Kontinuert, ”real time” måling af ATP og fysiske parametre i drikkevand

DANVA
Dansk Vand- og Spildevandsforening

DANVA
FORSKNINGS- OG UDREDNINGSPROJEKT NR. 6, 2007

Dansk Vand- og Spildevandsforening, DANVA
Danmarksvej 26, DK-8660 Skanderborg
Tlf.: +457021005. Fax: +4570210056

E-mail: danva@danva.dk
Hjemmeside: www.danva.dk

ISBN: 87-90455-76-2

© Dansk Vand- og Spildevandsforening, DANVA 2007

DANVA, CU-Test og Institut for Miljø & Ressourcer, Danmarks Tekniske Universitet

Kontinuert, ”real time” måling af ATP og fysiske parametre i drikkevand

DANVA FU projekt nr. 6

Marts 2007

Christian Ursin,
CU-Test

Charlotte Bettina Corfitzen,
Hans-Jørgen Albrechtsen,
Erik Arvin

Institut for Miljø & Ressourcer, Danmarks Tekniske Universitet

Forord

Dette projekt er opstået med udgangspunkt i behovet for kontinuert overvågning af den mikrobielle drikkevandskvalitet. Uden en kontinuert overvågning vil en del forureninger, specielt dem af relativt kort varighed, ikke blive registreret. En kontinuert overvågning vil give mulighed for et proaktivt handlingsmønster, som i sig selv vil højne sikkerheden for forbrugeren.

Projektet blev støttet med midler fra DANVA's F & U konto. Aarhus Kommunale Værker støttede opbygning af instrument til registrering af fem fysiske parametre. Desuden modtog projektet støtte fra Københavns Energi Vand ved deltagelse i sammenlignende målinger på Søndersø Vandværk og Hvidovre Vandværk, der ligeledes stillede deres faciliteter til rådighed for udførelse af praktiske måleserier på vandværket.

Der er med jævne mellemrum i projektperioden blevet fremsendt delrapporter (8 stk.) over det løbende arbejde til bevillingsgiver.

Sammenfatning

Den mikrobielle drikkevands kvalitet kontrolleres i dag med stikprøver udtaget med store intervaller, og der anvendes analysemetoder, hvor resultatet først foreligger efter 2-3 døgn. Der er derfor risiko for, at en forurening ikke opdages før vandet er forbrugt, og at forureninger af kortere varighed slet ikke registreres. Kontinuert prøvetagning kombineret med analyser, der giver svaret indenfor minutter, vil være et stærkt værktøj til forbedring af overvågningen af drikkevandskvaliteten.

Adenosin TriPhosphat (ATP) er den centrale omsætningsenhed for alle levende cellers energistofskifte og kan anvendes som mål for celledensitet ved en hurtig analyse. CU-Test råder over en α-model af et instrument til automatisk kontinuert ATP-analyse: MCCU-α-2. MCCU'en havde ved forsøgets start en række mangler og blev søgt optimeret. CU-Test anvendte en manuel laboratorie-opstilling, hvormed undersøgelser med henblik på optimering af MCCU'en blev udført. CU-Test's optimeringsarbejde blev vurderet ud fra validerede analyser foretaget af E&R DTU med kommercielt instrument.

I projektet blev der med henblik på optimering af måleprocedure arbejdet med
- effekt af medier og volumener
- intern standard
- udvælgelse af filtre
- evaluering af metoder til måling af Intracellulært-ATP
- celleoplukning

MCCU'en blev optimeret ved at
- forbedre renseprocedurer, for at mindske afsmitning imellem prøver
- udskifte reagenstermoblok, hvorved antallet af analyser, der kan foretages i automatisk modus, blev fordoblet
- forbedre termostateringen
- renovere slanger og ventiler

Erfaringer opnået i projektet giver grundlag for fremtidig forbedret udgave af MCCU'en.

Der blev opbygget en mobil enhed, Fys-Pack, til kontinuert måling af fem fysiske parametre: Temperatur, ledningsevne, turbiditet, tryk og flow. Fys-Pack udviste stor stabilitet og robusthed under drift.

Ved samtidig afprøvning af MCCU'en og Fys-Pack blev der ikke fundet direkte korrelation imellem de fysiske og mikrobiologiske parametre, men det kan ikke udelukkes at fysiske parametre kan være indikatorer for vandkvalitetsændringer. Begge instrumenter viste tydeligt variationer og gav tolkelige signaler.

Ved simuleringsforsøg blev det belyst, at ATP-analyse kan være et effektivt værktøj til detektion af forureninger i ledningsnet, f.eks. af spildevand. Kombineret med MCCU'ens kontinuerte måleteknik er der potentiale for en forbedring af overvågningen af mikrobiel drikkevandskvalitet.

Indholdsfortegnelse

1 INDLEDNING 1

2 FYS-PACK 3

2.1 UDVÆLGELSE AF SENSORER 3
2.2 OPBYGNING 4
2.3 KALIBRERING 5
2.4 TEST AF FYS-PACK 6

3 ATP 10

3.1 MÅLEPRINCIP 10
3.1.1 Reagenser 11
3.1.2 Faktorer influerende rlu-signal 12
3.1.3 ATP-fraktioner 12
3.2 MÅLEPROCEDURE I PROJEKTET 13
3.2.1 CU-Test, MCCU 13
3.2.2 CU-Test's laboratorie-opstilling 16
3.2.3 E&R DTU 17
3.3 KALIBRERING OG OPTIMERING AF ATP-ANALYSE 18
3.3.1 Effekt af medier og volumener 19
3.3.2 Intern Standard 21
3.3.3 Udvælgelse af filtre 24
3.3.4 Evaluering af metoder til måling af Intracellulært-ATP 26
3.3.5 Celleoplukning 27
3.4 OPTIMERING AF MCCU'EN 29
3.4.1 Minimering af afsmitning imellem prøver 29
3.4.2 Fordobling af antal analyser udført i automatisk modus 29
3.4.3 Forbedring af termostatering 29
3.4.4 Reparation af ventiler og slangeforbindelser 30

4 AFPRØVNINGER 31

4.1 SIMULERING AF SPILDEVANDSINDTRÆNGEN 31
4.1.1 Opsætning 31
4.1.2 Resultater 32
4.2 3-DØGNS KONTINUERT MÅLING 33
4.2.1 Opsætning 33
4.2.2 Resultater 33

5 DISKUSSION OG KONKLUSION 36

5.1 PERSPEKTIVERING 37

6 REFERENCER 38

1 Indledning

Mikrobiel drikkevandskvalitet kontrolleres i dag ved stikprøver og efterfølgende laboratorieanalyse ved hjælp af en dyrkningsbaseret kimtalsbestemmelse, hvilket tilsammen giver en række begrænsninger.

Først og fremmest har kimtalsbestemmelser en relativ lang analysetid, så resultaterne først foreligger efter 2-3 døgn, når vandet er anvendt. Sandsynligheden for at registrere en bakteriel forurening i drikkevand afhænger stærkt af forureningens varighed og prøvetagnings-hyppigheden, men kun få vandforsyninger udtager prøver hyppigere end én gang om ugen. Dette betyder, at der er meget ringe sandsynlighed for at detektere kortvarige forureninger (Boe-Hansen et al., 2003).

Kontinuert prøvetagning kombineret med analyser, der giver svar indenfor minutter ("real-time" analyse), vil sandsynligvis kunne påvise forekomst af kortvarige forureninger, som ellers normalt aldrig ville blive opdaget. "Real-time" analyse vil også være et stærkt redskab til undgå, at en mikrobiel forurening spredes eller når ud til forbrugerne, hvorved kontrollen af drikkevandskvaliteten forbedres betragteligt. Vandforsyningerne vil få mulighed for at handle proaktivt, og således højne sikkerheden for brugere.

Ændring af den kemiske vandkvalitet kan til dels følges ved kontinuert måling af en række fysiske parametre. Hvorvidt sådanne fysiske målinger i sig selv kan benyttes til at vurdere den mikrobielle vandkvalitet er tvivlsomt, men en række ændringer (fx trykfald, trykstød, variation i ledningsevne osv.) kan være årsag til eller indikere hændelser, der medfører risiko for mikrobiel forurening.

