



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 216 253 A1

3(51) C 12 Q 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 252 421 2

(22) 27.06.83

(44) 05.12.84

(71) Pädagogische Hochschule „Wolfgang Ratke“ Köthen, 4370 Köthen, Lohmannstraße 23, DD

(72) Kramer, Claus-Rüdiger, Doz. Dr. sc. nat.; Arndt, Horst, Dr. rer. nat.; Böhm, Heinz, Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) Selektionsverfahren für Effektoren mittels Gasumsatz- und Wachstumsanalysen heterotropher Zellsuspensionen

(57) Die Erfindung „Selektionsverfahren für Effektoren mittels Gasumsatz- und Wachstumsanalysen 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 Atmungshemmer, primär nichtrespiratorische Effektoren und unspezifische Atmungseffektoren besonders hinsichtlich der Beeinflussung sowohl der optischen Eigenschaften als auch der respiratorischen Gaswechselumsätze zu charakterisieren und zu differenzieren. Die Erfindung basiert auf einem Auswertungsverfahren, das die entwicklungsbedingten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften bei verschiedenen Wellenlängen sowie der respiratorischen Gaswechselumsätze – Kohlendioxidproduktion und Sauerstoffverbrauch – substanzbehandelter Zellsuspensionen nutzt. Die Fig. 1 illustriert anhand von Wirkbildern für die Beeinflussung der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm und der Kohlendioxidproduktion durch einen Effektor A, daß das Auswertungsverfahren darüber hinaus Informationen über Einsetzen, Verlauf und Beständigkeit der Wirkungsprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkungsdauer der Effektoren sowie über Art und Weise der Wirkungsauslösung liefert.

Titel der Erfindung

Selektionsverfahren für Effektoren mittels Gasumsatz- und Wachstumsanalysen heterotropher 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. Nach dem Patent "Verfahren zur Selektion biochemisch wirksamer Substanzen", DD WP C 12 K 1/00 Nr. 94 234, lassen sich mittels heterotroph kultivierter Zellsuspensionen diejenigen Chemikalien aus einer Stichprobe 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, werden nach diesem Verfahren als biochemisch unwirksam eingestuft. Solche Substanzen müssen dann in einer Kette nachfolgender Tests spezifischer Zielstellung auf entsprechenden spezifischen Effekt geprüft werden, z.B. potentielle Photosynthesehemmer in einem Autotrophtest, Effektoren des Nukleinsäurehaushaltes in einem Nukleinsäure-Test.

Auch die als "biochemisch wirksam" eingestuften Substanzen bilden hinsichtlich ihrer Wirkungsweise keine einheitliche Gruppe. Sie können die Atmung unmittelbar beeinflussen, also als primäre Atmungseffektoren wirken. Aber es besteht auch die Möglichkeit, daß sie nur mittelbar bzw. im Ergebnis ihrer Metabolisie-

zung den Atmungsprozeß tangieren, während sie ihre Hauptwirkung in anderen Stoffwechselbereichen manifestieren. Informationen hierüber sowie die Selektion von vorrangigen Photosynthese- bzw. Atmungseffektoren, von nicht primären Photosynthese- oder Atmungshemmern, die Aufdeckung von Permeationseffekten und die Selektion von Hemmern der Licht- und Dunkelreaktion ermöglichen Selektionsverfahren, die auf Auswertungsmodi basieren, die entweder die entwicklungsbedingten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften oder der photosynthetischen bzw. respiratorischen Gaswechsellumsätze substanzbehandelter autotropher bzw. heterotropher Zellsuspensionen nutzen.

Obwohl diese Selektionsverfahren darüber hinaus in der Lage sind, die Wirkungsverläufe näher zu charakterisieren, gestatten sie keine Aussagen über die Zeitabfolge der substanzinitiierten Beeinflussung der optischen Eigenschaften im Vergleich zur Beeinflussung der Gaswechsellumsätze.

