

Uorganisk biokemi og bioteknologi i nanoskala

Forskergrupperne for biouorganisk og analytisk kemi, DTU har arbejdet med at undersøge den biologiske funktion ned på det enkelte molekyles niveau. Arbejdet er udført vha. de nyeste scanning probe mikroskopiteknikker og har givet spændende resultater

Af Jingdong Zhang¹, Esben P. Friis², Niels H. Andersen¹, Allan G. Hansen¹, Jens U. Nielsen¹, Hainer Wackerbarth¹, Hans E.M. Christensen¹, Bee Lean Ooi¹, Jens E.T. Andersen¹ og Jens Ulstrup¹, ju@kemi.dtu.dk

¹Kemisk Institut, DTU

²Novozymes

Direkte iagttagelse af biologiske enkeltmolekyler i deres naturlige biologiske miljøer er et af kemiens ultimative mål. Et andet er at kunne styre den biologiske funktion helt ned på det enkelte molekyles niveau.

Det har forskergrupperne i biouorganisk og analytisk kemi på Kemisk Institut, DTU arbejdet med de sidste syv år [1]. Forskningen er baseret på de nye scanning probe mikroskopier (SPM), scanning tunnel (STM) og atomic force mikroskopi (AFM) i den specielle *in situ* teknologi, hvor enkeltmolekyler og -biomolekyler, direkte i deres naturlige vandige reaktionsmedier, kan studeres. Det er suppleret med bred forskning inden for biouorganisk kemi og ny fysisk-orienteret elektrokemi. Der har været meget fokus på kobberproteinet azurin. Figur 1A viser dette molekyles tredimensionale struktur og figur 1B et *in situ* STM-billede af azurin i aktion som biologisk elektrontransportør på en atomart plan guldoverflade i molekylets naturlige vandige reaktionsmedium [2].

Tværvideenskabelige indgangsvinkler til biologisk enkeltmolekylkemi

Den biouorganiske kemi

Billeder som figur 1B er resultat af tværfaglig videnskab med flere udgangspunkter.

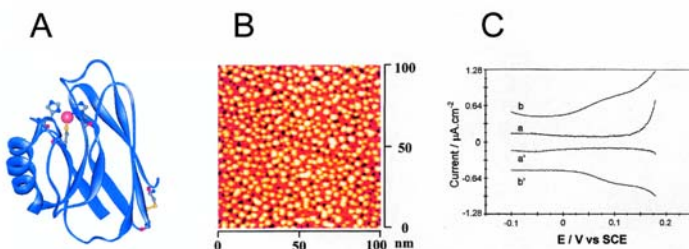
Metaller som jern, kobber, zink, molybdæn m.fl. indgår for

det første i mere end en tredjedel af alle kendte proteins funktion [3,4]. Der er altid involveret metalioner, når naturen udøver en sofistikeret funktion, f.eks. i fotosyntese, respiration, enzymfunktion og alle faser af DNA's biologiske virksomhed. Den tværfaglige videnskab biouorganisk kemi dækker netop metallers kemi i biologiske systemer.

På DTU varetages biouorganisk kemi på Kemisk Institut, hvor mangeartet uorganisk, biokemisk, fysisk kemisk og genteknologisk teknik omkring metalloproteiner er bygget op. Som navnet siger hører azurin (figur 1) til klassen af blå kobberproteiner og er en meget attraktiv repræsentant for den biouorganiske kemi. Azurin er molekylær aktør i bakteriel respiration. Molekylet varetager elektrontransport, hvorunder kobberionen varierer mellem oxideret, Cu(II), og reduceret, Cu(I) tilstand. Kobber er koordineret til ligander fra proteinsystemet, og beskrivelse af den molekylære struktur og funktion hos metalloproteiner som azurin tager udgangspunkt i den uorganiske koordinationskemi. Det illustrerer det spændende samspil mellem den uorganiske kemi og proteinmolekylets biologiske del, der netop er den biouorganiske kemis indhold.

