

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5608

**Miniaturisierte Fluoreszenz-
emissionsmessung an
Thylakoiden zum Nachweis der
Hemmung des photosyntheti-
schen Elektronentransportes
durch Photosystem II-Herbizide**
Stabilisierung von Thylakoiden und
Entwicklung eines Biosensors für Herbizide

D. Merz

Institut für Radiochemie

Juni 1995

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5608

**Miniaturisierte Fluoreszenzmissionsmessung
an Thylakoiden zum Nachweis der Hemmung
des photosynthetischen Elektronentransportes
durch Photosystem II - Herbizide:**

**Stabilisierung von Thylakoiden und
Entwicklung eines Biosensors für Herbizide**

Daniela Merz

Institut für Radiochemie

von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1995

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Miniaturisierte Fluoreszenzmissionsmessung an Thylakoiden zum Nachweis der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch Photosystem II - Herbizide: Stabilisierung von Thylakoiden und Entwicklung eines Biosensors für Herbizide

Ziel der Doktorarbeit war es, ein miniaturisiertes Meßsystem zum Nachweis von Photosystem II-Herbiziden zu entwickeln. Dieser Biosensor soll zum quantitativen Screening in der Wasseranalytik (Trinkwasser, Oberflächengewässer) vor Ort eingesetzt werden, aber auch Herbizid-Entwicklern und -Anwendern Informationen über die biologische Wirksamkeit ihrer Proben geben können.

Der Nachweis der Photosystem II-Herbizide wird über deren biologische Wirkung geführt. Die Blockade der photosynthetischen Elektronentransportkette wird in der vorliegenden Arbeit über die Veränderungen der Fluoreszenzmissionskinetiken nachgewiesen. Durch eine gezielte Analyse der Signale wird es in dieser Arbeit möglich, spezifisch den unmittelbaren Herbizideffekt zu verfolgen. Der Vorteil dieses Nachweisverfahrens liegt darin, daß zu der quantitativen Summen-Bestimmung von Herbiziden weiterführende Informationen erhalten werden, nämlich über die *biologische Wirksamkeit* der zu untersuchenden Probe auf die aus Blättern isolierten, pflanzlichen Biorezeptoren (isolierte Thylakoide).

Isolierte Thylakoide besitzen eindeutige Selektivitätsvorteile gegenüber anderen biologischen Rezeptoren (insbesondere gegenüber phototrophen Bakterien); ihre extreme Instabilität verhinderte jedoch bisher ihren Einsatz in einem praktikablen Biosensor; so erfordert ihre Verwendung als Rezeptoren in einem Biosensor die Entwicklung einer Methode zur Stabilisierung von Thylakoiden. In grundlegenden Untersuchungen dieser Arbeit zur Alterung, Stabilisierung und Immobilisierung von Thylakoiden erwies sich hierbei die Gefriertrocknung nach intensiver Optimierung als das beste Verfahren. Die Verwendbarkeit der biologischen Rezeptoren (isolierte Thylakoide) bei 25 °C konnte durch Gefriertrocknung von wenigen Stunden auf 20 Tage verlängert werden.

Um eine hochempfindliche Herbizidbestimmung im sub- $\mu\text{g/l}$ -Bereich realisieren zu können, ist es notwendig, die Elektronenakzeptoren der Redoxsysteme vor jeder Messung in einen definierten, möglichst vollständig oxidierten Zustand zu bringen. In dieser Arbeit wird gezeigt, wie durch Lichtinduktion unter Ausnutzung der Charakteristika der Elektronentransportkette ein reproduzierbarer Ausgangszustand in wenigen Sekunden eingestellt werden kann. Dadurch wurde zudem die Gesamt-Analysendauer von 15 Minuten auf 90 Sekunden verkürzt.

Es wird weiterhin beschrieben, wie miniaturisierte Bauteile ausgewählt und erprobt wurden, und wie der Herbizid-Biosensor als Labormuster konzipiert, hergestellt und getestet wurde. Es resultierte ein zigarrenkistengroßes Feldgerät, mit dem Vor-Ort-Messungen möglich sind.

Mit diesem optimierten und miniaturisierten Meßsystem für die Fluoreszenzmissionsmessung an isolierten Thylakoiden können in wäßriger Lösung ohne Anreicherung 0,1 $\mu\text{g/l}$ Diuron nachgewiesen werden. Für Wirkbestimmungen wird eine Nachweisgrenze von 0,04 $\mu\text{g/l}$ Diuron ohne Anreicherung erreicht.

Matrixeffekte bei der Untersuchung von Wirkproben und Trinkwasserproben wurden untersucht und minimiert. Versuche in realen Matrices zeigen, daß Herbizidbestimmungen in realen Matrices möglich sind.

In weiterführenden Versuchen wird gezeigt, wie diese Nachweismethode zu einem Meßverfahren in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders mit Blitzanregung weiterentwickelt werden kann. Hierdurch werden Serienuntersuchungen und die Erhöhung des Probendurchsatzes ermöglicht.

Miniaturized fluorescence emission measurement in thylakoids for the detection of the inhibition of photosynthetic electron transport by photosystem II herbicides: stabilization of thylakoids and development of a biosensor for herbicides

The purpose of this doctoral work was the development of a miniaturized measurement system for the detection of photosystem II herbicides. This biosensor is to be used in the field for quantitative screening in water analysis (drinking water, surface water), but should also be able to provide developers and users of herbicides with information on the biological efficacy of their samples.

The detection of photosystem II herbicides is achieved by means of their biological effect. In the present work, the inhibition of the photosynthetic electron transport chain is detected by means of changes in the kinetics of fluorescence emission. A precise analysis of the signals in this work makes it possible to monitor specifically the direct herbicide effect. The advantage of this method of detection lies in the fact that information supplementary to the quantitative total detection of herbicides is obtained, regarding the *biological inhibitory activity* of the sample to be investigated on plant bioreceptors isolated from leaves (thylakoids).

Isolated thylakoids have clear selectivity advantages when compared with other biological receptors (especially with phototrophic bacteria); however, their extreme instability has prevented their use in a practical biosensor to date; their use as receptors thus requires the development of a method for the stabilization of thylakoids. In the present work, fundamental investigations of the ageing, stabilization and immobilization of thylakoids showed freeze-drying, after intensive optimization, to be the best procedure. The useable lifetime of the biological receptors (isolated thylakoids) at 25 °C could be extended from a few hours to 20 days by freeze-drying.

In order to achieve highly sensitive herbicide detection in the sub- $\mu\text{g/l}$ range, the electron acceptors of the redox system must be brought as completely as possible to a defined oxidized state before each measurement. In this work, it is shown that a reproducible initial state can be achieved within a few seconds by a light induced process that exploits the characteristics of the electron transport chain. Additionally, this results in a reduction of the total analysis duration from 15 minutes to 90 seconds.

The conception, construction and testing of a laboratory prototype of the herbicide biosensor are also described, together with the selection and testing of suitable miniaturized components. The result was a cigar box-sized portable instrument with which field measurements are possible.

With this optimized and miniaturized measurement system for fluorescence emission measurement in isolated thylakoids, 0.1 $\mu\text{g/l}$ diuron can be measured in aqueous solutions without any extraction. For activity measurements, a detection threshold of 0.04 $\mu\text{g/l}$ diuron was achieved without extraction.

Matrix effects in the investigation of activity samples and drinking water samples were investigated and minimized. Initial experiments in real matrices show that herbicide measurements in real matrices are possible.

Further experiments show how this detection method can be developed into a measurement procedure in microtiter plates using a fluorescence reader with flash excitation. This allows serial investigations and an increased sample throughput.

INHALTSVERZEICHNIS

I. KURZREFERAT	1
II. EINLEITUNG.....	3
II.1. Herbizide und Herbizidanalytik.....	3
II.1.1. Bedeutung und rechtliche Grundlagen der Herbizidanalytik.....	3
II.1.2. Konventionelle Herbizidanalytik und PS II-Herbizide.....	4
II.1.3. Wirkungsweise von PSII-Herbiziden: Photosynthetische Elektronentransportkette und Hemmung des Elektronentransportes.....	8
II.1.3.1. Prinzip der Photosynthese.....	8
II.1.3.2. Photosynthetische Elektronentransportkette (Nicht-zyklischer Elektronentransport).....	9
II.1.3.3. Photosystem II und Q _B - Bindestelle.....	10
II.1.3.4. Photosystem I.....	11
II.1.3.5. Variable Chlorophyllfluoreszenz.....	11
II.1.3.6. Hemmung des Elektronentransportes durch PS II-Herbizide und Nachweis der Hemmung.....	13
II.2. Problemstellung und Ziele der Arbeit	17
II.2.1. Biosensoren.....	17
II.2.2. Isolierte Thylakoide als Rezeptoren.....	18
II.2.3. Ziele der Arbeit und Strategie.....	20
II.3. Definitionen	22
II.3.1. Nachweisprinzip und Auswerteverfahren.....	22
II.3.2. Statistik.....	24
II.3.3. Zusammenstellung von Bezeichnungen, Abkürzungen und Symbolen.....	26
III. EIGENE VERSUCHSREIHEN	28
III.1. Aktivität isolierter Thylakoide und Aktivitätsabnahme mit der Zeit.....	28

III.1.1. Ziele	28
III.1.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	28
III.1.3. Ergebnisse und Diskussion.....	31
III.1.3.1. Kontrolle der photosynthetischen Aktivität der präparierten Thylakoide.....	31
III.1.3.2. Alterungsverhalten der Thylakoide unter verschiedenen Lagerbedingungen.....	33
III.1.3.3. Mechanismen der Alterung (Literatur und eigene Versuche)	36
III.1.4. Schlußfolgerungen.....	40
III.2. Stabilisierung von Thylakoiden.....	42
III.2.1. Ziele	42
III.2.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	42
III.2.3. Ergebnisse und Diskussion.....	45
III.2.3.1. Gefriertrocknung von Thylakoiden - Optimierung des Verfahrens.....	45
III.2.3.2. Reaktionsfähigkeit der Thylakoidpulver mit Herbiziden	55
III.2.3.3. Alterung von Thylakoidpulvern	55
III.2.3.4. Stabilisierung durch Ersatz des Wasserspaltungssystems.....	59
III.2.4. Schlußfolgerungen.....	65
III.3. Immobilisierung von Thylakoiden	67
III.3.1. Motivation und Ziele	67
III.3.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	68
III.3.3. Ergebnisse und Diskussion.....	68
III.3.3.1. Immobilisierung in Polyacrylamidhydrazid-Polymere	68
III.3.3.2. Immobilisierung durch den Sol/Gel-Prozeß.....	74
III.3.3.3. Immobilisierung in einem Dialyseschlauch.....	76
III.3.4. Schlußfolgerungen zur Immobilisierung für den zu entwickelnden Biosensor.....	78
III.4. Verfahren zur beschleunigten Reoxidation.....	79
III.4.1. Motivation und Ziele	79
III.4.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	79
III.4.3. Ergebnisse und Diskussion.....	82
III.4.3.1. Reoxidation mit Licht	82
III.4.3.2. Reoxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III	88
III.4.4. Schlußfolgerungen für den Biosensor.....	90

III.5. Miniaturisierung der Meßtechnik.....	91
III.5.1. Motivation und Ziele	91
III.5.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	91
III.5.3. Ergebnisse und Diskussion.....	92
III.5.3.1. Anregung.....	92
III.5.3.2. Strahlteilung.....	97
III.5.3.3. Detektion	99
III.5.3.4. Reoxidation.....	100
III.5.3.5. Elektronik	102
III.5.4. Schlußfolgerungen.....	102
III.6. Realisierung eines Labormusters	103
III.6.1. Aufbau	103
III.6.2. Definitionen.....	104
III.6.3. Durchführung der Justage.....	104
III.6.4. Analysenablauf für die Spurenanalytik.....	105
III.6.5. Analysenablauf für Wirkproben.....	105
III.7. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems.....	106
III.7.1. Ziele.....	106
III.7.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	106
III.7.3. Ergebnisse und Diskussion.....	107
III.7.3.1. Auswertung der Herbizidsignale und Reproduzierbarkeit.....	107
III.7.3.2. Funktionstest: Dosis-Wirkungskurve für verschiedene Herbizide	110
III.7.3.3. Justage und Grundlinie	111
III.7.3.4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze	114
III.7.3.5. Analysendauer.....	118
III.7.3.6. Dauer der Verwendbarkeit der Rezeptoren.....	119
III.7.3.7. Proben-und Außentemperatur.....	121
III.7.3.8. Variierende Lichtverhältnisse bei der Probenvorbereitung.....	122
III.7.3.9. Chemische Selektivität und Matrixeffekte bei der Untersuchung von Wirkproben: maximale Ethanolkonzentration.....	124
III.7.3.10. Chemische Selektivität bei der Untersuchung von Trinkwasser: Nicht-herbizidische Triazine.....	125

III.7.3.11. Matrixeffekte bei Trinkwasserproben: Ionen	126
III.7.3.12. Minimierung des Calcium- und Magnesiumeinflusses: EDTA.....	133
III.7.3.13. Minimierung des Calcium- und Magnesiumeinflusses: Modifizierung der Pufferzusammensetzung durch Vorlegen von Calciumionen	135
III.7.3.14. Reale Proben: mit Herbizid aufdotiertes Trinkwasser	138
III.8. Erhöhung des Probendurchsatzes in Mikrotiterplatten.....	141
III.8.1. Ziele.....	141
III.8.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche	141
III.8.3. Ergebnisse und Diskussion.....	142
III.8.3.1. Fluoreszenzkinetiken durch Anregung mit Blitzen.....	142
III.8.3.2. Herbizidbestimmung in Mikrotiterplatten.....	143
III.8.4. Diskussion und Schlußfolgerungen	144
IV. ERGEBNISÜBERBLICK UND GESAMTDISKUSSION	145
IV.1. Überblick über die Ergebnisse der Arbeit.....	145
IV.2. Perspektiven für die miniaturisierte Fluoreszenzemissionsmessung an Thylakoiden zum Nachweis der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch PS II-Herbizide.....	151
IV.3. Beurteilung des miniaturisierten Meßsystems und Einsatzmöglichkeiten für den entwickelten Biosensor.....	157
V. AUSBLICK	162
VI. MATERIAL UND METHODEN.....	164
VI.1. Equipment.....	164
VI.2. Bauteile für den Sensor.....	164
VI.3. Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	165
VI.4. Biologische Puffer	166

VI.5. Präparation von Thylakoiden aus Erbsen und Kopfsalat.....	167
VI.6. Aktivitätsmessung: Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem.....	170
VI.7. Aktivitätsmessung: Messung der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit	171
VI.8. Gefriertrocknung und Handhabung von Thylakoidpulvern.....	172
VI.9. Messung der DCPIP-Reduktionsgeschwindigkeit	173
VI.10. Ersatz des Wasserspaltungssystems	176
VI.11. Immobilisierung in PAAH-Polymere	177
VI.12. Immobilisierung nach dem Sol/Gel-Prozeß.....	178
VI.13. Dialyse-Verfahren	178
VI.14. Beschleunigung der Reoxidation	179
VI.15. Versuche zur Meßtechnik und Realisierung.....	180
VI.16. Messungen am Dioden-Array-Spektrometer	181
VI.17. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems	182
VI.18. Versuche am Fluoreszenzreader	183
VII. LITERATURVERZEICHNIS	184
VIII. ANLAGEN.....	189

I. KURZREFERAT

Ziel der Doktorarbeit war es, ein miniaturisiertes Meßsystem zum Nachweis von Photosystem II-Herbiziden zu entwickeln. Dieser Biosensor soll als quantitative Screening-Methode in der Wasseranalytik (Trinkwasser, Oberflächengewässer) vor Ort eingesetzt werden, aber auch Herbizid-Entwicklern und -Anwendern Informationen über die biologische Wirksamkeit ihrer Proben geben können.

Der Nachweis der Photosystem II-Herbizide wird über deren biologische Wirkung geführt. Diese biologische Wirkung besteht vereinfacht ausgedrückt darin, daß der photosynthetische Elektronentransport blockiert wird, wodurch das „Unkraut“ auf dem Feld verkümmert.

Die Blockade der photosynthetischen Elektronentransportkette wird in der vorliegenden Arbeit über die Veränderungen der Fluoreszenzemissionskinetiken nachgewiesen. Durch eine gezielte Analyse der Signale wird es in dieser Arbeit möglich, spezifisch den unmittelbaren Herbizideffekt zu verfolgen.

Der Vorteil dieses Nachweisverfahren liegt darin, daß zu der quantitativen Summen-Bestimmung von Herbiziden weiterführende Informationen erhalten werden, nämlich über die *biologische Wirksamkeit* der zu untersuchenden Probe auf die aus Blättern isolierten, pflanzlichen Biorezeptoren (hier: isolierte Thylakoide). Derartige toxikologische Hinweise sind für zukünftige Analysenverfahren unverzichtbar, da sie den Analytiker in die Lage versetzen, die Quantität einer Herbizidbelastung nicht nur festzustellen, sondern auch zu werten. Antagonismen, Synergismen und Additionsreaktionen - welche oftmals weder bekannt noch berechenbar sind - werden hierbei berücksichtigt.

Isolierte Thylakoide besitzen eindeutige Selektivitätsvorteile gegenüber anderen biologischen Rezeptoren (insbesondere gegenüber phototrophen Bakterien); ihre extreme Instabilität verhinderte jedoch bisher ihren Einsatz in einem praktikablen Biosensor; so erfordert ihre Verwendung als Rezeptoren in einem Biosensor die Entwicklung einer Methode zur Stabilisierung von Thylakoiden. In grundlegenden Untersuchungen dieser Arbeit zur Alterung, Stabilisierung und Immobilisierung von Thylakoiden erwies sich hierbei die Gefriertrocknung nach systematischer, intensiver Optimierung als das beste Verfahren. Die Verwendbarkeit der biologischen Rezeptoren (isolierte Thylakoide) bei 25 °C konnte durch Gefriertrocknung von wenigen Stunden auf 19 Tage verlängert werden.

Um eine hochempfindliche Herbizidbestimmung im sub- $\mu\text{g/l}$ -Bereich realisieren zu können, ist es notwendig, die Elektronenakzeptoren der Redoxsysteme vor jeder Messung in einen definierten, möglichst vollständig oxidierten Zustand zu bringen. In dieser Arbeit wird gezeigt, wie durch Lichtinduktion unter Ausnutzung der Charakteristika der Elektronentransportkette ein reproduzierbarer Ausgangszustand in wenigen Sekunden eingestellt werden kann. Dadurch wurde außerdem die Gesamt-Analysendauer von 15 Minuten auf 90 Sekunden verkürzt.

In dieser Arbeit wird weiterhin beschrieben, wie miniaturisierte Bauteile ausgewählt und erprobt wurden, und wie der Herbizid-Biosensor als Labormuster konzipiert, hergestellt und getestet wurde. Es resultierte ein zigarrenkistengroßes Feldgerät, mit dem Vor-Ort-Messungen möglich sind.

Mit diesem optimierten und miniaturisierten Meßsystem für die Fluoreszenzemissionsmessung an isolierten Thylakoiden können in idealen Lösungen ohne jede Anreicherung $0,1 \mu\text{g/l}$ Diuron nachgewiesen werden. Für Wirkbestimmungen wird eine Nachweisgrenze von $0,04 \mu\text{g/l}$ Diuron ohne Anreicherung erreicht.

Matrixeffekte bei der Untersuchung von Wirkproben und Trinkwasserproben wurden untersucht und minimiert. Erste Versuche in realen Matrices zeigen, daß Herbizidbestimmungen in realen Matrices möglich sind.

In weiterführenden Versuchen wird gezeigt, wie diese Nachweismethode zu einem Meßverfahren in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders mit Blitzanregung weiterentwickelt werden kann. Hierdurch werden Serienuntersuchungen und die Erhöhung des Probendurchsatzes ermöglicht.

Durch die Entwicklung ähnlicher, auf dem Wirkprinzip beruhender Analysenmethoden für routinemäßig in der Umweltanalytik bestimmte Parameter kann eine neue Dimensionierung der Umweltanalytik resultieren. So werden dem Gesetzgeber analytische Verfahren an die Hand gegeben, die es ermöglichen, in der Umweltgesetzgebung auch Wirkaussagen als Grenzwerte zu berücksichtigen.

Die Ergebnisse der Arbeit sind in Abschnitt IV.1. *Übersicht über die Ergebnisse der Arbeit*, Seite 145, zusammengestellt.

II. EINLEITUNG

II.1. Herbizide und Herbizidanalytik

II.1.1. Bedeutung und rechtliche Grundlagen der Herbizidanalytik

In einer modernen Landwirtschaft sind Mittel und Methoden zum Pflanzenschutz und zur Schädlingsbekämpfung unverzichtbar. Sie müssen, um die beabsichtigten Effekte zu erzielen, biologisch aktive Wirkstoffe enthalten. Bei ihrer Anwendung muß daher sichergestellt sein, daß keine Gefährdungen für die Gesundheit des Menschen und die Umwelt auftreten. Pflanzenschutzmittel dürfen nur eingeführt oder in die Bundesrepublik Deutschland in den Verkehr gebracht werden, wenn sie nach dem Pflanzenschutzgesetz (*PflSchG*) zugelassen sind. Ihre Anwendung regelt die Pflanzenschutzanwendungsverordnung (*PfAnwV*). Das Pflanzenschutzgesetz verpflichtet den Antragsteller, für die Zulassung eines Pflanzenschutzmittels eine geeignete Einzelmethode vorzulegen, mit der man Rückstände des Wirkstoffes in Wasser mit guter Ausbeute isolieren, identifizieren und quantitativ bestimmen kann.

Ungefähr 80% der etwa 30000 Tonnen Pflanzenschutzmittel, die jährlich in der Bundesrepublik angewandt werden, werden in der Landwirtschaft eingesetzt. Den mengenmäßig größten Anteil nehmen hierbei die Herbizide mit 62 % ein, gefolgt von den Fungiziden (24 %), den Insektiziden (7 %) und sonstigen Gruppen (7 %) (*DFG-Mitteilung XVI, 1990*).

Aus den bisherigen Befunden zum Vorkommen von Pflanzenschutzmitteln in verschiedenen Bereichen der Umwelt kann gefolgert werden, daß eine Verunreinigung von Wasser, das zur Gewinnung von Trinkwasser dient, auch bei ordnungsgemäßer Anwendung der Mittel nicht auszuschließen ist. Dies ist primär darauf zurückzuführen, daß bei der Anwendung im Freiland Spuren von Pflanzenschutzmitteln zwangsläufig auch in die an die Zielflächen angrenzenden Kompartimente, so auch in das Oberflächen- und Grundwasser, gelangen. Die häufig geforderte Null-Immission wäre deshalb nur durch einen völligen Verzicht auf den chemischen Pflanzenschutz zu erreichen; dies ist jedoch auf absehbare Zeit ohne gravierenden Auswirkungen auf die Nahrungsmittelproduktion nicht möglich (*DFG-Mitteilung XVI, 1990*).

Hieraus ergeben sich vielfältige Aufgaben für die Ökodiagnose: Umfang der Anwendung und Anwendungsmuster einer Substanz müssen ebenso ermittelt werden, wie ihre Mobilität in der Umwelt (Ausbreitung, Aufnahme und Akkumulation). Für die Bewertung eines

Analysenergebnisse sind Daten zur Risikoabschätzung (Toxikologie, Persistenz und Abbau- bzw. Umwandlungsreaktionen) notwendig. Grundlage und Ausgangspunkt einer Ökodiagnose sind chemische Analysen von Umweltproben.

Leistungsfähige Analysensysteme für Herbizide werden insbesondere aus folgenden Gründen benötigt:

1. Humantoxikologische Wirkung. Sie ist je nach Einzelsubstanz verschieden und kann erheblich sein.
2. Irreparable Veränderungen in Ökosystemen auch bei geringen Herbizid-Konzentrationen.
3. Verzögerung und Verhinderung der Selbstreinigungsprozesse von Gewässern (beispielsweise Verzögerung der Nitrifikation ab 0.7 µg/l Atrazin (Zimmermann *et al.*, 1990)).
4. Schutz des Trinkwassers, Sicherstellung der Versorgung mit einwandfreiem Trinkwasser.

Die in der Trinkwasserverordnung (*TrinkwV*) festgelegten Grenzwerte gehen über eine rein toxikologisch begründete Festlegung hinaus und berücksichtigen die Tatsache, daß Trinkwasser das meist konsumierte, wichtigste Lebensmittel ist, welches gemäß DIN 2000 „appetitlich sein und zum Genuß anregen“ soll (*DIN 2000*). Für chemische Stoffe zur Pflanzenbehandlung und Schädlingsbekämpfung, einschließlich deren toxischer Hauptabbauprodukte (PBSM) sind in der *TrinkwV* als „analytische Nullwerte“ folgende Grenzwerte festgelegt: 0.1 µg/l für die Einzelsubstanz und 0.5 µg/l für die Summe aller vorhandenen PBSM. Diese Grenzwerte gelten seit Umsetzung der EG-Richtlinie in die Verordnungen der Einzelstaaten EG-weit.

II.1.2. Konventionelle Herbizidanalytik und PS II-Herbizide

Unter dem Begriff Herbizide (lat. ‘Krauttöter’) werden alle chemischen Substanzen zusammengefaßt, die zur Vernichtung von Pflanzen verwendet werden. Gemeinsam ist dieser Gruppe der Verwendungszweck; strukturell handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe: Sie umfaßt chemisch so unterschiedliche Verbindungen wie Triazine, Phenylharnstoffe, Uracile, Hydroxybenzonnitrile, Antrachinone usw. (vergleiche Abbildung 1-1). Innerhalb dieser Substanzklassen gibt es jedoch auch Verbindungen, die keine herbizidische Wirkung aufweisen.

Bei der Festlegung der pauschalen Grenzwerte für Pflanzenschutzmittel hat man sich an der besonders guten Nachweismöglichkeit von Organochlor-Insektiziden orientiert, deren Anwendung in der Landwirtschaft inzwischen stark eingeschränkt wurde. Die heute

vorwiegend verwendeten Wirkstoffe stellen hohe Anforderungen an die Identifizierung und quantitative Bestimmung bei sehr niedrigen Konzentrationen. Bei der Analytik der Pflanzenschutzmittelrückstände muß man unterscheiden zwischen sogenannten Einzelmethoden, die zur Ermittlung eines definierten Wirkstoffes bestimmt und dafür optimal konzipiert sind, und den sogenannten Multimethoden, die eine größere Gruppe von Wirkstoffen erfassen (*DFG-Mitteilung XVI, 1990*).

Besondere Bedeutung bei der Spurenanalytik von Herbiziden hat die Probenvorbereitung (Probennahme, Anreicherung, Reinigung), die auf die Art der Proben sowie auf die Selektivität der Bestimmungsmethoden abgestimmt werden muß. Zur Analytik werden chromatographische Verfahren verwendet: Polare Herbizide werden bevorzugt mit Dichlormethan und über eine Säule aus Aktivkohle, Magnesiumoxid und Celite isoliert. Als Reinigungsverfahren stehen Säulenchromatographie, Gel-Chromatographie und Sweep-Co-Destillation zur Verfügung. Die Analyse erfolgt beispielsweise über Kapillar-GC (Gaschromatographie) mit einem ECD (Elektron Capture Detektor) oder AED (Atomemissionsdetektor) als Detektor; für polare Herbizide besonders gut geeignet ist die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) mit anschließendem Photodiodenarray-Detektor (*Schwedt, 1992*). Neuere Untersuchungen befassen sich mit der Optimierung der Bestimmung von Triazin-Herbiziden aus Trinkwasser durch Festphasenextraktion und anschließende GC-Analyse, gekoppelt mit einem NPD (nitrogen-phosphorus detection) oder mit Massenspektrometrie als Detektor (*Psathaki et al., 1994*). Ebenso wird die Entwicklung neuer Extraktionsverfahren und Methoden zur Automatisierung vorangetrieben (vergl. *Wells et al., 1994; Sacchero et al. 1994; Chiron et al., 1994; Naish-Chamberlain et al., 1991*).

Diese konventionellen Methoden der Herbizidanalytik ermöglichen den geforderten, strukturellen Nachweis praktisch aller Wirkstoffe, für die der Grenzwert der TrinkwV gilt; die festgelegten Nachweisgrenzen können allerdings erst nach Anreicherung (Extraktion) und arbeitsintensiven Reinigungsschritten erreicht werden. Zusätzlich zu den Fehlerquellen, die diese Aufarbeitungsschritte beinhalten, handelt es sich also um apparativ aufwendige Methoden mit hohem Zeitbedarf, die nur von qualifiziertem Personal durchgeführt werden kann.

Diese Methoden sind heute unverzichtbar für die Herbizidanalytik. Jedoch besteht ein Bedarf in schnellen und zuverlässigen Screening-Methoden, die ergänzend zu den konventionellen Methoden verwendet werden sollen, und mit denen beispielsweise unbelastete Proben aussortiert, und so das Probenaufkommen reduziert werden kann.

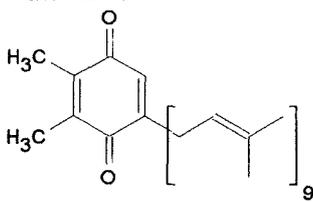
Ein Weg, um eine größere Anzahl Proben in kurzer Zeit möglichst automatisiert analysieren zu können, bietet das ELISA-Verfahren (Enzym linked immunoabsorbent assay). Hierbei werden spezifische Antigen (bzw. Hapten)-Antikörper-Reaktionen zum Nachweis ausgenutzt. Das Verfahren zeichnet sich durch hohe Selektivität und Empfindlichkeit aus. Jedoch erweist sich hier das strukturelle Nachweisprinzip als besonderer Nachteil: Für jede einzelne Substanz (jedes einzelne Hapten), die zur Gruppe der Herbizide gezählt wird, muß zunächst ein Antikörper erzeugt und isoliert werden. Das ELISA-Verfahren wird dennoch als Ergänzung zu den konventionellen Methoden eine zunehmende Bedeutung erlangen (*Schwedt, 1992*).

Bei der Vielzahl der chemisch und strukturell unterschiedlichen Substanzen, die zu den Herbiziden gezählt werden, ist es angezeigt, ein anderes analytisches Kriterium als den strukturellen Nachweis zur Detektion zu verwenden. Hierfür besonders geeignet ist die Einteilung der Substanzen nach ihrer herbizidischen Wirkungsweise. Über 25 chemisch-strukturell unterschiedliche Verbindungsklassen können so zu der größten Wirkgruppen zusammengefaßt werden: den PS II-Herbiziden.

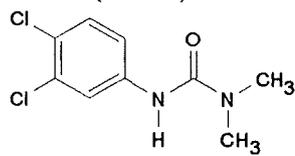
Diese Substanzen haben gemeinsam, daß sie mit dem Photosystem II (PS II) der photosynthetischen Elektronentransportkette wechselwirken; die Photosynthese der Pflanze wird blockiert, und die Pflanze verkümmert.

In Abbildung 1-1 sind die Strukturen typischer Vertreter der verschiedenen Substanzklassen, die zu den PS II-Herbiziden zählen, aufgeführt. Zum Vergleich ist die Struktur von Plastochinon-9 gezeigt; weiterhin sind DMT und TMT als nicht-herbizidische Triazine aufgeführt; beide Substanzen können in das Trinkwasser gelangen und sind bei strukturbezogenen Nachweismethoden schwer von Triazin-Herbiziden zu unterscheiden.

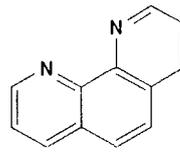
CHINONE
Plastochinon-9



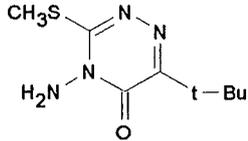
HARNSTOFFDERIVATE
Diuron (DCMU)



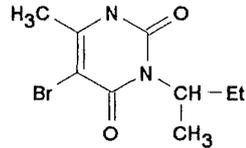
PHENANTHRENE
o-Phenanthrolin



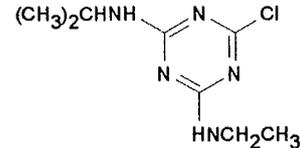
TRIAZINONE: Metribuzin



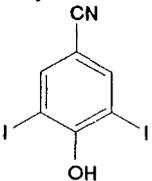
URACILE: Bromacil



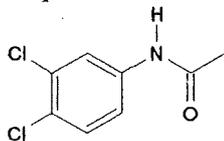
s-TRIAZINE: Atrazin



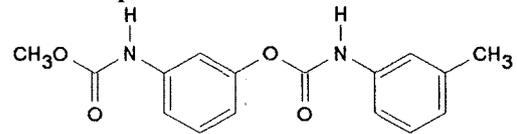
HYDROXYBENZONITRILE
Ioxynil



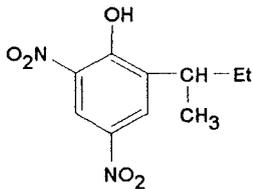
ANILIDE
Propanil



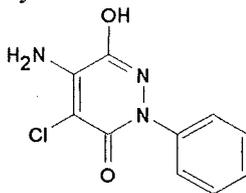
BISCARBAMATE
Phenmedipham



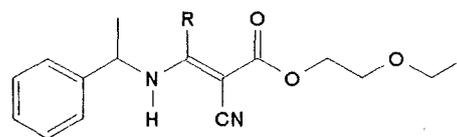
NITROPHENOL
Dinoseb



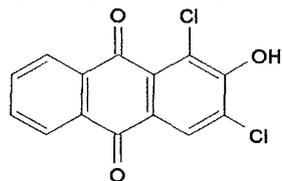
PYRIDAZINONE
Pyrazon



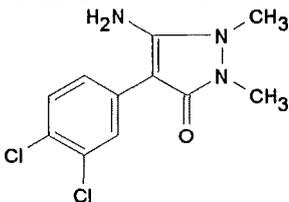
CYANOACRYLATE



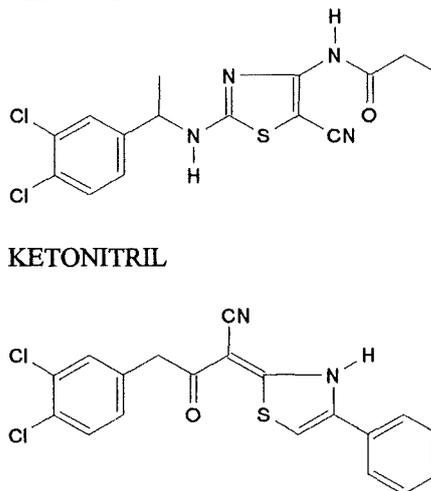
ANTHRACHINONE



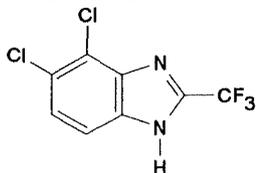
AMINOPYRAZOLONE



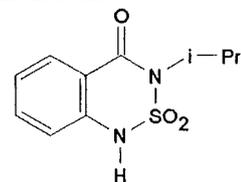
THIAZOLE



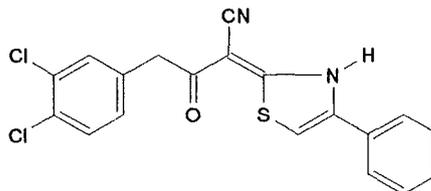
BENZIMIDAZOLE
Chlorfurazol



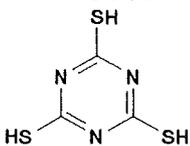
BENZOTHIADIAZONE
Bentazon



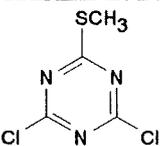
KETONITRIL



TRIAZINE: TMT



TRIAZINE: DMT



TRIAZINE: Terbutylazin

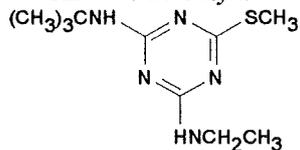


Abbildung 1-1: Substanzklassen und Vertreter von PS II-Herbiziden im Vergleich zu Plastochinonen und zu den nicht-herbizidischen Triazinen DMT und TMT

II.1.3. Wirkungsweise von PSII-Herbiziden: Photosynthetische Elektronentransportkette und Hemmung des Elektronentransportes

Da die PS II-Herbizide durch ihre Wirkungsweise charakterisiert sind, kann dieser Mechanismus als grundsätzliches Unterscheidungsmerkmal zu strukturell verwandten, jedoch nicht-herbizidischen Substanzen analytisch verwertet werden. Dieser Nachweis über die Wirkung der Herbizide kann zudem eine weiterführende Beurteilung des quantitativen Analyseergebnisses ermöglichen, nämlich über die biologische Wirksamkeit der untersuchten Probe auf Thylakoide. Damit unterscheidet sich diese Nachweismethode prinzipiell von den konventionellen, strukturellen Analyseverfahren für Herbizide.

In diesem Kapitel werden die Grundlagen des photosynthetischen Elektronentransportes und die Wirkungsweise der PS II-Herbizide schematisch dargestellt.

II.1.3.1. Prinzip der Photosynthese

Bei der Photosynthese wird die Energie elektromagnetischer Strahlung im Bereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes photochemisch genutzt, um bei höheren Pflanzen Kohlendioxid über NADPH zu Kohlenhydraten zu reduzieren. Dabei wird Sauerstoff photolytisch aus Wasser freigesetzt.

Die Energie von Photonen wird dabei dazu verwendet, die Potentialdifferenz zwischen Wasser und NADPH zu überwinden. Hierzu müssen Elektronen gegen den thermodynamischen Gradienten von einem niedrigen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Dies geschieht bei der Photosynthese in zwei hintereinander geschalteten Lichtreaktionen mit Hilfe spezieller Chlorophylle, P680 und P700, die gleichsam als Generatoren für die Umwandlung von elektromagnetischer Energie in chemische Energie dienen. Diese Chlorophylle sind als Reaktionszentren in die Photosysteme II und I integriert und stehen in enger Nachbarschaft zu Redoxsystemen, die beide Reaktionszentren in einer Kette miteinander verbinden. Chlorophylle und Redoxsysteme bilden eine Elektronentransportkette, an deren Anfang Wasser steht, das Elektronen unter Protonen- und O₂-Entwicklung in die Kette abgibt. Am Ende der Elektronentransportkette, deren Fluß letztlich durch die Energie absorbierter Quanten in Gang gehalten wird, erfolgt die Reduktion von NADP⁺ durch Aufnahme von Elektronen aus der Elektronentransportkette und von Protonen aus dem Stroma. NADPH wird schließlich in der Dunkelreaktion als Reduktionsmittel für CO₂ zur Synthese von Kohlenhydraten verwendet.

Die für diese Reaktion notwendige Energie wird durch ATP bereitgestellt, das in der Lichtreaktion durch ATP-Synthasen gebildet wird (Tevini, 1985).

II.1.3.2. Photosynthetische Elektronentransportkette

(Nicht-zyklischer Elektronentransport)

Photochemisch gesehen stehen im Mittelpunkt der Elektronentransportkette die Chlorophylle P680 und P700, die durch Aufnahme von elektromagnetischer Energie aus den Pigmentkollektiven ('Antennenmoleküle', Light Harvesting Complex) angeregt werden. Das auf ein höheres Energieniveau angeregte Elektron der zentralen Chlorophyllmoleküle wird durch einen Primärakzeptor übernommen. Dadurch findet eine Ladungstrennung statt, wobei P680 (bzw. P700) oxidiert, und der Akzeptor reduziert wird. Das Elektron von P680 wird über die Elektronentransportkette weitergegeben zu P700⁺; P680⁺ wird durch Elektronen aus dem Wasserspaltungssystem wieder reduziert.

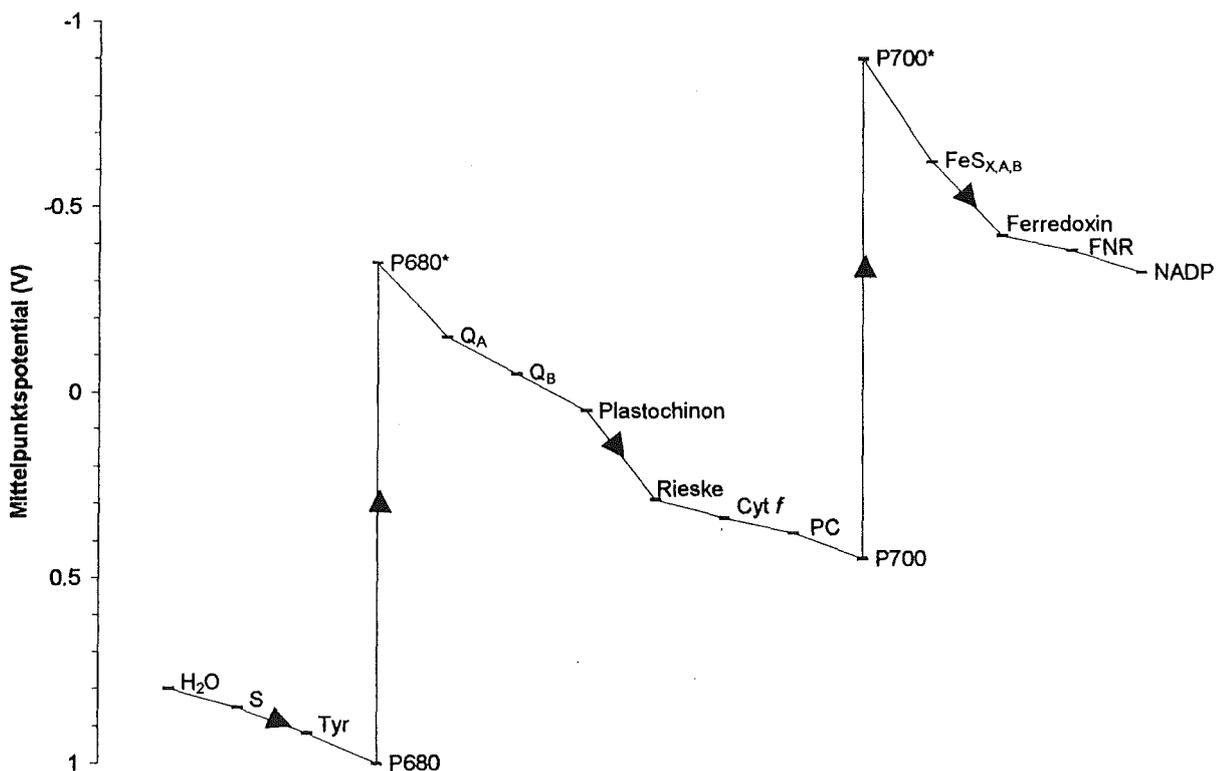


Abbildung 1-2: Z-Schema der photosynthetischen Elektronentransportkette; --mit: Tyr Tyrosin, P680 dimeres Chlorophyllmolekül des PS II, Q_A und Q_B Chinone A und B, Rieske Rieske-Eisenschwefelprotein, Cyt *f* Cytochrom *f*, PC Plastochinon, P700 dimeres Chlorophyllmolekül des PS I, FeS_{x,A,B} Eisenschwefelakzeptoren des PS I, FNR Ferredoxin-NADP-Reduktase

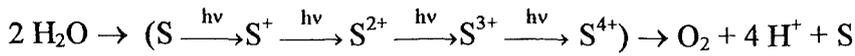
Dies ist in Abbildung 1-2 in einem Redox-Potentialdiagramm ('Z-Schema') dargestellt. Das Z-Schema verdeutlicht die energetischen Verhältnisse des Elektronenflusses über Chlorophylle und Redoxsysteme zwischen Wasser mit niedriger freier Energie und NADP mit hoher freier Energie. Schematisch steht am Anfang der Elektronentransportkette die Photolyse des Wassers, die Elektronen über Zwischenstufen an das Reaktionszentrum der Lichtreaktion II, P680, liefert. P680 ist Elektronendonator für die Plastochinone (Q_A , Q_B , PQ), von denen die Elektronen über die Redoxsysteme FeS-Zentrum, Cytochrom *f* und Plastocyanin (PC) zum Reaktionszentrum der Lichtreaktion I, P700, laufen. P700 ist der Elektronendonator für einige eisen- und schwefelhaltige Redoxsysteme, die Elektronen über Zwischenstufen zum terminalen Akzeptor NADP leiten. Unter gleichzeitiger Aufnahme eines Protons wird NADP zu NADPH reduziert. Die Potentialdifferenz zwischen Wasser und NADPH wird somit in zwei Sprüngen überbrückt, ausgelöst durch die Absorption der Strahlungsenergie in den Chlorophyllen (Tevini, 1985).

II.1.3.3. Photosystem II und Q_B - Bindestelle

Jedes Photosystem enthält ein Reaktionszentrum und einen Lichtsammelkomplex (LHC). Die Chlorophylle und Carotinoide des LHC absorbieren die Strahlungsenergie und leiten Excitonen an die Reaktionszentren weiter.

Im Zentrum des Photosystems II (PS II) steht P680, ein dimeres Chlorophyllmolekül. Nach Aufnahme eines Excitons aus dem LHC fungiert P680 über ein zwischengeschaltetes Phaeophytin als primärer Elektronendonator an ein gebundenes Plastochinon Q_A . Danach wird das Elektron an ein zweites Chinon Q_B weitergegeben. Q_B wird in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen über das Semichinon unter Protonenaufnahme zum Plastohydrochinon (PQH_2) reduziert. Als PQH_2 löst es sich aufgrund der kleineren Bindekonstante von der Bindestelle am PS II-Komplex ab und diffundiert in einen „Pool“ aus Plastochinonen hinein. Die Q_B -Bindestelle am D1-Protein des PS II kann dann erneut ein Plastochinon aus dem PQ-Pool aufnehmen. Diese Q_B - Bindestelle wird auch als Herbizidbindestelle bezeichnet.

$P680^+$ wird über Tyrosin durch ein Elektron aus dem Wasserspaltungssystem wieder reduziert. Die Wasserspaltung wird durch einen manganhaltigen Enzymkomplex S katalysiert. Die Freisetzung von einem Molekül O_2 aus zwei Molekülen H_2O findet erst nach Akkumulation von vier oxidierten Äquivalenten S^+ bis S^{4+} statt. Während der Oxidation werden außerdem Protonen freigesetzt:



(Tevini, 1985; Andersson, 1991).

II.1.3.4. Photosystem I

Photosystem I (PS I) enthält als Reaktionszentrum ebenfalls ein dimeres Chlorophyllmolekül, dessen Absorptionsmaximum im Vergleich zum Reaktionszentrum des PS II zu einer längeren Wellenlängen verschoben ist und bei 700 nm liegt. Auch hier findet durch Übernahme eines Excitons aus dem LHC des PS I eine Anregung und Ladungstrennung statt; P700⁺ wird durch das Elektron des PS II wieder reduziert. Primäre und membrangebundene sekundäre Elektronenakzeptoren leiten das Elektron weiter zu Ferredoxin. Durch NADP-Reduktase wird der Elektronentransport von Ferredoxin zu NADP katalysiert (Tevini, 1985; Golbeck, 1991).

II.1.3.5. Variable Chlorophyllfluoreszenz

Für die Fluoreszenzintensität F in Abhängigkeit der Intensität des Anregungslichtes gilt folgende allgemeine Beziehung (Schwedt, 1981):

$$F = 2.3 \cdot \phi \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot k$$

mit

ϕ	Quantenausbeute
I_0	Intensität der Lichtquelle
ε	molarer Absorptionskoeffizient
c	Konzentration an fluoreszierenden Molekülen (hier: Chlorophylle)
d	Schichtdicke
k	geometrische Konstante

Die im wäßrigen Medium maximal gemessene Fluoreszenzintensität ist außerdem abhängig von der Anwesenheit von Quenchern, Eigenabsorption, Eigenanregung, Streuung, dem pH-Gradienten über den photosynthetischen Membranen und der photochemischen Ladungstrennung.

Beim photosynthetischen Apparat wird Licht durch die Antennenpigmente (LHC) absorbiert und die Anregungsenergie auf die Reaktionszentren übertragen. Bei niedrigen Lichtintensitäten werden mehr als 90% der absorbierten Lichtquanten zur Photosynthese genutzt. Eine geringfügige Konkurrenzreaktion bei der Deaktivierung angeregter Pigmente besteht in der Emission der Chlorophyll a-Fluoreszenz. In Lösung (beispielsweise in Ether) zeigt Chlorophyll a eine hohe Fluoreszenzausbeute von 30%. Dagegen wird für den

photosynthetischen Apparat maximal eine Fluoreszenzausbeute von 3 % des absorbierten Lichtes beobachtet. Die Fluoreszenzausbeute einer unblockierten Elektronentransportkette (siehe unten) beträgt aufgrund der Quenchingprozesse durch die photochemischen Abläufe nur noch ungefähr 0,6 % des absorbierten Lichtes (Krause *et al.*, 1991). Abbildung 1-3 zeigt das Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum am Beispiel von Weizenchloroplasten.

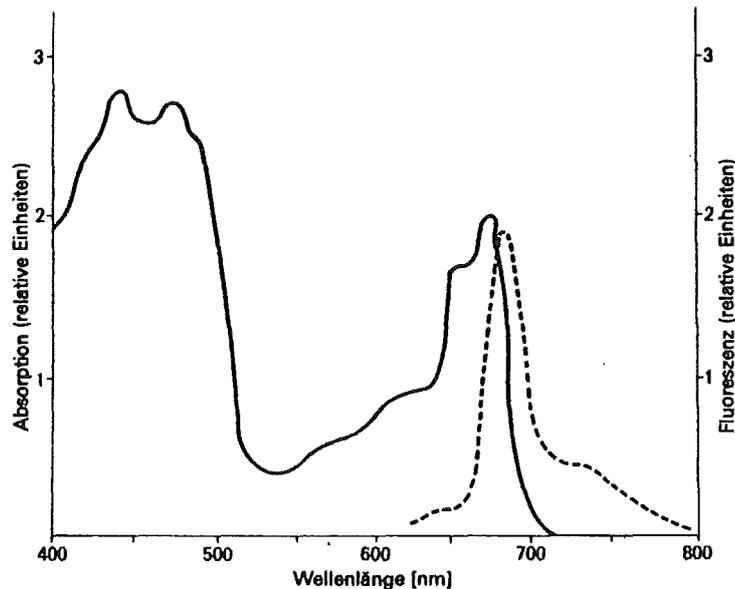


Abbildung 1-3: Absorptionsspektrum (linke Ordinate, durchgezogene Linie) und Emissionsspektrum (Fluoreszenz, rechte Ordinate, gestrichelte Linie) von Photosystem II aus Weizenchloroplasten bei 77 K (Teivini, 1985)

Bei der Anregung photosynthetischer Einheiten mit Licht wird eine Chlorophyllfluoreszenz des Photosystems II (Emissionsmaximum 685 nm) beobachtet, die sich mit der Dauer der Anregung in ihrer Intensität verändert. Von einer Grundfluoreszenz ausgehend wird in wenigen Sekunden ein Intensitätsmaximum erreicht; nach mehreren Minuten geht die Fluoreszenzintensität auf ein niedrigeres steady state-Niveau über. Man spricht von der Überlagerung einer konstanten Grundfluoreszenz F_0 durch eine variable Komponente, die variable Fluoreszenz F_v .

Die Intensität der variablen Chlorophyllfluoreszenz zu einem bestimmten Zeitpunkt wird von der chemischen Verwertbarkeit der durch das Chlorophyll absorbierten Energie bestimmt. Könnte die photochemische Energie verlustfrei ausgenutzt werden, gäbe es keine Fluoreszenz. Da die Fluoreszenz jedoch selbst bei maximaler Geschwindigkeit der Ladungstrennung einen nicht zu vernachlässigenden Konkurrenzprozeß darstellt, registriert man zunächst eine Grundfluoreszenz F_0 . Im weiteren Verlauf der Kinetik werden unter Dauerlicht die Elektronenakzeptoren des PS II reduziert. Bei vollständiger Reduktion der primären

Elektronenakzeptoren, insbesondere von Q_A , können die nachfolgenden Elektronen nicht mehr weitergegeben werden. Die Elektronen der angeregten Chlorophyllmoleküle kehren unter Abgabe der überschüssigen Energie als Fluoreszenz in den Grundzustand zurück, und man mißt eine durch Licht induzierte, maximale Fluoreszenzintensität F_{\max} (vergleiche Abbildung 3-1, Seite 23, Kinetik einer unbelasteten Thylakoidsuspension).

Folgende Bezeichnungen bezüglich der Fluoreszenzkinetiken werden in dieser Arbeit verwendet:

- F_{\max} : maximale Fluoreszenzintensität unter den eingestellten Bedingungen
- F_0 : theoretische, minimale Fluoreszenzintensität zu Beginn der Anregung, die nur durch Antennenmoleküle induziert ist
- F_{\min} : praktisch gemessene, minimale Fluoreszenzintensität; sie ist gegenüber F_0 leicht erhöht und abhängig vom apparativen Meßaufbau, insbesondere der Anschlaggeschwindigkeit der Anregungslichtquelle, bzw. der Öffnungsgeschwindigkeit der Blende im Makrosystem, sowie der Abtastgeschwindigkeit bei der Detektion. Außerdem kann ein Streulichtdurchbruch des Anregungslichtes zu einer künstlichen Erhöhung des Wertes F_{\min} gegenüber F_0 führen
- F_v variable Chlorophyllfluoreszenz, beträgt maximal $F_{\max} - F_0$

Bei genauer Betrachtung der Fluoreszenzkinetik (vergleiche Abbildung 3-1, Seite 23, Kinetik einer unbelasteten Thylakoidsuspension) erkennt man im Anfangsbereich einen sigmoiden Verlauf. Theoretisch würde man erwarten, daß die Fluoreszenzintensität zunächst konstant und minimal bleibt. Der anfänglich beschleunigte Verlauf wird durch sogenannte PS II- β -Zentren verursacht. Es handelt sich um Fragmente, deren Elektronentransportkette mit Q_A endet; bei Anregung mit Licht wird Q_A reduziert und daher sehr schnell die maximale Fluoreszenzemission der β -Zentren erreicht (*Melis, 1985*).

II.1.3.6. Hemmung des Elektronentransportes durch PS II-Herbizide und Nachweis der Hemmung

Wird ein PS II-Herbizid auf das Feld ausgebracht, so konkurriert dieses Herbizid mit Q_B um die Bindestelle am PS II (*Tischer, 1977; Velthuys, 1981; Oettmeier et al., 1983; Jansen et al., 1993*). Da Herbizide eine höhere Bindekonstante als Q_B aufweisen, verdrängen sie das Chinon

aus der Bindung. Herbizide können jedoch weder das Elektron von Q_A^- übernehmen noch es an die Elektronentransportkette weitergeben. Die Elektronentransportkette ist damit blockiert und die Oxidation von Q_A^- gehemmt.

Die Struktur der Bindestelle ist der Form und den chemischen Eigenschaften des Chinons Q_B angepaßt. PS II-Herbizide werden so ausgewählt, daß sie Form und Chemie der Chinone simulieren können. Daß es möglich ist, eine chemische Substanz zu synthetisieren, die eine höhere Bindekonstante aufweist als das biologisch optimierte Chinon, liegt in der Tatsache begründet, daß für eine optimale Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette im photosynthetischen Sinne im Gegensatz zur herbizidischen Blockade nicht allein die Bindungsenergie für Q_B wesentlich ist. Vielmehr ist ein möglichst hoher Durchsatz an Elektronen gefordert. Die Q_B -Bindestelle ist daher optimal konstruiert, um sowohl eine hohe Bindekonstante für das Chinon Q_B , als auch gleichzeitig die rasche Dissoziation des QH_2 von der Bindestelle zu gewährleisten.

Zur Messung der Blockade der Elektronentransportkette durch PS II-Herbizide werden verschiedene Prinzipien unter Verwendung unterschiedlicher biologischer Materialien in der Photosyntheseforschung und in der Herbizidanalytik angewandt.

Als biologische Materialien werden meist phototrophe Bakterien, einzellige Algen oder Chloroplasten verwendet (Chloroplasten sind die Zellorganellen höherer Pflanzen, die für die Photosynthese verantwortlich sind).

Beispielsweise ist es möglich, durch Einschleusen künstlicher Elektronenakzeptoren den Fluß der Elektronen in Teilbereichen der Elektronentransportkette zu verfolgen. In der sogenannten Hill-Reaktion wird die Photoreduktion eines künstlichen Elektronenakzeptors nach bzw. an der Q_B -Bindestelle verfolgt. Wird die Elektronentransportkette durch Herbizide blockiert, so ist die Reduktion des Akzeptors verlangsamt. Auch durch Messung der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit unter Anwesenheit eines Hill-Akzeptors kann die Blockade der Elektronentransportkette bestimmt werden.

Hierzu wurde beispielsweise eine amperometrische Messeinrichtung entwickelt, bei der photosynthetische Bakterien auf der Oberfläche einer Elektrode immobilisiert wurden (*Evans et al., 1986; Rawson et al., 1989; Pastrik et al., 1991*). Die Elektrode wurde so polarisiert, daß sie den reduzierten Hill-Akzeptor wieder oxidieren kann. Die Hemmung durch Herbizide wird hierbei über die Abnahme des Stroms bestimmt. *Zimmermann et al. (1990)* kuppelten

Spinatchloroplasten an eine Sauerstoffelektrode; hierbei diffundiert der durch Chloroplasten entwickelte Sauerstoff durch eine sauerstoffselektive Membran, wird an der Elektrode reduziert und amperometrisch nachgewiesen. Durch Herbizide gehemmte Chloroplasten entwickeln in der Zeiteinheit weniger Sauerstoff als ungehemmte Chloroplasten.

In der vorliegenden Arbeit wird der Nachweis der Herbizidblockade über die Veränderung des zeitlichen Verlaufs der variablen Chlorophyllfluoreszenz (Fluoreszenzkinetik) geführt. Hierbei kann direkt die Auswirkung der herbizidischen Blockade auf die Elektronentransportkette detektiert werden. In Vorversuchen zu dieser Arbeit (*Brauer, 1992*) erwies sich dieses Nachweisprinzip gegenüber anderen Nachweismethoden als optimal.

Dieses Nachweisprinzip beruht auf der Tatsache, daß in einer herbizid-blockierten Elektronentransportkette die Weitergabe der Elektronen von Q_A^- , und damit die Re-Oxidation von Q_A^- durch Q_B , nicht möglich ist.

Betrachtet man die Gesamtheit der in einer Probe suspendierten, aktiven PS II, so wächst bei Herbizidblockade die Gesamtkonzentration an Q_A^- um so schneller, je mehr Herbizid sich in der Probe befindet. Die Kinetiken für das Anwachsen der Q_A^- -Konzentration sind daher ein direktes Maß für die Herbizidkonzentration einer Probe. Durch die geringen, absoluten Q_A^- -Konzentrationen und niedrige molare Absorptionskoeffizienten ist eine photometrische Absorptionsmessung wenig geeignet für die Entwicklung einer empfindlichen Nachweismethode. Das Anwachsen der Q_A^- -Konzentration läßt sich jedoch indirekt über den veränderten zeitlichen Verlauf der variablen Chlorophyllfluoreszenz verfolgen, wie unter Punkt II.1.3.5 Variable Chlorophyllfluoreszenz beschrieben. So kann wesentlich empfindlicher als bei einer Absorptionsmessung auf den Herbizidgehalt der Probe geschlossen werden (siehe Abbildung 3-1, Seite 23).

Die Veränderung von Fluoreszenzkinetiken einzelliger Algen unter dem Einfluß phytotoxischer Verbindungen wurde in verschiedenen Arbeiten verfolgt (*Weston et al., 1991; Sayk et al., 1986; Arsalane et al., 1993;*). *Sayk et al. (1986)* haben hierzu ein Algen-Fluoreszenz-Automater entwickelt, mit dem in einer computergesteuerten Biotest-Meßapparatur algizide Substanzen, unter anderem auch Herbizide, nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um ein raumfüllendes Laborgerät. Trotz des sehr hohen technischen Aufwandes wird der Grenzwert der TrinkwV für Herbizide jedoch bei weitem nicht erreicht (Nachweisgrenze für

Atrazin: 32,5 µg/l unter idealen Bedingungen). Einzellige Algen können hier nur dann eingesetzt werden, wenn sie in einem Fermenter ständig neu gezüchtet werden. Dies erfordert ständige Wartung. Bei diesem Meßsystem ist es nicht möglich, einen sowohl schnellen, wie selektiven und hochempfindlichen Herbizidnachweis zu führen: Die doppelte Zellwand der Einzeller wirkt als Barriere für den Analyten, so daß eine 90minütige Inkubationszeit erforderlich ist, um einen einigermaßen empfindlichen Nachweis zu ermöglichen. Abgesehen von der langen Analysendauer, die daraus resultiert, unterliegen die einzelligen Algen in dieser Zeit Veränderungen, die unter anderem den Stoffwechsel der Algen betreffen und durch Matrixbestandteile der Probe ausgelöst werden; hierdurch wird die Querempfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl von Nicht-Herbiziden erhöht, die für den Einzeller in seiner Gesamtheit toxisch sind.

Dieses Beispiel zeigt, daß der Empfindlichkeit und Selektivität des Herbizidnachweises mit einzelligen Algen *in vivo* als biologischen Rezeptoren systemeigene Grenzen gesetzt sind.

In der vorliegenden Arbeit wird daher ein anderer Ansatz gewählt, um über die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes Herbizide nachweisen zu können: Als biologische Rezeptoren sollen isolierte Thylakoide verwendet werden. Hierbei handelt es sich um die nackten Trägermembranen der Photosynthesorgane; ohne jede störende Barriere wird dem Herbizid ein direkter Zugang zur Herbizidbindestelle ermöglicht. Die Eigenschaften isolierter Thylakoide und ihre Vorteile gegenüber anderen Rezeptoren werden unter II.2.2. genauer diskutiert.

Das Meßsystem soll technisch, biologisch und chemisch-analytisch auf die Fluoreszenzmessung an isolierten Thylakoiden ausgerichtet werden, ohne daß bei der Analyse selbst ein apparativ hoher Aufwand betrieben werden muß. Vielmehr soll ein Feldgerät resultieren, das eine rasche Vor-Ort-Analytik möglich macht; hierzu ist eine sehr kurze Analysenzeit notwendig, damit die Stärke des Nachweises über den Wirkmechanismus voll zur Geltung kommt: Sie liegt in dem Nachweis einer ganzen Wirkgruppe, also im Bereich eines quantitativen Screenings von Umweltproben.

