



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

214 455

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) G 01 N 33/52

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N/ 2496 432

(22) 07.04.83

(44) 10.10.84

(71) PAEDAGOGISCHE HOCHSCHULE "WOLFGANG RATKE" KOETHEN;DD;  
(72) TSCHIRNER, ERHARD,DIPL.-LEHRER;METZGER, ULRICH,DR. RER. NAT.;ARNDT, HORST,DR. RER. NAT.;  
HIEKEL, HANS-GUENTER,DR. RER. NAT.;DD;  
BOEHM, HEINZ,PROF. DR. SC.;OHMANN, ERICH,DR. SC.;DD;

(54) SELEKTIONSVERFAHREN FUER PHOTOSYNTHESEEFFEKTOREN MITTELS ANALYSE DER PROMPTEN  
CHLOROPHYLL-A-FLUORESZENZ

(57) Die Erfindung, Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse der prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenz, dient in erster Linie der Suche nach Phytoeffektoren. Sie verfolgt das Ziel, ein Verfahren vorzuschlagen, das durch die Erfassung der biologischen Aktivität von Effektoren mittels fluorometrischer Analysen an autotrophen zellulären oder auch an Suspensionen von subzellulären Partikeln neben einer Selektion von primären Photosynthesehemmern, die sich in Fluoreszenzänderungen reflektieren, gleichzeitig Dosis-Wirkungs-Analysen dieser Substanzen zuläßt. Quantitative Aussagen zur Wirksamkeit sind unter Verwendung des vorgeschlagenen mathematischen Modells zu erhalten. Weiterhin liefert das Untersuchungsverfahren orientierende Hinweise zum Wirkort der Effektoren im Bereich der Photosynthese.

Titel der Erfindung

Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse der prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenz

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 WPC 12 K/152 888, 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. Bei Festlegung 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. Man erhält nach diesem Verfahren nur eine Gruppe "bioche-

misch wirksamer" Substanzen, die hinsichtlich ihrer Wirkweise und des Wirkortes heterogen ist. Durch das Patent "Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren mittels autotropher Zellsuspensionen", DD WP C 12 Q 231 4847, wird mittels Analyse der Änderung der optischen Eigenschaften der Zellsuspensionen der Versuch unternommen, primäre und nicht primäre Photosyntheseeffektoren zu trennen.

Eine Selektion mittels Wirkbildern wird durch das "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 diese Verfahren erfordern mehr oder minder große Substanzmengen und sind mit einem Zeitaufwand von Stunden bis Tagen verbunden.

#### 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 niederer Pflanzen ein Verfahren vorzuschlagen, das neben einer Selektion von primären Photosyntheseelektronentransporteffektoren, die durch Fluoreszenzintensitätsänderungen reflektiert werden, gleichzeitig eine Dosis-Wirkungsanalyse dieser Effektoren ermöglicht, die unter Verwendung von bestimmten mathematischen Modellen genaue Aus-

sagen zur Wirksamkeit zuläßt und Hinweise für einen möglichen künftigen Einsatz von Effektoren gibt.

Das vorgeschlagene Verfahren ist automatisierbar und erfordert lediglich einen Zeitaufwand von Minuten.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mittels fluorometrischer Analysen auf Grundlage von Vergleichen der Fluoreszenzintensität von unbehandelten zu substanzbehandelten autotrophen zellulären oder subzellulären Partikelsuspensionen eines einheitlichen Standards reflektierte primäre Photosyntheseelektronentransporthemmer zu selektieren und diese danach einer Dosis-Wirkungs-Analyse auf der Basis bestimmter mathematischer Modelle zu unterziehen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Aussagen zu Permeations- und Transportproblemen des Effektors durch Vergleiche zwischen zellulären und subzellulären Partikelsuspensionen zu erhalten.

Beim "Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse der prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenz" 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 aller Proben gewährleistet. Bei Durchführung jeder Einzelmessung wird die Wirkung auf den Zustand der Zelle oder des subzellulären Partikels erfaßt als Änderung der Fluoreszenzintensität.

## Ausführungsbeispiele

### 1. Ausführungsbeispiel

Die zu prüfende Substanz A greift am B-Protein in den photosynthetischen Elektronentransport vom Wasser über die Photosysteme I und II zum  $\text{NADPH}_2$  ein. Für die Fluoreszenzmessungen wurden Zellsuspensionen der einzelligen Grünalge der Species *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK 1890, var. *vulgaris*, Stamm BÖHM et. BORNS 1972/1 nach entsprechendem Kultivierungsverfahren verwendet. Die spezifisch entwickelte Fluoreszenzmeßanordnung ist durch eine Halogenlichtquelle mit Blaufilter, einem Meßraum und einer im Winkel von  $90^\circ$  zur Lichtquelle hochempfindlichen Lichtempfängereinrichtung mit Rotfilter gekennzeichnet und mit einem Registriergerät gekoppelt. Die Substanz A wurde in abgestuften Konzentrationen in gelöster Form vor unmittelbarer Messung mit den Zellsuspensionen vermischt. Alle Meßproben unterlagen dem gleichen Zeitregime der Vorbereitung und Durchführung der Messung, wobei die Meßzeit nur 1 Minute betrug. Für die Quantifizierung wurde die Änderung der "steady state-fluorescence" gegenüber der Kontrolle herangezogen. Die Substanz A erhöht die Fluoreszenz entsprechend den abgestuften Konzentrationen.