Scanning probe og scanning tunnel mikroskopi i vandige reaktionsmedier

Det andet udgangspunkt for enkeltmolekyl-bioteknologi er ny SPM-teknologi. Her fokuseres på STM, da denne mikroskopi både er rettet mod molekylernes ydre form og mod enkeltmolekylær elektronisk funktion. Figur 2A viser princippet i STM. Et molekyle er immobiliseret, dvs. fastgjort kemisk eller ved fysisk adsorption, på en atomart plan elektrisk ledende overflade, her en enkeltkrystal-guldoverflade, også kaldet substratet. En tynd metalnål, tippet, bringes ned til nogle Ångstrøms eller et par nanometers afstand fra substratet. På trykning af en spændingsforskel mellem tip og substrat (bias-spændingen) får en elektrisk strøm (strøm af elektroner) til at løbe mellem substrat og tip. Strømmen er forårsaget af den kvantemekaniske tunneleffekt, der også er basis for tunnel-dioder, partikeludsendelse fra tunge atomkerner og andre grundvidenskabelige og teknologisk betydningsfulde fænomener. Tunnelstrømmen aftager hurtigt (eksponentielt) med afstanden mellem substrat og tip og bæres derfor af tippens yderste atomer. Strømmen er desuden meget følsom over for det mellemliggende materials egenskaber. Når tippet bevæges

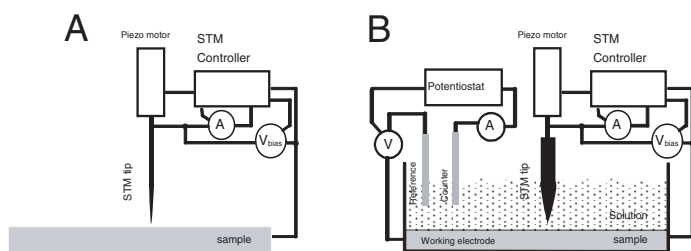


Figur 1.

A: Tredimensionel struktur af azurin fra bakterien *Pseudomonas aeruginosa*. Cu-ionen og disulfidbroen er fremhævet.

B: *In situ* STM-billede af azurin på Au(111) i vandig buffer (ammoniumacetat, pH 4.7) under fuld potentialkontrol [1,2]. De enkelte strukturer viser elektrontransporterende azurinmolekyler.

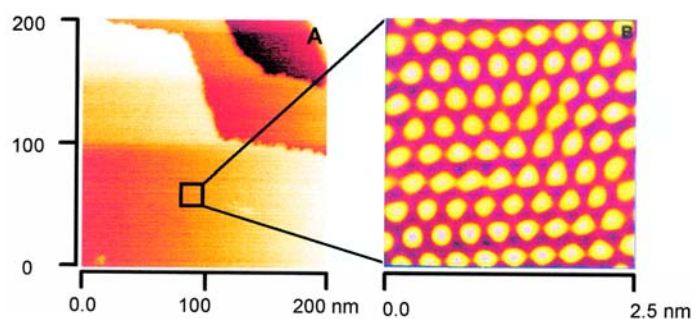
C: Differentialt pulsvoltammogram. Signalet ved 100 mV afspejler immobiliseret azurins elektrokemiske aktivitet.



Figur 2. Ex situ (A) og in situ (B) STM. I ex situ STM kontrolleres tunnelstrømmen alene af biasspændingen mellem tip og substrat. I in situ STM er tip- og substratpotentialet kontrolleret over for en fælles referenceelektrode, og tippet er dækket af et isolerende materiale ud til de yderste atomer.

hen over overfladen (overfladen scannes), kan den metalliske overflades og adsorberede molekylers egenskaber kortlægges med molekylær og undertiden atomar præcision. Tippens højde justeres normalt, så den målte strøm er konstant. Derved opnås et »topografisk kort«, der afspejler det mellemliggende rum, herunder adsorberede molekylers, egenskaber.

I langt de fleste tilfælde har STM været anvendt under ultrahøj vakuum eller gasformige (almindelig »luft«), *ex situ* betingelser. Høj (dvs. atomar) opløsningssevne er ofte fundet for små molekyler. Biologiske makromolekyler udfører deres funktion i vandige medier. *Ex situ* STM er derfor ikke umiddelbart repræsentativ for biologiske makromolekyler, men STM kan også bringes i anvendelse til kortlægning af molekylers og makromolekylers struktur og funktion i vandige buffermedier. Her er ny STM-teknologi påkrævet. Figur 2B viser princippet i *in situ* (vandigt buffermedium) STM. I *ex situ* STM er alene biasspændingen afgørende. Når substrat og tip er i kontakt med vandig opløsning (*in situ* STM), er særskilt kontrol af substratets og tippens elektrokemiske potential over for en fælles referenceelektrode absolut nødvendig. Tunnelstrømmene er nede i picoampere-området (10^{-12} A), og uønskede elektrokemiske processer ville helt dominere, hvis der blot påtrykkes en spændingsforskel mellem tip og substrat. Tippet skal desuden dækkes af et isolerende lag, der alene udsætter dens yderste ende (i princippet de yderste atomer) for det vandige mediums indflydelse. Denne del bærer tunnelstrømmen, hvorimod den uønskede elektrokemiske strøm bæres af hele den eksponerede tipoverflade. Ved at tildække (»coat«) tippet undertrykkes de elektrokemiske strømme næsten fuldstændigt, og alene tunnelstrømmen bliver tilbage. I relation til biologiske makromolekyler er *in situ* STM som nyskabelse udviklet på Kemisk Institut, DTU.