For kontinuert mikrobiologisk kontrol kræves en hurtig analysemetode med høj følsomhed. Dette kunne f.eks. være kvantificering af Adenosin TriPhosphat (ATP). ATP er den centrale omsætningsenhed for alle levende cellers energi-stofskifte, og kan således anvendes som et indirekte mål for mikrobiel aktivitet. Der er en stadig stigende interesse for ATP som kvalitetsparametre indenfor drikkevand. I Holland har det store vandinstitut KIWA Research gennem mange år målt ATP rutinemæssigt i forbindelse med vandundersøgelser, og i Finland er ATP blevet inkluderet som parameter ved drikkevandskontrol.

I det nu opløste selskab "Seashore Technology A/S" blev der udviklet en prototype til et automatisk on-line instrument til ATP-måling (MCCU-α-2). Dette apparat blev afprøvet med næsten kontinuert prøvetagning over ca. et døgn i henholdsvis Århus og København og virkede lovende, men fungerede endnu ikke perfekt, og krævede rensning eller udskiftning af slanger og ventiler før ny opstart.

Det var således i nærværende projekt ønsket at udvikle, optimere og afprøve enheder til kontinuert monitering af ATP og udvalgte fysiske parametre i forbindelse med drikkevandsforsyning og at undersøge, om kontinuert måling

af ATP eller fysiske parametre kan bidrage til vurderingen af den mikrobielle kvalitet af vand. Projektet havde en række delformål:

- Videreudvikling af MCCU-α-2 og ATP-målemetoden, samt at opbygge praktiske erfaringer med disse
- Udvikling af en mobil måleenhed til monitering af fem fysiske parametre: Temperatur, tryk, ledningsevne, turbididet og flow
- Etablering af grundlag for at vurdere, om ATP eller nogle af de fysiske parametre – evt. i kombination – i fremtiden kan anvendes som kvalitetsparametre i drikkevand
- Måling af sammenhørende værdier for de fysiske parametre samtidigt med ATP for at undersøge, om pludselige ændringer i ATP-signalet falder sammen med, og eventuelt kan forklares ud fra eller korreleres med nogle af de fysiske parametre

2 Fys-Pack

I projektet blev der udviklet en mobil måleenhed, som simultant, online kunne moniterer fem fysiske parametre: Turbiditet, tryk, ledningsevne, temperatur og flow. Denne måleenhed vil i det efterfølgende blive betegnet 'Fys-Pack'.

2.1 Udvælgelse af sensorer

Ved udvælgelsen af sensorer for de fem fysiske parametre blev der specielt lagt vægt på at finde et "on-line", "flow through" turbidimeter, der var velegnet til drikkevand. Tidligere erfaringer med en "flow through"-celle monteret i et laboratorie-turbidimeter (Lg-automatic, type HZ – 013) viste, at begroninger på cellens inderside efter kort tids brug umuliggjorde måling. Der blev vurderet turbidimetre fra Honeywell, Optek samt Wallace & Tiernan, men kun firmaet Hach Lange var leveringsdygtige af en tilfredsstillende løsning. Hach Lange har i instrumentet ULTRATURB plus SC løst problemet med begroning ved en simpel vinduesvisker-funktion, som programmeres til at renholde modulets indre overflader f. eks. én eller to gange i døgnet. Københavns Energi Vand havde endvidere gode erfaringer med Hach Lange. Ud fra disse betragtninger blev følgende sensorer indkøbt:

- Turbidimeter fra Hach Lange: ULTRATURB plus SC.
- Kombineret ledningsevne- og temperaturmåler fra Hach Lange: Type 3700 SC.
- En primær opsamlingsenhed SC1000 fra Hach Lange til opsamling af data fra tre ovennævnte sensorer. Opsamlingsenheden har et vand/stænk-tæt skærm-modul med "touch" skærm og "on screen display". SC 1000 probemodul har tilslutningsmulighed for op til seks SC-sensorer (fra Hach Lange). SC 1000 indeholder fire relæ'er og otte stk. 0/4 – 20 mA udgange (dvs. primærsignal bliver konverteret, så signal kan udtages som standard 0/4-20 mA).

Tryk- og flow-målere fra Danfoss (Siemens har siden overtaget flowmåler-systemet) blev udvalgt i samarbejde med AKV:

- Trykmåler fra Danfoss: Type MBS 5100. Trykområde 0 til 20 Bar - overbelastes ved 50 Bar; 4 – 20 mA udgang. Oprindeligt konstrueret til marine omgivelser.
- Flowmåler fra Siemens: Type Sitrans F M Magflo med målerør MAG 1100, type 7ME6110-1RA20-2AA0 og transmitter MAG 5000 IP67/NEMA 4x/6 type 7ME6910-1AA10-1AA0. Måleprincippet er baseret på en magnetisk induktiv føler; udgang 0/4 – 20 mA; flow 10-900 L per time.

Signaler fra alle enheder (udtaget som standard 0/4-20 mA) blev opsamlet via dataopsamlingsenhed/kort fra National Instruments (DAQ 6015) og videretransmitteret via USB 2.0 kabel til LabTop PC med specialskrevet LabView (ver. 8.0)-program.

2.2 Opbygning

De fem sensorer blev sat sammen med de øvrige dele på en plastplade, hvor ledningssamlinger og dataopsamling fortrinsvis blev anbragt øverst, mens vandet blev ledt gennem opstillingens nedre del (Figur 1). Opstillingen udgør en mobil enhed, der vejer under 30 kg med en højde på 105 cm og en bredde på 100 cm. Ved transport påsættes to hjul i den ene ende, og opstillingen kan således transporteres i en mindre varevogn af enkelt person.

Figur 1: Opbygning af Fys-Pack med sensorer for fem fysiske parametre. [1] Analogt manometer ved indløb til måleenhed, T-stykke til injektion af kalibreringsopløsning for turbidimeter, [2] Trykmåler, [3] Magnetventil (styres af LabView program), [4] Turbidimeter, [5] Primær dataopsamling og strømforsyning til turbidimeter samt ledningsevne- og temperaturmåler, [6] Ledningsevne- og temperaturmåler, [7] Analog trykmåler, [8] Manuel nåleventil til regulering af flow og tryk, [9] Flowmåler, [10] Dataopsamlingskort (transmitterer signaler til LabView program), [11] Kontraventil ved indløb.

Vandet tilledes via ½ tomme fleksibelt PEX rør og en kontraventil med standard ½ tomme BSP rørgevind. Efter gennemløb ledes vandet til afløb via fleksibel PVC slange. Der tilstræbes et flow igennem opstillingen på 20-30

L/h, for at sikre laminart flow. Vandets flow og tryk indreguleres ved hjælp af nåleventilen og trykmålerne. Flow aflæses på flowmåleren, og der sikres et mindre trykfald over turbidimetret for at modvirke bobledannelse. Ved meget lavt ledningstryk kan trykket hæves ved langsomtgående slangepumpe (ikke nødvendigt i dette projekt). Den analoge trykmåler anvendes kun orienterende.

2.3 Kalibrering

Tre af de fem sensorer blev kalibreret op imod referencer:

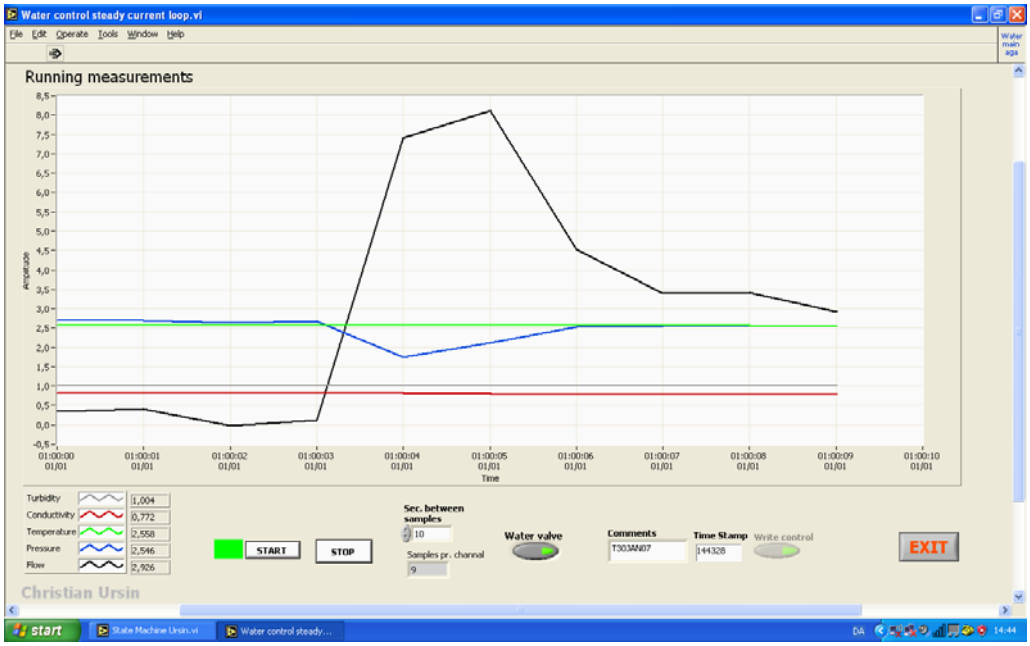
- Ledningsevnemåleren blev kalibreret ud fra en kalibreret saltopløsning (Radiometer Analytical, No. S51M003, 0,01D KCl, 140,8 mS/m 25º C)
- Temperatur ud fra et kalibreret kviksølv-termometer
- Flowmåler ved tidtagning på aftapning af valgt volumen (L/time)

Turbidimeter og trykmåler blev ikke direkte kalibreret.

