DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **226 903 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 12 Q 1/04**
C 12 N 1/12

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 267 226 4	(22)	12.09.84	(44)	04.09.85

(71) Pädagogische Hochschule „Wolfgang Ratke" Köthen, 4370 Köthen, Lohmannstraße 23, DD
(72) Kramer, Claus-Rüdiger, Doz. Dr. sc. nat.; Henze, Uwe, Dipl.-Päd., DD

(54) Selektionsverfahren für Wachstumseffektoren

(57) Die Erfindung verfolgt das Ziel, über ein Screening reine und partielle Wachstumseffektoren von rein toxisch wirkenden Effektoren zu selektieren. Dazu werden die Effektoren in abgestuften Konzentrationen parallel in einem wachstumsunabhängigen Toxizitätstest mit nährstofffreien Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen und in einem Wachstumstest mit autotroph kultivierten Zellsuspensionen des gleichen Stammes konfrontiert. Zu festgelegten Zeitpunkten werden dann Proben und Vergleichskulturen der beiden Testvarianten parallel oder in definierter Folge mittels spektralanalytischer Verfahren gegebenenfalls bei mehreren Wellengängen bzw. Wellenlängenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums untersucht und die dabei gewonnenen Ergebnisse wie pc_{50}-Daten und Wirkbilder vergleichenden Betrachtungen unterzogen.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Selektion von Wachstumseffektoren **dadurch gekennzeichnet,** daß die Effektoren gegebenenfalls in abgestuften Konzentrationen parallel in einem wachstumsunabhängigen Toxizitätstest und in einem Wachstumstest mit Zell- oder Organismensuspensionen konfrontiert und zu festgelegten Zeitpunkten bzw. am Testende die optischen Eigenschaften von Proben und Vergleichskulturen aus beiden Testvarianten parallel oder in definierter Folge untersucht werden, um mittels der substanzinitiierten Variationen der optischen Eigenschaften der Suspensionen in beiden Testvarianten die Effektoren in reine bzw. partielle Wachstumseffektoren und rein toxisch wirkende Effektoren selektieren und differenzieren zu können.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß zur Ermittlung der Toxizität der Effektoren nährstofffreie Zell- oder Organismensuspensionen, die durch Abtrennung des Zell- oder Organismenmaterials aus der Nährstofflösung, gegebenenfalls mehrmaligem Waschen und Suspendierung des Zell- oder Organismenmaterials in destilliertes Wasser gewonnen werden, mit zu prüfenden Substanzen gegebenenfalls in abgestuften Konzentrationen konfrontiert werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß zur Ermittlung der Wachstumsbeeinflussung der Effektoren autotroph kultiviertes Zell- oder Organismenmaterial mit den zu prüfenden Substanzen gegebenenfalls in abgestuften Konzentrationen konfrontiert wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Zell- oder Organismensuspensionen alle suspendierbaren Bakterien, Blaualgen und Grünalgen verwendet werden können.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die optischen Eigenschaften der Zellsuspensionen mittels Spektralkolorimetrie, Spektralphotometrie oder Nephelometrie bei 1 bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen oder ganzen Spektralbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich analysiert werden.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Anwendung der Erfindung

Pflanzenschutzmittelforschung, Suche nach Regulatoren biologischer Prozesse, Naturstoffchemie, Umweltanalyse

