

Eine verbesserte Methode zur Bestimmung von ATP in Seewasser

VON LORE HOFER-SIEGRIST

Eidg. Technische Hochschule Zürich,
Institut für Gewässerschutz und Wassertechnologie¹⁾

Manuskript eingegangen am 12. Februar 1976

SUMMARY

Improved Method for the Determination of ATP in Lakewater

An improved method for the determination of ATP in lakewater is described. The process can be usefully applied in limnological routine analyses by deep freezing filter residue samples in liquid nitrogen, which can then be transported to the laboratory. Possible sampling and processing errors are discussed.

1. Einleitung

Die Biomasse («standing crop») des Seenplanktons ist für manche limnologischen Fragestellungen eine unerlässliche Messgrösse. Ihre Berechnung durch Direktzählung im Mikroskop [11] und Multiplikation mit den entsprechenden durchschnittlichen Volumina liefert zwar die Menge der biologischen Substanz, jedoch ohne etwas über die Aktivität der Organismen zur Zeit der Fixierung auszusagen. Den Berechnungen der Biomasse durch Bestimmung chemischer Pauschalparameter wie partikulärem N, P oder C haftet ebenfalls der Nachteil an, nicht zwischen lebendem Material und Detritus unterscheiden zu können. Mit der Bestimmung der Phytopigmente wird zwar ausschliesslich pflanzliche Biomasse erfasst, ohne aber lebende und tote auseinanderzuhalten.

Die im folgenden beschriebene Methode erfasst das Adenosintriphosphat (ATP), das als notwendiger Energieträger in jeder lebenden pflanzlichen und tierischen Zelle vorhanden ist. Da ATP in toten Zellen nicht vorkommt, ist es als Indikator für lebende Biomasse geeignet [4, 6], jedoch mit der Einschränkung, dass die bisherige Methodik eine sofortige Verarbeitung der Proben unter Laborbedingungen (z. B. auf Forschungsschiff) erfordert; unter den Bedingungen der limnologischen Feldarbeit (d. h. kleine, meist offene Boote, ohne Laboreinrich-

¹⁾ Die Arbeit wurde an der Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) ausgeführt.

tungen) ist sie nicht ausführbar. Mit der vorliegenden Arbeit wird versucht, diese Lücke zu schliessen.

2. Problemstellung

Verschiedentlich wurde nachgewiesen, dass der ATP-Gehalt von Organismen sehr rasch auf Veränderungen der Umweltbedingungen (z. B. Nährstoffe, Licht) reagiert [1, 5, 7, 10]. Zusätzlich wird vermutet, dass auch mechanischer Stress den ATP-Gehalt einer Zelle beeinflusst [3]. Aus Versuchen mit gut wachsenden Labor-kulturen von Phytoplankton mit ausreichendem Angebot an Nährstoffen und je einem Störfaktor darf sicher geschlossen werden, dass sich die Organismen nach einer gewissen Zeit wieder erholen und der ATP-Gehalt letztlich konstant bleibt [5, 7]. Eigene Versuche mit *Chlorella vulgaris* aus einer Chemostatkultur zeigten jedoch selbst unter idealen Bedingungen eine Wahrscheinlichkeit für Effekt von 0,99 für Schütteln und von 0,97 für Licht-Dunkel-Variationen.

Eine Analyse von Seewasser erfordert im allgemeinen einen längeren Transport der geschöpften Probe ins Labor. Die Aktivitätsänderungen der einzelnen Organismen in der heterogenen Biomasse von Bakterien, Phyto- und Zooplankton während dieses Transportes in den Probeflaschen sind mannigfaltig und über-lappen sich gegenseitig. Die Berechnung eines «Transportfaktors» ist unmöglich.

Um alle Veränderungen minimal zu halten, wird das Plankton in dieser Methode so schnell als möglich konserviert. Eine Faktoranalyse mit Versuchswerten dieser Methode und mit Werten von stundenlang transportiertem Seewasser ergibt eine Wahrscheinlichkeit von 0,99 für einen Effekt des Transportes.

3. Material und Geräte

Probenahme:

- Glasfaserfilter GF/C \varnothing 5 cm, Filtrierapparat Millipore,
- Dewar-Gefäss mit etwa 1 Liter flüssigem Stickstoff (Haltbarkeit des Stickstoffs: etwa 10 Stunden),
- sterile Zentrifugenröhrchen 10 ml.

