



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 220 047 A1

4(51) C 12 Q 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 256 618 2

(22) 14.11.83

(44) 20.03.85

(71) Pädagogische Hochschule „Wolfgang Ratke“ Köthen, 4370 Köthen, Lohmannstraße 23, DD

(72) Kramer, Claus-Rüdiger, Doz. Dr. sc. nat.; Arndt, Horst, Dr. rer. nat.; Trümper, Lutz, Dipl.-Lehrer, DD

(54) **Selektionsverfahren für Effektoren mittels Wachstums- und Ionenumsatzanalysen autotropher Mikroalgen-suspensionen**

(57) Die Erfindung „Selektionsverfahren für Effektoren mittels Wachstums- und Ionenumsatzanalysen autotropher Mikroalgen-suspensionen“ dient der Suche nach Pflanzenschutzmitteln und der Charakterisierung von Effektoren biologischer Prozesse. Sie verfolgt das Ziel, möglichst in einem Arbeitsgang die Ergebnisse von Tests mit autotrophen Zellsuspensionen auszuwerten und dabei primäre Photosyntheseeffektoren von primären Effektoren des Stickstoffhaushalts bzw. der Proteinsynthese zu trennen. Die Erfindung basiert auf einem Auswertungsverfahren, das die entwicklungsbedingte Beeinflussung der optischen Eigenschaften und Ionenumsätze substanzbehandelter Zellsuspensionen nutzt. Fig. 3 illustriert anhand von Wirkbildern für die Beeinflussung der optischen Eigenschaften bei 680 bis 750 nm sowie des pH-Wertes durch einen Effektor B, daß das Auswertungsverfahren darüber hinaus Informationen über Einsetzen, Verlauf, Beständigkeit und Richtung der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkungs-dauer der Effektoren liefert. Fig. 3

