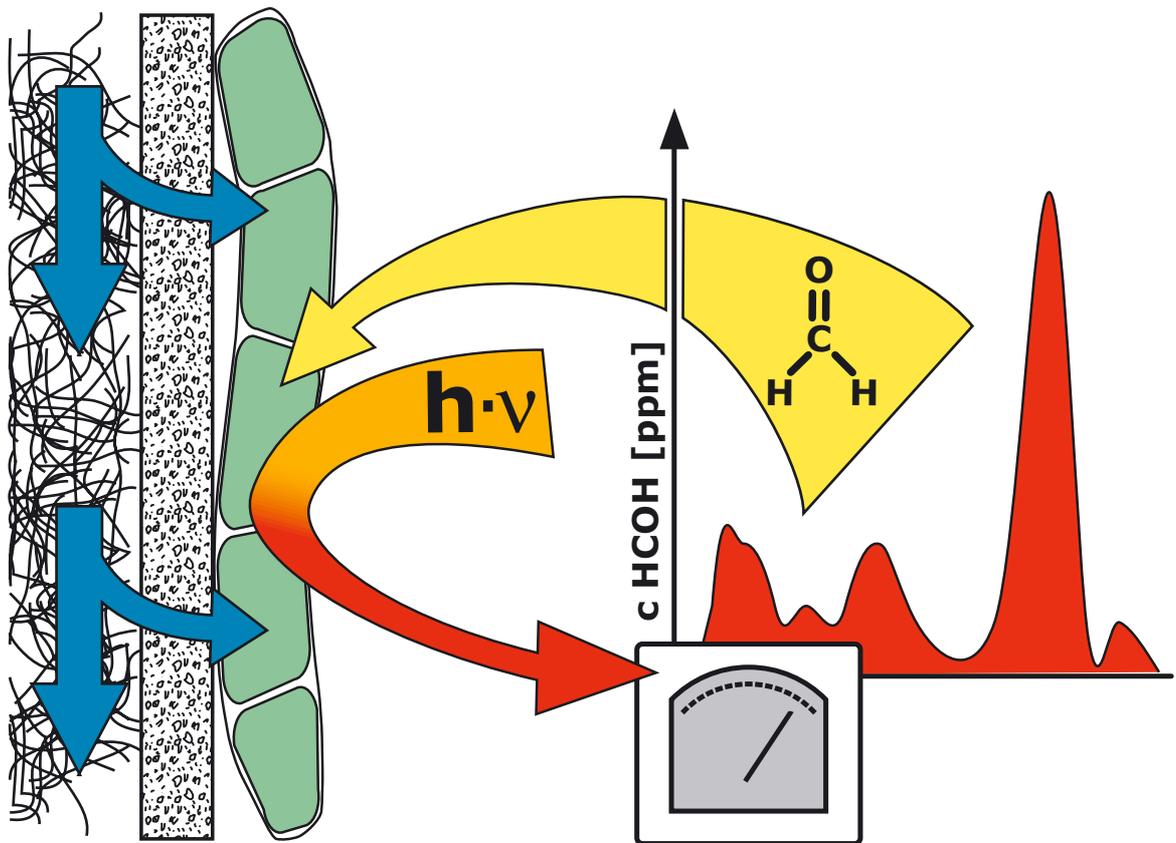


## Entwicklung von selektiven Biosensoren mit immobilisierten Mikroalgen

-  
Untersuchungen zur Detektion und  
Identifizierung von gasförmigen und  
wassergelösten toxischen Verbindungen



**Entwicklung von selektiven Biosensoren mit  
immobilisierten Mikroalgen**

-

**Untersuchungen zur Detektion und Identifizierung von gasförmigen und  
wassergelösten toxischen Verbindungen**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

**Björn Podola**

aus Düsseldorf

CUVILLIER VERLAG, Göttingen

**2004**

## **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004

Zugl.: Köln, Univ., Diss., 2004

ISBN 3-86537-302-X

Berichterstatter:

**Prof. Dr. Michael Melkonian**

**Prof. Dr. Helmut Hillebrand**

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Dezember 2004

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-302-X

## VORWORT

Die vorliegende Dissertation wurde am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt und von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen. Die Abschlußprüfung fand am 10. Dezember 2004 statt.

Herrn Prof. Dr. Michael Melkonian als Betreuer und Erstreferent dieser Arbeit gebührt mein besonderer Dank für die fortwährende theoretische und praktische Unterstützung zum wissenschaftlichen Gelingen der Dissertation. Sehr zu schätzen weiß ich außerdem die Möglichkeit zu einer eigenständigen Arbeitsweise, auch in anderen Projekten im Bereich der Biotechnologie. Nicht unerwähnt bleiben soll ebenfalls die nicht immer ganz einfache aber verlässliche Bereitstellung der finanziellen Mittel über die gesamte Dauer der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Helmut Hillebrand danke ich für die Übernahme des Zweitreferats.

Der Gruppe „Biotechnologie der Mikroalgen“ sowie der gesamten Arbeitsgruppe Melkonian danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit - Besonders Herrn Dipl.-Biol. Thomas Naumann für seine innovativen Ideen und fachkundigen Ratschläge, Frau Dipl.-Biol. Eva Nowack, den technischen Mitarbeitern Frau Nicole Feja, Frau Eva Schell und Frau Ute Powalowski sowie Herrn Dr. Karl-Heinz Linne von Berg für ihre Unterstützung in den verschiedensten Dingen.

Dank für die Unterstützung bei der Korrektur steht außerdem Herrn Dr. Dirk Mohr, Frau Dr. Bettina Koblenz, und Frau Dr. Jutta Schoppmeier zu, die mir durch ihre Anmerkungen wertvolle Dienste erwiesen. Überdies bleiben mir zahlreiche Mittags- und Kaffeepausen in guter Erinnerung. Dirk Mohr danke ich ferner für die Hinweise zur statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Des weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Versuchswerkstatt des Botanischen Instituts, ohne deren unkomplizierte Unterstützung die technische Entwicklung der Biosensorsysteme in diesem Umfang nicht durchführbar gewesen wäre. Besonders erwähnt seien hier Herr Feinmechanikermeister Leo Leson und Herr Ronald Zürner, die viel Enthusiasmus und Zeit in die perfekte Umsetzung kleinster technischer Details investierten.

Mein Dank gilt ebenso der Köln Fortune Stiftung des Klinikums der Universität zu Köln sowie der Graduiertenförderung der Universität zu Köln, die diese Arbeit finanziell unterstützten.



## KURZZUSAMMENFASSUNG

Seit einigen Jahren werden Biosensoren als alternative Technologie zur Analyse von Umweltbelastungen diskutiert. Unter Beachtung des Potentials von Mikroalgen in der Biotechnologie soll deren Nutzung in Biosensorsystemen im Rahmen dieser Arbeit weiter erschlossen werden.

Die Basis dafür bildet ein neu entwickeltes Verfahren zur stabilen Immobilisierung von Mikroalgen. Diese Methode ist auf der Trennung von immobilisierten Kulturen und dem kontinuierlichen Kulturmedienstrom durch eine semipermeable Membran begründet. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen konnte so eine physiologische Stabilität der Algen unterschiedlicher Taxa aufrecht erhalten werden. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurde ein Biosensorsystem konstruiert, das die Chlorophyllfluoreszenz der immobilisierten Organismen als Biosensorsignal nutzt. Die simultane Anwendung verschiedener Mikroalgen in einem Biosensorsystem wurde erstmals durch die Entwicklung von Array-Biochips in Verbindung mit einer Fluoreszenz-Imaging Technik ermöglicht.

Zur Charakterisierung des Biosensors wurden u. a. gasförmige und wassergelöste Schadstoffe im toxikologisch relevanten Meßbereich eingesetzt. Methanol- (50-500 ppm) und Formaldehyddämpfe (0,01-10 ppm) ließen sich durch das konzentrationsabhängige Biosensorsignal der Grünalge *Klebsormidium* innerhalb weniger Minuten signifikant nachweisen. Das reversible Signal konnte außerdem über einen Zeitraum von 30 Tagen in wiederholten Expositionsexperimenten reproduziert werden. In einer wässrigen Lösung konnten mittels verschiedener Mikroalgen die Herbizide Atrazin, Simazin, Diuron, Isoproturon und Paraquat innerhalb kurzer Zeit mit dem Biosensor nachgewiesen werden. Die erreichten Nachweisgrenzen lagen je nach verwendeter Alge und Herbizid zwischen 0,1 und 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Um die Selektivität des Biosensors zu erhöhen, wurden die unterschiedlichen Sensitivitäten der verschiedenen Algen genutzt. Methanol und Formaldehyd konnten signifikant anhand der Reaktionsrate, d. h. dem Quotienten der Biosensorsignale von zwei *Klebsormidium*-Stämmen, identifiziert werden. Mit Hilfe der gleichen Methodik wurde für jedes von fünf Herbiziden ein spezifisches Wirkungsmuster (RP1) erstellt, das auf den Biosensorsignalen von neun Algenstämmen basiert. Zur Überprüfung dieses Identifizierungsverfahrens wurde ein weiterer Satz der gleichen Wirkungsmuster (RP2) erstellt. Im Vergleich von RP1 und RP2 zeigte sich eine relativ

hohe Übereinstimmung zwischen identischen Herbiziden, während höhere Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Herbiziden zu beobachten waren.

Das hier entwickelte Biosensorsystem in Kombination mit dem diversitätsbasierten Identifikationsverfahren erwies sich als prinzipiell geeignet zur selektiven Messung von Schadstoffen in Echtzeit. Zukünftige Untersuchungen sollten jedoch besonders in Hinblick auf eine weitere Verbesserung von Selektivität und Sensitivität erfolgen.

---

**ABSTRACT**

In recent years, biosensors are discussed as an alternative technology in the analysis of environmental perturbations. Regarding the potential of algal diversity in biotechnology, this study aimed at utilising the advantages of biosensors incorporating microalgae.

As a requirement for the long-term use of microalgae in biosensor systems, a novel procedure for the stable immobilisation of microalgal cultures was developed. The method is based on the separation of the immobilised cells from a continuous flow of culture medium by a semi-permeable membrane and provided a sufficient physiological stability of microalgal strains from different taxa over a period of several weeks. By means of the new immobilisation technique a microalgal biosensor system was constructed. The signal of the biosensor was measured by a PAM chlorophyll fluorometer in terms of photosynthetic fluorescence induction of immobilised algae. The simultaneous application of different algal strains was enabled by the development of array plate biochips (algal sensor chip: ASC) in association with a fluorescence imaging technique.

To characterise the biosensor system, gaseous and water soluble toxicants were used in toxicologically relevant concentrations: Methanol (50-500 ppm) and formaldehyde (0.01-10 ppm) vapours were significantly detectable within minutes by a concentration-dependent biosensor signal derived from the green alga *Klebsormidium*. Additionally, repeated exposure experiments revealed a reversible and reproducible signal of the biosensor during 30 days of operation in gas phase. Detection of the herbicides atrazine, simazine, diuron, isoproturon and paraquat was also performed rapidly in aqueous solutions using several algal strains at detection limits from 0.1 to 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ , depending on the herbicide and strain used. Diverse sensitivities of microalgae to toxicants were employed to obtain selectivity of the biosensor. Methanol and formaldehyde were significantly identified by the compound-specific response rate as a ratio of the *Klebsormidium*-biosensor's responses of two different strains. By the same method, a complex herbicide-specific response pattern (RP1) was generated for each of five different herbicides using the biosensor signals of nine ASC-immobilised algal strains. For evaluation of selectivity, an identical set of RPs (RP2) was recorded. Comparing RP1 and RP2, a relatively high congruence was observed between RPs of identical herbicides, while RPs of different herbicides showed higher deviations.

This study suggested that the diversity-based, selective real-time detection of toxicants can be realised employing the algal sensor chip developed here. However, further improvements will be needed.

**INHALT**

|                                                                                                                                      |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>KURZZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                                                                                     | <b>I</b>           |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                 | <b>III</b>         |
| <b>INHALT .....</b>                                                                                                                  | <b>V</b>           |
| <br>                                                                                                                                 |                    |
| <b><u>I.</u>     <u>  <b>EINLEITUNG</b></u>.....</b>                                                                                 | <b><u>  1</u></b>  |
| <br>                                                                                                                                 |                    |
| <b>I.1.    <b>Biosensoren</b>.....</b>                                                                                               | <b>1</b>           |
| <b>I.2.    <b>Verwendung von Algen in der Umwelttechnologie</b> .....</b>                                                            | <b>4</b>           |
| <b>I.3.    <b>Nutzung des Potentials von Mikroalgen in Biosensorsystemen: Zielsetzung<br/>          und Vorgehensweise</b> .....</b> | <b>7</b>           |
| <b>I.4.    <b>Umweltrelevanz der verwendeten toxischen Verbindungen</b> .....</b>                                                    | <b>9</b>           |
| <br>                                                                                                                                 |                    |
| <b><u>II.</u>    <u>  <b>MATERIAL &amp; METHODEN</b></u>.....</b>                                                                    | <b><u>  10</u></b> |
| <br>                                                                                                                                 |                    |
| <b>II.1.   <b>Kultivierung von Mikroalgen in Flüssigkulturen</b>.....</b>                                                            | <b>10</b>          |
| II.1.1. Mikroalgenstämme, Kulturbedingungen und Ernte.....                                                                           | 10                 |
| II.1.2. Kulturmedien .....                                                                                                           | 11                 |
| <b>II.2.   <b>Das Verbundschichtverfahren zur Kultivierung immobilisierter Mikroalgen</b><br/>          .....</b>                    | <b>13</b>          |
| II.2.1. Kultivierung von Algen im Verbundschichtsystem.....                                                                          | 14                 |
| <b>II.3.   <b>Aufbau der Biosensoren</b> .....</b>                                                                                   | <b>16</b>          |
| II.3.1. Herstellung der Biosensormembranen.....                                                                                      | 16                 |
| II.3.2. Konstruktion der Biosenzorzellen.....                                                                                        | 19                 |
| II.3.3. Nutzung der Chlorophyllfluoreszenz als biosensorisches Signal .....                                                          | 23                 |
| <b>II.4.   <b>Expositionsexperimente mit toxischen Substanzen</b> .....</b>                                                          | <b>28</b>          |
| II.4.1. Expositionsexperimente mit VOCs .....                                                                                        | 28                 |
| II.4.2. Expositionsexperimente mit Herbiziden.....                                                                                   | 30                 |
| <b>II.5.   <b>Statistische Analysen</b> .....</b>                                                                                    | <b>32</b>          |
| <b>II.6.   <b>Analyse von schadstoffspezifischen Reaktionsraten und Wirkungsmustern</b></b>                                          | <b>33</b>          |
| <br>                                                                                                                                 |                    |
| <b><u>III.</u>   <u>  <b>ERGEBNISSE</b></u>.....</b>                                                                                 | <b><u>  35</u></b> |
| <br>                                                                                                                                 |                    |
| <b>III.1.   <b>Stabilität der immobilisierten Kulturen</b> .....</b>                                                                 | <b>35</b>          |

---

|                    |                                                                                                                           |                   |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>III.2.</b>      | <b>Entwicklung eines Algenbiosensors für gasförmige Schadstoffe .....</b>                                                 | <b>37</b>         |
| III.2.1.           | Etablierung eines langzeitstabilen fluoreszenzoptischen Biosensorsystems unter Nutzung der Verbundschichttechnologie..... | 37                |
| III.2.2.           | Quantitative und selektive Detektion von Methanol und Formaldehyd.....                                                    | 45                |
| <b>III.3.</b>      | <b>Analytik von wassergelösten Herbiziden mittels des Algen Sensor Chips ....</b>                                         | <b>50</b>         |
| III.3.1.           | Membranmaterial und Immobilisierung .....                                                                                 | 50                |
| III.3.2.           | Detektion von wassergelösten Herbiziden.....                                                                              | 53                |
| III.3.3.           | Analyse von herbizidspezifischen Wirkungsmustern.....                                                                     | 59                |
| <b><u>IV.</u></b>  | <b><u>DISKUSSION</u> .....</b>                                                                                            | <b><u>62</u></b>  |
| <b>IV.1.</b>       | <b>Technische Entwicklung des Biosensorsystems .....</b>                                                                  | <b>62</b>         |
| IV.1.1.            | Immobilisierbarkeit und physiologische Stabilität von Mikroalgenkulturen im Verbundschichtkulturverfahren .....           | 62                |
| IV.1.2.            | Verfahren zur Messung und Auswertung der Chlorophyll a-Fluoreszenz als Biosensorsignal.....                               | 64                |
| IV.1.3.            | Einfluß von Immobilisierung, Temperatur und Membranmaterial auf die Sensitivität des Biosensors.....                      | 66                |
| <b>IV.2.</b>       | <b>Quantitativer Nachweis toxischer Verbindungen.....</b>                                                                 | <b>71</b>         |
| IV.2.1.            | Flüchtige organische Verbindungen .....                                                                                   | 71                |
| IV.2.2.            | Herbizide.....                                                                                                            | 75                |
| <b>IV.3.</b>       | <b>Entwicklung eines selektiven Biosensors .....</b>                                                                      | <b>78</b>         |
| IV.3.1.            | Biosensorische Methoden der selektiven Schadstoffmessung.....                                                             | 78                |
| IV.3.2.            | Nutzung der unterschiedlichen Sensitivität von Mikroalgen zur Schadstoffidentifizierung.....                              | 78                |
| <b>IV.4.</b>       | <b>Optimierung von Sensitivität und Selektivität des Biosensors .....</b>                                                 | <b>82</b>         |
| <b><u>V.</u></b>   | <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u> .....</b>                                                                                       | <b><u>84</u></b>  |
| <b><u>VI.</u></b>  | <b><u>LITERATUR</u> .....</b>                                                                                             | <b><u>86</u></b>  |
| <b><u>VII.</u></b> | <b><u>ANHANG</u>.....</b>                                                                                                 | <b><u>102</u></b> |

---

**ABBILDUNGEN**

|                     |                                                                                                                                                      |    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1</b>  | Das Verbundschichtverfahren zur Kultivierung immobilisierter Mikroalgen.....                                                                         | 13 |
| <b>Abbildung 2</b>  | Vorrichtung zur Immobilisierung von Mikroalgen auf Biosensormembranen .....                                                                          | 18 |
| <b>Abbildung 3</b>  | Schematische Darstellung des Biosensors Typ II für Luftschadstoffe.....                                                                              | 19 |
| <b>Abbildung 4</b>  | Schematische Darstellung des Biosensors Typ IIIa/b für Luftschadstoffe.....                                                                          | 20 |
| <b>Abbildung 5</b>  | Schematische Darstellung des Biosensors Typ IIIc für Luftschadstoffe.....                                                                            | 21 |
| <b>Abbildung 6</b>  | Schematische Darstellung des Biosensors Typ FIIb für wassergelöste Schadstoffe.....                                                                  | 22 |
| <b>Abbildung 7</b>  | Die Beleuchtungsprogramme zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz .....                                                                               | 27 |
| <b>Abbildung 8</b>  | Versuchsaufbau der Expositionsexperimente mit flüchtigen organischen Verbindungen ...                                                                | 29 |
| <b>Abbildung 9</b>  | $\pm F/F'_m$ von <i>Klebsormidium</i> bei Kultivierung im Verbundschichtsystem über einen<br>Zeitraum von 30 Tagen .....                             | 35 |
| <b>Abbildung 10</b> | Biosensorsignale von <i>Klebsormidium</i> bei wiederholter Methanolexposition über einen<br>Zeitraum von 30 Tagen .....                              | 37 |
| <b>Abbildung 11</b> | Reversibilität des Biosensorsignals bei Methanolexposition von <i>Klebsormidium</i> .....                                                            | 38 |
| <b>Abbildung 12</b> | Biosensorsignal während der alternierenden Licht-/Dunkelwechsel bei Methanolexposition.<br>.....                                                     | 39 |
| <b>Abbildung 13</b> | Einfluß der Beleuchtungsprogramme zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz auf das<br>Biosensorsignal bei Methanolexposition .....                     | 40 |
| <b>Abbildung 14</b> | Temperaturabhängigkeit des Biosensorsignals von <i>Klebsormidium</i> bei Methanolexposition .<br>.....                                               | 41 |
| <b>Abbildung 15</b> | Einfluß der Immobilisierungsdichte auf das Biosensorsignal von <i>Klebsormidium</i> bei<br>Formaldehydexposition.....                                | 42 |
| <b>Abbildung 16</b> | Absolutes Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Immobilisierungsdichte von<br><i>Klebsormidium</i> oder <i>Pseudokirchneriella</i> .....         | 43 |
| <b>Abbildung 17</b> | Sensitivitäten verschiedener Mikroalgen gegenüber VOC-Dämpfen .....                                                                                  | 44 |
| <b>Abbildung 18</b> | Biosensorsignal von <i>Klebsormidium</i> bei Methanolexposition von 50-500 ppm.....                                                                  | 45 |
| <b>Abbildung 19</b> | Biosensorsignal von <i>Klebsormidium</i> bei Formaldehydexposition von 0,01-10 ppm.....                                                              | 46 |
| <b>Abbildung 20</b> | Einfluß der Dauer der Formaldehydexposition auf das Biosensorsignal von <i>Klebsormidium</i><br>.....                                                | 47 |
| <b>Abbildung 21</b> | Biosensorsignal von <i>Klebsormidium</i> und <i>Chlorella</i> bei VOC-Exposition.....                                                                | 48 |
| <b>Abbildung 22</b> | Reaktionsraten von zwei <i>Klebsormidium</i> -Stämmen bei VOC-Exposition.....                                                                        | 49 |
| <b>Abbildung 23</b> | Biosensorsignal von <i>Chlorella</i> in Abhängigkeit von dem verwendeten Membranmaterial<br>und der Expositionsdauer bei Exposition mit Diuron ..... | 50 |
| <b>Abbildung 24</b> | Biosensorsignal von <i>Pseudokirchneriella</i> in Abhängigkeit von Immobilisierungsdichte und<br>Dauer der Herbizidexposition. ....                  | 51 |
| <b>Abbildung 25</b> | Biosensorsignal von <i>Tetraselmis</i> bei Diuronkonzentrationen von 0,5 bis 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ .....                                          | 55 |
| <b>Abbildung 26</b> | Biosensorsignal von <i>Chlorella</i> und <i>Scherffelia</i> bei Diuron- und Paraquatexposition .....                                                 | 56 |
| <b>Abbildung 27</b> | Biosensorsignal von neun Mikroalgen in Expositionsexperimenten mit fünf Herbiziden. ..                                                               | 58 |
| <b>Abbildung 28</b> | Identifizierung von Herbiziden anhand des herbizidspezifischen Wirkungsmusters .....                                                                 | 60 |

## TABELLEN

|                   |                                                                                                                                                                                          |     |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabelle 1</b>  | Verwendete Algenkulturen .....                                                                                                                                                           | 10  |
| <b>Tabelle 2</b>  | Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen Biosensormembranen und deren Einsatz in den Biosensorsystemen .....                                                                   | 17  |
| <b>Tabelle 3</b>  | Übersicht über die verwendeten Biosensorsysteme .....                                                                                                                                    | 19  |
| <b>Tabelle 4</b>  | Übersicht über die in den wichtigsten experimentellen Setups verwendeten PAM-Chlorophyllfluorometer und deren Spezifikationen und Einstellungen .....                                    | 26  |
| <b>Tabelle 5</b>  | Übersicht über die auf Verbundschichten kultivierten Algen .....                                                                                                                         | 36  |
| <b>Tabelle 6</b>  | Einfluß der Expositionsdauer auf das Signal des Biosensors.....                                                                                                                          | 39  |
| <b>Tabelle 7</b>  | Einfluß des Kulturmediums auf die Wachstumsraten und den physiologischen Zustand von <i>Klebsormidium</i> .....                                                                          | 43  |
| <b>Tabelle 8</b>  | Übersicht über die Sensitivität verschiedener Algenstämme gegenüber Atrazin, Simazin und Diuron .....                                                                                    | 52  |
| <b>Tabelle 9</b>  | Signifikante Nachweisgrenzen im Vergleich der gleichen Algenstämme für die verschiedenen Auswertungsmethoden .....                                                                       | 53  |
| <b>Tabelle 10</b> | Übersicht über die erzielten geringsten Nachweisgrenzen und EC <sub>50</sub> unter Berücksichtigung der verschiedenen Fluoreszenzparameter und Auswertungsmethoden für fünf Herbizide .. | 54  |
| <b>Tabelle 11</b> | Sensitivitäten und Dosis-Wirkungs-Beziehungen neun verschiedener Mikroalgen bei Exposition zu fünf verschiedenen Herbiziden.....                                                         | 57  |
| <b>Tabelle 12</b> | Berechnung der Konzentration von Isoproturon anhand linearer Regression für 9 Algenstämme .....                                                                                          | 59  |
| <b>Tabelle 13</b> | Mittlere Abweichung des Wirkungsmusters RP2 vom herbizidspezifischen Wirkungsmuster RP1 für Triazine und Harnstoffderivate .....                                                         | 61  |
| <b>Tabelle 14</b> | Sensitivitäten von neun Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Anstieg der Fluoreszenz F <sub>t</sub> bei Anwendung des zeitlich terminalen Auswertungsverfahrens.....                    | 102 |
| <b>Tabelle 15</b> | Sensitivitäten neun verschiedener Mikroalgen auf fünf Herbizide: Anstieg der Fluoreszenz F <sub>t</sub> bei Anwendung des zeitlich integrierten Auswertungsverfahrens .....              | 103 |
| <b>Tabelle 16</b> | Sensitivitäten von neun Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Anstieg von $\Delta F/F'_m$ bei Anwendung des zeitlich terminalen Auswertungsverfahrens .....                              | 104 |
| <b>Tabelle 17</b> | Sensitivitäten von neun Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Anstieg von $\Delta F/F'_m$ bei Anwendung des zeitlich integrierten Auswertungsverfahrens .....                            | 105 |
| <b>Tabelle 18</b> | Reaktionsraten und daraus resultierende herbizidspezifische Wirkungsmuster (RP1) für fünf Herbizide berechnet anhand von neun verschiedenen Mikroalgenstämmen .....                      | 106 |

## **I. EINLEITUNG**

### **I.1. Biosensoren**

Seit Jahrzehnten verursachen anthropogene Schadstoffeinträge in die Umwelt in verschiedenster Hinsicht erhebliche Schäden. Umweltanalytische Verfahren leisten in vielfältiger Weise einen wichtigen Beitrag zur Erkennung und Vermeidung von Schadstoffbelastungen, binden aus diesem Grund aber auch große finanzielle Ressourcen. Die Standardmethoden zur Analyse von Umweltbelastungen basieren zu einem großen Teil auf etablierten chemisch-physikalischen Methoden. Obwohl diese technisch meist vollständig ausgereift sind, werden nicht alle Anforderungen an ein routinemäßig einsetzbares Umweltmonitoringsystem erfüllt. Die große Anzahl an potentiell umweltgefährdenden Substanzen vervielfacht den analytischen Aufwand. Eine meist zweistufige Vorgehensweise erfordert einen Probenahmeschritt vor der eigentlichen Analyse. Dies führt zu einem insgesamt zeitaufwendigen Nachweisverfahren, das kurzfristige Veränderungen in der Umwelt mit nur schlechter zeitlicher Auflösung wiedergeben kann (Codd, 1987; Rogers, 1995; Karube et al., 1998). Zusätzlich müssen oftmals hohe Kosten für instrumentelle Ausstattung und Verbrauchsmittel eingeplant werden (Karube et al., 1998; Riedel et al., 2003). Vor diesem Hintergrund werden biologische Monitoringverfahren zur Überwachung der Umwelt sowohl für Luftschadstoffe als auch für wasserlösliche toxische Substanzen als mögliche Alternative diskutiert (z. B. van der Schalie et al., 2001). Zur routinemäßigen Anwendung in diesem Bereich wird oftmals die Verwendung von Biosensoren vorgeschlagen (Rogers, 1995; Sandström & Turner, 1999; Velasco-Garcia & Mottram, 2003).

Das Prinzip eines Biosensors beruht auf der direkten Kopplung einer biologischen Komponente mit einem physikalischen Signalwandler (Transducer) (Hall, 1995; Riedel et al., 2003): Die biologische Komponente in Form von tierischen oder pflanzlichen Geweben, prokaryotischen oder eukaryotischen Mikroorganismen, Zellen, Zellorganellen, Enzymen, Antikörpern oder DNA dient der Rezeption des Analyts und dessen Umsetzung in ein meßbares Signal. Das Signal wird mit Hilfe des Transducers mit großer Nachweisempfindlichkeit detektiert, als elektrisches Signal verstärkt und ggf. auf elektronischem Weg einer unmittelbaren Auswertung zugänglich gemacht. In Abhängigkeit von der verwendeten biologischen Komponente und ihres emittierten Signals werden als Transducer hauptsächlich optische, elektrische oder Massendetektoren

eingesetzt. Das Konstruktionsprinzip des Biosensors bietet einige Vorteile gegenüber anderen Analyseverfahren in der Bio- und Umwelttechnologie (Riedel et al., 2003): Das System vermeidet zum einen den zeit- und kostenintensiven Probenahmeschritt, da es auf Grund seiner Miniaturisierung eine hohe Mobilität aufweist und an den Ort der Messung transportiert werden kann. Zum andern sind die Meßergebnisse durch die Kombination von biologischer Komponente und Transducer in kurzer Zeit für eine Evaluierung des Ist-Zustands der Umwelt zugänglich; notwendige Maßnahmen können daher ohne eine große zeitliche Verzögerung eingeleitet werden. Des weiteren lassen sich Biosensoren durch ihre einfache Konstruktionsweise oftmals zu vergleichsweise niedrigen Kosten produzieren, in großer Stückzahl einsetzen und nach der Verwendung problemlos entsorgen.

Seit der Entwicklung des ersten Biosensors zur enzymbasierten Glucosebestimmung im Blut durch Clark & Lyons (1962) wird diese Technologie kontinuierlich weiterentwickelt. Durch den technischen Fortschritt im vergangenen Jahrzehnt vor allem in den Bereichen der Mikroelektronik und der Molekularbiologie werden den Biosensoren ein großes Potential und vielfältige Einsatzmöglichkeiten, auch im Hinblick auf deren Wirtschaftlichkeit, zuerkannt (Hall, 1995; Rogers, 1995; Weetall, 1996). Besonders in den letzten Jahren finden Biosensoren im Bereich des Umweltmonitoring verstärkt Anwendung (Bäumner, 2003; Velasco-Garcia & Mottram, 2003). Dies beruht auch auf weiteren Verbesserungen bezüglich Sensitivität und Stabilität. Zur Erhöhung der Effizienz von Biosensoren erlangt der Biochip verstärkt Bedeutung. Biochips ermöglichen die kleinräumige Etablierung eines zweidimensionalen Feldes verschiedener biologischer Komponenten auf einem Substrat (Vo-Dinh et al., 2001) und bilden so eine Kombination aus verschiedenen Biosensoren in einem gemeinsamen System. Hauptsächlich finden hier DNA und Proteine (Antikörper) als Biorezeptoren im Bereich der Biomedizin Anwendung (Xu et al., 2000).

Trotz der zahlreichen Fortschritte in diesem Bereich wird die Anwendung von Biosensoren durch einige ungelöste Probleme behindert. So erweist sich z. B. die Langzeitstabilität vieler Systeme als unzureichend (z. B. Sandström & Turner, 1999; Riedel et al., 2003). Außerdem schränkt die große Anzahl der chemischen Verbindungen und deren Diversität eine umfassende Nutzung ein (Rogers, 1995). Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Detektionseigenschaften von Biosensoren im Hinblick auf ihre Schadstoffselektivität, so werden bisher zwei verschiedene Typen eingesetzt: (1) Nichtselektive Systeme besitzen die Fähigkeit zur Detektion einer Vielzahl von Substanzen (z. B. Koblizek et al., 2002;

Rodriguez et al., 2002; Shao et al., 2002; Tonnina et al., 2002). Nach der Erkennung einer biotoxischen Substanz durch den Biosensor sind jedoch zur Identifizierung des Analyts weitere chemisch-physikalische Analysen erforderlich. (2) Der zweite Detektionstyp, der den größten Teil der beschriebenen Biosensorsysteme bildet, erkennt Schadstoffe dagegen mit einer hohen Spezifität (Sandström & Turner, 1999; Herschkovitz et al., 2000; Lei et al., 2004). Diese hohe Spezifität basiert oftmals auf der Selektivität von Enzymen, kann jedoch bei der o. g. Vielfalt der Analyte auch als Nachteil dieser Systeme ausgelegt werden. Eine Lösung dieser Problematik könnte ein Biosensorsystem darstellen, das die Eigenschaften der beiden Detektionstypen in sich vereint: Ein nichtselektives System, das außerdem eine Möglichkeit zur Identifizierung von Schadstoff oder Schadstoffklasse bietet.

## **I.2. Verwendung von Algen in der Umwelttechnologie**

Als ubiquitär verbreitete photoautotrophe Organismen leisten Algen mit ca. 40 % einen erheblichen Beitrag an der weltweiten Photosynthese (Andersen, 1992). Dies ist gleichbedeutend mit einer deutlichen Reduzierung der globalen CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre und trägt damit zur Verminderung des anthropogen verursachten Treibhauseffekts bei. Algen können jedoch auch gezielt auf vielfältige Art in der Umweltbiotechnologie eingesetzt werden (Rai et al., 2000). Neben der Nutzung von Biomasse und Inhaltsstoffen als nachwachsende Rohstoffe finden die vorwiegend aquatischen Organismen in der Regulation der Wasserqualität Anwendung. Die entsprechenden Verfahren werden sowohl zur Reinigung eutrophierter oder anderweitig kontaminierter natürlicher Gewässer verwendet oder dienen der Reinigung von z. B. industriellen Abwässern (Hoffmann, 1998; Volterra & Conti, 2000; Mallick, 2002). Die gut untersuchte Schwermetallabsorption von Makro- (Sandau et al., 1996b; Yu et al., 1999) und Mikroalgen (Weber et al., 1978; Sandau et al., 1996a; Khattar et al., 1999; Radway et al., 2001) erreicht zum Teil die Kapazitäten von kommerziellen Ionenaustauschersystemen.

Zur Analyse von Umweltbelastungen werden verschiedenste pflanzliche und tierische Organismen eingesetzt (Slabbert & Venter, 1999; Girling et al., 2000). Gegenüber anderen im biologischen Monitoring eingesetzten Organismen erweisen sich besonders Mikroalgen in verschiedenen experimentellen Ansätzen als sensitiver gegenüber Schadstoffen (Thomas et al., 1986; Girling et al., 2000; Juneau et al., 2003). Auch Bringmann & Kuhn (1980) vergleichen die Wirkung von über 150 potentiellen Wasserschadstoffen auf das Wachstum verschiedener Organismen und weisen Effekte einer größeren Anzahl toxischer Verbindungen auf die Grünalge *Scenedesmus quadricauda* gegenüber einem heterotrophen Bakterium und einem farblosen einzelligen Flagellaten nach. Eine generell stark variierende Sensitivität von Pflanzen läßt sich sowohl zwischen den verschiedenen Umweltschadstoffen als auch zwischen den Arten innerhalb der Taxa feststellen (Wang & Freemark, 1995). Auch innerhalb der Gruppe der Mikroalgen zeigen sich deutliche Variationen in der Schadstoffsensitivität (z. B. Blanck et al., 1984).

Unter der Nutzung verschiedener Mikroalgen wird eine große Breite an Methoden zur Analyse von Umweltbelastungen entwickelt und erfolgreich getestet (McCormick & Cairns, 1994; Whitton & Kelly, 1995). So lassen sich an natürlichen Standorten durch eine Aufnahme der vorkommenden Mikroalgenarten Rückschlüsse über die Luft- (Hanninen et

al., 1993) oder Wasserqualität (Fore & Grafe, 2002) ziehen. In vielfach angewandten Standardverfahren werden Mikroalgen in kontrollierten Expositionsexperimenten, meistens Wachstumstests, zur Bewertung der Toxizität von potentiell schädlichen Substanzen herangezogen (z. B. EPA, 1994; Geis et al., 2000; Girling et al., 2000). Der Großteil der bisher durchgeführten Studien zur Nutzung von Algen in biologischen Monitoringverfahren beschränkt sich auf die aquatische Umgebung.

Die Integration von Mikroalgen als biologische Komponente in Biosensoren wird erstmals von Rawson et al. (1987) durchgeführt, wobei der Schwerpunkt der Forschungsarbeiten in diesem Bereich seither auf dem Nachweis wassergelöster Substanzen liegt. Die entwickelten Systeme werden vor allem zur Detektion von Herbiziden eingesetzt (Giardi et al., 2001). Als biosensorisches Signal werden hauptsächlich photosynthetische Parameter der Mikroalgen genutzt. Dies können die als eine elektrische Spannung meßbaren photosynthetischen Redoxvorgänge (Rawson et al., 1987), die photosynthetische Sauerstoffentwicklung (Pandard & Rawson, 1993; Campanella et al., 2001) oder die Chlorophyll a-Fluoreszenz (Rodriguez et al., 2002; Vadrine et al., 2003) sein. Zum Nachweis von gelösten Schwermetallen setzen Durrieu & Tran-Minh (2002) und Durrieu et al., 2004 jedoch auch die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase oder Esterase von *Chlorella vulgaris* ein. Shao et al. (2002) produzieren einen transgenen *Synechocystis*-Stamm, der in einem Biosensorsystem mit der Änderung von Biolumineszenzeigenschaften auf Herbizide und andere Toxine reagiert. Die biosensorische Detektion von Luftschadstoffen mittels Mikroalgen ist vergleichsweise wenig untersucht. Ein auf der Ermittlung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung basierender *Chlorella*-Biosensor wird von Naessens & Tran-Minh (1998a, 1998b, 1999) beschrieben. Dieses System kann zur quantitativen Messung von flüchtigen organischen Verbindungen oder Aerosolen eingesetzt werden. Sanders et al. (2001) entwickeln einen Biosensor zum Nachweis von gasförmigen chemischen Kampfstoffen und deren Simulantien.

Ein Nachteil einiger der o. g. Algenbiosensorsysteme sowohl für die gasförmige als auch die aquatische Umgebung ist die kurze physiologische Stabilität unter Einsatzbedingungen von wenigen Tagen. Des weiteren ist für die Kopplung der Mikroalgen mit dem Transducer und/oder dem Substrat des Biosensors oftmals der Einschluß der Zellen in eine vernetzende Matrix (z. B. Agarose oder Alginat) erforderlich, besonders wenn die Zellen einer strömenden Lösung ausgesetzt werden sollen. Der Einschluß der biologischen

Komponente hat jedoch unter Umständen eine bis zu 10-fache Verminderung der Sensitivität zur Folge (Bozeman et al., 1989; Frense et al., 1998; Avramescu et al., 1999).

### **I.3. Nutzung des Potentials von Mikroalgen in Biosensorsystemen: Zielsetzung und Vorgehensweise**

Das Potential der Mikroalgen in der Umwelttechnologie legt eine Verwendung im Bereich der biologischen Schadstoffanalytik nahe. Zu diesem Zweck soll die große Diversität der sensitiven Organismen in das anwendungsorientierte, technische System eines Biosensors integriert werden. Die vorliegende Arbeit gliedert sich im wesentlichen in drei Phasen. Nach der (1) **Optimierung der Langzeitstabilität von immobilisierten Algenkulturen** schließt die (2) **Entwicklung und Erprobung von Mikroalgenbiosensorsystemen für gasförmige und wassergelöste Schadstoffe** an. Auf der Basis der gewonnenen Ergebnisse wird (3) ein auf der Biodiversität der Algen begründetes Verfahren **zur Erhöhung der Selektivität der Biosensoren, d. h. Identifizierung von unbekanntem Schadstoffen** erarbeitet. Die Vorgehensweise wird im Folgenden eingehender beschrieben:

#### *(1) Optimierung der Langzeitstabilität von immobilisierten Mikroalgen*

Eine wichtige Voraussetzung für die routinemäßige Verwendung von Mikroalgen in Biosensorsystemen ist deren langfristige Stabilität, die ein noch ungelöstes Problem darstellt. Die Entwicklung eines neuartigen Immobilisierungsverfahrens auf der Basis eines permeablen Substrats soll der kontinuierlichen Kultur der Mikroalgen unter Einsatzbedingungen eines Biosensors zur Messung gasförmiger und wasserlöslicher Schadstoffe dienen. Ein Einschluß der immobilisierten Zellen in einer Matrix soll dabei auf Grund der bekannten Problematik vermieden werden.

#### *(2) Entwicklung eines fluoreszenzoptischen Mikroalgenbiosensors zur Messung von gasförmigen und wasserlöslichen Schadstoffen*

Dieser Abschnitt schließt die gesamte technische Entwicklung und Erprobung des Biosensorsystems ein. Die Ermittlung der Meßbereiche und Nachweisgrenzen der verschiedenen Schadstoffe (flüchtige organische Verbindungen und Herbizide, siehe I.4), die Erhöhung der Sensitivität und die Auswahl sensitiver und stabiler Algenstämme ist ein wichtiger Bestandteil dieser Phase. Das mittlerweile etablierte und nicht invasive Verfahren der PAM-Chlorophyllfluorometrie soll der Messung der Chlorophyll a-Fluoreszenz als Biosensorsignals dienen. Eine geeignete Methodik muß hierzu erarbeitet werden. Die Entwicklung des Biosensorsystems wird ebenfalls im Hinblick auf eine weitere Miniaturisierung durchgeführt. Die Anzahl der immobilisierten Stämme und damit die Kapazität des Biosensorsystems soll durch die Entwicklung des Algen Sensor Chip

(ASC) erhöht werden. Dies wird durch die Verwendung eines neuartigen Imaging-Chlorophyllfluorometers ermöglicht.

*(3) Entwicklung einer Methodik zur biosensorischen Schadstoffidentifizierung*

Die Identifizierung von Schadstoffen mittels eines nichtselektiven Biosensorsystems soll entwickelt und abschließend überprüft werden. Das Verfahren basiert auf der bekannten, hohen Diversität der schadstoffinduzierten Reaktionen verschiedener Mikroalgen. Aus den simultan aufgezeichneten Reaktionen der Mikroalgen werden gemeinsame Wirkungsmuster generiert. Die aus Expositionsexperimenten mit flüchtigen organischen Verbindungen und Herbiziden gewonnenen Wirkungsmuster werden auf ihre Herbizidspezifität hin untersucht. Um eine hohe Screeningeffizienz zu erreichen soll hierzu die ASC-Technologie eingesetzt werden. Im Vergleich mit Wirkungsmustern aus Referenzexperimenten soll ermittelt werden, inwieweit eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Wirkungsmustern des gleichen Schadstoffs feststellbar ist und somit eine Erhöhung der Selektivität des Biosensorsystems erreicht werden kann.

#### **I.4. Umweltrelevanz der verwendeten toxischen Verbindungen**

Als Vertreter der flüchtigen organischen Verbindungen (VOC: volatile organic compound) werden Methanol und Formaldehyd zur Erprobung der Biosensorsysteme für gasförmige Schadstoffe herangezogen. Die große Gruppe der VOCs wird seit einigen Jahren besonders im Innenraumbereich verstärkt in Verbindung mit negativen Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen gebracht. Andersson et al. (1997) zeigen einen Zusammenhang zwischen den VOCs und Erkrankungen wie SBS (sick building syndrome) oder der Verbreitung von Allergien auf. Im Rahmen der durchgeführten Expositionsexperimente werden daher Konzentrationen im humantoxikologisch relevanten Meßbereich eingesetzt. Diese orientieren sich an den deutschen MAK-Werten (MAK: maximale Arbeitsplatzkonzentration).

Exemplarisch für die wasserlöslichen Schadstoffe werden die Herbizide Atrazin, Simazin, Diuron und Isoproturon verwendet, die zu den (potentiell) wassergefährdenden Substanzen gezählt werden (Europäische Union, 2001) und daher eine hohe Priorität im Wasserschutzprogramm der Europäischen Union erhalten. Für das ebenfalls eingesetzte Herbizid Paraquat bestehen in einigen Ländern der EU bereits Einschränkungen oder ein Anwendungsverbot. In Anbetracht der Tatsache, daß Wasser verstärkt als wertvolle Ressource angesehen wird und daher umfassend geschützt werden muß (Europäische Union, 2000), stellen die weltweiten Herbizidemissionen ein ungelöstes Problem dar. Diese Verbindungen schädigen eine große Anzahl von Organismen und ganze Ökosysteme, von den Primärproduzenten bis zu Tieren und Menschen (Pipe, 1992; McCormick & Cairns, 1994; Short & Colborn, 1999; Girling et al., 2000; Bouchardy et al., 2002). Entsprechende Grenzwerte für die Herbizidbelastung von Gewässern sind daher neu definiert worden (Europäische Union, 1998).

## II. MATERIAL & METHODEN

### II.1. Kultivierung von Mikroalgen in Flüssigkulturen

#### II.1.1. Mikroalgenstämme, Kulturbedingungen und Ernte

Die in Tabelle 1 aufgeführten 42 Algenkulturen werden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Stammkulturen dieser Algen werden in ca. 60 ml Waris-H Kulturmedium (siehe II.1.2) in Erlenmeyerkolben bei einer Temperatur von  $14 \pm 1$  °C kultiviert. Zur Beleuchtung wird eine Kombination aus Fluoreszenzlampen ("Universal Weiß 58 W" und "Warm Weiß 36 W"; Osram, München, Deutschland) mit einer Intensität von 10 - 40  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einer Licht/Dunkelperiode von 14/10 h eingesetzt.

Für die Experimente in Verbindung mit den Biosensoren für Luftschadstoffe werden die entsprechenden Kulturen in steril belüfteten Erlenmeyerkolben in 300-500 ml Waris-H Kulturmedium überführt und bei einer Temperatur von  $22 \pm 1$  °C, einer Lichtintensität von 30-35  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und oben angegebener Lichtqualität und L/D-Periode kultiviert. Die Ernte erfolgt in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsraten der kultivierten Stämme im Zeitraum von 7-30 Tagen, jedoch vor Erreichen der stationären Wachstumsphase.

**Tabelle 1** Verwendete Algenkulturen. Folgende der Stammmnummer vorangestellte Abkürzungen bezeichnen die Herkunft der Kulturen: **CCAC**: Culture Collection of Algae at the University of Cologne (Universität zu Köln, Köln, Deutschland); **CCAP**: Culture Collection of Algae and Protozoa (Oban, UK); **SAG**: Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (Universität Göttingen, Göttingen, Deutschland); **M**: Sammlung von Algenkulturen Prof. Melkonian (Botanisches Institut, Universität zu Köln, Köln, Deutschland); **UTEX**: Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, Texas, USA).

|            |                                   |              |                                        |
|------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------------|
| CCAC0011   | <i>Eudorina elegans</i>           | M1949        | <i>Phacus</i> sp.                      |
| CCAC0055   | <i>Haematococcus pluvialis</i>    | M1977        | <i>Chlamydomonas</i> sp.               |
| CCAC0075   | <i>Woloszynskia pascheri</i>      | M1982        | <i>Chlamydomonas</i> sp.               |
| CCAC0120   | <i>Staurodesmus convergens</i>    | M2007        | <i>Klebsormidium flaccidum</i>         |
| CCAP 909/9 | <i>Chromulina chionophila</i>     | M2008        | <i>Klebsormidium</i> sp.               |
| M0560      | <i>Scourfieldia</i> sp.           | M2009        | <i>Klebsormidium</i> sp.               |
| M0764      | <i>Cyanophora paradoxa</i>        | M2015        | <i>Carteria</i> sp.                    |
| M0796      | <i>Synura</i> sp.                 | M2068        | <i>Klebsormidium flaccidum</i>         |
| M1164      | <i>Lyngbya halophila</i>          | M2069        | <i>Scenedesmus rubescens</i>           |
| M1167      | <i>Nostoc muscorum</i>            | M2116        | <i>Dunaliella lateralis</i>            |
| M1317      | <i>Synechocystis</i> sp.          | SAG11-60a    | <i>Chlamydomonas oblonga</i>           |
| M1395      | <i>Cryptomonas phaseolus</i>      | SAG61.81     | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> |
| M1398      | <i>Scherffelia dubia</i>          | SAG83.81     | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>       |
| M1488      | <i>Cryptomonas curvata</i>        | SAG86.81     | <i>Desmodesmus subspicatus</i>         |
| M1625      | <i>Chroomonas</i> sp.             | SAG211-11b   | <i>Chlorella vulgaris</i>              |
| M1883      | <i>Euglena archaeoplastidiata</i> | SAG211-12    | <i>Chlorella vulgaris</i>              |
| M1887      | <i>Cosmarium elegantissimum</i>   | SAG335-1a    | <i>Klebsormidium nitens</i>            |
| M1895      | <i>Klebsormidium subtile</i>      | SAG1224-5/25 | <i>Euglena gracilis</i>                |
| M1939      | <i>Klebsormidium</i> sp.          | SAGB26.82    | <i>Tetraselmis cordiformis</i>         |
| M1940      | <i>Klebsormidium</i> sp.          | SAGB59.87    | <i>Cystodinium</i> sp.                 |
| M1941      | <i>Klebsormidium</i> sp.          | UTEX LB 2255 | <i>Peridinium inconspicuum</i>         |

Die in Herbizidexpositionsexperimenten verwendeten Algen werden unter identischen Bedingungen wie die Stammkulturen, jedoch bei einer Lichtintensität von  $30 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert. Die Kulturen werden nach 14 - 28 d geerntet.