Figur 3. A: In situ STM-billede af en enkeltkrystal Au(111)-overflade i fortyndet perchlorsyre under fuld elektrokemisk potentialkontrol. B: samme overflade med atomar opløsning.

Elektrokemi og atomart plane elektrodeoverflader

In situ STM er central i enkeltmolekylers kortlægning, men kan ikke stå alene og må støttes af anden teknologi. Da *in situ* STM fundamentalt set involverer elektronoverførsel mellem metalliske overflader og molekyler, er elektrokemi en af de vigtigste komplementære indgangsvinkler. Det elektrokemiske system må svare så nøje som muligt til *in situ* STM, og elektrodeoverfladerne skal være plane på det atomare niveau, dvs. veldefinerede metalliske enkeltkrystalplaner (figur 3). Ud over at svare til *in situ* STM-betingelserne giver enkeltkrystal-elektrokemi flere detaljer og mindre baggrundsstrøm i strøm-spændingsrelationerne, der også kan optages samtidigt med STM. Herved fås en direkte sammenhæng mellem detaljerne i det elektrokemiske voltammogram og det scenario, der udspilles i STM-billederne.

In situ STM som in situ enkeltmolekylspektroskopi

In situ STM rummer andre perspektiver. Den individuelle kontrol af substratets og tippens elektrokemiske potentialer medfører, at teknikken frembyder to typer strøm-spændingsrelationer [1,5]. Den ene er mellem tunnelstrømmen og biasspændingen lige som i STM i vakuum eller luft, med den forskel, at biasspændingsvariation nu sker under fastholdelse af substratets elektrokemiske potential. Den anden relation er mellem tunnelstrømmen og substratets elektrokemiske potential – lige som i elektrokemi – men ved fastholdt biasspænding, hvor substratets og tippens elektrokemiske potentialer varieres parallelt. Herved ændres substratets elektrokemiske potential, samtidig med at enkeltmolekyler direkte under deres deltagelse i elektrokemiske processer »iagttages« med tippet.

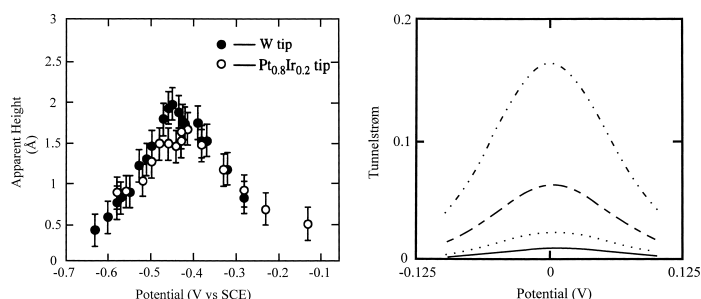


Specialister i

- Automatiseret Fastfaseoprensning Gilson ASPEC XL, ASPEC XLi, ASPEC XL4.
- Automatisering af væskehåndtering.
- HPLC, IC, SFC kromatografi.
- ERWEKA Dissolution systemer.
- Avancerede systemer til tabletkontrol.
- Salg og kalibrering af Gilson pipetter.



Biolab A/S · Sindalsvej 29 · DK-8240 Risskov
Telefon 8621 2866 · Telefax 8621 2301
E-mail: biolab@biolab.dk



Figur 4.

A: In situ STM-tunnelstrøm eller »tunnelspektre« (her i form af den »tilsyneladende tipafstand«) for jernprotoporphyrin IX (Fepph) adsorberet på en atomart plan grafitelektrode, som funktion af elektrodens elektrokemiske potential i vandig boratbuffer. [6]. Fepph er den centrale funktionelle gruppe i hæmoglobin og myoglobin..

