



Wirtschaftspatent

Ertelt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

214 146

Int.Cl.³

3(51) C 12 Q 1/02

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q/ 2489 312

(22) 18.03.83

(44) 03.10.84

(71) PAEDAGOGISCHE HOCHSCHULE "WOLFGANG RATKE" KOETHEN;DD;
(72) KRAMER, CLAUS-RUEDIGER,DOZ. DR. SC. NAT.;ARNDT, HORST,DR. RER. NAT.;
SCHELENZ, THOMAS,DIPL.-PAED.;DD;

(54) VERFAHREN ZUR SELEKTION VON EFFEKTOREN MITTELS WACHSTUMSANALYSE VON
ZELLSUSPENSIONEN

(57) Die Erfindung „Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Wachstumsanalyse von Zellsuspensionen“ dient der Suche nach Pflanzenschutzmitteln. Sie verfolgt das Ziel, möglichst in einem Arbeitsgang die Ergebnisse von parallelen Tests mit autotrophen und heterotrophen Zellsuspensionen auszuwerten und dabei vorrangige Photosyntheseeffektoren von primären Atmungseffektoren zu trennen. Die Erfindung basiert auf einem Auswertungsverfahren, das die optischen Eigenschaften substanzbehandelter autotropher und heterotropher Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen nutzt und deren substanzinitiierte Variation mit Hilfe der Spektralkolorimetrie, der Spektralphotometrie oder der Nephelometrie bei 2 bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich erfaßt und vergleichend betrachtet. Die Fig. 4 illustriert anhand von 4 Wirkbildern für die autotrophe und heterotrophe Wachstumsbeeinflussung von *Chlorella-vulgaris*-Suspensionen durch einen Effektor I neben der eindeutigen Zuordnung als primären Photosyntheseeffektor, daß das Auswertungsverfahren darüber hinaus Informationen über Einsetzen, Verlauf und Beständigkeit der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkdauer der Effektoren sowie über Art und Weise der Wirkungsauslösung liefert. Fig. 4

Titel der Erfindung

Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Wachstumsanalyse von Zellsuspensionen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Suche nach Regulatoren biologischer Prozesse, Naturstoffchemie, Umweltschutz

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß für die Indikation der biologischen Aktivität von Effektoren Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen genutzt werden können. So lassen sich nach dem Patent "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen", DD WP C 12 K 152 888, mittels autotroph kultivierter Zellsuspensionen diejenigen Chemikalien aus einer Stichprobe selektieren, die den fundamentalen Prozeß des autotrophen Zellwachstums, die Photosynthese, unmittelbar oder mittelbar beeinträchtigen oder fördern und mittels heterotroph kultivierter Zellsuspensionen aus einer Stichprobe von Chemikalien diejenigen selektieren, die den fundamentalen Prozeß des heterotrophen Zellwachstums, die Atmung, unmittelbar oder mittelbar beeinträchtigen oder fördern.

Verfährt man nach diesem Verfahren, so erlauben beide Testvarianten bei Festlegung einer wünschenswerten minimalen Wirkkonzentration der zu prüfenden Effektoren qualitative Angaben zur Wirksamkeit im Sinne "wirksam" oder "nicht wirksam". Durch Konfrontation der Zellsuspensionen mit abgestuft konzentrierten Lösungen der zu prüfenden Substanzen und nachfolgenden Vergleichen mit parallel kultivierten unbehandelten



Kontrollsuspensionen sind über Dosis-Wirkungs-Analysen quantitative Aussagen über die Hemmaktivität von Effektoren zugänglich.

Die nach diesen Verfahren als "biochemisch wirksam" eingestuft Substanzen bilden aber hinsichtlich ihrer Wirkungsweise keine einheitliche Gruppe. Sie können die Photosynthese bzw. die Atmung unmittelbar beeinflussen, also als primäre Photosyntheseeffektoren oder primäre Atmungshemmer wirken.

Aber es besteht auch die Möglichkeit, daß sie nur mittelbar bzw. im Ergebnis ihrer Metabolisierung den Photosyntheseprozess bzw. die Atmung tangieren, während sie ihre Hauptwirkung in anderen Stoffwechselbereichen manifestieren.