### II.1.2. Kulturmedien

Die im Folgenden aufgeführten Kulturmedien werden zur Kultivierung der Algen eingesetzt. Alle Medien werden vor der Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert.

#### *Waris-H*

Die Herstellung von Waris-H erfolgt nach McFadden & Melkonian (1986). In  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  werden folgende Komponenten eingewogen: 1 mM  $\text{KNO}_3$ ,  $81,1 \mu\text{M MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,15 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,42 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3) \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 1 mM HEPES,  $8,06 \mu\text{M EDTA}$  (Titriplex III),  $18,43 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$ ,  $0,58 \mu\text{M MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $73,04 \text{nM ZnSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $16,8 \text{nM CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , Fe-EDTA (Titriplex II) ( $18,0 \mu\text{M Fe}$ ),  $0,15 \text{nM Vitamin B}_{12}$ ,  $4,0 \text{nM Biotin}$ ,  $0,3 \mu\text{M Tiamin-HCl}$ ,  $0,8 \text{nM Nicotinsäureamid}$  und 10 ml Erdabkochung. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Zur Herstellung der Erdabkochung werden 10 g Gartenerde in ca. 120 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  für 10 min sprudelnd gekocht und anschließend 10 min bei ca. 1.000 g abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand durch Filtration aufgereinigt. Für die Filtration werden sukzessive verwendet: grober Faltenfilter, Glasfaserfilter und Membranfilter der Porengrößen  $1,2 \mu\text{m}$ ,  $0,8 \mu\text{m}$ ,  $0,45 \mu\text{m}$ ,  $0,2 \mu\text{m}$  und  $0,1 \mu\text{m}$ . Zur Aufbewahrung wird das Filtrat mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 100 ml aufgefüllt und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### *Varianten von Waris-H*

In Wachstumsexperimenten werden Varianten von Waris-H unter folgenden Bezeichnungen verwendet: -Erde (Waris-H ohne Erdextrakt), 10 %  $\text{PO}_4^{3-}$  (10 % des Standard-Phosphatgehalt), 1/x Waris-H (Waris-H in x-facher Verdünnung). Die pH-Werte dieser Medien werden ebenfalls auf 7,0 eingestellt.

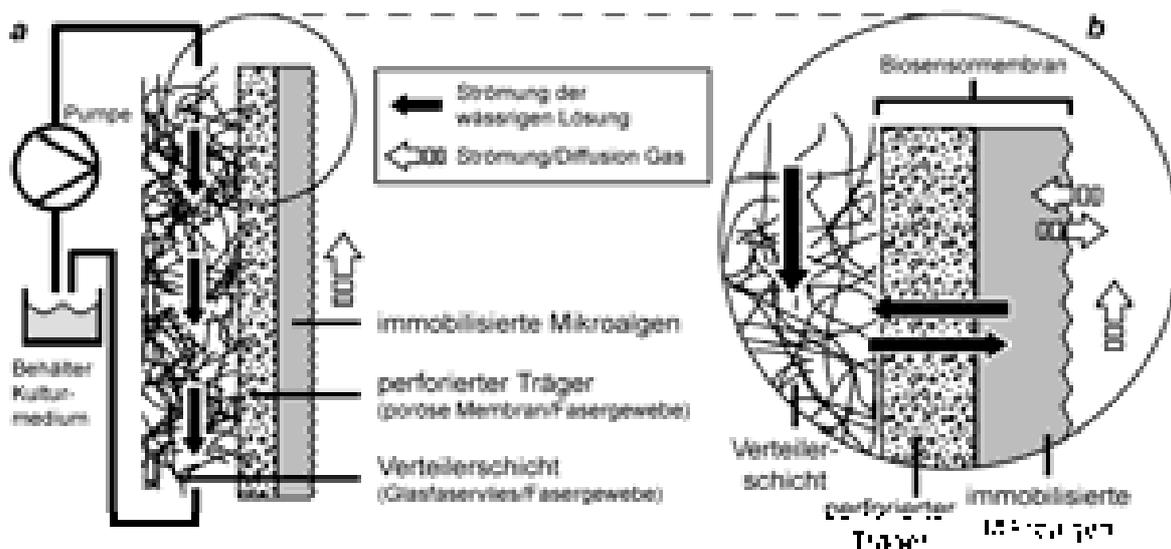
***Bold's Basal Medium (BBM)***

Zur Herstellung von Bold's Basal Medium nach CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, UK; [www.ccap.ac.uk](http://www.ccap.ac.uk)) werden 8,8 mM NaNO<sub>3</sub>, 1,3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,33 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,43 mM NaCl, 0,17 mM CaCl<sub>3</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 0,30 mM MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 50 mg l<sup>-1</sup> EDTA (Titriplex II), 2,2 μM FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 0,22 μM ZnCl<sub>2</sub>, 55 nM CoCl<sub>2</sub> und 0,1 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eingewogen. Anschließend wird der pH-Wert mit NaOH auf 6,6 eingestellt.

## II.2. Das Verbundschichtverfahren zur Kultivierung immobilisierter Mikroalgen

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verbundschichtverfahren zur Kultivierung von immobilisierten Mikroalgen basiert auf der Trennung von Organismen und Kulturmedium durch das poröse Immobilisierungssubstrat. Abbildung 1 zeigt den Aufbau des vertikal orientierten Verbundschichtsystems. Der den Mikroalgen als Substrat dienende Träger besteht aus einem porösen Membranmaterial oder einem Fasergewebe, das für die Mikroorganismen impermeabel ist. Der Träger liegt auf einer weiteren Faserschicht (Glasfaservlies) auf, die als Verteilerschicht für das mittels einer Pumpe an der Oberseite des Verbundschichtsystems applizierte Kulturmedium dient. Ein kontinuierlicher, laminarer Kulturmedienstrom verläuft vertikal durch das Verteilergewebe entlang des perforierten Trägers und wird an der Unterseite gesammelt, um dann entweder in den Medienbehälter zurückgeführt oder verworfen zu werden. Das Kulturmedium kann aus der Verteilerschicht durch den perforierten Träger auf die Seite der immobilisierten Mikroalgen übertreten, die so mit Nährsalzen und anderen essentiellen Komponenten versorgt werden. Von den Mikroalgen in das Medium abgegebene Stoffe können über dieses System ebenfalls abgeführt werden.

Der notwendige Gasaustausch - vor allem Zufuhr von  $\text{CO}_2$  und Abgabe von  $\text{O}_2$  - der immobilisierten Kulturen wird direkt an der Grenzschicht von Algenkultur zur Umgebungsluft realisiert. Über den die Algen umgebenden, laminaren Flüssigkeitsfilm können Gase über sehr kurze Diffusionswege ausgetauscht werden.



**Abbildung 1** Das Verbundschichtverfahren zur Kultivierung immobilisierter Mikroalgen: (a) Querschnitt durch eine Verbundschicht sowie Darstellung des Prinzips der Kulturmedierversorgung. (b) Vergrößerter

### II.2.1. Kultivierung von Algen im Verbundschichtsystem

Zur Bestimmung des Algenwachstums im Verbundschichtsystem werden Mikroalgen in verschließbaren transparenten Kästen aus Plexiglas kultiviert. Eine in die Kammer gelegte Glasfasermatte (Isola 26091 K, 80 g m<sup>-2</sup>, Isola, Eidanger, Norwegen) von 10 × 15 cm wird kontinuierlich mit Kulturmedium versorgt. Das Kulturmedium wird mit einer Strömungsgeschwindigkeit von ca. 2,0 ml h<sup>-1</sup> mittels einer Schlauchpumpe an zwei Punkten an der Oberseite zugeführt und anschließend verworfen. Zur Belüftung werden seitlich angebrachte Bohrungen genutzt. Die Plexiglaskästen dienen der Kultivierung von Algen auf Substrat, das nach dem oben genannten Prinzip zusammen mit der Verteilerschicht die Verbundschicht bildet (II.2). Alle Experimente unter der Verwendung des Verbundschichtkultursystems werden, soweit nicht anders angegeben, mit Waris-H Kulturmedium durchgeführt. Die Kultivierung in den hier dargestellten Systemen erfolgt bei 24 °C und bei einer Lichtintensität von 30 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Beleuchtung der Verbundschichtkulturen ebenfalls durch Fluoreszenzlampen, siehe II.1.1). Als Substrate werden kreisförmige Membranen aus Cellulosemischester (ME28, Schleicher & Schuell MicroSciences GmbH, Dassel, Deutschland) verwendet, die in einen Durchmesser von 20 mm aus dem Standardformat ausgestanzt werden (Inokulationsverfahren nach II.3.1).

Zur Dokumentation des Algenwachstums erfolgt die Bestimmung des Chlorophyllgehalts durch Aufnahme der Algen zusammen mit dem Substratmaterial in DMSO (Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland). Nachfolgende Schritte werden wie in Abschnitt II.3.1 beschrieben durchgeführt.

Die in Tabelle 5 (S.36) aufgeführten Wachstumsexperimente mit einer Auswahl verschiedener Mikroalgenstämme werden mit einer Nylonmembran von 10 × 15 cm (Hybond-NX, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, UK) bei 14 ± 1 °C und einer Lichtintensität von ca. 25 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durchgeführt. Auf die Membran werden mit Hilfe einer Mikrotiterplatte 24 Kulturen in kreisförmigen Flächen von 16 mm Durchmesser aufgetragen.

#### *Modifikationen des Kultursystems*

Für wiederholte Expositionsexperimente mit Methanoldämpfen innerhalb eines Zeitraums von 30 d werden spezielle Kulturkammern eingesetzt, um die Biosensormembranen zwischen den durchgeführten Expositionsexperimenten kultivieren zu können. Diese Kulturkammern sind im wesentlichen den Gegebenheiten der Biosensorzellen vom Typ II (Abbildung 3, S.19) nachempfunden. Das Gehäuse besteht aus PVC und weist eine

---

Frontabdeckung aus Plexiglas auf. Die fünf mit einem Abstand zur Rückwand vertikal orientierten Verteilerschichten werden mit  $3,0 \text{ ml min}^{-1}$  Kulturmedium durchströmt und dienen der Aufnahme von jeweils einer der Biosensormembranen von 47 mm Durchmesser (Tabelle 2, S.17).

Die oben aufgeführten Kammern werden ebenfalls verwendet, um den Effekt der kontinuierlichen Medienzufuhr auf den physiologischen Zustand der immobilisierten Mikroalgen im Vergleich zu stationären Verbundschichtkulturen zu untersuchen. Zum Vergleich werden Algen im Verbundschichtsystem ohne kontinuierliche Medienzufuhr kultiviert. Zu diesem Zweck wird das System horizontal orientiert. Die Trägerschichten werden hierzu jeweils in Petrischalen auf einer mit 2,5 ml Kulturmedium gesättigten Glasfasermatte gelegt. Um ein Austrocknen der Verbundschichten während der Langzeitexperimente zu verhindern, werden die Petrischalen in einem transparenten, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gefüllten Behälter gelagert und täglich kurz belüftet. Zur Beurteilung des physiologischen Status werden periodisch Chlorophyllfluoreszenzmessungen durchgeführt (II.3.3).

### II.3. Aufbau der Biosensoren

Die in dieser Arbeit entwickelten Biosensorsysteme setzen sich aus drei Hauptkomponenten zusammen, die in den nachfolgenden Abschnitten detailliert beschrieben werden: **(1)** Die **Biosensormembran** stellt eine Kombination aus dem Substratmaterial und den darauf immobilisierten Mikroalgen dar. In der einfachen Ausführung wird ein Algenstamm auf das Membranmaterial aufgebracht (single strain Algenbiosensor). Eine Weiterentwicklung ist der Algen Sensor Chip (ASC), auf dem verschiedene Mikroalgenkulturen auf räumlich kleiner Fläche nach dem Prinzip des Array-Biochip immobilisiert werden. **(2)** Die **Biosensorzelle** beinhaltet die einsatzfähige Biosensormembran. Sie dient zum einen der stabilen Aufrechterhaltung der immobilisierten Kulturen über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Dies wird durch die kontinuierliche Versorgung mit Kulturmedium im Verbundschichtverfahren sichergestellt. Zum anderen ermöglicht die Biosensorzelle durch ihre geschlossene Bauweise die Durchführung der Expositionsexperimente mit gasförmigen und wassergelösten Schadstoffen. Die Reproduzierbarkeit der Experimente wird u. a. durch die Regulation von Temperatur, Lichtintensität und den Strömungsgeschwindigkeiten von Gasen und Flüssigkeiten gewährleistet. **(3)** Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz als Folge von Einflüssen schädigender Substanzen werden mittels eines **PAM-Chlorophyllfluorometers** detektiert. Die Reaktion der biologischen Komponente in Form wechselnder Fluoreszenzeigenschaften von Chlorophyll a kann durch verschiedene chlorophyllfluorometrisch ermittelte Parameter, wie z. B. die Fluoreszenz  $F_t$  oder die Quantenausbeute des Elektronentransports des Photosystems II  $\Delta F/F'_m$ , wiedergegeben werden.

#### II.3.1. Herstellung der Biosensormembranen

Das membranbasierte Immobilisierungsverfahren für Mikroalgenkulturen bildet die Grundlage für die Verwendung von Mikroalgen in den in dieser Arbeit entwickelten Biosensorsystemen. Die Biosensormembran besteht aus dem perforierten Träger und den Mikroalgen, wobei der perforierte Träger als Substrat für die immobilisierten Organismen dient (siehe Abbildung 1).

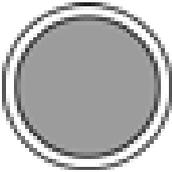
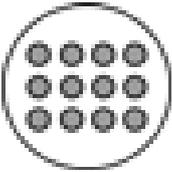
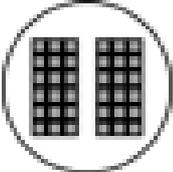
Die Ernte der Algen erfolgt nach den in Abschnitt II.1 angegebenen Zeiträumen. Aneinanderhaftende Zellfäden von *Klebsormidium* werden mit Hilfe eines Ultra-Turrax

(Jahnke & Kunkel, Stauffen, Deutschland) für einige Sekunden bei 20.000 UpM homogenisiert.

Die Inokulation der Biosensormembranen wird mit definierter Chlorophyll a-Menge pro Membranfläche durchgeführt. Dazu werden einige ml der geernteten Kultur bei ca. 1.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Chlorophyllextraktion wird nach Hiscox & Israelstam (1979) nach Aufnahme des Pellets in DMSO durchgeführt. Zur Entfernung der unlöslichen Fraktion aus dem Extrakt schließt sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an. Die Bestimmung des Chlorophyll a-Gehalts des Extrakts erfolgt spektralphotometrisch (Jeffrey & Humphrey, 1975) unter Berücksichtigung der jeweiligen Extinktionskoeffizienten und Wellenlängen für die verschiedenen Algengruppen. Für bestimmte, von den Autoren nicht berücksichtigte, Algengruppen werden die entsprechenden angegebenen Formeln für eine Algengruppe mit ähnlicher Pigmentzusammensetzung verwendet. Z. B. erfolgt die Berechnung des Chlorophyll a der Euglenophyta nach den Extinktionskoeffizienten und Wellenlängen für die Chlorophyta. Für Cyanobakterien entfällt außerdem die Korrektur der Extinktion durch die Absorption der Chlorophylle b und c.

Als Immobilisierungssubstrat dienen verschiedene Membranen aus Polycarbonat (0,4 µm

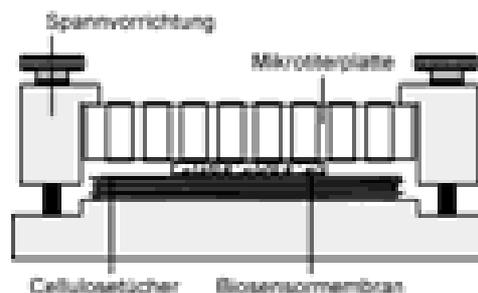
**Tabelle 2** Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen Biosensormembranen und deren Einsatz in den Biosensorsystemen. Soweit nicht anders angegeben, werden Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 0,4 µm eingesetzt (Typ PC40).

|                                                                                 | Algenbiosensor<br>single strain                                                     |                                                                                     | Algen Sensor Chip (ASC)<br>array chip                                                |                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                 |  |  |  |  |
| <b>Verwendung in Biosensorzelle</b>                                             | Typ II<br>Typ IIIa                                                                  | Typ IIIb                                                                            | Typ IIIc                                                                             | Typ FIIB                                                                              |
| <b>Membranmaterial</b>                                                          | Cellulose-<br>mischester                                                            | Cellulose-<br>mischester                                                            | Cellulose-<br>mischester                                                             | Polycarbonat                                                                          |
| <b>Größe Membran [mm]</b>                                                       | Ø 47                                                                                | Ø 20                                                                                | Ø 47                                                                                 | Ø 47                                                                                  |
| <b>Immobilisierungsdichte der Mikroalgen [µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup>]</b> | 5                                                                                   | 5                                                                                   | 1 oder 5                                                                             | 1                                                                                     |
| <b>Größe Feld [mm]</b>                                                          | Ø 40                                                                                | Ø 16                                                                                | Ø 6,7                                                                                | 3,7 × 3,7                                                                             |
| <b>maximal verfügbare Felder auf Membran</b>                                    | 1                                                                                   | 1                                                                                   | 12                                                                                   | 2 × 18                                                                                |

Porengröße, Typ PC40, Schichtdicke 10  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell; sowie 2,0  $\mu\text{m}$  Porengröße, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) oder Cellulosemischester (1,2  $\mu\text{m}$  Porengröße, Typ ME28, Schichtdicke 140  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell), die ggf. durch Ausstanzen in das gewünschte Format (Tabelle 2) überführt werden.

Das Aufbringen der Organismen auf das Substrat erfolgt bei Minimierung von mechanischem Streß und Vermeidung von Austrocknung durch ein schonendes Filtrationsverfahren. Das Substrat wird auf eine Glasfasermatte aufgelegt, die sich auf einigen Schichten Cellulosetüchern (Lübcke Papier, Berlin, Deutschland) befindet. Bei der Verwendung von Polycarbonatmembranen wird zwischen das Substrat und die Glasfasermatte ein weiterer Membranfilter aus Cellulosemischester gelegt. Die Algenkulturen werden mit Hilfe verschiedener Rahmen in den dafür vorgesehenen Bereich auf den Membranfilter appliziert. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Substratformate sowie die verschiedenen Inokulationsbereiche im Zusammenhang mit den verschiedenen Biosensorzellen, in denen die Biosensormembranen Anwendung finden. Zur Inokulation der single strain-Membranen werden zylindrische PVC-Rahmen von 40 mm bzw. 16 mm Durchmesser eingesetzt, die für die Dauer der Inokulation leicht auf den Filter aufgedrückt werden. Die Inokulation der ASC-Membranen wird mit Hilfe von perforierten Mikrotiterplatten durchgeführt, die in einer dafür gefertigten Halterung (Abbildung 2) mit der Oberseite auf dem Substrat fixiert werden. Verschiedene Algenkulturen können durch im Plattenboden angebrachte Bohrungen gezielt auf die dafür vorgesehenen Felder der Membran aufgebracht werden. Verwendet werden für den Biosensor Typ IIIc 96-Well-Platten mit zylindrischen Wells,  $\text{\O} 6,7 \text{ mm}$  (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) und für den Biosensor Typ FIIb 384-Well-Platten mit quadratischen Wells,  $3,7 \text{ mm} \times 3,7 \text{ mm}$  (MATRIX, ApogentDiscoveries, Wertheim, Deutschland).

Vor der Verwendung in Expositionsexperimenten werden die Biosensormembranen für



**Abbildung 2** Vorrichtung zur Immobilisierung von Mikroalgen auf Biosensormembranen mit Hilfe von perforierten Mikrotiterplatten.

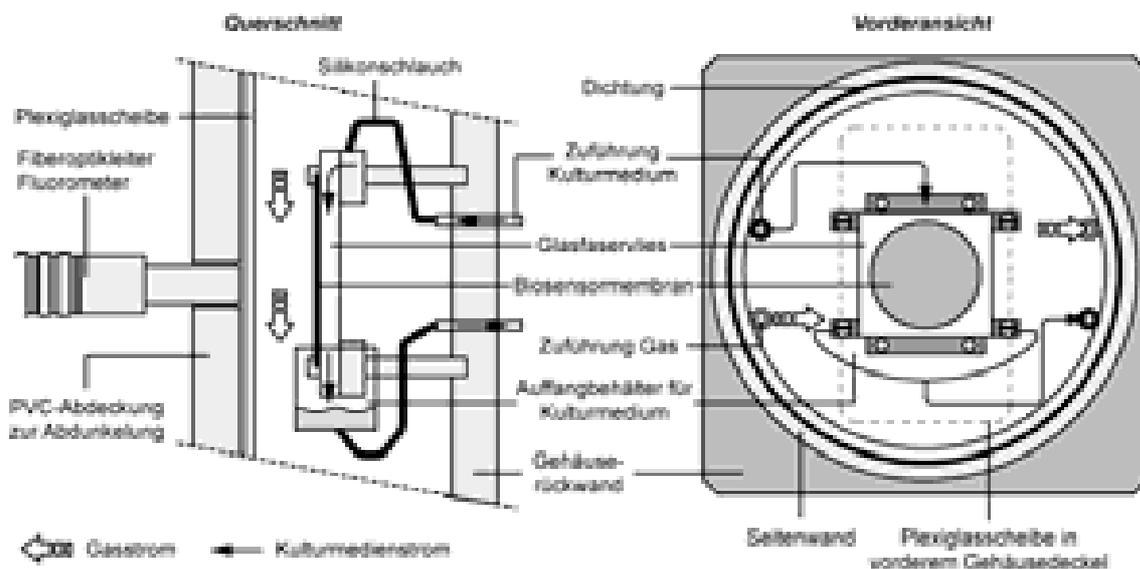
**Tabelle 3** Übersicht über die verwendeten Biosensorsysteme.

| Biosensorzelle | verwendete Membran | Fluorometer (Walz) | Einsatzbereich  |
|----------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Typ II         | single strain      | PAM-2000           | Luftschadstoffe |
| Typ IIIa/b     | single strain      | PAM-2000           | Luftschadstoffe |
| Typ IIIc       | ASC                | IMAGING-PAM        | Luftschadstoffe |
| Typ FIIB       | ASC                | IMAGING-PAM        | Flüssigkeiten   |

24 h bei 22 °C und Lichtintensitäten von 15-30  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf Glasfasermatten in Petrischalen gelagert. Zur Sättigung der Glasfasermatten wird das gleiche Kulturmedium wie in den anschließenden Versuchen eingesetzt.

### II.3.2. Konstruktion der Biosensorzellen

Die Entwicklung der verschiedenen Typen der Biosensorzellen für Luftschadstoffe wird vor allem begleitend zur Entwicklung der Biosensormembranen (Miniaturisierung, Erhöhung der Anzahl der immobilisierten Kulturen) durchgeführt. Basierend darauf wird nachfolgend eine Biosensorzelle für die Messung wassergelöster Schadstoffe konstruiert. Tabelle 3 gibt in der Reihenfolge der Entwicklung eine Übersicht über die vier verwendeten Konstruktionstypen der Biosensorzelle in Verbindung mit den verwendeten Biosensormembranen sowie den angekoppelten Fluorometertypen.

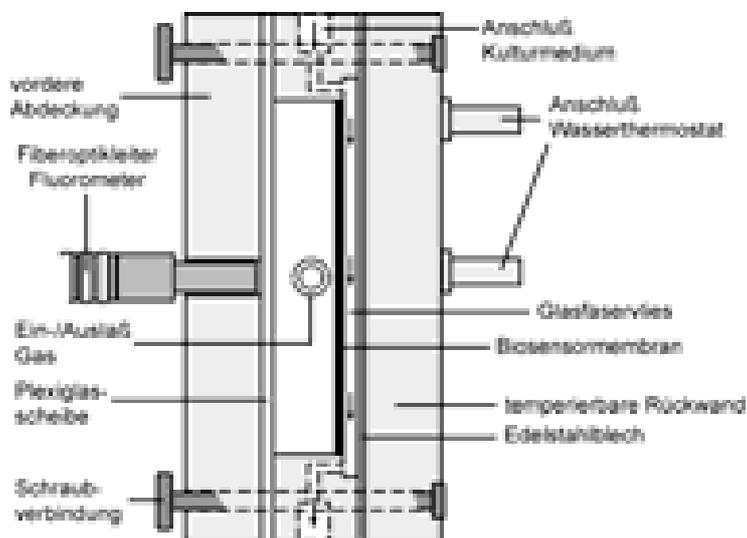


**Abbildung 3** Schematische Darstellung des Biosensors Typ II für Luftschadstoffe im Querschnitt und in Ansicht von der Frontseite.

### *Biosensoren für Luftschadstoffe*

Zur Messung von Luftschadstoffen mit einem Algenbiosensor müssen die aquatischen Mikroorganismen - zumindest im Hinblick auf eine längerfristige Verwendbarkeit - mit Wasser und Nährsalzen versorgt werden, gleichzeitig aber in Kontakt mit dem umgebenden Gasraum stehen. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten wird die Konstruktion der Biosensorzellen durchgeführt.

Das Gehäuse der Biosensorzelle Typ II aus V4A-Stahl läßt sich gasdicht verschließen und beinhaltet ein Volumen von ca. 500 ml (Abbildung 3). Im zylindrischen Innenraum der Zelle ist ein Glasfaservlies (50 × 50 mm) befestigt, dessen Abstand zur vorderen Plexiglasscheibe mittels des horizontal variablen Haltesystems regulierbar ist. Das Glasfaservlies wird kontinuierlich mit Kulturmedium durchströmt, das mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 3,0 ml h<sup>-1</sup> über eine peristaltische Schlauchpumpe zu- und abgeführt wird. Auf der zur Vorderseite der Zelle gewandten Seite des Glasfaservlieses wird die runde Biosensormembran (Ø 47 mm) mit den immobilisierten Mikroalgen aufgelegt. Mit Hilfe einer Membranpumpe kann ein kontinuierlicher Gasstrom über zwei Durchführungen an der Zellenrückwand durch die Zelle geleitet werden. Chlorophyllfluoreszenzmessungen in dem geschlossenen System werden durch die Plexiglasscheibe durchgeführt. In der lichtundurchlässigen Frontabdeckung aus PVC befindet sich zu diesem Zweck eine Aufnahme für den Faseroptikleiter des Chlorophyllfluorometers. Der Abstand des Faseroptikleiters zur Biosensormembran im variablen Haltesystem wird auf 12 mm justiert, um ein optimales Verhältnis zwischen der Fluoreszenzintensität und der in die Messung eingeschlossenen Fläche der

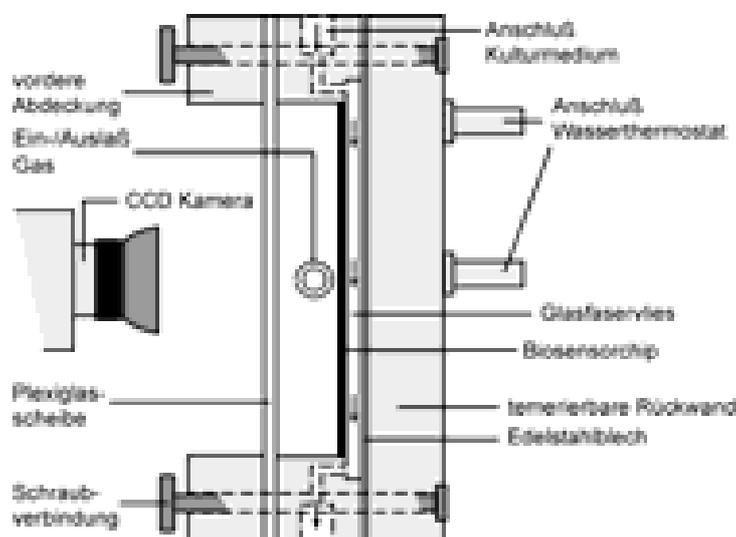


**Abbildung 4** Schematische Darstellung des Biosensors Typ IIIa/b für Luftschadstoffe im Querschnitt.

Biosensormembran zu erreichen.

Eine Weiterentwicklung der Biosensorzelle stellt Typ IIIa/b dar (Abbildung 4). Der seitliche Gehäusekörper ist aus PVC gefertigt und beinhaltet Zu- und Ableitungen sowohl des Medienversorgungssystems als auch der Gaszufuhr. Die von Kulturmedium mit  $3,0 \text{ ml h}^{-1}$  durchströmte Glasfasermatte wird durch das seitliche Gehäuse fixiert und liegt mit der Rückseite auf einem Edelstahlblech auf. In der Gehäuserückwand aus Messing ist ein Schneckengang integriert, der in Verbindung mit einem angeschlossenen Wasserthermostaten der Temperierung des Edelstahlblechs dient. Auf diese Weise können stabile Temperaturen auf der auf die Glasfasermatte aufgelegten Biosensormembran eingestellt werden. Die Biosensorzelle vom Typ III wird in 2 Größenausführungen verwendet. Typ IIIa ist für runde Biosensormembranen mit einem Durchmesser von 47 mm konstruiert, Typ IIIb kann Membranen mit einem Durchmesser von 20 mm aufnehmen. Dementsprechend beträgt das Volumen des Innenraums der Biosensorzelle 17,3 ml (Typ IIIa) bzw. 3,1 ml (Typ IIIb).

Um die Verwendung des Biosensors in Verbindung mit einem Imaging Fluorometer zur ermöglichen, werden geringfügige Modifikationen des Typs IIIa/b durchgeführt. Die Frontseite des Typs IIIc (Abbildung 5) wird gegenüberliegend der Biosensormembran nur von der Plexiglasscheibe abgedeckt, vor die sich die CCD-Kamera des Imaging Fluorometers orientieren läßt. Die ursprünglich zur Abdunklung und als Halterung für den Faseroptikleiter vorgesehene PVC-Abdeckung dient hier nur der Fixierung der Plexiglasscheibe. Zur Abschirmung vom Außenlicht können Biosensorzelle und CCD-Kamera mit einem lichtundurchlässigen Textilgewebe abgedeckt werden.

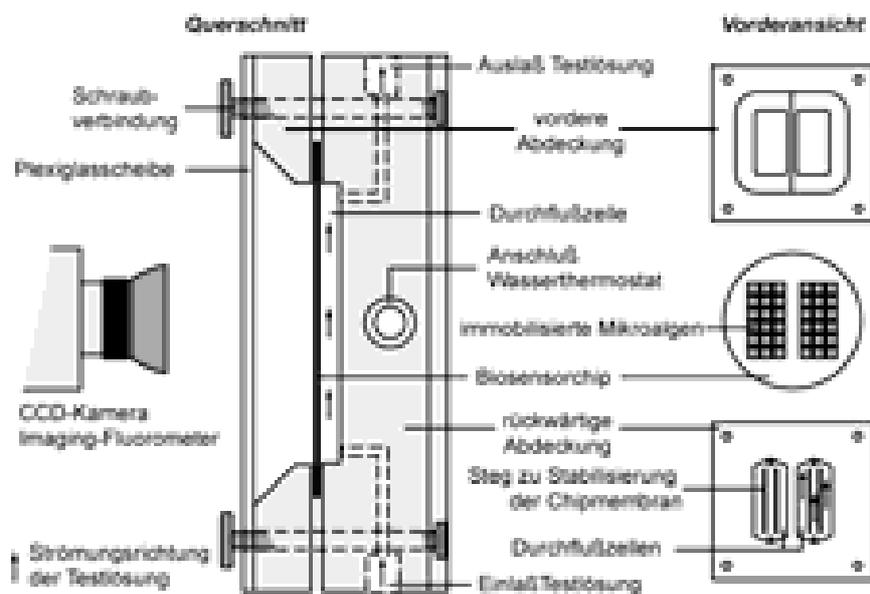


**Abbildung 5** Schematische Darstellung des Biosensors Typ IIIc für Luftschadstoffe im Querschnitt.

### ***Biosensoren für wassergelöste Schadstoffe***

Die Messung von wassergelösten Schadstoffen mit Hilfe von immobilisierten Mikroalgen erfordert einige Modifikationen der oben beschriebenen Biosensorkammern, die zur Detektion von gasförmigen Verbindungen entwickelt worden sind.

Die Biosensorzelle Typ FIIB (Abbildung 6) wird aus chemisch beständigem Delrin (Polyacetal) hergestellt und besteht aus einem die wesentlichen technischen Merkmale aufweisenden Hauptkörper und einer Frontabdeckung. Die Biosensormembran mit den immobilisierten Mikroalgen wird zwischen Hauptkörper und aufsetzbarer vorderer Abdeckung fixiert, wobei die immobilisierten Mikroalgen sich auf der zur Frontseite hin gewandten Seite der Biosensormembran befinden. Hinter Algenkulturen und Membran befinden sich, in den Hauptkörper der Zelle eingelassen, zwei getrennte, unabhängige Durchflußzellen für flüssige Medien. Mittels einer Schlauchpumpe können Flüssigkeiten durch einen am oberen Anschluß angelegten leichten Unterdruck durch die Durchflußzellen strömen. In den Durchflußzellen integrierte Stege stabilisieren die Biosensormembran gegenüber unterdruckbedingten Bewegungen in Richtung der Rückseite. Wassergelöste Komponenten werden durch Diffusion durch die Membran auf die Seite der immobilisierten Algen transportiert. Die Temperierung der Durchflußzellen erfolgt über den rückwärtigen Gehäusebereich, der in den Kreislauf eines Wasserthermostaten integriert ist. Messungen der Chlorophyllfluoreszenz werden mit einem Imaging Chlorophyllfluorometer durchgeführt.



**Abbildung 6** Schematische Darstellung des Biosensors Typ FIIB für wassergelöste Schadstoffe im Querschnitt.

### **II.3.3. Nutzung der Chlorophyllfluoreszenz als biosensorisches Signal**

Die Chlorophyllfluoreszenz wird als eine meßbare Größe des umweltsensitiven Photosyntheseprozesses als Signal des Biosensors genutzt. In den folgenden Abschnitten wird das Prinzip der Fluoreszenzmessung sowie die experimentelle Anordnung und Anwendung im Biosensorsystem erläutert.

#### ***Messung der Chlorophyll a-Fluoreszenz mittels des PAM-Prinzips***

Konventionelle Chlorophyllfluorometer verwenden dieselbe Lichtquelle zur Anregung der Chlorophyllfluoreszenz ( $\lambda = 650-800$  nm) und der Photosynthese. Diese Geräte sind in ihren Anwendungsmöglichkeiten stark eingeschränkt, da das zu detektierende Fluoreszenzlicht von Anregungs- und Photosynthesebeleuchtung getrennt und von möglicher Hintergrundbeleuchtung isoliert werden muß. Diese Nachteile werden durch die Anwendung des von Schreiber et al. (1986) beschriebenen pulsamplitudenmodulierten (PAM) Meßprinzips umgangen. Ein schwaches, pulsmoduliertes LED-Meßlicht wird zur Anregung der Chlorophyllfluoreszenz eines photosynthetisch aktiven Organismus verwendet. Je nach PAM-Fluorometer beträgt die Pulsfrequenz dieses Anregungslichts 1 Hz bis 20 kHz. Dieses schwache, nicht aktinische Anregungslicht induziert eine Chlorophyllfluoreszenz mit einer identischen Pulsmodulation. Auf Grund dieser pulsmodulierten „Signatur“ wird die Unterscheidung der Chlorophyllfluoreszenz von dem die Photosynthese induzierenden Licht und der auftretenden Hintergrundstrahlung ermöglicht, auch wenn diese Strahlungsquellen das Fluoreszenzsignal mit einer vielfachen Intensität ( $\times 10^5$ ) überschreiten.

#### ***Chlorophyllfluoreszenz Quenching Analyse***

Die Methode der PAM-Chlorophyllfluoreszenzanalyse wird zur Beschreibung des Photosynthesestatus von Höheren Pflanzen und Algen seit langem eingesetzt. Chlorophyllmoleküle im Reaktionszentrum des Photosystems II (PSII) werden durch Lichtenergie angeregt. Die absorbierte Lichtenergie wird hauptsächlich drei verschiedenen, miteinander konkurrierenden Prozessen zugeführt: Ein Teil der Lichtenergie geht in die photochemischen Prozesse über (Elektronentransport, Aufbau des Protonengradienten). Des weiteren wird Energie in Form von Wärme und als Fluoreszenz abgegeben. Prinzipiell läßt sich eine hohe Fluoreszenzausbeute messen, wenn Photochemie und Wärmeabgabe gering sind. Gesteigerte Photochemie und Wärmeabgabe resultieren daher umgekehrt in einer Löschung („quenching“) des meßbaren Fluoreszenzsignals. Photochemische Prozesse

und nicht-photochemische Vorgänge (Wärmeabgabe) werden daher auch als „photochemisches Quenching“ (PQ) und „nicht-photochemisches Quenching“ (NPQ) bezeichnet. Beobachtet man eine Veränderung der Fluoreszenzausbeute, stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß die beiden unterschiedlichen Quenching-Prozesse jeweils dazu beitragen. Diese Anteile lassen sich mit Hilfe der sogenannten Sättigungspuls-Methode ermitteln.

Diese Methode basiert auf der Anwendung eines kurzen aber intensiven Sättigungsblitzes, der den primären Elektronenakzeptor (Plastochinon  $Q_A$ ) des PSII vollständig reduziert und somit den Elektronentransport und damit die Umwandlung von Lichtenergie in photochemische Energie verhindert (PQ=0). Zwei Sonderfälle ermöglichen hier die Analyse der Quenchingprozesse:

(1) Bei dunkeladaptierten Proben ist theoretisch kein nicht-photochemisches Quenching vorhanden und das photochemische Quenching maximal (da der primäre Elektronenakzeptor vollständig oxidiert vorliegt).

(2) Sowohl bei dunkel- als auch bei lichtadaptierten Proben ändert sich das Ausmaß von NPQ während des kurzen Sättigungsblitzes ( $\Delta t$ ) nicht.

Ein während des Sättigungsblitzes unter aktinischer Beleuchtung beobachteter Anstieg der Fluoreszenz  $F_t$  auf das maximale Fluoreszenzsignal  $F'_m$  spiegelt das photochemische Quenching wider. Im Vergleich mit der zuvor durchgeführten Bestimmung der maximalen und minimalen Fluoreszenzausbeute ( $F_m$  und  $F_0$ ), gemessen an dunkeladaptierten Proben (PQ=max, NPQ=0), wird eine Aussage über den relativen Anteil des photochemischen und nicht-photochemischen Quenchings möglich.

Zur Beschreibung des photochemischen und nicht-photochemischen Quenchings dienen die Quenching-Koeffizienten  $qP$  und  $qN$ , die sich nach Schreiber et al. (1986) aus den aufgenommenen Fluoreszenzparametern wie folgt berechnen lassen:

$$qP = (F'_m - F_t) / (F'_m - F_0)$$

$$qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F_0)$$

Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung des Zustands der Photosynthese unter aktinischer Beleuchtung ist die Quantenausbeute (auch Quanteneffizienz) des Photosystems II (auch des Elektronentransports)  $\lambda_{PSII}$  (Genty et al., 1989):

$$\lambda_{\text{PSII}} = F'_m - F_t / F'_m = \div F / F'_m.$$

$\lambda_{\text{PSII}}$  gibt die Effizienz der Energieumwandlung von Lichtenergie zu photochemischer Energie durch das Photosystem II bei ablaufender Photosynthese wieder.

Die maximale Quantenausbeute des Photosystems II beschreibt die Effizienz, mit der die Anregungsenergie in die oxidiert vorliegenden Reaktionszentren des PSII übernommen werden kann (Butler & Kitajima, 1975; Baker, 1991) und errechnet sich nach:

$$\lambda_{\text{PSIImax}} = F_m - F_0 / F_m = F_v / F_m.$$

Eine Proportionalität von  $\lambda_{\text{PSII}}$  bzw.  $\lambda_{\text{PSIImax}}$  zur Quantenausbeute der  $\text{CO}_2$ -Assimilation oder zur Quantenausbeute der Sauerstoffentwicklung konnte gezeigt werden (z. B. Björkmann & Demming, 1987; Genty et al., 1989; Krause & Weis, 1991).

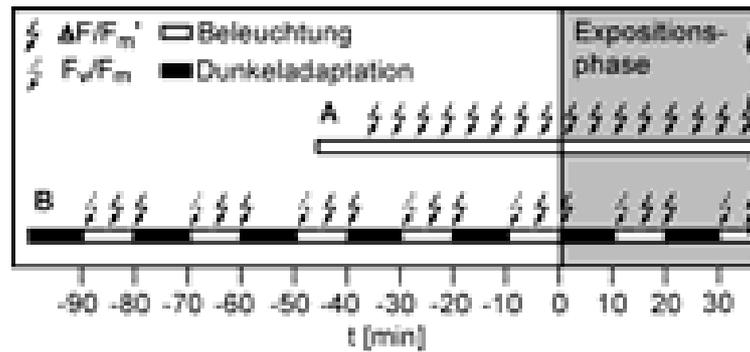
### ***Durchführung der Fluoreszenzmessungen***

In den entwickelten Biosensorsystemen werden das „PAM-2000 Chlorophyll Fluorometer“ und das „IMAGING-PAM Chlorophyll Fluorometer“ der Firma Walz GmbH (Effeltrich, Deutschland) verwendet. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Geräten besteht in dem Modus der Fluoreszenzdetektion. Während das PAM-2000 eine an einen Faseroptikleiter gekoppelte analoge Photodiode verwendet, nimmt das IMAGING-PAM die Fluoreszenz über eine CCD-Kamera in Form eines digitalen Bilds auf. In Folge dessen ist das gemessene Fluoreszenzsignal des PAM-2000 ein gemittelter Wert der gesamten in die Messung eingeschlossenen Fläche. Dagegen liefert das Fluoreszenzbild mit  $640 \times 480$  Bildpunkten zweidimensional aufgelöste Informationen, die mit Hilfe der dazugehörigen Software in definierten Bereichen ausgewertet werden können. Dies ermöglicht z. B. den zeitgleichen Einsatz verschiedener immobilisierter Mikroalgenstämmen in einem Biosensorsystem. Das „mini-PAM Chlorophyll Fluorometer“ (Walz GmbH) wird als portables Gerät in den Experimenten zur Überwachung des physiologischen Status von langzeitimmobilisierten Kulturen eingesetzt.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die wichtigsten technischen Spezifikationen der Chlorophyllfluorometer. Des Weiteren ist deren Verwendung in Verbindung mit den verschiedenen Biosensorsystemen und die Kategorie der durchgeführten Experimente angegeben.

**Tabelle 4** Übersicht über die in den wichtigsten experimentellen Setups verwendeten PAM-Chlorophyllfluorometer und deren Spezifikationen und Einstellungen.

| <b>Experiment</b>                                      | <b>VOC-Exposition<br/>Langzeit</b> | <b>VOC-Exposition</b>        | <b>VOC-Exposition<br/>Chip</b> | <b>Herbizid-<br/>exposition<br/>Chip</b> | <b>Wachstum,<br/>Medien-<br/>versorgung</b> |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Typ Biosensor</b>                                   | <b>II</b>                          | <b>IIIa/b</b>                | <b>IIIc</b>                    | <b>FIIb</b>                              | <b>-</b>                                    |
| <b>Fluorometer</b>                                     | <b>PAM-2000</b>                    | <b>PAM-2000</b>              | <b>IMAGING-<br/>PAM</b>        | <b>IMAGING-<br/>PAM</b>                  | <b>mini-PAM</b>                             |
| <b>Anregungslicht</b>                                  |                                    |                              |                                |                                          |                                             |
| Pulsmodulation                                         | 600 Hz oder<br>20 kHz              | 600 Hz oder<br>20 kHz        | 1 Hz                           | 1 Hz                                     | 600 Hz oder<br>20 kHz                       |
| Pulslänge                                              | 3 $\mu$ s                          | 3 $\mu$ s                    |                                |                                          | 3 $\mu$ s                                   |
| Maximum [nm]                                           | 655                                | 655                          | 470                            | 470                                      | 650                                         |
| Intensität [ $\mu$ E m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ] | > 0,5                              | > 0,5                        | > 0,5                          | > 0,5                                    | > 0,5                                       |
| <b>Fluoreszenzdetektion</b>                            |                                    |                              |                                |                                          |                                             |
| Detektor                                               | Photodiode                         | Photodiode                   | CCD-<br>Kamera                 | CCD-<br>Kamera                           | Photodiode                                  |
| [nm]                                                   | > 700                              | > 700                        | > 630                          | > 630                                    | > 700                                       |
| <b>Aktinische<br/>Beleuchtung</b>                      |                                    |                              |                                |                                          |                                             |
| Typ                                                    | LED                                | LED                          | LED                            | LED                                      | Fluoreszenz-<br>lampen, s. II.1.1           |
| max [nm]                                               | 655                                | 655                          | 470                            | 470                                      | weiß                                        |
| Intensität [ $\mu$ E m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ] | 35                                 | 35                           | 30                             | 20                                       | 30                                          |
| <b>Sättigungspuls</b>                                  |                                    |                              |                                |                                          |                                             |
| Lampe                                                  | Halogen                            | Halogen                      | LED                            | LED                                      | Halogen                                     |
| max [nm]                                               | weiß                               | weiß                         | 470                            | 470                                      | weiß                                        |
| Intensität [ $\mu$ E m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ] | 2000                               | 2000                         | > 700                          | > 700                                    | 2000                                        |
| Dauer [ms]                                             | 600                                | 600                          | 800                            | 800                                      | 600                                         |
| <b>Lichtprogramm</b><br>(siehe Abbildung 7)            | B                                  | A                            | A                              | A                                        | -                                           |
| <b>Sequenz des<br/>Sättigungsblitzes</b><br>[min]      | 5                                  | 5 (Typ IIIa)<br>2 (Typ IIIb) | 2                              | 2                                        | -                                           |



**Abbildung 7** Die Beleuchtungsprogramme zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz. Programm A: Fluoreszenzmessungen ( $F_t$ , Berechnung von  $\Delta F/F'_m$ ) bei kontinuierlicher Beleuchtung unter Anwendung eines Sättigungsblitzes von 5 oder 2 min. Programm B: Alternierende Licht-/Dunkelphasen von jeweils 10 min Dauer für die zusätzliche wiederholte Aufnahme der Dunkelparameter am Ende der Dunkelperiode ( $F_0$ ,  $F_m$ , Berechnung von  $F_v/F_m$ ). Bei Anwendung eines Sättigungsblitzes während der aktinischen Beleuchtung lassen sich so außerdem  $qN$  und  $qP$  bestimmen.

