
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 CO₂-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