

O - 40/71

INNLEDENDE STUDIER OVER ADENOSINTRIFOSFAT (ATP) SOM
MÅL PÅ BIOMASSE I FORSØKSRESIPIENTER OG AKTIVSLAM-
ANLEGG.

FORSØKSANLEGGET

KJELLER

INTERN RAPPORT

Arbeidet ble vesentlig utført i tiden juni - august 1971.
Rapporten ble avsluttet oktober 1972.

Siviling. Morten Laake

INNHALDSFORTEGNELSE

1.	INNLEDNING	side 2
2.	LITTERATURSTUDIER	3
	2.1 ATP-nivå i forskjellige organismer	3
	2.2 Ekstraksjon av ATP	8
	2.3 Analyse av ATP	9
	2.4 Anvendelsesområder	10
3.	UTPRØVNING AV ANALYSEMETODEN	12
	3.1 Innledning	12
	3.2 Forsøk, resultater og diskusjon	12
	3.3 Anbefalt prosedyre	14
4.	ATP I FORSØKSRENNESEDIMETER	16
	4.1 Innledning	16
	4.2 Prøvetaking og ekstraksjon	16
	4.3 Resultater og beregninger	20
	4.4 Diskusjon	27
	4.5 Anbefalt prosedyre	28
5.	HEMNINGSFORSØK MED ALUMINIUMSULFAT	30
	5.1 Innledning	30
	5.2 Forsøk	30
	5.3 Resultat	30
	5.4 Diskusjon	30
6.	ATP I AKTIVSLAM MODELLANLEGG	33
	6.1 Innledning	33
	6.2 Prøvetaking og ekstraksjon	33
	6.3 Resultater	34
	6.4 Diskusjon	35
7.	ATP-NIVÅ VED DYRKING AV <u>Fusarium</u> sp. NIVA E 70 I KJEMOSTAT	38
	7.1 Innledning	38
	7.2 Forsøk og resultater	38
	7.3 Diskusjon	39
8.	SAMMENDRAG OG KONKLUSJON	41
9.	LITTERATURHENVISNINGER	44

1. INNLEDNING

I de senere år har det oppstått en betydelig interesse for analyse av ATP-nivåer i havet, bunnsedimenter i sjøområder, jord, biologiske renseanlegg og ved kulturforsk som et mål på den samlede biomasse eller antall levende celler, og som aktivitetsparameter. Som kjent er adenosin trifosfat (ATP) en nøkkelforbindelse i all cellulær aktivitet; den er "høy-energiforbindelsen" i enhver levende celle. All evidens hittil tyder dessuten på at forbindelsen brytes raskt ned etter at livsaktivitetene har stoppet, slik at ATP kun er assosiert med levende celler, noe som er en forutsetning for metodens anvendbarhet.

Videre foreligger det idag en meget sensitiv og spesifikk analysemetode for ATP basert på omsetning med enzymsystemet luciferin/luciferase under lysproduksjon. Lysintensiteten er ved overskudd av enzym direkte proporsjonal med konsentrasjonen av ATP og kan måles med en foto-multiplikator. Andre analysemetoder som anvendes for biomassebestemmelse; som tørrvekt, cellekarbon, viable counts, telling i mikroskop, DNA-analyse og klorofyllanalyse, er alle beheftet med alvorlige svakheter, som gjør at reelle tall for antall levende mikroorganismer er vanskelige å oppnå (Brock 1971).

På denne bakgrunn ble det på initiativ av forsker Tor Traaen, NIVA, sommeren 1971 satt igang arbeid for å tilpasse analysemetoden til NIVAs formål. Rapporten behandler de innledende litteraturstudier over metoden og dens anvendelsesområder, samt resultater fra analyser og eksperimenter ved Forsøksanlegget på Kjeller juli - august 1971 og fra vekstfysiologiske forsøk med soppen Fusarium i kjemostat utført som hovedoppgave på NTH høsten 1971. De utførte forsøk er av rent veiledende natur.

2. LITTERATURSTUDIER

2.1. ATP-nivå i forskjellige organismer

Bestemmelse av biomasse ved måling av ATP bygger på det forhold at alle celler uansett art, inneholder ATP, og på antagelsen om at ATP ikke er assosiert med dødt, partikulært materiale. Holm-Hansen og Booth (1966) har vist at dette er holdbart; vanskeligheten synes imidlertid å bestå i fastleggelse av det riktige mulige gjennomsnittsnivå for ekstrapolering av ATP-verdier til celletall, tørrvekt og lignende for heterogene kulturer eller naturlige økosystemer. I det følgende er det gitt en oversikt over tilgjengelige data om ATP-nivået i forskjellige organismer under ulike betingelser.

Strange, Wade og Dark (1963) har undersøkt effekten av mangel på eksogen næring på ATP-nivået i Aerobacter aerogenes ved å suspendere celler i fosfatbuffer-salt-løsning pH 7.4, og de fant konstante nivåer over tid under optimale temperatur og konsentrasjonsforhold. Nivået under aeroboe forhold lå imidlertid langt høyere enn under anaerobe forhold, henholdsvis 1.6 - 2.2 og 0.2 - 0.5 µg ATP/mg celletørrvekt. Selvom de ikke fant noen direkte relasjon mellom ATP-nivået og viabilitet, syntes evnen til å syntetisere ATP i fravær av eksogen næring å ha sammenheng med overlevelsessevnen.

Holm-Hansen og Booth (1966) har utført et grunnleggende arbeid på anvendelsen av ATP-analyser for estimering av levende biomasse i havprofiler ved å bruke ATP-nivået i dyrkede mikro-organismer som standard. Ved overføring av tallene til antall bakterier fant man mellom 50 og 2000 ganger tettere populasjoner enn ved utplatingsteknikker, og man unngikk interferens med suspendert og oppløst organisk stoff, som er problemet ved DNA- og C-analyser.

I kulturer av marine bakterier varierte nivået med en faktor på 3 (0.07 - 0.22 % pr. tørrvekt) og i enda større grad i algekulturer (tabell 2.1.1). Store variasjoner for hver art skyldes her trolig variasjoner i fysiologisk tilstand, da

cellene ble høstet i forskjellige vekststadier i batchkultur.

Hamilton og Holm-Hansen (1967) har videreført arbeidet ved å bestemme ATP-nivået i syv utvalgte kulturer av marine bakterier både i kjemostat og i forskjellige vekstfaser i batchkulturer. Variasjonsområdet i kjemostat var 0.3 - 1.1 % pr. cellekarbon, mens nivået i aldrende celler i batchkulturer og i sultede celler (salt-buffer-suspensjon) generelt var en femtedel av nivået under logaritmisk vekst, alle data referert til viable counts (tabell 2.1.1). Totalt gjennomsnitt lå på 0.4 % ATP pr. cellekarbon, og størst variasjon fant en hos Vibrio sp. med $0.5 - 4.0 \cdot 10^{-9}$ µg ATP/celle.

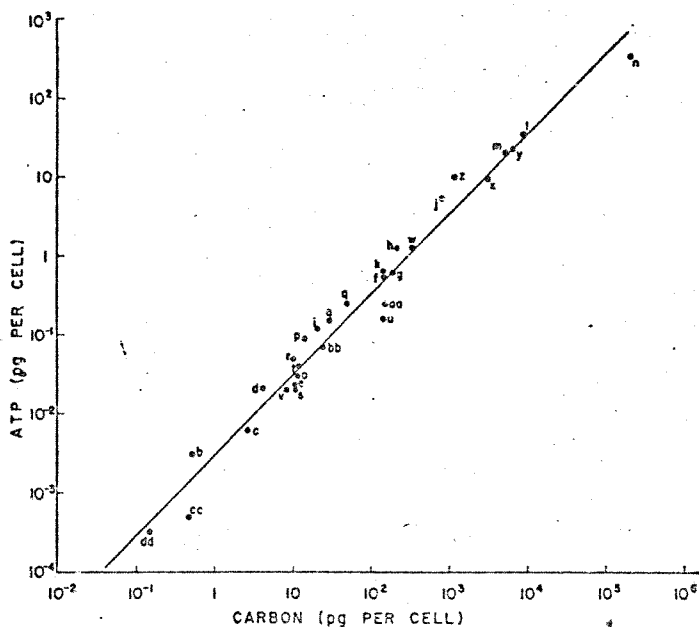
D'Eustachio og Johnson (1968) undersøkte endogent ATP-nivå i 13 arter Gram+ og -, aerobe bakterier og fant en middelvei på 2.1 µg ATP/mg tørrvekt celler. Standardavvik over alle species var ± 1.1 µg/mg, og en fant en lineær korrelasjon mellom kimtall ved utplating og ATP-nivå.

Chappelle og Levin (1968) har bestemt ATP-nivået i 18 bakteriespecies i stasjonær vekstfase. De fant variasjoner over en størrelsesorden med et totalt gjennomsnitt på 2.09 µg/mg celledørrvekt, men deres ekstraksjonsprosedyre er muligens noe mangelfull.

Petterson, Brezonik og Putnam (1970) har nedlagt et grunnleggende arbeid for den praktiske anvendelse av ATP-analyser for prosesskontroll og aktivitetsanalyser i biologisk renseanlegg (aktiv-slam). For studier av toksiske effekter synes metoden å være svært velegnet ved siden av måling av dehydrogenaseaktivitet og respirasjonsaktivitet. Anlegg i laboratorieskala viste nivåer på 1.8 - 2.0 µg ATP/mg VSS (volatile suspended solids) i batchvis og 1.4 - 1.8 µg ATP/mg VSS i kontinuerlig drift, og endogene nivåer (etter 2 døgn substratmangel) lå på 0.8 µg/mg. Ved å anta verdien 2 µg ATP/mg VSS som det endogene nivå i levende celler, har en anslått at 40 % av tørrvekten i anleggene utgjøres av levende celler.

Holm-Hansen (1970) har videre undersøkt ATP-innholdet relativt til cellestørrelse og cellulært organisk karbon i 30 for-

skjellige alger i batchkultur. Under eksponensiell vekst var nivået temmelig konstant og utgjorde 0.35 % pr. cellekarbon, varierende fra 0.30 til 0.39 % for henholdsvis små og store celler. I fig. 2.1.1 gjengis alle data for ATP/celle plottet mot org. C/celle, og en får en lineær regresjonslinje med korrelasjonskoeffisient 0.987. Under ekstrem N- og P-mangel synker det cellulære ATP-nivå til 20 - 50 % av nivået under eksponensiell vekst, men nivået reetableres meget raskt ved tilsetning. Skifte mellom lys og mørke gir kortvarige fluktuasjoner, men innvirker ikke på steady-state-nivået av ATP i cellene.



FIGUR 2.1.1

Cellulært innhold av ATP i 30 algekulturer som funksjon av organisk karbon pr. celle. Alle bestemmelser ble gjort under eksponensiell vekstfase i batchkulturer. (Fra Holm-Hansen 1970).

Lee, Harris, Syers og Armstrong (1971) har funnet nivået 3.4 μg ATP/mg celletørrvekt hos Selenastrum capricornutum ved overskudd av fosfat, 3.1 μg /mg ved fosfatbalanse og 1.4 μg /mg ved underskudd av fosfat i mediet. Det angis videre at reduksjonen i ATP-nivå ved fosfatmangel hos bakterier er langt større; ned til en tiendedel av normalt.

Bestemmelse av ATP-nivåer for estimering av levende biomasse er videre anvendt på marine sedimenter (Ernst 1970), i jord (MacLeod, Chappelle og Crawford 1969), i dype havområder (Hamilton, Holm-Hansen og Strickland 1968, Holm-Hansen 1969) og i ferskvannsedimenter (Lee, Harris, Williams, Syers og Armstrong 1971).

Ut fra de forskjellige data som er gitt i den refererte litteratur, har en satt opp en kronologisk oversikt over ATP-nivået i forskjellige organismer (tabell 2.1.1). En vil se at det er en tendens til økning i tallene med årene, noe som vel skyldes forbedret eksperimentell metodikk. Det er videre påfallende at en ikke har funnet publiserte data for sopp annet enn et gammelt tall for Saccharomyces cerevisiae.

På tross av et etter hvert ganske omfattende analysemateriale er det enda langt igjen før man har noen klar overståelse for hva ATP-nivået i en celle egentlig betyr sett i relasjon til andre aktivitetsparametre som respirasjonsaktivitet og vitalitet, og man har bare såvidt tatt skritt i retning av å klarlegge ATPs rolle i metabolsk kontroll og enzymregulering og i samspillet mellom de forskjellige organeller i cellene (Atkinson 1969).