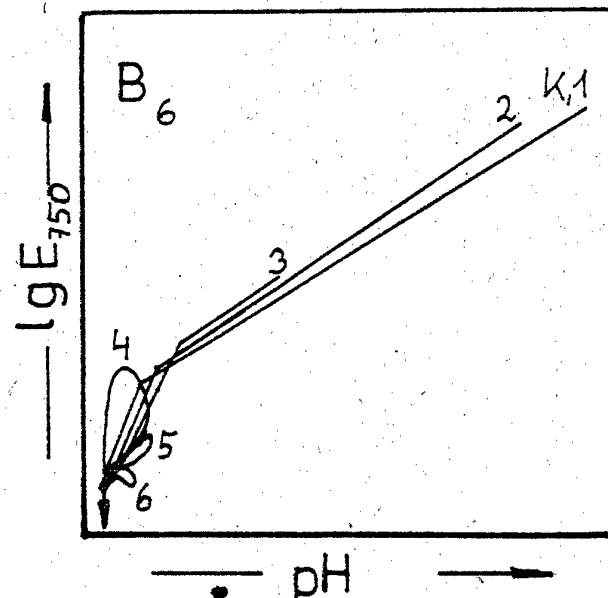
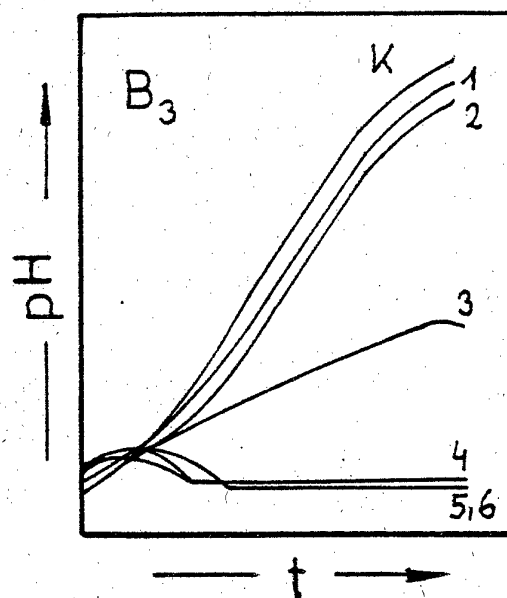
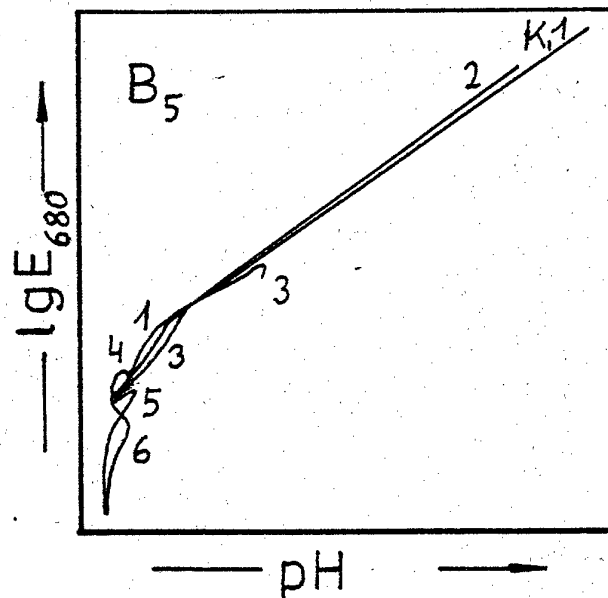
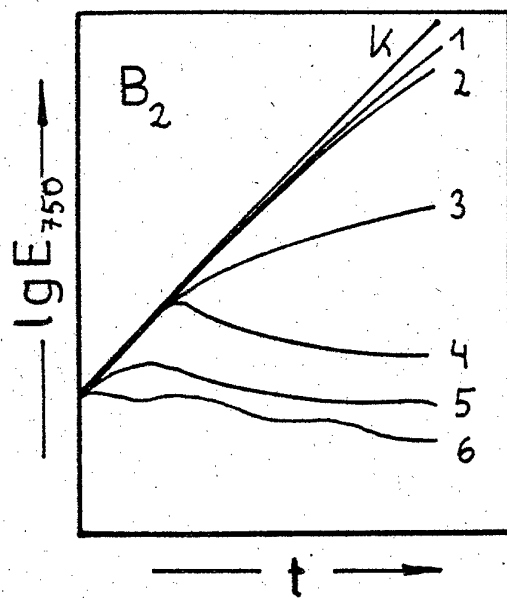
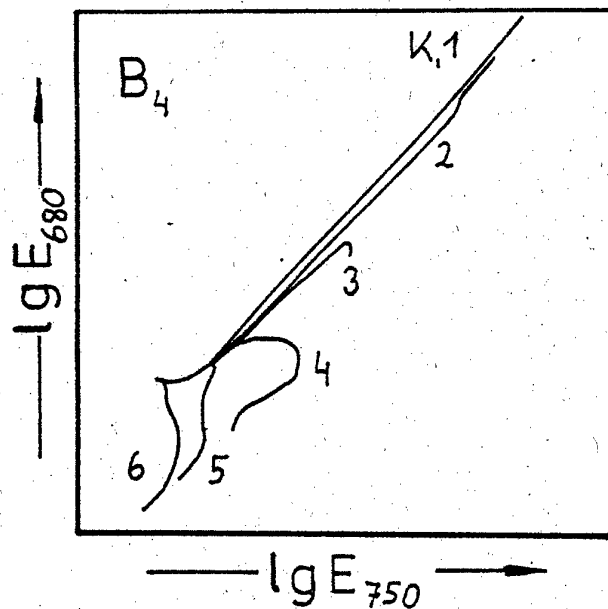
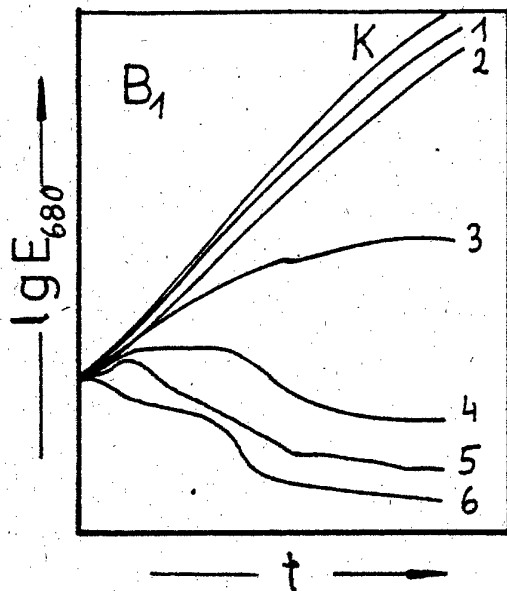


Fig.3

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Wachstums- und Ionenumsatzanalysen autotropher Zellsuspensionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optischen Eigenschaften und der Ionenumsatz des Stickstoffhaushalts substanzbehandelter autotropher Mikroalgensuspensionen genutzt werden, um mittels substanzinitiiert Variation der optischen Eigenschaften und der Ionenumsätze solcher Suspensionen die Effektoren in einem Arbeitsgang nach ihrer Wirksamkeit in primäre und sekundäre Photosynthese- bzw. Proteinsyntheseeffektoren sowie in photosynthese- bzw. proteinsyntheseneutrale Effektoren differenzieren 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 Spektrophotometrie, Spektrophotometrie 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 der Ionenumsatz der Algensuspensionen mittels pH-Elektroden, nitratsensitiver Elektroden oder anderer ionensensitiver Elektroden, polarographischer Methoden oder anderer elektrochemischer Verfahren, spektralanalytischer Methoden oder durch Kombination mehrerer dieser Methoden analysiert wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optischen Eigenschaften und die Ionenumsätze der autotrophen Algensuspensionen in einem Arbeitsgang kontinuierlich oder in definierter Zeitfolge parallel oder simultan analysiert werden.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Suche nach Regulatoren biologischer Prozesse, Umweltanalyse, Naturstoffchemie