Informationen hierüber erhält man, wenn man nach dem "Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren mittels autotropher Zellsuspensionen", DD WP C 12 Q 231 484 7, bzw. nach dem "Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren mittels heterotropher Zellsuspensionen", DD WP C 12 Q 244 388 8, verfährt. Beide Verfahren verfolgen das Ziel, mittels Analyse der substanzinitiierten Variation der optischen Eigenschaften von Zellsuspensionen möglichst in einem Arbeitsgang mit der Autotrophvariante primäre und nicht primäre Photosyntheseeffektoren bzw. mit der Heterotrophvariante primäre und nicht primäre Atmungseffektoren zu trennen.

Aussagen darüber, ob die Effektoren nur oder hauptsächlich die Photosynthese oder die Atmung hemmen bzw. ob beide Stoffwechselprozesse im Ergebnis der Metabolisierung der Wirkstoffe spezifisch oder unspezifisch tangiert werden, sind mit diesen Verfahren nicht möglich.

Da das Verhältnis der Hemmung der Photosyntheseprozesse zur Hemmung der Atmungsprozesse auch für den möglichen Einsatz der potentiellen Herbizide in der Vorauf- oder Nachaufbehandlung von Bedeutung ist, ergibt sich der Wunsch nach einem Verfahren, das zwar ebenfalls auf Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen beruht, dessen Auswertungsmodus jedoch neben der Selektion vorrangiger Photosynthese- und Atmungshemmer auch die genauere Charakterisierung der Effektoren hinsichtlich ihrer Wirkspezifik erlaubt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für parallele Tests mit autotrophen und heterotrophen Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen einen Auswertungsmodus vorzuschlagen, der in einem Arbeitsgang die Selektion vorrangiger Photosyntheseeffektoren und vorrangiger Atmungseffektoren ermöglicht und die nähere Charakterisierung der Wirkeigenschaften erlaubt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mittels eines speziellen Auswertungsverfahrens auf der Grundlage von Vergleichen der Analysenergebnisse der optischen Eigenschaften substanzbehandelter autotroph und heterotroph kultivierter einzelliger Grünalgensuspensionen primäre Photosyntheseeffektoren, primäre nichtphotosynthetische Effektoren, primäre Atmungseffektoren und nicht primär die Atmung tangierende Effektoren bzw. unspezifische Photosynthese- und Atmungseffektoren zu charakterisieren und zu differenzieren. Insbesondere erlaubt die Erfindung die sichere Identifizierung von Photosynthesehemmern und Atmungseffektoren und damit eine Selektion von Effektoren, die vorrangig als Nachauflaufherbizide oder Vorauflaufherbizide genutzt werden können. Das Anwendungsverfahren liefert darüber hinaus Informationen über Einsetzen, Verlauf und Beständigkeit der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkungsdauer der Effektoren, über Art und Weise der Wirkungsauslösung wie Soforthemmung der Photosynthese und/oder der Atmung, über Permeations- und Transportprobleme sowie über den Wirkungsmechanismus des Effektors.

Beim "Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Wachstumsanalyse von Zellsuspensionen" verfährt man zunächst grundsätzlich so, wie es das "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" empfiehlt, also definierte Mengen chemischer Verbindungen parallel oder simultan mit autotroph und heterotroph kultivierten Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen in unmittelbaren Kontakt bringt und diese Proben parallel

