



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **246 565 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 / 286 608 0

(22) 30.01.86

(44) 10.06.87

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

(72) Arndt, Horst, Dr. rer. nat.; Tschirner, Erhard, Dr. rer. nat.; Hiekel, Hans-Günther, Dr. rer. nat.; Böhm, Heinz, Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) **Selektionsverfahren für Phytoeffektoren mit Wirkung auf die Karotinoidsynthese**

(57) Die Erfindung „Selektionsverfahren für Phytoeffektoren mit Wirkung auf die Karotinoidsynthese“ dient in erster Linie der Suche nach Pflanzenschutzmitteln. Zusätzlich bestehen Möglichkeiten des Einsatzes des Verfahrens zur Umweltüberwachung. Sie verfolgt das Ziel, ein Verfahren vorzuschlagen, das durch photometrische Messung der Extinktionen zweier definierter Wellenlängen mittels speziell hergerichteter Photometer und opalisierten Küvetten, auf der Basis von diffus gestreutem Licht mit Wellenlängen des Absorptionsmaximums des jeweiligen Pigmentes bei nur geringer Überlagerung des Absorptionsspektrums durch andere Pigmente und des absorptionsfreien Bereiches zur Korrektur der Reststreuung, an intakten Algensuspensionen, die dem Einfluß abgestufter Konzentrationen verschiedener Noxen oder anderer Umweltfaktoren ausgesetzt werden, unter Ausschaltung des zellzahl- und volumenproportionalen Streuungseinflusses, weitgehend pigmentkonzentrationsproportionale Meßwerte zuläßt, wodurch diese im Vergleich mit denen unbehandelter Proben exakt quantifizierbare Aussagen zur Beeinflussung der wachstums- und entwicklungsabhängigen Neusynthese der Karotinoide von Pflanzen zulassen. Das Verfahren ermöglicht auch eine Testung von Verbindungen, die eine Trübung des Kulturmediums der Algen hervorrufen.

Erfindungsanspruch:

1. Selektionsverfahren für Phytoeffektoren mit Wirkung auf die Karotinoidsynthese, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch photometrische Messung der Extinktionen zweier definierter Wellenlängen mittels speziell hergerichteter Photometer und opalisierten Küvetten, auf der Basis von diffus gestreutem Licht mit Wellenlängen des Absorptionsmaximums der Karotinoide bei nur geringer Überlagerung des Absorptionsspektrums durch andere Pigmente und des absorptionsfreien Bereiches zur Korrektur der Reststreuung, in intakten Algensuspensionen, die dem Einfluß abgestufter Konzentrationen verschiedener Noxen oder anderer Umweltfaktoren ausgesetzt werden, unter Ausschaltung des zellzahl- und volumenproportionalen Streuungseinflusses, weitgehend pigmentkonzentrationsproportionale Meßwerte erhalten werden, die im Vergleich mit denen unbehandelter Proben exakt quantifizierbare Aussagen zur Beeinflussung der wachstums- und entwicklungsabhängigen Neusynthese der Karotinoide von Pflanzen zulassen.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch die Bildung der Differenzen der Meßwerte des absorbierenden Wellenlängenbereiches minus derer des absorptionsfreien Bereiches pigmentkonzentrationsproportionale Extinktionswerte erhalten werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren mit verschiedensten Spezies von Mikroalgen sowie Homogenaten von pigmenthaltigen Organen niederer und höherer Pflanzen und auch mit suspendierten Chloroplasten und Chloroplastenfragmenten durchführbar ist.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die durch das beschriebene Vorgehen erhaltenen Extinktionswertdifferenzen einer unterschiedlichen mathematischen Bearbeitung zugeführt werden können und Vergleiche mit dem Verhalten von anderen Wachstums- und Entwicklungsparametern durchführbar sind.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Umweltschutz, Mikroalgen Biotechnologie

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Detaillierte in vitro-Untersuchungen des Pigmentgehaltes von Pflanzen sind zeit-, material- und personalaufwendig. Sie erfordern neben einer Zerkleinerung der Pflanzen den Aufschluß der Zellen sowie die Extraktion, die Trennung und Quantifizierung der verschiedenen Pigmentanteile. Zur gravimetrischen Bestimmung braucht man zusätzlich nicht nur sehr viel Phytomasse, sondern unterliegt auch der Gefahr eines oxydativen Abbaus oder Zerfalls der Farbstoffe. Daher wird in den meisten Fällen der Pigmentgehalt nach Aufschluß- und Extraktionsverfahren ohne Auftrennung photometrisch bestimmt und nach Ausgleichsformeln verschiedener Autoren (MC KINNEY, 1941; ARNON, 1949; BÖGER, 1964; ELEY, 1971) berechnet. Bei den durch Pigmentextraktion charakterisierten Verfahren muß mit Fehlern um 15% gerechnet werden (KUNERT und BÖGER, 1979).