Charakteristik der bekannten Lösungen

Der Einfluß chemischer Substanzen auf biologische Prozesse kann auf vielfältige Weise geprüft werden. Nach dem Patent DD WP C 12 K 1/100 Nr. 94 234 lassen sich aus einer Stichprobe von Chemikalien diejenigen selektieren, die den fundamentalen Prozeß des autotrophen Zellwachstums, die Photosynthese, unmittelbar oder mittelbar beeinträchtigen oder fördern. Substanzen, die die Photosynthese nicht beeinflussen, aber dennoch biochemisch wirksam sind, werden nach diesem Verfahren als biochemisch unwirksam eingestuft. Solche Substanzen müssen dann in einer Kette nachfolgender Tests spezifischer Zielstellung auf entsprechenden spezifischen Effekt geprüft werden, so zum Beispiel potentielle Atmungshemmer in einem Atmungstest, Effektoren des Nukleinsäurehaushalts bzw. des Stickstoffhaushalts in einem Nukleinsäuretest bzw. in einem Stickstofftest. Während eine Reihe von Verfahren wie DD WP C 12 Q 1/00 Nr. 200 472/1 eine genauere Charakterisierung von Effektoren hinsichtlich ihrer spezifischen Beeinflussung der optischen Eigenschaften und der photosynthetischen bzw. respiratorischen Gaswechselumsätze autotroph bzw. heterotroph kultivierter Zell- oder Organismensuspensionen und damit eine Selektion der Effektoren nach ihrer Wirksamkeit erlauben, bereitet eine ähnliche Differenzierung und Selektion der Wirkstoffe hinsichtlich ihrer spezifischen Beeinflussung des Stickstoffhaushalts bzw. der Proteinsynthese solcher Zell- oder Organismensuspensionen Schwierigkeiten.

So werden neben verschiedenen Verfahren zur Eiweißbestimmung wie teilautomatisierte chromatographische Verfahren vor allem variierte Methoden der Stickstoffbestimmung nach der Kjeldahltechnik genutzt.

Die Nachteile dieser Verfahren bestehen hauptsächlich im erheblichen Arbeitsaufwand, das Kjeldahlverfahren erfordert z. B. die drei Arbeitsabschnitte Veraschung, Destillation und Titration, und den dadurch determinierten objektiven und subjektiven Fehlerquellen, so daß insgesamt eine Interpretation solcher Daten, die nur in einem kleinen Bereich variieren, fraglich erscheint.

Daraus ergibt sich der Wunsch nach einem Verfahren, das zwar ebenfalls auf Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen beruht, dessen Meßtechnik und Auswertungsmodus neben der Charakterisierung der Effektoren hinsichtlich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften von Zellsuspensionen auch eine Charakterisierung der Beeinflussung des Stickstoffhaushalts und damit eine Differenzierung in primäre und sekundäre Effektoren der Photosynthese bzw. des Stickstoffhaushalts in einem Arbeitsgang erlaubt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für Tests mit autotrophen Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen ein Verfahren und einen Auswertungsmodus vorzuschlagen, das bzw. der in einem Arbeitsgang eine Selektion in primäre Photosyntheseeffektoren, Effektoren, die primär den Stickstoffhaushalt tangieren bzw. Proteinsyntheseeffektoren und sekundäre Photosynthese- bzw. Stickstoffhaushaltseffektoren ermöglicht und die Wirksamkeit solcher Effektoren hinsichtlich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften und der Ionenumsätze des Stickstoffhaushalts der Suspensionskulturen genauer charakterisiert.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mittels eines speziellen Meß- und Auswertungsverfahrens Effektoren in einem geschlossenen Arbeitsgang als primäre Photosyntheseeffektoren oder als primäre Effektoren des Stickstoffhaushalts wie Proteinsynthese-, Nukleinsäuresynthese- und andere Effektoren oder sekundäre Effektoren der Photosynthese oder des Stickstoffhaushalts zu charakterisieren und zu differenzieren.

Das „Selektionsverfahren für Effektoren mittels Wachstums- und Ionenumsatzanalyse autotropher Mikroalgensuspensionen“ nutzt hierbei die teils unterschiedlichen substanzinitiierten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften einzelliger Algensuspensionen im infraroten, sichtbaren und/oder ultravioletten Spektralbereich und die Möglichkeit, die Beeinflussung des Stickstoffhaushalts solcher Algensuspensionen direkt durch Nitrat-, Nitrit- oder Ammoniumumsatzanalysen oder besser auf indirektem Wege durch Analyse der korrespondierenden Hydroxid- bzw. Wasserstoffionenumsätze verfolgen zu können. Einzellige Mikroalgen sind für Untersuchungen der Beeinflussungen des Stickstoffhaushalts besonders geeignet, da sie weder über Speicherkapazitäten für Nitrat- oder andere stickstoffhaltige Ionen verfügen und es für solche Ionenumsätze prinzipiell keine Transport- und Permeationsbarrieren gibt. Das Auswertungsverfahren liefert darüber hinaus Informationen über

Einsetzen, Verlauf und Beständigkeit der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkungsdauer der Effektoren sowohl hinsichtlich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften als auch der Beeinflussung des Stickstoffhaushalts.