Abbildung 7 stellt die während der Expositionsexperimente angewendeten Beleuchtungsprogramme dar, die über die Chlorophyllfluorometer appliziert werden. Sollen neben  $F_t$  und  $\Delta F/F'_m$  die Quenchingkoeffizienten  $qP$  und  $qN$  sowie  $F_v/F_m$  ermittelt werden, ist eine vorangehende Messung an einer dunkeladaptierten Probe notwendig. Beleuchtungsprogramm B verwendet daher alternierende Licht-/Dunkelperioden von jeweils 10 min. Sollen dagegen nur  $F_t$  und  $\Delta F/F'_m$  bestimmt werden, eignet sich die Anwendung von Beleuchtungsprogramm A. Das Programm verwendet Dauerlicht und erfordert eine wesentlich kürzere Vorlaufphase bis zur Stabilisierung der Fluoreszenzparameter, d. h. bis zum Beginn der Expositionsphase (siehe Abbildung 7).

## II.4. Expositionsexperimente mit toxischen Substanzen

Die Erprobung und Charakterisierung der Biosensorsysteme erfolgt in Expositionsexperimenten mit gasförmigen oder wassergelösten Schadstoffen.

### II.4.1. Expositionsexperimente mit VOCs

In Expositionsexperimenten werden die flüchtigen organischen Verbindungen Methanol und Formaldehyd eingesetzt (Carl Roth GmbH). Zur Herstellung der VOC-Dämpfe wird das Konzentrationsgleichgewicht zwischen flüssiger und gasförmiger Phase ausgenutzt. Dieses Gleichgewicht wird durch die stoffspezifische Henry-Konstante

$$k_H [\text{M atm}^{-1}] = c_a / p_g$$

bei definierter Temperatur beschrieben, wobei  $c_a$  die Stoffkonzentration in der wässrigen Phase und  $p_g$  der Partialdruck des Stoffs in der Gasphase ist. Die Temperaturabhängigkeit von  $k_H$  lässt sich nach

$$k_H^I = k_H^J \exp\left(\frac{H}{R} \left(\frac{1}{T^J} - \frac{1}{T^I}\right)\right)$$

berechnen;  $k_H^I$  und  $T^I$  beziehen sich hier auf Standardbedingungen bei 25 °C. Anhand der dimensionslosen Henry-Konstante  $k_H^{cc}$ , die die Stoffkonzentrationen in beiden Phasen berücksichtigt, lässt sich das Konzentrationsgleichgewicht als

$$k_H^{cc} = c_a / c_g$$

ausdrücken, wobei  $c_a$  und  $c_g$  die Konzentration des Stoffs in Wasser- und Gasphase angeben. Die Beziehung zwischen  $k_H$  und  $k_H^{cc}$  kann nach Sander (1999) als

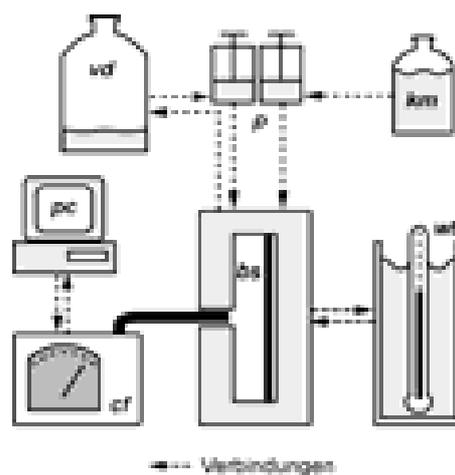
$$T \times k_H = 12,2 \times k_H^{cc}$$

wiedergegeben werden und wird zur Berechnung des Konzentrationsgleichgewichts der in den Expositionsexperimenten benötigten VOC-Konzentrationen in der Gasphase herangezogen. Die zur Berechnung notwendigen Konstanten werden für Methanol aus Snider & Dawson (1985) und für Formaldehyd aus Zhou & Mopper (1990) entnommen.

Das Einstellen der VOC-Konzentrationen erfolgt mindestens 30 min vor Expositionsbeginn in mit 2 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gefüllten Glasflaschen eines Gesamtvolumens von 1 l. Das Gasvolumen der Flasche wird mit durch einen Kohle- und einen Sterilfilter (Gelman Acro 50; Pall, New York, USA) filtrierter und befeuchteter Druckluft aufgefüllt. Anschließend wird die entsprechende Menge an VOC bei definierter Temperatur zugegeben und die Lösung während der Experimente mittels eines Magnetrührers kontinuierlich durchmischt.

Während der Expositionsphase zirkuliert das Gasgemisch mit Hilfe einer Membranpumpe mit einer Strömungsleistung von  $1,0 \text{ l min}^{-1}$  über ein Schlauchsystem zwischen dem Vorratsbehälter und der Biosensorzelle (Typ II und IIIa/b/c), in der sich die immobilisierten Mikroalgen befinden (Abbildung 8).

Fluoreszenzmessungen werden wie oben beschrieben für mindesten 30 min in VOC-freier Luft durchgeführt, bis sich ein konstanter Photosynthesestatus in Bezug auf die ermittelten Fluoreszenzparameter einstellt. Basierend auf dem Mittelwert der letzten 3-5<sup>a</sup> Messungen unter VOC-freier Luft werden die prozentualen Veränderungen der



**Abbildung 8** Versuchsaufbau der Expositionsexperimente mit flüchtigen organischen Verbindungen (VOC): *bs* Biosensorzelle, *cf* Chlorophyllfluorometer, *km* Kulturmedium, *vd* VOC-Dämpfe, *p* Pumpe, *pc* Rechner, *wt* Wasserthermostat.

<sup>a</sup> Bei einer Meßfrequenz von 5 min dienen die letzten drei Werte vor Beginn der Schadstoffexposition als Referenz. Wird eine Meßfrequenz von 2 min angewandt, werden die letzten fünf Werte verwendet.

Photosyntheseparameter während der anschließenden Expositionsphase von bis zu 60 min Dauer berechnet. Zur Berücksichtigung von nicht-VOC-induzierten Effekten auf die Chlorophyll a-Fluoreszenz werden die erhobenen Fluoreszenzparameter durch Daten aus Kontrollexperimenten mit VOC-freier Luft korrigiert.

#### **II.4.2. Expositionsexperimente mit Herbiziden**

Die Triazine Atrazin (2-Chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin) und Simazin (2,4-Bis(ethylamino)-6-chloro-1,3,5-triazin), die Harnstoffderivate Diuron (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff) und Isoproturon (3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) und das Bipyridyliumsalz Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid-hydrat) werden über Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) als PESTANAL Analysenstandard bezogen. Stammlösungen der Herbizide werden mit einer Konzentration von 100 mg l<sup>-1</sup> in 99,9 % Ethanol (ROTIPURAN, Carl Roth GmbH) angesetzt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

In den Expositionsexperimenten werden Herbizide in Konzentrationen von 0,05 bis 500 µg l<sup>-1</sup> eingesetzt. Die entsprechenden Konzentrationen werden in BBM Kulturmedium angesetzt. Die Durchführung der Experimente erfolgt unter der Verwendung des Biosensorsystems Typ FIIB in zwei unabhängigen Durchflußzellen. Die Applikation von Herbiziden und herbizidfreien Lösungen erfolgt rezirkulierend (Gesamtmenge der Lösungen 50 ml) über eine Schlauchpumpe mit einer Durchflußrate von 2,9 ml min<sup>-1</sup>. Zur Verhinderung von Herbizidabsorption werden ausschließlich Pumpen- und Verbindungsschläuche aus chemisch inertem Teflon bzw. Viton eingesetzt. Die Temperatur während der Expositionsexperimente wird mittels des Wasserthermostaten auf 21,5 °C eingeregelt. Jeweils ein Expositionsexperiment wird zeitgleich mit einem parallelen Kontrollexperiment durchgeführt. Die begleitenden Kontrollexperimente zu den Herbizidexpositionen von 500 µg l<sup>-1</sup> werden unter Zugabe der entsprechenden Menge Ethanol durchgeführt, die in der Herbizidlösung enthalten ist. Wie in Experimenten bestätigt werden kann, beeinflussen die in den Herbizidlösungen von Ö 100 µg l<sup>-1</sup> enthaltenen Ethanolkonzentrationen die gemessenen Fluoreszenzparameter nicht.

Die ermittelten Fluoreszenzparameter  $F_t$  und  $\Delta F/F'_m$  werden, wie unter II.3.3 beschrieben, für 16 min mit herbizidfreiem Kulturmedium ermittelt und dienen als Referenz für die anschließende Expositionsperiode von 20 min. Herbizidinduzierte prozentuale Veränderungen der Fluoreszenzparameter während der Expositionsphase werden durch

---

den Vergleich der Expositionsdaten mit dem Mittelwert der letzten drei Meßwerte vor Beginn der Expositionsperiode ermittelt. Zur Beschreibung der Herbizidwirkung auf die Chlorophyllfluoreszenzparameter werden zwei verschiedene Verfahrensweisen angewandt. (1) *Zeitlich terminale Auswertung*: Die herbizidinduzierten Effekte werden als Veränderung der Fluoreszenzparameter an einem bestimmten Meßzeitpunkt innerhalb der Expositionsphase ausgedrückt. (2) *Integrierte Auswertung*: Die innerhalb der Expositionsperiode alle 2 min aufgenommenen Fluoreszenzparameter werden über diesen Zeitraum integriert, um den gesamten Verlauf der Exposition in die Auswertung einzubeziehen (Trapmann et al., 1998). Zur Bildung der Integrale wird GraphPad Prism v4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet.

Einflüsse anderer Faktoren auf die erhobenen Fluoreszenzparameter werden durch die simultan in der zweiten Durchflußzelle durchgeführten Kontrollmessungen korrigiert. Im Anschluß an die Herbizidexposition werden die Durchflußzellen mit ca. 10 ml Kulturmedium gespült, um anschließend die Reversibilität des Biosensorsignals über einen Zeitraum von 10 min zu beobachten.

## II.5. Statistische Analysen

Zur Analyse der Daten aus den Expositionsexperimenten mit Luftschadstoffen wird GraphPad Prism v4.02 verwendet. Zum Vergleich von Datensätzen wird der nichtparametrische Mann-Whitney Test herangezogen, dessen Ergebnisse u. a. der Definition der NOEC (No Observed Effect Concentration) und LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) dienen. Die durchgeführten nichtlinearen Regressionen basieren auf dem Modell der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung und dienen als Basis zur Berechnung der  $EC_{50}$  mit 95 % Vertrauensbereichen. Zur Bestimmung des linearen Meßbereichs der Biosensoren werden lineare Regressionen durchgeführt.

Aus Datensätzen der Expositionsexperimente mit wassergelösten Schadstoffen werden die  $EC_{50}$  mit 95 % Vertrauensbereichen und die Sättigung des Biosensorsignals ebenfalls mit GraphPad Prism v4.02 nach dem Modell der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt. Die Definition des linearen Meßbereichs erfolgt durch lineare Regression mit der gleichen Software. Zur Bestimmung der NOEC und LOEC werden die Datensätze mittels des Student'schen t-Tests ( $p=0,05$ ) unter der Verwendung von Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) miteinander verglichen. Der Student'sche t-Test ( $p=0,05$ ) wird darüber hinaus auch zur Analyse von signifikanten Unterschieden innerhalb der schadstoffspezifischen Wirkungsmuster verwendet (vgl. Abschnitt II.6).

Als Nachweisgrenzen des Biosensors wird die Schadstoffkonzentration definiert, die im Gegensatz zur nächst niedrigeren applizierten Konzentration, statistisch signifikante Unterschiede (Mann-Whitney Test,  $p \leq 0,05$ ) gegenüber einer Kontrollmessung aufweist. Dabei wird gleichzeitig vorausgesetzt, daß mit, von der Nachweisgrenze an, ansteigender Konzentration eine Konzentrationsabhängigkeit des Biosensorsignals festzustellen ist. Die LOEC dagegen gibt das mit steigender Konzentration erste Auftreten von signifikanten Unterschieden des Biosensorsignals zur Kontrolle an, auch wenn bei einer höheren Konzentration keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden können (z. B. auf Grund einer starken Variabilität innerhalb der Datensätze).

## II.6. Analyse von schadstoffspezifischen Reaktionsraten und Wirkungsmustern

Die in dieser Arbeit vorgestellten Biosensorsysteme ermöglichen die zeitgleiche Verwendung verschiedener Mikroalgenstämme in Expositionsexperimenten sowohl für Luftschadstoffe als auch für wassergelöste Schadstoffe. Um unterschiedliche Reaktionen der verschiedenen Mikroalgenstämme auf einen Schadstoff, unabhängig von dessen Konzentration, zu beschreiben, wird die Reaktionsrate (engl. response rate) verwendet. Die dimensionslose Reaktionsrate ist definiert als der Quotient des Biosensorsignals von zwei unterschiedlichen Algenstämmen. Das Biosensorsignal definiert sich wiederum als die prozentuale Veränderung der chlorophyllfluorometrisch ermittelten Photosyntheseparameter gegenüber einer Referenzmessung (Kontrolle).

Aus der Verwendung einer bestimmten Anzahl von Mikroalgenstämmen ( $m$ ) in Expositionsexperimenten lassen sich  $m^2$ -m Reaktionsraten errechnen. Die Gesamtheit dieser Reaktionsraten bildet ein Wirkungsmuster (engl. response pattern: RP), das nachfolgend auf seine Schadstoffspezifität untersucht werden kann.

Die Analyse von schadstoffspezifischen Wirkungsmustern wird anhand von neun verschiedenen Mikroalgenstämmen durchgeführt. Daraus ergibt sich zunächst ein aus 72 Reaktionsraten bestehendes Wirkungsmuster, das in Expositionsexperimenten mit fünf verschiedenen photosynthetisch wirksamen Herbiziden in einem Konzentrationsbereich von 0,05 - 500  $\mu\text{g l}^{-1}$  aufgenommen wird. Die Berechnung einer Reaktionsrate aus der Reaktion von zwei Algenstämmen wird nur für Herbizidkonzentrationen durchgeführt, die sich in einem gemeinsamen Bereich einer linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung beider Algen befinden. Anschließend wird die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsraten statistisch überprüft. Alle konzentrationsunabhängigen Reaktionsraten der jeweiligen Algenpaare werden nun unter Berücksichtigung der verschiedenen Herbizide miteinander verglichen. Herbizidspezifische, d. h. zu allen anderen Herbiziden signifikant unterschiedliche, und konzentrationsunabhängige Reaktionsraten werden zur Identifizierung der Herbizide herangezogen. Das *herbizidspezifische* Wirkungsmuster (im Folgenden RP1, Kalibrations-Wirkungsmuster) kann somit aus deutlich weniger Reaktionsraten bestehen, als sich theoretisch errechnen lassen. Die Anzahl von herbizidspezifischen Reaktionsraten für die einzelnen Herbizide ist in Tabelle 13 (S.61) aufgeführt.

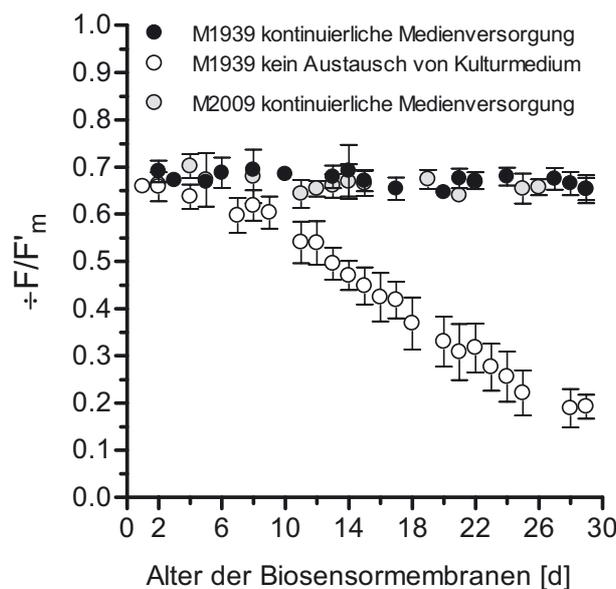
Zur Evaluierung dieser Methode zur Schadstoffidentifizierung werden weitere Wirkungsmuster (RP2, Evaluierungs-Wirkungsmuster) bei einer Konzentration im Bereich der linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung für 4 Herbizide aufgenommen. Diese Wirkungsmuster RP2 werden mit den zuvor ermittelten herbizidspezifischen Wirkungsmustern (RP1) verglichen. Für jedes Herbizid wird die prozentuale Abweichung des Wirkungsmusters RP2 von dem Kalibrations-Wirkungsmuster RP1 als Mittel des Betrags der einzelnen prozentualen Abweichungen der herbizidspezifischen und konzentrationsunabhängigen Reaktionsraten errechnet.

### III. ERGEBNISSE

#### III.1. Stabilität der immobilisierten Kulturen

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität immobilisierter Mikroalgen werden Verbundschichtkulturen einer Auswahl von 25 Süßwasseralgen verschiedener Gruppen angelegt und in Kulturkästen kontinuierlich mit Kulturmedium versorgt. Über einen Zeitraum von 21 d wird der physiologische Zustand mittels Chlorophyllfluoreszenzmessungen ( $\div F/F'_m$ ) überprüft, die in den hier entwickelten Biosensorsystemen der Beschreibung der Schadstofftoxizität dienen (Tabelle 5). 80 % der Stämme zeigen eine dauerhaft stabile Effizienz des PSII. Bei 72 % der Algenkulturen kann ebenfalls ein eindeutiges Wachstum durch optische Kontrolle festgestellt werden.

Um den Einfluß der kontinuierlichen Kulturmedierversorgung auf die Stabilität von  $\div F/F'_m$  zu ermitteln, werden Biosensormembranen von *Klebsormidium* über 30 d mit frischem Kulturmedium versorgt. Parallel dazu werden Membranen ohne Austausch des Kulturmediums im Verbundschichtsystem kultiviert. Während die kontinuierlich versorgten Kulturen konstante  $\div F/F'_m$  in einem Bereich von 0,70 bis 0,65 zeigen, kann im selben Zeitraum unter stationärer Medienversorgung ein annäherungsweise linearer Abfall von  $\div F/F'_m$  um ungefähr 70 % beobachtet werden (Abbildung 9). Signifikante



**Abbildung 9** Quanteneffizienz des Elektronentransports  $\div F/F'_m$  immobilisierter *Klebsormidium*-Stämme (M1939 und M2009) über einen Zeitraum von 30 d. Die Kulturen werden kontinuierlich mit frischem Kulturmedium versorgt oder innerhalb der 30 d ohne den Austausch des Kulturmediums kultiviert. Hemmung  $\div F/F'_m \pm$  Standardabweichung ( $n \times 4$ ), Immobilisierungsdichte zu Versuchsbeginn  $5 \mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ .

Unterschiede zwischen beiden Ansätzen lassen sich bereits nach 7 d feststellen.

**Tabelle 5** Übersicht über die für 21 d auf Verbundschichten kultivierten Algen sowie eine abschließende Bewertung über deren Wachstum (+ deutlich erkennbar, - nicht erkennbar) und physiologischen Zustand (+ stabile  $\pm F/F'_m$  über den Versuchszeitraum, -  $\pm F/F'_m$  nicht stabil oder kontinuierlich abnehmend). Kulturbedingungen: Temperatur 14 °C, Lichtintensität 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Waris-H Kulturmedium, n=2.

| Stamm        |                                   | Klasse              | Wachstum<br>deutlich<br>erkennbar | stabile $\pm F/F'_m$<br>im Versuchs-<br>zeitraum |
|--------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
| M1398        | <i>Scherffelia dubia</i>          | Chlorophyta         | +                                 | +                                                |
| M0560        | <i>Scourfieldia</i> sp.           | Prasinophyceae      | -                                 | +                                                |
| SAGB26.82    | <i>Tetraselmis cordiformis</i>    |                     | +                                 | +                                                |
| SAG11-60a    | <i>Chlamydomonas oblonga</i>      | Chlorophyceae       | +                                 | +                                                |
| CCAC0011     | <i>Eudorina elegans</i>           |                     | +                                 | +                                                |
| CCAC0055     | <i>Haematococcus pluvialis</i>    |                     | +                                 | +                                                |
| CCAP 909/9   | <i>Chromulina chionophila</i>     | Chrysophyceae       | +                                 | +                                                |
| M1625        | <i>Chroomonas</i> sp.             | Cryptophyceae       | +                                 | +                                                |
| M1395        | <i>Cryptomonas phaseolus</i>      |                     | -                                 | -                                                |
| M1488        | <i>Cryptomonas curvata</i>        |                     | +                                 | +                                                |
| M1164        | <i>Lyngbya halophila</i>          | Cyanobacteria       | +                                 | +                                                |
| M1167        | <i>Nostoc muscorum</i>            |                     | +                                 | +                                                |
| M1317        | <i>Synechocystis</i> sp.          |                     | +                                 | +                                                |
| UTEX LB 2255 | <i>Cystodinium</i> sp.            | Dinophyceae         | +                                 | +                                                |
| UTEX LB 2255 | <i>Peridinium inconspicuum</i>    |                     | +                                 | +                                                |
| CCAC0075     | <i>Woloszynskia pascheri</i>      |                     | -                                 | -                                                |
| M1883        | <i>Euglena archaeoplastidiata</i> | Euglenophyceae      | -                                 | +                                                |
| SAG1224-5/25 | <i>Euglena gracilis</i>           |                     | -                                 | +                                                |
| M1949        | <i>Phacus</i> sp.                 |                     | +                                 | -                                                |
| M0764        | <i>Cyanophora paradoxa</i>        | Glaucozystophyceae  | -                                 | -                                                |
| M2009        | <i>Klebsormidium</i> sp.          | Klebsormidiophyceae | +                                 | +                                                |
| M1939        | <i>Klebsormidium</i> sp.          |                     | +                                 | +                                                |
| M0796        | <i>Synura</i> sp.                 | Synurophyceae       | -                                 | -                                                |
| M1887        | <i>Cosmarium elegantissimum</i>   | Zygnemophyceae      | +                                 | +                                                |
| CCAC0120     | <i>Staurodesmus convergens</i>    |                     | +                                 | +                                                |

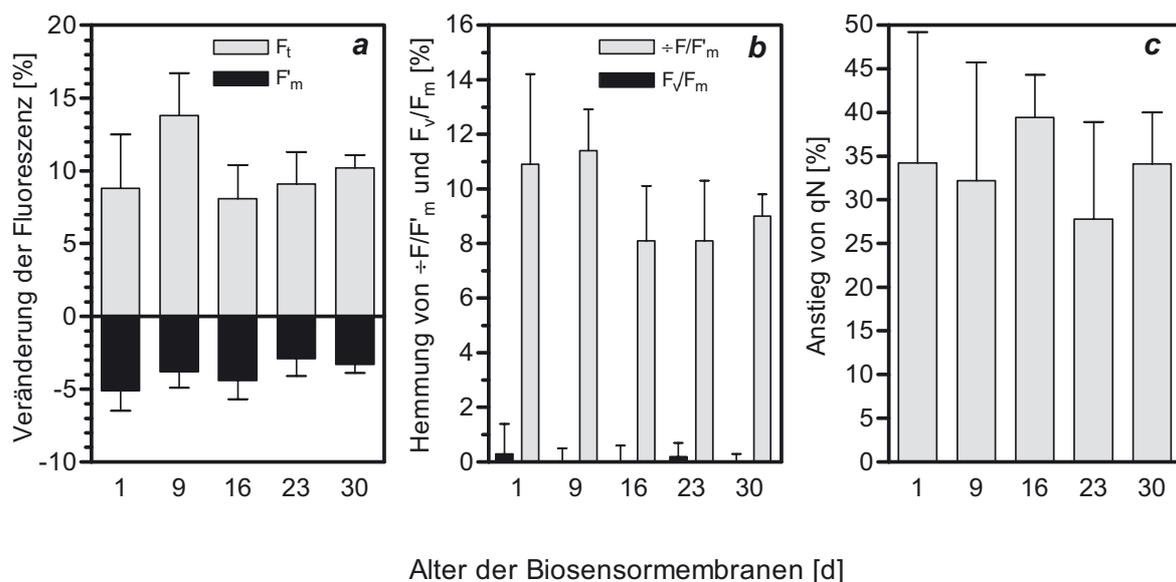
### III.2. Entwicklung eines Algenbiosensors für gasförmige Schadstoffe

Die hier durchgeführte Entwicklung eines Algenbiosensorsystems für gasförmige Schadstoffe gliedert sich im wesentlichen in zwei Phasen: Zu Beginn soll überprüft werden, inwiefern die langzeitstabilen Algenkulturen über einen Zeitraum von einigen Wochen wiederholt zum Nachweis toxischer Substanzen eingesetzt werden können. Daran schließt sich eine eingehendere Charakterisierung der Biosensoren in ihrer Eignung zur Messung von VOCs an, die ebenfalls eine Methode zur Identifizierung dieser Substanzen einschließt.

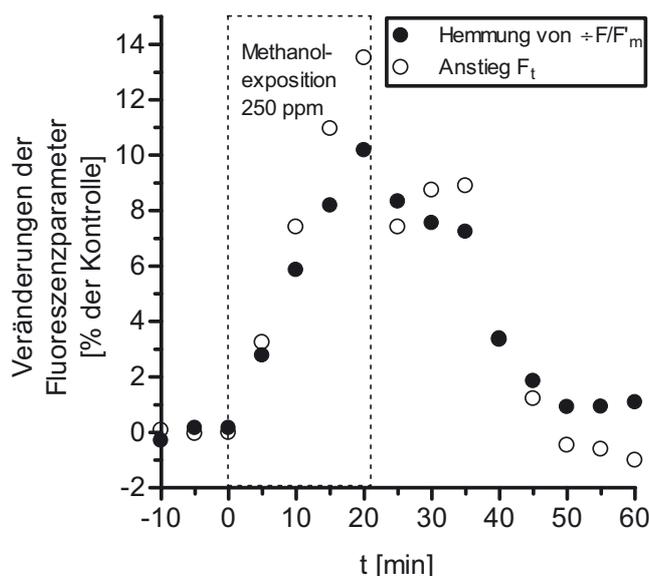
#### III.2.1. Etablierung eines langzeitstabilen fluoreszenzoptischen Biosensorsystems unter Nutzung der Verbundschichttechnologie

##### *Wiederholte Expositionsexperimente mit Methanoldämpfen*

Biosensormembranen von *Klebsormidium* (M1939) werden über 30 Tage kultiviert und innerhalb dieses Zeitraums wiederholt Methanoldämpfen von 500 ppm ausgesetzt. Die 60-minütigen Expositionsexperimente werden im Biosensorsystem Typ II durchgeführt. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenzparameter erfolgt bei alternierenden Licht- und Dunkelphasen (Abbildung 7). 1 d nach Herstellung der Membranen kann nach 20 min



**Abbildung 10** Biosensorsignale in Form der prozentualen Veränderungen der verschiedenen Fluoreszenzparameter gegenüber der Kontrolle bei Methanolexposition von 20 min bei 500 ppm. Wiederholte Expositionsexperimente werden über einen Zeitraum von 30 d mit *Klebsormidium* (M1939) durchgeführt. (a) Veränderungen der Fluoreszenz  $F_t$  und  $F'_m$ . (b) Hemmung der maximalen Quanteneffizienz  $F_v/F'_m$  (10 min Exposition) und effektiven Quanteneffizienz ( $+F/F'_m$ ) des Elektronentransports. (c) Anstieg des nichtphotochemischen Quenchings. Alle Angaben  $\pm$  Standardabweichung ( $n=4$ ), Biosensor Typ II, Temperatur  $26,5 \pm 2,5$  °C, Immobilisierungsdichte  $5 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$ .



**Abbildung 11** Prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m$  und Anstieg der Fluoreszenz  $F_t$  von *Klebsormidium* M1939 gegenüber der Kontrolle. Die Dauer der Expositionsexperimente mit Methanol beträgt 20 min bei einer Dampfkonzentration von 250 ppm und anschließend für 40 min bei methanolfreier Luft. Biosensor Typ IIIa, Temperatur 29 °C, Immobilisierungsdichte 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ .

Methanolexposition ein Anstieg der Fluoreszenz  $F_t$  und ein Abfallen der maximalen Fluoreszenz  $F'_m$  im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 10a). Dies resultiert in einer Hemmung der effektiven Quantenausbeute des PSII  $+F/F'_m$  um 10 %, wobei die maximale Quantenausbeute des PSII  $F_v/F_m$  (nach 10 min Exposition, siehe Abbildung 7) nicht beeinflusst wird (Abbildung 10b). Abbildung 10c zeigt einen Anstieg des nicht-photochemischen Quenchings (qN) um 35 % bei 20-minütiger Methanolexposition. Methanolinduzierte Effekte in einer ähnlichen Größenordnung sind ebenfalls nach 9, 16, 23 und 30 d nach Herstellung der Membranen feststellbar. Statistische Analysen zeigen keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Expositionsexperimenten am 1. Tag.

Bei einer Verlängerung der Expositionsperiode auf 40 bzw. 60 min können keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) in der Ausprägung der Reaktion des Biosensors bezüglich der Parameter  $F_v/F_m$ ,  $+F/F'_m$ ,  $F_t$ ,  $F'_m$  und qN beobachtet werden (Tabelle 6). Die Reversibilität des Biosensorsignals in Form von  $F_t$  und  $+F/F'_m$  nach 20-minütiger Methanolexposition bei 250 ppm ist in Abbildung 11 dargestellt. Ungefähr 30 min nach dem Ausspülen der Methanoldämpfe werden die Werte der parallel durchgeführten Kontrollexperimente erreicht. Dieser Effekt ist generell für alle getesteten Methanolkonzentrationen bis 500 ppm feststellbar.

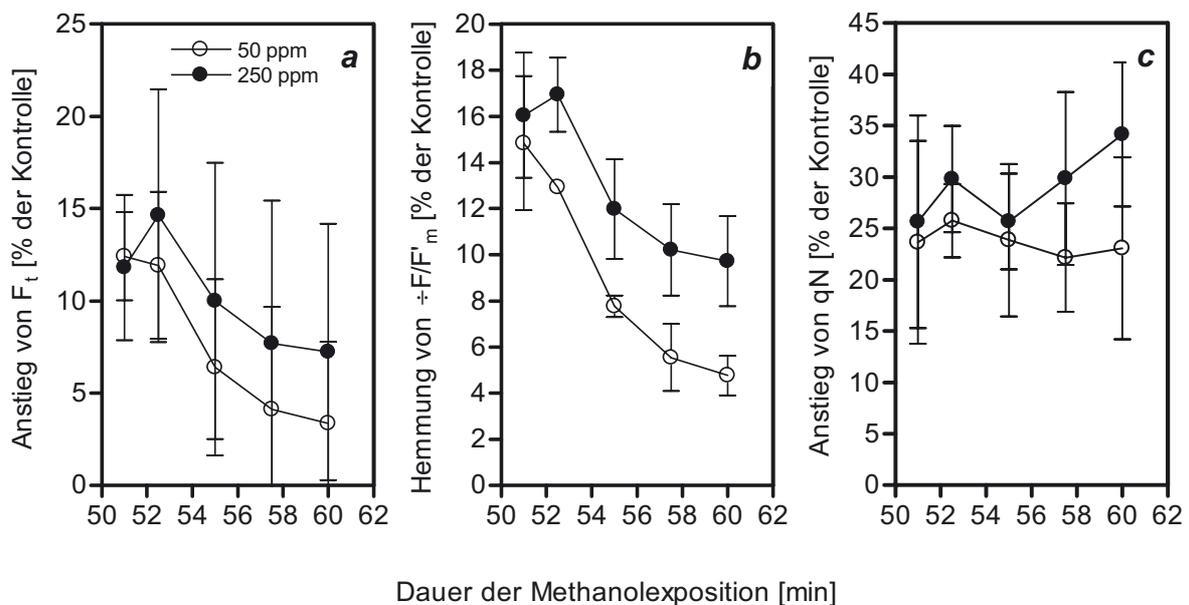
**Tabelle 6** Einfluß der Expositionsdauer auf das Signal des Biosensors in Form der Veränderung verschiedener Fluoreszenzparameter gegenüber der Kontrolle.  $F_v/F_m$  wird entsprechend dem Beleuchtungsprogramm nach 10, 30 und 50 min im Expositionszeitraum ermittelt (Abbildung 7).

| Exposition [min] | $F_t$            | $F'_m$         | $F_v/F_m$      | $\div F/F'_m$  | qN                |
|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| 20               | -10,0 $\div$ 3,1 | 3,9 $\div$ 1,3 | 0,5 $\div$ 0,4 | 9,5 $\div$ 2,4 | -33,5 $\div$ 10,4 |
| 40               | -9,5 $\div$ 3,9  | 4,4 $\div$ 2,6 | 1,0 $\div$ 0,7 | 9,5 $\div$ 2,2 | -32,1 $\div$ 13,5 |
| 60               | -9,8 $\div$ 4,6  | 4,6 $\div$ 3,6 | 1,0 $\div$ 0,3 | 9,8 $\div$ 2,1 | -33,8 $\div$ 11,6 |

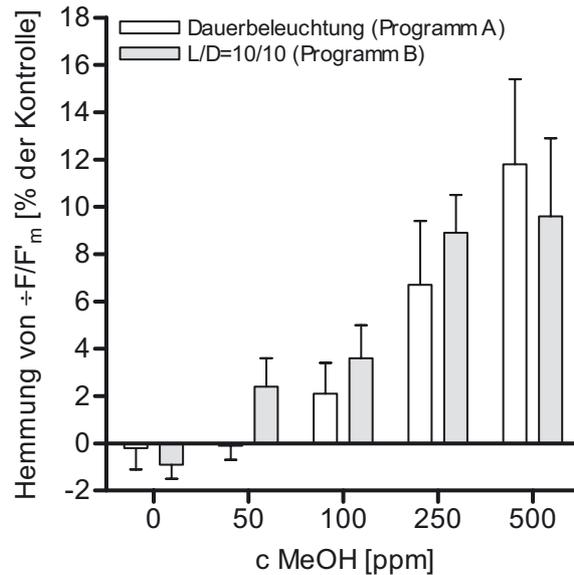
**Einfluß des experimentellen Setups auf die Sensitivität des Klebsormidium-Biosensors**

*Beleuchtungsprogramm während der Fluoreszenzmessungen*

Während der Verwendung von alternierenden Licht-/Dunkelphasen zur Fluoreszenzmessung wird das Biosensorsignal von *Klebsormidium* M1939 innerhalb des Verlaufs der 10-minütigen Lichtphase untersucht. Abbildung 12 zeigt Messungen der Fluoreszenzparameter nach 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 min bei Methanolexpositionen von 50 und 250 ppm während der 3. Lichtphase (50-60 min Exposition). Zu diesem Zeitraum kann von einer Sättigung des Biosensorsignals ausgegangen werden (vgl. Tabelle 6). Für den Anstieg von  $F_t$  und die Hemmung von  $\div F/F'_m$  können die jeweils höchsten prozentualen



**Abbildung 12** Biosensorsignale in Form der prozentualen Veränderungen der verschiedenen Fluoreszenzparameter gegenüber der Kontrolle bei Methanolexposition von 50-60 min bei 50 und 250 ppm über den gesamten Zeitraum einer 10-minütigen Lichtphase unter Anwendung der alternierenden Licht-/Dunkelphasen zur Fluoreszenzmessung. (a) Anstieg der Fluoreszenz  $F_t$ . (b) Hemmung der effektiven Quanteneffizienz  $\div F/F'_m$  des Elektronentransports. (c) Anstieg des nichtphotochemischen Quenchings. Alle Angaben  $\pm$  Standardabweichung ( $n=4$ ), Biosensor Typ II, Temperatur  $26,5 \pm 2,5$  °C, Immobilisierungsdichte  $5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$ .



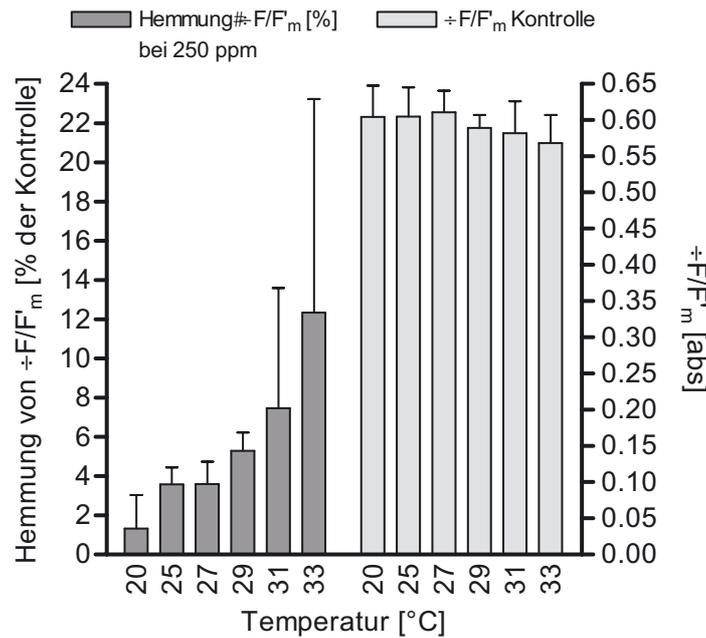
**Abbildung 13** Einfluß des Beleuchtungsprogramms auf das Biosensorsignal bei Anwendung von Dauerbeleuchtung (Biosensor Typ IIIa) und von alternierenden Licht-/Dunkelphasen (Biosensor Typ II): Prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m$  gegenüber der Kontrolle von *Klebsormidium* M1939 nach 20-minütigen Expositionsexperimenten mit Methanol bei einer Dampfkonzentration von 0-500 ppm (keine Korrektur der Expositionsdaten durch Kontrollwerte). Hemmung  $+F/F'_m \pm$  Standardabweichung ( $n \times 4$ ), Temperatur  $26,5 \pm 2,5$  °C, Immobilisierungsdichte  $5 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$ .

Biosensorsignale zu Beginn der Lichtphase, nach 1 und 2,5 min Beleuchtung, festgestellt werden. Im Vergleich zu den nach 10 min Beleuchtung gemessenen Biosensorsignalen zeigt sich eine um den Faktor 2 (bei 250 ppm) bzw. 3 (bei 50 ppm) erhöhte Sensitivität von *Klebsormidium* gegenüber Methanol. Auf qN wird dagegen kein signifikanter Einfluß des Meßzeitpunkts innerhalb der Lichtphase beobachtet.

Im Folgenden soll überprüft werden, ob die mit dem alternierenden Lichtprogramm aufgezeichneten Biosensorsignale unter Dauerbeleuchtung mit einer vergleichbaren Sensitivität zu messen sind. Abbildung 13 stellt die gemessenen Biosensorsignale in Form von  $+F/F'_m$  nach 20-minütiger Methanolexposition (1) des letzten Meßwerts während der Lichtphase bei Nutzung alternierender Beleuchtung und (2) des Meßwerts nach 20 min Exposition unter Dauerbeleuchtung dar. Im Bereich von Methanolkonzentrationen bis 500 ppm kann nur bei einer vergleichsweise geringen Konzentration von 50 ppm eine erhöhte Sensitivität des Biosensors unter Einsatz des alternierenden Beleuchtungsprogramms festgestellt werden.

### Temperatur

Der Einfluß der Temperatur auf die Höhe des Signals eines *Klebsormidium* (M1939) Biosensors bei Methanolexposition von 250 ppm und auf die absolute  $+F/F'_m$  während der

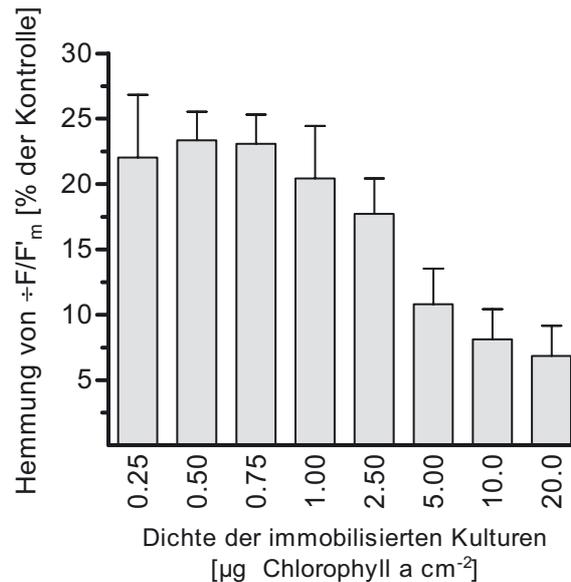


**Abbildung 14** Temperaturabhängigkeit der prozentualen Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m \pm$  Standardabweichung ( $n=8$ ) im Vergleich zur Kontrolle bei Methanolexposition von 250 ppm. Absolute  $+F/F'_m \pm$  Standardabweichung ( $n=8$ ) in methanolfreier Luft. Alle Experimente unter Verwendung der Alge *Klebsormidium* M1939, Biosensor Typ IIIa, Immobilisierungsdichte  $5 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$ .

Kontrollexperimente ist in Abbildung 14 dargestellt. Die methanolinduzierte Hemmung von  $+F/F'_m$  im Vergleich zur Kontrolle unter kontinuierlicher Beleuchtung erhöht sich von 1,3 % bei 20 °C auf 12,3 % bei 33 °C. Dagegen können mit steigender Temperatur keine signifikanten Veränderungen der absoluten  $+F/F'_m$  nachgewiesen werden. Eine hohe Variabilität der prozentualen Hemmung von  $+F/F'_m$  innerhalb der parallelen Messungen, zu erkennen an einer hohen Standardabweichung, ist bei Temperaturen über 29 °C zu beobachten.

*Dichte der immobilisierten Kulturen*

Zur Messung des Effekts der Immobilisierungsdichte auf die Reaktion des Biosensors wird *Klebsormidium* M1939 in einer Dichte von  $0,25 - 20 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$  auf Membranen aufgebracht. Expositionsexperimente unter der Verwendung von 1 ppm Formaldehyd werden für 30 min durchgeführt. Eine maximale Hemmung von  $+F/F'_m$  von 20 % im Vergleich zur Kontrolle kann bei Immobilisierungsdichten von  $0,25 - 1 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$  ermittelt werden (Abbildung 15). Eine sukzessive Erhöhung der Immobilisierungsdichte auf  $10 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$  resultiert in der Abnahme der Hemmung von  $+F/F'_m$  bis auf 8,1 %. Die Formaldehydexposition von Biosensormembranen mit einer Immobilisierungsdichte von  $20 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$

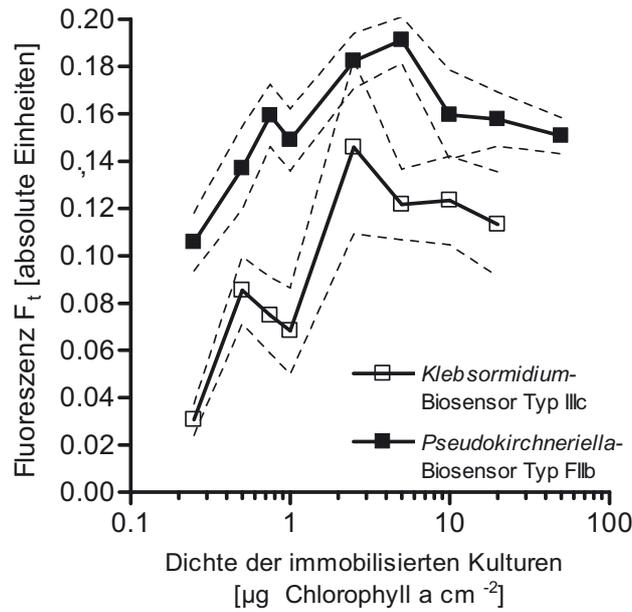


**Abbildung 15** Einfluß der Immobilisierungsdichte auf das Biosensorsignal von *Klebsormidium* M1939 in Form der prozentualen Hemmung von  $F_v/F_m$  gegenüber der Kontrolle nach 30-minütiger Formaldehydexposition bei einer Dampfkonzentration von 1 ppm. Hemmung  $F_v/F_m \pm$  Standardabweichung ( $n=9$ ), Temperatur 29 °C, Biosensor Typ IIIc.

zeigt eine Hemmung von  $F_v/F_m$  um 6,5 % verglichen mit der Kontrolle und führt daher nicht zu einem weiteren Abfallen des Biosensorsignals.

Mit Anstieg der Immobilisierungsdichte bis auf 2,5 µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup> erhöht sich auch das absolute Fluoreszenzsignal  $F_t$ , gemessen in schadstofffreier Luft. Bei höheren Chlorophyllkonzentrationen ist dagegen eine leichte, kontinuierliche Abnahme der absoluten Fluoreszenz zu verzeichnen (Abbildung 16).

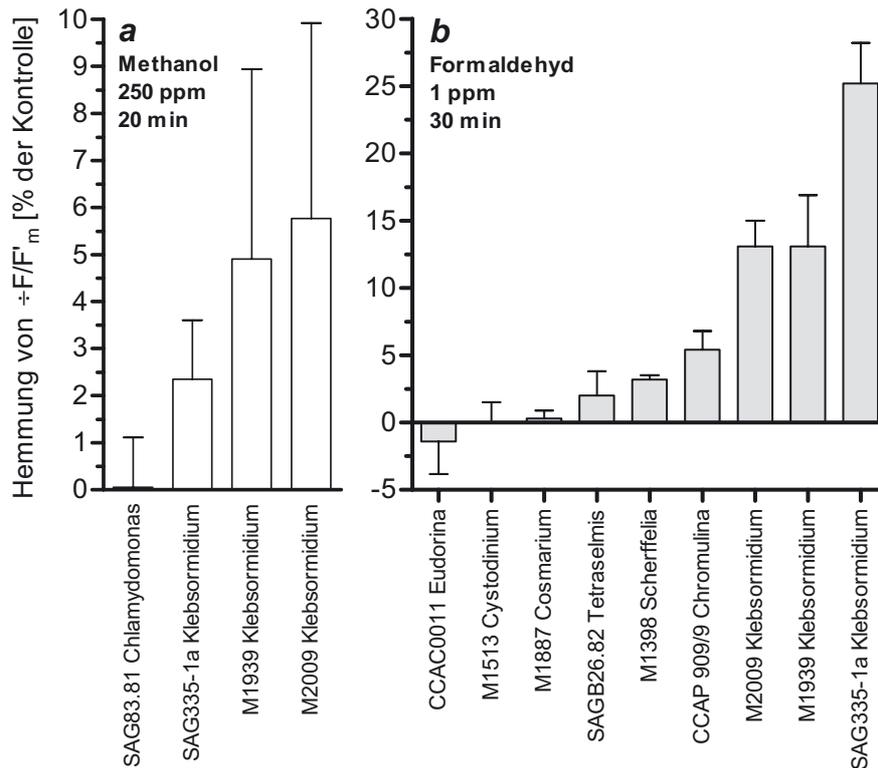
Die Dichte der Kulturen wird in Langzeitexperimenten durch das Wachstum der Organismen beeinflusst. Tabelle 7 zeigt den Einfluß der Kulturmedienzusammensetzung auf das Wachstum der immobilisierten Kulturen für *Klebsormidium* SAG335-1a und M1939. Generell kann die Wachstumsrate innerhalb eines Zeitraums von 2 - 10 Tagen nach Inokulation mit 2,5 µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup> durch die Verringerung der Nährstoffkonzentration des Kulturmediums herabgesetzt werden. Die Verdünnung von Waris-H um den Faktor 20 bzw. 50 resultiert für beide Algen in einer Stagnation des Wachstums. Begleitende Chlorophyllfluoreszenzmessungen zeigen jedoch nur für Stamm M1939 eine kontinuierlich stabile Effizienz des PSII.