Extraktion:

- Kalte HClO_4 p. a. (7%),
- KOH p. a. (2 M) zur Neutralisation,
- Laborzentrifuge,
- H_2O bidest., steril: für alle Lösungen,
- Standard: 10^{-2} g ATP/l, gelöst in Tris-Puffer (0,02 M), wird bei -20°C in kleinen Portionen aufbewahrt.

Messung:

- Du Pont Enzym-Kit: Puffer, Luziferin/Luziferase lyophilisiert; Rehydratation mit 3 ml H_2O bidest., steril; Verwendung nach 12 Stunden in abgedunkeltem Reagenzglas bei 4°C ,
- 50 μl Enzymlösung + 500 μl ATP-Lösung,
- JRB-ATP-Photometer (JRB Inc., La Jolla, Calif.).

4. Methodik

a) Probenahme

HOLM-HANSEN [4] entwickelte eine Methode zur Verarbeitung von Filtrerrückständen in kochendem Tris-Puffer und wendet sie auch auf See an. Im offenen Boot erwies sich dieses Verfahren als undurchführbar. Es ist bei kühlerem Wetter praktisch unmöglich, den Puffer auf die maximal erreichbare Temperatur von 98 °C (Vierwaldstättersee, 434 m ü. M.) zu bringen und nach Zugabe des Filters auf diesem Wert zu halten. Zudem zeigten Versuche von PATTERSON [8] mit Bakterien, dass die Extraktion von ATP bei Puffertemperaturen unter 100 °C stark vermindert ist.

Als Alternative zur Verarbeitung auf dem See oder zum problematischen Transport des Seewassers ins Labor wird die Probe im Boot sofort nach Entnahme durch Glasfaserfilter schonend filtriert. Wie Filtrationsversuche mit Glasfaser- oder Membranfiltern zeigten, ist der «Filtrationsstress» bei letzteren stärker, die erhaltenen Werte liegen zu hoch [2]. Nach beendeter Filtration wird das Filter sofort in flüssigen Stickstoff eingetaucht, der in einem Dewar-Gefäß mitgenommen wurde. Das Plankton wird auf diese Weise so schnell gefroren, dass Veränderungen des ATP-Gehalts der Zelle mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,95 auszuschliessen sind. Die gefrorenen Filter kommen in ein Zentrifugenröhrchen, das verschlossen und in den Stickstoff gelegt wird. Hier bleibt das Plankton bei -196 °C konserviert und wird in diesem Zustand ins Labor transportiert.

b) Extraktion

Kritisch bei jeder Erfassung von ATP ist die Aktivität der ATPase. Das Extraktionsmedium muss möglichst schnell die Zellwand durchdringen und die ATPase inaktivieren. Bei der Methode nach HOLM-HANSEN [4] mit kochendem Tris-Puffer wird dieser Schritt wahrscheinlich bei erniedrigter Temperatur verlangsamt, was in einer geringeren Menge von extrahiertem ATP resultiert. Eine Extraktion mit kalter Perchlorsäure, wie hier vorgeschlagen, erfüllt diese Bedingungen.

Die Reagenzgläser mit den gefrorenen Filtern werden in ein Eiswasserbad gestellt und jeder Filter mit kalter Perchlorsäure (7%) übergossen. Während der Extraktionszeit von 20 Minuten werden die Filter und die Lösung 2-3mal auf einem Reagenzienmischer aufgerührt. Das Plankton taut in der Säure auf, wobei der niedere pH die ATPase sofort inaktiviert, die Zellwände lysiert und das ATP extrahiert. Die Extraktion in der Säure ist sehr schnell, wird aber von einer Hydrolyse von ATP überlagert. Nach 2 Minuten sind bereits 50% des gesamten ATP extrahiert, das Maximum wird aber erst nach 20 Minuten erreicht. Der Zerfall von ATP beträgt unter diesen Bedingungen $e^{-0,004 \cdot t}$ (t : Zeit in Minuten), d. h. etwa 21% pro 60 Minuten. Eine Simulation der Extraktionskurve, d. h. Extraktion minus Hydrolyse, ist in Abb. 1 dargestellt. Eine Variation der Extraktionszeit mit *Chlorella vulgaris* ergab die eingesetzten Messwerte.

