



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **245 905 A1**4(51) C 12 Q 1/02
G 01 N 21/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 286 248 7	(22)	16.01.86	(44)	20.05.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VEB Chemiekombinat Bitterfeld, 4400 Bitterfeld, DD
(72)	Kramer, Claus-Rüdiger, Prof. Dr. sc. nat.; Arndt, Horst, Dr.rer.nat., DD

(54) **Selektionsverfahren für Effektoren von Stickstoffreduktions-Metabolismen**

(57) Die Erfindung „Selektionsverfahren für Effektoren von Stickstoffreduktions-Metabolismen“ dient der Suche nach Pflanzenschutzmitteln und der Charakterisierung von Effektoren biologischer Prozesse. Sie verfolgt das Ziel, möglichst in einem Arbeitsgang die Ergebnisse von Tests zur Effektorbeeinflussung des Wachstums von autotrophen Algensuspensionen in mindestens zwei Variationen der Oxydationsstufe des Stickstoffs der genutzten Stickstoffquelle der Nährlösung auszuwerten und dabei primäre Effektoren der Reduktion des Nitrat- bzw. des Nitritstickstoffs oder unspezifische Effektoren des Stickstoffhaushalts zu differenzieren und zu charakterisieren. Die Erfindung basiert auf einem Auswertungsverfahren, das die entwicklungsbedingte Beeinflussung der optischen Eigenschaften substanzbehandelter Zellsuspensionen in mindestens zwei Suspensionskulturvariationen bezüglich der Stickstoffquelle bei sonst vergleichbaren Bedingungen nutzt. Die Fig. 2, A₃ und A₄ illustriert, daß das Auswertungsverfahren darüber hinaus Informationen über Einsetzen, Verlauf, Beständigkeit und Richtung der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis der Effektoren liefert.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Selektion von Effektoren von Stickstoffreduktions-Metabolismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die teils unterschiedlich substanzinitiierten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften des durch Nitrat- bzw. Nitritionen und durch Ammoniumionen determinierten Wachstums autotropher Mikroalgensuspensionen unter vergleichbaren Bedingungen analysiert werden, um mittels Vergleich der substanzinitiierten Variation der optischen Eigenschaften während des Wachstums der Algensuspensionen in mindestens zwei Varianten der Oxydationsstufe des Stickstoffs der genutzten Stickstoffquelle die Effektoren in möglichst einem Arbeitsgang nach ihrer Wirkspezifität hinsichtlich des Stickstoffhaushaltes in primäre Effektoren der Reduktion des Nitrat- bzw. des Nitritstickstoffs oder als unspezifische Effektoren des Stickstoffhaushaltes differenzieren und charakterisieren zu können.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als autotrophe Zellsuspensionen alle suspendierbaren autotrophen einzelligen Algen verwendet werden können.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optischen Eigenschaften der Algensuspensionen mittels Spektalkolorimetrie, Spektralphotometrie oder Nephelometrie bei ein bzw. zwei bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen oder ganzen Spektralbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich analysiert werden.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optischen Eigenschaften der verschiedenen Proben in einem Arbeitsgang kontinuierlich oder in definierter Zeitfolge parallel oder simultan analysiert werden.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Suche nach Regulatoren biologischer Prozesse, Umweltanalyse, Naturstoffchemie

Charakteristik der bekannten Lösungen

Es ist bekannt, daß Stickstoff in Form von anorganischen Verbindungen zu den Hauptnährstoffen pflanzlicher Organismen gehört. Er wird zur Synthese von Eiweißen bzw. von Eiweißbausteinen wie Aminosäuren und anderen organischen Bestandteilen von Lebewesen unbedingt benötigt. Stickstoffautotrophe Pflanzen verwenden dazu anorganische Stickstoffquellen, insbesondere Nitrationen. Die Pflanzen sind aber auch in der Lage, Nitrit-, Ammoniumionen und weitere stickstoffhaltige Verbindungen aufzunehmen.

Die entscheidenden Schritte des pflanzlichen Stickstoffhaushaltes sind die Stufen der Reduktion des Stickstoffs der Oxydationsstufe N^{-5} in den Nitrationen zu N^{-3} als Nitritionen und über weitere wasserstoffhaltige Zwischenprodukte bis zur Stufe N^{+3} in Form von Ammoniumverbindungen.

Nach Bindung der letzteren an organische Akzeptoren erfolgt anschließend die Synthese von stickstoffhaltigen Mono- und Polymeren bis zu komplizierten Eiweißstrukturen.

