



**Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

**211 126**

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

**3(51) C 12 Q 1/02**

**AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q/ 2443 888

(22) 29.10.82

(44) 04.07.84

(71) PAEDAGOGISCHE HOCHSCHULE "WOLFGANG RATKE" KOETHEN,DD;  
(72) KRAMER, CLAUS-RUEDIGER,DOZ. DR. SC. NAT.;BOEHM, HEINZ,PROF. DR. SC. NAT.;  
SEISS, ULRICH,DR RER. NAT.;DD;

(54) **VERFAHREN ZUR DIFFERENZIERTEN SELEKTION VON EFFEKTOREN MITTELS HETEROTROPHER ZELLSUSPENSIONEN**

(57) Die Erfindung „Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren mittels heterotropher Zellsuspensionen“ dient der Suche nach Pflanzenschutzmitteln und nach Effektoren biologischer Prozesse. Sie verfolgt das Ziel, möglichst in einem Arbeitsgang die Ergebnisse von Tests mit heterotrophen Zellsuspensionen auszuwerten und dabei primäre Atmungseffektoren von primär nicht die Atmung tangierenden Effektoren zu trennen. Die Erfindung basiert auf einem Auswertungsverfahren, das die optischen Eigenschaften substanzbehandelter 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. Das Verfahren wird an 3 Zeichnungen erläutert.

### Titel der Erfindung

Verfahren zur differenzierten Selektion von Effektoren  
mittels heterotropher Zellsuspensionen

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Suche nach Regulatoren biologischer Prozesse, Umweltanalyse, Naturstoffchemie

### Charakteristik der bekannten Lösungen

Es ist bekannt, daß der Einfluß chemischer Substanzen auf biologische Prozesse auf vielfältige Weise geprüft werden kann. Als Indikatoren lassen sich auch Zellsuspensionen heterotroph kultivierter einzelliger Grünalgen nutzen. Die dabei zu praktizierende Methodik legt das Patent "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen", WP C 12k/152 888, fest. Verfährt man danach, so lassen sich aus einer Stichprobe von Chemikalien diejenigen selektieren, die den fundamentalen Prozeß des heterotrophen Zellwachstums, die Atmung, unmittelbar oder mittelbar beeinträchtigen oder fördern. Substanzen, die die Atmung nicht beeinflussen, aber dennoch biochemisch wirksam sind, lassen sich auf die genannte Weise nicht definieren. Sie werden notwendigerweise als biochemisch unwirksam eingestuft. Solche Substanzen müssen dann in einer Kette nachfolgender Tests spezifischer Zielstellung auf entsprechend spezifischen Effekt geprüft werden, so zum Beispiel potentielle Photosynthesehemmer in einem Autotrophentest, Effektoren des

Nukleinsäurehaushalts in einem Nukleinsäure-Test. Demnach ist es also unumgänglich, alle im "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" geprüften und für unwirksam befundenen Chemikalien einem erneuten Prüfungsgang zu unterwerfen.

Auch die als "biochemisch wirksam" eingestufteten Substanzen bilden hinsichtlich ihrer Wirkungsweise keine einheitliche Gruppe. Sie können die Atmung unmittelbar beeinflussen, also als primäre Atmungseffektoren wirken. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß sie nur mittelbar bzw. im Ergebnis ihrer Metabolisierung den Atmungsprozeß tangieren, während sie ihre Hauptwirkung in anderen Stoffwechselbereichen manifestieren. Daraus ergibt sich der Wunsch nach einem Verfahren, das zwar ebenfalls auf Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen beruht, dessen Auswertungsmodus jedoch neben der Selektion primärer Atmungseffektoren auch die Charakterisierung von Effektoren in einem Arbeitsgang erlaubt, die biologisch wirksam sind und auf die Atmung primär keinen Einfluß haben.

#### Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für Tests mit heterotrophen Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen einen Auswertungsmodus vorzuschlagen, der in einem Arbeitsgang die Selektion primärer Atmungseffektoren und auch von solchen Effektoren ermöglicht, die nicht primär die Atmung tangieren, aber biologisch wirksam sind.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mittels eines speziellen Auswertungsverfahrens die in Anwendung des "Verfahrens zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" selektieren Effektoren in einem geschlossenen Arbeitsgang als

primäre Atmungseffektoren bzw. nicht primär die Atmung tangierende, aber biologisch wirksame Effektoren zu charakterisieren, sie also zu differenzieren, und gleichzeitig den Nachweis zu führen, ob sich unter den als biochemisch unwirksam eingestuften Substanzen Effektoren anderer Stoffwechselbereiche befinden. Das geschieht, indem man zunächst grundsätzlich so verfährt, wie es das "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen" empfiehlt, also definierte Mengen chemischer Verbindungen mit 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 Dunkeln belüftet, so daß sie auf der Grundlage des sich vollziehenden Atmungsprozesses 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 Wellenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums untersucht und die dabei gewonnenen Ergebnisse vergleichenden Betrachtungen unterzogen.