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß der Einfluß chemischer Substanzen auf biologische Prozesse und ihre Toxizität auf vielfältige Weise geprüft werden kann. Als Indikatoren lassen sich auch autotroph oder heterotroph kultivierte Mikroalgensuspensionen nutzen. Nach dem Patent DD Nr. 94 234 lassen sich mittels autotroph kultivierter einzelliger Algensuspensionen diejenigen Chemikalien aus einer Stichprobe selektieren, die den fundamentalen Prozeß des autotrophen Zellwachstums, die Photosynthese, unmittelbar oder mittelbar beeinträchtigen. Da dieses und andere Prüf- und Selektionsverfahren prinzipiell an das komplexe Wachstum von Zell- bzw. Organismensuspensionen gebunden sind, können die erhaltenen Hemmdaten nicht eindeutig auf reine wachstumshemmende Wirkungen und/oder auf wachstumsunabhängige Vergiftungserscheinungen zurückgeführt werden. Eine gezielte Suche besonders nach selektiv wirkenden Effektoren macht ein Verfahren wünschenswert, das in einem Screening eine Selektion der Wachstumseffektoren von toxisch wirkenden Effektoren ermöglicht.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, einen Test auf der Basis von Mikroalgen zu entwickeln, der eine sichere Selektion von Wachstumseffektoren und von rein toxisch wirkenden Effektoren gestattet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß in zwei parallel durchgeführten Tests auf der Basis von Mikroalgen die wachstumsunabhängige Toxizität der Effektoren und die Beeinflussung des Wachstums solcher Mikroalgensuspensionen analysiert werden. Im Toxizitätstest werden definierte Mengen chemischer Verbindungen mit nährstofffreien einzelligen Algensuspensionen, die durch Abtrennung des Zellmaterials aus der Nährstofflösung, gegebenenfalls mehrmaliges Waschen und Suspendierung des Zellmaterials in destilliertes Wasser gewonnen werden, in abgestuften Konzentrationen in unmittelbaren Kontakt gebracht und diese Proben parallel mit unbehandelten Vergleichskulturen bei einheitlicher Temperatur mit Stickstoff zum Zweck einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen begast werden. Beim Wachstumstest werden definierte Mengen chemischer Verbindungen mit autotroph kultivierten Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen in unmittelbaren Kontakt gebracht und diese Proben parallel mit unbehandelten Vergleichskulturen bei einheitlicher Temperatur zwischen 20 °C und 38 °C im Licht belüftet, so daß sie auf der Grundlage des sich vollziehenden Photosyntheseprozesses wachsen und sich entwickeln. Zu festgelegten Zeitpunkten werden dann Proben und Vergleichskulturen oder Anteile von beiden aus beiden Testvarianten parallel oder in definierter Folge mittels spektralanalytischer Verfahren gegebenenfalls bei mehreren Wellenlängen bzw. Wellenlängenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums untersucht und die dabei gewonnenen Ergebnisse vergleichenden Betrachtungen unterzogen.

Ausführungsbeispiele

Aus einer Serie monosubstituierter Benzene werden die Effektoren 1 bis 8 gemäß Tabelle 1 parallel im Toxizitätstest und im Wachstumstest auf ihre toxischen Eigenschaften und auf spezifische Wachstumsbeeinflussungen untersucht, um sie in toxische oder wachstumshemmende Effektoren selektieren zu können. Dazu werden für den Toxizitätstest aus normal autotroph kultivierten Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen der Species Chlorella vulgaris var. vulgaris Stamm BÖHM u. BORNS 1972/1 durch Abzentrifugieren und Waschen mit destilliertem Wasser die frischen Autosporen oder gegebenenfalls des asynchrone Zellmaterial von der Nährstofflösung getrennt und dann in destilliertes Wasser suspendiert. Durch gegebenenfalls mehrmalige Wiederholung dieses Vorganges werden dann die vollkommen nährstofffreien Algensuspensionen definierter optischer Dichte (z. B. $20 \cdot 10^6$ Zellen/cm^3) mit verschiedenen Konzentrationen alkoholischer Lösungen der zu prüfenden Substanzen 1 bis 8 beimpft und zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 37 °C mit Stickstoff begast, damit eine ständige gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet ist. Während die Algen in den Kontrollsuspensionen auf Grund des Nährstoff- und Kohlendioxidmangels nicht wachsen und sich nicht entwickeln können, die optischen Eigenschaften bleiben bis zu normalerweise 8 bis 10 Stunden nahezu konstant, werden die Algenzellen in den mit Chemikalien versetzten Proben mehr oder weniger beeinflußt, wenn verschiedene Substanzkonzentrationen mehr oder weniger toxisch wirken. In diesem Fall verringert sich die optische Dichte der Suspensionen. Als Beispiel zeigen Figur 1 und Figur 2 Analysenergebnisse der toxischen Wirkung des Effektors Nr. 1. Figur 1 enthält die Extinktionswerte bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle K und die mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen 1 bis 6, die zu den entsprechenden Zeitpunkten vorgenommen wurden. Die Figur 2 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) in Form von Auftragungen der relativen Vergiftung in Prozent als Funktion der Logarithmen der Effektorkonzentrationen für den Einfluß des Wirkstoffes nach 1, 2, 4 und 8 Stunden Einwirkzeit. Aus den Halbstufenhöhen dieser Dosis-Wirkungs-Kurven erhält man in allen vier Fällen beispielsweise einen Toxizitätswert $-\lg c_{50} = 2{,}12$. Im parallel zum Toxizitätstest durchgeführten Wachstumstest werden autotroph kultivierte synchrone Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen der Species Chlorella vulgaris var. vulgaris Stamm BÖHM u. BORNS 1972/1 in einer Suspensionsdichte von $7\ 10^6$ Zellen/cm^3 mit verschieden konzentrierten alkoholischen Lösungen der zu prüfenden Substanzen Nr. 1 bis 8 beimpft und zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 37 °C belichtet und belüftet, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Photosynthese 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 Photosyntheseprozeß mehr oder weniger stören. Die Ergebnisse der Analyse sind am Beispiel des Effektors 1 der Figur 3 zu entnehmen. Sie zeigt eine Auftragung der dekadischen Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle K und die mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen der Substanz Nr. 1 versetzten Proben 1 bis 6 als Funktion der Wachstums- bzw. Einwirkzeiten. Aus diesen Analysenergebnissen lassen sich auf einfache Weise über Dosis-Wirkungs-Kurven gemäß Figur 2 die pc_{50}-Daten oder entsprechend andere vergleichbare Daten als Maß der Wachstumshemmung bestimmen. Die Tabelle 1 enthält die für die Effektoren 1 bis 8 im Toxizitätstest und im Wachstumstest festgestellten pc_{50}-Werte.