Beim „Selektionsverfahren für Effektoren mittels Wachstums- und Ionenumsatzanalysen autotropher Mikroalgensuspensionen“ werden definierte Mengen chemischer Verbindungen mit autotroph kultivierten Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen in unmittelbarem Kontakt gebracht und diese Proben 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 nach 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 sowie durch Analyse des Ionenumsatzes mittels pH-Elektroden, nitratsensitiven Elektroden bzw. anderen stickstoffionensensitiven Elektroden, polarographischen Methoden, konduktometrischen oder anderen elektrochemischen Verfahren bzw. spektralanalytischen Methoden 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 BORNIS 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 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 · 6H₂O/1000 cm³

Stammlösung 3: 250 g MgSO₄ · 7H₂O/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 · 7H₂O, 2,5 mg CuSO₄ · 5H₂O und 12,4 mg (NH₄)₂MoO₄.

Nährlösung N₃

Zur Herstellung der Nährlösung N₃ werden 6,9 g FeSO₄ · 7H₂O 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, durch ein Gemisch aus gereinigter Luft und 2 Vol.-% Kohlendioxid begast und mit je 1 cm³ verschieden konzentrierter wäßriger Lösungen der zu prüfenden Substanzen A, B und C beimpft oder als unbehandelte Kontrollen bei 37,5°C belichtet, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Photosynthese gegeben sind.

Während die in Nährlösung suspendierten Zellen in den unbehandelten Vergleichskulturen normal wachsen und sich entwickeln, werden Wachstum und Ionenumsatz in den mit Chemiekalien 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 750 nm als Wachstumsparameter sowie der pH-Wert als Maß für den Stickstoffhaushalt gemessen.

Die Ergebnisse der Analysen sind den Fig. 1 bis 4 zu entnehmen.

Figur 1, A₁ enthält die dekadischen Logarithmen der Extinktionsmessungen bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle K und die mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 1 bis 5, die von der nullten Stunde bis etwa zur achten Stunde rund alle 45 Minuten gemessen wurden, die Fig. 1, A₂ die entsprechenden Ergebnisse solcher Extinktionsmessungen bei 750 nm. Ein Vergleich der auf diese Weise parallel, also in einem Arbeitsgang gewonnenen Wirkbilder zeigt trotz unterschiedlicher Spektralbereiche weitgehende und prinzipielle Übereinstimmung der dosisabhängigen Wirkungsverläufe. Dies wird besonders deutlich bei einer Zusammenfassung beider Wirkbilder in Form einer Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm und 750 nm gegeneinander in Fig. 2, A₅. Aus diesem Vergleich läßt sich zunächst nur der Schluß ziehen, daß Substanz A auf jeden Fall biochemisch aktiv ist, wobei sich ihre Wirkung offensichtlich im Photosyntheseprozess zu manifestieren scheint. Die Analysenergebnisse für die pH-Messungen zeigen die Fig. 1, A₃ und A₄. Während die unbehandelte Kontrolle K einen Anfangs-pH-Wert von 5,1 hat, der nach acht Stunden den Wert 6,5 erreicht, variieren die Anfangs-pH-Werte der mit der Substanz A behandelten Suspensionen konzentrationsabhängig von 5,25 für Probe 1 bis 5,45 für Probe 5. Zur Vereinfachung der Auswertung wurde deshalb dieses Wirkbild in Form von Fig. 1, A₄ normiert, indem die pH-Zeit-Kurven für die Dosen 1 bis 5 parallel zur Zeitachse verschoben wurden, daß die Anfangs-pH-Werte für alle Dosen mit dem Kontrollwert 5,1 übereinstimmten. Das so erhaltene, normierte Wirkbild Fig. 1, A₄ ist qualitativ den Wirkbildern Fig. 1, A₁ und Fig. 1, A₂ ähnlich.

Eine Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm zu den entsprechenden pH-Werten zeigt das Wirkbild Fig. 2, A₆, das auch normiert wurde, Fig. 2, A₇.

Aus den Wirkungsverläufen in Fig. 2, A₇ lassen sich zwei Wirkmechanismen ableiten. Während die Dosen 1 und 2 sofort zu einer dosisabhängigen, wachstumsbedingten Hemmung der pH-Wert-Zunahme und damit zu einer entsprechenden Hemmung

Gegensatz zu den Dosen 1 und 2 läßt sich zunächst keine Wirkung nachweisen. Im zweiten Wirksamkeitsabschnitt wird dann der Stickstoffhaushalt stark beeinflusst, der dann im dritten Wirksamkeitsabschnitt eine starke Hemmung des Wachstums der Zellen determiniert. Daraus ist zu schlußfolgern, daß Substanz A ein vorrangiger Effektor des Stickstoffhaushalts und ein unspezifischer Photosynthesehemmer ist.