**Abbildung 16** Absolutes Fluoreszenzsignal  $F_t \pm$  Standardabweichung (gestrichelte Linie,  $n=12$ ) von *Klebsormidium* sp. (M1939) und *Pseudokirchneriella subcapitata* in Abhängigkeit von der Immobilisierungsdichte von 0,25 - 50  $\mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$ . Die Experimente werden mit *Klebsormidium* unter Verwendung des Biosensors Typ IIIc bei 29 °C (für Luftschadstoffe) bzw. des Typs IIIc bei 21,5 °C (für wassergelöste Schadstoffe) mit *Pseudokirchneriella* durchgeführt.

**Tabelle 7** Einfluß des Kulturmediums auf die Wachstumsraten im linearen Bereich (2-10 d) von *Klebsormidium* ermittelt anhand der Chlorophyll a-Menge pro Fläche und physiologischer Zustand (+ stabile  $\div F/F'_m$  über den Versuchszeitraum von 10 d, -  $\div F/F'_m$  nicht stabil oder kontinuierlich abnehmend).

| Kulturmedium                          | SAG335-1a                                                                |                                         | M1939                                                                    |                                         |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                       | Wachstumsrate<br>2-10d<br>[ $\mu\text{g Chl a cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ] | kontinuierlich<br>stabile $\div F/F'_m$ | Wachstumsrate<br>2-10d<br>[ $\mu\text{g Chl a cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ] | kontinuierlich<br>stabile $\div F/F'_m$ |
| BBM                                   | 9,7                                                                      | +                                       | 3,8                                                                      | +                                       |
| Waris-H                               | 14,1                                                                     | +                                       | 11,6                                                                     | +                                       |
| Waris-H -Erde                         | 10,4                                                                     | +                                       | 10,5                                                                     | +                                       |
| Waris-H 10 % $\text{PO}_4^{3-}$ -Erde | 2,4                                                                      | +                                       | 3,6                                                                      | +                                       |
| Waris-H 1/5 -Erde                     | 0,5                                                                      | -                                       | 2,4                                                                      | +                                       |
| Waris-H 1/20 -Erde                    | -0,1                                                                     | -                                       | -0,2                                                                     | +                                       |
| Waris-H 1/50 -Erde                    | -0,2                                                                     | -                                       | 0,2                                                                      | +                                       |



**Abbildung 17** Sensitivitäten verschiedener Mikroalgen gegenüber VOC-Dämpfen: Prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m$  ( $\pm$  Standardabweichung) im Vergleich zur Kontrolle. (a) Methanolexposition für 20 min bei 250 ppm im Biosensor Typ IIIb ( $n=4$ ). (b) Formaldehydexposition von 1 ppm für 30 min im Biosensor Typ IIIc ( $n=3$ ). Alle Versuche werden mit einer Immobilisierungsdichte von  $5 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$  und bei einer Temperatur von  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.

### Auswahl VOC-sensitiver Algenstämme

Zur Auswahl sensibler Algenstämme zum quantitativen Nachweis von VOCs werden Expositionsexperimente mit Methanol (250 ppm) und Formaldehyd (1 ppm) durchgeführt. Für Methanol zeigen die *Klebsormidium*-Stämme eine Hemmung von  $+F/F'_m$  im Vergleich zur Kontrolle von 2,5 - 5,8 % (Abbildung 17a). Eine zellwandlose *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante wird dagegen von Methanoldämpfen nicht beeinflusst. In Formaldehydexpositionsexperimenten (Abbildung 17b) erweisen sich Stämme der Gattung *Klebsormidium* mit 13 - 25 % Hemmung  $+F/F'_m$  ebenfalls als am sensitivsten. Sechs andere Algen verschiedener Gruppen zeigen keine Hemmung von  $+F/F'_m$ , bzw. weisen mit Werten von  $\leq 5$  % ein eindeutig geringeres Biosensorsignal auf.

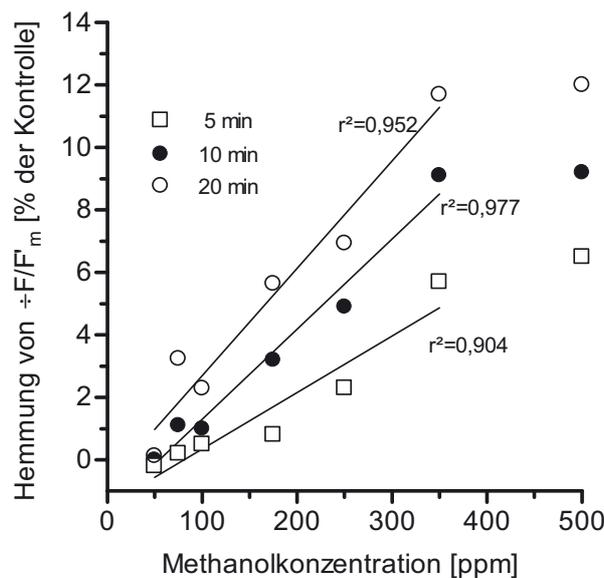
**III.2.2. Quantitative und selektive Detektion von Methanol und Formaldehyd**

**Quantitative Detektion**

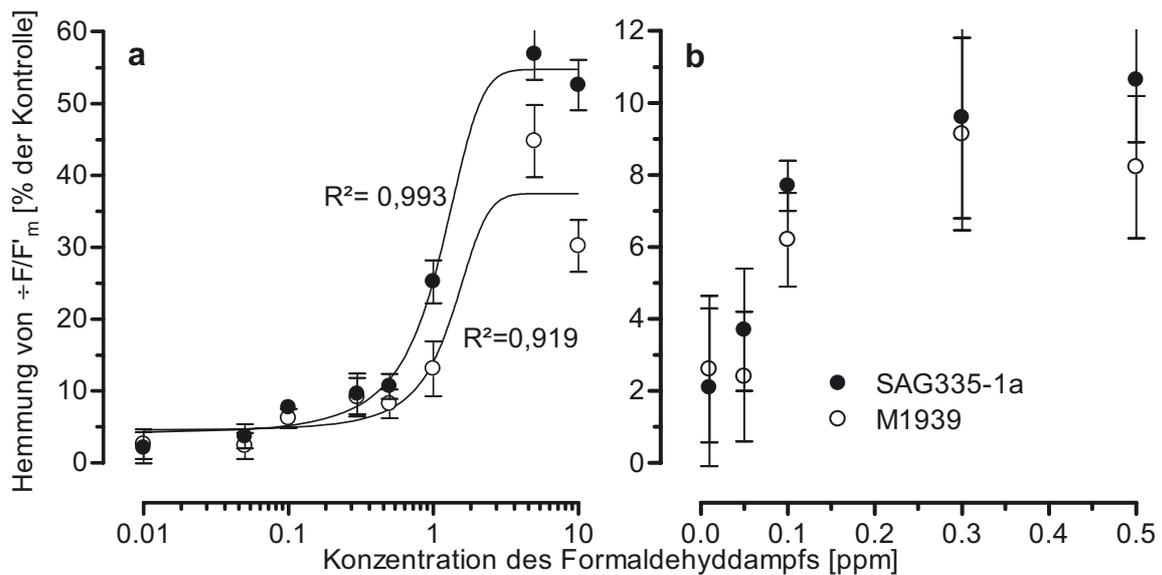
Zur Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Reaktionskinetiken der *Klebsormidium*-Biosensoren werden Expositionsexperimente mit Methanol- und Formaldehyddämpfen durchgeführt.

*Methanol*

Bei Methanolkonzentrationen von 50 - 350 ppm und Expositionszeiten von 5, 10 und 20 min kann ein Anstieg der Hemmung von  $\div F/F'_m$  im Vergleich zur Kontrolle mit ansteigender Methanolkonzentration beobachtet werden (Abbildung 18). Bei einer Expositionsdauer von 20 min ist eine signifikante Hemmung von  $\div F/F'_m$  von 3,2 % bereits bei einer Methanolkonzentration von 75 ppm feststellbar, die sich auf 12 % bei 350 ppm erhöht. Eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung ( $r^2 \times 0,9$ ) in diesem Konzentrationsbereich kann für alle Expositionszeiträume durch lineare Regression ermittelt werden. Bei Methanolkonzentrationen von 500 ppm steigt die Hemmung von  $\div F/F'_m$  gegenüber den bei 350 ppm gemessenen Biosensorsignalen signifikant nicht weiter an. Der Einsatz von Methanolkonzentrationen > 500 ppm zeigt eine Sättigung des Biosensorsignals in diesem Konzentrationsbereich (nicht gezeigte Daten). Neben der Konzentrationsabhängigkeit kann



**Abbildung 18** Mittlere prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $\div F/F'_m$  gegenüber der Kontrolle ( $n=6$ ) von *Klebsormidium*-Biosensoren (M1939) bei 20-minütiger Methanolexposition von 50-500 ppm und Expositionsdauer von 5, 10 und 20 min. Biosensor Typ IIIb, Temperatur 29 °C, Immobilisierungsdichte 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ . Die linearen Regressionen werden im Bereich von 50-350 ppm durchgeführt.

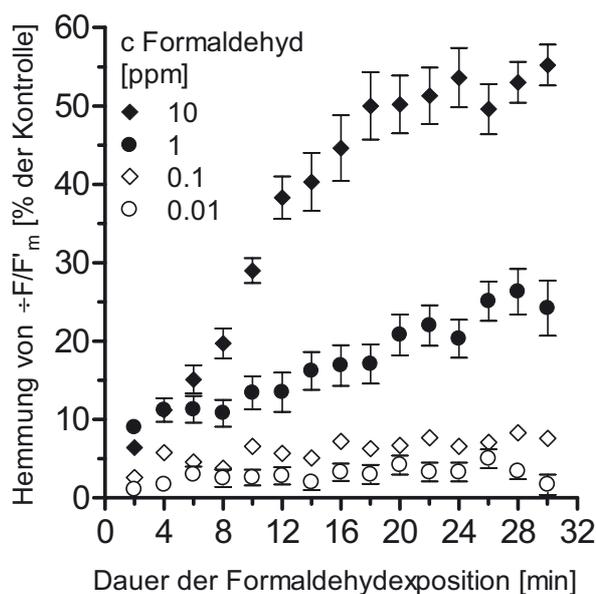


**Abbildung 19** Prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m$  gegenüber der Kontrolle bei 30-minütiger Formaldehydexposition von *Klebsormidium* (Stämme M1939 und SAG335-1a). (a) Dampfkonzentrationen von 0,01-10 ppm in logarithmischer Skalierung und nichtlineare Regression (sigmoidale Dosis-Wirkungs-Beziehung). (b) Konzentrationen von 0,01 bis 0,5 ppm in linearer Skalierung. Hemmung von  $+F/F'_m \pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ), Biosensor Typ IIIc, Temperatur 29 °C, Immobilisierungsdichte 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ .

die Abhängigkeit der Hemmung von  $+F/F'_m$  im Vergleich zur Kontrolle von der Expositionsdauer nachgewiesen werden. Eine verlängerte Expositionsdauer resultiert in der Erhöhung des gemessenen Biosensorsignals. (Abbildung 18).

### Formaldehyd

Für Expositionsexperimente mit Formaldehyddämpfen werden Biosensormembranen (ASC) mit den *Klebsormidium*-Stämmen SAG335-1a und M1939 mit einer Immobilisierungsdichte von 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$  vorbereitet. Das Biosensorsignal in Form der Hemmung von  $+F/F'_m$  gegenüber der Kontrolle wird über 30 min gemessen und ist abhängig von der verwendeten Formaldehydkonzentration (Abbildung 19). Im Bereich von Formaldehydkonzentrationen von 10 ppb bis 10 ppm folgt die Hemmung von  $+F/F'_m$  mit  $R^2 > 0,9$  dem Modell der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abbildung 19a). Ein maximales Biosensorsignal wird bei Konzentrationen von  $\times 5$  ppm mit ca. 55 % Hemmung von  $+F/F'_m$  für Stamm SAG335-1a und 35 % für Stamm M1939 erreicht. Die  $EC_{50}$  werden mit 1,06 ppm für Stamm SAG335-1a und 1,33 für Stamm M1939 berechnet. Die niedrigste applizierte Formaldehydkonzentration von 10 ppb induziert eine Hemmung von  $+F/F'_m$  von 2,1 % (SAG335-1a) bzw. 2,6 % (M1939) (Abbildung 19b), die sich für beide Stämme signifikant ( $p < 0,01$ ) von der Kontrolle unterscheidet.

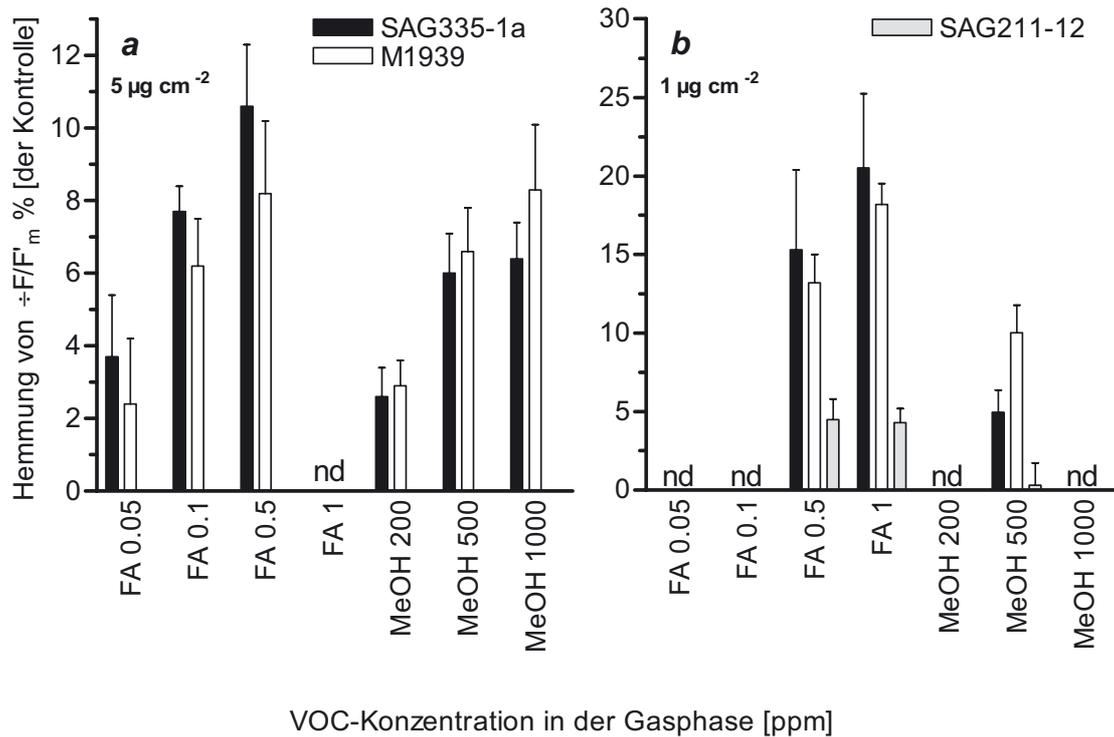


**Abbildung 20** Einfluß der Expositionsdauer der Formaldehydexposition von 2-30 min auf das Biosensorsignal von *Klebsormidium* (SAG335-1a) als prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m$  gegenüber der Kontrolle bei verschiedenen Dampfkonzentrationen. Hemmung von  $+F/F'_m \pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ), Biosensor Typ IIIc, Temperatur 29 °C, Immobilisierungsdichte 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ .

Abbildung 20 zeigt die Abhängigkeit der Hemmung von  $+F/F'_m$  von der Expositionsdauer von 2 - 30 min während Formaldehydexposition bei verschiedenen Konzentrationen. Nach 2 min Expositionsdauer ist ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle für alle Formaldehydkonzentrationen von 0,01 - 10 ppm zu erkennen. Bei hohen Formaldehydkonzentrationen von 1 und 10 ppm hat die Verlängerung der Expositionszeit einen deutlichen Anstieg der Hemmung von  $+F/F'_m$  zur Folge. Verglichen mit den ersten 20 min der Exposition ist der Anstieg innerhalb der letzten 10 min weniger stark und erreicht annäherungsweise eine Sättigung. Für Formaldehydkonzentrationen von 0,1 und 0,01 ppm ist nach den ersten 10 min nach Expositionsbeginn dagegen kein erkennbarer Anstieg des Biosensorsignals zu verzeichnen. Für alle applizierten Formaldehydkonzentrationen konnte eine Reversibilität des Biosensorsignals beobachtet werden.

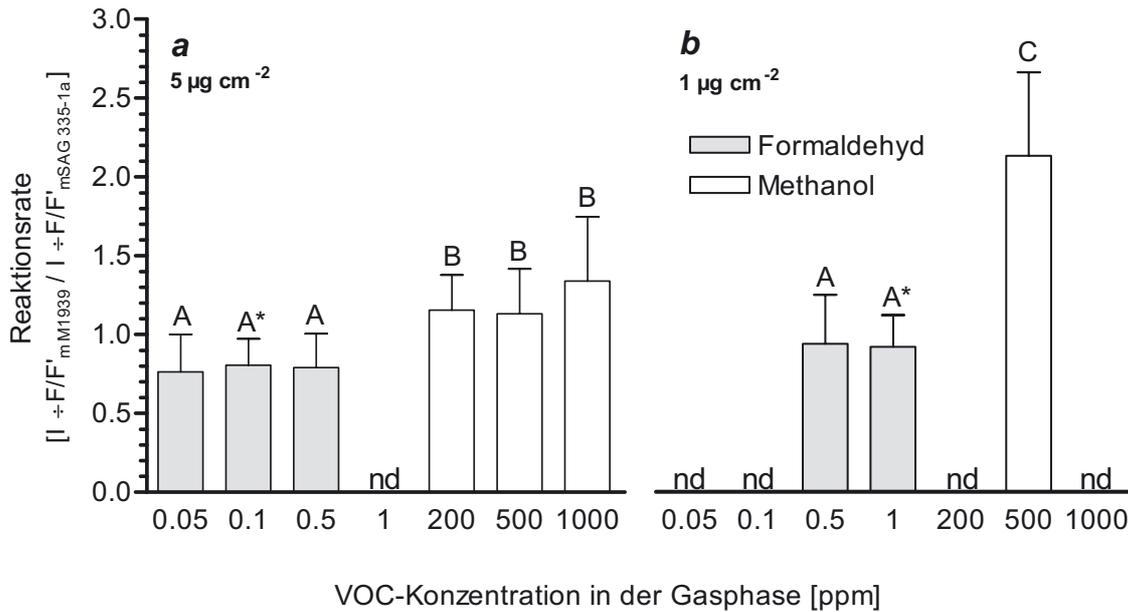
### ***ASC-gestützte Identifizierung mittels der VOC-spezifischen Reaktionsrate***

Der simultane Einsatz verschiedener Mikroalgenstämmen in einem Biosensorsystem wird mit Hilfe des Algen-Sensor-Chip (ASC) in Expositionsexperimenten unter Verwendung von Formaldehyd- und Methanoldämpfen realisiert.



**Abbildung 21** Prozentuale Hemmung der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports  $+F/F'_m$  gegenüber der Kontrolle bei 30-minütiger Formaldehyd- (FA) oder Methanolexposition (MeOH) von *Klebsormidium* (Stämme M1939 und SAG335-1a) und *Chlorella vulgaris* (Stamm SAG211-12) bei verschiedenen Dampfkonzentrationen. Die Immobilisierungsdichte beträgt (a)  $5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  ( $n=6$ ) und (b)  $1 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  ( $n=4$ ). *Chlorella* wird ausschließlich in den Experimenten bei einer Immobilisierungsdichte von  $1 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  verwendet. Für einige VOC-Konzentrationen werden keine Daten erhoben (nd). Hemmung von  $+F/F'_m \pm$  Standardabweichung, Biosensor Typ IIIc, Temperatur  $29^\circ\text{C}$ .

Zwei *Klebsormidium*-Stämme (SAG335-1a und M1939) werden dazu mit einer Dichte von  $5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  immobilisiert. Weitere Biosensormembranen werden mit den *Klebsormidium*-Stämmen und zusätzlich einem Stamm von *Chlorella vulgaris* (SAG211-12) bei einer Immobilisierungsdichte von  $1 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  hergestellt. Wiederum ist eine Konzentrationsabhängigkeit des Biosensorsignals in Form der Hemmung von  $+F/F'_m$  der *Klebsormidium*-Stämme nach 30-minütiger Exposition sowohl für Formaldehyd als auch für Methanol bei jeweils verschiedenen Konzentrationen feststellbar (Abbildung 21). Ein höheres Biosensorsignal von *Klebsormidium* kann bei der niedrigeren Zelldichte beobachtet werden. Die Hemmung von  $+F/F'_m$  von *Chlorella* bei einer Immobilisierungsdichte von  $1 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  ist 5 % bei Formaldehydkonzentrationen von 0,5 und 1 ppm und somit signifikant niedriger verglichen mit der Reaktion der *Klebsormidium*-Stämme (Abbildung 21b). Bei Methanolkonzentrationen von 500 ppm kann dagegen keine Reaktion von *Chlorella* gemessen werden.



**Abbildung 22** Reaktionsraten (Hemmung  $+F/F'_m$  M1939 / Hemmung  $+F/F'_m$  SAG335-1a) werden anhand von Expositionsexperimenten mit *Klebsormidium* von 30 min Dauer mit Methanol oder Formaldehyd bei verschiedenen Dampfkonzentrationen berechnet. Die Kulturen werden mit einer Dichte von (a) 5 µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup> (n=6) und (b) 1 µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup> (n=4) immobilisiert. Zwischen mit denselben Großbuchstaben (A oder B) markierten Reaktionsraten können keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden - mit Ausnahme der mit \* gekennzeichneten Datensätze, die sich signifikant unterscheiden (p<0,05). Außerdem können signifikante Unterschiede zwischen den mit unterschiedlichen Großbuchstaben gekennzeichneten Reaktionsraten beobachtet werden. Für einige VOC-Konzentrationen werden keine Daten erhoben (nd). Reaktionsraten ± Standardabweichung, Biosensor Typ IIIc, Temperatur 29 °C.

Unabhängig von der VOC-Dampfkonzentration und Immobilisierungsdichte reagiert *Klebsormidium* SAG335-1a verglichen mit M1939 sensitiver auf Formaldehyd und vergleichsweise weniger sensitiv auf Methanol (Abbildung 21). Die Beziehung zwischen den Reaktionen der beiden *Klebsormidium*-Stämme auf VOC-Exposition wird durch die in Abbildung 22 dargestellten Reaktionsraten beschrieben. Bei Formaldehydexposition der Kulturen bei einer Immobilisierungsdichte von 5 µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup> ergibt sich eine Reaktionsrate von ca. 0,8. Für Methanolexposition unter denselben Bedingungen errechnet sich eine Reaktionsrate von über 1,1. Bei einer Immobilisierungsdichte von 1 µg Chlorophyll a cm<sup>-2</sup> sind die Reaktionsraten ca. 0,9 für Formaldehyd und 2,1 für Methanol. Die Reaktionsraten unterscheiden sich für die jeweilige Immobilisierungsdichte signifikant (p<0,01) zwischen Formaldehyd- und Methanolexpositionsexperimenten. Dagegen können unter Berücksichtigung der jeweiligen Immobilisierungsdichte sowohl für Methanol als auch für Formaldehyd keine signifikanten Unterschiede der Reaktionsraten zwischen den verschiedenen applizierten VOC-Konzentrationen ermittelt werden.

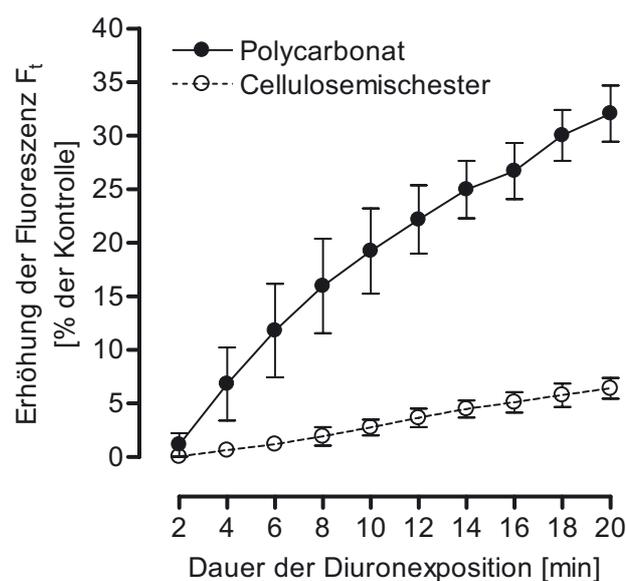
### III.3. Analytik von wassergelösten Herbiziden mittels des Algen Sensor Chips

Basierend auf den zuvor beschriebenen Biosensorsystemen für Luftschadstoffe wird durch einige technische Modifikationen ein Biosensor für die Messung von wassergelösten Herbiziden konstruiert. Die Eignung dieses Biosensors zur Messung verschiedener Herbizide wird anhand von Expositionsexperimenten mit diversen Mikroalgenstämmen demonstriert. Mittels der so erhobenen Daten wird anschließend die bereits vorgestellte Methodik zur Schadstoffidentifizierung auf die eingesetzten Herbizide angewandt.

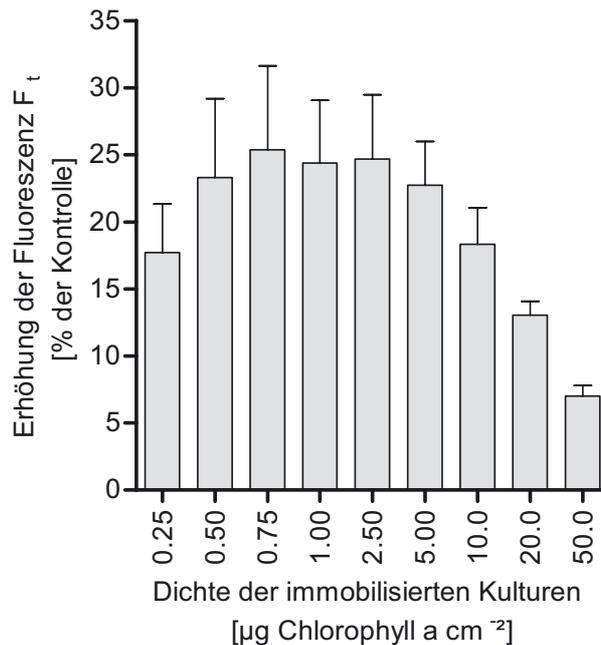
#### III.3.1. Membranmaterial und Immobilisierung

Das Membranmaterial als Basis des ASC stellt im Biosensor des Typs FIIB konstruktionsbedingt die Schnittstelle zwischen den wassergelösten, zu detektierenden Substanzen und den immobilisierten Sensororganismen dar.

Um den Effekt des Membranmaterials auf das Biosensorsignal zu untersuchen, wird *Chlorella vulgaris* Stamm SAG211-12 mit einer Immobilisierungsdichte von  $1 \mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$  auf Cellulosemischester- (Porengröße  $1,2 \mu\text{m}$ ) und Polycarbonatmembranen (Porengröße  $2,0 \mu\text{m}$ ) immobilisiert. Expositionsexperimente mit  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  Diuron werden für 20 min durchgeführt. Das Biosensorsignal als die Erhöhung von  $F_t$  im Vergleich zur Kontrolle ist unter der Verwendung beider Materialien von der



**Abbildung 23** Biosensorsignal von *Chlorella vulgaris* (SAG211-12) in Form des prozentualen Anstiegs von  $F_t$  gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von dem verwendeten Membranmaterial und der Expositionsdauer bei Exposition mit  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  Diuron für 20 min. Anstieg  $F_t \pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ), Biosensor Typ FIIB, Temperatur  $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , Immobilisierungsdichte  $1 \mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ .



**Abbildung 24** Prozentualer Anstieg von  $F_t$  von *Pseudokirchneriella subcapitata* gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der Immobilisierungsdichte bei Exposition mit  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  Diuron für 20 min. Anstieg  $F_t \pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ). Biosensor Typ FIIIb, Temperatur  $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Expositionszeit abhängig (Abbildung 23). Ein Anstieg von  $F_t$  um 32 % ist nach 20-minütiger Exposition für die Polycarbonatmembranen gegenüber nur 6 % bei dem Einsatz von Cellulosemischestermembranen zu beobachten. Schon eine Expositionsdauer von 4 min führt bei der Verwendung von Polycarbonat zu einem signifikant höheren Biosensorsignal verglichen mit Cellulosemischester. Diese Ergebnisse werden durch identische Experimente mit *Haematococcus pluvialis* und *Pseudokirchneriella subcapitata* bestätigt.

Der Einfluß der Porengröße von Polycarbonatmembranen auf das Biosensorsignal wird in weiteren Expositionsexperimenten des gleichen Ansatzes untersucht. Zwischen den Porengrößen 0,4 und 2,0  $\mu\text{m}$  zeigen sich für sechs Algenstämme bei Diuronexposition keine signifikanten Unterschiede im Anstieg von  $F_t$ .

Die Immobilisierungsdichte der Kulturen beeinflusst auch bei Verwendung von wassergelösten Schadstoffen die Sensitivität des Biosensors. Der Anstieg von  $F_t$  von *Pseudokirchneriella subcapitata* bei Diuronexposition von  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  in Abhängigkeit von der Immobilisierungsdichte ist in Abbildung 24 dargestellt. Ein maximales Biosensorsignal von 22 - 25 % Anstieg von  $F_t$  im Vergleich zur Kontrolle wird bei Immobilisierungsdichten zwischen 0,5 und 5  $\mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  erreicht. Begleitend

zur ansteigenden Algendichte von 5 auf 50  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$  ist eine kontinuierliche Abnahme des herbizidinduzierten Anstiegs von  $F_t$  bis auf 7 % feststellbar.

Betrachtet man die Abhängigkeit des absoluten Fluoreszenzsignals von der Immobilisierungsdichte von *Pseudokirchneriella subcapitata* in schadstofffreiem Kulturmedium (Abbildung 16), so zeigt sich ein Anstieg der absoluten Fluoreszenz  $F_t$  bis zu einer Dichte von 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ . Eine leichte kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzsignals ist oberhalb dieser Konzentration zu beobachten.

**Tabelle 8** Übersicht über die Sensitivität verschiedener Algenstämme gegenüber Atrazin, Simazin und Diuron. Die fett hervorgehobenen neun Stämme werden für weitere Experimente mit dem Algen-Sensor-Chip für Herbizide ausgewählt. Stämme mit kursiv hervorgehobenen Werten zeigen auf Grund der schlechten Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmessungen keine Eignung zur weiteren Verwendung.

|                                               | n        | Biosensorsignal: Hemmung von $\pm F/F'_m$ [% der Kontrolle] bei 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ Herbizid für 20 min |                                  |                                   |
|-----------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
|                                               |          | Atrazin                                                                                                     | Simazin                          | Diuron                            |
| <i>Carteria</i> sp.                           | 9        | -                                                                                                           | -                                | 16,9 $\pm$ 4,1                    |
| <i>Chlamydomonas</i> cw-15+                   | 12       | 23,3 $\pm$ 20,4                                                                                             | 3,4 $\pm$ 27,7                   | -12,1 $\pm$ 92,0                  |
| <b><i>Chlamydomonas</i> sp. M1977</b>         | <b>6</b> | <b>8,2 <math>\pm</math> 7,1</b>                                                                             | <b>2,9 <math>\pm</math> 1,1</b>  | <b>27,2 <math>\pm</math> 2,3</b>  |
| <i>Chlamydomonas</i> sp. M1982                | 9        | -                                                                                                           | -                                | 23,8 $\pm$ 5,1                    |
| <b><i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-11b</b>   | <b>6</b> | <b>3,5 <math>\pm</math> 1,1</b>                                                                             | <b>2,8 <math>\pm</math> 0,7</b>  | <b>12,9 <math>\pm</math> 1,4</b>  |
| <i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-12           | 6        | 4,7 $\pm$ 2,1                                                                                               | 2,4 $\pm$ 0,5                    | 12,1 $\pm$ 2,6                    |
| <i>Chromulina chionophila</i>                 | 6        | 12,5 $\pm$ 3,2                                                                                              | 7,0 $\pm$ 3,4                    | 70,5 $\pm$ 21,1                   |
| <i>Cosmarium elegantissimum</i>               | 6        | 4,4 $\pm$ 6,1                                                                                               | 1,7 $\pm$ 2,7                    | 38,8 $\pm$ 3,5                    |
| <b><i>Cryptomonas curvata</i>.</b>            | <b>6</b> | <b>6,6 <math>\pm</math> 5,3</b>                                                                             | <b>3,7 <math>\pm</math> 2,5</b>  | <b>36,7 <math>\pm</math> 8,3</b>  |
| <i>Cystodinium</i> sp..                       | 6        | 5,9 $\pm$ 4,5                                                                                               | 2,5 $\pm$ 1,6                    | 38,8 $\pm$ 15,7                   |
| <i>Desmodesmus subspicatus</i>                | 6        | 3,8 $\pm$ 1,8                                                                                               | 2,1 $\pm$ 0,9                    | 11,8 $\pm$ 2,1                    |
| <i>Dunaliella lateralis</i>                   | 12       | 16,8 $\pm$ 8,8                                                                                              | 9,0 $\pm$ 1,0                    | -89,1 $\pm$ 295                   |
| <b><i>Eudorina elegans</i></b>                | <b>6</b> | <b>11,5 <math>\pm</math> 5,1</b>                                                                            | <b>3,4 <math>\pm</math> 3,0</b>  | <b>28,8 <math>\pm</math> 6,5</b>  |
| <i>Euglena archaeoplastidiata</i>             | 6        | 7,4 $\pm$ 5,2                                                                                               | 6,5 $\pm$ 2,5                    | 64,3 $\pm$ 21,5                   |
| <i>Euglena gracilis</i>                       | 6        | 10,7 $\pm$ 2,9                                                                                              | 10,9 $\pm$ 3,6                   | 73,3 $\pm$ 9,5                    |
| <i>Haematococcus pluvialis</i>                | 6        | 6,9 $\pm$ 4,0                                                                                               | 5,0 $\pm$ 2,2                    | 21,1 $\pm$ 2,5                    |
| <i>Klebsormidium nitens</i>                   | 8        | -                                                                                                           | -                                | 3,1 $\pm$ 1,6                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M1939                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 4,0 $\pm$ 1,8                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M1940                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 1,1 $\pm$ 3,7                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M1941                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 0,9 $\pm$ 5,1                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M2007                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 4,9 $\pm$ 1,7                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M2008                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 4,0 $\pm$ 1,8                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M2009                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 2,2 $\pm$ 3,6                     |
| <i>Klebsormidium</i> sp. M2068                | 8        | -                                                                                                           | -                                | 3,2 $\pm$ 2,8                     |
| <i>Klebsormidium subtile</i> M1895            | 8        | -                                                                                                           | -                                | 2,4 $\pm$ 1,3                     |
| <i>Lyngbya halophila</i>                      | 6        | 8,4 $\pm$ 5,6                                                                                               | 7,1 $\pm$ 6,2                    | 49,7 $\pm$ 13,1                   |
| <i>Nostoc muscorum</i>                        | 6        | 12,3 $\pm$ 4,1                                                                                              | 11,1 $\pm$ 2,6                   | 50,9 $\pm$ 26,9                   |
| <b><i>Pseudokirchneriella subcapitata</i></b> | <b>6</b> | <b>4,5 <math>\pm</math> 1,7</b>                                                                             | <b>3,6 <math>\pm</math> 1,9</b>  | <b>26,4 <math>\pm</math> 4,4</b>  |
| <i>Scenedesmus rubescens</i>                  | 6        | 3,2 $\pm$ 1,5                                                                                               | 3,1 $\pm$ 1,1                    | 13,4 $\pm$ 3,5                    |
| <b><i>Scherffelia dubia</i></b>               | <b>6</b> | <b>10,4 <math>\pm</math> 1,6</b>                                                                            | <b>5,2 <math>\pm</math> 1,6</b>  | <b>61,4 <math>\pm</math> 5,0</b>  |
| <b><i>Staurodesmus convergens</i></b>         | <b>6</b> | <b>9,9 <math>\pm</math> 1,9</b>                                                                             | <b>6,0 <math>\pm</math> 3,3</b>  | <b>83,3 <math>\pm</math> 7,9</b>  |
| <b><i>Synechocystis</i> sp.</b>               | <b>6</b> | <b>10,8 <math>\pm</math> 4,6</b>                                                                            | <b>6,3 <math>\pm</math> 4,0</b>  | <b>62,3 <math>\pm</math> 10,0</b> |
| <b><i>Tetraselmis cordiformis</i></b>         | <b>6</b> | <b>12,3 <math>\pm</math> 3,9</b>                                                                            | <b>10,6 <math>\pm</math> 2,5</b> | <b>79,2 <math>\pm</math> 15,5</b> |

### III.3.2. Detektion von wassergelösten Herbiziden

#### *Auswahl geeigneter Mikroalgenstämme*

Zur Auswahl geeigneter herbizidsensitiver Stämme werden Screeningexperimente mit den Herbiziden Atrazin, Simazin und Diuron durchgeführt. 33 Stämme werden in 20-minütigen Expositionsexperimenten eingesetzt. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Biosensorsignale in Form der Hemmung der effektiven Quantenausbeute des Elektronentransports  $\div F/F'_m$  im Vergleich zur Kontrolle. Für die parallele Verwendung in einem ASC werden neun Stämme unter Berücksichtigung von Herbizidsensitivität, Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmessungen und ihrer Herkunft aus möglichst unterschiedlichen Algengruppen für die Verwendung in weiteren Expositionsexperimenten ausgewählt (siehe Tabelle 8). Bemerkenswert erscheint, daß sich im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Expositionsexperimenten mit Luftschadstoffen die neun getesteten Stämme der Gattung *Klebsormidium* gegenüber allen andern Mikroalgen als am wenigsten herbizidsensitiv erweisen.

#### *Methoden der Auswertung des Biosensorsignals*

In Expositionsexperimenten von 20 min werden die zuvor ausgewählten neun Mikroalgenstämme (Tabelle 8) im ASC-Biosensor in Verbindung mit fünf verschiedenen Herbiziden verwendet. Als Signal des Biosensors wird der Anstieg der Fluoreszenz  $F_t$  bzw.

**Tabelle 9** Anzahl der jeweils niedrigeren signifikanten Nachweisgrenzen im Vergleich der gleichen Algenstämme (von insgesamt neun) bei Berücksichtigung von (a) der Fluoreszenzparameter  $F_t$  und  $\div F/F'_m$  bei zeitlich terminaler Auswertung nach 20 min; (b) der Fluoreszenzparameter  $F_t$  und  $\div F/F'_m$  bei zeitlich integrierter Auswertung; (c) der Auswertungsmethodik zeitlich terminal und zeitlich integriert unter Verwendung von  $F_t$ .

|               | (a) niedrigere Nachweisgrenzen bei zeitlich terminaler Auswertung nach 20 min für: |               | (b) niedrigere Nachweisgrenzen bei zeitlich integrierter Auswertung für: |               | (c) $F_t$                                                                 |                                                                 |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|               | $F_t$                                                                              | $\div F/F'_m$ | $F_t$                                                                    | $\div F/F'_m$ | niedrigere Nachweisgrenzen bei zeitlich terminaler Auswertung nach 20 min | niedrigere Nachweisgrenzen bei zeitlich integrierter Auswertung |
| Atrazin       | 2                                                                                  | 5             | 1                                                                        | 2             | 2                                                                         | 0                                                               |
| Diuron        | 3                                                                                  | 0             | 3                                                                        | 1             | 0                                                                         | 0                                                               |
| Isoproturon   | 5                                                                                  | 2             | 5                                                                        | 0             | 2                                                                         | 2                                                               |
| Paraquat      | 1                                                                                  | 0             | 4                                                                        | 1             | 2                                                                         | 1                                                               |
| Simazin       | 2                                                                                  | 2             | 3                                                                        | 1             | 3                                                                         | 0                                                               |
| <b>gesamt</b> | <b>13</b>                                                                          | <b>9</b>      | <b>16</b>                                                                | <b>5</b>      | <b>9</b>                                                                  | <b>3</b>                                                        |

**Tabelle 10** Übersicht über die erzielten geringsten Nachweisgrenzen und  $EC_{50}$  unter Berücksichtigung der verschiedenen Fluoreszenzparameter und Auswertungsmethoden für fünf Herbizide. Angaben zu den jeweils sensitivsten Organismen im Anhang Tabelle 14 - Tabelle 17.

|             | Nachweisgrenze [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] |            |               |            | $EC_{50}$ [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] |            |               |            |
|-------------|-----------------------------------------|------------|---------------|------------|------------------------------------|------------|---------------|------------|
|             | $F_t$                                   |            | $\div F/F'_m$ |            | $F_t$                              |            | $\div F/F'_m$ |            |
|             | 20 min                                  | integriert | 20 min        | integriert | 20 min                             | integriert | 20 min        | integriert |
| Atrazin     | 2                                       | 2          | 1             | 1          | 34,3                               | 40,0       | 47,5          | 55,5       |
| Diuron      | 0,5                                     | 0,5        | 0,5           | 0,1        | 3,0                                | 5,0        | 4,3           | 7,2        |
| Isoproturon | 0,5                                     | 0,5        | 0,5           | 0,5        | 12,3                               | 16,6       | 18,0          | 24,7       |
| Paraquat    | 10                                      | 10         | -             | 5          | 19,6                               | 27,3       | -             | 8,2        |
| Simazin     | 2                                       | 1          | 2             | 2          | 57,8                               | 75,0       | 70,4          | 85,7       |

die Hemmung von  $\div F/F'_m$  gegenüber einer jeweiligen Kontrolle herangezogen. Diese Biosensorsignale werden im Hinblick auf die Nachweisgrenzen unter Berücksichtigung von zum einen des zeitlich terminalen Meßwerts nach 20 min und zum anderen des Integrals über die gesamte Zeit der Exposition von 20 min ausgewertet. Eine vollständige Übersicht über alle während dieser Expositionsexperimente erhobenen Daten wird im Anhang gegeben (Tabelle 14, S.102 - Tabelle 17, S.105). Tabelle 9 zeigt die Anzahl der jeweils niedrigsten erreichten Nachweisgrenzen für die verschiedenen Ansätze der Auswertung des Biosensorsignals, ermittelt durch den Vergleich der Nachweisgrenzen des gleichen Algenstamms zwischen jeweils zwei Auswertungsmethoden oder zwei Fluoreszenzparametern. Unter Beachtung der Fluoreszenzparameter zeigen sich für beide Auswertungsmethoden eine höhere Anzahl niedrigerer Nachweisgrenzen für  $F_t$  (Tabelle 9a/b). Für die Fluoreszenz  $F_t$  können im Folgenden eine deutlich höhere Anzahl niedrigere Nachweisgrenzen unter Verwendung der zeitlich terminalen Auswertung nach 20 min erreicht werden (Tabelle 9c). Weitere Auswertungen der Herbizidexpositionsexperimente werden somit unter der Verwendung von  $F_t$  bei zeitlich terminaler Auswertung vorgenommen.

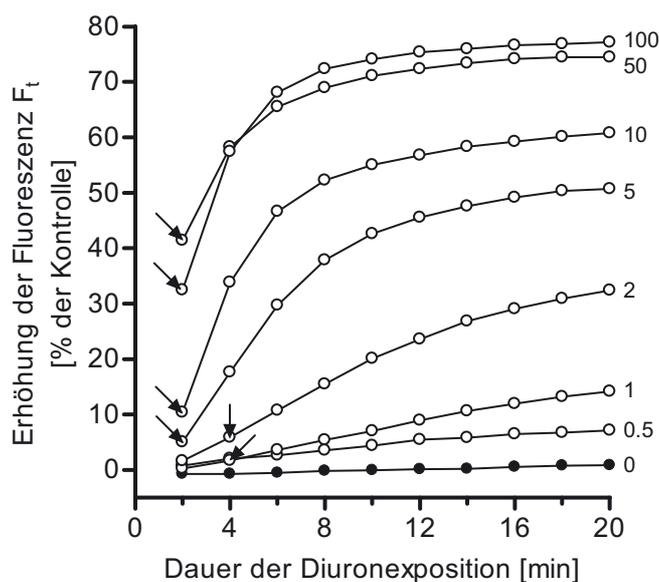
Tabelle 10 zeigt die jeweils niedrigsten erreichten Nachweisgrenzen und  $EC_{50}$  der jeweils sensitivsten der neun Mikroalgen für die verwendeten Fluoreszenzparameter und Auswertungsmethoden. Unter Berücksichtigung der  $EC_{50}$  kann eine generell höhere Sensitivität des Biosensors durch die Verwendung von  $F_t$  erreicht werden. Für  $F_t$  und  $\div F/F'_m$  erwies sich das zeitlich terminale Auswertungsverfahren als sensitiver. Für die Nachweisgrenzen werden nur geringe Unterschiede zwischen den Fluoreszenzparametern und Auswertungsverfahren festgestellt, wobei hier die Anwendung der integrierten

Auswertung, besonders unter Verwendung von  $\pm F/F'_m$ , in einigen Fällen eine Erhöhung der Nachweisgrenze ermöglicht.

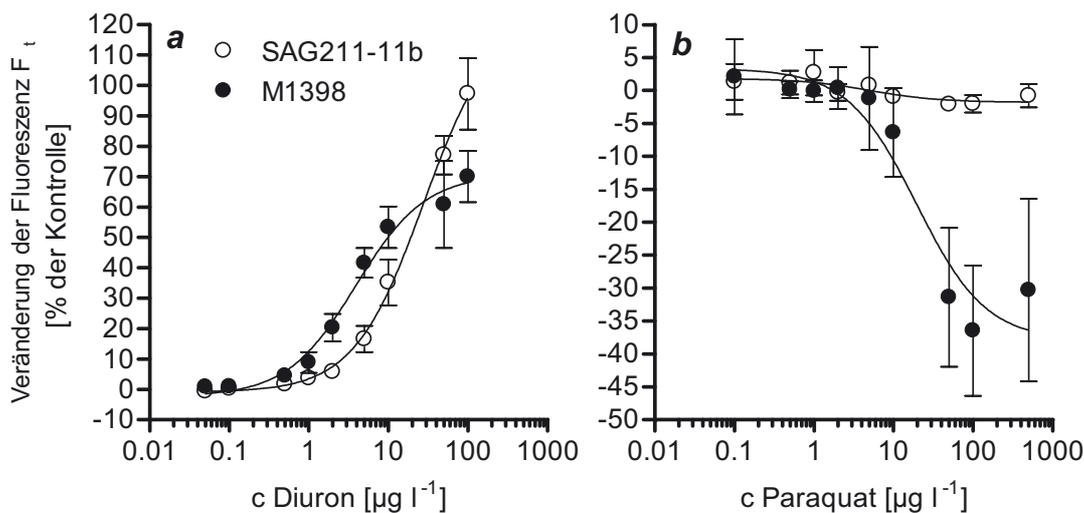
**Charakterisierung des ASC Biosensors für Herbizide unter der Verwendung von verschiedenen Mikroalgenstämmen**

Die Kinetik des diuroninduzierten Biosensorsignals über einen Zeitraum von 20 min und einer Herbizidkonzentration von 0,5 - 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  ist beispielhaft in Abbildung 25 dargestellt. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg von  $F_t$  von *Tetraselmis cordiformis* kann beobachtet werden. Der Anstieg von  $F_t$  gegenüber der Kontrolle erreicht bei Diuronkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  mit 70 % ein Maximum. Die niedrigste applizierte Diuronkonzentration (0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) induziert einen  $F_t$ -Anstieg von 7 % im Vergleich zur Kontrolle. Neben der Konzentrationsabhängigkeit ist im zeitlichen Verlauf der Exposition ein Anstieg von  $F_t$  festzustellen. Innerhalb von 20 min stellt sich bei niedrigen Diuronkonzentrationen keine Sättigung des Biosensorsignals ein. Eine Sättigung ist im Bereich von 5 - 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  Diuron festzustellen. Die minimal benötigte Zeit zur signifikanten ( $p < 0,05$ ) Detektion von Diuron ist 4 min bei Konzentrationen von 0,4 - 2,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  und 02 min bei Konzentrationen von  $\times 2 \mu\text{g l}^{-1}$ .

