

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH No. 10882

**Phytochemical and Biological Investigations
of Cyanobacteria, in particular of
Fischerella ambigua and *Nostoc sphaericum***

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

BEATRIX S. FALCH

Pharmacist
born April 27, 1965
Esslingen, Germany



accepted on recommendation of

Prof. Dr. O. Sticher, examiner
Prof. Dr. G. M. König, co-examiner
Dr. H.-R. Bürgi, co-examiner

Zürich 1994

SUMMARY

Twenty strains of freshwater and terrestrial cyanobacteria were investigated for their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities.

Extracts of *Fischerella ambigua* showed the most potent activities in these biological assays. Antibacterial and antifungal activities were found against the test organisms *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, and *Penicillium oxalicum*. The dichloromethane, ethyl acetate, and the methanol extracts also demonstrated strong lethal effects toward brine shrimp (*Artemia salina*). Additionally, the dichloromethane extract showed a weak molluscicidal activity (*Biomphalaria glabrata*). Ethyl acetate and methanol extracts of *Nostoc sphaericum* exhibited antibacterial activities. Antifungal activity against *P. oxalicum* was detected for the petroleum ether and ethyl acetate extracts. Lethal effects toward brine shrimp were observed for the ethyl acetate extract.

Based on these results *F. ambigua* and *Nostoc sphaericum* were chosen for large-scale cultivation. Bioassay-guided fractionation of the combined ethyl acetate and dichloromethane extracts of *F. ambigua* using a combination of several chromatographic methods (e.g., VLC, MPLC, HPLC) led to the isolation of eleven compounds.

Five polyhalogenated phenols, ambigols A – E were isolated. Due to the low amount of the three derivatives ambigols C, D, and E, only structure proposals are presented. These combined extracts also provided, apart from the known compound tjipanazole D, a series of monogalactosyl diacylglycerols, of which three were obtained as pure compounds. The methanol extract afforded two known compounds, *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxybenzhydrazide.

The biological activities of the ambigols A and B, as well as that of tjipanazole D, were investigated in detail using additional bioassays to those described above. Ambigol A was slightly more active than ambigol B showing antimicrobial, anti-inflammatory, cytotoxic, antiviral, and molluscicidal effects. Tjipanazole D possessed only moderate antibacterial activities.

Investigation of the culture medium of *N. sphaericum* resulted in the isolation of a series of hydrocarbons which were new to the literature. The structures of nostocanes A and B are presented. Those of nostocanes C and D were not completely resolved and only structure proposals are given.

Structure elucidation was supported by spectroscopic methods, mainly 1D and 2D NMR spectroscopy. A 2D INADEQUATE experiment made it possible to solve the structure of ambigol A. Single-crystal X-ray analysis confirmed the structure of ambigol A.

GC/MS investigations were performed to characterize the fatty acids in the monogalactosyl diacylglycerols which were liberated after regioselective enzymatic and alkaline hydrolyses.

The above findings support the general notion that cyanobacteria are promising organisms in regard to the isolation of new biologically active secondary metabolites with interesting chemical and biological properties.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwanzig Frischwasser- und terrestrische Cyanobakterienstämme wurden bezüglich ihrer antibakteriellen, antifungalen und zytotoxischen Aktivitäten untersucht.

Die Extrakte von *Fischerella ambigua* zeigten in diesen biologischen Testsystemen die stärksten Aktivitäten. Antibakterielle und antifungale Aktivitäten wurden gegenüber den Testorganismen *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* und *Penicillium oxalicum* gefunden. Die Dichlormethan-, Ethylacetat- und Methanolextrakte zeigten auch stark letale Effekte gegenüber Brine shrimp (*Artemia salina*). Zusätzlich zeigte der Dichlormethanextrakt eine schwach mollusizide Aktivität (*Biomphalaria glabrata*). Die Ethylacetat- und Methanolextrakte von *Nostoc sphaericum* wiesen antibakterielle Aktivitäten auf. Antifungale Aktivitäten gegenüber *P. oxalicum* wurden in den Petrolether- und Ethylacetatextrakten gefunden. Letale Effekte gegenüber Brine shrimp wurden im Ethylacetatextrakt beobachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden *F. ambigua* und *N. sphaericum* für eine Kultivierung im grossen Maßstab ausgewählt.

Die von biologischen Tests geleitete Fraktionierung der vereinigten Ethylacetat- und Dichlormethanextrakte von *F. ambigua* führte mit Hilfe verschiedener chromatographischer Methoden (z. B. VLC, MPLC, HPLC) zur Isolierung von elf Substanzen.

Fünf polyhalogenierte Phenole, Ambigol A – E, wurden isoliert. Aufgrund der geringen Mengen der drei Ambigolderivate C, D und E werden nur Strukturvorschläge vorgestellt. Darüberhinaus lieferte der vereinigte Extrakt neben der bekannten Substanz Tjipanazol D eine Reihe von Monogalaktosyldiacylglycerolen, von denen drei als reine Substanzen erhalten wurden. Der Methanolextrakt lieferte die zwei bekannten Substanzen p-Hydroxybenzaldehyd und p-Hydroxybenzhydrazid.

Die biologischen Aktivitäten der Ambigole A und B und Tjipanazole D wurden detailliert unter Verwendung von biologischen Testsystemen, zusätzlich zu den oben beschriebenen, untersucht. Ambigol A war etwas aktiver als Ambigol B und zeigte antimikrobielle, antiinflammatorische, cytotoxische, antivirale, und mollusizide Effekte. Tjipanazol D besass nur eine geringe antibakterielle Aktivität.

Die Untersuchung des Kulturmediums von *N. sphaericum* führte zur Isolierung einer Reihe von Kohlenwasserstoffen, die hier zum ersten Mal

beschrieben werden. Die Strukturen der Nostocane A und B werden vorgestellt. Diejenigen der Nostocane C und D wurden nicht vollständig gelöst, so dass nur Strukturvorschläge angegeben sind.

Die Strukturaufklärung wurde mittels spektroskopischer Methoden, hauptsächlich 1D- and 2D-NMR-Spektroskopie unterstützt. Ein 2D-INADEQUATE-Experiment ermöglichte es, die Struktur von Ambigol A aufzuklären. Mit Hilfe der Einkristall-Röntgenstrukturanalyse konnte die Struktur von Ambigol A bestätigt werden.

GC/MS Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Fettsäuren in den Monogalaktosyldiacylglycerolen, welche nach einer regioselektiven enzymatischen und alkalischen Hydrolyse freigesetzt wurden, zu charakterisieren.

Die hier beschriebenen Ergebnisse unterstützen die allgemeine Ansicht, dass Cyanobakterien vielversprechende Organismen in Bezug auf die Isolierung von neuen, biologisch aktiven Sekundärmetaboliten mit interessanten chemischen und biologischen Eigenschaften sind.