Tabelle 1 pc_{50}-Daten[1] für die Aktivitäten monosubstituierter Benzene C_6H_5R im Toxizitätstest (T) und im Wachstumstest (W)

		T	W	
Nr.	R	pc_{50}	pc_{50}	Δpc_{50}[2]
1	H	2,12	2,04	−0,08
2	Cl	2,93	2,97	0,04
3	Br	3,03	3,22	0,19
4	I	3,31	3,46	0,15
5	OH	1,71	2,30	0,59
6	OCH_3	2,05	2,02	−0,03
7	CHO	1,89	2,70	0,81
8	CN	2,05	2,67	0,62

1 $pc_{50} = -\lg c_{50}$ (c in mol l^{-1})

2 $\Delta pc_{50} = pc_{50}(W) - pc_{50}(T)$

Ein Vergleich der für beide Testvarianten erhaltenen pc_{50}-Werte für die Substanzen Nr. 1 bis 4 und Nr. 6 zeigt gute Übereinstimmung. Die Variation Δpc_{50} ist kleiner als $\pm$ 0,20 und auf eine normale Streuung zurückzuführen. Daraus ist abzuleiten, daß die im Wachstumstest gezeigte Wachstumsbeeinflussung durch diese Effektoren quantitativ auf die Toxizität dieser Substanzen zurückzuführen ist. Demgegenüber liegen die für den Wachstumstest gefundenen pc_{50}-Werte der Effektoren Nr. 5,7 und 8 deutlich höher als die entsprechenden Werte für den Toxizitätstest. Die Δpc_{50}-Werte liegen im Bereich von 0,59 bis 0,81. Das weist darauf hin, daß neben der toxischen Wirkung diese Effektoren das Wachstum der Algensuspensionen zusätzlich hemmen, d. h. diese Effektoren sind als partielle Wachstumshemmer einzustufen. Zusätzliche konkretere Informationen zum Einfluß der Effektorkonzentration oder der Einwirkzeit auf das Wachstum der Algensuspensionen sind neben den Wirkbildern Figur 1 und Figur 3 insbesondere über gegenseitige Auftragungen der aus beiden Testvarianten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Extinktionen bzw. deren Logarithmen zugänglich.

