

Biosensoren für die Wasseranalyse 4.0: Analytik trifft auf Digitalisierung

Günther Proll¹

¹Fakultät Life Sciences, Hochschule Reutlingen, Reutlingen, Deutschland

Kontakt: guenther.proll@reutlingen-university.de

Einleitung

Im Bereich Gewässerschutz sowie beim Schutz unserer Trinkwasserressourcen wurden bis heute große Fortschritte erzielt, die insbesondere auf Reinigungsmaßnahmen, städtebaulichen Maßnahmen und auf einer konsequenten analytischen Überwachung basieren. Neben der Einführung einer 4. Reinigungsstufe zur Elimination von Mikroverunreinigungen bei immer mehr Kläranlagen sind hier allgemein die Kanalanbindungen und Regenwasserrückhaltebecken sowie eine systematische analytische Überwachung mittels verschiedener on- und offline arbeitender Methoden der Wasseranalytik zu nennen. Dabei hat auch insbesondere die nationale und EU weite Gesetzgebung große Anstrengungen unternommen, die Qualität von Oberflächen- und Bewässerungswässern durch entsprechende Grenzwertvorgaben (EU Umweltqualitätsnormen 2008/105/EG; Nitratrichtlinie 91/676/EG) zu sichern. Dies hat bundesweit zu spürbaren Verbesserungen der Oberflächenwasserqualitäten, dem verbesserten Schutz der aquatischen Flora und Fauna und damit zu einem verbesserten Schutz der Rohwässer geführt. Hierdurch wird neben der Sicherung der Trinkwassergewinnung auch der gesellschaftlich bedeutsame Schutz einer intakten Umwelt im Einklang mit einer verträglichen Nutzung bis hin zu den Badegewässern durch Privatpersonen gewährleistet.

Trotz dieser positiven Entwicklungen stellt die European Environmental Agency (EEA) in ihrem aktuellen Bericht [1] fest, dass sich die Wasserressourcen in Europa unter großem Druck befinden. Dies wird u. a. an der Wasserknappheit sichtbar, von der jährlich etwa 20 % des europäischen Territoriums und 30 % der Bevölkerung betroffen sind. Weiterhin berichtet die EEA, dass wenn man von Verunreinigungen wie Quecksilber und bromierten Flammschutzmittel absieht, hauptsächlich Nitrate und Pestizide als Schadstoffe auffallen. Neben dieser Bestandsaufnahme durch die EEA findet sich zum Beispiel in der KomS-Liste eine weitere große Anzahl verschiedenster Spurenstoffe wie z. B. Arzneimittelrückstände, die über unvollständig gereinigte Abwässer in die Umwelt gelangen können [2]. Darüber hinaus stellen Mikroschadstoffe wie Toxine oder Pathogene ein weiteres Problem dar.

Das aktuelle Forschungsrahmenprogramm der Europäischen Union hat jüngst diese komplexe Situation in einer holistisch angelegten Ausschreibung adressiert (Call: HORIZON-CL6-2024-ZEROPOLLUTION-

02-1), in der nach ganzheitlichen Ansätzen für eine effektive Überwachung der Wasserqualität in städtischen Gebieten gesucht wurde. Dabei soll als Kernforderung ein fortschrittliches Überwachungs- und Kontrollsystem entwickelt werden, das über die konventionellen Schadstoffe hinausgeht, die städtischen Trink- und Abwasserkreisläufe miteinander verbindet, Risikomanagementansätze integriert und verbesserte digitale Lösungen zur Unterstützung des städtischen Wasserqualitätsmanagements nutzt. In Kombination mit geeigneten Modellierungswerkzeugen und Szenarien, sollen die langfristigen Auswirkungen zukünftiger sich ändernder sozioökonomischer und klimatischer Verhältnisse besser vorhersagbar und beherrschbar werden. Hierbei stellen neue und verbesserte Analysewerkzeuge und Überwachungsmethoden wie z.B. Biosensoren zur Analyse eines breiten Spektrums von Schadstoffen, ein wichtiges Werkzeug dar.