Isolierte Thylakoide sind sehr instabil; das Ziel, sie als Rezeptoren zu verwenden, bestimmt damit eine grundsätzliche Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit, die darin besteht, native Thylakoide derart zu stabilisieren, daß sie für einen hochempfindlichen und selektiven Biosensor eingesetzt werden können.

II.2. Problemstellung und Ziele der Arbeit

II.2.1. Biosensoren

Ziel der Sensorentwicklung ist heute die Bereitstellung von geeigneten Meßsystemen für die Vor-Ort-Untersuchungen in der Umweltanalytik, für die Automatisierung in der chemischen Prozeßkontrolle und für die medizinischen Diagnostik. Der Bedarf an diesen Analysensystemen ist groß. So wird beispielsweise innerhalb der nächsten Jahre für Biosensoren ein jährliches Wachstum des westeuropäischen Marktes von 17 % erwartet (Krause, 1993).

Ein chemischer Sensor im allgemeinen wird als ein System definiert, das eine chemische Information in ein analytisch verwertbares Signal transformiert (Scheller et al., 1989). Wie Abbildung 2-1 zeigt, kann ein Sensor prinzipiell in zwei funktionelle Einheiten aufgeteilt werden: den Rezeptor („sensitive Schicht“) und den Transducer („Übertragungseinheit“).

Der Rezeptor reagiert dabei in einer stoffspezifischen energetischen Wechselwirkung mit dem Analyten. Die Änderung der chemischen oder physikalischen Eigenschaften der sensitiven Schicht wird von dem Transducer erfaßt und in ein elektronisches Signal umgewandelt. Dieses Signal wird anschließend elektronisch verstärkt, an eine Datenverarbeitungseinheit weitergegeben und dort ausgewertet.

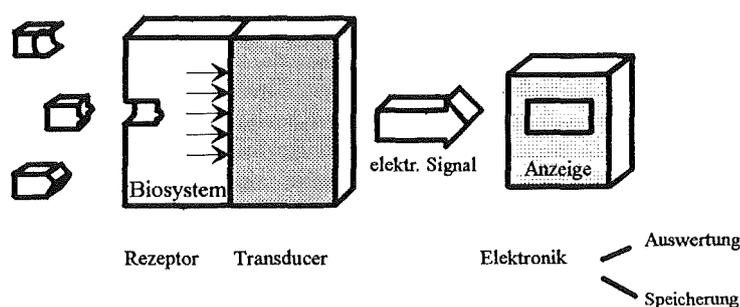


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung eines Biosensors mit Rezeptorschicht, Transducer und einer Einheit zur Aufnahme und Verarbeitung der Meßdaten

Biosensoren sind spezielle chemische Sensoren, deren sensitive Schicht aus einem Biosystem besteht. Das Biosystem kann ein Antikörper, Enzym oder Rezeptoren sein, die entweder

isoliert, als Zellfragment, Zelle oder als ganzes Gewebe vorliegen können. Die Entwicklung von Biosensoren stellt weltweit ein stark wachsendes Arbeitsgebiet dar; prominentestes Beispiel hierbei sind Glucosesensoren für Diabetiker, die in ihrer endgültigen Form implantierbar sein sollen (vergl. *Scheller et al., 1989*).

II.2.2. Isolierte Thylakoide als Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit werden isolierte Thylakoide als Rezeptoren für einen Herbizid-Biosensor eingesetzt.

Aus Blättern höherer Pflanzen lassen sich die Organellen der Photosynthese, die Chloroplasten, isolieren. Sie sind von einer doppelten Hülle umgeben, die eine wäßrige Phase, das Stroma, einschließt. Im Stroma befinden sich außer Ribosomen, Nukleotiden, Plastoglobuli und Stärkekörnern auch die sogenannten Thylakoide.

Thylakoide sind in sich geschlossene Membransysteme, die bei Samenpflanzen in gestapelter Form lichtmikroskopisch erkennbare Grana (Granathylakoide) bilden, von denen sich unregelmäßige Thylakoide in das Stroma (Stromathylakoide) erstrecken. Thylakoide bestehen aus einer Lipidmembran, in die die Photosysteme I und II als integrale Pigment-Proteinkomplexe eingelagert sind. Beide Photosysteme verbindet die Elektronentransportkette, wobei der Cytochrom *bf*-Komplex ebenfalls als integrales Protein die Thylakoidmembran durchspannt. Räumlich von diesen Komplexen getrennt, bildet die ATP-Synthase ein weiteres integrales Protein der Thylakoidmembran. Die Photosysteme sind mit peripheren Proteinen verbunden, von denen eines auf der Thylakoidinnenseite die Wasserspaltung katalysiert (*Tevini 1985*).

Isolierte Thylakoide verfügen über ein funktionsfähiges Wasserspaltungssystem, Photosystem II mit Q_B -Bindestelle, Photosystem I und eine vollständige Elektronentransportkette bis zum Ferredoxin. Isolierte Thylakoide führen jedoch nur dann noch eine NADP-Reduktion durch, wenn bei der Isolation Ferredoxin und FNR an der Außenseite der Membran elektrostatisch gebunden bleiben; Reaktionen der CO_2 -Fixierung, bzw. der Dunkelreaktion können nicht mehr durchgeführt werden.

Isolierte Thylakoide haben wesentliche theoretische Selektivitätsvorteile gegenüber anderen biologischen Rezeptoren zum Nachweis von PS II-Herbiziden:

Bakterielle Reaktionszentren beispielsweise sind leicht zu isolieren und sehr stabil. Obwohl Reaktionszentren aus phototrophen Bakterien eine hohe Homologie zum pflanzlichen System aufweisen, sind jedoch nicht alle PS II-Herbizide im bakteriellen System wirksam. Insbesondere unter den Harnstoffderivaten und Triazinen gibt es Herbizide, die im bakteriellen System keine oder nur schwache Wirkung zeigen, wie beispielsweise Atrazin, eines der bekanntesten PS II-Herbizide (*Jockers, 1991*). Die Verwendung des pflanzlichen Systems hat daher einen Selektivitätsvorteil, der sich daraus ableitet, daß die PS II-Herbizide speziell für die Wirksamkeit im pflanzlichen System entwickelt werden.

Die Verwendung einzelliger Algen bietet sich aufgrund ihrer guten Stabilität bei gleichzeitiger Verwendung des pflanzlichen Rezeptorsystems an. Jedoch zeigt sich, daß die Reaktionszeit verlangsamt ist, da die Zellwand als natürliche Barriere überwunden werden muß (*Weston et al., 1991; Sayk et al., 1986*). Die für einen empfindlichen Nachweis notwendige Inkubationszeit führt dazu, daß die Empfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl von Nicht-Herbiziden erhöht wird, die für den Einzeller insgesamt toxisch sind.

Bei der Verwendung von Teilen höherer Pflanzen ist zwischen Blättern, Zellen, Organellen und Funktionseinheiten zu unterscheiden. Werden ganze Blätter verwendet, so werden Transportprozesse den Herbizidnachweis verlangsamen; in Blättern wie in ganzen Zellen können Herbizide abgebaut oder umgewandelt werden. Diese Metabolisierungsprozesse setzen die Empfindlichkeit der Herbizidbestimmung herab. Auch bei der Verwendung von Chloroplasten ist die Barriere der doppelten Hüllmembran zu überwinden, und es sind unterschiedliche enzymatische Reaktionen im Stroma des Chloroplasten zu berücksichtigen.

Isolierte Thylakoide sind dagegen Untereinheiten, die für die verschiedenen höheren Pflanzen im wesentlichen identisch sind, und die nach Isolation ein Minimum an metabolisierenden Enzymen enthalten. Durch die Isolation dieser Thylakoide aus dem Blatt wird dem Herbizid ein direkter Zugang zur Herbizidbindestelle am D1-Protein des Photosystems II ermöglicht. Einer Verwendung dieser Rezeptoren in einem Biosensor stand jedoch bislang die extreme Instabilität isolierter Thylakoide entgegen.

II.2.3. Ziele der Arbeit und Strategie

Ziel der Doktorarbeit

Durch die Untersuchungen der Doktorarbeit sollen die Bedingungen eruiert werden, unter denen ein miniaturisiertes Meßgerät zum hochempfindlichen Vor-Ort-Nachweis von PS II-Herbiziden mit Thylakoiden als Rezeptoren hergestellt werden kann. Die biologischen Rezeptoren sind hierfür in geeigneter Weise zu stabilisieren. Nach Realisierung eines Labormusters unter Berücksichtigung der grundlegenden Ergebnisse sollen für eine gezielte Anwendung des Meßsystems die Eigenschaften der miniaturisierten Meßmethode ermittelt werden.

Strategie

Um diese Ziele zu erreichen, wurde folgende Strategie aufgestellt:

In Basisuntersuchungen muß zunächst geklärt werden, ob Thylakoide als Rezeptoren verwendet werden können. Hierzu wird insbesondere eine Stabilisierung der Thylakoide als notwendige Voraussetzung angesehen.

In Versuchen zu Immobilisierung von Thylakoiden wird untersucht werden, inwieweit eine Immobilisierung notwendig und sinnvoll für einen Biosensor in der Vor-Ort-Analytik ist.

Für eine Analytik im Bereich des Grenzwertes der TrinkwV (0,1 µg/l) wird es als notwendig angesehen, den Ausgangszustand der biologischen Rezeptoren vor jeder Messung zu standardisieren. Weiterhin müssen Meßtechnik und Meßbedingungen genau auf prinzipiell denkbare Störeinflüsse untersucht, miniaturisiert, optimal ausgewählt und kombiniert werden.

Um die miniaturisierte Meßmethode zu charakterisieren, wird ein Labormuster basierend auf den Ergebnissen der grundlegenden Versuche realisiert und getestet.

Gliederung der Doktorarbeit

Um das Ziel der Arbeit zu erreichen, werden zunächst die Ist-Bedingungen eruiert, das heißt, die statistische Verlässlichkeit der Präparation und Qualitätskontrolle sichergestellt und die Alterung der Thylakoiden quantifiziert (III.1. Aktivität isolierter Thylakoide und Aktivitätsabnahme mit der Zeit). In Versuchsreihen zur Stabilisierung (III.2. Stabilisierung von Thylakoiden) und Immobilisierung (III.3. Immobilisierung von Thylakoiden) des biologischen Materials werden die Eigenschaften der Rezeptoren so qualifiziert, daß sie sich für einen Einsatz in einem Biosensor eignen. Versuche zur Erzeugung eines definierten

Ausgangszustandes der Thylakoide (III.4. Beschleunigung der Reoxidation) und zur eigentlichen Meßtechnik (III.5. Versuche zur Miniaturisierung der Meßtechnik) bilden die Grundlagen zur Realisierung eines Labormusters (III.6.), das anschließend in seinen Eigenschaften charakterisiert wird (III.7. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystemes). Abschließend wird eine weiterführende Grundlagenuntersuchung zur Herbizidbestimmung mittels eines Fluoreszenzreaders durch Blitzanregung (III.8. Erhöhung des Probendurchsatzes in Mikrotiterplatten) vorgestellt.

Diese Versuchsreihen basieren jeweils auf prinzipiell verschiedenen Grundlagen; sie stehen für sich und sind mit den übrigen Kapiteln nur durch das übergeordnete Ziel der Arbeit verbunden. Um dieser Tatsache auch beim Aufbau der Doktorarbeit Rechnung zu tragen, werden für jedes Kapitel getrennt die jeweiligen speziellen Ziele, Grundlagen, Ergebnisse und Schlußfolgerungen aufgeführt. Abschließend werden in einer Gesamtdiskussion übergeordnete Fragen der Arbeit und die gefundenen Antworten gegenübergestellt.

II.3. Definitionen

II.3.1. Nachweisprinzip und Auswerteverfahren

In dieser Arbeit wird ein Auswerteverfahren entwickelt, das es ermöglicht, den spezifischen Herbizideffekt in den ersten Millisekunden der Anregung zur Auswertung zu verwenden.

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der variablen Chlorophyllfluoreszenz (Fluoreszenzkinetik) einer herbizidbelasteten Probe und einer unbelasteten Referenz, so erkennt man unter optimalen Bedingungen, daß die Fluoreszenzintensität bei der belasteten Probe aufgrund der Blockade schnell ansteigt und der maximale Wert der Fluoreszenzintensität F_{\max} wesentlich schneller erreicht wird als bei der unbelasteten Referenz (zu den mechanistischen Grundlagen siehe unter Wirkungsweise von PS -Herbiziden, Seite 8 ff.).

Der Anstieg auf den Wert F_{\max} kann auch bei der unbelasteten Probe durch Wahl einer genügend großen Lichtintensität nach wenigen Sekunden erreicht werden (Aufbrauchen der vorhandenen Elektronenakzeptoren). Dieser Anstieg verläuft dennoch wesentlich langsamer als unter Herbizideinfluß. Der Wert F_{\max} kann dann zur Kalibration des Systems verwendet werden. Hierdurch werden geringe Unterschiede der Chlorophyllkonzentrationen, Detektorgeometrie und Detektorempfindlichkeit in Probe- und Referenzkanal ausgeglichen (Konzentrationsunterschiede von mehr als dem Doppelten können durch das Auswerteverfahren nicht ausgeglichen werden, da sie die Gesamtintensität des Anregungslichtes so stark verändern, daß außer F_{\max} der Verlauf der Fluoreszenzkinetik verändert wird. Unter Verwendung gängiger, exakter Dosierverfahren der Suspension (Homogenisieren, Pipettieren) treten diese großen Konzentrationsunterschiede bei sorgfältigem Arbeiten jedoch nicht auf.).

Ein abweichender Offset (Dunkelstrom) der beiden Detektoren wird vor der Normierung auf F_{\max} subtrahiert und damit durch das Auswerteverfahren eliminiert.

Bei den nachzuweisenden sehr geringen Herbizidkonzentrationen im sub- $\mu\text{g/l}$ -Bereich sind die resultierenden Änderungen in den Fluoreszenzkinetiken sehr klein. Daraus ergeben sich nicht nur hohe Anforderungen an die Meßtechnik; es muß auch sichergestellt sein, daß

Untergrundstörungen aufgrund des "Zustandes" der Thylakoide (Dunkeladaption, Alterung) berücksichtigt werden können. Mit dem hier entwickelten Verfahren wird dieser Ausgangszustand der Thylakoide berücksichtigt. Dies wird dadurch erreicht, daß die Kinetiken der unbehandelten Thylakoide und die der mit herbizidhaltiger Probe versetzten Thylakoide parallel aufgenommen und anschließend subtrahiert werden (siehe Abbildung 3-1)

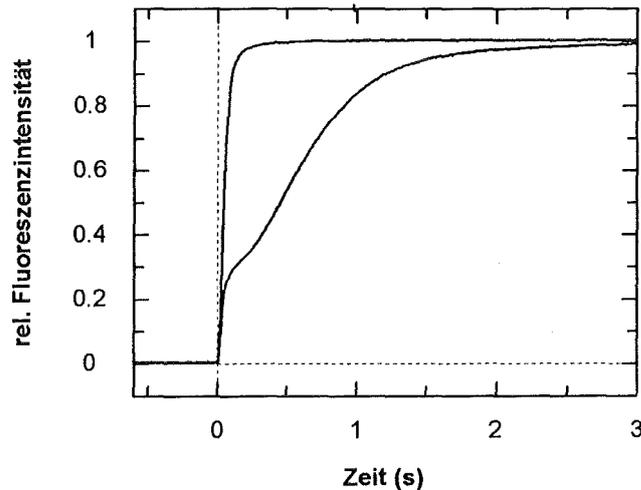


Abbildung 3-1: Fluoreszenzkinetiken von Thylakoiden; --untere Kinetik (langsamer Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit) einer unbelasteten Thylakoidsuspension („Referenz“); --obere Kinetik (schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit) einer mit Herbizid versetzten Thylakoidsuspension („Probe“) unter idealen Bedingungen (siehe unter VI. Material und Methoden, Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem)

Hierdurch ergeben sich Differenzkurven mit einem deutlichen Maximum, das von der Herbizidkonzentration abhängt. Die nächste Abbildung zeigt als Beispiel den charakteristischen Verlauf eines Herbizidsignales, das man mit dem entwickelten Auswerteverfahren erhält:

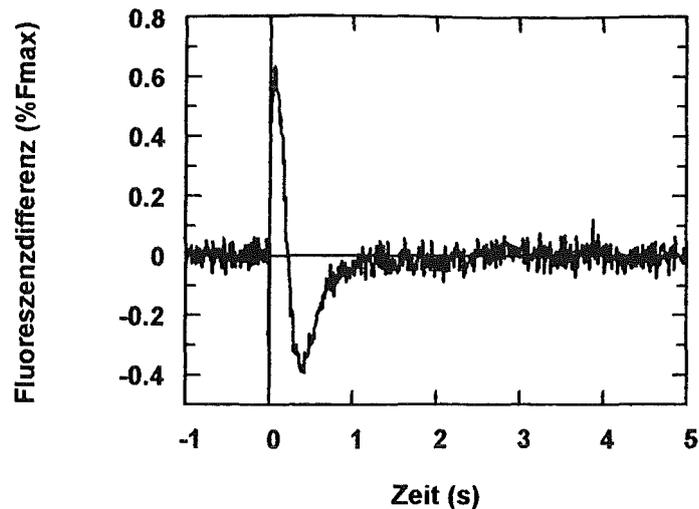


Abbildung 3-2: Fluoreszenzdifferenzkurven als Herbizidsignale; --durch Differenzbildung zwischen den auf F_{max} normierten Fluoreszenzkinetiken einer unbelasteten Referenz gegenüber einer herbizid-gehemmten Probe; --man erkennt den charakteristischen zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzdifferenz in % F_{max} , mit einem positiven Maximum (unmittelbarer Herbizideffekt) und einem Minimum (mittelbarer Herbizideffekt); --genauer zur statistisch optimalen Auswertung und Bedeutung der Signale siehe unter III.7. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems, Auswertung der Signale

Zur Auswertung kann die Höhe des Signals oder die Fläche verwendet werden. Die optimale Auswertung dieser Signale wird mit dem realisierten Labormuster erprobt und im Kapitel III.7. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystemes beschrieben.

II.3.2. Statistik

Die statistischen Berechnungen in dieser Arbeit werden entsprechend folgender Definitionen und Gleichungen durchgeführt (*Schweizer, 1977; Bailey, 1976*):

Definitionen

Das Ziel der beurteilenden Statistik besteht darin, von einer gegebenen Stichprobe auf die Grundgesamtheit zu schließen, der die Stichprobe entnommen wurde.

Die unendliche Gesamtheit aller bei fortgesetzter Wiederholung eines Zufallsexperimentes unter gleichbleibenden Bedingungen möglichen Beobachtungsergebnisse ist die Grundgesamtheit.

Die Grundgesamtheit wird theoretisch durch die Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Zufallsvariablen x beschrieben.

n zufällig aus dieser Grundgesamtheit herausgegriffene Beobachtungsergebnisse werden als **Stichprobe vom Umfang n** bezeichnet.

Jedes Beobachtungsergebnis in der Stichprobe heißt **Stichprobenwert x_i** .

Das *Stichprobenmittel* x_m ist eine erwartungstreue Schätzfunktion für den Mittelwert μ der Grundgesamtheit. Bei großem Stichprobenumfang n ist das Stichprobenmittel x_m angenähert normalverteilt (unabhängig davon wie die Grundgesamtheit verteilt ist). Ist die Grundgesamtheit normalverteilt, ist das Stichprobenmittel ebenfalls normalverteilt.

Varianz und Standardabweichung der Einzelwerte

(unter der Voraussetzung, daß der Erwartungswert der Grundgesamtheit unbekannt ist und an seiner Stelle der Mittelwert der Stichprobe verwendet werden muß)

Varianz der Einzelwerte: $S^2 = 1/n-1 \sum (x_i - x_m)^2$

Standardabweichung der Einzelwerte: $S = \text{Wurzel}(S^2)$

relative Standardabweichung der Einzelwerte: $S_{\text{rel}} (\%) = S * 100 / x_m$

Varianz und Standardabweichung des Mittelwertes (Stichprobenmittel)

Hat eine Zufallsvariable x die Varianz S_x^2 , so hat das zum Stichprobenumfang n gehörige Stichprobenmittel x_m die Varianz $1/n * S_x^2$.

Varianz des Mittelwertes : $S_m^2 = S_x^2 / n$

Standardabweichung des Mittelwertes: $S_m = S_x / \text{Wurzel}(n)$

relative Standardabweichung des Mittelwertes: $S_{m,\text{rel}} (\%) = S_m * 100 / x_m$

Signifikanz-Test (t-Test) für die Abweichung zweier Mittelwerte voneinander bei kleinen Stichproben

Voraussetzung: Die Wahrscheinlichkeit P , daß der beobachtete Unterschied allein durch Stichprobenwahl aus einer einzigen, zusammengehörigen Grundgesamtheit zustandekommt, sei kleiner als 10 % .

Variance-Ratio-Distribution: $F = S_1^2 / S_2^2$

für $P < 10\%$ (Stichprobenumfang $n=5$) gilt: $F > 6.39$ **bei signifikant unterschiedlichen Varianzen**

Läßt sich kein signifikanter Unterschied feststellen, darf der t-Test für signifikant abweichende Mittelwerte angewandt werden:

Berechnung des kombinierten Varianzwertes: $S_c^2 = A/B$
mit $A = S_1^2 (n_1-1) + S_2^2 (n_2-2)$
und $B = n_1 + n_2 - 2$

es ergibt sich für t: $t = x_{m1} - x_{m2} / S_c * \text{Wurzel } (1/n_1+1/n_2)$
für P < 10 % (Stichprobenumfang n=5) gilt: $t > 1,86$ bei signifikant
unterschiedlichen Mittelwerten

II.3.3. Zusammenstellung von Bezeichnungen, Abkürzungen und Symbolen

Bezeichnungen und Definitionen

native Thylakoide: Die direkt aus der Präparation gewonnene, nicht veränderte Suspension wird - wie auch immer gelagert - als "native Thylakoid-Suspension" bezeichnet.

Thylakoidpulver: native Thylakoide nach der Gefriertrocknung

TRIS-gewaschene Thylakoide: Nach Behandlung nativer Thylakoide mit TRIS-Puffer; hierbei wird das Wasserspaltungssystem der Elektronentransportkette entfernt.

Aktivität: Meßwert aus der Bestimmung der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit oder aus der Aufnahme der Fluoreszenzkinetiken (Fluoreszenzaktivität); relative Werte in % der Anfangsaktivität direkt nach der Präparation, vergleiche Kapitel III.1. Aktivität nativer Thylakoide

Makrosystem: Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken an einem Fluorimeter, das mit Teilen einer optischen Bank zur Anregung von Thylakoiden konstruiert wurde („Makro“ im Gegensatz zur miniaturisierten Meßtechnik des Labormusters)

Aktivitätsmessung: Messung der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit oder Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem (vergleiche VI. Materialien und Methoden)

Alterung: Die Abnahme der Aktivität der Thylakoide mit der Zeit

Stabilisierungsverfahren: Verfahren, das die Alterung der Thylakoide verzögert (vergleiche Kapitel III.2. Stabilisierung von Thylakoiden)

Reoxidation: Oxidation der Elektronenakzeptoren der Elektronentransportkette

einfache Dunkeladaption: Konventionell wird die Oxidation der Elektronenakzeptoren der Elektronentransportkette dadurch erreicht, daß man im Dunkeln abwartet, bis diese Akzeptoren direkt durch gelösten Sauerstoff oxidiert wurden. Die Dauer dieser einfachen Dunkeladaption beträgt mindestens 5 Minuten (vergleiche Kapitel III.4. Beschleunigung der Reoxidation).

Labormuster: Miniaturisiertes Meßgerät zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken gemäß Kapitel III.6.

Symbole und Abkürzungen

Fluoreszenzkinetiken

F_0 :	kleinster theoretischer Wert der Fluoreszenzintensität
F_{\min} :	kleinster, meßbarer Anfangswert der Fluoreszenzkinetiken,
F_{\max} :	maximale Fluoreszenzintensität.
A_F :	Fluoreszenzaktivität (Berechnung siehe Kapitel III.1. Aktivität nativer Thylakoide)
PQ-Pool	Plastochinon-Pool der Elektronentransportkette
Q_A	Chinon A (kovalent gebundenes Chinon) der Elektronentransportkette
Q_B	Chinon B (Chinon aus dem PQ-Pool für die Q_B -Bindestelle)
a_w -Wert:	definiert als das Verhältnis der Wasserdampfpartialdruckes der Probe (Pulver, Lebensmittel) zum Sättigungsdampfpartialdruck reinen Wassers bei einer gegebenen Temperatur
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
DMT	2,4-Dichlor-6-Methylthio-1,3,5-Triazin
TMT	Trithiocyanursäure
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DPC	Diphenylcarbazid
GT	Gefriertrocknung
LHC	Light Harvesting Complex (Antennenmolekül-Komplex der Photosysteme)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase

III. EIGENE VERSUCHSREIHEN

III.1. Aktivität isolierter Thylakoide und Aktivitätsabnahme mit der Zeit

III.1.1. Ziele

In diesem Kapitel sollen die grundlegenden Bedingungen für die weiteren Versuche der Arbeit eruiert werden. Hierzu gehören die Definition zweier Methoden zur Aktivitätsbestimmung, die Optimierung der Präparation des biologischen Materials bezüglich der Aktivitätserhaltung während der Präparation, die statistische Wiederholbarkeit der Anfangsaktivität isolierter Thylakoide, die Zuverlässigkeit der Methoden zur Qualitätskontrolle (Aktivitätsüberwachung) und die Feststellung des quantitativen Verlaufs der Alterung von Thylakoiden unter verschiedenen Lagerbedingungen.

Bislang stellte die extreme Instabilität isolierter Thylakoide das größte Hindernis für die Realisierung eines Biosensors auf Thylakoidbasis dar. Diese Abnahme der Aktivität der Thylakoide mit der Zeit soll quantifiziert werden, um beurteilen zu können, wie und ob die Thylakoide stabilisiert werden müssen. Auch der Erfolg einer Stabilisierungsmethode kann nur dann überprüft werden, wenn die Abnahme der Aktivität mit der Zeit von nativen Thylakoiden bekannt ist.

III.1.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

Prinzip der Präparation nativer Thylakoide

Als biologische Rezeptoreinheiten wurden in dieser Arbeit isolierte Thylakoide verwendet. Sie wurden aus Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*) oder - nach Modifikation der Präparation - aus Kopfsalat (*Lactuca sativa* var. *capitata*) präpariert. Zunächst wurden die grünen Pflanzenteile (vorzugsweise die Blätter) in einem biologischen Puffer homogenisiert und durch Filtration Zellen und Blattreste abgetrennt. Nach Zentrifugation des Filtrates erhält man im Rückstand Chloroplasten. Diese Chloroplasten sind teilweise intakt, teilweise sind die Hüllmembranen aufgeplatzt und die darin befindlichen Thylakoide freigesetzt. Um homogenes biologisches Material zu erhalten, wurde diese Mischung mit einer hypotonischen $MgCl_2$ -Lösung versetzt, wodurch alle Membranen aufbrechen, wasserlösliche Enzyme aus dem Stroma herausgewaschen werden und die Thylakoide isoliert vorliegen (*Moss et al., 1984*).

Voraussetzung zur Gewinnung aktiver Thylakoide ist das Heranziehen "gesunder", gut wachsender Erbsenpflanzen. Um die Wachstumsbedingungen zu optimieren und zu standardisieren, wurden die Erbsenpflanzen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen gezogen. Ferner mußten optimale Präparationsparameter gewählt und genau eingehalten werden. Die Präparation muß möglichst schnell durchgeführt werden, um die Thylakoide rasch aus dem Zellhomogenisat mit aktiven, abbauenden Enzymen abtrennen zu können. Weiterhin soll vermieden werden, daß die Thylakoide während der Präparation Temperaturen über 4 °C ausgesetzt werden. Zur Präparation wurde die Methode nach *Moss et al. (1984)* angewandt, die für die bestehende Laboreinrichtung und für die Präparation von Thylakoiden aus Kopfsalat modifiziert wurde. Bei der Präparation von Thylakoiden aus Kopfsalat wurde dem Isolationspuffer 5 mM Ascorbinsäure als Reduktionsmittel zugesetzt; so sollen die oxidativen Abbaureaktionen der bei der Zerkleinerung von Kopfsalat freigesetzten Enzyme zurückgedrängt werden.

Die aus der Präparation gewonnene, nicht weiter veränderte Suspension wird im Folgenden - wie auch immer gelagert - als "native Thylakoid-Suspension" bezeichnet. Die Thylakoidmembranen sind dabei in Standardpuffer suspendiert; sie liegen als Grana-Stapel vor und sedimentieren innerhalb weniger Stunden.

Als vergleichendes Maß für den Thylakoidgehalt wurde der Chlorophyllgehalt der Suspension bestimmt.

Kontrolle der photosynthetischen Aktivität

Messung der Sauerstoffentwicklungs-Geschwindigkeit

Um die Qualität der präparierten Thylakoide beurteilen und Alterungsvorgänge beschreiben zu können, wurde eine in der Photosyntheseforschung routinemäßig eingesetzte Methode - die sog. Sauerstoffmessung - angewandt (*Walker, 1987*). Diese Meßmethode ist besonders empfindlich und läßt Schlüsse auf die Veränderungen in einem definierten Abschnitt der Elektronentransportkette zu. Sie wurde insbesondere deshalb ausgewählt, um das Alterungsverhalten unterschiedlich behandelter Thylakoide quantitativ vergleichen zu können. Hierzu wird gemessen, wieviel Sauerstoff eine definierte Menge Thylakoide bei Beleuchtung mit sättigendem Licht in einer Zeiteinheit entwickeln. Die absolute Aktivität der Thylakoide ist um so höher, je mehr Sauerstoff in der Zeiteinheit entwickelt wird. Um die Elektronentransportkette bis Q_B in ihrer Funktionsfähigkeit überprüfen zu können, wurde der Reaktionsmischung Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung zugesetzt (Hill-Reaktion).

Kaliumhexacyanoferrat-(III) dient als Elektronenakzeptor und übernimmt die von Q_B weitergegeben Elektronen (Tevini, 1985). Außerdem wurden Ammoniumionen zugegeben, welche als Carrier für Protonen durch die Thylakoid-Membran agieren und so verhindern, daß durch einen extremen pH-Gradienten der Elektronentransport verlangsamt wird.

Die Absolutwerte der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit werden in $\mu\text{mol Sauerstoff/ mg Chlorophyll und Stunde}$ angegeben. Der Wert unmittelbar nach der Präparation wird im Folgenden als "Anfangsaktivität" gleich 100 % gesetzt. Die Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt (bspw. bei Alterungsmessungen) errechnet sich aus dem jeweiligen Absolutwert zu diesem Zeitpunkt in Prozent des Absolutwertes unmittelbar nach der Präparation.

Veränderung der Fluoreszenzkinetiken mit der Zeit (Fluoreszenzaktivität von Thylakoiden)

Mit Hilfe der Sauerstoffmessung wird die Alterung der Thylakoide unter verschiedenen Lagerbedingungen standardisiert verglichen. Später sollen jedoch als eigentliche Meßsignale die Fluoreszenzkinetiken ausgewertet werden. Daher ist es notwendig, auch deren Alterungsverhalten zu kennen.

Mit der Alterung verändert sich die Fluoreszenzintensität an jedem Zeitpunkt, das heißt, die „Form“ der Kinetik; für die spätere Herbizidbestimmung besonders bedeutend ist dabei die Veränderung des Verhältnisses F_{\min}/F_{\max} mit der Zeit, da dieses Verhältnis bei Betrachtung von Einzelkinetiken gehemmter Thylakoide häufig als Maß zur Quantifizierung des Herbizidgehaltes verwendet wird.

Zur Berechnung der „Fluoreszenzaktivität“ A_F wird in dieser Arbeit folgende Formel verwendet:

$$A_F (\%) = (1 - X) * 100 / (1 - B)$$

mit $X = F_{\min}/F_{\max}$ zum jeweiligen Zeitpunkt der Alterungsmessung

$B = F_{\min}/F_{\max}$ unmittelbar nach der Präparation

Gleichung 1-1: Berechnung der Fluoreszenzaktivität

Aus Veränderungen der Fluoreszenzkinetiken mit der Zeit wird der Einfluß der Alterung auf das eigentliche Meßsignal abgeschätzt. Verändert sich die Fluoreszenzkinetik mit der Zeit nicht, so kann man daraus schließen, daß der zur Aufrechterhaltung des Fluoreszenzverhaltens notwendige Teil der Elektronentransportkette noch intakt ist: eine Veränderung an der Herbizid-Bindestelle in den Fluoreszenzkinetiken wäre erkennbar, da auch Q_B dann ein

verändertes Bindeverhalten zeigen würde. Solange also die Fluoreszenzkinetik unverändert ist, ist zu erwarten, daß eine Blockade durch Herbizide die erwarteten Auswirkungen hätte.

Die Sauerstoffmessung wurde derart in die bestehende Apparatur integriert, daß eine annähernd simultane Messung von Sauerstoffentwicklung und Fluoreszenzkinetik möglich war.

Alterung von Thylakoiden (Aktivitätsabnahme mit der Zeit)

Um die Lagerstabilität der Thylakoide zu überprüfen, wurden die Thylakoide aliquotiert, in getrennten Behältnissen bei verschiedenen Temperaturen gelagert, und die Veränderung der Aktivität der Thylakoide mit der Zeit mittels Sauerstoffmessung und Fluoreszenzmessung überprüft. Die Lagertemperaturen wurden den Möglichkeiten eines Anwenders des zu entwickelnden Sensors entsprechend ausgewählt (Zimmertemperatur, Kühlschrank, Tiefkühlfach). Für die Lagerung während der Forschungsarbeiten und für einen Hersteller von Thylakoidsuspensionen ist zusätzlich die Lagerdauer in flüssigem Stickstoff interessant.

III.1.3. Ergebnisse und Diskussion

III.1.3.1. Kontrolle der photosynthetischen Aktivität der präparierten Thylakoide

Thylakoide aus	Sauerstoffmessung		Fluoreszenzmessung	
	n. Walker, 1987	eigene Präparation	n. Strasser et al. 1991	eigene Präparation
Erbsenkeimlingen	200	200-220	20-30 %	23 %
Kopfsalat	<200	190	20-30 %	23 %

Tabelle 1-1: Qualität der eigenen Präparation im Vergleich zu Literaturwerten; --Qualitätskontrolle über Sauerstoffmessung, Angabe der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chlorophyll und Stunde}$ für $T_{\text{Meß}} = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; --Qualitätskontrolle über Messung der Fluoreszenzkinetik im Makrosystem, Angabe in $F_{\text{min}} / F_{\text{max}}$ in %.

Die Meßwerte der Sauerstoffmessung für die eigenen Präparationen stimmen mit den in der Literatur für „sehr gute“ Thylakoide beschriebenen Aktivitäten überein. Thylakoide aus Kopfsalat gelten allgemein als schwerer zu präparieren als Thylakoide aus Erbsenpflanzen (Walker, 1987). Die hier gefundenen Aktivitätswerte für Kopfsalat-Thylakoide sind jedoch durchaus mit denen der Erbsen-Thylakoide vergleichbar.

Bei den Fluoreszenzkinetiken wurde keinerlei Unterschied zwischen Erbsen- und Kopfsalat-Thylakoiden beobachtet. Die in der Literatur angegebenen Werte für „ideale“ Fluoreszenzkinetiken über den Wert $F_{\text{min}} / F_{\text{max}}$ variieren je nach der dort gewünschten

Genauigkeit. So ist es in der Photosyntheseforschung oft völlig ausreichend, die Genauigkeit auf 20-30 % F_{\min} / F_{\max} (Strasser et al., 1991; Walker, 1987) anzugeben. Die Schwankungen in diesen Werten ergeben sich aus den apparativen Voraussetzungen für diese Messungen. Der Wert F_{\min} kann durch auf den Detektor gelangendes Streulicht fälschlich erhöht werden, und so ein höherer Wert für das Verhältnis F_{\min} / F_{\max} gefunden werden. Bei Strasser et al. (1991) ist beschrieben, daß auch andere apparative Bedingungen, wie die Öffnungsgeschwindigkeit der Blenden vor dem Anregungslicht, den Wert F_{\min} künstlich erhöhen können. Als „idealer“ Wert wird dort ein Verhältnis von 20% F_{\min} / F_{\max} angeführt.

Auch bei der hier verwendeten Meßapparatur (Makrosystem für Fluoreszenzmessungen, siehe unter Abschnitt VI. Materialien und Methoden) wurde beobachtet, daß die Geschwindigkeit der Blendenöffnung die Messung beeinflussen konnte; Öffnete sich die Blende relativ langsam, wurden die Fluoreszenzkinetiken im Bereich der ersten 20 ms mit dieser Öffnungskinetik überlagert. Die Abweichung des Mittelwertes (23%) vom idealen Meßwert für aktive Thylakoide (20%) wird auf diese apparativen Bedingungen zurückgeführt.

Die aus der Qualitätskontrolle gewonnenen Mittelwerte von 23% F_{\min} / F_{\max} werden daher als Meßwerte sehr guter Thylakoide gewertet.

Die Genauigkeit der Fluoreszenzmessung an der optischen Bank ist gut und - da es sich um vergleichende Messungen handelt - sowohl für die Qualitätsüberwachung der isolierten Thylakoide als auch für die Alterungsmessungen vollkommen ausreichend.

Die Bedingungen der Präparation der Thylakoide aus dem Blatt müssen zwar gut kontrolliert werden, jedoch überwiegt der Selektivitätsvorteil, der aus der Isolation der Thylakoide resultiert (siehe II. Einleitung). Der schnelle, unbehinderte Herbizidnachweis wird damit erkauft, daß die aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelösten Membranen nun auch mit anderen äußeren Einflüssen, wie Alterungsreaktionen, direkt konfrontiert werden.

III.1.3.2. Alterungsverhalten der Thylakoide unter verschiedenen Lagerbedingungen

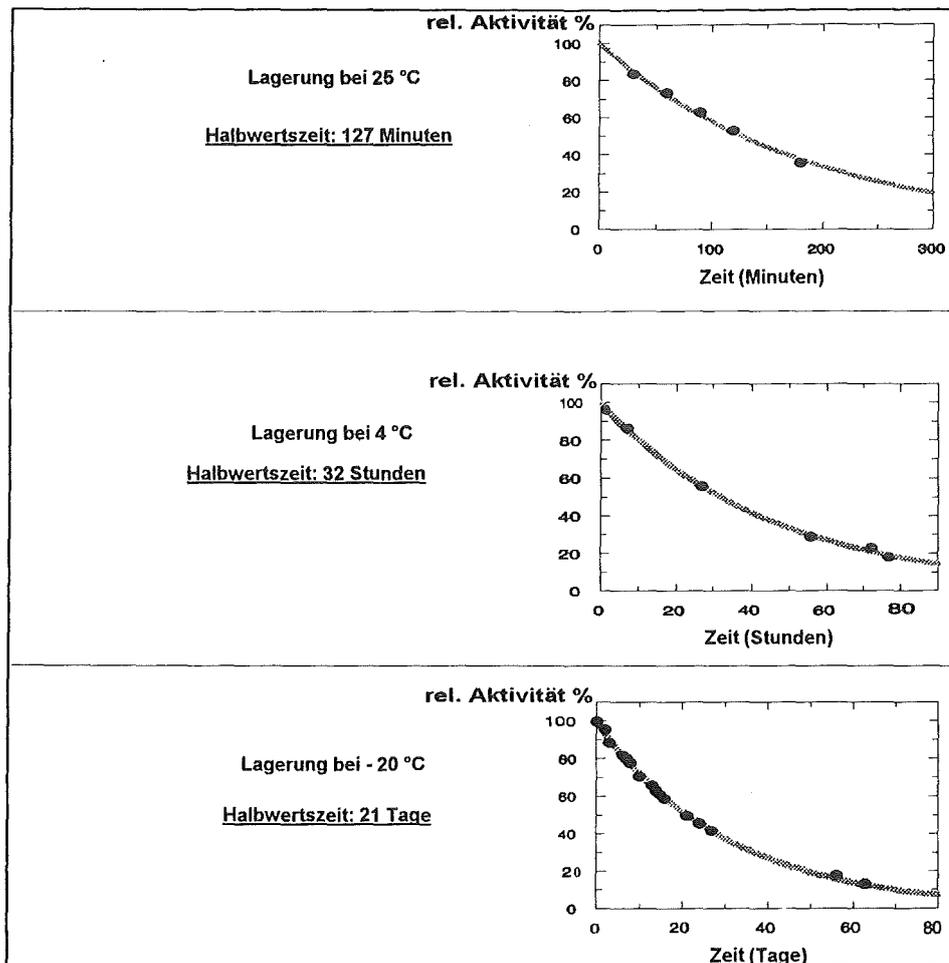


Abbildung 1-1: Alterungsverhalten der nativen Thylakoidsuspension bei verschiedenen Lagertemperaturen; --Aktivitätsmessung über Messung der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit bei 20 °C (Bedingungen siehe VI: Materialien und Methoden); --ausgefüllte Kreise = Meßwerte als Mittelwerte aus drei Messungen; --relativen Aktivität in Bezug zur Anfangsaktivität unmittelbar nach Präparation; --Halbwertszeiten berechnet aus der nichtlinearen Beschreibung der Werte als Vergleichswerte.

Aus der Sauerstoffmessung der bei 25 °C, 4 °C und -20 °C gelagerten Thylakoide (Abbildung 1-1) ist zu erkennen, daß die Abnahme der Aktivität mit der Zeit jeweils mit einem einfach-exponentiellen Abfall beschrieben werden kann. Um die Alterung quantitativ vergleichen zu können, wurde jeweils die Halbwertszeit der Aktivitätsabnahme berechnet. Aus dem Vergleich dieser Werte ergibt sich, daß Thylakoide aus Erbsenpflanzen im Kühlschrank 16mal langsamer altern als bei Zimmertemperatur. Dies stimmt gut mit den Daten für Thylakoide aus Spinat überein, die aus *Loranger et al. (1994)* abgeleitet werden können. Für die dort ablesbaren Daten läßt sich aus dem Aktivitätsabfall auf die Hälfte der Anfangsaktivität eine 16-20fache Verzögerung berechnen.

Besonders große Auswirkungen hat die Lagerung im Tiefkühlfach (-20°C): Nach eigenen Messungen verzögert sich hier die Alterung um einen Faktor 250.

Wie Abbildung 1-2 zeigt, bleibt die Aktivität der Thylakoide in flüssigem Stickstoff mindestens ein Jahr unverändert:

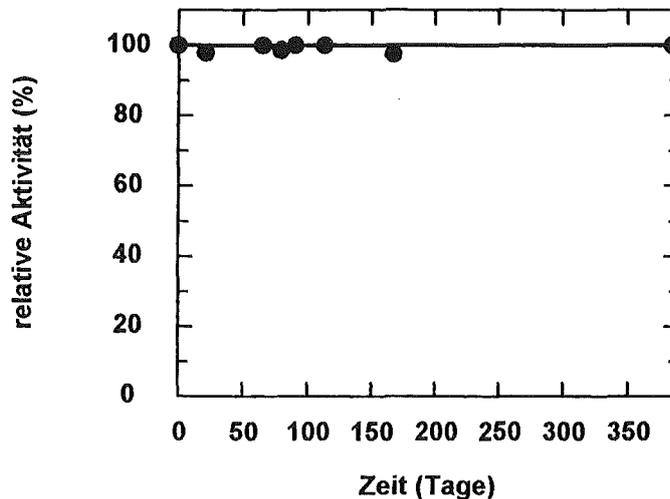


Abbildung 1-2: Lagerung der nativen Thylakoidsuspension in flüssigem Stickstoff; --Meßwerte der Sauerstoffmessung bei 20 °C (Bedingungen siehe VI. Materialien und Methoden); --relative Aktivität bezogen auf die Aktivität der Thylakoide unmittelbar nach der Präparation.

Einfrieren und Auftauen (jeweils bei Zimmertemperatur) hat keinen Einfluß auf die Aktivität der Rezeptoren. Es ist auch nicht notwendig, nach dem Auftauen eine Zeitlang abzuwarten, bis die größtmögliche Aktivität erreicht ist, wie das bei vielen anderen biologischen Materialien nach Einfrieren teilweise erforderlich ist.

Die Temperaturniedrigung beeinflusst verschiedene Reaktionen, die bei der Alterung der Thylakoide eine Rolle spielen: Chemische Reaktionen werden verlangsamt und der für die enzymatische Katalyse optimale Temperaturbereich unterschritten. Die Diffusion von Sauerstoff in der Lösung ist verzögert. Schließlich wird durch das Einfrieren der a_w -Wert (siehe unter III. Einleitung, Definitionen) stark herabgesetzt, wodurch die Diffusion der Reaktionspartner zueinander behindert ist (*Belitz, 1989*).

Um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmessungen und die Standardisierung des biologischen Materials zu überprüfen, wurde die statistische Wiederholbarkeit der aus der Sauerstoffmessung gewonnenen Halbwertszeit der Alterung bei -30 °C für 5 verschiedene Thylakoidchargen untersucht.

Charge	Halbwertszeit (aus Sauerstoffmessung, Alterungskurve über 40 Tage, je 10 Meßwerte)
260193/II	24,3 Tage
290193/I	25,3 Tage
290193/II	29,8 Tage
090293	24,5 Tage
240293	26,7 Tage
Mittelwert \pm Standardabweichung des MW	26 Tage \pm 1 Tag

Tabelle 1-2: Halbwertszeit der Alterung bei -30 °C über Sauerstoffmessung; --Statistik gemäß II. Einleitung, Statistik.

Der Mittelwert für die Halbwertszeit wurde insgesamt aus 50 Meßwerten gewonnen; die ausgewählte Stichprobe wird daher als geeignet für eine statistische Erhebung angesehen.

Auch diese Messung bestätigte den oben festgestellten Trend, daß durch Absenken der Lagertemperatur bis auf -30 °C nochmals eine Verzögerung der Alterung resultiert.

Dadurch, daß der Mittelwert für die Lagerung bei -30 °C bestimmt wurde, konnten auch routinemäßige Modifikationen am Meßsystem (Neuaufbau der Sauerstoffelektrode jeweils nach einer Woche, Neuansatz von Puffern und Hilfschemikalien etc.) mit dieser Statistik erfaßt werden; die Reproduzierbarkeit dieser Meßwerte zu kennen, ist wichtig für die Vergleichbarkeit der Halbwertszeiten für die verschiedenen Temperaturen, da sich diese Messungen über unterschiedliche Zeitintervalle innerhalb mehrere Monate erstreckten.

Wenn man berücksichtigt, daß in den ermittelten Bereich von 26 ± 1 Tag alles einfließt, was mit dem biologischen Material geschieht, von dem Ziehen der Erbsenpflanzen, über die Präparation der Thylakoide, Aliquotieren der Suspension, Lagerung und die Messung über mehrere Wochen, so ist die Reproduzierbarkeit der Halbwertszeit als sehr gut zu bezeichnen. Es zeigt sich, daß das biologische Material von Charge zu Charge vergleichbar gezogen und präpariert werden kann und somit standardisiert zur Verfügung steht. Die beobachteten Unterschiede in den Halbwertszeiten für unter verschiedenen Temperaturen gelagerte Thylakoide (vgl. Abbildung 1-1) sind um ein Mehrfaches größer als die relative, statistische Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Mittelwerts (Tabelle 1-2; statistische Bedingungen siehe oben) von 4 %. Die Messung ist über Wochen in einem vernünftigen statistischen Rahmen reproduzierbar, so daß die Qualitätskontrolle sinnvoll durchgeführt

werden kann, und der Vergleich der Alterungsmessungen über verschiedene Zeiträume hinweg zulässig ist.

Aus der Beobachtung der Fluoreszenzkinetiken (Abbildung 1-3) ergibt sich, daß sich auch das Verhältnis F_{\min} / F_{\max} mit der Zeit ändert; Zunächst ist ein langsamer Aktivitätsverlust zu beobachten, welcher schließlich immer schneller wird. Dieser Prozeß verläuft bei -30 °C entsprechend der Ergebnisse aus der Sauerstoffmessung wesentlich langsamer als bei Zimmertemperatur.

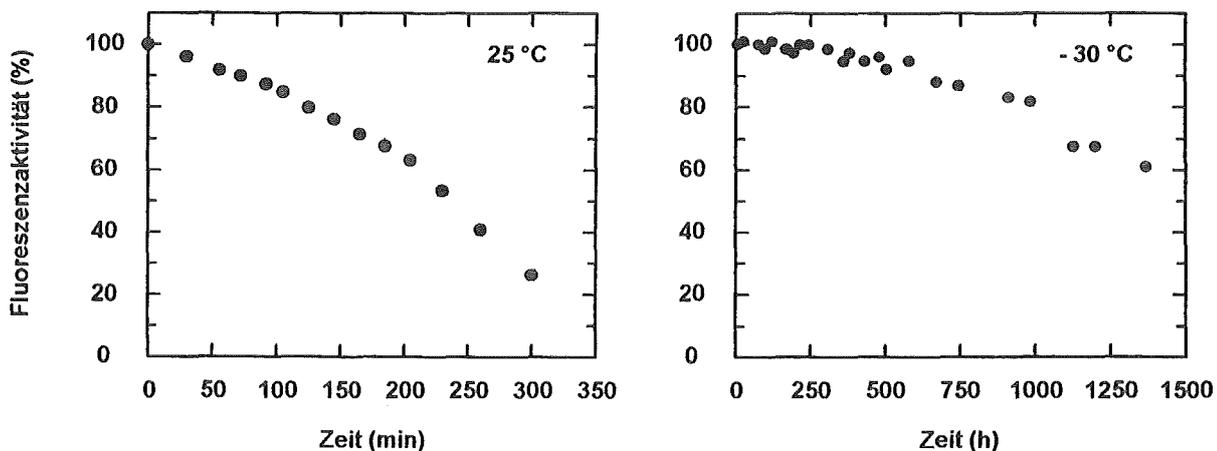


Abbildung 1-3: Veränderung der Fluoreszenzaktivität bei der Alterung, für 25 °C (links; Zeit in Minuten) und für -30 °C (rechts; Zeit in Stunden); --aufgetragen ist die Lagerdauer gegen die Fluoreszenzaktivität zum jeweiligen Zeitpunkt; --die ausgefüllten Kreise bezeichnen den Mittelwert aus zwei Messungen; --Berechnung der Fluoreszenzaktivität gemäß Gleichung 1-1; --Bedingungen gemäß Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden; --man erkennt jeweils eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzaktivität mit der Zeit, das heißt, eine Veränderung des Verlaufs der Fluoreszenzkinetik während der Alterung, die bei tiefen Temperaturen verzögert ist.

Im Rahmen dieser Versuche wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem Alterungsverhalten von Erbsenthylakoiden und Kopfsalatthylakoiden festgestellt.

III.1.3.3. Mechanismen der Alterung (Literatur und eigene Versuche)

In eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, daß der Wert für F_{\max} während der Lagerung abnahm (Abbildung 1-4).

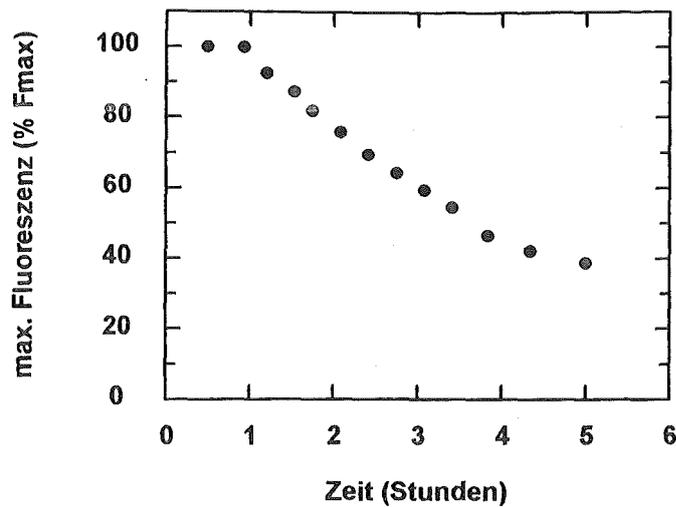


Abbildung 1-4: Intensitätsabnahme von F_{\max} mit der Zeit (25 °C); --aufgetragen ist die Lagerdauer nativer Thylakoide in Stunden gegen die maximale Fluoreszenzintensität, die nach 5 Sekunden Belichtung emittiert wird; --die maximale Fluoreszenzintensität ist ausgedrückt in % der Intensität unmittelbar nach Präparation; --die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einem 655nm-Diodenlaser, detektiert wurde im Makrosystem (siehe unter VI. Materialien und Methoden) mit einem Photomultiplier mit vorgeschaltetem RG715-Kantenfilter (Transmission ab 700nm).

Die Banden des Emissionsspektrums in F_{\max} bei Anregung mit einem 655nm-Diodenlaser ändert sich während der Alterung nicht (Emissionsspektrum siehe Abbildung 1-5). Jedoch ist auch hier eine Abnahme der Fluoreszenzintensität über das gesamte Emissionsspektrum zu erkennen.

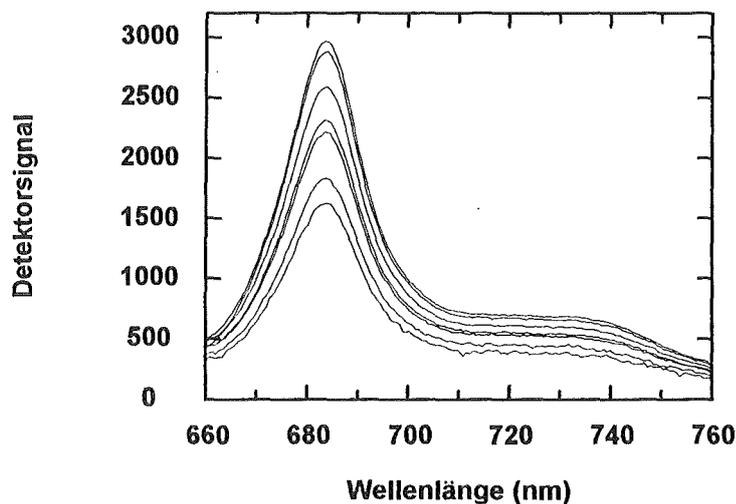


Abbildung 1-5: Intensitätsabnahme des Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Thylakoiden während der Alterung; --Die Spektren sind von oben nach unten mit zunehmender Lagerdauer bei 25 °C mit einem Diodenarray-Spektrometer aufgenommen worden; --die Anregung erfolgte extern mit einem 655nm-Diodenlaser; --Bedingungen der Messung siehe unter VI. Materialien und Methoden; --man erkennt, daß keine zusätzlichen Banden aufwachsen, jedoch die Gesamtintensität der Fluoreszenzemission abnimmt. Dies stimmt überein mit der in Abbildung 1-4 dargestellten Beobachtung der Intensitätsabnahme von F_{\max} mit der Lagerdauer.

Die Abnahme von F_{\max} kann verschiedene Ursachen haben, unter anderem die unten diskutierte Desaktivierung des Wasserspaltungssystems, Veränderungen in den Redoxsystemen der Elektronentransportkette und in den LHCs oder eine allgemeine Abnahme des Gehaltes an fluoreszierenden Chlorophyllmolekülen. Hinweise auf andere fluoreszierende Moleküle, die mit einem 655nm Diodenlaser angeregt werden können und die bei der Alterung gebildet oder freigesetzt werden, konnten mit diesem Versuch nicht gewonnen werden. Allerdings ist zu bedenken, daß freigesetzte Pigmente im allgemeinen lichtempfindlicher als ihre Proteidkomplexe sind, und so durch das Anregungslicht möglicherweise weiter abgebaut werden. Geht dieser Abbau bis zur Zerstörung des π -Elektronensystems, sind diese Moleküle weder in der Lage, Licht zu absorbieren noch es zu emittieren. Durch diese „Bleichung“ können sie sich bei diesem Versuchsaufbau der Detektion entziehen.

Über Ursachen und Mechanismen der Alterung wird in der Photosyntheseforschung insbesondere für Systeme *in vivo* intensiv geforscht. Ziel dieser Forschungen ist die Aufklärung von Ab- und Aufbaumechanismen *in vivo*, die beispielsweise bei Waldschädigungen beobachtet werden. Diese Erkenntnisse können nur dann auf isolierte Thylakoide übertragen werden, wenn es sich um unmittelbare Einflüsse auf Funktionen der Thylakoide handelt, die *in vitro* weiter ablaufen können. Im folgenden sollen die wichtigsten Vorgänge bei der Alterung kurz diskutiert werden.

Wie im Abschnitt II. Einleitung beschrieben, findet bei der Anregung eine Ladungstrennung statt, der Primärakzeptor wird reduziert und P680 oxidiert. In diesem Zustand ist „P680⁺“ nicht in der Lage, an der Lichtreaktion (Absorption, Emission) teilzunehmen. In intakten Thylakoiden dient das Wasserspaltungssystem als Elektronendonator, um P680⁺ wieder zu reduzieren. Ein Aktivitätsverlust dieses Wasserspaltungssystems während der Alterung führt dazu, daß P680⁺ weniger effektiv reduziert werden kann, und somit weniger P680 für die Lichtreaktion zur Verfügung steht. Möglicherweise ist also die Donorseite von P680 von der Alterung betroffen; Insbesondere unter dem Einfluß von UV-Strahlung (*Khalilov et al., 1992*) wird das Wasserspaltungssystem für eines der instabilsten Systeme der Elektronentransportkette gehalten.

Beschrieben wird auch ein autoproteolytischer Vorgang bei der Alterung, der zum Abbau eines Teiles des Photosystems II führt:

Aus der Photosyntheseforschung ist bekannt, daß die Pflanze in vivo Reparaturmechanismen insbesondere gegen Schädigung durch hohe Lichtintensitäten besitzt; zu diesen Reparaturmechanismen gehört ein Ab- und wieder Aufbau („Turnover“) des D1-Proteins des PS II. Die Mechanismen und insbesondere die Vorgänge, die zur ersten Schädigung des Proteins führen und den Turnover auslösen, sind momentan zentrale Themen in der Photosyntheseforschung (Review: *Andersson & Styring, 1991*).

Während der *Aufbau* des D1-Proteins in vitro für unwahrscheinlich gehalten wird, ist der *Abbau* des D1-Proteins für isolierte Thylakoide nachgewiesen worden. Dieser D1-Abbau kann durch Inhibitoren von Serin-Proteasen verhindert werden; er wird zwar durch Beleuchtung, die zur Photoinhibition führt, ausgelöst, zum Abbau selbst ist jedoch kein Licht notwendig. *Salter et al. (1992)* haben gezeigt, daß der eigentliche Abbau des D1-Proteins durch eine Serinprotease erfolgt; die Proteolyse wird durch Substrat-Aktivierung ausgelöst, wahrscheinlich durch Oxidation des Proteins in Verbindung mit der Photoinhibition. (*Andersson & Styring, 1991*). Voraussetzung für den D1-Abbau scheint damit eine Konformationsänderung des D1-Proteins zu sein. *Salter et al. (1992)* vermuten, daß nicht nur starkes Licht, sondern auch andere Effekte, die zu einer Konformationsänderung führen, den Abbau des D1-Proteins auslösen können, zum Beispiel Detergenzienbehandlung oder Erhitzen auf 40 °C im Dunkeln. Nach diesen Erkenntnissen ist der D1-Abbau ein sekundärer Effekt, der erst nach einer Schädigung des Proteins ausgelöst wird. Da diese Schädigung mit einer Konformationsänderung des Proteins verbunden ist, liegt der Schluß nahe, daß es die primären Reaktionen sind, die die Fluoreszenzkinetik verändern. Da die Protease erst danach in den Abbauprozess eingreift, kann eine Hemmung der Protease die Alterung nicht verhindern.

Auf der Suche nach den Ursachen der Alterung muß berücksichtigt werden, daß die Thylakoidsuspensionen nicht autoklaviert werden können; die Kontamination mit Mikroorganismen und/oder externen Enzymen (wie Proteasen, Lipasen) kann daher nicht ausgeschlossen werden. Deren Katalyse ist temperaturabhängig und kann durch Erniedrigung der Temperatur unter den optimalen Temperaturbereich der Katalyse verlangsamt werden. Ferner können solche Abbaureaktionen durch eine Erniedrigung des a_w -Wertes verzögert werden. (*Belitz, 1989*).

Weiterhin ist durch die Vielzahl der vorliegenden Moleküle ein ganze Reihe chemischer Abbaureaktionen denkbar; die Redoxsysteme der Elektronentransportkette können durch gelösten Sauerstoff irreversibel oxidiert werden; die Acyllipide der Membranen können

Autoxidationsreaktionen eingehen; hierbei entstehen durch Photooxygenierung zunächst Hydroperoxide, die insbesondere durch Schwermetallionen zu Radikalen umgesetzt werden, welche dann die Oxidation ungesättigter Fettsäuren starten können (Belitz, 1989). Die Destabilisation von Proteinen, kann sowohl Änderungen in kovalenten Bindungen, als auch Änderungen in der dreidimensionalen Struktur beinhalten (Hanson, 1992). Es handelt sich hier um integrale Proteine, die durch die umgebenden Membranen abgeschirmt werden, und daher stabiler sind als die selben Proteine in Lösungen; jedoch ragen größere Anteile der Proteine ungeschützt aus den Membranen heraus in die wäßrige Phase.

III.1.4. Schlußfolgerungen

Für den Biosensor kann der Literatur entsprechend sehr gutes biologisches Material gewonnen werden, das standardisiert und reproduzierbar aus selbstgezogenen Erbsenpflanzen präpariert werden kann. Auch das aus käuflichem Kopfsalat gewonnene Material ist in seiner Qualität vergleichbar. Die Verwendung von Kopfsalat ist insbesondere für Versuchsreihen vorteilhaft, bei denen große Mengen biologisches Material sofort benötigt werden; das Ziehen von Erbsenkeimlingen erfordert zehntägige Pflege, und die Menge ist begrenzt durch den zur Verfügung stehenden Platz im Gewächshaus. Die Verwendung von Kopfsalat hat jedoch den Nachteil, daß die „Vorgeschichte“ (Wachstumsbedingungen, Lagerung) weder bekannt ist noch gesteuert werden kann und erst bei der Qualitätskontrolle offensichtlich wird.