mit unbehandelten Vergleichskulturen bei einheitlicher Temperatur zwischen 20 °C und 38 °C im Licht bzw. im Dunkeln belüftet, so daß sie auf der Grundlage der sich vollziehenden Photosynthese- und Atmungsprozesse wachsen und sich entwickeln. Zu festgelegten Zeitpunkten werden dann Proben und Vergleichskulturen oder Anteile von beiden parallel oder in definierter Folge mittels spektralanalytischer Verfahren bei zwei oder mehreren Wellenlängenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums untersucht und die dabei gewonnenen Ergebnisse vergleichenden Betrachtungen unterzogen. Die Fig. 1 zeigt solche Analysenergebnisse der entwicklungsbedingten optischen Eigenschaften autotropher, synchroner *Chlorella-vulgaris*-Suspensionen, die mit der Substanz A in abgestuft zunehmenden Konzentrationen 1 bis 4 konfrontiert wurden. Ein Vergleich der Wirkbilder Fig. 1, A₂ bis A₅ - Logarithmen der Extinktionen bei 621, 680, 702 und 750 nm als Funktionen der Einwirkzeiten - illustrieren einige mögliche wellenlängenabhängige Beeinflussungen der optischen Eigenschaften substanzbehandelter *Chlorella*-Suspensionen. Neben solchen Wirkbildern können auch Auftragungen der Logarithmen der scheinbaren Extinktionen $\lg E'$ nephelometrischer Messungen bei 545 nm - Fig. 1, A₁ - oder anderer Wellenlängen oder Auftragungen der Differenzen zwischen zwei Extinktionen verschiedener Wellenlängen wie $\Delta E_{680-750}$ in Abhängigkeit von der Zeit - Fig. 1, A₆ - zu vergleichenden Betrachtungen herangezogen werden. Die Wirkbilder B bis G in Fig. 2, hier als Auftragungen der Logarithmen der Extinktionen bei 680 und 750 nm zueinander, für die autotrophe Wachstumsbeeinflussung synchroner *Chlorella-vulgaris*-Suspensionen durch abgestufte, zunehmende Konzentrationen 1 bis 6 der Substanzen B bis G zeigen als Beispiele die unterschiedliche Wirksamkeit dieser Substanzen.

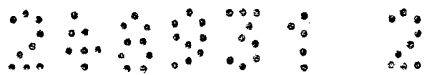
Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Von der zu prüfenden Substanz H werden parallel in einem Autotrophtest und einem Heterotrophtest die optischen Eigenschaften bei 680 nm und 750 nm untersucht.

Hierzu werden autotroph und heterotroph kultivierte Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen der Species *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, Stamm BÖHM und BORNS 1972/1 in einer Suspensionsdichte von 12×10^6 Zellen/cm³ mit verschiedenen konzentrierten wäßrigen Lösungen der zu prüfenden Substanz H beimpft und zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 37,5 °C im Licht bzw. bei der Heterotrophvariante im Dunkeln belüftet, wobei in diesem Fall Glukose als organische Kohlenstoffquelle eingesetzt wird, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Photosynthese bzw. für die Atmung gegeben sind. Deshalb wachsen und entwickeln sich die in Nährlösung suspendierten Zellen der unbehandelten Vergleichskulturen normal. In den mit Chemikalien versetzten Proben sind in beiden Testvarianten Wachstum und Entwicklung mehr oder weniger stark beeinflusst, wenn verschiedene Substanzkonzentrationen den Photosynthese- oder Atmungsprozeß mehr oder weniger stören.

Die Ergebnisse der Analyse sind der Fig. 3, H₁ bis H₆ zu entnehmen. So veranschaulichen die aus den Wachstums-Zeit-Kurven der unbehandelten Kontrollen K und mit abgestuften Konzentrationen der Substanz H versetzten Proben 1 bis 4 sich ergebenden Wirkbilder Fig. 3, H₁ und H₄ die entwicklungsbedingte autotrophe Wachstumsbeeinflussung der Algensuspensionen durch Substanz H. Als Maß für das Wachstum wurden hierbei die Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm - Fig. 3, H₁ - und bei 750 nm - Fig. 3, H₄ - benutzt. Die Wirkbilder Fig. 3, H₂ und Fig. 3, H₅ zeigen unter vergleichbaren Bedingungen die entsprechenden Wachstumsbeeinflussungen für die Heterotrophvariante. Die vergleichbaren Wirkbilder Fig. 3, H₁, H₂ und H₅ zeigen, daß erst nach ein bis drei Stunden eine signifikante Abweichung zwischen den behandelten Proben 1 bis 4 und den Kontrollen K



