

# Micronitratsensor

## - måling i hav- og søsedimenter

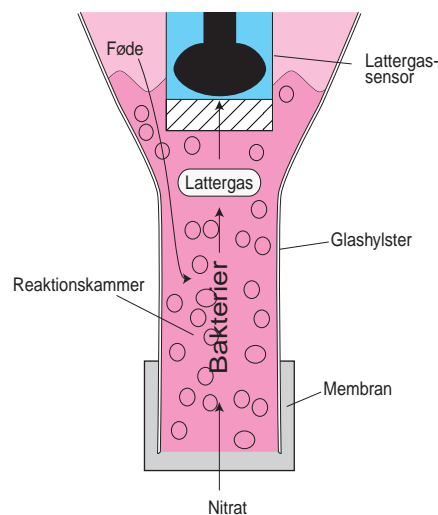
Lars Hauer Larsen, teknisk direktør,  
Unisense A/S

Ny mikrosensor for nitrat til undersøgelse af sø- og havsedimenters kvælstofomsætning.

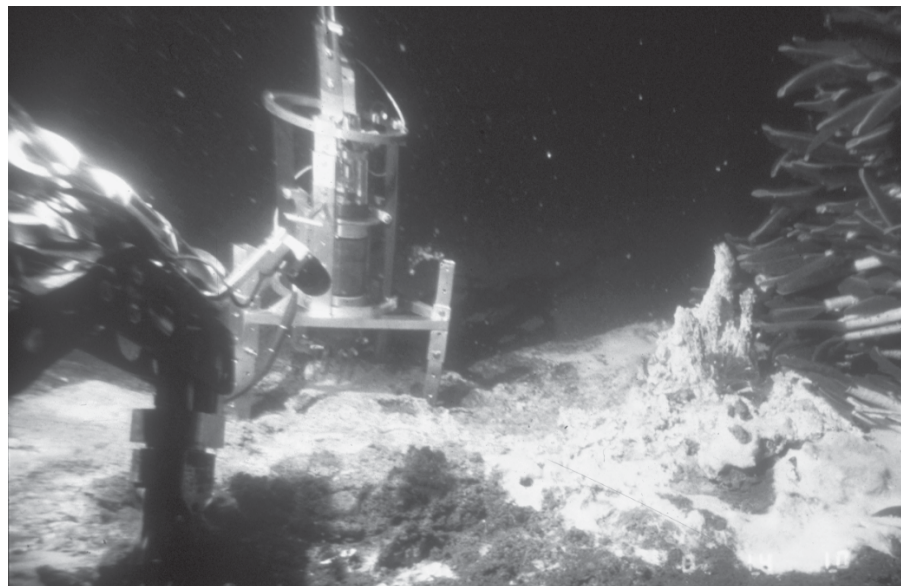
En væsentlig forudsætning for udforskning af stofomsætningen i sedimenter, hvor de forskellige processer ofte finder sted i meget tynde lag, har været udviklingen af målemetoder med den nødvendige rumlige opløsning. Udviklingen af mikrosensorer til måling af bl.a. ilt, pH, sulfid, brint, nitrat, lattergas, metan og redoxpotentiale,  $S^{2-}$ , har således bidraget betydeligt til en øget forståelse af de bio-geokemiske reaktioner i sedimenter. I det følgende beskrives en ny mikrosensor til måling af nitrat, som for nyligt er taget i anvendelse i forskningen.

### Mikrosensorer i biogeokemisk forskning

I våde og stagnerende miljøer, som f.eks. hav og søsedimenter, foregår transporten af opløste stoffer ved diffusion. I sådanne systemer kan man undersøge fordelingen og aktiviteten af processer ved at måle den rumlige fordeling af involverede reaktanter/produkter i og omkring de mikromiljøer, hvor processerne foregår. Når tilgængeligheden af organisk stof er høj, er der ofte stejle gradienter af sådanne reaktanter/produkter på grund af høj mikrobiel og kemisk aktivitet. Eksempelvis trænger



Skitse af en nitrat-mikrosensor. Spidsdiametere af sensoren kan laves ned til 20  $\mu\text{m}$ . (Grafik: KB)



Billede af en Unisense Deep Sea Profiler, på bunden af Guaymas Bassin (2000 meter) ved Mexico. Området er vulkansk, og hvor reducerede stoffer trænger op gennem sedimentet og møder det iltholdige havvand, er der udviklet en helt speciel fauna og mikrobiel flora. (Foto: udlånt af Unisense A/S)

ilt ofte kun under 1 mm ned under overfladen i organisk rige sedimenter.

