 4(410).
- Yamamoto, H.Y. (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure and Applied Chemistry*. 51(3).
- Yan, G.A., Yan, X., Wu, W. (1997) Effects of the herbicide molinate on mixotrophic growth, photosynthetic pigments, and protein content of *Anabaena sphaerica* under different light conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38(2):144–149.
- Yemm, E.W., Cocking, E.C., Ricketts, R.E. (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst*. 80(948):209.
- Ying, G.-G., Kookana, R.S., Kolpin, D.W. (2009) Occurrence and removal of pharmaceutically active compounds in sewage treatment plants with different technologies. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*. 11(8):1498–1505.
- Zamani, N., Noshadi, M., Amin, S., Niazi, A., Ghasemi, Y. (2012) Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. *Journal of Applied Phycology*. 24(4):649–656.
- Zanger, U.M. und Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*. 138(1):103–141.
- Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K. (2014) Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: a review. *Environmental Pollution*. 184:620–639.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y. (2004) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*. 55(2):167–174.
- Zhang, W., Zhang, M., Lin, K., Sun, W., Xiong, B. *et al.* (2012) Eco-toxicological effect of carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 33(2):344–352.
- Zhang, Y. und Geissen, S.-U. (2010) Prediction of carbamazepine in sewage treatment plant effluents and its implications for control strategies of pharmaceutical aquatic contamination. *Chemosphere*. 80(11):1345–1352.

- Zhang, Y. und Geissen, S.-U. (2012) Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Biore-source Technology*. 112:221–227.
- Zhang, Y., Geissen, S.-U., Gal, C. (2008) Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 73(8):1151–1161.
- Zhang, Y. und Miller, R.M. (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(6).
- Zhang, Y., Zhu, H., Szewzyk, U., Geissen, S.U. (2015) Removal of pharmaceuticals in aerated biofilters with manganese feeding. *Water Research*. 72:218-226.



# Anhang



**Abbildung A-1:** Chromatographische Auswertung zur Bestimmung der Konzentrationen von CBZ, CBZ 10,11-epoxid, CBZ-diol, 2-OH CBZ und 3-OH CBZ im Ablauf der Kläranlage Herrenhausen; die chromatographischen Analysen wurden vom BAM in Berlin durchgeführt; (A) CBZ (13,63 min); (B) 2-OH CBZ (11,57 min) und 3-OH CBZ (12,30 min); (C) CBZ-diol (11,22 min) und CBZ 10,11-epoxid (11,86 min)

# Curriculum Vitae

---

Sandra Mareike Haase

Geburtsdatum: 21. Juni 1985

---

## STUDIUM/AUSBILDUNG

---

- 12/2011 – 12/2016     **Leibniz Universität Hannover**, Naturwissenschaftliche Fakultät  
Promotionsstudium
- 10/2008 – 11/2011     **Leibniz Universität Hannover**, Fakultät für Bauingenieurwesen und  
Geodäsie  
Masterstudium Wasser und Umwelt mit Abschluss
- 10/2007 – 11/2009     **Leibniz Universität Hannover**, Naturwissenschaftliche Fakultät  
Masterstudium Pflanzenbiotechnologie mit Abschluss
- 09/2004 – 08/2007     **Fachhochschule Lippe und Höxter**, Fachbereich Life Science Techno-  
logies  
Bachelorstudium Biotechnologie mit Abschluss
- 06/2004                 **Stadtgymnasium (Detmold)**  
Allgemeine Hochschulreife

## BERUFLICHE PRAXIS/TÄTIGKEITEN

---

- seit 06/2016            **Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser u. Abfall e.V.**  
**(DWA)**, Projektkoordinatorin
- 10/2015 – 03/2016     **Leibniz Universität Hannover**, Institut für Gartenbauliche Produktions-  
systeme, wissenschaftliche Hilfskraft
- 05/2015 – 08/2015     **Leibniz Universität Hannover**, Institut für Botanik, wissenschaftliche  
Hilfskraft
- 12/2011 – 09/2015     **Leibniz Universität Hannover**, Institut für Gartenbauliche Produktions-  
systeme, wissenschaftliche Mitarbeiterin
- 08/2010 – 05/2011     **Aquaplaner Ingenieurgesellschaft (Hannover)**
- 12/2009 – 05/2010     **Leibniz Universität Hannover**, Institut für Gartenbauliche Produktions-  
systeme, wissenschaftliche Hilfskraft

## EHRENÄMTER

---

- stellv. Leiterin des VDI Arbeitskreises Biotechnologie (seit 2015)  
stellv. Doktorandensprecherin am Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme (2013-2015)  
Mitglied der Berufungskommission für das Lehrgebiet Biotechnologie (2006-2007)

Hannover, März 2017