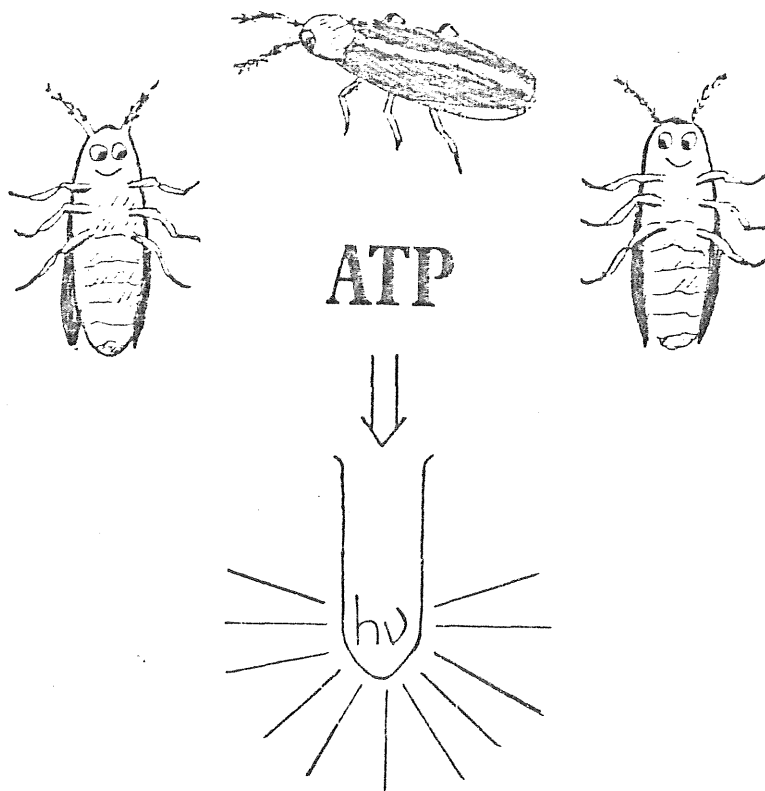


# UTPROVNING AV METODER FÖR BESTÄMNING AV ADENOSINTRI- FOSFAT (ATP) I AKTIVT SLAM

Gittan Horkeby

Nyckelord: Adenosintrifosfat (ATP), aktivt slam, bioluminescens, eldflugeluciferas, analysmetod



## UTPROVNING AV METODER FÖR BESTÄMNING AV ADENOSINTRI- FOSFAT (ATP) I AKTIVT SLAM

Gittan Horkeby

## FÖRORD

Föreliggande rapport omfattar utveckling av en analysmetod för bestämning av adenositriphosfat (ATP) i aktivt slam. Avsikten med arbetet är att redovisa en metod som är användbar i VA-tekniska sammanhang.

Projektarbetet har utförts på institutionen för VA-teknik, Chalmers Tekniska Högskola.

Forskningsmedel för projektet har beviljats av VAV:s programstyrelse.

Göteborg i november 1983

Gittan Horkeby

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

	<u>Sid</u>
1. SAMMANFATTNING	
2. INLEDNING	1
3. BIOLUMINESCENSREAKTION MED ATP	2
3.1 Teoretisk bakgrund	2
3.2 Analysbetingelser	4
4. UNDERSÖKNINGAR	7
4.1 Undersökningens uppläggning	7
4.2 Extraktion med TRIS-buffert	7
4.2.1 Metodbeskrivning	7
4.2.2 Inverkan av koncentration av komplex- bildare i extraktionslösning	7
4.2.3 Inverkan av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam	8
4.2.4 Extraktens hållbarhet	9
4.2.5 Reproducerbarhet	10
4.3 Extraktion med TCA	10
4.3.1 Metodbeskrivning	10
4.3.2 Inverkan av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam	11
4.3.3 Inverkan av extraktionslösningens koncentration	12
4.3.4 Inverkan av extraktionstid	12
4.3.5 Extraktens hållbarhet	12
4.3.6 Reproducerbarhet	13
4.4 Jämförelse mellan TRIS- och TCA-extraktion	14
4.5 Reagens- och standardlösningar	14
4.5.1 Inverkan av Luciferas-reagentets kvalitet	15
4.5.2 Luciferin-luciferasreagentets hållbarhet	16
4.5.3 ATP-standardens hållbarhet	17
4.6 Provtagningsbetingelser	17

5.	PRAKTISKA SYNPUNKTER	21
6.	SLUTSATSER	22
7.	REFERENSER	23
8.	BILAGA	24
	Bestämning av ATP-koncentration i aktivt slam	

## 1. SAMMANFATTNING

Denna undersökning har syftat till att utveckla en metod för bestämning av halten ATP i aktivt slam från avloppsreningsverk.

Utgångspunkten har varit en metod som numera används rutinmässigt inom medicin. Metoden innebär att ATP extraheras från cellerna i provet varefter eldflugeextrakt, luciferas, och luciferin tillsätts varvid ljusemission uppstår. Ljuset mäts med en fotomultiplikator.

Vid extraktionsförsök med triklorättiksyra (TCA) resp tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS) visade det sig att TCA var ca 50% effektivare som extraktionsmedel än TRIS-buffert samtidigt som det var enklare att arbeta med.

Den lägsta koncentration av ATP som kan analyseras med denna metod är ca 3  $\mu\text{g}$  ATP/l.

Efter provtagning, extraktion och utspädning kan extrakten frysas och förvaras flera månader. Nedfrysning av proven är inte nödvändig om analysen sker inom tre dygn. Reagens- och standardlösning för analysen kan göras färdiga och förvaras infrysade flera månader. Intensiteten på luciferin-luciferas-lösningen sjunker till ca 50% efter 3 månaders frysförvaring. Vid analysen används små reagens- och provvolymmer (300 resp 25  $\mu\text{l}$ ) varför reagenskostnaden per analys blir låg (0.7 kr).

## 2. INLEDNING

Vid såväl forskningsarbete som vid praktiskt inriktade undersökningar i biologiska behandlingsanläggningar är det av stort värde att kunna bestämma mängden aktiva mikroorganismer i systemet. Traditionellt används, i brist på bättre, torrsubstans- eller glödningsförlustbestämningar. Begränsningarna härmed är dock uppenbara.

Alltsedan mitten av sextiotalet har försök gjorts för att hitta lämpliga parametrar för innehållet av aktiva mikroorganismer. Exempel på sådana parametrar är DNA-halt, dehydrogenasaktivitet och adenosintrifosfathalt (ATP).

Den parameter som torde vara mest intressant är ATP-halten. Denna anses nämligen stå i ett någorlunda konstant förhållande till mängden aktiva mikroorganismer och när cellerna dör sjunker ATP-halten snabbt.

ATP-analyser började användas för olika ändamål redan i slutet av 1960-talet. I princip innebär analysmetoden att ATP extraheras från cellerna varefter eldflugeextraktet luciferas och luciferin tillsätts. Härvid emitteras ljus som mäts med en fotomultiplikator.

ATP-analys var i flera år en utpräglad forskningsmetod. Sedan man lyckats framställa renare reagens, har det blivit möjligt att med relativt enkel instrumentell utrustning bestämma ATP. Analysen används numera rutinmässigt inom medicin.

Syftet med föreliggande undersökning har varit att arbeta fram en lämplig metod för bestämning av ATP i VA-tekniska sammanhang.

Forskningsmedel för projektet har beviljats av VAV:s programstyrelse.

### 3. BIOLUMINESCENSREAKTION MED ATP

#### 3.1 Teoretisk bakgrund

Bioluminescens är en enzymkatalyserad reaktion som resulterar i ljusemission.