Die Wasserchemische Gesellschaft stellte diesen Forschungsbedarf ebenfalls in seiner aktuellen Forschungsstrategie fest [3], wobei zusätzlich auf einige wichtige Aspekte insbesondere in Hinblick auf die Verfügbarkeit von geeigneten Erkennungsstrukturen und der mangelnden Robustheit hingewiesen wird. Diese Punkte sind besonders wichtig, um neben dem Monitoring zukünftig auch die Prozesskontrolle zu adressieren.

Ziel dieses Beitrags ist es daher, zunächst eine kurze Bestandsaufnahme zu Biosensoren für die Spurenstoffanalytik im Wasser zu geben und in die Methodik der Wasseranalytik 4.0 einzuführen. Basierend auf diesen komplexen Anforderungen werden dann drei Handlungsfelder adressiert, die dringend bei der Entwicklung von neuen Biosensorsystemen bzw. als Rahmenbedingungen für deren Einsatz berücksichtigt werden müssen, damit diese Systeme den Weg in die Routineanwendung finden können. Dabei konzentriert sich dieser Beitrag auf immunanalytische Biosensorverfahren für Spurenstoffe wie z. B. Pestizide und Arzneimittelrückstände in Wasser.

Biosensoren für die Überwachung von Spurenstoffen im Wasser

Biosensoren sind Analyseinstrumente, die ein Signal von einer biologischen Erkennungsstruktur (wie z. B. Antikörper) in eine messbare Reaktion umwandeln. Einige der Hauptvorteile dieser Geräte sind heute schon, dass sie leicht als automatisierte Analysensysteme konzipiert sein können, bis hin zu tragbaren

und einfach zu bedienenden Geräten, die sich durch kurze Ansprechzeiten und eine teilweise sehr gute analytische Leistungsfähigkeit auszeichnen. Solche Biosensoren finden sich heute insbesondere im Bereich des Point-of-Care-Testings (POCT) und ermöglichen diagnostische Labormessungen eines bestimmten Analysespektrums direkt vor Ort. Dabei erreichen kommerzielle Biosensoren, wie z. B. das Atellica® VTLi Immunoassay-Analysesystem Nachweisgrenzen im unteren ng/l-Bereich [4]. Ein Überblick zum aktuellen Stand der Forschung und Entwicklung zu Biosensormethoden für den Nachweis von Spurenstoffen ist in Tabelle 1 [5] zusammengefasst, wobei insbesondere solche Arbeiten aufgenommen wurden, die Spurenstoffe nachweisen, die in der KomS-Liste [2] aufgeführt sind.

Tabelle 1: Beispiele von Biosensorverfahren für ausgewählte Spurenstoffe ohne aufwändige Probenaufkonzentrierung.

Einzelsubstanz / BG-Ablauf ¹⁾ [µg/L]	Biosensorverfahren	Analytische Leistungsfähigkeit laut Referenz	Ref.
Ciprofloxacin / 0,05	Immunoassay on Silica Optical Fiber	LOQ 0,01 ng/L	[6]
Carbamazepin / 0,025	Lab-on-Valve (LoV)	LOQ 1 µg/L	[7]
	Suspension Array Fluorescence Immunoassay (SAFIA)	LOD 0,14 µg/L	[8]
Diclofenac / 0,025	SAFIA	LOD 0,004 µg/L	[8]
	Quartz Crystal Microbalance (QCM)	LOD 0,002 µg/L	[9]
	Magnetic Bead-Based Immunoassay (MBBA)	LOD 0,4 µg/L	[10]
Hydrochlorothiazid / 0,05	Zyklische Voltammetrie*	LOD 148 µg/L	[11]
Ibuprofen / 0,025	Chitosan über porous silicon optical transducer	LOD 1000 µg/L	[12]
Sulfamethoxazol / 0,025	Immunoassay mit Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	LOD 0,1 µg/L	[13]
	Immunoassay Totale Interne	LOD 0,007 µg/L	[14]

	Reflexionsfluoreszenz (TIRF)		
Estron / 0,0001	TIRF	LOQ 0,0014 µg/L	[15]
Benzotriazol / 0,05	Mikroalgenbiosensor	LOD 25 µg/L	[16]
	ISO-Referenztests (einzellige Algen und Leuchtakterien)	LOD 10 µg/L	[17]

¹⁾ Werte für die Bestimmungsgrenze im Ablauf (BG Ablauf) der vierten Reinigungsstufe einer Kläranlage nach [2].