Wirkstoffe, die den Stickstoffhaushalt von Pflanzen tangieren, gewinnen in der landwirtschaftlichen Praxis ständig an Bedeutung. Sie können den ersten, den zweiten oder beide Reduktionsschritte dieses wichtigen Metabolismus beeinträchtigen.

Nutzt man als Indikator Mikroalgensuspensionen, so können nach dem Verfahren DD 220 047 mittels Wachstums- und Ionenumsatzanalysen autotropher Mikroalgensuspensionen primäre Photosyntheseeffektoren von primären Effektoren des Stickstoffhaushaltes in einem Arbeitsgang getrennt werden. Weitere Verfahren wie DD 94 234, DD 200 472, DD 211 126, DD 212 985, DD 213 949, DD 213 950, DD 214 146, DD 216 253 und 216 254, die auf Auswertungsmodi basieren, die die wachstums- bzw. entwicklungsbedingten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften und/oder der photosynthetischen bzw. respiratorischen Gaswechselumsätze substanzbehandelter autotropher und/oder heterotropher Zellsuspensionen nutzen, ermöglicht die Selektion von vorrangigen Photo-Synthese- oder Atmungshemmern und von unspezifischen Hemmern, die Aufdeckung von Permeationseffekten sowie die Selektion von Hemmern der Licht- und der Dunkelreaktion. Darüber hinaus sind diese Verfahren über die Analyse dosisabhängiger Wirkeffekt-Zeit-Verläufe in der Lage, die Wirkspezifität der Effektoren näher zu charakterisieren.

Eine ähnliche Differenzierung und Selektion der Wirkstoffe hinsichtlich ihrer spezifischen Beeinflussung der Reduktion des Nitrat- und/oder des Nitritstickstoffs auf der Grundlage substanzbehandelter Zell- oder Organismensuspensionen bereitet bisher große Schwierigkeiten. Da für die Wirkstoffcharakterisierung auf der Grundlage komplexer Analysen der Lebensprozesse vergleichende Betrachtungen der Auswertungsergebnisse zunehmend an Bedeutung gewinnen, ergibt sich der Wunsch nach einem einfachen Verfahren, das als Indikator autotrophe Mikroalgensuspensionen nutzt und dessen Meßtechnik und Auswertungsmodus eine Charakterisierung der Effektoren als primäre Effektoren der Reduktion des Nitrat- bzw. des Nitritstickstoffs oder als unspezifische Effektoren des Stickstoffhaushaltes in einem Arbeitsgang erlaubt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für Tests auf der Grundlage autotropher Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen ein Verfahren und einen Auswertungsmodus vorzuschlagen, die in möglichst einem Arbeitsgang eine Selektion von Wirkstoffen gestatten, die primär die Nitratstickstoffreduktion bzw. die Nitritstickstoffreduktion oder den Stickstoffhaushalt unspezifisch tangieren und die Wirkspezifität solcher Effektoren hinsichtlich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften der Suspensionskulturen genauer zu charakterisieren ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß beim „Selektionsverfahren für Effektoren von Stickstoffreduktions-Metabolismen“ die teils unterschiedlich substanzinitiierten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften des durch Nitrat- bzw. durch Nitritionen und durch Ammoniumionen determinierten Wachstums einzelliger Algensuspensionen analysiert und vergleichend betrachtet werden. Das Auswertungsverfahren liefert darüber hinaus Informationen über Einsetzen, Verlauf und Beständigkeit der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkungsdauer der Effektoren hinsichtlich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften.

Beim „Selektionsverfahren für Effektoren von Stickstoffreduktions-Metabolismen“ werden zunächst frisch geerntete Autosporen von Mikroalgen in unterschiedlichen Nährlösungen einmal mit Nitrationen bzw. Nitritionen und zum anderen mit Ammoniumionen als Stickstoffquelle so suspendiert, daß beide, gegebenenfalls alle drei Suspensionskulturen die gleiche Autosporendichte aufweisen. Anteile dieser autotrophen Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen werden dann als Proben mit definierten Mengen chemischer Verbindungen in unmittelbarem Kontakt gebracht und parallel mit unbehandelten Vergleichskulturen bei einheitlicher Temperatur zwischen 20°C und 38°C im Licht belüftet, so daß sie auf der Grundlage des sich vollziehenden Photosyntheseprozesses wachsen und sich entwickeln.