B: Teoretisk beregnede (»normaliserede«) tunnelspektre [5]. Der er maksimum i tunnelspektret tæt ved Fepph's elektrokemiske ligevægtpotential.

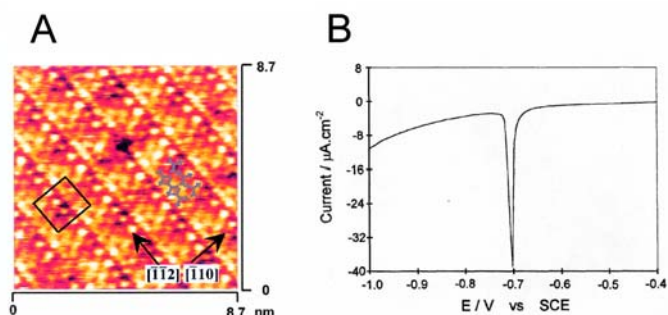
Relationen mellem tunnelstrømmen og substratets elektrokemiske potential kan også anskues som en ny enkeltmolekylspektroskopi, hvor biasspændingen fungerer analogt med en monokromatisk lysstråle i optisk spektroskopi. Herved fremkommer enkeltmolekyle *in situ* tunnelspektre eller strømspændings »absorptionsbånd«, der afspejler vigtige fysiske egenskaber hos de adsorberede molekyler, lige som i optisk spektroskopi (figur 4 [5,6]).

Kemiske og biologiske systemer kortlagt med *in situ* STM og enkeltkrystal-elektrokemi

Figur 3A viser *in situ* STM af den specielle Au(111) krystalplan i kontakt med vandig buffer under fuld elektrokemisk kontrol. Atomart plane områder (terrasser) af flere hundrede nanometers udstrækning adskilt af monoatomare trin ses tydeligt. Billedet til højre er »zoomet ind« og viser overfladens enkelte atomer direkte i den vandige opløsning.

Azurin er et velkarakteriseret, redoxaktivt metalloprotein, der er velegnet som fokusmolekyle i ny nanoskalakemi og bioteknologi. Azurin udviser et andet træk, der gør det til et godt valg. En af de vigtigste forudsætninger for karakterisering af enkeltmolekyler med *in situ* STM er, at molekylerne kan fikses eller »immobiliseres« i veldefinerede orienteringer på metaloverfladen. En disulfidbro i azurins overflade (figur 1A) bevirker netop, at molekylet kan fastgøres på Au(111) ved kemisorption, dvs. næsten kovalent bindingsdannelse mellem svovlatomerne og guldatomer på substratoverfladen. Immobiliseringen er så nansom, at azurin bevarer sin integritet som molekylær elektrontransportør. Figur 1C viser et differentielt pulsvoltammogram (en følsom elektrokemisk strøm-spændingsrelation) af et azurinmonolag på Au(111). Et signal omkring 100 mV vidner om, at kobberionen har bevaret sin evne til at udveksle elektroner med elektrodooverfladen [1,2]. Immobiliseret azurin er altså fuldt funktionsdygtigt, og *in situ* STM som på figur 1B viser azurin-enkeltmolekyler direkte i elektrontransporterende aktion.

Svovlatomers velegnethed som molekylær forbindelsesgruppe (molekylært »anker« eller »link«) er også vist på figur 5, der



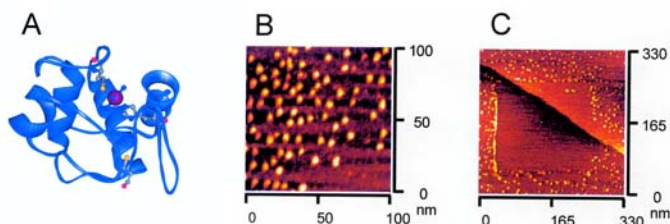
Figur 5.

A: Højopløst *in situ* STM-billede af den svovlholdige aminosyre cystein adsorberet på atomart plant Au(111) i 50 mM ammoniumacetat buffer under fuld elektrokemisk potentialkontrol. Hver klynge indeholder seks cysteinmolekyler [7]. De skarpe diagonalt orienterede kontraster viser svovlatomer. Tallene angiver de underliggende guldatomers atomare orden. De øvrige kontraster kan tilordnes den molekylære model aftegnet med gråt. Tre hydrogenbundne cysteinmolekyler er orienteret parallelt og modsat tre andre, ligeledes parallelt orienterede molekyler. Enkelte sorte huller viser steder, hvor et cysteinmolekyle »mangler« i netværket. Billedet viser den høje præcision i små eller mellemstore adsorberede molekyleres strukturelle organisation i deres naturlige medier, der kan opnås ved *in situ* STM.

