

Bakterier i arbejde

- biosensorer måler kemi

Bakterier kan omsætte et utal af stoffer. Denne evne kan vi udnytte til at lave meget nøjagtige målesensorer, der kan måle kemi direkte ude i miljøet



Måling af NO_x^- i en algemåtte med en biosensor.

Af Rikke Louise Meyer,
Michael Nielsen og
Niels Peter Revsbech

■ I det kemiske laboratorium kan man måle koncentrationer af alle mulige stoffer. Ofte tager analysen dog lang tid, kræver store og dyre instrumenter, og der skal tilsættes adskillige kemikalier og opløsningsmidler. Levende celler er i stand til at genkende og anvende et utal af stoffer, og ofte er deres evne til at genkende kemiske stoffer lige så god som de bedste kemiske metoder i laboratoriet. Det er derfor en oplagt mulighed at anvende levende celler eller deres enzymer til måling af kemiske stoffer. Dette kaldes

biosensorer.

Den enkleste måde at lave en biosensor på er ved at anbringe f.eks. levende celler mellem det miljø, man vil undersøge, og en detektorenhed. Cellerne reagerer på et bestemt stof i miljøet, og detektoren måler så produktet af denne reaktion. På denne måde kan man hurtigt og billigt måle koncentrationen af det givne stof.

Biosensorer vinder frem

Cirka halvdelen af de omkring 6000 artikler, der årligt bliver skrevet om biosensorer,

omhandler enzymatiske biosensorer for glukose. Sådanne sensorer bruges nemlig i behandling af sukkersyge og har derfor et enormt marked.

Mange andre biosensorer kan også laves på basis af oprensede enzymer, men ingen af dem har endnu opnået en større praktisk anvendelse på grund af begrænset levetid og andre uheldige faktorer. Der sker dog hele tiden store fremskridt på området, og vi vil uden tvivl se udbredt brug af mange andre enzymatiske sensorer i fremtiden.

Udvikling af biosensorer

På Afdeling for Mikrobiel Økologi ved Aarhus Universitet har vi de seneste år udviklet en række biosensorer.

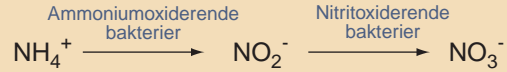
Udviklingen startede for ca. 10 år siden, hvor forskere ved afdelingen begyndte at interessere sig for biosensorer til måling af kemiske forhold i bakteriebelægninger. Afdelingen havde gennem mange år arbejdet med meget små målesensorer baseret på elektrokemi. Sådanne elektrokemiske sensorer til måling af f.eks. ilt og svovlbrinte kan laves med spids-

Nitrifikation og Denitrifikation

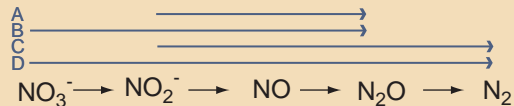
Bakterier er i stand udnytte kvælstofforbindelser gennem deres stofskifte. To nøgleprocesser i bakteriers kvælstofomsætning i naturen kaldes nitrifikation og denitrifikation. Nitrifikationen er en iltning af ammonium (NH_4^+) til nitrit (NO_2^-) og videre til nitrat (NO_3^-). De to delprocesser i den samlede nitrifikation udføres af to forskellige typer af bakterier, som er i stand til at bruge henholdsvis ammonium og nitrit. Fælles for processerne er, at de kun kan udføres, hvor der er ilt til stede i miljøet.

Under iltfrie forhold kan en række andre bakterier (denitri-

Nitrifikation



Denitrifikation



fikanter) udnytte nitrat eller nitrit som alternativ til ilt i deres respiration, og nitrat eller nitrit reduceres herved til gasformigt kvælstof.

Der findes mange forskellige denitrificerende bakterier, og det er ikke alle, som er i stand til at

omdanne nitrat helt til kvælstof gas (N_2). Pilene A til D på figuren ovenfor illustrerer, hvordan forskellige denitrifikanter kan udnytte henholdsvis nitrat eller nitrit, og produktet kan enten være N_2O eller N_2 .

diametre på nogle få tusindedele millimeter, og de kan derfor bruges til at undersøge, hvilke processer der foregår i eksempelvis bakteriebelægninger på tænder. Ved at kombinere disse erfaringer med ekspertise i at håndtere bakterier, kunne man lave meget små målesensorer, hvor bakterier indeholdt i sensoren laver et ellers ikke målbart stof om til et stof, der kan måles elektrokemisk.

Hvordan virker biosensorerne?

Princippet i vore sensorer er, at bakterierne inden i sensoren har alt andet, de skal bruge til deres vækst, end lige netop stoffet, der kommer ind gennem membranen og bliver omsat (se boks).