Kontinuierlich oder zu festgelegten Zeitpunkten werden dann Proben und Vergleichskulturen oder Anteile von beiden parallel oder in definierter Folge mittels spektralanalytischer Verfahren bei einem, zwei oder mehreren Wellenlängenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums untersucht und die dabei gewonnenen Ergebnisse vergleichenden Betrachtungen unterzogen.

Ausführungsbeispiele

Frisch geschlüpfte Aplanosporen synchroner Kulturen einzelliger Grünalgen der Species *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, Stamm BÖHM und BORNS 1972/1, werden in eine anorganische Nährlösung mit Fe-EDTA-Komplex und Spurenstoffen so überführt, daß jeder Kubikzentimeter der Suspension etwa sechs Millionen Algenzellen enthält. 1 Liter der Kultur-Nährlösung N setzt sich dabei aus den drei Teilnährlösungen N₁, N₂ und N₃ zusammen;

$$1000\text{ cm}^3\text{ N} = 998\text{ cm}^3\text{ N}_1 + 1\text{ cm}^3\text{ N}_2 + 1\text{ cm}^3\text{ N}_3.$$

Die Nährlösungen N₁, N₂ und N₃ enthalten folgende Substanzen:

Nährlösung N₁ für die Testvariante mit Nitrationen als Stickstoffquelle. Für die Nährlösung N₁ werden zunächst die Stammlösungen 1 bis 4 durch Auffüllen der genannten Substanzmengen mit Aqua dest. hergestellt:

Stammlösung 1: 100 g KNO₃/1000 cm³

Stammlösung 2: 25 g CaCl₂ · 6 H₂O/1000 cm³

Stammlösung 3: 250 g MgSO₄ · 7 H₂O/1000 cm³

Stammlösung 4: 160 g KH₂PO₄/1000 cm³.

Nährlösung N₁ für Testvariante mit Ammoniumionen als Stickstoffquelle.

Stammlösung 1: 120 g NH₄H₂PO₄, 260 g Na₂HPO₄/1000 cm³

Stammlösung 2: 25 g CaCl₂ · 6 H₂O/1000 cm³

Stammlösung 3: 250 g MgSO₄ · 7 H₂O/1000 cm³

Stammlösung 4: 160 g KH₂PO₄/1000 cm³.

Diese Stammlösungen sind zu sterilisieren (Feuchtsterilisation) und kühl zu lagern.

Aus je 5 cm³ der Stammlösung 1, 0,5 cm³ der Stammlösung 2, 1 cm³ der Stammlösung 3 und 5 cm³ der Stammlösung 4 werden durch Auffüllen mit destilliertem Wasser entweder 1000 cm³ bzw. bei Beachtung der Verhältnisse eine beliebige Menge der Nährlösung N₁ hergestellt.

Nährlösung N₂

Die Nährlösung N₂ enthält in 1000 cm³ Lösung 61 mg H₃BO₃, 169 mg MnSO₄ · H₂O, 287 mg ZnSO₄ · 7 H₂O, 2,5 mg CuSO₄ · 5 H₂O und 12,4 mg (NH₄)₂MoO₄.

Nährlösung N₃

Zur Herstellung der Nährlösung N₃ werden 6,9 g FeSO₄ · 7 H₂O und 9,3 g Na-EDTA in destilliertem Wasser gelöst und auf 1000 cm³ mit Aqua dest. aufgefüllt.

Je 80 cm³ der so hergestellten Suspension werden in je eine Kulturröhre eingebracht, mit je 1 cm³ verschieden konzentrierter Lösung der zu prüfenden Substanzen A und B beimpft oder als nur mit dem Lösungsmittel behandelte Kontrollen bei 37°C belichtet und mit gereinigter Luft, der 2 Vol.-% Kohlendioxid beigegeben werden, begast, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Photosynthese gegeben sind.

Während die in den zwei Nährlösungen mit unterschiedlicher Stickstoffquelle suspendierten Zellen in den unbehandelten Vergleichskulturen normal und vergleichbar wachsen und sich entwickeln, werden Wachstum und Ionenumsatz in den mit Chemikalien versetzten Proben mehr oder weniger beeinflusst, wenn verschiedene Substanzkonzentrationen den Photosyntheseprozess bzw. den Stickstoffhaushalt mehr oder weniger stören. In definierter Zeitfolge werden von den Vergleichskulturen und den mit der Substanz A behandelten Proben die optischen Eigenschaften bei 680 und/oder 750 nm als Wachstumsparameter gemessen.