Photometrische in vivo-Pigmentbestimmungsverfahren an Algen sind durch die von den Zellen verursachte Scheinextinktion mit einem großen Fehler behaftet. DOUCHA und KUBIN (1976) eliminieren die Meßwertverfälschung durch Streuung dadurch, daß jede Probe intakter Algen gegen ihre eigene Referenzprobe mit ausgebleichten Zellen vermessen wird. Dieses Vorgehen erfordert einen erhöhten Zeit- und Materialaufwand und setzt voraus, daß beim Ausbleichen der Zellen die pigmentfreien intrazellulären Strukturen nicht angegriffen werden.

Nach den Patenten „Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen“, DD-WP 94234 „Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren mittels autotropher Zellsuspensionen“, DD-WP 200472 und „Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Wachstumsanalyse von Zellsuspensionen“, DD-WP 214 146 können diejenigen Chemikalien aus einer Stichprobe selektiert werden, die den außerordentlichen komplexen Lebensprozeß des Zellwachstums oder die ihm zu Grunde liegenden Metabolismen beeinträchtigen. Derartige Verfahren erheben keinen Anspruch auf eine Zuordnung der Wirkung der eingesetzten Chemikalien zu einem Teilprozeß des komplexen Lebensprozesses des Zellwachstums. Aussagen zum Einfluß auf die Karotinoidsynthese sind nicht verifizierbar.

Das von SHIBATA und Mitarbeitern (1954) im Rahmen von Grundlagenuntersuchungen zur Pigmentbestimmung an Algen vorgeschlagene Verfahren, die durch die Algenzellen verursachte Scheinextinktion in ihrem Einfluß auf die Messung der Lichtabsorption durch Pigmente dadurch zu minimieren, daß mit durch geeignete Opalglasfilter maximal gestreutem, d.h. diffusem Licht bei einer das jeweilige Pigment charakterisierenden Wellenlänge photometriert wird, bildet die Grundlage für das nachfolgend vorgeschlagene Selektionsverfahren für Photoeffektoren mit Wirkung auf die Karotinoidsynthese.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, ein einfaches, schnelles und hinreichend sicheres Verfahren für den photometrischen in vivo-Test mittels diffusem Licht zur Selektion von Phytoeffektoren bzw. anderweitiger Umwelteinflüsse mit Wirkung auf die Karotinoidsynthese von höheren Pflanzen auf der Basis einzelliger Mikroalgenkulturen vorzuschlagen, das nicht nur große

Versuchsserien zuläßt, arbeits-, material-, zeit- und personalökonomisch sowie automatisierbar ist und sowohl bei Kultivierungsverfahren mit periodischer oder kontinuierlicher Verdünnung Verwendung finden kann, sondern auch erlaubt, Aussagen zur Substanzwirkung in den Fällen vorzunehmen, die bisher infolge von Trübung der Meßprobe einer Analyse meßtechnisch nicht zugänglich waren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch photometrische Messung der Extinktion zweier definierter Wellenlängen mittels speziell hergerichteter Photometer und opalisierten Küvetten, auf der Basis von diffus gestreutem Licht mit Wellenlängen des Absorptionsmaximums des jeweiligen Pigmentes bei nur geringer Überlagerung des Absorptionsspektrums durch andere Pigmente und des absorptionsfreien Bereiches zur Korrektur der Reststreuung, an intakten Algensuspensionen, die dem Einfluß abgestufter Konzentrationen verschiedener Noxen oder anderer Umweltfaktoren ausgesetzt werden, unter Ausschaltung des zellzahl- und volumenproportionalen Streuungseinflusses, weitgehend pigmentkonzentrationsproportionale Meßwerte zu erhalten, die im Vergleich mit denen unbehandelter Proben exakt quantifizierbare Aussagen zur Beeinflussung der wachstums- und entwicklungsabhängigen Neusynthese der Karotinoide von Pflanzen zulassen. Daneben sollen Aussagen zur biologischen Aktivität solcher Verbindungen, die infolge schlechter Löslichkeit und Trübung des Kulturmediums einer in vivo-Testung an Algen bisher unzugänglich waren, auf der Basis der Pigmentsynthese nach Eliminierung der durch die Zellen selbst und die Wirkstoffe verursachten Streuungen des Meßlichtes, mittels des Verfahrens möglich werden.