B: Lineært voltammogram (strøm-spændingsrelation) for reduktiv desorption af cystein fra Au(111)-overfladen. Det skarpe signal vidner om høj strukturel orden i cysteinlaget og om meget velkontrollerede og »superrene« elektrokemiske betingelser.

viser et monolag af den svovlholdige aminosyre cystein adsorberet på Au(111) i vandig buffer [7]. Et velorganiseret hydrogenbundet og elektrostatisk netværk af cysteinmolekyler udstrækker sig over store domæner. Hver klynge indeholder seks cysteinmolekyler, hvor svovlatomerne fremtræder med stærke kontraster. Også nitrogen- og carbonatomer, men ikke oxygenatomer giver STM-kontrast. Billedet viser den næsten atomare *in situ* STM-opløsningssevne, også i vandig elektrolytopløsning. Det viser også, at STM ikke direkte afbilder molekylerens topografiske form, men deres elektriske ledningsevne og de enkelte atomers eller molekylfragmenters evne til at transmittere elektroner. Figur 5 til højre illustrerer cysteinmonolagets høje laterale orden på anden vis. Adsorption af thiolgrupper ledsages af oxidation af Au-S-overfladelaget. Au-S-laget kan reduceres elektrokemisk under frigørelse af thiolen i en reduktiv desorptionsproces. Det meget skarpe voltammetriske signal vidner om høj strukturel orden i cysteinlaget. Mindre orden som på polykrystallinsk guld giver et langt bredere signal.

Figur 6B viser *in situ* STM af et hæmoprotein, cytochrom c

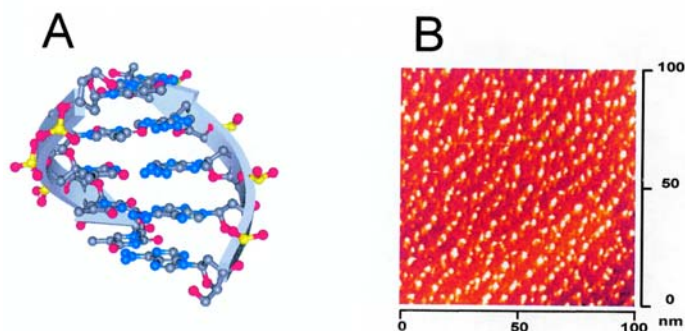


Figur 6.

A: Tredimensional struktur af cytochrom c fra gærarten *Saccharomyces cerevisiae*. Hæmgruppen med jernatomet og thiol-gruppen nær proteinets overflade er fremhævet.

B: In situ STM-billede af gær cytochrom c på Au(111) i vandig buffer under fuld potentialkontrol. Som på figur 1 viser de enkelte strukturer elektrontransporterende molekyler. Cytochrom c er svagere adsorberet end azurin og monolagstætheden væsentligt mindre.

C: Rektangulært område, hvor den cytochrom c dækkede overflade er »skrabet ren«.



Figur 7.

A: Tredimensional struktur af det korte DNA-fragment 5-A-T (A = adenin, T = thymin). Thiollinkeren er ikke vist, men er påsat den nederste ende af molekylet.

B: In situ STM-billede af 5-A-T på Au(111) (kemisk fastgjort med en -SH gruppe) i vandig phosphatbuffer under elektrokemisk potentialkontrol. Hver af de lyse kontraster repræsenterer ét adsorberet 5-A-T-molekyle. Enkeltstrengene af 5-A eller 5-T giver ikke velopløste billeder.