Organisme:	% A T P			Litteratur:	
	pr.	variasjon	snitt		
Chlorella vulgaris	tørrv.	-	0.2	Syrett (1958)	
Saccharomyces cerevisiae	"	-	0.04	Grylls (1961)	
Aerobacter aerogenes (+O ₂)	"	0.16-0.22	-	} Strange et al. (1963)	
Aerobacter aerogenes (-O ₂)	"	0.02-0.05	-		
Escherichia coli	"	-	0.3	Lehninger (1965)	
Streptococcus faecalis	"	0.2 -1.2	-	Forrest (1965)	
Marin bakterie C-6	"	0.072-0.14	0.098	} Holm-Hansen og Booth (1966)	
Marin bakterie GL-7	"	0.18-0.22	0.20		
Marin bakterie GU-1	"	-	0.14		
Skeletonema costatum	"	0.028-0.036	0.31		
Amphidinium carteri	"	0.005-0.027	0.015		
Dunaliella tertiolecta	"	0.020-0.49	0.15		
Syracosphaera elongata	"	0.002-0.004	0.003		
Monochrysis lutheri	"	0.010-0.049	0.028		
Cyclotella nana	"	-	0.084		
Ditylum brightwellii	"	0.10-0.13	0.12		
Rhizosolenia sp.	"	0.15-0.17	0.16		
Escherichia coli	"	0.3 -0.9	-		} Cole et al. (1967)
Chromobacter marinum	karbon	0.70-0.99	0.8		
Vibrio sp.	"	0.50-0.67	0.6		} Hamilton og Holm-Hansen (1967)
Pseudomonas sp. GL-7	"	0.99-1.21	1.1		
Pseudomonas sp. C-6	"	0.42-0.78	0.6		
Pseudomonas sp. GU-1	"	-	0.7		
Serratia sp.	"	0.43-0.61	0.5		
Micrococcus sp.	"	0.12-0.48	0.3	} D'Eustachio Johnson (1968)	
13 bakterie-species	tørrv	+0.11	0.21		
19 bakterie-species	"	en størrelsesorden	0.209	Chappelle og Levin (1968)	
30 encellede alge-sp.	karbon	0.30-0.39	0.35	} Holm-Hansen (1970)	
Calanus helgolandicus	"	-	0.50		
Selenastrum { (-P)	tørrv.	-	0.14	} Lee, Harris, Syers og Arm- strong (1971)	
capricornutum { (=P)	"	-	0.31		
{ (+P)	"	-	0.34		

TABELL 2.1.1

ATP-nivået i forskjellige organismer utfra data i litteraturen.

2.2 Ekstraksjon av ATP

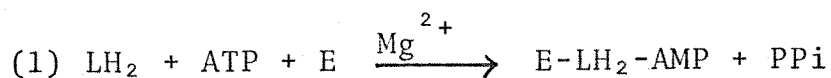
En skal kort gi en oversikt over de ekstraksjonsmetoder som anvendes. De krav som må stilles, er først at all enzymatisk aktivitet i organismene stanses meget hurtig (10-15 sek.), at ATP ekstraheres kvantitativt, og at ekstraksjonsmiddelet ikke virker forstyrrende på luminescensreaksjonen. Flere har anvendt perklorsyre (Aledort, Weed og Troup 1966) med etterfølgende nøytralisering, mens andre angir at ekstraktet virker sterkt inhiberende på luciferase. Enkelte benytter kokende etanol med etterfølgende inndampning og oppløsning i vann, men tapet blir da relativt stort. Ved anvendelse av kokende vann får en stor variasjon i pH, og Holm-Hansen og Booth (1966) har funnet TRIS-buffer (0.025 M, pH 7.75) svært tilfredsstillende. Det kvantitative forhold mellom ATP og emmitert lyskvantum er pH-avhengig, og alle oppløsninger bør derfor buffers til optimal pH \sim 7.75.

Høy ionestyrke virker inhiberende på lysemisjonen, og ved saltvannsprøver må derfor organismene filtreres fra over et membranfilter. Holm-Hansen og Booth (1966) har vist at ATP-nivået synker hurtig ned til 50 % av initialnivået ved 5 min. henstand på filteret. Dette må således hurtigst mulig overføres til kokende TRIS-buffer, og metoden er da likeverdig med direkte pipettering av kultur til kokende buffer, noe som med fordel anvendes på ferskvannsorganismer. Ekstraksjons-effektiviteten synker hurtig med temperaturen, spesielt under 90°C, mens 5 - 10 minutters ekstraksjon ved 100°C på den annen side er fullt tilstrekkelig. Noen nedbrytning av ATP foregår ikke selv ved 30 min. ekstraksjon. Ekstraherte ATP-prøver kan lagres i måneder i frossen tilstand uten tap.

Alt i alt synes drepehastigheten å være den kritiske faktor ved ekstraksjonen. Holm-Hansens og Booths (1966) erfaringer bekreftes av Patterson, Brezonik og Putnam (1970), som har modifisert metoden for analyse av aktivslam. Aktivslam pipetteres direkte til kokende TRIS-buffer, som siden sentrifugeres. Ernst (1970) har benyttet samme metode for marine sedimenter og fant da en gjennviningsgrad på 60-100 % alt etter sedimentenes beskaffenhet.

2.3 Analyse av ATP

Sensitive metoder for ATP-analyse har utviklet seg fra påvisningen av at luminescens hos ildfluer (Photinus pyralis), som krever ATP og ikke kan utnytte andre energikilder direkte (Hastings 1968). In vitro lysproduksjon med ildfluelanterne-ekstrakt er vist å være avhengig av nærvær av luciferin (LH_2), enzymet luciferase (E), oksygen, magnesiumioner og ATP (McElroy og Strehler 1949), og følgende mekanisme er vist for reaksjonen:



Første trinn er hastighetsbestemmende, og reaksjonen gir ett lyskvant pr. molekyl ATP ved optimal pH 7.2 - 7.4. Enzymet inaktiveres ved temperaturer over 35°C (Aledort, Weed og Troup 1966).

Lysintensiteten kan enten måles i et konvensjonelt spektrofotometer med relativt liten følsomhet (Prydz og Frøholm 1964) eller i følsomme fotomultiplikatorrør med høyspenningsfelt. Holm-Hansen og Booth (1966) konstruerte en egen apparatur hvor en lysintensitetskurve skrives ut, og arealet under kurven i et bestemt tidsintervall etter start er da proporsjonalt med mengde ATP. ATP-fotometeret produseres nå kommersielt (JRB, California) for måleområdet 10^{-9} - 1 mg/ml ($5 \cdot 10^{-12}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M), men en rekke forfattere har funnet at konvensjonelle væske-scintillasjonstellere er velegnet med et effektivt måleområde på 10^{-7} - 10^{-3} mg ATP/ml ($5 \cdot 10^{-10}$ - $5 \cdot 10^{-6}$ M), vesentlig begrenset av telleverkenes kapasitet.

Selv om selve lysreaksjonen er spesifikt avhengig av ATP, vil nærvær av transfosforylase-enzymmer i kommersielle ekstrakter gi noe lysproduksjon som skyldes nærvær av andre "høyenergetiske" fosfatforbindelser. Holm-Hansen og Booth (1966) har

undersøkt 13 intracellulære fosfatforbindelser, og av disse var bare adenosindifosfat (ADP), cytidin-5-trifosfat (CTP) og inosin-5-trifosfat (ITP) virksomme. ADP gav 1 % lysintensitet relativt til ekvimolar mengde ATP, mens CTP og ITP var likeverdige med ATP. Det samme antas å gjelde for guanosintrifosfat (GTP) (Patterson, Brezonik og Putnam 1970), og den målte lysintensitet gir derfor strengt tatt uttrykk for den samlede konsentrasjon av energirike trifosfater.

Forsøk utført av Prydz og Frøholm (1964) synes imidlertid å tyde på at CTP, GTP og ITP ikke simultant overføres til ATP og således gir mindre utslag enn mengdene skulle tilsi. Divergensen kan skyldes ulikheter i transfosforylaseaktivitet i kommersielle enzympreparater, men en nærmere klargjøring synes ønskelig.

Som nevnt er lysreaksjonen meget pH-sensitiv, og pH må holdes meget nær den optimale pH 7.75 i prøvene. Ionesammensetningen i løsningen er videre vist å ha stor betydning for emmisjonshastigheten (Aledort, Weed og Troup 1966), idet ekvimolare mengder av kationer inhiberer i rekkefølgen $Ca^{2+} > K^+ > Na^+ > Rb^+ > Li^+ > cholin^+$, mens anioninhibering følger rekken $I^- > H_2PO_4^- > Br^- > ClO_3^- > Cl^- > F^- > HCO_3^- > COOCH_3^-$. Med økende kationkonsentrasjoner (log-skala) utover 10 mM fåes lineært avtagende lysintensitet, og en Ca^{2+} -konsentrasjon på 97 mM inhiberer lysreaksjonen fullstendig. For $Na^+ + K^+$ er det vist at det finnes et optimalt blandingsforhold da inhiberingen er minst. For å minske ionestyrken, kan for-tynningsforholdet i ekstraktet økes eller cellene filtreres fra før ekstraksjonen (sjøvann).

2.4 Anvendelsesområder.

Bestemmelse av ATP-nivåer for estimering av biomasse blir anvendt i økende grad og for en rekke formål. En har således ikke tatt sikte på noen fullstendig oversikt over publiserte arbeider innen feltet, men eksempelvis kan nevnes biomassebestemmelser i marine sedimenter (Ernst 1970), i jord (MacLeod, Chappelle og Crawford 1969), i sjøvann fra dype havområder (Hamilton, Holm-Hansen og Strickland 1968, Holm-Hansen 1969, Dumas og Filia 1969), i ferskvannssedimenter (Lee, Harris, Williams, Syers og Armstrong 1971) og i aktivslam (Patterson, Brezonik og Putnam 1970).

Metoden er meget sensitiv, og antar en verdien $1,5 \times 10^{-9}$ mg ATP/celle som omregningsfaktor (Holm-Hansen og Booth 1966), skulle en med et ATP-fotometer (JRB, California) kunne påvise nedtil 1500 bakterie/celler pr. ml (etter endelig fortynning). ATP-analyser anvendes således også ved næringsmiddelkontroll.

3. UTPRØVING AV ANALYSEMETODEN

3.1 Innledning

ATP analyseres best ved å måle lysemisjonen ved tilsetning av lucifrase og co-enzymet luciferin til ATP-ekstraktet (2.3). Enzymsystemet fås som kommersielle preparater (Sigma, Worthington) bestående av et rækstrakt av ildfluelanterner som inneholder luciferase, luciferin, transfosforylaser (og andre enzymer?), tilsatt arsenatbuffer og frysetørket.

For disse undersøkelser hadde en til disposisjon en konvensjonell væskescintillasjonsteller uten coincidenskrets (Packard Tri-carb Scintillation Spectrometer 2002), og en valgte da å benytte stort sett de samme apparatinnstillinger om angitt av Patterson, Brezonik og Putnam (1970) for samme modell: Gain 53%, Window 50-1000 (en kanal), innstilt på REPEAT COUNT, 5 sek. talletid med 7.32 sek. målt utskriftsintervall for hver telling.

Ved å plotte antall counts for hvert intervall langs en logaritmisk y-akse, fåes die-out-kurver for lysintensiteten. Omkring 1-2 min. reaksjonstid vil kurvene være lineære, og en velger ut et count-nummer (n) som ligger innen området. Ved å analysere standardløsninger med ATP vil en således ved å plotte counts/5 sek. for count nr.n i alle prøvene mot konsentrasjonen av ATP, få en lineær standardkurve.

3.2 Forsøk, resultater og diskusjon

Dato 13/7: En enhetsporsjon luciferase/luciferin (Worthington Biochemical Corp., Inc., ATP Determination Kit) ble tilsatt 35 ml dest.vann ca. 1 t før analysen og plassert på isbad. En analyserte forsøksvis en standardserie (672-67,2 µg/l) og enkelte prøver med varierende volumforhold enzym: substrat. Forholdet 1:1 syntes å være optimalt. Tiden ble målt fra blanding av enzym og substrat frem til første telling startet, varierende mellom 15 og 20 sek.

Dato 20/7: Med samme prosedyre som ovenfor ble prøver fra 7/7 analysert.

Intensitetskurvene viser utmerket linearitet de første 60 sek., ved høye aktiviteter opptil 120 sek. Standardkurver basert på count no. 5 var lineær ned til ca. 50 µg ATP/l etter korreksjon for ulik initial reaksjonstid. Analysene viste videre at bakgrunnsaktiviteten i enzympreparatet var svært høy - omkring 2800 counts pr. 5 sek., og en antok at dette skyldtes restmengder av ATP i preparatet. Dette reduserer følsomheten i nokså høy grad.

Dato 27/7: På basis av resultatene fra de første analysene ble prosedyren endret noe: Enzym ble løst i ca. 28 ml dest. vann 20-24 timer før bruk, inkubert ved romtemperatur i 1 time og satt i kjøleskap og på isbad inntil bruk. Bakgrunnsverdiene for ATP i enzymet sank da drastisk uten at det syntes å gå ut over enzymaktiviteten. Videre ble telleren satt på MANUAL OPERATION, tiden kneppet av ved pipettering av enzym, prøven plassert i tellekammeret ved å snu til REPEAT COUNT, og 1. telling startet manuelt etter 18.0 sekunders reaksjonstid for alle prøver. Så ble straks telleren satt til AUTOMATIC OPERATION. En slapp nå vanskelig korrigeringsarbeid for å få direkte sammenliknbare tellinger. Hver prøve ble talt i 3 - 4 minutter.

Dato 3/8: Samme prosedyre som ovenfor ble nå anvendt, men med 20 sekunders initial reaksjonstid.

Ved å inkubere enzymet i kjøleskap i 24 timer før bruk, sank bakgrunnen ned til ca. 1 % av den opprinnelige og kunne således neglisjeres fullstendig for de fleste prøver. Nedre grense for analysen sank følgelig til ca. 0.5µg ATP/l, eller $0.5 \cdot 10^{-6}$ mg ATP/ml. Dette harmonerer godt med data fra litteraturen (2.3).

Ved enkelte anledninger fikk en ustabile standardprøver, idet de ved gjentatt analyse viste avtagende ATP-innhold. Dette syntes å skyldes urenheter i benyttede glassvarer, og en gjennomførte siden syrevask (1% HNO₃) og gjentatt skylling med destillert vann av alt utstyr. En har ikke undersøkt om telleglass av plast for engangsbruk kan benyttes.

3.3 Anbefalt prosedyre

På grunnlag av de utførte forsøk og senere erfaringer med metoden kan en anbefale følgende fremgangsmåte ved ATP-analyser med væskescintillasjonsteller. En har valgt å beskrive metoden for Packard Tri-Carb 3375, som er den mest aktuelle.