Die Lösung wird nach 20 Minuten mit 2 M KOH neutralisiert und das ausgefällte Kaliumchlorat abzentrifugiert. Damit wird einerseits die Hydrolyse von ATP

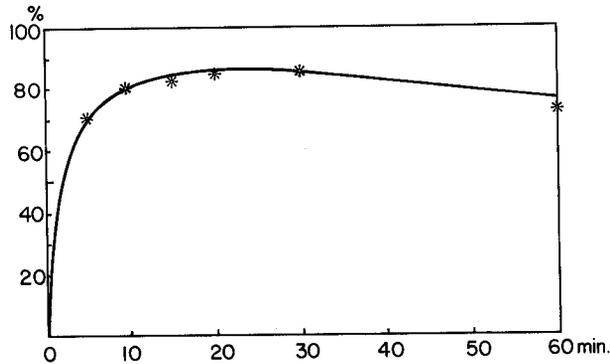


Abb. 1. Simulierte Extraktionskurve mit Messwerten.
Fig. 1. Simulated extraction curve with values measured.

gestoppt, andererseits die Bedingungen für die Reaktion mit Luziferin/Luziferase (pH, Fremdionen) optimiert. Die ATP-Lösung kann nun sofort gemessen werden. Soll der Extrakt aufbewahrt werden, so empfiehlt sich die Überführung eines Aliquots (z. B. 1:100) in Tris-Puffer, worin ATP bei -20°C einige Monate stabil bleibt [9].

c) Messung

Vor der Messung werden die Proben wenn nötig aufgetaut, aufgerührt und dann etwa 30 Minuten ruhig stehen gelassen, um die Sauerstoffverhältnisse in der Lösung zu stabilisieren. Die Reaktion von ATP mit Luziferin/Luziferase ist sowohl sauerstoff- als auch temperaturempfindlich. Es empfiehlt sich deshalb, die Proben in einem Wasserbad von 20°C zu thermostatisieren und sie vor Bewegung, Aufrühren oder Schütteln zu schützen.

Um bei der Messung mit Luziferin/Luziferase eine gute Reproduzierbarkeit zu erhalten, müssen einige Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden:

1. Die Küvetten müssen peinlichst sauber sein. Das Waschen der Küvetten gleich nach der Messung auf einem Küvettenspüler mit destilliertem Wasser, Äthanol und Aceton hat sich als praktisch erwiesen.
2. Die meisten Küvetten gläser phosphoreszieren und stören dadurch die Resultate. Eine Aufbewahrung im Dunkeln, z. B. einer Schublade, und Abdunkeln des Messraums gegen Tageslicht schalten diesen Störeffekt aus.
3. Auch die gut gereinigten käuflichen Präparate von lyophilisiertem Luziferin und Luziferase (SIGMA, DU PONT) geben nach der Hydratation einen hohen schwankenden «background». Bei Verwendung des rehydratisierten Enzympräparates nach etwa 12 Stunden bei 4°C und in abgedunkeltem Reagenzglas bleibt der «background» konstant.

Vorgehen:

10 Minuten vor der Messung werden in jede Küvette $50\ \mu\text{l}$ Enzymlösung abgefüllt und nachher im Dunkeln ruhig stehen gelassen, damit sich der «background» (Sauerstoffeintrag durch Pipettieren) «beruhigt». Unmittelbar vor der Messung

wird die Küvette herausgenommen, 500 μ l ATP-Lösung zugegeben und 10 Sekunden leicht geschüttelt, um die Lösungen gut zu mischen. Die Küvette wird ins Photometer gestellt, und 15 Sekunden nach der Injektion beginnt die automatische Messperiode von 1 Minute.

5. Nachweisbereich

Das JRB-ATP-Photometer erfasst bei höchster Empfindlichkeitsstufe 10^{-9} g ATP/l. Bei dieser niederen Konzentration liegt der Zählbereich jedoch in der Größenordnung des konstanten absoluten Fehlers der Methodik. Eine Anreicherung der Probe auf etwa 10^{-7} g/l ist daher empfehlenswert. Der Gehalt an ATP in mesotrophen Seen beträgt etwa 10^{-8} bis 10^{-4} g/l. Mit einer Filtrationsmenge von 0,5 bis 1 Liter Seewasser kann der optimale Messbereich erreicht werden.