Diese Qualitätskontrolle ist sowohl mit Sauerstoffmessung als auch mit Fluoreszenzmessung reproduzierbar und statistisch verläßlich.

Die Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken an der optischen Bank ist möglich; jedoch ergibt sich für den apparativen Aufbau des Sensors der Hinweis, daß die Verwendung eines Shutters zum Anschalten des Anregungslicht vermieden werden sollte.

Die Alterung kann durch Erniedrigung der Temperatur gebremst werden und ist in flüssigem Stickstoff nicht zu beobachten; eine Stabilisierung der Thylakoide für einen praktikablen Biosensor, der bei Zimmertemperatur verwendet und transportiert werden soll, ist notwendig.

Unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse der Photosyntheseforschung ergibt sich bei der Betrachtung der Mechanismen der Alterung ein komplexes Bild verschiedener Reaktionswege, von denen einige je nach Lagerbedingungen bevorzugt ablaufen werden. Es ist jedoch naheliegend anzunehmen, daß die Alterung nicht durch einen einzigen, unabhängigen Reaktionsweg beschrieben werden kann, sondern an verschiedenen Stellen der

Elektronentransportkette gleichzeitig angreift. Eine Lagerung im Dunkeln und das Vermeiden sehr hoher Lichtintensitäten bei der Handhabung sind angezeigt.

Aus den diskutierten Aspekten kristallisieren sich zwei mögliche Wege zur Verzögerung der Alterung heraus:

Der Ersatz des Wasserspaltungsystems durch andere Elektronendonoren für P680, oder die Verzögerung von Abbaureaktionen verschiedenster Ursache durch Herabsetzung des Wassergehaltes der Thylakoidsuspension.

III.2. Stabilisierung von Thylakoiden

III.2.1. Ziele

Bisher ist es nicht möglich, Thylakoide ohne eine aufwendige Kühlung zu transportieren. Ein Vorteil des zu entwickelnden Biosensors soll jedoch eine schnelle Vor-Ort-Analytik sein.

In diesem Kapitel wird daher die Frage gestellt, ob und wie Thylakoide stabilisiert werden können, wobei Aktivität und Reaktionsfähigkeit der Thylakoide durch das Stabilisierungsverfahren möglichst wenig verändert werden sollen.

Übergeordnetes Ziel ist die Gewinnung eines Thylakoidpräparates, das stabiler als die native Thylakoidsuspension ist, und das standardisiert und reproduzierbar gewonnen werden kann.

III.2.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

Aus dem Kapitel III.1. „Aktivität nativer Thylakoiden“ läßt sich folgern, daß die Verzögerung der Alterung entweder durch Trocknen der Thylakoide oder durch Modifikation der Donor-Seite von P680 (Ersatz des Wasserspaltungssystems) erreicht werden könnte.

Senken des Wassergehaltes durch Gefriertrocknung

Durch Trocknung können chemische Einflüsse bei der Lagerung stark vermindert werden. Ist der Wassergehalt geringer als der Gehalt an Feststoffen, hängt die Geschwindigkeit vieler Reaktionen vom Grad der Wasserbindung ab.

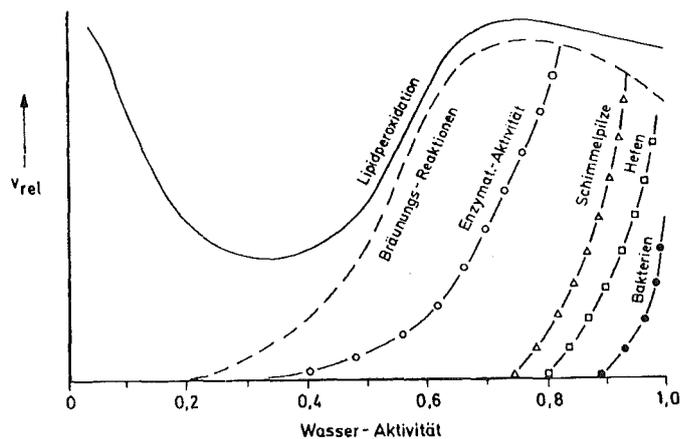


Abbildung 2-1: Relative Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Belitz, 1987)

Da Erhitzen die Thylakoide inaktiviert, muß eine besonders schonende Methode der Trocknung gefunden werden.

Bei der Gefriertrocknung (oder Lyophilisation) wird das Lösungsmittel zunächst gefroren und dann durch Sublimation im Vakuum aus der Probe entfernt. Die Probe kann auf einer kühlbaren Platte in der Trocknungskammer selbst oder extern eingefroren werden. Wenn das Produkt gefroren ist, wird das System evakuiert, und die Temperatur der Stellplatte auf einen, für die Sublimation günstigen Wert eingestellt. Dieser Sublimationsprozeß wird als „Haupttrocknung“ bezeichnet. Die Temperatur des Kondensators, an dem sich der aus der Probe freigesetzte Wasserdampf niederschlägt, wird möglichst tief (meist -60 °C) gewählt. Nachdem das Eis durch Sublimation entfernt wurde, enthält das Produkt einen noch relative hohen Wassergehalt (20-50%). Dieses Wasser wird in einem „Nachrocknungsprozeß“ entfernt, der bei höherer Temperatur unter Vakuum abläuft.

Obwohl die Lagerstabilität empfindlicher Produkte aus Lebensmittelchemie, pharmazeutischer Chemie und Biochemie durch Gefriertrocknung oft wesentlich verbessert werden kann, ist es häufig schwierig, insbesondere bei empfindlichen Proben, einen Aktivitätsverlust während der Gefriertrocknung zu verhindern. Daher müssen die Verfahrensschritte Einfrieren, Beschicken der Trockenkammer, Haupttrocknung, Nachrocknung und Nachbehandlung sowie die chemische Zusammensetzung der Probe für jedes Produkt optimiert werden (Pikal, 1990).

Aufgrund der Vielzahl der zu variierenden Parameter wurden für diese Versuche große Mengen an biologischem Material benötigt; in dieser Arbeit wurden Kopfsalat-Thylakoide zur Durchführung der Optimierung verwendet, da Kopfsalat als Ausgangsmaterial schnell und in großer Menge zur Verfügung stand.

Ersatz des Wasserspaltungssystems

In Arbeiten der Photosyntheseforschung wurde gezeigt, daß künstliche Elektronendonoren für PS II in die Elektronentransportkette eingeschleust werden können. Sie übernehmen die Funktion des Wasserspaltungssystems, indem sie $P680^+$ reduzieren. (Vernon *et al.*, 1969; Yamashita *et al.*, 1969; Purcell *et al.* 1993). Besonderes Augenmerk wurde auf chemische Verbindungen gerichtet, die selektiv die Donorseite von PS II reduzieren, wie beispielsweise p-Hydrochinon, p-Aminophenol, Dihydroxydiphenyl. Als besonders effektiv wird 1,5-Diphenylcarbazon angesehen (Vernon *et al.*, 1969). Yamashita *et al.* (1969) zeigen, daß die Fluoreszenzintensität bei Beleuchtung im Minutenbereich durch Hydroxylamin besonders gut wiederhergestellt werden kann.

Zunächst wird bei diesen Versuchen das Wasserspaltungssystem entfernt. Dies wurde hier nach Yamashita *et al.* (1969) durch Waschen mit TRIS-Puffer erreicht. Die so gewonnene Präparation wird als „TRIS-gewaschene Thylakoidsuspension“ bezeichnet. Da diese Thylakoide kein Wasserspaltungssystem mehr besitzen, und eben dieses System als besonders empfindlich gilt, sollten TRIS-gewaschene Thylakoide langsamer altern, als die native Thylakoidsuspension. Zur „Wiederbelebung“ der nach dem Waschen mit TRIS-Puffer inaktivierten Thylakoide wurden 1,5-Diphenylcarbazon (DPC) und Hydroxylamin verwendet.

Zur Überprüfung der wiederhergestellten Aktivität der Thylakoide und der Alterung wird eine alternative Methode zur Sauerstoffmessung verwendet, da durch die Entfernung des Wasserspaltungssystems kein Sauerstoff mehr gebildet wird. Die Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette wird daher auf der Akzeptorseite des PS II überprüft: 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP), ein blauer Farbstoff, übernimmt die Elektronen des PS II von Q_A und wird reduziert. Die daraus resultierende Abnahme des Absorptionsmaximums bei 600nm kann spektrometrisch verfolgt werden; die Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme ist ein Maß für die Aktivität der Thylakoide (Vernon *et al.*, 1969).

Bei der Einführung dieser Methode in die bestehende Laboreinrichtung wurden erhöhte Blindwerte durch DCPIP-Bleichung, Thylakoidbleichung und die Blendung des Detektors unmittelbar nach der Belichtung nivelliert; außerdem wurde festgestellt, daß die reduzierte

Form von DCPIP im Dunkeln rasch wieder oxidiert wird, so daß es wichtig ist, den Meßwert für die Abnahme der Absorption sofort nach Ausschalten des Anregungslichtes abzulesen. Danach stimmte die DCPIP-Messung intakter Thylakoide mit den Ergebnissen für die Aktivität der Sauerstoffmessung überein und war somit zuverlässig (s. VI. Materialien und Methoden).

III.2.3. Ergebnisse und Diskussion

III.2.3.1. Gefriertrocknung von Thylakoiden - Optimierung des Verfahrens

Durch die Optimierung der Gefriertrocknung von Thylakoiden konnte im Rahmen dieser Arbeit das in Abbildung 2-2 dargestellte Ergebnis erzielt werden. Hierbei bezeichnen die Balken jeweils einen unabhängigen Versuch, die Höhe der Balken die Aktivität nach der Gefriertrocknung. Die erste Balkengruppe zeigt die Ergebnisse vor der Optimierung des Verfahrens; die zweite Gruppe zeigt die Reproduzierbarkeit und die relative Aktivität der Thylakoide, nachdem das Verfahren optimiert wurde.

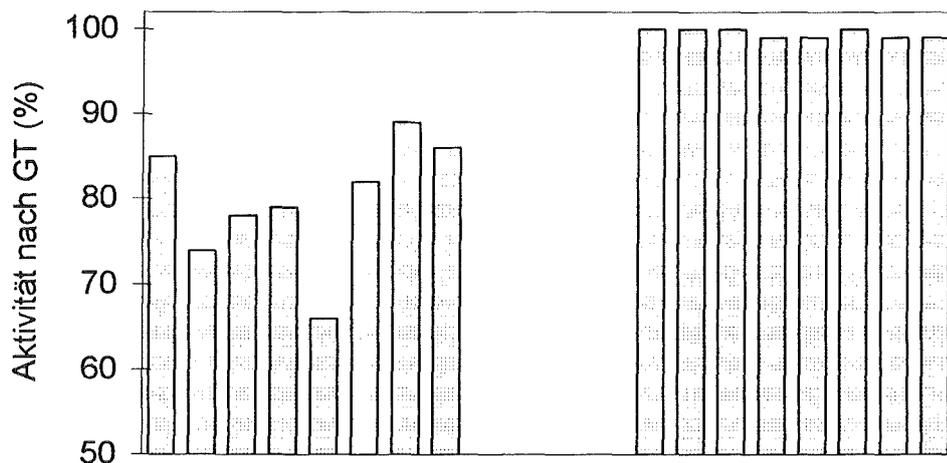


Abbildung 2-2: Reproduzierbarkeit und relative Aktivität vor und nach der Optimierung des Gefriertrocknungsverfahrens (GT); --jeder Balken zeigt das Ergebnis jeweils eines Gefriertrocknungsversuchs; --die erste Gruppe bezeichnet die Ergebnisse vor der Optimierung, die zweite Gruppe die Ergebnisse nach der Optimierung des Verfahrens; --Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden; --Man erkennt, daß nach der Optimierung die Aktivität zu durchschnittlich 99 % erhalten blieb und die Reproduzierbarkeit sehr gut ist.

Wie die Aktivität der Thylakoide im Verlaufe der Gefriertrocknung bewahrt werden konnte und wie die Bedingungen ausgewählt und konstant gehalten wurden, wird im folgenden detailliert beschrieben und diskutiert.

Minimieren äußerer Einflüsse beim Einfrieren und Beschicken der Trockenkammer

Das Einfrieren der Probe und das Beschicken der Trockenkammer muß unter kontrollierten Bedingungen ablaufen, um die Ergebnisse der Gefriertrocknung reproduzieren zu können. Im

Folgenden werden die Parameter dargestellt, die sich als kritisch erwiesen haben (Franks, 1990; Pikal, 1990).

Es muß darauf geachtet werden, daß

1. durch identische *Einfriergeschwindigkeit* die Größe der Eiskristalle gleich ist, da die Größe der Eiskristalle die Dauer der Gefriertrocknung wesentlich bestimmt.
2. keine *Einschlüsse aus übersättigten Lösungen* entstehen, aus denen anschließend Wasser verdampfen und zu einer Schädigung des biologischen Material führen könnte.
3. kein zufälliges *Erwärmen* der Probe auftritt, da hierdurch die Eiskristalle umkristallisieren und nicht-reproduzierbare Kristallgrößen entstehen.

Eine hohe Kühlrate beim Einfrieren ist erwünscht. Dadurch werden Einschlüsse aus übersättigter Lösung vermindert. Die entstehenden kleinen Eiskristalle bilden jedoch kleinere Poren, wodurch die Sublimation verlangsamt wird (Franks, 1990; Pikal, 1990).

Für das hier verwendete biologische Material gelten weitere spezielle Bedingungen. Um die Thylakoide nicht bereits beim Einfrieren zu schädigen, mußte ein optimales Gefrierverfahren gefunden werden; bei den eigenen Versuchen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff hat sich gezeigt, daß schnellstmögliches Einfrieren die Aktivität der Thylakoide am besten erhält; zu langsames Einfrieren kann die Aktivität der Thylakoide herabsetzen. Denkbar ist zudem, daß nachträgliches Kristallwachstum die Lipidmembranen schädigen kann. Für die Gefriertrocknung von Thylakoiden wurde daher eine möglichst hohe und gut reproduzierbare Kühlrate angestrebt.

Die oben genannten kritischen Punkte konnten erst dann gut kontrolliert werden, nachdem ein optimales Oberflächen/Volumenverhältnis der Probe gefunden worden war.

Je größer das Oberflächen/Volumenverhältnis ist, desto schneller kann die Probe eingefroren und getrocknet werden; gleichzeitig wirken sich jedoch Temperaturschwankungen stärker aus, und damit verschlechtert sich die Reproduzierbarkeit der Gefriertrocknung. Es erwies sich als optimal, 4 ml Suspension in einer Petrischale gleichmäßig verteilt, in flüssigem Stickstoff einzufrieren (Fläche: 71 cm^2 ; Volumen der Probe: 4 cm^3 ; ideale Schichtdicke: 0,6 mm). Durch die Bewegung der Suspension während des Einfrierens können Schwankungen in der Schichtdicke entstehen. Im Bereich von 0,4 mm - 0,8 mm sind sie nicht kritisch und beeinflussen die Reproduzierbarkeit nicht.

Zum Einfrieren wird die Thylakoidprobe schnellstmöglich in flüssigen Stickstoff getaucht; diese Gefriereschwindigkeit kann gut reproduziert werden; die Gefahr der Bildung von Einschlüssen aus übersättigten Lösungen wird so minimiert.

Während des Beschickens der Trockenkammer wird auf die gefrorene Thylakoidschicht flüssiger Stickstoff gegossen, bis die Petrischale gefüllt ist; dieser Füllstand wird während des Handlings der Probe aufrechterhalten; die Stellplatte der Gefriertrocknungsanlage wird mit flüssigem Stickstoff gefüllt und darin die Probe transportiert, bzw. die Trockenkammer beschickt. Erst beim Evakuieren der Trockenkammer wird der flüssige Stickstoff entfernt; Temperaturschwankungen durch äußere Einflüsse wirken sich so lediglich auf die Geschwindigkeit des Phasenübergangs des Stickstoffes und nicht auf die Probe aus; die Probe kann damit unter identischen und reproduzierbaren Bedingungen in die Trockenkammer eingebracht werden. Die in Abbildung 2-2 gezeigte, sehr gute Reproduzierbarkeit des Gesamtprozesses bestätigt, daß der wichtige Teilschritt des Einfrierens und Beschickens der Trockenkammer unter den gewählten Bedingungen konstant und wiederholbar abläuft, beziehungsweise daß die verbleibenden minimalen Schwankungen keinen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Aktivität der Thylakoidpulver haben.

Optimierung des Trocknungsprozesses (Haupttrocknung und Nachrocknung)

Die Sublimationsgeschwindigkeit wird thermodynamisch betrachtet von der Temperaturdifferenz zwischen Probe und Kondensator bestimmt. Die Proben-Temperatur während der Haupttrocknung soll demnach deutlich über der Kondensator-Temperatur (-60°C) liegen (*Franks, 1990*); jedoch muß sichergestellt sein, daß das Wasser der Probe gefroren bleibt. Die maximale Temperatur, die bei der Gefriertrocknung nicht überschritten werden darf, wird für die amorphe Phase als „Kollapstemperatur“ bezeichnet. Für ein System aus gelösten Substanzen, das kristallisiert, ist es die eutektische Temperatur (*Pikal, 1990*). Überschreiten der Kollapstemperatur kann zu einem Verlust an Aktivität während der Gefriertrocknung und zu schlecht resuspendierbaren Produkten führen (*Pikal, 1990; Bellows, 1992; Mackenzie, 1975*).

Die Kollapstemperatur einer Probe kann mit technischem Aufwand durch Differenz-Scanning-Kalorimetrie (DSC), Differenz-Thermoanalyse (DTA), über die Messung des elektrischen Widerstandes oder durch Gefrier-Mikroskopie exakt bestimmt werden (*Pikal, 1990*).

Um zu testen, ob Thylakoide durch Gefriertrocknung stabilisiert werden können, war es zunächst ausreichend, die maximale Temperatur der Haupttrocknung nach *Bellows (1972)* abzuschätzen. Hier wird gezeigt, daß Lösungen höhermolekularer Substanzen aufgrund der höheren Viskosität eine deutlich höhere Kollapstemperatur aufweisen, als Lösungen niedermolekularer Substanzen. Beispielsweise wird durch Zumischen von 2% Gelatine zu einer 23 %ige Fructose-Lösung die Kollapstemperatur im Vergleich zur reinen Fructose-Lösung von -44 °C auf -28 °C heraufgesetzt.

Für eine 15%ige Saccharose-Lösung wird die Kollapstemperatur mit -23 °C angegeben (*Bellows, 1972*).

Berücksichtigt man die hohe Thylakoidkonzentration (entsprechend 1 mg Chlorophyll / ml Suspension) in der Probe, kann man davon ausgehen, daß die Kollapstemperatur der Thylakoidprobe (enthält 11% Saccharose) über -20 °C liegt. Um sicher zu gehen, wurde die Haupttrocknung bei einem Druck von 0.12 mbar durchgeführt; aus dem Phasendiagramm für Eis ergibt sich bei diesem Druck idealerweise eine Abkühlung der Probe auf -38 °C durch Sublimation. Die Temperatur der Stellplatte während der Haupttrocknung wurde mit einem Kühlbad temperiert, welches auf -40°C (niedrigstmögliche Temperatur) eingestellt worden war. Daraus resultierte auf der Stellplatte eine Temperatur von -33 °C.

Das Ende der Haupttrocknung ist erreicht, wenn das Eis vollständig aus der Probe entfernt ist; die Probentemperatur wird dann nicht mehr durch Sublimation verringert und entspricht der Außentemperatur (Plattentemperatur). Danach beginnt die Nachtrocknung (*Franks, 1990; Pikal, 1990*); durch sie wird der Restfeuchtegehalt der Probe gesenkt, der wesentlich die Langzeitstabilität bestimmt. Technisch wird die Plattentemperatur erhöht und der Druck in Größenordnungen von 0.3 mbar eingestellt. Es ist zwar für die Lagerstabilität wünschenswert, möglichst lange nachzutrocknen; jedoch darf die Probe auch nicht „übertrocknet“ werden, da hierbei ein Aktivitätsverlust auftreten kann (*Pikal, 1990*).

Um die optimale Nachtrockendauer zu ermitteln, wurden die technischen Bedingungen des Prozesses und die Zusammensetzung der Probe konstant gehalten; die Nachtrocknung wurde nach verschiedenen Zeiten unterbrochen, und die Aktivität der Thylakoide bestimmt.

Wie Abbildung 2-3 zeigt, ist die Aktivität der Thylakoide nach der Gefriertrocknung abhängig von der Dauer des Trocknungsprozesses.

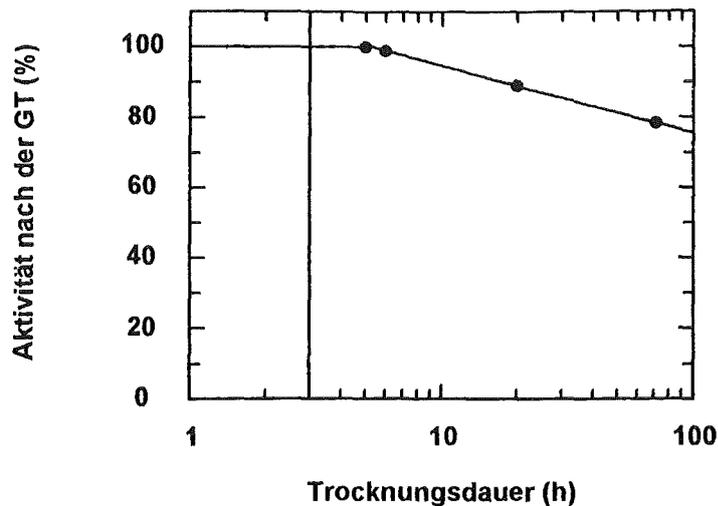


Abbildung 2-3: Abhängigkeit der Aktivität der Thylakoide nach Gefriertrocknung (GT) von der Trocknungsdauer; --die senkrechte Linie bezeichnet das Ende der Haupttrocknung; --dargestellt ist die Aktivität relativ zur Aktivität vor der Gefriertrocknung ($t_{GT} = 0$; $A_F = 100\%$); --Stabilisator: Saccharose (Mittelwert (6 h): 99,5 % Aktivität); --Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Aus Abbildung 2-3 ist ersichtlich, daß die Aktivität nach einer Gesamtprozeßdauer von 6 Stunden deutlich abnimmt.

Die Abnahme der Aktivität mit der Trocknungsdauer kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Denkbar ist, daß es sich um allgemeine Abbaureaktionen handelt, die auch bei der Alterung der Pulver während der Lagerung auftreten. Jedoch zeigt sich, daß der Aktivitätsverlust während der Trocknung schneller verläuft, als bei der Lagerung (vergleiche Abbildung 2-5).

Die Trocknung bewirkt also eine Aktivitätsabnahme zusätzlich zur normalen Alterung. Dieser Effekt könnte mit einer „Übertrocknung“ erklärt werden: Thylakoide sind in sich geschlossene Vesikel, die im Innern Wasser enthalten. Es ist wahrscheinlich, daß dieses Wasser - wenn überhaupt - erst bei der Nachtrocknung entfernt wird. Dadurch können schützende Hydrathüllen um Proteine verloren gehen, und durch verstärkte Wechselwirkungen Reaktionen möglich werden, wie sie auch für die Gefrierkonzentration (*Franks, 1990*) beschrieben werden. Für den Schutz von Proteinen oder Liposomen werden Stabilisatoren (insbesondere Zucker) empfohlen, die dann die Aufgabe der Wassermoleküle übernehmen können (*Arakawa, 1991; Engel et al., 1994*). Da die hierzu in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zucker und Sorbitol durch die hydrophoben Ketten der Lipide aufgrund ihrer Polarität nicht hindurchdringen können, können sie bei Reaktionen, die sich im Innern der Thylakoide abspielen, nicht eingreifen.

Denkbar ist auch, daß durch die lipophile Thylakoidmembran kein Wasserdampf entweichen kann. Während der Nachrocknung wird dann möglicherweise eine mechanische Beschädigung der Bestandteile der Lipidmembran durch Sieden des Wasser erfolgen.

Um Aktivitätsverluste durch die Trocknung zu vermeiden, wird die Nachrocknung auf maximal 3 Stunden verkürzt.

Nach der Optimierung wird die Gefriertrocknung unter folgenden technischen Bedingungen durchgeführt:

Verfahrensschritt	Parameter	Wert
Einfrieren und Beschicken	Temperatur	-196 °C (fl. Stickstoff)
	Schichtdicke	0,6 mm
Haupttrocknung	Druck	0,12 mbar
	Temperatur der Stellplatte	-33 °C
	Temperatur des Kondensators	-60 °C
	Dauer	3 h
Nachrocknung	Druck	0,12 mbar
	Temperatur der Stellplatte	-10 °C bis + 10 °C
	Dauer	3 h
Lagerung		dunkel, über Kieselgel

Tabelle 2-1: Technische Parameter nach der Optimierung

Aktivitätserhalt während der Gefriertrocknung und Zusammensetzung des Puffers

Um die Aktivität des Trockengutes zu erhalten, werden bei gängigen Gefriertrocknungsverfahren optimale Stabilisatoren ausgewählt. Für Proteine und Liposomen werden verschiedene Additiva empfohlen, deren genaue molekulare Funktionsweise Ziel aktueller Untersuchungen ist. Aufgaben und Bedeutung verschiedener Stabilisatoren sind in Tabelle 2-3 zusammengestellt.

Zur Stabilisierung während der Gefriertrocknung und Lagerung werden bevorzugt Kohlenhydrate verwendet; ihre stabilisierende Wirkung wird sowohl bei Proteinen als auch bei Liposomen darauf zurückgeführt, daß sie eine zu starke Annäherung (und damit Wechselwirkung) der Moleküle bei Entfernung des Lösungsmittels verhindern. Bei Proteinen wird von den Lyoprotectants (Stabilisatoren bei Trocknung und Lagerung) die abschirmende

Wirkung einer Hydrathülle übernommen und so die Denaturierung der Proteine verhindert (Hanson et al., 1992; Arakawa et al., 1991; Franks, 1990; Timasheff, 1992).

Für Liposomen wird beschrieben, daß durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den polaren Regionen der Membranlipide und den als Lyoprotectants verwendeten Kohlenhydraten eine Stabilisierung erfolgt, die auf die Verhinderung der Fusion der Lipide durch diese „Spacer“ zurückgeführt wird. Bei im Vergleich zur Lipidkonzentration hohen Lyoprotectant-Konzentrationen wird vermutet, daß sich eine schützende Matrix ausbildet, in die die Liposomen eingebettet sind (Engel et al., 1994).

Thylakoide sind komplex zusammengesetzte, biologische Membranen, die aus Acyllipiden wie Phospholipiden und Glycolipiden gebildet werden, und die die Photosysteme als integrale Proteine enthalten. Die gefundenen Ergebnisse für Proteine und Liposomen können so nur bedingt auf die komplexen biologischen Membranen übertragen werden.

Um zu testen, inwieweit die Aktivitätserhaltung während der Gefriertrocknung von Thylakoiden durch Stabilisatoren beeinflusst werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit Saccharose (als nichtreduzierendes Disaccharid) oder Raffinose (als nichtreduzierendes Trisaccharid) oder Sorbitol (Hexitol) in jeweils äquimolaren Mengen dem Suspensionspuffer zugegeben. Weiterhin wurden zwei Saccharose/Sorbitol-Mischungen erprobt.

Glucose wurde nicht eingesetzt, da reduzierende Zucker Wechselwirkungen mit den Proteinen (Maillard-Reaktionen) bei Trocknung eingehen können. Statt dessen wurde mit Sorbitol ein Hexitol erprobt.

Raffinose wurde getestet, um herauszufinden, ob ein Trisaccharid durch die größere Anzahl an OH-Gruppen / mol stabilisierender als Disaccharide (Saccharose) wirken kann.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-2 dargestellt.

Stabilisator	Aktivitätserhaltung während der Gefriertrocknung (Mittelwert aus 3 Ansätzen)	Beschaffenheit des Produktes
Saccharose	99,5 % (100,0 / 98,6 / 100,0)	pulvrig, kristallin
Saccharose/Sorbitol 2:1	100,1 % (100,0 / 99,1 / 101,4)	pulvrig, schwach hygroskopisch
Saccharose/Sorbitol 1:1	99,5 % (100,0 / 99,3 / 100,0)	pulvrig, hygroskopisch
Sorbitol	-	kein Pulver, klebrige Konsistenz
Raffinose	96,2 % (98,1 / 94,4 / 96,1)	pulvrig, kristallin

Tabelle 2-2: Aktivitätserhaltung während der Gefriertrocknung;--Einzelwerte in Klammern.

Es ist ersichtlich, daß bei allen erprobten Stabilisatoren, mit denen es gelingt, ein trockenes Pulver zu gewinnen, die Aktivität zu über 95 % erhalten bleibt. Praktisch unverändert ist die Aktivität der Thylakoide, die mit Saccharose oder einem Saccharose/Sorbitol-Gemisch getrocknet werden. Alle resultierenden Pulver sind sehr gut resuspendierbar.

Mit Sorbitol alleine war es nicht möglich, ein Pulver zu gewinnen, auch dann nicht, wenn die Trocknungszeit verdoppelt wurde. Der resultierende Gefriertrocknungs“kuchen“ war schlecht strukturiert, klebrig und feucht.

Diese Produktzusammensetzung wird als ein Indiz dafür angesehen, daß die Kollapstemperatur während der Gefriertrocknung überschritten wurde (*Pikal, 1990*). Eine reine Sorbitollösung weist bei gleicher Konzentration gegenüber den anderen, verwendeten Stabilisatoren tatsächlich eine sehr niedrige Kollapstemperatur auf. (*Mackenzie, 1975*: Sorbitol: -45°C; Saccharose: -32 °C; Raffinose: -18 °C). Inwiefern die übrigen suspendierten Bestandteile die Kollapstemperatur heraufsetzen, kann nur durch eine Bestimmung der Kollapstemperatur der Probe mit einem der obengenannten Meßverfahren ermittelt werden. Das primäre Ziel dieser Arbeit bezüglich der Gefriertrocknung war zu untersuchen, ob Thylakoide für den späteren Biosensor überhaupt genügend stabilisiert werden können. Da mehrere Stabilisatoren - wie oben gezeigt - zur Untersuchung dieses Problems gefunden worden waren, wurde das Problem „Kollapstemperatur mit Sorbitol“ hier nicht weiter verfolgt.

Sorbitol ist außerdem äußerst hygroskopisch (*Belitz, 1989*); zwar wird die zum Fluten der Gefriertrocknungsanlage verwendete Luft über ein Trockenmittel geleitet; möglicherweise genügt jedoch die Restfeuchte, um die mit Sorbitol getrockneten Pulver wieder anzufeuchten;

auch dies wäre eine Erklärung für die feuchten und klebrigen Produkte nach Gefriertrocknung mit reinem Sorbitol.

Mit steigendem Sorbitolgehalt in den Proben wird in oben gezeigter Versuchsreihe eine wachsende Hygroskopie der Pulver beobachtet. Dies bedeutet, daß diese Pulver über einem Trockenmittel gelagert werden müssen. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, werden generell alle gewonnenen Pulver im Exsiccator über Kieselgel gelagert.

Zur Abhängigkeit der Lagerstabilität von der Pufferzusammensetzung siehe unter 3. Alterung von Thylakoidpulvern, Seite 55.

Ergebnis der Optimierung

Nach der Optimierung steht ein Gefriertrocknungsverfahren zur Verfügung, das reproduzierbar ist, und mit dem Thylakoidpulver ohne Verlust an Aktivität innerhalb von 6 Stunden gewonnen werden können. Gefriergetrocknete Thylakoide werden im folgenden als „Thylakoidpulver“ bezeichnet.

Tabelle 2-3: Zusammenfassung der Optimierung der chemischen Probenzusammensetzung; DMSO: Dimethylsulfoxid

Experimentelle Variablen	Art der Beeinflussung	Grund/ Funktionsweise	Beispiele	Eigene Maßnahmen
Cryoprotektant Literatur: Hanson et al., 1992; Arakawa et al., 1991; Franks, 1990	Schützt beim Einfrieren, insbesondere vor verstärkten Wechselwirkungen durch die beim Einfrieren auftretende Gefrierkonzentration	Verhindert Aggregation der Biomoleküle, insbes. von Proteinen (Denaturierung durch Konzentrierung)	für Proteine: Zucker, Polyole. Aminosäuren, Methylamine; reduzierende Zucker können mit Proteinen Maillard-Reaktionen eingehen	Zugabe von DMSO erwies sich als wirkungslos; Zugabe von Saccharose, oder Raffinose, oder Sorbitol Kaum Unterschied in der schützenden Wirkung
Lyoprotectant Literatur: Hanson et al., 1992; Arakawa et al., 1991;Franks, 1990; Timasheff, 1992; Engel et al., 1994	Stabilisierung während der Trocknung und Lagerung	Proteinstabilisierung durch Wirkung als „Wasserersatz“ im trockenen Produkt. Liposomen: Verhinderung der Fusion als „Spacer“ zwischen den Membranen ; in hohen Konzentrationen Verhinderung der Aggregation durch Bildung einer schützenden Matrix	für Proteine: Saccharose, Ficoll 70, Polyvinylpyrrolidon; für Liposomen: Saccharose bei niedrige Lyoprotectant- Konzentrationen, Saccharose oder Glucose bei hohen Konzentrationen	Zugabe von Saccharose oder Raffinose oder Saccharose/Sorbitol-Gemisch; Aktivitätserhalt vergleichbar; steigender Sorbitolanteil verlängert Lagerdauer
Puffer Literatur: Hanson et al., 1992	schützt vor Veränderungen des pH-Wertes	Puffer mit passendem pKs-Wert für optimalen pH-Wert der Probe. pKs-Wert ist temperaturabhängig	gängige Puffer für biologische Substanzen (Phosphatpuffer, TRIS.)	HEPES als optimaler Puffer für Thylakoide
amorphe Stabilisatoren Literatur: Izutsu et al., 1991; Izutsu et al. 1993; Izutsu et al., 1994; Hanson et al. 1992;	stabilisierende Wirkung besser als bei kristallisierenden Stabilisatoren; Trocknung; jedoch etwas verlangsamt	Denaturierung von Proteinen (Aggregation) wird verhindert	für Proteine: Kohlenhydrate bzw. Polyole unter jeweils optimalen Bedingungen bei der Gefriertrocknung	Verhindern von Erwärmen der Probe beim Einfrieren und Beschicken

III.2.3.2. Reaktionsfähigkeit der Thylakoidpulver mit Herbiziden

Nach Optimierung des Verfahrens sind die Fluoreszenzkinetiken resuspendierter, gefriergetrockneter Thylakoide gegenüber der nativen Suspension unverändert. Daraus läßt sich ableiten, daß die Q_B -Bindestelle unverändert ist, und auch die Reaktion mit Herbiziden unverändert sein sollte. Um dies zu überprüfen, wurden die gefriergetrockneten Thylakoide in Suspensionspuffer resuspendiert und mit $0,9 \mu\text{g/l}$ Diuron versetzt (Abbildung 2-4). Das resultierende Signal wurde mit dem der nativen Thylakoidsuspension verglichen:

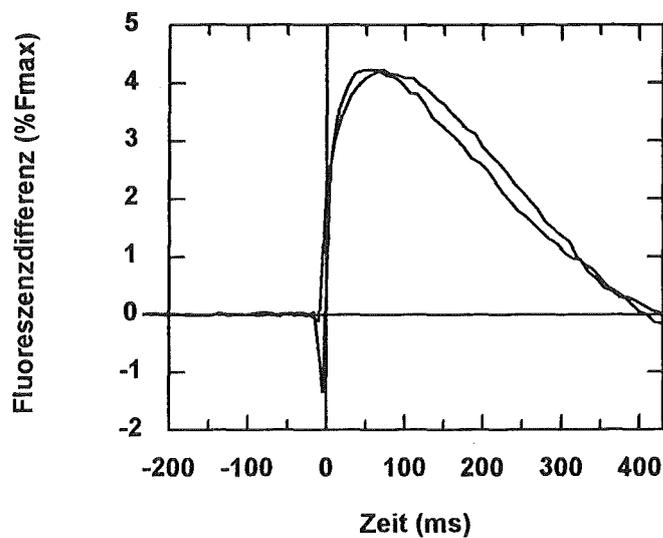


Abbildung 2-4: Reaktion gefriergetrockneter Thylakoide mit Herbiziden im Vergleich zur nativen Suspension; --Beispielsignal für $0,9 \mu\text{g/l}$ Diuron; --Messung im Labormuster (siehe Kapitel III.6.); --Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung der miniaturisierten Meßmethode“

Man erkennt, daß die Höhe des Signals innerhalb der normalen Schwankungsbreite unverändert ist.

III.2.3.3. Alterung von Thylakoidpulvern

Der Aktivitätsverlust der Thylakoidpulver mit der Zeit wurde für zwei verschiedene Pufferzusammensetzungen mittels Fluoreszenzmessung bestimmt: für Stabilisator Saccharose:Sorbitol in äquimolarer Menge und für Stabilisator Saccharose.

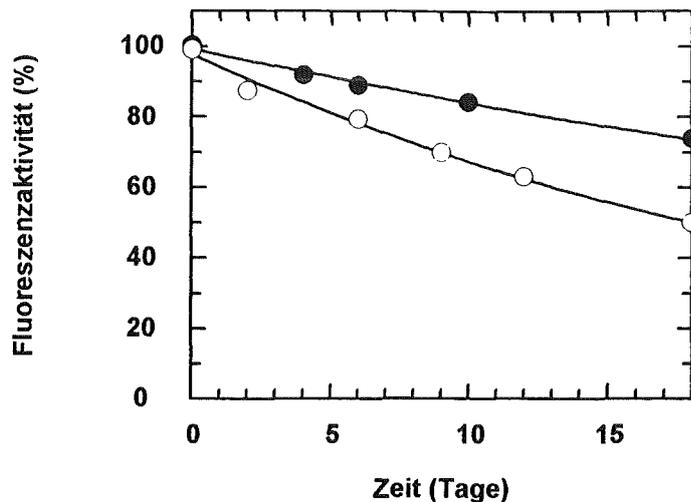


Abbildung 2-5: Abhängigkeit der Alterung gefriergetrockneter Thylakoide von der Pufferzusammensetzung; --ausgefüllte Kreise: Stabilisator Saccharose:Sorbitol äquimolar; --leere Kreise: Stabilisator Saccharose; --Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Die Alterung kann jeweils mit einem einfach-exponentiellen Verlauf beschrieben werden. Abbildung 2-5 zeigt, daß die Abnahme der Aktivität unter Verwendung des Stabilisators Saccharose : Sorbitol in äquimolarer Menge langsamer abläuft als unter Verwendung des Stabilisators Saccharose.

Um diesen Versuch zu verifizieren, wurden die Pulver über mehrere Wochen bei 25 °C gelagert und jeden dritten Tag die Aktivität bestimmt. Aus der nichtlinearen Regressionskurve wurde die Aktivität nach 8 Tagen abgelesen. Die statistische Auswertung für je drei unabhängige Gefrietrocknungen pro Puffer ergab folgendes Ergebnis:

	Aktivität nach 8 Tagen (%)	
	Saccharose	Saccharose : Sorbitol 1:1
Einzelwerte	70 73 74	83 86 87
Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes	72 ± 1	85 ± 1

Tabelle 2-4: Abhängigkeit der Aktivität nach 8 Tagen (Lagerung bei 25 °C) von der Zusammensetzung des Puffers

Die Werte können gut reproduziert werden; der Unterschied der Aktivitäten nach 8 Tagen in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung ist signifikant. Es ergibt sich also, daß Thylakoide, welche mit einer Mischung aus einer äquimolaren Menge an Saccharose und Sorbitol gefriergetrocknet werden, deutlich stabiler sind als Thylakoide, welche nur Saccharose als Stabilisator enthalten.

Möglicherweise besteht die stabilisierende Wirkung von Sorbitol und Saccharose in einer Funktion als Wasserersatz („Pseudohydratation“). Vorstellbar ist, daß sich die Sorbitolmoleküle räumlich optimaler zwischen den Lipidmembranen bei den Phosphatresten anordnen und so die Beweglichkeit der Membranen und die Wechselwirkung ihrer Bausteine und integralen Bestandteile einschränken können.

Jedoch ist festzuhalten, daß die äquimolare Mischung der beiden Lyoprotectants sich nur in puncto Lagerstabilität deutlich von dem anderen erprobten Lyoprotectant unterscheidet. Bei der Erhaltung der Aktivität während des Trocknungsprozesses (siehe oben) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen reiner Saccharose oder Saccharose:Sorbitol in äquimolarer Mischung als Stabilisator gefunden werden. Da die Aktivität in beiden Fällen praktisch vollständig erhalten bleibt, kann gefolgert werden, daß die schützende Wirkung der beiden Lyoprotectants als Matrix für Lipidmembranen vergleichbar ist.

Sorbitol unterscheidet sich von Saccharose jedoch durch sein höheres Wasserbindungsvermögen (*Belitz, 1987*). Dies ist bei der Lagerung gefriergetrockneter Produkte insofern bedeutend, daß der Restwassergehalt nach der Trocknung durch Sorbitol besser gebunden werden kann als durch Saccharose. So ist zu folgern, daß der a_w -Wert der Pulver durch Sorbitol stärker erniedrigt wird als durch Saccharose. Eine Erniedrigung des a_w -Wertes bedeutet eine Verzögerung allgemeiner Abbaureaktionen durch Bakterien, einzellige Pilze und Enzyme. Dies kann die bessere Lagerstabilität gefriergetrockneter Thylakoide mit einem Zusatz von Sorbitol als Stabilisator gegenüber reiner Saccharose als Stabilisator erklären.

Eine Gefriertrocknung einzig mit Sorbitol als Stabilisator wäre ein lohnender, weiterführender Versuch bei einer Fortsetzung der Optimierung der Gefriertrocknung. Hierzu muß jedoch zunächst die exakte Kollapstemperatur einer Thylakoidsuspension mit Sorbitol wie oben angegeben bestimmt werden und möglicherweise technische Modifikationen an der Kühleinrichtung (Kryostat bis $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorgenommen werden, damit die richtige Plattentemperatur bei der Haupttrocknung eingestellt werden kann. Mit einer entsprechenden Veränderung des Gefriertrocknungsprozesses kann dann u.U. ein trockenes Produkt gewonnen werden; bei Lagerung und Handhabung muß jedoch berücksichtigt werden, daß Sorbitol hygroskopisch ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Thylakoidpräparat zu gewinnen, das stabiler als die native Suspension ist. In Abbildung 2-6 wird das Alterungsverhalten bei 25 °C der nativen Suspension dem der Thylakoidpulver (Stabilisator: Saccharose:Sorbitol 1:1) gegenübergestellt:

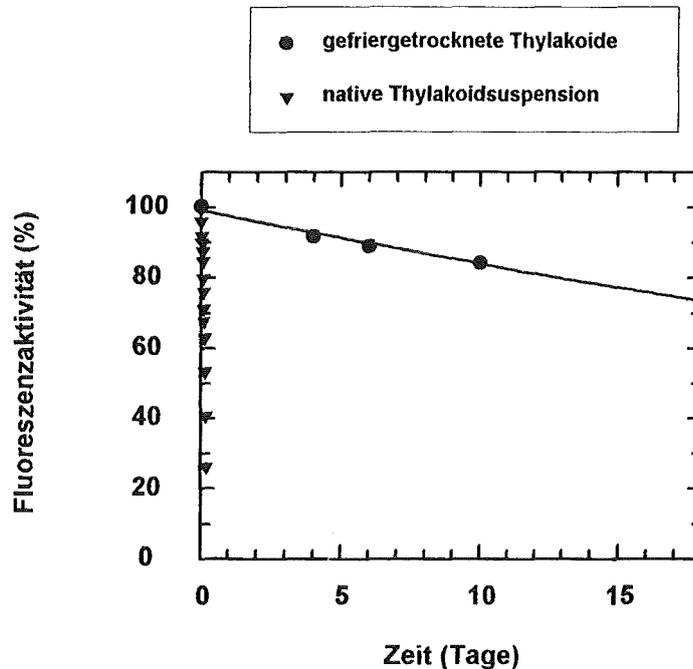


Abbildung 2-6: Alterungsverhalten bei 25 °C der nativen Suspension gegenüber gefriergetrockneten Thylakoiden; --Stabilisator bei der Gefriertrocknung: Saccharose:Sorbitol 1:1; --Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Die Alterung gefriergetrockneter Thylakoide ist enorm verzögert. Das Alterungsverhalten der gefriergetrockneten Thylakoide läßt sich mit einem einfach-exponentiellen Abfall beschreiben, wohingegen der Abfall der Fluoreszenzaktivität der nativen Suspension zunächst langsam, und anschließend beschleunigt verläuft (vergl. auch Kapitel III.1. Aktivität nativer Thylakoide). Durch die optimierte Gefriertrocknung wird also ein Thylakoidpräparat gewonnen, das wesentlich stabiler als die native Suspension ist, gut resuspendiert und bei 25 °C im Dunkeln aufbewahrt werden kann.

Eine weitere Verzögerung der Alterung ist durch Aufbewahrung dieser Pulver im Kühlschrank zu erreichen (Abbildung 2-7):

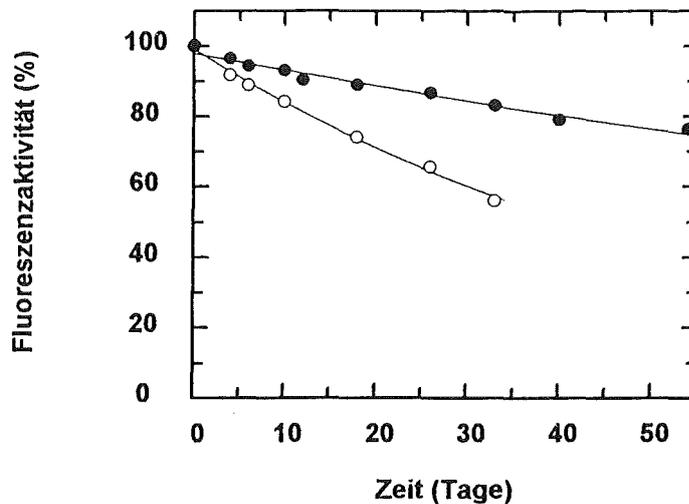


Abbildung 2-7: Alterung gefriergetrockneter Thylakoide bei Lagerung bei 4 °C (ausgefüllte Kreise) im Vergleich zur Alterung bei Lagerung bei 25 °C; --Stabilisator bei der Gefriertrocknung: Saccharose:Sorbitol 1:1; --Aktivität bestimmt über das Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Dies läßt darauf schließen, daß trotz des Wasserentzugs bei 25 °C im Pulver immer noch Abbaureaktionen möglich sind, die durch Lagerung bei tieferen Temperaturen verzögert werden können.

III.2.3.4. Stabilisierung durch Ersatz des Wasserspaltungssystems

Die Stabilisierung durch Ersatz des Wasserspaltungssystems wurde zunächst mit 1,5-Diphenylcarbaid (DPC) als künstlichem Elektronendonator erprobt. Die Aktivität der Thylakoide wurde mittels DCPIP-Messung bestimmt (Abbildung 2-8; Signal 3), dann wurden sie mit TRIS-Puffer gewaschen (Entfernen des Wasserspaltungssystems) und die Inaktivierung überprüft (Abbildung 2-8; Signal 1). Nach Zugabe von 0.5 mM DPC wurde gemessen, inwieweit die Aktivität der Thylakoide wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 2-8; Signal 2):

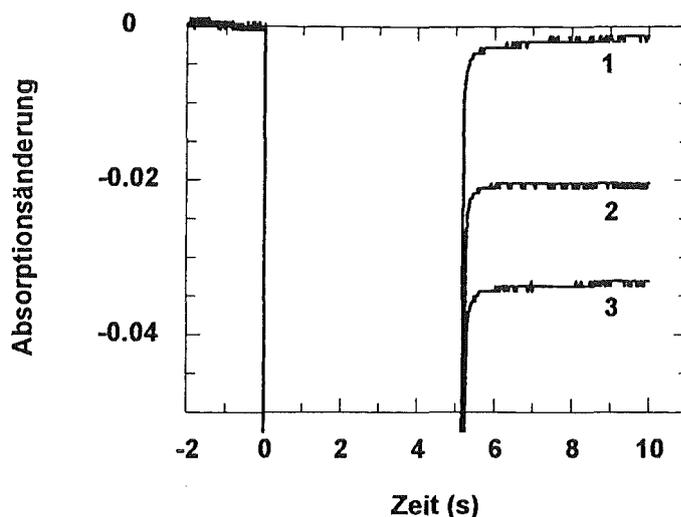


Abbildung 2-8: Wiederherstellung der Aktivität mit DPC - DCPIP-Messung; 1 Kontrolle (Tris-gewaschene Thylakoide); – 2 Tris-gewaschene Thylakoide nach Zusatz von DPC; –3 native Thylakoide mit Wasserspaltungssystem;

korrelierbare Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl und h}$:

1 Kontrolle:	10
2 Tris-g. Thylakoide mit DPC:	73
3 native Thylakoide:	119

–Beschreibung der Meßsignale: (-2...0) s: Absorption von DCPIP vor Anschalten des Anregungslichtes (gleich Null gesetzt); bei 0 s: Anschalten des Anregungslichtes für die Thylakoide (Detektorsignal schlägt an); (0...5) s: Dauer der Anregung der Thylakoide; > 5s: Nach Ausschalten des Anregungslichtes zeigt sich eine verminderte Absorption, das heißt, eine Abnahme der DCPIP-Konzentration durch Reduktion von DCPIP ($\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$) zu DCPIPH₂ (farblos); –die Aktivität der Thylakoide ergibt sich aus der Absorptionsänderung: je größer der Absolutwert der Absorptionsänderung, desto größer die Reduktionsfähigkeit der Thylakoide; –Ablesen der Meßwerte und mathematische Korrelation mit der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden

Aus Abbildung 2-8 ist ersichtlich, daß TRIS-gewaschene Thylakoide praktisch nicht mehr aktiv sind. Die Änderung der Absorption ist sehr gering und kann mit einem sehr geringen Sauerstoffverbrauch korreliert werden. Nach Zugabe von DPC konnte mit den rekonstruierten Thylakoide 60% der Ausgangsaktivität der intakten Thylakoide wieder erreicht werden. Entsprechend der Literatur (*Vernon et al., 1969*) ist es also möglich, TRIS-gewaschene Thylakoide mit DPC wiederzubeleben.

Vernon et al. (1969) haben gezeigt, daß dieses System ein pH-Optimum von pH 6,4 aufweist. Für intakte Thylakoide (mit Wasserspaltungssystem) wurde ein optimaler pH-Bereich um pH 8 gefunden. Dies ist der Grund dafür, daß die „Kontrolle“ intakter Thylakoide in Abbildung 2-8 (Signal 3) nicht den idealen Wert für „sehr gute“ Thylakoide von 200 $\mu\text{mol O}_2$ pro mg Chlorophyll und Stunde erreicht.

In dem zu entwickelnden Biosensor sollen jedoch Fluoreszenzkinetiken ausgewertet werden. Die DCPIP-Messung zeigt, daß die Aktivität der Thylakoide nur zum Teil erhalten bleibt; es ist

daher möglich, daß die Fluoreszenzkinetik verändert ist. DPC kann unter Umständen neben der Reduktion auch andere Wechselwirkungen mit der Elektronentransportkette eingehen.

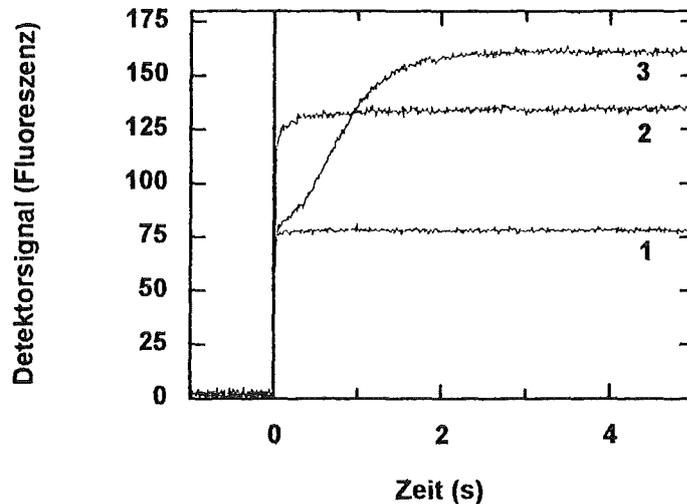


Abbildung 2-9: Wiederherstellung der Aktivität mit DPC - Fluoreszenzkinetik; --1 Kontrolle (Tris-gewaschene Thylakoide); --2 Tris-gewaschene Thylakoide nach Zusatz von DPC; --3 native Thylakoide mit Wasserspaltungssystem; --Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden;

Wie Abbildung 2-9 zeigt, ist die Fluoreszenzkinetik des rekonstruierten Systems deutlich verändert; es zeigt sich ein rascher Anstieg auf eine maximale Fluoreszenzintensität, die deutlich unter der unbehandelten Thylakoide liegt. Dieser rasche Anstieg auf F_{max} ist auch ein Charakteristikum einer herbizidischen Wirkung, also einer Blockade der Elektronentransportkette an der Q_B -Bindestelle des PS II. *Purcell et al. (1993)* haben festgestellt, daß DPC tatsächlich mit der Q_B -Bindestelle wechselwirkt und so beispielsweise die Wirkung von Herbiziden durch die zusätzliche Konkurrenz um die Bindestelle herabsetzt. Allerdings wird betont, daß der Elektronentransport durch die Kette kaum behindert sei.

Ungünstig ist außerdem die schlechte Wasserlöslichkeit und die Lichtempfindlichkeit von DPC. Aus diesen Gründen erweist sich das DPC-System nicht als geeignet zur Herbizidmessung über Fluoreszenzkinetiken, so daß sich die Untersuchung der Alterungsvorgänge erübrigt. Statt dessen wird Hydroxylamin als Elektronendonator erprobt (Abbildung 2-10), von dem berichtet wurde, daß es die Fluoreszenzintensität im Minutenbereich („steady state“) besonders gut wiederherstellen kann (*Yamashita et al., 1969*).

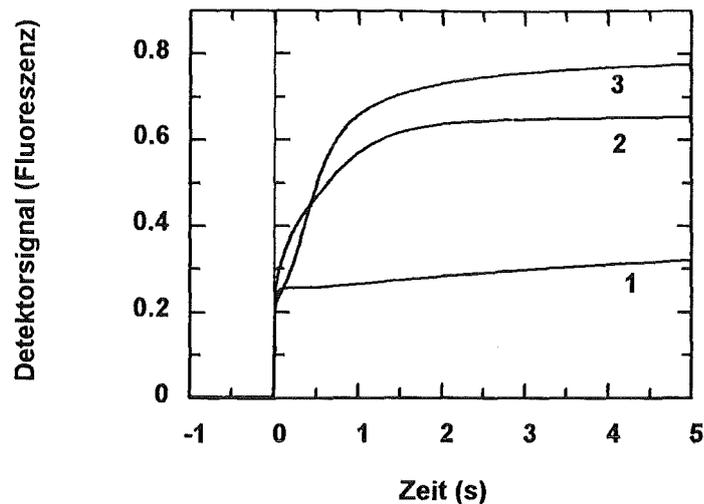


Abbildung 2-10: Wiederherstellung der Aktivität mit 3 mM Hydroxylamin; --1 Kontrolle (Tris-gewaschene Thylakoide); --2 Tris-gewaschene Thylakoide nach Zusatz von Hydroxylamin; --3 native Thylakoide mit Wasserspaltungssystem; ----Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden, mit 655 nm Diodenlaser/Neutralfilter (2,5 % Transmission) zur Anregung

Auch hier zeigt sich beim rekonstruierten System eine leichte Veränderung der ursprünglichen Kinetik, jedoch ist der verlangsamte Anstieg auf F_{max} deutlich zu erkennen. Er ist Voraussetzung für eine Detektion von Herbiziden, da dort der Anstieg sehr rasch erfolgt. In Abbildung 2-11 ist die Reaktion des rekonstruierten Systems mit 1 $\mu\text{g/l}$ Diuron dargestellt (Referenzmessung gegen das rekonstruierte System ohne Herbizidzusatz und Differenzbildung):

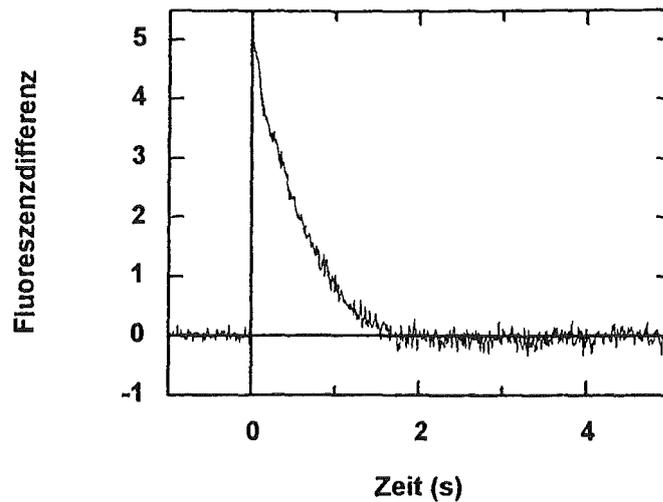


Abbildung 2-11: Reaktion des mit 3 mM Hydroxylamin rekonstruierten Systems mit 1 $\mu\text{g/l}$ Diuron; Zugabe des Herbizides nach Justage und Aufnahme der Differenzkurve im Labormuster; Messung in Referenz zum rekonstruierten System ohne Herbizidzusatz; Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung der miniaturisierten Meßmethode“

Nach Wiederbelebung mit Hydroxylamin ist eine Herbizidmessung möglich. Die Höhe des Signals für 1 $\mu\text{g/l}$ Diuron entspricht dem Wert, der mit nativen Thylakoiden erreicht wird (vergleiche Kapitel III.7. Charakterisierung des Meßsystems).

Ziel dieser Versuche war, ein bei 25 °C stabileres Präparat als die native Suspension zu gewinnen. Die TRIS-gewaschene Thylakoidsuspension wurde im Dunkeln bei 25 °C aufbewahrt, zum jeweiligen Zeitpunkt ein Teil der Thylakoide entnommen und mit einer frischen Hydroxylamin-Lösung versetzt. Die Veränderung der Fluoreszenzkinetiken mit der Zeit wurden beobachtet und mit der nativen Suspension verglichen (Abbildung 2-12).

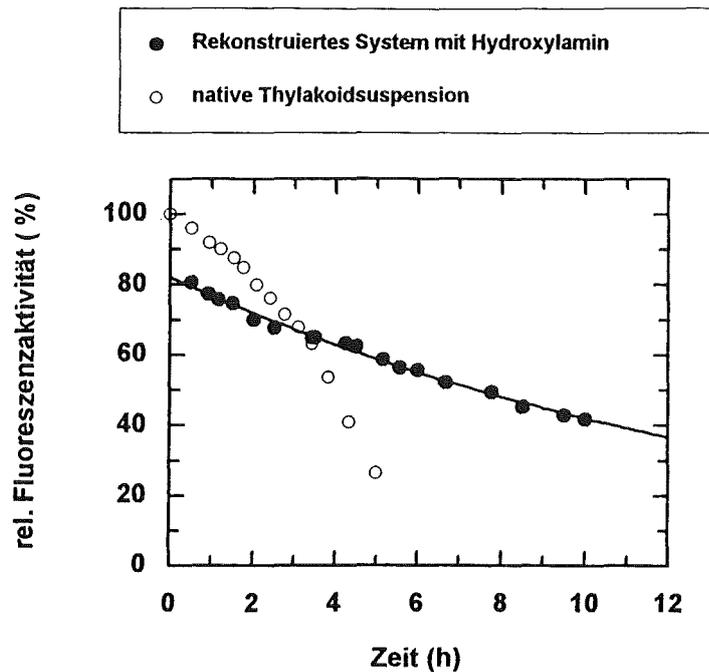


Abbildung 2-12: Alterung von Thylakoiden ohne Wasserspaltungssystem im Vergleich zur Alterung nativer Thylakoide bei 25 °C; --Wiederherstellung der Aktivität Tris-gewaschener Thylakoide durch Zusatz von 3 mM Hydroxylamin (resultierende Konzentration in der Küvette); --Aktivität aus dem Verhältnis F_{min}/F_{max} berechnet als Fluoreszenzaktivität wie im Standardverfahren für native Thylakoide; Messung über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Die Aktivität bezieht sich in Abbildung 2-12 jeweils auf die Anfangsaktivität nativer, unveränderter Thylakoide, um nicht nur die Effekte der Alterung beurteilen zu können, sondern auch den Vergleich der Aktivitäten bei einem bestimmten Zeitpunkt zu ermöglichen. Dies ist bedeutend für die Beurteilung der Brauchbarkeit des Systems für eine Biosensor.

Es zeigt sich, daß Thylakoide ohne Wasserspaltungssystem („TRIS-gewaschene Thylakoide“) langsamer altern, als Thylakoide mit Wasserspaltungssystem. Dies bestätigt, daß es sich beim Wasserspaltungssystem um ein empfindliches System der Elektronentransportkette handelt. Allerdings wird ersichtlich, daß die Veränderung des Wasserspaltungssystems mit der Zeit nicht der einzige Mechanismus ist, der bei der Alterung von Thylakoiden eine Rolle spielt.

Da nur die Thylakoide einem Alterungsprozeß unterworfen waren, und alle anderen Lösungen, insbesondere die Hydroxylaminlösung, jeweils frisch bereiteten wurden, muß der verbleibende, als einfach-exponentieller Abfall beschriebene Aktivitätsabfall auf Alterungsreaktionen der Thylakoide zurückgeführt werden. Dieser Aktivitätsabfall verläuft zwar langsamer, als bei der nativen Suspension, insofern ist das gestellte Ziel erreicht worden. Jedoch ist der Aktivitätsverlust innerhalb von Stunden noch immer groß und die Stabilisierung damit nur gering.