Unter Verwendung des Algen Sensor Chips wird der Effekt von Atrazin, Simazin, Diuron, Isoproturon und Paraquat in Konzentrationen von 0,05 bis 500  $\mu\text{g l}^{-1}$  auf die Chlorophyllfluoreszenz von neun verschiedenen Mikroalgenstämmen in 20-minütigen



**Abbildung 25** Biosensorsignal von *Tetraselmis cordiformis* als prozentualer Anstieg von  $F_t$  gegenüber der Kontrolle bei Diuronkonzentrationen von 0,5 bis 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  über einen Zeitraum von 20 min. Die zeitlich ersten signifikanten Unterschiede zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ) sind durch Pfeile markiert. Anstieg  $F_t$  ( $n=6$ ), Biosensor Typ FIIb, Temperatur 21,5 °C, Immobilisierungsdichte 1  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$ .



**Abbildung 26** Veränderungen von  $F_t$  im Vergleich zur Kontrolle [%] von *Chlorella vulgaris* (SAG211-11b) und *Scherffelia dubia* bei Diuron- und Paraquatexposition von 20 min im Bereich von 0,5-500  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Die nichtlineare Regression (Linie) wird nach dem Modell der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung durchgeführt. Veränderung  $F_t \pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ), Biosensor Typ FIIIb, Temperatur 21,5 °C, Immobilisierungsdichte 1  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$

Expositionsexperimenten getestet (gesamte Datensätze siehe Anhang S.102-105: Tabelle 14 - Tabelle 17). Abbildung 26 zeigt die Veränderungen der Fluoreszenz  $F_t$  von *Chlorella vulgaris* SAG211-11b und *Scherffelia dubia* bei Exposition gegenüber Diuron und Paraquat in verschiedenen Konzentrationen. Diuronexposition induziert bei beiden Algen einen Anstieg von  $F_t$ . *Scherffelia dubia* erweist sich im Vergleich mit *Chlorella vulgaris* als sensitiver gegenüber niedrigen Diuronkonzentrationen, erreicht aber einen niedrigeren maximalen Anstieg von  $F_t$  bei hohen Konzentrationen (Abbildung 26a). Paraquatexposition führt bei *Scherffelia dubia* zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme von  $F_t$ . Die Fluoreszenz  $F_t$  von *Chlorella vulgaris* wird dagegen selbst bei hohen Paraquatkonzentrationen nicht beeinflusst (Abbildung 26b).

**Tabelle 11** Sensitivitäten und Dosis-Wirkungs-Beziehungen neun verschiedener Mikroalgen auf fünf Herbizide, berechnet auf der Basis der Veränderung der Fluoreszenz  $F_t$  gegenüber der Kontrolle nach 20-minütigen Expositionsexperimenten.

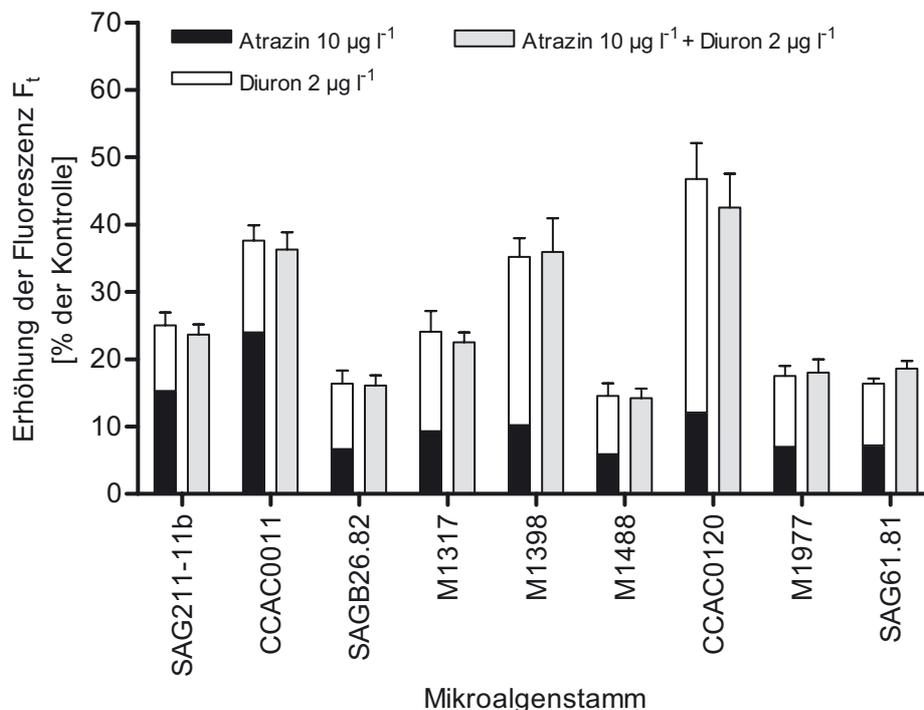
|             | Mikroalgenstamm                        | berechnete Sättigung des Anstiegs von $F_t$ (% der Kontrolle) | $R^2$ sigmoidale Dosis-Wirkung | $EC_{50}$ (95 % CI) $\mu\text{g l}^{-1}$ | NOEC $\mu\text{g l}^{-1}$ | LOEC $\mu\text{g l}^{-1}$ | linearer Bereich ( $r^2 > 0,97$ ) $\mu\text{g l}^{-1}$ |
|-------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| Atrazin     | <i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-11b   | 111,4                                                         | 0,9969                         | 63,0 (48,8 - 81,3)                       | 1,0                       | 2,0                       | 1-50                                                   |
|             | <i>Eudorina elegans</i>                | 89,1                                                          | 0,9983                         | 38,9 (31,8 - 47,5)                       | 1,0                       | 2,0                       | 1-50                                                   |
|             | <i>Tetraselmis cordiformis</i>         | 61,8                                                          | 0,9942                         | 34,3 (23,6 - 50,0)                       | 2,0                       | 5,0                       | 1-50                                                   |
|             | <i>Synechocystis</i> sp.               | 63,2                                                          | 0,9972                         | 49,8 (38,8 - 64,0)                       | 2,0                       | 5,0                       | 2-50                                                   |
|             | <i>Scherffelia dubia</i>               | 62,1                                                          | 0,9839                         | 42,4 (22,9 - 78,5)                       | 2,0                       | 5,0                       | 2-50                                                   |
|             | <i>Cryptomonas curvata</i>             | 47,0                                                          | 0,9973                         | 55,8 (43,8 - 71,2)                       | 2,0                       | 5,0                       | 2-50                                                   |
|             | <i>Staurodesmus convergens</i>         | 78,6                                                          | 0,9946                         | 55,7 (39,6 - 78,5)                       | 1,0                       | 2,0                       | 1-50                                                   |
|             | <i>Chlamydomonas</i> sp. M1977         | 91,4                                                          | 0,9969                         | 72,0 (56,0 - 92,6)                       | 2,0                       | 5,0                       | 2-50                                                   |
|             | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 92,9                                                          | 0,9962                         | 104,2 (78,8 - 137,8)                     | 2,0                       | 5,0                       | 2-50                                                   |
| Diuron      | <i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-11b   | 122,8                                                         | 0,9981                         | 27,4 (21,1 - 35,5)                       | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-10                                                 |
|             | <i>Eudorina elegans</i>                | 82,4                                                          | 0,9974                         | 13,2 (10,4 - 16,9)                       | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-5                                                  |
|             | <i>Tetraselmis cordiformis</i>         | 79,8                                                          | 0,9963                         | 3,0 (2,3 - 3,8)                          | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-2                                                  |
|             | <i>Synechocystis</i> sp.               | 68,0                                                          | 0,9944                         | 7,6 (5,5 - 10,5)                         | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-5                                                  |
|             | <i>Scherffelia dubia</i>               | 70,8                                                          | 0,9883                         | 3,9 (2,5 - 6,2)                          | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-5                                                  |
|             | <i>Cryptomonas curvata</i>             | 49,2                                                          | 0,9978                         | 6,4 (5,3 - 7,8)                          | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-2                                                  |
|             | <i>Staurodesmus convergens</i>         | 94,0                                                          | 0,9848                         | 4,1 (2,5 - 6,9)                          | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-5                                                  |
|             | <i>Chlamydomonas</i> sp. M1977         | 108,9                                                         | 0,9974                         | 10,8 (8,5 - 13,6)                        | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-5                                                  |
|             | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 90,8                                                          | 0,9934                         | 13,8 (9,3 - 20,4)                        | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-10                                                 |
| Isoproturon | <i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-11b   | 140,9                                                         | 0,9963                         | 22,0 (16,3 - 29,9)                       | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-10                                                 |
|             | <i>Eudorina elegans</i>                | 98,5                                                          | 0,9966                         | 17,3 (13,0 - 23,1)                       | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-10                                                 |
|             | <i>Tetraselmis cordiformis</i>         | 83,1                                                          | 0,9887                         | 12,4 (7,5 - 20,5)                        | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-10                                                 |
|             | <i>Synechocystis</i> sp.               | 79,5                                                          | 0,9982                         | 21,2 (17,2 - 26,1)                       | 0,5                       | 1                         | 0,5-10                                                 |
|             | <i>Scherffelia dubia</i>               | 77,7                                                          | 0,9913                         | 16,1 (10,2 - 25,4)                       | 0,5                       | 1                         | 0,5-10                                                 |
|             | <i>Cryptomonas curvata</i>             | 53,1                                                          | 0,9945                         | 23,0 (15,9 - 33,2)                       | 0,1                       | 0,5                       | 1-10                                                   |
|             | <i>Staurodesmus convergens</i>         | 112,2                                                         | 0,9987                         | 20,1 (16,8 - 24,1)                       | 0,1                       | 0,5                       | 0,1-10                                                 |
|             | <i>Chlamydomonas</i> sp. M1977         | 105,0                                                         | 0,9972                         | 24,9 (19,2 - 32,4)                       | 0,5                       | 1                         | 2-10                                                   |
|             | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 90,4                                                          | 0,9868                         | 41,6 (23,9 - 72,7)                       | 0,1                       | 0,5                       | 2-50                                                   |
| Paraquat    | <i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-11b   | -                                                             | -                              | -                                        | 10                        | 50                        | -                                                      |
|             | <i>Eudorina elegans</i>                | -                                                             | -                              | -                                        | 1                         | 2                         | -                                                      |
|             | <i>Tetraselmis cordiformis</i>         | -                                                             | -                              | -                                        | 10                        | 50                        | -                                                      |
|             | <i>Synechocystis</i> sp.               | -                                                             | -                              | -                                        | 5                         | 10                        | -                                                      |
|             | <i>Scherffelia dubia</i>               | -38,0                                                         | 0,9369                         | 19,6 (5,5 - 70,8)                        | 5                         | 10                        | 2-50                                                   |
|             | <i>Cryptomonas curvata</i>             | -                                                             | -                              | -                                        | 10                        | 50                        | -                                                      |
|             | <i>Staurodesmus convergens</i>         | -                                                             | -                              | -                                        | 10                        | 50                        | -                                                      |
|             | <i>Chlamydomonas</i> sp. M1977         | -                                                             | -                              | -                                        | 5                         | 10                        | -                                                      |
|             | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | -                                                             | -                              | -                                        | 50                        | 100                       | -                                                      |
| Simazin     | <i>Chlorella vulgaris</i> SAG211-11b   | 162,1                                                         | 0,9889                         | 152,9 (92,2 - 253,6)                     | 2                         | 5                         | 2-100                                                  |
|             | <i>Eudorina elegans</i>                | 119,9                                                         | 0,9964                         | 69,4 (52,7 - 91,3)                       | 1                         | 2                         | 1-100                                                  |
|             | <i>Tetraselmis cordiformis</i>         | 78,4                                                          | 0,9908                         | 57,8 (36,9 - 90,4)                       | 1                         | 2                         | 2-100                                                  |
|             | <i>Synechocystis</i> sp.               | 91,9                                                          | 0,9891                         | 131,0 (80,5 - 213,3)                     | 1                         | 2                         | 2-100                                                  |
|             | <i>Scherffelia dubia</i>               | 61,5                                                          | 0,9836                         | 62,5 (34,5 - 113,1)                      | 10                        | 50                        | 5-100                                                  |
|             | <i>Cryptomonas curvata</i>             | 60,6                                                          | 0,9857                         | 95,0 (55,2 - 163,5)                      | 1                         | 2                         | 1-100                                                  |
|             | <i>Staurodesmus convergens</i>         | 99,7                                                          | 0,9941                         | 95,7 (67,6 - 135,4)                      | 1                         | 2                         | 1-100                                                  |
|             | <i>Chlamydomonas</i> sp.               | 98,8                                                          | 0,9864                         | 106,9 (62,8 - 182,0)                     | 5                         | 10                        | 5-100                                                  |
|             | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 94,3                                                          | 0,9831                         | 70,6 (38,9 - 128,1)                      | 1                         | 2                         | 1-100                                                  |

Allgemein läßt sich bei Applikation der Herbizide Atrazin, Simazin, Diuron und Isoproturon an allen Algen ein konzentrationsabhängiger Anstieg von  $F_t$  feststellen, der mit hoher Anpassung ( $R^2 \times 0,98$ ) dem Modell der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung entspricht (Tabelle 11). Der maximale Anstieg von  $F_t$  gegenüber der Kontrolle liegt in Abhängigkeit von Herbizid und dem verwendeten Algenstamm zwischen 49 und 160 %. Im Gegensatz dazu induziert Paraquat bei allen Stämmen einen Abfall der Fluoreszenz  $F_t$ ,

wobei *Scherffelia dubia* die sensitivste Alge ist (max. Signal:  $F_t = -38\%$ ). Zur Bewertung der Herbizidtoxizität werden die EC-Werte berechnet. Die niedrigsten  $EC_{50}$  können für die Phenylharnstoff-Herbizide Diuron ( $3,0 - 27,4 \mu\text{g l}^{-1}$ ) und Isoproturon ( $12,4 - 41,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ) ermittelt werden. Die Triazine Atrazin und Simazin zeigen höhere  $EC_{50}$  von  $34,3 - 104,2 \mu\text{g l}^{-1}$  bzw.  $57,8 - 152,9 \mu\text{g l}^{-1}$ . Bei Paraquatexposition kann für die einzige sensitive Alge *Scherffelia dubia* eine  $EC_{50}$  von  $19,6 \mu\text{g l}^{-1}$  berechnet werden. Die signifikanten Nachweisgrenzen sind mit Ausnahme von Diuron abhängig von den Algenstämmen. Unter Berücksichtigung der EC-Werte erweisen sich *Tetraselmis cordiformis* und *Scherffelia dubia* als am sensitivsten gegenüber Herbiziden. Weniger sensitive Stämme sind *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. und *Pseudokirchneriella subcapitata*, wobei für die Mehrzahl der neun Stämme keine generelle Herbizidsensitivität oder -insensitivität festgestellt werden kann.

Nach 10-minütigem Ausspülen der Herbizidlösungen aus den Durchflußzellen im Anschluß an die Expositionsexperimente ist eine Reversibilität des Biosensorsignals für die Triazine und Harnstoffderivate festzustellen. Paraquatinduzierte Effekte auf die Chlorophyllfluoreszenz sind dagegen in diesem Zeitraum nicht reversibel.

Expositionsexperimente mit einer Mischung der Herbizide Diuron ( $2 \mu\text{g l}^{-1}$ ) und Atrazin



**Abbildung 27** Biosensorsignal (prozentualer Anstieg von  $F_t$  gegenüber der Kontrolle) für neun verschiedene Mikroalgen in Expositionsexperimenten mit Atrazin ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ), Diuron ( $2 \mu\text{g l}^{-1}$ ) und einer Mischung der beiden Herbizide in jeweils gleicher Konzentration nach 20 min. Anstieg  $F_t \pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ), Biosensor Typ FIIb, Temperatur  $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , Immobilisierungsdichte  $1 \mu\text{g}$  Chlorophyll  $\text{a cm}^{-2}$ .

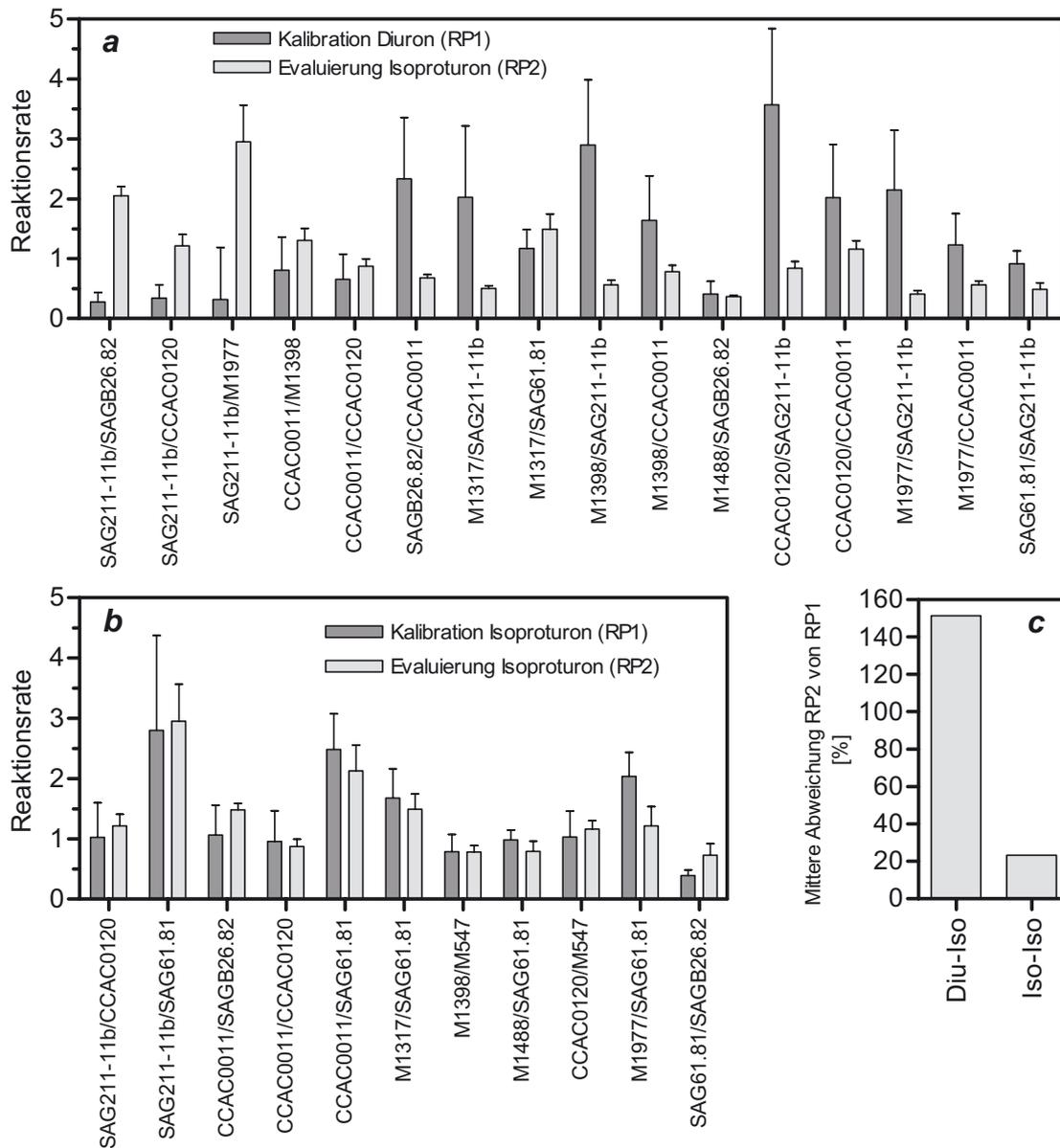
(10 µg l<sup>-1</sup>) zeigen den additiven Effekt der beiden Substanzen. Für neun verschiedene Algen können keine signifikanten Unterschiede für das Biosensorsignal (Anstieg von F<sub>t</sub>) zwischen der Applikation der Herbizidmischung und den addierten Biosensorsignalen aus den jeweiligen exklusiven Expositionsexperimenten festgestellt, d. h. keine kombinierten Wirkungen nachgewiesen werden (Abbildung 27).

### III.3.3. Analyse von herbizidspezifischen Wirkungsmustern

Anhand der aus den Expositionsexperimenten gewonnenen spezifischen Reaktionen der neun Algen auf fünf verschiedene Herbizide wird für jedes Herbizid ein spezifisches Wirkungsmuster (RP1) im Bereich der linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung berechnet (siehe Anhang S.106, Tabelle 18). Zur Evaluierung der errechneten Herbizidspezifität werden anhand von weiteren 20-minütigen Expositionsexperimenten zusätzliche, analoge Wirkungsmuster (RP2) im Bereich einer linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Herbizide Atrazin (10 µg l<sup>-1</sup>), Simazin (50 µg l<sup>-1</sup>), Diuron (2 µg l<sup>-1</sup>) und Isoproturon (10 µg l<sup>-1</sup>) erstellt und mit den Kalibrations-Wirkungsmustern (RP1) verglichen. Abbildung 28 zeigt beispielhaft das Verfahren der Identifizierung und Quantifizierung von Isoproturon anhand der Wirkungsmuster von zwei Harnstoffderivaten (Isoproturon und Diuron). Deutliche Abweichungen sind zwischen RP2 Isoproturon und RP1 Diuron für die Mehrzahl der 16 einzelnen Reaktionsraten zu erkennen (Abbildung 28a). Für die für Isoproturon RP1 bestimmten elf herbizidspezifischen Reaktionsraten konnte dagegen ein deutlich geringerer Unterschied zu RP2 Isoproturon festgestellt werden (Abbildung 28b). Die Abweichungen betragen im Mittel ca. 150 % für RP2 Isoproturon/RP1 Diuron und nur ca. 20 % für RP2 Isoproturon/RP1 Isoproturon (Abbildung 28c).

**Tabelle 12** Berechnung der Konzentration von Isoproturon anhand linearer Regression für neun Algenstämme.

|                                                                                              | Mikroalgenstamm |          |           |       |       |       |          |       |          | Ø           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|-----------|-------|-------|-------|----------|-------|----------|-------------|
|                                                                                              | SAG211-11b      | CCAC0011 | SAGB26.82 | M1317 | M1398 | M1488 | CCAC0120 | M1977 | SAG61.81 |             |
| Biosensorsignal als Anstieg von F <sub>t</sub> [% der Kontrolle]                             | 56,0            | 40,3     | 27,4      | 28,3  | 31,4  | 14,9  | 46,7     | 22,8  | 19,6     |             |
| über lineare Regression errechnete Konzentration der Isoproturonlösung [µg l <sup>-1</sup> ] | 13,7            | 11,2     | 7,0       | 11,0  | 11,3  | 9,5   | 11,6     | 7,5   | 16,1     | <b>11,0</b> |



**Abbildung 28** Identifizierung von Herbiziden anhand des herbizidspezifischen Wirkungsmusters am Beispiel von Diuron und Isoproturon: **(a)** Vergleich des Wirkungsmusters (RP2) von Isoproturon mit dem herbizidspezifischen Wirkungsmuster (RP1) von Diuron, bestehend aus 16 Reaktionsraten. **(b)** Vergleich des Wirkungsmusters (RP2) von Isoproturon mit dem herbizidspezifischen Wirkungsmuster (RP1) von Isoproturon aus 11 Reaktionsraten. **(c)** Prozentuale mittlere Abweichung der Wirkungsmuster RP2 von RP1 für **(a)** Diuron-Isoproturon und **(b)** Isoproturon-Isoproturon.

Im Folgenden kann die Evaluierung der Quantifizierung für das anhand der Wirkungsmuster identifizierte Herbizid Isoproturon vorgenommen werden. Hierzu werden für die Intensitäten der Biosensorsignale als Anstieg von  $F_t$  gegenüber der Kontrolle herangezogen. Unter Beachtung des linearen Bereichs der Dosis-Wirkungs-Beziehung lässt sich anhand linearer Regressionen für jeden Algenstamm die Konzentration von Isoproturon errechnen (Tabelle 12). Im Mittel wird so eine Isoproturonkonzentration

**Tabelle 13** Mittlere Abweichung [%] des Wirkungsmusters RP2 vom herbizidspezifischen Wirkungsmuster RP1 für die Triazine und Harnstoffderivate sowie die Anzahl der Reaktionsraten des jeweiligen RP1 und der Konzentrationsbereich der Berechnung der Reaktionsraten.

| herbizid-spezifisches Wirkungsmuster (RP1) für: | Anzahl der singnifikanten Reaktionsraten des RP1 zur Identifikation | Wirkungsmuster (RP2) für:       |                               |                                     |                                 | Konzentrationsbereich der Berechnung der Reaktionsraten $\mu\text{g l}^{-1}$ |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|                                                 |                                                                     | Atrazin $10 \mu\text{g l}^{-1}$ | Diuron $2 \mu\text{g l}^{-1}$ | Isoproturon $10 \mu\text{g l}^{-1}$ | Simazin $50 \mu\text{g l}^{-1}$ |                                                                              |
| Atrazin                                         | 8                                                                   | <b>43,5</b>                     | 70,7                          | 42,4                                | 44,5                            | 2-50                                                                         |
| Diuron                                          | 16                                                                  | 228,5                           | <b>52,9</b>                   | 153,2                               | 131,2                           | 0,1-2                                                                        |
| Isoproturon                                     | 11                                                                  | 54,5                            | 84,0                          | <b>22,2</b>                         | 97,1                            | 2-10                                                                         |
| Paraquat                                        | 3                                                                   | 203,7                           | 129,6                         | 223,9                               | 190,6                           | 2-50                                                                         |
| Simazin                                         | 4                                                                   | 57,1                            | 148,1                         | 104,0                               | <b>16,3</b>                     | 5-100                                                                        |

von  $11,0 \mu\text{g l}^{-1}$  errechnet, das entspricht einer Abweichung von der tatsächlich eingesetzten Konzentration von 10 %.

Vergleich man die Wirkungsmuster RP2 für alle vier Herbizide mit den herbizidspezifischen Wirkungsmustern RP1, so zeigt sich in allen Fällen für RP2 die jeweils geringste Abweichung von RP1 für das jeweils identische Herbizid (Tabelle 13). Für Isoproturon (22,2 %) und Simazin (16,3 %) ist die Abweichung geringer als für Atrazin (43,5 %) und Simazin (52,9 %).

## IV. DISKUSSION

### IV.1. Technische Entwicklung des Biosensorsystems

#### IV.1.1. Immobilisierbarkeit und physiologische Stabilität von Mikroalgenkulturen im Verbundschichtkulturverfahren

Die Immobilisierung von Mikroalgen in oder auf einem inerten Träger (Polyurethan, Cellulosederivate, verschiedene Kunststoffe) oder einer vernetzenden Matrix (Agar, Alginat, Carrageen) bietet seit langem zahlreiche Einsatzmöglichkeiten in der Biotechnologie (Robinson et al., 1986; Codd, 1987). Die Immobilisierung ermöglicht höhere Zelldichten und verstärkt und stabilisiert die Stoffwechselaktivität von Mikroalgen (Robinson et al., 1986; Brouers et al., 1988). Gleichzeitig werden die schädigenden Auswirkungen mechanischer Scherkräfte herabgesetzt (z. B. Largeau et al., 1988). Tamponnet et al. (1985) und Bailliez et al. (1986) weisen eine erhöhte Stabilität von Chlorophyll-Proteinkomplexen bei immobilisierten Kulturen von *Botryococcus* bzw. *Euglena* gegenüber freien Zellen nach. Durch Immobilisierungsverfahren, oftmals durch eine Einkapselung der Algen in Alginatkugeln, kann eine erhöhte Langzeitstabilität der Kulturen von mehreren Monaten erreicht werden (Codd, 1987; Romo & Perez-Martinez, 1997; Chen, 2003). Mit der Einkapselung geht jedoch ebenfalls ein Verlust der Sensitivität gegenüber Schadstoffen einher (vgl. Abschnitt I.2). Im Hinblick auf eine Verwendung in einem Biosensorsystem erscheint dieses Verfahren daher ungeeignet.

Untersuchungen über die Immobilisierbarkeit von Mikroalgen beschränken sich bisher meist auf eine Auswahl technisch genutzter Stämme in den Bereichen Biotechnologie und Toxikologie. Wie viele der in Flüssigkultur kultivierbaren Mikroalgen mit den derzeit verfügbaren Techniken immobilisierbar sind, ist nicht bekannt. Lukavsky (1988) zeigt, daß ungefähr 80 % von über 30 Mikroalgenstämmen (größtenteils Grünalgen, aber auch Cyanobakterien, Kieselalgen und eine einzellige Rotalge) auf Agar immobilisierbar sind. Nach mehrjähriger Lagerung bei niedrigen Temperaturen wachsen diese immobilisierten Stämme nach Transfer in eine Flüssigkultur wieder an. Über den Zustand dieser Stämme während der Immobilisierung, wie z.B. die Bildung von Dauerstadien oder Photosyntheseaktivität, werden jedoch keine Angaben gemacht. Bisherige Erfahrungen der Sammlung von Algenkulturen Prof. Melkonian (Botanisches Institut, Universität zu Köln) mit einer weitaus größeren Anzahl und taxonomischer Vielfalt an Algenstämmen deuten dagegen darauf hin, daß der Anteil der auf Agar immobilisierbaren Stämme bei nur 50 %

liegt. Die von der Sammlung von Algenkulturen Prof. Melkonian auf ihre Immobilisierbarkeit getesteten Stämme erweisen sich oftmals als auch in Flüssigkultur schwerer kultivierbar, wie z. B. viele Flagellaten, gegenüber den von Lukavsky (1988) getesteten Vertretern u. a. aus den Gattungen *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Nostoc*, *Navicula* und *Porphyridium*.

Die Verwendung der etablierten Immobilisierungsverfahren weist neben den bisher dargestellten Nachteilen ein weiteres Hindernis in Bezug auf die Nutzung in einem Biosensorsystem auf: Werden physiologisch aktive Zellen über einen längeren Zeitraum auf einer Nährstoffe beinhaltenden Matrix kultiviert, so ist damit unweigerlich eine kontinuierliche Abnahme des Nährstoffgehalts oder eine Anreicherung anderer Stoffwechselprodukte verbunden. Wie in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen wird, wirkt sich die Veränderung der Nährstoffzusammensetzung auf die Chlorophyllfluoreszenz aus (z. B. Wood & Oliver, 1995; Milligan & Harrison, 2000; Beardall et al., 2001; Lippemeier et al., 2001; Young & Beardall, 2003). Dies würde eine Nutzung der Chlorophyllfluorometrie als Signal eines Biosensors erheblich einschränken.

Die Anwendung von Biosensoren in der routinemäßigen Umweltüberwachung erfordert einen unter realen Einsatzbedingungen langzeitstabilen Sensororganismus. Bisher beschriebene Biosensorsysteme mit immobilisierten Mikroalgen kommen diesen Anforderungen nur unzureichend nach, besonders wenn die aquatischen Organismen in einem engen Kontakt zur Gasphase stehen. Der enge Kontakt zur Gasphase ist jedoch besonders zur Messung von Luftschadstoffen erforderlich. Die von Naessens & Tran-Minh (1998b, 1999) entwickelten *Chlorella*-Biosensoren für VOCs zeigten eine Abnahme des Biosensorsignals in Form der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung um 50 % innerhalb von 8 - 10 Tagen. In diesem Fall kann die reduzierte Sensoraktivität sicher zu einem großen Teil auf die unzureichende Versorgung der Algen mit Wasser und Nährstoffen zurückgeführt werden. In Verbindung mit einem Biosensorsystem für chemische Kampfstoffe demonstrieren Sanders et al. (2001) das Auftreten einer normalen Fluoreszenzsignatur nach einer 40-tägigen Lagerung in Kulturmedium und Dunkelheit im Vergleich zu vor der Lagerung vorgenommenen Fluoreszenzmessungen. In diesem Fall weichen die Lagerbedingungen des Biosensors jedoch deutlich von den Einsatzbedingungen ab.

Im Rahmen dieser Arbeit kann die Eignung des hier entwickelten neuartigen Immobilisierungsverfahrens für eine Vielzahl verschiedener Mikroalgen demonstriert

werden. Bisher unveröffentlichte Daten zeigen, daß aus einer taxonomisch breiten Auswahl von über 100 diversen Mikroalgenstämmen ca. 80 % mittels des Verbundschichtkulturverfahrens stabil kultiviert werden können, z. T. über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten. Durch die Verwendung einer für Mikroorganismen schwer abbaubaren Trägerschicht als Substrat weist das Verbundschichtverfahren einen weiteren Vorteil gegenüber einer Agar-, Alginat- oder Carrageenmatrix auf. Diese Materialien können vergleichsweise leicht von Mikroorganismen abgebaut werden (z. B. Faafeng et al., 1994). Das Verbundschichtverfahren ermöglicht außerdem die stabile Etablierung einer Mikroalgenkultur in einem Biosensorsystem für Luftschadstoffe über einen Zeitraum von 30 d unter realen Einsatzbedingungen. Die Beständigkeit des Biosensorsignals in Form von  $\pm F/F'_m$  wird durch die kontinuierliche Versorgung mit Kulturmedium sichergestellt. Diese langfristig erreichte physiologische Stabilität bildet die Grundlage für die Entwicklung des ASC-Biosensors und des diversitätsbasierten Identifikationsverfahrens für Schadstoffe. Die hier entwickelte Immobilisierungsmethodik vermeidet außerdem einen Einschluß der Organismen in Matrices und ermöglicht so in Verbindung mit der technischen Konzeption des Biosensorsystems eine sensitive Schadstoffmessung, auch in Verbindungen mit strömenden Lösungen.

#### **IV.1.2. Verfahren zur Messung und Auswertung der Chlorophyll a-Fluoreszenz als Biosensorsignal**

Die PAM-Chlorophyllfluoreszenzanalyse erweist sich seit einigen Jahren in vielfältiger Hinsicht als eine verlässliche Methode zur Evaluierung von Umweltstress auf Pflanzen (z. B. Juneau & Popovic, 1999; Maxwell & Johnson, 2000). Die mit dieser Methode erlangten Informationen über den Status der Photosynthese werden am Photosystem II erhoben (siehe II.3.3). Dessen zentrale Bedeutung bezüglich auf eine Beeinträchtigung durch verschiedene exogene Stressfaktoren wird von Baker (1991) betont. Unter der Berücksichtigung einiger spezieller Gegebenheiten läßt sich dieses ursprünglich für Höhere Pflanzen entwickelte Meßverfahren auch an Algen anwenden (Büchel & Wilhelm, 1993; Schreiber et al., 1995). Im Folgenden Abschnitt wird betrachtet, inwieweit sich die erhobenen Fluoreszenzparameter als Signal des Biosensors besonders im Hinblick auf die Sensitivität und unter Gesichtspunkten der praktischen Anwendung verwenden lassen. Die Diskussion der Wirkungsmechanismen der verwendeten Schadstoffe auf die Photosynthese der Algen erfolgt in den nachfolgenden Abschnitten.

Da der *Klebsormidium*-Biosensor für die getesteten gasförmigen Schadstoffe die höchste Sensitivität aufweist, wird die Optimierung des Fluoreszenzmeßverfahrens auf der Basis dieses Systems durchgeführt. Das Meßverfahren unter der Anwendung der alternierenden Licht-/Dunkelphasen erweist sich unter dem Aspekt der Maximierung des Biosensorsignals (d. h. der Sensitivität) als am günstigsten, wenn die nach 1 bzw. 2,5 min nach Beleuchtungsbeginn erhobenen Fluoreszenzparameter  $F_t$  oder  $\Delta F/F'_m$  als Biosensorsignal herangezogen werden (Abbildung 12, S.39).  $\Delta F/F'_m$  zeigt hier die beste Reproduzierbarkeit, wiedergegeben durch eine vergleichsweise niedrige Standardabweichung. Die höchste Sensitivität kann für  $qN$  festgestellt werden, das sich jedoch auf Grund einer ungenügenden Reproduzierbarkeit nicht als Biosensorsignal eignet. Die Anwendung der alternierenden Licht-/Dunkelphasen zur Fluoreszenzmessung weist im Hinblick auf eine praktische Anwendung einige Nachteile auf. Das Biosensorsignal ist nur während der Beleuchtungsphase verfügbar, so daß keine kontinuierliche Messung durchgeführt werden kann. Eine maximale Sensitivität ist außerdem nur zu Beginn der Lichtphase meßbar. Resultierend aus dieser Versuchsanordnung lassen sich nutzbare Signale effektiv nur alle 20 min erheben. Einige Algen benötigen zudem deutlich längere als die hier verwendeten Dunkeladaptationsphasen von 10 min (Büchel & Wilhelm, 1993). Dies wäre mit einem weiteren Verlust an zeitlicher Auflösung verbunden. Ein weiteres Problem stellen die unterschiedlichen Anforderungen der verschiedenen Algen an die Chlorophyllfluorometrie dar. Nach Büchel & Wilhelm (1993) benötigen besonders phycobilingehaltige (Cyanobakterien und Rotalgen) und Chlorophyll c beinhaltende heterokonten Algen (z. B. Diatomeen) oftmals eine nur sehr geringe Anregungsbeleuchtung zur Bestimmung der Grundfluoreszenz  $F_0$ . Eine Herabsetzung der Anregungsbeleuchtung führt aber gleichzeitig zu einem ungünstigen Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen, zumal das Fluoreszenzsignal in diesen Algengruppen häufig vergleichsweise schwach ist. Außerdem können hier z. T. unbekannte physiologische Mechanismen zur inkorrekten Bestimmung der Grundfluoreszenz  $F_0$  führen, die wiederum in einer falschen Berechnung der Dunkelparameter  $F_v/F_m$ , und  $qN$  resultiert. Da die unter kontinuierlicher Beleuchtung ermittelten Fluoreszenzparameter  $F_t$  und  $\Delta F/F'_m$  nicht auf vorangegangener Dunkeladaptation basieren, empfiehlt sich vor diesem Hintergrund eine Anwendung der kontinuierlichen Beleuchtung zur Fluoreszenzmessung. So ist ein kontinuierliches und stabiles Biosensorsignal in deutlich höherer zeitlicher Auflösung verfügbar. Dies ist jedoch auch mit einem Verlust der Nachweissensitivität verbunden, die

in etwa der Sensitivität des nach 10 min Beleuchtung erhobenen Meßwertes bei Verwendung der alternierenden Beleuchtung entspricht.

Der Biosensor für wassergelöste Schadstoffe soll als Weiterentwicklung der Systeme für Luftschadstoffe neben der quantitativen Messung von Herbiziden auch zu deren Identifizierung genutzt werden. Das auf den verschiedenen Reaktionen der Mikroalgen basierende Verfahren erfordert den Einsatz von sensitiven Mikroalgen. Im Vergleich der Fluoreszenzparameter  $F_t$  und  $\Delta F/F'_m$  können bei Herbizidexposition für eine höhere Anzahl an Algen niedrigere Nachweisgrenzen bei Verwendung von  $F_t$  gegenüber  $\Delta F/F'_m$  erreicht werden. Die von Trapmann et al. (1998) vorgeschlagene Methode zur Erhöhung der Sensitivität bei Integration des Meßsignals  $F_t$  über den Expositionszeitraum von 20 Minuten erweist sich als weniger sensitiv im Vergleich zum Auswertungsverfahren unter Nutzung des terminalen Meßwertes nach 20-minütiger Exposition.

Die mit einzelnen Algen gemessenen niedrigsten Nachweisgrenzen werden jedoch zu einem großen Teil unter der Verwendung von  $\Delta F/F'_m$  und der integrierten Auswertungsmethodik ermittelt. Dies kann die Sensitivität für eine quantitative Analytik verbessern. Die Unterschiede zwischen den Nachweisgrenzen der verschiedenen Algen sind jedoch für dieses Auswertungsverfahren deutlich größer. Da für das Identifizierungsverfahren jedoch möglichst viele in einem ähnlichen Konzentrationsbereich sensitive Algenstämme erforderlich sind (siehe Abschnitt II.6), ist die Verwendung von  $F_t$  bei Verwendung des terminalen Meßwertes nach 20-minütiger Exposition als Biosensorsignal empfehlenswert.

#### **IV.1.3. Einfluß von Immobilisierung, Temperatur und Membranmaterial auf die Sensitivität des Biosensors**

##### *Immobilisierung*

Die Untersuchung des Einflusses der Immobilisierungsdichte der biologischen Komponente auf das Signal eines Biosensors wird vor allem für rezeptorbasierte Biosensorsysteme (Nukleinsäuren und Antikörper) durchgeführt. Hier kann der Einfluß der Dichte der Rezeptoren auf das Biosensorsignal, resultierend z. B. aus der mit der Dichte assoziierten Bindungsaffinität und -kapazität oder der Zugänglichkeit der Rezeptoren für

die Analyte, demonstriert werden (Rogers et al., 1991; Henke & Krull, 1999; Barie & Rapp, 2001; Watterson et al., 2001).

Bei Biosensorsystemen, die ganze Zellen oder Mikroorganismen nutzen, wird die Abhängigkeit zwischen Immobilisierungsdichte und induzierbarer Signalintensität dagegen bisher wenig beachtet. In der vorliegenden Untersuchung kann diese jedoch nachgewiesen werden. Für *Klebsormidium* sp. (M1939) und *Pseudokirchneriella subcapitata* ist der Beginn der Bildung einer mehrlagigen Zellschicht ab einer Dichte von ungefähr 2,5 - 5 (*K.* sp.) bzw. ca. 1 - 2,5 (*P. subcapitata*)  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$  erkennbar (nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtung steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Stagnation des Anstiegs des absoluten Fluoreszenzsignals  $F_t$  mit steigender Chlorophyllmenge (Abbildung 16, S.43): Setzt man eine proportionale Beziehung zwischen Chlorophyllmenge und Chlorophyllfluoreszenz voraus (Vyhnaek et al., 1993; Gregor & Marsalek, 2004), so ist ein Anstieg der Fluoreszenz mit der Erhöhung der Chlorophyllmenge zu erwarten. Ist begleitend zur zunehmenden Chlorophyllkonzentration kein weiterer Anstieg von  $F_t$  feststellbar, so kann möglicherweise die zur Anregung der Chlorophyllfluoreszenz verwendete, schwache Lichtstrahlung nicht in tiefere Lagen der sich bildenden Algenschicht vordringen. Der leichte Fluoreszenzverlust oberhalb von 2,5 bzw. 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$  könnte zusätzlich durch das Phänomen der Reabsorption der kurzwelligigen Fluoreszenz durch benachbarte Zellen bei hohen Chlorophyllkonzentrationen erklärt werden (Eullaffroy et al., 1998; Gitelson et al., 1998; Buschmann et al., 2000). Vedrine et al. (2003) postulieren ebenfalls Fluoreszenzreabsorption in einem Algenbiosensorsystem bei hoher Immobilisierungsdichte von *Chlorella vulgaris*.

Die Auswirkungen einer mehrlagigen Zellschicht auf die Sensitivität des Biosensors sind für gasförmige und wassergelöste Schadstoffe getrennt zu betrachten. Für das Herbizid Diuron kann eine abnehmende Sensitivität bei einer Immobilisierungsdichte über 5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll a  $\text{cm}^{-2}$  nachgewiesen werden. Der Schadstoff wird im Fall des Biosensors für wasserlösliche Verbindungen von der entgegengesetzten Seite im Verhältnis zur Fluoreszenzmessung appliziert. Daher könnte eine suboptimale Sensitivität auf den Diffusionsweg von Diuron durch die Zellschichten zurückzuführen sein, der sich mit steigender Schichtdicke verlängert. Auch eine mögliche schnelle Absorption des Herbizids durch die Algenzellen während des Durchtritts durch die Zellschichten könnte mit steigender Schichtdicke kurzfristig zu einer geringeren Konzentration auf der Seite der Fluoreszenzmessung führen. Das formaldehydinduzierte Signal des Biosensors für

Luftschadstoffe sinkt bei Chlorophyllmengen von über  $1 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  ebenfalls mit steigender Immobilisierungsdichte. In diesem System werden die gasförmigen Verbindungen von der der Lichtquelle zugewandten Oberfläche der Biosensormembran zugeführt. Auf Grund des absoluten Fluoreszenzsignals kann davon ausgegangen werden, daß eine Schicht bis zu einer Dichte von  $2,5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  in die Fluoreszenzmessung einbezogen wird. Für den Expositionszeitraum von 30 min kann man eine Diffusion von Formaldehyd bis in eine Schicht einer Dicke von  $1 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  vermuten (maximale Sensitivität bis zu dieser Dichte). Bei einer Schichtdicke von  $2,5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  würde dann sowohl die von Formaldehyd penetrierte Zellschicht, als auch der nicht formaldehydexponierte, tiefer liegende Bereich in die Messung der Fluoreszenz einbezogen werden. D. h. das gemessene Biosensorsignal wäre ein Mittel aus durch Formaldehyd beeinträchtigten und nicht beeinträchtigten Schichten, verbunden mit einem Verlust an Sensitivität.

Auch in natürlichen Biofilmen können die Dichte und die aus den gepackten Zellen gebildete Struktur die Schadstoffsensitivität beeinflussen. Nach Barranguet et al. (2000) üben diese physikalischen Faktoren z. B. einen stärkeren Einfluß auf die Kupfersensitivität eines Biofilms aus als dessen Artzusammensetzung und fungieren so als protektiver Mechanismus gegen die toxische Wirkung von Schadstoffen (Barranguet et al., 2002).

Da ein Effekt der Schichtdicke auf die Sensitivität des Biosensorsignals nachgewiesen werden kann, entsteht aus dem Wachstum der immobilisierten Organismen eine Problematik im Hinblick auf einen längeren Einsatzzeitraum des Biosensors. Die potentielle Einsatzdauer wird daher durch den Bereich der maximalen Sensitivität von  $0,25$  bis  $1$  bzw.  $5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$ , d. h. durch das Wachstum der Algen bis zum Erreichen dieses Grenzwerts, beschränkt. Anhand der Erkenntnisse, die in Wachstumsexperimenten mit *Klebsormidium* gewonnen worden sind, zeigt sich, daß sich die Wachstumsraten der Algen durch Veränderung der Zusammensetzung des Kulturmediums z. T. deutlich reduzieren lassen, ohne die Stabilität der immobilisierten Kulturen zu beeinträchtigen. Durch eine Umoorientierung der Fluoreszenzmessung auf die Seite der Schadstoffapplikation könnte der Sensitivitätsverlust des Biosensorsystems für wassergelöste Schadstoffe bei steigender Schichtdicke vermieden werden. Dies könnte durch die Verwendung klarsichtiger Trägermaterialien, wie z. B. die hier eingesetzte Polycarbonatmembran realisiert werden. Im Fall der Biosensoren für Luftschadstoffe könnte außerdem die Immobilisierung bei hohen Dichten  $\times 10 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  eine

Dichteabhängigkeit umgehen. Dies wäre allerdings mit einer deutlichen Einbuße an Sensitivität verbunden.

### *Temperatur*

Am Beispiel der Expositionsexperimente mit Methanol zeigt sich die Temperaturabhängigkeit des Biosensorsignals in Form der prozentualen Hemmung der effektiven Quantenausbeute des Elektronentransports  $\Delta F/F'_m$  gegenüber einer Kontrolle. Bei einer guten Reproduzierbarkeit ist eine maximale Sensitivität des *Klebsormidium*-Biosensors bei 29 °C zu erreichen.