Ausführungsbeispiel

Die Wirkung von Amitrol auf die β -Karotinsynthese von Chlorella-Suspensionen soll untersucht werden. Dazu ist es zuerst notwendig zu klären, bei welcher Wellenlänge die β -Karotinsynthese ohne größere Störeinflüsse in vivo photometrisch verfolgt werden kann. Relevant in ihrem Störungseinfluß sind die Absorptionseigenschaften der Chlorophylle. Lediglich bei Wellenlängen über 470 nm ist der Einfluß der Chlorophylle bezüglich einer günstigen Karotinbestimmung gering. Hier haben α - (472 nm) und β -Karotin (480 nm) in vitro-Absorptionsmaxima. Bei 480 nm muß jedoch noch mit etwa 30 % Einfluß der in vivo-Absorption des Chlorophyll b gerechnet werden. Diese Chlorophyllabsorption fällt mit größer werdender Wellenlänge steil ab. Bei in vivo-Messungen bei einer Wellenlänge von 490 nm wird das Signal neben dem streuungsabhängigen Anteil ausschließlich durch die Absorption von β -Karotin gebildet, was Möglichkeiten für einen Test eröffnet. Die Korrektur der Reststreuung kann durch Messungen der Extinktion bei 750 nm oder 545 nm erfolgen. Zu empfehlen ist jedoch die Messung bei 545 nm, da die Scheinextinktion mit kürzer werdender Wellenlänge von 750 nm bis 490 nm erheblich ansteigt. Es gibt bei der Wellenlänge von 545 nm eine geringfügige echte Pigmentabsorption, deren Einfluß auf das Meßergebnis aber geringer als der Streuungszuwachs ist. Nach diesen Vorbetrachtungen wird die Untersuchung wie folgt durchgeführt:

Man suspendiert eine Synchronkultur von Chlorella vulgaris in ein mineralisches Nährmedium und zieht die Zellen in einer geeigneten Anzuchtapparatur autotroph bei einer Temperatur von 37°C unter Zufuhr von 5 l Luft pro Stunde, die 2 Vol.-% CO₂ enthält, an. Es werden vor Belichtungsbeginn die Kontrollsuspension mit einem minimalen Volumen Wasser sowie die weiteren Chargen der Algensuspensionen mit den gleichen Volumina, die abgestufte Konzentrationen des gelösten Phytoeffektors Amitrol enthalten, beimpft. Die Karotinsynthese der Algen soll bei einer Lichtintensität von $2 \times 90 \text{ Watt/m}^2 \text{ PhAR}$ über den Zeitraum von 6,5 Stunden untersucht werden. Dazu erfolgen innerhalb dieses Zeitintervalls distinkte Messungen der optischen Dichte der einzelnen Chargen bei 490 nm und 545 nm mit opalisierten Küvetten (0,5 cm Schichtdicke) am Photometer (Spekol 10). Für jedes gemessene Wertepaar wird nun die β -karotinkonzentrationsproportionale Extinktionsdifferenz $\Delta \text{Ext.}$ ($\Delta \text{Ext.} = E_{490} - E_{545}$) errechnet. Sie wird in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit t für die einzelnen Chargen zeichnerisch aufgetragen (Fig. 1). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind der Figur 1 zu entnehmen. Die mit K gekennzeichnete Kurve zeigt den Extinktionsdifferenzverlauf der unbehandelten Kontrolle. Der zeitliche Verlauf der β -karotin-proportionalen Extinktionsdifferenz nach Zugabe von $5 \times 10^{-2}\%$, $1 \times 10^{-2}\%$, $5 \times 10^{-3}\%$ und $1 \times 10^{-3}\%$ Amitrol wird durch die Kurven I bis IV dargestellt. Die Kurve I zeigt, daß die Karotinsynthese durch die Behandlung mit $5 \times 10^{-2}\%$ Amitrol fast vollkommen unterbunden wird. Auch mit der niedrigsten eingesetzten Konzentration (Kurve IV) werden die Kontrollwerte nicht erreicht.