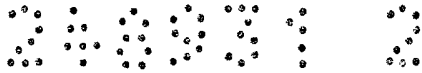
feststellbar ist. Danach ist ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt nachweisbar, der bis zum Ende der Versuche erhalten bleibt. Ganz anders ist das Bild Fig. 3, H₃ für die Beeinflussung der optischen Eigenschaften bei 750 nm durch Substanz H im Autotrophtest. Hier übersteigen die Extinktionswerte der behandelten Proben sogar die Kontrollwerte, was zu der Annahme berechtigt, daß das Zellwachstum der mit Substanz H behandelten Proben gegenüber der Kontrolle scheinbar gefördert wird. Nach drei bis vier Stunden stimmen die Extinktionswerte behandelter und unbehandelter Proben wieder weitgehend überein. Danach erst erweisen sich die Proben 1 bis 4 auch bei dieser Wellenlänge als merklich gehemmt. Vergleichen wir die Aussagen der Fig. 3, H₁, H₂, H₄ und H₅ für die Substanz H mit denen der Fig. 1, A₁ bis A₆ für die Substanz A, 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, in einem kombinierten Arbeitsgang von Autotroph- und Heterotrophtest zu sehr differenzierten Aussagen hinsichtlich der Wirkung der Substanzen führen kann. Aber erst Auftragungen der Extinktionen oder deren Logarithmen beider Testvarianten zueinander erlauben unter vergleichbaren Bedingungen konkretere Einstufungen der Substanzen als vorrangige Photosynthese- oder Atmungseffektoren. Die Fig. 3, H₃ und H₆ zeigen solche Auftragungen für die Substanz H bei 680 und 750 nm. Beide Wirkbilder verdeutlichen, daß die Substanz H konzentrationsabhängig das heterotrophe Wachstum stärker tangiert als das autotrophe Wachstum. Auf Grund dessen kann Substanz H als vorrangiger, aber unspezifischer Atmungshemmer eingestuft werden.

2. Ausführungsbeispiel

Mit der Substanz I wird wie im 1. Ausführungsbeispiel verfahren. Allerdings werden 5 unterschiedliche Konzentrationen von I - 1 bis 5 - getestet und mit den unbehandelten Kontrollen K verglichen. Die Auswertung beider Tests erfolgte wiederum bei

zwei verschiedenen Wellenlängen, bei 680 nm und bei 750 nm. Fig. 4 informiert über die Wirkspezifik der Substanz I. Die Wirkbilder Fig. 4, I₁ und I₂ zeigen wie Fig. 2 für die Substanzen B bis G im Autotrophtest unterschiedliche, substanzspezifische Wirkungen in beiden Testvarianten. Aber auch hier erlaubt erst ein Vergleich der optischen Eigenschaften beider Testvarianten untereinander eine genauere Einordnung des Effektors. Die Wirkbilder Fig. 4, I₃ und I₄ zeigen für 680 und 750 nm einen solchen Vergleich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften durch Substanz I. Besonders die Auftragung Fig. 4, I₃ berechtigt zu einer Einordnung der Substanz I als primären Photosynthesehemmer, da das Wachstum im Autotrophtest deutlich stärker gehemmt wird als im Heterotrophtest.

Neben den in den Fig. 3 und 4, aber auch in den Fig. 1 und 2 vorgestellten Wirkbildern gibt es noch eine größere Anzahl qualitativ und quantitativ unterscheidbarer Wirkungsverläufe für die Beeinflussung des autotrophen und heterotrophen Wachstums von Zellsuspensionen. 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 Wirkorte, Wirkmechanismen, Selektivität und Anwendungsmöglichkeiten solcher Effektoren.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels Zellsuspensionen, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften substanzbehandelter, unter vergleichbaren Bedingungen sich entwickelnder autotropher und heterotropher Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen genutzt werden, um mittels substanzinitiiertener Variation der optischen Eigenschaften solcher Suspensionen und vergleichender Betrachtung der optischen Analyseergebnisse des Autotroph- und des Heterotrophtests die Effektoren in primäre Photosyntheseeffektoren oder Atmungseffektoren sowie in unspezifische Photosynthese- und Atmungseffektoren differenzieren zu können.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als autotrophe und heterotrophe Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen alle suspendierbaren autotrophen und heterotrophen Bakterien, Blaualgen, Grünalgen sowie submers gehaltene niedere und höhere mehrzellige Pflanzen verwendet werden können.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften der Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen mittels Spektalkolorimetrie, Spektralphotometrie oder Nephelometrie bei 2 bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen oder ganzer Spektralbereiche im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich analysiert werden.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