### Ausführungsbeispiele

#### 1. Ausführungsbeispiel

Heterotroph kultivierte Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen der Species *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, Stamm BÖHM u. BORNS 1972/1 in einer Suspensionsdichte von  $7 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>3</sup> werden mit verschiedenen konzentrierten wässrigen Lösungen der zu prüfenden Substanz A beimpft und zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 37 °C im Dunkeln belüftet, wobei Glukose als organische C-Quelle eingesetzt wird, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Atmung der Zellen gegeben sind. Deshalb wachsen und entwickeln sich die in Nährlösung suspendierten Zellen in den unbehandelten Vergleichskulturen normal.

In den mit Chemikalien versetzten Proben sind Wachstum und Entwicklung mehr oder weniger beeinflusst, wenn verschiedene Substanzkonzentrationen den Atmungsprozeß mehr oder weniger stören. Die Ergebnisse der Analyse sind den Figuren 1 und 2 zu entnehmen. Figur 1 enthält die dekadischen Logarithmen der Extinktionsmessungen bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle K und die mit abgestuften Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, die zu den jeweiligen Zeitpunkten vorgenommen wurden, Figur 2 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 im Wirkungsverlauf, so daß man bei oberflächlicher Betrachtung beider Abbildungen zu dem Schluß kommen könnte, daß Extinktionsmessungen bei einer einzigen Wellenlänge ausreichen, um die Wirkung oder Nichtwirkung einer Substanz auf die Atmung hinreichend beurteilen zu können.

Bildet man jedoch aus den bei 680 nm und bei 750 nm ermittelten Meßwerten den Quotienten

$$Q = \frac{E_{680}}{E_{750}}$$

so lassen sich Kontrolle K und behandelte Proben 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 quantitativ miteinander vergleichen. Aus diesem Vergleich lassen sich Schlüsse ziehen, ob, in welchem Umfang und zu welchem Zeitpunkt des Tests diese Quotienten übereinstimmen bzw. wann in welchem Maße und in welcher Richtung sie differieren.

Zu noch präziseren und aussagekräftigeren Schlüssen gelangt man, wenn man die Logarithmen der bei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig ermittelten Extinktionswerte im Koordinationssystem miteinander in Beziehung bringt, wie es in Figur 3 geschieht. Hier wird eindeutig sichtbar,

- daß die zugrundegelegten Parameter bei der Kontrolle K und den Substanzkonzentrationen 5 - 7 ein deckungsgleiches Graphenbild ergeben,
- daß es einen Testabschnitt gibt, in dem praktisch alle Konzentrationsstufen der Grundcharakteristik der Kontrollkurve K entsprechen,
- daß in einer folgenden Testphase sich die Relationen der Logarithmen unserer Extinktionswerte für die Konzentrationsstufen 1 - 4 mehr oder weniger einschneidend verändern und von der Kontrollkurve K entsprechend abweichen,
- daß man aus diesen Abweichungen auf ein verändertes Verhältnis zwischen atmungsstimuliertem Zellwachstum und Chlorophyllentwicklung schließen kann, das bei den Konzentrationsstufen 1, 2 und 3 sich zuungunsten der Chlorophyllentwicklung gestaltet,
- daß diese Tendenz bei der stärksten Konzentration 1 beibehalten und verstärkt (Zellzerstörung und Chlorophyllabbau), bei den Konzentrationen 2 und 3 jedoch wieder umgekehrt wird, so daß deren graphische Bilder in ihrer Richtung denen der Kontrolle entsprechen, ohne deren Werte je wieder zu erreichen, demnach die Zellen unter Substanzeinfluß dann wieder so wie in der Kontrolle wachsen, jedoch bei vermindertem Chlorophyllgehalt.