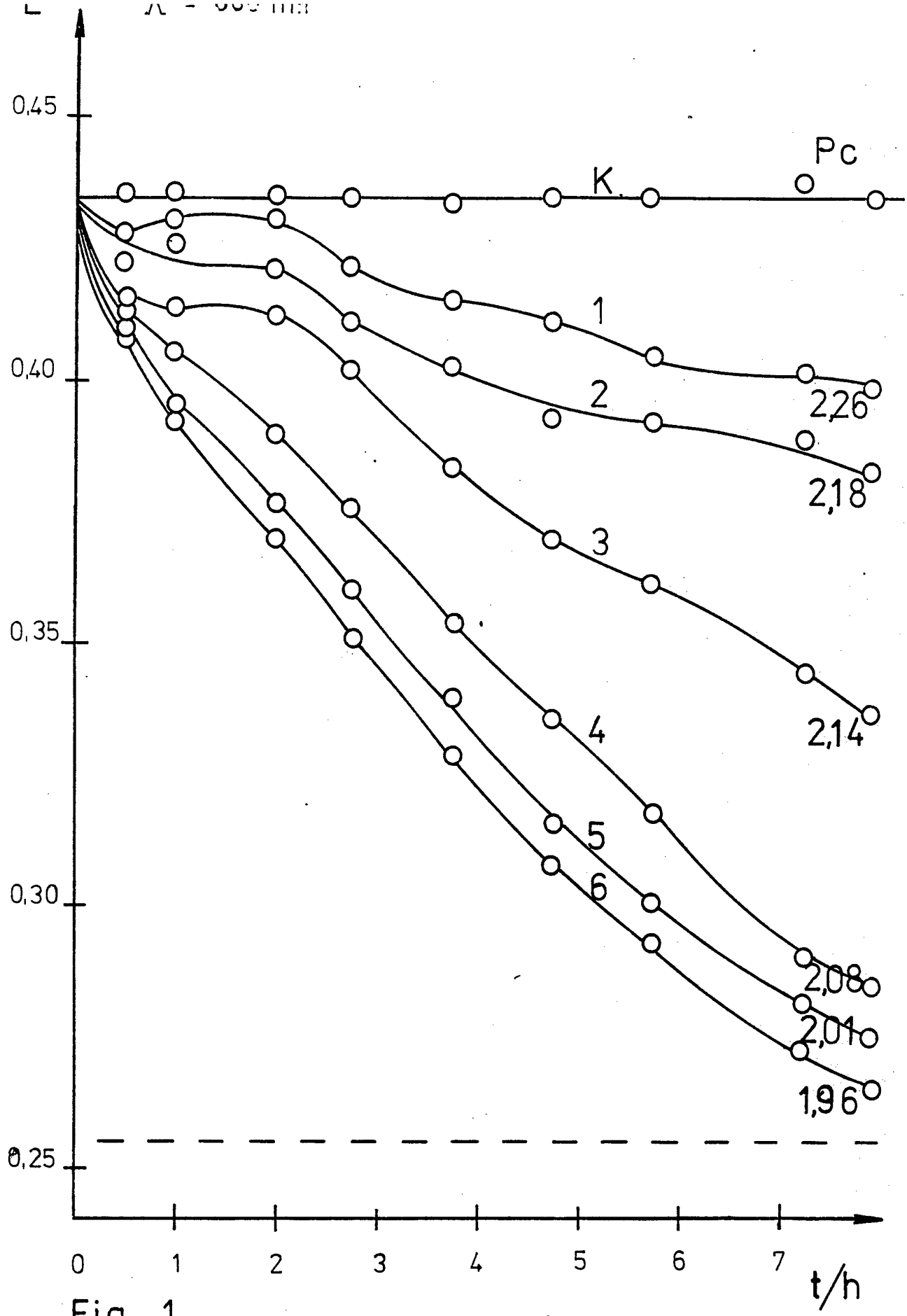

0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
Pc
K
1
2
2,26
2,18
3
2,14
4
5
6
2,08
2,01
1,96
0
1
2
3
4
5
6
7
t/h