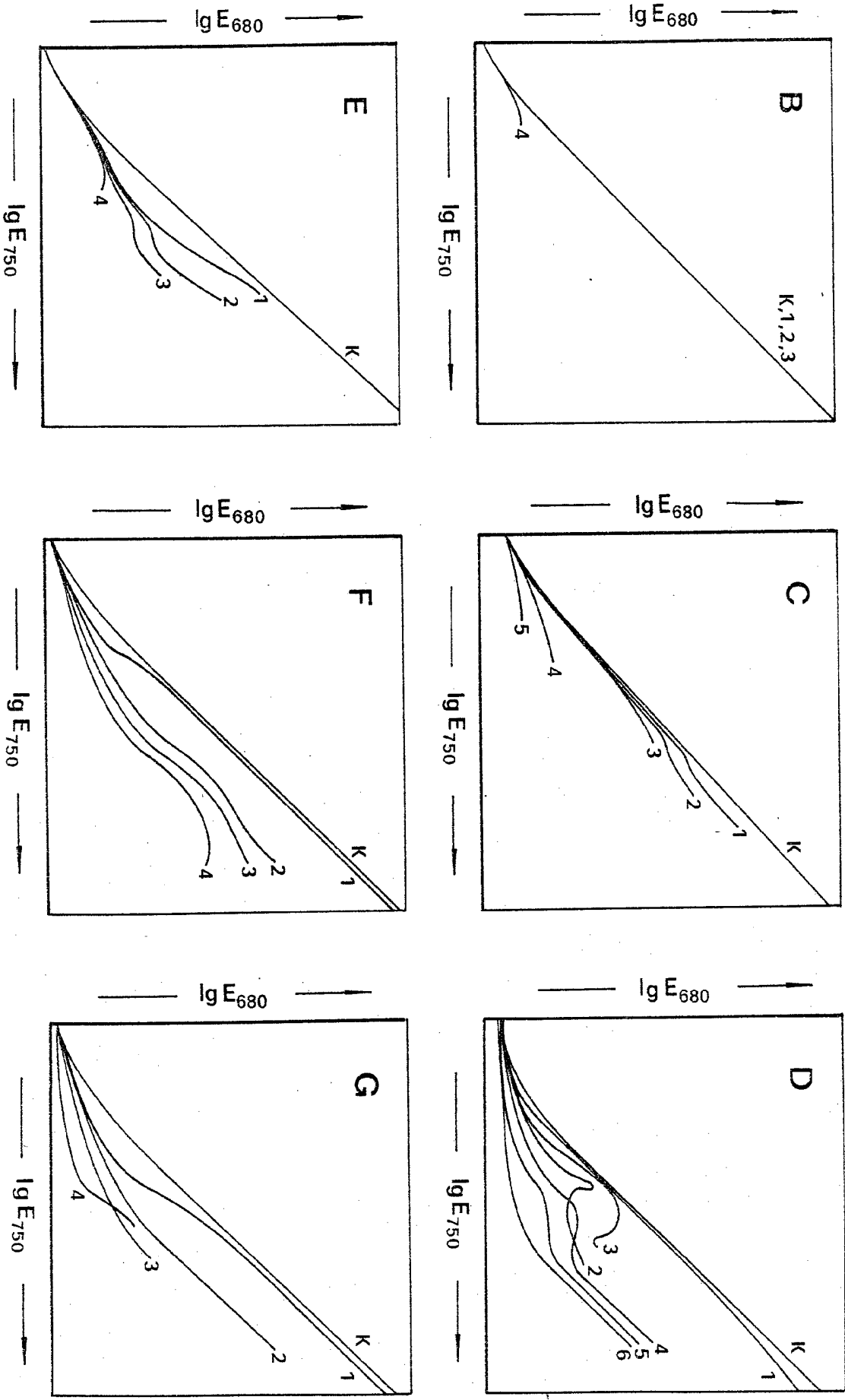


Fig. 2