Von der Substanz B, über deren Analysenergebnisse und Auswertungen Fig. 3 informiert, wurde der Einfluß von 6 abgestuft zunehmenden Konzentrationen 1 bis 6 auf Wachstum und Stickstoffhaushalt von Chlorella-Suspensionen untersucht.

Figur 3, B₁ zeigt eine Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm in Abhängigkeit von der Wachstums- bzw. Einwirkzeit und Fig. 3, B₂ eine entsprechende Korrelation der Extinktionen bei 750 nm. Ein Vergleich der Wirkbilder Fig. 3, B₁ und B₂ für die Wachstumsbeeinflussungen untereinander und mit Fig. 3, B₃, das die Beeinflussung des pH-Wertes der Suspensionen durch Substanz B in Abhängigkeit von der Einwirkzeit zeigt, illustriert anschaulich Unterschiede im Einsetzen, Verlauf und in der Beständigkeit der Wirkungsprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkdauer des Effektors. Das wird besonders durch die unterschiedlichen dosisabhängigen Wirkungsverläufe in den Wirkbildern Fig. 3, B₄ bis B₆ verdeutlicht. Eine Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 und 750 nm zueinander, Fig. 3, B₄, zeigt in den ersten Abschnitten der Wirkkurven für die Dosen 2 bis 4 eine zunehmend stärkere Wachstumshemmung bei 680 nm als bei 750 nm. Das weist diese Substanz als einen spezifischen Photosynthesehemmer aus.

Vergleiche der Wachstumsbeeinflussungen bei 680 bzw. 750 nm mit der Beeinflussung des pH-Wertes in Fig. 3, B₅ und B₆ bestätigen in ähnlicher Weise besonders in den ersten Wirkungskurvenabschnitten, daß mit zunehmenden Dosen der Substanz B die optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm zunehmend stärker beeinflusst werden als der wachstumsbedingte Stickstoffhaushalt.

Damit kann Substanz B als primärer Photosyntheseeffektor eingestuft werden.

Über die Analysenergebnisse der Beeinflussung des Wachstums und des Stickstoffhaushalts der Chlorella-Suspensionen durch Substanz C informieren die Fig. 4, C₁ bis C₆. Auch hier zeigen die Fig. 4, C₁, C₂ und C₃ die zeitabhängigen Beeinflussungen der optischen Eigenschaften bei 680 nm, Fig. 4, C₁, und bei 750 nm, Fig. 4, C₂, sowie des pH-Wertes, Fig. 4, C₃.

Eine Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 und 750 nm gegeneinander, Fig. 4, C₄, zeigt, daß das Wachstum dosisabhängig bei 680 nm stärker gehemmt wird als bei 750 nm. Das weist Substanz C zunächst als einen Photosynthesehemmer aus. Aber ein Vergleich der Wachstumsbeeinflussungen mit der Beeinflussung des Stickstoffhaushalts durch Substanz C in Form von Auftragungen der Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm, Fig. 4, C₅, bzw. bei 750 nm, Fig. 4, C₆, in Abhängigkeit vom pH-Wert der Suspensionen zeigt in beiden Wirkbildern, daß die wachstumsbedingte pH-Wert-Zunahme und damit der Stickstoffhaushalt mit zunehmender Dosis im ersten Wirksamkeitsabschnitt stärker beeinflusst wird als die Chlorophyllbildung oder das Zellwachstum. Gleichzeitig verdeutlicht Fig. 4, C₅ vergleichsweise zu Fig. 4, C₆, daß die pH-Wert-Beeinflussung und damit die Störung des Stickstoffhaushalts zu einer vergleichsweise stärkeren Hemmung der Chlorophyllbildung führt, während das Zellwachstum durch die Dosen 1 bis 3 in Fig. 4, C₅ kaum beeinflusst wird, wie die weiteren Verläufe der Graphen in Fig. 4, C₅ und C₆ zeigen. Damit kann Substanz C als ein primärer Effektor des Stickstoffhaushalts eingestuft werden.

Vergleicht man die Aussagen der Figuren 1 bis 4 für die Substanzen A, B und C miteinander, so wird deutlich, daß die Auswertung solcher Tests bei verschiedenen Wellenlängen, für die die Extinktionsmessungen bei 680 und 750 nm lediglich eine mögliche Kombination von vielen darstellen, und gleichzeitiger pH-Wert-Messungen, die wiederum nur eine von mehreren Ionenumsatzmessungen darstellen, in einem Arbeitsgang zu sehr differenzierten Aussagen hinsichtlich der Wirkung der drei Substanzen führen kann. Besonders deutlich zeigen sich diesbezügliche Unterschiede bei Korrelationen der dekadischen Logarithmen der Extinktionen verschiedener Wellenlängen wie 680 und 750 nm zueinander sowie Auftragungen der dekadischen Logarithmen der Extinktionen in Abhängigkeit von den entsprechenden pH-Werten. Durch Vergleich entsprechender Wirkbilder von neu untersuchten Substanzen, über deren herbizide Wirksamkeit bisher nichts oder wenig bekannt ist, mit einer Wirkbildkartei oder mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung der Wirkdaten von gut untersuchten, auch kommerziell vertriebenen Herbiziden oder Standardherbiziden erhält man konkrete Hinweise über ähnliche Wirkspezifika, Wirkmechanismen, Selektivität und Anwendungsmöglichkeiten solcher Effektoren.