Da auch eine vergleichende Betrachtung der Auswertungsergebnisse aus mehreren dieser Verfahren keine gesicherten Aussagen zulassen, ergibt sich der Wunsch nach einem Verfahren, das zwar ebenfalls auf Suspensionskulturen einzelliger Grünalgen- oder anderer Organismensuspensionen beruht, dessen Auswertungsmodus jedoch durch gleichzeitige bzw. simultane Analyse der optischen Eigenschaften und der entsprechenden Gaswechsellumsätze eine genauere Charakterisierung der Effektoren hinsichtlich ihrer Wirkspezifität auf die Atmungsprozesse und optischen Eigenschaften der Zellsuspensionen gestattet.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für die Testung der biologischen

Aktivität von Effektoren mittels paralleler oder simultaner Analyse der substanzinitiierten Beeinflussung der optischen Eigenschaften sowie der respiratorischen Kohlendioxidproduktion und/oder des respiratorischen Sauerstoffverbrauchs heterotropher Zell- oder Organismensuspensionen einen Auswertungsmodus vorzuschlagen, der neben einer Selektion primärer Atmungshemmer, einer Selektion von Effektoren, die die Atmung nicht primär tangieren, aber biologisch wirksam sind, auch die Wirkspezifik besonders der gleichzeitigen Beeinflussung der optischen Eigenschaften und der respiratorischen Gaswechselumsätze zu charakterisieren und zu vergleichen 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 als Wachstumsparameter und der respiratorischen Gaswechselumsätze substanzbehandelter, heterotroph kultivierter einzelliger Grünalgensuspensionen primäre Atmungshemmer, Effektoren, die nicht primär die Atmung tangieren und unspezifische Atmungseffektoren zu charakterisieren und zu differenzieren. Darüber hinaus werden 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 Atmung, über Permeations- und Transportprobleme sowie über den Wirkungsmechanismus des Effektors erhalten. Insbesondere gestattet das Verfahren, die Effekte für die Beeinflussung der optischen Eigenschaften mit denen der Beeinflussung der respiratorischen Gaswechselumsätze zu vergleichen und damit die Wirkspezifik und das Wechselverhältnis zwischen Gaswechselumsatz- und Wachstumsbeeinflussung zu charakterisieren und für die gezielte Wirkstoffforschung zu nutzen.

Beim "Selektionsverfahren für Effektoren mittels Gasumsatz- und Wachstumsanalysen heterotropher 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 hetero-

troph kultivierten Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen in unmittelbarem 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. Kontinuierlich oder zu festgelegten Zeitpunkten werden dann Proben und Vergleichskulturen oder Anteile von beiden parallel oder in definierter Folge mittels spektralanalytischer Verfahren bei einem, zwei oder mehreren Wellenlängenbereichen des infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektrums analysiert sowie die respiratorische Kohlendioxidproduktion mittels Infrarot-Gasanalytoren, ¹⁴C-Methode, photometrischer Methoden und weiterer Verfahren und/oder der respiratorische Sauerstoffverbrauch mittels Paramagnet-Gasanalytoren, sauerstoffsensitiver Elektroden, polarographischer und anderer elektrochemischer Meßketten, manometrischer Verfahren oder der Winkler-Methode analysiert und die dabei gewonnenen Ergebnisse beider Analysemethoden - Analyse der optischen Eigenschaften und Analyse der respiratorischen Gaswechselumsätze - vergleichenden Betrachtungen unterzogen.