Fig. 1

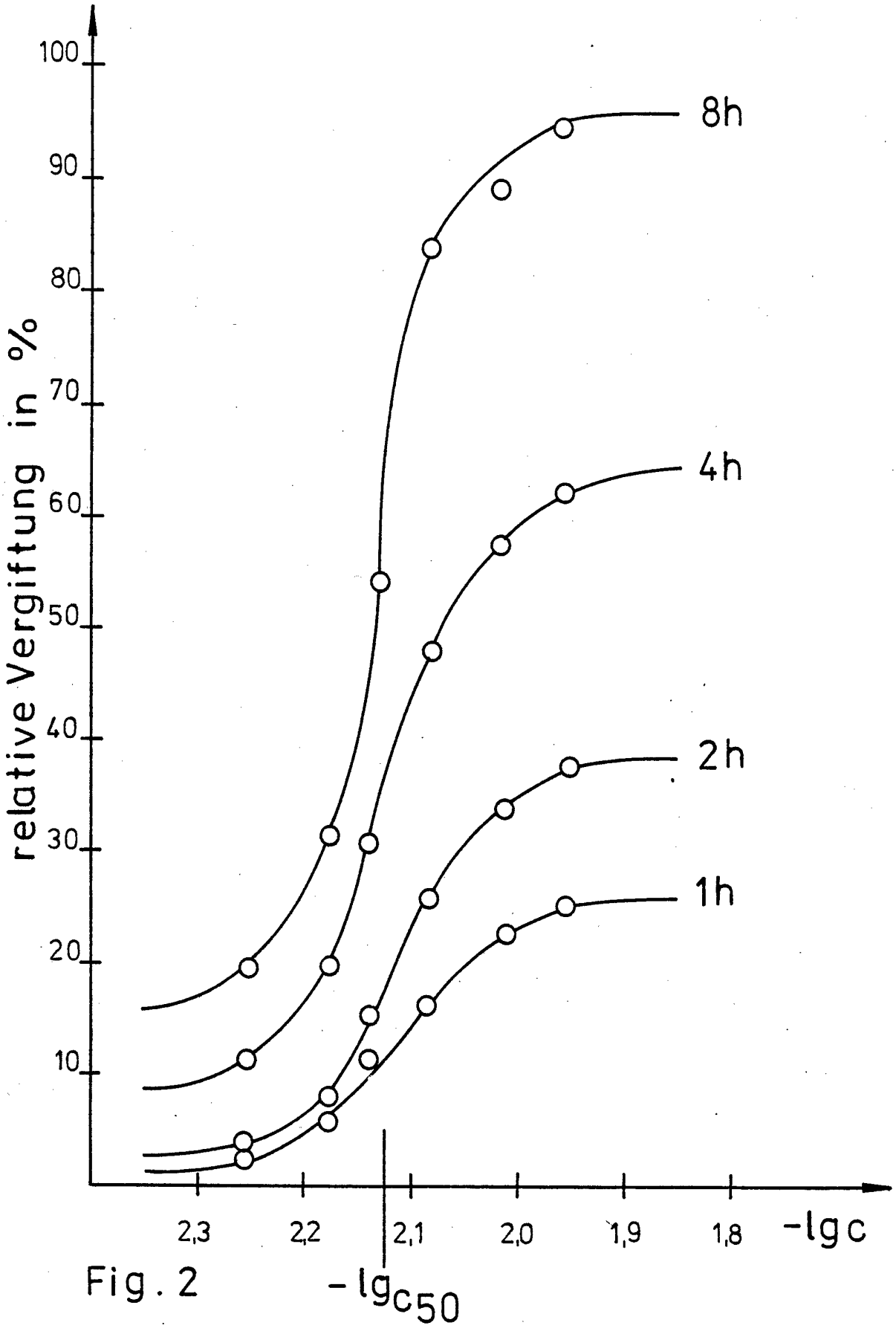

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
relative Vergiftung in %
8h
4h
2h
1h
2,3
2,2
2,1
2,0
1,9
1,8
-lg c
-lg c50