III.2.4. Schlußfolgerungen

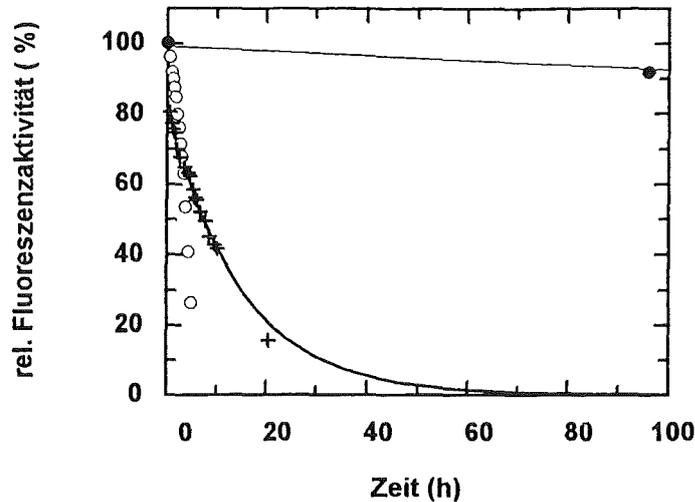


Abbildung 2-13: Vergleich zweier verschiedener Stabilisierungsmethoden und Alterung nativer Thylakoide bei 25 °C; --ausgefüllte Kreise: Alterung gefriergetrockneter Thylakoide (Ausschnitt Fluoreszenzmessung nach Resuspension); --Kreuze: Alterung von Thylakoiden ohne Wasserspaltungssystem nach Rekonstruktion mit 3 mM Hydroxylamin; --leere Kreise: Alterung der nativen Suspension; ---Aktivität jeweils bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Sowohl durch die Gefriertrocknung als auch durch den Ersatz des Wasserspaltungssystems mit Hydroxylamin werden die Rezeptoren gegenüber der nativen Thylakoidsuspension stabilisiert. Aus dem Vergleich beider Versuche (Abbildung 2-13) ergibt sich, daß die Gefriertrocknung dabei eine deutliche bessere Stabilisierung bewirkt als der Ersatz des Wasserspaltungssystems. Die Verzögerung der Alterung durch die Gefriertrocknung ist enorm.

Für einen Biosensor stehen durch die Optimierung der Gefriertrocknung wesentlich stabilere Thylakoide zur Verfügung, als es bislang der Fall war. Die Gewinnung von biologischem Material der angegebenen Qualität und Stabilität ist standardisiert möglich.

Bemerkung

In den Vorversuchen zur Gefriertrocknungsoptimierung wurden naturgemäß schwankende Ergebnisse für Aktivität und Stabilität erzielt, die generell schlechter waren als nach der Optimierung.

Einmal gelang es jedoch, ein Pulver zu präparieren, das zwar nur 80 % der Aktivität vor der Gefriertrocknung aufwies, jedoch nach zwanzig Tagen noch eine Restaktivität von 72 % (bezogen auf die Aktivität vor der Gefriertrocknung) zeigte und damit sehr langsam alterte.

Dieser Ausreißer im positiven Sinn war aufgrund des zu diesem Zeitpunkt noch schwer kontrollierbaren Ablaufes der Gefriertrocknung nicht reproduzierbar; er zeigt jedoch, daß durch eine weitere intensive Optimierung des Verfahrens möglicherweise eine noch größere Stabilität der Pulver erreicht werden könnte. Technische Voraussetzung hierfür ist insbesondere die Möglichkeit der exakten Bestimmung der Kollapstemperatur durch thermische Analysenverfahren (wie oben beschrieben).

III.3. Immobilisierung von Thylakoiden

III.3.1. Motivation und Ziele

Mit der Immobilisierung von Thylakoiden ergeben sich prinzipiell folgende Vorteile für einen Biosensor:

Geometrie

Die fluoreszierenden Rezeptoren werden in optimaler Geometrie bezüglich des Anregungslichtes und vor oder auf dem Detektor immobilisiert. Sie müssen nicht in der Probe suspendiert werden und können in der Suspension weder sedimentieren, noch sich während der Messung durch äußere Erschütterungen oder thermisch induziert bewegen. Dies bedeutet theoretisch eine bessere Reproduzierbarkeit der Messung.

Stabilisierung

Ein großer Vorteil der Immobilisierung kann die Verbesserung der Betriebsstabilität der Rezeptoren sein. Für Enzyme und andere biologische Materialien wurde eine Stabilisierung durch Immobilisierung beobachtet (*Braun*).

Anreicherung in Matrix und Membranen

In den Polymermatrices kann eine Anreicherung des Analyten und daraus resultierend eine Verbesserung der Empfindlichkeit der Messung erreicht werden. Eine Anreicherung von lipophilen Herbiziden in den Lipidmembranen der Thylakoide ist vorstellbar und kann so genutzt werden.

Dauerüberwachung

Für eine Dauerüberwachung ist die Immobilisierung oder Retention der Thylakoide Voraussetzung. Durch die äußerst langsame Rückreaktion der Herbizidbindung bedingt durch die hohe Bindekonstante der Herbizide muß die Rezeptorschicht jedoch bei jedem „Alarm“ ausgewechselt werden.

Einmal-Tauchsonde

Prinzipielle Voraussetzung für eine Einmal-Tauchsonde ist die Immobilisierung der Rezeptoren, oder zumindest ihre Retention beispielsweise in Dialyseschläuchen, und die Präparation einer Rezeptorschicht, die ausgetauscht werden kann.

Die Immobilisierung ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn sie die Aktivität der Biomoleküle nicht verändert, die Stabilität der immobilisierten Thylakoide vergleichbar ist mit gefriergetrockneten

Thylakoiden und die Handhabbarkeit des Biosensors im Ganzen nicht beeinträchtigt wird (beispielsweise durch Verlängerung der Ansprechzeiten).

In diesem Kapitel soll geklärt werden, ob Thylakoide ohne Veränderung der Fluoreszenzkinetiken in optisch homogene Matrices immobilisiert werden können.

III.3.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

An die Polymermatrix werden folgende Anforderungen gestellt:

1. Zurückhalten der Thylakoide in der Matrix
2. Erhalt der biologischen Aktivität der Biomoleküle während der Präparation
3. Optisch homogene und klare, möglichst luftblasenfreie Gele für optische Messungen
4. Chemische und mechanische Stabilität über einen längeren Zeitraum
5. Genügend schnelle Diffusion des Analyten durch die Polymermatrix zum Akzeptor
6. Stabilität auch bei tiefen Temperaturen, Erhalt der Struktur nach dem Auftauen

In Vorversuchen (*Brauer, 1992*) wurden Immobilisierungen in verschiedenen Polymeren erprobt. Hierbei zeigte sich, daß die Thylakoide äußerst empfindlich bei Polymerisierungsvorgängen reagieren, bei denen Radikale, erhöhte Temperaturen oder aggressive Monomere beteiligt sind.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt nach Immobilisierungsverfahren gesucht, die unter besonders milden Bedingungen ablaufen, und gleichzeitig Matrices ergeben, die die oben genannten Eigenschaften erfüllen. Erprobt wurde die Immobilisierung in PAAH-Polymere (Polyacrylamid-hydrazid-Polymere) durch Vernetzung von linearen PAAH-Polymerkettens und die Immobilisierung mit Hilfe des Sol/Gel-Prozesses.

Ob eine erhöhte Empfindlichkeit durch Anreicherung in den Thylakoiden selbst erreicht werden kann, läßt sich durch Dialyse testen. Hierbei werden Thylakoide in Dialyseschläuchen zurückgehalten und mit einem großen Volumen der Probe über einen längeren Zeitraum in Kontakt gebracht.

III.3.3. Ergebnisse und Diskussion

III.3.3.1. Immobilisierung in Polyacrylamidhydrazid-Polymere

Um die guten optischen und mechanischen Eigenschaften von Polyacrylamid-Polymeren zu erzielen, die Thylakoide jedoch keiner radikalischen Reaktion aussetzen zu müssen, wird in

dieser Arbeit eine Vernetzung von linearen Polyacrylamid-Hydrazid-Ketten durch Polykondensation mit bifunktionellen Aldehyden und Ketonen als eine möglichst 'schonende' Präparationsmethode erprobt (*Freeman, 1981*).

Auswahl der Vernetzermoleküle

Der in der Literatur vorgeschlagene Vernetzer für lineare PAAH-Ketten, Glyoxal, erwies sich als äußerst reaktiv. Durch eine Reaktionsgeschwindigkeit im Sekundenbereich ist es nicht möglich, optisch homogene Polymeregele zu erhalten. Zur Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden pH-Wert (pH 6-pH 8) und Temperatur in den für die Biomoleküle möglichen Grenzen variiert, ohne die Reaktion deutlich verzögern zu können. Eine Verminderung der Konzentration der Vernetzer beeinflusst außer der Reaktionsgeschwindigkeit die Struktur der Gele (Vernetzungsgrad) und ist daher zur selektive Steuerung der Reaktionsgeschwindigkeit nur bedingt geeignet.

Daher werden andere Vernetzermoleküle anhand chemisch-struktureller Überlegungen ausgewählt, die deutlich langsamer mit den funktionellen Gruppen der linearen Ketten reagieren sollten.

Prinzip der Reaktion:

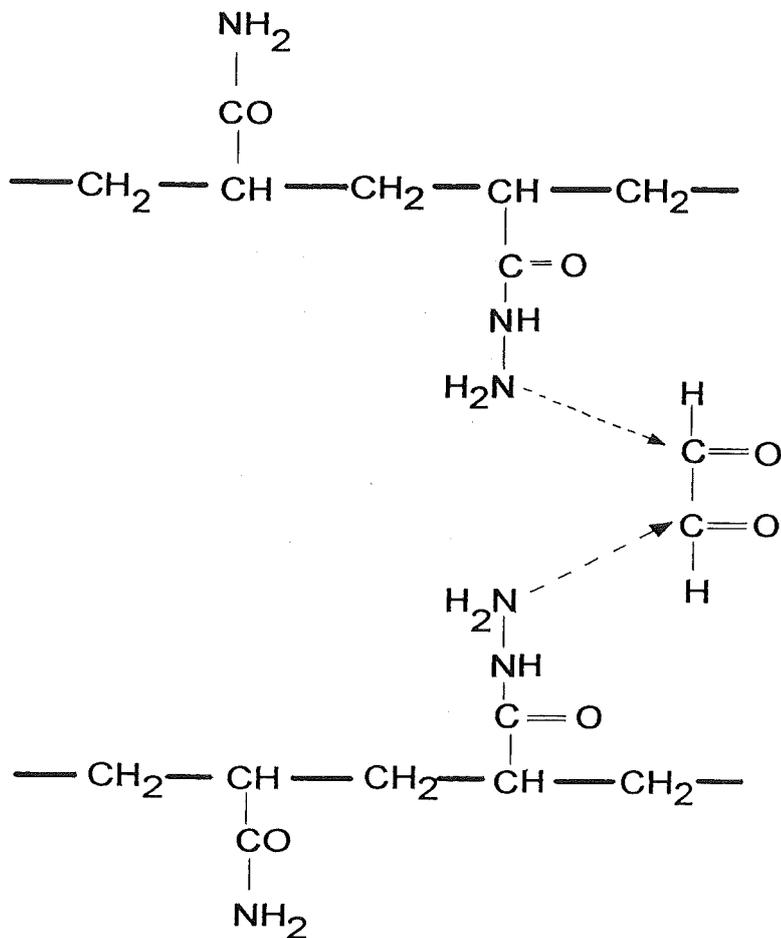


Abbildung 3-1: Reaktionsschema der Vernetzung von linearen Polyacrylamid-Hydrazid-Ketten durch Polykondensation mit bifunktionellen Aldehyden und Ketonen

Wie in Abbildung 3-1 gezeigt, handelt es sich um eine nucleophile Addition, der sich ein Eliminierungsschritt (hier von Wasser) anschließt. Bei einer Additions-Eliminierungsreaktion schwächerer Nucleophile wird über den pH-Wert bestimmt, welcher Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, die Addition oder die sich anschließende Eliminierung; die Reaktionsgeschwindigkeit durchläuft bei einem optimalen pH-Wert ein Maximum (Sykes, 1986).

Hier ging es jedoch darum, die Gelbildung hinauszuzögern, um die Thylakoide homogen in der Mischung verteilen zu können. Es ist zu erwarten, daß für die Bildung einer gelartigen Matrix die Geschwindigkeit des Additionsschrittes der Vernetzer an die linearen PAAH-Polymerketten entscheidend ist, denn hierdurch wird bereits das Polymernetz aufgebaut. Die Geschwindigkeit der Abspaltung von Wasser (Eliminierungsschritt) ist damit für diese verfahrenstechnische Verbesserung zunächst zweitrangig.

Gemäß *Sykes (1986)* ist bei einfachen nucleophilen Additionsreaktionen, deren geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Angriff des Nucleophils ist, zu erwarten, daß die Additions geschwindigkeit durch elektronenliefernde Substituenten am Carbonylkohlenstoff verkleinert wird. Zudem sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit mit wachsendem Raumbedarf der Reste. So hat die beobachtete Reaktionsfolge $\text{H}_2\text{C}=\text{O} > \text{RHC}=\text{O} > \text{R}_2\text{C}=\text{O}$ elektronische und sterische Ursachen.

Entsprechend diesen Erkenntnissen werden statt Glyoxal zwei Diketone als Vernetzer eingesetzt, Acetylaceton und Acetonylaceton, und getestet, ob sich bei sonst konstanten Bedingungen die Gelbildungsgeschwindigkeit dadurch deutlich verringern läßt.

Vernetzer für lineare PAAH-Ketten:

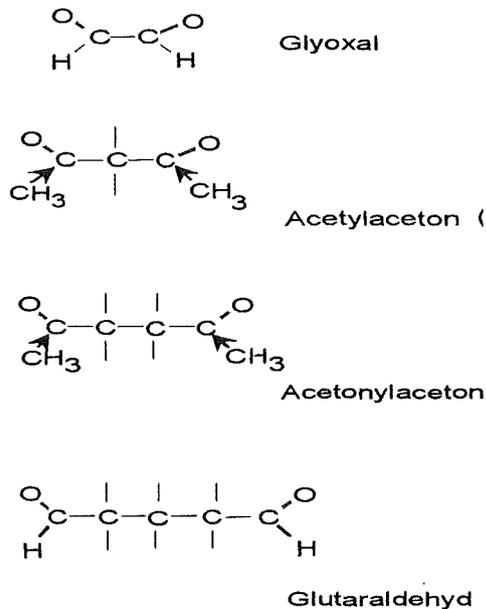


Abbildung 3-2: Vernetzer für lineare PAAH-Ketten; --Der +I-Effekt der Alkylgruppen und sterische Effekte durch größere Kettenlänge unterscheidet die neuen Vernetzer Acetylaceton und Acetonylaceton von Glyoxal (Ergebnisse siehe Tabelle 3-1); --Glutaraldehyd wurde ausgewählt, da es Thylakoide stabilisieren kann (Ergebnisse siehe Tabelle 3-2).

Optisch homogene Gele durch Variation der Vernetzer

	Glyoxal	Acetylaceton*	Acetonylaceton
Reaktionsdauer	Sekunden	> 3 Tage	1 Stunde
mechanische Eigenschaften	formstabil	-	formstabil
	Schrumpfung		Schrumpfung
optische Eigenschaften	inhomogen	-	homogen
Fluoreszenzkinetik	nicht meßbar	-	Aktivität: 52 %

*Gelbildung stark verzögert; mögliche Nebenreaktion zum 1-Polyacrylamid-3,5-Dimethyl-Pyrazol (Absättigung der Seitenketten des linearen Ketten durch Ringschluß)

Tabelle 3-1: Variation der Vernetzer für lineare PAAH-Ketten; --Präparationstemperatur: 4°C; --Bedingungen und Durchführung der Präparation siehe Kapitel VI: Materialien und Methoden; --Aktivität als Fluoreszenzaktivität bezüglich der Aktivität der Thylakoide vor der Präparation; ----Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Die Tabelle zeigt, daß es durch Variation der Vernetzermoleküle gelingt, die Reaktionsgeschwindigkeit zu verlangsamen; mit Acetonylaceton wird ein stabiles und optisch homogenes Gel präpariert. Jedoch beträgt die Fluoreszenzaktivität nach der Präparation nur noch 52 % der Anfangsaktivität. Innerhalb einer Stunde, die zur Präparation dieses Gels benötigt wird, altern native Thylakoide im Kühlschrank jedoch kaum. Untersuchungen des Verhaltens der Thylakoide in den zur Präparation verwendeten Lösungen ergeben, daß insbesondere die Vernetzermoleküle (Dialdehyde, Diketone) die Thylakoide beeinflussen und die Fluoreszenzkinetiken verändern. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Wechselwirkung zwischen Proteinen in den Thylakoidmembranen (Aminosäureresten) und den Carbonylfunktionen der Vernetzer.

Erhalt der Aktivität während der Immobilisierung in PAAH-Gele

Auswahl des Vernetzers

Glutaraldehyd gilt in der Photosyntheseforschung als Stabilisator für Thylakoide gegen bestimmte Einflüsse chemischer (Angriff auf das Wasserspaltungssystem) und physikalischer Art (Erhitzen). Zwar wird mit steigender Glutaraldehyd-Konzentration auch der Elektronentransport beeinflusst. Jedoch wird vermutet, daß Glutaraldehyd die Mikrostruktur der Thylakoide durch Vernetzen der Lysinreste von Proteinen fixiert, und so die Thylakoide vor starken Konformationsänderungen schützt (*Zilinskas et al., 1976*).

Glutaraldehyd weist zwei Carbonylfunktionen auf, welche theoretisch mit den Hydrazidresten der lineare PAAH-Ketten wie in Abbildung 3-1 gezeigt (Nukleophiler Angriff / Add.-Elim.-Rkt.) reagieren können. Da es außerdem Thylakoide zu stabilisieren vermag, erschien es

aussichtsreich, Glutaraldehyd als Vernetzer für lineare PAAH-Polymerketten zu verwenden und die Auswirkungen der Immobilisierung in diesem Polymer auf die Fluoreszenzkinetiken zu beobachten.

	Glutaraldehyd	Glutaraldehyd mit Glycerin
Dauer	< 1 min	5 min
mechan. Eigenschaften	formstabil Schrumpfung	stabil, zäh Schrumpfung
optische Eigenschaften	leicht inhomogen	homogen
Fluoreszenzaktivität	88 %	96 %

Tabelle 3-2: Glutaraldehyd als Vernetzer für lineare PAAH-Ketten; --Präparationstemperatur: 4°C; --Bedingungen und Durchführung der Präparation siehe Kapitel VI: Materialien und Methoden; --Aktivität als Fluoreszenzaktivität bezüglich der Aktivität der Thylakoide vor der Präparation; ---Aktivität bestimmt über Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

PAAH-Glutaraldehyd-Gele wurden synthetisiert und vermessen (Tabelle 3-2). Die Aktivität der Thylakoide bleibt während der Präparation dieses speziellen Gels wesentlich besser erhalten als bei den bisher erprobten Präparationen. Dies wird auf die Verwendung des Vernetzers Glutaraldehyd zurückgeführt.

Allerdings können die Thylakoide durch die hohe Reaktionsgeschwindigkeit (zurückzuführen auf die Verwendung eines *Dialdehydes*) nicht vollkommen homogen in dem Gel verteilt werden. Zudem weist das Gel keinerlei Gefrierstabilität auf.

Um diese Nachteile auszugleichen, wird bei der Präparation Glycerin zugemischt. Glycerin ist durch drei Hydroxylgruppen im Molekül in der Lage, Wasser über Wasserstoffbrückenbindung zu binden, wodurch die Gefrierstabilität des Gels wesentlich verbessert wird. Zudem wird die Reaktion durch den Zusatz von Glycerin leicht verlangsamt (Erhöhung der Viskosität, Verdünnungseffekt). Dieser geringe Effekt (Dauer der Reaktion ca. 5 min) genügt, um ein ausreichend homogenes PAAH-Glutaraldehydgel mit Glycerin zu erhalten. Die Fluoreszenzkinetik immobilisierter Thylakoide in diesen Gelen ist in Abbildung 3-3 dargestellt:

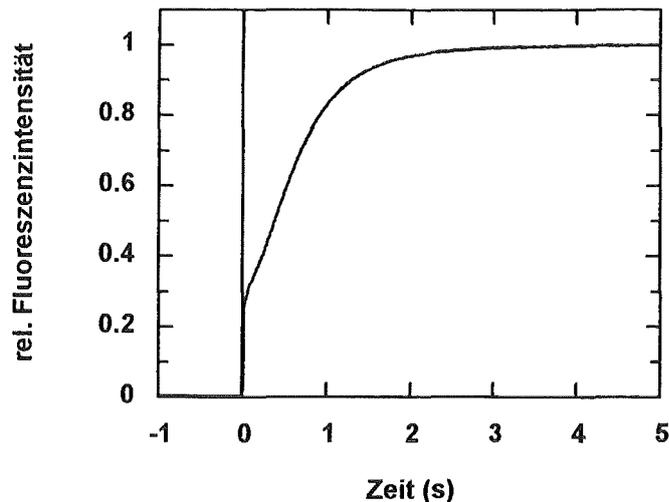


Abbildung 3-3: Kinetik immobilisierter Thylakoide in PAAH-Glutaraldehyd-Gele mit Glycerin;
 -- Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden; Man erkennt eine gegenüber nativen Thylakoiden praktisch unveränderte Fluoreszenzkinetik

Die Aktivität der Thylakoide bleibt in diesem Gel praktisch unverändert. Die Verbesserung von 88% auf 96% Aktivität durch die Zugabe von Glycerin ist durch einen Verdünnungseffekt des Vernetzers oder eine Schutzfunktion des Glycerins zu erklären. Die mechanische Stabilität des Gels ist durch den Verdünnungseffekt wie erwartet gegenüber den anderen präparierten PAAH-Gelen herabgesetzt.

Eine Verlängerung der Lagerdauer immobilisierter Thylakoide kann nicht beobachtet werden. Jedoch ist eine Immobilisierungsmethode für Thylakoide gefunden worden, welche die biologische Einsatzfähigkeit der Biomoleküle erhält und es ermöglicht, das Gel bei tiefen Temperaturen zu lagern.

III.3.3.2. Immobilisierung durch den Sol/Gel-Prozeß

In der Literatur (*Braun et al. 1994*) wird berichtet, daß Enzyme durch Immobilisierung mit Hilfe des Sol/Gel-Prozesses stabilisiert werden konnten. Die Stabilisierung wird darauf zurückgeführt, daß Konformationsänderungen durch die starre Matrix verhindert werden. Die porösen Gläser weisen außerdem sehr gute mechanische und optische Eigenschaften auf. Der Sol-Gel-Übergang kann bei tiefen Temperaturen ablaufen; er eignet sich für die Immobilisierung empfindlicher Moleküle - vorausgesetzt, es gelingt, die Reaktionen mit freigesetztem Methanol zu minimieren. Die Aktivität von Thylakoiden wird durch Alkohole beeinträchtigt (siehe unter Kapitel III.7 Charakterisierung). Dies muß bei der Verfahrensführung berücksichtigt werden.

Sol-Gel-Reaktion: (mit R = Methyl-) (Brinker et al., 1990)

1. Hydrolyse:



Die Vollständigkeit der Hydrolyse des Si(OR)_4 ist abhängig von dem Gehalt an Wasser und Katalysatoren in der Mischung

2. Kondensationsreaktion (Beispiel):



Ketten und Ringbildung verlaufen nach dem gleichen Prinzip

Die Aktivität der Thylakoide kann nur unter folgenden Voraussetzungen erhalten werden:

1. Sehr großes Oberflächen/Volumenverhältnis während des Prozesses
(Oberfläche/Volumen: 5 cm^{-1} ; Schichtdicke 0,2 cm)
2. Vormischung von Suspensionspuffer und Tetramethoxysilan ohne Thylakoide auf Eis
3. Reproduzierbarkeit des Gelierungsmomentes

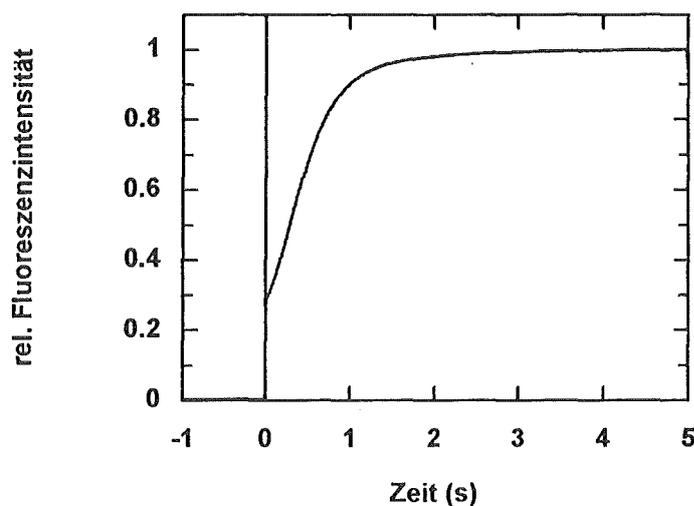


Abbildung 3-4: Fluoreszenzkinetik von Thylakoiden nach Immobilisierung durch den Sol/Gel-Prozeß; Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden

Die Fluoreszenzkinetik wird durch die Präparation nicht verändert. Durch die Modifikation des Sol-Gel-Prozesses gelingt es, den Einfluß von Methanol zurückzudrängen. Durch das hohe Oberflächen/Volumenverhältnis kann Methanol schnell aus der Reaktionsmischung verdampfen. Dies würde bei höheren Temperaturen zwar schneller verlaufen, jedoch kann dann der Moment der Bildung eines festen Gels schlecht reproduziert werden. Dieser Moment muß jedoch vorhersagbar sein, um die Thylakoide kurz zuvor zugeben zu können.

Hierzu wird der Sol/Gel-Prozeß auf Eis und ohne Thylakoide gestartet, 5 Minuten abgewartet, und anschließend die Lösung erwärmt; die Thylakoide werden zugegeben, wenn die Gelierung bereits einsetzt, aber noch so rechtzeitig, daß eine homogene Vermischung ohne die Bildung von Luftblasen möglich ist. Sobald sich ein Gel ausgebildet hat, wird es vorsichtig mit Puffer gespült.

Die Erhaltung der Aktivität der Thylakoide trotz der Freisetzung von Methanol während dieses Prozesses ist dadurch erklärbar, daß nach Modifizierung des Verfahrens der Hauptanteil des Methanols entfernt wird, bevor die Thylakoide zugegeben werden.

Die Gele wurden ständig unter Puffer aufbewahrt, um Schrumpfungsprozesse zu verhindern. Hierbei findet kein Austrag der Thylakoide statt. Eine Stabilisierung durch die Immobilisierung durch den Sol/Gel-Prozeß wurde nicht festgestellt.

III.3.3.3. Immobilisierung in einem Dialyseschlauch

Für einen Biosensor bietet die Immobilisierung in Dialyseschläuche wenig Vorteile gegenüber der direkten Verwendung der Suspension. Jedoch kann dieser Versuch Erkenntnisse liefern über die Effizienz einer Immobilisierung im allgemeinen: Durch Dialyse kann ohne die Matrixeinflüsse der anderen Immobilisierungsmethoden getestet werden, ob es möglich ist, Herbizide in den Thylakoidmembranen selbst anzureichern, und ob dies zu einer Erhöhung des Signals und damit zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze führt.

Um zu testen, ob sich Herbizide in den Thylakoidmembranen anreichern und ob dies zu einer Signalerhöhung führt, wurde die Suspension in Dialyseschläuche gefüllt und gegen 1 Liter Puffer mit Diuron dialysiert; Diuron zählt als Phenylharnstoffderivat zu den polaren Herbiziden und wurde ausgewählt, um herauszufinden, ob sich diese Herbizide überhaupt in Thylakoidmembranen anreichern.

Diese Versuche wurden bei 4°C durchgeführt, um Störungen durch Alterungsprozesse möglichst zurückzudrängen. Aus demselben Grund wurden Thylakoide ohne Dialyse in

Referenz mitgelagert, sowie gegen Puffer ohne Herbizidzusatz dialysiert (zur Durchführung der Versuche siehe detailliert unter Abschnitt VI. Materialien und Methoden).

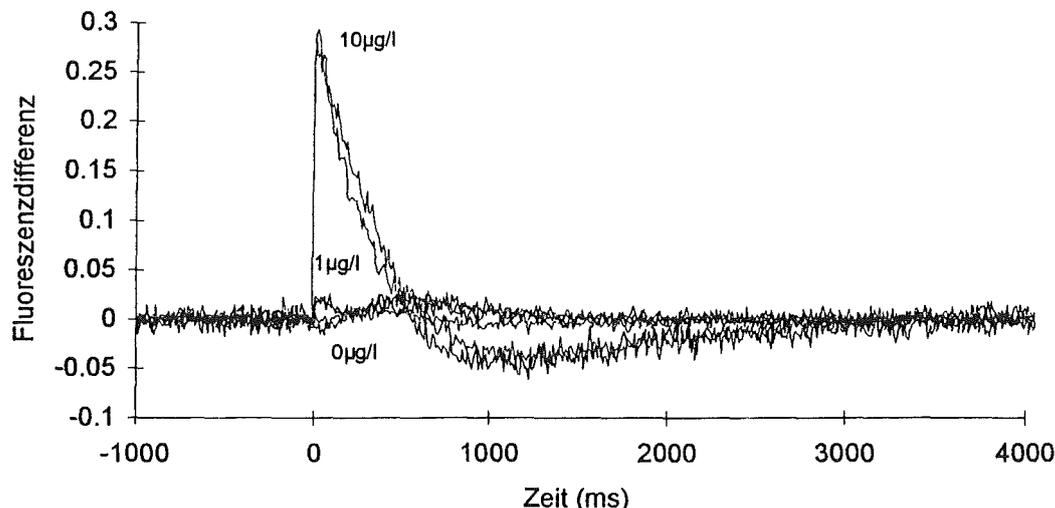


Abbildung 3-5: Ergebnis der Dialyseversuche für (0, 1, 10) $\mu\text{g/l}$ Diuron, jeweils zum Vergleich aufgetragen die nicht-dialysierte Probe; --Bedingungen und Durchführung der Dialyse siehe unter VI. Material und Methoden; --Messung in einer ersten Sensorversion S1/4; --Differenzkurven durch Referenzmessung zwischen herbizidbelasteter und unbelasteter Suspension; --aufgetragen ist die Zeit in ms gegen die Fluoreszenzdifferenz in Anteilen von F_{max} ; --die Signalhöhe wächst mit wachsender Herbizidkonzentration, jedoch erkennt man jeweils keinen Unterschied (im Rahmen der Meßgenauigkeit) zwischen den Herbizid-Differenzkurven der dialysierten Probe und den Herbizid-Differenzkurven der nicht-dialysierten Probe

Diese Messungen wurden mit einer ersten Sensorversion durchgeführt, in der Optik und Elektronik noch nicht vollständig optimiert waren, worauf das schlechtere Signal/Rausch-Verhältnis zurückzuführen ist. Auch mit dieser Sensorversion hätte jedoch ein praktisch relevanter Anreicherungseffekt detektiert werden können. Im Rahmen der Genauigkeit dieser Messungen ist für die drei getesteten Diuron-Konzentrationen kein Unterschied in der Signalhöhe im Vergleich zu nicht-dialysierten Proben erkennbar (Abbildung 3-5). Ein Anreicherungseffekt ist nicht zu beobachten.

Die Dialyse gegen 11 Probe verbessert damit nicht die Empfindlichkeit der Herbizidbestimmung.

Dies deutet darauf hin, daß Diuron nicht oder nur in geringem Maß in den Membranen angereichert wird, oder daß die Membranen bei geringen Probevolumina bereits mit Diuron gesättigt sind. Denkbar ist weiterhin, daß in den Membranen gelöste Herbizide nicht zu der aus der Membran herausreichenden Bindestelle am D1-Protein gelangen können, und daher eine mögliche Anreicherung nicht zu einer Erhöhung des Signals führt.

III.3.4. Schlußfolgerungen zur Immobilisierung für den zu entwickelnden Biosensor

Die Immobilisierung von Thylakoiden in optisch homogene PAAH-Glutaraldehyd-Glycerin-Gele (Aktivität 96%) und durch den Sol/Gel-Prozeß (Aktivität: 99%) ohne relevanten Aktivitätsverlust ist gelungen. Thylakoide können praktisch ohne Veränderung der Fluoreszenzkinetiken immobilisiert werden. Die Thylakoide werden bei beiden erprobten Methoden in der Matrix zurückgehalten. Der optimierte Aufbau der Durchlichtfluoreszenzmessung kann ohne weitere Modifikationen übernommen werden.

Eine Stabilisierung durch die Immobilisierung kann nicht erreicht werden. Die Thylakoide zwecks Dauerüberwachung mit diesen Methoden zu immobilisieren, ist daher nicht angezeigt.

Eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Herbizidbestimmung durch Anreicherung in den Thylakoidmembranen wird ebenfalls nicht beobachtet.

Bei der Umsetzung dieser grundlegenden Ergebnisse in die Praxis muß berücksichtigt werden, daß die Zugabe von Hilfschemikalien bei immobilisierten Thylakoiden nicht möglich ist, außer es gelingt, diese Hilfschemikalien ebenfalls in die Matrix einzubinden.

Die Immobilisierung kann für die Geometrie des optischen Aufbaus, eine evtl. Anreicherung in den Polymermatrices und für Einmaltauchsonden interessant sein; dies gilt jedoch nur, wenn durch die Immobilisierung eine Stabilisierung erreicht werden könnte, die mit der Stabilität von gefriergetrockneten Thylakoiden konkurrieren kann.

Da die verbleibenden Vorteile einer Immobilisierung die Nachteile nicht überwiegen, wird für das Funktionsmuster dieser Arbeit die Immobilisierung nicht angewandt. Statt dessen wird der guten Lagerstabilität gefriergetrockneter Thylakoide dahingehend Rechnung getragen, daß spezielle Einmalbehältnisse konzipiert werden, in denen die Thylakoide gelagert werden und in die die Wasserprobe pipettiert wird. Hierdurch wird erwartet, ein flexibleres, stabileres und leistungsfähigeres Analysensystem entwickeln zu können als unter Verwendung von immobilisierten Thylakoiden, auch wenn zur Handhabung ein Pipettierschritt notwendig wird. Für die Forschungsergebnisse ergibt sich der Vorteil, daß die grundsätzlichen Eigenschaften der Meßmethode an sich ohne zusätzliche Einflüsse durch die Polymermatrices studiert werden können, und Wirkbestimmungen für Herbizide objektiver möglich sind.

III.4. Verfahren zur beschleunigten Reoxidation

III.4.1. Motivation und Ziele

Vor jeder Messung müssen insbesondere die Primärakzeptoren des PS II, Q_A und der PQ-Pool möglichst vollständig oxidiert sein, um die Kinetik einer unblockierten Elektronentransportkette zu erhalten. Konventionell wird das dadurch erreicht, daß man im Dunkeln abwartet, bis diese Akzeptoren direkt durch gelösten Sauerstoff oxidiert wurden („einfache Dunkeladaption“). Die Dauer der Reoxidation beträgt dann 5-10 Minuten. Da diese Wartezeit der Dunkeladaption im Vergleich zum Aktivitätsverlust der Thylakoide in Suspension bei 25 °C relativ lang ist, muß bei der einfachen Dunkeladaption damit gerechnet werden, daß Alterungsprozesse die Kinetiken und die Reproduzierbarkeit der Messung beeinflussen können.

Für eine hohe Meßgenauigkeit ist es allerdings erforderlich, einen definierten und reproduzierbaren Ausgangszustand der Thylakoide herzustellen; dies kann durch ein geeignetes Reoxidationsverfahren und durch die Verkürzung der Reoxidation an sich erreicht werden.

Die Vorteile einer Beschleunigung der Reoxidation für die Messung mit dem zu entwickelnden Biosensor liegen auf der Hand: Die Analysendauer wird bislang von der Reoxidationszeit bestimmt, so daß eine schnelle Reoxidation eine deutliche Verkürzung der Gesamtanalysendauer bedeuten wird.

In diesem Kapitel wird gezeigt, wie die Reoxidationszeit auf wenige Sekunden verkürzt werden kann.

III.4.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

Um die Dauer der Reoxidation zu verkürzen, werden zwei prinzipiell verschiedene Methoden konzipiert: Die beschleunigte Reoxidation mittels Licht und die Beschleunigung der Reoxidation mittels externen chemischen Oxidationsmitteln, hier Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung.

Die Geschwindigkeit dieser Reoxidationsmethoden wird mit der der einfachen Dunkeladaption verglichen.

Reoxidation mit Licht

Das Verfahren der lichtgetriebenen Reoxidation soll sich die Charakteristika der photosynthetischen Elektronentransportkette zunutze machen. Im Anschluß an die zu oxidierenden Redoxsysteme (Q_A , PQ-Pool) befindet sich das dimere Chlorophyllmolekül

Cytochrom bf-Komplex Elektronen aus dem PQ-Pool ab. Bei Wahl einer optimalen Anregungswellenlänge für PS I werden die Elektronen schneller aus dem PQ-Pool abgezogen als Elektronen von PS II nachgeliefert werden können; daraus resultiert eine Oxidation des PQ-Pools, der seinerseits Q_B bzw. Q_A oxidiert.

Auf der Akzeptorseite von PS I kann je nach Präparation Ferredoxin verbleiben (*Shahak et al., 1980*). Ferredoxin übernimmt die von PS I gelieferten Elektronen und wird sehr schnell durch Sauerstoff wieder oxidiert (*Tagawa et al., 1963*).

Beschleunigung der Reoxidation durch Zugabe von Oxidationsmitteln

Man kann sich die Frage stellen, ob es nicht auch möglich ist, die reduzierten Chinone durch Zugabe eines geeigneten Oxidationsmittels chemisch zu re-oxidieren. Bei der Hill-Reaktion (siehe Einleitung) wird prinzipiell genau das getan, allerdings mit einer anderen Intention: Die Zugabe von Oxidationsmitteln für Q_B^- dient hier dazu, *während der Belichtung* die Elektronen aus der Elektronentransportkette auszuschleusen. So kann beispielsweise die Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette bis Q_B mittels Sauerstoffmessung überprüft werden. Als Oxidationsmittel wird hierbei häufig Kaliumhexacyanoferrat-III verwendet (*Tevini, 1985*).

Die Oxidation von Q_B^- wird entsprechend auch im Dunkeln ablaufen und könnte so bewirken, daß die Reoxidation beschleunigt wird (siehe Abbildung 4-2).

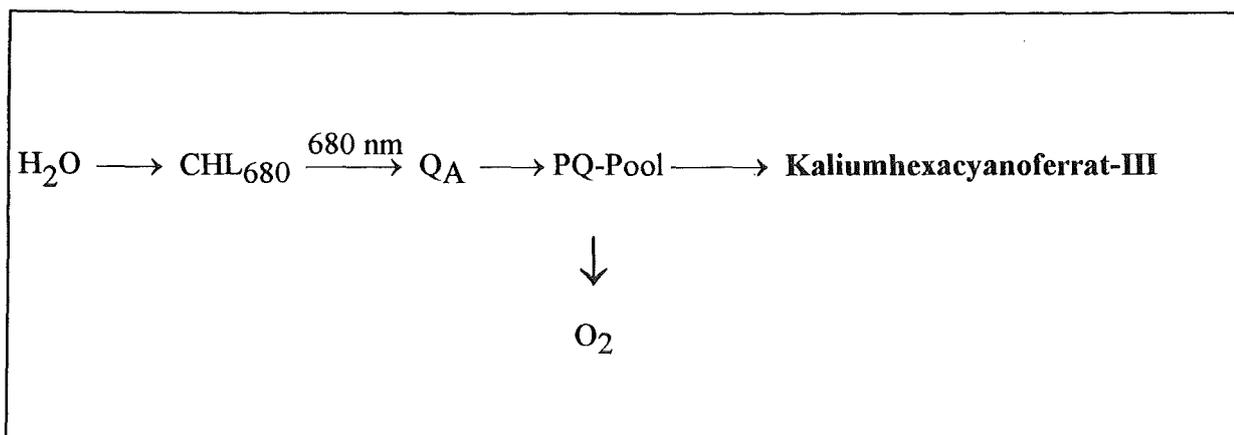


Abbildung 4-2: Reaktionsweg der Reoxidation durch Oxidationsmittel, hier Kaliumhexacyanoferrat-III; --die Pfeile bezeichnen den Übergang eines Elektrons von einem Redoxsystem zum anderen. Mit: --P680: aktives Chlorophyll des PS II; -- H_2O Wasserspaltungssystem;

Prinzipielles Problem dieser Methode ist, daß Kaliumhexacyanoferrat-III während der Belichtung Elektronen aus der Elektronentransportkette ausschleusen wird, was zur Folge hat, daß der Verlauf der Fluoreszenzkinetik verändert wird. Primäres Ziel war daher

herauszufinden, ob es eine Kaliumhexacyanoferrat-III-Konzentration gibt, die die Fluoreszenzkinetik praktisch nicht verändert, die im Dunkeln jedoch trotzdem ausreicht, um die Oxidation des PQ-Pools ausreichend zu beschleunigen.

III.4.3. Ergebnisse und Diskussion

III.4.3.1. Reoxidation mit Licht

Diese Versuche wurden an der optischen Bank mit demselben geometrischen Aufbau durchgeführt wie die Messungen der Fluoreszenzkinetiken (siehe unter Abschnitt VI. Materialien und Methoden). Es wurden lediglich die Filter vor dem Anregungslicht gewechselt: Zur Reoxidation wird das blaue Transmissionsfilter (400-500 nm) gegen ein 715 nm -Kantenfilter ausgetauscht.

Zunächst wurde die minimale Reoxidationsdauer bestimmt, die unter den gewählten Bedingungen (resultierende Lichtintensität in der Küvette; Wellenlänge) benötigt wird, um die Fluoreszenzkinetik einer unblockierten Elektronentransportkette zu erhalten.

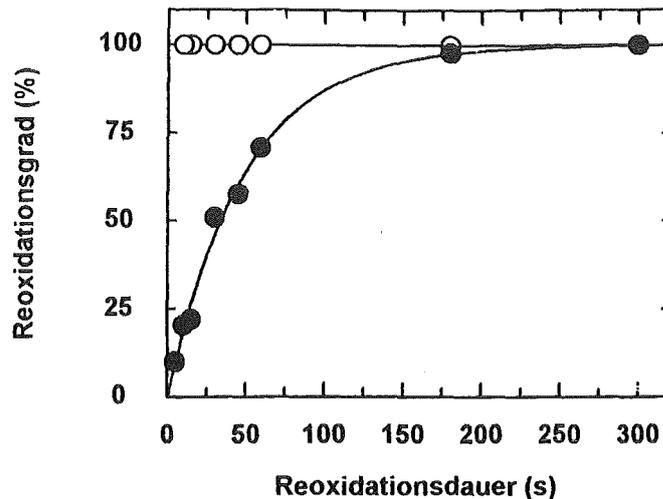


Abbildung 4-3: Lichtinduzierte Reoxidation (leere Kreise) im Vergleich zur einfachen Dunkeladaption (ausgefüllte Kreise); --aufgetragen ist die Reoxidationsdauer gegen den Reoxidationsgrad; --der Reoxidationsgrad bezieht sich auf den erreichbaren Reoxidationsgrad nach 5 Minuten (300 s) Reoxidation; --zur Berechnung des Reoxidationsgrades und zum Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden; ----man erkennt, daß bei der einfachen Dunkeladaption mit der Dauer der Reoxidation der Reoxidationsgrad wächst, bis der Reoxidationsgrad nach 300 s (definitionsgemäß 100 % Reoxidation) erreicht ist. Dieser Reoxidationsgrad wurde deshalb als 100 % Reoxidationsgrad definiert, da längeres Abwarten zu einer praktisch nicht meßbaren Verbesserung des Verlaufes der Kinetiken führte, jedoch gleichzeitig eine Veränderung der Kinetiken durch beginnende Alterung beobachtet wurde. Bei der lichtinduzierten Reoxidation zeigt sich schon nach 5 Sekunden ein Reoxidationsgrad von 100 %. Dies ist die kürzeste Reoxidations-Belichtungsdauer, die technisch eingestellt und durchgeführt werden konnte.

Die Reoxidation dauert unter Verwendung eines 715nm-Kantenfilters und der eingestellten, resultierenden Lichtintensität nur noch wenige Sekunden (Abbildung 4-3). Die lichtinduzierte Reoxidation ist damit wesentlich schneller als die einfache Dunkeladaption.

Entsprechend der theoretischen Erwartung arbeitet das Photosystem I unter den gewählten Bedingungen schneller als Photosystem II, so daß von einer annähernd 'selektiven' Anregung von PS I gesprochen werden kann. $P700^+$ zieht Elektronen aus der Elektronentransportkette ab und oxidiert so rasch den PQ-Pool und Q_A .

Bei dieser Belichtung wird das Reaktionsprodukt der Reoxidation ($P700$) ständig dem Gleichgewicht entzogen, wodurch eine praktisch vollständige Oxidation des Chinonpools resultiert.

Es wird weiterhin beobachtet, daß die lichtinduzierte Reoxidation zu besser reproduzierbaren Kinetiken führte. Dies wird darauf zurückgeführt, daß in wenigen Sekunden keine Alterungsvorgänge die Reoxidation überlagern.

Gegenüber dem einfachen Abwarten im Dunkeln hat die lichtgetriebene Reoxidation daher außer der Zeitverkürzung den wesentlichen Vorteil der besseren und genaueren

Wiederholbarkeit. Dies hat unmittelbare Bedeutung für eine gute Reproduzierbarkeit der Meßwerte.

Im folgenden wird gezeigt, wie sich die lichtgetriebene Reoxidation auf die Differenzkurven auswirkt, wenn sich in der Probe Herbizid befindet.

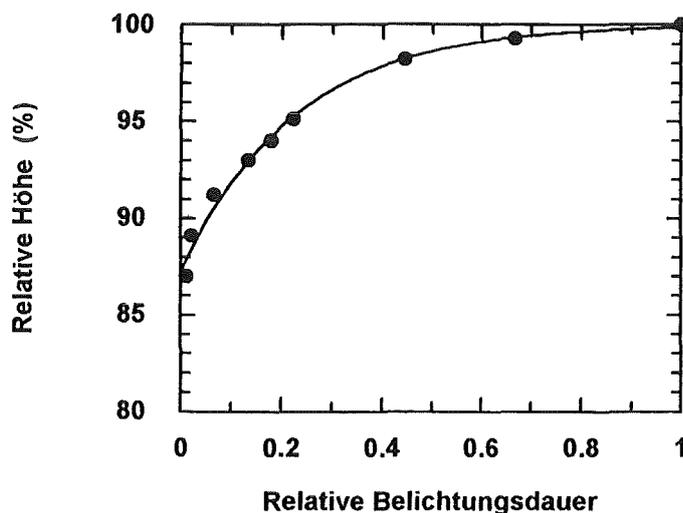


Abbildung 4-4: Einfluß der Belichtungsdauer für die lichtinduzierte Reoxidation auf die Höhe der Differenzkurven; --hier: Signal für 10 µg/l Diuron; --aufgetragen ist auf der Abszisse die Belichtungsdauer relativ zur notwendigen Belichtungsdauer, um ein maximales Signal zu erhalten. Auf der Ordinate ist die Höhe des Herbizidsignals für 10 µg/l Diuron aufgetragen, relativ zur maximalen Höhe des Signals nach vollständiger Reoxidation; ----Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“; ----man erkennt, daß eine zu kurze Reoxidation zu einem zu kleinen Herbizidsignal für eine definierte Herbizidkonzentration führt, und daß es eine bestimmte Zeit t_R gibt, an der das Herbizidsignal maximal wird; --zur Erklärung des Signalwachstums während der Reoxidation und des positiven Offsets siehe die folgende Diskussion bzw. mathematischen Beweis

Wie Abbildung 4-4 zeigt, hat die Dauer der Belichtung Einfluß auf die Höhe der Differenzkurven. Es gibt für jedes optische System eine bestimmte Zeit t_R , ab der die Differenzkurve für eine konstante Herbizidkonzentration maximal wird.

Diskussion dieser Beobachtung

Zur Diskussion dieses Ergebnisses müssen zwei Vorgänge berücksichtigt werden: erstens die Oxidation der Chinone in der Elektronentransportkette, also die eigentliche Reoxidation, und zweitens die Veränderungen im Verlauf der Fluoreszenzkinetiken durch die Reoxidation von Probe und Referenz.

Mit dieser Diskussion soll geklärt werden, ob die in Abbildung 4-4 dargestellte Beobachtung bedeuten muß, daß die Reoxidation durch Herbizide verlangsamt wird, oder ob das Wachstum

des Signales mit längerer Reoxidationsdauer auch ohne Verlangsamung der Reoxidation der herbizidbelasteten Probe erklärt werden kann. Dies wird genauer untersucht, um entscheiden zu können, wie die minimale Reoxidationsdauer für das optische System des Biosensors ermittelt werden kann.

Hierzu wurde das Problem mathematisch betrachtet:

Das mathematische Modell wurde mit der Voraussetzung erstellt, daß Probe und Referenz zu jedem Zeitpunkt der Reoxidation den gleichen Reoxidationsgrad aufweisen. Der Reoxidationsgrad wird beschrieben durch den Anteil der PS II-Komplexe mit oxidiertem Q_A (n). Die Gesamtfluoreszenzintensität zu einem Zeitpunkt (hier als „Fluoreszenz“ bezeichnet) setzt sich zusammen aus der Grundfluoreszenz F_0 und der variablen Fluoreszenzemission zu diesem Zeitpunkt. Die variable Fluoreszenz F_v ist eine Funktion der Herbizidkonzentration und der Beleuchtungsdauer. Die maximale Fluoreszenzintensität F_{max} wird von den PS II-Komplexen erreicht, bei denen Q_A reduziert ist. Sie ist für Probe und Referenz definitionsgemäß identisch und konstant.

Die Höhe des Herbizidsignales („Signal“) wird mit dem verwendeten Auswerteverfahren durch Differenzbildung zwischen Probe und Referenz erhalten.

n = Anteil der PS II-Komplexe mit oxidiertem Q_A
 mit $0 \leq n \leq 1$
 Fluoreszenz = $F_o + F_v$
 (wobei F_v von der Herbizidkonzentration und Beleuchtungsdauer abhängt)

$1 - n$ = Anteil der PS II-Komplexe mit reduziertem Q_A
 Fluoreszenz = F_{max}
 (zeit- und herbizidunabhängig)

mit F = Fluoreszenz zu einem gegebenen Zeitpunkt:
 = Summe der Fluoreszenz aus allen PS II-Komplexen (mit oxidiertem und reduziertem Q_A)

$$\text{Signal} = F^{\text{herb}} - F^{\text{ref}}$$

$$= [n \cdot (F_o + F_v^{\text{herb}}) + (1 - n) \cdot F_{max}] - [n \cdot (F_o + F_v^{\text{ref}}) + (1 - n) \cdot F_{max}]$$

$$= n \cdot (F_v^{\text{herb}} - F_v^{\text{ref}})$$

Dieses Ergebnis bedeutet:

Unter der Voraussetzung, daß Probe und Referenz zu jedem Zeitpunkt der Reoxidation den gleichen Reoxidationsgrad aufweisen, folgt:

- Die Signalhöhe des Herbizidsignales ist linear abhängig von der Anzahl n der oxidierten PS II, also vom Reoxidationsgrad
- Die Signalhöhe ist Null, wenn alle Elektronenakzeptoren reduziert sind. (Dieser Zustand konnte unter realen Versuchsbedingungen (Abbildung 4-4) nicht erzeugt werden. Durch den apparativen Aufbau müssen vor der Anregung immer wenige Sekunden Rechenzeit und die Zeit der experimentellen Bedingungen bis zum Start der Messung berücksichtigt werden, in denen die Thylakoide sich im Dunkeln befinden. In diesen Sekunden findet eine Dunkeladaption mit Sauerstoff statt und damit eine Oxidation der Akzeptoren. Hierdurch ist der positive Offset in Abbildung 4-4 zu erklären).
- Die Signalhöhe wächst mit wachsendem n (Reoxidationsgrad), wie beobachtet.
- Die Signalhöhe wird maximal und konstant bei vollständiger Reoxidation ($n = 1$), wie beobachtet.

Der beobachtete Anstieg des Signales bis zur maximalen Höhe wird also auch unter der Voraussetzung beobachtet, daß Probe und Referenz zu jedem Zeitpunkt den gleichen Reoxidationsgrad aufweisen. Eine Verlangsamung der Reoxidation durch Herbizide ist nicht die Ursache dieser Beobachtung.

Das Wachstum des Signales kann mit einem einfach-exponentiellen Anstieg beschrieben werden. Da auch der Reoxidationsgrad einfach-exponentiell wächst, gibt es keine Hinweise darauf, daß Herbizide die Reoxidation verlangsamen. Unter diesen Voraussetzungen wird die Reoxidationsdauer nicht von Herbiziden beeinflusst, und ist damit auch unabhängig von der Herbizidkonzentration.

Mechanistisch kann dies dadurch beschrieben werden, daß die Bindung des Herbizides an der Herbizidbindestelle reversibel ist. Das Herbizid steht in Konkurrenz zu den aus dem PQ-Pool stammenden Chinon Q_B . Befindet sich Q_B an der Bindestelle, ist die Blockade aufgehoben. Durch diese dynamische Gleichgewichtsreaktion ist es möglich, auch herbizidbelastete Thylakoide vollständig zu reoxidieren. Eine Verlangsamung muß durch diese Gleichgewichtsreaktion nicht resultieren, da es sich um eine geringfügige Hemmung eines Reaktionsschrittes handelt, der für die Reoxidation nicht geschwindigkeitsbestimmend ist.

Für die Reoxidation bei der Herbizidbestimmung bedeutet das, daß erst nach einer bestimmten Zeit t_R die maximale und objektiv richtige Höhe des Signales erreicht ist. Dies stellt jedoch kein Meßhindernis dar, da dieser Zeitpunkt für jedes optische System (jede resultierende Reoxidations-Lichtintensität) exakt ermittelt werden kann und aufgrund der guten Reproduzierbarkeit nur einmal bestimmt werden muß.

III.4.3.2. Reoxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III

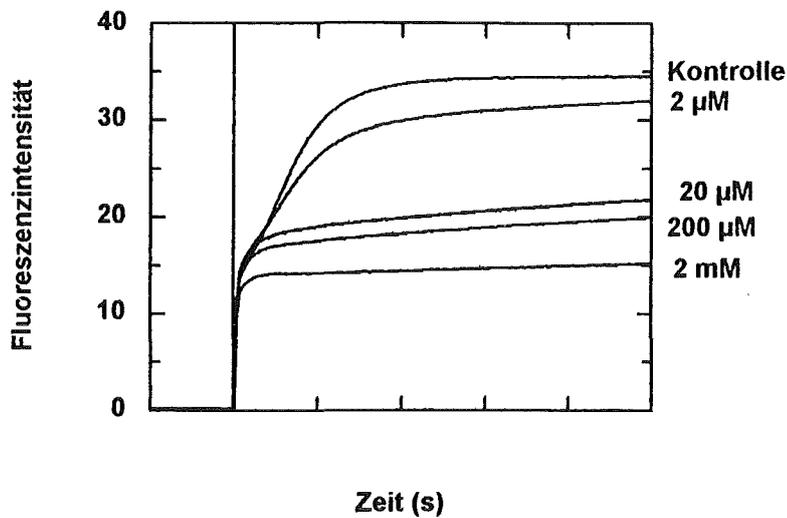


Abbildung 4-5: Veränderung von Fluoreszenzkinetiken durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat-III in verschiedenen Konzentrationen (siehe Legende); -- Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden; --man erkennt, daß die Erhöhung der Kaliumhexacyanoferrat-III-Konzentration in der Küvette zu einer Verminderung des Wertes F_{max} führt, und der zeitliche Verlauf des Anstieges der Fluoreszenzintensität durch das Ausschleusen der Elektronen aus der Elektronentransportkette verändert wird.

Wie aus Abbildung 4-5 erkennbar, beeinflusst Kaliumhexacyanoferrat-III erwartungsgemäß je nach Konzentration die Fluoreszenzkinetik. Die maximale Fluoreszenzintensität F_{max} wird nicht erreicht, da Kaliumhexacyanoferrat-III die Elektronen von Q_B übernimmt und so aus der Elektronentransportkette ausschleust. Solange Kaliumhexacyanoferrat-III als Elektronenakzeptor vorhanden ist, steigt daher die Fluoreszenzintensität nicht auf den maximal möglichen Wert an.

Die Ermittlung der optimalen Kaliumhexacyanoferrat-III-Konzentration erwies sich als äußerst kritisch; jedoch führt bei sehr geringen Kaliumhexacyanoferrat-III-Konzentrationen die Oxidation durch Kaliumhexacyanoferrat-III im Licht zu sehr geringen Veränderungen, die die Messung nicht beeinflussen.

Die chemische Beschleunigung der Reoxidation wurde daher mit $0.4 \mu\text{M}$ Kaliumhexacyanoferrat-III erprobt.

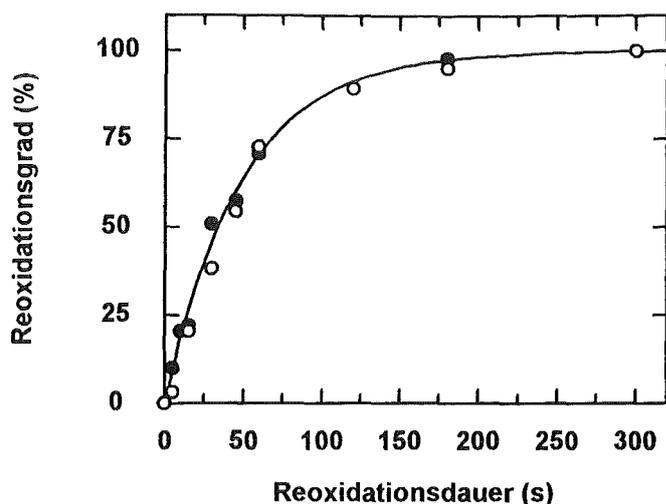


Abbildung 4-6: Dunkeladaption mit $0,4 \mu\text{M}$ Kaliumhexacyanoferrat-III (leere Kreise) im Vergleich zur einfachen Dunkeladaption (ausgefüllte Kreise); --aufgetragen ist die Reoxidationsdauer gegen den Reoxidationsgrad; --der Reoxidationsgrad bezieht sich auf den erreichbaren Reoxidationsgrad nach 5 Minuten (300 s) Reoxidation; --zur Berechnung des Reoxidationsgrades und zum Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem, siehe unter VI. Material und Methoden; ----man erkennt, daß bei der einfachen Dunkeladaption mit der Dauer der Reoxidation der Reoxidationsgrad wächst, bis der Reoxidationsgrad nach 300 s (definitionsgemäß 100 % Reoxidation) erreicht ist. Der exponentielle Anstieg des Reoxidationsgrades mit der Reoxidationsdauer wird durch die Anwesenheit von Kaliumhexacyanoferrat-III nicht beeinflußt; eine Beschleunigung der Reoxidation durch $0,4 \mu\text{M}$ Kaliumhexacyanoferrat-III kann nicht festgestellt werden.

Abbildung 4-6 zeigt, daß die Reoxidation bei Anwesenheit von $0,4 \mu\text{M}$ Kaliumhexacyanoferrat-III genauso lange dauert, wie ohne Kaliumhexacyanoferrat-III. Daraus wird geschlossen, daß Kaliumhexacyanoferrat-III in dieser Konzentration keinen Einfluß auf die Reoxidationsgeschwindigkeit hat.

Möglicherweise liegt dies in der Konzentration begründet, die zu gering sein könnte, um einen meßbaren Effekt zu erhalten. Zudem muß die vorangehende Lichtreaktion berücksichtigt werden; sowohl während des Pipettierens der Lösung als auch bei aufeinanderfolgenden Messungen wird die Küvette vor der Reoxidation Licht ausgesetzt. Bei kleinen Kaliumhexacyanoferrat-III-Konzentrationen ist es denkbar, daß Kaliumhexacyanoferrat-III in der Lichtreaktion bereits größtenteils reduziert wurde; so ist die effektive Konzentration, die im Dunkeln in der Küvette zur Reoxidation zur Verfügung steht, noch geringer.

Da die Kaliumhexacyanoferrat-III-Konzentration nicht erhöht werden kann, ohne die Fluoreszenzkinetiken zu verändern, ist eine Beschleunigung der Reoxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III nicht möglich. Das prinzipielle Problem der chemischen Oxidationsmittel ist, daß sie an der Lichtreaktion teilnehmen, und damit in hohen (wirksamen) Konzentrationen die Fluoreszenzkinetik verändern. Die Bestimmung einer noch effektiven Konzentration im Dunkeln hat sich als sehr kritisch erwiesen. Insbesondere für

Mehrfachmessungen muß berücksichtigt werden, daß die Oxidationsmittel im Licht bereits aufgebraucht werden. Die chemische Beschleunigung der Reoxidation wird daher auch mit anderen Oxidationsmitteln als wenig aussichtsreich angesehen, außer es kann ein Elektronenakzeptor eingeschleust werden, der selbst rasch durch Sauerstoff wieder oxidiert wird, so daß die resultierende Konzentration des Oxidationsmittels durch eine dynamische Gleichgewichtsreaktion auch bei Belichtung praktisch konstant bleibt. Dieser zusätzliche Versuchsansatz zur chemischen Beschleunigung der Reoxidation wurde nicht weiter verfolgt, da die lichtinduzierte Reoxidation sich als technisch sehr einfache, wirksame und reagenzienfreie Methode bewährt hat.

III.4.4. Schlußfolgerungen für den Biosensor

Im Gegensatz zur chemischen Oxidationsmethode kann die Reoxidation durch annähernd selektive Anregung des PS I mit Licht ($\lambda > 700 \text{ nm}$) wesentlich beschleunigt werden. Der Reoxidationsgrad, der durch einfache Dunkeladaption erst nach mindestens 5 Minuten erreicht ist, ist mit dem gewählten optischen Aufbau bereits nach 5 Sekunden eingestellt.

Dies hat wesentliche Bedeutung für den zu entwickelnden Biosensor:

Eine Fluoreszenzkinetik der unblockierten Elektronentransportkette kann nun innerhalb von 10 Sekunden aufgenommen werden, wohingegen mit der einfachen Dunkeladaption mindestens 5 Minuten benötigt werden.

