



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 225 794 A1

4(51) G 01 N 33/487
G 01 N 21/17

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 260 156 4 (22) 17.02.84 (44) 07.08.85

(71) Pädagogische Hochschule „Wolfgang Ratke“ Köthen, 4370 Köthen, Lohmannstraße 23, DD
(72) Tschirner, Erhard, Dipl.-Lehrer; Arndt, Horst, Dr. rer. nat.; Böhm, Heinz, Prof. Dr. sc., DD

(54) Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse des prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenzinduktionsverlaufes

(57) Die Erfindung, Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse des prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenzinduktionsverlaufes, dient in erster Linie der Suche nach Phytoeffektoren. Sie verfolgt das Ziel, ein Verfahren vorzuschlagen, das für die Testung der biologischen Aktivität von Effektoren mittels fluorometrischer Analysen von autotrophen zellulären und subzellulären Suspensionen von Partikeln niederer und höherer Pflanzen neben einer Selektion von primären Photosyntheseelektronentransporteffektoren deren Formulate und Gemische, die Änderung des Fluoreszenzinduktionsverlaufes im Bereich O, I, D, P, S, M hervorrufen und nicht allein durch Analyse der steady-state-Chlorophyllfluoreszenz erfaßt werden können, gleichzeitig eine Dosis-Wirkungsanalyse ermöglicht, die unter Verwendung von bestimmten mathematischen Modellen, Verfahren und Methoden genaue Aussagen zur Wirksamkeit zuläßt und Hinweise für einen möglichen künftigen Einsatz von Effektoren gibt. Das vorgeschlagene Verfahren ist automatisierbar und erfordert einen geringeren Zeit- und Testmaterialaufwand gegenüber anderen nicht auf fluorometrischen Analysen beruhenden Selektionsverfahren.

Erfindungsansprüche:

1. Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse des prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenzinduktionsverlaufes, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch fluorometrische Messungen des Fluoreszenzinduktionsverlaufes von behandelten und unbehandelten Suspensionen autotropher zellulärer und subzellulärer Partikel die direkte Wirkung von Substanzen auf die für die Fluoreszenz verantwortlichen Abschnitte der Elektronentransportkette der photosynthetischen Lichtreaktionen sowie der Funktionsfähigkeit der Absorptionseinheiten der Pigmentmoleküle selbst erfaßt und auf dieser Grundlage von indirekt wirkenden Effektoren abgegrenzt werden können, so daß bei Einsatz von abgestuften Effekorkonzentrationen sowie deren Formulate und Gemische eine Dosis-Wirkungs-Analyse erfolgen kann sowie gleichzeitig Aussagen zu einer Wirkorteingrenzung im Bereich der Lichtreaktionen gemacht werden können.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als autotrophe zelluläre Partikelsuspensionen alle suspendierbaren autotrophen Mikroalgen und photosynthetisierende Teile höherer Pflanzen verwendet werden können.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß von den in Punkt 2 genannten Objekten photosynthetisch aktive Partikel verschiedener Integrationsstufe und verschiedenen Reinheitsgrades verwendet werden können.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fluoreszenzmessungen mit Apparaturen unterschiedlichem Aufbau, verschiedener Lichtqualitäten und -quantitäten, mit variablen Belichtungszeiten und unterschiedlichen Empfangs- und Registriermethoden sowie Registrierzeiten durchgeführt werden können.
5. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Erfassen der Punkte O, I, D, P, S, M der Fluoreszenzinduktionskurve oder durch selektive Integration der Kurvenabschnitte und nachfolgender Anwendung von mathematischen Modellen, Verfahren und Methoden zur Auswertung der Meßergebnisse eine Dosis-Wirkungsanalyse über den gesamten Wirkbereich durchgeführt werden kann.
6. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich die Wirkung der Effektoren sowohl in einer Erhöhung oder Senkung der gesamten Fluoreszenzinduktionskurve oder einzelner Teile sowie in der Grundfluoreszenz (F_0) und/oder der variablen Fluoreszenz zeigen kann.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Umweltschutz, Mikroalgen

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Indikation der biologischen Aktivität von Effektoren wird nach dem Patent „Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen“, DD-Patent 94234, mittels autotroph kultivierter Zellsuspensionen von Grünalgen durchgeführt. Es werden aus einer Stichprobe diejenigen Chemikalien selektiert, die den fundamentalen Prozeß des autotrophen Zellwachstums, die Photosynthese in ihrer Gesamtheit, unmittelbar oder mittelbar vermindern oder fördern. Durch das Festlegen von minimalen Wirkkonzentrationen erhält man über die Wirksamkeit der Effektoren die qualitative Aussage „wirksam“ oder „nicht wirksam“. Bei Einsatz abgestufter Konzentrationen der Effektoren ist durch Vergleich zur Kontrollsuspension eine Dosis-Wirkungsanalyse möglich. Nach diesem Verfahren erhält man eine Gruppe „biochemisch wirksamer“ Substanzen, die hinsichtlich ihrer Wirkweise und des Wirkortes heterogen ist. Eine differenzierte Selektion von Effektoren mittels autotropher Zellsuspensionen kann mittels Analyse der Änderung der optischen Eigenschaften von Zellsuspensionen durchgeführt werden.

Eine Selektion mittels Wirkbildern wird durch ein Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Wachstumsanalyse von Zellsuspensionen durch Analyse der Extinktionsmessungen bei 621, 680, 702 und 750 nm gezeigt. Auf Grundlage von Vergleichen der Analyseergebnisse des photosynthetischen Gaswechselumsatzes substanzbehandelter autotropher einzelliger Grünalgensuspensionen wird durch das „Verfahren zur gasanalytischen Selektion von Effektoren mittels Zellsuspensionen“ eine Selektion von primären Photosyntheseeffektoren nach Charakterisierung ihrer Wirkbilder ermöglicht. Alle weiteren auf diesen Grundlagen basierenden Verfahren erfordern mehr oder minder große Substanzmengen und sind mit einem Zeitaufwand von Stunden bis Tagen verbunden.