Turbidimeteret kan kalibreres ved at måle en veldefineret formazin-standard, men da den er toksisk, er dette ikke brugevenligt og ikke velegnet at anvende på vandværker. Fabrikanten angiver turbidimetrets detektionsgrænse til 0,008 FNU svarende til 1 % i området 0 – 1 FNU (FNU angiver, at referencen er en formazin-standard, 1 FNU = 1 NTU: Nephelometrisk Turbididtets Unit). Reproducerbarheden angives til ± 0,5 % i området 0 – 2 FNU. Ifølge fabrikanten kan de moderne infra-røde kilder i turbidimeteret holder sig stabile i årevis. Fabrikanten leverer en ”glas-standard”, som kan anbringes i målekammeret og dermed benyttes til at vurdere, om målingen driver. Desuden kan der foretages en nul-punkts måling ved hjælp af partikelfrit vand. I projektet blev turbidimetrets visning sammenlignet med to lignende instrumenters ved serieopkobling på samme vandstrøm (se afsnit 2.4).

Trykmåleren blev grovkalibreret ved at sammenligne tre forskellige analoge instrumenter (data ikke vist).

Det største kalibreringsarbejde var at konfigurere sensorernes output og dermed input-signaler til LabView-programmet, der krævede en del redigering af konstanter og algoritmer i programmet. Signalerne blev skaleret, så alle fem parameter kunne følges i samme figur i LabView format (se eksempel i Figur 2).



Figur 2: Eksempel på LabView skærmbillede fra monitering med måleenheden.

2.4 Test af Fys-Pack

For at teste Fys-Pack'ens robusthed og stabilitet, blev den afprøvet på Søndersø vandværk i samarbejde med Københavns Energi Vand (KEV) 7. - 14. marts 2006 og på Hvidovre vandværk 3.-12. juli 2006.

På Søndersø vandværk blev alle fem parametre målt kontinuert over syv døgn med måling hvert 10. sekund. Fys-Pack'en blev tilsluttet 'afgang vandværk', og der var fra vandværkets side især interesse for at følge eventuelle ændringer i turbiditet i forbindelse med returskyl af værkets filtre. Turbiditeten blev registeret parallelt på to andre instrumenter: KEV's mobile turbidimeter af samme mærke (Hach Lange, Ultraturb plus sc)), som det, der indgår i Fys-Pack med måling hver time og dataopsamling på Gemini Tinytag Plus logger via analogt 0-20 mA udgangssignal; samt KEV's stationære turbidimeter: Great Lakes Instrument Low-Range Turbidimeter System type T53 Analyzer/Controller med 8320 sensorer – med måling hvert minut og dataoverførelse til KEV's SRO-anlæg (opstilling i Figur 3)

På Hvidovre blev alle fem fysiske parametre målt kontinuert med Fys-Pack'en over ni døgn med måling hvert minut. Fys-Pack'en var tilsluttet hane 16427 placeret efter sandfilteret, men før værkets kulfiltre.

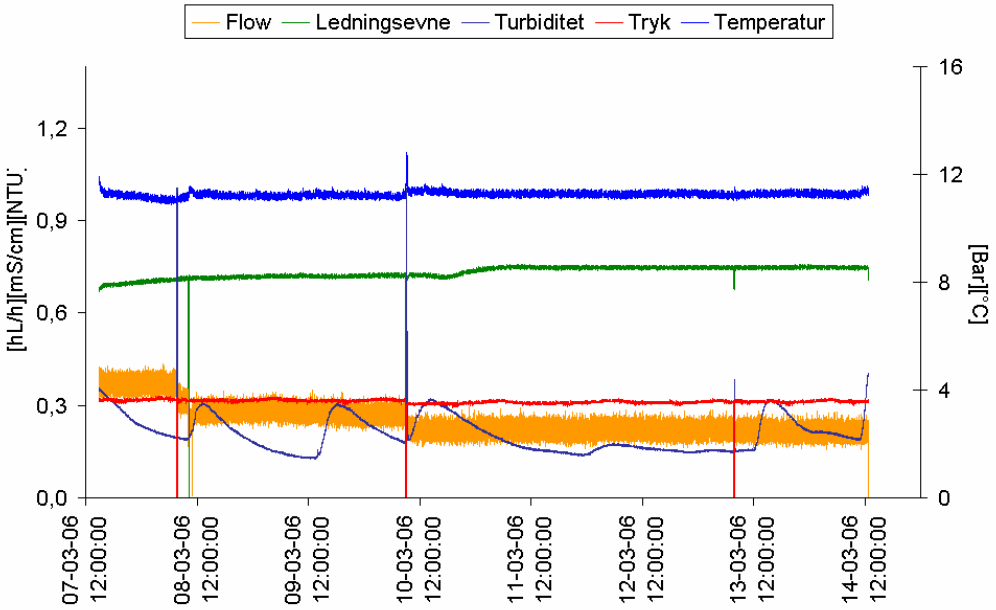
Det blev demonstreret, at Fys-Pack'en kunne opererer problemfrit over de valgte perioder med en kontinuert registrering af alle fem parametre hvert 10. sekund (Figur 4) og hvert minut (Figur 5).

Figur 3: Instrumenter anvendt ved parallelle måleserier af turbiditet på Søndersø Vandværk 7.-14. marts 2006.
[1] KEV's mobile turbiditetsmåler [2] CU-Tests Fys-Pack til registrering af fem fysiske parametre [3] KEV's stationære turbiditets-procesmåler.

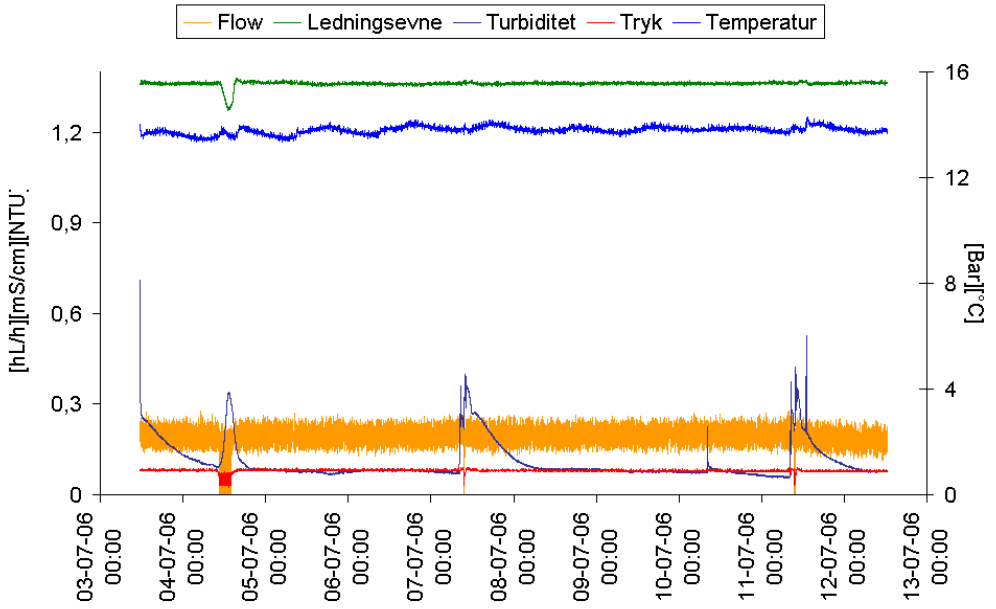
På Søndersø vandværk (Figur 4) blev det demonstreret, at flow (gennem instrumentet) kunne holdes på stabile niveauer, ved at indstille tre niveauer med faldende gennemsnitlig flow (32-40; 22-34; 17-27 L/time) over perioden. Der var der kun mindre udsving i temperatur (10,8-12,8°C), tryk (ca. 3,4-3,7 Bar) og ledningsevne (ca. 0,67-0,75 mS/cm). Turbiditeten varierede mere, med tydelige udsving ved ibrugtagning af værkets filtre efter returskyl med værdier på ca. 0,30 NTU lige efter returskyl og ca. 0,15 NTU som laveste baggrund. Turbiditetsniveauet var 10-15 timer om at stabilisere sig efter endt returskyl.