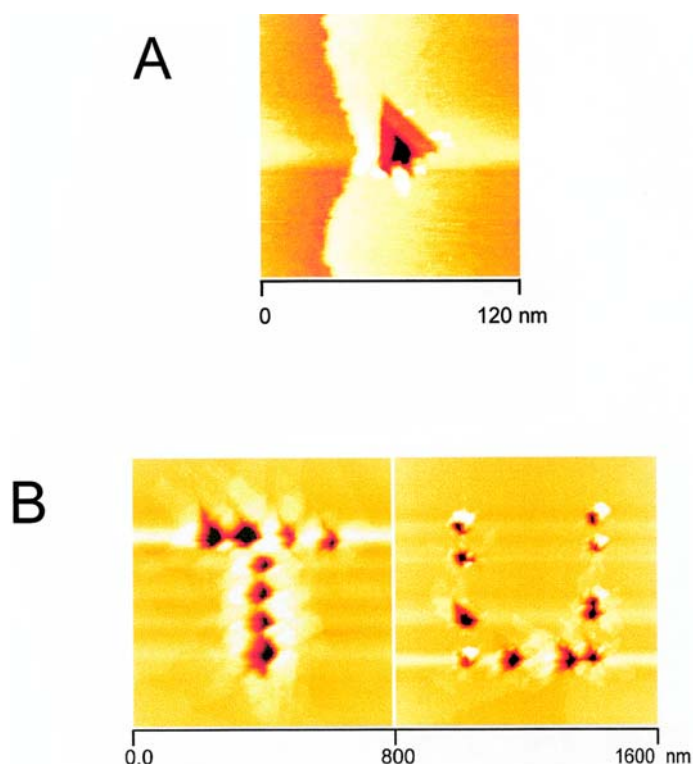
fra en gærart (figur 6A). Cytochrom *c* er også et elektrontransportprotein, hvis centrale funktionsdel er en hæmgruppe med jern som indgående metal. Proteinet indeholder en fri thiolgruppe (-SH), der kan være »link« mellem proteinet og guldoberfladen, men da gruppen sidder lidt »inde i« proteinstrukturen, medfører binding til guldoberfladen nogen deformation af proteinstrukturen. Au-S-binding finder faktisk sted, men bindingen er ikke så stærk som for azurin, og der dannes kun ca. 15% af et monolag. En interessant udnyttelse er vist på figur 6C, hvor STM-tippen i et veldefineret rektangulært område er benyttet til at skrabe overfladen ren. Det kunne rumme nogle interessante perspektiver for konstruktion af nanoskala-proteinarrays i veldefinerede geometriske udformninger. Figur 7B viser *in situ* STM af et kort syntetisk oligonukleotid (DNA-fragment) med fem basepar (adenin og thymin, 5-A-T, figur 7A) og en påhæftet thiol-linker. I homogen opløsning er den korte dobbelthelix »smeltet«, dvs. den optræder som enkeltstreng. På Au(111)-overfladen dannes kun veldefinerede *in situ* STM-kontraster, når begge strenge er tilstede. Det tyder på, at dobbeltstrengen stabiliseres på den metalliske overflade. Det kan få betydning for forståelse af oligonukleotiders og DNA's elektroniske ledningsevne, for tiden et meget aktivt forskningsområde. Det kan også føre til direkte billeddannelse (visualisering) på enkeltmolekylniveau af oligonukleotiders »hybridisering«, dvs. enkeltstrengenes binding til deres komplementære strenge. Det vil videre have betydning for visualisering af enkeltmolekylscreening af biologiske væsker med en mangfoldighed af medicinske og farmakologiske perspektiver til følge.

Nogle konkluderende iagttagelser

Biologiske molekyler og makromolekyler *in situ* STM i vandige buffermedier, i kombination med »state-of-the-art« elektrokemi og den brede tværfaglige videnskab biouorganisk kemi, er ved at åbne en ny verden inden for kemi og bioteknologi i nanometer- og enkeltmolekylskala. Som noget særligt i DTU's nanoteknologiske og bioteknologiske programmer indgår metalioners mangeartede biologiske facetter i denne enkeltmolekyl-tværvidevidenskab på Kemisk Institut.

In situ STM er specielt ved ud over molekylers ydre form at afdække enkeltmolekylers og -biomolekylers elektroniske egenskaber. I relation til kemisk og biokemisk nanoteknologi er elektrokemisk *in situ* STM desuden unik ved både at sikre overfladens nøje kontrollerede tilstand og at indeholde en indbygget elektrisk kontakt til ydre elektriske kredsløb via elektrontransport tværs over den elektrokemiske fasegrænse mellem elektroder og adsorberede molekyler. Den flerfoldige teknologi anvendt på azurin og gær cytochrom *c* vil kunne bruges generelt på redoxproteiner. *In situ* STM og enkeltkrystal-elektrokemi har derved åbnet mulighed for også at følge elektrontransporterende enzymer i fotosyntese og respiration m.m. i det naturlige miljø og på et nyt nanoskalaniveau.