- a) En porsjon luciferin-luciferase (Worthington Biochemical, crude firefly extract) angitt tilstrekkelig for 25 analyser, løses i 25 ml deionisert vann i en erlenmeyerkolbe (50 ml) og inkuberes ved ca. 4°C i et døgn. Bakgrunnsverdien av ATP i ekstraktet synker da til å gi 10-15 cpm.
- b) 1.0 ml enzym pipetteres til hvert telleglass (syrevaskede) og settes i transportbåndet (Packard Tri-Carb 3375) for temperaturstabilisering.
- c) Dypfrosne prøver tines i varmt vann og settes strakt på isbad etter tiningen. Standardløsninger av ATP (Merck, analytical grade) i konsentrasjonsområdet 0.1 - 100 µg/l (ca. $5 \cdot 10^{-9}$ - $5 \cdot 10^{-7}$ M) utblandes i TRIS-buffer (0.025 M pH 7.75) og plasseres på isbadet.
- d) Scintillasjonstellersen gis følgende innstillinger:

Time: 0.2 (0.1) min.

Automatic standardisation: OUT

Normalization: OFF

Sample changer: ~~OO~~ COUNTS, 1 CYCLE

Channel selection: BLUE and RED: OFF

GREEN: C - D = 50 - 1000

Amplification: 53 %

Preset count: 900 000

Low level reject: OFF

Background: ZERO

Erfaring med denne modellen har dessuten vist at coincidence-kretsen må brytes. Bryter finnes på baksiden av panelet, avmerket i Operation Manual fig. 4 - 10 (Packard Instruments Company, Inc. (1966)).

e) Dernest utføres tellingene etter følgende tidsskjema (stoppeklokke):

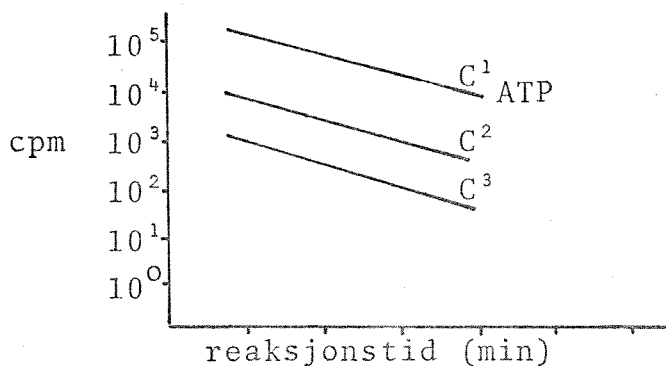
t = 0 sek: 1.0 ml prøve pipetteres raskt til teleglasset, rystes forsiktig og plasseres i tellekammeret ved å trykke på LOAD.

t = 20 sek: RESET/START trykkes inn og tellingen starter momentant. En trykker straks (inn 6 sek) på OPERATE.

t = 26 sek: Første PRINTOUT kommer, og telleren teller pånytt etter en fast printout-tid avhengig av antall printkontroll-brytere i OFF-posisjon (P). Tiden er omtrentlig gitt som $(14 - P)$ sek., men må måles manuelt.

t = 120 sek: Tellingene stoppes med STOP/PRINT. Prøven tas ut med UNLOAD, og en er klar for ny prøve.

f) Printout gir lysintensiteten som counts pr. minutt (cpm) som funksjon av reaksjonstiden, og plottet semilogaritmisk fås normalt lineært fallende intensitetskurver:



Standardkurven, som angir konsentrasjonen av ATP som funksjon av lysintensiteten (cpm), fåes ved å velge en telleperiode (f.eks. count no. \underline{n} etter \underline{t} sek.) og plote standard konsentrasjoner mot aktiviteten i denne perioden. Telleperioden velges slik at den ligger i det lineære område av flest mulige intensitetskurver, samtidig som aktiviteten er høyest mulig.

4. ATP I FORSØKSRENNESEDIMENTER

4.1 Innledning

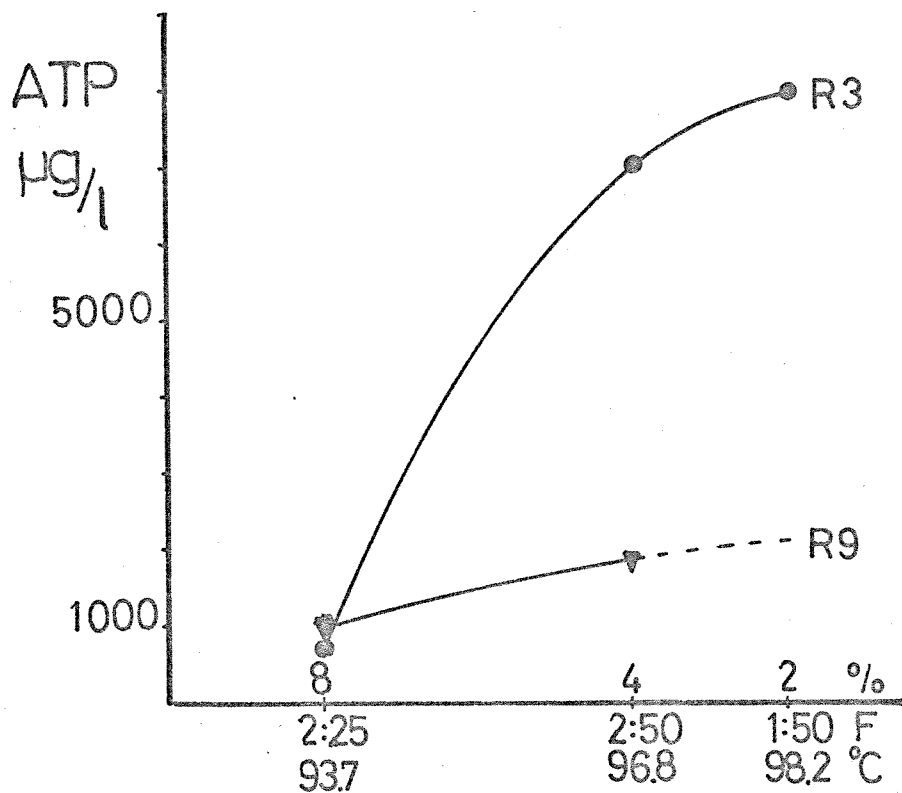
For en nærmere beskrivelse av forsøksresipientene, forsøksbetingelser, kvantitative og kvalitative undersøkelser og prøvetakningsmetodikk henvises til Fremdriftsrapport nr. 1 (Balmér og Traaen 1972) og til Metoder for prøvetakning, Kjelleranlegget (NIVA 1970).

Opplegget omfattet periodevis prøvetaking for analyse av glødetap og klorofyll, og ATP-analyse ble foretatt på enkelte av prøvene, noe som muliggjør korrelasjon av klorofyll, tørrvekt og ATP pr. arealarealenhet rennesediment. Formålet med ATP-analysene var først og fremst å prøve ut metodikken for senere anvendelser, og en har derfor anvendt noe varierende prosedyre for prøvetaking og ekstraksjon.

4.2 Prøvetaking og ekstraksjon

Dato 7/7: En tok ut 1 alternativt 2 ml volumer fra både homogenisert og ikke-homogenisert sedimentsuspensjon, pipeterte prøvene til erlenmeyer-kolber og tilsatte 20 alternativt 40 ml kokende TRIS-buffer. (Ved en feil fra Mikrobiologisk lab. var bufferen 0.005 M pH 7.75, ikke 0.025 M som ønsket). Etter 2 min ekstraksjon ble prøvene kvantitativt overført til sentrifugerør og sentrifugert ved ca. 10000 x g. Supernatanten ble overført videre til målekolber og volumet justert til 25 alternativt 50 ml før nedfrysning på plastflasker (50 ml) i kjøleskapets fryseboks inntil analyse (3.2 Dato 13/7 og 20/7). Prøver ble tatt fra R3, R6 og R9.

Kontrollmåling av pH i ekstraktene viste en variasjon fra 7.75 til 7.91 med en middelværdi for 16 analyser på 7.83 ± 0.01 . Anvendelsen av 0.005 M av TRIS-buffer i stedet for 0.025 M (2.2) har derfor ikke hatt noen betydning for analysene.



FIGUR 4.2.1

Konsentrasjon av ATP i ekstraktet som funksjon av for-
tynningsforholdet (F) ved ekstraksjonen. Prøvevolumets
andel (%) av ekstraktvolumet og omtrentlig temperatur
(°C) ved ekstraksjonen er også angitt.

Ved pipettering av prøve til buffer ble det anvendt følgende fortynningsforhold (ml prøve: ml totalt); 1:50, 2:50, 1:25 og 2:25. Bakgrunnsnivået i enzymet ved analysen var svært høyt (3.2), og resultatene fra R6 med lavt ATP-nivå lar seg derfor ikke vurdere. Som vist i Fig. 4.2.1 viser imidlertid den målte ATP-konsentrasjon i R3 med høyt ATP-nivå en sterkt fallende tendens ved mindre fortynning. Tendensen er også tydelig, men noe svakere for R9 med 80% lavere ATP-nivå. Reduksjonen skyldes trolig primært at ekstraksjonstemperaturen synker vesentlig under 100°C, anslagsvis til 98, 97 og 94°C ved de 3 ulike fortynningene, og en bør derfor ved pipettering til kokende buffer ikke la prøvevolumet overstige 5 % av buffervolumet når en anvender kort ekstraksjonstid og ingen ettervarming.

Homogeniserte sedimentprøver viste samme ATP-nivå som ikke-homogeniserte for de 4 sammenlignbare analysene en hadde, og en valgte for ettertiden å homogenisere prøvene for å redusere tilfeldige utslag ved prøvepipetteringen.

Dato 14-15/7: Sedimentsuspensjonen fra alle renner ble straks homogenisert, maksimalt i 1½ min (Braun Multi-mix). Enkelte prøver på 3 alternativt 5 ml ble forsøkt filtrert (Sartorius 50 mm, 0.45 µ membranfilter), mens de fleste prøver ble pipettert direkte til 40 ml kokende TRIS-buffer i en e.m.-kolbe og sentrifugert som før (Dato 7/7).

Ved filtrering (elektrisk vakuumpumpe) tok det opptil 8 min før membranfilteret var tørt og kunne ekstraheres, og total tid for prøvetaking og ekstraksjon kom da opp i 10-12 min mot 3½ min ved direkte pipettering. Membranfilter er således ikke anvendbart for rennesedimenter, da ekstraksjonen bør skje så raskt som mulig etter prøvetakingen.

Dato 21-22/7: En homogeniserte nå prøver fra alle renner som før. Fra elvevannsrennene ekstrahertes en parallell ved direkte pipettering og en annen etter filtrering over glassfiberfilter (Whatman GF/C). En tok ut 3 ml prøve fra elvevannsrennene og 4-5 ml fra innsjøvannsrennene og fortynnet til 50 ml

med buffer. Enkelte prøver ble frosset i flytende N₂ før innsetting i fryseboksen.

Renne	Belastning	Konsentrasjon ATP (µg/l)			Økning ved filtrering (%)
		Pipettert direkte til buffer (P)	Filtrert før ekstrak- sjon (F)	F-P	
R2	ingen	1517	2120	+ 603	+ 39.8
R3	15% Mek.	4065	2480	-1585	- 38.9
R4	5% Mek.	849	675	- 224	- 24.9
R5	15% Kj.	167	117	- 50	- 29.9
R6	5% Kj.	300	550	+ 250	+ 83.3
R7	15% Biol.	1500	1830	+ 330	+ 22.0

TABELL 4.2.1

Sammenligning av ATP-verdier ved direkte pipettering av homogenisert prøve til kokende buffer og ved filtrering med glassfiberfilter og ekstraksjon fra filteret.

Hurtig nedfrysning av ekstraktene syntes ikke å gi vesentlig forskjellige ATP-nivåer, men forholdet fortjener nok en nærmere undersøkelse. I følge tidligere undersøkelser er imidlertid ATP relativt termostabilt.

Konsentrasjonen av ATP i prøvene viser til dels svært forskjellige verdier ettersom prøvene er filtrert eller pipettert direkte (tab. 4.2.1), men det er ingen klar tendens i tallene, eller forhold som umiddelbart lar seg forklare. Det er oppsummert en relativ økning i ATP konsentrasjonen ved filtrering, mens summen av absoluttverdiene viser en motsatt tendens. Materialet er således alt for lite til at en kan dømme en metode til å være bedre enn den andre, men det synes ikke å være noe å vinne ved filtrering før ekstraksjonen her hvor en forutsetningsvis ikke har enzyminhiberende komponenter oppløst i vannet. Erfaring viste dessuten at frafiltrert materiale ikke heftet til filteret under ekstraksjonen, og ekstraktet måtte likevel sentrifugeres.

Variasjonen i resultatene er utfra senere erfaring med direkte pipettering, for store til å skyldes tilfeldige avvik, og ekstraksjon og prøvetaking fra rennene fortjener derfor en nøyere undersøkelse.

4.3 Resultater og beregninger

Ved å anta at forholdet mellom organisk C og tørrvekt i cellemateriale er 0.4 kan en omberegne de angitte data (Holm-Hansen 1970) for ATP-nivået i bakterier og alger til tørrvektsbasis:

ATP-nivå bakterier: 0.4 % C = 1.6 µg/mg tw.

ATP-nivå alger : 0.35% C = 1.4 "

Nivåene er stort sett fastlagt under logaritmisk vekst i kultur, og ATP-nivået viser en avtagende tendens i postlogaritmisk fase. I rennesedimentene vil veksten være underlagt hastighetsbegrensning, og anslagsvis synes en reduksjonsfaktor på 0.8 å være rimelig. En velger å gå ut fra følgende verdier:

ATP-nivå heterotrofe organismer: 1.3 µg/mg tw.