Die signifikante Temperaturstabilität von  $\Delta F/F'_m$  deutet nicht auf eine generelle Temperaturbeeinträchtigung der Photosynthesevorgänge hin. Vielmehr scheinen bestimmte, mit der Toxizität von Methanol verknüpfte Vorgänge, wie z.B. die Methanoxidation/-detoxifikation oder die Bindungsaffinitäten von Methanol oder seinen Oxidationsprodukten an den Mn-Cluster des wasserspaltenden Komplexes des PSII (siehe IV.2.1) temperaturabhängig zu sein. Diese wirken sich dann mit alternierender Temperatur unterschiedlich auf die Effizienz des Elektronentransports aus. Viele dieser Stoffwechselfvorgänge basieren auf enzymatischen Reaktionen. So zeigen z. B. Mahan et al. (2004) einen Zusammenhang zwischen temperaturabhängiger Enzymaktivität und der Effektivität von Herbizidgaben. Für das Biosensorsystem ergibt sich hieraus neben dem Einfluß der Temperatur auf dessen Sensitivität zumindest die Notwendigkeit zur Stabilisierung der Temperatur während der Anwendung des Biosensors. Besonders bei der Anwendung des ASC-Biosensors ist zu bedenken, daß verschiedene Algen maximale Signale bei unterschiedlichen Temperaturen aufweisen könnten.

Berücksichtigt man das temperaturabhängige Phasengleichgewicht der VOCs, so nimmt die Menge an in der Wasserphase gelösten Schadstoffe bei einem Temperaturanstieg von 20 auf 30 °C für Methanol um 42 % und für Formaldehyd um 50 % ab. Dagegen zeigen Walsh et al. (2004) eine steigende Methanolpermeabilität der Zellmembranen von *Chlorococcum texanum* mit ansteigender Temperatur. Welchen Einfluß diese beiden in Bezug auf das resultierende Biosensorsignal gegensätzlich wirkenden Prozesse auf dessen Temperaturabhängigkeit haben, kann jedoch nicht abgeschätzt werden.

### *Membranmaterial*

Die Wahl eines optimalen Membranmaterials als Immobilisierungssubstrat ist für die Biosensorsysteme von unterschiedlicher Bedeutung. Stellt das Substratmaterial in den

Biosensorsystemen für Luftschadstoffe die dauerhafte Versorgung mit Nährstoffen sicher, so sind dessen Permeabilität und Adsorptionseigenschaften zur Messung von wassergelösten Schadstoffen von größerer Bedeutung, da diese Schadstoffe durch das Substrat hindurchtreten müssen. Sollen gerade kurzfristige Änderungen in der Zusammensetzung einer zu analysierenden Lösung im Rahmen weniger Minuten mittels des Biosensors gemessen werden, sind die Diffusions- und Adsorptionseigenschaften von besonderer Bedeutung. In den durchgeführten Experimenten zeigt sich eine deutlich bessere Eignung der Polycarbonat- gegenüber der Cellulosemischestermembran. Dies kann vor allem auf deren deutlich geringere Schichtdicke, gleichbedeutend mit einem kürzeren Diffusionsweg, zurückzuführen sein. Des weiteren kann die bessere Eignung auch aus der bekannt geringen Bindungsaffinität von Polycarbonaten für verschiedene Stoffe resultieren. Dies wird z. B. von Weltje et al. (2003) für einige Metalle demonstriert. Aus verschiedenen getesteten Membranmaterialien zeigen Cellulosemischestermaterialien die höchsten, Polycarbonat mit die geringsten Adsorptionsraten.

## IV.2. Quantitativer Nachweis toxischer Verbindungen

### IV.2.1. Flüchtige organische Verbindungen

#### *Wirkungsweise der VOCs auf die Photosynthese*

Die schädigende Wirkung der flüchtigen organischen Verbindungen Methanol und Formaldehyd auf pflanzliche Organismen basiert auf verschiedenen Mechanismen. Die Toxizität von Methanol kann sicher zu einem Teil auf dessen guten Lösungseigenschaften für Biomembranen zurückzuführen sein, weshalb Methanol in Standardmethoden zur Pigmentextraktion eingesetzt wird (z. B. Simon & Helliwell, 1998). Nach Hayat (1989) induziert Formaldehyd eine Vernetzung von freien Aminogruppen mit anderen funktionellen Gruppen der Polypeptidketten. Des Weiteren reagieren ungesättigte Fettsäuren an den Doppelbindungen unter Veränderung ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften mit Formaldehyd.

Im Zusammenhang mit dem hier beschriebenen Biosensorsystem kommt jedoch der Betrachtung einer direkten VOC-Schadwirkung auf die Photosynthese besondere Bedeutung zu. Force et al. (1998) erbringen den Nachweis der Bindung von Methanol und anderen kleinen Alkoholen an den Mn-Cluster des wasserspaltenden Komplexes. Dies führt zu einer Abnahme der photosynthetischen Sauerstoffproduktion, deren Ausmaß von der applizierten Alkoholkonzentration abhängt und im Fall von Methanol vollständig reversibel ist. Sowohl Methanol als auch Formaldehyd sind Bestandteile in einem Stoffwechselweg, der Methanoloxidation/-detoxifikation über Formaldehyd zu Format und CO<sub>2</sub> (Cossins, 1964; McGiffen & Manthey, 1996). Für Format ist ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf den Elektronentransport der Photosynthese und auf den wasserspaltenden Komplex bekannt (Feyziev et al., 2000).

Neben der Inhibition des photosynthetischen Elektronentransports kann auf Grund der oben genannten Oxidation von Methanol und Formaldehyd zu CO<sub>2</sub> in manchen Fällen ein stimulierender Effekt dieser Substanzen auf die Biomasseproduktion von Pflanzen nachgewiesen werden, der auf der Anreicherung des CO<sub>2</sub> beruht (McGiffen & Manthey, 1996). Unter spezieller Betrachtung der Mikroalgen erzielen z. B. Kotzabasis et al. (1999) bei Addition von geringen Mengen Methanol (0,05-1 % v/v) gesteigerte Photosyntheseraten und Biomasseproduktionen von *Chlorella*. Bei Lichtintensitäten  $\times 100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  zeigen Theodoridou et al. (2002) ähnliche Ergebnisse. Niedrigere

Lichtintensitäten, wie in den hier dargestellten Biosensorsystemen angewendet, dagegen resultieren in einer leichten Abnahme der Photosyntheseaktivität.

Die durch Chlorophyllfluoreszenzparameter mit den Biosensorsystemen ermittelten inhibitorischen Effekte von Methanol- bzw. Formaldehyddämpfen auf die Photosynthese der Algen sind evident. Die Abnahme der effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports des PSII ( $\Phi/F'_m$ ) sowie die Erhöhung der langwelligen Strahlungsemission (Wärmeabgabe), wiedergegeben durch den Koeffizienten des nicht-photochemischen Quenching  $q_N$ , können auf die o. g. Inhibition des Mn-Clusters durch Methanol oder die Hemmung des Elektronentransports und des wasserspaltenden Komplexes durch Format zurückgeführt werden. Ein enger Zusammenhang zwischen der durch diese beschriebenen Prozesse beeinträchtigten Sauerstoffentwicklung und der im Rahmen dieser Arbeit als Biosensorsignal untersuchten effektiven Quanteneffizienz des Elektronentransports ist erwiesen (Endo et al., 1995).

Die Anwendung der alternierenden Licht-/Dunkelphasen zeigt unter Methanolexposition einen maximalen Anstieg der Fluoreszenz  $F_t$  und eine maximale Hemmung von  $\Phi/F'_m$  gegenüber der Kontrolle in den ersten Minuten der Lichtphase. Doman & Romanova (1962) demonstrieren, daß die Oxidation von Methanol, Formaldehyd und Format und somit deren Detoxifikation in Dunkelheit wesentlich langsamer als im Licht abläuft. Somit könnte gegen Ende der Dunkelphase und zu Beginn der Lichtphase durch allmähliche Anreicherung eine höhere Methanolkonzentration in den Zellen vorliegen. Diese führt dann anfangs zu einem höheren Signal des Biosensors und nimmt mit der Erhöhung der Effizienz des lichtinduzierten Detoxifikationsmechanismus ab. Dieser Sachverhalt würde gleichzeitig auf eine stärkere Beteiligung von Methanol im Vergleich zu dessen Oxidationsprodukten Formaldehyd oder Format an der Hemmung der photosynthetischen Prozesse hindeuten. Jedoch sind an der Induktion der Chlorophyllfluoreszenz beim Übergang von der Dunkeladaptation zum Steady State der Photosynthese zahlreiche andere photochemische und nicht-photochemische Prozesse beteiligt (Seaton & Walker, 1990; Büchel & Wilhelm, 1993; Rohacek & Bartak, 1999), deren Einfluß auf die Fluoreszenzsignale während der Methanolexposition anhand der gewonnenen Daten nicht abgeschätzt werden kann.

Die maximale Quanteneffizienz des Elektronentransports  $F_v/F_m$  wird durch die VOC-Exposition nicht beeinträchtigt. Eine Abnahme von  $F_v/F_m$  gilt als zuverlässiger Parameter zur Beschreibung von Photoinhibition (Figueroa et al., 1997; Maxwell & Johnson, 2000; Montero et al., 2002), die in einem engen Zusammenhang mit der Degradation des D1-

Proteins des PSII steht (Han et al., 2000; Marshall et al., 2000). Eine Schadwirkung von Methanol oder Formaldehyd auf das D1-Protein ist nicht bekannt. Dagegen weisen Shiraishi et al. (2000) eine protektive Wirkung von Format (als Zwischenprodukt der Methanol-/Formaldehydoxidation) gegenüber der Photoinhibition nach.

Generell kann davon ausgegangen werden, daß in der Zelle oder zumindest in der immobilisierten Zellen umgebenden wässrigen Lösung eine weitaus höhere VOC-Konzentration vorliegt als in der umgebenden Gasphase. Unter Berücksichtigung der Henrykonstante ergibt sich bei vollständiger Einstellung des Phasengleichgewichts und einer Temperatur von 29 °C ein Anreicherungsfaktor von ~57.000 für Formaldehyd und ~4.300 für Methanol. Dieses stark zur wässrigen Phase verlagerte Gleichgewicht begünstigt generell die Messung dieser VOCs in der Gasphase und könnte gleichzeitig auch die im Vergleich zu Methanol deutlich niedrigere Nachweisgrenze des Biosensors für Formaldehyddämpfe erklären.

#### *Nachweis der VOC-Dämpfe durch Mikroalgenbiosensoren*

Üblicherweise werden VOCs mittels der Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS) nachgewiesen. Diese gekoppelte Methode verbindet die gaschromatographische Auftrennung der Probe mit der Identifizierung der Einzelkomponenten mittels der Massenspektrometrie. Dieses Verfahren ermöglicht den VOC-Nachweis im sub-ppb Bereich (McClennen et al., 1996; Wedel et al., 1998; Srivastava et al., 2004). Dazu ist jedoch in manchen Fällen eine vorangehende Konzentrationsanreicherung notwendig (Almasi et al., 1993).

Die Anwendung von Biosensoren zum Nachweis flüchtiger organischer Verbindungen beschränkt sich hauptsächlich auf die Messung dieser Substanzen in wässrigen Lösungen. Biosensoren für den Einsatz in der Gasphase sind in vergleichsweise geringem Maße untersucht. Für Methanol präsentieren Naessens & Tran-Minh (1998) ein Biosensorsystem unter der Verwendung von *Chlorella vulgaris* (SAG211-12). In kurzzeitigen Expositionsexperimenten kann die Wirkung von Methanoldämpfen auf die photosynthetische Sauerstoffentwicklung bei Methanolkonzentrationen unterhalb von 500 ppm demonstriert werden. In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen kann eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung in diesem Bereich festgestellt werden. Die niedrigste nachgewiesene Konzentration liegt bei 30 ppm und induzierte einen Rückgang der Sauerstoffentwicklung um 5 %. Mit dem *Klebsormidium*-Biosensor kann im Vergleich dazu eine Nachweisgrenze von 50 ppm erreicht werden. Das Biosensorsignal des

*Chlorella*-Biosensors ist dagegen nur bis zu einer Konzentration von 390 ppm vollständig reversibel. Loreto et al. (1999) beschreiben die Wirkung von Methanoldämpfen auf die Blattphotosynthese verschiedener Höherer Pflanzen. Innerhalb weniger Minuten kann eine sehr deutliche und reversible Abnahme von Gaswechsel und Elektronentransportrate festgestellt werden. Obwohl in diesen Experimenten wesentlich höhere Methanolkonzentrationen als in den hier durchgeführten Expositionsversuchen eingesetzt werden, beruhen die beobachteten Reaktionen vermutlich auf den gleichen o. g. Wirkungsweisen der VOCs, da Elektronentransportrate und  $\Delta F/F'_m$  eng miteinander verknüpft sind.

Zur Messung von Formaldehyddämpfen sind einige Enzymbiosensoren auf der Basis von Dehydrogenasen bekannt, Mikroalgen werden zu diesem Zweck bisher nicht eingesetzt. Unter Verwendung eines enzymbeschichteten Piezokristalls kann von Guilbault (1983) ein lineares Biosensorsignal im Bereich von 10 ppb bis 10 ppm ermittelt werden. Die mit Biosensorsystemen bisher erreichten Nachweisgrenzen für Formaldehyddämpfe zwischen 300 ppb (Hämmerle et al., 1996) oder 1 ppb (Dennison et al., 1996) zeigen die Funktionalität des entwickelten *Klebsormidium*-Biosensors, definiert man die Nachweisgrenze entweder als die statistisch signifikante LOEC von 10 ppb oder als die LOEC mit 3-facher Standardabweichung von ca. 100 ppb.

Mittels des entwickelten *Klebsormidium*-Biosensors kann sowohl für Methanol- als auch für Formaldehyddämpfe eine ausreichende Sensitivität zum Nachweis der praxisrelevanten MAK (maximale Arbeitsplatzkonzentration) erreicht werden. Die MAK beschreibt die bei täglich 8-stündiger Humanexposition höchstzulässige Schadstoffkonzentration und beträgt für Methanol 200 ppm (Mann et al., 2002) und für Formaldehyd 0,5 ppm (Schmid et al., 1994). Im Fall von Methanol läßt sich anhand der linearen Beziehung zwischen dem Biosensorsignal in Form von  $\Delta F/F'_m$  und der Methanolkonzentration im humantoxikologisch relevanten Bereich von 75 bis 350 ppm eine quantitative Bestimmung durchführen. Da für Formaldehyd keine Linearität des Biosensorsignals in Abhängigkeit von der Konzentration nachweisbar ist, wird hier die quantitative Konzentrationsbestimmung auf der Basis des sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Modells bei geringerer Genauigkeit ermöglicht.

Der Nachweis der VOCs kann innerhalb weniger Minuten durchgeführt werden. Um ein maximales Signal und eine bessere Reproduzierbarkeit zu erhalten, empfiehlt sich jedoch eine Meßdauer von mindestens 20 min. Für Formaldehyd kann in diesem Zeitraum eine

Sättigung des Signals erreicht werden. Zusammen mit der beobachteten Reversibilität erweist sich das System als geeignet zur kontinuierlichen Messung von Formaldehyd- und Methanoldämpfen. Wiederholte 60-minütige Expositionsexperimente über einen Zeitraum von 30 Tagen zeigen eine gute Reproduzierbarkeit des Biosensorsignals bei einer längeren Anwendungsdauer einer Biosensormembran. Der Effekt des kontinuierlichen Wachstums der Schichtdicke während des Experiments wird in diesem Versuchsansatz durch eine Inokulationsdichte von  $5 \mu\text{g Chlorophyll a cm}^{-2}$  minimiert (siehe auch Abschnitt IV.1.3).

#### IV.2.2. Herbizide

##### *Wirkungsweise*

Die eingesetzten Triazine (Atrazin, Simazin) und Harnstoffderivate (Diuron und Isoproturon) besetzen den Akzeptor der  $Q_B$ -Untereinheit am D1-Protein im Photosystem II (Mattoo et al., 1981; Pfister et al., 1981). Beide Gruppen interagieren jedoch mit jeweils verschiedenen Aminosäureresten des D1-Proteins (Youngman & Elstner, 1988; Draber et al., 1991). Die Wirkungsweise der PSII-Herbizide beruht auf der Unterbindung des Elektronentransports und damit auf der Verhinderung des Energietransfers von den angeregten Chlorophyllmolekülen. Ein Teil der absorbierten Lichtenergie wird somit verstärkt als Fluoreszenz abgegeben, als Konsequenz sinkt ebenfalls die effektive Quantenausbeute des Elektronentransports  $\div F/F'_m$  ab. Diese zu erwartenden Reaktionen können hier durch Applikation von PSII-Herbiziden an verschiedenen Mikroalgen nachgewiesen werden. Gleichzeitig dazu kann es außerdem zur Reaktion der angeregten Chlorophyllmoleküle mit molekularem Sauerstoff kommen. Es entsteht hochreaktiver Singulett-Sauerstoff, der zur Lipidoxidation in den Chloroplastenmembranen führt.

Das Bipyridyliumsalz Paraquat (Methylviologen) greift am Photosystem I (PSI) in die Photosyntheseprozesse ein. Im Gegensatz zu den PSII-Herbiziden kommt es nicht zur Unterbindung des Elektronentransports. Paraquat weist mit  $-446 \text{ mV}$  ein sehr negatives Redoxpotential auf und fungiert so als alternativer Elektronenakzeptor am PSI, wobei die Bildung von NADPH verhindert wird (Youngman & Elstner, 1988). Das nach der Reduktion durch Ferredoxin entstandene Paraquatradikal generiert außerdem freie Sauerstoffradikale (Hiyama et al., 1993; Moreland, 1993). Neben der langfristigen Schädigung der Pflanze durch die Unterbindung der Bildung der Reduktionsäquivalente wirkt Paraquat somit auch kurzfristig durch die Zerstörung der Integrität der Phospholipidmembranen (Moreland, 1993). Der in den Expositionsexperimenten mit

Paraquat beobachtete charakteristische Abfall der Fluoreszenz ist auf die starke reduzierende Wirkung von Paraquat am PSI zurückzuführen: Wie die Anregung des PSI durch dunkelrote Beleuchtung (Peterson, 1991; Consalvey et al., 2004) induziert Paraquat als stark elektronegativer terminaler Elektronenakzeptor eine verstärkte Oxidation des primären Elektronenakzeptors  $Q_A$  des PSII (Bukhov et al., 2001). Hieraus ergibt sich ein Abfall der Fluoreszenz  $F_t$ , bzw. ein Anstieg der effektiven Quantenausbeute des Elektronentransports  $\div F/F'_m$  (vgl. Abschnitt II.3.3).

#### *Nachweis von Herbiziden*

Als Standardmethoden der Herbizidanalytik werden die Gaschromatographie oder die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in Verbindung mit der Massenspektrometrie und oftmals einem vorangehenden Anreicherungsschritt durch die Festphasenextraktion eingesetzt (Oehmichen et al., 1987; Grandet et al., 1988; Reupert & Plöger, 1988; Schlett, 1991). Alternativ wird die sensitive Methode des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt (Weil et al., 1991; Ben Rejeb et al., 1998; Walker et al., 2000). Hiermit lassen sich Nachweisgrenzen bis in den Bereich einiger  $\text{pg l}^{-1}$  erreichen. Unter den Biosensoren werden Systeme auf der Basis von Mikroalgen oder anderen photosynthetisch aktiven Strukturen (isolierte Chloroplasten, PSII-Partikel) relativ häufig zur Messung photosynthetischer Herbizide angewandt (Giardi et al., 2001). Geringe Nachweisgrenzen werden mit Mikroalgen von Schreiber et al. (2002) mit  $0,014 \mu\text{g l}^{-1}$  für Diuron und von Vedrine et al. (2003) mit  $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$  für Simazin,  $0,25 \mu\text{g l}^{-1}$  für Atrazin und  $0,025 \mu\text{g l}^{-1}$  für Diuron und Isoproturon erreicht. Damit zeigt sich, daß die biosensorische Detektion von Herbiziden mittels der PAM-Chlorophyllfluorometrie im Rahmen der EU-Wasserrichtlinie (Europäische Union, 1998) mit Grenzwerten von  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$  für einzelne Herbizide unter der Nutzung von Mikroalgen möglich ist. Eine genügende Sensitivität wird ebenfalls durch die Verwendung immobilisierter Photosystem II-Partikel erzielt (Koblizek et al., 1998; Koblizek et al., 2002).

Unter Berücksichtigung der minimalen erreichten Nachweisgrenzen (Tabelle 10, S.54) genügt das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Biosensorsystem unter Verwendung von *Synechocystis* sp. für Diuron den Sensitivitätsanforderungen der EU-Wasserrichtlinie für einzelne Herbizide. Der für den Gesamtgehalt an Herbiziden vorgeschriebene Grenzwert von  $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$  (Europäische Union, 1998) ist bei Exposition mit Isoproturon nachweisbar. Für Atrazin, Simazin und Paraquat erweist sich das System als 5- bis 20-fach zu insensitiv,

---

kann jedoch dem Vergleich mit anderen bisher beschriebenen Biosensorsystemen standhalten: Brack & Frank (1998) analysieren die Chlorophyllfluoreszenz von *Chlamydomonas reinhardtii* und erreichten so eine Nachweisgrenze von  $4,1 \mu\text{g l}^{-1}$  für Simazin und  $140 \mu\text{g l}^{-1}$  für Paraquat. Der Nachweis von Atrazin und Simazin bis zu einem minimalen Grenzwert von  $2 \mu\text{g l}^{-1}$  und von Diuron bis  $0,23 \mu\text{g l}^{-1}$  wird von Naessens et al. (2000) durchgeführt. Freuse et al. (1998) entwickeln einen *Scenedesmus subspicatus*-Biosensor mit einer Nachweisgrenze von  $1-10 \mu\text{g l}^{-1}$ , abhängig von den Kulturbedingungen der Mikroalge. Des weiteren überschreiten die in der Umwelt gemessenen Herbizidkonzentrationen oftmals deutlich die definierten Grenzwerte und erfordern daher ebenfalls die Anpassung des Meßbereichs an höhere Konzentrationen; Atrazin ist z. B. in Konzentrationen von mehr als  $0,4 \text{ mg l}^{-1}$  in deutschen Oberflächengewässern nachweisbar (Umweltbundesamt, 1997). Ein weiterer Vorteil des Biosensorsystems ist die hohe Nachweisgeschwindigkeit für Herbizide im Bereich von wenigen Minuten. Hier zeigt sich die große Überlegenheit von Biosensorsystemen gegenüber vielen Test für Herbizidtoxizität im Zeitrahmen einiger Stunden bis Tage (z. B. EPA, 1994; Fairchild et al., 1997; Tang et al., 1997; Girling et al., 2000; Ma et al., 2003).

### **IV.3. Entwicklung eines selektiven Biosensors**

#### **IV.3.1. Biosensorische Methoden der selektiven Schadstoffmessung**

Biochips bieten die Möglichkeit der simultanen Verwendung einer Vielzahl biologischer Komponenten in einem Biosensorsystem. Werden Biochips zu Identifizierung verschiedenster chemischer oder biologischer Substanzen verwendet, nutzen diese oftmals immobilisierte Antikörper oder DNA: Diese Vorgehensweise erhält ihre Selektivität durch die jeweilige Spezifität der chipimmobilisierten biologischen Komponente des Biosensors (Vo-Dinh et al., 2001; Moreno-Bondi et al., 2003). Als Konsequenz daraus muß jedoch für jede selektiv zu detektierende Komponente eine dafür spezifische Sonde auf dem Biochip vorhanden sein. Die Kombination einer nichtselektiven biologischen Komponente mit der Analyse von spezifischen Reaktionen/Reaktionsmustern kann die Anzahl der nachweisbaren Substanzen vergrößern, ohne begleitend die Zahl der biologischen Komponenten zu erhöhen. Dieses Prinzip wird von Turner et al. (2001) demonstriert: Verschiedene Schadstoffe lassen sich mit einem bakteriellen Lumineszenzbiosensor auf Grund spezifischer Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Lumineszenz identifizieren. Durch die Analyse der Chlorophyllfluoreszenz von *Chlamydomonas reinhardtii* weisen Brack & Frank (1998) für verschiedene Umweltschadstoffe charakteristische Wirkungsmuster in der Fluoreszenzinduktionskinetik nach und schlagen diese zur Identifizierung der Schadstoffe vor.

#### **IV.3.2. Nutzung der unterschiedlichen Sensitivität von Mikroalgen zur Schadstoffidentifizierung**

Unterschiedliche Sensitivitäten verschiedener Organismen, insbesondere der Algen, gegenüber Umweltschadstoffen können häufig beobachtet werden. Im Hinblick auf die verschiedenen Schadstoffe treten jedoch in vielen Fällen keine generell sensitiven oder insensitiven Arten auf (Blanck et al., 1984; Fairchild et al., 1998). Ein Zusammenhang einer spezifischen Sensitivität gegenüber einem oder mehreren Schadstoffen und einer höheren taxonomischer Organisationsebene scheint ebenfalls oftmals nicht zu existieren (Dijkman et al., 1997; Fairchild et al., 1997; Rojickova-Padrtova & Marsalek, 1999). Die von Wängberg & Blanck (1988) beschriebenen signifikanten Unterschiede in der Wirkung von Schadstoffen auf zwei Gruppen von coccalen Grünalgen gegenüber der Schadwirkung auf Cyanobakterien zeigen jedoch ein gegenteiliges Ergebnis. Zu beobachtende Varianzen der Sensitivität auf Artebene, auch innerhalb einer Gattung, können ebenfalls sehr deutlich

sein (Blanck et al., 1984; Kent & Currie, 1995). Abd-El-Monem et al. (1998) weisen Unterschiede in der Sensitivität von zwei Stämmen von *Scenedesmus acutus* gegenüber Chrom, Kupfer und Zink nach.

Generell können diese beobachteten Unterschiede in der Sensitivität der Mikroalgen, sowohl zwischen verschiedenen Algen als auch die Sensitivität einer Alge gegenüber unterschiedlichen Schadstoffen, auf morphologische oder physiologische Eigenschaften der Organismen zurückzuführen sein. Z. B. führen Corre et al. (1996) die artspezifische Widerstandsfähigkeit von zwei *Chlorella*-Arten gegenüber Detergenzien auf die unterschiedliche Zellwandkomposition zurück. Im Fall von Atrazin korreliert die Sensitivität von fünf verschiedenen Mikroalgen vor allem mit der Menge des in die Zelle aufgenommenen Herbizids signifikant (Weiner et al., 2004). Die Atrazinsensitivität korreliert dagegen nicht mit anderen physiologischen Parametern wie Oberfläche, Biovolumen oder Trockengewicht. Verschiedene Kupfersensitivitäten bei *Scenedesmus* treten in Verbindung mit unterschiedlichen Mechanismen der Resistenzbildung auf: Ein Stamm absorbiert Kupfer an den Zellwänden (Twiss et al., 1993), ein anderer dagegen akkumuliert und detoxifiziert Kupfer innerhalb der Zelle (Nalewajko & Olaveson, 1995). Auf enzymatischer Ebene demonstrieren Kirso & Irha (1998) eine von den Umsatzraten verschiedener Enzyme abhängige Detoxifikationsleistung verschiedener Makroalgen für polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. Auch Umweltfaktoren können die Resistenz/Sensitivität von Algen gegenüber Schadstoffen beeinflussen. Berard et al. (1999) weisen den Einfluß von Jahreszeit und Temperatur auf die Atrazinsensitivität von *Oscillatoria* nach. Die spezifischen Sensitivitäten der Algen sind nicht nur durch die hier dargestellten verschiedenen Faktoren unterschiedlich ausgeprägt. So können sich z. B. über einen längeren Zeitraum als Anpassung an Umweltveränderungen erhöhte Resistenzen ausbilden (Soldo & Behra, 2000; Costas et al., 2001). Betrachtet man die Vielzahl und Verschiedenheit der weltweiten Habitate von Mikroalgen, könnte sich darin die große Diversität in den Sensitivitäten von Algen gegenüber verschiedensten Schadstoffen begründen, die im Laufe der Evolution erworben worden ist.

#### *Identifikation von VOCs mittels der Reaktionsrate*

Die o. g. Diversität in der Ausprägung der Sensitivität gegenüber toxischen Substanzen kann die unterschiedlich starken Reaktionen der chipimmobilisierten Mikroalgen gegenüber den VOCs und Herbiziden erklären.

Unterschiedliche Sensitivitäten der hier eingesetzten Mikroalgen gegenüber Methanol bzw. Formaldehyd könnten möglicherweise als Folge verschiedener Sensitivitäten des wasserspaltenden Komplexes oder unterschiedlicher Effizienzen der Enzyme des Methanol/Formaldehyd oxidierenden Stoffwechselwegs entstehen. Eine biochemisch basierte Beeinflussung der Photosynthese durch Methanoldämpfe wird auch von Loreto et al. (1999) für verschiedene methanolsensitive Höhere Pflanzen angenommen. Überraschenderweise scheint die An- oder Abwesenheit einer Zellwand keinen entscheidenden Einfluß auf die VOC-Sensitivität von Algen zu haben. Die zellwandlose *Chlamydomonas*-Mutante zeigt eine deutlich geringe Methanolsensitivität im Vergleich zu den *Klebsormidium*-Stämmen, die eine relativ stark ausgebildete Zellwand besitzen.

Eine signifikant unterschiedliche Sensitivität gegenüber Formaldehyd und Methanol zwischen zwei *Klebsormidium*-Stämmen und *Chlorella vulgaris* sowie zwischen den beiden VOCs kann zur eindeutigen Identifizierung der beiden VOCs genutzt werden. Die Sensitivitätsunterschiede lassen sich durch die ebenfalls signifikant VOC-spezifische Reaktionsrate, gebildet aus den Biosensorsignalen der beiden *Klebsormidium*-Stämme, beschreiben. Der verwendete *Chlorella*-Stamm wird in verschiedenen Biotests zur Umweltüberwachung eingesetzt (z. B. van der Heever & Grobbelaar, 1997; Vedrine et al., 2003). Seine Reaktion auf VOCs ist in den durchgeführten Experimenten deutlich geringer als die der *Klebsormidium*-Stämme. *Chlorella vulgaris* kann jedoch trotzdem als zusätzlicher Marker zur Unterscheidung zwischen Methanol und Formaldehyd verwendet werden.

#### *Identifikation der Herbizide durch spezifische Wirkungsmuster*

Der Identifizierung von toxischen Verbindungen anhand der spezifischen Wirkungsmuster nach der hier entwickelten Methodik liegt ebenfalls die Diversität und Schadstoffspezifität der verschiedenen Mikroalgenstämme zu Grunde. Die Nutzung der komplexen Wirkungsmuster zur biosensorischen Schadstoffidentifikation wird am Beispiel der Herbizide demonstriert. Zur Berechnung der einzelnen Reaktionsraten ist für beide Stämme eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung im selben Konzentrationsbereich erforderlich - gleichbedeutend mit einem niedrigen, aber signifikanten Unterschied in der Herbizidsensitivität. In toxikologischen Studien mit Herbiziden aus der Gruppe der Triazine und Harnstoffderivate zeigen sich zwischen verschiedenen Mikroalgen Unterschiede in der Sensitivität, die eine Variabilität der EC<sub>50</sub> bis zu einem Faktor von

---

100.000 aufweisen (Blanck et al., 1984; Tang et al., 1997; Rojickova-Padrtova & Marsalek, 1999). Überraschenderweise findet sich hier in den 33 auf ihre Herbizidsensitivität überprüften Mikroalgen verschiedener Gruppen eine Variabilität von einem Faktor von ungefähr 10. Die Auswahl der neun sensitivsten Stämme zur Berechnung der Wirkungsmuster reduziert diese Variabilität erneut und vergrößert so den gemeinsamen linearen Konzentrationsbereichs des Biosensorsignals von zwei verschiedenen Algenstämmen.

Im Rahmen der definierten Konzentrationsbereiche (Tabelle 13, S.61) kann für Isoproturon und Simazin eine vergleichsweise sehr geringe Abweichung der Wirkungsmuster RP1 und RP2 identischer Herbizide (<20 %) festgestellt werden. Für Atrazin und Diuron ist diese Abweichung mit über 40 % höher und unterscheidet sich weniger deutlich von den anderen drei getesteten Herbiziden. Die Identifikation von Paraquat anhand der Wirkungsmuster kann nicht durchgeführt werden, da nur ein Algenstamm eine ausreichende Sensitivität zeigte. Paraquat zeigt jedoch im Gegensatz zu den anderen Herbiziden einen eindeutig charakteristischen Abfall des Fluoreszenzsignals  $F_t$ .

Das Prinzip der Identifizierung von Herbiziden anhand der Wirkungsmuster kann im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich demonstriert werden. Dennoch wäre eine höhere Spezifität dieser biodiversitätsbasierten Methode auch im Hinblick auf eine Abschätzung der Anwendungsmöglichkeiten wünschenswert. Um ein spezifischeres Wirkungsmuster zu erhalten, ist eine Verminderung der Variabilität des Biosensorsignals innerhalb der Experimentwiederholungen erforderlich. Zur Abdeckung einer größeren Breite an biologischem Material innerhalb der parallelen Expositionsexperimente werden bisher Algenkulturen verwendet, die zufällig im Alter von 14 - 28 d (siehe Abschnitte II.1.1) aus unterschiedlichen Batchkulturen geerntet werden. Ein Einfluß des Alters der Algenkultur auf die herbizidinduzierten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz der Algen kann jedoch von Conrad et al. (1993) gezeigt werden. Dies kann somit in der hier verwendeten experimentellen Anordnung zu einer größeren Variabilität gegenüber biologisch homogenem Material führen. Daher erscheint eine Verwendung von kontinuierlichen Kulturen oder die Bevorratung von homogenem Material durch Cryopreservation der Biosensormembranen in zukünftigen Untersuchungen empfehlenswert.

#### **IV.4. Optimierung von Sensitivität und Selektivität des Biosensors**

Die Erhöhung der Sensitivität des Biosensors kann zum einen durch die Auswahl weiterer, sensitiver Mikroalgenstämme in einem Screening-Programm erfolgen. Zum anderen kann durch die Herstellung herbizidsensitiver Mutanten eine bis zu 10-fache Erhöhung der Sensitivität gegenüber dem Wildtyp erreicht werden (Patrik et al., 1991). Auch die zuvor diskutierte Abhängigkeit der Sensitivität von der Immobilisierungsdichte und die verschiedenen Verfahren der Fluoreszenzmessung bieten Optimierungsmöglichkeiten der hier entwickelten Algenbiosensorsysteme. Verwenden Fluoreszenzmeßsysteme eine blaue anstelle einer roten Anregungsbeleuchtung (wie z.B. das IMAGING-PAM), läßt sich ein Fluoreszenzsignal in einem breiteren Wellenlängenbereich (siehe Tabelle 4, S.26) mit deutlich höherer Intensität messen (Büchel & Wilhelm, 1993). Die gesteigerte Meßsensitivität ermöglicht wiederum eine geringere Immobilisierungsdichte.

Eine ausreichende Selektivität zur Identifizierung von Schadstoffen aus einer Gruppe von zwei bzw. fünf verschiedenen Verbindungen kann in dieser Arbeit sowohl unter der Verwendung von Algen einer Gattung, als auch unter Nutzung einer größeren taxonomischen Breite bei gleichzeitig ähnlicher Sensitivität demonstriert werden. Soll die Anzahl der meßbaren Schadstoffe erhöht werden, empfehlen Wängberg & Blanck (1988) die Verwendung einer möglichst großen taxonomischen Breite an Mikroalgen in Toxizitätstests. Da jedoch in vielen Fällen die Sensitivitätsunterschiede den Faktor 1.000 deutlich überschreiten (Blanck et al., 1984), eignet sich diese Strategie nicht für das hier angewandte Identifikationsverfahren, denn für die Berechnung der schadstoffspezifischen Wirkungsmuster müssen Konzentrationsbereiche einer gemeinsamen Sensitivität zwischen den Algen bestehen. Vielmehr müßte eine Kombination der taxonomischen Breite mit einer Überschneidung der Sensitivität angestrebt werden. Das könnte z. B. durch die Nutzung mehrerer, taxonomisch verschiedener Gruppen mit geringen, aber distinkten Sensitivitätsunterschieden innerhalb einer Gruppe realisiert werden.

Die selektive Messung von Schadstoffen in Schadstoffmischungen ist unter der Verwendung von biologischen Systemen ein noch ungelöstes Problem. Die Toxizität von Herbizidmischungen gegenüber Mikroalgen kann in einigen Fällen durch das Modell der additiven Wirkung beschrieben werden (Faust et al., 2001; Junghans et al., 2003), die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls für eine Mischung aus Diuron und Atrazin festgestellt werden kann. Dagegen lassen sich kombinatorische Effekte dieser Substanzen in anderen

---

Untersuchungen nachweisen (Faust et al., 2003), bzw. kann die Toxizität durch beide Modelle erklärt werden (Backhaus et al., 2004). Die Komplexität dieser Zusammenhänge und vor allem die große Anzahl an potentiellen Schadstoffmischungen machen eine Identifizierung von verschiedenen, simultan auftretenden Schadstoffen mittels der hier entwickelten Methode der Analyse der Wirkungsmuster nicht anwendbar. Durch eine Kombination des ASC mit einer von Altamirano et al. (2004) am Beispiel von TNT demonstrierten Methode wäre jedoch eine deutliche Verbesserung der Selektivität bei Messung in Schadstoffmischungen zu erzielen: Eine spezifisch resistente Mutante dient der Erzeugung der Selektivität, eine weitere sensitive Alge generiert dagegen das empfindliche Biosensorsignal. Zur Verfolgung dieses Ansatzes muß für jeden zu messenden Stoff oder jede Stoffgruppe eine spezifische Mutante hergestellt werden.

Das ASC-System erweist sich durch die auf der Array-Chip-Immobilisierung basierende hohe Screeningkapazität verschiedener Mikroalgenstämme als sehr effizient. Auch im Hinblick auf die hier dargestellten Optimierungsmöglichkeiten von Sensitivität und Selektivität empfiehlt sich weiterhin die Nutzung dieses Meßsystems.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die technische und methodische Entwicklung eines selektiven Biosensorsystems auf der Basis immobilisierter Mikroalgen war Ziel der vorliegenden Arbeit. Schwerpunkte sollten auf folgende Aspekte gelegt werden:

- (1) Die Optimierung der Langzeitstabilität von immobilisierten Mikroalgen zum Einsatz in einem Biosensor
- (2) Die Entwicklung von Mikroalgenbiosensoren und die anschließende Charakterisierung der Funktionsweise bezüglich der Eignung zur Messung von gasförmigen und wassergelösten Schadstoffen
- (3) Die Entwicklung eines schadstoffselektiven Meßverfahrens

Die Basis dafür bildet die hier durchgeführte Entwicklung eines neuen Verfahrens zur stabilen Immobilisierung von Mikroalgen. Die Methode ist auf der Trennung von immobilisierten Kulturen und dem kontinuierlichen Kulturmedienstrom durch eine semipermeable Membran begründet. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen konnte so eine physiologische Stabilität diverser Algen aus unterschiedlichen Taxa nachweislich aufrecht erhalten werden.

Unter Nutzung der entwickelten Immobilisierungstechnik wurde ein Biosensorsystem konstruiert. Als Signal des Biosensors wurde die Chlorophyllfluoreszenz der photosynthetischen Organismen herangezogen. Die PAM-Chlorophyllfluorometrie diente der nichtinvasiven Messung des Signals. Eine simultane Nutzung von verschiedenen Mikroalgenstämmen wurde durch die Entwicklung von Array-Biochips in Verbindung mit einer Fluoreszenz-Imaging Technik ermöglicht.

Zur Charakterisierung des Biosensors wurden u. a. gasförmige und wassergelöste Schadstoffe im toxikologisch relevanten Meßbereich eingesetzt. Dämpfe der flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) Methanol- (50-500 ppm) und Formaldehyddämpfe (0,01-10 ppm) ließen sich durch das konzentrationsabhängige Biosensorsignal der Grünalge *Klebsormidium* innerhalb weniger Minuten signifikant nachweisen. Das reversible Signal ließ sich außerdem über einen Zeitraum von 30 Tagen in wiederholten Expositionsexperimenten reproduzieren. In einer wässrigen Lösung konnten mittels verschiedener Mikroalgen die Herbizide Atrazin, Simazin, Diuron, Isoproturon und Paraquat in kurzer Zeit nachgewiesen werden. Die erreichten Nachweisgrenzen lagen je

nach verwendeter Alge und Herbizid zwischen 0,1 und 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Eine ausreichende Sensitivität gemäß der aktuellen EU-Wasserrichtlinie konnte für Diuron mittels eines *Synechocystis*-Biosensors erzielt werden. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des Biosensorsignals in den entwickelten Systemen von technischen Gegebenheiten wie Immobilisierungsdichte der Mikroalgen, Temperatur und Expositionsdauer festgestellt.

Um die Selektivität des Biosensors zu erhöhen, wurden die unterschiedlichen Sensitivitäten der Algen genutzt. Methanol und Formaldehyd konnten signifikant anhand der Reaktionsrate, d. h. dem Quotient der Biosensorsignale von zwei *Klebsormidium*-Stämmen identifiziert werden. Mit Hilfe der gleichen Methodik wurde für jedes von fünf Herbiziden ein spezifisches Wirkungsmuster (RP1) erstellt, das auf den Biosensorsignalen von neun Algenstämmen basiert. Zur Evaluierung der Selektivität wurde ein weiterer Satz der gleichen Wirkungsmuster (RP2) erstellt. Im Vergleich der Wirkungsmuster RP1 und RP2 zeigte sich eine relativ hohe Übereinstimmung zwischen identischen Herbiziden, während höhere Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Herbiziden zu beobachten waren.

Das hier entwickelte Biosensorsystem in Kombination mit dem diversitätsbasierten Identifikationsverfahren erwies sich als prinzipiell geeignet zur selektiven Messung von Schadstoffen in Echtzeit. Zukünftige Untersuchungen sollten jedoch besonders im Hinblick auf eine weitere Verbesserung von Selektivität und Sensitivität erfolgen. Die Verwendung von selektiven oder sensitiven Mutanten erscheint zu diesem Zweck besonders geeignet.

## VI. LITERATUR

- Abd-El-Monem, H. M., Corradi, M. G. & Gorbi, G. (1998). Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environmental and Experimental Botany* **40**: 59-66.
- Almasi, E., Kirshen, N. & Kern, H. (1993). The determination of sub part-per-billion levels of volatile organic-compounds in air by preconcentration from small sample volumes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **52**: 39-48.
- Altamirano, M., Garcia-Villada, L., Agrelo, M., Sanchez-Martin, L., Martin-Otero, L., Flores-Moya, A., Rico, M., Lopez-Rodas, V. & Costas, E. (2004). A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT. *Biosensors and Bioelectronics* **19**: 1319-1323.
- Andersen, R. A. (1992). Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* **1**: 267-292.
- Andersson, K., Bakke, J. V., Bjørseth, O., Bornehag, C. G., Clausen, G., Hongso, J. K., Kjellman, M., Kjærgaard, S., Levy, F., Mølhav, L., Skerfving, S. & Sundell, J. (1997). TVOC and health in non-industrial indoor environments - Report from a Nordic scientific consensus meeting at Langholmen in Stockholm, 1996. *Indoor Air - International Journal of Indoor Air Quality and Climate* **7**: 78-91.
- Avramescu, A., Rouillon, R. & Carpentier, R. (1999). Potential for use of a cyanobacterium *Synechocystis* sp. immobilized in poly(vinylalcohol): application to the detection of pollutants. *Biotechnology Techniques* **13**: 559-562.
- Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Gramatica, P., Vighi, M. & Grimme, L. H. (2004). Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 258-264.
- Bailliez, C., Largeau, C., Berkaloff, C. & Casadevall, E. (1986). Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate - Influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**: 361-366.
- Baker, N. R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **81**: 563-570.

- Barie, N. & Rapp, M. (2001). Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 979-987.
- Barranguet, C., Charantoni, E., Plans, M. & Admiraal, W. (2000). Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *European Journal of Phycology* **35**: 397-406.
- Barranguet, C., Plans, M., van der Grinten, E., Sinke, J. J. & Admiraal, W. (2002). Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**: 1955-1965.
- Bäumner, A. J. (2003). Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**: 434-445.
- Beardall, J., Young, E. & Roberts, S. (2001). Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences* **63**: 44-69.
- Ben Rejeb, S., Fischer-Durand, N., Martel, A., Le Goffic, F., Lawrence, J. F., Yeung, J. M. & Abbott, M. A. (1998). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for the detection of the herbicide isoproturon in water matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **69**: 13-30.
- Berard, A., Leboulanger, C. & Pelte, T. (1999). Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: influence of season and temperature. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**: 472-479.
- Björkmann, O. & Demming, B. (1987). Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504.
- Blanck, H., Wallin, G. & Wängberg, S.-Å. (1984). Species dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **8**: 339-351.
- Bouchardy, C., Schüler, G., Minder, C., Hotz, P., Bousquet, A., Levi, F., Fisch, T., Torhorst, J. & Raymond, L. (2002). Cancer risk by occupation and socioeconomic group among men - A study by The Association of Swiss Cancer Registries. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* **28**: 1-88.
- Bozeman, J., Koopman, B. & Bitton, G. (1989). Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology* **14**: 345-352.

- Brack, W. & Frank, H. (1998). Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **40**: 34-41.
- Bringmann, G. & Kuhn, R. (1980). Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test. *Water Research* **14**: 231-241.
- Brouers, M., de Jong, H., Shi, D. J. & Hall, D. O. (1988). Immobilized cyanobacteria for sustained ammonia production. In: Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.-C. et al. (Hrsg.): *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London: 265 ff.
- Büchel, C. & Wilhelm, C. (1993). In-vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae - Progress, problems and perspectives. *Photochemistry and Photobiology* **58**: 137-148.
- Bukhov, N., Egorova, E., Krendeleva, T., Rubin, A., Wiese, C. & Heber, U. (2001). Relaxation of variable chlorophyll fluorescence after illumination of dark-adapted barley leaves as influenced by the redox states of electron carriers. *Photosynthesis Research* **70**: 155-166.
- Buschmann, C., Langsdorf, G. & Lichtenthaler, H. K. (2000). Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: an overview. *Photosynthetica* **38**: 483-491.
- Butler, W. L. & Kitajima, M. (1975). Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **376**: 116-125.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P. & Saoncella, A. (2001). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research* **35**: 69-76.
- Chen, Y. C. (2003). Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. *Journal of Applied Phycology* **15**: 439-444.
- Clark, L. C. & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**: 29-45.
- Codd, G. A. (1987). Algal immobilization for biotechnology. *British Phycological Journal* **22**: 302-302.
- Conrad, R., Büchel, C., Wilhelm, C., Arsalane, W., Berkaloff, C. & Duval, J. C. (1993). Changes in yield in in-vivo fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring. *Journal of Applied Phycology* **5**: 505-516.