ATP är ett energiöverförande ämne som finns i varje levande cell. Strukturformeln för ATP visas nedan i figur 1.

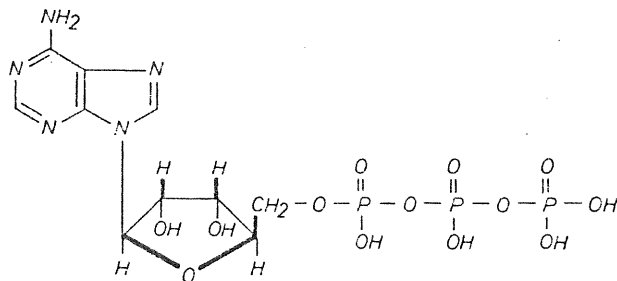


Fig 1. Strukturformel för ATP.

Vid bioluminescens-reaktionen för bestämning av ATP används enzymet luciferas från eldfluga som katalysator samt substratet luciferin som reagerar med ATP under ljusemission. Reaktionsförloppet åskådliggörs i figur 2 (Myhrman et al 1978).



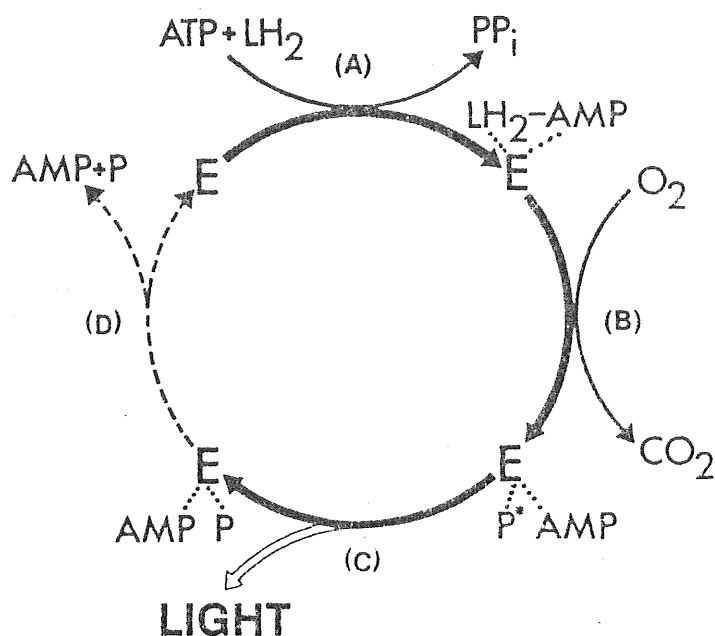


Fig 2. Schematisk beskrivning av reaktionsförloppet för eldflugeluciferas-reaktionen (Myhrman et al 1978).  
( $P^*$  och P betecknar produkt = oxyluciferin)

I den första reaktionen (A) sker en adenylylgruppöverföring från ATP till carboxylgruppen på luciferin ( $LH_2$ ) och eliminering av oorganisk pyrofosfat ( $PP_i$ ). Reaktionen är snabb och reversibel men pyrofosfat hämmar bildning av  $LH_2$ -AMP. Fosforhalten i avloppsvatten medför dock inga problem vid ATP-analysen.

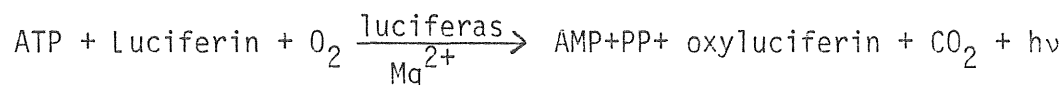
I den andra reaktionen (B) reagerar det enzymsbundna luciferyl-adenylatet ( $E \cdot LH_2$ -AMP) med molekylärt syre och bildar ett oxyluciferinkomplex ( $E \cdot AMP \cdot P^*$ ) i ett elektronexiterat tillstånd samt  $CO_2$  och AMP. I detta steg finns två hastighetsbestämmande reaktioner, dels ett protonborttagande från luciferin och dels en ombyggnad av luciferas, innan oxidationen.

I den tredje reaktionen (C) går oxyluciferinkomplexet över från exiterat tillstånd till grundtillstånd under avgivande av en foton.

I den fjärde reaktionen frigörs oxyluciferin och AMP från enzymproduktkomplexet ( $E \cdot P \cdot AMP$ ). Denna reaktion är långsam och

vid höga substratkoncentrationer leder den till förbrukning av enzymet vilket resulterar i en minskning av ljusproduktionen.

Hela reaktionsförloppet kan sammanfattas enligt reaktionen nedan (Thore 1979). (PP betecknar organisk pyrofosfat)



### 3.2 Analysbetingelser

Vid analys måste först cellernas ATP-innehåll extraheras med något lämpligt extraktionsmedel.

Nästa steg är att tillsätta luciferas och luciferin. I detta arbete har använts en reagenslösning innehållande både luciferas och luciferin så att vid analys har man endast behövt tillsätta ett reagens.

Reagenset innehåller även EDTA för komplexbildning av metaller som annars kan medföra att ATP omvandlas före reaktion med luciferin. Dessutom innehåller reagenset bovine serum albumin för stabilisering av reagenset. Reagensframställningen är i detalj beskriven i bilaga 1.

Givetvis måste man också ha en ATP-standard i det koncentrationsområde man skall arbeta. Det färdiga reagenset och ATP-standard förvaras fryst i lagom stora portioner för en dags arbete.

Då reagenset är känsligt för ljus är det viktigt att det förvaras mörkt och att det även vid tillredning och analys hanteras så mörkt som möjligt. Reagenset skall tinas upp samma dag som den skall användas och förvaras svalt (ca +5°C) under hela analysen, för att inte intensiteten skall sjunka.

Arbetsförfarande vid analysen är följande:

Med konstriktionspipett pipetteras 25  $\mu$ l prov eller standardlösning och 300  $\mu$ l reagens i ett kylt 4 ml:s polyetylenprovrör. Röret placeras så snabbt som möjligt i en polyetylenadapter i vätskescintillationsräknaren och förs ner i mätcellen, där mätningen börjar.

Mätning sker i 0.1 min, värdet registreras och mätning startar igen. Efter tre registrerade värden avbryts mätningen. Inställning av vätskescintillationsräknaren framgår av bilaga 1.

För samtliga prover och standarder tas det tredje mätvärdet för beräkning av resultat. Det är väsentligt att samma tid används för varje analys eftersom ljusintensiteten sjunker något med tiden. Vid tredje mätningen, ca 60 sek efter reagenstilläts, hinner också effekten av eventuell ljuspåverkan utifrån, på adapter och provrör elimineras.

Vid varje analystillfälle analyseras en serie standardlösningar med känd ATP-halt. Ett exempel på standardkurva visas i fig 3. Tillsammans med standardserien körs alltid ett nollprov d v s 25  $\mu$ l TRIS-EDTA-buffert och 300  $\mu$ l reagens. Vid plottning av standardkurva korrigeras erhållna värden på standarder med nollprovsvärdet.

Lämpligt koncentrationsområde på proven är  $\sim$  3-500  $\mu$ g/l. Provets ATP-halt anges ofta som  $\mu$ g ATP/mg flyktiga suspenderade ämnen.