Die Ergebnisse der Analysen sind den Fig. 1 und 2 zu entnehmen. Fig. 1, A₁ enthält die dekadischen Logarithmen der Extinktionsmessungen bei 680 nm für die unbehandelten Kontrollen K bzw. K' und die mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 1 (1') bis 5 (5'), die von der nullten Stunde bis zur sechsten Stunde alle 60 Minuten vorgenommen wurden. Die IgE-t-Kurven (—) 1' bis 5' wurden für die dosisabhängige Beeinflussung des Wachstums der Zellen in Suspensionskultur mit Nitrationen als Stickstoffquelle und entsprechend die IgE-t-Kurven (—) für die Beeinflussung des Wachstums in Suspensionskultur mit Ammoniumionen als Stickstoffquelle durch den Effektor A gefunden. Ein Vergleich der parallel in einem Arbeitsgang unter vergleichbaren Bedingungen gewonnenen Wirkeffekt-Zeit-Kurven in Fig. 1,

A₁ zeigt deutlich Unterschiede der Wirkung des Effektors A auf das Wachstum der Algen in beiden Testvarianten. Das durch die Nitrationen determinierte Wachstum wird deutlich stärker gehemmt als das durch die Ammoniumionen determinierte Wachstum. Dieses differenzierte Verhalten des Effektors A kann auch in Form von Wirkquantitäts ($\Delta \lg E$)-Zeit-Kurven veranschaulicht werden, Fig. 1, A₂, wobei die Wirkquantität gemäß

$$\Delta \lg E = \lg E_{\text{Kontrolle}} - \lg E_{\text{Probe}}$$

bestimmt werden kann.

Einen Eindruck über Qualität und Quantität der Wirkeffekte vermitteln die Fig. 2, A₃ und Fig. 2, A₄.

Die Fig. 2, A₃ zeigt eine gegenseitige Auftragung der Wachstumsparameter $\lg E$ aus den beiden Testvarianten. Während in diesem Fall für die Kontrolle die Gerade K mit einem Anstieg von 45 Grad gefunden wird, erhält man bei gleicher Auftragung für die wirkstoffbehandelten Proben typische Kurven 1 bis 5, die auf mehrere Metabolismen hinweisen. Typisch für den Effektor A ist, daß das Wachstum in Suspensionskultur mit Nitrationen als Stickstoffquelle nach einer gewissen Einwirkzeit dosisabhängig blockiert wird, während in Suspensionskultur mit Ammoniumionen als Stickstoffquelle weiteres Wachstum, welches aber auch dosisabhängig gehemmt wird, Fig. 1, A₁ und Fig. 1, A₂, erfolgt. Gleichzeitig zeigt Fig. 2, A₃, daß die stärkste Dosis 5, angezeigt durch den zweiten Kurvenabschnitt, in beiden Testvarianten zu einer totalen Hemmung des Wachstums führt, wobei die Blockierung in „Nitrationskultur“ eher einsetzt als in „Ammoniumionenkultur“. Die Wirkkurve der Dosis 4 veranschaulicht zunächst eine Blockierung des Wachstums in „Nitrationskultur“, die im Verlaufe in eine zunehmende Hemmung des Wachstums in „Ammoniumionenkultur“ bei gleichzeitiger verstärkter Zunahme relativen Wachstums in „Nitrationskultur“ übergeht. Die mittleren Dosen 2 und 3 determinieren zunächst den gleichen Kurvenverlauf, der auch im zweiten Kurventeil eine Blockierung bzw. einen relativen Rückgang des Wachstums in „Nitrationskultur“ anzeigt. Im dritten Kurvenabschnitt spaltet sich die Kurve in zwei Teilläste. Während der Kurventeil für Dosis 3 mit einem Anstieg kleiner als der Anstieg der Kontrolle darauf hinweist, daß die Dosis 3 bei diesem sekundären Metabolismus eine relativ stärkere Hemmung in „Nitrationskultur“ determiniert, scheint der Anstieg des Kurvenabschnitts für Dosis 2, der ähnlich wie für Dosis 1 größer als der Anstieg der Kontrolle ist, auf Reparaturmetabolismen hinzuweisen. Aus Fig. 2, A₃ und insbesondere aus den dosisabhängigen Blockierungen des Wachstums in „Nitrationskultur“ kann geschlußfolgert werden, daß es sich beim Effektor A um einen typischen Hemmer der Nitratstickstoffreduktion-Metabolismen handelt. Für den Wirkstoff B, mit dem wie beim Effektor A verfahren wurde, konnte bei einer entsprechenden Auftragung der Wachstumsparameter gemäß Fig. 2, A₃ nur die Gerade B, die mit der Geraden für die Kontrollen identisch ist, gefunden werden. Das weist darauf hin, daß im Gegensatz zum Wirkstoff A der Effektor B nur ein unspezifischer Hemmer des Stickstoffhaushaltes ist. Zu gleichen Schlußfolgerungen führt eine gegenseitige Auftragung der Hemmquantitäten $\Delta \lg E$ aus beiden Testvarianten, Fig. 2, A₄. Auch hier wurde erwartungsgemäß für den unspezifischen Hemmer des Stickstoffhaushaltes B die Gerade B erhalten. Demgegenüber weisen die Kurvenverläufe auch für die geringen Dosen 1 und 2 bei typischer Konzentrationsabhängigkeit auf eine relativ stärkere Hemmung in „Nitrationskultur“. Für die Wirkstoffcharakterisierung ist die übergeordnete Kurve A bedeutsam, da sie relativiert für das Wachstum von 0 bis 1 in einer bestimmten Standardwirkzeit und unter streng standardisierten Bedingungen als quantitatives Maß der spezifischen Wirkung des Effektors angesehen werden kann.