Ausführungsbeispiel

Von der zu prüfenden Substanz A werden in einem Heterotrophtest die Beeinflussungen der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm und der respiratorischen Kohlendioxidproduktion untersucht. Hierzu werden heterotroph kultivierte Zellsuspensionen einzelliger Grünalgen der Species *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, Stamm BÖHM und BORNS 1972/1 mit einer Suspensionsdichte von $12 \cdot 10^6$ Zellen/cm³ mit verschiedenen konzentrierten wäßrigen Lösungen der zu prüfenden Substanz A beimpft und zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 37,5°C im Dunkeln belüftet, wobei Glucose als organische Kohlenstoffquelle eingesetzt wird, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Atmung gegeben sind. Die Analysen der optischen Eigenschaften und der respiratorischen Kohlendioxidproduktion erfolgten nach einer spezifisch entwickelten Meßanordnung, die durch Kopplung von kommerziell erhältlichen Infrarot- und Paramagnet-Gasanalytoren eine gleichzeitige Bestimmung der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentratio-

nen der entwicklungsbedingten Gaswechselumsätze an 6 Meßplätzen im offenen Gasstrom mit hoher Genauigkeit sowie eine äußere Messung der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm ermöglichte. Während das Wachstum und der respiratorische Gaswechselumsatz der in Nährlösung suspendierten Zellen in den unbehandelten Vergleichskulturen einer normalen heterotrophen Wachstumsentwicklung entsprechen, werden die optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm sowie die Kohlendioxid- und Sauerstoffumsätze in den mit Chemikalien versetzten Chlorella-Suspensionen während des Wachstums und der Entwicklung mehr oder weniger beeinflusst, wenn verschiedene Substanzkonzentrationen den Atmungsprozeß mehr oder weniger stören.

Die Ergebnisse der Analysen für die Substanz A sind der Fig. 1 zu entnehmen. Zum besseren Vergleich wurden in allen Fällen vergleichbare Maßstäbe in Fig. 1 verwendet.

Die Fig. 1, A₁ enthält die dekadischen Logarithmen der Extinktionsmessungen bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle K und die mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 1, 2, 3 und 4 in Abhängigkeit von der Wachstums- bzw. Einwirkzeit, Fig. 1, A₂ die entsprechenden Ergebnisse solcher Extinktionsmessungen bei 750 nm. Obwohl beide Wirkbilder prinzipiell ähnliche Wirkungsverläufe zeigen, bestehen größere Unterschiede im Zeitpunkt des Einsetzens, im Verlauf und in der Beständigkeit der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis des Effektors. Das verdeutlicht, 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 Arbeitsgang zu zum Teil sehr differenzierten Aussagen hinsichtlich der Wirkung auf die optischen Eigenschaften führen kann. Besonders deutlich zeigen sich diesbezügliche Unterschiede bei Korrelationen der dekadischen Logarithmen der Extinktionswerte zueinander, Fig. 1, A₆, bzw. bei Auftragungen der Q-Werte, $Q = E_{680}/E_{750}$, in Abhängigkeit von der Wirkdauer, Fig. 1, A₃.

Die Fig. 1, A₄ zeigt eine Auftragung der dekadischen Logarithmen der Konzentrationen der respiratorischen Kohlendioxidproduktion für die unbehandelte Kontrolle K und die mit abgestuften Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 1 bis 4

in Abhängigkeit von der Wachstums- bzw. Einwirkzeit. Im Vergleich zur Beeinflussung der optischen Eigenschaften in Fig. 1, A_1 und A_2 bestehen große Unterschiede im Zeitpunkt des Einsetzens, im Verlauf und in der Beständigkeit der Wirkungsausprägung der Wirkkurven in Abhängigkeit von der Dosis der Substanz A. So hemmen alle 4 Konzentrationsstufen in Abhängigkeit von der Dosis von Anfang an die Kohlendioxidproduktion.

Die Dosis 2 führt zu einer Totalhemmung und die Dosen 3 und 4 scheinen den Kohlendioxidproduktionsprozeß in einen Kohlendioxidverbrauchsprozeß umzukehren.