Ein Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse der prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenz, bezieht sich punktuell auf Messungen der Chlorophyll-a-steady state-Fluoreszenz von behandelten und unbehandelten Suspensionen autotropher zellulärer und subzellulärer Partikel. Dadurch können nur Substanzen erfaßt werden, die den „steady state“, den T-Bereich der Fluoreszenzinduktionskurve erhöhen oder vermindern.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für die Testung der biologischen Aktivität von Effektoren mittels fluorometrischer Analysen von autotrophen zellulären und subzellulären Suspensionen von Partikeln niederer und höherer Pflanzen ein Verfahren vorzuschlagen, das neben einer Selektion von primären Photosyntheseelektronentransporteffektoren deren Formulate und Gemische, die Änderungen des Fluoreszenzinduktionsverlaufes im Bereich O, I, D, P, S, M hervorrufen und nicht allein durch Analyse der steady-state-Chlorophyllfluoreszenz erfaßt werden können, gleichzeitig eine Dosis-Wirkungsanalyse ermöglicht, die unter Verwendung von bestimmten mathematischen Modellen, Verfahren und Methoden genaue Aussagen zur Wirksamkeit zuläßt und Hinweise für einen möglichen künftigen Einsatz von Effektoren gibt.

Das vorgeschlagene Verfahren ist automatisierbar und erfordert einen geringeren Zeitaufwand gegenüber anderen nicht auf fluorometrischen Analysen beruhenden Selektionsverfahren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mittels fluorometrischer Analysen auf Grundlage von Vergleichen der Fluoreszenzintensitäten der Fluoreszenzinduktionskurve im Bereich O, I, D, P, S, M von unbehandelten zu substanzbehandelten autotrophen zellulären oder subzellulären Partikelsuspensionen eines einheitlichen Standards reflektierte primäre Photosyntheseelektronentransporthemmer zu selektieren und diese danach einer Dosis-Wirkungsanalyse auf der Basis bestimmter mathematischer Modelle, Verfahren und Methoden zu unterziehen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Aussagen zu Permeations- und Transportproblemen der Effektoren durch Vergleiche zwischen zellulären und subzellulären Systemen sowie nach unterschiedlichen Applikationszeitpunkten zu erhalten.

Beim „Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse des prompten Chlorophyll-a-

Fluoreszenzinduktionsverlaufes“ verfährt man so, daß man jeder Fluoreszenzmeßprobe außer der Kontrolle eine definierte Menge chemischer Verbindungen in konstanten Zeitabständen vor der Messung im gelösten Zustand appliziert und eine gleiche Vorbehandlung (z.B. Vorverdunkelung) aller Proben gewährleistet. Bei Durchführung jeder Einzelmessung wird die Wirkung auf den Zustand der Zellen oder der subzellulären Partikel als Änderung der Fluoreszenzintensität im Induktionsverlauf erfaßt.

Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Als zu prüfende Substanz wird p-Nitrobenzonitril verwendet. Für die Fluoreszenzmessungen kommen Zellsuspensionen der einzelligen Grünalge der Species *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK 1890, var. *vulgaris*, Stamm BÖHM et BURNS 1972/1 nach entsprechenden Kultivierungsverfahren zum Einsatz. Die Fluoreszenzmeßvorrichtung ist durch eine Halogenlichtquelle mit Blaufilter, einem Meßraum und einer im Winkel von 90° zur Lichtquelle hochempfindlichen Lichtempfängereinrichtung mit Rotfilter gekennzeichnet und mit einem technischen Schnellschreiber gekoppelt. Die Substanzapplikation erfolgt in abgestuften Konzentrationen in gelöster Form drei Minuten vor Messung in die Zellsuspensionen. Alle Meßproben unterliegen einer Minute Vorverdunkelung. Die Fluoreszenzinduktionskurvenaufzeichnung findet danach über einen Zeitraum von fünf Sekunden statt.

Für die Quantifizierung wird die Änderung der Fluoreszenzintensität im Punkt P gegenüber der Kontrolle herangezogen. Die Substanz erniedrigt zuerst die Intensität von P entsprechend den abgestuften Konzentrationen bei gleichbleibender Intensität des MT-Bereiches. Wird dessen Intensität erreicht, so findet eine weitere Erniedrigung der Fluoreszenzintensität bis zur völligen Fluoreszenzlöschung statt.

Die Bearbeitung der Meßdaten erfolgt mittels Lineweaver-Burck-Auftragung, aus der sich ein ED_{50} -Wert von $7,14 \times 10^{-5}$ M ermitteln läßt.

Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit dem durch Absorptionsmessungen ermittelten Wert im autotrophen Wachstumstest von *Chlorella*-Synchronkulturen.

2. Ausführungsbeispiel

Untersuchungen der Wirkung von 1,3-Dinitrobenzol führen zum phänomenologisch gleichen Erscheinungsbild wie dem Fluoreszenzverhalten unter p-Nitrobenzonitrileinfluß.

Nach mathematischer Bearbeitung der Meßergebnisse mittels Lineweaver-Burck-Auftragung zur Dosis-Wirkungsanalyse kann ein ED_{50} -Wert von $3,4 \times 10^{-6}$ M ermittelt werden, der mit dem aus dem autotrophen Wachstumstest von Synchronkulturen der kokkalen Grünalge *Chlorella vulgaris* erhaltenen Wert in Einklang steht.