Vergleicht man die Aussagen der Figuren 1 und 2 für die Substanzen A und B miteinander, so wird deutlich, daß die Auswertung solcher parallel durchgeführten Tests mit unterschiedlichen Stickstoffquellen in den Suspensionskulturen zu sehr differenzierten Aussagen hinsichtlich der Wirkung von Effektoren auf den Stickstoffhaushalt führen kann.

Besonders deutlich zeigen sich diesbezüglich Unterschiede bei Korrelationen der Wachstumsparameter $\lg E$ und der Hemmquantitäten $\Delta \lg E$ für die Beeinflussung des Wachstums in den Testvarianten mit unterschiedlichen Stickstoffquellen zueinander. Durch Vergleich entsprechender Wirkbilder von neu untersuchten Substanzen, über deren herbizide Wirksamkeit bisher nichts oder wenig bekannt ist, mit einer Wirkbildkartei gemäß den Fig. 1 und 2 oder mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung, die beide entsprechende Wirkdaten von gut untersuchten, auch kommerziell vertriebenen Herbiziden oder Standardherbiziden speichern, erhält man konkrete Hinweise über ähnliche Wirkspezifika, Wirkmechanismen, Selektivität und Anwendungsmöglichkeiten solcher Effektoren.

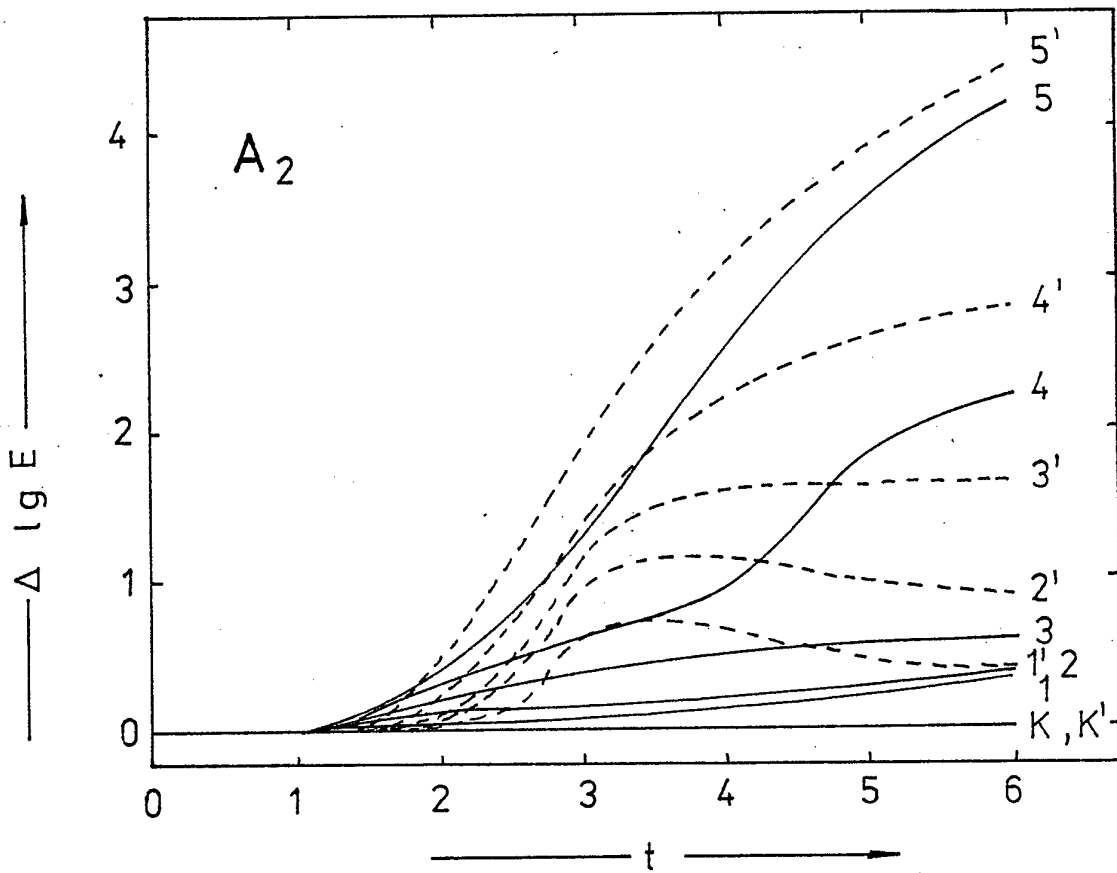
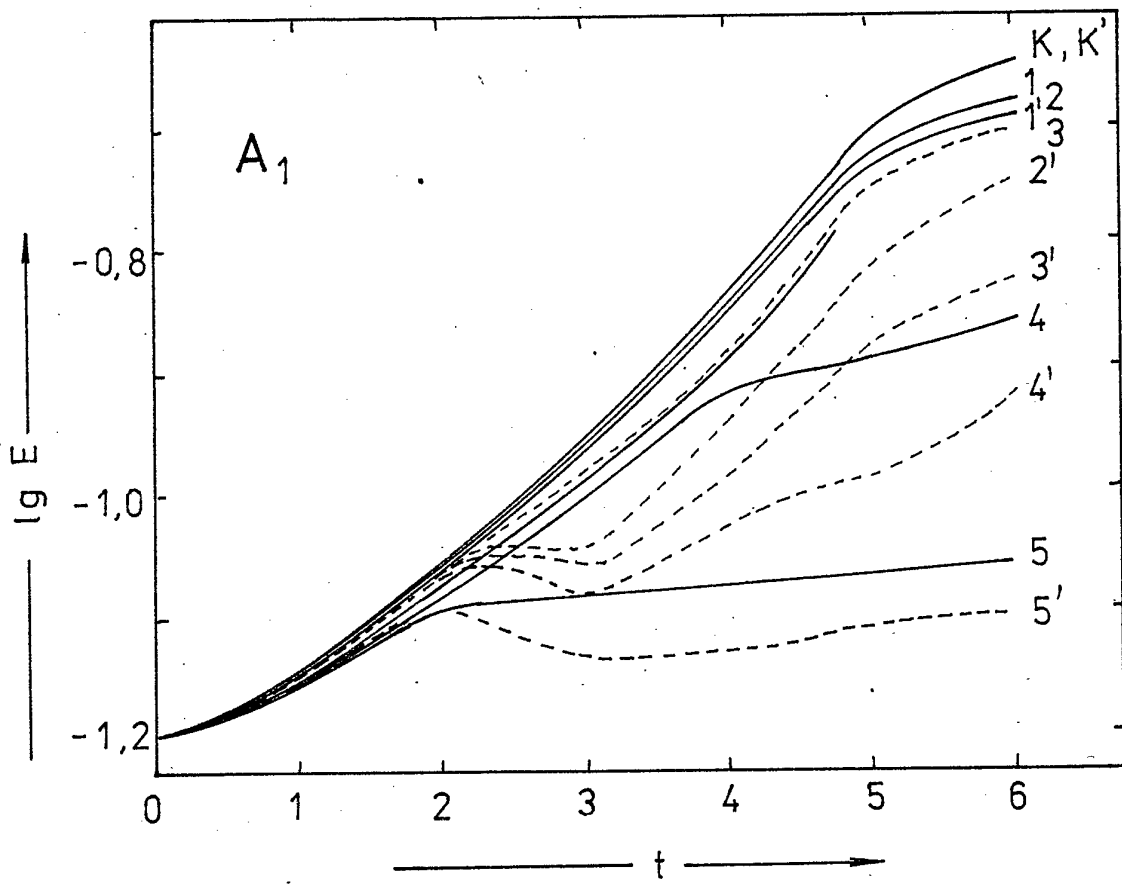


Fig. 1