²⁾ Elektrochemisches Verfahren.

Die in Tabelle 1 vorgestellten Biosensorverfahren zeichnen sich dabei alle dadurch aus, dass sie ohne eine aufwändige Probenaufkonzentrierung auskommen, was positiv für einen Routineeinsatz zu sehen ist. Allerdings bestehen große Unterschiede bei den diskutierten Verfahren und Methoden in der praktischen Handhabbarkeit. So benutzt z. B. die SAFIA Methode für die Detektion ein kommerzielles Durchflusszytometer, das in Kombination mit dem gut standardisierbaren Arbeitsablauf eine robuste und gut reproduzierbare Labormethode darstellt, die allerdings nicht einfach auf eine Vor-Ort Analytik anwendbar ist. Dass sich Immunoassay-basierte Biosensoren vollständig automatisieren lassen, wurde jedoch bereits z. B. für das beschriebene TIRF Verfahren in [14] gezeigt. Im Unterschied zu vielen anderen Biosensoren als auch zu etlichen verfügbaren Biotestverfahren zeichnet sich dieser Biosensor durch seine Unabhängigkeit vom Bedienpersonal aus, da alle Prozessschritte automatisiert sind und auch außerhalb einer Laborumgebung analytisch korrekte Ergebnisse im Multianalytbetrieb erzielt werden können.

Unter den vielen weiteren Biosensoren sind insbesondere solche besonders interessant, die ein Multiparameter-Monitoring ermöglichen. Dies trifft z. B. auf die flussbasierte Microarray-Analyseplattform MCR [18] sowie tragbare Sensorik-Assays zu, die wegen ihrer großen Vorteile wie Einfachheit und Erschwinglichkeit für den Vor-Ort-Nachweis geeignet sind. Daher haben sich in den letzten Jahrzehnten viele Forscher und Wissenschaftler mit der Entwicklung und Herstellung tragbarer Assays mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität für den Nachweis verschiedener Schadstoffe im Wasser beschäftigt. In [19] sind die jüngsten Verbesserungen bei tragbaren Biosensoren und Sensoren für die Überwachung biologischer und chemischer Schadstoffe in verschiedenen Wasserproben ausführlich erläutert. So sind schon seit längerer Zeit die Mikrofluidik und Chip-basierte Ansätze die treibenden Faktoren für die Miniaturisierung bzw. die Entwicklung von tragbaren Geräten. Zwar kann nicht davon ausgegangen werden, dass solche Biosensorsysteme in naher Zukunft eine umfassende

Quantifizierung aller möglicher Spurenstoffe in einem Gerät ermöglichen, jedoch ist die Multianalytfähigkeit verschiedener Biosensorsysteme so weit entwickelt, dass unter der Voraussetzung von vorhandenen biologischen Erkennungsstrukturen (wie z. B. Antikörpern) aussagekräftige Panels an z. B. 4-8 verschiedenen Spurenstoffen gleichzeitig untersucht werden können. Diese Panels, wie die in Tabelle 1 dargestellte Auswahl bezüglich der Überwachung einer 4. Reinigungsstufe einer Kläranlage könnten sehr wahrscheinlich ein aussagekräftiges Monitoring am Ort des Geschehens ermöglichen und stellen somit eine mögliche Ergänzung zur laufenden laborgestützten Analytik dar, da sie direkten Eingang in die Prozesssteuerung finden könnten.

Wasseranalyse 4.0

Die Digitalisierung der Wasserwirtschaft bietet bedeutende Chancen zur Verbesserung der Überwachung, Verwaltung und Sicherstellung der Wasserqualität. Sowohl das Umweltbundesamt (UBA) [20] als auch die Umweltpolitische Digitalagenda der Bundesregierung [21] erkennen die Notwendigkeit, digitale Technologien zu nutzen, um nachhaltige Lösungen zu entwickeln und umzusetzen. Hierzu gehört die Implementierung moderner digitaler Technologien, wie z. B. die Einführung und Integration von IoT (Internet of Things), Sensoren, Big Data und Künstlicher Intelligenz (KI). Begründet wird dies damit, dass diese Technologien eine Echtzeitüberwachung der Wasserqualität und eine schnelle Reaktion auf Veränderungen ermöglichen sollen. Als zweiten Handlungsbereich sehen die Akteure die Notwendigkeit einer verbesserten Datenverfügbarkeit und -verarbeitung. Dies beinhaltet die Schaffung robuster Dateninfrastrukturen, um genaue und verlässliche Informationen über den Zustand der Wasserressourcen zu erhalten. Zur Erreichung dieser Ziele ist die Entwicklung von Standards und Normen unerlässlich, da durch die Standardisierung und Normierung der Erhebung, Verarbeitung und Auswertung von Wasserdaten die notwendige Konsistenz und Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet wird.