Der Verlauf des Anstieges der Fluoreszenzintensität ist außerdem besser reproduzierbar, da durch die schnelle Reoxidation keine Alterungsprozesse die Reoxidation überlagern. Der technische Aufwand ist gering: Der Meßaufbau des Makrosystems muß nur derart modifiziert werden, daß ein rascher Filterwechsel vor dem Anregungslicht möglich ist.

Die Miniaturisierung dieses Reoxidationsverfahrens wird im Kapitel Meßtechnik beschrieben. Erprobt werden Leuchtdioden oder Laserdioden, deren Emissionsmaximum zwischen 700 und 750 nm liegt. Da die Geschwindigkeit des Einschaltens hier - im Gegensatz zur Anregung - keine Rolle spielt, ist auch der Einsatz kleiner Miniglühlampen (wie sie beispielsweise in Taschenlampen verwendet werden) mit Filtervorsatz denkbar. Für jedes optische System ist dabei die notwendige Reoxidationsdauer charakteristisch und kann exakt bestimmt werden.

III.5. Miniaturisierung der Meßtechnik

III.5.1. Motivation und Ziele

Der zu entwickelnde Biosensor soll in der Vor-Ort-Analytik eingesetzt werden. Hierfür ist eine angepaßte Meßtechnik notwendig, die insbesondere folgenden Anforderungen gerecht wird:

1. Miniaturisiert bis maximal „Zigarrenkistengröße“
2. Transportfähigkeit, Mobilität
3. Funktionsfähigkeit bei gängigen Außentemperaturen gemäßiger Breiten

Die Verwendung miniaturisierter Bauteile stellt nicht nur technische Aufgaben; je nach verwendeten Bauteilen und optischer Geometrie ergeben sich Veränderungen in den detektierten Fluoreszenzkinetiken im Vergleich zu den Kinetiken aus dem Makrosystem; der Einfluß auf diese Kinetiken und die Erklärung der biochemischen Ursachen für diese Veränderungen sind daher bedeutende Ziele dieses Kapitels, neben der optimalen Miniaturisierung der Meßtechnik, um ein Feldgerät realisieren zu können.

III.5.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

Das Prinzip der Meßtechnik leitet sich aus dem makroskopischen Meßaufbau zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken (siehe unter Abschnitt VI. Materialien und Methoden) ab: Es wird eine miniaturisierte Lichtquelle zur Anregung der Thylakoiden benötigt, ein Detektor zum Abtasten der Fluoreszenzintensität mit der Zeit und Filtersysteme für eine optimale Anregung und Detektion. Hinzu kommen geeignete Behältnisse für die Proben und - wie in Kapitel III.4 beschrieben - eine Lichtquelle für die Reoxidation. Zur Messung von Probe und Referenz gleichzeitig stellt sich außerdem die Aufgabe, in beiden Behältnissen sowohl auf der Anregungs- als auch auf der Detektionsseite gleiche Verhältnisse zu verwirklichen.

Zum Test verschiedener optischer Bauteile wurde ein Funktionsmuster mit Bausteinen einer optischen Bank realisiert; durch einen flexiblen Aufbau konnten die verschiedenen optischen Bauteile ohne Veränderung der übrigen Parameter (optische Geometrie) ausgetauscht und getestet werden. Die mit diesem Experimentalaufbau gewonnenen Ergebnisse sind in diesem Kapitel dargestellt; insbesondere die absoluten Werte für die Grundlinienschwankung werden dabei als vergleichende Werte zur Optimierung des Systems angegeben und sind unabhängig

von den absoluten Werten zu betrachten, die letztendlich mit den speziell gefertigten, mechanischen Komponenten des Labormusters erhalten werden.

Diese Messungen wurden jeweils mit einer Thylakoidsuspension mit 100 % Aktivität durchgeführt. Die Anregung erfolgte im 90°-Winkel zur Detektion, wobei jeweils durch den Boden der Behältnisse detektiert wurde. Die resultierenden Fluoreszenzkinetiken wurden mit den optimalen Kinetiken des Makrosystems mit Halogenlampe, Interferenzfilter (400-500nm), Lichtleiter, Shutter und Photomultiplier verglichen.

Durch Streuung an den Thylakoiden kann trotz 90°-Anordnung eine erhebliche Menge des Anregungslichtes zum Detektor gelangen; es muß dort durch geeignete Filtersysteme von der Fluoreszenzemission abgetrennt werden können.

Der Streulichtdurchbruch verändert die Fluoreszenzkinetiken und verfälscht den Wert F_{\min} / F_{\max} . Während jedoch ein identischer Streulichtdurchbruch in beiden Kanälen aufgrund des Auswerteverfahrens (Differenzbildung nach Normierung) die Messung nicht beeinflusst, erzeugt ein *unterschiedlicher* Streulichtdurchbruch eine Grundlinienverschiebung, die durch einfache Justage nicht nivelliert werden kann. Schon geringfügige Unterschiede in den verwendeten Materialien für die beiden Kanäle führt in der Praxis zu einem meßbaren, unterschiedlichen Streulichtdurchbruch. Bei der Auswahl der optischen Bauteile wird daher außer auf die Erzeugung von optimalen, gegenüber dem Makrosystem „unveränderten“ Fluoreszenzkinetiken insbesondere darauf geachtet, daß der Streulichtdurchbruch am Detektor möglichst gering ist.

III.5.3. Ergebnisse und Diskussion

III.5.3.1. Anregung

Um mit miniaturisierten Lichtquellen unveränderte Fluoreszenzkinetiken erzeugen zu können, ist es notwendig, daß die Lichtquellen folgende Eigenschaften erfüllen:

1. Emission einer genügend großen Lichtintensität, um den Wert F_{\max} möglichst schnell ($t_{\text{optimal}} : 5 \text{ s}$, $t_{\text{maximal}} : 10 \text{ s}$) zu erreichen.
2. Die Möglichkeit einer Abschwächung der Lichtintensität, wenn die Sättigung durch Licht zu schnell eintritt, und daher ein Unterschied zu einer herbizid-belasteten Probe nicht detektiert werden könnte.

3. Emission einer optimalen Wellenlänge möglichst nahe der Absorptionsmaxima des Photosystems II, also bei $\lambda_{\max 1} = 450 \text{ nm}$ oder $\lambda_{\max 2} = 680 \text{ nm}$.
4. Keine Aussenden von Licht im Bereich der Detektionswellenlänge, insbesondere für $\lambda > 700 \text{ nm}$, um den Streulichtdurchbruch zu minimieren.
5. Hohe Anschlaggeschwindigkeit, um die Fluoreszenzkinetiken im Bereich der ersten 20 ms nicht zu überlagern; zugrunde liegt das Ziel, den Shutter des Makrosystems zu eliminieren, da er die Meßtechnik des Sensors kompliziert und durch seine langsame Öffnungsgeschwindigkeit ($t_{\text{off}}: 2 \text{ ms}$) die Fluoreszenzkinetiken verändern kann.

Entsprechend dem Makrosystem wäre eine Anregung im Bereich von $\lambda = (400..500) \text{ nm}$ optimal, um den Streulichtdurchbruch minimieren zu können; für die Anregung wesentlich ist jedoch, daß durch eine genügend hohe Lichtintensität eine vollständige Reduktion der Redoxsysteme der Elektronentransportkette erreicht werden kann (die Fluoreszenzmission pendelt sich sonst in einem Zwischenzustand ein, erreicht den Wert F_{\max} nicht, und erfüllt so nicht die Voraussetzungen, die für die Anwendung des optimierten Auswerteverfahrens (Normieren auf F_{\max}) notwendig sind). Die Lichtintensität kommerziell erhältlicher, miniaturisierter Lichtquellen im Bereich von $\lambda = (400..500) \text{ nm}$ ist jedoch im allgemeinen wesentlich geringer, als die Lichtintensität von Lichtquellen, die im Bereich des zweiten Maximums des Absorptionsspektrums (680 nm) emittieren.

Kleine Halogenlampen entsprechend dem Makrosystem zeigen eine zu langsame Anschlagcharakteristik, so daß ein Shutter benötigt würde. Daher sind Diodenlaser und Leuchtdioden (LED) zu erproben.

Auswahl der Filter: Einfluß der Eigenfluoreszenz von Kantenfiltern

Im Makrosystem der optischen Bank kann die Eigenfluoreszenz der Filter vernachlässigt werden, da die Intensität des gestreuten Anregungslichtes aufgrund der relativ großen Entfernung der Probe zum Filter (10 cm) zu gering ist, um die Eigenfluoreszenz der Filter bedeutend anzuregen.

Im miniaturisierten System muß diese Eigenfluoreszenz aufgrund geringerer Entfernungen und größeren Streulichteinfluß jedoch untersucht werden.

Bei direkter Beleuchtung der vorliegenden Farbglas-(Kanten-)Filter wird eine Eigenfluoreszenz der Filter angeregt. Bei Messungen im miniaturisierten System ist der Einfluß durch die

Eigenfluoreszenz jedoch praktisch nicht relevant. Da die ersatzweise erprobten Interferenzfilter zudem zu einer erheblichen Intensitätsverminderung der zu detektierenden Fluoreszenzemission führen, werden die Kantenfilter für den Einsatz im Sensor ausgewählt.

Auswahl der Kantenfilter bei der Anregung mit Diodenlasern

Zur Auswahl der geeigneten Filter vor den Detektoren zum Ausschluß von Streulichteinflüssen wurden die folgenden Spektren aufgenommen (Abbildung 5-1):

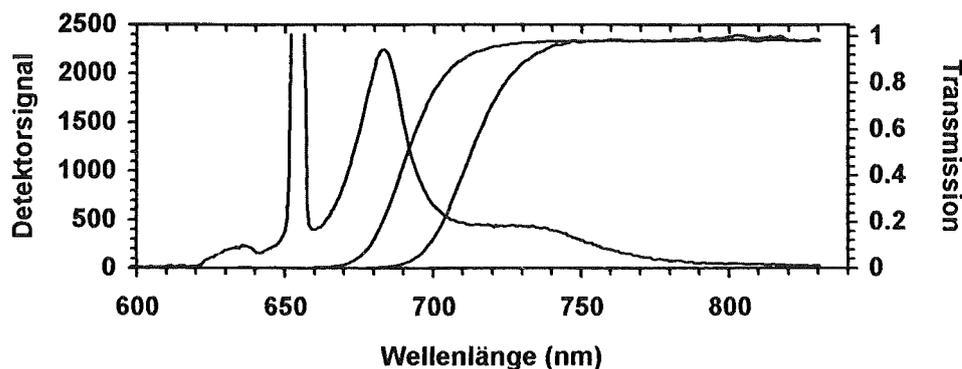


Abbildung 5-1: Emissionsspektrum mit Laser-Streulichtdurchbruch und Transmissionsspektren zweier Kantenfilter

Jeweils getrennt aufgenommen am Dioden-Array-Spektrometer (Bedingungen siehe VI. Materialien und Methoden); --Fluoreszenzemission der Thylakoidsuspension entsprechend 10 µg Chlorophyll / ml in Puffer; --Anregung mit Laserdiode 655 nm; --Transmissionsspektren der Filter jeweils durch Absorption des Lichtes der internen Halogenlampe des Spektrometers; --Berechnung des Transmissionsspektrums nach Abzug des Lampenspektrums;

Spektren von links nach rechts:

- Fluoreszenzemissionsspektrum von Kopfsalat-Thylakoiden (Maximum 685 nm) mit Streulichtdurchbruch des Anregungslichtes (Diodenlaser 655 nm)
- RG 695-Kantenfilter, Transmissionsspektrum
- RG 715-Kantenfilter, Transmissionsspektrum

Bei der Verwendung von Lichtquellen, die bis zu Wellenlängen von $\lambda = 680$ nm emittieren, wird, um Streulicht sicher ausschließen zu können, ein RG 715-Kantenfilter vor den Detektoren angebracht. Die verbleibende Fluoreszenzintensität reicht aus, um die Kinetiken aufnehmen zu können. Die Verwendung eines Kantenfilters mit längerer Transmissionswellenlänge ist aufgrund der Verminderung der detektierbaren Fluoreszenzintensität für eine empfindliche Messung nicht geeignet.

Anregung mit Diodenlasern

Baustein	Fluoreszenzkinetik unverändert?	Streulichtdurchbruch mit RG 715 -Kantenfilter	Maximales Signal bezogen auf DL 655
Diodenlaser 655nm	ja	gering	1
Diodenlaser 635nm	ja	gering	0,14

Tabelle 5-1: Diodenlaser als Anregungslichtquelle; --Anregung einer Küvette mit einem Thylakoidgehalt entsprechend 5 µg Chlorophyll / ml; --Gesamtvolumen: 1 ml; --Detektion mit Photodiode 13.7 mm² und RG715-Kantenfilter vor Photodiode; --Reoxidation durch einfache Dunkeladaption; --DL = Diodenlaser; --unterschiedl. Leistung der Diodenlaser: DL 655 nm 3 mW, DL 635 2 mW; --die Anregungsintensität beider Diodenlasern reicht zur Anregung der Thylakoide aus; zur direkten Anregung einer einzigen Küvette wurde ein Transmissionsfilter zur Abschwächung der Intensität der Diodenlaser vorgeschaltet; --Der Streulichtdurchbruch wurde abgeschätzt über die Erhöhung des Wertes F_{min} für 100 % aktive Thylakoide im Vergleich zum optimierten Makrosystem.

Die Ergebnistabelle zeigt, daß mit beiden Diodenlasern eine unveränderte Fluoreszenzkinetik erzeugt werden kann; der Streulichtdurchbruch ist gering. Mit dem Diodenlaser 655 nm kann insbesondere aufgrund seiner höheren Lichtemissionsintensität ein größeres Signal für F_{max} erzeugt werden; für die Differenzkurven bedeutete dies, daß ein geringeres Rauschen resultiert. Streulichteinflüsse werden durch Filtersysteme vor den Detektoren weitgehend ausgeschlossen.

Leuchtdioden (LEDs) als Anregungslichtquellen

Baustein	direkte Anregung einer Küvette möglich?	Streulichtdurchbruch (Filter vor Detektor)
LED NSB blau	ja	sehr gering (Filter 645 nm oder 715 nm)
LED rot	ja	großer Durchbruch auch bei 715 nm Filter
LED orange	ja	Durchbruch durch Nebenbande
LED grün	nein	

Tabelle 5-2: LEDs als Anregungslichtquellen; --LED NSB blau: New Super Bright Blue LED L200CWB14; --Bedingungen der Messung siehe Tabelle 5-1

Nur mit der neuen, blauen NSB-LED (Emissionsspektrum siehe Anlage) wird eine unveränderte Fluoreszenzkinetik gemessen. Bei Verwendung von 645 nm- bzw. 715 nm-Kantenfiltern erreicht praktisch kein Streulicht den Detektor.

Mit der grünen LED ($\lambda_{\max} = 560$ nm) ist es erwartungsgemäß aufgrund der niedrigen Absorptionskoeffizienten in diesem Bereich nicht möglich, die Thylakoide anzuregen. Mit der orangen ($\lambda_{\max} = 620$ nm) und der roten ($\lambda_{\max} = 660$ nm) LED können Thylakoide angeregt werden, jedoch wird ein starker Streulichtdurchbruch beobachtet; dieser Effekt konnte durch

verschiedene Filtersysteme nicht nivelliert werden. Dies liegt darin begründet, daß dieses LEDs auch Strahlung im Bereich von $\lambda > 700$ nm emittieren: Da diese Nebenmaxima in den Bereich der Detektions-Wellenlänge der Fluoreszenzemission der Thylakoide fallen, können sie nicht ausgefiltert werden. Die Intensität dieser Nebenmaxima ist im Vergleich zur Fluoreszenzemission groß genug, um eine praktisch relevante Veränderung der Fluoreszenzkinetiken hervorzurufen.

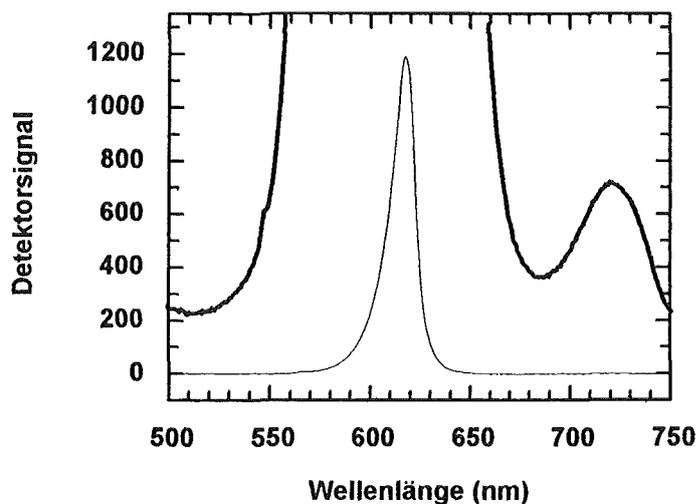


Abbildung 5-2: Emissionsspektrum einer orangen LED ($\lambda_{\text{max}} = 620$ nm), mit Integrationszeit 0,015 s (dünne Linie) und 1000facher Integrationszeit (dicke Linie) am Dioden-Array-Spektrometer aufgenommen; --Bedingungen der Messung siehe Materialien und Methoden, Messungen am Dioden-Array-Spektrometer; --man erkennt bei langer Integrationszeit die von der orangen LED emittierte Nebenbande für $\lambda > 700$ nm

Zur Anregung der Thylakoide unter den gegebenen Bedingungen eignen sich insbesondere der Diodenlaser 655 nm und die blaue NSB-LED.

Für den 655 nm-Diodenlaser muß zur Vermeidung eines Streulichtdurchbruches ein RG 715-Kantenfilter vor dem Detektor angebracht werden. Dies hat zwar zur Folge, daß das Maximum der Fluoreszenzemission bei $\lambda_{\text{max}} = 685$ nm nicht detektiert wird. Jedoch reicht die resultierende Fluoreszenzintensität der Peakflanke und der anschließenden Schulter für die Aufnahme einer Fluoreszenzkinetik mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis aus.

Die emittierte Wellenlänge der blauen NSB-LED ist in dieser Hinsicht deutlich günstiger; jedoch ist die emittierte Lichtintensitätsverteilung aufgrund der bei käuflichen LEDs aufgesetzten Linse wesentlich ungleichmäßiger als bei dem Diodenlaser. Zur simultanen Anregung zweier Küvetten (siehe unter 2. „Strahlteilung“) werden mehrere blaue NSB-LEDs kombiniert. Da es sich bei den blauen NSB-LEDs um eine Neuentwicklung handelt, die erst

zum Ende der Doktorarbeit zur Verfügung stand, konnte die technische Durchführung der Justage für ein einfach zu handhabendes Meßsystem noch nicht perfektioniert werden.

III.5.3.2. Strahlteilung

Zur Bildung der Differenzkurven soll es mit dem zu entwickelnden Sensor möglich sein, die Fluoreszenzkinetiken von Probe und Referenz gleichzeitig aufzunehmen. In Vorversuchen wurden die Vorteile der Simultanmessung gegenüber der sequenziellen Messung belegt. Die Thylakoide in beiden Behältnissen sind in Reoxidationsgrad und Alterungszustand absolut vergleichbar. Gleiche Anregungslicht-Intensitäten in beiden Probengefäßen können durch Justage realisiert und optimiert werden. Die Unsicherheiten einer Hintereinandermessung bezüglich Alterungsvorgängen und den apparativen Bedingungen der Anregung (Anschaltkinetik, Intensitätsschwankungen, Präzision beim Küvettenwechsel) werden so ausgeschaltet.

Voraussetzung für eine simultane Messung ist eine exakte Aufteilung der Strahlungsintensität der Anregungslichtquelle und eine gute Justierbarkeit dieser Strahlteilung.

Hierzu wurden zwei generell verschiedene Konzepte erprobt:

1. Teilung des Strahles durch einen Keilstrahlteiler, der in einen Plexiglaschip mit zwei Vertiefungen für Probe und Referenz eingearbeitet ist („Keilstrahlteiler“).
2. Erzeugen eines großen, homogenen Lichtkegels, der zwei identische Probenbehältnisse gleichzeitig überstreicht („Lichtkegel“).

Zur Justage wurde jeweils die Anregungslichtquelle mit Hilfe von Mikrometerschrauben in allen drei Raumrichtungen verschoben; der Erfolg der Justage wurde nach Differenzbildung über den Verlauf der Grundlinie beurteilt. Bei vollkommen gleichen Verhältnissen in beiden Probengefäßen sollte die Differenz zu jedem Zeitpunkt gleich null sein, das heißt, eine glatte Grundlinie ohne Abweichungen resultieren.

Baustein	Justage / Handling	maximale Grundlinienabweichung nach Justage bei Anregung mit Laser 655nm / Detektion 715 nm Filter %F _{max}
Keilstrahlteiler	schlecht; kleine Veränderung hat große Folgen	2
Lichtkegel ohne Diffusor	gut	1
Lichtkegel mit Diffusor	gut	0.5

Tabelle 5-3: Verschiedene Geometrien der Strahlteilung und Erfolg der Justage; Bedingungen: --Anregung: Diodenlaser 655nm; --Detektion: Kantenfilter RG715 und Photodiode 13.7mm²; --Chlorophyllgehalt 5µg/ml; --Volumen: je 1ml; --Reoxidation durch einfache Dunkeladaption.

Die Justage mit dem Keilstrahlteiler ist erschwert. Kleine Verschiebungen der Anregungslichtquelle bewirken große Veränderungen in der Grundlinie. Zum einen wird dies darauf zurückgeführt, daß der Laser kollimiert auf den Strahlteiler auftrifft (hierdurch werden Störungen durch materialbedingte Unterschiede der Oberfläche des Keiles nivelliert); dadurch werden jedoch nicht alle Thylakoide in den Probengefäßen angeregt und Störeffekte durch Eigenabsorption und Streuung verstärkt. Da bei Verschiebung des Lasers gegen den Keil nicht nur die Anregungsintensität, sondern auch der Strahlquerschnitt beim Auftreffen auf die Küvette verändert wird, wird bei dieser Geometrie während der Justage auch die Anzahl der angeregten Thylakoide verändert. Die Veränderung mehrerer Parameter während der Justage führt dazu, daß die Grundlinie nach Justage noch Abweichungen bis zu 2 %F_{max} aufweist. Dies ist zwar ein geringer Unterschied, er wird jedoch die Empfindlichkeit der Herbizidmessung beeinflussen.

Um zwei Küvetten gleichzeitig beleuchten zu können, wird die Tatsache ausgenutzt, daß Laserdioden einen elliptischen Strahlkegel mit einer Ausbreitung von etwa 60° (längere Achse) emittieren. Hierzu wird die Kollimator-Optik des Diodenlasers entfernt. Zusätzlich wird ein Diffusor eingesetzt, der die Homogenität der Lichtintensitätsverteilung verbessert.

Für diese Geometrie der Anregung wird kein gesonderter Strahlteiler mehr benötigt.

Mit dem überstreichenden Lichtkegel wird eine Grundlinie erzeugt, die im Experimentieraufbau des Funktionsmusters lediglich Verschiebungen von 0,5 %F_{max} aufweist.

Dieses System wird daher im Feldgerät zur Strahlteilung verwendet.

III.5.3.3. Detektion

Zur Detektion der emittierten Fluoreszenzintensität wird im Makrosystem ein Photomultiplier verwendet. Photodioden sind zur Miniaturisierung besser geeignet, wenn auch kleine Photomultiplier auf dem Markt erhältlich sind; zudem werden Photomultiplier mit Hochspannungen betrieben; da der Sensor in der Vor-Ort-Analytik vorzugsweise autonom mit Batterien betrieben werden soll, ist anstelle zweier Photomultiplier die Verwendung von Photodioden angezeigt.

Zur Detektion wurden zwei Photodioden mit unterschiedlich großer sensitiver Fläche erprobt:

	Fluoreszenzkinetik	Max. Signal bezogen auf PD 33	maximale Grundlinienabweichung nach Justage
Photodiode 33 mm ²	leicht verzerrt	1	1.5
Photodiode 13.7 mm ²	unverändert	0.5	0.5

Tabelle 5-4: Photodioden als Detektoren; --Anregung: Diodenlaser 655nm; --Detektion: Filter RG 715; --Chlorophyllgehalt 5µg/ml; --Volumen in beiden Küvetten: je 1ml; --Strahlteilung „Lichtkegel“; --Reoxidation durch einfache Dunkeladaption.

Hierbei empfängt die Photodiode 33 die emittierte Lichtintensität über den gesamten Küvettenboden, während die kleinere Photodiode die über einen kleineren Querschnitt emittierte Lichtintensität aus der Mitte des Küvettenbodens detektiert. Die Erhöhung des maximalen Signales bei Verwendung der größeren Photodiode entspricht der Erwartung. Jedoch zeigt sich eine schlechtere Justierbarkeit und eine leichte Verzerrung der Fluoreszenzkinetik.

Durch Streuung und Selbstabsorption entsteht ein Lichtgradient in der Küvette; Thylakoide, die sich an der Stirnseite der Küvette befinden und direkt angestrahlt werden, werden so einer höheren Lichtintensität ausgesetzt, als Thylakoide, die sich im hinteren Bereich der Küvette befinden.

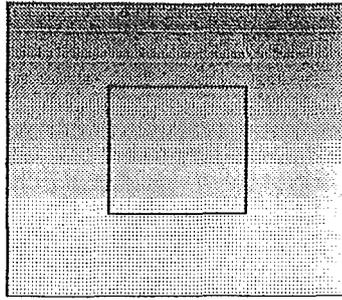


Abbildung 5-3: Qualitative schematische Darstellung des Verlaufs eines Lichtgradienten in der Küvette, von oben betrachtet, bei Anregung von der Frontseite der Küvette (unten)

Dies kann Unterschiede in der Geschwindigkeit des Anstieges der Fluoreszenzintensität nach sich ziehen. Da die große Photodiode die Fluoreszenzintensität aller Thylakoide detektiert, haben diese Unterschiede auf die Gesamtfluoreszenzkinetik einen größeren Einfluß als bei der kleinen Photodiode.

Da die kleineren Photodioden zudem schneller detektieren, werden für den Sensor Photodioden mit einer sensitiven Fläche von 13.7 mm^2 eingesetzt; zusätzlich sorgt ein Spiegel hinter den Küvetten dafür, daß der Lichtgradient in der Küvette minimiert wird.

Auch eine Verringerung der Thylakoidkonzentration in der Küvette führt zu einem kleineren Lichtgradienten. Jedoch wurde die Thylakoidkonzentration in der Küvette in Vorversuchen optimiert und hier nicht herabgesetzt, da dadurch die maximale Fluoreszenzintensität verringert würde.

III.5.3.4. *Reoxidation*

Zur Reoxidation werden Lichtquellen benötigt, die annähernd selektiv das Photosystem I anregen. Hierzu sind - wie in Kapitel III.4. ermittelt - Wellenlängen mit $\lambda > 700 \text{ nm}$ praktikabel. Im Gegensatz zur Anregung spielt hier die Anschaltcharakteristik eine untergeordnete Rolle, jedoch ist die geeignete Wellenlänge ein kritischer Faktor:

Wellenlängen mit $\lambda > 750 \text{ nm}$ werden durch die LHCs der Thylakoide praktisch nicht mehr absorbiert, durch Wellenlängen mit $\lambda < 700 \text{ nm}$ wird das Photosystem II mitangeregt; daraus resultiert eine der Reoxidation entgegengerichtete Konkurrenzreaktion, die die Oxidation der Chinone verlangsamt.

Um den bewährten Aufbau des Makrosystems möglichst exakt zu übernehmen, wurden daher 2 Miniglühlampen, wie sie auch in Taschenlampen verwendet werden, in einer speziell konzipierten Fassung mit einem 715 nm -Kantenfilter erprobt.

Alternativ hierzu wurde eine Laserdiode 750 nm und zwei 740 nm High Performance LEDs (H-LED 740 nm) eingesetzt. Die Küvetten wurden simultan entsprechend der Strahlteilung „Lichtkegel“ reoxidiert.

Baustein	minimaler Zeitbedarf bis zur vollständigen Reoxidation bei simultaner Beleuchtung beider Küvetten (s)	Wärmeentwicklung	max. Grundlinienverschiebung nach Justage % F _{max}
Miniglühlampen / 715 nm Filter	20	groß	0,5
Laserdiode 750 nm	> 5min	-	-
2 H-LEDs 740 nm	30	gering	0,5

Tabelle 5-5: Lichtquellen zur Reoxidation; --Bedingungen: Anregung DL 655nm; --Detektion: PD 13.7 mm² und RG 715; --Chlorophyllgehalt 5µg/ml; --Volumen in beiden Küvetten: 1 ml; --Strahlteilung: „Lichtkegel“; --optische Geometrie der Reoxidation: entsprechend Anregung.

Mit dem System der Miniglühlampen kann innerhalb von 20 Sekunden eine vollständige Reoxidation der Thylakoide beider Behältnisse erreicht werden. Die freigesetzte Wärmestrahlung der Miniglühlampen ist hoch und kann bei längerer Beleuchtung die Thylakoide schädigen. Die ersatzweise getestete Laserdiode 750 nm kann erwartungsgemäß keine Beschleunigung der Reoxidation im Vergleich zu einfachen Dunkeladaption bewirken, da diese Wellenlänge von den LHCs des PS I praktisch nicht mehr absorbiert wird. Laserdioden mit einer Kennwellenlänge von $\lambda = (700...740)$ nm können mit den allgemein verwendeten Materialien nicht hergestellt werden.

Mit zwei H-LEDs 740 nm beträgt die minimale Reoxidationsdauer 30 Sekunden. Die Reoxidation dauert hier etwas länger als beim Miniglühlampensystem, jedoch hat die LED den Vorteil, weniger Wärmestrahlung zu emittieren (Wärmestrahlung beschleunigt die Alterungsvorgänge der Thylakoide). Außerdem haben LEDs eine größere Lebensdauer und einen geringeren Leistungsbedarf als die Miniglühlampen.

Für den Sensor sind beide Systeme zur beschleunigten Reoxidation geeignet.

Die Richtung, aus der die Thylakoide in den Küvetten mit Reoxidationslicht beleuchtet werden, ist bedeutend für die Dauer und die Vollständigkeit der Reoxidation. So kann eine unveränderte Fluoreszenzkinetik in minimaler Zeit nur dann erreicht werden, wenn die Reoxidation aus derselben Richtung erfolgt wie die Anregung. Bei Reoxidation in 90° oder

180° Winkel zur Anregung resultieren leicht verzerrte Fluoreszenzkinetiken, und die Justage ist erschwert.

Denkbar ist, daß auch hier ein Intensitätsgradient in der Küvette entsteht (vergleiche Abbildung 5-3); Thylakoide, welche sich im „Schatten“ bezüglich des Reoxidationslichtes befinden, weisen dann einen geringeren Reoxidationsgrad auf, als solche, die direkt angeregt werden; verläuft dieser Gradient entgegen dem Gradienten des Anregungslichtes, werden die Unterschiede in den Fluoreszenzkinetiken möglicherweise detektiert.

Für den Sensor folgt daraus, daß Anregung und Reoxidation aus der gleichen Richtung erfolgen sollten.

III.5.3.5. Elektronik

Die Elektronik wurde auf ein maximales Signal/Rausch-Verhältnis optimiert. Hierzu wurde der von den Photodioden erzeugte Strom mit einem Transimpedanzverstärker rauscharm verstärkt. Zu Einzelheiten des elektronischen Aufbaus und der verwendeten Bauteile siehe Schaltplan, Anlage.

III.5.4. Schlußfolgerungen

Folgende miniaturisierte Bauteile haben sich für das vorliegende Meßproblem zur Realisierung eines Feldgerätes als optimal erwiesen:

Anregung:	Diodenlaser 655nm oder blaue NSB-LED
Strahlteilung:	überstreichender Lichtkegel
Detektion:	Photodiode mit sensitiver Fläche von 13.7 mm ² Kantenfilter RG 715 (für Diodenlaser) oder Kantenfilter RG 645 (für blaue NSB-LED)
Reoxidation:	Miniglühlampen mit RG 715-Kantenfilter oder 2 H-LEDs 740 nm opt. Geometrie: Reoxidationsrichtung entsprechend Anregung

Zur optimierten, elektronischen Schaltung siehe Anlage, Schaltplan

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Feldgerät als Labormuster realisiert, dessen Design und Funktionsweise im nächsten Kapitel vorgestellt wird.

III.6. Realisierung eines Labormusters

Aufgrund der Ergebnisse aus den Basisuntersuchungen (Kapitel III.1.-III.5.) wurde ein Labormuster gefertigt, das in Aufbau und Funktionsweise in diesem Kapitel vorgestellt wird.

III.6.1. Aufbau

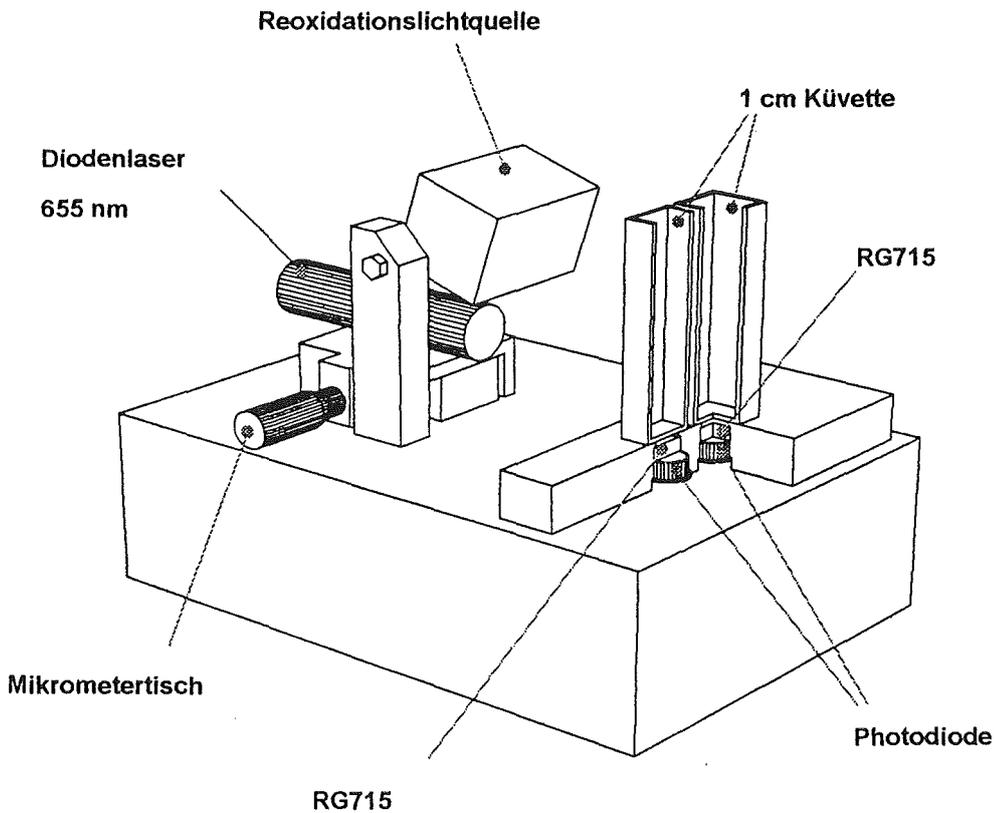


Abbildung 6-1: Miniaturisiertes Meßsystem - Labormuster; –mit: 1cm-Küvetten mit vorgelegten gefriergetrockneten Thylakoiden (in Puffermatrix, fest) zur Aufnahme von Probelösung bzw. Referenz; Photodioden 13.7 mm^2 mit vorgeschaltetem RG715 nm-Filter zur getrennten Detektion des Anwachsens der Fluoreszenzintensität mit der Zeit; Diodenlaser 655 nm zur Anregung der Thylakoide; Mikrometertisch zur Justage (Verschieben des Diodenlasers in X-Richtung gegen die Küvetten).

III.6.2. Definitionen

Der entwickelte Sensor soll PS II-Herbizide empfindlich nachweisen können; durch das Nachweisprinzip über den Wirkmechanismus eröffnen sich für den Sensor zwei prinzipiell verschiedene Einsatzmöglichkeiten: In der Spurenanalytik (bspw. Analytik von Trinkwasser gemäß TrinkwV) und bei der Bestimmung der Wirkung verschiedener Proben in der Herbizidentwicklung und -anwendung (Wirkproben).

Generell ist der Sensor für beide Probenarten konzipiert worden. Ihr wesentlicher Unterschied besteht in der Herbizidkonzentration: Zur Untersuchung von hochverdünnten Proben, wie Trinkwasserproben, ist eine Justage vor jeder Messung und Quantifizierung der Grundlinie nicht möglich. Der Sensor wird einmal justiert und diese Justage von Messung zu Messung nicht mehr verändert. Bei konzentrierten Herbizidproben (Wirkproben) dagegen wird vor jeder Messung justiert, die Grundlinie aufgenommen und die konzentrierte Herbizidprobe danach in kleinsten Mengen zu einer der Suspensionen gegeben; nach Mischen wird die Differenzkurve aufgenommen. Durch Subtraktion der Grundlinie erhält man das bereinigte Meßsignal. Bei der Auswertung errechnet sich aus dem Gesamtvolumen im Probekanal die Wirksamkeit der Probe im Vergleich zu einem bekannten Herbizid.

Dieser prinzipielle unterschiedliche Analysenablauf wird im Folgenden im einzelnen dargestellt, da er Bedeutung für die jeweils erreichbaren Nachweisgrenzen hat; dies wird im Kapitel III.7. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems detailliert beschrieben.

III.6.3. Durchführung der Justage

Zur Justage wird eine Suspension aus gefriergetrockneten Thylakoiden in Standardpuffer aliquotiert und in beide Behältnisse gegeben. Durch Starten der Messung wird die Grundlinie aufgenommen. Um die Lichtintensität in beiden Behältnissen auszubalancieren, wird die Lichtquelle gegen die Küvetten in x -Richtung (parallel zur Frontseite der Küvetten in konstanter Höhe bezüglich der Detektoren) verschoben und wiederholt die Grundlinie aufgenommen, bis eine möglichst „glatte“ Grundlinie bei Null resultiert, das heißt, die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenzintensität in beiden Kanälen gleich ist.

III.6.4. Analysenablauf für die Spurenanalytik

1. Einsetzen der Einmalküvetten mit vorgelegten, gefriergetrockneten Thylakoiden in Puffer (fest)
2. Pipettieren von 1 ml Referenz (unbelastete Wasserprobe, aq. dest.) in Küvette 1; Mischen
3. Pipettieren von 1 ml Probe in Küvette 2; Mischen
4. Verschließen des Sensors und Starten der Messung

III.6.5. Analysenablauf für Wirkproben

1. Einsetzen der Einmalküvetten mit vorgelegten, gefriergetrockneten Thylakoiden in Puffer (fest)
2. Pipettieren von 995 μl Referenz (unbelastete Wasserprobe, aq. dest.) in Küvette 1 und 2
3. Verschließen des Sensors und Aufnahme der Grundlinie (evtl. Justage und Wiederaufnahme der Grundlinie)
4. Pipettieren eines Referenzvolumens* $V = 5\mu\text{l}$ zu Küvette 1; Mischen
5. Pipettieren eines Probevolumens* $V = 5\mu\text{l}$ zu Küvette 2; Mischen
6. Verschließen des Sensors und Starten der Messung
7. Auswertung unter Abzug der Grundlinie

*Die Volumina der zupipettierten Probe bzw. Referenz können bis maximal 5 μl variiert werden, ohne daß sich die Wiederholbarkeit der Hintereinandermessung ändert; das zur Justage vorgelegte Volumen wird so gewählt, daß zur eigentlichen Messung ein Gesamtvolumen von 1 ml resultiert

Zum direktem Vergleich der Wirksamkeit zweier Herbizide können Herbizidlösungen derselben Konzentration gegeneinander nach dem Analysenablauf für Wirkproben vermessen werden.

III.7. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems

III.7.1. Ziele

In diesem Kapitel soll festgestellt werden, wie leistungsfähig ein Meßsystem auf der Basis der Chlorophyllfluoreszenz isolierter Thylakoide sein kann, wenn die entscheidenden technischen und biologischen Parameter speziell für dieses Meßproblem entwickelt und optimiert wurden.

Mit Hilfe dieser angepaßten Verfahrensgrundlagen können zudem die Eigenschaften der Meßmethode an sich ermittelt werden; die Ergebnisse dieses Kapitels sollen zur Aufklärung der Charakteristika des Nachweises von Triazin-Herbiziden auf der Basis der Chlorophyllfluoreszenz im Photosystem II isolierter Thylakoide beitragen.

III.7.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

Das Labormuster wurde einem eingehenden Test unterzogen. Dabei wurde folgenden Gesichtspunkten besondere Bedeutung beigemessen:

1. Charakteristische Eigenschaften von Sensoren, wie Nachweisgrenze und Nachweisempfindlichkeit, Reproduzierbarkeit der Signale, Analysendauer und Handhabung, Stabilität.
2. Einfluß der Meßbedingungen, wie Außentemperatur, Probentemperatur, Lichtverhältnisse
3. Chemische Selektivität und Matrixeffekte bei Herbizid-Wirkproben
4. Chemische Selektivität und Matrixeffekte bei Trinkwasserproben
5. Nivellierung chemischer Einflüsse

Abschließend wurde eine „reale Matrix“, hier eine Trinkwasserprobe, mit einem bekannten Herbizidgehalt aufdotiert und vermessen.

Bei der Präparation isolierter, nativer Thylakoide wird der Pellet isolierter Thylakoide in einem Standardpuffer aufgenommen, der 50 mM HEPES (Säure/Basen-Puffer, $pK_s = 7,5$ bei $T = 25\text{ °C}$) enthält.

In Vorversuchen (*Brauer, 1992*) wurde festgestellt, daß bei Zugabe von 1 ml einer Wasserprobe zur Thylakoidsuspension die resultierende Pufferkonzentration ausreicht, um den pH-Wert der Probe in einem definierten Bereich abzupuffern. Es ergab sich hierbei, daß eine pH-Unabhängigkeit der Meßmethode im Bereich von pH 6 bis pH 8,6 vorliegt.

Die absolute Konzentration des Säure/Basen-Puffers wird durch die Gefriertrocknung nicht beeinflusst. Resuspendierte, gefriergetrocknete Thylakoide enthalten daher den Säure/Basen-Puffer (HEPES) im gleichen Verhältnis zur Thylakoidkonzentration wie die Suspension gleichen Chlorophyllgehalts. Daraus folgt, daß die Bedingungen der pH-Abhängigkeit unter Verwendung einer Thylakoidsuspension auf gefriergetrocknete Thylakoide direkt übertragbar sind; da durch die Konzeption des Labormusters zur Vermessung extrem saurer oder basischer Proben jeder Zeit eine größere Menge Säure/Basen-Puffer in den Küvetten vorgelegt werden kann, ist die pH-Abhängigkeit kein prinzipielles Problem der Meßmethode; dieser Versuch wurde daher nicht wiederholt.

III.7.3. Ergebnisse und Diskussion

III.7.3.1. Auswertung der Herbizidsignale und Reproduzierbarkeit

Nach Aufnahme und Normierung der Einzelkinetiken auf F_{\max} wird bei dem in dieser Arbeit entwickelten Auswerteverfahren (siehe unter II.Einleitung: Definitionen) die Differenz zwischen Probe und Referenz gebildet.

Die folgende Abbildung zeigt ein Herbizidsignal am Beispiel von 0,5 µg/l Diuron:

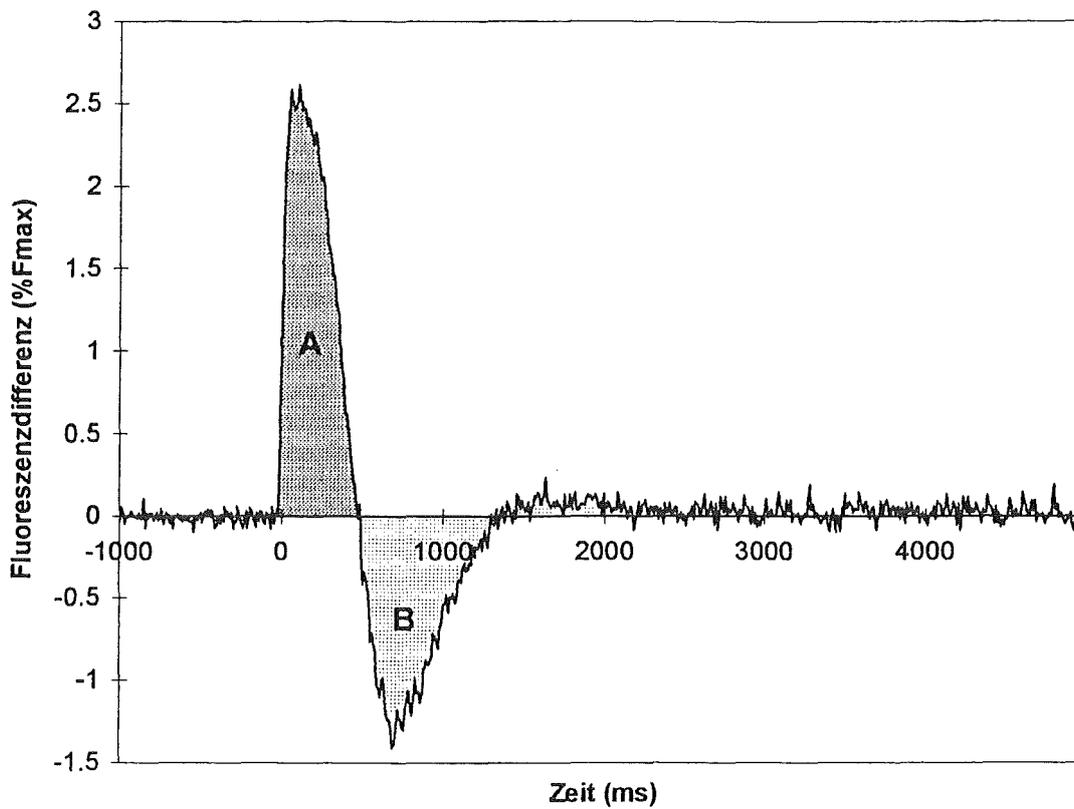


Abbildung 7-1: Herbizidsignal und Auswertung; --Signal A bezeichnet den unmittelbaren Herbizideffekt, Signal B den mittelbaren Herbizideffekt (siehe Erklärung im Text); --die absolute zeitliche Lage der Maxima und Nullstellen ist abhängig vom technischen Meßaufbau: eine Herabsetzung der Intensität des Anregungslichts führt zu einer Verbreiterung der Flächen und einer Verschiebung der Maxima zu längeren Zeiten; die Quantifizierung erfolgte daher immer unter Berücksichtigung der jeweiligen technischen Bedingungen, das heißt, nach Bestimmung der für die jeweilige Meßeinrichtung (bzw. Sensorversion) charakteristischen Lage der Maxima und Nullstellen; --das hier gezeigte Meßsignal zur Darstellung der prinzipiellen Auswertemöglichkeiten wurde mit dem Labormuster Version S2/4 aufgenommen, dessen Anregungslichtquelle einen minimal größeren Abstand zu den Küvetten aufwies als das zu Messungen verwendete Labormuster, Bedingungen ansonsten gemäß Kapitel VI, Materialien und Methoden, Messungen zur Charakterisierung

Zur Quantifizierung des Herbizidsignals können die Höhe oder Fläche der Differenzkurve verwendet werden. Abbildung 7-1 zeigt die beiden Flächen, die durch die Herbizideinwirkung entstehen. Fläche A umfaßt dabei die ersten Millisekunden der Beleuchtung, also den Bereich, in dem die Probenkinetik durch die Herbizidblockade beschleunigt wird. Fläche A beschreibt somit die unmittelbare Herbizideinwirkung. In diesem Zeitabschnitt bestimmt die schnelle Kinetik der blockierten PS II die Gesamtkinetik. Anschließend bestimmen die unblockierten PS II die Kinetik. Sie bewirken einen allmählichen Anstieg auf die maximale Fluoreszenzintensität. Gegenüber der unbelasteten Referenz ist dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität in diesem

Zeitbereich verlangsamt, da weniger unblockierte Zentren in der belasteten Probe vorliegen, und damit weniger Zentren zur Reduktion des Chinonpools beitragen; dies ist jedoch zum Erreichen des Wertes F_{\max} Voraussetzung. Fläche B ist damit nur mittelbar ursächlich mit der Herbizideinwirkung verbunden.

Im folgenden wurden Differenzkurven für 0,5 µg/l Diuron aufgenommen; hierbei wurden die Meßbedingungen konstant gehalten; um realistische Bedingungen zu schaffen, wurden verschiedene Thylakoidchargen zur Messung eingesetzt. Quantifiziert wurde jeweils über die Höhe des Signals A, die Fläche A, die Absolutwerte der Fläche B und die Summe der Absolutwerte aus Fläche A und B. Durch die Berechnung der Standardabweichung wurde die Reproduzierbarkeit des jeweiligen Auswerteverfahrens bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-1 zusammengefaßt.

	Höhe	Fläche A	Fläche B (Absolutwert)	Additive Fläche (A+absB)
Einzelwerte (%Fmax)	2,55	81,55	58,34	139,89
	2,70	92,11	61,92	154,03
	2,35	76,89	29,02	105,91
	2,40	70,50	101,93	172,43
	2,45	68,65	123,33	191,97
	2,50	92,62	18,53	111,15
	2,20	64,65	48,00	112,65
	2,35	70,86	39,45	110,31
	2,50	84,00	45,89	129,90
	2,50	58,77	73,92	132,69
Mittelwert (%Fmax)	2,45	76,06	60,03	136,09
Anzahl der Werte	10,00	10,00	10,00	10,00
Standardabweichung der Einzelwerte (%Fmax)	0,14	11,39	32,34	29,01
Standardabweichung des Mittelwertes (%Fmax)	0,04	3,60	10,23	9,17
relative Standardabweichung der Einzelwerte	5,5%	15,0%	53,9%	21,3%
relative Standardabweichung des Mittelwertes	1,8%	4,7%	17,0%	6,7%

Tabelle 7-1: Statistik: Optimale Reproduzierbarkeit bei Auswertung über die Signalhöhe bei Quantifizierung des Signals für 0,5 µg/l Diuron über die Signalhöhe oder die Signalflächen. --Bezeichnungen „Fläche A“ und „Fläche B“ gemäß Abbildung 7-1; --Quantifizierung der Fläche B über Absolutwerte; --„Additive Fläche“ aus der Addition der Absolutwerte für Fläche A und Fläche B. --Berechnung der Flächen durch Addition der Einzelwerte bis zum Nullpunkt (Schnittpunkt der Differenzkurve mit der X-Achse). --Statistik gemäß „Einleitung Definitionen, Statistik“; --Messungen im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, Charakterisierung

Wie Tabelle 7-1 zeigt, ist die relative Standardabweichung der Einzelwerte bei Quantifizierung über die *Höhe* des Signals mit 5,5 % am geringsten. Bei Quantifizierung über die Fläche A resultiert eine relative Standardabweichung von 15 %, also relative Abweichungen von fast

dem Dreifachen im Vergleich zur Quantifizierung über die Signalthöhe. Eine Quantifizierung über Fläche B oder die Addition von Fläche A und B ist aufgrund der hohen relativen Standardabweichung ($S_{\text{Einzelwert}}$ 53,9 % bzw. 21,3 %) nicht praktikabel.

Dieses Ergebnis bestätigt die oben genannten theoretischen Überlegungen, nach denen die Höhe des Signals A und die Fläche A unmittelbar die Herbizideinwirkung repräsentieren, und damit unabhängiger sind von äußeren Einflüssen und Schwankungen in den Messungen als die mittelbaren Effekte der Fläche B bzw. der Summe aus den Flächen A und B.

Die Auswertung über die Höhe des Signals A ist hierbei deutlich besser reproduzierbar als die Werte für die Signalfäche A. Dies ist darauf zurückzuführen, daß apparative Bedingungen und der Zustand der Thylakoide den Verlauf der Fluoreszenzkinetiken, und damit die Breite des Signals, beeinflussen können. So wurde beobachtet, daß mit zunehmender Alterung der Thylakoide (in Referenz und Probe parallel) die Signalbreite deutlich abnimmt; die Lage des Maximums kann sich zwar um wenige Millisekunden verschieben, die maximale Höhe bleibt jedoch bis zu einem bestimmten Zeitpunkt der Alterung konstant (siehe hierzu Abschnitt 6: Dauer der Verwendbarkeit der Rezeptoren).

Die Reproduzierbarkeit über die Höhe des Signals A ist mit 5,5 % (relative Standardabweichung der Einzelwerte; $n = 10$; Diuron 0,5 µg/l) sehr gut, auch wenn unterschiedliche Thylakoidchargen eingesetzt werden. Dieses Auswerteverfahren ist für eine zuverlässige Herbizidmessung geeignet. Im folgenden wird daher generell über die Höhe des Signals A quantifiziert.

Die gute Reproduzierbarkeit unter Verwendung verschiedener Thylakoidchargen zeigt, daß eine Nachkalibrierung mit Standardlösungen nicht notwendig ist, nachdem die Bezugskurve für die Korrelation von Höhe und Herbizidäquivalenten in die Auswerteeinheit des Sensors eingegeben wurde.

III.7.3.2. Funktionstest: Dosis-Wirkungskurve für verschiedene Herbizide

Für Diuron, Terbutylazin und Atrazin wurde jeweils die Dosis-Wirkungsbeziehung aufgenommen:

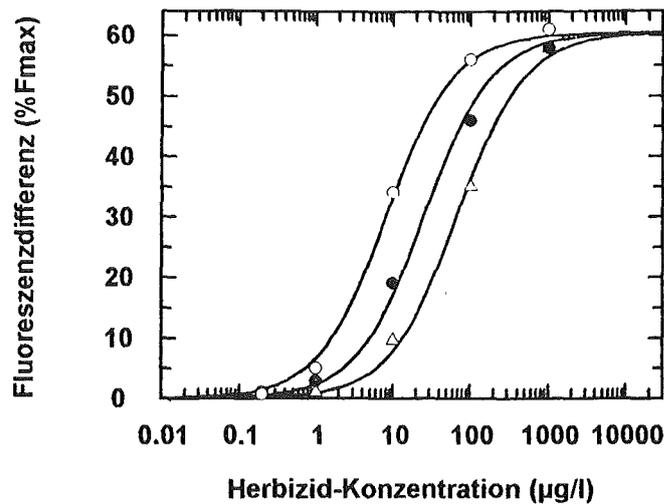


Abbildung 7-2: Dosis-Wirkungsbeziehung für Diuron (leere Kreise), Terbutylazin (ausgefüllte Kreise) und Atrazin (Dreiecke); Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden; K_1 -Werte aus der nicht-linearen Regression für halbmaximale Hemmung

Die nicht-lineare Regression der Daten ergibt K_1 -Werte von $(8.1 \pm 0.7) \mu\text{g/l}$ für Diuron, $(25.1 \pm 2.4) \mu\text{g/l}$ für Terbutylazin und $(66.9 \pm 6.1) \mu\text{g/l}$ für Atrazin in guter Übereinstimmung mit der Literatur (Tischer *et al.*, 1977). Für die Leitsubstanz dieser Arbeit, Diuron, ergibt sich der relative K_1 -Wert als Verhältnis des Literaturwertes (Tischer *et al.*, 1977: K_1 (Diuron): $9 \mu\text{g/l}$) zum mittleren, gemessenen Wert zu K_1 (rel) = 90 %.

Der Sensor kann also Aufschluß geben über die biologische Wirksamkeit einer Herbizidprobe oder eines neu entwickelten Herbizides auf Thylakoide. Die K_1 -Werte neuer Herbizide können genau bestimmt werden (siehe auch 4., „Empfindlichkeit und Nachweisgrenze“).

Für Diuron ergibt sich eine besonders große Änderung der Signalhöhe im Bereich von 1 bis $100 \mu\text{g/l}$. Messungen in diesem Bereich sind auch mit einfacheren Meßgeräten möglich. Messungen unter $1 \mu\text{g/l}$ setzen jedoch eine optimale Meßtechnik und ein optimales Meßverfahren voraus. Welche Nachweisgrenzen mit dem entwickelten Labormuster erreicht werden können, wird mit den nächsten Abschnitten dargestellt.

III.7.3.3. Justage und Grundlinie

Ein Unterschied in der Anregungsintensität wird eine Abweichung der Grundlinie von Null zur Folge haben: Thylakoide, die stärker beleuchtet werden, erreichen den Wert der Lichtsättigung (F_{max}) schneller, als die schwächer beleuchteten Thylakoide. Dies ist gleichbedeutend mit einem Unterschied des Verlaufs der Fluoreszenzkinetiken.

Für eine Messung von Herbizidgehalten unter $1 \mu\text{g/l}$ Diuron muß die Lichtintensität der Anregung in beiden Küvetten exakt ausbalanciert werden. Hierzu wurde eine Thylakoidsuspension aliquotiert und in beide Behältnisse pipettiert; nach Verschieben der Anregungslichtquelle in x-Richtung gegen die Küvetten („Justage“, vergl. Kapitel III.6. Labormuster) wurde die Differenz der Fluoreszenzkinetiken bestimmt. Ist die Lichtintensität der Anregung in beiden Küvetten gleich, sollten identische Fluoreszenzkinetiken gemessen werden. Nach Differenzbildung resultiert dann eine „glatte“ Grundlinie bei Null, das heißt, die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenzintensität ist in beiden Küvetten gleich.

Trotz Justage wird jedoch eine Standardabweichung der Grundlinienschwankung von $0,2 \%F_{\text{max}}$ festgestellt. Diese Abweichung ist äußerst gering, und kann nur aufgrund der optimierten Meßtechnik detektiert werden. Die einzelnen, möglichen Ursachen und Voraussetzungen zur Minimierung der Grundlinienabweichung werden im folgenden kurz diskutiert.

Diskussion zu Ursachen der Grundlinienabweichung nach Justage

Wenn man voraussetzt, daß die Justage mit der optimierten Justiereinrichtung tatsächlich erfolgreich ist, und in beiden Küvetten dieselben Lichtintensitäten resultieren, verbleiben für die Optik Unterschiede im Verhalten des biologischen Materials oder Unterschiede auf der Detektionsseite, die diese Grundlinienverschiebung verursachen können.

Die für die Justage verwendete Thylakoidsuspension in Puffer wird aus gefriergetrockneten Thylakoiden in einer größeren Menge jeweils unmittelbar vor der Messung angesetzt und nach gründlicher Verteilung der Thylakoide aliquotiert. Unterschiede im biologischen Material sind damit weitgehend ausgeschlossen.

Ein abweichender Offset (Dunkelstrom) der beiden Photodioden wird subtrahiert und damit durch das Auswerteverfahren eliminiert (siehe unter II. Einleitung: Auswerteverfahren).

Wie im Kapitel Meßtechnik bereits diskutiert, wird das Anregungslicht an den Thylakoiden gestreut und kann so auf den Detektor gelangen. Trotz der optimierten Filtersysteme kann ein geringer Streulichtdurchbruch bei der Verwendung eines 655nm Diodenlasers nicht verhindert werden. Dieser Streulichtdurchbruch besteht als additiver Untergrund unter den Einzelkinetiken und wird durch das Auswerteverfahren nur dann eliminiert, wenn er in beiden Kanälen gleich ist. Ist dieser Streulichtdurchbruch in beiden Küvetten aufgrund optischer Unterschiede (beispielsweise durch die verwendeten Küvetten) verschieden, kann bei der

Differenzbildung eine minimale Grundlinienverschiebung auftreten; es existiert eine Justageposition, mit der der Streulichtdurchbruch in beiden Kanälen ausgeglichen werden kann; jedoch ist diese Position nicht zwingend identisch mit der optimalen Justageposition zum Ausbalancieren der Anregungslichtintensität in beiden Behältnissen. Die Abweichung von Null durch unterschiedlichen Streulichtdurchbruch wird dann durch die Justage nicht ausgeglichen.

Um beurteilen zu können, ob diese Unterschiede groß genug sind, um die beobachtete Grundlinienabweichung zu erklären, müßte der Streulichtdurchbruch quantifiziert werden. Das Streulicht entsteht jedoch in erster Linie an den Thylakoiden, welche bei Beleuchtung fluoreszieren werden, so daß die Quantifizierung des Streulichts nicht ohne weiteres durchgeführt werden kann.

Ein Hinweis darauf, daß diese These die Grundlinienverschiebung erklären kann, ist das Resultat bei der Verwendung von blauen NSB-LEDs zur Anregung. Die niedrigeren Werte für $F_{\min, \text{norm}}$ beweisen, daß der Streulichtdurchbruch hierbei geringer ist als bei dem Diodenlaser. Nach intensiven Justageversuchen kann hier in den ersten 100 ms eine glatte Grundlinie erzeugt werden. Durch die niedrigere Lichtemission der LEDs ist es jedoch notwendig, zur Anregung mindestens zwei blaue NSB-LEDs zu verwenden. Durch Überschneidungen entstehen dabei optische Inhomogenitäten im Strahlkegel, die die Durchführung der Justage erheblich komplizieren. Die praktische Durchführbarkeit der Justage bei Verwendung blauer NSB-LEDs muß in weiterführenden Versuchen technisch perfektioniert werden, um mit diesem System Analysen durchführen zu können (vergl. Kapitel III.5. Meßtechnik).

Schlußfolgerungen zu Justage und Grundlinie bei der Charakterisierung des Sensors

Die Charakterisierung der Meßmethode wird von der minimalen Grundlinienabweichung nicht beeinflußt, wenn wie folgt verfahren wird:

Um unter möglichst objektiven Bedingungen die Leistungsfähigkeit der Meßmethode zu eruieren, wird zunächst justiert, die verbleibende (minimale) Grundlinienverschiebung festgestellt, und anschließend dieser „Blindwert“ vom Meßwert subtrahiert. Damit sind die Ergebnisse unabhängig vom Operator und dessen Geschicklichkeit beim Justieren, sowie unabhängig von den optischen Eigenschaften in beiden Probekanälen sowie von den verwendeten Einmalküvetten.