ATP-nivå autotrofe organismer : 1.1 "

Gjennomsnitt : 1.2 "

Klorofyllnivået i alger vil være avhengig blant annet av lysintensiteten, og en har ikke funnet data for klorofyllnivået som gir rimelige resultater ved beregning av autotrof biomasse. Med pålitelige data her ville en kunne foreta følgende beregninger av biomassefordelingen på tørrvektsbasis:

Autotrof biomasse (A):

$$A = \frac{\text{Chl}}{a} \quad (I)$$

hvor a = klorofyll pr tørrvekt autotrofe celler

Chl = klorofyllmengde pr areal

Heterotrof biomasse (H):

$$\text{ATP} = H \cdot h + A \cdot b \quad (\text{I})$$

$$= H \cdot h + \frac{b}{a} \cdot \text{Chl}$$

$$H = \frac{\text{ATP} - \frac{b}{a} \cdot \text{Chl}}{h} \quad (\text{II})$$

hvor b = ATP pr tørrvekt autotrofe celler

h = ATP pr tørrvekt heterotrofe celler

ATP = ATP pr areal

Detritus, dødt organisk materiale (D):

$$D = G - A - H \quad (\text{III})$$

hvor G = gløderest pr areal

For nærværende har en antatt $b = h = 1.2$ og på det grunnlag beregnet levende biomasse (A+H) som % av gløderesten (G). Videre er ATP angitt som % av klorofyll.

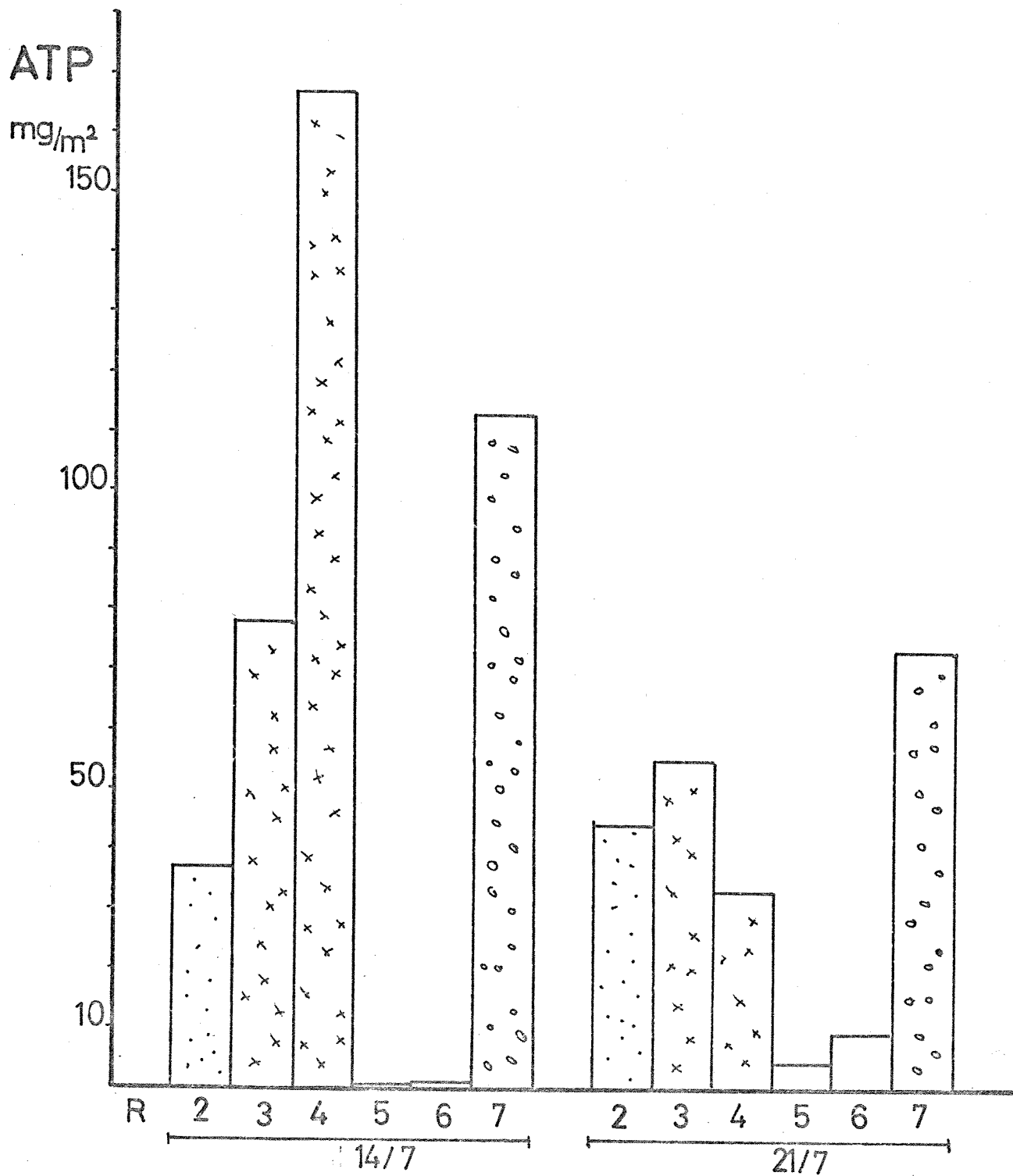
Analyseresultater og beregninger er gitt i tab. 4.3.1.

En kan videre sammenligne ATP-nivået og biomassen i de ulike renner ved samme analysedato, og dette er illustrert grafisk i fig. 4.3.1 - 2 for ellevannsresipientene og fig. 4.3.3 - 4 for innsjøvannsresipientene.

Renne nr Resipient Belastning	Prøve- dato	Glødetap G (g/m ²)	Klorofyll Chl (mg/m ²)	ATP (mg/m ²)	ATP Chl (%)	A + H G (%)
R2 Nitelvvann	14.7	42.1	305.25	37	12.1	73.2
	21.7	41.5	212.45	44	20.7	88.4
R3 Nitelvvann + 15 % M	7.7	73.7	446.9	(120)	26.8	(135.6)
	14.7	117	508.75	78	15.3	55.6
	21.7	129	618.4	56	9.1	36.1
R4 Nitelvvann + 5% M	14.7	81.2	562.9	167	29.6	171.5
	21.7	94.0	676.65	33	4.9	29.3
R5 Nitelvvann + 15% K	14.7	26.8	77.0	0.7	0.9	2.2
	21.7	58.0	250.7	4.2	1.7	6.0
R5 Nitelvvann + 5% K	7.7	22.1	93.25	(6.3)	6.8	(23.8)
	14.7	47.2	131.95	0.9	0.7	1.6
	21.7	44.3	128.50	9.2	7.2	17.3
R7 Nitelvvann + 15% B	14.7	131	666.55	113	17.0	71.8
	21.7	133	787.5	73	9.3	45.8
R8 Innsjøvann	15.7	6.7	0.0	< 0.4	-	4.9
	22.7	11.5	8.38	0.2	2.4	1.5
R9 Innsjøvann + 5% M	7.7	10.8	1.42	(25)	1760	(192.5)
	15.7	28.0	30.0	14	46.7	41.7
	22.7	36.2	212.4	33	15.5	76.0
R10 Innsjøvann + 1% M	15.7	9.2	32.87	1.3	4.0	10.8
	22.7	14.5	112.1	2.8	2.5	1.6
R11 Innsjøvann + 5% K	15.7	8.2	1.67	0.4	24.0	4.1
	22.7	12.6	0.52	0.3	57.7	2.0
R12 Innsjøvann + 1% K	15.7	8.9	0.0	0.4	-	3.7
	22.7	8.8	0.28	0.2	71.4	1.9

TABELL 4.3.1

Sammenhørende data for glødetap (G), klorofyll (Chl) og ATP i forsøksrenner med Nitelvvann og innsjøvann som resipienter, og med ulik belastning av rensset avløpsvann. Beregnede data for biomasse (A+H) og ATP pr. Chl.



FIGUR 4.3.1

ATP-nivå i elvevannsresipientene (R2-7) ved ulik belastning av mekanisk (M), kjemisk (K) eller biologisk (B) rensed avløpsvann og ved to ulike tidspunkter.

R2: Nitelvvann

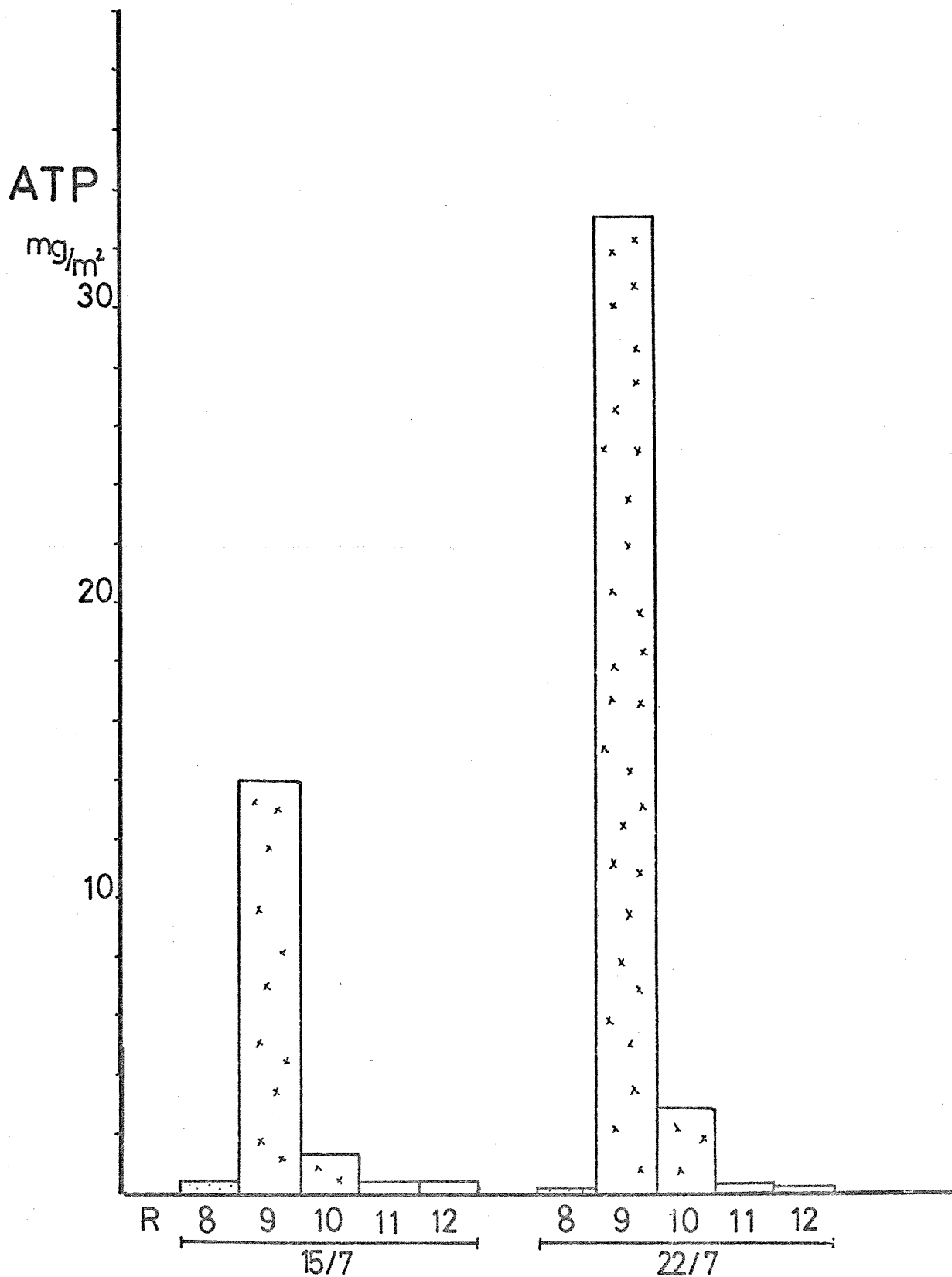
R3: + 15 % M

R4: + 5 % M

R5: + 15 % K

R6: + 5 % K

R7: + 15 % B



FIGUR 4.3.2

ATP-nivå i innsjøvannsresipientene (R2-7) ved ulik belastning av mekanisk (M) eller kjemisk (K) renset avløpsvann og ved to ulike tidspunkter