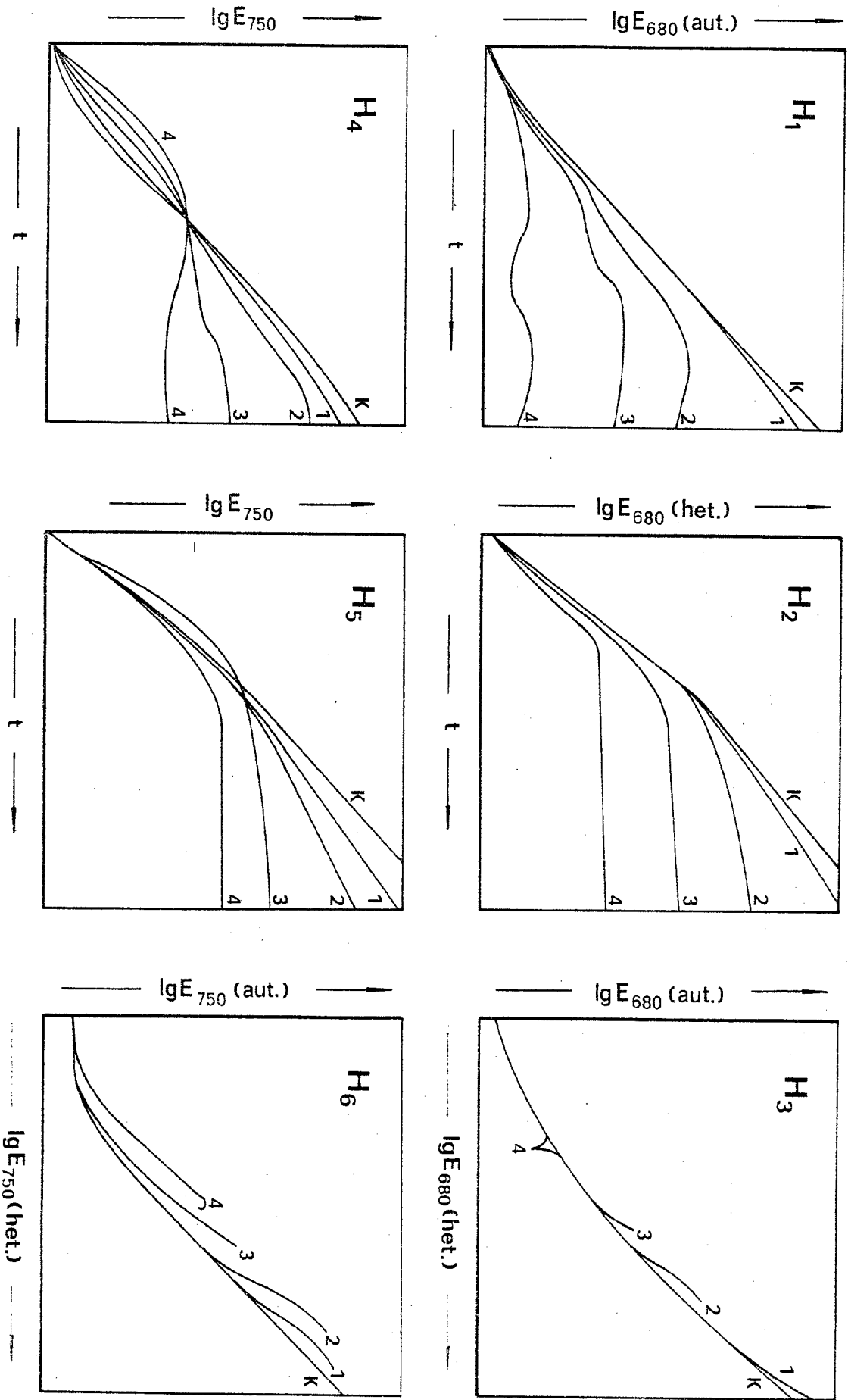


Fig. 3