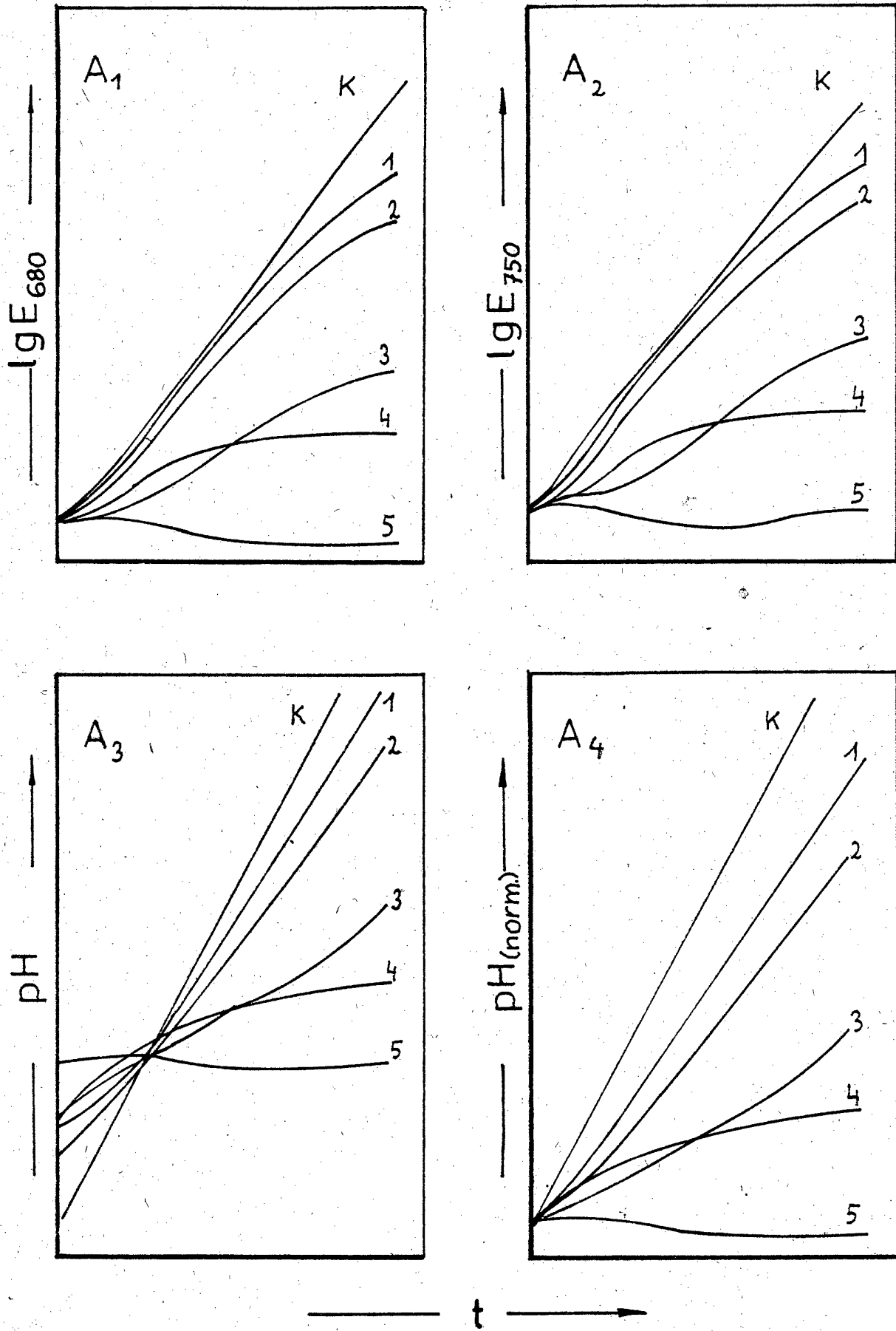
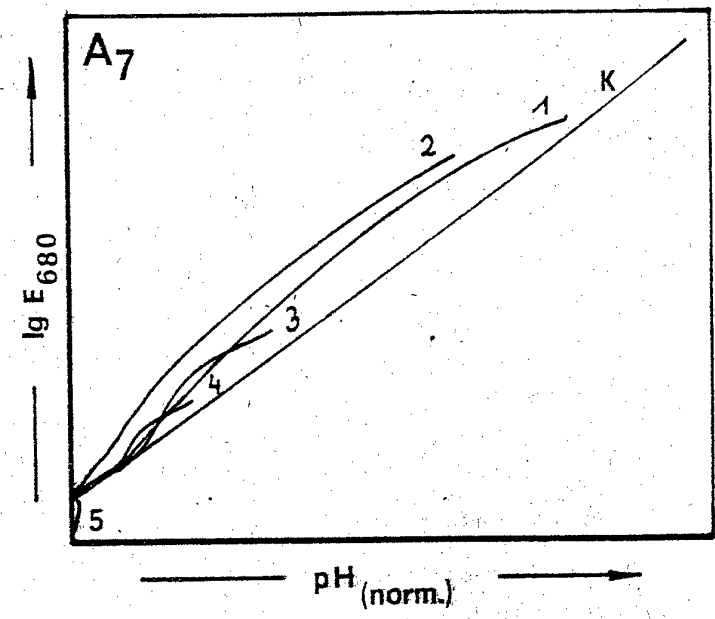
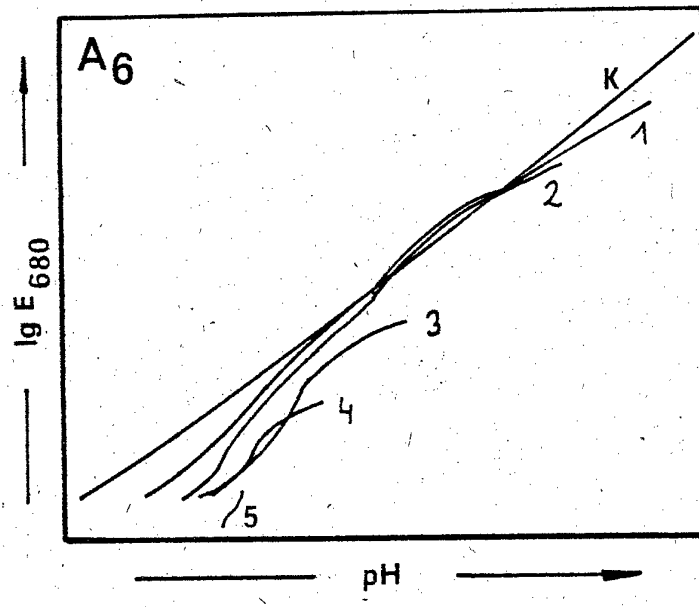
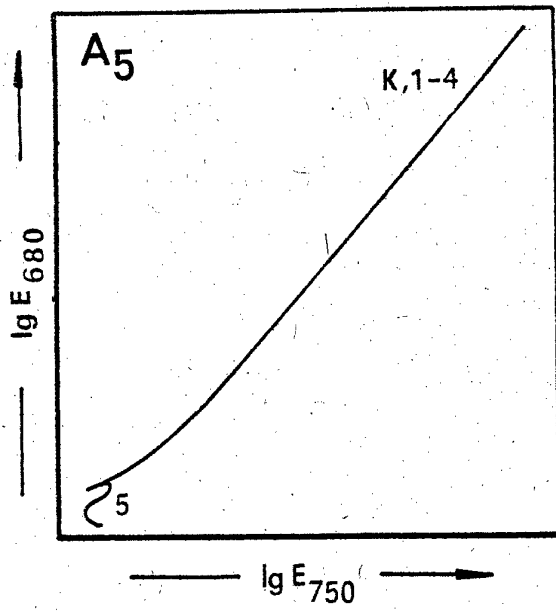