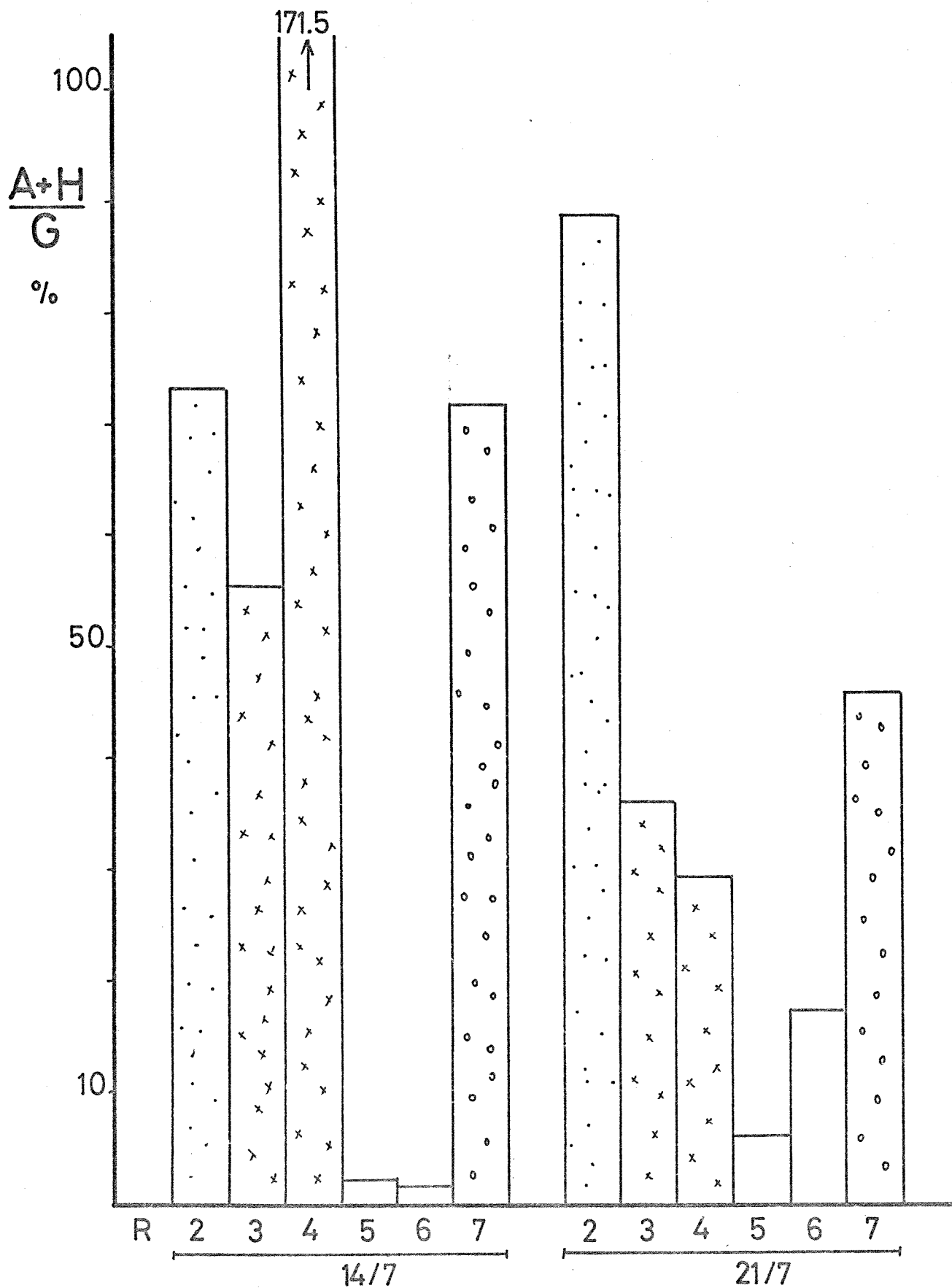
R8: Innsjøvann

R9: + 5 % M

R10: + 1 % M

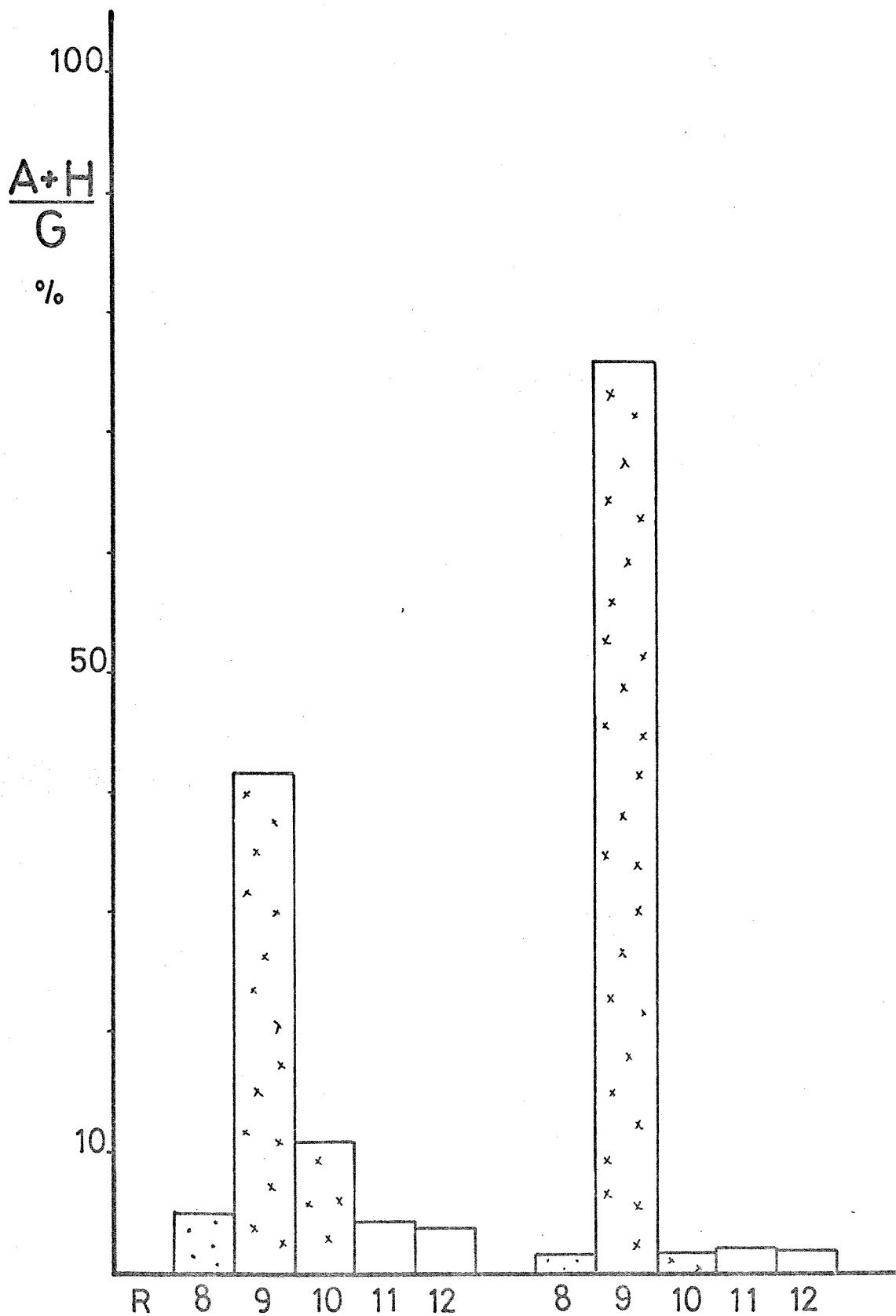
R11: + 5 % K

R12: + 1 % K



FIGUR 4.3.3

Biomasse (A+H) som % av gløderest (G) beregnet utfra ATP-nivået i ellevannsresipientene ved to ulike tidspunkter. Belastning er angitt i Fig. 4.3.1.



FIGUR 4.3.4

Biomasse (A+H) som % av gløderest (G) beregnet fra ATP-nivået i innsjøvannsresipienten ved to ulike tidspunkter. Belastningen er angitt i Fig. 4.3.2.

4.4 Diskusjon

En må anta at feilkildene ved sommerens undersøkelser har vært for store til at en vurdering av utviklingen over tid er riktig å foreta. Dette illustreres jo av at en i tre tilfeller har beregnet en biomasseandel på over 100 %. I R3 og R9 7.7 skyldes dette trolig at høy bakgrunnsverdi av ATP i enzymet ved analysen 13.7 har gitt for høye ATP-verdier (3.2), og dette gjelder også for R6 7.7. Prøvene fra denne dato er derfor ikke sammenlignbare med de øvrige.

Den høye verdien fra R4 14.7 må imidlertid forklares på annen måte: Det benyttede ATP-nivå kan være litt for lavt slik at alle biomasseverdier må justeres ned. Trolig har ikke prøven vært tilstrekkelig homogen tross homogenisering, og dette vil nok være hovedårsaken til tilfeldige variasjoner ved analysen. Imidlertid viser de høye biomasseverdiene at ekstraksjonen av ATP er meget effektiv; men en kan sette et spørsmålsteget ved ekstraksjonen fra renner belastet med kjemisk rensset vann. Her kan de lave ATP-verdiene også skyldes at luciferase ved analysen inhiberes av Al-forbindelser i ekstraktet (5). En kan utfra de foreliggende undersøkelser ikke si noe om hvor mye disse faktorer har gitt seg utslag i den beregnede biomasseverdi, og problemet fortjener en nærmere undersøkelse for å klarlegge om fellingskjemikaliene også virker hemmende på veksten i rennene.

Betrakter en ATP-nivået i elvevannsresipientene (4.3.1), ser en at tilførsel av kjemisk rensset kloakkvann synes å gi bare 10 -20 % av biomassen i ren resipient, og dette kan som nevnt tyde på en vekstinhiberende effekt. Mekanisk rensset vann gir en markert økning i biomassen, og det gjelder i enda sterker grad biologisk rensset vann med 50-100 % økning.

Ser en så på biomassens andel av organisk materiale (4.3.3), så er denne 70-90 % i ren resipient, 45-75 % ved tilførsel av biologisk rensset vann, 30-60 % med mekanisk rensning og

2-20 % med kjemisk rensning. Tallene uttrykker endel om resipientens selvrensningspotensial, som vel kan sies å avta i samme rekkefølge.

Ser en nå på ATP-nivået i innsjøvannsresipientene (4.3.2), så viser dette at biomassen i renner tilført kjemisk rensset avløpsvann ligger på samme nivå som i renvannsrennen, mens tilførsel av 1 % mekanisk rensset vann gir 5-10 ganger og 5 % 30-100 ganger høyere biomassenivå. Interessant er det videre at en økning fra 1 til 5 % belastning av mekanisk avløp leder til en 10-dobling av biomassen, mens en ved økning fra 5 til 15 % i elvevannsresipientene ikke finner noen signifikant forskjell.

Karakteristisk for innsjøvannsresipientene er det videre at biomassen i rent vann og vann tilført kjemisk rensset avløp bare utgjør 1-5 % av organisk materiale (4.3.4). Dette avspeiler trolig en utfelling og sedimentering av humusforbindelser fra vannet. Ved tilførsel av 5 % mekanisk rensset vann øker biomassens andel til 40-50 %, altså i noen mindre grad enn den absolutte økning i biomassen skulle tilsi. Følgelig har også nivået av organisk detritus øket betraktelig.

Tross de relativt store unøyaktigheter som hefter ved årets ATP-analyser, viser resultatene at en i ATP har en svært verdifull parameter for kvantifisering og evaluering av de endringer som skjer i en resipients biologiske miljø ved utslipp av vekstfremmende eller veksthemmende natur. De enkelte uforklarlige utslag i tallene vil trolig kunne elimineres ved å ta minst to parallelle prøver fra hvert homogenat. Ved å standardisere prøvetaking, prøvevolum/ekstraktvolum, temperaturbetingelser, ekstraksjonstid mm som angitt (4.5), vil analysene kunne gi direkte sammenlignbare verdier over tid og mellom ulike resipienter.

4.5 Anbefalt prosedyre

På basis av disse innledende forsøkene, synes følgende prøve-

takings- og ekstraksjonsprosedyre å være velegnet for forsøksresipienter for mekanisk og biologisk rensset avløpsvann ved Kjelleranlegget:

- 1) Sedimentprøven fra en renne bringes straks etter høstingen til laboratoriet og homogeniseres i maksimalt 2 min (Braun Multi-Mix).
- 2) 2 aliquoter på 2 ml for elvevannsrennene og 4 ml for innsjøvannsrennene pipetteres direkte til 40 ml kokende TRIS-buffer (0.025 M pH 7.75) i 2 50 ml målekolber (Pyrex). En anvender 5 ml blow-out-pipetter.
- 3) Målekolbene settes på kokende vannbad i 5 min og avkjøles så på isbad eller under rennende springvann til ca. 20°C. Volumet justeres med TRIS til 50.0 ml.
- 4) Svært urene ekstrakter bør nå sentrifugeres eller filtreres. Minst 10 ml ekstrakt fryses på syrevaskede plastflasker og oppbevares ved -20°C inntil analyse.

For forsøksresipienter tilført kjemisk rensset avløpsvann, bør en inntil spørsmålet om luciferasehemmende komponenter (5) er nærmere klarlagt, anvende følgende prosedyre:

- 1) Som foran.
- 2) 1 aliquot på 2 henholdsvis 4 ml pipetteres direkte til TRIS-buffer som foran. 1 aliquot på 4 ml pipetteres på glassfiber-filter (Whatman GF/C), vaskes med litt destillert vann og straks det er tørt, overføres til en 50 ml erlenmeyer-kolbe med 40 ml kokende TRIS-buffer.
- 3) Kolben settes på kokende vannbad i 5 min og kjøles på isbad eller under rennende springvann til ca. 20°C. Ekstraktet overføres kvantitativt til en 50 ml målekolbe ved å skylle etter med litt TRIS-buffer, og volumet justeres til 50.0 ml.
- 4) Som foran.

5 HEMNINGSFORSØK MED ALUMINIUMSULFAT

5.1 Innledning

Da det i løpet av prøvetakingsperioden viste seg at en fikk overraskende lavt ATP-nivå i renner tilført kjemisk rensset vann, gjorde en den 3/8 et enkelt forsøk for å se om fellingsmiddelet $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ kunne inhibere luciferasereaksjonen. En har ikke funnet direkte holdepunkter for dette i den undersøkte litteratur, men det forhold at en rekke ioner virker inhiberende (2.3) styrket mistanken. Da TRIS-buffer viste seg å felles av Al-sulfat, måtte en unnvære pH-kontroll, idet en ikke kjente eventuelle andre bufferes virkning på luciferase.

5.2 Forsøk

ATP (p.a.) ble oppløst i destillert vann tilsatt 20-2-0.2-0.02 mg/ml $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (industriell kvalitet), til en sluttkonsentrasjon på 336 μg ATP/l. Prøvene ble analysert som før beskrevet (3.2 dato 3/8) mot en ATP-standard uten Al-sulfat. En målte dessuten pH etter utblandingen.