Durch die Umsetzung dieser Maßnahmen kann die Wasserwirtschaft effizienter, nachhaltiger und zukunftssicher - nicht zuletzt mit Hinblick auf die Herausforderungen durch den Klimawandel - gestaltet werden.

Ein wesentlicher Bestandteil bei der Umsetzung dieser Strategie kann zukünftig intelligenten Sensornetze zukommen, da sie eine ideale Perspektive bieten, um sowohl lokale, regionale als auch übergreifende räumliche und zeitliche Veränderungen von Ist-Zuständen zusätzlich zur etablierten Analytik kontinuierlich zu erfassen [22]. Als Ergebnis kann erwartet werden, dass sich hierdurch eine verbesserte Reaktion / Regelungen z.B. für Betriebsabläufe in der

Wasserwirtschaft bzw. der Steuerung bestimmter Infrastruktur implementieren lassen könnte. Als Konsequenz aus diesem Vorgehen lässt sich wiederum eine nachhaltigere Ressourcennutzung erwarten.

Neben der intelligenten Vernetzung von Sensoren und der Nutzung anderer analytischer Datenquellen kann die zusätzliche Einbindung von Metadaten in Kombination mit KI-Methoden für Trendanalysen und Frühwarnsysteme vorteilhaft sein. So sollten zukünftig KI-basierte Aus- und Bewertungsstrategien für die Modellierung lokaler Zustände und für die Vorhersage von kritischen Betriebszuständen und Szenarien genutzt werden und die online-Sensorik kann zusammen mit datengetriebenen Modellen zur Prozesssteuerung weiterentwickelt werden. Ziel kann u. a. die intelligente Steuerung kritischer Infrastrukturen der Wasserwirtschaft (z.B. 4. Reinigungsstufe von Kläranlagen) oder auch die automatisierte Erkennung von Sensorfehlanzeigen oder Güteveränderungen sein.

Forschungslücken, Handlungsbedarf und Lösungsansätze

Bis heute haben es allerdings kaum Biosensoren in den Realbetrieb für Umwelt- bzw. Wasseranalytische Fragestellungen geschafft. Als Barrieren dieser Entwicklung können neben verbesserungswürdigen Eigenschaften wie Robustheit und Miniaturisierung insbesondere drei Themenfelder identifiziert werden:

1. Die eingeschränkte Verfügbarkeit von Antikörpern bzw. alternativen Erkennungsstrukturen für relevante Spurenstoffe stellt insbesondere für Firmen eine hohe Eintrittsbarriere auf diesem Gebiet dar. Darüber hinaus fehlen auch entsprechende Goldstandardimmunoassays für das Benchmarking.
2. Bisher existiert auf dem Gebiet der Immunoassays für die Analytik der Wasserbeschaffenheit lediglich die Norm ISO 15089:2000, die sich auf Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel fokussiert. Es fehlt aktuell eine Norm, die allgemein immunanalytische Methoden für Spurenstoffe adressiert. Dabei führt diese Situation sowohl auf Herstellerseite als auch auf Anwenderseite zu Unsicherheiten, die hemmend auf notwendige F&E-Aktivitäten bzw. Innovationsprojekte wirken. Entsprechende Normungsaktivitäten von Fachvereinigungen sind hier dringend notwendig.
3. Wie bereits im Stand-der-Forschung zu Biosensoren für die Wasseranalytik aufgezeigt, gibt es für einzelne Spurenstoffe sehr leistungsstarke Biosensorverfahren. Allerdings bestehen hinsichtlich der Einsetzbarkeit dieser Biosensoren auf Anwendungsbereiche mit unterschiedlicher oder stark veränderlicher Matrix große Herausforderungen, die üblicherweise eine Neukalibrierung des Messsystems erforderlich machen. Dies ist häufig den