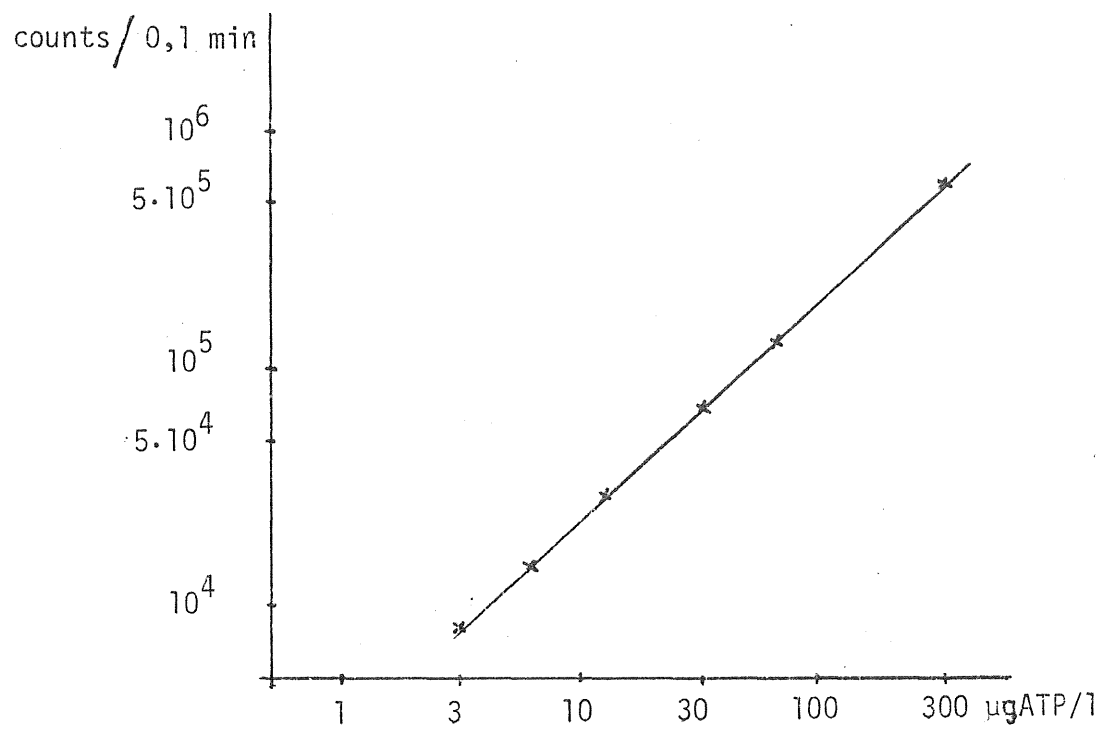


Fig 3. Standardkurva med counts/0,1 min som funktion av  $\mu\text{g ATP/l}$ .

## 4.           UNDERSÖKNINGAR

### 4.1           Undersökningens uppläggning

Utprovningen av en lämplig metod att bestämma ATP i aktivt slam har omfattat:

- lämplig extraktionsmetod och extraktens hållbarhet
- reagenskoncentrationer och hållbarhet
- provtagning

### 4.2           Extraktion med TRIS-buffert

#### 4.2.1       Metodbeskrivning

Ett ofta använt extraktionsmedel vid ATP-analys är kokande TRIS-buffert (2-Amino-2(hydroxymetyl)-1,3-propandiol).

Extraktionslösningen är 0.1M med avseende på TRIS-buffert och justerad till pH 7.75, med ättiksyra, vilket är det optimala pH-värdet för luciferasreaktionen. Dessutom innehåller TRIS-extraktionslösningen EDTA (2-8 mM) (Myhrman et al 1978).

Vid extraktion tillsätts 10 ml aktivt slam till 90 ml kokande TRIS-EDTA-buffert. Efter 10 min kokning kyls proven snabbt till rumstemperatur. ATP bestäms sedan enl avsnitt 3.2 eventuellt efter spädning med TRIS-EDTA-buffert. Vid aktivt slam måste man vanligen späda extraktet 50-100 ggr.

#### 4.2.2       Inverkan av koncentration av komplexbildare i extraktionslösning

Ett stabilt extrakt är en förutsättning för att få tillfredsställande resultat vid ATP-analys av aktivt slam. En tillsats av komplexbildaren EDTA i extraktionslösningen medför att det extraherade provet blir mer stabilt. I alla biologiska system finns nämligen ATP-omvandlingsenzym vilkas aktivitet och stabi-

titet är beroende av divalenta metalljoner. Genom att metallerna kelatbinds till EDTA minskar effekten av dessa enzym (Thore, 1981).

Eventuell inverkan av olika halt EDTA (2,4 och 8 mM) i extraktionsmedlet har därför undersökts. I tabell 1 visas resultat erhållna på ett aktivt slamprov som analyserats efter 5, 13 resp 23 dygns frysförvaring av extraktet.

Tabell 1. Inverkan av EDTA-halt i extraktionsmedlet vid ATP-analys.

mM EDTA	µg ATP/mg flyktiga suspenderade ämnen		
	5 dygn	13 dygn	23 dygn
2	0.27	0.28	0.27
4	0.23	0.26	0.23
8	0.24	0.25	0.23

Variationen i resultatet ligger inom felgränsen för analysen. Av resultatet framgår att en halt på 2 mM EDTA i extraktionslösningen är tillräcklig.

#### 4.2.3 Inverkan av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam

Extraktion med varierande provvolym respektive spädning av provet före extraktion har undersökts.

Aktivt slam extraherades dels enl 4.2.1 med 10 ml prov och 90 ml TRIS-EDTA-buffert, dels med spädning av provet, 5 resp 10 ggr före extraktion.

Dessutom extraherades en mindre volym, 5 ml, aktivt slam i 95 ml TRIS-EDTA-buffert.

Resultaten, tabell 2, visar att en spädning av provet 10 ggr före extraktion ger ca 50% högre ATP-halt vid analysen. Ett

större förhållande extraktionsmedel - aktivt slam ger alltså högre ATP-halt vilket tyder på att TRIS-EDTA ej är tillräckligt effektivt för att extrahera all ATP ur provet vid extraktionsförhållandet 90:10.

Tabell 2. Inverkan av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam vid TRIS-EDTA-extraktion.

Prov	µg ATP/mg flyktiga suspenderade ämnen			
	10 ml prov 90 ml TRIS-EDTA	5 ml prov 95 ml TRIS-EDTA	10 ml prov spätt 5 ggr 90 ml TRIS-EDTA	10 ml prov spätt 10 ggr 90 ml TRIS-EDTA
I	0.24		0.47	0.50
II	0.44	0.49		

#### 4.2.4 Extraktens hållbarhet

Extraktens hållbarhet vid förvaring undersöktes vid olika förhållanden, såsom tid, temperatur och utspädning.

De extraherade proven förvarades upp till 2 månader medan ATP-halten bestämdes vid några tidpunkter. Förvaringstemperaturen var +4°C resp -20°C. En del av de extraherade proven späddes 100 ggr i TRIS-EDTA före förvaring med en del förvarades utan spädning efter extraktionen.

Några resultat redovisas i tabell 3 nedan.

Tabell 3. TRIS-extraktens hållbarhet vid förvaring.

Förva- rings- tempera- tur	Spädn. i TRIS- EDTA	Prov I II III IV	$\mu\text{g ATP/mg}$ flyktiga suspenderade ämnen					
			antal dygn efter provtagning					
			1	5	10	20	25	40
+ 4 <sup>o</sup> C	före	I			1.13			0.90
	förva- ring	II			0.27			
		IV	0.60	0.55	0.55		0.53	0.50
-20 <sup>o</sup> C	före	I	1.01					1.04
	förva- ring	II		0.27	0.30	0.27	0.24	
		III		0.44	0.50	0.53		
		IV	0.60	0.63	0.62		0.60	0.58
-20 <sup>o</sup> C	efter förva- ring	I			1.12			1.03

Försöksresultaten visar att TRIS-extraherade prover går att kylförvara en viss tid, men frysförvaring är att föredraga vid längre tids (mer än 1 vecka) förvaring.