5.3 Resultat

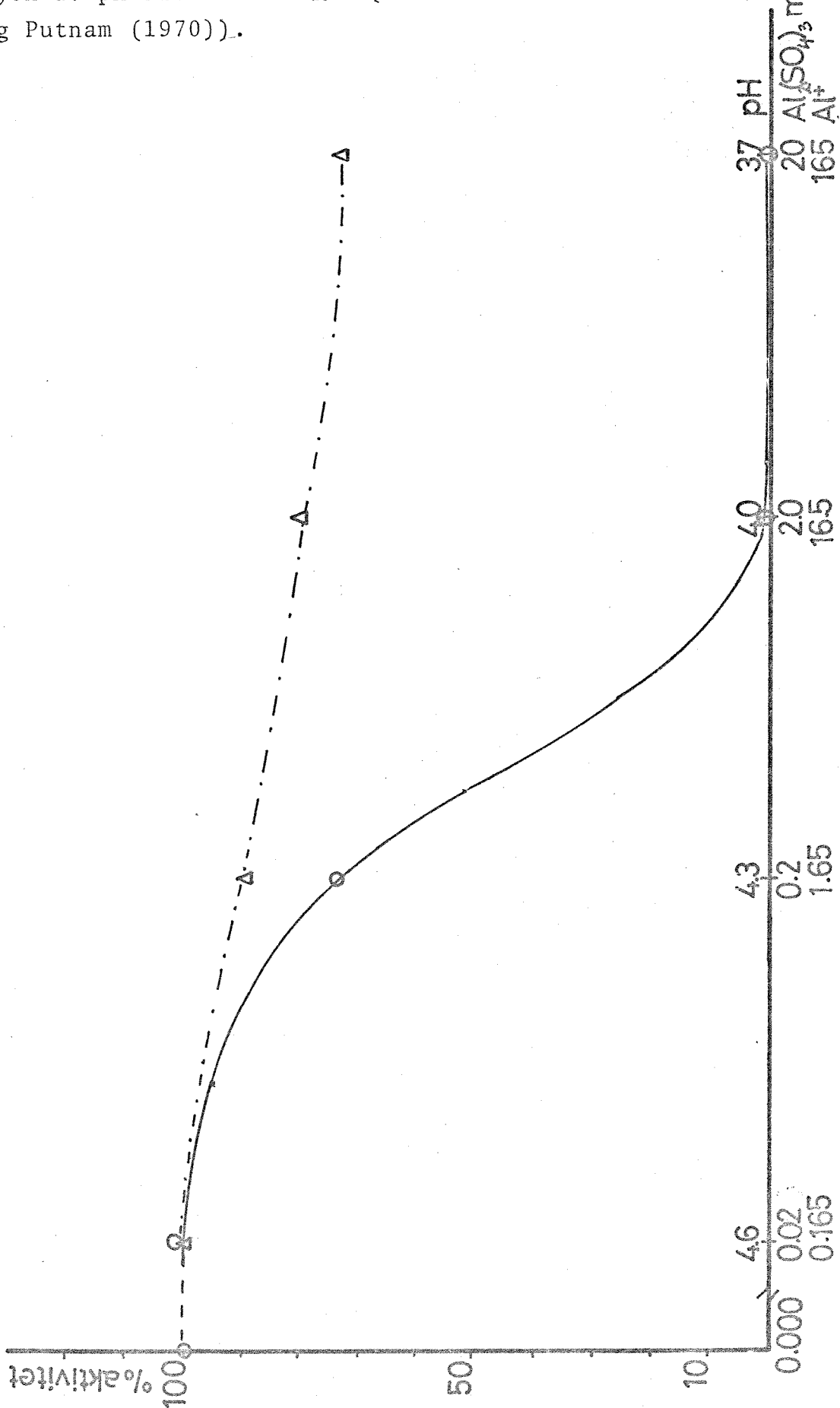
Resultatet er vist i fig. 5.3.1, hvor aktiviteten av luciferase er uttrykt som % av normalaktiviteten og plottet mot konsentrasjonen av Al-sulfat og pH i prøvene. pH viste seg å avta tilnærmet eksponensielt med konsentrasjonen, og en har derfor til sammenligning kunnet plote aktiviteten som funksjon av pH alene, beregnet utfra data i litteraturen.

5.4 Diskusjon

Anslagsberegninger over hvilke maksimalkonsentrasjoner Al^{3+} en kan finne i ATP-ekstraktene har gitt verdier fra 0.47 - 8.4 mM Al^{3+} , og dette tilsvarer det inhiberende konsentrasjons-

FIGUR 5.3.1

Aktiviteten av luciferin/luciferase (som % av normalaktiviteten) som funksjon av pH og tilsatt mengde $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ —○—, og som funksjon av pH alene —△— (etter data fra Patterson, Breznik og Putnam (1970)).



området. Beregningene er imidlertid basert på at alt tilført Al sedimenterer homogent i rennene, og en sammenligning med total mengde uorganisk materiale viser at dette ikke er tilfelle. Av den grunn må maksimalkonsentrasjonene reduseres med anslagsvis 50 %. Videre er beregningene basert på at Al-forbindelsene løses opp i ekstraktet, og dette er trolig ikke tilfelle ved pH 7.75. En videre reduksjon på 80 % synes rimelig, og konsentrasjonen av oppløst Al i ekstraktet ligger således under det inhiberende området. Dette støttes av Al-analyse på enkelte ekstrakter, som viste svært lave verdier.

Videre er det utfra hva som fra før er kjent om Al som enzym-inhibitor, lite trolig at metallet skulle virke inhiberende selv ved de konsentrasjoner hvor en finner at luciferase hemmes ved tilsats av $Al_3(SO_4)_2$. Det er overveiende sannsynlig at andre metaller som Cu, Cd, Hg og Zn foreligger som forurensninger i den industrielle Al-sulfaten som ble anvendt for forsøket, og at disse når opp i hemmende konsentrasjoner. Hvilket metall det dreier seg om, er det utfra det foreliggende ikke mulig å si noe om.

Spørsmålet om hva de lave ATP-verdiene for renner tilført kjemisk rensset vann skyldes, står således fremdeles ubesvart. Det kan antydes endel forklaringer:

- (1) Al-forbindelser i sedimentet hemmer produksjonen.
- (2) Al-forbindelser feller ut eller absorberer ATP under ekstraksjonen.
- (3) Andre metallforbindelser (tungmetaller) i effluenten hemmer produksjonen.
- (4) Tungmetaller i sedimentet løses under ekstraksjonen og hemmer luciferasen.

Som støtte for punkt 2 kan nevnes at leireholdige sedimenter er kjent for å binde ATP. Utfra andre biologiske undersøkelser (Balmer og Traaen 1972) synes imidlertid heller ikke en veksthemmende effekt å kunne utelukkes, og de lave ATP-verdiene avspeiler trolig både et analytisk problem og et forurensningsproblem.

6 ATP I AKTIVSLAM MODELLANLEGG

6.1 Innledning

Analyse av ATP i aktivslam-anlegg er vist å ha store potensielle muligheter som en parameter for metabolsk aktivitet til driftsoptimalisering og forgiftningsstudier (Patterson, Brezonik og Putnam 1970; Brezonik og Patterson 1971).

For å vinne erfaring med metoden ble det ved en anledning tatt prøver fra en trinnvis, en halvkontinuerlig og tre kontinuerlige aktivslam modellanlegg (Ole-Jacob Johansen, NIVA) for samtidig analyse av FSS (mg/l), Q_{O_2} (mg/l min) og ATP (mg/l). Fra diskontinuerlige kulturer tok en prøver som funksjon av tiden etter substrat-tilførsel, mens det i kontinuerlige kulturer ble operert med 3 ulike belastninger av husholdningskloakk. For nærmere beskrivelse av forsøksbetingelser og anlegg henvises til Johansen (1972).

6.2 Prøvetaking og ekstraksjon

En fant ingen grunn til å endre på ekstraksjonsmetoden slik den er beskrevet av Patterson et al. (1970):

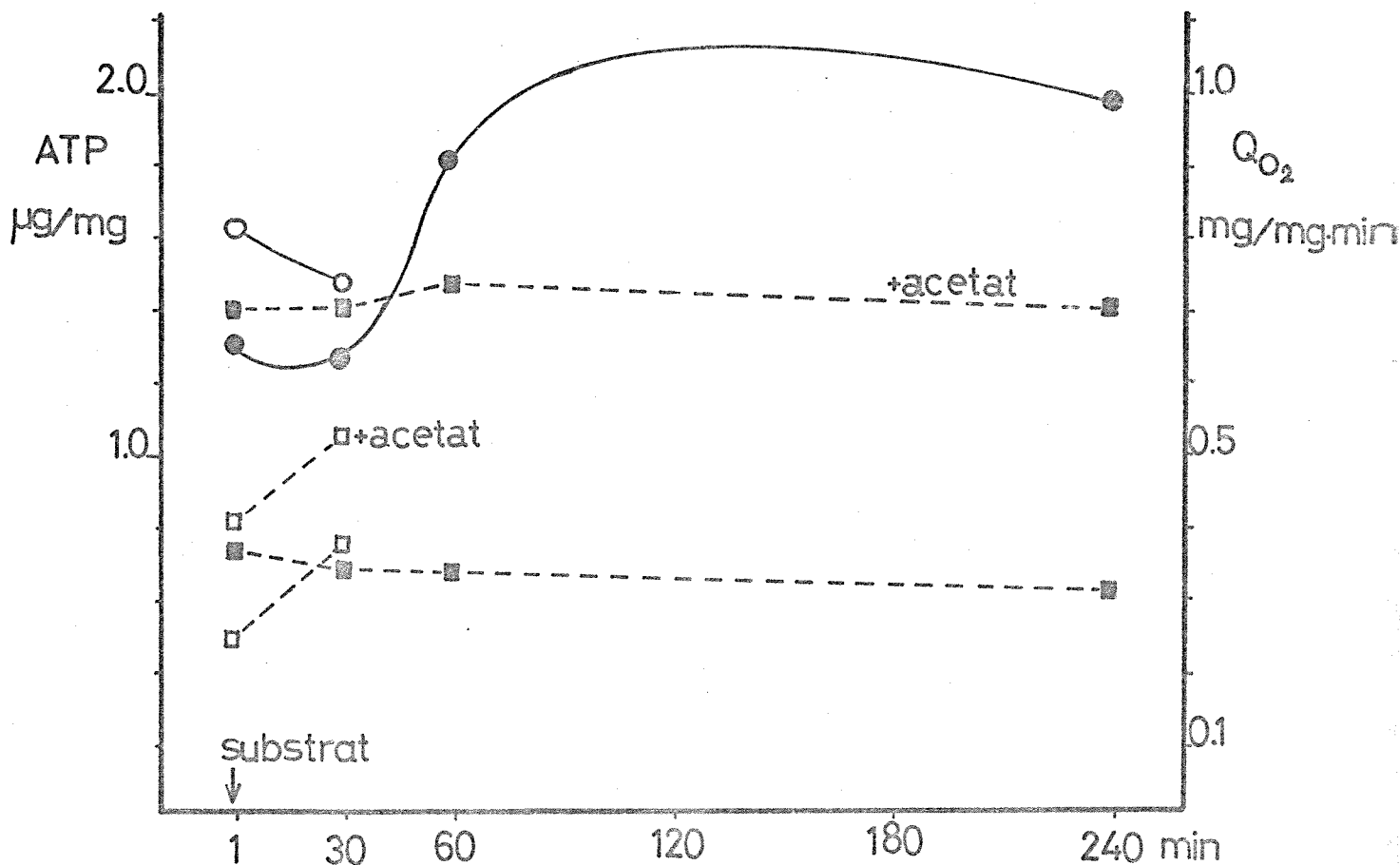
2 paralleller á 2 ml homogen kultur pipetteres raskt til en 50.0 ml målekolbe med ca. 45 ml kokende TRIS-buffer (0.025 M, pH 7.75) og varmes på kokende vannbad i ca. 10 min. Derneft avkjøles kolben under rennende vann eller på isbad til ca. 20°C, og volumet justeres til 50.0 ml med TRIS-buffer. Ekstraktet sentrifugeres ved ca. 10000 x g i 10 min, analyseres direkte eller overføres til 50 ml plastflasker og fryses i fryseboks (ca. -20°C).

Samtidige analyser av flyktig suspendert stoff (FSS) og O_2 -forbruk (Q_{O_2}) med og uten acetat-tilsetning ble utført etter standardiserte metoder.

6.3 Resultater

Variasjonen i respirasjon (Q_{O_2}) og ATP-nivå i trinnvis (B2) og halvkontinuerlig (B1) kultur som funksjon av tiden etter tilførsel av substrat er vist i fig. 6.3.1. Innholdet av FSS var temmelig konstant lik 1.65 - 1.78 g/l i B1 og 3.31 - 3.36 g/l i B2 i løpet av prøvetakingsperioden.

For kontinuerlige kulturer (K1 - 3) ser en i fig. 6.3.2 variasjonen i ATP-nivå og respirasjon som funksjon av tilførselshastigheten (Q) for substratet. Verdiene antas å representere "steady state"-nivåer i kulturene. Nivået av FSS var temmelig konstant lik 1.38 - 1.51 g/l.