- Consalvey, M., Jesus, B., Perkins, R. G., Brotas, V., Underwood, G. J. C. & Paterson, D. M. (2004). Monitoring migration and measuring biomass in benthic biofilms: the effects of dark/far-red adaptation and vertical migration on fluorescence measurements. *Photosynthesis Research* **81**: 91-101.
- Corre, G., Templier, J., Largeau, C., Rousseau, B. & Berkaloff, C. (1996). Influence of cell wall composition on the resistance of two *Chlorella* species (Chlorophyta) to detergents. *Journal of Phycology* **32**: 584-590.
- Cossins, E. A. (1964). Utilization of carbon-1 compounds by plants. I. Metabolism of methanol-C<sup>14</sup> and its role in amino acid biosynthesis. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **42**: 1793-1802.
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L. M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J. & Lopez-Rodas, V. (2001). Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* **40**: 391-398.
- Dennison, M. J., Hall, J. M. & Turner, A. P. F. (1996). Direct monitoring of formaldehyde vapour and detection of ethanol vapour using dehydrogenase-based biosensors. *Analyst* **121**: 1769-1773.
- Dijkman, N. A., van Vlaardingen, P. L. A. & Admiraal, W. A. (1997). Biological variation in sensitivity to N-heterocyclic PAHs: effects of acridine on seven species of micro-algae. *Environmental Pollution* **95**: 121-126.
- Doman, N. G. & Romanova, A. K. (1962). Transformation of labeled formic acid, formaldehyde, methanol, and CO<sub>2</sub> absorbed by bean and barley leaves from air. *Plant Physiology* **37**: 833-840.
- Draber, W., Tietjen, K., Kluth, J. F. & Trebst, A. (1991). Herbicides in photosynthesis research. *Angewandte Chemie - International Edition in English* **30**: 1621-1633.
- Durrieu, C., Chouteau, C., Barthet, L., Chovelon, J. M. & Tran-Minh, C. (2004). A bi-enzymatic whole-cell algal biosensor for monitoring waste water pollutants. *Analytical Letters* **37**: 1589-1599.
- Durrieu, C. & Tran-Minh, C. (2002). Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**: 206-209.

- Endo, T., Schreiber, U. & Asada, K. (1995). Suppression of quantum yield of photosystem II by hyperosmotic stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1253-1258.
- EPA (1994). 96-hour static toxicity test using *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Agency of the United States: 1-5.
- Eullaffroy, P., Popovic, R. & Franck, F. (1998). Changes of chlorophyll(ide) fluorescence yield induced by a short light pulse as a probe to monitor the early steps of etioplast phototransformation in dark-grown leaves. *Photochemistry and Photobiology* **67**: 676-682.
- Europäische Union (1998). Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998
- Europäische Union (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000
- Europäische Union (2001). Decision No. 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001
- Faafeng, B. A., Vandonk, E. & Källqvist, S. T. (1994). In situ measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae. *Journal of Applied Phycology* **6**: 301-308.
- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S. & Carlson, A. R. (1998). Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 1830-1834.
- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., Haverland, P. S. & Carlson, A. R. (1997). Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **32**: 353-357.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Bodeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M. & Grimme, L. H. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* **56**: 13-32.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Bodeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M. & Grimme, L. H. (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology* **63**: 43-63.
- Feyziev, Y. M., Yoneda, D., Yoshii, T., Katsuta, N., Kawamori, A. & Watanabe, Y. (2000). Formate-induced inhibition of the water-oxidizing complex of photosystem II studied by EPR. *Biochemistry* **39**: 3848-3855.

- Figueroa, F. L., Jimenez, C., Lubian, L. M., Montero, O., Lebert, M. & Häder, D. P. (1997). Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana* Lubian (Eustigmatophyceae). *Journal of Plant Physiology* **151**: 6-15.
- Force, D. A., Randall, D. W., Lorigan, G. A., Clemens, K. L. & Britt, R. D. (1998). ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of photosystem II. *Journal of the American Chemical Society* **120**: 13321-13333.
- Fore, L. S. & Grafe, C. (2002). Using diatoms to assess the biological condition of large rivers in Idaho (USA). *Freshwater Biology* **47**: 2015-2037.
- Frense, D., Müller, A. & Beckmann, D. (1998). Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sensors and Actuators B - Chemical* **51**: 256-260.
- Geis, S. W., Fleming, K. L., Korthals, E. T., Searle, G., Reynolds, L. & Karner, D. A. (2000). Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 36-41.
- Genty, B., Briantais, J. M. & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**: 87-92.
- Giardi, M. T., Koblizek, M. & Masojidek, J. (2001). Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 1027-1033.
- Girling, A. E., Pascoe, D., Janssen, C. R., Peither, A., Wenzel, A., Schäfer, H., Neumeier, B., Mitchell, G. C., Taylor, E. J., Maund, S. J., Lay, J. P., Jüttner, I., Crossland, N. O., Stephenson, R. R. & Personne, G. (2000). Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**: 148-176.
- Gitelson, A. A., Buschmann, C. & Lichtenthaler, H. K. (1998). Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* **152**: 283-296.
- Grandet, M., Weil, L. & Quentin, K. E. (1988). Determination of triazine-herbicides and their metabolites in water samples by gas-chromatography. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasserforschung - Journal for Water and Wastewater Research* **21**: 21-24.

- Gregor, J. & Marsalek, B. (2004). Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll alpha: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research* **38**: 517-522.
- Guilbault, G. G. (1983). Determination of formaldehyde with an enzyme-coated piezoelectric crystal detector. *Analytical Chemistry* **55**: 1682-1684.
- Hall, E. A. H. (1995). *Biosensoren*. Springer, Berlin.
- Hämmerle, M., Hall, E. A. H., Cade, N. & Hodgins, D. (1996). Electrochemical enzyme sensor for formaldehyde operating in the gas phase. *Biosensors and Bioelectronics* **11**: 239-246.
- Han, B. P., Virtanen, M., Koponen, J. & Straskraba, M. (2000). Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. *Journal of Plankton Research* **22**: 865-885.
- Hanninen, O., Ruuskanen, J. & Oksanen, J. (1993). A method for facilitating the use of algae growing on tree trunks as bioindicators of air quality. *Environmental Monitoring and Assessment* **28**: 215-220.
- Hayat, M. A. (1989). *Electron Microscopy*. The MacMillan Press Ltd., Houndmills, Basingstoke, Hampshire.
- van der Heever, J. A. & Grobbelaar, J. U. (1997). The use of oxygen evolution to assess the short-term effects of toxicants on algal photosynthetic rates. *Water South Africa* **23**: 233-237.
- Henke, L. & Krull, U. J. (1999). Immobilization technologies used for nucleic acid biosensors: a review. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **44**: 61-70.
- Herschkovitz, Y., Eshkenazi, I., Campbell, C. E. & Rishpon, J. (2000). An electrochemical biosensor for formaldehyde. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **491**: 182-187.
- Hiscox, J. D. & Israelstam, G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* **57**: 1332-1334.
- Hiyama, T., Ohinata, A. & Kobayashi, S. (1993). Paraquat (methylviologen) - Its interference with primary photochemical reactions. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* **48**: 374-378.
- Hoffmann, J. P. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology* **34**: 757-763.

- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **167**: 191-194.
- Juneau, P. & Popovic, R. (1999). Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application. *Ecotoxicology* **8**: 449-455.
- Juneau, P., Sumitomo, H., Matsui, S., Itoh, S., Kim, S. G. & Popovic, R. (2003). Use of chlorophyll fluorescence of *Closterium ehrenbergii* and *Lemna gibba* for toxic effect evaluation of sewage treatment plant effluent and its hydrophobic components. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**: 1-8.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M. & Grimme, L. H. (2003). Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Management Science* **59**: 1101-1110.
- Karube, I., Yano, K., Sasaki, S., Nomura, Y. & Ikebukuro, K. (1998). Biosensors for environmental monitoring. In: Laskin, A. I., Li, G.-X. & Yu, Y.-T. (Hrsg.): *Enzyme Engineering XIV*. New York Academy of Sciences, New York: 23 ff.
- Kent, R. A. & Currie, D. (1995). Predicting algal sensitivity to a pesticide stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**: 983-991.
- Khattar, J. I. S., Sarma, T. A. & Singh, D. P. (1999). Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* **25**: 564-568.
- Kirso, U. & Irha, N. (1998). Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **41**: 83-89.
- Koblizek, M., Maly, J., Masojidek, J., Komenda, J., Kucera, T., Giardi, M. T., Mattoo, A. K. & Pilloton, R. (2002). A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using photosystem II coupled to a screen-printed electrode. *Biotechnology and Bioengineering* **78**: 110-116.
- Koblizek, M., Masojidek, J., Komenda, J., Kucera, T., Pilloton, R., Mattoo, A. K. & Giardi, M. T. (1998). A sensitive photosystem II-based biosensor for detection of a class of herbicides. *Biotechnology and Bioengineering* **60**: 664-669.
- Kotzabasis, K., Hatziathanasiou, A., Bengoa-Ruigomez, M. V., Kentouri, M. & Divanach, P. (1999). Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of

- the microalgae *Chlorella minutissima*: role of the concentration and frequency of administration. *Journal of Biotechnology* **70**: 357-362.
- Krause, G. H. M. & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 313-349.
- Largeau, C., Bailliez, C., Yang, L. W., Frenz, J. & Casadevall, E. (1988). Immobilization of the microalga *Botryococcus braunii* in calcium alginate gels and in polyurethane foams. In: Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.-C. et al (Hrsg.): *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London: 245 ff.
- Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J. & Mulchandani, A. (2004). Whole cell-enzyme hybrid amperometric biosensor for direct determination of organophosphorous nerve agents with p-nitrophenyl substituent. *Biotechnology and Bioengineering* **85**: 706-713.
- Lippemeier, S., Hintze, R., Vanselow, K. H., Hartig, P. & Colijn, F. (2001). In-line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects of fluctuating nutrient supply on photosynthesis. *European Journal of Phycology* **36**: 89-100.
- Loreto, F., Tricoli, D., Centritto, M., Alvino, A. & Delfino, S. (1999). Short-term effects of fumigation with gaseous methanol on photosynthesis in horticultural plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**: 377-380.
- Lukavsky, J. (1988). Long-term preservation of algal strains by immobilization. *Archiv für Protistenkunde* **135**: 65-68.
- Ma, J., Lin, F., Wang, S. & Xu, L. (2003). Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **71**: 594-601.
- Mahan, J. R., Dotray, P. A. & Light, G. G. (2004). Thermal dependence of enzyme function and inhibition; implications for herbicide efficacy and tolerance. *Physiologia Plantarum* **120**: 187-195.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*. **15**: 377-390.
- Mann, W. J., Muttray, A., Schäfer, D., Klimek, L., Faas, M. & Konietzko, J. (2002). Exposure to 200 ppm of methanol increases the concentrations of interleukin-1 beta and interleukin-8 in nasal secretions of healthy volunteers. *Annals of Otolaryngology Rhinology and Laryngology* **111**: 633-638.

- Marshall, H. L., Geider, R. J. & Flynn, K. J. (2000). A mechanistic model of photoinhibition. *New Phytologist* **145**: 347-359.
- Mattoo, A. K., Pick, U., Hoffman-Falk, H. & Edelman, M. (1981). The rapidly metabolized 32,000-Dalton polypeptide of the chloroplast is the proteinaceous shield regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences* **78**: 1572-1576.
- Maxwell, K. & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- McClennen, W. H., Vaughn, C. L., Cole, P. A., Sheya, S. N., Wager, D. J., Mott, T. J., Dworzanski, J. P., Arnold, N. S. & Meuzelaar, H. L. C. (1996). Roving GC/MS: mapping VOC gradients and trends in space and time. *Field Analytical Chemistry and Technology* **1**: 109-116.
- McCormick, P. V. & Cairns, J. (1994). Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology* **6**: 509-526.
- McFadden, G. I. & Melkonian, M. (1986). Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. *Phycologia* **25**: 551-557.
- McGiffen, M. E. & Manthey, J. A. (1996). The role of methanol in promoting plant growth: a current evaluation. *Hortscience* **31**: 1092-1096.
- Milligan, A. J. & Harrison, P. J. (2000). Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **36**: 78-86.
- Montero, O., Sobrino, C., Pares, G. & Lubian, L. M. (2002). Photoinhibition and recovery after selective short-term exposure to solar radiation of five chlorophyll c-containing marine microalgae. *Ciencias Marinas* **28**: 223-236.
- Moreland, D. E. (1993). Research on biochemistry of herbicides - An historical overview. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* **48**: 121-131.
- Moreno-Bondi, M. C., Alarie, J. P. & Vo-Dinh, T. (2003). Multi-analyte analysis system using an antibody-based biochip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**: 120-124.
- Naessens, M., Leclerc, J. C. & Tran-Minh, C. (2000). Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **46**: 181-185.

- Naessens, M. & Tran-Minh, C. (1998a). Whole-cell biosensor for determination of volatile organic compounds in the form of aerosols. *Analytica Chimica Acta* **364**: 153-158.
- Naessens, M. & Tran-Minh, C. (1998b). Whole-cell biosensor for direct determination of solvent vapours. *Biosensors and Bioelectronics* **13**: 341-346.
- Naessens, M. & Tran-Minh, C. (1999). Biosensor using immobilized *Chlorella* microalgae for determination of volatile organic compounds. *Sensors and Actuators B - Chemical* **59**: 100-102.
- Nalewajko, C. & Olaveson, M. M. (1995). Differential responses of growth, photosynthesis, respiration, and phosphate uptake to copper in copper-tolerant and intolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Canadian Journal of Botany* **73**: 1295-1303.
- Oehmichen, U., Karrenbrock, F. & Haberer, K. (1987). Determination of N-pesticides in natural waters. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* **327**: 715-719.
- Pandard, P. & Rawson, D. M. (1993). An amperometric algal biosensor for herbicide detection employing a carbon cathode oxygen electrode. *Environmental Toxicology and Water Quality* **8**: 323-333.
- Pastrik, K. H., Karst, U. & Schmid, R. D. (1991). Cyanobacteria mutants with increased sensitivity to herbicides - An improved biological material for biosensors. *Journal for Water and Wastewater Research* **24**: 12-15.
- Peterson, R. B. (1991). Analysis of changes in minimal and maximal fluorescence yields with irradiance and O<sub>2</sub> level in tobacco leaf tissue. *Plant Physiology* **96**: 172-177.
- Pfister, K., Steinback, K. E., Gardner, G. & Arntzen, C. J. (1981). Photoaffinity labeling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences* **78**: 981-985.
- Pipe, A. E. (1992). Pesticide effects on soil algae and cyanobacteria. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **127**: 95-170.
- Radway, J. C., Wilde, E. W., Whitaker, M. J. & Weissman, J. C. (2001). Screening of algal strains for metal removal capabilities. *Journal of Applied Phycology* **13**: 451-455.
- Rai, L. C., Kumar, H. D., Mohn, F. H. & Soeder, C. J. (2000). Services of algae to the environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**: 119-136.
- Rawson, D. M., Willmer, A. J. & Cardosi, M. F. (1987). The development of whole cell biosensors for online screening of herbicide pollution of surface waters. *Toxicity Assessment* **2**: 325-340.

- 
- Reupert, R. & Plöger, E. (1988). Determination of nitrogen-containing pesticides by HPLC with diode-array detection. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* **331**: 503-509.
- Riedel, K., Kuntze, K. & König, A. (2003). *Biosensoren für die Umweltkontrolle*. Oldenbourg Industrieverlag, München.
- Robinson, P. K., Mak, A. L. & Trevan, M. D. (1986). Immobilized algae - A Review. *Process Biochemistry* **21**: 122-127.
- Rodriguez, M., Sanders, C. A. & Greenbaum, E. (2002). Biosensors for rapid monitoring of primary-source drinking water using naturally occurring photosynthesis. *Biosensors and Bioelectronics* **17**: 843-849.
- Rogers, K. R. (1995). Biosensors for environmental applications. *Biosensors and Bioelectronics* **10**: 533-541.
- Rogers, K. R., Valdes, J. J. & Eldefrawi, M. E. (1991). Effects of receptor concentration, media pH and storage on nicotinic receptor-transmitted signal in a fiberoptic biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **6**: 1-8.
- Rohacek, K. & Bartak, M. (1999). Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**: 339-363.
- Rojickova-Padrtova, R. & Marsalek, B. (1999). Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* **38**: 3329-3338.
- Romo, S. & Perez-Martinez, C. (1997). The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *Journal of Phycology* **33**: 1073-1076.
- Sandau, E., Sandau, P. & Pulz, O. (1996a). Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnologica* **16**: 227-235.
- Sandau, E., Sandau, P., Pulz, O. & Zimmermann, M. (1996b). Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products. *Acta Biotechnologica* **16**: 103-119.
- Sander, R. (1999). Modeling atmospheric chemistry: interactions between gas-phase species and liquid cloud/aerosol particles. *Surveys in Geophysics* **20**: 1-31.
- Sanders, C. A., Rodriguez, M. & Greenbaum, E. (2001). Stand-off tissue-based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 439-446.
- Sandström, K. J. M. & Turner, A. P. F. (1999). Biosensors in air monitoring. *Journal of Environmental Monitoring* **1**: 293-298.

- van der Schalie, W. H., Shedd, T. R., Knechtges, P. L. & Widder, M. W. (2001). Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 457-465.
- Schlett, C. (1991). Multi-residue-analysis of pesticides by HPLC after solid-phase extraction. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **339**: 344-347.
- Schmid, K., Schaller, K. H., Angerer, J. & Lehnert, G. (1994). Investigations on the importance of the formic-acid excretion in urine from an environmental and occupational medical point-of-view. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* **196**: 139-152.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H. L. & Asada, K. (1995). Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method - Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* **36**: 873-882.
- Schreiber, U., Müller, J. F., Haugg, A. & Gademann, R. (2002). New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research* **74**: 317-330.
- Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**: 51-62.
- Seaton, G. G. R. & Walker, D. A. (1990). Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **242**: 29-35.
- Shao, C. Y., Howe, C. J., Porter, A. J. R. & Glover, L. A. (2002). Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5026-5033.
- Shiraishi, T., Fukusaki, E. I., Miyake, C., Yokota, A. & Kobayashi, A. (2000). Formate protects photosynthetic machinery from photoinhibition. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**: 564-568.
- Short, P. & Colborn, T. (1999). Pesticide use in the US and policy implications: a focus on herbicides. *Toxicology and Industrial Health* **15**: 240-275.
- Simon, D. & Helliwell, S. (1998). Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Research* **32**: 2220-2223.
- Slabbert, J. L. & Venter, E. A. (1999). Biological assays for aquatic toxicity testing. *Water Science and Technology* **39**: 367-373.

- Snider, J. R. & Dawson, G. A. (1985). Tropospheric light alcohols, carbonyls, and acetonitrile: concentrations in southwestern United States and Henry's law data. *Journal of Geophysical Research - Atmospheres* **90**: 3797-3805.
- Soldo, D. & Behra, R. (2000). Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* **47**: 181-189.
- Srivastava, A., Joseph, A. E. & Wachasunder, S. D. (2004). Qualitative detection of volatile organic compounds in outdoor and indoor air. *Environmental Monitoring and Assessment* **96**: 263-271.
- Tamponnet, C., Costantino, F., Barbotin, J. N. & Calvayrac, R. (1985). Cytological and physiological behavior of *Euglena gracilis* cells entrapped in a calcium alginate gel. *Physiologia Plantarum* **63**: 277-283.
- Tang, J. X., Hoagland, K. D. & Siegfried, B. D. (1997). Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **59**: 631-637.
- Theodoridou, A., Dornemann, D. & Kotzabasis, K. (2002). Light-dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1573**: 189-198.
- Thomas, J. M., Skalski, J. R., Cline, J. F., McShane, M. C., Miller, W. E., Peterson, S. A., Callahn, C. A. & Greene, J. C. (1986). Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* **5**: 487-501.
- Tonnina, D., Campanella, L., Sammartino, M. P. & Visco, G. (2002). Integral toxicity test of sea waters by an algal biosensor. *Annali Di Chimica* **92**: 477-484.
- Trapmann, S., Etxebarria, N., Schnabl, H. & Grobecker, K. H. (1998). Progress in herbicide determination with the thylakoid bioassay. *Environmental Science and Pollution Research* **5**: 17-20.
- Turner, N. L., Horsburgh, A., Paton, G. I., Killham, K., Meharg, A., Primrose, S. & Strachan, N. J. C. (2001). A novel toxicity fingerprinting method for pollutant identification with lux-marked biosensors. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 2456-2461.
- Twiss, M. R., Welbourn, P. M. & Schwartzel, E. (1993). Laboratory selection for copper tolerance in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Canadian Journal of Botany* **71**: 333-338.

- Umweltbundesamt (1997). Daten zur Umwelt - Der Zustand der Umwelt in Deutschland. Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin.
- Vedrine, C., Leclerc, J. C., Durrieu, C. & Tran-Minh, C. (2003). Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics* **18**: 457-463.
- Velasco-Garcia, M. N. & Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering* **84**: 1-12.
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. M. & Stokes, D. L. (2001). Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B - Chemical* **74**: 2-11.
- Volterra, L. & Conti, M. E. (2000). Algae as biomarkers, bioaccumulators and toxin producers. *International Journal of Environment and Pollution* **13**: 92-125.
- Vyhnalek, V., Fisar, Z., Fisarova, A. & Komarkova, J. (1993). In-vivo fluorescence of chlorophyll a - Estimation of phytoplankton biomass and activity in Rimov Reservoir (Czech Republic). *Water Science and Technology* **28**: 29-33.
- Walker, A. E., Holman, R. E. & Leidy, R. B. (2000). ELISA and GC/MS analysis of pesticide residues in North Carolina. *Journal of the American Water Resources Association* **36**: 67-74.
- Walsh, J. R., Diller, K. R. & Jerry, B. (2004). Measurement and simulation of water and methanol transport in algal cells. *Journal of Biomechanical Engineering - Transactions of the ASME* **126**: 167-179.
- Wang, W. C. & Freemark, K. (1995). The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **30**: 289-301.
- Wängberg, S.-Å. & Blanck, H. (1988). Multivariate patterns of algal sensitivity to chemicals in relation to phylogeny. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **16**: 72-82.
- Watterson, J. H., Piuino, P. A. E., Wust, C. C. & Krull, U. J. (2001). Controlling the density of nucleic acid oligomers on fiber optic sensors for enhancement of selectivity and sensitivity. *Sensors and Actuators B - Chemical* **74**: 27-36.
- Weber, A., Melkonian, M., Lorch, D. W. & Wettern, M. (1978). Accumulation of lead by several green algae. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie* **21**: 254-260.
- Wedel, A., Müller, K. P., Ratte, M. & Rudolph, J. (1998). Measurements of volatile organic compounds (VOC) during POPCORN 1994: applying a new on-line GC-MS-technique. *Journal of Atmospheric Chemistry* **31**: 73-103.

- Weetall, H. H. (1996). Biosensor technology - What? Where? When? And Why? *Biosensors and Bioelectronics* **11**: I-IV.
- Weil, L., Schneider, R. J., Schäfer, O., Ulrich, P., Weller, M., Ruppert, T. & Niessner, R. (1991). A heterogeneous immunoassay for the determination of triazine herbicides in water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **339**: 468-469.
- Weiner, J. A., DeLorenzo, M. E. & Fulton, M. H. (2004). Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquatic Toxicology* **68**: 121-128.
- Weltje, L., den Hollander, W. & Wolterbeek, H. T. (2003). Adsorption of metals to membrane filters in view of their speciation in nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 265-271.
- Whitton, B. A. & Kelly, M. G. (1995). Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Australian Journal of Ecology* **20**: 45-56.
- Wood, M. D. & Oliver, R. L. (1995). Fluorescence transients in response to nutrient enrichment of nitrogen-limited and phosphorus-limited *Microcystis aeruginosa* cultures and natural phytoplankton populations - A measure of nutrient limitation. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 331-340.
- Xu, J. Q., He, X. Z., Zhou, Y. X., Liu, L. T. & Cheng, J. (2000). Research and applications of biochip technologies. *Chinese Science Bulletin* **45**: 101-108.
- Young, E. B. & Beardall, J. (2003). Rapid ammonium- and nitrate-induced perturbations to chl a fluorescence in nitrogen-stressed *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **39**: 332-342.
- Youngman, R. J. & Elstner, E. F. (1988). Herbizide. In: Hock, B. & Elstner, E. F. (Hrsg.): *Schadwirkungen auf Pflanzen*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim: 132 ff.
- Yu, Q. M., Matheickal, J. T., Yin, P. H. & Kaewsarn, P. (1999). Heavy metal uptake capacities of common marine macro algal biomass. *Water Research* **33**: 1534-1537.
- Zhou, X. L. & Mopper, K. (1990). Apparent partition-coefficients of 15 carbonyl-compounds between air and seawater and between air and freshwater - Implications for air-sea exchange. *Environmental Science & Technology* **24**: 1864-1869.

## VII. ANHANG

## Tabellen

**Tabelle 14** Sensitivitäten von neun Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Veränderung der Fluoreszenz  $F_t$  [%]  $\pm$  Standardabweichung gegenüber der Kontrolle nach 20-minütigen Expositionsexperimenten ( $n=6$ ).

| c           | Herbizid<br>[ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] | SAG<br>211-11b  | CCAC<br>0011    | SAG<br>B26.82   | M1317            | M1398            | M1488            | CCAC<br>0120    | M1977           | SAG61.81        |
|-------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Atrazin     | 0                                    | 0,2 $\pm$ 1,4   | 1,5 $\pm$ 0,7   | 0,8 $\pm$ 1,4   | -0,1 $\pm$ 1,1   | 0,5 $\pm$ 2,4    | 0,2 $\pm$ 1,3    | 0,5 $\pm$ 0,8   | 0,2 $\pm$ 1,7   | 0,2 $\pm$ 0,4   |
|             | 0,1                                  | 4,2 $\pm$ 5,6   | -3,2 $\pm$ 6,1  | 2,5 $\pm$ 2,9   | -3,8 $\pm$ 6,8   | 2,9 $\pm$ 3,7    | -0,9 $\pm$ 3,3   | 2,4 $\pm$ 4,7   | 0,8 $\pm$ 0,7   | 3,5 $\pm$ 6,5   |
|             | 0,5                                  | 1 $\pm$ 1,1     | 1,9 $\pm$ 1,3   | 0,9 $\pm$ 0,5   | 1,1 $\pm$ 2,1    | -0,2 $\pm$ 4,1   | 1,6 $\pm$ 2,2    | 0,9 $\pm$ 1     | 1,3 $\pm$ 0,8   | 0,5 $\pm$ 0,8   |
|             | 1                                    | 0,9 $\pm$ 0,6   | 1,5 $\pm$ 1,1   | 1,2 $\pm$ 0,5   | 0,2 $\pm$ 0,6    | 0,4 $\pm$ 0,6    | 0,1 $\pm$ 0,7    | 0,4 $\pm$ 0,9   | -0,1 $\pm$ 0,9  | 0,2 $\pm$ 1     |
|             | 2                                    | 2,8 $\pm$ 0,6   | 3,9 $\pm$ 1,3   | 3,3 $\pm$ 2,7   | 1,1 $\pm$ 0,9    | 1,4 $\pm$ 1,7    | 0,5 $\pm$ 1      | 1,8 $\pm$ 0,9   | 1,2 $\pm$ 2,1   | 0,3 $\pm$ 1,5   |
|             | 5                                    | 6,7 $\pm$ 2,1   | 10 $\pm$ 3,1    | 6,5 $\pm$ 2,4   | 3,8 $\pm$ 1      | 4,1 $\pm$ 1,8    | 2,8 $\pm$ 0,8    | 5,6 $\pm$ 1,7   | 5,4 $\pm$ 1,2   | 4,5 $\pm$ 0,9   |
|             | 10                                   | 12,1 $\pm$ 3,5  | 16,6 $\pm$ 6,8  | 11,1 $\pm$ 3,5  | 8,4 $\pm$ 1,2    | 5,4 $\pm$ 5,3    | 5,5 $\pm$ 1,1    | 7,8 $\pm$ 3,9   | 6,7 $\pm$ 1,7   | 7,5 $\pm$ 2     |
|             | 50                                   | 50,8 $\pm$ 5,8  | 50,8 $\pm$ 9,5  | 38,4 $\pm$ 16,1 | 31 $\pm$ 3       | 36,2 $\pm$ 6,6   | 22,4 $\pm$ 4,5   | 39,5 $\pm$ 9,9  | 38,4 $\pm$ 7,4  | 32,5 $\pm$ 1,1  |
|             | 100                                  | 69,1 $\pm$ 6    | 62,5 $\pm$ 11,7 | 47,5 $\pm$ 18,8 | 41,9 $\pm$ 7,9   | 44,8 $\pm$ 8,4   | 30,2 $\pm$ 6,1   | 50 $\pm$ 14,1   | 53,1 $\pm$ 6,8  | 44,1 $\pm$ 9,2  |
| 500         | 98,3 $\pm$ 6,6                       | 83,1 $\pm$ 12,9 | 56,4 $\pm$ 19,5 | 57,1 $\pm$ 2,1  | 55,4 $\pm$ 5,3   | 42 $\pm$ 3       | 70,2 $\pm$ 15    | 79,4 $\pm$ 3,3  | 77,1 $\pm$ 7,7  |                 |
| Diuron      | 0                                    | 0,2 $\pm$ 1,4   | 1,5 $\pm$ 0,7   | 0,8 $\pm$ 1,4   | -0,1 $\pm$ 1,1   | 0,5 $\pm$ 2,4    | 0,2 $\pm$ 1,3    | 0,5 $\pm$ 0,8   | 0,2 $\pm$ 1,7   | 0,2 $\pm$ 0,4   |
|             | 0,1                                  | -0,5 $\pm$ 0,8  | 0,4 $\pm$ 0,9   | 0 $\pm$ 0,8     | -0,2 $\pm$ 1     | 0,9 $\pm$ 1,1    | 0,4 $\pm$ 0,7    | 0,3 $\pm$ 0,9   | 0,9 $\pm$ 2     | 0,2 $\pm$ 0,5   |
|             | 0,5                                  | 0,3 $\pm$ 0,6   | 0,5 $\pm$ 0,8   | 0,9 $\pm$ 0,6   | 0,4 $\pm$ 0,7    | 0,9 $\pm$ 1,4    | 0,4 $\pm$ 0,8    | 0,9 $\pm$ 0,3   | 1,1 $\pm$ 2,3   | 0,5 $\pm$ 0,4   |
|             | 1                                    | 1,7 $\pm$ 0,7   | 4 $\pm$ 1,5     | 7,1 $\pm$ 3,6   | 4 $\pm$ 1,4      | 4,4 $\pm$ 2,5    | 2,6 $\pm$ 1,6    | 5,9 $\pm$ 1,8   | 3,3 $\pm$ 1,9   | 4,2 $\pm$ 2,9   |
|             | 2                                    | 3,7 $\pm$ 0,9   | 5,8 $\pm$ 1,3   | 14,2 $\pm$ 6,6  | 5,9 $\pm$ 1,4    | 8,9 $\pm$ 3,4    | 4,4 $\pm$ 1,5    | 12,8 $\pm$ 4,6  | 7,7 $\pm$ 1,9   | 5,2 $\pm$ 1     |
|             | 5                                    | 5,8 $\pm$ 1,2   | 11,7 $\pm$ 1,8  | 32,4 $\pm$ 11,9 | 10,6 $\pm$ 3,7   | 20,3 $\pm$ 4,5   | 12 $\pm$ 2,9     | 20 $\pm$ 8,1    | 11,9 $\pm$ 2,3  | 9,6 $\pm$ 0,8   |
|             | 10                                   | 16,6 $\pm$ 4,3  | 23,4 $\pm$ 3,6  | 50,7 $\pm$ 11,5 | 26,7 $\pm$ 3,8   | 41,6 $\pm$ 4,9   | 22,2 $\pm$ 4,6   | 54,8 $\pm$ 25,2 | 34,7 $\pm$ 10,1 | 21,3 $\pm$ 1,1  |
|             | 50                                   | 35,2 $\pm$ 7,5  | 36,3 $\pm$ 4,7  | 60,8 $\pm$ 13,2 | 40,7 $\pm$ 8,9   | 53,4 $\pm$ 6,8   | 28,9 $\pm$ 2,9   | 71,7 $\pm$ 21,5 | 52,9 $\pm$ 5,8  | 38,6 $\pm$ 1,8  |
|             | 100                                  | 77,1 $\pm$ 6,4  | 62,2 $\pm$ 10,1 | 74,4 $\pm$ 12,7 | 55,9 $\pm$ 7,6   | 60,8 $\pm$ 14,3  | 43,8 $\pm$ 2,8   | 83 $\pm$ 21,6   | 91,2 $\pm$ 12,3 | 76 $\pm$ 7,5    |
| 500         | 97,2 $\pm$ 11,7                      | 75,1 $\pm$ 9,7  | 77,2 $\pm$ 10,3 | 64,8 $\pm$ 7,5  | 70 $\pm$ 8,4     | 46,2 $\pm$ 1,5   | 89,5 $\pm$ 27,8  | 96,4 $\pm$ 10,8 | 75,9 $\pm$ 5,4  |                 |
| Isoproturon | 0                                    | 0,2 $\pm$ 1,4   | 1,5 $\pm$ 0,7   | 0,8 $\pm$ 1,4   | -0,1 $\pm$ 1,1   | 0,5 $\pm$ 2,4    | 0,2 $\pm$ 1,3    | 0,5 $\pm$ 0,8   | 0,2 $\pm$ 1,7   | 0,2 $\pm$ 0,4   |
|             | 0,1                                  | 3,1 $\pm$ 5,1   | 1,8 $\pm$ 2,9   | 1,2 $\pm$ 1,4   | 0,7 $\pm$ 2,1    | 0,8 $\pm$ 1,3    | 2,2 $\pm$ 2,9    | -0,1 $\pm$ 2,7  | 0,9 $\pm$ 0,6   | 3,7 $\pm$ 6,5   |
|             | 0,5                                  | 4,3 $\pm$ 2,3   | 3,6 $\pm$ 1,3   | 3,1 $\pm$ 1,5   | 1,1 $\pm$ 0,8    | 0,7 $\pm$ 1,5    | 1,7 $\pm$ 0,8    | 2,7 $\pm$ 1,6   | 1,9 $\pm$ 1,8   | 3,5 $\pm$ 2,1   |
|             | 1                                    | 4,4 $\pm$ 1,1   | 4,7 $\pm$ 1,2   | 4,4 $\pm$ 0,9   | 2,2 $\pm$ 0,6    | 3,9 $\pm$ 0,8    | 1,6 $\pm$ 0,9    | 4,2 $\pm$ 2,3   | 3,2 $\pm$ 1,7   | 1,6 $\pm$ 1,2   |
|             | 2                                    | 9,3 $\pm$ 1,5   | 7,1 $\pm$ 2,4   | 8,3 $\pm$ 1,6   | 6,8 $\pm$ 5,5    | 6,7 $\pm$ 4,7    | 3,9 $\pm$ 3,3    | 8,2 $\pm$ 2,4   | 3,5 $\pm$ 5,9   | 9,5 $\pm$ 11,5  |
|             | 5                                    | 18,5 $\pm$ 6    | 18,6 $\pm$ 2,4  | 21,4 $\pm$ 3,3  | 11,9 $\pm$ 3     | 12,7 $\pm$ 4,1   | 7 $\pm$ 1,9      | 21,3 $\pm$ 7    | 15,6 $\pm$ 4,6  | 7,6 $\pm$ 2,2   |
|             | 10                                   | 46,8 $\pm$ 6    | 36,3 $\pm$ 1,9  | 38,2 $\pm$ 6,1  | 26,4 $\pm$ 5     | 28,4 $\pm$ 4,9   | 15,9 $\pm$ 2,6   | 39,9 $\pm$ 14,7 | 30,7 $\pm$ 3,1  | 16 $\pm$ 3,4    |
|             | 50                                   | 99,9 $\pm$ 9,5  | 74,3 $\pm$ 2,7  | 63,6 $\pm$ 6,5  | 57 $\pm$ 5,7     | 61,4 $\pm$ 2,8   | 37,8 $\pm$ 5     | 77,3 $\pm$ 19,4 | 67,7 $\pm$ 6    | 47,7 $\pm$ 6,8  |
|             | 100                                  | 115,3 $\pm$ 8,6 | 86,7 $\pm$ 3    | 81,3 $\pm$ 14,8 | 64,5 $\pm$ 4,3   | 70,2 $\pm$ 8,1   | 44,6 $\pm$ 4,7   | 93,5 $\pm$ 22,1 | 87,2 $\pm$ 6,5  | 71 $\pm$ 4,4    |
| 500         | 133,7 $\pm$ 14,1                     | 92,2 $\pm$ 7,1  | 76,6 $\pm$ 8,9  | 76,2 $\pm$ 11,6 | 70,9 $\pm$ 3,8   | 49,2 $\pm$ 3,2   | 108,9 $\pm$ 28,5 | 98,5 $\pm$ 7,5  | 80,5 $\pm$ 6,3  |                 |
| Paraquat    | 0                                    | 0,2 $\pm$ 1,4   | 1,5 $\pm$ 0,7   | 0,8 $\pm$ 1,4   | -0,1 $\pm$ 1,1   | 0,5 $\pm$ 2,4    | 0,2 $\pm$ 1,3    | 0,5 $\pm$ 0,8   | 0,2 $\pm$ 1,7   | 0,2 $\pm$ 0,4   |
|             | 0,1                                  | 1,3 $\pm$ 2,7   | 0,9 $\pm$ 1,1   | 0,1 $\pm$ 1,6   | -0,2 $\pm$ 1,8   | 2,1 $\pm$ 5,7    | 0,1 $\pm$ 1,5    | 0,1 $\pm$ 1     | -0,3 $\pm$ 1,7  | 2,7 $\pm$ 4,2   |
|             | 0,5                                  | 1,2 $\pm$ 1,8   | 1,2 $\pm$ 1,3   | -0,2 $\pm$ 0,5  | 0,3 $\pm$ 0,6    | 0,1 $\pm$ 1,3    | 0,1 $\pm$ 0,4    | -0,2 $\pm$ 1,3  | 0 $\pm$ 0,5     | 2,9 $\pm$ 4,1   |
|             | 1                                    | 2,7 $\pm$ 3,4   | 1,3 $\pm$ 1,6   | 0,5 $\pm$ 1,1   | 1 $\pm$ 1        | -0,1 $\pm$ 1,6   | 0,7 $\pm$ 1,4    | 1,8 $\pm$ 2,3   | -0,1 $\pm$ 1    | 2,6 $\pm$ 5,2   |
|             | 2                                    | -0,3 $\pm$ 1,3  | 0 $\pm$ 1,1     | -0,1 $\pm$ 0,7  | -0,4 $\pm$ 1,3   | 0,4 $\pm$ 3,2    | -0,3 $\pm$ 0,9   | -1,9 $\pm$ 3,5  | -1,3 $\pm$ 2,2  | -0,3 $\pm$ 1,5  |
|             | 5                                    | 0,8 $\pm$ 0,9   | 0,9 $\pm$ 0,5   | 0,9 $\pm$ 0,4   | -0,4 $\pm$ 1,7   | -1,2 $\pm$ 7,8   | 0,9 $\pm$ 1,1    | -0,2 $\pm$ 0,6  | -1,3 $\pm$ 1,9  | 2,1 $\pm$ 2,3   |
|             | 10                                   | -0,9 $\pm$ 0,5  | -1,5 $\pm$ 1,3  | -0,1 $\pm$ 0,8  | -1,4 $\pm$ 0,4   | -6,4 $\pm$ 6,8   | -0,9 $\pm$ 1,1   | -0,7 $\pm$ 0,5  | -2,4 $\pm$ 1    | 0,4 $\pm$ 0,8   |
|             | 50                                   | -2,1 $\pm$ 0,8  | -5,4 $\pm$ 2,6  | -2,4 $\pm$ 1,9  | -6,8 $\pm$ 3,4   | -31,4 $\pm$ 10,5 | -5,6 $\pm$ 2,7   | -2,3 $\pm$ 1,5  | -5,8 $\pm$ 2    | -0,7 $\pm$ 2,1  |
|             | 100                                  | -2 $\pm$ 1,3    | -6,3 $\pm$ 1,8  | -4,7 $\pm$ 3,1  | -7,6 $\pm$ 3,1   | -36,5 $\pm$ 9,9  | -7,9 $\pm$ 3,3   | -2,2 $\pm$ 0,9  | -7 $\pm$ 2,2    | -3,4 $\pm$ 3,1  |
| 500         | -0,8 $\pm$ 1,8                       | -1,8 $\pm$ 3    | -5,4 $\pm$ 2,9  | -5 $\pm$ 4,5    | -30,3 $\pm$ 13,9 | -5,6 $\pm$ 4,7   | -1,9 $\pm$ 2,5   | -5,7 $\pm$ 1,9  | -2,7 $\pm$ 2,3  |                 |
| Simazin     | 0                                    | 0,2 $\pm$ 1,4   | 1,5 $\pm$ 0,7   | 0,8 $\pm$ 1,4   | -0,1 $\pm$ 1,1   | 0,5 $\pm$ 2,4    | 0,2 $\pm$ 1,3    | 0,5 $\pm$ 0,8   | 0,2 $\pm$ 1,7   | 0,2 $\pm$ 0,4   |
|             | 0,1                                  | 3,3 $\pm$ 4,2   | 2,2 $\pm$ 2,8   | 1,2 $\pm$ 1,6   | 0,8 $\pm$ 2,6    | -1,6 $\pm$ 3,2   | 1,5 $\pm$ 2,1    | 2,4 $\pm$ 2,9   | 0,9 $\pm$ 1,3   | 4,7 $\pm$ 6,1   |
|             | 0,5                                  | 2,4 $\pm$ 4,4   | 2,9 $\pm$ 2,7   | 1,3 $\pm$ 1,1   | 0,4 $\pm$ 1,1    | -0,8 $\pm$ 0,7   | 1,1 $\pm$ 1,5    | 1,3 $\pm$ 1,8   | -1,1 $\pm$ 1,2  | 5,2 $\pm$ 6,4   |
|             | 1                                    | 1,5 $\pm$ 1,7   | 3,2 $\pm$ 2,5   | 1,2 $\pm$ 1,3   | 0,3 $\pm$ 0,7    | -0,2 $\pm$ 1,1   | 1,2 $\pm$ 1      | 0,8 $\pm$ 1,4   | -0,6 $\pm$ 2    | 2,6 $\pm$ 2,8   |
|             | 2                                    | 3,4 $\pm$ 3,3   | 5 $\pm$ 2,6     | 2,9 $\pm$ 1     | 1,6 $\pm$ 1,3    | 1,2 $\pm$ 1,8    | 2,4 $\pm$ 1,7    | 2,2 $\pm$ 1,5   | 0,6 $\pm$ 2     | 4,7 $\pm$ 3,3   |
|             | 5                                    | 4,9 $\pm$ 1,9   | 9,3 $\pm$ 2,8   | 5,9 $\pm$ 2,5   | 3 $\pm$ 1,1      | 2,3 $\pm$ 2,6    | 3,4 $\pm$ 2,3    | 3,8 $\pm$ 1,8   | 2,6 $\pm$ 3,5   | 7 $\pm$ 4,2     |
|             | 10                                   | 13,4 $\pm$ 5,6  | 19 $\pm$ 7,1    | 14 $\pm$ 5      | 5,7 $\pm$ 4,6    | 4,5 $\pm$ 5,3    | 7 $\pm$ 3,5      | 9,6 $\pm$ 3,2   | 5,3 $\pm$ 2,8   | 16,4 $\pm$ 4,8  |
|             | 50                                   | 31,5 $\pm$ 11,8 | 47 $\pm$ 15,1   | 32 $\pm$ 11,7   | 19,8 $\pm$ 13,3  | 22,6 $\pm$ 13    | 17,2 $\pm$ 9,3   | 30,5 $\pm$ 14,7 | 24,3 $\pm$ 17,6 | 34,1 $\pm$ 12,6 |
|             | 100                                  | 72,6 $\pm$ 8,2  | 75,6 $\pm$ 6,4  | 54,5 $\pm$ 5,8  | 44,6 $\pm$ 6,7   | 42,8 $\pm$ 5,7   | 35,6 $\pm$ 4,8   | 55,4 $\pm$ 8,6  | 53,6 $\pm$ 12,5 | 63,6 $\pm$ 12,8 |
| 500         | 123,3 $\pm$ 4,3                      | 104,7 $\pm$ 6,1 | 69,2 $\pm$ 11,3 | 71,9 $\pm$ 8,4  | 52,7 $\pm$ 6,7   | 50,2 $\pm$ 8     | 82,8 $\pm$ 11,8  | 79,7 $\pm$ 8,9  | 81,2 $\pm$ 15   |                 |

**Tabelle 15** Sensitivitäten neun verschiedener Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Anstieg der Fluoreszenz  $F_1$  [%]± Standardabweichung gegenüber der Kontrolle integriert über den Expositionszeitraum von 20 min ( $n=6$ ).