#### 4.2.5 Reproducerbarhet

Ett värde på metodens reproducerbarhet och precision vid extraktion med TRIS-buffert erhålls ur statistiska beräkningar på de erhållna försöksresultaten.

Medelvärdet av standardavvikelsen resp variationskoefficienten från sju extraktionsförsök blev  $4 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g ATP/mg VSS}$  resp 7.7%. ATP-halten vid dessa extraktionsförsök låg mellan 0,2 och 1,2  $\mu\text{g/mg VSS}$ .

### 4.3 Extraktion med TCA

#### 4.3.1 Metodbeskrivning

TCA (triklorättiksyra) har undersökts som extraktionsmedel. Extraktionen är mycket enkel eftersom den utförs i rumstemperatur och dessutom går snabbt, 0,5-1 min. Triklorättiksyrans anjoner inhiberar dock luciferasereaktionen varför de efter



ATP-extraktionen måste tas bort genom extraktion eller spädas till en koncentration som inte stör reaktionen.

Vid extraktion tillsätts 1 ml aktivt slam till 9 ml 5%-ig TCA-lösning. Blandningen omskakas ca 1 min vid rumstemperatur. Därefter späds provet 50-100 ggr med TRIS-EDTA-buffert och ATP-halten bestäms enligt avsnitt 3.2.

#### 4.3.2 Inverkan av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam

Aktivt slam extraherades vid några olika förhållanden extraktionsmedel - aktivt slam (se tabell 4) och dessutom extraherades aktivt slam som späts 3,5 resp 10 ggr med destillerat vatten.

Tabell 4 Inverkan av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam vid TCA-extraktion.

Förhållande extraktions- medel - aktivt slam	µg ATP/mg flyktigt suspenderat material					
	Prov I	II	III	IV	V	VI
4:1		1.39				
9:1	0.56	1.35	0.97	1.13	1.03	1.07
19:1		1.36	0.97			
27:1						1.00
19.5:0.5				1.24		
90:1						0.9
9:1* (spdn 3ggr)						1.07
9:1* (spdn 5ggr)	0.68					
9:1* (spdn 10ggr)	0.62					0.90
18:2* (spdn 5ggr)					1.30	

\* ml utspätt slam

Resultatet visar att extraktionen ej påverkas av förhållandet extraktionsmedel - aktivt slam inom det undersökta området, vilket indikerar att TCA är ett effektivt extraktionsmedel.

#### 4.3.3 Inverkan av extraktionslösningens koncentration

Extraktionsförsök har utförts med tre olika koncentrationer, 5, 10 resp 20%, på TCA-lösningen. Resultatet visar att utbytet vid extraktionen blir lika stort för 5%-ig TCA-lösning som 10 resp 20%-ig. Det är alltså en fördel att använda 5%-ig lösning eftersom 10 och 20%-ig lösning kräver större spädning av extraktet för att inte störa luciferasreaktionen.

#### 4.3.4 Inverkan av extraktionstid

Extraktionstidens inverkan på analysresultatet undersöktes. Två slamprov extraherades båda under olika tider, 0,5, 1,0 och 4 min.

Resultatet visade att extraktionen är fullständig redan efter 0,5 minuter.

#### 4.3.5 Extraktens hållbarhet

De extraherade provens hållbarhet vid några olika förvaringssätt har registrerats.

Bästa sättet att förvara extrakten, om de inte kan analyseras inom tre dygn efter provtagningen, är infrysning. Det är dock nödvändigt att späda proven med TRIS-EDTA-buffert efter extraktionen eftersom ATP annars kommer att sönderdelas av triklorättiksyran så att halten sjunker. Efter ca 3 veckors frysförvaring utan spädning efter extraktionen har halten sjunkit till 50% och efter lång tids förvaring (2-3 mån) går halten ner under detektionsgränsen. Prov som späts i TRIS-EDTA-buffert efter extraktionen har en oförändrad ATP-halt efter 3 månaders frysförvaring. Vid själva extraktionen hinner dock ingen sönderdel-

ning ske. Ett prov som späddes 2 timmar efter extraktionen gav samma resultat som ett som späddes genast efter extraktionen.

I tabell 5 nedan redovisas några resultat.

Tabell 5 TCA-extraktens hållbarhet vid förvaring.

Förva- rings- temp	Spädn i TRIS- EDTA	Prov	$\mu\text{g ATP/mg flyktiga suspenderade ämnen}$						
			antal dygn efter provtagningen						
	100ggr		1	5	10	20	30	40	90
+ 4 <sup>0</sup> C	Före	I			1.47				
	förv.	II			0.48				
	Efter								
-20 <sup>0</sup> C	förv.	I			0.30				
	Före	I	2.07	1.96					
	förv.	II		0.54	0.55			0.56	
		III		1.03	1.14	1.18			
		IV	0.95	1.04				0.95	1.09
	Efter								
	förv.	I		1.85		0.90			<0.1

#### 4.3.6 Reproducerbarhet

Ett värde på metodens reproducerbarhet och precision vid extraktion med TCA erhålls ur statistiska beräkningar på de erhållna försöksresultaten.

Medelvärdet av standardavvikelsen resp variationskoefficienten från åtta extraktionsförsök blev  $6 \cdot 10^{-2} \mu\text{g ATP/mg VSS}$  resp 7.6%. ATP-halten vid dessa extraktionsförsök låg mellan 0.5 och 1.1  $\mu\text{g/mg VSS}$ .

#### 4.4 Jämförelse mellan TRIS- och TCA-extraktion

Vid analys av några slamprov jämfördes de två olika extraktionsmetoderna. Extraktionen utfördes enligt beskrivning i 4.2.1 resp 4.3.1.

Av detta framgick att TCA är mycket effektivare som extraktionsmedel än TRIS-buffert, se tabell 6. TCA-extraktionen ger ca 50% högre ATP-halt än TRIS-extraktion för de undersökta slamproven.

Tabell 6 ATP-koncentrationer i aktivt slam vid TRIS- resp TCA-extraktion.

Prov	$\mu\text{g ATP/mg flyktiga suspenderade ämnen}$	
	Extraktion med TRIS	Extraktion med TCA
I	0.9	1.7
II	0.3	0.6
III	0.5	1.0

TCA är dessutom mycket enklare att använda eftersom extraktionen sker i rumstemperatur och relativt snabbt, ca 1 min. Vid TRIS-extraktion sker reaktionen i kokande TRIS-buffert i 10 min.

De TCA-extraherade proven måste visserligen spädas 50-100 gånger i TRIS-buffert, men pga den höga halten ATP i aktivt slam måste de TRIS-extraherade proven spädas lika mycket. Vid de fortsatta undersökningarna användes därför endast TCA-extraktion.

#### 4.5 Reagens- och standardlösningar

I nyare litteratur (Myhrman et al 1978, Idahl 1981, Marwell 1981) och vid personlig kontakt (Idahl, Lundin) varierar uppgifterna om lämpliga koncentrationer och lagringsmöjligheter gällande reagens- och standardlösningar.

I föreliggande undersökning har därför försök gjorts med varierande koncentrationer, lagringstider samt reagenskvaliteter.