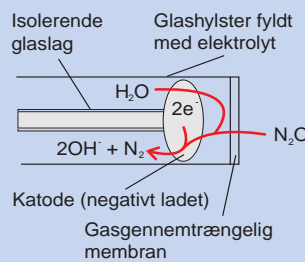
Forsyningen af bakterierne med næring fra sensorens indre er kun mulig, når dimensionerne holdes så små, at molekylers varmebevægelse (diffusion) er tilstrækkelig til at sørge for transporten af næringsstoffer (derfor var vores erfaring med at arbejde med meget små sensorer afgørende).

I biosensoren vist i boksen, har man udnyttet bakteriers omsætning af nitrat + nitrit ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- = \text{NO}_x^-$) til lattergas (N_2O) til at lave en sensor for NO_x^- . Lattergas kan let måles elektrokemisk, og da lattergas stort set kun kan laves ved at reducere enten nitrat eller nitrit, er en sådan sensor meget specifik for NO_x^- . Som det også er vist i boksen (figuren th), kan man med små mikrosensorer lavet på denne måde måle den detaljerede fordeling af NO_x^- i eksempelvis havbunds sediment, selv om NO_x^- kun trænger nogle få millimeter ned i sedimentet.

Ud over biosensoren for NO_x^- har vi udviklet biosensorer for nitrit (NO_2^-), eddikesyre-ion

Mikrosensorer

Visse gasser kan måles med elektrokemiske sensorer af den såkaldte Clark-type. Princippet i denne type sensorer er, at gassen reduceres på en negativt ladet metaloverflade (katode), som er adskilt fra det ydre miljø af en gasgennemtrængelig kunststofmembran. Nedenfor er der som eksempel vist en lattergas (N_2O) sensor. Lattergas bliver reduceret til N_2 på sensorens katode, og der dannes en strøm, der kan



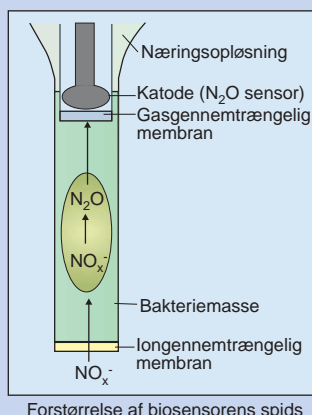
måles på et amperemeter.

Ideen bag at konstruere sensorerne i mikroskala er, at molekyl-

lers varmebevægelse (diffusion) er en meget effektiv transportmekanisme i små dimensioner. Det er derfor unødvendigt at skabe omrøring omkring sensorens spids, når der måles, og man kan derfor måle koncentrationsgradienter i f.eks. sedimenter, hvor der ikke er nogen vandstrøm. De små dimensioner i sensorens spids gør også, at sensoren vil reagere meget hurtigt på ændringer i koncentration af det stof, der måles på.

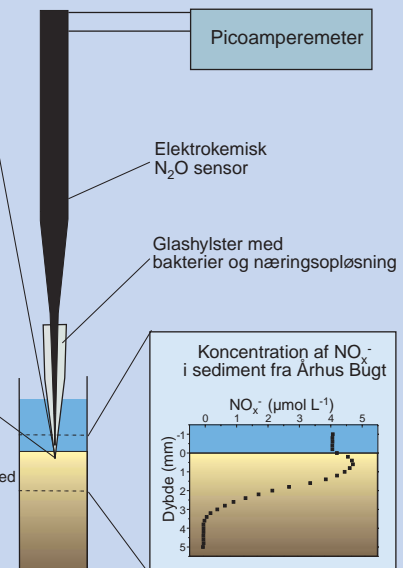


Spidsen af en nitritbiosensor set under mikroskop. Spidsdiametern er 0,03 mm.



Forstørrelse af biosensorens spids

Skematisk tegning af en NO_x^- mikrobiosensor. Til højre er vist et eksempel på måledata fra havbunden i Århus Bugt.





Med biosensorer i felten: Her er bruges biosensorerne i en rismark på Filippinerne.

(acetat, CH_3COO^-) og naturgas (methan, CH_4). Alle disse stoffer er meget vigtige i bakteriers stofomsætning, og de har givet os et vigtigt indblik i fordelingen af bakteriers stofskifte i naturen.

Kunsten at finde de rigtige bakterier

En vigtig del af arbejdet med biosensorerne har været at finde de rette bakterier til formålet. Bakterien til NO_x^- biosensoren skal vokse hurtigt og kunne respirere (ånde) med nitrit og nitrat og samtidig lave lattergas som slutprodukt. Normalt producerer bakterier frit kvælstof

(N_2) som slutprodukt, når de ånder med nitrit eller nitrat (se boks om nitrifikation/denitrifikation). Ved at isolere bakterier fra mange miljøer lykkedes det dog at finde en bakterie med de rigtige egenskaber i en kompostdyng.