På Hvidovre vandværk (Figur 5) blev flow igennem instrumentet holdt på et stabilt niveau (14-26 L/h) over perioden. Der blev set samme mønster som på Søndersø med kun mindre udsving i temperatur (13,3-14,3°C), tryk (ca. 0,3-1,1 Bar) og ledningsevne (ca. 1,27-1,38 mS/cm). Der var ligeledes udsving i turbiditeten i forbindelse med ibrugtagning af filtre efter returskyl, med

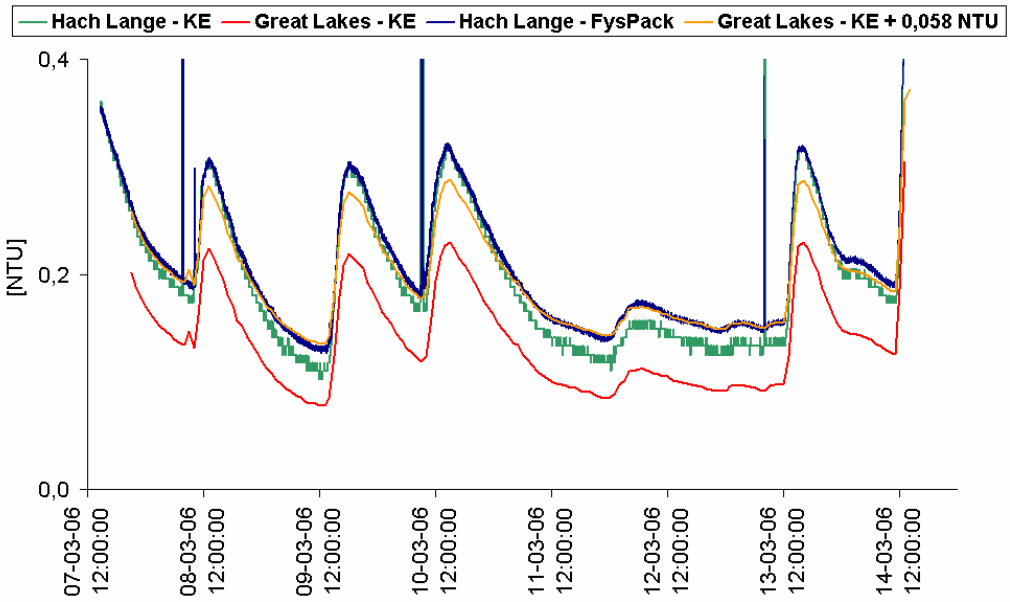
maksimale værdier efter returskyl på 0,37 NTU og 0,06 NTU som laveste baggrund, og ca. 12 timers stabiliseringstid efter returskyl.



Figur 4: Monitering af fem fysiske parameter med Fys-Pack'en over en 7-døgns periode (7.-14. marts 2006) på Søndersø vandværk. Fys-pack'en var monteret ventil 'afgang vandværk'. Lodrette udslag skyldes rutinemæssige vandprøvetagning til driftskontrol, hvorunder vandstrømmen til Fys-Pack'en kortvarigt blev afbrudt. Starten af hvert returskyl ses inden for fem minutter ved, at turbidimeter-signalet begynder at stige.



Figur 5: Monitering af fem fysiske parameter med Fys-Pack'en over en 10-døgns periode (3.-12. juli 2006) på Hvidovre vandværk. Fys-pack'en var monteret en hane efter værkets sandfiltre og før kulfiltrene. Starten af hvert returskyl ses inden for fem minutter ved, at turbidimeter-signalet begynder at stige.



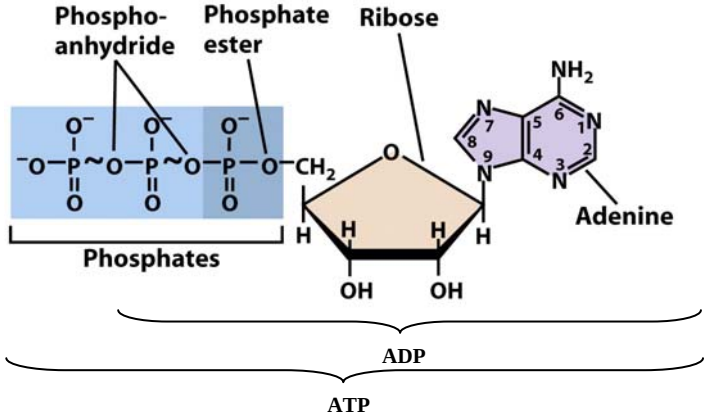
Figur 6: Turbiditet målt med tre forskellige instrumenter; KEV's permanent monterede enhed af mærket Great Lakes, KEV's mobile enhed af mærket Hach Lange og Fys-Pack'ens af mærket Hach Lange. Monitering fra ventil 'afgang vandværk' på Søndersø vandværk 7.-14. marts 2006. Lodrette udslag skyldes rutinemæssige vandprøvetagning til driftskontrol, hvorunder vandstrømmen til Fys-Pack'en kortvarigt blev afbrudt.

Alle tre anvendte turbidimetre på Søndersø Vandværk registrerede turbiditetstoppe af sammenlignelig varighed efter hvert returskyl (Figur 6). KEV's mobile enhed og med Fys-Pack'en gav sammenlignelige værdier: Høje værdier (toppe) var stort set enslydende, mens FysPack'en lå lidt højere på de lave værdier (afvigelsen var mindre end 10%). KEV's permanent monterede enhed gav langt lavere værdier end de to øvrige instrumenter. Dette skyldtes formentlig en kalibreringsfejl, da en parallelforskydning på 0,058 NTU kunne placere kurven for KEV's stationære enhed oveni kurverne for de to andre instrumentet (Figur 6), så det kun var for de højeste værdier (toppe), at KEV's stationære instrument lå lidt lavere (mindre end 10%). En generel variation indenfor 10% imellem instrumenter må betegnes som acceptabelt. En korrekt kalibrering af turbidimetre er selvfølgelig vigtig for at kontrollere, at vandet fra værkets afgang overholder gældende grænseværdier (0,3 NTU), men er mindre vigtig ved monitering af ændringer, hvor de tre turbidimetre fortalte samme historie over tid.

Det blev således demonstreret, at den opbyggede Fys-Pack fungerede, var robust med en stabil drift og gav tydeligt tolkelige respons.

3 ATP

Adenosin **T**ri**P**hosphat (ATP - Figur 7) er den energibærende enhed i alle levende celler og kan betragtes som cellens energienhed. Energi frigives ved fraspaltning af en phosphat-enhed, som omdanner **A**denosin **T**ri**P**hosphat til **A**denosine **D**i**P**hosphat.



Figur 7: Molekylestruktur af ATP (Madigan & Martinko, 2006).

De enkelte cellers ATP kan således variere afhængig af vækstfase, stresspåvirkning og stamme, men kan anvendes som et relativt mål for en prøves celleaktivitet og derved som et relativt mål for celledensitet. ATP-analysen vil i modsætning til kimtalsbestemmelser inkludere alle aktive celler og er derfor velegnet til at måle prøver med blandede bakteriesammensætning, såsom drikkevand.

3.1 Måleprincip

ATP-analyse er baseret på enzymet luciferase, der er ekstraheret fra ildfluer. Luciferase katalyserer reaktion mellem ATP, D-luciferin og ilt, hvorved ATP omdannes til ADP, og den derved frigivne energi udsendes som lys:

$$\mathrm{ATP} + \mathrm{D}\cdot\mathrm{luciferin} + \mathrm{O}_2 \xrightarrow{\mathrm{luciferase} + \mathrm{Mg}^{2+}}$$

$$\mathrm{ADP} + \mathrm{P_i} + \mathrm{oxyluciferin} + \mathrm{CO}_2 + \mathrm{energi\ (lys)}$$

Lysudsendelsen er proportional med ATP-mængden og kan registres med en photomultiplier, som angiver signalet i **r**elative **l**ight **u**nits (rlu). Ved at sammenligne rlu-signalet fra en prøve med rlu-signalet fra ATP-standard(er) kan det målte rlu-signal omsættes til en ATP-koncentration.