| c Herbizid<br>[µg l <sup>-1</sup> ] | SAG<br>211-11b | CCAC<br>0011 | SAG<br>B26.82 | M1317    | M1398    | M1488    | CCAC<br>0120 | M1977    | SAG61.81 |         |
|-------------------------------------|----------------|--------------|---------------|----------|----------|----------|--------------|----------|----------|---------|
| <b>Atrazin</b>                      | 0              | -3±21        | 21±18         | 0±20     | -7±15    | 7±27     | -2±8         | 8±8      | 1±13     | -5±8    |
|                                     | 0,1            | 68±104       | -67±111       | 40±58    | -76±135  | 44±69    | -25±62       | 41±85    | 9±7      | 66±116  |
|                                     | 0,5            | 9±22         | 27±25         | 11±7     | 15±44    | -19±77   | 25±42        | 15±17    | 15±17    | 4±10    |
|                                     | 1              | 6±12         | 17±18         | 14±8     | -5±9     | -2±14    | 2±8          | 3±17     | -4±15    | -9±15   |
|                                     | 2              | 24±10        | 41±22         | 36±41    | 5±9      | 9±30     | 1±16         | 20±13    | 3±34     | -16±25  |
|                                     | 5              | 81±26        | 131±46        | 92±44    | 47±15    | 57±34    | 32±9         | 72±24    | 67±17    | 40±9    |
|                                     | 10             | 140±59       | 209±89        | 140±53   | 113±22   | 74±90    | 73±12        | 88±71    | 84±25    | 65±30   |
|                                     | 50             | 771±104      | 810±171       | 618±280  | 478±48   | 590±106  | 325±94       | 551±143  | 550±100  | 353±42  |
|                                     | 100            | 1117±102     | 1043±214      | 771±337  | 680±122  | 764±158  | 452±114      | 736±232  | 824±117  | 524±126 |
| 500                                 | 1492±275       | 1442±239     | 951±364       | 926±81   | 1024±67  | 675±78   | 1080±267     | 1346±109 | 1155±82  |         |
| <b>Diuron</b>                       | 0              | -3±21        | 21±18         | 0±20     | -7±15    | 7±27     | -2±8         | 8±8      | 1±13     | -5±8    |
|                                     | 0,1            | -5±11        | 5±14          | -6±16    | -3±18    | 9±23     | 2±8          | 3±20     | 14±38    | -2±11   |
|                                     | 0,5            | -1±12        | 3±11          | 6±14     | -3±9     | 2±17     | 1±14         | 10±6     | 2±25     | 0±4     |
|                                     | 1              | 12±7         | 61±26         | 83±49    | 45±31    | 55±35    | 29±23        | 59±20    | 43±22    | 54±55   |
|                                     | 2              | 36±10        | 66±16         | 140±61   | 61±17    | 98±47    | 44±14        | 123±45   | 85±26    | 42±15   |
|                                     | 5              | 64±14        | 139±26        | 361±129  | 112±46   | 242±89   | 139±39       | 186±75   | 139±38   | 85±14   |
|                                     | 10             | 207±54       | 321±61        | 701±174  | 356±57   | 605±120  | 292±82       | 632±292  | 459±162  | 215±18  |
|                                     | 50             | 480±85       | 534±69        | 926±220  | 605±126  | 870±143  | 402±60       | 1016±280 | 795±128  | 415±16  |
|                                     | 100            | 1234±91      | 1023±246      | 1273±248 | 936±151  | 1029±334 | 701±80       | 1389±361 | 1519±336 | 1074±70 |
| 500                                 | 1541±201       | 1250±161     | 1296±197      | 1091±153 | 1236±191 | 763±37   | 1467±430     | 1657±270 | 1172±91  |         |
| <b>Isoproturon</b>                  | 0              | -3±21        | 21±18         | 0±20     | -7±15    | 7±27     | -2±8         | 8±8      | 1±13     | -5±8    |
|                                     | 0,1            | 43±79        | 22±41         | 16±26    | 8±27     | 3±25     | 26±43        | -12±47   | 0±10     | 50±102  |
|                                     | 0,5            | 51±30        | 41±15         | 38±23    | 10±9     | 2±32     | 19±12        | 26±23    | 13±37    | 42±26   |
|                                     | 1              | 48±12        | 59±18         | 52±20    | 20±9     | 45±13    | 15±10        | 48±32    | 33±25    | 4±13    |
|                                     | 2              | 109±16       | 90±40         | 113±22   | 94±78    | 86±74    | 51±47        | 96±29    | 30±100   | 137±210 |
|                                     | 5              | 203±94       | 244±49        | 294±42   | 138±53   | 173±76   | 84±20        | 259±123  | 205±70   | 66±22   |
|                                     | 10             | 595±61       | 528±54        | 570±104  | 354±68   | 450±94   | 207±29       | 538±198  | 437±30   | 156±41  |
|                                     | 50             | 1661±174     | 1268±56       | 1043±110 | 946±88   | 1061±55  | 562±73       | 1245±311 | 1135±120 | 583±97  |
|                                     | 100            | 1989±170     | 1522±59       | 1389±256 | 1105±73  | 1242±179 | 678±65       | 1563±339 | 1495±111 | 898±91  |
| 500                                 | 2251±211       | 1647±124     | 1367±157      | 1311±188 | 1254±58  | 847±49   | 1823±446     | 1721±145 | 1354±97  |         |
| <b>Paraquat</b>                     | 0              | -3±21        | 21±18         | 0±20     | -7±15    | 7±27     | -2±8         | 8±8      | 1±13     | -5±8    |
|                                     | 0,1            | 9±41         | 9±20          | -2±24    | -9±27    | 24±86    | -3±27        | -2±13    | -14±37   | 35±66   |
|                                     | 0,5            | 7±25         | 9±18          | -11±7    | -2±11    | -9±16    | -1±8         | -3±16    | -8±11    | 36±60   |
|                                     | 1              | 36±50        | 16±15         | -2±9     | 5±17     | -10±35   | 5±16         | 25±44    | -10±6    | 32±68   |
|                                     | 2              | -10±25       | -4±14         | -9±13    | -10±18   | -5±44    | -8±10        | -35±66   | -29±26   | -13±17  |
|                                     | 5              | 8±12         | 8±7           | 2±8      | -9±11    | -14±66   | 10±11        | 0±9      | -24±29   | 21±32   |
|                                     | 10             | -19±9        | -16±18        | -7±9     | -18±7    | -55±58   | -8±7         | -14±11   | -34±18   | -10±13  |
|                                     | 50             | -28±13       | -58±34        | -27±22   | -75±48   | -326±169 | -66±35       | -34±24   | -76±32   | -25±41  |
|                                     | 100            | -32±26       | -80±34        | -54±42   | -89±40   | -422±179 | -98±47       | -29±16   | -96±40   | -65±39  |
| 500                                 | -16±27         | -27±48       | -65±50        | -71±69   | -402±263 | -76±81   | -27±33       | -67±50   | -54±38   |         |
| <b>Simazin</b>                      | 0              | -3±21        | 21±18         | 0±20     | -7±15    | 7±27     | -2±8         | 8±8      | 1±13     | -5±8    |
|                                     | 0,1            | 47±60        | 31±34         | 15±19    | 10±33    | -29±38   | 16±26        | 31±40    | 10±20    | 61±82   |
|                                     | 0,5            | 29±67        | 36±43         | 12±20    | -7±20    | -25±13   | 10±24        | 13±21    | -30±18   | 72±86   |
|                                     | 1              | 13±23        | 40±34         | 14±21    | -6±15    | -8±22    | 11±10        | 8±22     | -20±32   | 30±35   |
|                                     | 2              | 43±50        | 61±36         | 37±13    | 15±23    | 11±25    | 28±21        | 24±21    | -6±34    | 48±42   |
|                                     | 5              | 66±29        | 129±40        | 82±38    | 41±13    | 30±53    | 39±31        | 47±27    | 21±55    | 72±59   |
|                                     | 10             | 198±107      | 253±130       | 212±92   | 71±81    | 45±92    | 81±58        | 130±51   | 47±49    | 201±70  |
|                                     | 50             | 504±200      | 749±268       | 498±168  | 311±238  | 358±233  | 239±148      | 452±221  | 343±292  | 444±163 |
|                                     | 100            | 1199±148     | 1295±125      | 908±100  | 741±122  | 732±119  | 562±79       | 844±161  | 872±239  | 960±210 |
| 500                                 | 2135±127       | 1865±127     | 1245±176      | 1199±102 | 967±80   | 834±111  | 1392±196     | 1384±174 | 1426±247 |         |

**Tabelle 16** Sensitivitäten neun verschiedener Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Hemmung der effektiven Quantenausbeute des Elektronentransports des Photosystems II  $\pm F/F'_m$  [%]  $\pm$  Standardabweichung gegenüber der Kontrolle nach 20-minütigen Expositionsexperimenten ( $n=6$ ).

| c Herbizid<br>[ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] | SAG<br>211-11b  | CCAC<br>0011   | SAG<br>B26.82   | M1317           | M1398            | M1488           | CCAC<br>0120   | M1977           | SAG61.81        |                 |
|----------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Atrazin</b>                         | 0               | 0,5 $\pm$ 1,2  | -0,2 $\pm$ 0,9  | -0,4 $\pm$ 1,4  | 0,7 $\pm$ 1,4    | 0 $\pm$ 1,6     | 1,4 $\pm$ 1,2  | 0,6 $\pm$ 1,2   | -1,3 $\pm$ 0,9  | 0 $\pm$ 0,4     |
|                                        | 0,1             | 0,6 $\pm$ 0,8  | 0,6 $\pm$ 3,1   | 2,7 $\pm$ 2,5   | -0,6 $\pm$ 2,3   | 2,4 $\pm$ 3,5   | 3,4 $\pm$ 7,1  | 0,6 $\pm$ 1,8   | 1,3 $\pm$ 4,1   | 0 $\pm$ 1,5     |
|                                        | 0,5             | 0,7 $\pm$ 0,5  | 0,6 $\pm$ 0,6   | 0,4 $\pm$ 1,4   | 1,3 $\pm$ 1,2    | 1,2 $\pm$ 1,1   | 0,9 $\pm$ 1,2  | 0,5 $\pm$ 1     | -0,3 $\pm$ 1,4  | 0,5 $\pm$ 0,5   |
|                                        | 1               | 0,8 $\pm$ 0,2  | 1,3 $\pm$ 0,8   | 0,8 $\pm$ 0,9   | 1,4 $\pm$ 1,4    | 0,6 $\pm$ 1,5   | -0,3 $\pm$ 2,1 | 1,9 $\pm$ 0,9   | 0,8 $\pm$ 1,2   | 0,6 $\pm$ 0,4   |
|                                        | 2               | 2,2 $\pm$ 0,6  | 3,3 $\pm$ 1,2   | 3,2 $\pm$ 1,2   | 2,7 $\pm$ 1,2    | 1,9 $\pm$ 5,1   | 0,7 $\pm$ 2,2  | 2,5 $\pm$ 1     | 0,4 $\pm$ 1,7   | 1,2 $\pm$ 0,9   |
|                                        | 5               | 4,4 $\pm$ 1,4  | 7,4 $\pm$ 2,4   | 6 $\pm$ 1,6     | 4,7 $\pm$ 2,1    | 2 $\pm$ 2,4     | 2,7 $\pm$ 1,2  | 5,1 $\pm$ 1,5   | 3,7 $\pm$ 0,9   | 3,4 $\pm$ 0,4   |
|                                        | 10              | 7,4 $\pm$ 2,2  | 13,9 $\pm$ 6,8  | 11,7 $\pm$ 1,8  | 8 $\pm$ 4,1      | 6,7 $\pm$ 6,6   | 3,8 $\pm$ 5,4  | 8,5 $\pm$ 2,2   | 6 $\pm$ 5,5     | 5,7 $\pm$ 1,6   |
|                                        | 50              | 34,2 $\pm$ 6,1 | 49,8 $\pm$ 9,4  | 38 $\pm$ 3,1    | 35,9 $\pm$ 2,8   | 51 $\pm$ 8,9    | 27,1 $\pm$ 2,6 | 38,9 $\pm$ 3,5  | 46,1 $\pm$ 11,1 | 29,9 $\pm$ 3,5  |
|                                        | 100             | 53,1 $\pm$ 6   | 68,5 $\pm$ 13,4 | 52,7 $\pm$ 5,1  | 52,5 $\pm$ 3,9   | 76,1 $\pm$ 13,4 | 44,5 $\pm$ 6   | 56,9 $\pm$ 5,6  | 70,7 $\pm$ 10,7 | 54,4 $\pm$ 10,6 |
| 500                                    | 79,8 $\pm$ 12,2 | 88,3 $\pm$ 8,1 | 71,7 $\pm$ 16,1 | 76,6 $\pm$ 9,6  | 92,4 $\pm$ 9,9   | 63,7 $\pm$ 5,2  | 81,6 $\pm$ 8,8 | 96 $\pm$ 9,3    | 85,9 $\pm$ 6,8  |                 |
| <b>Diuron</b>                          | 0               | 0,5 $\pm$ 1,2  | -0,2 $\pm$ 0,9  | -0,4 $\pm$ 1,4  | 0,7 $\pm$ 1,4    | 0 $\pm$ 1,6     | 1,4 $\pm$ 1,2  | 0,6 $\pm$ 1,2   | -1,3 $\pm$ 0,9  | 0 $\pm$ 0,4     |
|                                        | 0,1             | 0 $\pm$ 0,5    | 0,2 $\pm$ 0,9   | 0,5 $\pm$ 2,7   | 0,7 $\pm$ 1      | -0,6 $\pm$ 1,1  | 0,7 $\pm$ 1    | 0,9 $\pm$ 0,9   | 0,4 $\pm$ 2,7   | 0,1 $\pm$ 0,6   |
|                                        | 0,5             | 0,4 $\pm$ 0,5  | 0,1 $\pm$ 0,6   | -0,3 $\pm$ 1,2  | 2,2 $\pm$ 0,7    | -0,1 $\pm$ 1,1  | 0,4 $\pm$ 1,8  | 1,4 $\pm$ 0,7   | 0,6 $\pm$ 1,1   | 0,4 $\pm$ 0,4   |
|                                        | 1               | 1,5 $\pm$ 0,8  | 2,3 $\pm$ 1,4   | 5,4 $\pm$ 3,1   | 4,8 $\pm$ 1,7    | 2,8 $\pm$ 2,4   | 3,5 $\pm$ 1,4  | 7 $\pm$ 0,5     | 5,9 $\pm$ 8,9   | 3 $\pm$ 1       |
|                                        | 2               | 2,1 $\pm$ 0,6  | 4,2 $\pm$ 1,2   | 11,2 $\pm$ 4,7  | 8,1 $\pm$ 1,7    | 7,1 $\pm$ 4     | 3,8 $\pm$ 2,6  | 13,3 $\pm$ 2,5  | 4,7 $\pm$ 3     | 3,8 $\pm$ 0,8   |
|                                        | 5               | 4,1 $\pm$ 1,6  | 9,1 $\pm$ 1,9   | 26,4 $\pm$ 6,7  | 13,7 $\pm$ 5,8   | 20,5 $\pm$ 11,3 | 10,8 $\pm$ 2,3 | 21 $\pm$ 6,3    | 11,5 $\pm$ 4,3  | 7,4 $\pm$ 1,3   |
|                                        | 10              | 11,8 $\pm$ 3,7 | 18,7 $\pm$ 2,1  | 42,5 $\pm$ 8,9  | 30,9 $\pm$ 3,9   | 45 $\pm$ 4,8    | 21,7 $\pm$ 3,5 | 56,3 $\pm$ 11,1 | 29,3 $\pm$ 5,1  | 17,7 $\pm$ 2,9  |
|                                        | 50              | 23,3 $\pm$ 6,5 | 30,6 $\pm$ 4,8  | 57,5 $\pm$ 9,6  | 45 $\pm$ 8       | 68,7 $\pm$ 9,3  | 36,8 $\pm$ 3,5 | 75,2 $\pm$ 7,7  | 57,1 $\pm$ 10,3 | 38,8 $\pm$ 4,1  |
|                                        | 100             | 55,4 $\pm$ 5,4 | 58,4 $\pm$ 13,9 | 76,3 $\pm$ 8,9  | 63,9 $\pm$ 5     | 86,3 $\pm$ 10,6 | 62 $\pm$ 3,3   | 88,6 $\pm$ 6,6  | 91,4 $\pm$ 9,3  | 88 $\pm$ 4,1    |
| 500                                    | 70,1 $\pm$ 4,6  | 75,8 $\pm$ 8,5 | 86,2 $\pm$ 9,1  | 72,6 $\pm$ 2    | 100,4 $\pm$ 6,6  | 69,2 $\pm$ 2,7  | 92,9 $\pm$ 3,8 | 95,9 $\pm$ 2,4  | 94,8 $\pm$ 2,4  |                 |
| <b>Isoproturon</b>                     | 0               | 0,5 $\pm$ 1,2  | -0,2 $\pm$ 0,9  | -0,4 $\pm$ 1,4  | 0,7 $\pm$ 1,4    | 0 $\pm$ 1,6     | 1,4 $\pm$ 1,2  | 0,6 $\pm$ 1,2   | -1,3 $\pm$ 0,9  | 0 $\pm$ 0,4     |
|                                        | 0,1             | -1,3 $\pm$ 2,5 | -0,6 $\pm$ 1,2  | -0,9 $\pm$ 1,8  | -0,1 $\pm$ 2,1   | -1 $\pm$ 2,4    | 0,7 $\pm$ 1,2  | 1,1 $\pm$ 0,9   | -1,2 $\pm$ 3,3  | 0,5 $\pm$ 0,5   |
|                                        | 0,5             | 1,8 $\pm$ 0,8  | 0,9 $\pm$ 1,3   | 0,9 $\pm$ 1,3   | 1,5 $\pm$ 1      | -0,5 $\pm$ 1,7  | 0 $\pm$ 1,6    | 3,1 $\pm$ 0,6   | -0,3 $\pm$ 1    | 0,8 $\pm$ 0,5   |
|                                        | 1               | 3 $\pm$ 0,7    | 3 $\pm$ 1       | 3 $\pm$ 1,2     | 4,5 $\pm$ 0,8    | 0,3 $\pm$ 1,5   | 1,4 $\pm$ 1,6  | 4,4 $\pm$ 0,9   | 1,4 $\pm$ 1,1   | 1,4 $\pm$ 0,4   |
|                                        | 2               | 6,8 $\pm$ 1,5  | 5,6 $\pm$ 2     | 5,2 $\pm$ 1,7   | 6,5 $\pm$ 1,9    | 2 $\pm$ 3,2     | 1,6 $\pm$ 1    | 10 $\pm$ 0,9    | 8 $\pm$ 12,1    | 0,1 $\pm$ 6,4   |
|                                        | 5               | 12,2 $\pm$ 4,7 | 13,9 $\pm$ 2,2  | 14,7 $\pm$ 1,6  | 13,9 $\pm$ 3,3   | 8,5 $\pm$ 5,3   | 5,9 $\pm$ 2,8  | 20,1 $\pm$ 5,3  | 10,7 $\pm$ 4,4  | 5,5 $\pm$ 1     |
|                                        | 10              | 27,3 $\pm$ 2,2 | 26,8 $\pm$ 2,5  | 24,7 $\pm$ 3,2  | 24,1 $\pm$ 4     | 24,8 $\pm$ 6,9  | 12,5 $\pm$ 2,4 | 33,5 $\pm$ 7,4  | 26,6 $\pm$ 5,3  | 11 $\pm$ 2,7    |
|                                        | 50              | 72,5 $\pm$ 5   | 69 $\pm$ 3      | 62,6 $\pm$ 3    | 65,4 $\pm$ 4,1   | 85,8 $\pm$ 6,7  | 46,8 $\pm$ 6,3 | 77 $\pm$ 5,6    | 81,5 $\pm$ 8,4  | 49,5 $\pm$ 9,2  |
|                                        | 100             | 83,6 $\pm$ 2,2 | 77,7 $\pm$ 6,4  | 69,4 $\pm$ 7,9  | 72,7 $\pm$ 3     | 90,4 $\pm$ 8,8  | 53,2 $\pm$ 8,3 | 88,4 $\pm$ 2,4  | 90,6 $\pm$ 9,5  | 67,6 $\pm$ 7,6  |
| 500                                    | 95,2 $\pm$ 3,2  | 93,2 $\pm$ 4,4 | 86,6 $\pm$ 7,2  | 84,2 $\pm$ 6,7  | 102,9 $\pm$ 10,9 | 72,1 $\pm$ 5,5  | 94,6 $\pm$ 7,1 | 102,9 $\pm$ 9,5 | 93,7 $\pm$ 4    |                 |
| <b>Paraquat</b>                        | 0               | 0,5 $\pm$ 1,2  | -0,2 $\pm$ 0,9  | -0,4 $\pm$ 1,4  | 0,7 $\pm$ 1,4    | 0 $\pm$ 1,6     | 1,4 $\pm$ 1,2  | 0,6 $\pm$ 1,2   | -1,3 $\pm$ 0,9  | 0 $\pm$ 0,4     |
|                                        | 0,1             | -2,8 $\pm$ 2,4 | -1,4 $\pm$ 2,4  | -0,6 $\pm$ 3,1  | -1,7 $\pm$ 1,8   | -0,9 $\pm$ 5,3  | -2,4 $\pm$ 0,8 | -1,6 $\pm$ 1,8  | -2,4 $\pm$ 2,7  | -0,7 $\pm$ 1,5  |
|                                        | 0,5             | -0,1 $\pm$ 1,2 | -0,3 $\pm$ 0,3  | -0,6 $\pm$ 1,4  | -0,5 $\pm$ 1,1   | -1 $\pm$ 2,1    | -0,4 $\pm$ 2,1 | -1 $\pm$ 1,1    | -1,6 $\pm$ 1,7  | -0,7 $\pm$ 1,6  |
|                                        | 1               | -0,4 $\pm$ 0,8 | -1,1 $\pm$ 1,6  | -0,4 $\pm$ 1    | -0,1 $\pm$ 1,8   | -0,5 $\pm$ 2    | -0,1 $\pm$ 1,9 | 0 $\pm$ 1,2     | -1,2 $\pm$ 2,7  | -0,5 $\pm$ 1    |
|                                        | 2               | 0,2 $\pm$ 0,6  | 0,6 $\pm$ 0,8   | 0,5 $\pm$ 1,3   | 0,8 $\pm$ 0,6    | 4,9 $\pm$ 6     | 0,4 $\pm$ 1,5  | 0,3 $\pm$ 1     | 1,1 $\pm$ 1     | 0,8 $\pm$ 0,5   |
|                                        | 5               | 0,5 $\pm$ 0,9  | 1,6 $\pm$ 0,8   | 1,2 $\pm$ 1,4   | 2,9 $\pm$ 1,2    | 24,6 $\pm$ 7,9  | 5,2 $\pm$ 2,6  | -0,1 $\pm$ 1,4  | 1,2 $\pm$ 3,5   | 0,5 $\pm$ 0,4   |
|                                        | 10              | 0,4 $\pm$ 0,2  | 1,6 $\pm$ 0,7   | 1,2 $\pm$ 4,1   | 3,5 $\pm$ 1,6    | 32,3 $\pm$ 11,5 | 5,4 $\pm$ 3,2  | 1,4 $\pm$ 0,8   | 4,4 $\pm$ 2,4   | 0,9 $\pm$ 0,5   |
|                                        | 50              | -0,1 $\pm$ 0,9 | 0,9 $\pm$ 1,1   | 4,6 $\pm$ 1,7   | 1,6 $\pm$ 3,6    | 34,7 $\pm$ 10,9 | 4,6 $\pm$ 5    | 1,7 $\pm$ 0,5   | 5,7 $\pm$ 3,4   | 1,2 $\pm$ 3,8   |
|                                        | 100             | 0,2 $\pm$ 0,7  | 1,2 $\pm$ 1,5   | 7,1 $\pm$ 5,1   | 2,1 $\pm$ 1,3    | 28,3 $\pm$ 11,1 | 3,6 $\pm$ 5    | 1,7 $\pm$ 1,2   | 3,6 $\pm$ 1,8   | 0,6 $\pm$ 1,9   |
| 500                                    | -0,6 $\pm$ 1,5  | 2,7 $\pm$ 1,2  | 7,4 $\pm$ 6,3   | 0,4 $\pm$ 1,5   | 12,5 $\pm$ 13,8  | 2,9 $\pm$ 4,8   | 1 $\pm$ 1,7    | 2 $\pm$ 5,6     | -0,1 $\pm$ 0,6  |                 |
| <b>Simazin</b>                         | 0               | 0,5 $\pm$ 1,2  | -0,2 $\pm$ 0,9  | -0,4 $\pm$ 1,4  | 0,7 $\pm$ 1,4    | 0 $\pm$ 1,6     | 1,4 $\pm$ 1,2  | 0,6 $\pm$ 1,2   | -1,3 $\pm$ 0,9  | 0 $\pm$ 0,4     |
|                                        | 0,1             | -1,5 $\pm$ 1,5 | -0,5 $\pm$ 1,2  | -0,5 $\pm$ 1,6  | -0,5 $\pm$ 2,1   | 0,6 $\pm$ 7,4   | -1,9 $\pm$ 2,1 | 0,1 $\pm$ 1,4   | -3,1 $\pm$ 2,4  | -1,6 $\pm$ 1,3  |
|                                        | 0,5             | -0,6 $\pm$ 1,7 | 0,7 $\pm$ 1,3   | 0,1 $\pm$ 2,4   | 0,7 $\pm$ 2,9    | -2 $\pm$ 5,3    | -0,3 $\pm$ 3,1 | 0,7 $\pm$ 1,7   | -1,4 $\pm$ 5,1  | 0,8 $\pm$ 3,9   |
|                                        | 1               | 0,4 $\pm$ 0,7  | 0,9 $\pm$ 1,4   | 0,3 $\pm$ 1,9   | 0,5 $\pm$ 0,7    | -1,6 $\pm$ 7,1  | 0,4 $\pm$ 1,1  | 0,1 $\pm$ 1,3   | 0 $\pm$ 3,2     | 0,9 $\pm$ 1,8   |
|                                        | 2               | 0,6 $\pm$ 1    | 3 $\pm$ 1       | 3,3 $\pm$ 1,6   | 1,4 $\pm$ 2,3    | 1,3 $\pm$ 4,1   | 2 $\pm$ 3,5    | 2,1 $\pm$ 1,1   | 2,1 $\pm$ 2,9   | 2,9 $\pm$ 1,5   |
|                                        | 5               | 3,2 $\pm$ 1,1  | 7,9 $\pm$ 4,1   | 5,2 $\pm$ 3,6   | 4,5 $\pm$ 2,3    | 4,4 $\pm$ 4,9   | 2,9 $\pm$ 1,4  | 4,8 $\pm$ 2,2   | 7,4 $\pm$ 6,4   | 5,2 $\pm$ 1,8   |
|                                        | 10              | 6,2 $\pm$ 1,6  | 12,5 $\pm$ 3,6  | 11,6 $\pm$ 3,9  | 8 $\pm$ 3,2      | 6,6 $\pm$ 3,5   | 10,1 $\pm$ 7,3 | 8,1 $\pm$ 2,3   | 7,2 $\pm$ 7,1   | 9,1 $\pm$ 4,6   |
|                                        | 50              | 16,9 $\pm$ 9,3 | 37,5 $\pm$ 18,5 | 31,6 $\pm$ 14,5 | 24 $\pm$ 14      | 34,9 $\pm$ 16,2 | 24,2 $\pm$ 9,3 | 27,4 $\pm$ 16,2 | 29,2 $\pm$ 23,6 | 27,1 $\pm$ 17,9 |
|                                        | 100             | 41,9 $\pm$ 5,8 | 63,6 $\pm$ 6,5  | 58 $\pm$ 2,9    | 44,9 $\pm$ 4,9   | 61,4 $\pm$ 5,4  | 45,7 $\pm$ 4,3 | 52,3 $\pm$ 3,9  | 68,7 $\pm$ 5,1  | 62,9 $\pm$ 7,8  |
| 500                                    | 78,6 $\pm$ 3,2  | 89,2 $\pm$ 3,5 | 78,2 $\pm$ 9,5  | 74 $\pm$ 4,2    | 86,8 $\pm$ 12,1  | 61,2 $\pm$ 4,9  | 85,5 $\pm$ 4,5 | 97,5 $\pm$ 10,9 | 90,3 $\pm$ 3,3  |                 |

**Tabelle 17** Sensitivitäten neun verschiedener Mikroalgen gegenüber fünf Herbiziden: Hemmung der effektiven Quantenausbeute des Elektronentransports des Photosystems II  $\mp F/F'_m$  [%]  $\pm$  Standardabweichung gegenüber der Kontrolle integriert über den Expositionszeitraum von 20 min ( $n=6$ ).

| c Herbizid<br>[µg l <sup>-1</sup> ] | SAG<br>211-11b | CCAC<br>0011 | SAG<br>B26.82 | M1317    | M1398    | M1488    | CCAC<br>0120 | M1977    | SAG61.81 |          |
|-------------------------------------|----------------|--------------|---------------|----------|----------|----------|--------------|----------|----------|----------|
| <b>Atrazin</b>                      | 0              | 7±12         | -5±14         | -10±16   | 5±9      | -7±31    | 13±15        | 13±13    | -29±20   | 4±5      |
|                                     | 0,1            | 0±11         | 2±59          | 11±26    | -13±32   | 18±52    | 52±130       | 3±34     | 14±66    | -1±30    |
|                                     | 0,5            | 7±9          | 7±10          | 10±21    | 19±14    | 13±30    | 10±25        | 19±4     | -6±21    | 9±8      |
|                                     | 1              | 12±4         | 12±13         | 16±9     | 16±13    | -2±17    | 8±13         | 23±7     | 4±19     | 8±3      |
|                                     | 2              | 28±10        | 30±9          | 28±19    | 34±13    | -7±61    | 7±17         | 39±14    | -11±23   | 10±8     |
|                                     | 5              | 60±18        | 90±26         | 90±32    | 66±24    | 27±46    | 30±10        | 74±19    | 33±26    | 34±6     |
|                                     | 10             | 95±47        | 178±98        | 167±34   | 110±64   | 122±108  | 54±69        | 110±54   | 68±82    | 58±21    |
|                                     | 50             | 544±114      | 821±173       | 642±88   | 592±64   | 889±147  | 410±54       | 590±69   | 662±174  | 333±51   |
|                                     | 100            | 907±119      | 1177±249      | 903±140  | 897±68   | 1333±191 | 663±75       | 919±127  | 1072±165 | 632±144  |
| 500                                 | 1316±408       | 1571±155     | 1234±294      | 1293±245 | 1685±207 | 1068±147 | 1403±295     | 1677±195 | 1359±194 |          |
| <b>Diuron</b>                       | 0              | 7±12         | -5±14         | -10±16   | 5±9      | -7±31    | 13±15        | 13±13    | -29±20   | 4±5      |
|                                     | 0,1            | 7±8          | -1±11         | 2±29     | 12±6     | -30±41   | 3±13         | 3±13     | 6±30     | 2±10     |
|                                     | 0,5            | 5±4          | -6±14         | 7±14     | 19±12    | -16±17   | 12±20        | 12±20    | -6±19    | 7±9      |
|                                     | 1              | 19±8         | 21±19         | 69±38    | 59±20    | 20±37    | 37±20        | 37±20    | 68±131   | 41±20    |
|                                     | 2              | 27±13        | 48±17         | 130±37   | 107±29   | 77±53    | 41±16        | 41±16    | 49±33    | 43±12    |
|                                     | 5              | 48±21        | 113±26        | 313±90   | 162±74   | 265±191  | 125±43       | 125±43   | 129±52   | 74±14    |
|                                     | 10             | 157±53       | 252±45        | 611±133  | 426±73   | 633±125  | 280±65       | 280±65   | 353±92   | 176±31   |
|                                     | 50             | 325±83       | 445±69        | 899±188  | 690±118  | 1091±123 | 481±68       | 481±68   | 777±147  | 402±40   |
|                                     | 100            | 923±95       | 988±319       | 1336±169 | 1095±112 | 1361±304 | 990±116      | 990±116  | 1511±294 | 1273±104 |
| 500                                 | 1178±85        | 1300±139     | 1463±161      | 1287±58  | 1672±97  | 1141±41  | 1141±41      | 1648±60  | 1518±67  |          |
| <b>Isoproturon</b>                  | 0              | 7±12         | -5±14         | -10±16   | 5±9      | -7±31    | 13±15        | 13±13    | -29±20   | 4±5      |
|                                     | 0,1            | -32±49       | -13±19        | -10±29   | -11±37   | -20±39   | -7±27        | 15±15    | -22±46   | -1±12    |
|                                     | 0,5            | 15±16        | 12±16         | 8±17     | 25±25    | -13±21   | -1±15        | 37±6     | -5±11    | 9±10     |
|                                     | 1              | 37±9         | 32±13         | 40±19    | 59±12    | -5±19    | 22±10        | 56±6     | 10±20    | 19±4     |
|                                     | 2              | 84±18        | 70±34         | 67±23    | 92±22    | 16±32    | 23±21        | 132±14   | 99±190   | -20±121  |
|                                     | 5              | 141±74       | 186±49        | 212±29   | 172±73   | 130±127  | 82±41        | 265±107  | 109±47   | 58±13    |
|                                     | 10             | 360±33       | 392±59        | 390±66   | 348±65   | 371±127  | 166±25       | 481±127  | 324±65   | 113±28   |
|                                     | 50             | 1284±86      | 1234±51       | 1069±68  | 1169±66  | 1566±99  | 706±82       | 1381±138 | 1346±148 | 606±130  |
|                                     | 100            | 1529±49      | 1410±117      | 1220±146 | 1313±39  | 1580±127 | 798±119      | 1628±37  | 1516±160 | 851±150  |
| 500                                 | 1746±29        | 1725±51      | 1573±79       | 1601±18  | 1892±100 | 1287±61  | 1819±32      | 1897±58  | 1690±24  |          |
| <b>Paraquat</b>                     | 0              | 7±12         | -5±14         | -10±16   | 5±9      | -7±31    | 13±15        | 13±13    | -29±20   | 4±5      |
|                                     | 0,1            | -56±43       | -30±14        | -19±26   | -39±19   | -33±49   | -30±24       | -25±19   | -40±38   | -13±29   |
|                                     | 0,5            | -10±14       | -10±8         | -15±22   | -11±16   | -30±24   | -6±26        | -5±13    | -22±21   | -16±31   |
|                                     | 1              | -14±20       | -19±19        | -13±22   | -14±30   | -28±23   | 2±27         | 1±19     | -25±39   | -6±24    |
|                                     | 2              | -1±6         | -2±10         | 4±27     | 2±19     | 8±48     | 2±22         | 4±20     | 1±14     | 9±11     |
|                                     | 5              | 7±12         | 5±7           | -4±10    | 23±12    | 187±72   | 39±22        | 1±13     | -4±37    | 8±5      |
|                                     | 10             | 1±3          | 11±11         | 4±18     | 27±19    | 263±138  | 53±32        | 8±6      | 20±38    | 9±8      |
|                                     | 50             | 2±12         | 31±21         | 64±42    | 51±35    | 683±144  | 107±35       | 21±6     | 97±48    | 33±60    |
|                                     | 100            | 3±9          | 23±18         | 70±48    | 58±11    | 695±130  | 101±63       | 27±10    | 65±37    | 11±17    |
| 500                                 | -16±25         | 35±18        | 94±88         | 18±14    | 444±212  | 75±81    | 15±24        | 46±88    | 4±11     |          |
| <b>Simazin</b>                      | 0              | 7±12         | -5±14         | -10±16   | 5±9      | -7±31    | 13±15        | 13±13    | -29±20   | 4±5      |
|                                     | 0,1            | -34±38       | -20±23        | -10±21   | -10±44   | -6±118   | -38±42       | 0±23     | -55±43   | -31±29   |
|                                     | 0,5            | -20±41       | -2±22         | 2±36     | -7±37    | -38±83   | 6±59         | 10±34    | -28±78   | 9±66     |
|                                     | 1              | -1±15        | 3±22          | 14±29    | -3±18    | -37±93   | 17±28        | 1±18     | -21±45   | 16±25    |
|                                     | 2              | 4±17         | 34±14         | 44±28    | 24±24    | 11±52    | 29±34        | 33±16    | 14±35    | 36±26    |
|                                     | 5              | 50±19        | 105±61        | 73±42    | 60±43    | 58±85    | 46±25        | 62±25    | 63±88    | 59±19    |
|                                     | 10             | 88±25        | 159±63        | 188±72   | 120±60   | 69±56    | 139±133      | 112±41   | 76±115   | 107±76   |
|                                     | 50             | 281±170      | 617±341       | 513±226  | 413±255  | 612±300  | 374±147      | 432±264  | 430±384  | 355±264  |
|                                     | 100            | 747±106      | 1133±123      | 1023±31  | 809±90   | 1139±112 | 759±67       | 891±82   | 1136±142 | 996±144  |
| 500                                 | 1449±58        | 1656±47      | 1479±149      | 1372±76  | 1631±247 | 1162±44  | 1529±52      | 1822±139 | 1628±49  |          |

**Tabelle 18** Reaktionsraten (A/B)  $\pm$  Standardabweichung ( $n=6$ ) und daraus resultierende herbizidspezifische Wirkungsmuster (RP1) für fünf Herbizide (A=Atrazin, D=Diuron, I=Isoproturon, P=Paraquat, S=Simazin), berechnet anhand von neun verschiedenen Mikroalgenstämmen. Zu allen anderen Herbiziden signifikant unterschiedliche, d. h. herbizidspezifische Wirkungsraten ( $p<0,05$ ) sind fett hervorgehoben.

| B        |            | SAG<br>211-11b                  | CCAC<br>0011                    | SAG<br>B26.82                   | M1317                           | M1398                            | M1488                           | CCAC<br>0120                    | M1977                           | SAG61.81                        |                                 |
|----------|------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A        | SAG211-11b | A                               |                                 | 1,4 $\pm$ 0,8                   | 1,63 $\pm$ 0,4                  | 1,31 $\pm$ 5,09                  | 2,38 $\pm$ 0,73                 | 1,63 $\pm$ 0,94                 | 1,52 $\pm$ 0,56                 | <b>1,55<math>\pm</math>0,25</b> |                                 |
|          |            | D                               |                                 | <b>0,28<math>\pm</math>0,16</b> | 0,58 $\pm$ 0,18                 | 0,41 $\pm$ 0,2                   |                                 | <b>0,34<math>\pm</math>0,22</b> | 0,32 $\pm$ 0,87                 |                                 |                                 |
|          |            | I                               | 1,22 $\pm$ 0,62                 |                                 | 1,14 $\pm$ 0,52                 | 2,09 $\pm$ 1,51                  | 2,55 $\pm$ 4,31                 | 3,97 $\pm$ 3,55                 | <b>1,02<math>\pm</math>0,57</b> | 1,29 $\pm$ 0,67                 | <b>2,8<math>\pm</math>1,57</b>  |
|          |            | P                               |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          |            | S                               |                                 |                                 |                                 | 0,84 $\pm$ 2,45                  | 1,78 $\pm$ 0,71                 | 3,14 $\pm$ 4,29                 | 1,38 $\pm$ 0,57                 | 2,57 $\pm$ 2,47                 |                                 |
|          | CCAC0011   | A                               |                                 |                                 | 1,79 $\pm$ 1,09                 |                                  |                                 | 3,1 $\pm$ 1,48                  |                                 |                                 |                                 |
|          |            | D                               |                                 |                                 |                                 | 1,05 $\pm$ 0,33                  | <b>0,81<math>\pm</math>0,55</b> |                                 | <b>0,65<math>\pm</math>0,43</b> | -0,19 $\pm$ 5,16                | 1,16 $\pm$ 0,31                 |
|          |            | I                               | 1,05 $\pm$ 0,58                 |                                 | <b>1,06<math>\pm</math>0,5</b>  |                                  | 1,67 $\pm$ 1,64                 | 2,71 $\pm$ 1,09                 | <b>0,96<math>\pm</math>0,51</b> | 1,23 $\pm$ 0,23                 | <b>2,48<math>\pm</math>0,59</b> |
|          |            | P                               |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          |            | S                               |                                 |                                 | 1,59 $\pm$ 0,64                 |                                  | 2,25 $\pm$ 1,07                 | 4,48 $\pm$ 5,66                 |                                 |                                 | 1,41 $\pm$ 0,7                  |
|          | SAGB26.82  | A                               | 0,99 $\pm$ 0,6                  | 0,83 $\pm$ 0,57                 |                                 | 1,47 $\pm$ 0,71                  | -0,12 $\pm$ 4,61                | 2,16 $\pm$ 1,15                 | 1,64 $\pm$ 1,84                 |                                 | <b>1,46<math>\pm</math>0,73</b> |
|          |            | D                               | 5,27 $\pm$ 3,59                 | <b>2,33<math>\pm</math>1,02</b> |                                 | 2,72 $\pm$ 1,87                  | 2,06 $\pm$ 1,47                 | 7,51 $\pm$ 20,4                 | 1,68 $\pm$ 1,38                 | -0,64 $\pm$ 12,28               | 2,71 $\pm$ 1,3                  |
|          |            | I                               | 1,04 $\pm$ 0,56                 | 1,12 $\pm$ 0,49                 |                                 | 1,99 $\pm$ 1,35                  | 2,27 $\pm$ 3,76                 |                                 | 1,04 $\pm$ 0,58                 | 1,37 $\pm$ 0,37                 | 2,74 $\pm$ 0,82                 |
|          |            | P                               |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          |            | S                               |                                 | 0,69 $\pm$ 0,18                 |                                 | 0,17 $\pm$ 5,38                  | 1,55 $\pm$ 0,67                 | 3,21 $\pm$ 4,57                 | 0 $\pm$ 0                       | 2,51 $\pm$ 2,72                 | <b>0,94<math>\pm</math>0,55</b> |
|          | M1317      | A                               | 0,66 $\pm$ 0,21                 |                                 | 0,83 $\pm$ 0,39                 |                                  | 0,15 $\pm$ 2,94                 | 1,52 $\pm$ 0,59                 | 1,14 $\pm$ 1,32                 |                                 |                                 |
|          |            | D                               | <b>2,03<math>\pm</math>1,19</b> | 1,05 $\pm$ 0,31                 | 0,53 $\pm$ 0,29                 |                                  |                                 | 3,75 $\pm$ 10,81                | 0,63 $\pm$ 0,4                  | -0,29 $\pm$ 5,51                | <b>1,17<math>\pm</math>0,31</b> |
|          |            | I                               | 0,64 $\pm$ 0,33                 |                                 | 0,64 $\pm$ 0,31                 |                                  |                                 | 1,83 $\pm$ 0,75                 | 0,63 $\pm$ 0,36                 | 0,83 $\pm$ 0,24                 | <b>1,68<math>\pm</math>0,49</b> |
|          |            | P                               |                                 |                                 |                                 |                                  | 0,02 $\pm$ 0,4                  |                                 |                                 | 0,98 $\pm$ 0,63                 |                                 |
|          |            | S                               | 0,6 $\pm$ 0,26                  |                                 |                                 |                                  | 0,94 $\pm$ 0,52                 |                                 | 0,76 $\pm$ 0,4                  | 1,38 $\pm$ 1,64                 |                                 |
| M1398    | A          | 0,57 $\pm$ 0,29                 |                                 | 0,87 $\pm$ 0,65                 | 0,98 $\pm$ 0,48                 |                                  | 1,33 $\pm$ 0,71                 | 0,69 $\pm$ 0,65                 |                                 | <b>0,89<math>\pm</math>0,42</b> |                                 |
|          | D          | <b>2,9<math>\pm</math>1,09</b>  | <b>1,64<math>\pm</math>0,74</b> | 0,83 $\pm$ 0,65                 |                                 |                                  | 2,99 $\pm$ 4,73                 |                                 |                                 | 1,81 $\pm$ 0,7                  |                                 |
|          | I          | 0,83 $\pm$ 0,46                 | <b>0,79<math>\pm</math>0,29</b> | 0,78 $\pm$ 0,36                 |                                 |                                  | 1,82 $\pm$ 0,6                  | 0,72 $\pm$ 0,39                 | 0,88 $\pm$ 0,22                 | 1,74 $\pm$ 0,35                 |                                 |
|          | P          |                                 |                                 |                                 | <b>4,95<math>\pm</math>3,68</b> |                                  |                                 |                                 | <b>4,37<math>\pm</math>3,13</b> |                                 |                                 |
|          | S          | 0,64 $\pm$ 0,24                 |                                 |                                 | 0,72 $\pm$ 0,89                 |                                  | 1,42 $\pm$ 0,79                 | 0,74 $\pm$ 0,16                 | 0,98 $\pm$ 0,38                 |                                 |                                 |
| M1488    | A          | 0,46 $\pm$ 0,14                 | 0,39 $\pm$ 0,19                 | 0,58 $\pm$ 0,27                 | 0,72 $\pm$ 0,17                 | 0,28 $\pm$ 1,2                   |                                 | 0,69 $\pm$ 0,4                  |                                 | <b>0,7<math>\pm</math>0,21</b>  |                                 |
|          | D          |                                 |                                 | <b>0,41<math>\pm</math>0,21</b> | 0,93 $\pm$ 0,47                 | 0,64 $\pm$ 0,35                  |                                 | 0,51 $\pm$ 0,31                 | 0,74 $\pm$ 0,47                 |                                 |                                 |
|          | I          | 0,43 $\pm$ 0,3                  | 0,44 $\pm$ 0,21                 |                                 | 0,61 $\pm$ 0,18                 | 0,64 $\pm$ 0,35                  |                                 | 0,42 $\pm$ 0,26                 | 0,5 $\pm$ 0,12                  | <b>0,98<math>\pm</math>0,16</b> |                                 |
|          | P          |                                 |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          | S          | 0,56 $\pm$ 0,25                 | 0,41 $\pm$ 0,21                 | 0,62 $\pm$ 0,31                 |                                 | 0,83 $\pm$ 0,33                  |                                 |                                 | 1,43 $\pm$ 1,87                 | <b>0,51<math>\pm</math>0,27</b> |                                 |
| CCAC0120 | A          | 0,74 $\pm$ 0,19                 |                                 | 1,03 $\pm$ 0,59                 | 1,23 $\pm$ 0,42                 | 0,77 $\pm$ 3,64                  | 1,77 $\pm$ 0,81                 |                                 | 1,11 $\pm$ 0,45                 | <b>1,16<math>\pm</math>0,35</b> |                                 |
|          | D          | <b>3,57<math>\pm</math>1,27</b> | <b>2,02<math>\pm</math>0,89</b> | 1,01 $\pm$ 0,63                 | 1,93 $\pm$ 0,65                 |                                  | 3,62 $\pm$ 5,21                 |                                 | 1 $\pm$ 3,08                    | 2,31 $\pm$ 1,03                 |                                 |
|          | I          | 1 $\pm$ 0,55                    | <b>1,03<math>\pm</math>0,43</b> | 1 $\pm$ 0,48                    | 1,8 $\pm$ 0,86                  | 1,8 $\pm$ 1,86                   | 3,13 $\pm$ 1,66                 |                                 | 1,33 $\pm$ 0,36                 | 2,71 $\pm$ 0,86                 |                                 |
|          | P          |                                 |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          | S          | 0,82 $\pm$ 0,29                 |                                 |                                 | 0,27 $\pm$ 3,45                 | 1,42 $\pm$ 0,37                  | 1,91 $\pm$ 3,01                 |                                 | 1,92 $\pm$ 1,74                 |                                 |                                 |
| M1977    | A          | 0,75 $\pm$ 0,28                 | 0,65 $\pm$ 0,37                 | 0,95 $\pm$ 0,52                 |                                 |                                  | 1,68 $\pm$ 0,5                  | 1,13 $\pm$ 0,72                 |                                 | 1,13 $\pm$ 0,38                 |                                 |
|          | D          | <b>2,15<math>\pm</math>0,99</b> | <b>1,23<math>\pm</math>0,52</b> | 0,59 $\pm$ 0,39                 | 1,19 $\pm$ 0,35                 |                                  |                                 | 0,66 $\pm$ 0,32                 |                                 | 1,38 $\pm$ 0,48                 |                                 |
|          | I          | 0,99 $\pm$ 0,59                 | 0,84 $\pm$ 0,15                 | 0,79 $\pm$ 0,23                 | 1,29 $\pm$ 0,35                 | 1,21 $\pm$ 0,38                  | 2,16 $\pm$ 0,79                 | 0,83 $\pm$ 0,36                 |                                 | <b>2,04<math>\pm</math>0,39</b> |                                 |
|          | P          |                                 |                                 |                                 | 1,53 $\pm$ 1,11                 | <b>-0,09<math>\pm</math>0,78</b> |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          | S          | 0,64 $\pm$ 0,38                 |                                 |                                 | 0,61 $\pm$ 1,17                 | 1,11 $\pm$ 0,29                  | 1,64 $\pm$ 1,57                 | 0,75 $\pm$ 0,31                 |                                 |                                 |                                 |
| SAG61.81 | A          | 0,67 $\pm$ 0,14                 | <b>0,55<math>\pm</math>0,16</b> | <b>0,89<math>\pm</math>0,5</b>  | 1,06 $\pm$ 0,24                 | 1,27 $\pm$ 1,84                  | 1,55 $\pm$ 0,43                 | <b>1,05<math>\pm</math>0,78</b> | 0,97 $\pm$ 0,31                 |                                 |                                 |
|          | D          |                                 | <b>0,92<math>\pm</math>0,22</b> |                                 | 0,93 $\pm$ 0,33                 | 0,72 $\pm$ 0,56                  | 3,59 $\pm$ 12,53                | 0,62 $\pm$ 0,55                 | -0,74 $\pm$ 7,23                |                                 |                                 |
|          | I          | 0,52 $\pm$ 0,4                  | 0,42 $\pm$ 0,09                 | <b>0,39<math>\pm</math>0,1</b>  | 0,65 $\pm$ 0,21                 | 0,6 $\pm$ 0,13                   | 1,05 $\pm$ 0,23                 | 0,42 $\pm$ 0,2                  | 0,51 $\pm$ 0,1                  |                                 |                                 |
|          | P          |                                 |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|          | S          |                                 | 0,81 $\pm$ 0,26                 | <b>1,24<math>\pm</math>0,47</b> | 0,5 $\pm$ 5,14                  | 1,71 $\pm$ 0,7                   | 2,56 $\pm$ 4,06                 | <b>1,62<math>\pm</math>0,69</b> | 2,97 $\pm$ 3,75                 |                                 |                                 |

*Erklärung*

"Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Michael Melkonian betreut worden."



Köln, Dezember 2004

Björn Podola

*Publikationen*

Nachfolgend aufgeführte Teile dieser Arbeit wurden bisher publiziert:

- Podola, B. & Melkonian, M. (2002). Mikroalgen als Biosensoren für Luftschadstoffe. In: Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie, Band 32. Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie, Cottbus. Verlag Die Werkstatt, Göttingen. S. 367.
- Podola, B. & Melkonian, M. (2003). A long-term operating algal biosensor for the rapid detection of volatile toxic compounds. *Journal of Applied Phycology* **15**: 415-424.
- Podola, B., Nowack, E. C. M. & Melkonian, M. (2004). The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. *Biosensors and Bioelectronics* **19**: 1253-1260.
- Melkonian, M. & Podola, B. (2004). Verfahren und Vorrichtung zur Kultivierung von eukaryotischen Mikroorganismen oder Blaualgen sowie Biosensor mit kultivierten eukaryotischen Mikroorganismen oder Blaualgen. Internationale Patentanmeldung PCT/EP2004/008144.