Til at måle sådanne stejle gradienter er der udviklet forskellige typer af mikrosensorer, med iltmikrosensoren som den første. For at opnå pålidelige målinger med mikrosensorer må disse ikke forstyrre koncentrationsgradienterne i det undersøgte miljø. Mikrosensorer, som i kraft af deres ringe størrelse har et forsvindende lille forbrug af det sensor-specifikke stof, er derfor ideelle. Udover kravet om et forsvindende lille forbrug af det sensor-specifikke stof må mikrosensorer være så tynde, at man ikke inducerer en fysisk forstyrrelse af det miljø, man undersøger eller forstyrrer diffusionstransporten til sensorens spids.

Nitratmikrosensoren blev således udviklet til at måle mikrogradienter af nitrat i våde miljøer, hvor man ønskede at få et detaljeret indblik i bakteriers kvælstofomsætning; herunder nitrifikationen og denitrifikationen.

Forskning af sedimenter gennemføres traditionelt i laboratoriet på indsamlede prøver. Langt den meste sedimentforskning inkluderer derfor indsamlings- og inkubationsprocedurer, gennem hvilke artefakter kan introduceres. Til undersøgelse af sedimenters bio-geokemi er der derfor udviklet såkaldte profilerende instrumenter (profilere), som kan nedsænkes på sedimentoverfladen, og hvorpå der er

monteret mikrosensorer, se foto. Der findes mikrosensorer for ilt, pH, sulfid, brint, redox, nitrat, lattergas og temperatur, som kan monteres på sådanne "profilere". Den programmerbare profiler fører mikrosensorerne ned i sedimentet i mikroskopiske steps (0,025 mm) og lagrer deres signaler. Disse data fortæller, hvordan mikrofordelingen af stoffer i sedimentet helt aktuelt ser ud med den mindst mulige forstyrrelse af sedimentet.

### Mikro nitratbiosensoren

Den nye nitrat-biosensor fungerer ved, at nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) fra det analyserede miljø diffunderer ind i sensoren. Nitraten omdannes af bakterier i et reaktionskammer til lattergas ( $\text{N}_2\text{O}$ ), som efterfølgende detekteres af en lattergassensor.

Omdannelsen af nitrat til lattergas sker som følge af nitrat- eller nitrit ( $\text{NO}_2^-$ )-respiration (denitrifikationen) af en kulstofkilde (føde), som nedbrydes til  $\text{CO}_2$  og vand, helt analogt til menneskers respiration med ilt.



I ligningen står  $\text{NO}_x^-$  for enten nitrit eller nitrat, og både nitrit og nitrat bliver altså denitrificeret til lattergas. Biosensoren måler altså den samlede koncentration af nitrit og nitrat.

Nitratsensoren er forsynet med et reservoir indeholdende kulstofkilden, som diffunderer ned i reaktionskammeret. Bakterierne gror altså i et modsattrettede diffusionsfelt, hvor kulstofkilde og respirationsmiddel tilføres fra hver sin side. Når bakterievæksten i reaktionskammeret resulterer i overskydende bakterier, presses de opad i reservoiret, hvor der ikke findes respirationsmidler. Uden respirationsmulighed ophører væksten, og på sigt vil cellerne gå i opløsning, hvorefter cellekomponenterne står til rådighed som kulstofkilde for de aktivt voksende bakterier i reaktionskammeret.