En ATP-analyse foregår generelt i tre hovedtrin:

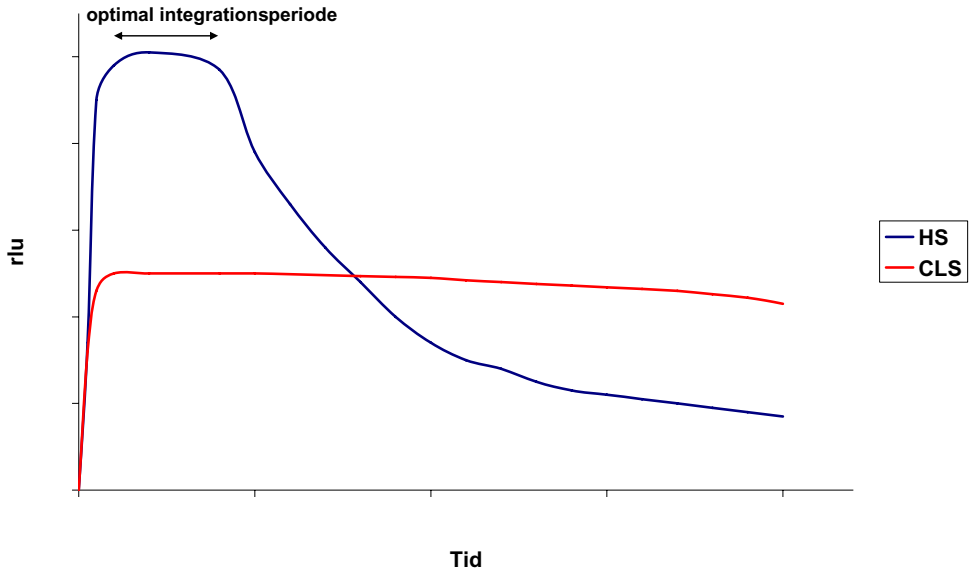
1. Ekstraktion af ATP ved oplukning af cellerne
2. Reaktion med luciferin/luciferase-reagens
3. Registrering af lysudsendelsen (rlu) i photomultiplier over fast integrationsperiode

Celler kan oplukkes på flere forskellige måder, f.eks. ved tilsætning af et ekstraktionsreagens (en detergent), som nedbryder cellemembranerne og derved frigiver ATP fra cellerne. Alternativt kan cellemembranerne nedbrydes ved varmebehandling. En kombination af ekstraktionsreagens og varmebehandling kan i visse situationer være optimalt.

3.1.1 Reagenser

Kommercielt luciferin/luciferase-reagens indeholder alle de nødvendige katalysatorer og stabilisatorer til den lysudsendende reaktion. Disse reagensblandinger kan fås i mange forskellige kvaliteter (renhed, følsomhed, pris) og reagenset må vælges efter, hvad det skal anvendes til.

Generelt kan reagenserne opdeles i to produktkategorier: **C**onstant **L**ight **S**ignal (CLS) og **H**ighpeak **S**ignal (HS). CLS-produkter resulterer i en stort set konstant lysudsendelse over tid (Figur 8), hvilket gør valget af integrationsperioden fleksibelt. CLS-produkter har imidlertid en relativ lav følsomhed, hvilket gør dem mindre egnet til analyse af prøver med relativt lave ATP-koncentrationer, som f.eks. drikkevand.



Figur 8: Skitsering af forskel i signal-output imellem HS- og CLS-produkter. Ved måling integreres der for HS- reagenset over peak-periode.

HS-produkter giver derimod et peak-signal (Figur 8), hvilket giver en langt højere følsomhed end med CLS-produkter. Aktiviteten aftager dog relativt

hurtigt, hvilket giver et aftagende signal. Når HS-produkter anvendes er det derfor meget vigtigt, at integrationstiden påbegyndes og afsluttes ens imellem prøver. I dette projekt er udelukkende anvendt HS-produkter.

Luciferin/luciferase-reagens er følsomt overfor mekanisk påvirkning og kan nedbrydes ved f.eks. ved hård omrystning (f.eks. Roche datablad). Det er endvidere ustabilt, så aktiviteten aftager over tid. Ved stuetemperatur er holdbarheden i størrelsesorden af en halv arbejdsdag, men forlænges betydeligt ved lavere temperaturer.

3.1.2 Faktorer influerende rlu-signal

Reaktionseffektiviteten under reaktionen afhænger af temperatur (optimum 22-26°C), pH (optimum 7,8) og aktivitet af luciferin/luciferase-reagenset (afhænger af tiden siden fremstilling og opbevaringstemperatur). Desuden kan selve prøven påvirke målingen, f.eks. ved indehold af stoffer, som hæmmer reaktionen, høj turbiditet (høj celletæthed eller højt partikelindhold) eller er farvet, så lysvejen til photomultiplieren hindres.

Da ATP-målemetoden er baseret på måling af lysudsendelse, er photomultiplierens følsomheden væsentlig for målingens følsomhed. Her skal der tages højde både for photomultiplierens baggrundssignal (signal/støj-forholdet), og hvor meget det målte signal opskaleres. Måling med identiske reagenser kan give vidt forskellige rlu-værdier med forskellige photomultiplierer, og sammenligning af sådanne målinger forudsætter, at rlu-værdien relateres til måling af ATP-standard og omregnes til ATP-koncentration.

3.1.3 ATP-fraktioner

ATP er intracellulært, men kan ved celledød eller høj celledelingsaktivitet frigives til vandfasen. Frit-ATP vil i reglen hurtigt blive omsat af aktive mikroorganismer og derved fjernet fra vandfasen, men en vis mængde Frit-ATP kan forekomme. Der skelnes således imellem tre ATP-fraktioner: Intracellulært-ATP, Frit-ATP og Total-ATP (= Intracellulært + Frit). Intracellulært-ATP vil formentlig give det bedste mål for densiteten af aktive celler, men Frit/Total-ATP, kan bidrage med yderligere information, idet en høj koncentration af Frit-ATP f.eks. kan tolkes som forudgående (historisk) stor celledød eller en høj bakterieaktivitet.

Historisk set har der fortrinsvis været analyseret for Total-ATP. Ved at frafiltrere celler i en vandprøve kan der analyseres direkte for Intracellulært-ATP, og da det er muligt af filtrering et større vandvolumen, er dette desuden en måde at opkoncentrere vandprøven på, hvorved større følsomhed opnås for analysen.

3.2 Måleprocedurer i projektet

I projektet blev der anvendt forskellige tilgange til ATP-analysen.

Hos CU-Test blev der som supplement til MCCU'en anvendt en fleksibel laboratorie-opstilling til udvikling, optimering og afprøvning af filtreringsmetoder og måleprocedurer. På DTU blev der målt med kommercielt tilgængeligt instrument med dertilhørende reagens-kit. I det følgende præsenteres de forskellige metoder.

E&R DTU har deltaget i europæisk ringtests og har således dokumenteret et korrekt måleniveau (f.eks. van der Kooij et al., 2006). Sammenlignende målinger imellem CU-Test og E&R DTU lå til grund for en stor del af projektets kalibreringsarbejde.