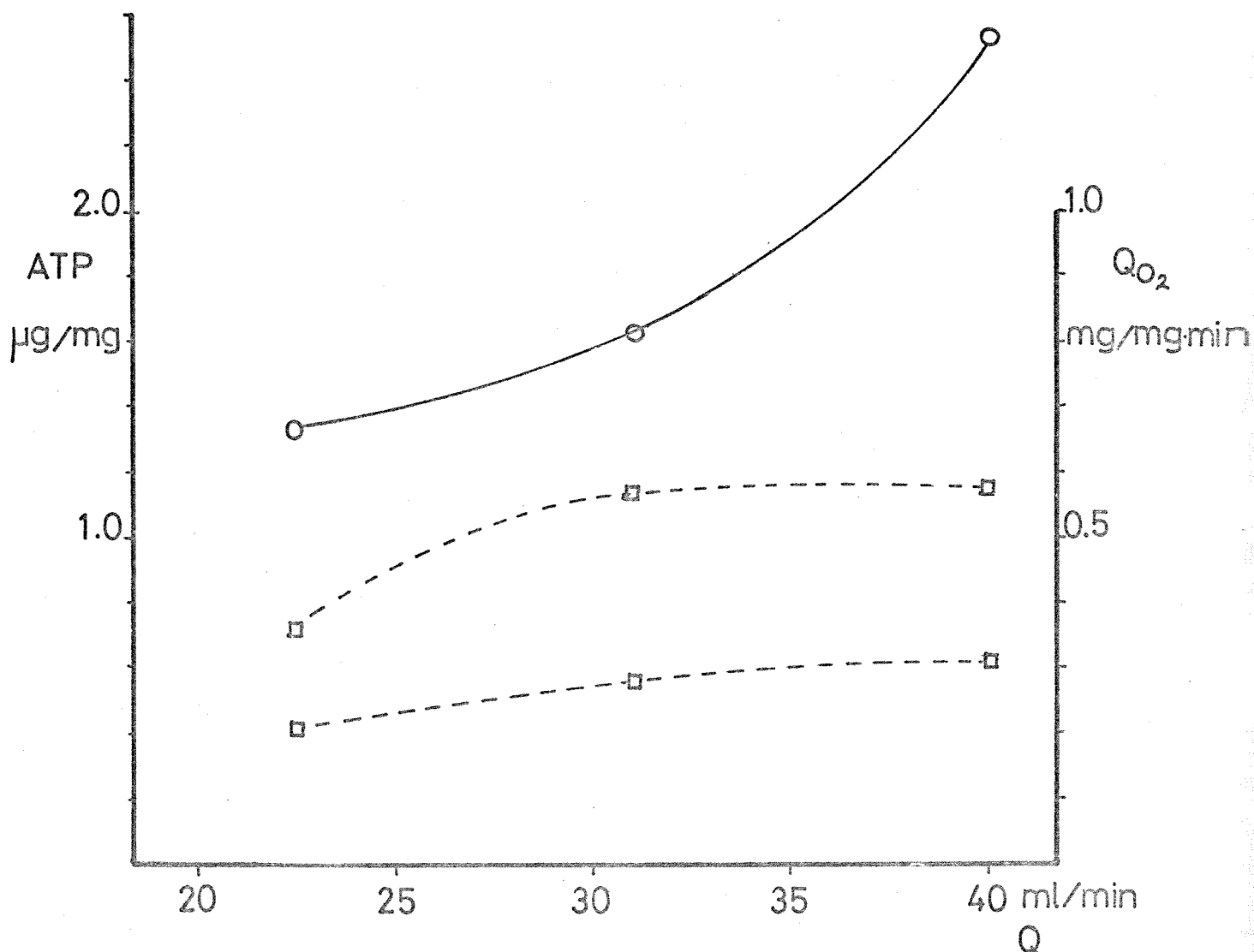
FIGUR 6.3.1

ATP-nivå (●) og O_2 -opptak (■) som funksjon av tid etter substrattilførsel for en halvkontinuerlig (●) og trinnvis (○) aktivslam-kultur.

Ved analyse av to parallelle ATP-prøver fant en et midlere standardavvik for enkelt måling på $(11 \pm 2)\%$.

6.4 Diskusjon

En ser av fig. 6.3.1 at ATP-nivået i en halvkontinuerlig aktivslamkultur viser en markert økning 40 min etter at nytt substrat er tilført, etter først å ha vist en svak nedgang. En kan tolke dette slik at det cellulære ATP-nivå først synker fordi ATP benyttes til nysyntese og volumvekst. Derneft får en celledeling og ny akkumulering av ATP i cellene mellom



FIGUR 6.3.2

ATP-nivå (O) og O₂-opptak (□) som funksjon av avløpsvannsbelastningen for 3 kontinuerlige aktivslam-kulturer.

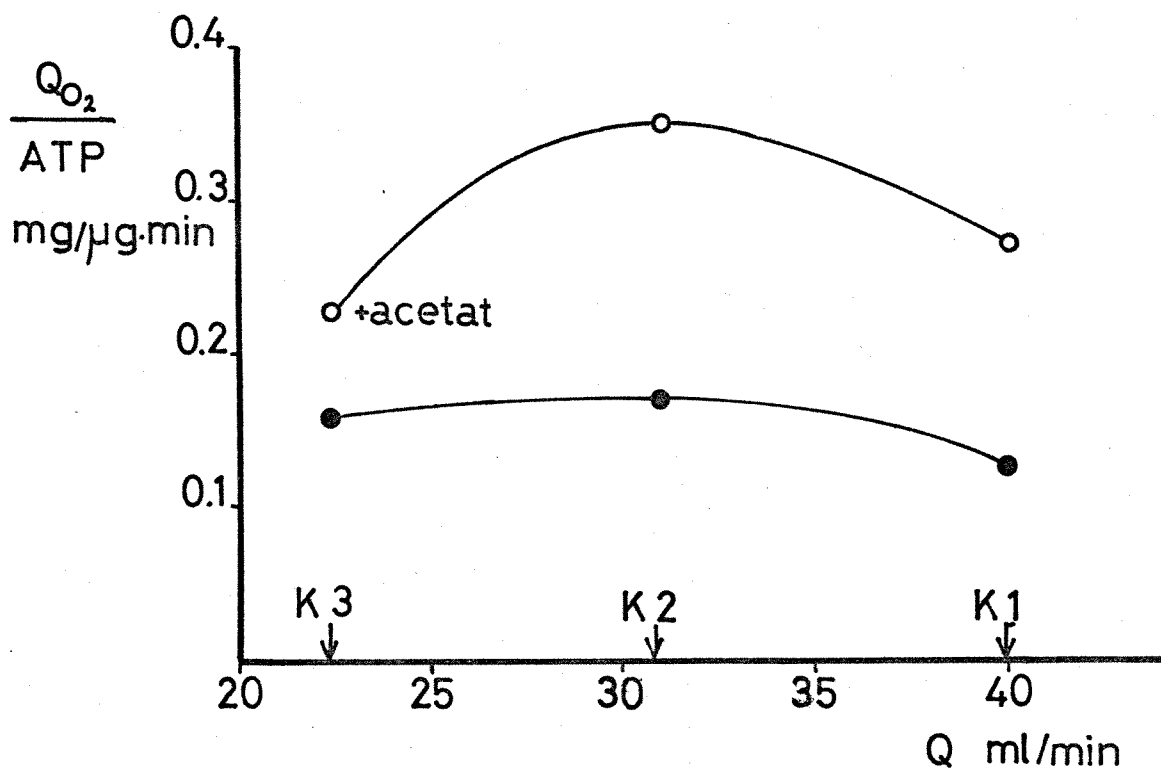
40 og 80 min etter tilførselen, inntil celletallet har nådd et maksimum. Det cellulære ATP-nivå stabiliserer seg også på et høyere nivå enn før, men fluktuasjonen er trolig relativt liten i forhold til økningen i celletallet i kulturen.

Dersom dette er riktig, så viser oksygenopptakets jevne tendens at metabolismen pr. celle er svært høy like etter tilførsel av substrat og dernest raskt synker til å nå et nytt stabilt nivå etter 80 minutter. Den trinnvise kulturen viser en kraftigere ATP og Q_{O_2} -respons like etter tilførselen, men en har her for få data for ytterligere diskusjon.

Av fig. 6.3.2 ser en at ATP-nivået i kontinuerlig aktivslamkultur øker eksponensielt med økende belastning, noe som gir uttrykk for at biomassens andel i det organiske materialet øker sterkt, da nivået av FSS er temmlig konstant. Derimot viser økningen i oksygenopptaket målt ved acetat-tilsetning en avtagende tendens, noe som tyder på at cellens metabolisme passerer et optimum ved en belastning omkring 30 ml/min. Dette kan en få frem ved å plotte Q_{O_2} pr. ATP, som vist i fig. 6.4.1.

Ser en på det absolutte nivå av ATP i aktivslamkulturene så varierer dette mellom 1.2 og 2.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ FSS i semikontinuerlig og 1.3 og 2.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ FSS i kontinuerlig kultur. I forhold til det tidligere angitt gjennomsnitt for bakterier (4.3) på 1.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tw., så ligger nivåene høyt. Det harmonerer imidlertid meget godt med verdien 2.1 ± 1.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tw. som angis av D'Eustachio og Johnson (1968), som tidligere referert (2.1).

Noen nærmere diskusjon av resultatene er det neppe grunnlag for på basis av såvidt få data, men en kan slå fast at ATP-nivået i en aktivslamkultur viser signifikante og systematiske variasjoner. I relasjon til parametre som oksygenopptak, FSS driftskontroll, da analysen er rask og kan gi hurtig feed-back til operatøren. Den grunnleggende viten om hva ATP-nivået i kulturen egentlig gir uttrykk for mangler imidlertid i stor



FIGUR 6.4.1

Forholdet mellom oksygenopptak (Q_{O_2}) med/uten acetattilsetning og ATP, som funksjon av belastningen (Q) av avløpsvann i 3 kontinuerlige aktivslamkulturer.

grad idag. ATP-analyser vil særlig være velegnet til hurtig deteksjon av forgiftninger ved tilførsel av tungmetaller og lignende (Brezonik og Patterson 1971).

7 ATP-NIVÅ VED DYRKING AV Fusarium sp. NIVA E 70 I KJEMOSTAT.

7.1 Innledning

Som tidligere nevnt (2.1), har en ikke funnet publiserte data over ATP-nivået i sopp annet enn et gammelt tall for Saccharomyces cerevisiae, men en kjenner til at de analyser som er utført, viser at nivået er i god overensstemmelse med nivået i bakterier og alger (Holm-Hansen pers.med.). For ytterligere å klarlegge dette, har en bestemt ATP-nivået i relasjon til veksthastighet og oksygenopptak under "transition state" og "steady state" ved dyrking av Fusarium sp. NIVA E 70 i kjemostat. Dette inngår som et mindre ledd i en hovedoppgave over soppens vekstfysiologi i kjemostat utført ved Institutt for teknisk biokjemi, NTH, høsten 1971 (Laake 1971). For nærmere beskrivelse av forsøksbetingelser og apparatur, må en henwise til dette arbeidet.

7.2 Forsøk og resultater.

Fusarium sp. ble dyrket på et syntetisk, glukosebegrensende medium bestående av 0.05 % glukose, 0.025 % NH₄Cl samt salter og mineraler i overskudd. Kulturen ble holdt i kraftig turbulens med magnetrører og tilført luft i overskudd ved temperatur 32[±] 1°C og pH 7.0[±] 0.2.

En fikk dessverre store problemer med bakterieinfeksjoner i kulturen, noe som vesentlig skyldtes svært gunstige vekstvilkår for bakterier, men en har analysert ATP ved to forskjellige veksthastigheter under tilnærmet "steady state" forhold:

Spesifikk veksthastighet μ (h ⁻¹)	ATP-nivå (μ g ATP/mg tw.)	
	Variasjon	Middel
0.020	2.42-4.20	3.31
0.040	2.78-4.88	3.77

Tabell 7.2.1 Analyseverdier for ATP-nivå i Fusarium sp. under glukosebegrenset vekst i kjemostat.

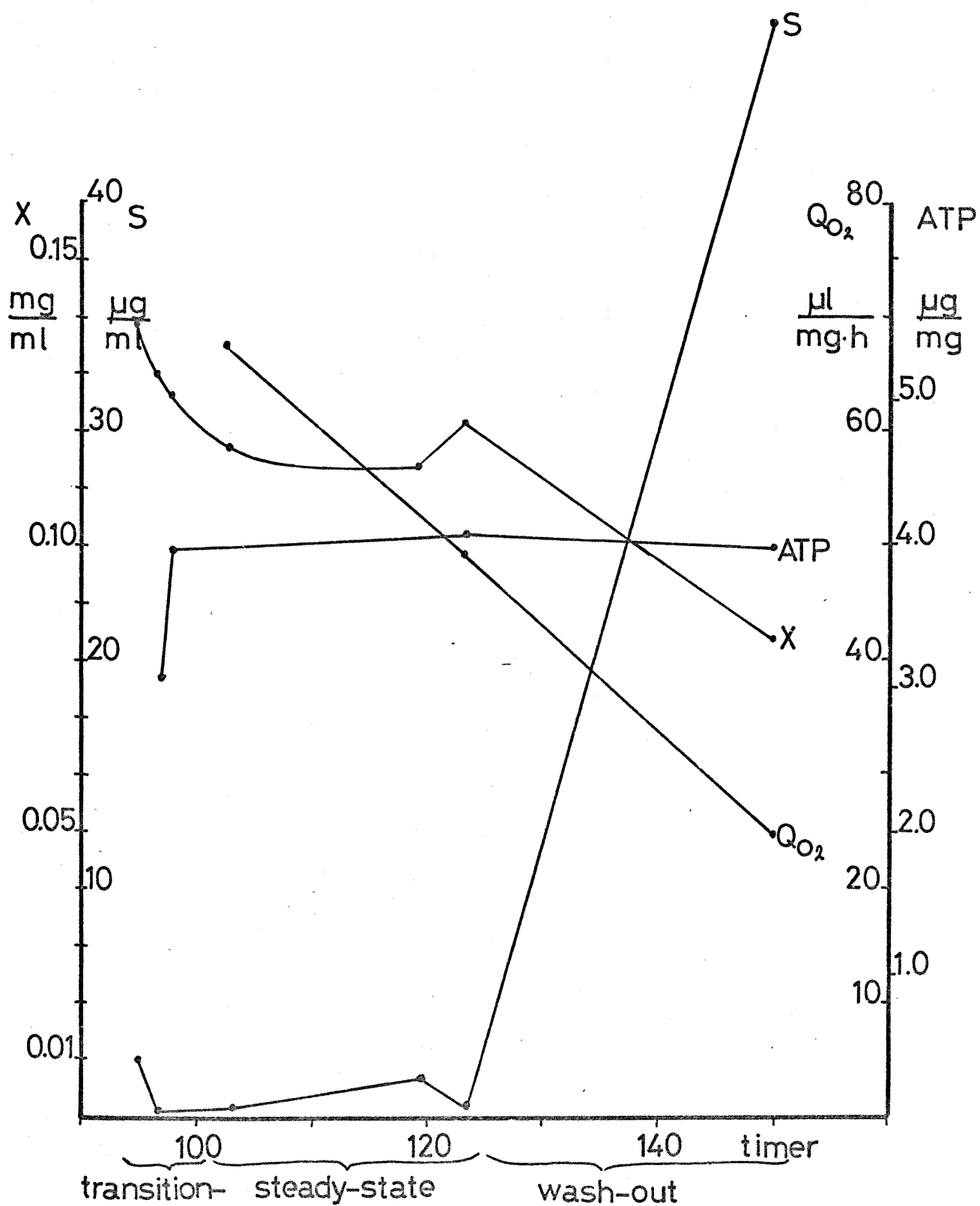
Under veksthastigheten 0.040 h^{-1} , som er ca 30 % av maksimal veksthastighet for soppen, har en fulgt variasjonene i tørrvekt (x), substratkonsentrasjon (S), respirasjon (Q_{O_2}) og ATP som funksjon av tiden under "transition state", "steady state" og utvasking som følge av infeksjon, som vist i fig. 7.2.2.