#### 4.5.1 Inverkan av Luciferas-reagentets kvalitet

Ljusintensiteten vid luciferasreaktionen är beroende av luciferin-luciferas-reagensets renhetsgrad. Ett renare reagens gör att ljusintensiteten håller sig mer konstant med tiden (Lundin et al 1976).

Två typer av reagens har undersökts dels ett mycket rent reagens, ATP-Monitoring Reagent (LKB-Wallac, Turku, Finland), samt ett mindre renat reagens, FLE-50 (Sigma Chemical Company, St. Louis).

Figur 4 och 5 visar ljusintensiteten (counts/0.1 min) som funktion av tiden för respektive reagens. Inverkan av luciferas-reagensets kvalitet framgår tydligt. Ljusintensiteten vid användning av det renade reagentet sjunker obetydligt med tiden jämfört med det mindre renade reagentet.

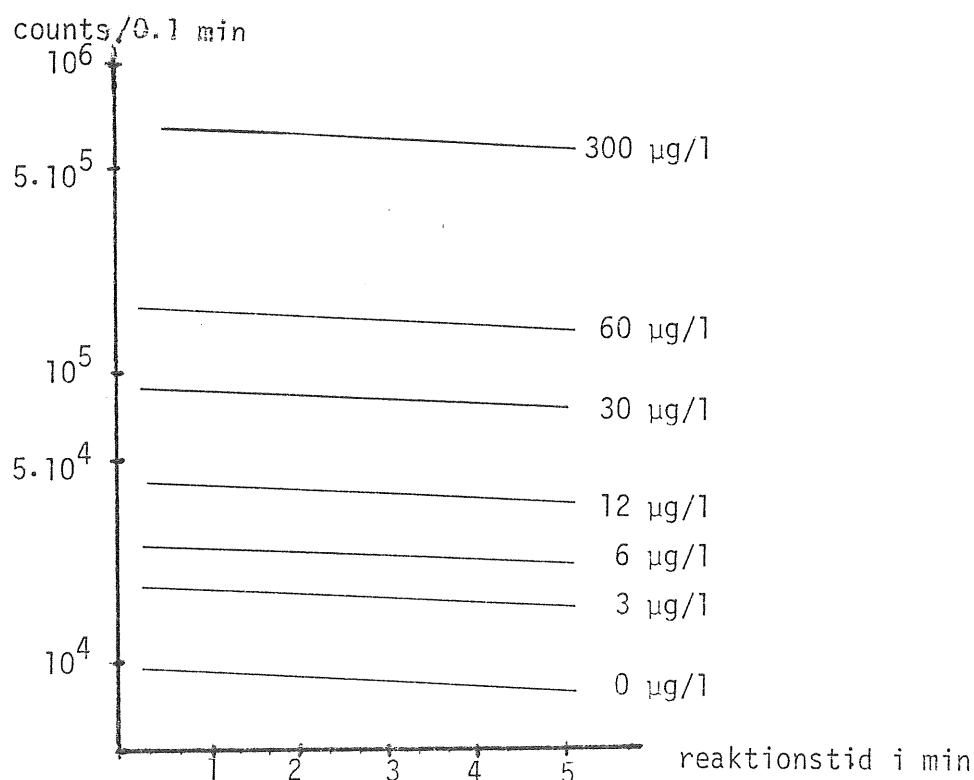


Fig 4. Luciferin-luciferasreaktionens intensitet som fkn av tiden för några standardlösningar (mycket rent reagens).

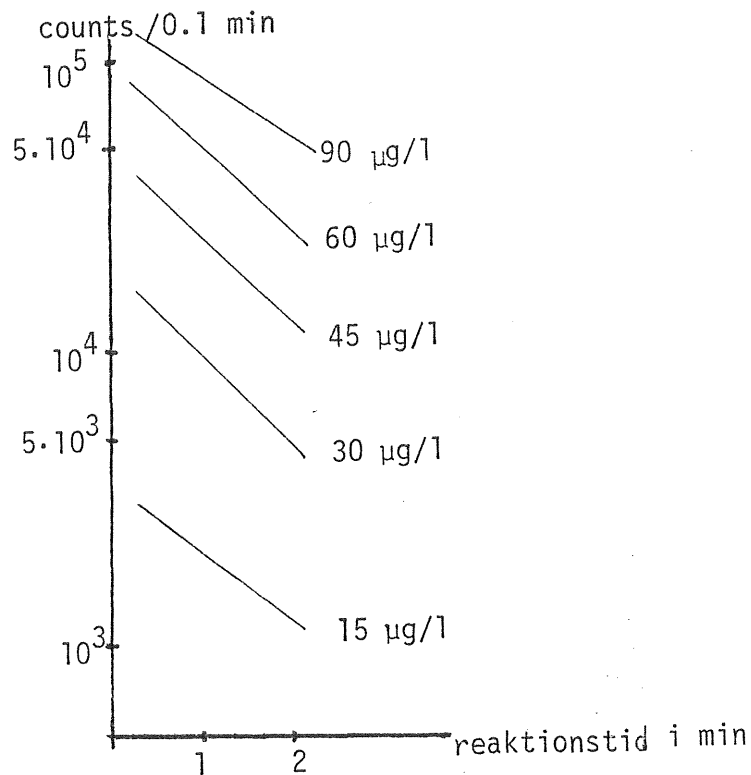


Fig 5. Luciferin-luciferasreaktionens intensitet som fkn av tiden för några standardlösningar (mindre renat reagens).

#### 4.5.2 Luciferin-luciferasreagensets hållbarhet

Undersökning av hållbarheten på det färdigblandade reagenset (AMR-HEPES, bilaga 1) har gjorts dels med frysförvaring, dels med kylförvaring av reagenset.

Aktiviteten på reagenset sjunker och är nere på ca 50% efter 2-3 månaders frysförvaring, men eftersom man vid varje analystillfälle kör upp en standardkurva är man oberoende av denna aktivitetssänkning. Försök med att kylförvara reagenset har visat sig sämre då aktiviteten sjunker mycket snabbare. I figur 6 åskådliggörs hur reagensets aktivitet sjunker vid frys- resp kylförvaring.

Relativ aktivitet.

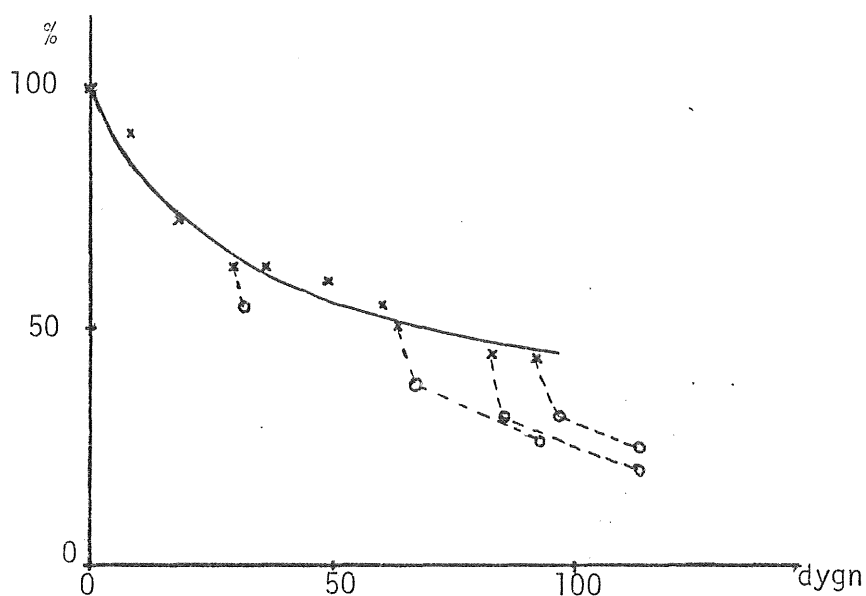


Fig 6. Reagensets hållbarhet vid förvaring.  
—— frysförvaring, ----- kylförvaring.