Zusätzliche, weiterreichende Informationen zur Wirkspezifität der Substanz A auf den komplexen Atmungsprozeß heterotropher Zellsuspensionen sind über Vergleiche der Ergebnisse der optischen Analyse mit denen der Gaswechselumsatz-Analyse, in die beide respiratorischen Gaswechselumsätze - Kohlendioxidproduktion und Sauerstoffverbrauch - einbezogen werden können, zugänglich. Die Fig. 1, A_5 zeigt als Beispiel in Form einer Auftragung der dekadischen Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm und der dekadischen Logarithmen der Konzentrationen der respiratorischen Kohlendioxidproduktion einen solchen Vergleich. Der Fig. 1, A_5 ist zu entnehmen, daß bereits die Dosis 1 die Kohlendioxidproduktion stärker hemmt als das Wachstum bei 680 nm, wobei der Wirkungsverlauf für Dosis 1 dem der Kontrolle K ähnlich ist. Der Graph für Dosis 2 verdeutlicht, soweit eine Auswertung möglich war, daß diese Dosis das Wachstum vergleichsweise zur Dosis 1 und zur Kohlendioxidproduktion stärker hemmt, also ein anderer Wirkmechanismus vorliegt. Ähnliche Auswertungen für die Dosen 3 und 4 konnten in diesem Fall nicht durchgeführt werden, da die Umkehrung des respiratorischen Gaswechselumsatzes durch diese Dosen das nicht zuließen.

Neben den in der Fig. 1, A_1 bis A_6 für die Substanz A vorgestellten spezifischen Wirkbildern, die eine differenzierte Beurteilung der Wirkeigenschaften des Effektors und damit eine Selektion zulassen, sind n qualitativ und quantitativ unterscheidbare Wirkungsverläufe sowohl hinsichtlich der Beeinflussung der optischen Eigenschaften bei mehreren Wellenlängen als auch hinsichtlich beider respiratorischer Gaswechselumsätze denkbar. Die Fig. 2 zeigt als Beispiel 6 verschiedene Wirkbilder von n

möglichen in Form von Auftragungen der Respirationsgeschwindigkeit dc_{CO_2}/dt als Funktion der Wachstums- bzw. Einwirkzeiten für die Beeinflussung des heterotrophen Atmungsprozesses einzelliger Grünalgen durch die Effektoren B, C, D, E, F und G. Im Gegensatz zu Fig. 1, A₄ erfolgte hier die Applikation nicht zur nullten Stunde, sondern erst im Bereich der dritten bis vierten Stunde. Der Applikationszeitpunkt ist in Fig. 2 durch Pfeile gekennzeichnet.

Durch Vergleiche entsprechender Wirkbilder, die aus parallelen oder simultanen Analysen der wachstumsbedingten Beeinflussungen der optischen Eigenschaften und der respiratorischen Gaswechsellumsätze resultieren, 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 Gasumsatz- und Wachstumsanalysen heterotropher Zellsuspensionen, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften und der respiratorische Kohlendioxid- und/oder Sauerstoff-Umsatz substanzbehandelter heterotropher Zellsuspensionen oder Organismensuspensionen genutzt werden, um mittels substanz-initiiertes Variation der optischen Eigenschaften und respiratorischen Kohlendioxid- und/oder Sauerstoff-Umsätze solcher Suspensionen die Effektoren nach ihrer Wirkspezifität 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 Zell- oder Organismensuspensionen mittels Spektalkolorimetrie, Spektralphotometrie oder Nephelometrie bei ein bzw. zwei bis n verschiedenen Wellenlängenbereichen oder ganzen Spektralbereichen im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich analysiert werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß der respiratorische Sauerstoffumsatz mittels Paramagnet-Gasanalytoren, sauerstoffsensitiven Elektroden, Polarographie und anderen elektrochemischen Meßketten, manometrischen Verfahren, der Winklermethode oder durch Kombination mehrerer dieser Methoden analysiert wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß der respiratorische Kohlendioxidumsatz mittels Infrarot-Gasanalytoren, ¹⁴C-Methode, photometrischer Methoden oder durch Kombination dieser Methoden analysiert wird.