Den detekterede mængde lattergas er proportional med koncentrationen af nitrat (og nitrit) i det eksterne medium. Ved kontinuert at detektere lattergasproduktionen i reaktionskammeret kan man derved kontinuert (on-line) fastlægge nitrat + nitritkoncentrationen ved spidsen af nitratsensoren.

Ændringer i nitratkoncentrationen detekteres med kun 30 - 60 sekunders forsinkelse (responstid).

Følsomheden er under 0,5  $\mu\text{mol/liter}$  nitrat, og der er ikke interferens på målingen. Kun nitrat/nitrit kan omsættes til lattergas af bakterierne og derved give et signal.

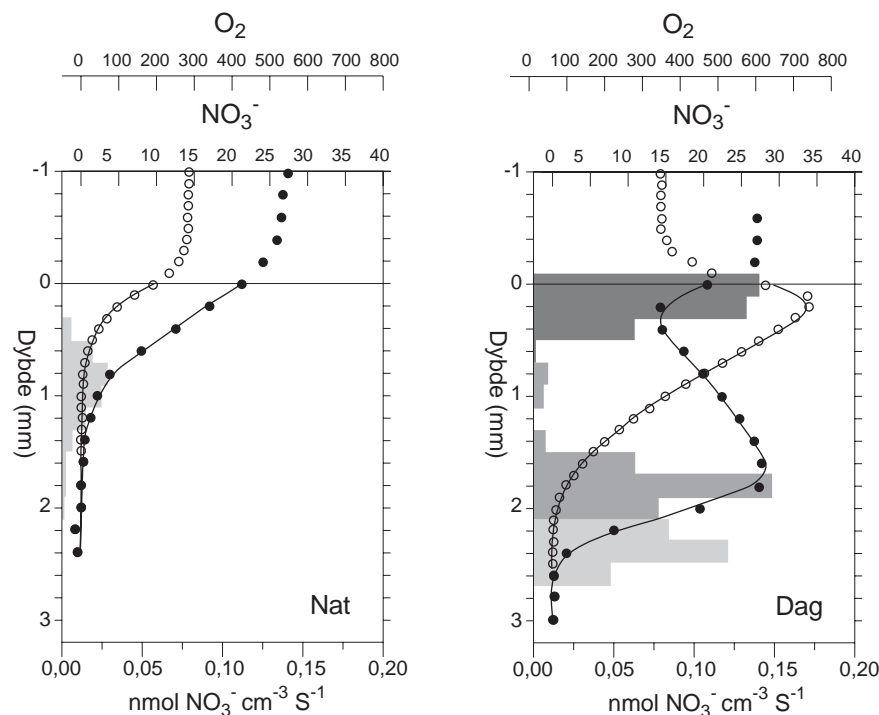
Mikrosensoren responderer lineært på nitrat og en 2-punkts kalibrering er derfor tilstrækkelig. Sensorens måleområde afhænger af dimensioneringen af reaktionskammeret, men ligger normalt i intervallet 0 - 500  $\mu\text{mol/liter}$  nitrat.

### Alger influerer kvælstofomsætning

Mikroalger vokser på sø- og havsedimentoverflader, hvor lysforholdene er tilstrækkeligt gode, og kan danne et filter på sedimentoverfladen i lavvandede områder som har betydning for fluxen af kvælstof og fosforforbindelser mellem sediment og vandsojle. Mikroalgernes fotosyntetiske aktivitet producerer ilt som forårsager en dyb ilt nedtrængning i sedimentet i dagtimerne, mens de om natten ved deres respiration bidrager til sedimentets samlede iltforbrug. Denne døgnrytme har indflydelse på kvælstofcyklus i sedimentet, eftersom tilstedeværelsen af ilt forhindrer denitrifikation, men er en forudsætning for nitrifikationen. Direkte målinger af nitratfordelingen i sedimenter dækket af mikroalger har ikke kunne udføres med den traditionelle opskærings-ekstraktionsteknik, da koncentrationsgradienterne med denne teknik ikke kan måles med tilstrækkelig høj rumlig opløsning.