#### 4.5.3 ATP-standardens hållbarhet

ATP-standarder (300-3000  $\mu\text{g/l}$ ) som förvarats frysta har hållit sig stabila i minst 6 månader.

På utspädda standarder (3-30  $\mu\text{g/l}$ ) som kylförvarats har ATP-halten minskat ca 10% efter 1 månad.

#### 4.6 Provtagningsbetingelser

Då omsättningen av ATP i biologiska system är mycket stor kan provtagning och provförvaring tänkas ha betydelse för ATP-innehållet.

Försök gjordes därför med aktivt slam för att jämföra effekten av aeroba respektive anaeroba förhållanden efter provtagningen. Ett returslamprov delades upp varvid den ena delen fick stå anaerobt medan den andra delen luftades. Prov togs direkt vid

provtagningen och sedan vid bestämda tider för extraktion och bestämning av ATP-halt.

Av resultatet i figur 7 framgår att ATP-halten i det anaerobt förvarade provet sjunker hela tiden medan halten i det luftade provet initialt ökar något och därefter sjunker.

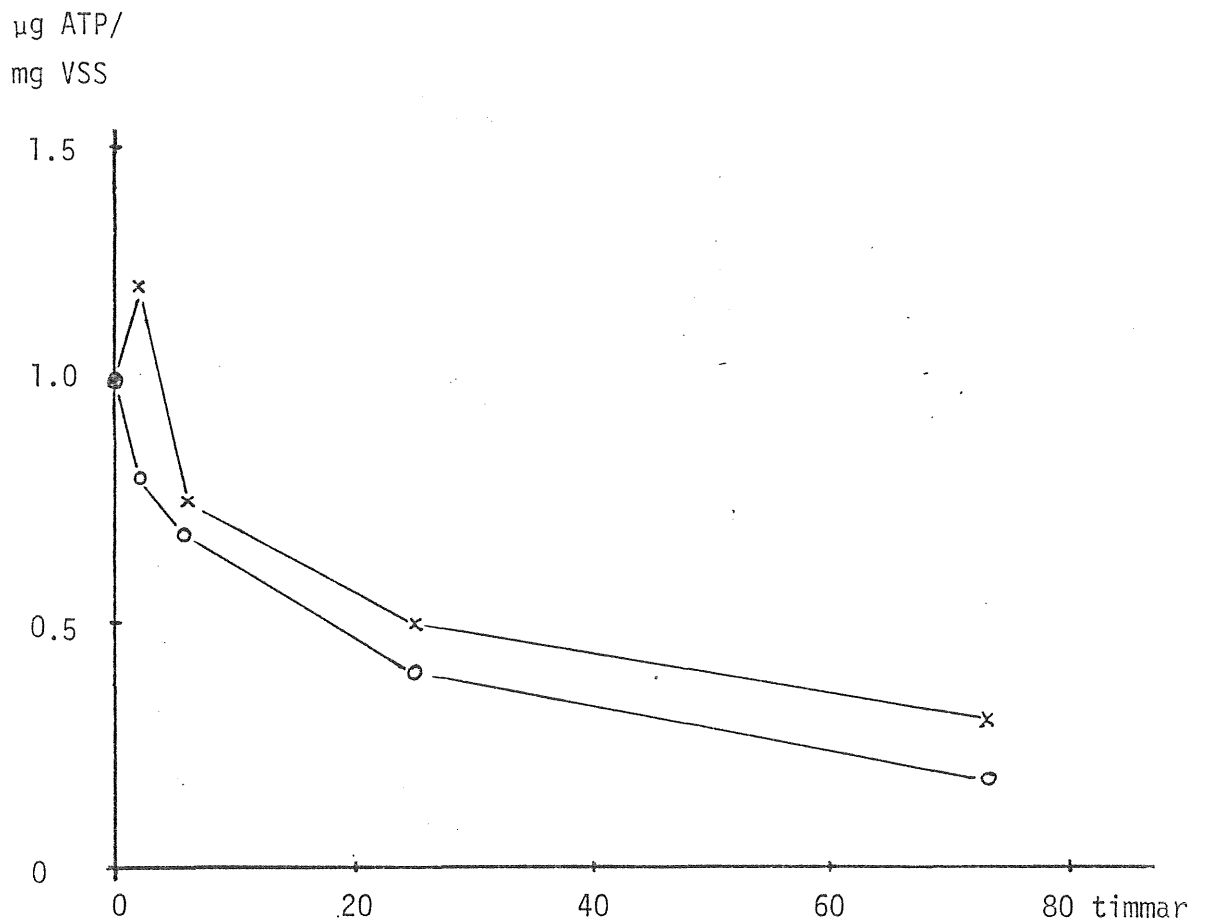


Fig 7. ATP-haltens variation vid aerob resp anaerob förvaring av ett aktivslamprov x—x aerob förvaring, o—o anaerob förvaring. ATP-analys vid 0, 2, 6, 25 och 73 timmar.

Även provtagningsplatsen i en aktivslamanläggning kan påverka ATP-halten i provet. Ett försök har därför utförts för att belysa detta.



Ett prov togs på returslammet på Göteborgs avloppsreningsverk, Ryaverket. Sedimenteringsbassängerna på Ryaverket arbetade vid provtagningstillfället långt under den maximala förtjockningskapaciteten och slammets uppehållstid i bassängen var därför kort. Prov för ATP-analys uttogs omedelbart efter provtagningen men provet fick sedan stå utan luftning i 1 h, för att simulera en "normal" uppehållstid i en sedimenteringsbassäng, varefter ett nytt prov för ATP-analys uttogs.

Provet delades sedan upp varvid den ena delen luftades efter tillsats av näringslösning (1 l aktivt slam + 3 l 300 mg glukos/l). Näringslösningen simulerar inkommande avloppsvatten. Den andra delen av det aktiva slamprovet luftades utan tillsats av näringslösning. Försöket pågick ca 1 dygn och under tiden togs några prov ut för ATP-analys.

Resultatet av försöket framgår av figur 8.