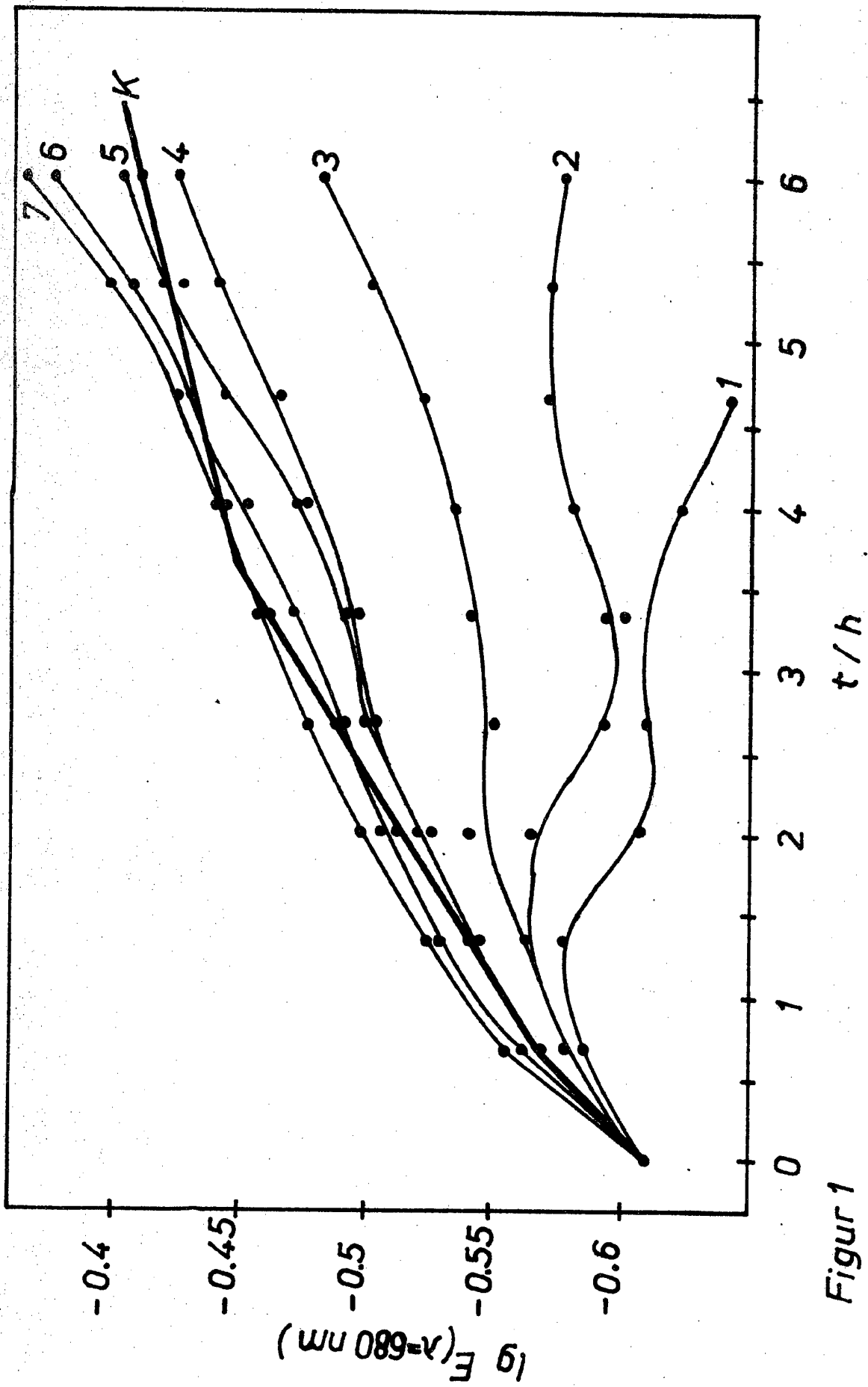
## 2. Ausführungsbeispiel

Von einer neu synthetisierten Substanz X, über deren biologische Wirkeigenschaften noch nichts bekannt ist, werden - wie im 1. Ausführungsbeispiel angegeben - mittels heterotroph kultivierter Kulturen der einzelligen Grünalge *Chlorella vulgaris* durch Vermessen der mit verschiedenen Substanzkonzentrationen behandelten Zellsuspensionen ebenso wie bei einer parallel kultivierten Kontrollkultur ohne Substanzeinfluß bei 2 oder mehreren Wellenlängen die Extinktionswerte erfaßt, logarithmiert, dann zueinander - wie in Figur 3 geschehen - in Beziehung gesetzt und