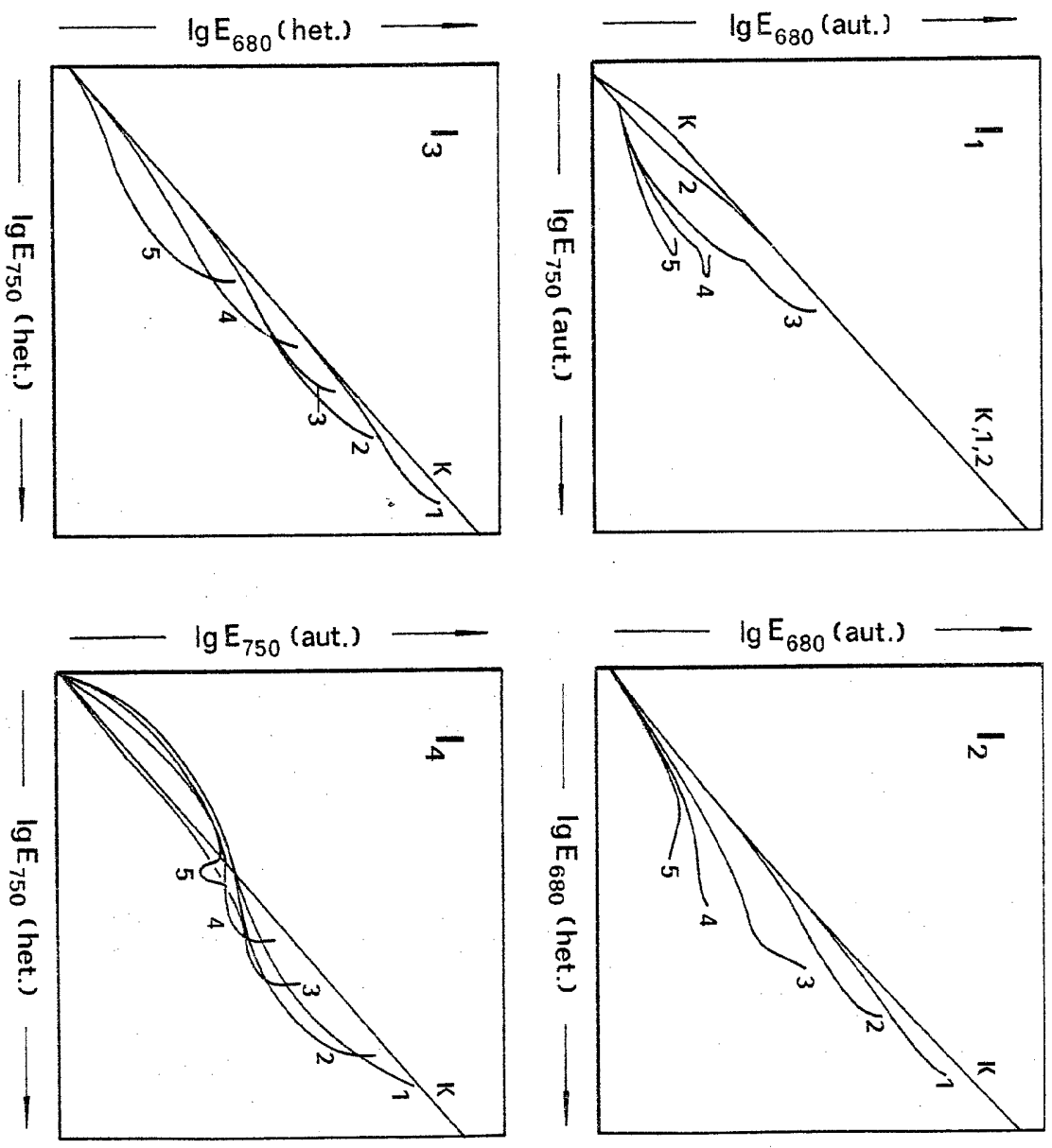


Fig. 4