Efter opfindelsen af nitrattmikrosensoren har man for første gang kunnet studere de vigtige nitrifikations- og denitrifikationsprocesser med måling af nitrattmikroprofiler med den relevante rumlige opløsning (som ofte er under 0,1 mm).

Algebelagte sedimentsøjler fra Vilhelmsborg Sø blev inkuberet i laborato-



Ilt- og nitratprofiler samt metabolismehastigheder i et sediment fra en eutrof sø, om natten og om dagen. Nitratmålinger er indikeret med udfyldte, iltmålinger med lyse cirkler. Vandrette rektangler viser hastigheder af nitratassimilering (mørk), nitrifikation (mellemgrå), og denitrifikation (lys grå). (Grafik: KB, efter Lorenzen et al., 1998)

riet, og udsat for en lys/mørke-cyklus på 12/12 timer. Med iltmikrosensorer og nitrattbiosensorer blev der målt mikroprofiler af ilt og nitrat, og der blev fundet store forskelle på disse profiler målt i henholdsvis lys og i mørke (figur oven for).

Om natten, hvor der ikke er iltproduktion fra algerne, trængte ilt under 1 mm ned i sediment. Ilt blev brugt af mikroorganismene i sedimentet til nedbrydning af organisk materiale. Nitratkoncentrationen i vandet over sedimentet var omkring 27  $\mu\text{mol/liter}$  og nitraten trængte ned i de iltfrie lag af sedimentet, hvor den blev reduceret i forbindelse med denitrificerende bakteriers oxidation af organisk materiale. Nitraten trængte kun 1,5 mm ned i sedimentet i mørke.

Både ilt og nitrattmikroprofilerne i sedimentet ændrede sig dramatisk ved belysning. Algerne på overfladen af sedimentet begyndte at producere ilt, hvilket tydeligt ses på iltprofilen, hvor iltkoncentrationen er højst lige under sedimentoverfladen. Ilt nedtrængningen blev under belysning øget til 2 mm.

Nitrattfordelingen i sedimentet ændredes ligeledes dramatisk fra nat til dag. Det ses, at der, hvor algerne har deres højeste aktivitet, optages nitrat i forbindelse med opbygning af biomolekyler hvor kvælstof indgår som byggesten. Derudover er det bemærkelsesværdigt, at der i 1 - 2 mm dybde var et koncentrationsmaximum af nitrat, der må skyldes produktion af nitrat i denne dybde. På grund af fotosyntesen blev laget i 1 - 2 mm dybde iltholdigt under belysning, og der var således dannet

basis for de ammoniumoxiderende bakteriers (nitrifikanters) produktion af nitrit og nitrat.

Med profiler af nitrat og ilt som vist på Fig. 3 er det muligt at få en meget detaljeret indblik i dynamikken af kvælstofomsætningen i sedimenter, biofilm, jord, etc.

### Snart på markedet

Det ovenover beskrevne studie viser hvorledes brug af den nye nitrattsensor kan bidrage til en bedre forståelse af naturens kvælstofkredsløb. En god forståelse af denne vigtige proces vil have positive økonomiske og miljømæssige konsekvenser.

Selvom der med brug af nitrattmikrosensoren allerede er produceret væsentlige resultater, er den endnu ikke kommet på markedet som et produkt der kan købes af interesserede. Unisense A/S gennemfører i øjeblikket et produktmodningsarbejde der i løbet af år 2001 forventes at bringe nitrattmikrosensoren i produktion.

Unisense har derudover planer om i løbet af 2001 at markedsføre en makroversion af nitrattsensoren (ydre diameter ca. 10 mm), som vil blive designet til at kunne måle nitrat i vandprøver. ■

*Princippet for nitrattbiosensoren er opfundet på Afdeling for Mikrobiel Økologi, Biologisk Institut, Aarhus Universitet, af Niels Peter Revsbech, Thomas Kjær, og Lars Hauer Larsen. Der blev samtidigt udtaget et patent på princippet, og dette patent ejes nu af Unisense A/S, Forskerpark Aarhus, der producerer mikrosensorer til forskningsformål.*