Bakterien til nitrit-sensoren var derimod nem, da den netop var blevet optaget i en kommerciel kultursamling. Den var oprindeligt isoleret fra et gasrensfilter i Tyskland. På samme måde blev den methanoxidierende bakterie, der er blevet anvendt i methansensoren, fundet i en kultursamling.

Bakterien til acetatsensoren

skulle gro hurtigt på acetat uden at behøve andre organiske stoffer og ellers have samme karakteristika som bakterien til NO_x^- sensoren. En passende bakterie blev her fundet i landbrugsjord.

Patentering – nyt for universitetsforskeren

Der er store samfundsmæssige interesser knyttet til de nyudviklede biosensorer, da de eksempelvis kan bruges til at kontrollere spildevandsrensning eller måle næringssalt-forureningen i vandløb og havmiljø.

For at sikre, at en dansk virksomhed ville videreudvikle biosensorerne til alment brug, blev der derfor taget patent på flere biosensor-teknikker, selv om patentering i midten af 1990'erne bestemt ikke var noget, som man normalt tænkte på i universitetsmiljøet. Siden da er det blevet et direkte krav til forskerne, at de sørger for at patentere lovende opfindelser, og patenterne er universitetets ejendom.

Patentet på NO_x^- -biosensoren blev udvalgt som det mest spændende danske patent i år 2000. En af de patenterede teknikker er en elektrisk justering af måleområdet. Ved at pålægge en positiv ladning på eksempelvis 0,5 V over membranen i spidsen af sensoren, bliver negative ioner som nitrat trukket ind gennem membranen, og man får altså et større signal for en bestemt koncentration og dermed en mere følsom sensor. Pålægges man derimod et negativt potential forhindrer man nitrat i at komme ind i sensoren, og man får derved en værdi for signalet uden tilstedeværelse af nitrat.

Mikrofordeling af kemi

Hvilken viden er der så opnået gennem brugen af de nye biosensorer? Vi har først og fremmest været i stand til direkte at kunne iagttage bakteriel omsætning i de mikromiljøer, hvor den foregår.

I havsedimentet analyseret på Figur 1 kan man således se, at iltningen af ammonium til NO_x^- fandt sted i de øverste iltholdige 2 mm af sedimentet, hvor koncentrationen nåede op

over havvandets koncentration på 4 mM. Under en dybde af 2 mm var sedimentet iltfrit, og her blev NO_x^- forbrugt gennem bakteriers nitrat- og nitrit-respiration, så koncentrationen nåede nul i en dybde af 4 mm. Ved at regne på koncentrationskurvens hældning i de forskellige dybder kan man finde ud af nøjagtigt hvilke NO_x^- dannelses- eller forbrugshastigheder, der er i de forskellige dybder.

Den detaljerede beskrivelse af de mikrobielle processers størrelse og rumlige fordeling, som sensorerne giver os, er med til at øge vores forståelse af mikroorganismers vekselvirkning med hinanden i miljøet.

Nitrat er et vigtigt plantenæringsstof og spiller en central rolle i overgødskningen af vandmiljøet. Det er derfor relevant at opnå en forståelse af, hvordan bakterierne i det naturlige miljø omsætter nitrat, og hvilke faktorer, der påvirker processerne.

Ud over arbejdet i det vandige miljø, har vi bl.a. brugt NO_x^- sensorerne til at studere frigivelsen af kvælstof fra kogødning til landbrugsjord, og sensorerne har også været med på Filippinerne, hvor vi undersøgte fordelingen af nitrat i rismarker.

Kontrol af spildevandsrensning

Ud over at kunne iagttage mikrofordelingen af mikroorganismernes omsætning har det også vist sig, at de nyudviklede biosensorer har et stort potentiale for brug i vandrensning.

Det er kun muligt at måle ganske få parametre ved at have målesensorer nedstænket i spildevand, da de fleste sensormålinger bliver uheldigt påvirket af spildevandets mange komponenter. Af egentlige sensormålinger er det da også kun ilt, pH samt oxidations-reduktionspotentialer, der rutinemæssigt bliver udført »on-line«, dvs. med løbende måling af parametrene. Desuden er det muligt gennem optiske målinger at anslå mængden af nitrat og biomasse.