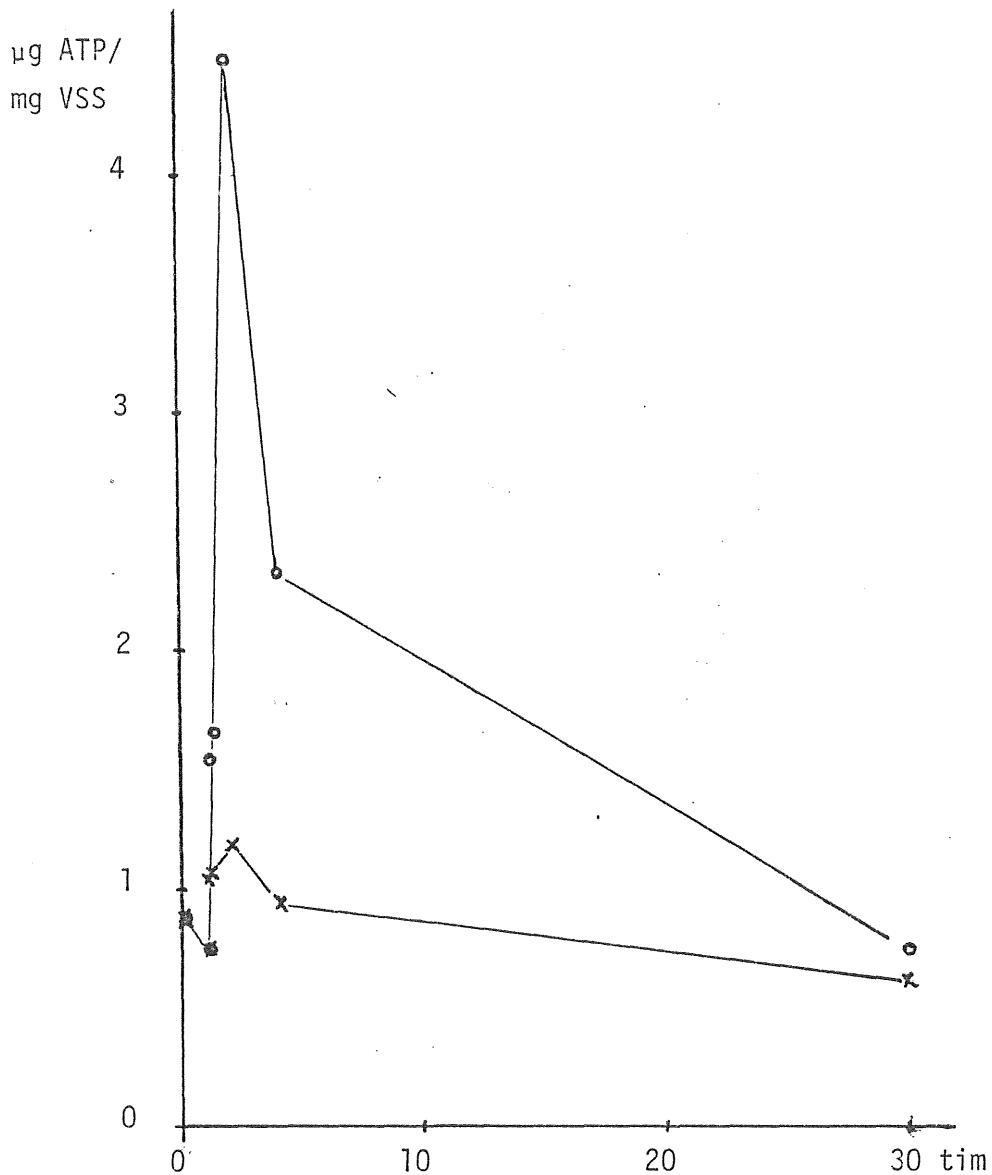


Fig 8. ATP-haltens variation vid luftningsförsök.  
 o—o med näringslösning, x—x utan näringslösning.  
 ATP-analys vid 0, 1, 1.08, 1.25, 2, 4 och 30 timmar.

ATP-halten sjunker endast obetydligt under de anaeroba förhållandena i slamfickan. Vid näringslösningstillsetsen ökar ATP-halten kraftigt för att sedan snabbt sjunka igen och efter 1 dygn ligger halten nästan lika lågt som halten i provet utan näringslösning.

De ovanstående undersökningarna är av orienterande karaktär, men de visar att provtagningsplats och provets fortsatta hantering kan väsentligt påverka de värden på ATP-nivån som erhålls. Dessa frågor bör studeras mer ingående.

## 5. PRAKTISKA SYNPUNKTER

Praktisk användning av ATP-analys vid avloppsreningsverk med aktivslamanläggningar kan tyckas problematiskt då analysen kräver specialkemikalier och även speciell utrustning (lumino- meter el vätskescintillationsspektrometer). Men eftersom de färdigspädda extrakten har visat sig hållbara några dygn vid kylförvaring och flera månader vid frysförvaring, kan man begränsa sig till att utföra extraktionen vid verket och där- efter sända frysta eller kylda prov till ett laboratorium. Extraktionen kan lätt utföras av personal med viss laboratorie- vana.

Flera av reagensen som används vid ATP-analysen är relativt dyra. Kostnaden per analys blir dock inte mer än 0.7 kr. Vid analys av ett enstaka prov måste standardkurva och dubbelprov köras varvid reagenskostnaden uppgår till ca 15 kr.

Antal analyser som kan utföras per dag är 50-100 om alla reagens- lösningar är färdigblandade i förväg.

## 6. SLUTSATSER

Denna undersökning visar att

- ATP-innehållet i aktivt slam kan bestämmas med god reproducerbarhet
- triklorättiksyra är att föredraga framför TRIS-buffert som extraktionsmedel
- att provtagningsbetingelserna och provförvaringens inverkan på ATP-halten bör studeras mer ingående.

7. REFERENSER

Idahl, L-Å (1981)

An Ultrasensitive Assay of Nicotinamide Adenine Dinucleotide.  
Uppsala J, Med. Sci. 86;131-135.

Idahl, L-Å. Personlig kommunikation.

Inst för histologi med cellbiologi, Umeå universitet.

Lundin, A., Rickardsson, A. och Thore, A. (1976)

Continuous Monitoring of ATP Converting Reactions by Purified  
Firefly Luciferase. Anal. Biochem. 75, 611.

Lundin, A. Personlig kommunikation.

LKB-Produkter AB, S-161 25 Bromma.

Marwell, AB. (1981)

Applikationsbeskrivning och arbetsmall för bestämning av ATP-  
mängder ned till 0.1 pmol med Analytical Luminescence Laboratory's  
eldfluge-luciferassystemet Firelight.

Myhrman, A., Lundin, A. och Thore, A. (1978)

The Analytical Application of ATP Monitoring Using Firefly  
Bioluminescence. LKB Wallac. Application Note 504.

Thore, A. (1979)

Technical Aspects of the Bioluminescent Firefly Luciferase Assay  
of ATP. Science Tools, 26 30-34.

Thore, A. (1981)

Chemiluminescent Analysis in Microbiology. LKB Wallac. ISBN  
951-9489-01-0.

## 8. BILAGA

### Bestämning av ATP-koncentration i aktivt slam.

- Kemikalier: TRIS-buffert (2-Amino-2(hydroxymetyl)-1,3-propandiol)
- TCA (Triklorättiksyra)
- HEPES-buffert (4-(2-Hydroxyletyl)-1-piperazinetsulfonsyra)
- Ättiksyra koncentrerad
- Magnesiumsulfat, pa
- EDTA
- D-Luciferin
- Albumin
- ATP-Monotoringreagent (AMR) (LKB, Wallac)
- ATP-standard
- Lösningar: TRIS-EDTA-buffert, 0.1 M: Lös 12.12 g TRIS-buffert och 0.744 g EDTA i ca 950 ml re-destillerat vatten, pH-justera till 7.75 med konc ättiksyra och späd till 1000 ml. Kylförvaras i plastflaska.
- TCA-lösning, 5%-ig: 5.0 g triklorättiksyra löses och spädes till 100 ml med redestiljerat vatten.

Reagenslösning: Lös 8.937 g HEPES-buffert i 140 ml redestillerat vatten, pH-justera till pH 7.5 och späd därefter till 1500 ml.

Till 1372 ml av buffertlösningen sättes 1.690 g  $\text{MgSO}_4$ , 1.021g EDTA, 0.686 g albumin och 10 mg D-Luciferin.

Lösningen innehåller:

25 mM HEPES-buffert (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsyra),  
pH 7.5

5 mM  $\text{MgSO}_4$

2 mM EDTA

26  $\mu\text{M}$  D-Luciferin

0.5 mg/ml albumin

AMR-HEPES-reagens: I 2 ml HEPES-albumin (0.5 mg albumin/ml HEPES) löses innehållet i en flaska med ATP-Monitoring Reagent. Skaka ej eftersom luftinblandning minskar effekten av Luciferin-Luciferase. Denna lösning blandas därefter med 400 ml reagenslösning. Det färdigblandade AMR-HEPES-reagenset fryses in i lagom stora portioner.