Eigenschaften der Antikörper geschuldet, die als Glykoproteine für die erfolgreiche und reproduzierbare spezifische Bindung ihres Antigens (also dem bestimmten Spurenstoff) von den Reaktionsbedingungen abhängen, die u.a. die Aktivität und Affinität beeinflussen. Beim bekannten laborbasierten Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kann dieser Nachteil sehr einfach durch eine Konzentrationsreihe auf der Mikrotiterplatte ausgeglichen werden. Da diese messbegleitende Kalibrierung für Biosensoren nur schwerlich umsetzbar ist, könnte ein kürzlich weiterentwickeltes Verfahren für das Standardadditionsverfahren für Immunoassays einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Realtauglichkeit von Biosensoren für die Wasseranalytik 4.0 darstellen [23].

Bezugnehmend auf dieses dritte Handlungsfeld muss für die Suche nach einem Lösungsansatz zunächst auf das nichtlineare Verhalten der Kalibrierkurven von Immunoassays hingewiesen werden, was eine direkte Übertragung des Standardadditionsverfahrens, wie es aus der klassischen Analytik bekannt ist, unmöglich macht. Pang und Cowen schlugen 2017 [24] vor, die Standardadditionsmethode auf sigmoidale Kalibrierkurven mit einer neuartigen Bewertungsmethode zu übertragen. Durch eine Optimierung des dort verwendeten Algorithmus zur kalibrierungsfreien Konzentrationsbestimmung für Immunoassays, konnte eine Standardadditionsmethode entwickelt werden, die unter realistischen Einsatzbedingungen robuste Ergebnisse liefert [23].

Dabei wird die Probe mit unbekannter Konzentration durch bekannte Analytkonzentrationen aufgestockt. Aufgrund des nichtlinearen Verhaltens von Immunoassays muss für die Auswertung das Messsignal logit-transformiert werden und gegenüber dem Logarithmus der Konzentration aufgetragen werden. Die Auswertung beruht nun auf der von Pang und Cowen [24] vorgeschlagenen Linearisierung, bei der angenommen wird, dass nur bei einer richtigen Schätzung der unbekanntes Analytkonzentration alle Messpunkte einen optimalen linearen Zusammenhang zeigen. Diese als wahr anzunehmende Analytkonzentration wird durch Einsetzen verschiedener geratener Probenkonzentrationen so lange ermittelt, bis die beste Linearität (Minimum der SSres-Werte) gefunden ist.

In [23] konnte gezeigt werden, dass dieser neuartige logit-log-Ansatz (s. Abbildung 1 [5]) auch bei quantitativen Immunoassays in komplexen Matrices hervorragend funktioniert und eine aufwändige Kalibrierung obsolet macht.

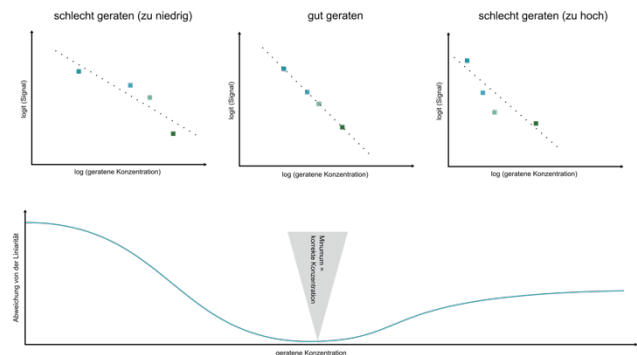


Abbildung 1: Logit-log Standardadditionsverfahren für Immunoassays. Oben: Auftragung des $\log(\text{Signal})$ eines Immunoassays gegen $\log(\text{geratene Konzentration})$ eines Analyten, beispielhaft für 3 verschiedene geratene Probenkonzentrationen (links: zu niedrig; Mitte: korrekt; rechts: zu hoch), jeweils mit linearer Regression, aus der die SSres-Werte bestimmt werden können. Unten: Die Bestimmung der Probenkonzentration erfolgt über das eingezeichnete Minimum, da hier die Linearität am besten gegeben ist. Übernommen aus [5].