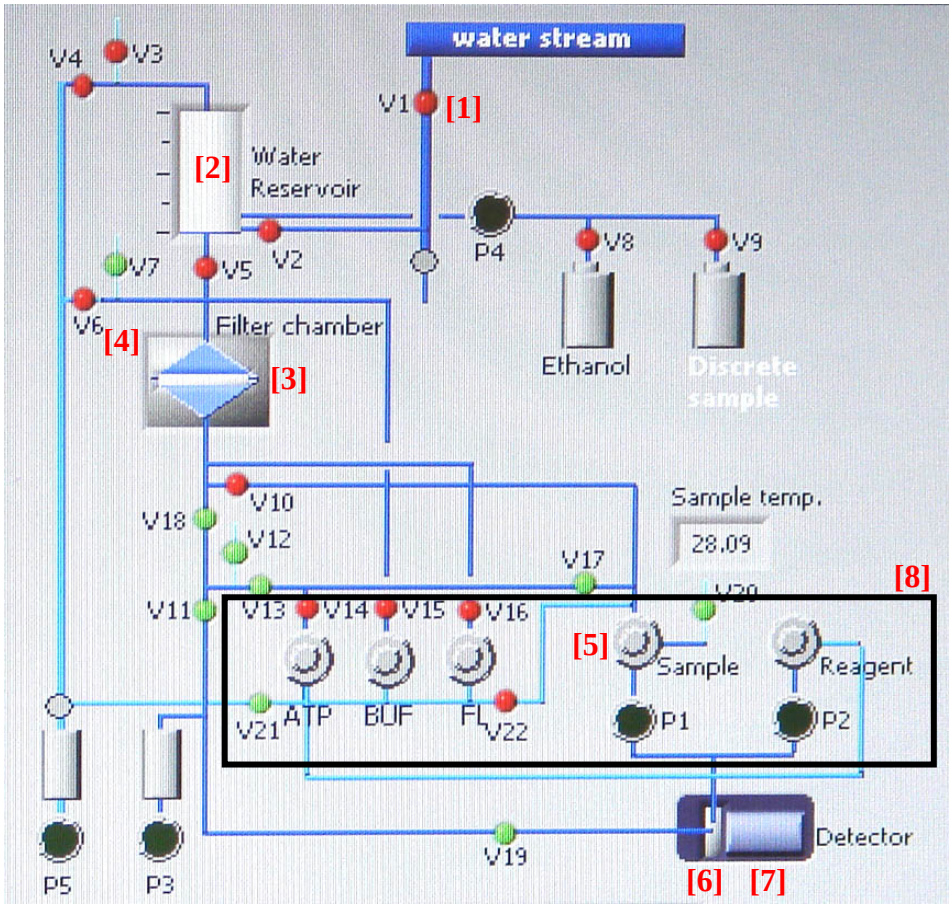
3.2.1 CU-Test, MCCU

Microbial Contamination Control Unit prototype nr. 2 (MCCU-α-2) blev udviklet i det nu opløste selskab Seashore Technology A/S. Instrumentet har tidligere kørt kontinuert flere steder i felten, men er ikke blevet decideret kalibreret, og de målte rlu-værdier er ikke blevet omregnet til ATP-niveauer.

Over en given periode prøvetager instrumentet kontinuert vand, der filtreres. Bakterierne på filtret analyseres for ATP, og MCCU'en måler således udelukkende den Intracellulære-ATP fraktion.

Figur 9 viser en oversigt over MCCU'en. MCCU'en styres via et program programmeret i LabView (Ver. 6.0) fra National Instruments, og kan programmeres til at både køre automatisk analyse over tid og til at analysere diskrete prøver.

Vand opsamles via en ventil [1] (Figur 9) over en given periode (f.eks. 15 min) i vandreservoiret [2], og når det rummer 100 mL, lukkes ventilen. Prøven filtreres igennem et PTFE membranfilter (Bola BL N169036, PTFE [3] i et PTFE filterhus) ved både tryk (1,7 Bar) og vakuum (0,1 Bar), hvorved bakteriecellerne opsamles fra vandfasen. Filteret tilsættes 2000 µL buffer til at resuspendere cellerne, der efterfølgende varmebehandles i mikrobølgefelt (800 W i tre perioder á 40 sek [4]), hvor temperaturen stiger til over 90º C. Herved oplukkes cellerne og frigiver ATP til bufferen. Bola PTFE filteret og filterhus er udvalgt til at kunne modstå påvirkningerne fra mikrobølgefeltet og tilhørende varme. Prøven overføres via tryk til et termostateret kammer [5], og når prøven er kølet til 20°C, aktiveres doseringspumper, som tilsætter luciferin/luciferase-reagens. Prøve og luciferin/luciferase-reagens blandes undervejs til reaktionskammeret [6] ved photomulitplieren [7], hvor 700 µL af prøven doseres i reaktionskammeret og lysudsendelsen registreres over 300 sek. Signalet registreres i MCCU'ens indbyggede computer. Reaktions-kammeret tømmes og filter, slangesystem og reaktionskammer renses ved skylning med buffer.

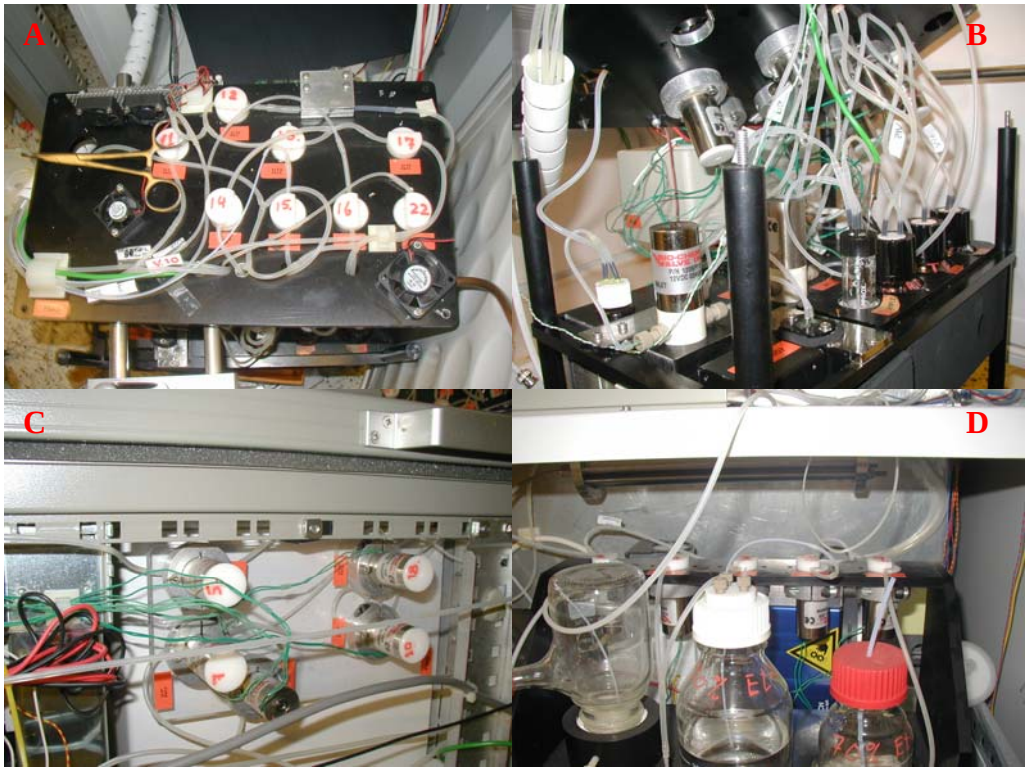


Figur 9: Skematisk skitse af MCCU-α-2. [1] Ventil, opsamling af vandprøve, [2] Vandreservoir, [3] Filter, [4] Mikrobølgefelt, [5] Termostateret kammer, [6] Reaktionskammer, [7] Photomultiplier, [8] Køleenhed, [V] Ventiler, [P] Pumper.

Reagenser opbevares i en køleenhed (5°C) [8] for at sikre deres stabilitet og dermed effektivitet. Imellem prøver kan der doseres ATP-standard til at kontrollere og korrigere for reagensernes henfald. En enkelt påfyldning af reagenser rækker til 28 målinger. Afhængigt af vandkvaliteten kan hvert enkelt filter anvendes til 10-15 prøver.

Alle elementer (Figur 10) er bygget sammen i en transportable enhed på hjul og måler samlet 175 cm i højde, 68 cm i bredden og 70 cm i dybden med en vægt på ca. 50 kg (Figur 11).

I MCCU'en anvendes reagens-kit fra Roche Diagnostics (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Cat. No. 1 699 709). Kittet består af luciferin/luciferase-reagens (af HS-typen), buffer (Tricine buffer (25 mM) Sigma T 5816, pH justeret til mellem 7,75 og 7,80) og ATP-standard salt til opløsning i bufferen.



Figur 10: MCCU'ens indre. A: Øverste dæk med V11 til V17 samt V22; B: Mellemste dæk med pumperne P1 og P2, toppen af reaktionskammeret og photomultiplieren; C: Sidepanel ved mikrobølgefelt, V5, V7, V10 og V18; D: Øverste dæk under PC med bla. vandreservoir.

Figur 11: Ydre kabinet og brugerflade af MCCU'en.

3.2.2 CU-Test's laboratorie-opstilling

For at afklare en række metodespørgsmål anvendte CU-Test en laboratorie-opstilling (Figur 12), med samme reagenser som i MCCU'en.