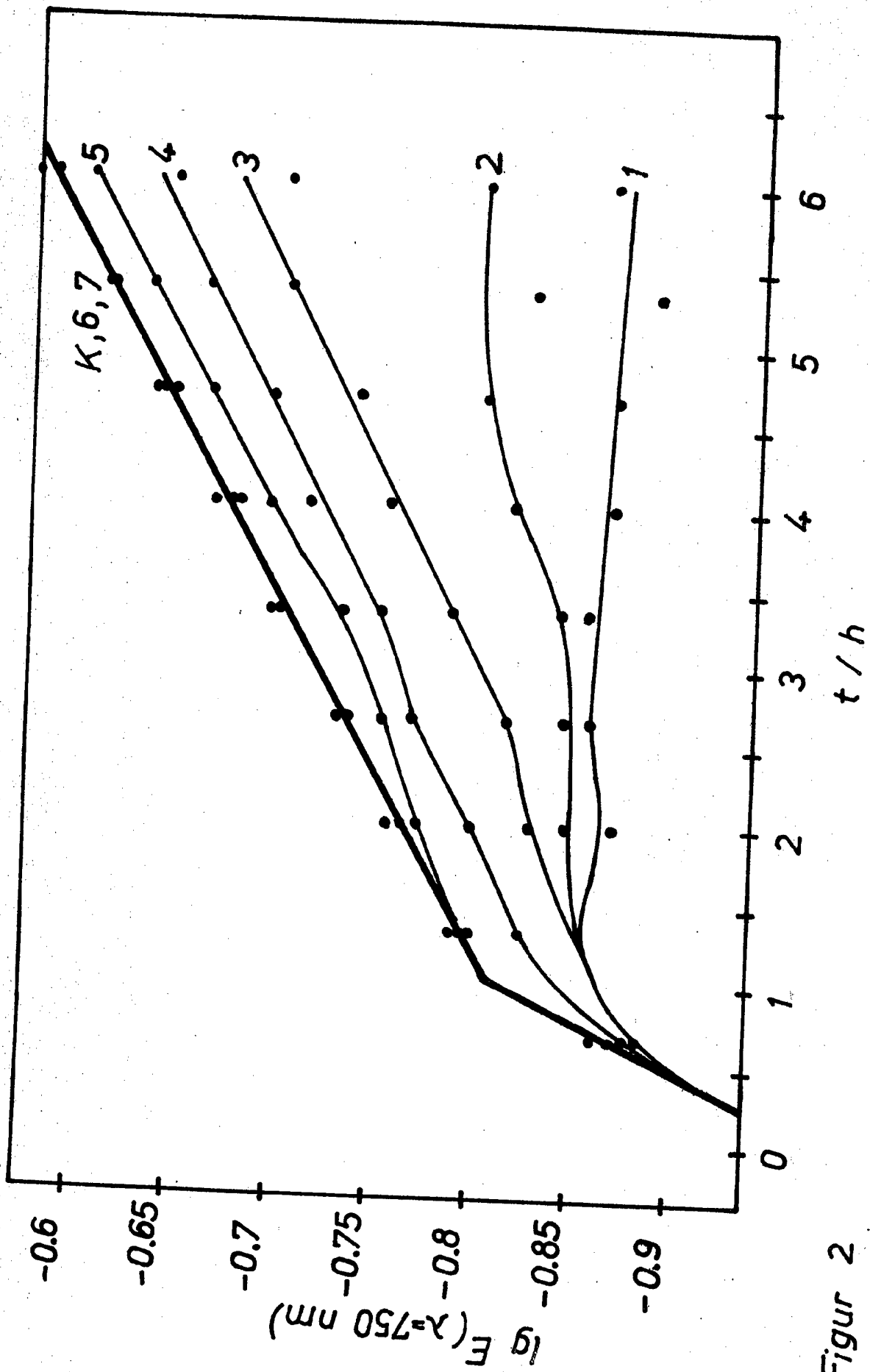
graphisch dargestellt. Wählt man die Meßbereiche so aus, daß sie für bestimmte Stoffwechselbereiche hinreichend repräsentativ sind, so läßt sich aus einem Graphenvergleich zwischen behandelten Proben und unbehandelter Kontrolle auf den Wirkungsverlauf, die Wirkungsrichtung und ihre Dynamik und auf die Wirkungsintensität schließen. Arbeitet man mit streng standardisierten Heterotrophkulturen einzelliger Grünalgen, so kann sogar auf die Kontrollkultur verzichtet werden, da ihre Extinktionswerte dann als Standard ständig verfügbar sind.