Fig. 2

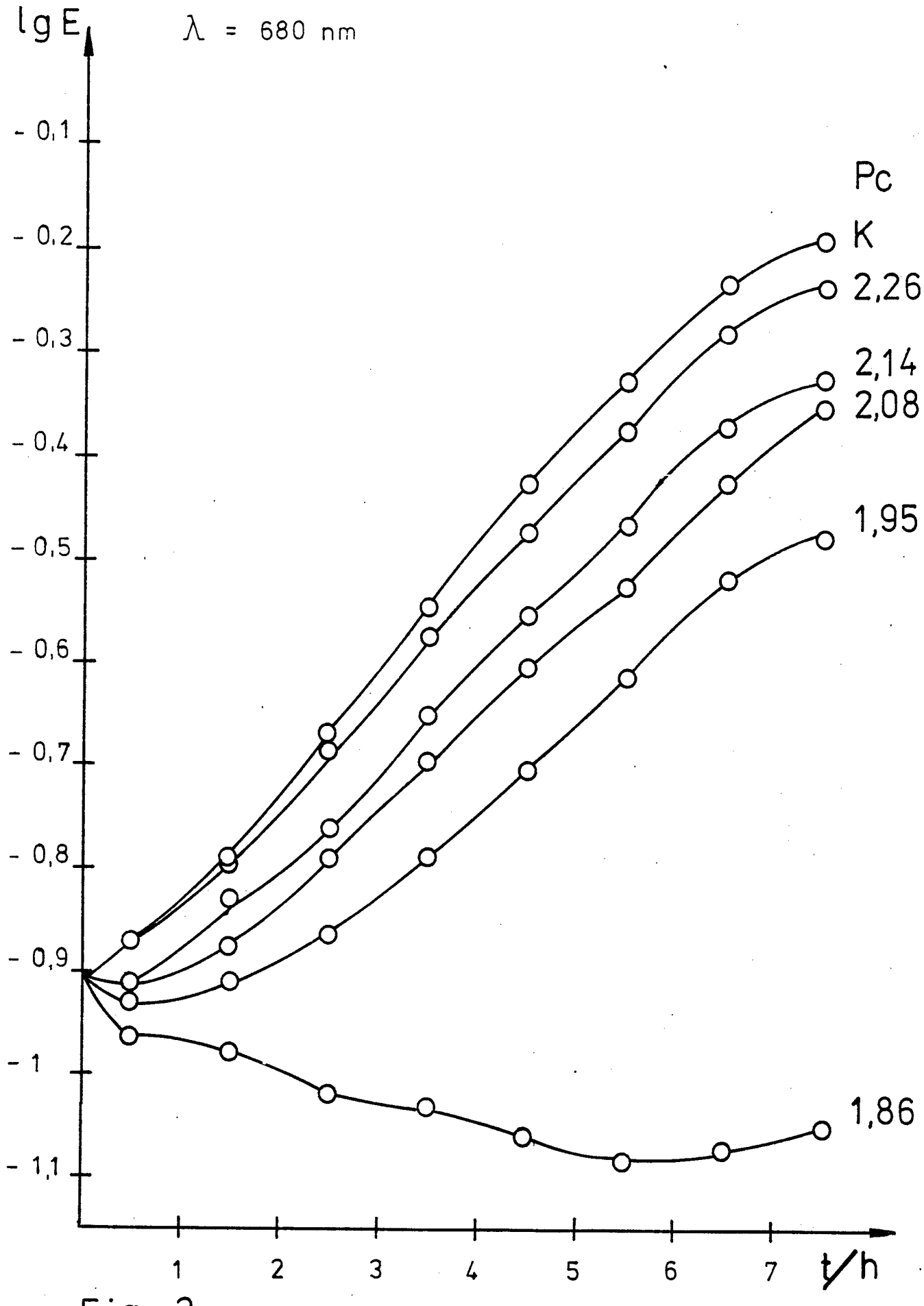

lg E
λ = 680 nm
- 0,1
- 0,2
- 0,3
- 0,4
- 0,5
- 0,6
- 0,7
- 0,8
- 0,9
- 1
- 1,1
Pc
K
2,26
2,14
2,08
1,95
1,86
1
2
3
4
5
6
7
t/h

Fig. 3