En vandprøve filtreres igennem et filter (centrifugefilter f.eks. Lida Macrospin) ved hjælp af et overtryks-manifold. Filteret tilsættes herefter manuelt 100 µL buffer (uden påført tryk holder filteret tæt), og placeres i en varmeblok (3 min, 80ºC - Figur 12.C [1]) for at oplukke cellerne og ekstrahere ATP. Filteret overføres manuelt til et køleaggregat (3 min ved 80ºC - Figur 12.A [2]), og efterfølgende til en separat photomulitplier-enhed (Hamamatsu - Figur 12.B [3]). Manuelt tilsættes 50 µL luciferin/luciferase-reagens, og 2 sek efter tilsætning måles signalet over 30 sek og aflæses direkte på photomulitplier-enheden. Der måles således direkte på filteret, som kasseres efter hver enkelt måling

Figur 12: CU-Test's laboratorie-opstilling.
A: [1] Detektorhus (lukket), [2] Peltier-element til køling/termostatering af prøver, [3] Køletermostat, [4] Slangepumpe til dosering af intern ATP-standard (IS), [5] Doserings-rør IS, [6] Slange til indblæsning af opblandingsluft på prøvens overflade.
B: Åbent detektorhus, [1] Prøveholder til køling/termostatering, [2] Køletermostat, [3] Målekammer, [PMT1,2] Photomultipliere.
C: Termo-oplukning af celler på filter, [1] Stor Alu-blok, [2] Filter under oplukning, [3] Solid state relæ, [4] Varmetermostat.
D: Styresystem til doseringspumpe for semi-automatisk dosering af intern ATP-standard, [1, 2, 3] Strømforsyninger, [T1, T2, T3, T4, T5] "Timere".

I laboratorie-opstillingen kan der også måles Frit-ATP i den oprindelige vandprøve, idet 100 µL af filtratet fra filtrering af prøven overføres til en transparent polypropylen kuvette, som varmebehandles og måles som ovenfor. Total-ATP i prøven kan ligeledes bestemmes ved at måle 100 µL af den oprindelige vandprøve.

Photomultiplier-enheden i laboratorie-opstillingen er rimelig fleksibel og derfor velegnet til afprøvning af forskellige filtertyper (størrelser, udformninger).

3.2.3 E&R DTU

E&R DTU anvender Advance Coupe instrument fra Celsis med tilhørende Lumin(ATE)/Lumin(EX) reagens-kit (Celsis no. 92687). Kittet består af en buffer (Lumin(PM)), et ekstraktionsreagens (Lumin(Ex)) og frysetørret luciferin/luciferase (Lumin(ATE)), som resuspenderes i buffer. ATP-standard salt (Celsis no. 92588) opløses i buffer til kalibrering (standardfortyndinger fremstilles generelt i sterilt drikkevand).

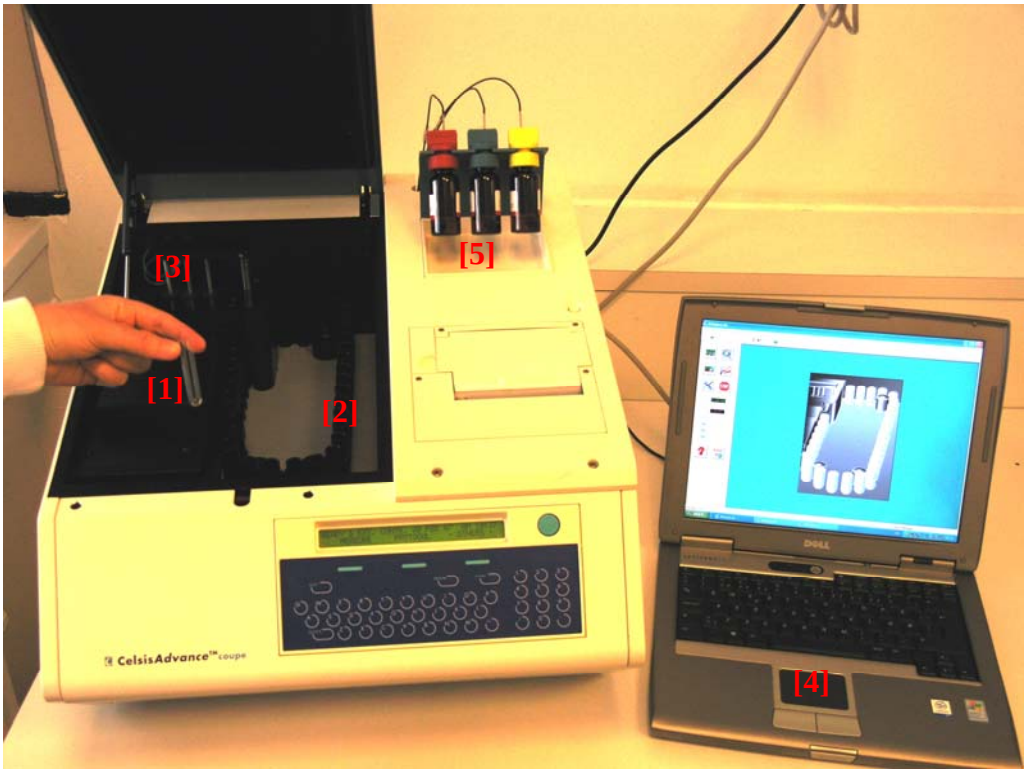
Ekstraktionsreagens og luciferin/luciferase-reagenset loades på Advance Coupe (Figur 13), som automatisk doserer reagenserne under målingen. 100 µL vandprøve overføres manuelt til en transparent polypropylen-kuvette [1] og indsættes i kæden [2], der kan loades med op til 30 kuvetter per målerunde. Kuvetten føres ind i en photomultiplier-enhed [3] og 100 µL ekstraktionsreagens tilsættes, hvorved ATP ekstraheres over 10 sek. Dernæst tilsættes 100 µL luciferin/luciferase-reagens, og efter 2 sek stabilisering måles lysudsendelsen over 10 sek integrationstid. Målingen styres af en computer med Advance Software (Celsis Advance.im version 2.1 [4]), der ligeledes opsamler signalet. Målingen er ikke temperaturreguleret, og det er derfor nødvendigt, at reagenserne er tempereret til rumtemperatur før måling for at holde en konstant temperatur. Dette betyder, at luciferin/luciferase-reagenset er stabilt 2-5 timer, afhængigt af den aktuelle temperatur.

Som udgangspunkt måles der på E&R DTU således Total-ATP i en vandprøve. Frit-ATP kan måles i filtratet fra en filtreret vandprøve (se nedenfor), efter samme fremgangsmåde som måling af Total-ATP. Et indirekte mål for Intracellulært-ATP kan derefter bestemmes som differencen imellem Total-ATP og Frit-ATP. Da der ofte er tale om lave ATP-koncentrationer i drikkevand, vil Intracellulært-ATP bestemt indirekte ofte være behæftet med relativt store usikkerheder. Direkte måling af ATP i celler opkoncentreret ved filtrering kræver manuel håndtering af prøven:

En given vandmængde filtreres manuelt igennem 0,45 µm sprøjtefilter (25 mm MFS filter - styren-akryl-nitril-filterhus med en celluloseacetat membran) ved brug af stempelsprøjte. Derefter ekstraheres ATP fra cellerne ved følgende procedure:

1. Filter 'tørredes' ved tre gange luftgennemblæsning (fra stempelsprøjte)
2. 1 ml steril stempelsprøjte med 1 ml ekstraktionsreagens påsættes
3. Stemplet trækkes tilbage for at opsuge luft over filter
4. 0,5 ml ekstraktionsreagens presses langsomt igennem filteret
5. Ekstraktion over 1 min
6. Resterende ekstraktionsreagens presses langsomt igennem filteret
7. Filter 'tørredes' ved tre gange luftgennemblæsning (fra stempelsprøjte)
8. Trin 2-7 gentages en gang mere
9. De 2x1 mL ekstraktionsreagens med ATP samles til ATP-analyse

100 µL overføres til kuvette og 100 µL buffer tilsættes til volumen-udligning (svarende til den normal vandprøve), inden prøven placeres i Advance Coupe og måles uden tilsætning af yderligere ekstraktionsreagens. For at korrigere for buffertilsætningen, skal der altid måles med IS (jævnfør afsnit 3.3.1og 3.3.2).



Figur 13: Advance Coupe anvendt til ATP-målinger på E&R DTU.
[1] PP-kuvette, hvori måling foretages, [2] Kæde, [3] Photomultiplierenhed,
[4] Computer med Advance Coupe software, [5] Reagenser.