Bei der Ermittlung der Charakteristika des Sensors wird bezüglich realer Proben im folgenden zwischen Wirkproben (Herbizid in einem Lösungsmittel, zur Ermittlung der Eigenschaften des

Herbizides) und Trinkwasserproben (als Beispiel für hochverdünnte Umweltproben) unterschieden.

III.7.3.4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der größtmöglichen Empfindlichkeit und der unteren Nachweisgrenze wurde Diuron ausgewählt. Diuron zeigt die stärkste Hemmwirkung der für diese Arbeit ausgewählten Leitsubstanzen und gilt als eines der stärksten PS II Herbizide (Tischer *et al.*, 1977).

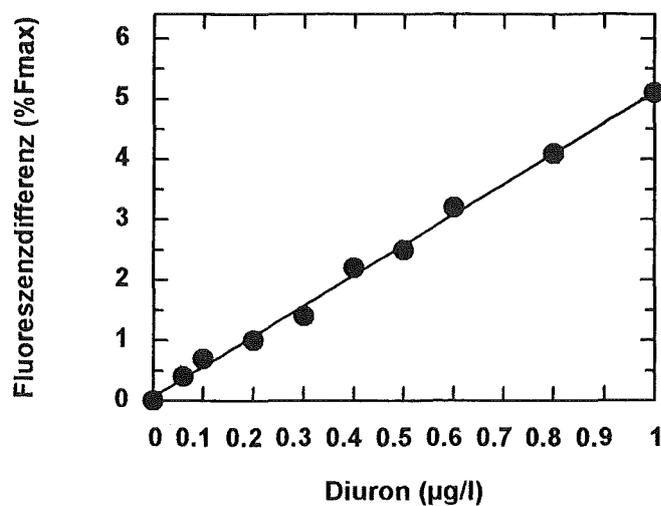


Abbildung 7-3: Kalibrierkurve für $c \leq 1 \mu\text{g/l}$ Diuron; Aufgetragen ist die Diuronkonzentration der Probe gegen die maximale Höhe, wie unter „Auswertung der Herbizidsignale und Reproduzierbarkeit“, Seite 107, beschrieben. Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden; --man erkennt, daß sich die Meßwerte (Mittelwerte aus drei Messungen) im angegebenen Bereich mit einer linearen Kalibrierkurve beschreiben lassen.

Aus Abbildung 7-3 ergibt sich, daß sich die Meßwerte mit einer linearen Kalibrierkurve für den Bereich bis $1 \mu\text{g/l}$ Diuron beschreiben lassen. Die Abweichung von Null ist mit $0.076 \%F_{\text{max}}$ sehr gering, und entspricht der Abweichung des Rauschens um den Nullwert. Die lineare Regression ergibt einen Korrelationskoeffizienten von $0,9979$; somit lassen sich die Meßwerte im Bereich bis $1 \mu\text{g/l}$ sehr gut mit einer Geraden korrelieren.

Die Empfindlichkeit der Diuronbestimmung in diesem Konzentrationsbereich wird aus der Steigung der Geraden abgeleitet:

$$\text{Empfindlichkeit } E_{\text{Diuron } (\leq 1\mu\text{g/l})} = 5,02 \%F_{\text{max}} / \mu\text{g/l}$$

Die folgende Abbildung zeigt ein Einzelsignal für 0,1 µg/l Diuron:

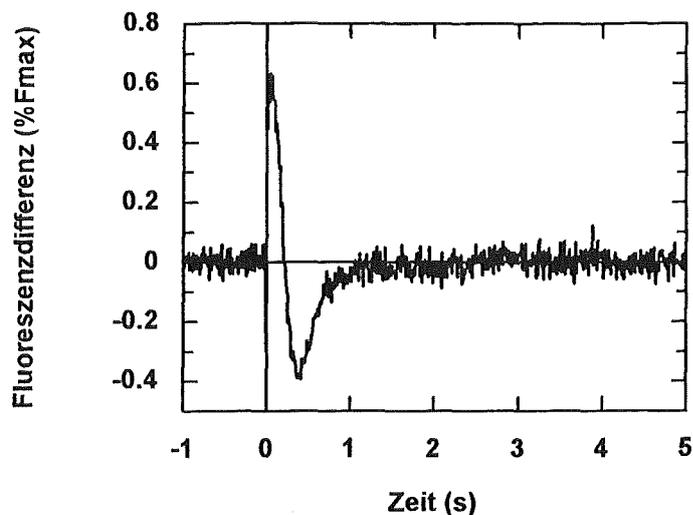


Abbildung 7-4: Signal für 0,1 µg/l Diuron; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden „Messungen zur Charakterisierung“; man erkennt den charakteristischen zeitlichen Verlauf eines Herbizidsignals, das sich deutlich vom apparativen Rauschen abhebt.

Aus dem Signal/Rausch-Verhältnis errechnet sich (siehe unten), daß die Nachweisgrenze der Methode an sich deutlich unter den gezeigten 0,1 µg/l Diuron liegt.

Für die praktischen Messungen der Spurenanalytik limitierend ist die Schwankung in der Grundlinie nach Justage. Wie im Kapitel „Realisierung des Labormusters“ (siehe unter III.6.) beschrieben, kann bei der Vermessung von Wirkproben diese Grundlinienschwankung quantifiziert und subtrahiert werden, während dies bei der Spurenanalytik nicht möglich ist. Die Nachweisgrenze der Messung wird daher für die verschiedenen Anwendungsbereiche gesondert berechnet.

Hierfür wird das in der Spurenanalytik gängige Verfahren angewandt (*Schwedt, 1992*), wonach sich die Nachweisgrenze aus dem Dreifachen der Standardabweichung des Blindwertes plus dem Blindwert abschätzen läßt.

Mit diesen Voraussetzungen ergeben sich folgende Berechnungen der minimalen Höhen, die mit statistischer Sicherheit mit einem Herbizidgehalt der Probe korreliert werden können:

Mit:

BW = Blindwert (konstanter, additiver Wert)

Sb = Standardabweichung des Blindwertes

H_{min} = minimale Höhe zur Korrelation mit einem Herbizidgehalt: $H_{min} = 3 * Sb + BW$

wurden folgende Fälle betrachtet:

1. Fall: H_{min} für den Fall, daß die Schwankungen um den Blindwert nur durch das Rauschen bestimmt werden, also der minimale Einfluß auf die Nachweisgrenze der Methode an sich besteht:

$$H_{min} (\%F_{max}) = 3 * Sb_{Rauschen} + BW = (3 * 0.075 + 0) \%F_{max}$$

2. Fall: H_{min} für den Fall, daß die Messung jeweils ohne vorherige Justage durchgeführt wird (Grundlinienabweichung nicht vor jeder Messung quantifizierbar), mit einer Standardabweichung der Grundlinienschwankung von 0,2 %F_{max}.

Beispiel: Herbizidbestimmung in hochverdünnter Proben (Spurenanalytik)

$$H_{min} (\%F_{max}) = 3 * Sb_{Grundlinie} + BW = (3 * 0.2 + 0) \%F_{max}$$

3. Fall: H_{min} für den Fall, daß vor der Messung jeweils die Grundlinienverschiebung (GLV) bestimmt wird und vom Meßwert subtrahiert wird, mit einer Standardabweichung der Hintereinandermessung von 0,1 %F_{max}.

Beispiel: Messungen zur Charakterisierung; Messung der biologischen Wirksamkeit konzentrierter Herbizid-Proben (Wirkproben).

$$H_{min} (\%F_{max}) = 3 * Sb_{GLV} + GLV - GLV = (3 * 0.1 + 0) \%F_{max}$$

Tabelle 7-2: Betrachtung verschiedener Anwendungsgebiete des Sensors und Berechnung der Nachweisgrenze

In Tabelle 7-3 sind die Ergebnisse dieser Berechnungen zusammengefaßt; es sind jeweils die minimalen Höhen in %F_{max} dargestellt, die mit einer Herbizideinwirkung korreliert werden können; mit Hilfe der Bezugskurve (Abbildung 7-3) wurden daraus die Nachweisgrenzen für Diuron berechnet.

	Standardabweichung Höhe (%Fmax)	minimale, korrelierbare Höhe H _{min} (%Fmax)	Nachweisgrenze für Diuron (µg/l)
Fall 1 (nur Rauschen) „Methode“	0,075	0,23	0,03
Fall 2 (unbekannte Grundlinienschwankung) „Spurenanalytik“	0,2	0,6	0,10
Fall 3 (Abzug der Grundlinienschwankung) „Wirkproben“	0,1	0,3	0,04

Tabelle 7-3: Minimal korrelierbare Höhen und Nachweisgrenzen für Diuron für verschiedene Anwendungsgebiete des Sensors

Nachweisgrenzen für Diuron

Wird die Messung nur vom Grundrauschen beeinflusst, kann die Nachweisgrenze der Methode zu 0,03 µg Diuron/l abgeschätzt werden.

Besteht keine Möglichkeit, die Grundlinienschwankung zu subtrahieren, ergibt sich eine Nachweisgrenze von 0,10 µg/l.

Unter den Bedingungen der in diesem Kapitel durchgeführten Messungen, das heißt, nach Abzug des Blindwertes, besteht eine Nachweisgrenze für Diuron von 0,04 µg/l.

Eine gängige Vergleichssubstanz in der Herbizidanalytik ist Atrazin. Für Atrazin ergibt sich für den Bereich bis 0.6 µg/l folgende Bezugskurve: $y = 2.029x + 0.043$

Hieraus errechnet sich für Atrazin eine Nachweisgrenze von 0,27 µg/l für die Spurenanalytik, und 0,13 µg/l für die Wirkanalytik.

In reinen Herbizid-Lösungen gelingt es also, ohne jede Anreicherung Diuron im Bereich des Grenzwertes der Trinkwasserverordnung nachzuweisen. Bei dem Vergleich mit anderen Meßsystemen auf der Basis der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports (vergleich II. Einleitung) zeigt sich, daß eine gezielte Optimierung der Meßbedingungen zu einer wesentlichen Verbesserung der Nachweisgrenze geführt hat. So wird für das Algen-Fluoreszenz-Autometer eine Nachweisgrenze für Atrazin unter idealen Bedingungen von 32,5 µg/l angegeben (Sayk et al., 1986); damit ist sie dort 100 mal höher als die in der

vorliegenden Arbeit mit dem miniaturisierten Meßsystem erreichte Nachweisgrenze für die Spurenanalytik von Atrazin.

III.7.3.5. Analysendauer

Parameter	Zeit (s)
Reoxidation	20
Anregung	5
Analysendauer	25

Tabelle 7-4 Analysendauer für eine Messung im Labormuster; Die Gesamtdauer ergibt sich durch Addition der Rechenzeit (15 s) zu 40 s

Im Sensor beträgt die Analysendauer, wie Tabelle 7-4 zeigt, nur 40 Sekunden einschließlich der Rechenzeit für die Datenerfassung und die Bildung der Differenzkurven. Hierdurch erhält man ein auswertbares Herbizidsignal.

Für maximale Empfindlichkeit des Nachweises muß der Meßzyklus jedoch wiederholt werden. Hierbei zeigt sich, daß die maximale Höhe des Signals nach 3 Meßzyklen erreicht ist und dann stabil bleibt. Die eigentliche Analysendauer für eine Herbizidbestimmung mit maximaler Empfindlichkeit errechnet sich damit zu 75 Sekunden. Unter Berücksichtigung der Zeit für Datenverarbeitung und -auswertung ergibt sich daraus eine Gesamtanalysendauer mit dem Labormuster von 90 Sekunden. Diese Zeitspanne ist im Vergleich zu einer konventionellen Herbizid-Analyse sehr kurz.

Diskussion zur Ursache des Signalwachstums

Da einfaches Abwarten von 90 Sekunden nicht zu einer Erhöhung des Signals führt, muß davon ausgegangen werden, daß die Belichtung einen Einfluß auf die Empfindlichkeit des Nachweises hat. Selbst unter der Voraussetzung, daß Anregung und Reoxidation möglichst vollständig ablaufen, kann das Wachstum des Signals durch die Konkurrenz zwischen dem Herbizid und Q_B^- (im Gegensatz zu Q_B) an der Herbizidbindestelle erklärt werden: Bei einigen PS II-Zentren ist an der Bindestelle bei Zugabe des Herbizides Q_B^- (aufgrund der sehr hohen Bindekonstante) noch gebunden, das erst bei der Belichtung durch Bildung von QH_2 die Herbizidbindestelle verläßt (Urbach et al. 1984). Diese Reaktion ermöglicht es schließlich den PS II-Zentren, Herbizide aufzunehmen, wodurch die Hemmwirkung erst bei mehrmaligem Belichten maximal wird.

III.7.3.6. Dauer der Verwendbarkeit der Rezeptoren

Im Kapitel III.2. Stabilisierung wurde festgestellt, daß gefriergetrocknete Thylakoide wesentlich langsamer altern als die native Suspension. Für den Biosensor ist insbesondere die Verwendbarkeit der biologischen Rezeptoren interessant.

Die Dauer der Verwendbarkeit der biologischen Rezeptoren wird als der Zeitraum definiert, in dem die Signalhöhe für eine gegebene Herbizidkonzentration innerhalb eines Bereiches von $\pm 10\%$ konstant bleibt.

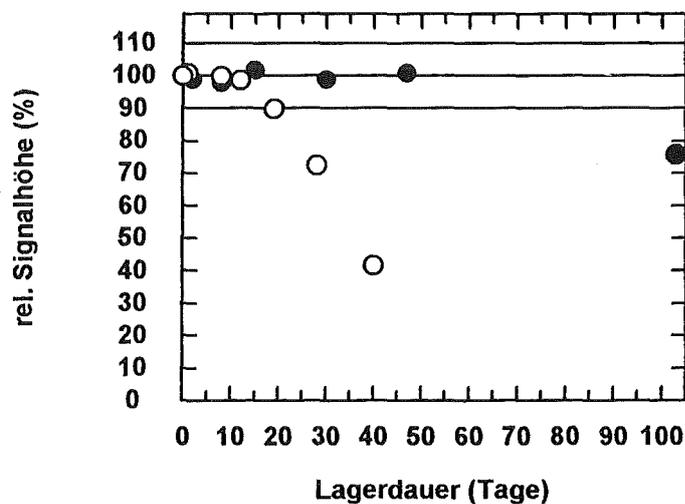


Abbildung 7-5: Veränderung der relativen Signalhöhe des 1 µg/l Diuron-Signals mit der Lagerdauer gefriergetrockneter Thylakoide bei 25°C (leere Kreise) und bei 4°C (ausgefüllte Kreise); --relative Signalhöhe bezogen auf die Signalhöhe unmittelbar nach der Gefriertrocknung; --jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen; --Querbalken markieren (90, 100 und 110) %; --Verwendbarkeit als Schnittpunkt der Alterungskurve mit der 90% Linie: 19 Tage für Lagerung bei 25 °C, etwa 80 Tage bei Lagerung bei 4 °C; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“; --Thylakoide gefriergetrocknet nach dem optimierten Verfahren aus Kapitel III.2. mit Stabilisator Saccharose:Sorbitol äquimolar

Die optimierten Thylakoidpulver (siehe Kapitel III.2. Stabilisierung von Thylakoiden) sind für Messungen bei 1 µg/l Diuron bei 25 °C 19 Tage lang verwendbar. Werden die Thylakoidpulver im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt, läßt sich aus Abbildung 7-5 eine Verwendbarkeit von 80 Tagen ermitteln.

Tabelle 7-5 zeigt, daß diese Werte gut reproduziert werden können:

Verwendbarkeit bei Lagerung bei 25 °C (Tage)	
Einzelwerte	19
	21
	18
Mittelwert, gerundet	19

Tabelle 7-5: Verwendbarkeit gefriergetrockneter Thylakoide; –Lagertemperatur 25 °C;–Gefriertrocknungs-Chargen mit Puffer Saccharose:Sorbitol 1:1; –Verwendbarkeit: Zeit bei 90% der Signalthöhe

Abbildung 7-6 zeigt, daß die Signalthöhe für Thylakoide, die bei -30 °C (Tiefkühltruhe) gelagert werden, mindestens 9 Monate konstant bleibt:

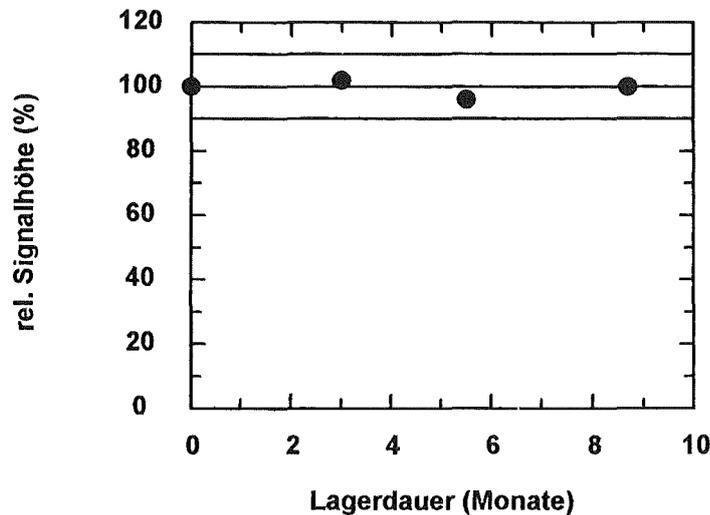


Abbildung 7-6: Verwendbarkeit gefriergetrockneter Thylakoide bei Lagerung bei -30 °C (Tiefkühltruhe); --relative Signalthöhe in % bezogen auf die Signalthöhe für 1 µg/l Diuron unmittelbar nach der Gefriertrocknung; --jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen; --Querbalken markieren (90, 100 und 110) %; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“; --Thylakoide gefriergetrocknet nach dem optimierten Verfahren aus Kapitel III.2. mit Stabilisator Saccharose:Sorbitol äquimolar; --man erkennt keine signifikante Änderung der Signalthöhe innerhalb von 9 Monaten.

Diskussion: Stabilität der Signalthöhe

In Kapitel III.2 „Stabilisierung von Thylakoiden - Gefriertrocknung“ wird gezeigt, daß die Fluoreszenzaktivität (berechnet aus dem Verhältnis F_{min} / F_{max}) innerhalb von 20 Tagen auf 70 % absinkt. In dieser Diskussion soll erklärt werden, warum trotz des Aktivitätsabfalls die Signalthöhe für 1 µg/l Diuron in diesem Zeitraum konstant bleibt.

Die Abnahme der Fluoreszenzaktivität ist definitionsgemäß gleichbedeutend mit einer Zunahme des Verhältnisses F_{min} / F_{max} . Normiert man die Kinetiken auf F_{max} (siehe Definition:

Auswerteverfahren), so folgt, daß die relative Anfangsfluoreszenzemission F_{\min}^{norm} mit zunehmender Alterung wächst.

Durch Herbizide wird die Fluoreszenzkinetik beschleunigt. Dies bedeutet, daß innerhalb der ersten einhundert Millisekunden die Fluoreszenzemission gegenüber der unbelasteten Referenz erhöht wird. Für die Differenzkurve resultiert ein Herbizidsignal mit einer definierten Höhe, die nur von der Herbizidkonzentration abhängt.

Man beobachtet im Verlauf der Alterung der Thylakoide, daß es einen Zeitpunkt t_{Limit} gibt, an dem der Wert F_{\min}^{norm} so stark erhöht ist, daß mit zusätzlicher Fluoreszenzemission durch die Herbizidblockade der Wert F_{\max} erreicht ist. Für jeden späteren Zeitpunkt ergibt sich aus der Addition der Fluoreszenzemission aus Alterungseffekt und Herbizideffekt eine theoretische Gesamtintensität, die größer als F_{\max} wäre. In der Differenzkurve äußert sich dies in einer Abnahme der Signalhöhe für die festgelegte Herbizidkonzentration ab dem Zeitpunkt t_{Limit} .

Schlußfolgerungen für die Verwendbarkeit

Daraus folgt, daß die Stabilität, die in Abbildung 7-5 für 1 µg/l Diuron gezeigt wurde, mindestens auch für alle Konzentrationen kleiner 1 µg/l Diuron gilt; sie ist außerdem übertragbar auf andere Herbizide: 19 Tage lang können die Thylakoide für die Detektion von Herbizidsignalen verwendet werden, die mit einer Signalhöhe korreliert werden, die kleiner oder gleich einer Höhe von 5 % F_{\max} sind. Da Diuron einer der effektivsten Hemmstoffe ist, sind dies im allgemeinen Konzentrationen über 1 µg/l Herbizid.

Unter Berücksichtigung des Grenzwertes der TrinkwV von 0,1 µg/l Herbizid ist die Verwendbarkeit von 19 Tagen bei 25 °C daher bei weitem ausreichend für Feldversuche. Die Lagerdauer von 80 Tagen im Kühlschrank ist vergleichbar mit gängigen Enzymtestkits, und für den Anwender praktikabel.

III.7.3.7. Proben-und Außentemperatur

Ein Sensor, der außerhalb des Labors bei Feldmessungen eingesetzt wird, ist größeren Temperaturschwankungen ausgesetzt als ein Laborgerät. Die Temperatur der Probe kann je nach Herkunft (Brunnen, Oberflächengewässer) stark variieren. Entsprechend sollte die Empfindlichkeit der Messung über einen größeren Temperaturbereich konstant sein.

Die Versuchsreihen zur Ermittlung des Temperatureinflusses wurde als Feldversuch durchgeführt; im Labor kann die gewünschte Probentemperatur mit Hilfe eines Temperierbades

zwar exakt eingestellt werden. Jedoch gleicht sie sich in den wenigen Minuten der Probennahme und -Vorbereitung (Pipettieren eines Probevolumens von 1 ml) der Raumtemperatur an, so daß unter diesen Bedingungen bestenfalls bei verschiedenen, unbekanntem Temperaturen zwischen Raum und Probe, meistens jedoch bei immer derselben Temperatur - nämlich der Raumtemperatur - gemessen würde.

Bei Feldmessungen während der Probennahme gleicht sich die Probentemperatur der Umgebungstemperatur ebenso an. Entscheidend für die Beurteilung der Einsatzbedingungen des Sensors ist also der Schwankungsbereich der Umgebungstemperatur und nicht die eigentliche Probentemperatur eines Brunnens oder Gewässers.

Bei Feldmessungen ergab sich folgendes Ergebnis:

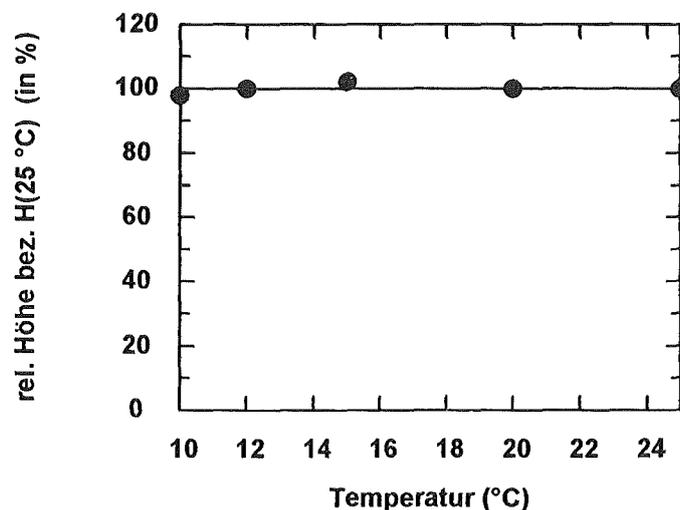


Abbildung 7-7: Temperaturkonstanz der Signalhöhe von 10 °C...25 °C; --relative Höhe in % der Signalhöhe bei 25 °C; --Mittelwerte aus drei Messungen; --Messung im Labormuster, Bedingungen außer Meßtemperatur gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden „Messungen zur Charakterisierung“; --man erkennt eine konstante Signalhöhe im Meßbereich (10...25 °C).

Im Bereich von (10...25) °C ist die Signalhöhe konstant und unabhängig von der Proben- bzw. Umgebungstemperatur.

III. 7.3.8. *Variierende Lichtverhältnisse bei der Probenvorbereitung*

Alterung und Zustand der Thylakoide sind abhängig von den Lichtverhältnissen, denen sie ausgesetzt sind. Grundsätzlich müssen sie daher im Dunkeln bzw. in lichtundurchlässigen Behältern gelagert werden. Bei der Probenvorbereitung werden die Thylakoide dem Umgebungslicht ausgesetzt. Die Methode der Reoxidation (siehe Kapitel „Beschleunigung der Reoxidation“) wurde eingeführt, um die Thylakoide vor jeder Messung unbeachtet ihrer Vorbehandlung auf einen definierten Ausgangszustand zu bringen.

In dieser Versuchsreihe wurde am Beispiel von 0,5 µg/l Diuron getestet, ob die Signalhöhe tatsächlich unabhängig von den Lichtverhältnissen bei der Probenvorbereitung ist. Für die Probenvorbereitung, die die Zugabe von Probe und Referenz, sowie das Mischen beinhaltet, werden im allgemeinen weniger als zwei Minuten benötigt. Um eine genügend große Sicherheitsspanne zu berücksichtigen, wurde die Dauer der Probenvorbereitung in dieser Versuchsreihe auf konstant 5 Minuten festgelegt.

	Probenvorbereitung dunkel	Probenvorbereitung hell
Signalhöhe in %F _{max} Mittelwert (gerundet) ; n = 5	2,48	2,43
relative Standardabweichung des Mittelwertes für n=5	2,6 %	2,1 %
relative Standardabweichung der Einzelwerte (n=5)	5,8 %	5,1 %

Tabelle 7-6: Signalhöhe für 0.5 µg/l Diuron (Mittelwerte) bei versch. Lichtverhältnissen. --Berechnet wurde jeweils der Mittelwert aus 5 Messungen und die relativen Standardabweichungen gemäß Einleitung, „Statistik“; --Probenvorbereitung dunkel: Probenzugabe im dunklen Raum unter Abdunklung mit einem schwarzen Tuch; --Probenvorbereitung hell: Probenzugabe bei Tageslicht. --Dauer der Probenvorbereitung $t = \text{konst.} = 5$ Minuten.

Der Mittelwert für die Signalhöhe bei 0,5 µg/l Diuron beträgt 2,48 %F_{max} bzw. 2,43%F_{max}. Nach dem t-Test ist dieser Unterschied nicht signifikant (Signifikanz-Test mit P (0,1); siehe Einleitung, Statistik). Auch die Standardabweichungen unterscheiden sich gemäß der Varianz-Verhältnisverteilung nicht signifikant. Es gelingt also, unabhängig von der Vorbehandlung der Thylakoide vor jeder Messung durch die lichtinduzierte Reoxidation identische Ausgangsbedingungen (Oxidationszustände) herzustellen.

Die Probenvorbereitung beschränkt sich im allgemeinen auf das Zupipettieren der Lösung und das Mischen der Suspension; die dieser Versuchsreihe zugrundegelegte Zeitdauer von 5 Minuten wird dabei in der Praxis nicht überschritten, sondern eher weit unterschritten werden.

Die Herbizidbestimmung mit dem Biosensor ist somit unabhängig von den Lichtverhältnissen bei der Probenvorbereitung.

Zur Charakterisierung der Meßmethode für die Analyse realer Proben wird im folgenden zwischen Wirkproben und Trinkwasserproben (Spurenanalytik) unterschieden.

III.7.3.9. Chemische Selektivität und Matrixeffekte bei der Untersuchung von Wirkproben: maximale Ethanolkonzentration

Proben zur Bestimmung der biologischen Wirksamkeit eines unbekanntes oder neu entwickelten Herbizides bestehen aus einem geeigneten Lösungsmittel und dem Herbizid selbst. Das Lösungsmittel kann im Rahmen der Löslichkeit des Herbizides so ausgewählt werden, daß die Wirkbestimmung mit dem Biosensor möglich und unbeeinflusst ist. Außer dem Herbizid und dem Lösungsmittel könnten daher nur Abbauprodukte des Herbizides einen zusätzlichen Meßeffect bewirken. Da diese Abbauprodukte zur Gesamtwirksamkeit der Herbizidprobe beitragen, ist dieser Meßeffect erwünscht.

Störende, chemische Verbindungen, die mit der Q_B -Bindestelle wechselwirken, also Querempfindlichkeiten im eigentlichen Sinne, sind daher in Wirkproben nicht zu erwarten.

Unter den Matrixeffekten sind lediglich die verwendeten Lösungsmittel zu untersuchen. Als Lösungsmittel für Phenylharnstoffderivate und Triazine haben sich Alkohole, insbesondere Ethanol, bewährt. Für Untersuchungen von Wirkproben ist es daher bedeutend, den Konzentrationsbereich zu kennen, in dem Ethanol die Messung beeinflussen würde.

Alkohole verändern in höheren Konzentrationen die Thylakoidmembranen. Proteine werden denaturiert, und die Struktur der Lipidmembranen werden verändert.

Mit dem folgenden Versuch wurde getestet, welcher resultierende Ethanolgehalt (Vol%) in der Küvette für Herbizidmessungen im Biosensor maximal verwendet werden kann.

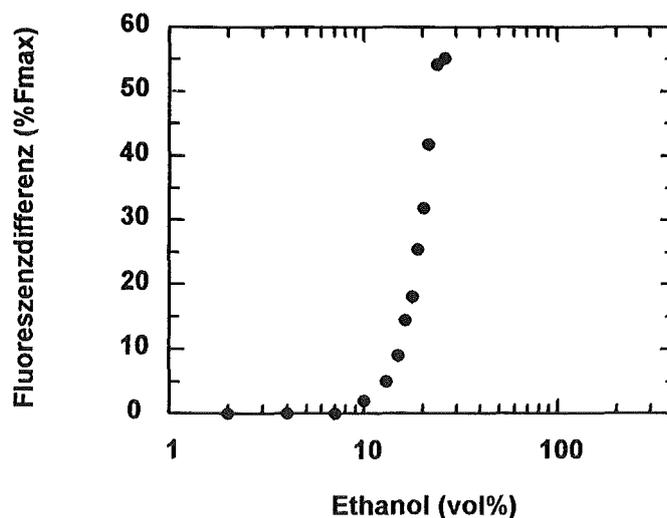


Abbildung 7-8: Einfluß durch Ethanol; Messung durch Pipettieren kleinster Ethanolmengen zur Thylakoidsuspension im Probengefäß und Messung gegen Suspension als Referenz. Die Messung wurde in einer ersten Sensorversion S1/4 durchgeführt; -- Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden „Messungen zur Charakterisierung“

Unter 5 Vol% Ethanol in der Probenküvette kann keine Wirkung durch Ethanol nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden Ethanolkonzentrationen von maximal 0,5 Vol% Ethanol

verwendet, das heißt, Diuron wurde in Ethanol gelöst und maximal Volumina von 5 µl zu 995 µl Thylakoidsuspension pipettiert. Die maximal nachweisbare Wirkung eines Herbizides ist damit abhängig von der Löslichkeit des Herbizides bzw. dem verwendeten Lösungsmittel. Die für die Wirkmessung im Biosensor optimalen Konzentrationen und Lösungsmittel können für jedes unbekanntes Herbizid schnell bestimmt werden.

Randbemerkung:

Aus der oben gezeigten Dosis-Wirkungskurve erkennt man, daß die Signalhöhe zwischen (10...30) Vol% Ethanol stark wächst. Beispielweise läßt sich für den Bereich zwischen (12...18) Vol% Ethanol berechnen, daß Änderungen von 0.2 Vol% Ethanol in diesem Bereich detektiert werden könnten. Dies bezieht sich natürlich nur auf reine Ethanol-Lösungen. Genauere, weiterführende Untersuchungen könnten Aufschluß darüber geben, inwieweit dieser Sensor, bzw. ein einfacherer Sensor, dessen Wirkprinzip auf der Reaktion von Ethanol mit Lipidmembranen beruht, zu Ethanoldetektion eingesetzt werden kann.

III. 7.3.10. Chemische Selektivität bei der Untersuchung von Trinkwasser:

Nicht-herbizidische Triazine

PSII-Herbizide sind von ihrer Struktur her eine sehr heterogene Gruppe. Andererseits gibt es strukturverwandte Verbindungen, die nicht als Herbizide eingesetzt werden, da sie praktisch keine herbizidische Wirkung haben. Hierzu gehören die Triazine DMT (2,4-Dichlor-6-Methylthio-1,3,5-Triazin), das als optischer Aufheller in Waschmitteln Anwendung findet, und TMT (Trithiocyanursäure), das in der Metallindustrie und bei der Rauchgaswäsche zum Ausfällen von Schwermetallen verwendet wird. Beide Substanzen können in das Trinkwasser gelangen und sind bei strukturbezogenen Nachweismethoden schwer von Triazin-Herbiziden zu unterscheiden (zum Vergleich der chemischen Strukturen siehe II. Einleitung).

Die Detektion von Herbiziden über ihre Wirkung hat theoretisch vor den strukturabhängigen Nachweismethoden den Vorteil, zwischen diesen strukturähnlichen Verbindungen unterscheiden zu können.

In diesem Versuch wurden daher die Dosis-Wirkungsbeziehungen für DMT und TMT aufgenommen und die daraus ermittelten K_I -Werte mit den K_I -Werten von Triazin-Herbiziden

verglichen. Je kleiner die K_I -Werte sind, desto empfindlicher reagieren die Thylakoide auf das Triazin.

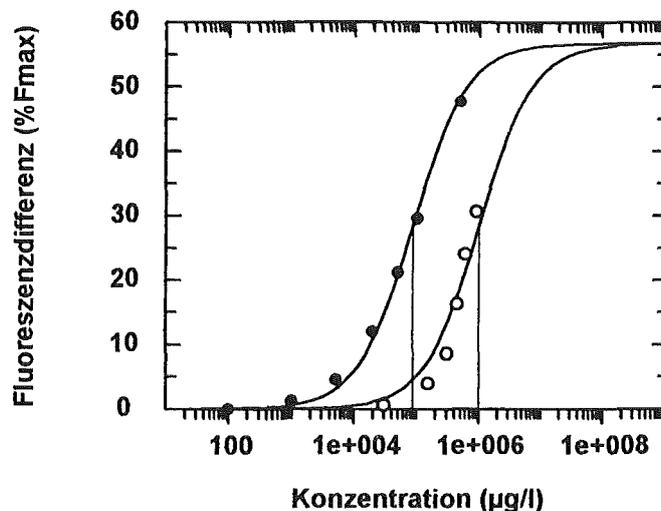


Abbildung 7-9: Dosis-Wirkungsbeziehung für nicht-herbizidische Triazine; --ausgefüllte Kreise TMT, leere Kreise DMT; senkrechte Markierung bezeichnet die halbe Hemmung zur Bestimmung des K_I -Wertes; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden „Messungen zur Charakterisierung“;

Triazin	K_I -Wert ($\mu\text{g/l}$)
DMT	$9,9 \cdot 10^6$
TMT	$8,6 \cdot 10^5$
Terbutylazin	$2,5 \cdot 10^1$
Atrazin	$6,7 \cdot 10^1$

Tabelle 7-7: K_I -Werte aus der Dosis-Wirkungsbeziehung; DMT u. DMT aus Abbildung 7-9, Terbutylazin und Atrazin aus Abbildung 7-2 ; --je kleiner der K_I -Wert, desto kleiner ist die notwendige Konzentration für dieselbe Wirkung, d.h., desto empfindlicher ist der Nachweis

Tabelle 7-7 zeigt, daß für dieselbe Wirkung bis zu 5 Größenordnungen höhere Konzentrationen an den erprobten, nicht-herbizidischen Triazine benötigt werden. Der Nachweis der Triazin-Herbizide Atrazin und Terbutylazin ist damit um mehrere Größenordnungen empfindlicher als für die strukturverwandten, nicht-herbizidischen Triazine. Die Herbizidbestimmung in Trinkwasser mit dem Biosensor ist selektiv gegenüber den strukturverwandten Nicht-Herbiziden DMT und TMT.

III.7.3.11. Matrixeffekte bei Trinkwasserproben: Ionen

Wie gezeigt wurde, ist der Nachweis von Herbiziden mit dem Sensor sehr selektiv. Bei der Untersuchung realer Proben muß jedoch berücksichtigt werden, daß Matrixbestandteile der

realen Probe nach gesetzlichen Bestimmungen oft in sehr hoher Konzentration vorkommen können. So ist in Trinkwasser eine Calciumionenkonzentration von bis zu 400 mg/l zulässig, dies entspricht einem Faktor von 10^6 im Vergleich zur zulässigen Herbizidkonzentration (0,1 µg/l für die Einzelsubstanz).

Wesentliche Matrixbestandteile in Trinkwasser sind Kationen und Anionen. Ihr Konzentrationsbereich kann je nach Herkunft geogen, durch Rohrmaterialien oder Verschmutzungen stark schwanken. In der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) sind Grenzwerte für Ionen angegeben, die nicht überschritten werden dürfen. Zusätzlich sind in Anlage 7 Richtwerte für Kupfer und Zink festgelegt, die insbesondere bei der Untersuchung von Standwasser (Korrosion von Leitungsmaterialien) bedeutend sind.

Zur Ermittlung von Veränderungen in den Differenzkurven, welche durch Ionen verursacht werden, wurden 15 Kationen und 5 Anionen untersucht, die in Trinkwasser vorkommen können, und für die Grenzwerte oder Richtwerte in der TrinkwV festgelegt sind.

Bei diesen Versuchsreihen wird zwischen Signalen unterschieden, die 1. im Zeitabschnitt des Herbizidsignals und 2. außerhalb dieses Zeitabschnittes („zusätzliches Signal“) auftreten. Das Zeitfenster für Herbizide liegt bei den für diese Messungen gültigen technischen Bedingungen zwischen 20 ms und 100 ms, mit einem Maximum des Herbizidsignals bei 30 ms. Gemessen wurde jeweils nach Justage durch Zugabe der Lösungen zu Standardpuffer. Die angegebenen Konzentrationen sind die resultierenden Differenzkonzentrationen zwischen Probe und Referenz. Als Signal durch Ionen wird ein negatives oder positives Signal definiert, dessen Absolutwert des Maximums größer als die in Abschnitt „Nachweisgrenze“ aus dem Rauschen und der Wiederholbarkeit der Hintereinandermessung bestimmte, minimal korrelierbare Höhe ($0,3\% F_{\max}$) ist.

Kation	Grenzwert der TrinkwV mg / l	Signal bei 30 ms mg / l	zusätzliches Signal mg / l
Na ⁺	150	>650	>650
K ⁺	12	4000	400
NH ₄ ⁺	0,5	100	5
Ca²⁺	400	10	10
Mg²⁺	50	50	5
Cd ²⁺	0,005	50	5
Cr ²⁺	0,05	5	5
Pb ²⁺	0,04	40	4
Cu²⁺	3*	1	1
Zn ²⁺	5*	50	5
Mn ²⁺	0,05	50	0,5
Ni ²⁺	0,05	5	5
Hg ²⁺	0,001	1	0,1
Fe ³⁺	0,2	1	1
Ag ⁺	0,01	0,1	0,1

Tabelle 7-8: Veränderungen der Grundlinie durch Kationen; --* Richtwert der TrinkwV; --Kationen als Chloride oder Nitrate; unterhalb des Grenz-/Richtwertes der TrinkwV störende Ionen sind herausgehoben (fett)

Anionen

Zum Vergleich der Effekte durch Anionen wurden die Natriumsalze Natriumnitrat, Natriumnitrit mit Natriumchlorid verglichen; Kaliumhydrogenphosphat wurde Kaliumchlorid gegenübergestellt.

Zur Abschätzung des Effektes durch Sulfat wurden Ammoniumsulfat und Ammoniumchlorid mit gleicher Ammoniumkonzentration vermessen.

Anion	Grenzwert aus TrinkwV mg / l	Signal bei 30 ms mg / l	zusätzliches Signal mg / l
Chlorid	250	>800	>800
Nitrat	50	>1000	>1000
Nitrit	0,1	>20	>20
Phosphat	6,7	67	>6,7
Sulfat	240	>240	>240

Tabelle 7-9: Veränderung der Grundlinie durch Anionen

Der Einfluß durch Ionen ist je nach Ion unterschiedlich stark ausgeprägt. Anionen zeigen geringere Auswirkungen als Kationen. Die 'zusätzlichen Signale' treten überwiegend schon bei geringeren Konzentrationen auf als Signale bei 30 ms im Zeitfenster für Herbizide.

Empfindlich reagieren die Chloroplasten insbesondere auf Silber- und Quecksilberionen, jedoch jeweils deutlich oberhalb des zulässigen Höchstgehalts für Trinkwasser.

Unterhalb des Grenzwertes ergeben sich Signale bei 30 ms bei Calcium (ab 1/40 des Grenzwertes), Magnesium (ab Grenzwert), und Kupfer (ab 1/3 des Richtwertes).

Bei Silber wird beobachtet, daß ab dem 10fachen des Grenzwertes durch lichtgetriebene Reoxidation keine vollständige Wiederherstellung der Ursprungskinetiken möglich ist, jedoch durch einfaches Abwarten im Dunklen (5 min) eine Reoxidation erfolgt.

Bei Betrachtung der Einzelkinetiken wird sowohl bei Calciumionen als auch bei Magnesiumionen eine Erhöhung des Wertes F_{max} festgestellt. Bei der Auswertung wird eine Normierung auf den Wert F_{max} sowohl in Probe als auch in Referenz durchgeführt. Dies ist nur zulässig, wenn der Wert F_{max} der Probe nicht verändert ist, was definitionsgemäß für die Bestimmung von Herbiziden zutrifft. (Herbizide verändern den Wert F_{max} nicht, da die Blockade der Elektronentransportkette durch Licht (Referenz) oder Herbizid (Probe) definitionsgemäß die gleichen Folgen hat). Die Normierung ist notwendig, um minimale Unterschiede in der Chlorophyllkonzentration, Detektorgeometrie und Detektorempfindlichkeit der beiden Kanäle auszugleichen (siehe hierzu Einleitung, Auswertung).

Die Erhöhung des Wertes F_{max} im Probenkanal durch Calcium- oder Magnesiumionen führt daher bei Anwendung der Normierung in den Differenzkurven dazu, daß ein negatives Signal im Bereich von 30 ms, und ein positives Signal bei 500 ms auftritt.

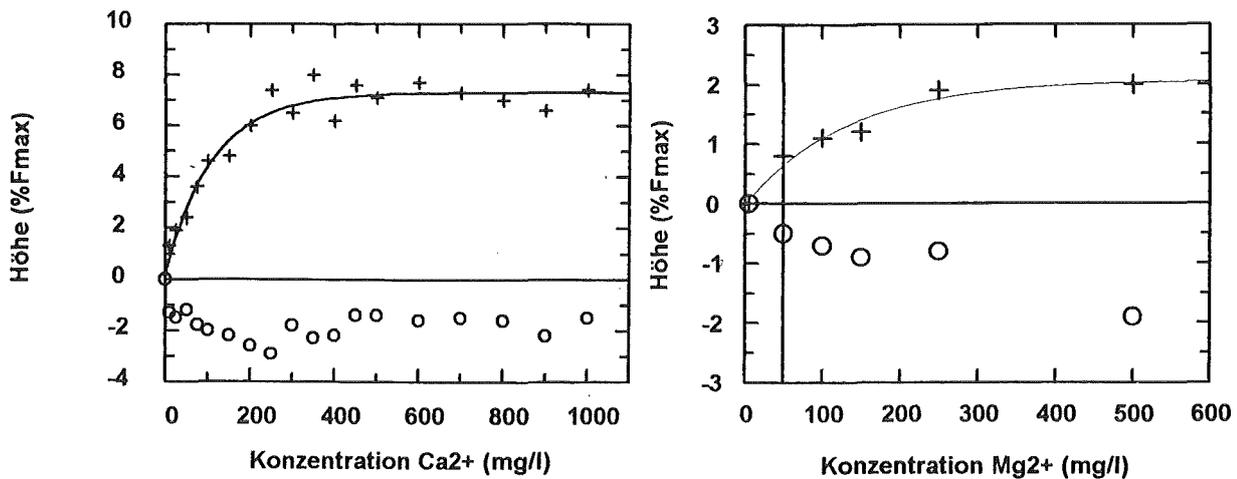


Abbildung 7-10: Links Störsignale durch Calciumionen, rechts Störsignale durch Magnesiumionen; --man erkennt jeweils zwei Störsignale, die jedoch durch denselben Effekt (Erhöhung des Wertes F_{max}) erzeugt werden; --das positive Störsignal (Kreuze) befindet sich außerhalb des Zeitfensters für Herbizide, das negative Störsignal (leere Kreise) befindet sich innerhalb des Zeitfensters für Herbizide; --man erkennt, daß der Störeffekt durch Calciumionen mit der Erhöhung der Calciumkonzentration ab 600 mg/l Calciumionen nicht weiter zunimmt; --der Grenzwert der TrinkwV liegt bei 400 mg/l Calciumionen; --der Effekt durch Magnesiumionen ist im positiven Bereich geringer als der Calciumeffekt und kommt ebenfalls zur Sättigung; --für Magnesiumionen ist ein Grenzwert von 50 mg/l festgelegt worden; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“

Bei Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven für Calcium und Magnesium stellt sich für das positive Signal nach einem steilen Anstieg eine Sättigung des Effektes ein, wobei der Störeffekt an sich durch Calcium wesentlich ausgeprägter ist, als jener durch Magnesium (Maximum Ca^{2+} : 7, Maximum Mg^{2+} : 2). Das negative Signal, welches durch denselben Mechanismus (Erhöhung von F_{max}) erzeugt wird, läßt sich schlechter reproduzieren und quantifizieren. Für Calciumionen ist zu erkennen, daß eine Sättigung des Effektes ab 600 mg/l Calcium auftritt. Das Störsignal durch Magnesiumionen ändert sich ebenfalls ab 600 mg/l Magnesium kaum mehr.

Kupferionen bewirken dagegen eine deutliche Abflachung der Kinetiken und damit ein breites, positives Signal in den Differenzkurven (Erniedrigung des Verhältnisses F_{min} / F_{max} durch Erniedrigung von F_{max} . Herbizideffekt: Erhöhung von F_{min}). Für Kupfer war die Aufnahme einer quantitativen Dosis-Wirkungskurve nicht möglich, da die Signalhöhen von Belichtung zu Belichtung schwankten und schlecht reproduziert werden konnten.

Diskussion dieser Befunde:

Calcium-, Magnesium- und Kupfer-Ionen verursachen bereits unterhalb der zulässigen Höchstgehalte ein Signal im Zeitfenster des Herbizidsignals, und stellen daher bei der Untersuchung von Trinkwasser eine mögliche Störungsquelle dar.

Calcium und Magnesium bilden innerhalb dieses Zeitfensters negative Signale, die zu einer Unterdrückung eines Herbizidsignals führen könnten. Calcium könnte maximal Signale bis 0.6 µg/l Diuron, Magnesium bis 0.4 µg/l Diuron unterdrücken.

Das durch Kupfer erzeugte Signal läßt sich bei mehrmaligem Belichten kaum stabilisieren und wandert auf der Zeitskala hin zu längeren Zeiten. Aus den Einzelkinetiken läßt sich erkennen, daß bei dem ionischen Effekt durch Kupfer der Wert für F_{\max} stark verringert wird. Da durch Herbizide F_{\max} nicht beeinflusst wird, kann der Effekt durch Kupferionen als nicht-herbizidischer Effekt identifiziert werden.

Unabhängig von der toxischen Wirkung durch Kupfer werden die Störeffekte beispielsweise durch Calcium und Magnesium nicht ausgelöst durch Wechselwirkungen mit der Herbizidbindestelle, es handelt sich also nicht um Querempfindlichkeiten im eigentlichen Sinne. Vielmehr ist bei großen Konzentrationsänderungen ein ionischer Effekt zu beobachten, dessen Änderung den Abstand der Membranen beeinflusst.

Betrachtet man die Wechselwirkungen zwischen zwei Membranoberflächen, die negative Ladungen tragen, so wird sich unter gegebenen Bedingungen ein bestimmter Abstand zwischen den Membranen einstellen, der vom Gleichgewicht zwischen anziehenden Van der Waals-Kräften und abstoßenden Coulomb-Kräften bestimmt wird. Da die Van-der Waals-Kräfte im allgemeinen als konstant angesehen werden können, wird eine Änderung der räumliche Anordnung der Membranen in erster Näherung von den Änderungen der abstoßenden Coulomb-Kräfte bestimmt; das bedeutet, daß durch eine Änderung der Raumladungsdichte Prozesse in und zwischen den Membranen gesteuert werden können. Die molekularen Mechanismen bei der Erhöhung des Wertes F_{\max} beispielsweise durch Calcium- und Magnesiumionen können auf eine Ladungsabschirmung der negativen Ladungen der Membran durch Kationen zurückgeführt werden. Das Ausgleichen dieser Ladungen führt dazu, daß die abstoßenden Kräfte zwischen den Membranen vermindert werden und sich die Membranstapel zusammenziehen; dies kann zu einer Erhöhung des Wertes F_{\max} führen (*Barber, 1982*). So ist auch erklärbar, daß dieser Effekt eine Sättigungskonzentration erreicht.

Die Effektivität bivalenter Kationen bei dieser Ladungsabschirmung und dem Zusammenziehen der Membranstapel ist gegenüber monovalenten Ionen deutlich größer (*Barber, 1982*).

Dies stimmt mit der eigenen Beobachtung überein: Die getesteten bivalenten Kationen erzeugen gegenüber den erprobten monovalenten Kationen bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen eine Veränderung der Kinetiken und damit einen Störeffekt.

Hierbei ist festzustellen, daß der Effekt durch Calcium und Magnesium durchaus im Rahmen des Effektes der übrigen bivalenten Kationen liegt. Sie erweisen sich jedoch in Gegensatz zu den meisten anderen, erprobten bivalenten Kationen als störend, da der Grenzwert der TrinkwV für Calcium (400 mg / l) und Magnesium (50 mg / l) vergleichsweise hoch ist.

Starke Oxidationsmittel in höheren Konzentrationen können Elektronen aus der Elektronentransportkette ausschleusen; dies führt jedoch nur dann zu einer Veränderung der Fluoreszenzkinetik, wenn höhere Konzentrationen an diesen Oxidationsmitteln auftreten, da sie wie im Kapitel „Beschleunigung der Reoxidation“ beschrieben, durch die Belichtung reduziert und der Reaktion rasch entzogen werden;

Kupferionen beeinflussen im Vergleich zu den anderen, erprobten bivalenten Kationen bereits in geringen Konzentrationen die Kinetiken. Ein toxischer Effekt durch Kupfer wird auch bei *Sayk et al. (1986)* - und zwar bereits für deutlich geringere Kupfergehalte - auf *einzellige Algen* beobachtet. Toxische Effekte durch Schwermetalle bestehen *in vivo* schon in wesentlich geringeren Konzentrationen als *in vitro*, da *in vivo* auch die Dunkelreaktion der Photosynthese beeinträchtigt wird. Eine Empfindlichkeit *in vitro* wird insbesondere für PS II beobachtet, wobei eine Hemmung der PS II-Aktivität durch Messung des Elektronentransportes bis Q_B festgestellt wurde (*Krupa et al., 1993*).

Schlußfolgerungen

Da Calcium- und Magnesiumionen nicht nur gängige Matrixbestandteile von Trinkwasser sind, sondern gleichzeitig in großen Konzentrationsbereichen von Probe zu Probe aus geogenen Ursachen schwanken können, wird im folgenden primär versucht, diese Störungen auszuschalten.

Ein wesentlicher Vorteil der Konzeption des Sensors mit Einmalküvetten und vorgelegtem biologischem Material mit Puffer ist die Möglichkeit, durch Modifikation der Pufferzusammensetzung den Einfluß von Ionen zu minimieren.

Beispielsweise können störende Ionen durch Zugabe von EDTA unter geeigneten Bedingungen (pH-Wert) komplexiert werden. Komplexbildner können jedoch nur dann erfolgreich eingesetzt werden, wenn die Stabilitätskonstante des Komplexes größer sind als die mit den

Phosphatgruppen der Lipide bzw. der Bindungskonstanten für die übrigen Reaktionen. Außerdem dürfen sie nicht in die Elektronentransportkette eingreifen, die Membranen schädigen oder anderweitig die Fluoreszenzkinetiken verändern. Im folgenden (siehe 12. "Minimierung des Calcium- und Magnesiumeinflusses: EDTA") werden Versuchsreihen zur Minimierung des Calcium- und Magnesiumeffektes mit EDTA beschrieben.

Aus dem Verlauf der Dosis-Wirkungskurven für Calcium läßt sich folgern, daß durch Vorlegen von 600 mg/l Ca^{2+} eine zusätzliche Erhöhung der Calciumkonzentration durch das Trinkwasser keinen weiteren Einfluß mehr auf die Kinetiken haben sollte. Durch den molekularen Mechanismus dieses Störeffektes wird hauptsächlich die räumliche Anordnung der Membranen verändert, ein Effekt, der die eigentliche Herbizidbindung nicht betrifft. *Fromme et al. (1990)* beschreiben, daß keine Auswirkungen durch Calciumionen auf die Bindungseigenschaften von Herbiziden an der Herbizidbindestelle zu beobachten sind.

Weiterhin soll geprüft werden, ob durch das Vorlegen von Calcium auch der Magnesiumeffekt verringert werden kann (siehe 13. "Minimierung des Calcium- und Magnesiumeinflusses: Modifizierung der Pufferzusammensetzung durch Vorlegen von Calciumionen").

Durch die toxische Wirkung von Kupferionen ist es nicht möglich, den Effekt entsprechend der Calcium- und Magnesiumionen durch Vorlage von Kupferionen zu nivellieren, da die Empfindlichkeit der Herbizidmessung bei sehr niedrigen Werten für F_{\max} deutlich abnimmt.

III.7.3.12. Minimierung des Calcium- und Magnesiumeinflusses: EDTA

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wird konventionell insbesondere zur komplexometrischen Titration eingesetzt. Der vierzählige Ligand EDTA bildet mit zahlreichen Metallen sechsfach koordinierte stabile 1:1-Komplexe mit fünfgliedrigen Chelatringen. Die Stabilität der Komplexe nimmt mit der Wertigkeit der Metalle zu; das Komplexierungsgleichgewicht ist stark pH-abhängig, da die Konzentration an (komplexierend wirkenden) EDTA-Ionen mit abnehmendem pH-Wert durch Protonierung verringert wird.

Für die Thylakoide hat sich ein pH-Wert des Puffers von 7,8 als optimal erwiesen. In diesem pH-Bereich liegt beispielsweise das Komplexierungsgleichgewicht folgender Ionen aus Trinkwasser praktisch vollständig auf der Seite des Komplexes: Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} . Der optimale pH-Wert für die Komplexierung von Mg^{2+} liegt bei pH 10. (*Schwedt, 1992*).

Letztendlich entscheidend für die Verringerung des Calcium- und Magnesiumeffektes ist jedoch die Konkurrenzreaktion der Wechselwirkung der Ionen mit den Lipidmembranen bzw. mit EDTA.

Zur Komplexbildung mit EDTA wurde der Standardpuffer (pH 7,8) mit 10 mM EDTA angereichert (Puffer B).

Die Versuche ergaben folgende Ergebnisse:

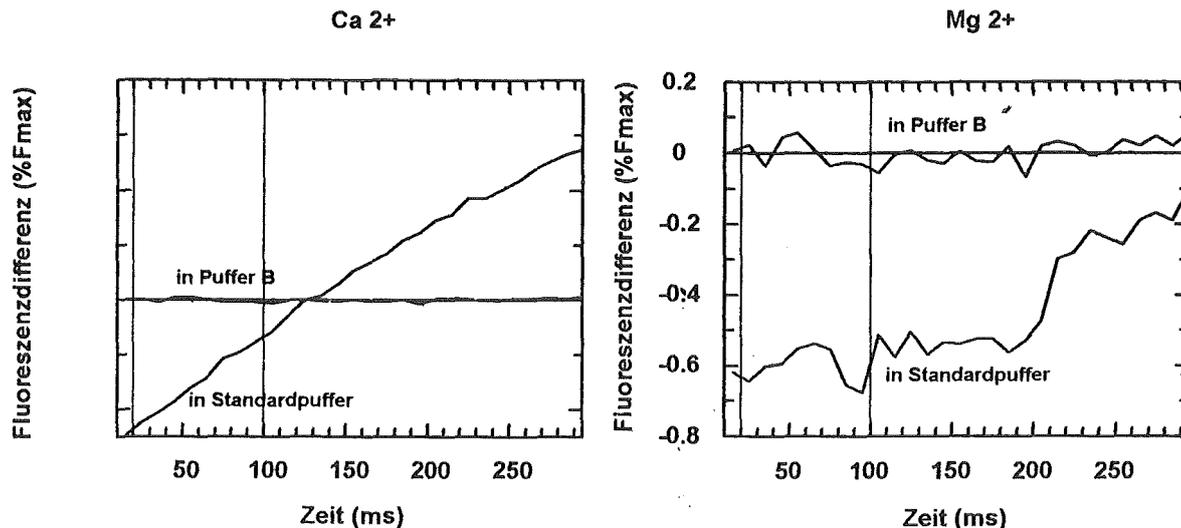


Abbildung 7-11: Links Calciumeffekt durch 100 mg/l Ca²⁺, rechts Magnesiumeffekt durch 100 mg/l Mg²⁺ in Standardpuffer und jeweils die resultierende Nulllinie unter Verwendung von Puffer B (angereichert mit 10mM EDTA); --Die senkrechten Linien bezeichnen das Zeitfenster für Herbizide, das unter den gewählten Meßbedingungen zwischen 20 ms und 100 ms liegt; ----Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“; --man erkennt, daß sowohl bei Calcium als auch für Magnesium der Effekt vermindert werden konnte

Wie Abbildung 7-11 zeigt, werden Effekte durch Mg²⁺ im Zeitfenster für Herbizide bis 100 mg/l Mg²⁺ (Grenzwert der TrinkwV: 50 mg/l) durch die Zugabe von EDTA nivelliert.

Der Effekt im Zeitfenster für Herbizide, der durch 100 mg/l Ca²⁺ ausgelöst wird, kann ebenfalls mit EDTA nivelliert werden kann. Bei Ca²⁺-Konzentrationen im Bereich des Grenzwertes der TrinkwV (400 mg/l; Daten nicht gezeigt) wurde jedoch beobachtet, daß die Störungen nicht vollständig beseitigt werden; zudem wurde festgestellt, daß die Erhöhung der EDTA-Konzentration nicht unbeschränkt möglich ist, da dies zu Veränderungen der Kinetiken der unbelasteten Referenz führt.

Diese Ergebnisse bedeuten, daß der Einfluß von Magnesiumionen bis zum Zweifachen des Grenzwertes der TrinkwV durch EDTA eliminiert werden kann. Auch der Calciumeffekt kann bis zu 100mg/l Ca²⁺ entfernt werden. Eine Erhöhung der EDTA-Konzentration ist nicht möglich, ohne daß Veränderungen in den Kinetiken auftreten. Diese Veränderungen sind

darauf zurückzuführen, daß EDTA in hohen Konzentrationen Ionen der Elektronentransportkette komplexiert, und damit dem photosynthetischen Elektronentransport entzieht. Der Vorteil der Minimierung von Matrixeinflüssen durch EDTA wird darin gesehen, daß außer Calcium- und Magnesiumionen auch andere Metallionen (siehe oben), die in der unbekannt Probe möglicherweise in höheren Konzentrationen vorliegen, durch EDTA komplexiert werden können.

III.7.3.13. Minimierung des Calcium- und Magnesiumeinflusses: Modifizierung der Pufferzusammensetzung durch Vorlegen von Calciumionen

Da die Sättigung des Calciumionen-Effektes bei 600 mg/l Ca^{2+} eintritt, wurde der Standardpuffer zur Minimierung dieses Effektes mit 600 mg/l Ca^{2+} (als CaCl_2) angereichert (Puffer C).

Anschließend wurden Dosis-Wirkungskurven für Ca^{2+} und Mg^{2+} in diesem Puffer aufgenommen.

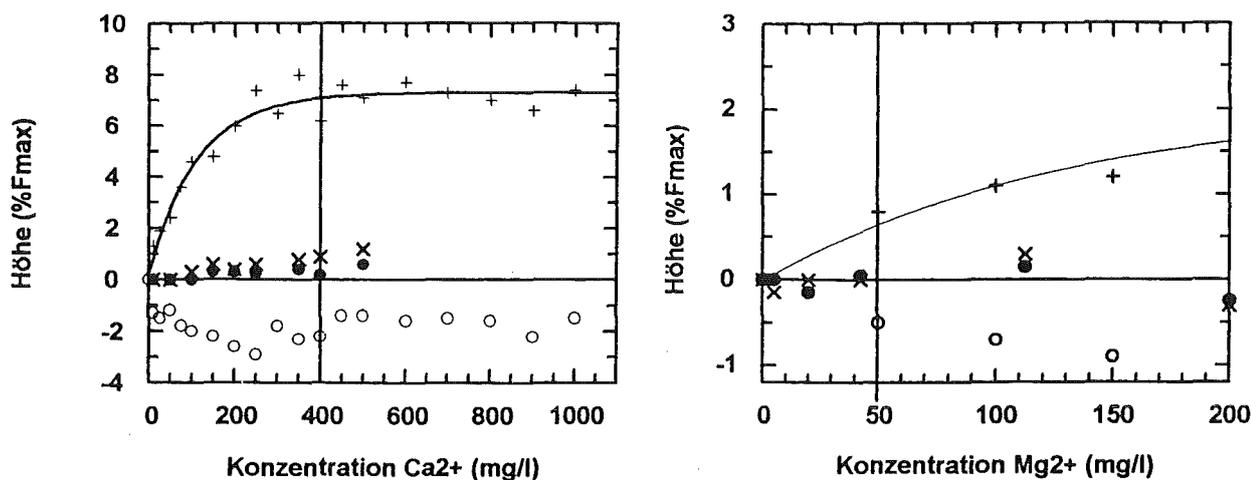


Abbildung 7-12: Links Störsignale durch Calciumionen, rechts Störsignale durch Magnesiumionen (leere Kreise und Kreuze) und Minimierung der Störsignale durch Vorlegen von 600 mg/l Ca^{2+} im Puffer (ausgefüllte Kreise und Sterne); --man erkennt jeweils zwei Störsignale, die jedoch durch denselben Effekt (Erhöhung des Wertes F_{max}) erzeugt werden; --das positive Störsignal (Kreuze) befindet sich außerhalb des Zeitfensters für Herbizide, das negative Störsignal (leere Kreise) befindet sich innerhalb des Zeitfensters für Herbizide; --man erkennt, daß der Störeffekt durch Calciumionen mit der Erhöhung der Calciumkonzentration durch Vorlegen von 600 mg/l Calciumionen minimiert wurde (ausgefüllte Kreise für das Störsignal im Zeitfenster (negativ), Sterne für das Störsignal außerhalb des Zeitfensters (positiv));--der Grenzwert der TrinkwV liegt bei 400 mg/l Calciumionen; --der Effekt durch Magnesiumionen kann ebenfalls durch Vorlegen von 600 mg/l Ca^{2+} minimiert werden; --für Magnesiumionen ist ein Grenzwert von 50 mg/l festgelegt worden; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“

Die Störeffekte (positive oder negative Signale) werden bis 400 mg/l Ca^{2+} und 200 mg/l Mg^{2+} nivelliert; ab 500 mg/l Ca^{2+} zeigt sich ein schwaches, positives Signal; die Störsignale durch Magnesium steigen ab 250 mg/l Mg^{2+} deutlich an. Die Störungen durch Ca^{2+} und Mg^{2+} am und unterhalb des Grenzwertes werden durch Modifikation des Puffers also entfernt.