In situ STM og nanoskala-elektrokemi har andre teknologiske dimensioner. Billederne af cystein (figur 5) viser, at en metallisk overflade kan behandles og gøres hydrofob eller hydrofil afhængig af de adsorberede molekylers funktionelle grupper, under bibeholdelse af den strukturelle orden. Det vil kunne anvendes til at bringe proteiner og enzymer til adsorption i forskellige, men veldefinerede orienteringer [1]. Efterfølgende *in situ* STM frembyder enestående indgangsvinkler til molekylære biosensorer, hvor biologiske substrater for immobiliserede enzymer vil kunne påvises på enkeltmolekylniveau. DNA-fragmenters *in situ* STM er et andet eksempel, hvor biologiske væsker vil kunne screenes på enkeltmolekylniveau. Biomolekylers *in situ* STM vil endelig kunne kombineres med anden, fysisk *in situ* nanoteknologi. *In situ* STM kan f.eks. være et effektivt værktøj til nøje kontrolleret frembringelse af nanoskala-»hul-
»



Figur 8.

A: Nanoskala-»hul« i en Au(111)-overflade frembragt ved *in situ* STM under nænsom elektronisk kontakt mellem tip og substrat i fortyndet perchlorsyre ved lav biasspænding [8]. Hullets trekantede form følger Au(111)-overfladens atomare struktur. Den centrale fordybning er to atomlag dyb og nogle nanometer i udstrækning. Fordybningen er omgivet af et større (30-40 nm) område af et enkelt atomlags dybde. »Opravede« Au-atomer kan ses omkring hullets rand.

B: Bogstaverne T U (Technical University) skrevet med nanoskala-»huller«.

ler«, »udfræsninger« m.m. i metalliske overflader under ganske milde betingelser. Et eksempel er vist på figur 8 [8], jfr. figur 6. Redoxzymer (»enkeltmolekylære biosensorer«) vil kunne fikseres i sådanne metalliske nanostrukturer i multifunktionelle molekylære enzymarrays med nye enkeltmolekyle elektroniske egenskaber [9]. Kemisk Institut er engageret i et større EU-projekt med sådanne mål for øje.

Undervisnings- og forskeruddannelsesprogram

Forskningsprogrammer inden for biouorganisk kemi og nanoskalabioteknologi på Kemisk Institut, DTU er, sluttelig, afspejlet i et spændende undervisnings- og forskeruddannelsesprogram. Det omfatter en kursuspakke: Koordinationskemi (26124), Biouorganisk kemi (26126) og Eksperimentalkursus i koordinationskemi og biouorganisk kemi (26122); et årligt udbudt ph.d.-kursus i teoretiske grundlag for molekylær elektrontransport, nanoskalakemi, STM og elektrokemi (26900) samt polytekniske midtvejs-eksamens- og ph.d.-projekter inden for bl.a.: metalloproteiners elektroniske egenskaber og foldningsmekanismer; metalloproteiners elektrontunnel-effekter og elektrostatiske egenskaber, metalloproteiners og organiske molekylers *in situ* STM og SPM, metalloproteiners og DNA-fragmenters elektrokemi på atomart plane elektrodeoverflader; flerkernede metalkomplekser i koordinationskemi og biouorganisk kemi samt genteknologisk fremstilling af metalloproteiner og rekombinante metalloproteiners fysisk-kemiske egenskaber. Nærmere beskrivelse af disse programmer kan findes på websiten: <http://big.kemi.dtu.dk/big/index.html>

Referencer

1. J. Zhang, Q. Chi, A.M. Kuznetsov, A.G. Hansen, H. Wackerbarth, H.E.M. Christensen, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup: Electronic properties of functional biomolecules at metal/aqueous solution interfaces. *J. Phys. Chem. B* 106: 1131-1152 (2002). Feature article.
2. Q. Chi, J. Zhang, J.U. Nielsen, E.P. Friis, I. Chorkendorff, G.W. Canters, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup: Molecular monolayers and interfacial electron transfer of *Pseudomonas aeruginosa* azurin on Au(111). *J. Am. Chem. Soc.* 122: 4047-4055 (2000).
3. I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine (Eds.): *Bioinorganic chemistry*. University Science Books, Mill Valley (1994).
4. A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt (Eds.): *Handbook of metalloproteins*. Wiley, Chichester (2001).
5. A.M. Kuznetsov, J. Ulstrup: Mechanisms of in situ scanning tunnelling microscopy of organized redox molecular assemblies. *J. Phys. Chem. A* 104: 11531-11540 (2000).
6. N. Tao: Probing potential-tuned resonant tunneling through redox molecules with scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 76: 4066-4069 (1996).
7. J. Zhang, Q. Chi, J.U. Nielsen, E.P. Friis, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup: Two-dimensional cysteine and cystine cluster networks on Au(111) disclosed by voltammetry and in situ scanning tunneling microscopy. *Langmuir* 16: 7229-7237 (2000).
8. Q. Chi, J. Zhang, E.P. Friis, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup: Creating nanoscale pits on solid surfaces in aqueous environment with scanning tunnelling microscopy. *Surf. Sci. Lett.* 463: L641-648. A method for fabricating nanoscale patterns on a surface: US Pat.09/497.881.
9. A.M. Kuznetsov, J. Ulstrup: Mechanisms of molecular electronic rectification through electronic levels with strong vibrational coupling. *J. Chem. Phys.* 116: 2149-2165 (2002).