- 9
4
6. Verfahren nach Punkt 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die optischen Eigenschaften und die respiratorische Kohlendioxidproduktion und/oder der respiratorische Sauerstoffverbrauch der heterotrophen Zell- oder Organismensuspensionen parallel oder simultan analysiert werden.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

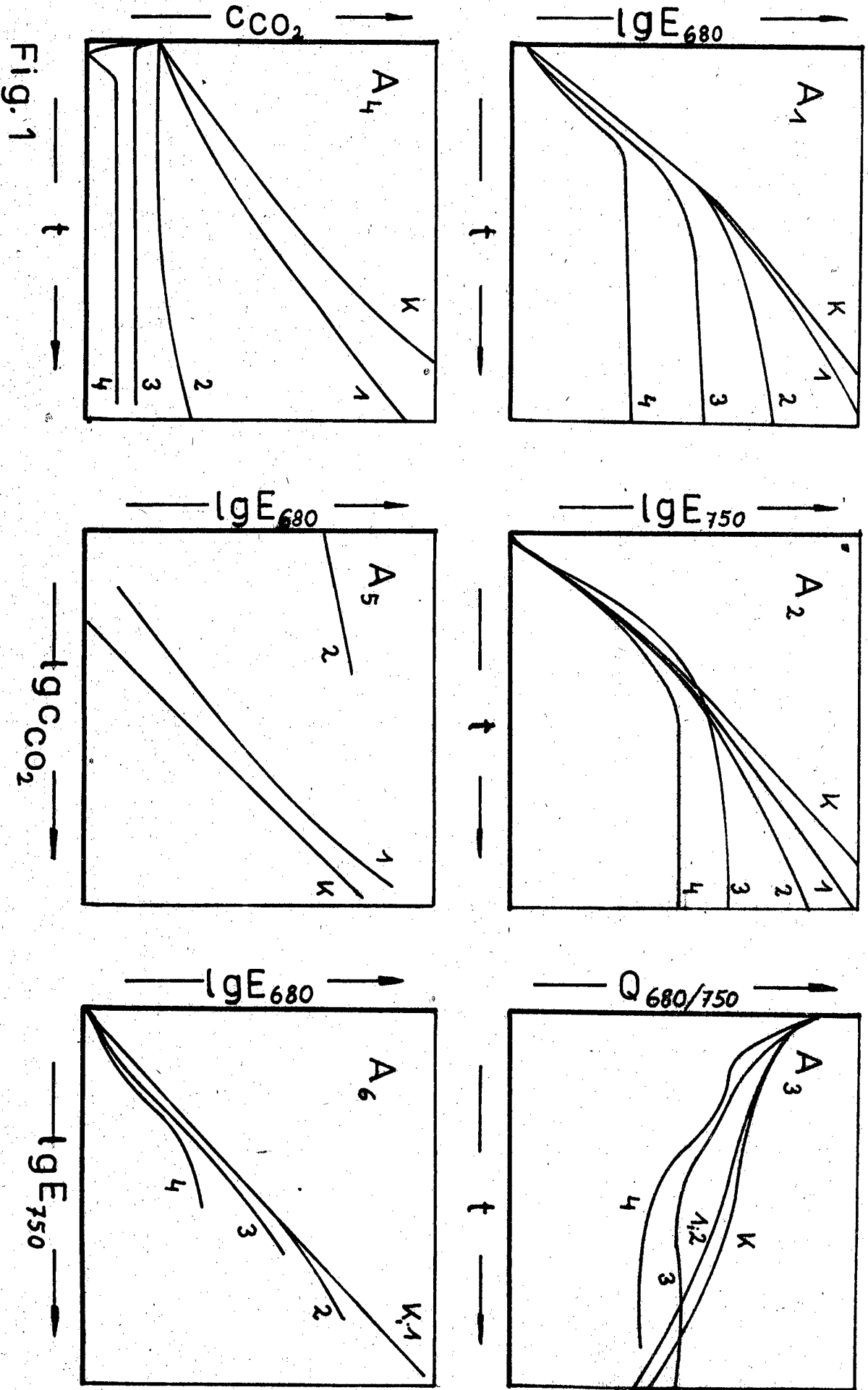


Fig. 1

dc/dt →

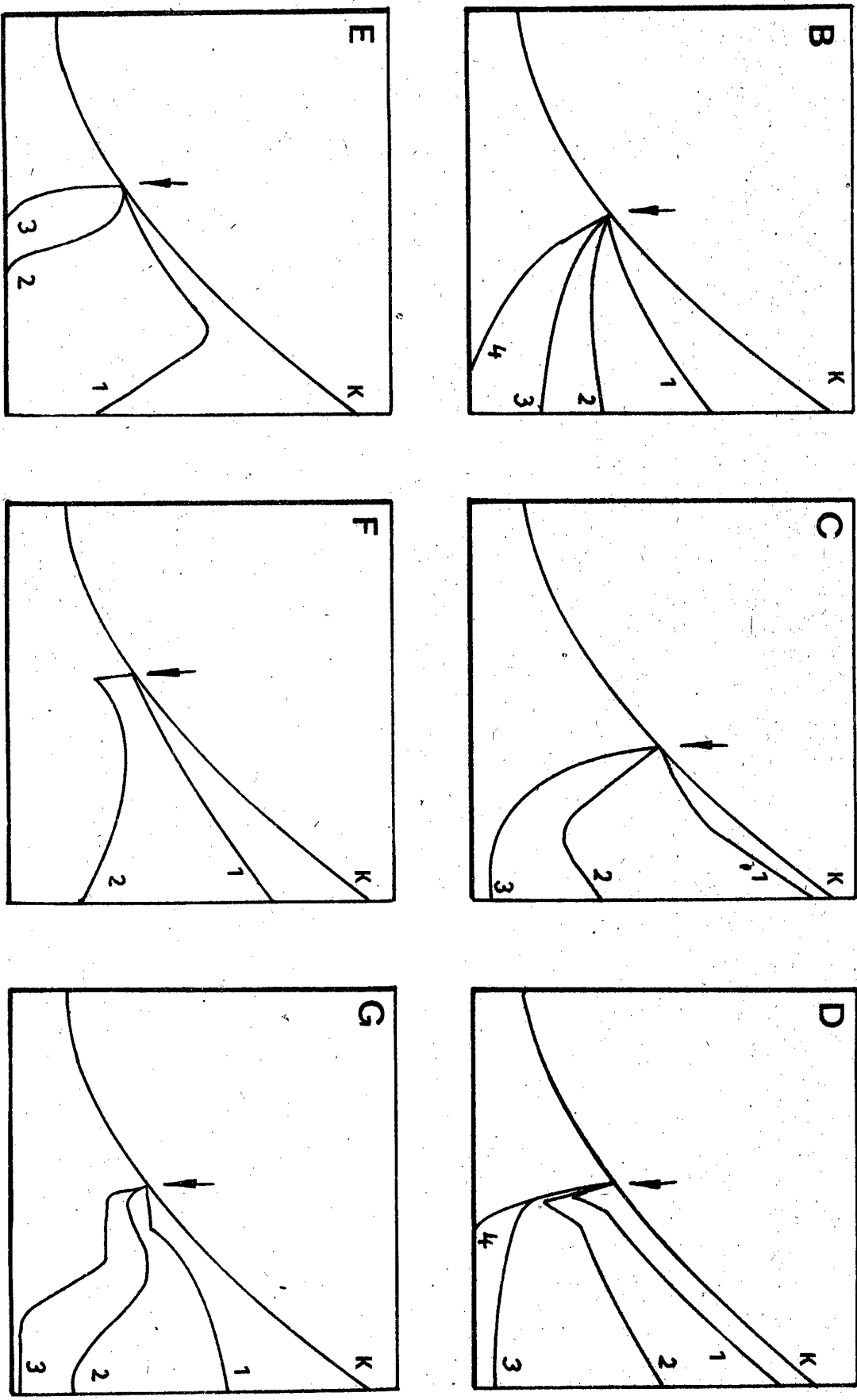


Fig. 2

27 JUN 1983 * 090440