Um festzustellen, ob die veränderte Zusammensetzung des Puffers durch Anreicherung mit 600 mg/l Ca^{2+} zu einem veränderten Verhalten der Thylakoide gegenüber anderen Ionen führt, beispielsweise zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber anderen Ionen oder zu einer Erniedrigung der Empfindlichkeit gegenüber potentiellen Störionen, wurde der Einfluß der oben untersuchten Ionen an ihrem jeweiligen Grenz- bzw. Richtwert der TrinkwV unter den modifizierten Bedingungen nochmals untersucht; als Medium wurde hier Standardpuffer angereichert mit 600 mg/l Ca^{2+} verwendet. Die Meßbedingungen entsprechen ansonsten Abschnitt 11: Matrixeffekte bei Trinkwasserproben: Ionen.

Kation	Grenzwert der TrinkwV mg / l	Signal im Herbizidzeitfenster am Grenzwert	zusätzliches Signal am Grenzwert
Na ⁺	150	k.S.	k.S.
K ⁺	12	k.S.	k.S.
NH ₄ ⁺	0,5	k.S.	k.S.
Ca ²⁺	400	k.S.	k.S.
Mg ²⁺	50	k.S.	k.S.
Cd ²⁺	0,005	k.S.	k.S.
Cr ²⁺	0,05	k.S.	k.S.
Pb ²⁺	0,04	k.S.	k.S.
Cu ²⁺	3*	Signal (erhöht)	Signal (erhöht)
Zn ²⁺	5*	k.S.	k.S.
Mn ²⁺	0,05	k.S.	k.S.
Ni ²⁺	0,05	k.S.	k.S.
Hg ²⁺	0,001	k.S.	k.S.
Fe ³⁺	0,2	k.S.	k.S.
Ag ⁺	0,01	k.S.	k.S.

Tabelle 7-10: Einfluß von Kationen auf die Grundlinie bei Verwendung von Puffer C; --* Richtwert der TrinkwV; --k.S.: kein Signal am Grenzwert; --Signal erhöht: Störsignal am Grenzwert durch Verwendung des modifizierten Puffers erhöht; --Kationen als Chloride oder Nitrate

Anionen

Anion	Grenzwert der TrinkwV mg / l	Signal im Herbizidzeitfenster am Grenzwert	zusätzliches Signal am Grenzwert
Chlorid	250	k.S.	k.S.
Nitrat	50	k.S.	k.S.
Nitrit	0,1	k.S.	k.S.
Phosphat	6,7	k.S.	k.S.
Sulfat	240	k.S.	k.S.

Tabelle 7-11: Einfluß auf die Grundlinie durch Anionen am Grenzwert bei Verwendung von Puffer C (angereichert mit 600 mg/l Ca²⁺)

Zusammenfassung dieser Ergebnisse:

1. Die Zusammensetzung des Puffers wurde durch die Zugabe von 600 mg/l Ca^{2+} optimiert. Hierdurch werden die Störeffekte durch Ca^{2+} bis zum Grenzwert, bei Mg^{2+} bis zum 4fachen des Grenzwertes ausgeschaltet.
2. Der störende Effekt durch Cu^{2+} wird leicht erhöht.
3. Die übrigen untersuchten Ionen haben im Bereich der in Trinkwasser zulässigen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Messung

Diskussion

Entsprechend der Erwartung kann der Effekt durch Calciumionen und Magnesiumionen durch Vorlegen der Sättigungskonzentration von 600 mg/l Ca^{2+} nivelliert werden. Zusätzliche Störungen durch die übrigen, untersuchten Ionen treten dabei nicht auf.

Der Einfluß von Kupferionen kann anhand der Veränderung der Einzelkinetik der Probe und anhand des positiven, zusätzlichen Signals außerhalb des Herbizidzeitfensters als ionischer Effekt identifiziert werden; der in der TrinkwV, Anlage 7 festgelegte Richtwert für Kupferionen (3 mg/l) in Trinkwasser wurde in erster Linie für den Test von Standwasser zur Überprüfung der Korrosivität von Trinkwasser gegenüber Kupferleitungen aufgestellt. In Trinkwasserproben im allgemeinen sind geogen wesentlich geringere Kupferkonzentrationen (deutlich unter 1 mg/l) zu erwarten (Höll, 1968).

III.7.3.14. Reale Proben: mit Herbizid aufdotiertes Trinkwasser

Der summarische Einfluß aller Matrixbestandteile einer Trinkwasserprobe kann über eine Herbizidbestimmung in realen Probenmatrizes ermittelt werden. Hierzu wurde im folgenden Versuch eine Trinkwasserprobe unbekannter Zusammensetzung gezogen. Sie wurde unter verschiedenen Bedingungen zweimal unverändert im Sensor gegen die Referenz (jew. Puffer) vermessen, und schließlich mit Herbizid angereichert.

Versuchsablauf:

1. Messung der Trinkwasserprobe nach Vorlage von Thylakoiden mit unverändertem Standardpuffer gegen Standardpuffer.
2. Messung der Trinkwasserprobe nach Vorlage von Thylakoiden mit Puffer B (resultierender EDTA-Gehalt in der Küvette: 10mM) gegen Puffer B.
3. Aufdotieren der Trinkwasserprobe mit 0,7 µg/l Diuron, und Vermessung der aufdotierten Trinkwasserprobe nach Vorlage von Thylakoiden mit Puffer B.

Durch diesen Versuchsablauf sollte einerseits festgestellt werden, inwieweit summarische Matrixeinflüsse durch Trinkwasser im konkreten Fall überhaupt bestehen (1.) und ob sie durch EDTA minimiert werden können (2.). Die Methode der Minimierung der Störeffekte durch EDTA wurde ausgewählt, um - wie oben diskutiert - die Effekte möglichst vieler Ionen ausschließen zu können. Anschließend sollte beurteilt werden, ob eine Herbizidbestimmung in realer Matrix möglich ist, wenn Matrixeffekte ausgeschlossen worden sind (3.). Ziel war nicht die Feststellung einer Bestimmungsgrenze in Trinkwasser, da hierzu eine statistisch ausreichend große Anzahl verschiedener Proben in Routinemessungen (gesonderte Validierung außerhalb der Arbeit) vermessen werden müssen. Der Herbizidgehalt in der konkreten Probe wurde daher mit $0,7 \mu\text{g/l}$ Diuron hoch genug gewählt, um einen großen Herbizideffekt zu erhalten.

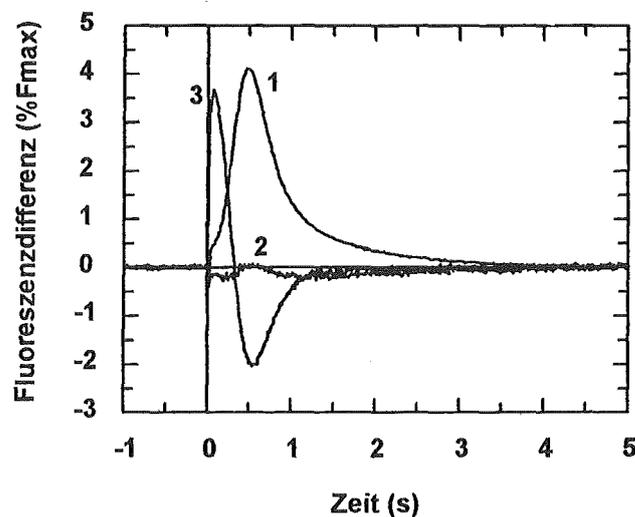


Abbildung 7-13: Messung in realer Probe; --1 Messung der Trinkwasserprobe nach Vorlage von Thylakoiden mit unverändertem Standardpuffer gegen Standardpuffer; --2 Messung der Trinkwasserprobe nach Vorlage von Thylakoiden mit Puffer B (resultierender EDTA-Gehalt in der Küvette: 10mM) gegen Puffer B; --3 Aufdotieren der Trinkwasserprobe mit $0,7 \mu\text{g/l}$ Diuron, und Vermessung der aufdotierten Trinkwasserprobe nach Vorlage von Thylakoiden mit Puffer B; --Messung im Labormuster, Bedingungen gemäß Kapitel VI. Materialien und Methoden, „Messungen zur Charakterisierung“

Aus Abbildung 7-13 ist der summarische Matrixeffekt der Probe erkennbar (Signal 1). Es handelt sich um ein positives Signal, dessen Maximum außerhalb des Zeitfensters für Herbizide liegt (Maximum bei 600 ms, Höhe $4 \%F_{\text{max}}$). Das Zeitfenster für Herbizide wird durch den langsamen Anstieg dieses Signals überlagert. Hierdurch könnten bis zu $0,3 \mu\text{g/l}$ Diuron vorgetäuscht werden. Nach Anreicherung der Trinkwasserprobe mit EDTA (resultierende Konzentration: 10 mM) verschwindet das Signal; es resultiert eine praktisch unveränderte Grundlinie. Aus dieser Reaktion kann gefolgert werden, daß das aufgetretene Störsignal durch Ionen verursacht wurde, die von EDTA bei pH 7,8 komplexiert werden, und so der Reaktion

mit den Membranen entzogen werden können. Die aufdotierte Trinkwasserprobe wurde ebenfalls mit 10 mM EDTA vermessen. Man erkennt ein Herbizidsignal, das in Lage (Maximum innerhalb des Herbizidzeitfensters) und Form dem Herbizidsignal einer reinen Herbizid-Lösung entspricht. Auch die Signalhöhe von $3,7 \%F_{\max}$ entspricht der erwarteten Höhe für $0,7 \mu\text{g/l}$ Diuron.

Es zeigt sich also, daß im konkreten Fall nach Ausschluß der Matrixeffekte durch Ionen mit Hilfe von EDTA eine Herbizidbestimmung in realer Matrix durchgeführt werden kann.

Zu einem Ergebnisüberblick und zur Diskussion dieser Befunde siehe unter Einheit IV. Ergebnisüberblick und Gesamtdiskussion: Beurteilung des miniaturisierten Meßsystems und Einsatzmöglichkeiten des entwickelten Biosensors.

III.8. Erhöhung des Probendurchsatzes in Mikrotiterplatten

(Weiterführender Versuch)

III.8.1. Ziele

Mit dem entwickelten Biosensor als Feldgerät lassen sich in kurzer Zeit durch Auswechseln der Einmalgefäße verschiedene Proben analysieren. Im Routinelabor ist es jedoch häufig erwünscht, einen hohen Probendurchsatz durch Automatisierung zu erreichen. Für Fluoreszenzmessungen wurden hierzu Fluoreszenzreader entwickelt, welche Mikrotiterplatten mit bis zu 96 Kavitäten aufnehmen können; hierbei wird die Fluoreszenz in jeder Kavität durch automatisierte Positionierung der Anregungslichtquelle und des Detektors einzeln angeregt und die Fluoreszenzintensität einzeln detektiert. Die Messung ist nur im Labor möglich, hat jedoch den Vorteil eines hohen Automatisierungsgrades und eines hohen Probendurchsatzes. In vielen analytischen Laboratorien stehen daher diese Geräte mit dem entsprechenden Zubehör für das Einbringen der Probe zur Verfügung.

Diese Fluoreszenzreader sind für die Detektion der Gesamtfluoreszenzintensität konstruiert und für die vorliegende Meßaufgabe der Aufnahme sehr schneller Kinetiken durch langsame Anschaltzeiten der Anregungslichtquelle nicht ohne größere Modifikationen verwendbar.

In einer Weiterentwicklung gängiger Fluoreszenzreader, die allgemein mit Dauerlicht arbeiten, sind nun Fluoreszenzreader mit Blitzanregung erhältlich. Mit einer Blitzanregung könnte unter Einbeziehung der Ergebnisse und Erfahrungen aus den Basisuntersuchungen der vorliegenden Arbeit durch optimale Wahl der Blitzfrequenz, Intensität und Anregungswellenlänge eine Adaption an die Meßmethode erreicht werden; hierbei wird angestrebt, lediglich Modifikationen der Steuersoftware, und nicht des eigentlichen Gerätes durchzuführen.

Mit den weiterführenden Versuchen dieses Abschnittes wird daher geprüft, ob es grundsätzlich möglich ist, Thylakoide in einem Fluoreszenzreader durch schnell aufeinanderfolgende Blitze anzuregen. Weiterhin wird untersucht, ob Herbizidbestimmungen in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders mit Blitzanregung durchgeführt werden können.

Diese orientierenden Versuche sollen dazu dienen, die Realisierbarkeit einer Herbizidbestimmung in Mikrotiterplatten anhand von Fakten zu diskutieren.

III.8.2. Grundlagen und Prinzipien der Versuche

Diese Versuche wurden in einem kommerziell erhältlichen Fluoreszenzreader mit Blitzanregung (SLT Fluostar) durchgeführt, der minimal auf das Meßproblem dieser Arbeit

spezifiziert wurde. Hierzu wurde in das Filtrerrad vor der Anregungslichtquelle ein Transmissionsfilter (400...500) nm eingesetzt. Ferner wurde die Software, welche lediglich die summarischen Auswertung der Gesamtfluoreszenz vorsah, dahingehend geändert, daß durch einzelne Auswertung der Fluoreszenzintensität pro Blitz kinetische Messungen möglich sind.

III.8.3. Ergebnisse und Diskussion

III.8.3.1. Fluoreszenzkinetiken durch Anregung mit Blitzen

Um den langsamen Anstieg der Fluoreszenzintensität einer unbelasteten Probe messen zu können, wurde die Blitzanzahl in der Zeiteinheit und der Chlorophyllgehalt der Probe variiert. Eine zu langsame Blitzfrequenz führt dazu, daß in den Dunkelphasen zwischen den Blitzen eine Oxidation der Elektronenakzeptoren (entsprechend der einfachen Dunkeladaption) stattfindet; dadurch wird die Hemmung der Elektronentransportkette durch das Anregungslicht in wenigen Sekunden nicht vollständig herbeigeführt, und die maximale Fluoreszenzintensität F_{\max} wird nicht erreicht. Eine zu schnelle Blitzfrequenz reduziert die Elektronenakzeptoren nach wenigen Blitzen, so daß kein Unterschied mehr zur herbizidbelasteten Probe detektiert werden kann. Die folgende Abbildung zeigt die Fluoreszenzkinetik einer unbelasteten Thylakoidsuspension (Chlorophyllgehalt 10 µg/ml) nach Anregung mit Blitzen der Frequenz 25 Hz im Vergleich zu einer herbizidgehemmten Thylakoidsuspension:

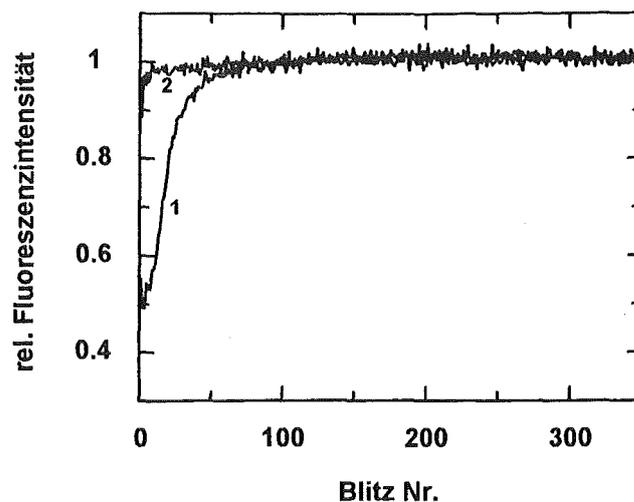


Abbildung 8-1: Fluoreszenzkinetiken von Thylakoiden nach Anregung mit Blitzen (Frequenz 25 Hz); --1 unbelastete Thylakoidsuspension; --2 Thylakoidsuspension mit 50 µg/l Diuron versetzt; --Modifikationen für den SLT-Fluostar siehe oben; --Optimierte Bedingungen der Messung am Fluoreszenzreader gemäß Abschnitt VI. Materialien und Methoden; --Reoxidation durch einfach Dunkeladaption; --man erkennt den im Vergleich zur herbizidgehemmten Probe langsamen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Blitzanzahl; der Unterschied zwischen unbelasteter Referenz (1) und Herbizidprobe (2) kann detektiert werden.

Die Anregung einer Thylakoidsuspension mit Blitzen der Frequenz 25 Hz ist möglich. Ein deutlicher Unterschied zu einer mit Herbizid versetzten Probe wird detektiert.

III.8.3.2. Herbizidbestimmung in Mikrotiterplatten

Eine Thylakoidsuspension mit einer resultierenden Diuronkonzentration von 1 µg/l wurde in Referenz zu einer Kavität mit einer unbelasteten Thylakoidsuspension vermessen; die Fluoreszenzkinetiken wurden entsprechend dem in dieser Arbeit für das Feldgerät entwickelten und erprobten Auswerteverfahren (Einzelheiten siehe Abschnitt II. Einleitung) voneinander subtrahiert; dabei wurde folgendes Differenzsignal erhalten:

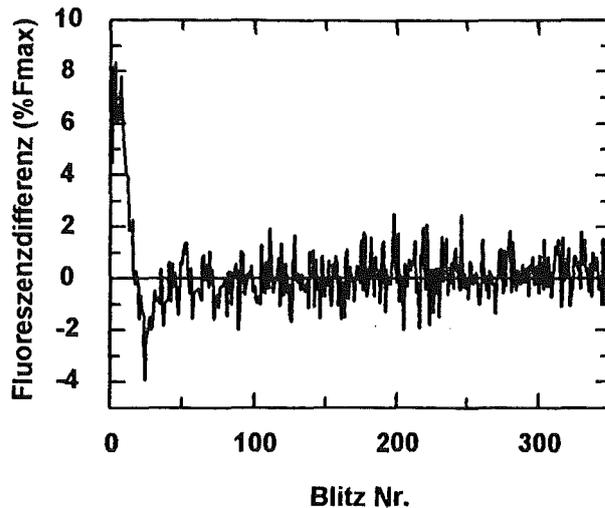


Abbildung 8-2: Signal für 1 µg/l Diuron im Fluoreszenzreader mit Blitzanregung; --Mittelwert aus drei Messungen; --Modifikationen für den SLT-Fluostar siehe oben; --Optimierte Bedingungen der Messung am Fluoreszenzreader gemäß Abschnitt VI. Materialien und Methoden; --Reoxidation durch einfach Dunkeladaption; --Differenzbildung jeweils zwischen den Fluoreszenzkinetiken einer unbelasteten Referenz und der herbizidgehemmten Probe in zwei benachbarten Kavitäten

Der Nachweis von 1 µg/l Diuron in Mikrotiterplatten durch Blitzanregung ist möglich. Dieses Ergebnis wurde ohne weitere Optimierung als Mittelwert aus drei Messungen gewonnen.

III.8.4. Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Messung von Herbiziden in Mikrotiterplatten mit einem Fluoreszenzreader unter Anregung mit Blitzen ist grundsätzlich möglich. In orientierenden Versuchen ohne weitere Optimierung gelingt es, 1 µg/l Diuron nachzuweisen.

In einer Optimierung muß insbesondere geprüft werden, wie das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert werden kann. Die Reproduzierbarkeit der Kinetiken von Kavität zu Kavität muß ermittelt werden, um die Nachweisgrenze bestimmen zu können.

Zur Verminderung dieser Einflüsse bietet sich eine Mittelwertbildung an, die technisch durch die zur Verfügung stehenden 96 Kavitäten leicht durchführbar sein sollte.

Die technischen Voraussetzungen zur Durchführung einer lichtinduzierten Reoxidation sind durch ein steuerbares Filterrad, in das ein RG 715nm-Kantenfilter eingesetzt werden kann, gegeben. Die Reoxidationsdauer unter Verwendung von Blitzen muß gesondert ermittelt und optimiert werden.

Nach einer Optimierung bietet die Herbizidbestimmung in Mikrotiterplatten eine vielversprechende Möglichkeit zur Erhöhung des Probendurchsatzes und zur Automatisierung einer Herbizidbestimmung auf der Basis der Chlorophyllfluoreszenz im PS II isolierter Thylakoide.

IV. ERGEBNISÜBERBLICK UND GESAMTDISKUSSION

IV.1. Überblick über die Ergebnisse der Arbeit

Qualitätskontrolle und Alterung

1. Für den Biosensor wird aktives, biologisches Material standardisiert und reproduzierbar aus selbstgezogenen Erbsenpflanzen präpariert. Auch das aus käuflichem Kopfsalat gewonnene Material ist in seiner Qualität vergleichbar; Die Qualitätskontrolle ist sowohl mit Sauerstoffmessung als auch mit Fluoreszenzmessung reproduzierbar und statistisch verlässlich.
2. Die Alterung kann durch Erniedrigung der Temperatur verzögert werden und ist in flüssigem Stickstoff nicht zu beobachten; eine Stabilisierung der Thylakoide für einen praktikablen Biosensor, der bei Zimmertemperatur verwendet und transportiert werden soll, ist notwendig.
3. Unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse der Photosyntheseforschung ergibt sich bei der Betrachtung der Mechanismen der Alterung ein komplexes Bild verschiedener Reaktionswege, von denen einige je nach Lagerbedingungen bevorzugt ablaufen werden. Eine Lagerung im Dunkeln und das Vermeiden hoher Lichtintensitäten bei der Handhabung sind angezeigt. Aus den diskutierten Aspekten kristallisieren sich zwei mögliche Wege zur Verzögerung der Alterung heraus: Der Ersatz des Wasserspaltungssystems durch andere Elektronendonoren für P680, oder die Verzögerung von Abbaureaktionen verschiedenster Ursache durch Herabsetzung des Wassergehaltes der Thylakoidsuspension durch Gefriertrocknung.

Gefriertrocknungsverfahren für Thylakoide

1. Die Aktivität der Thylakoide nach der Gefriertrocknung ist abhängig von der Dauer des Trocknungsprozesses. Die Nachrocknung (Dauer drei Stunden) unter den eingestellten Bedingungen wurde optimiert zwischen der Abnahme der Aktivität während der Nachrocknung, und der Notwendigkeit der Nachrocknung für ein lagerstabiles, trockenes Pulver.
2. Bei allen erprobten Stabilisatoren, mit denen es gelingt, ein trockenes Pulver zu gewinnen, bleibt die Aktivität zu über 95 % erhalten. Praktisch unverändert ist die Aktivität der

Thylakoide, die mit Saccharose oder einem Saccharose/Sorbitol-Gemisch getrocknet wurden.

3. Thylakoide, welche mit einer Mischung aus einer äquimolaren Menge an Saccharose und Sorbitol gefriergetrocknet werden, sind deutlich stabiler als Thylakoide, welche nur Saccharose als Stabilisator enthalten.
4. Mit steigendem Sorbitolgehalt in den Proben wird eine wachsende Hygroskopie der Pulver beobachtet. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, werden generell alle gewonnenen Pulver im Exsiccator über Silicagel gelagert.

Stabilisierung von Thylakoiden

1. Sowohl durch die Gefriertrocknung als auch durch den Ersatz des Wasserspaltungssystems mit Hydroxylamin werden die Rezeptoren gegenüber der nativen Thylakoidsuspension stabilisiert.
2. Thylakoide ohne Wasserspaltungssystem („TRIS-gewaschene Thylakoide“) altern langsamer, als Thylakoide mit Wasserspaltungssystem. Dies bestätigt, daß es sich beim Wasserspaltungssystem um ein empfindliches System der Elektronentransportkette handelt. Allerdings wird ersichtlich, daß die Veränderung des Wasserspaltungssystems mit der Zeit nicht der einzige Mechanismus ist, der bei der Alterung von Thylakoiden eine Rolle spielt.
3. Aus dem Vergleich beider Versuche ergibt sich, daß die Gefriertrocknung eine deutlich bessere Stabilisierung bewirkt als der Ersatz des Wasserspaltungssystems.
4. Die Alterung gefriergetrockneter Thylakoide ist enorm verzögert. Das Alterungsverhalten der gefriergetrockneten Thylakoide läßt sich mit einem einfach-exponentiellen Abfall beschreiben, wohingegen die Fluoreszenzalterung der nativen Suspension zunächst langsam, und anschließend beschleunigt verläuft.
5. Die Reaktion gefriergetrockneter Thylakoide mit Herbiziden ist gegenüber nativen Thylakoiden innerhalb der normalen Schwankungsbreite der Messung unverändert.

Immobilisierung von Thylakoiden

1. Die Immobilisierung von Thylakoiden in optisch homogene PAAH-Glutaraldehyd-Glycerin-Gele (Aktivität 96%) gelingt; mit Glyoxal und Acetylaceton als Vernetzer kann kein optisch homogenes Gel präpariert werden, Acetylaceton führt zu einem Aktivitätsverlust.
2. Durch einen angepaßten Sol/Gel-Prozeß können Thylakoide ohne relevanten Aktivitätsverlust (Aktivität: 99%) immobilisiert werden.

3. Die Thylakoide werden bei den erprobten Methoden in der Matrix zurückgehalten.
4. Eine Stabilisierung wird durch diese Immobilisierungsverfahren nicht erreicht. Die Thylakoide zwecks Dauerüberwachung zu immobilisieren, ist daher nicht angezeigt.
5. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Herbizidbestimmung durch Anreicherung in den Thylakoidmembranen wird ebenfalls nicht beobachtet.

Beschleunigung der Reoxidation

1. Im Gegensatz zur alternativ erprobten, chemischen Oxidationsmethode wird die Reoxidation durch annähernd selektive Anregung des PSI mit Licht (Wellenlänge $\lambda > 700$ nm) wesentlich beschleunigt. Der Reoxidationsgrad, der durch einfache Dunkeladaptation erst nach mindestens 5 Minuten erreicht werden kann, ist mit dem gewählten optischen Aufbau bereits nach 5 Sekunden eingestellt.
2. Die lichtinduzierte Reoxidation führt zu besser reproduzierbaren Kinetiken. Dies wird darauf zurückgeführt, daß in wenigen Sekunden keine Alterungsvorgänge die Reoxidation überlagern. Durch den Entzug des Reaktionsproduktes bei der lichtgetriebenen Reoxidation ist eine optimale Reoxidation möglich.
3. Mathematisch wird gezeigt, daß der beobachtete Anstieg des Herbizidsignals bis zu einer maximalen Höhe mit wachsender Reoxidationsdauer auch unter der Voraussetzung beobachtet wird, daß Probe und Referenz zu jedem Zeitpunkt den gleichen Reoxidationsgrad aufweisen. Eine Verlangsamung der Reoxidation durch Herbizide ist nicht die Ursache dieser Beobachtung.
4. Für die Reoxidation bei der Herbizidbestimmung bedeutet das, daß erst nach einer bestimmten Zeit t_R die maximale und objektiv richtige Höhe des Signals erreicht ist. Dies stellt jedoch kein Meßhindernis dar, da dieser Zeitpunkt für jedes optische System (jede resultierende Reoxidations-Lichtintensität) exakt ermittelt werden kann und aufgrund der guten Reproduzierbarkeit nur einmal bestimmt werden muß.

Miniaturisierung der Meßtechnik

1. Zur Anregung der Thylakoide unter den gegebenen Bedingungen eignen sich ein Diodenlaser 655 nm und die blaue NSB-LED. Streulichteinflüsse werden durch Filtersysteme vor den Detektoren weitgehend ausgeschlossen. Andere erprobte LEDs

zeigen zu geringe Lichtintensitäten oder Nebenbanden, die im Wellenlängenbereich der Fluoreszenzemission liegen.

2. Zur Strahlteilung ist die Justage mit einem überstreichenden Lichtkegel optimal.
3. Zur Detektion eignen sich Photodioden mit einer sensitiven Fläche von 13.7 mm^2 . Ihre Detektion ist weniger durch den Lichtgradienten betroffen als die der erprobten Photodioden mit einer sensitiven Fläche von 33 mm^2 . Zusätzlich wird mit einem Spiegel hinter den Küvetten der Lichtgradient in der Küvette minimiert.
4. Mit zwei H-LEDs 740 nm wird eine minimale Reoxidationsdauer von 30 Sekunden benötigt. Die Reoxidation dauert hier etwas länger als beim Miniglühlampensystem (20 Sekunden), jedoch hat die LED den Vorteil, weniger Wärmestrahlung zu emittieren, wodurch die Thylakoide geschont werden. Außerdem haben LEDs eine größere Lebensdauer und einen geringeren Leistungsbedarf als die Miniglühlampen.
5. Die Richtung, aus der die Thylakoide in den Küvetten mit Reoxidationslicht beleuchtet wurden, ist bedeutend für die Dauer und die Vollständigkeit der Reoxidation. So wird eine unveränderte Fluoreszenzkinetik in minimaler Zeit nur dann erhalten, wenn die Reoxidation aus derselben Richtung erfolgt wie die Anregung. Bei Reoxidation in 90° oder 180° Winkel zur Anregung resultieren leicht verzerrte Fluoreszenzkinetiken, und die Justage ist erschwert.

Konzeption und Realisierung eines Labormusters

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Basisuntersuchungen wurde ein Labormuster für einen Biosensor für Fluoreszenzemissionsmessungen an Thylakoiden zum Nachweis von PS II-Herbiziden realisiert (Aufbau siehe Kapitel III.6.).

Ergebnisse der Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems

Die Charakteristika der Methode unter Verwendung eines optimierten Meßsystems und die Kenndaten des in dieser Arbeit entwickelten Sensors in idealen Lösungen wurden bestimmt. Bei der Variation äußerer Meßbedingungen für ein Feldgerät wird kein praktisch relevanter Einfluß auf die Messung beobachtet. Die chemische Selektivität gegenüber strukturverwandten Verbindungen ist durch den Nachweis über das Wirkprinzip sehr hoch. Einen quantitativen Überblick über diese Ergebnisse zeigt die nachfolgende Tabelle 1-1:

Parameter	Kennzahl des Sensors
Empfindlichkeit der Diuron-Bestimmung	5,0 %Fmax / µg/l
Nachweisgrenze f. Diuron, Spurenanalytik (vergl. Grenzwert TrinkwV: 0,1 µg/l)	0,1 µg/l
Nachweisgrenze f. Diuron, Wirkproben	0,04 µg/l
relativer K_1 - Wert, bestimmt mit dem Sensor im Vergleich zur Literatur (Tischer et al., 1977)	Diuron: 90 %
Reproduzierbarkeit der Signalhöhe (0.5 µg/l Diuron, n=10; relative Standardabweichung der Einzelwerte)	5,5 %
Analysendauer im Sensor (für maximale Empfindlichkeit)	90 Sekunden
Verwendbarkeit bei Lagerung bei $T_L = 25$ °C (gefriergetrocknete Thylakoide)	19 Tage
Verwendbarkeit der Rezeptoren bei $T_L = +4$ °C	80 Tage
Verwendbarkeit der Rezeptoren bei $T_L = -30$ °C	> 9 Monate
Temperaturbereich der Messung (maßgebend ist Außentemperatur)	10 °C - 25 °C
Lichtverhältnisse bei der Probenvorbereitung	unabhängig
Chemische Selektivität f. Terbutylazin gegenüber DMT und TMT (aus K_1 - Werten)	Faktor geg. DMT: $5 \cdot 10^5$ Faktor geg. TMT: $3 \cdot 10^4$
Matrixeffekte durch Ionen unterhalb des Grenzwertes/ Richtwertes der TrinkwV	keine durch Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} ; Fe^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{2+} , Cd^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Na^+ ; Ca^{2+} , Mg^{2+} (unter Verwendung von Puffer C) Störung durch $Cu^{2+} > 1$ mg/l (falsch-positiv; identifizierbar)
Calcium- und Magnesiumeinfluß bei Verwendung von Puffer mit 10 mM EDTA	keine Störung bis 100 mg/l Ca^{2+} und 100 mg/l Mg^{2+}
Lösungsmittel für Herbizide bei Wirkproben: Maximale Ethanolkonzentration in der Küvette	max. 5 Vol%

Tabelle 1-1: Kenndaten des Sensors (geordnet nach Bedeutung für die Analyse); --Definition Verwendbarkeit gemäß Definition Kapitel III.7. für Herbizidgehalte entsprechend $c \leq 1$ µg/l Diuron: Signalhöhe bleibt konstant im Bereich von $\pm 10\%$; -- T_L = Lagertemperatur

In einem orientierenden Versuch mit einer realen Trinkwasserprobe, welche mit einem bekannten Herbizidgehalt aufdotiert wurde, wurde im konkreten Fall gezeigt, daß eine Herbizidbestimmung nach Nivellierung des Matrixeffektes mit EDTA ohne Störung möglich ist.

Weiterführender Versuch: Erhöhung des Probendurchsatzes in Mikrotiterplatten

1. Die Messung von Herbiziden in Mikrotiterplatten mit einem Fluoreszenzreader unter Anregung mit Blitzen ist grundsätzlich möglich.

2. In orientierenden Versuchen ohne weitere Optimierung gelingt es, 1 µg/l Diuron nachzuweisen.
3. In einer Optimierung muß insbesondere geprüft werden, wie das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert werden kann. Die Reproduzierbarkeit der Kinetiken von Kavität zu Kavität muß statistisch ermittelt werden, um die Nachweisgrenze bestimmen zu können.

IV.2. Perspektiven für die miniaturisierte Fluoreszenzmissionsmessung an Thylakoiden zum Nachweis der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch PS II-Herbizide

Bedeutung der Stabilität gefriergetrockneter Thylakoide für die miniaturisierte Fluoreszenzmessung

Durch die Optimierung des Verfahrens der Gefriertrocknung (Kapitel III.2) können nun Thylakoidpulver gewonnen werden, die durch die Gefriertrocknung keinerlei Verlust der Fluoreszenzaktivität erleiden und wesentlich stabiler als einzellige Algen sind. Hierbei zeigt sich im einzelnen, daß der Verlust der Aktivität der Thylakoide während der Gefriertrocknung von der Nachrocknungsdauer abhängt, und die Stabilität der Thylakoidpulver durch Optimierung der Pufferzusammensetzung gesteigert werden kann. Wichtig ist außerdem eine optimale und reproduzierbare Prozeßführung bezüglich Druck und Temperaturen.

Stabilisierte Thylakoide sind für die miniaturisierte Fluoreszenzmessung zum Nachweis von Herbiziden von prinzipieller Bedeutung, da

1. Thylakoide einen Selektivitätsvorteil gegenüber phototrophen Bakterien aufweisen, der darin begründet liegt, daß PS II-Herbizide bei Anwendung und Entwicklung speziell für die Bindestelle am PS II höherer Pflanzen ausgewählt werden;
2. in isolierten Thylakoiden im Gegensatz zu ganzen Zellen keine herbizidmetabolisierenden Enzyme des Cytoplasmas vorliegen, die die Analysenempfindlichkeit herabsetzen würden;
3. mit Thylakoiden dem Herbizid ein direkter, schneller Zugang zur Bindestelle ermöglicht wird, da die Barrieren durch die Hüllmembranen der Chloroplasten oder die Zellwände ganzer Zellen entfernt sind, sowie Transportprozesse wie in ganzen Blättern ausgeschlossen sind;
4. gefriergetrocknete Thylakoide leicht zu handhaben sind, und die biologischen Rezeptoren nicht ständig gezüchtet werden müssen.

Eine Immobilisierung der Thylakoide ist nicht notwendige Voraussetzung für eine empfindliche und praktikable Messung

Von den allgemeinen Vorteilen, die eine Immobilisierung der Rezeptoren bieten kann, verbleiben nach den Untersuchungen Vorteile für die Geometrie des optischen Aufbaus, eine evtl. Anreicherung in den Polymermatrices und für eine Anwendung als Einmaltauchsonden.

Durch die hier erprobten Immobilisierungsverfahren (Kapitel III.3) gelingt es zwar, Thylakoide ohne Veränderung des Verlaufes der Fluoreszenzkinetiken in zwei verschiedene, optisch homogene Matrices zu immobilisieren (Immobilisierung in PAAH-Glutaraldehyd-Gele und Immobilisierung nach dem Sol/Gel-Prozeß). Diese Immobilisierungsmethoden haben gemeinsam, daß sie ohne radikalische Zwischenstufen und ohne für Thylakoide aggressive Monomere ablaufen. Dies beweist, daß Thylakoide durch besonders schonende Immobilisierungsverfahren ohne Veränderung der Fluoreszenzkinetiken immobilisiert werden können. Eine Stabilisierung, die mit der Gefriertrocknung konkurrieren könnte, resultiert hier jedoch nicht, und eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit durch Anreicherung von Diuron in den Membranen ist nicht festzustellen.

Für eine einfache, miniaturisierte Fluoreszenzemissionsmessung an Thylakoiden ist die Immobilisierung keine notwendige Voraussetzung. Eine geometrische Fixierung der Thylakoide verringert zwar die Störeinflüsse bei der Messung durch die freie Bewegung der Thylakoide in dem Probebehältnis; jedoch wird dieser Vorteil nivelliert durch die geringe Stabilität immobilisierter Thylakoide, die bei den erprobten Immobilisierungsverfahren der Stabilität der nativen Suspension entspricht.

Bessere Reproduzierbarkeit der Messung durch lichtinduzierte Beschleunigung der Reoxidation

Die lichtinduzierte Beschleunigung der Reoxidation (Kapitel III.4) nutzt die Charakteristika der photosynthetischen Elektronentransportkette, und ermöglicht es, theoretische Erkenntnisse der Photosyntheseforschung praktisch zu verwerten: Durch die Beschleunigung der Reoxidation wird die Reproduzierbarkeit der Messung verbessert, indem die Gesamtanalysendauer der miniaturisierte Fluoreszenzmessung verkürzt wird. Alterungsvorgänge haben mit diesem Reoxidationsverfahren im Gegensatz zur einfachen Dunkeladaption mit Sauerstoff (Dauer mindestens 5 Minuten) keinen Einfluß mehr auf die Messung.

Die Miniaturisierung der Meßtechnik ist möglich; ein aufwendiges Analysengerät ist nicht die Voraussetzung für eine empfindliche Herbizidbestimmung

Für die miniaturisierte Fluoreszenzmessung (Kapitel III.5) erweist sich die Referenzmessung zu einer unbelasteten Probe als notwendiges Hilfsmittel beim Ausgleichen minimaler Unterschiede

in Alterung oder Vorgeschichte des biologischen Materials. Das Ausbalancieren der Lichtintensitäten des Anregungslichtes in Probe- und Referenzkanal ist eine wesentliche Voraussetzung für eine störungsfreie Messung. Zur Strahlteilung ist ein beide Küvetten überstreichender Lichtkegel optimal. Störungsquellen, die bei konventionellen Makrosystemen zur Fluoreszenzmessung keine Rolle spielen, und bei der Miniaturisierung oft nicht berücksichtigt werden, sind die Eigenfluoreszenz der optischen Filter, sowie Nebenbanden der zur Anregung getesteten LEDs. Bei Fluoreszenzmessungen an einer Thylakoidsuspension kommen Streulichteffekte des Anregungslichtes und Lichtgradienten in der Küvette hinzu, die für eine hochempfindliche Messung möglichst ausgeschlossen werden müssen. Unter der Verwendung eines 655nm Diodenlasers, RG 715-Kantenfiltern vor den Detektoren und Photodioden mit kleiner sensitiver Fläche im Vergleich zur Fläche des Küvettenbodens läßt sich ein laborunabhängiges, miniaturisiertes Meßsystem entwickeln. Der hohe technische Aufwand, der häufig als notwendig angesehen wird, ist durch gezielte Optimierung auf ein Minimum reduziert worden (Kapitel III.6).

Eigenschaften des Labormusters im Vergleich zu den Zielen der Arbeit und gegenüber anderen Arbeiten

Mit dem Labormuster werden Atrazinkonzentrationen mit dem Meßablauf für reale Proben bis 0,3 µg/l Atrazin innerhalb von 90 Sekunden nachgewiesen, während für das Algen-Fluoreszenz-Autometer (Syks, 1986) nach 90-minütiger Inkubationszeit 32,5 µg/l Atrazin als toxische Schwellenkonzentration angegeben werden. Diese Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 1/100 ist darauf zurückzuführen, daß sowohl das biologische Material als auch Meßtechnik, Auswertung und Meßablauf auf die miniaturisierte Fluoreszenzmessung an Thylakoiden untersucht und optimiert wurden. Für das Algen-Fluoreszenz-Autometer wird eine toxische Schwellenkonzentration für CuSO₄ von 3 µg/ml angegeben. Dies entspricht 1,2 µg/ml Cu²⁺, im Vergleich zu einem Störeinfluß ab 1 mg/l Cu²⁺ bei dem entwickelten Biosensor. Diese Verringerung des Störeinflusses wird auf die kurze Analysenzeit im Sensor im Vergleich zur 90minütigen Inkubationszeit im Algen-Fluoreszenz-Autometer und die Verwendung von Thylakoiden (in vitro) im Gegensatz zu Algen zurückgeführt.

Mit dem Labormuster konnte also nicht nur gezeigt werden, daß eine Miniaturisierung der Meßtechnik möglich ist, sondern auch die Empfindlichkeit der Messung um den Faktor 1/100 verbessert werden, sowie die Selektivität erhöht werden. Dies ist im wesentlichen auf die kurze Inkubations- bzw. Meßzeit durch die lichtinduzierten Reoxidation und durch Verwendung von

Thylakoiden als Rezeptoren zurückzuführen. Die Stabilisierung dieser Thylakoide durch Gefriertrocknung ist hierbei eine wesentliche Voraussetzung zur miniaturisierten Fluoreszenzmessung an Thylakoiden zum Nachweis von PS II-Herbiziden. In dieser Arbeit konnten folgende Vorteile gegenüber dem Algen-Fluoreszenz-Automater erreicht werden, die als Ziele der Arbeit formuliert worden waren:

Eigenschaft	Algen-Fluoreszenz-Automater nach Sayk et al., 1986	Biosensor für PS II-Herbizide dieser Arbeit
Größe	Laborgerät	tragbares Feldgerät, unabhängig von der Temperatur im Bereich von 10-25°C, unabhängig von den Lichtverhältnissen bei der Probenvorbereitung
biologische Rezeptoren	einzellige Algen, frisch aus Fermenter	isolierte Thylakoide, stabilisiert durch Gefriertrocknung
Technik	aufwendig und optimiert	miniaturisiert durch Verwendung von Laserdiode, Photodioden, LEDs und einer optimierten optischen Geometrie
Auswerteverfahren über Fluoreszenzkinetiken	unspezifisch 10% Abweichung	Auswertung über die Höhe des Signals des unmittelbaren Herbizideffektes; Zeitfenster für Herbizide
Analysendauer	90 Minuten	90 Sekunden
Volumina der Probe	15 ml	1 ml
Notwendiger Ausbildungsstand des Anwenders	hoch (Wartung des Algenfermenters)	einfache Handhabung; Pipettierschritt notwendig
Selektivität für Herbizide	Erfassung algizider Verbindungen insgesamt wegen langer Inkubationszeit	möglichst kurze Einwirkzeit durch direkten Zugang des Herbizides zur Bindestelle durch Verwendung isolierter Thylakoide und Verkürzung der Meßdauer durch lichtinduzierte Beschleunigung der Reoxidation
Nachweisgrenze für Atrazin	bei 32,5 µg/l	0,3 µg/l
Wirkaussage durch Herbizide	nicht uneingeschränkt möglich	Bestimmung von K_T -Werten und der relativen Wirksamkeit möglich

Tabelle 2-1: Vorteile des neuen miniaturisierten Meßsystems zum Nachweis von PS II-Herbiziden

Vergleich des entwickelten Biosensors mit kommerziellen ELISA-Tests

Als Nachweisverfahren für Triazinherbizidrückstände werden derzeit ELISA-Tests (Enzyme linked immuno sorbent assay) kommerziell angeboten. Daher ist es relevant, den Wirksensor

mit dem immunologischen Verfahren zu vergleichen. Die Nachweisgrenzen, die mit dem Biosensor erreicht werden, sind vergleichbar mit der Empfindlichkeit gängiger ELISA-Tests. Für Diuron wird beispielsweise eine Nachweisgrenze von 0,04 µg/l angegeben, was der Nachweisgrenze für Wirkproben des Sensors entspricht. Ein grundlegender Unterschied besteht jedoch in der analytischen Aussage der beiden Analysemethoden: Während das ELISA-Verfahren eine strukturbezogene, nur für eine Einzelsubstanz gültige, qualitative und quantitative Information liefert, werden bei dem Biosensor Wirksamkeiten detektiert; damit wird eine Summenquantifizierung der größten Herbizid-Gruppe möglich; Ein prinzipieller Vorteil des Sensors, der sich direkt hieraus ergibt, ist die Unabhängigkeit von neuen Entwicklungen oder gesetzgeberischen Änderungen. Da PS II-Herbizide speziell für die Blockade der Bindestelle am PS II konzipiert werden, und der Sensor genau diesen Mechanismus zur Detektion verwendet, können auch neu hergestellte oder als PS II-Herbizide „unbekannte“ Substanzen detektiert werden. Immunoassays erweisen sich hier als wenig flexibel; durch den strukturabhängigen Nachweis muß jeweils zunächst der entsprechende Antikörper erzeugt und isoliert werden, bevor ein neues Herbizid nachgewiesen werden kann. Eine Gesamtanalyse der strukturell sehr unterschiedlichen PS II-Herbizide (siehe Einleitung) mit dem ELISA-Verfahren würde voraussetzen, daß für die verschiedenen Vertreter der über 17 chemischen Substanzklassen jeweils Antikörper erzeugt und isoliert werden, was in absehbarer Zeit nicht erreicht sein wird; zusätzlich muß jede Substanz einzeln detektiert und quantifiziert werden. Hierbei zeigt sich ein Nachteil der strukturbezogenen Analysemethoden: Nur die Substanzen, nach denen gezielt gesucht wird, werden detektiert, und nur für diese Substanzen können quantitative Aussagen gemacht werden. Der entwickelte Biosensor kann durch das Wirkprinzip alle PS II-hemmenden Substanzen nachweisen, also auch chemische Verbindungen detektieren, deren herbizidische Wirkung bislang nicht bekannt war, oder nach denen nicht im einzelnen gesucht wurde.

Der Analytiker erhält mit dem Sensor im Gegensatz zum ELISA-Verfahren außer der quantitativen Aussage einen Hinweis auf die biologische Wirksamkeit der untersuchten Probe. Der Analytiker kann damit die Belastung der Probe nicht nur feststellen, sondern auch werten. Insbesondere die Berücksichtigung von additiven Effekten und Synergismen, die häufig weder bekannt noch berechenbar sind, geben dem Analytiker neue Hilfsmittel bei der Beurteilung unbekannter Proben in die Hand.

Beim ELISA-Verfahren werden hochempfindliche Meßgeräte eingesetzt, die nur im Laboratorium betrieben werden können; dagegen ist das hier entwickelte miniaturisierte

Analysensystem ein autonomes Feldgerät, das den Anforderungen gerecht wird, die an ein einfach zu handhabendes, mobiles Meßgerät in der Vor-Ort-Analytik gestellt werden.

Weder mit ELISA noch mit dem entwickelten Biosensor ist eine kontinuierliche Dauerüberwachung möglich; für den Biosensor wird dies jedoch durch die sehr kurze Analysenzeit ausgeglichen, die pro Bestimmung im Sensor nur 90 Sekunden dauert, und damit pro Analyse 20mal schneller ist als gängige ELISA-Verfahren (Analysenzeit 30 min).

Insgesamt ist festzustellen, daß das Nachweisprinzip des Biosensors für ein schnelles und umfassendes, quantitatives Screening besser geeignet ist als der strukturbezogenen Einzelsubstanz-Nachweis des ELISA-Verfahrens. Für die genaue Einzelstoffprüfung belasteter Proben wird, soweit diese Informationen benötigt werden, eine Entscheidung zwischen HPLC und ELISA zu treffen sein; die auf dem Wirkprinzip beruhenden Informationen durch eine Analyse mit dem Biosensor können jedoch mit keiner der beiden strukturellen Methoden gewonnen werden.

IV.3. Beurteilung des miniaturisierten Meßsystems und Einsatzmöglichkeiten für den entwickelten Biosensor

Als Biosensor für die Herbizidbestimmung in Trinkwasser

Grundlage für die Analytik von Herbiziden in Trinkwasser ist der in der Trinkwasserverordnung festgelegte Grenzwert für Pflanzenschutzmittel und ihre Hauptabbauprodukte (PBSM). Als „analytischer Nullwert“ wurde er für die Einzelsubstanz zu 0,1 µg/l PBSM, für die Summe zu 0,5 µg/l PBSM festgelegt.

Diese sehr niedrigen Konzentrationen werden konventionell durch HPLC oder GC nach Anreicherung und Reinigung nachgewiesen. Dies ist mit großem technischen Aufwand und hohem Zeitbedarf verbunden; ein großer Teil der analysierten Proben ist zudem nicht belastet (*DFG-Mitteilung XVI, 1990*). Vorteil einer Screening-Methode könnte damit die Vorauswahl unkritischer Proben sein, bzw. ein quantitativer Hinweis auf die Konzentrationsbereiche der Belastung der Proben.

Der hier entwickelte Herbizid-Biosensor auf der Basis der Chlorophyllfluoreszenz im Photosystem II isolierter Thylakoide detektiert Herbizide über ihre biologische Wirkung. Eine Quantifizierung der Herbizidgehalte erfolgt über ihre Wirksamkeit; daher werden sie in Äquivalenten zu häufig eingesetzten Herbiziden, wie Atrazin oder Diuron, angegeben.

Wie oben gezeigt wurde, kann der Biosensor Diuronkonzentrationen von 0,1 µg/l ohne jede Anreicherung oder Aufreinigung der Probe nachweisen. Dies bedeutet einen großen Vorteil des Biosensors gegenüber konventionellen Methoden der Herbizidanalytik, da Probenanreicherung und Aufreinigung häufige Fehlerquellen bei der Analytik im Spurenbereich darstellen (Verluste oder externe Kontamination). Die berechnete Nachweisgrenze bezieht sich auf Diuron und ist für das Labormuster- wie oben gezeigt - begrenzt durch die Reproduzierbarkeit der Grundlinie; die Abweichungen in der Grundlinie werden auf einen unterschiedlichen Streulichtdurchbruch in Probe und Referenz zurückgeführt und hängen damit vom verwendeten Material (Einmalküvetten) und der Wellenlänge des Anregungslichtes ab. Orientierende Versuche zur Anregung mit blauen NSB-LEDs zeigen, daß der Streulichtdurchbruch hierbei wesentlich vermindert ist. Durch Optimierung der technischen Durchführbarkeit der Justage mit blauen NSB-LEDs wird erwartet, daß die Grundlinie wesentlich besser reproduziert werden kann.

Aus dem apparativen Rauschen errechnet sich für die Methode (ohne Grundlinienschwankung) eine erreichbare Nachweisgrenze von 0,03 µg/l Diuron; unter diesen Bedingungen kann auch mit schwächeren Herbiziden der Grenzwert der Trinkwasserverordnung erreicht werden.

Die Optimierung der Meßtechnik für das Meßproblem ermöglichte eine Verbesserung der Nachweisgrenze - wie vorne diskutiert - gegenüber anderen Methoden. Die Signalhöhen sind gut reproduzierbar und ermöglichen nach Eingabe der Bezugskurve in die Auswerteeinheit des Sensors eine zuverlässige Quantifizierung ohne Nachkalibration.

Der Biosensor ist für die Vor-Ort-Analytik geeignet. Die Messung zeigt keine Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen bei der Probenvorbereitung und keinen Temperatureinfluß von 10 °C - 25 °C. Die getesteten Ionen beeinträchtigen die Messung im Rahmen der in Trinkwasser zulässigen Grenzen nicht. Ihre summarische Wirkung kann jedoch nur durch reale Trinkwassermatrices direkt beurteilt werden. Zur Validierung der Herbizidbestimmung in realen Matrices muß daher eine statistisch ausreichend große Anzahl verschiedener Trinkwasserproben in anschließenden Routinebestimmungen vermessen werden. Wege zur Nivellierung von hohen Ionenkonzentrationen mittels EDTA wurden aufgezeigt, und im konkreten Fall einer Trinkwasserprobe eine störungsfreie Messung durchgeführt.

Mit gefriergetrockneten Thylakoiden steht stabiles Material zur Verfügung, das im Kühlschrank über 80 Tage aufbewahrt werden kann. Bei -30 °C Lagertemperatur sind die Thylakoide über 9 Monate verwendbar. Diese Lagerdauer ist vergleichbar mit der Haltbarkeit von gängigen Enzymtestkits und vom Anwender ohne technische Veränderungen durchführbar. Beim Transport zu Feldmessungen bleiben die Thylakoide für Messungen bis zu 1 µg/l Diuron 19 Tage verwendbar. Die Analysendauer ist mit 90 Sekunden sehr kurz. Zur Probenaufbereitung ist ein Pipettier- und Mischvorgang notwendig, für den weniger als zwei Minuten benötigt werden. Die kurze Gesamtanalysendauer gleicht die Tatsache aus, daß ein Biosensor für die Dauerüberwachung mit den instabilen Thylakoiden vorläufig nicht realisierbar ist. Dies könnte nur erreicht werden, wenn ein Immobilisierungsverfahren für Thylakoide gefunden würde, das die Betriebsstabilität dieser Rezeptoren ähnlich enorm verlängert, wie es für die Lagerstabilität durch Gefriertrocknung gelungen ist.

Wesentliche Voraussetzungen zur Praktikabilität eines Biosensors für Vor-Ort-Messungen sind also gegeben.

Die Wirkaussage des Sensors kann den in der TrinkwV geforderten strukturellen Nachweis nicht ersetzen. Jedoch könnte er beim Aussortieren unkritischer Proben eingesetzt werden, und

die für die HPLC benötigte große Anzahl an Vergleichssubstanzen zur Identifizierung der Herbizide herabsetzen.

Idealerweise sind für ein quantitatives Screening von Trinkwasserproben folgende Grenzen festzulegen: Wenn die gesamte Herbizidaktivität einer Probe geringer ist, als die Wirkung von 0,1 µg/l des schwächsten Herbizides, so kann die Probe als übereinstimmend mit den gesetzlichen Vorgaben angesehen werden; eine Gesamtaktivität, die größer ist als 0,5 µg/l des stärksten Herbizides dagegen beweist, daß die Probe nicht der Definition von Trinkwasser gemäß TrinkwV entspricht. Nur die Proben zwischen diesen beiden Grenzen müssen zur genaueren Untersuchung mittels HPLC in ein Labor gebracht werden. Um diese Unterscheidung mit dem Biosensor durchführen zu können, ist es notwendig, die meßtechnischen Voraussetzungen weiter zu optimieren, um auch schwache Herbizide im Bereich des Grenzwertes der TrinkwV nachweisen zu können; Lösungswege hierzu basieren insbesondere auf der Minimierung des Streulichtdurchbruches durch die technische Perfektionierung der Justage bei Verwendung blauer NSB-LEDs.

Für Analysen von Einläufen in Wasserwerke oder Kläranlagen kann der Biosensor ebenfalls eingesetzt werden. Hier stellt sich häufig das Problem, ob und wie das ankommende Wasser aufbereitet werden muß. Hier ist ein quantitatives Screening höherer Herbizidkonzentrationen gefordert, das mit dem Biosensor im Hinblick auf PS II-Herbizide durchgeführt werden kann. Bei Einläufen in Kläranlagen müssen jedoch die Matrixbestandteile in ihrer Wirkung auf Thylakoide bekannt sein. Bei stark verschmutzten Abwässern mit hohen Gehalten an Schwermetallionen oder organischen Lösungsmitteln ist eine Herbizidanalytik mit Thylakoiden durch toxische Effekte und Auflösung der Struktur der Lipidmembranen nicht möglich.

Bei Wasserwerken jedoch ist die Matrix häufig im wesentlichen bekannt und konstant. In diesem Fall kann im Referenzkanal eine „Matrixprobe“ ohne Herbizid eingesetzt werden. Unter diesen Bedingungen werden Herbizide auch in komplexen Matrices unter minimalen Störeinflüssen mit maximaler Empfindlichkeit nachgewiesen.

Bei Analysen von Trinkwasser mit dem Biosensor muß immer berücksichtigt werden, daß er nur für PS II-Herbizide konzipiert wurde, und die übrigen Pflanzenschutzmittel, für die der Grenzwert der TrinkwV ebenfalls gilt, nicht detektiert werden können. Als Ergänzung zu konventionellen Analysemethoden und bei Feldmessungen bietet er jedoch neue Perspektiven für eine schnelle und mobile Analytik für die bedeutendste Gruppe der Herbizide.

Biosensor zur Analytik von Wirkproben

Der Nachweis über das Wirkprinzip eröffnet für den entwickelten Biosensor weitere Einsatzmöglichkeiten in Herbizidentwicklung und -anwendung.

Hierbei kann Ethanol bis zu einer resultierenden Konzentration von 5 Vol% in der Küvette eingesetzt werden. Bei eigenen Versuchen war es möglich, den Ethanolgehalt in der Küvette auf 0,5 Vol% zu beschränken. Da es sich bei PS II-Herbiziden im wesentlichen um polare Herbizide handelt, die sich in Ethanol gut lösen, und die Empfindlichkeit der Messung sehr hoch ist, wird der Höchstgehalt von 5 Vol% Ethanol im allgemeinen einzuhalten sein.

Ein Anwender von PS II-Herbizidlösungen erhält über den Biosensor einen Hinweis auf die biologische Wirksamkeit seiner Probe im Vergleich zu einer bekannten Herbizidlösung. Er kann damit schnell und einfach überprüfen, ob die individuelle Mischung korrekt zusammengestellt wurde, und so einer unnötigen Umweltbelastung durch zu hohe Herbizid-Konzentrationen vorbeugen.

Bei der Entwicklung neuer Herbizide sind Methoden gefragt, mit denen schnell und möglichst empfindlich die herbizidische Wirksamkeit einer chemischen Verbindung festgestellt werden kann. Hierzu werden konventionell Versuche mit Zellkulturen und Feldversuche durchgeführt.

Für PS II-Herbizide kann der Sensor sowohl für absolute (Bestimmung des K_I -Wertes) als auch für relative Wirkanalysen eingesetzt werden. Dies ist möglich, da isolierte Thylakoide als Rezeptoren im Biosensor verwendet werden. Ganze Zellen hingegen enthalten im Cytoplasma jene Enzyme, die als Schutzfunktion für die Pflanze Herbizide metabolisieren und abbauen können. Mit diesen biologischen Rezeptoren kann die Bestimmung des K_I -Wertes daher verfälscht werden. Zur Bestimmung von K_I -Werten mit dem Biosensor müssen Thylakoide eingesetzt werden, die eine Restaktivität von mindestens 95 % aufweisen; ansonsten wird der Maximalwert der Dosis-Wirkungskurve zu schnell erreicht und damit der K_I -Wert ungenau quantifiziert.

Zur Bestimmung der relativen Wirksamkeit eines PS II-Herbizides sind bis zu einer korrelierbaren Höhe von 5 % F_{max} die selben Lagerbedingungen gültig, wie sie oben für die Spurenanalytik beschrieben wurden (19 Tage bei 25 °C, 80 Tage im Kühlschrank). Durch die optimierte Meßtechnik ist die Bestimmung der Wirksamkeit genau (Reproduzierbarkeit: 5,5% für 0,5 µg/l Diuron, n= 10), empfindlich (Empfindlichkeit: 5,0 % F_{max} / µg/l Diuron) und schnell (Analysendauer im Sensor f. maximale Empfindlichkeit: 90 Sekunden), das heißt, auch für eine rasche Vorauswahl geeignet. Versuche mit Zellkulturen und Feldversuche können so sinnvoll ergänzt und in ihrer Anzahl verringert werden.

Die Adaption des Meßsystems an Organellen (Chloroplasten) oder Zellen ist möglich; dieses Material muß in Einmalküvetten suspendiert werden können. Eine Optimierung der Meßtechnik wird sich hier auf die Konzentration des jeweiligen biologischen Materials in der Gesamtsuspension richten, um eine optimale (ausreichende) resultierende Lichtintensität in der Küvette auch bei größeren suspendierten Teilchen zu gewährleisten. Damit wird es möglich, die Veränderung der Wirksamkeit eines Herbizides mit der Komplexität des biologischen Materials zu verfolgen.

Zusätzlich ist bei dieser analytischen Fragestellung die Zugabe von herbizid-metabolisierenden Enzymen interessant. Technisch ist hierzu durch den Aufbau mit Einmalküvetten keine Modifikation notwendig.

Auch bei der Wirksamkeitsbestimmung ist das Einsatzgebiet des Biosensors auf PS II-Herbizide begrenzt. Für Wirkuntersuchungen wird die Substanzklasse im allgemeinen jedoch bekannt sein; ist sie es nicht, kann mit dem Biosensor die Klasse der PS II-Herbizide identifiziert oder ausgeschlossen werden.