Ph.d.-projekt

Biologisk phosphorfjernelse

Behandling med aktivt slam er i øjeblikket den mest anvendte metode til rensning af spildevand fra husholdninger og industri. I en aktiv slamproces bringes spildevandet i kontakt med en blanding af aerobe og anaerobe bakterier - den aktive slam - i en fri suspension. Det aktive slam virker som en biologisk katalysator, der omdanner forurenende stoffer i spildevandet til gasformige produkter - nitrogen og carbondioxid - samt til biomasse eller andre uopløselige komponenter, der let kan fjernes ved fældning.

Den aktive slamproces blev oprindeligt udviklet til at fjerne organiske forbindelser, idet de organiske bestanddele var substrater for aerobt mikrobielt stofskifte. Den voksende erkendelse af problemerne med udledning af næringssalte til vandløb og de kystnære områder ledte til udvikling af nye aktive slamprocesser, som også fjerner nitrogen- og phosphorforbindelser.

Nitrogen fjernes biologisk i to trin:

1. Nitrifikation, hvor ammonium aerobt omdannes til nitrat af autotrofe bakterier
2. Denitrifikation, hvor nitrat konverteres til nitrogen af heterotrofe bakterier, uden at der er fri oxygen tilstede, dvs. under såkaldte anoxiske betingelser.

Phosphorfjernelse kan ske ved kemisk eller biologisk udfældning. Sidstnævnte sker vha. bakterier, der kollektivt betegnes som polyphosphatakkumulerende organismer, der kan optage stort overskud af fosfat i interne polyphosphatlagre. I fravær af elektronacceptorer, som nitrogenoxider eller oxygen, tjener polyphosphaterne som energikilde ved nedbrydning af visse letnedbrydelige organiske komponenter som polyhydro-

xyalkanolater. Under aerobe forhold tjener sådanne oplagrede komponenter som substrat for cellevækst og genopbygning af interne polyphosphatlagre. Kommer spildevandet i kontakt med slammet i en anaerob zone, kan phosphatakkumulerende organismer formere sig i det aktive slam. Phosphor fjernes fra spildevandsprocessen ved at overskydende slam fjernes, når slammets polyphosphatindhold er maksimalt.

Det væsentligste formål med og de originale bidrag fra dette ph.d.-projekt var at finde og undersøge årsagssammenhænge for biologisk phosphorfjernelse i den anoxiske zone og at evaluere deres effekt på operation og opførslen af det totale anlæg. Det forskningsmæssige arbejde omfattede eksperimenter og evaluering af modeller. Den biologiske phosphorfjernelse blev ved forskellige betingelser fulgt i batch- og pilotanlægseksperimenter. De var planlagt baseret på mikrobiel fysiologisk forståelse og velovervågede eksperimenter. På dette grundlag var det muligt at kvantificere bakterierne opførsel. Resultaterne og konklusionerne blev implementeret i evalueringen af hensigtsmæssige operations- og reguleringsstrategier mhp. at undgå nitratakkumulation i systemet, hvilket vist at kunne interferere med den biologiske phosphorfjernelse. En strategi mhp. regulering af denitrifikation ved tilsætning af en ekstern kulstofkilde til den anoxiske fase blev testet og modificeret på anlægget mhp. biologisk phosphorfjernelse. De modifikationer, der blev udført på modellen mhp. at opnå en forbedret beskrivelse af den biologiske næringstoffs fjernelse, blev evalueret ud fra de eksperimentelle resultater.

Jens Meinold, Institut for Kemiteknik, DTU