Schwankungen der Enzymaktivität ergeben bei repetierten Messungen eine Messgenauigkeit von $\pm 5\%$. Die Verarbeitung von Seewasser in Parallelversuchen führt zu einer Streuung von $\pm 10\%$.

Herrn Dipl.-Natw. H. Bühler danke ich für seine Hilfe bei der mathematischen Verarbeitung meiner Daten. Herrn Dipl.-Chem. E. Szabó und Herrn A. Schlatter verdanke ich viele Hinweise zur Technik der Messung.

6. Zusammenfassung

Es wird eine verbesserte Methodik zur Erfassung von ATP im Wasser von Binnenseen vorgeschlagen. Die Arbeitsgänge, die unter den Bedingungen der limnologischen Feldarbeit nicht durchführbar sind, erfolgen nach dem Transport der im Feld gewonnenen Filtrerrückstände in flüssigem Stickstoff im Labor. Dadurch ist es möglich, die Methode für limnologische Routinearbeiten einzusetzen. Die Fehlermöglichkeiten bei Probenahme und Verarbeitung werden beschrieben.

RÉSUMÉ

Méthode améliorée pour la détermination d'ATP dans l'eau des lacs

Une méthode améliorée pour la détermination d'ATP dans l'eau des lacs est présentée. Il est possible d'appliquer cette méthode au travail de routine en limnologie, en transportant les résidus sur filtre dans l'azote liquide. Les manipulations suivantes sont faites en laboratoire. Les possibilités d'erreur par le prélèvement des échantillons et l'analyse sont décrites.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] COLE, H.A., WIMPENNY, J.W.T., and HUGHES, D.E., *The ATP Pool in Escherichia coli*, Biochim. Biophys. Acta 143, 445-453 (1967).
- [2] HOFER-SIEGRIST, L., *Die Bestimmung der Plankton-Biomasse*, Diplomarbeit ETH (1972).
- [3] HOFER-SIEGRIST, L., in Vorbereitung.
- [4] HOLM-HANSEN, O., and BOOTH, CH.R., *The Measurement of ATP in the Ocean and Its Ecological Significance*, Limnol. Oceanogr. 11, 510-519 (1966).

- [5] HOLM-HANSEN, O., *ATP Levels in Algal Cells as Influenced by Environmental Conditions*, Plant Cell Physiol. 11, 689-700 (1970).
- [6] HOLM-HANSEN, O., and PAERL, H.W., *The Applicability of ATP-Determination for Estimation of Microbial Biomass and Metabolic Activity*, Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 29, Suppl., 149-168 (1972).
- [7] HOLMS, W.H., HAMILTON, I.D., and ROBERTSON, A.G., *The Rate of Turnover of the ATP Pool of Escherichia coli Growing Aerobically in Simple Defined Media*, Arch. Mikrobiol. 83, 95-109 (1972).
- [8] PATTERSON, J.W., BREZONIK, P.L., and PUTNAM, H.D., *Measurement and Significance of ATP in Activated Sludge*, Envir. Sci. Technol. 4, 569-575 (1970).
- [9] RUDD, JOHN W.M., and HAMILTON, R.D., *Measurement of ATP in Two Precambrian Shield Lakes of Northwestern Ontario*, J. Fish. Res. Board Can. 30, 1537-1546 (1973).
- [10] SYRETT, P.J., *Respiration Rate and Internal ATP-Concentration in Chlorella*, Arch. Biochem. Biophys. 75, 117-124 (1958).
- [11] UTERMÖHL, H., *Unzulänglichkeiten bei den bisherigen Einteilungen des mikroskopischen Gesichtsfeldes und ihre Beseitigung durch das Zählstreifenokular*, Z. wiss. Mikr. 44, 466-470 (1927).

Adresse der Autorin:

Lore Hofer-Siegrist, dipl. rer. nat., EAWAG, Überlandstrasse 133, CH-8600 Dübendorf, Schweiz.