V. AUSBLICK

Mit dieser Arbeit steht ein miniaturisiertes Meßsystem zur Verfügung, das für Vor-Ort-Messungen geeignet ist und aufgrund der biologischen Wirkung Herbizide bis zu 0,1 µg/l Diuron (Methode Spurenanalytik) beziehungsweise bis zu 0,04 µg/l (Methode Wirkproben) nachweist. Durch die kurze Analysendauer (90 Sekunden) und die leichte Handhabbarkeit können mehrere Messungen innerhalb einer Stunde ohne großen Aufwand durchgeführt werden; dies gleicht die Tatsache aus, daß eine kontinuierliche Dauerüberwachung mit den empfindlichen Thylakoiden vorläufig nicht realisierbar erscheint.

Bezüglich der Gefriertrocknung ergeben sich Hinweise, daß eine weitere Verbesserung der Stabilität von Thylakoiden durch zusätzliche Optimierung des Verfahrens erreicht werden könnte. Ein Anhaltspunkt für die Verfahrensführung kann dabei die exakte Bestimmung der Kollapstemperatur der Probe geben.

Biosensor für Herbizide

Limitierend für die Nachweisgrenze der Messung, insbesondere bei der Methode Spurenanalytik, ist die Reproduzierbarkeit der Grundlinie bei Verwendung eines 655nm-Diodenlasers zur Anregung. Hierbei besteht die Möglichkeit, daß nach einer technischen Perfektionierung der Anregung mit blauen NSB-LEDs die Grundlinie durch verminderte Streulichteinflüsse besser reproduziert werden kann. Kann diese Abweichung eliminiert werden, besteht die Möglichkeit, der nur durch das apparative Rauschen bestimmten Nachweisgrenze von 0,03 µg/l Diuron näherzukommen.

Zur Verwendung des Sensors in der Spurenanalytik ist eine große Anzahl unbekannter Proben in Routinemessungen zu untersuchen und hieraus die Bestimmungsgrenzen in realen Proben abzuleiten. Eine Liste der unter idealen und realen Bedingungen unterhalb des Grenzwertes erfaßbaren Herbizide kann Aufschluß über konkrete Einsatzgebiete des Sensors geben. In zahlreichen Wasserwerken und Oberflächengewässern wird gezielt nach einer begrenzten Anzahl von Herbiziden gesucht, die in der Nachbarschaft der Einzugsgebiete der Trinkwasserbrunnen angewandt werden.

Erhöhter Probendurchsatz in Mikrotiterplatten

Die orientierenden Versuche zum Nachweis von Herbiziden in Mikrotiterplatten zeigen, daß eine Erhöhung des Probendurchsatzes mit diesem System erreicht werden kann. Die

Nachweisgrenzen liegen ohne jede Optimierung bereits im $\mu\text{g/l}$ -Bereich. Durch Analyse der Störeinflüsse und gezielte Optimierung ist eine Nachweisgrenze unter $1 \mu\text{g/l}$ zu erwarten. Der verwendete Fluoreszenzreader mit Blitzanregung wurde zudem kaum modifiziert und ist käuflich zu erwerben, so daß der Herbizidtest als Ergänzung zu Analysenverfahren mit diesem Fluoreszenzreader von Anwendern der Spurenanalytik und der Wirkstoffanalytik verwendet werden könnte. Hierbei ist das System für die Wirkstoffanalytik bereits einsetzbar, wenn Lösungen höherer Wirkstoffkonzentrationen auf ihre herbizidische Wirkung hin untersucht werden sollen.

Miniaturisiertes Meßsystem

Das miniaturisierte Meßsystem wurde für die Fluoreszenzemissionsmessung an Thylakoiden optimiert. Gleichwohl handelt es sich um ein miniaturisiertes System zur Fluoreszenzmessung, da prinzipielle Störeinflüsse bei der Fluoreszenzmessung berücksichtigt wurden. Durch Austauschen der Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung und durch geeignete Auswahl von Filtersystemen ist es prinzipiell auch für andere analytische Aufgaben auf der Basis der Fluoreszenzemission vor Ort einsatzfähig. Hierzu müßten Chemikalien und Hilfsstoffe in den Küvetten vorgelegt werden können, und eine Anpassung des Verfahrens durchgeführt werden.

Nachweisverfahren

Das Nachweisverfahren bietet außer einer Äquivalentquantifizierung zusätzlich weiterführende Informationen, nämlich über die *biologische Wirksamkeit* der zu untersuchenden Probe auf Thylakoide. Der Biosensor dieser Arbeit liefert pflanzentoxikologische Informationen. Prinzipiell kann ein System für humantoxikologische Hinweise entwickelt werden, beispielsweise unter Verwendung spezifischer Enzymsysteme. Derartige toxikologische Hinweise sind für zukünftige Analysenverfahren unverzichtbar, da sie - wie im vorliegenden Fall - den Analytiker in die Lage versetzen, die Quantität einer Herbizidbelastung nicht nur festzustellen, sondern auch zu werten. Antagonismen, Synergismen und Additionsreaktionen - welche oftmals weder bekannt noch berechenbar sind - werden erfaßt. Durch die Entwicklung ähnlicher, auf dem Wirkprinzip beruhender Analysemethoden für routinemäßig in der Umweltanalytik bestimmte Parameter kann eine neue Dimensionierung der Umweltanalytik resultieren. So werden dem Gesetzgeber analytische Verfahren an die Hand gegeben werden, die es ermöglichen, in der Umweltgesetzgebung auch Wirkaussagen als Grenzwerte zu berücksichtigen.

VI. MATERIAL UND METHODEN

Die Originaldaten wurden auf 40 Datendisketten HD 3,5'' gespeichert.

VI.1. Equipment

Makrosystem für Fluoreszenzmessungen:

Optische Bank-Bauteile, Spindler&Hoyer

Anregungslichtquelle Diaprojektorlampe 12 V, 50 W Xenophot HCX

Kantenfilter und Interferenzfilter, Fa. Dr. Anders, Nabburg

Lichtleiter, Oriol, BTO, LaserComponents

Transientenrecorder, A-D Wandler: Microlink, Fa. Biodata, Manchester

Monochromator mit Schrittmotor, L.O.T. Oriol

Photomultiplier HC125-01 1Inch Headon-PMT, Hamamatsu

Gefriertrocknungsanlage I (für Vorversuche), Sigma 1A, Fa. Christ

Gefriertrocknungsanlage II:

Lyovac GT 2 Grundanlage mit kleiner Trockenkammer, FinnAqua
mit Druckwächter

Pumpe Vakuubrand RZ 8

Kryostat Haake F3-K

Dioenarray-Spektrometer X-DAP, Polytec

fl.Stickstoffbehälter Gt 35, Bender&Hobein

Fluoreszenzreader Fluostar, SLT

Gewächshaus des Forschungszentrums

Glove Bag X-17-17, Roth

Homogenisator Ultra Turrax T25, Kanket&Kunkel Labortechnik

Kälte-Umwälzthermostat Julabo VC F10

PEA-Detektor, Hansatech, U.K.

Sauerstoffelektrode DW 1, Bachofer

Spektralphotometer DMS 70 UV/VIS, Varian

Vortex Genie 2, Bender&Hobein

Zentrifuge, kühlbar Omnifuge 2.ORS, Heraeus Sepatech

VI.2. Bauteile für den Sensor

Diffusor, Spindler&Hoyer

Elektronik, siehe Anlage

Filter Detektion, RG 715-Kantenfilter, Dr. Anders, Nabburg

Diodenlaser: Flexpoint 655nm 3mW, Flexpoint 635nm, 2 mW, FP-642TD, Laser Components

Lasordiode: DLS-25-750-5, Spindler&Hoyer

LED blau zur Anregung: New Super Bright Blue LED, L200CWB14, LEDTronics Inc.,
Torrance, CA, USA

LED rot zur Reoxidation: 740 nm High Performance LED, 1A334, ABB Hafo

Meßtisch 30•4,8, Owis

Photodioden, Hamamatsu Dt., München

Hardware Portable PC T 6400 SXC, Toshiba; Notebook Z-LITE 425L, Zenith

Einmalküvetten, Sarstedt

VI.3. Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Alle Grundchemikalien, die nicht in der nachstehenden Liste aufgeführt wurden, sowie organische Lösungsmittel (p.A.-Qualität) wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

Friko, Karlsruhe:

Saatgut Erbsensamen Progreß Nr. 9

Einheits-P-Erde, Patzer

Bender&Hobein:

Cryo-Zubehör, Eppendorf Pipetten und Zubehör

Aldrich:

Diphenylcarbamid; Tetramethoxysilan; Acetylaceton; Acetonylaceton; Glyoxal, 40%aq.

Sigma:

Polyacrylamid-hydrazide (PAAH), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, pKs: 8,3 bei $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$),

N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES, pKs 7,5 bei $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$),

Natriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Titriplex III), Raffinose, Saccharose,

Sorbitol, Glutaraldehyd Grade I (25%ige Lösung aq.), Mikrotiterplatten CytoPlate 96 Well

Riedel de Haen, Stuttgart: Herbizide

Diuron: 3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff

Atrazin: 2-Ethylamino-4-chloro-6-isopropylamino-1,3,5-Triazin

Terbutylazin: 2-Ethylamino-4-chloro-6-t-butylamino-1,3,5-Triazin

Serva, Heidelberg:

BSA Albumine bovine Fraktion V, receptorgrade; Dialyseschläuche

Leihgaben:

Dr. Mostart, Ciba Geig, Basel:

DMT (2,4-Dichlor-6-Methylthio-1,3,5-Triazin)

TMT (Trithiocyanursäure)

Universität Freiburg:

DCPIP (Dichlorphenolindophenol)

VI.4. Biologische Puffer

Lösungsmittel generell: entmineralisiertes Wasser

Isolationspuffer für Thylakoide aus Erbsenkeimlingen (*Moss et al., 1984*)

Saccharose	340	mM
HEPES	2	mM
KCl	0,4	mM
EDTA	0,04	mM

mit 2 M KOH auf pH 7,8

Isolationspuffer für Thylakoide aus Kopfsalat

Saccharose	340	mM
Ascorbinsäure	5	mM
HEPES	2	mM
KCl	0,4	mM
EDTA	0,04	mM

mit 2 M KOH auf pH 7,8

Doppelt konzentrierter Isolationspuffer

entsprechend Isolationspuffer; Konzentrationen in mM • 2

Standardpuffer

Saccharose	340	mM
HEPES	50	mM
KCl	10	mM
EDTA	1	mM
MgCl ₂ •6aq	1	mM
MnCl ₂ •2aq	1	mM

mit 2 M KOH auf pH 7,8

nur zur Thylakoid-Präparation:

add. BSA 0,4 Gew %

Doppelt konzentrierter Standardpuffer

entsprechend Standardpuffer; Konzentrationen in mM • 2

Suspensionspuffer (Sauerstoffmessung) (*Walker, 1987*)

Sorbitol	340	mM
HEPES	50	mM
KCl	10	mM
EDTA	1	mM
MgCl ₂ • 6aq	1	mM
MnCl ₂ • 2aq	1	mM

mit 2 M KOH auf pH 7,8

Roh-Standardpuffer (ohne Osmotikum)

HEPES	50	mM
KCl	10	mM
EDTA	1	mM
MgCl ₂ •6aq	1	mM
MnCl ₂ •2aq	1	mM
BSA	0,4	Gew %

mit 2 M KOH auf pH 7,8

Puffer für die Gefriertrocknung

Roh-Standardpuffer, je nach Versuch angereichert mit

1. „Sorbitol“	Sorbitol	340	mM		
2. „Saccharose“	Saccharose	340	mM		
3. „Raffinose“	Raffinose	340	mM		
4. „Saccharose:Sorbitol 1:1“	Saccharose	160	mM	und Sorbitol	160 mM
5. „Saccharose:Sorbitol 2:1“	Saccharose	227	mM	und Sorbitol	113 mM

VI.5. Präparation von Thylakoiden aus Erbsen und Kopfsalat

Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum*) als biologisches Material

Voraussetzung zur Gewinnung aktiver Thylakoide ist das Heranziehen "gesunder", gut wachsender Erbsenpflanzen. Hierfür wurde das Saatgut Progress Nr. 9 ausgewählt, sechs Stunden in Leitungswasser eingeweicht (180 g / 1 l) und anschließend auf Einheitserde gleichmäßig ausgesät. Um die Wachstumsbedingungen zu optimieren und zu standardisieren, wurden die Erbsenpflanzen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen gezogen.

Bedingungen im Gewächshaus:

Tag-Nacht-Zyklus:	14 h „Tag“, 10 h „Nacht“
Temperatur Tag:	25 °C
Temperatur Nacht:	15 °C
Beleuchtung im Tagzyklus:	Tageslicht plus Zusatzbeleuchtung mit Pflanzlampen
rel. Luftfeuchte:	70 %
Wasserversorgung:	pro 48 h / ca. 500 ml kaltes Leitungswasser pro Schale

Kopfsalat als biologisches Material

Käuflicher Kopfsalat wurde möglichst frisch erworben (Großmarkt) und sofort zur Präparation verwendet. Harte Leitbündel-Anteile wurden entfernt, weiche, angegriffene oder vergilbte

Blätter wurden nicht verwendet. Die äußeren, dunkelgrünen Blätter wurden in 3 cm² Stücke gerissen und sofort in halbgefrorenes Medium eingebracht. Die Präparationsschritte entsprechen denen der Präparation von Thylakoiden aus Erbsenpflanzen; der Isolationspuffer wurde mit 5 mM Ascorbinsäure angereichert.

Präparationsverfahren für isolierte Thylakoide (Moss et al., 1984)

Prinzip der Präparation

1. Züchtung der Erbsenkeimlinge / Kaufen des Kopfsalates
2. Ernte der Erbsenkeimlinge / Auswahl der Kopfsalatblätter
3. Zerkleinern des biologischen Materials
4. Homogenisieren in Isolationspuffer
5. Filtrieren und Zentrifugieren des Filtrates
6. Abdekantieren der überstehenden Lösung und Resuspension des "Pellet" in Isolationspuffer
7. Osmotisches "Schocken" mit MgCl₂-Lösung zur Gewinnung isolierter Thylakoide
8. Zugabe von doppeltkonzentriertem Isolationspuffer und Zentrifugation
9. Abdekantieren der überstehenden Lösung und Resuspension des "Pellet" in Standardpuffer
10. Aliquotieren

Um aktive Thylakoide aus Erbsenpflanzen präparieren zu können, müssen optimale Präparationsparameter gewählt und genau eingehalten werden. Prinzipiell muß die Präparation möglichst schnell durchgeführt werden und es soll vermieden werden, daß die Thylakoide während der Präparation Temperaturen über 4°C ausgesetzt werden.

Vor der Präparation wurden alle Geräte und Gefäße auf 0°C vorgekühlt.

Um eine möglichst rasche Homogenisation zu ermöglichen, wurde das biologische Material nach dem Ernten in 3 cm² große Stücke geschnitten. Das biologische Material wurde in halbgefrorenem Isolationsmedium homogenisiert, um die bei der Homogenisation entstehende Wärme möglichst rasch abführen zu können. Zur Beschleunigung der Homogenisation und um ein Festfahren des Stabes zu verhindern, wurde der Stab gleichmäßig während des Rührens von oben nach unten durch die Mischung geführt.

Für die Filtration wurde Mull verwendet, der zur weiteren Beschleunigung des Prozesses ausgewungen wurde.

Die Zentrifugationsbedingungen wurden wie folgt optimiert:

Gerät:	Omnifuge 2. ORS, Fa. Heraeus Sepatech
Temperatur:	0°C
max. Geschwindigkeit:	3000 g (30 s)
Beschleunigungszeit:	30 s
Abbremszeit:	30 s
Gefäß:	500 ml Zentrifugenbecher (Teflon)

Der "Pellet" wurde mit Watte aufgenommen und resuspendiert. Die Resuspension konnte durch die Verwendung eines 500 ml Zentrifugenbeckers (anstatt 4 mal 100 ml Zentrifugenbechern) wesentlich beschleunigt werden (Arbeiten in "einer Charge").

Das osmotische Schocken mit 10 mM MgCl₂-Lösung wurde auf 15 s verkürzt.

Präparationsverfahren für TRIS-gewaschene Thylakoide (modifiziert nach *Yamashita et al., 1969*)

Chemikalien: TRIS-Puffer 0,2 M, auf pH 8,0 mit verd. HCl

Mengen: pro Pellet 200 ml TRIS-Puffer

(Voraussetzung: Pellet enthält 5 mg Chlorophyll. Dies wurde erfahrungsgemäß bei guter Ausbeute und Einwaagen wie oben erreicht)

Während der Präparation wurde das TRIS-Waschen als weiterer Suspensions/Zentrifugationsschritt nach dem osmotischen Schocken eingeführt.

Hierzu wurde der Pellet 5 min in TRIS-Puffer bei 25 °C suspendiert, 2 min zentrifugiert (Bedingungen wie oben), und der Pellet wie oben beschrieben in Standardpuffer aufgenommen.

Für eine optimale Hemmung durch TRIS-Waschen mußte die Temperatur der Suspension während der Reaktion bei 25 °C gehalten werden.

Bestimmung des Chlorophyllgehaltes (*Moss et al., 1984*)

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde die Chloroplastensuspension in 80% Aceton ausgeschüttelt, zentrifugiert, und bei 652 nm gegen 80 % Aceton im Zweistrahlphotometer vermessen (Extinktionskoeffizient zur Berechnung: 34,5 (mg/ml)⁻¹ cm⁻¹).

Gerät:	Omnifuge 2. ORS, Fa. Heraeus Sepatech
Temperatur:	20 °C
max. Geschwindigkeit:	4000 g (2 min)
Beschleunigungszeit:	30 s
Abbremszeit:	30 s
Gefäß:	10 ml Zentrifugengläser

VI.6. Aktivitätsmessung: Standardverfahren zur Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken im Makrosystem

Die Aktivitätsmessung über Fluoreszenzkinetiken wurde in der optischen Bank mit folgendem Aufbau durchgeführt:

Aufbau Fluoreszenzmeßplatz

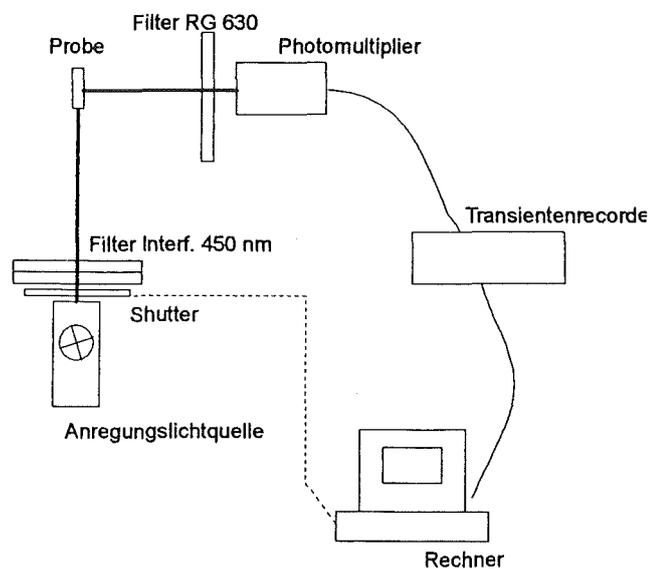


Abbildung 6-1: Aufbau des Fluoreszenzmeßplatzes mit Bauteilen der optischen Bank („Makrosystem für Fluoreszenzmessungen“). Zur Spezifizierung der Geräte siehe oben unter „Equipment“

Thylakoide wurden dabei entsprechend $10\mu\text{g}$ Chlorophyll / ml in Standardpuffer suspendiert, in Einmalküvetten pipettiert und die Fluoreszenzkinetik aufgenommen.

Zu Alterungsmessungen wurden die Thylakoide aliquotiert und unter den jeweiligen Bedingungen in Volumina von $(50\dots100)\mu\text{l}$ gelagert. Zur Messung wurde jeweils eines der Gefäße entnommen, gegebenenfalls bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut, und die Thylakoide entsprechend $10\mu\text{g}$ Chlorophyll / ml in Standardpuffer suspendiert.

Berechnung der Aktivität

Zur Berechnung der „Fluoreszenzaktivität“ A_F wurde folgende Formel verwendet:

$$A_F (\%) = (1 - X) \cdot 100 / (1 - B)$$

mit $X = F_{\min}/F_{\max}$ zum jeweiligen Zeitpunkt der Alterungsmessung

$B = F_{\min}/F_{\max}$ unmittelbar nach der Präparation

VI.7. Aktivitätsmessung: Messung der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit

Der Nachweis von Sauerstoff erfolgte gemäß *Walker, 1987*, elektrochemisch mittels einer Platinelektrode, welche von einer für Sauerstoff selektiv durchlässigen Teflonmembran überspannt ist („Sauerstoffelektrode“). Als Gegenelektrode wurde eine Silber/Silberchloridelektrode verwendet. Zur Steuerung der Anregungslichtquelle und zur Meßdatenerfassung bzw. -auswertung wurde eine in der Arbeitsgruppe Biosensoren des KfK entwickelte Software benutzt.

Die Absolutwerte der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit wurde in mmol Sauerstoff/ mg Chlorophyll und Stunde angegeben. Der Wert unmittelbar nach der Präparation wurde in der vorliegenden Arbeit als "Anfangsaktivität" gleich 100 % gesetzt. Die Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt (bspw. bei Alterungsmessungen) errechnete sich aus dem jeweiligen Absolutwert zu diesem Zeitpunkt in Prozent des Absolutwertes unmittelbar nach der Präparation.

Die Meßbedingungen wurden wie folgt optimiert:

Suspensionspuffer f. Sauerstoffmessung	1 ml
Kaliumhexacyanoferrat-III-Lsg, 200mM	10 µl
NH ₄ Cl-Lsg., 300 mM	10 µl
Chlorophyllgehalt	10 µg/ml
Anregung über	Weißlichtquelle, 50W
Filter vor Anregungslichtquelle	RG 610
Kalibrierung der Elektrode	2-Punkt -Eichung mit sauerstoffgesättigtem dest. Wasser (25°C : 0.253 µmol O ₂ /ml) und Nulllinie mit Dithionit
spez. Bedingung der Messung	temperiert (20 °C)
Meßdatenerfassung und -auswertung	über PC

VI.8. Gefriertrocknung und Handhabung von Thylakoidpulvern

Die Einzelschritte der Gefriertrocknung zu optimieren und die besten Verfahrensbedingungen zu ermitteln, war ein Ziel der Doktorarbeit. Die Details zur Durchführung der Gefriertrocknung und die optimalen Geräteparameter werden daher im Kapitel III.2. Stabilisierung von Thylakoiden ausführlich beschrieben.

Zu den verwendeten Puffern siehe unter VI.4. „Biologische Puffer“.

Bei der Überführung der Thylakoidpulver aus den Petrischalen der Gefriertrocknung in die Gefäße zur Aufbewahrung wurden folgende Maßnahmen zur Erhaltung des Trocknungszustandes eingehalten:

1. Fluten der Gefriertrocknungskammer mit trockener Luft, die langsam durch ein Trockenrohr mit Silicagel geleitet wurde.
2. Die Temperatur der Petrischalen bei der Entnahme aus der Kammer gleich der Raumtemperatur oder lag darüber (sonst Gefahr der Kondenswasserbildung).
3. Die Verschlusseinrichtung (drehbare Stahlplatte, von außen zu bedienen; Zubehör Lyovac GT 2, FinnAqua) wurde vor der Gefriertrocknung mit Parafilmstücken belegt; vor dem Öffnen der Kammer muß die Verschlusseinrichtung fest auf die Petrischalen geschraubt werden; der Parafilm wurde anschließend über die Petrischalen gezogen und erst dann die Petrischalen aus der Kammer entnommen und sofort in einen Exsiccator eingebracht (Silicagel).
4. Zur Überführung der Pulver aus den Petrischalen in die Aufbewahrungsgefäße wurde ein Glove Bag mit trockener Luft oder Innertgas gefüllt, und darin das Umfüllen vorgenommen. (hierbei erwiesen sich aufgrund elektrostatischer Aufladung nicht-metallische Hilfsmittel als optimal).

Aktivitätsmessung an Thylakoidpulvern

Die Aktivitätsmessung an Thylakoidpulvern wurde entsprechend der oben angegebenen Bedingungen für die Aktivitätsmessung an nativen Thylakoiden (Fluoreszenzmessung) durchgeführt (siehe S. 26).

Um die korrekte Chlorophyllkonzentration sicherzustellen, wurden zwei Verfahren entwickelt: Für Vorversuche: Der Chlorophyllgehalt wurde zunächst visuell abgeschätzt, indem eine geringe Menge Thylakoidpulver in 5 ml Standardpuffer suspendiert wurden, und die Färbung und Trübung mit einer Referenz (pipettierte native Suspension) der gewünschten Chlorophyllkonzentration verglichen und korrigiert wurde. Durch die unter konstanten

Bedingungen ermittelte maximale Fluoreszenzintensität im Vergleich zur nativen Suspension wurde die Abschätzung überprüft. Hierbei zeigte sich, daß die visuelle Abschätzung für einen geübten Experimentator für Vorversuche ausreicht und gut reproduzierbar ist.

Für die Messungen dieser Arbeit, die mit der Aktivität und Alterung der Thylakoide, bzw. der Charakterisierung des Sensors verbunden waren, wurde vor jedem Meßzyklus eine definierte Menge Thylakoidpulver eingewogen, in 250 µl Standardpuffer suspendiert, und der Chlorophyllgehalt dieser Suspension wie unter „Präparation von Thylakoiden aus Erbsen und Kopfsalat“ beschrieben, bestimmt. Hieraus wurde das Volumen berechnet, das einem Chlorophyllgehalt von 10 µg/ml entspricht. Aus einer zweiten Suspension, deren Konzentration an Thylakoidpulver der ersten entsprach, konnten dann die Messungen durchgeführt werden. Die zweite Suspension wurde erst nach der Chlorophyllbestimmung hergestellt, um Alterungsmessungen und Aktivitätsbestimmungen nicht zu verfälschen.

VI.9. Messung der DCPIP-Reduktionsgeschwindigkeit

Prinzip der Messung

Die Messung der DCPIP-Reduktionsgeschwindigkeit beruht auf der Abnahme der Absorption bei 600 nm (Maximum der DCPIP-Absorption) über einen festgelegten Zeitraum der Belichtung der Thylakoide. Mechanistisch wird DCPIP während der Belichtung als Elektronenakzeptor nach Q_A durch die Elektronen der Lichtreaktion II zu $DCPIPH_2$ (farblos) reduziert (*Vernon et al., 1969*).

Zur Messung der DCPIP-Reduktionsgeschwindigkeit wurde ein Absorptionsmeßplatz mit der Möglichkeit, Thylakoide anzuregen, aufgebaut (siehe Abbildung 9-1).

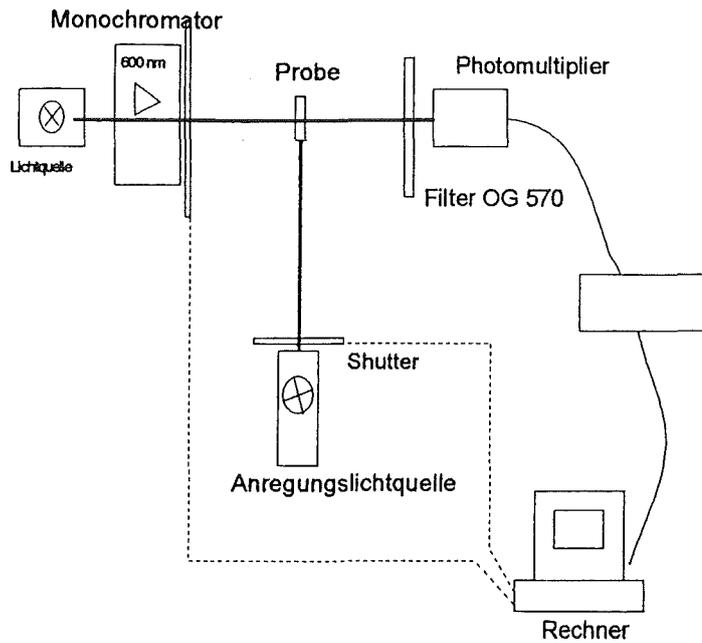


Abbildung 9-1: Absorptionmeßplatz (aus Bauteilen der optischen Bank); --Bauteile siehe oben „Equipment“

Optimierte Meßbedingungen bei DCPIP-Messungen

Standardpuffer	1 ml
NH ₄ Cl-Lösung, 300 mM	10 µl
DCPIP-Lösung, 1 mM	25 µl
Chlorophyll in der Küvette	5 µg / ml
Belichtungszeit	5 Sekunden
Dunkeladaption	5 Minuten
Anregungslichtquelle	50 W, Weißlichtquelle
Strom für Anregungslicht	3,7 A
Abstand Lichtleiter-Küvette	2 cm
Meßwellenlänge	600 nm
Detektor	Photomultiplier mit OG 570 Filter
Auswertung	Programm DCPIP

Umrechnung der Absorptionsänderung bei der DCPIP-Messung in Einheiten der Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit und theoretische Voraussetzungen:

Absorptionskoeffizient DCPIP bei 600 nm	0,0206 $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Länge der durchstrahlten Schicht (Küvette) (d)	1 cm
Anzahl der Elektronen für die DCPIP-Reduktion (n_{DCPIP})	2
Anzahl der Elektronen für die Sauerstoffentwicklung ($n_{\text{Sauerstoff}}$)	4
Belichtungsdauer x in Stunden	5/3600 Stunden
Chlorophyllkonzentration in der Küvette, C	5 mg/l

Für den Umrechnungsfaktor z für die Meßwerte der DCPIP-Messung als

Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol Sauerstoff} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$ gilt:

$$z = n_{\text{Sauerstoff}} / (n_{\text{DCPIP}} \cdot 0,0206 \cdot d \cdot C \cdot x) = 3495 \mu\text{M Sauerstoff} \cdot \text{l} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$= 3495 \mu\text{mol Sauerstoff} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$$

DCPIP-Reduktionsgeschwindigkeit als Sauerstoffentwicklungsgeschwindigkeit (mit Delta A = Absolutwert der Absorptionsänderung während der DCPIP-Messung; Meßwert):

$$V_{\text{DCPIP}} = \text{Delta A} \cdot z$$

Um den Einfluß von Nebenreaktionen und Untergrundsignalen ausschalten zu können, wurden die Signale ermittelt, welche aus den apparativen Bedingungen, einer DCPIP-Bleichung und einer Bleichung der Thylakoide allein resultieren.

Nach Abzug dieser Untergrundsignale konnte aus der Absorptionsänderung des bereinigten Meßsignals eine Aussage über die Aktivität der untersuchten Chloroplasten getroffen werden.

Die unter Einhaltung der optimierten Parameter gewonnenen Meßdaten stimmen gut mit den Daten überein, die über die Sauerstoffmessung gewonnen werden.

Hierbei wurde festgestellt, daß es für die Vergleichbarkeit der Messungen aus Sauerstoffmessung und DCPIP-Messung (und damit für die Richtigkeit der DCPIP-Messung) notwendig war, die Meßdaten der DCPIP-Reduktion unmittelbar nach Ausschalten des Anregungslichtes abzugreifen. Wartet man im Dunkeln ab, so zeigt sich eine allmähliche Zunahme der Absorption im Dunkeln. Dies wurde auf eine Re-Oxidation von DCPIPH₂ durch Sauerstoff zurückgeführt. Mit der folgenden Meßreihe wurde gezeigt, daß es sich tatsächlich um eine Rückreaktion zu DCPIP handelt (Abbildung 9-2). Dabei wurden die Spektren vor dem Belichten als Referenz aufgenommen; nach dem Belichten wurde alle 30 Sekunden ein Spektrum aufgenommen, während DCPIPH₂ allmählich oxidiert wurde. Durch Bildung der

Differenzspektren ist deutlich zu sehen, daß die Bande bei 600 nm während der Dunkelphase vom negativen Bereich (geringe Absorption) in Richtung Null (wachsende Absorption bei 600 nm) wächst.

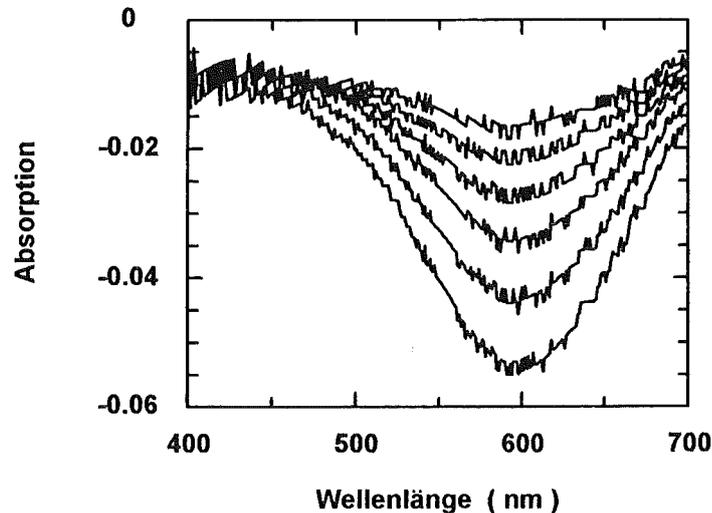


Abbildung 9-2: Oxidation von DCPIP₂ zu DCPIP im Dunkeln; Referenz:Spektrum vor dem Belichten; Differenz-Spektren im 30-Sekunden-Abstand aufgenommen (von unten nach oben); man erkennt die Zunahme der Absorption bei 600 nm, das heißt, die Zunahme an DCPIP

Bei der Qualitätsbeurteilung von Thylakoiden zeigte sich, daß die optimierte DCPIP-Messung Werte liefert, die innerhalb des Analysenfehlers mit der Sauerstoffmessung vergleichbar sind:

Beispiele

Charge-Nr.	DCPIP	Sauerstoffmessung
100792	212	203
150792	245	234

VL.10. Ersatz des Wasserspaltungssystems

Der Ersatz des Wasserspaltungssystems durch DPC wurde nach *Vernon et al. (1969)* durchgeführt. Zu diesen Messungen wurden TRIS-gewaschene Thylakoide (siehe unter „Präparation von Thylakoiden aus Erbsen und Kopfsalat“, TRIS-Thylakoide) verwendet.

Hierbei wurden folgende, optimierte Bedingungen eingehalten:

Puffer V (eingestellt auf pH 6,4):

Saccharose	250	mM
KH ₂ PO ₄	30	mM

Reaktionsmischung in der Küvette zur Aktivitätsmessung über DCPIP (siehe S.173)

Puffer V	1	ml
TRIS-Thylakoide, entspr.	10	µg Chlorophyll / ml
DPC	0,5	mM
DCPIP	0,025	mM

Der Ersatz des Wasserspaltungssystems durch Hydroxylamin wurde nach *Yamashita et al.* (1978) durchgeführt. Auch zu diesen Messungen wurden TRIS-gewaschene Thylakoide (siehe unter „Präparation von Thylakoiden aus Erbsen und Kopfsalat“, TRIS-Thylakoide) verwendet.

Reaktionsmischung in der Küvette zur Aktivitätsmessung über Fluoreszenzmessung im Makrosystem (siehe S.26):

Standardpuffer	1	ml
TRIS-Thylakoide, entspr.	10	µg Chlorophyll / ml
Hydroxylamin, 300mM aq.	10	µl

Hierbei wurde die Hydroxylaminlösung bei Alterungsmessungen jeweils frisch bereitete und unmittelbar vor jeder Messung zupipettiert.

VI.11. Immobilisierung in PAAH-Polymere

Die Immobilisierung in PAAH-Polymere durch Quervernetzung linearer Polyacrylamidhydrazid-Ketten wird exemplarisch an der Präparation eines PAAH-Glutaraldehyd-Geles beschrieben und gilt entsprechend für die übrigen, erprobten Vernetzer.

Lösung P₁ : 3 % PAAH-Lösung, aq., 18 Stunden gerührt

Lösung P₂ : 10 % Glutaraldehydlösung, aq. und Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7 im
Volumenverhältnis 1:1 gemischt

1 cm-Küvetten wurden auf Eis vorgekühlt, 1 ml P₁-Lösung darin vorgelegt und 200 µl doppelt konzentrierter Standardpuffer zugegeben. Nach Zugabe von 200 µl 87 %igem Glycerin wurden native Thylakoide entsprechend 10 µg Chlorophyll / ml (bez. des Endvolumens) zugegeben und mit einem Glasstab gründlich gemischt. Anschließend wurden 50 µl Lösung P₂ zupipettiert, rasch durchmischt und die Lösung auf Eis belassen, bis ein festes

Gel entstanden war (hier: 5 Minuten). Danach wurde mehrmals vorsichtig Standardpuffer über das Gel geschichtet und wieder abdekantiert (Waschvorgang).

Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Küvette direkt in die optische Bank eingestellt und im Makrosystem (siehe S.26) die Fluoreszenzkinetiken aufgenommen.

VI.12. Immobilisierung nach dem Sol/Gel-Prozeß

Die Optimierung des Verfahrens zur Immobilisierung von Thylakoiden nach dem Sol/Gel-Prozeß war ein Ziel dieser Arbeit und wird in Kapitel III.3 Immobilisierung beschrieben.

Reaktionsmischung

Tetramethoxysilan	200	µl
Standardpuffer	800	µl
Thylakoide, entspr.	10	µg Chlorophyll / ml
Oberfläche:	4,9	cm ²
Schichtdicke:	0,2	cm

Vorgehen

Standardpuffer und Tetramethoxysilan wurden mit einem Vortex-Mixer vorgemischt und in eine Mini-Petrischale, die auf Eis gekühlt wurde, gegeben. Nach 5 Minuten auf Eis wurde die Petrischale mit Handwärme rasch auf Raumtemperatur gebracht, kurz vor der Gelierung die Thylakoide zugegeben und gemischt. Nach Bildung eines Geles wurde mehrmals vorsichtig mit Standardpuffer überschichtet und abdekantiert (Waschvorgang). Zur Messung wurde das Gel in eine Küvette mit 1 ml Standardpuffer überführt und die Fluoreszenzkinetiken aufgenommen. Aufbewahrt wurde das Gel unter Standardpuffer im Kühlschrank.

VI.13. Dialyse-Verfahren

Der Ablauf dieses Versuches ist darauf ausgerichtet, möglichst wenig Störeinflüsse auf die Messung zu erhalten. Diese Störeffekte könnten durch unterschiedliche Thylakoidkonzentrationen oder durch Alterungseinflüsse, sowie bei der Herstellung der Herbizidlösungen entstehen. Folgende Vorgehensweise hat sich daher bewährt:

Zunächst wurde ein Dialyseschlauch in 10 cm lange Einheiten geschnitten (pro Ansatz ein Teilstück) und in 400 ml Wasser mit einer Spatelspitze Titriplex ausgekocht. Währenddessen wurde pro Ansatz ein Becherglas mit 1 l Standardpuffer gefüllt und 4 cm lange Magnetstäbe

(Rührfische) zugegeben. Hierzu wurde jeweils eine sehr geringe Menge einer Herbizidstammlösung gegeben, so daß im Becherglas die gewünschte Herbizidkonzentration resultierte (Referenz ohne Herbizid, 1 mg/l, 10 mg/l). Von jedem Ansatz wurden 5 ml mit einer Glasvollpipette entnommen und in ein 10 ml Becherglas gegeben. Hierzu wurden jeweils Thylakoide entsprechend 10 µg Chlorophyll / ml pipettiert. 2,5 ml dieser Lösungen wurden jeweils in die ausgekochten und mit entmineralisiertem Wasser gespülten Dialyseschläuche gefüllt, diese verschlossen, und, wie die übrigen Lösungen, in den Kühlschrank verbracht. Die 10 ml Bechergläser wurden mit Parafilm verschlossen.

Die 1 l-Bechergläser wurden auf ein Magnetrührfeld (Magnetrührfeld Multipoint HP6, Variomag) im Kühlschrank gestellt, die jeweils zugehörigen, gefüllten Dialyseschläuche zugegeben, und unter gleichmäßigem Rühren dialysiert.

Nach Ablauf der gewünschten Dialysezeit (20 min) wurde jeweils Probe gegen Referenz im Sensor vermessen: jeweilige Herbizidkonzentration dialysiert (aus Dialyseschlauch) gegen Standardpuffer dialysiert (aus Dialyseschlauch), sowie jeweilige Herbizidkonzentration nicht dialysiert (aus 10 ml Becherglas) gegen Standardpuffer nicht dialysiert (aus 10 ml Becherglas). Aus dem Vergleich der Signalhöhen für jede Herbizidkonzentration (dialysiert - nicht dialysiert) lassen sich Rückschlüsse auf das Anreicherungsverhalten der Herbizide in Thylakoiden ziehen.

VL14. Beschleunigung der Reoxidation

Zur Messung des Reoxidationsgrades unter verschiedenen Bedingungen wurden jeweils die Fluoreszenzkinetiken der Thylakoide in Standardpuffer (entsprechend 10 µg Chlorophyll / ml) im Makrosystem (siehe S.26) aufgenommen, und ihr Verlauf mit einer Kinetik mit 100%igem Reoxidationsgrad verglichen. Dies wurde mathematisch durch Differenzbildung Probe-Referenz erreicht. Dadurch erhält man die Abweichung von der Kinetik ideal reoxidierter Thylakoide in Form von positiven, peakförmigen Signalen (Abweichungen von der Nulllinie). Die Höhe der Signale (H_x) wurde jeweils abgelesen.

Für einen 100%ige Reoxidationsgrad (RG) war die Höhe des Signals gleich Null; ohne jede Reoxidation (Reoxidationsgrad = 0%; H_0) wurde ein maximales Signal ermittelt.

Berechnung:

$$RG (\%) = (H_0 - H_x) \cdot 100 / H_0$$

Zur Messung der lichtinduzierten Beschleunigung der Reoxidation wurden im Makrosystem (Aufbau S. 170) während der Reoxidation die Filter vor dem Anregungslicht durch eine RG 715 - Filter ersetzt. Zur Anregung konnten die Filter in ca. 3 Sekunden gewechselt werden. Zur Messung der Beschleunigung der Reoxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung wurde mit einer resultierenden Konzentration in der Küvette von 0,4 μM Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung (aq) gemessen. Hierbei wurden die Fluoreszenzkinetiken der Thylakoide nach variierenden Zeiten einfacher Dunkeladaption aufgenommen, und mit vollständig dunkeladaptierten Thylakoiden (5 Minuten Dunkeladapionszeit) verglichen.

VI.15. Versuche zur Meßtechnik und Realisierung

Zum Test der optischen und elektronischen Bauteile des Labormusters und zur Ermittlung der optimalen optischen Geometrie von Anregung, Reoxidation und Detektion wurde aus Bausteinen einer optischen Bank ein Funktionsmuster aufgebaut. Hierbei konnten die optischen und elektronischen Bauteile einzeln verändert oder ausgetauscht werden, ohne daß die übrige Konfiguration verändert werden mußte. Die Lichtquellen zur Anregung konnten in drei Raumrichtungen durch Mikrometertische justiert werden. Die Geometrie der Reoxidation wurde durch verschiedene Positionen des Reoxidationlichtes auf der Grundplatte des Funktionsmusters erprobt. Die Untersuchungen wurden im allgemeinen mit Einmalküvetten durchgeführt; zum Test verschiedener Küvetten-systeme konnten auch andere 1cm-Küvetten in den Küvettenhalter eingesetzt werden. Die Filter wurden aus käuflichen Kantenfiltern ausgeschnitten und jeweils in eine Halterung eingesetzt.

In Vorversuchen erwies sich eine Thylakoidsuspension entsprechen 5 μg Chlorophyll / ml für Messungen im Labormuster als optimal.

Zum Test wurde jeweils nur der zu testende Parameter variiert und die übrigen Bedingungen konstant gehalten. Zu den Einzelheiten der jeweiligen Optimierungsversuche siehe Kapitel III.5. Optimierung der Meßtechnik.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche wurde das Labormuster konzipiert und gemäß Kapitel III.6 realisiert.

VI.16. Messungen am Dioden-Array-Spektrometer

Messungen mit externer Lichtquelle

LED-Emissionsspektren

Filter vor LED	Neutralfilter 5 %Transmission
Detektionsbereich	VIS / 500-750 nm
Integrationszeit des Detektors	0.015 s
Meßdatenerfassung	PC/Software AK Biosensoren

Fluoreszenzemissionsspektren

Meßtemperatur	25 °C
biologisches Material	Thylakoidsuspension, 100%Aktivität
Medium	Standardpuffer, 2 ml
Konzentration des biolog. Materials	entspr. 10 µg Chlorophyll/ml
Anregungslichtquelle extern	Diodenlaser 655 nm
Geometrie der Anregung zur Detektion	90 °
Reoxidation	keine (Messung in F_{max})
Detektionsbereich	VIS / 600-830 nm
Integrationszeit des Detektors	10 s (Accumulation 1)
Meßdatenerfassung	PC/Software AK Biosensoren

Fluoreszenzemissionsspektren für die Beobachtung von Alterungsprozessen

Lagertemperatur der Thylakoide	25 °C
Meßtemperatur	25 °C
biologisches Material	Thylakoidsuspension, 100%Aktivität
Medium	Standardpuffer, 2 ml
Konzentration des biolog. Materials	entspr. 10 µg Chlorophyll/ml
Anregungslichtquelle extern	Diodenlaser 655 nm
Geometrie der Anregung zur Detektion	90 °
Reoxidation	keine (Messung in F_{max})
Detektionsbereich	VIS / 600-830 nm
Integrationszeit des Detektors	10 s (Accumulation 1)
Meßdatenerfassung	PC/Software AK Biosensoren

Messungen mit interner Lichtquelle

Filtertransmissionsspektren unter vergleichbaren Bedingungen zu den Emissionsspektren

Lichtquelle	intern VIS
Detektionsbereich	VIS / 400-830 nm
Integrationszeit des Detektors	0.06 s
Meßdatenerfassung	PC/Software AK Biosensoren
Berechnung der Transmission	unter Abzug des Lampenspektrums

VI.17. Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems

Die Messungen zur Charakterisierung des Meßsystems wurden im Labormuster in der endgültigen, optimierten Version („Sensorversion S 2/5“)entsprechend der Abbildung in Kapitel III.6. durchgeführt. Der Meßablauf entsprach der dort angegebenen Vorgehensweise zur Bedienung des Sensors.

Hierbei wurden im allgemeinen die im folgenden aufgezählten Bedingungen konstant gehalten. Davon abweichende Bedingungen sind bei den jeweiligen Ergebnissen im Kapitel III.7 „Charakterisierung des miniaturisierten Meßsystems“ detailliert angegeben.

Für Vorversuche wurde eine erste Sensorversion S1/4 verwendet, deren Elektronik nicht optimiert war, und deren Signale daher ein kleineres Signal/Rausch-Verhältnis aufwiesen.

Konstante Bedingungen bei der Messung im Labormuster

Meßeinrichtung	Sensorversion 2/5
Anregungslichtquelle	Diodenlaser 655 nm mit Diffusor
Anregungsdauer	5 Sekunden
Reoxidationslichtquelle	2 Minilampen mit RG 715-Filter
Reoxidationsdauer	20 Sekunden
Küvetten	Einmalküvetten
biolog. Material	Thylakoide gefriergetrocknet
Chlorophyllgehalt	5 µg Chlorophyll / ml
Matrix	Standardpuffer
Meßvolumen	1 ml
Meßtemperatur (Außentemperatur)	Raumtemperatur, temperiert 23 ± 2 °C
Probentemperatur	entspr. Raumtemperatur
Lichtverhältnisse	Laborbel., Meßplatz nicht direkt beleuchtet
Steuerung	PC/Software AK Biosensoren
Meßdatenerfassung	PC/Software AK Biosensoren
Datenauswertung	PC/Software AK Biosensoren
ausgewertetes Signal	Höhe hieraus abgelesen Maximum (konstante Signalthöhe)

Herbizidstammlösungen

Herbizide:	Diuron, Atrazin, Terbutylazin gem. Chemikalienliste (ab Seite 165)
Lösungsmittel:	Ethanol p.A.
Stammlösung:	50 mg Herbizid / 100 ml (500 mg/l)
Verdünnung 1:	1 ml / 100 ml (5 mg/l)
Bedingungen:	weitere Verdünnungen je nach benötigtem Konzentrationsbereich Herstellen von jeweils 3 Stammlösungen und Überprüfen der Reproduzierbarkeit Verwendung von jeweils frisch hergestellten Lösungen Herstellen der Lösungen in Meßkolben, temperiert bei 20 °C Verwenden von Pipetten und Analysenwaagen zur Spurenanalytik

VI.18. Versuche am Fluoreszenzreader

Für Versuche am Fluoreszenzreader wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Meßeinrichtung	Fluoreszenzreader mod. gem. Kapitel III.7
Anregungslichtquelle	Blitze, Transmissionsfilter (400...500) nm
Anregungsdauer	300 Blitze pro Kavität
Blitzfrequenz	25 Hz
Reoxidationslichtquelle	durch Dunkeladaption
Reoxidationsdauer	5 Minuten
Mikrotiterplatten	96 Kavitäten, weiß
Referenz	jeweils benachbarte Kavitäten
biolog. Material	Thylakoide gefrieretrocknet
Chlorophyllgehalt	10 µg Chlorophyll / ml
Matrix	Standardpuffer
Meßvolumen	200 µl
Meßtemperatur (Außentemperatur)	Raumtemperatur, temperiert 23 ± 2 °C
Probentemperatur	entspr. Raumtemperatur
Lichtverhältnisse	Laborbel., Meßplatz nicht direkt beleuchtet
Steuerung	PC/Software des Herstellers
Meßdatenerfassung	PC/Software AK Biosensoren
Datenauswertung	Differenzbildung in Tabellenkalkulationsprogramm (MS Excel), Höhe hieraus abgelesen
ausgewertetes Signal	Mittelwert aus 3 Kavitätspaaren, Maximum bei konstanter Signalthöhe
Herbizidlösungen	siehe unter VI.16

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ◆ Andersson, B. und Styring, S. (1991), Photosystem II: molecular organization, function and acclimation, *Curr.Top.Bioenerg.* 16, 1-81
- ◆ Arakawa, T; Kita, Y. and Carpenter, J.F. (1991), Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations, *Pharmaceutical Research* 8, 285-290
- ◆ Arsalane, W., Paresys, G., Duval, J.-C., Wilhelm, C., Conrad, R., Büchel, C. (1993), A new fluorimetric device to measure the in vivo chlorophyll fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor, *Eur.J.Phycol.*, 28, 247-252
- ◆ Bailey, N.T.J. (1976), *Statistical methods in biology*, Hodder & Stoughton, London
- ◆ Barber, J. (1982), Influence of surface charges on thylakoid structure and function, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33, 261-295
- ◆ Belitz, H.-B., Grosch W. (1987), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag Heidelberg
- ◆ Bellows, R.J. and King, C.J. (1972), Freeze-Drying of Aqueous Solutions: Maximum allowable operating temperature, *Cryobiology* 9, 559-561
- ◆ Brauer, S. (1992) Untersuchungen zur Entwicklung eines Biosensors für PS II-Herbizide, Diplomarbeit Universität Karlsruhe
- ◆ Braun, S. und Shtelzer, S. (1994), An optical biosensor based upon glucose oxidase immobilized in sol-gel silicate matrix, *Biotechnol.Appl.Biochem.*, 19, 293-305
- ◆ Brinker, C.J. und Scherer, G.W. (1990), *Sol-Gel-Science: the physics and chemistry of sol-gel processing*, Academic Press, London
- ◆ Chiron, S., Dupas, S., Scribe, P., Barcelo, D. (1994), Application of on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry to the determination of pesticides in environmental waters, *Journal of Chromatography A*, 665, 295-305
- ◆ DFG-Mitteilung XVI (1990), *Pflanzenschutzmittel in Trinkwasser*, VCH Weinheim
- ◆ DIN 2000: Leitsätze für Anforderungen an Trinkwasser, DIN 2000, Fachnormenausschuß Wasserwesen im Deutschen Normenausschuß, November 1973
- ◆ Engel, A., Bendas, G., Wilhelm, F., Mannova, M., Ausborn, M. und Nuhn, P. (1994), Freeze drying of liposomes with free and membrane-bound cryoprotectants - the

- background of protection and damaging processes, *Int. Journal of Pharmaceutics*, 107, 99-110
- ◆ Evans, G.P., Briers, M.G. und Rawson, D.M. (1986), Can Biosensors help to protect drinking water?, *Biosensors*, 2, 287-300
 - ◆ Franks, F (1990), Freeze Drying: From empiricism to predictability, *Cryo-Letters* 11, 93-110
 - ◆ Freeman, A. und Aharonowitz, Y. (1981), Immobilization in polyacrylamid-hydrazide polymers, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 2747-2750
 - ◆ Fromme, R. und Renger, G. (1990), Studies on herbicide binding in photosystem II membrane fragments from spinach, *Z.Naturforsch.* 45c, 373-378
 - ◆ Golbeck, J.H. und Bryant, D.A. (1991), Photosystem I, *Curr.Top.Bioenerg.* 16, 83-177
 - ◆ Hanson, M.A. and Rouan, S.K.E. (1992), Introduction to formulation of protein pharmaceuticals in: *Stability of protein pharmaceuticals*, part B, ed. T.J. Ahern, M.C. Manning, Plenum Press New York
 - ◆ Höll, K. (1968), *Wasser - Untersuchung, Beurteilung, Aufbereitung*, 4.Aufl., DeGruyter Verlag, Berlin
 - ◆ Iszutsu, K; Yoshioka, S and Terao, T (1991), The effect of additives on the stability of freeze-dried β -galactosidase stored at elevated temperature, *International Journal of Pharmaceutics*, 71, 137-146
 - ◆ Iszutsu, K; Yoshioka, S and Terao, T (1993), Decreased protein-stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization, *Pharmaceutical Research* 10, 1232-1237
 - ◆ Iszutsu, K; Yoshioka, S and Terao, T (1994), Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying, *Chem.Pharm.Bull.* 42, 5-8
 - ◆ Jansen, M.A.K., Mattoo A.K., Makin, S. und Edelman, M. (1993), Direct demonstration of binding-site competition between photosystem II inhibitors at the Q_B niche of the D1 Protein, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 46, 78-83
 - ◆ Jockers, R. (1991), *Untersuchungen zur Verwendung des Reaktionszentrums phototropher Bakterien als Herbizidsensor*, Dissertation TU Braunschweig
 - ◆ Khalilov, R.I., Khomutov, G.B. and Tikhonov, A.N. (1993), Effect of UV-radiation on structural-functional characteristics of the thylakoid membrane, *Russian Plant Physiology*, 40, 1993
 - ◆ Krause, G. (1993), Trends bei Sensoren, *VDI-Nachrichten*, 42, 22-23

- ◆ Krause, G.H. und Weis, E. (1991), Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics, *Ann.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.*, 42, 313-349
- ◆ Krupa, Z., Siedlecka, A., Maksymiec, W. und Baszynski, T. (1993), In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* to nickel toxicity, *J.Plant.Physiol.*, 142, 664-668
- ◆ Loranger, C. und Carpentier, R. (1994), A fast bioassay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes, *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 178-183
- ◆ Mackenzie, A.P. (1975), Collapse during freeze-drying - qualitative and quantitative aspects in: *Freeze-Drying and advanced food technology*, Academic Press London
- ◆ Melis, A. (1985), Functional properties of photosystem II_β in spinach chloroplasts, *Biochim.Biophys.Acta*, 808, 334-342
- ◆ Moss, D.A., und Bendall, D.S. (1984), Cyclic electron transport in chloroplasts: The Q-cycle and the site of action of antimycin, *Biochim.Biophys.Acta*, 767, 389-395
- ◆ Naish-Chamberlain, P.J., Cooke, A.R. (1991), Automation of sample preparation for pesticide analysis in water, *LC-GC INTL.*, Vol.4, No.8, 38-45
- ◆ Oettmeier, W. und Soll, H.-J., Competition between plastoquinone and DCMU at the acceptor side of photosystem II, *Biochim Biophys Acta*, 724, 287
- ◆ Pastrik, K.-H., Kärst, U. und Schmid, R. (1991), *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, 24, 12-15
- ◆ PflAnwV: Verordnung über Anwendungsverbote für Pflanzenschutzmittel (Pflanzenschutz-Anwendungsverordnung) vom 27.7.1988, *BGBI. I S.1196*
- ◆ PflSchG: Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz) vom 16.9.1986, *BGBI. I S. 1505*
- ◆ Pikal, M.J. (1990), Freeze-Drying of Proteins Part I: Process Design, *BioPharm* 9/1990, 18-27
- ◆ Psathaki, M., Manoussaridou, E., Stephanou, E.G. (1994), Determination of organophosphorous and triazine pesticides in ground- and drinking water by solid-phase extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus or mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 667, 241-248
- ◆ Purell, M. und Carpentier, R. (1993), Alteration of the stromal side of photosystem II by diphenylcarbazide, *Plant Science* 94, 55-59
- ◆ Rawson, D.M., Willmer, A.J. und Turner, A.P.F. (1989), Whole-cell biosensors for environmental monitoring, *Biosensors*, 4, 299-311

- ◆ Sacchero, G., Sazanini, C., Mentasi, E. (1994), On-line preconcentration and ion chromatography of triazine compounds, *Journal of Chromatography A*, 671, 151-157
- ◆ Salter, A.H., Virgin, I, Hagman, A. und Andersson, B. (1992), On the molecular mechanism of light-induced D1 protein degradation in photosystem II core particles, *Biochimistry* 31, 3990-3998
- ◆ Sayk, F. und Schmidt, C. (1986), Algen-Fluoreszenz-Automater, eine computergesteuerte Biostest-Meßapparatur, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, 19, 182-184
- ◆ Scheller, F. und Schubert, F. (1989), *Biosensoren*, Birkhäuser Verlag, Basel
- ◆ Schwedt, G. (1981), *Flourimetrische Analyse*, VCH Weinheim
- ◆ Schwedt, G. (1992), *Taschenbuch der Analytik*, Thieme Verlag, Stuttgart
- ◆ Schweizer, W. (1977), *Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik*, Klett Verlag Stuttgart, 1. Auflage, 201-219
- ◆ Shahak, Y., Crowther, D. und Hind, G. (1980), Endogenous cyclic electron transport in broken chloroplasts, *FEBS Letters*, 114, 73-78
- ◆ Strasser, R.J. und Govindjee (1991), The F_0 and the 0-J-I-P Fluorescence rise in higher plants and algae, in: *Regulation of chloroplast biogenesis*, 1-4, Plenum Publishing Company, London
- ◆ Sykes, P. (1986), *Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie*, 8. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- ◆ Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y. und Arnon, D.I. (1963), Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis, 49, 567-572
- ◆ Tevini, M. und Häder, D.-P. (1985), *Allgemeine Photobiologie*, G.Thieme Verlag, Stuttgart
- ◆ Timasheff, S.N. (1992), Stabilization of protein structure by solvent additives in: *Stability of protein pharmaceuticals*, part B, ed. T.J. Ahern, M.C. Manning, Plenum Press New York
- ◆ Tischer, W. und Strotmann, H. (1977), Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport, *Biochim.Biophys.Acta*, 460, 113-125
- ◆ TrinkwV: Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, (Trinkwasserverordnung) i.d.F. der Bekanntmachung der Neufassung vom 5.12.1990 (BGBl. I, S. 2612)
- ◆ Urbach, W., Laasch, H., Schreiber, U. (1984), Redox-state dependent changes of inhibitor-binding to thylakoide photosystem II acceptor complex, *Z.Naturforsch.*, 39c, 397-401

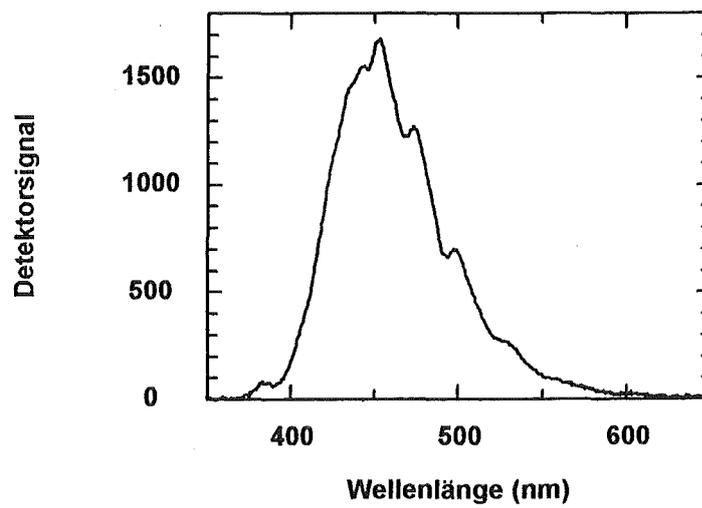
- ◆ Velthuys, B.R. (1981), Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II, *FEBS Lett.*, 126, 277
- ◆ Vernon, L.P. und Shaw, E.R. (1969), Photoreduction of 2,6-dichlorphenolindophenol by diphenylcarbazide: a photosystem II reaction catalyzed by Tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments, *Plant Physiol.* 44, 1645-1649
- ◆ Walker, D. (1987), The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis, University of Sheffield Print Unit, Sheffield
- ◆ Wells, M., Riemer, D.D., Wells-Knecht, M.C. (1994), Development and optimization of a solid-phase extraction scheme for determination of the pesticides metribuzin, atrazine, metolachlor and esfenvalerate in agricultural runoff water, *Journal of Chromatography A*, 659, 337-348
- ◆ Welz, B. (1983), *Atomabsorptionsspektroskopie*, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim
- ◆ Weston, L.H., Robinson, P.K. (1991), Detection and quantification of triazine herbicides using algal cell fluorescence, *Biotechnical Techniques*, 5, 327-330
- ◆ Yamashita, T. und Butler, W.L. (1969), Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to photosystem II, *Plant Physiol.* 44, 435-438
- ◆ Zilinskas, B.A. und Govindjee (1976), Stabilization by glutaraldehyde fixation of chloroplast membranes against inhibitors of oxygen evolution, *Z.Pflanzenphysiol.* 77, 302-314
- ◆ Zimmermann, G.M., Weil, L. und Quentin, K.-E. (1990), Biotest als Summenparameter zur Bestimmung von Herbiziden, *Vom Wasser*, 74, 195-206

VIII. ANLAGEN

Anlage 1

Emissionsspektrum der NSB LED blau zur Anregung

(Aufnahme mit Dioden-Array-Spektrometer, siehe VI. Material und Methoden)



Anlage 2

Elektronik des Labormusters: Schaltplan