Fig. 1



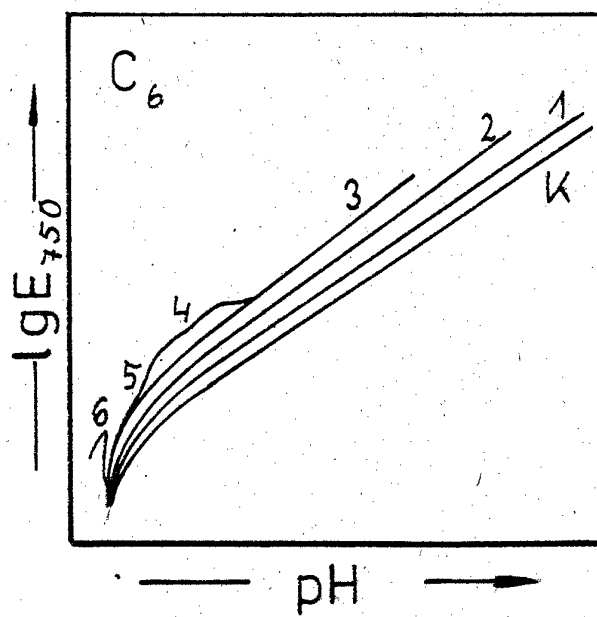
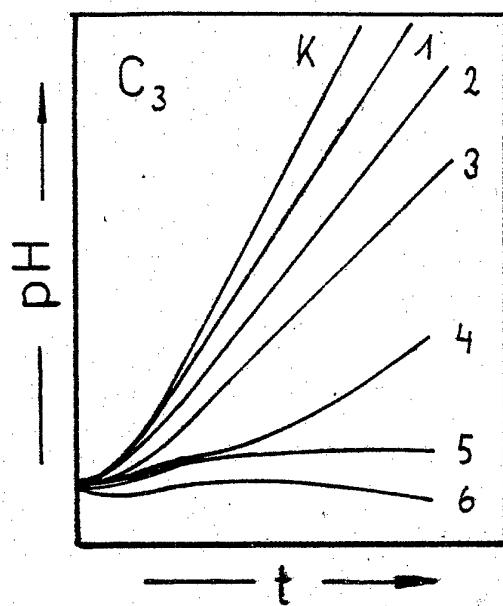
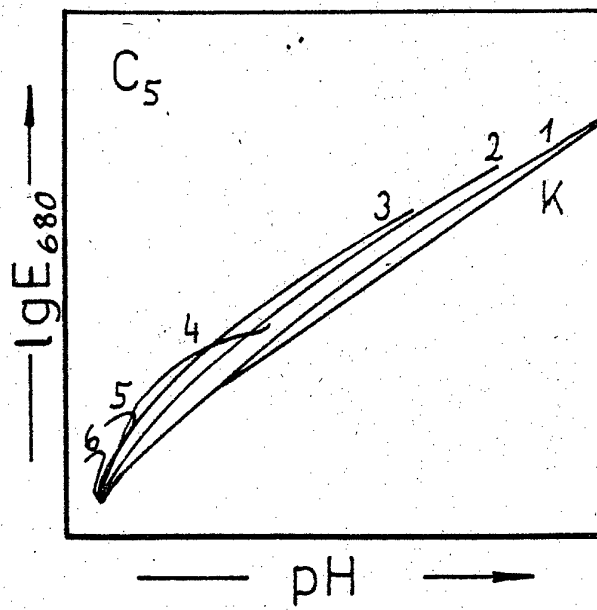
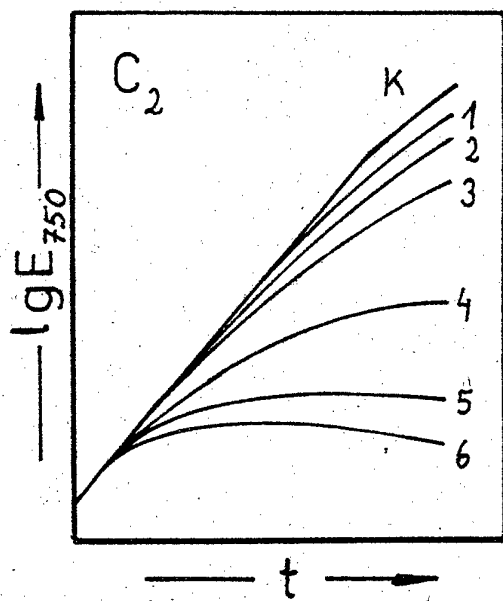
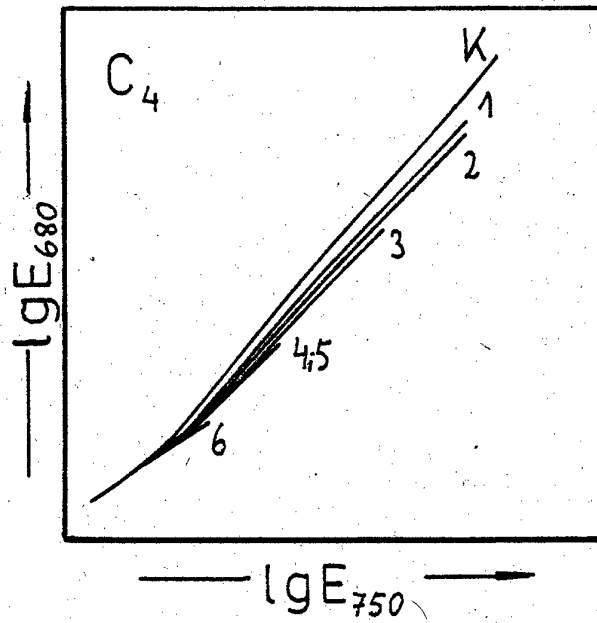
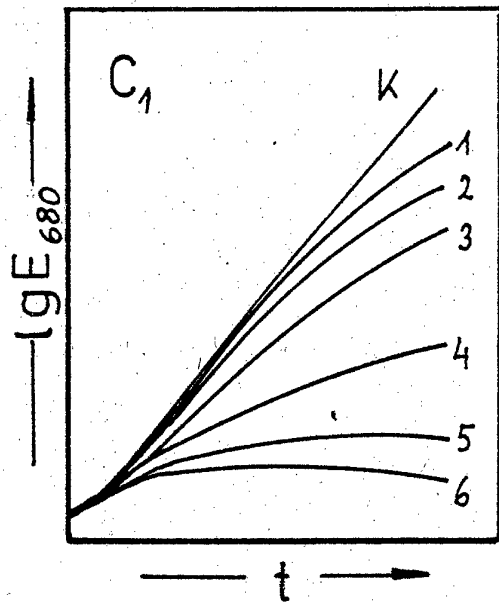


Fig. 1.