In Figur 2 sind Dosis-Wirkungskurven von Amitrol für verschiedene an Chlorella vulgaris untersuchte Lebensteilprozesse dargestellt. Kurve 1 bezieht sich auf die Chlorophyllsynthese, Kurve 2 auf die β -Karotinsynthese, Kurve 3 auf die Photosynthese und Kurve 4 auf die Glukoseatmung. Es läßt sich ableiten, daß niedrige Wirkstoffkonzentrationen die Chlorophyllsynthese stärker beeinträchtigen als die β -Karotinsynthese.

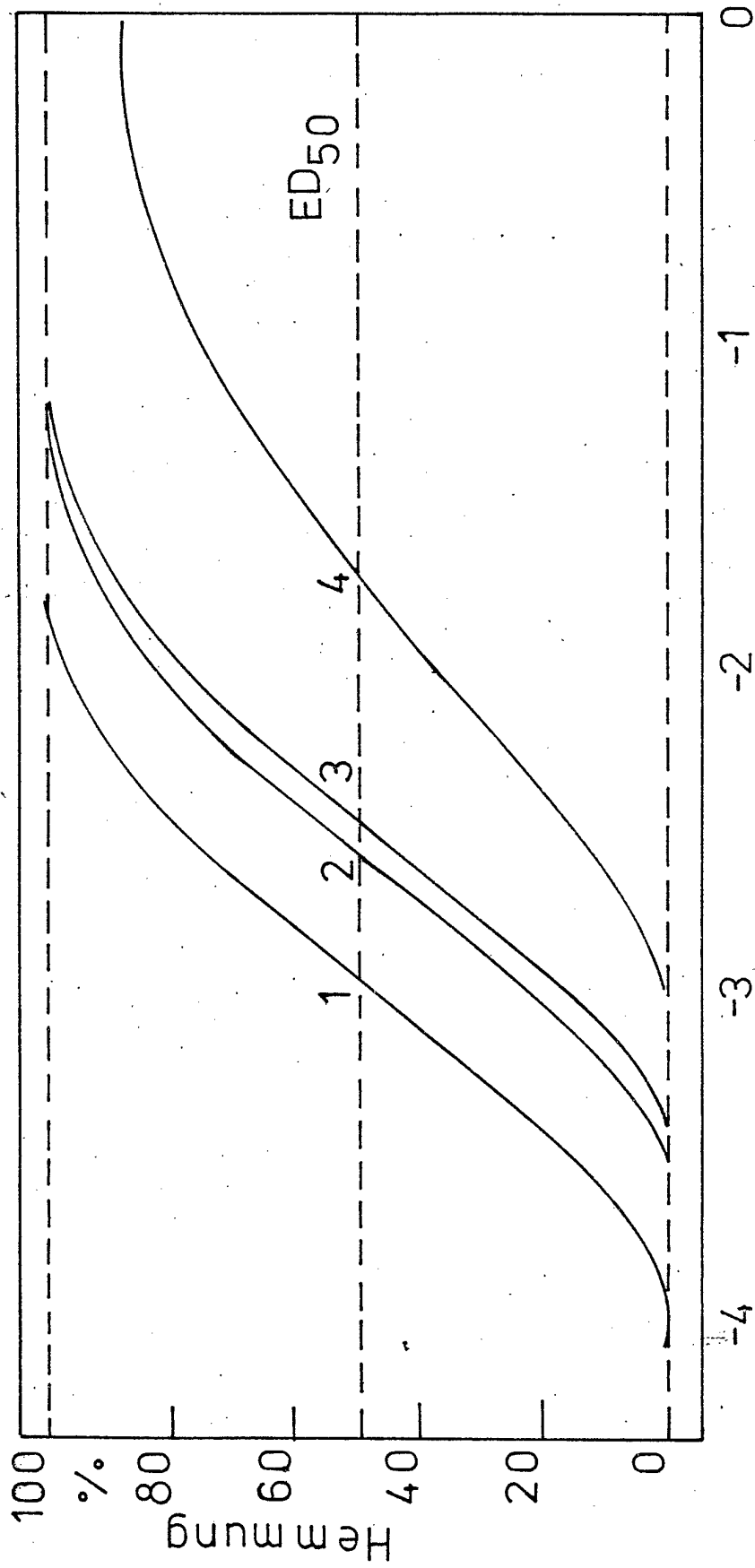


Fig. 2