Literatur

- [1] EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY: Europe's state of water 2024: the need for improved water resilience, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2024
- [2] https://koms-bw.de/cms/content/media/KomS_Handlungsempfehlung_2018.pdf
- [3] https://wasserchemische-gesellschaft.de/images/PDFs/Downloads_und_Infos/Forschungsstrategie_Broschure_Layout%20final.pdf
- [4] <https://www.siemens-healthineers.com/de/cardiac/cardiac-systems/atellica-vtli>
- [5] Proll, G; Seidel, M.; Schneider, R.: Moderne bioanalytische Methoden für die schnelle Quantifizierung von Mikroschadstoffen und Pathogenen in Wasser. Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der Gesellschaft Deutscher Chemiker 30.2 (2024): 66-70.
- [6] Lamarca, R.S., et al., Label-Free Ultrasensitive and Environment-Friendly Immunosensor Based on a Silica Optical Fiber for the Determination of Ciprofloxacin in Wastewater Samples. *Analytical Chemistry*, 2020. 92(21): p. 14415-14422.
- [7] Ramos, I.I., et al., Automated lab-on-valve sequential injection ELISA for determination of carbamazepine. *Analytica Chimica Acta*, 2019. 1076: p. 91-99.
- [8] Carl, P., et al., Wash-Free Multiplexed Mix-and-Read Suspension Array Fluorescence Immunoassay for Anthropogenic Markers in Wastewater. *Analytical Chemistry*, 2019. 91(20): p. 12988-12996.
- [9] Mazouzi, Y., et al., Design and Analytical Performances of a Diclofenac Biosensor for Water Resources Monitoring. *Acs Sensors*, 2021. 6(9): p. 3485-3493.
- [10] Ecke, A., et al., A rapid magnetic bead-based immunoassay for sensitive determination of diclofenac.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022. 414(4): p. 1563-1573.

- [11] Zaimbashi, R., et al., Simultaneous Electro-chemical Sensing of Methyldopa and Hydro-chlorothiazide using a Novel ZnO/Al₂O₃ Nano-composite Modified Screen Printed Electrode. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*, 2017. 9(8): p. 1008-1020.
- [12] Sciacca, B., et al., Chitosan-functionalized porous silicon optical transducer for the detection of carboxylic acid-containing drugs in water. *Journal of Materials Chemistry*, 2021. 21: p. 2294-2302.
- [13] Snopok, B.A., et al., Effect of the local environment and state of the immobilized ligand on its reaction with a macromolecular receptor. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2006. 42: p. 217-223.
- [14] Tschmelak, J., et al., Biosensor for seven sulphonamides in drinking, ground, and surface water with difficult matrices. *Analytical Letters*, 2004. 37(8): p. 1701-1718.
- [15] Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz, Immunosensor for estrone with an equal limit of detection as common analytical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004. 378(3): p. 744-745.
- [16] Varelas, I., Microalgae as bioindicators for water quality analyses. *Repositório da Universidade de Lisboa*, 2017, <http://hdl.handle.net/10451/36032>
- [17] Wang, H.Y., et al., Syntheses of molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study for benzotriazole. *Reactive & Functional Polymers*, 2006. 66(10): p. 1081-1086.
- [18] Seidel, M.; Niessner, R.: Chemiluminescence microarrays in analytical chemistry: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014, 406. Jg., Nr. 23, S. 5589-5612.
- [19] Sohrabi, H., et al. Recent advances on portable sensing and biosensing assays applied for detection of main chemical and biological pollutant agents in water samples: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 143. Jg., S. 116344.
- [20] <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/recht-oekonomie-digitalisierung/digitalisierung-wasserwirtschaft>
- [21] Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit: *Umweltpolitische Digitalagenda*. 2020.
- [22] Ullo, S.L., Sinha, G.R., 2020. Advances in Smart Environment Monitoring Systems Using IoT and Sensors. *Sensors* . <https://doi.org/10.3390/s20113113>
- [23] Conrad, M., et al., (R)evolution of the Standard Addition Procedure for Immunoassays. *Biosensors-Basel*, 2023. 13(9).
- [24] Pang, S. and S. Cowen, A generic standard additions based method to determine endogenous analyte concentrations by immunoassays to overcome complex biological matrix interference. *Scientific Reports*, 2017. 7.