### Patentansprüche

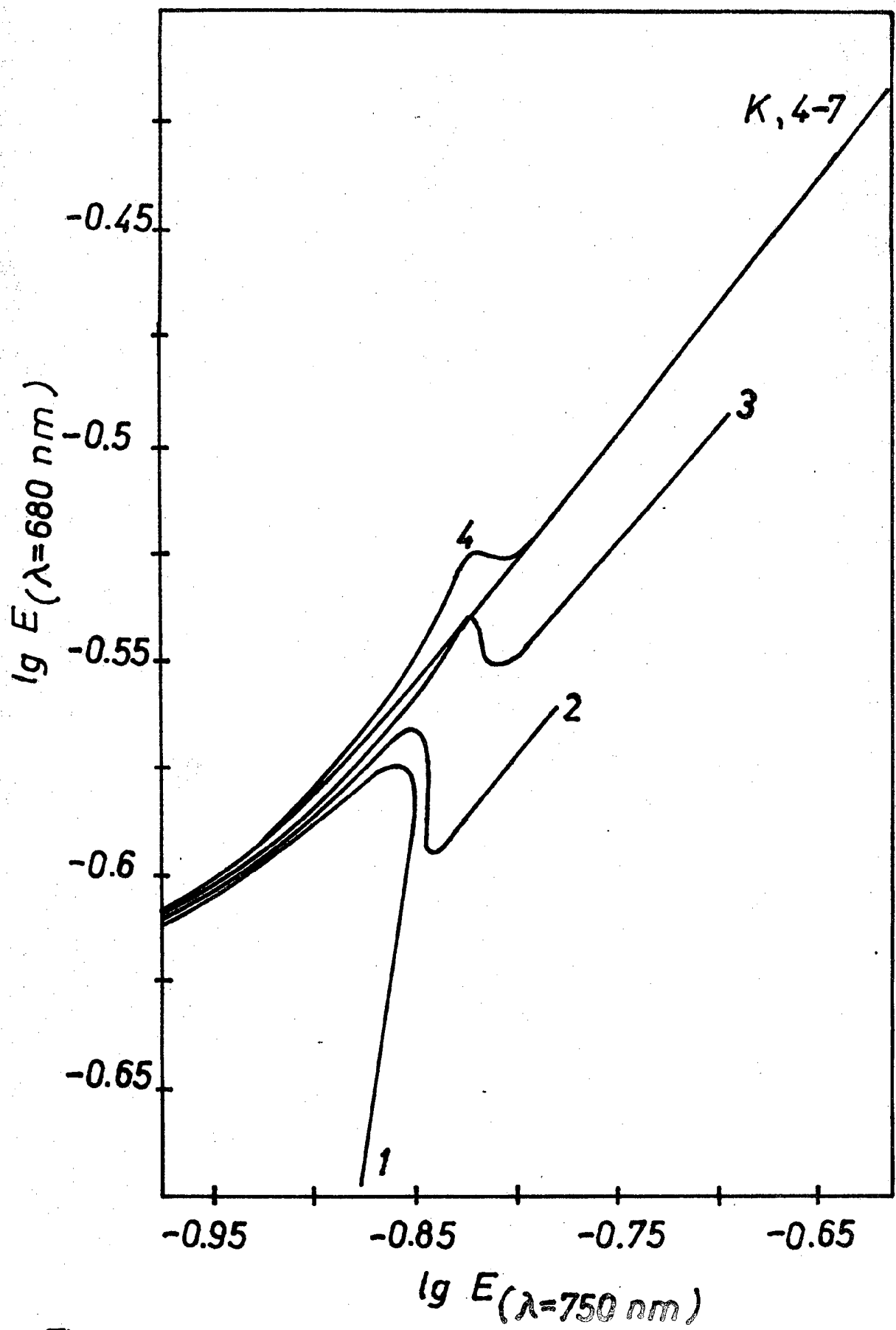
1. Verfahren zur Selektion von Effektoren mittels heterotropher Zellsuspensionen, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften substanzbehandelter heterotropher Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen genutzt werden, um mittels substanzinitiiertes Variation der optischen Eigenschaften solcher Suspensionen die Effektoren in primäre und sekundäre Atmungseffektoren sowie in atmungsneutrale Effektoren differenzieren zu können.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als heterotrophe Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen alle suspendierbaren heterotrophen Bakterien, Blaualgen und Grünalgen verwendet werden können.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften der Zellsuspensionen mittels Spektralkolorimetrie, Spektralphotometrie oder Nephelometrie bei 2 bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen oder ganzen Spektralbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich analysiert werden.



Figur 1



Figur 2



Figur 3