Biosensorernes målinger af NO_2^- og NO_x^- er mere nøjagtige/detaljerede end hvad



I renseanlæg kan biosensorer give en bedre styring af driften.

man kan opnå med alternative teknikker, og det er derfor muligt at bruge dem i overvågning og regulering af kvælstofomsætningen i renseanlæg.

En vigtig del af vandrensningen er at fjerne kvælstof fra spildevandet. Her udnytter man en kombination af nitrifikations- og denitrifikationsproces-

serne (se boks), hvorved man får omsat den ammonium, som frigives fra organisk materiale i spildevandet, til frit kvælstof. Den frie kvælstof afgives til atmosfæren, og er ikke umiddelbart tilgængelig for levende organismer. Omsætningen sker ved skiftevis at gøre spildevandet henholdsvis iltet og iltfrit.

Under iltede forhold sker der en iltning af ammonium til nitrit og nitrat, og i den efterfølgende iltfrie periode sker der en reduktion af nitrit og nitrat til gasformigt kvælstof.

Danske biosensorer i fremtidens renseanlæg?

Kendskab til i særdeleshed NO_x^- er af meget stor betydning for optimal drift af almindelige renseanlæg, men i specielle renseanlæg har NO_2^- koncentrationen også stor betydning. Moderne dambrugsproduktion af fisk er således afhængig af genbrug af vandet, og det er ved rensningen meget vigtigt at undgå ophobning af NO_2^- , da det kan dræbe fiskene. Også i drift af nye renseanlæg, hvor bakterier ilter ammonium med nitrit, og hvor N_2 er slutprodukt (den såkaldte anammox proces) er kendskab til nitritkoncentrationen vigtig.

Den udviklede biosensor for NO_x^- har vist sig at kunne fungere i månedsvi i renseanlæg med kontinuerlig udskrift af NO_x^- , og da karakteristika med hensyn til såvel stabilitet som responstid er meget fine, er der store forhåbninger om, at de i fremtiden vil være at finde i alverdens renseanlæg.

Om forfatterne:



Rikke Louise Meyer er Ph.D. studerende, E-mail: rikke.meyer@biology.au.dk
Telefon: 8942 3326



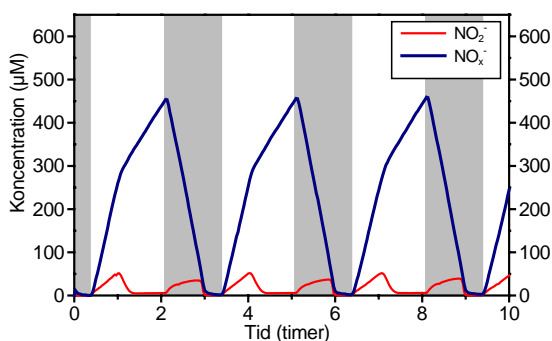
Michael Nielsen er Ph.D. studerende, E-mail: mnielsen@biology.au.dk
Telefon: 8942 3329



Niels Peter Revsbech er professor, E-mail: revsbech@biology.au.dk
Telefon: 8942 3244

Postadresse:
Afd. for Mikrobiel Økologi
Århus Universitet
8000 Århus C

Måling af kvælstofomsætningen



Figuren viser et eksempel på måling af dynamikken for kvælstofomsætningen i et renseanlæg ved hjælp af biosensorer for NO_2^- og NO_x^- . Det ses her, hvorledes man kan følge det overordnede forløb med produktion af NO_x^- i den iltede periode, og det efterfølgende forbrug under iltfrie forhold. De mørke felter angiver den iltfrie periode.

Man kan bl.a. se, at NO_x^- ikke ophobes med konstant hastighed under hele den iltede periode, hvilket ses som et »knæk« i hældningen på grafen. Desuden ses det, at NO_2^- kun forekommer i særlige faser i løbet af en iltet/iltfri cyklus. Den detaljerede indsigt i sådanne dynamikker kan man efterfølgende bruge til at optimere omsætningen kvælstof i renseanlægget.

Yderligere læsning

»Måling af denitrifikation i mikroskala.« Af Peter Bondo Christensen m.fl. Vand og Miljø, 1-1991.

»Stofomsætning i biofilm målt med mikrosensorer.« Af Tage Dalsgaard m.fl. Vand og Miljø, 10-1991.

Kapitlet »Biosensors for Analysis of Water, Sludge and Sediments with Emphasis on Microscale Biosensors«. Af Niels Peter Revsbech m.fl. Det er kap. 6 i bogen »In situ Monitoring of Aquatic Systems: Chemical analysis and Separation.« 2000. Ed. J. Buffle and G. Horvai. John Wiley & Sons Ltd.

Hjemmesider

<http://www.unisense.com>
<http://darwin.mudpop.bio.au.dk/research/microsensors.html>