Tabelle 1

C		W(c )	1/C	1/W(c )	P <sub>n</sub>
10 <sup>-3</sup>	M	5.425	·10 <sup>3</sup>	-	
5·10 <sup>-4</sup>	M	5.425	2·10 <sup>3</sup>	-	
2·10 <sup>-4</sup>	M	5.425	5·10 <sup>3</sup>	0.183	
10 <sup>-4</sup>	M	5.15	10·10 <sup>3</sup>	0.194	
5·10 <sup>-5</sup>	M	5.0	20·10 <sup>3</sup>	0.200	P <sub>1</sub>
2·10 <sup>-5</sup>	M	4.6	50·10 <sup>3</sup>	0,217	
10 <sup>-5</sup>	M	3.7	100·10 <sup>3</sup>	0.270	P <sub>2</sub>
5·10 <sup>-6</sup>	M	2.6	200·10 <sup>3</sup>	0.385	
2·10 <sup>-6</sup>	M	1.5	500·10 <sup>3</sup>	0.667	
10 <sup>-6</sup>	M	1.1	1000·10 <sup>3</sup>	0.909	

Zur Quantifizierung der Wirkung von Effektoren auf den photosynthetischen Elektronentransport betrachtet man als Wirkung die Änderung der Meßwerte der Fluoreszenz. Aus den Differenzen der Fluoreszenz der Kontrolle und der der behandelten Proben läßt sich die Wirkung W(c) in den meisten Fällen durch das Modell

$$W(c) = \psi \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad \text{Gl. 1}$$

beschreiben.

In dieser Gleichung bedeutet  $\psi$  die theoretische Maximalwirkung. K ist eine Geschwindigkeitskonstante und die eingesetzte Substanzkonzentration. Die Wirkung einer Substanz wird beschrieben durch den ED<sub>50</sub>-Wert, d. h. die Konzentration, bei der die Wirkung  $\frac{\psi}{2}$  erreicht wird. Aus Gleichung 1 folgt:

$$ED_{50} = \frac{1}{K} \quad \text{Gl. 2}$$

Um den  $ED_{50}$ -Wert nach Gleichung 2 zu bestimmen, benutzt man die Linearisierung von 1, die sich in der Form

$$\frac{1}{W} = \frac{1}{\psi \cdot K} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{\psi} \quad \text{Gl.3}$$

schreiben läßt. Man trägt die Werte gegen auf und berechnet von einer Ausgleichsgeraden etwa mit Hilfe der Zwei-Punkte-Gleichung die Parameter und . Die im vorliegenden Beispiel ausgewählten Punkte  $P_1$  und  $P_2$  sind in der Tabelle 1 in der Spalte  $P_n$  gekennzeichnet. Mit Hilfe einer solchen Darstellung wurde auf der Basis der angegebenen Meßwerte die folgende Lösung berechnet:

$$\frac{1}{W} = 8.7838 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{1}{c} + 1.8243 \cdot 10^{-1}$$

$$\psi = 5.481$$

$$ED_{50} = \frac{1}{K} = 4.815 \cdot 10^{-6}$$

$$W = 5.481 \cdot \frac{207692c}{1 + 207692c}$$

Der ermittelte  $ED_{50}$ -Wert stimmt mit dem aus Untersuchungen des Elektronentransports mittels sauerstoffsensitiver Elektroden bzw. dem mittels Gasanalysatoren registrierten  $O_2$ - bzw.  $CO_2$ -Umsatz der Photosynthese beim gewählten Untersuchungsmaterial überein.

## 2. Ausführungsbeispiel

Die Substanz B wurde im Konzentrationsbereich  $10^{-7}$  M bis  $10^{-3}$  M untersucht. Nach Absenkung der Fluoreszenz bei niederen Konzentrationen folgt eine Erhöhung mit steigenden Konzentrationen. In diesem Fall kann man die Wirkung als Überlagerung nach Gleichung 1 in der Form

$$W(c) = \psi_1 \cdot \frac{K_1 \cdot c}{1 + K_1 \cdot c} - \psi_2 \cdot \frac{K_2 \cdot c}{1 + K_2 \cdot c}$$

erfassen. Für die zu prüfende Substanz B ergibt sich danach:

$$W(c) = 7.9609 \frac{903995c}{1 + 903995c} - 9.0488 \frac{237476c}{1 + 237476c}$$

$$ED_{50} = 1.1062 \cdot 10^{-6} - 4.2109 \cdot 10^{-6}$$

## 3. Ausführungsbeispiel

Die Substanz C wurde im Konzentrationsbereich  $10^{-8}$  bis  $10^{-3}$  M untersucht. Es zeigt sich keine Veränderung der Fluoreszenzintensität über den gesamten Untersuchungsbe- reich. Eine Wirkung im Elektronentransport vom Wasser bis zur Akzeptorsseite des Photosystems II kann dadurch aus- geschlossen werden.

Patentansprüche

1. Selektionsverfahren für Photosyntheseeffektoren mittels Analyse der prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenz, dadurch gekennzeichnet, daß durch fluorometrische Messungen der Chlorophyll-a-steady state-Fluoreszenz von behandelten und unbehandelten Suspensionen autotropher zellulärer und subzellulärer Partikel die primäre Wirkung auf den durch die Fluoreszenz reflektierten Elektronentransportabschnitt der photosynthetischen Lichtreaktion erfaßt wird und damit sekundäre Effektoren ausgeschieden werden, so daß bei Einsatz von abgestuften Effektorkonzentrationen, die Wirkungen erzielen, eine Dosis-Wirkungs-Analyse erfolgen kann und gleichzeitig Aussagen zur groben Wirkungseingrenzung gemacht werden können.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als autotrophe zelluläre Partikelsuspensionen alle suspendierbaren autotrophen Mikroalgen verwendet werden können.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß von den in Punkt 2 genannten Zellsuspensionen 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 durchgeführt werden können.

5. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß durch Anwendung von mathematischen Modellen zur Auswertung der Meßergebnisse eine Dosis-Wirkungs-Analyse über den gesamten Wirkungsbereich durchgeführt werden kann.