7.3 Diskusjon

På basis av data for veksthastigheten 0.04 h^{-1} , kan en anslå ATP-nivået i Fusarium sp. til $3.8 \pm 0.5 \mu\text{g ATP/mg tørrvekt}$, eller $0.38 \pm 0.05 \%$. Dette er et nivå som er i meget god overensstemmelse med nyere verdier for andre organismer (tab. 2.5.1).

Av fig. 7.2.2 ser en videre at ATP-nivået under sterkt begrenset vekst (transition state) kan ligge 20 - 30 % lavere, noe som også bekreftes av verdiene for veksthastigheten 0.02 h^{-1} (fig. 7.2.1). En kan tenke seg at nivået under eksponensiell vekst vil ligge noe høyere, og en fysiologisk variasjon i ATP-nivået i levende celler på $\pm 30 \%$ synes å være et realistisk anslag, noe som også harmonerer godt med tidligere antagelser (2.2). Bemerkelsesverdig er antydning om at ATP ikke varierer med respirasjon, og heller ikke svarer på at cellene slutter å dele seg og istedet synes å danne lagringsprodukter og hvilestadier, hvilket var tilfellet under utvaskingen. Stagnasjonen i veksten skyldtes trolig veksthemmende stoffer utskilt av bakterier - eller av soppen selv.

Standardavviket for middelveiden av to parallelle ATP-prøver ble beregnet til $\pm 12 \%$, og dette er såvidt mye at en ikke kan trekke sikre konklusjoner, men en kan trygt si at resultatene viser endel interessante problemstillinger, som vil kunne belyses ved nærmere undersøkelser etter de samme linjer.



FIGUR 7.2.2

Variasjoner i tørrvekt (x), glukose (S), respirasjon (Q_{O_2}) og ATP-nivå i en kultur av *Fusarium* NIVA E-70 i kjemostat. Veksthastighet 0.04 h^{-1} , pH 7 og 32°C på glukosebegrensende, syntetisk medium. Etter Laake (1971).

8 SAMMENDRAG OG KONKLUSJON

En har med tanke på å anvende adenosintrifosfat (ATP) som et mål på biomasse i forsøksresipienter for rensset avløpsvann, gjennomført litteraturstudier og enkle forsøk med prøvetaking, ekstraksjon og analyse. En har dessuten utført analyser i aktivslamforsøksanlegg og på Fusarium sp. (Deuteromycetes) i kjemostat.

Den mest vesentlige litteraturen på området er dekket frem til juli 1971, og en har ved gjennomgåelsen lagt vekt på å få et overblikk over anvendelsesområder, metoder for prøvetaking og ekstraksjon samt analysemetoder. De konkrete økologiske, fysiologiske eller biokjemiske vurderinger anvendelsen av ATP-analyser har gitt opphav til, er imidlertid utelatt her. Videre har en forsøkt å samle tilgjengelige data over ATP-nivået i forskjellige organismer.

Tidligere arbeider på området viser klart at ATP er den hittil mest generelle og spesifikke parameter for å uttrykke biomasse kvantitativt under varierende prøvetakingsbetingelser. Selvom ATP-nivået varierer noe fra art til art og innen den enkelte celle, så er ikke variasjonene større enn at nivået gir et meget godt grunnlag for kvantitativ estimering av mikrobiell og fytoplanktonisk biomasse i artsmessig heterogene økosystemer.

En må imidlertid være oppmerksom på at anaerobe forhold for bakterier kan redusere det normale ATP-nivået i cellene betraktelig (Strange, Wade og Dark 1963), og at nivået også reduseres i aldrende celler og ved ekstrem substratmangel (Hamilton og Holm-Hansen 1967). I alger synker nivået ved ekstrem N- og P-mangel (Holm-Hansen 1970), men dette bør en kunne korrigere for når slike forhold foreligger. Videre representerer ATP-nivået trolig det samlede cellulære nivå av energirike trifosfater (Patterson, Brezonik og Putnam 1970), men dette er av underordnet betydning for metodens anvendbarhet.

Analysen baseres på at ATP er et spesifikt substrat for enzymet luciferase, som via coenzymet luciferin produserer ildfluenes (Photinus pyralis) lanternelys. Luciferase er som andre enzymer, utsatt for inhibitorer, særlig tungmetaller og andre uorganiske ioner. Generelt må derfor ionestyrken i ATP-ekstraktet holdes så lavt som mulig, og i særlige tilfeller kan det være nødvendig å anvende f.eks. ionebyttere for å rense ekstraktet. Saltvannsprøver må filtreres før ekstraksjonen. Innstillingen av scintillasjonstelleren kan trolig optimaliseres ytterligere mot øket følsomhet (Stanley og Williams 1969).

Ved anvendelse på naturlige økosystemer er det således en rekke forhold som vil innvirke både på ekstraksjon, analyse og vurdering av resultatene, og en bør planlegge prøvetakings- og ekstraksjonsprosedyren nøye med henblikk på det aktuelle system for å redusere feilkildene i størst mulig grad.

De forsøk som er utført, viser at en i ATP har en meget følsom parameter for å estimere biomassen i forsøksresipienter for rensset avløpsvann, særlig i kombinasjon med klorofyll- og tørrvektsanalyser. Ved en videre systematisk kombinasjon og analyse av disse data, vil en trolig kunne karakterisere en resipients respons på ulike belastninger kvantitativt. Den prøvetakings- og ekstraksjonsmetodikk en har kommet fram til, vil trolig gi godt reproduserbare og representative ATP-verdier når den gjennomføres konsekvent. Forholdene ved prøvetaking for renner belastet med kjemisk rensset avløpsvann bør imidlertid undersøkes nærmere.

Tross sparsomme data, må en karakterisere resultatet av ATP-analysene på aktivslamkulturer som svært løfterike, og en bør straks innføre ATP i analyseprogrammet ved rensetekniske forsøk. Ved korrelasjon med tradisjonelle, rensetekniske parametre vil en da få en dypere forståelse for hva ATP-nivået står for i denne sammenheng, og forhåpentlig kunne utnytte ATP ved driftskontroll og prosess-optimalisering.

ATP-nivået er også forsøkt analysert på en heterotrof organisme i kjemostat. Ved dyrking av organismer i renkultur vil en kunne få nærmere kunnskap om hva cellens ATP-nivå betyr i relasjon til andre fysiologiske parametre, som oksygenopptak, fotosyntese, klorofyllnivå, protein, DNA og viabilitet. Det er allerede utført endel arbeid i denne retning i en slik grad at ATP-nivået kan utnyttes i praktisk økologisk sammenheng, men mye mangler enda. Det vil særlig være av interesse å undersøke om ATP kan utnyttes ved produksjonsmålinger, analyse av "energy flow" og måling av nedbrytningshastigheter; i det hele tatt kunne gi oss dynamiske størrelser i tillegg til statisk biomasse. Forsøk i kontinuerlig kultur (kjemostat) og dialysekultur vil her være til stor nytte.

9 LITTERATURHENVISNINGER

Aledort, L.M., R.I. Weed og S.B. Troup (1966); Ionic effects on firefly bioluminescence assay of red blood cell ATP. *Anal. Biochem.* 17: 268-277

Atkinson, D.E. (1969); Regulation of enzyme function. *Ann.Rev. Microbiol.* 23: 47-68.

Balmér, P. og T. Traaen (1972); Rensing av avløpsvann, stabilisering og avvanning av slam. Fremdriftsrapport nr. 1. PRA 2. Norsk Inst. for Vannforskning, Oslo.

Brezonik 1)

Brock, T.D. (1971); *Bact.Rev.* 35 (1): 39-58.

Chappelle, E.W. og G.V. Levin (1968); *Biochem. Med.* 2(1): 41-52.

Cole, H.A., J.W.T. Wimpenny og D.E. Huges (1967); *Biochem. Biophys. Acta*, 143: 445-453.

D'Eustachio, A.J., og D.R. Johnson (1968); *Fed.Proc.* 27: 761-

Dumas, R., og M. Filia (1969); Evaluation de la matière organique vivant dans les eaux marines par la mesure de l'adénosine triphosphate. *Mar.Biol.* 3: 243-246.

Ernst, W. (1970); ATP als Indikator für die Biomasse mariner sedimente. *Oecologia (Berl.)* 5: 56-60.

Forrest, W.W. (1965); Adenosine triphosphate pool during the growth cycle in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 90: 1013-1016.

Grylls, F.S.M. (1961); The chemical composition of yeasts, p.1050-1053. In C.Long (ed.); *Biochemist's Handbook*. van Nostrand, New York, N.Y.

Hamilton, R.D., og O. Holm-Hansen (1967); Adenosine triphosphate content of marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 12: 319-324.

Hamilton, R.D., O. Holm-Hansen og J.D. Strickland (1968); Notes on the occurrence of living microscopic organisms in deep water. *Deep Sea Research* 15: 651-656.

Hastings, J.W. (1968); *Ann.Rev. Biochem.* 37: 603.

Holm-Hansen, O., og C.R. Booth (1966); The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.* 11: 510-519.

Holm-Hansen, O.(1969); Determination of microbial biomass in ocean profiles. *Limnol. Oceanogr.* 14: 740-747.

Holm-Hansen, O.(1970); ATP-levels in algal cells as influenced by environmental conditions. *Plant & Cell Physiol.* 11: 689-700.

Holm-Hansen, O. (1972); pers.med. NIVA kollokvium.

Johansen, O.J. (1972); Teoretisk og eksperimentell undersøkelse av aktivslam-prosessen. Kinetikk ved kontinuerlige og diskontinuerlige reaktorer i laboratoriemålestokk. NIVA, Blindern, Oslo.

Laake, M. (1971); Vekstfysiologiske undersøkelser av Fusarium sp. NIVA E 70 (Deuteromycetes) i kjemostat. Hovedoppgave, Inst.for Teknisk Biokjemi, NTH.

Lee, C.C., R.F. Harris, J.D.D. Williams, J.K. Syers og D.E. Armstrong (1971); ATP in lake sediments. *Soil.Sci. Soc.Amer.Proc.* 35: 82-91.

Lee, C.C. R.F. Harris, J.K. Syers og D.E. Armstrong (1971); Adenosine triphosphate content of Selenastrum capricornutum. *Appl.Microbiol.* 21(5): 957-958.

Lehninger, A.L. (1965); Bioenergetics. Benjamin, Inc., New York, N.Y.

MacLeod, N.H., E.W. Chappelle og A.M. Crawford (1969); Nature 223(5203): 267-268.

McElroy, W.D., og B.L. Strehler (1949); Arch.Biochem. Biophys. 22: 520.

NIVA (1970); Metoder for prøvetaking, Kjelleranlegget. Intern publ., NIVA, Oslo 1970.

Packard Instrument Comp., Inc. (1966); Operation Manual Model 3375, 3000 Series Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer System, Preliminary Manual 2040.

Patterson, J.W., P.L. Brezonik og H.D. Putnam (1970); Measurement and significance of adenosine triphosphate in activated sludge. Envir. Sci.Techn. 4 (7): 569-575.

Prydz, H., og L.O. Frøholm (1964); The use of a recording Beckman D.B. Spectrometer for the assay of ATP with a luciferin-luciferase reagent. Acta Chem. Scand. 18: 554-556.

Stanley, P.E., og S.G. Williams (1969); Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. Anal.Biochem. 29(3):381-392.

Strange, R.E., H.E. Wade og F.A. Dark (1963); Effect of starvation on adenosine triphosphate concentration in Aerobacter aerogenes. Nature 199 (4888):55-57.

Syrett, P.J (1958); Respiration rate and internal adenosine triphosphate concentration in Chlorella. Arch. Biochem. Biophys. 75: 117-124.

1) Brezonik, P.L., og J.W. Patterson (1971); Activated sludge ATP; effects of environmental stress. J. Sanit.Eng.Div 6: 813-824.