Då reagenset är känsligt för ljus är det viktigt att det förvaras mörkt och att det även vid tillredning och analys hanteras så mörkt som möjligt. Reagenset skall tinas upp samma dag som den skall användas och förvaras svårt (ca  $+6^{\circ}\text{C}$ ) under hela analysen, för att inte intensiteten skall sjunka.

ATP-standardlösning: ATP-standarden spädes med TRIS-EDTA-buffert till en koncentration av 300-3000 $\mu$ g/l som fryses in i små plaströr. Vid analystillfället spädes dessa 100 gånger med TRIS-EDTA-buffert.

Utförande: Extraktion: Genast vid provtagningen tillsätts 1 ml aktivt slam till en kolv innehållande 9 ml 5%-ig TCA-lösning. Blandningen omskakas ca 1 min vid rumstemperatur. Därefter späds 50-100 ggr med TRIS-EDTA-buffert. Det extraherade provet kylförvaras om analys sker inom 3 dygn, i annat fall bör provet förvaras fryst fram till analystillfället.

Analys: (vid användning av vätskescintillations-spektrometer)

Med konstriktionspipett pipetteras 25  $\mu$ l prov eller standardlösning och 300  $\mu$ l reagens i ett kylt 4 ml:s polyetylenprovrör. Röret placeras så snabbt som möjligt i en polyetylenadapter i apparaten och förs ner i mätcellen, där mätningen börjar. Mätning sker i 0,1 min, värdet registreras och mätning startar igen. Efter tre registrerade värden avbryts mätningen. Tiden mellan två mätningar är 20 sek.

För samtliga prover och standarder tas det tredje mätvärdet för beräkning av resultat. Det är väsentligt att samma tid används för varje analys eftersom ljusintensiteten sjunker något med tiden. Vid den tredje mätningen, dvs efter ca 60 sek, hinner också effekten av eventuell ljuspåverkan utifrån på adapter och provrör elimineras.



Vid varje analystillfälle analyseras en serie standardlösningar med känd ATP-halt. Tillsammans med standardserien körs alltid ett nollprov d v s 25  $\mu$ l TRIS-EDTA-buffert och 300  $\mu$ l reagens. Vid plottning av standardkurva korrigeras erhållna värden på standarder med nollprovsvärdet.

Lämpligt koncentrationsområde på proven är  $\sim$  3-500  $\mu$ g/l. Provets ATP-halt anges ofta som  $\mu$ g ATP/mg flyktiga suspenderade ämnen.

INSTITUTIONENS NYA PUBLIKATIONS- OCH INTERNSKRIFTSSERIE

Publikationsserien

- 1:82        Årsrapport 1981.
- 2:82        Hedberg, T., Liljenzin, J.O., Fridemo, L.,  
Sjölander, B.  
Sätt att minska radonhalten i dricksvatten.  
Forskningsrapport
- 3:82        Andersson, Ö., Hanaeus, J., Hedberg, T.  
Kartläggning av vattenkvalitetsförändringar i distribu-  
tionsnät, Stockholm 1981. Forskningsrapport
- 4:82        Sjölander, B., Hanaeus, J., Hedberg, T.  
Kartläggning av vattenkvalitetsförändringar i distribu-  
tionsnät, Malmö 1980. Forskningsrapport
- 1:83        Årsrapport 1982
- 2:83        Hedberg, T. Referat.  
Hårdhetshöjning av mjuka vatten.
- 3:83        Lumley, D och Balmér, P  
Analysis of Operational Data Collected at the  
Eskilstuna Wastewater Treatment Plant
- 4:83        Kaffehr, B.  
Naturliga organiska ämnen i integrerade vattensystem.  
En litteraturstudie.
- 5:83        Svensson, G. Ej publicerad
- 6:83        Hedberg, T  
Undersökning av alkaliska filtermassor

- 7:83 Hedberg, T., Nilsson, U.  
Rörsnätundersökning i samband med hårdhetshöjning vid  
Arvika vattenverk.
- 8:83 Horkeby, G.  
Utprovning av metoder för bestämning av adenosintri-  
fosfat (ATP) i aktivt slam.

## Internskriftserien

- 1/82 Lund, A. och Ström, R. Examensarbete.  
Urtvättning och transport av partikulära föroreningar från hårdgjorda ytor i samband med regn. "Modellförsök".
- 2/82 Nygren, Sven-Olof B. Examensarbete.  
Betydelse av löst och partikulärt substrat för slamproduktionen vid aktivslamprocessen.
- 3/82 Nilsson, L. och Nord, L. Examensarbete.  
Reduktion av organisk substans med makroporös jonbytare vid renvattenframställning.
- 4/82 Hedberg, Torsten. Förstudie  
Dricksvatten från försurade sjöar. Ett försök i pilotskala att reducera aluminiumhalten.
- 5/82 Hedberg, Torsten. Föredrag  
Förändring av vattenkvalitet i distributionsnät.
- 6/82 Hedberg, Torsten. IWSA 82  
Water Quality in the Distribution Network.
- 7/82 Hedberg, T. och Andersson, Ö. Redovising  
Funktionsbesiktning av Marstrands vattenverk.
- 8/82 Bäckström, L., Zetterberg, M. Examensarbete.  
Privata avloppsserviser - en intervjuundersökning i 16 kommuner.
- 9/82 Bolinder, Lena och Ernbrink, Gudrun. Examensarbete.  
Renvattenförbrukningens variationer.

- 10/82 Johansson, B., Jonsson, S., Rahm, I., Stening, B., Teiland, T. Examensarbete.  
Föroreningsbelastning av dagvatten. Metodstudie tillämpad på Gullmarsfjorden.
- 11/82 Johansson, Thomas. Examensarbete.  
Teknisk-ekonomisk uppföljning av vatten- och avloppsinfodringar.
- 12/82 Andersson, Göran och Einarsson Fredrik. Examensarbete.  
Undersökning av vattenkvalitetsproblem i ett bostadsområde, Våglängdsgatorna, Västra Frölunda.
- 1/83 Johnson, Bo. Examensarbete.  
Rännstensbrunnars betydelse för dagvattnets föroreningsbelastning.
- 2/83 Bäckman, H och Svensson, G.  
Utvärdering av kaliberingspunkter vid flödesmätning i öppen ledning. - Presentation av en metod och ett datorprogram för ABC80
- 3/83 Hallquist, C., Riemsdijk, A., Söderstam, G och Wikström, I. Examensarbete  
Driftstudier av reningsverk med Järn(II)sulfat fällning.
- 4/83 Arvidsson, M., Blomquist, U. Examensarbete.  
Miljöfarligt gods över Gullmarn. (Utgivet av Länsstyrelsen i Göteborgs och Bohus län, Naturvårdsenheten).
- 5/83 Söderstam, Gunilla. Examensarbete.  
Kemisk fällning med järn(II)salter - Litteraturstudie.
- 6/83 Hedberg, Torsten. Föredrag.  
Rening med hänsyn till distributionsnätet.

- 7/83 Johansson, E., Andersson, Ö., Hedberg, T. Utredning  
Vattenkvalitetsförändringar i Distributionsnät, Stenungsund 1983.
- 8/83 Grane, Ingvar. Examensarbete  
Teknisk-ekonomisk uppföljning av avloppsinfiltration.