3.3 Kalibrering og optimering af ATP-analyse

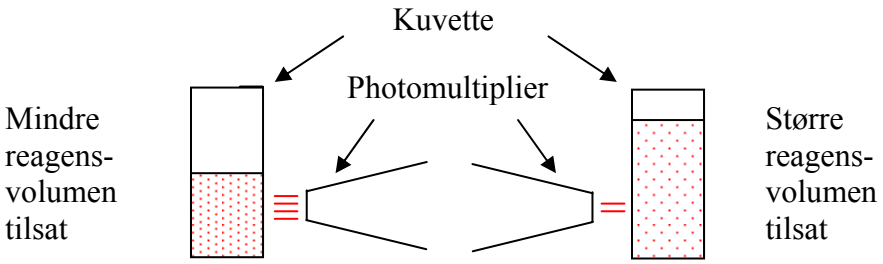
En række sammenlignende målinger på cellekulturer og vandprøver imellem E&R DTU og CU-Test til validering af CU-Test's procedurer demonstrerede vigtigheden af at identificere mulige fejlkilder ved analysen og brug af korrekte procedurer ved omregning af rlu-signaler til ATP-koncentrationer.

Optimeringen af måleprocedurer omfattede emnerne:

- Effekt af medier og volumener
- Intern standard
- Udvælgelse af filtre
- Evaluering af metoder til måling af Intracellulært-ATP
- Celleoplukning

3.3.1 Effekt af medier og volumener

En photomultiplier måler typisk lysudsendelsen gennem et 'vindue' i vandret plan dvs. fra siden af kuvetten. Fortyndingen af prøven ved reagenstilsætning påvirker således det signal, der rammer 'vinduet' (Figur 14), men effekten afhænger af den enkelte photomultipliers 'vindue'. Prøver og de ATP-standarder, prøverne relateres til, skal derfor måles i samme volumen.



Figur 14: Illustration af betydning af fortynding af prøve ved reagenstilsætning.

Lysudsendelsen kan delvis blive absorberet af mediet, hvilket benævnes quenching. Medier quencher lysudsendelsen forskelligt, f.eks. giver ATP-standarder fremstillet i buffer kun 80% af rlu-signalet fra tilsvarende standarder fremstillet i sterilt drikkevand på E&R DTU (f.eks. van der Kooij et al., 2006). Omregner man rlu-signalet fra en drikkevandsprøver direkte fra ATP-standard(er) i buffer, resulterer dette i en fejl svarende til forskellen i quenching mellem vand og buffer. Dette kan der korrigeres for, hvis forskellen i quenching imellem de to medier kendes – f.eks. kan man på E&R DTU beregne ATP-værdien i en drikkevandsprøve direkte ud fra ATP-standard(er) i buffer, såfremt man reducerer resultatet med de 20%, der var forskel i signal imellem buffer og drikkevand.

ATP-standarder kan fremstilles i sammen medie, som de prøver, der skal måles, f.eks. fremstilles ATP-standarder i sterilt drikkevand, når der skal analyseres drikkevandsprøver. Derved kan quenching-effekter til dels undgås. Endvidere kan der tages højde for forskel i medie mellem prøve og standarder ved at måle med intern standard (se afsnit 3.3.2). Pga. quenching-effekter er det ligeledes vigtigt, at prøver og ATP-standarder måles med samme reagenser, f.eks hvis prøverne analyseres ved brug af ekstraktionsreagens, må ATP-standarder ligeledes tilsættes dette ekstraktionsreagens, selvom der ikke er et behov for ekstraktion i forbindelse med ATP-saltet.

På E&R DTU måles prøver og standarder i samme type kuvetter med identisk reagenstilsætning (se afsnit 3.2.3). Standarder fremstilles i sterilt drikkevand, ved analyse af drikkevandsprøver. Der måles rutinemæssigt med intern standard, for at tage højde for højde for eventuelle forskelle imellem vand anvendt til ATP-standarder og drikkevandsprøver.

Ved projektets start anvendte CU-Test tre forskellige procedurer ved måling af Intracellulært-ATP, Frit-ATP og ATP-standarder i laboratorie-opstillingen, jævnfør Tabel 1. Disse forskelle gav anledning til fejl ved omregning af rlu-signal til ATP-koncentration, og udredning resulterede i identifikation af problematikker:

- Lysabsorbtionen var forskellig imellem centrifugefiltrer og kuvetter, så der blev opnået højere rlu-signal ved måling i kuvetter (30%) end i centrifugefilteret. Dette gav anledning til en underestimering af prøvens ATP-koncentration ved korrelation mellem rlu-signal for prøve målt i centrifugefilter og ATP-standard målt i kuvette.

- De forskellige ATP-fraktioner og ATP-standarder forekom i forskellige mediesammensætning når de blev målt. Intracellulært-ATP blev målt i ekstraktionsreagenset, Frit-ATP i drikkevandsfiltrat og ATP-standarder i ren buffer. Afprøvningen viste f.eks., at måling i ekstraktionsreagenset CUBX1 gav 60% reduktion af rlu-signalet i forhold til i buffer.

Intracellulært-ATP:	Frit-ATP (filtrat):	Standarder:
• Filtrering • Tilsætning af 100 µL ekstraktions-reagens • Varmebehandling • Køling • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i filter	• 100 µL filtrat (fra drikkevandsprøve) i kuvette • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i kuvette	• 100 µL standard i buffer i kuvette • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i kuvette

Tabel 1: Oversigt over CU-Test's måleprocedurer for laboratorie-opstillingen ved projektets start, hvor et ekstraktionsreagens (CUBX1 i Tricinebuffer) blev anvendt sammen med varmebehandlingen til celleoplukning.

For at løse ovenstående problematikker optimerede CU-Test måleprocedurerne ved følgende tiltag:

- Cellerne blev udelukkende oplukket ved opvarmning (se afsnit 3.3.5), og ekstraktionsmidlet blev derved erstattet med buffer ved måling af Intracellulært-ATP. For at sikre at opvarmningen ikke påvirkede quenching-effekten af reagenserne blev alle prøver og standarder opvarmet før måling. Dette medførte endvidere, at Total-ATP kunne måles efter samme procedure som Frit-ATP (udført på henholdsvis vandprøve og filtrat).

- Problematikken ved forskellen i lysabsorbtion mellem centrifugefilter og kuvette kunne være løst ved at udføre alle målinger i filterenheden. Rent økonomisk var dette imidlertid ikke hensigtsmæssigt, så CU-Test valgte i stedet at anvende to procedurer til måling af ATP-standard:
    1. Måling i kuvette med standarder i sterilt drikkevand til beregning af ATP-koncentrationer i filtrater/totalprøver.
    2. Måling i centrifugefilter med standarder i buffer til beregning af Intracellulært-ATP ved måling på celler.

De optimerede måleprocedure er angivet i Tabel 2.

Intracellulært-ATP	Standarder (centrifugefilter):	Standard (kuvette):	Frit/Total-ATP:
• Filtrering • Tilsætning af 100 µL buffer • Varme-behandling • Køling • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i filter	• 100 µL standard i buffer i kuvette • Varme-behandling • Køling • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i filter	• 100 µL standard i vand i kuvette • Varme-behandling • Køling • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i kuvette	• 100 µL filtrat/ totalprøve i kuvette • Varme-behandling • Køling • Tilsætning af 50 µL luciferin/ luciferase-reagens • Måling i kuvette

Tabel 2: Oversigt over CU-Test's måleprocedurer for laboratorie-opstillingen efter optimering.

3.3.2 Intern Standard

For at tage højde for hvordan selve prøvens matrix påvirker målingen, kan der korrigeres ved hjælp af. intern standard (additions-standard), hvor der tilsættes en kendt mængde ATP (Intern standard: IS) til prøven. Forholdet imellem rlu-signalet for IS i en prøve og i en ATP-standard betegnes effektivitetsprocenten (E). Signalet fra målingen af selve prøven korrigeres med E-værdien inden omregning til ATP-koncentration ud fra ATP-standardkurve foretages. For at ændre mindst muligt på prøvevolumen og undgå fortynding af prøven skal IS tilsættes i et så lille volumen som muligt. IS skal tilsættes efter oplukningen af cellerne, da de aktive celler ellers kan nå at omsætte det tilsatte ATP inden måling (f.eks. van der Kooij *et al.*, 2006). IS-koncentrationen skal langt overgå prøvens eget ATP-indhold for at negligere effekt af måleusikkerheder.

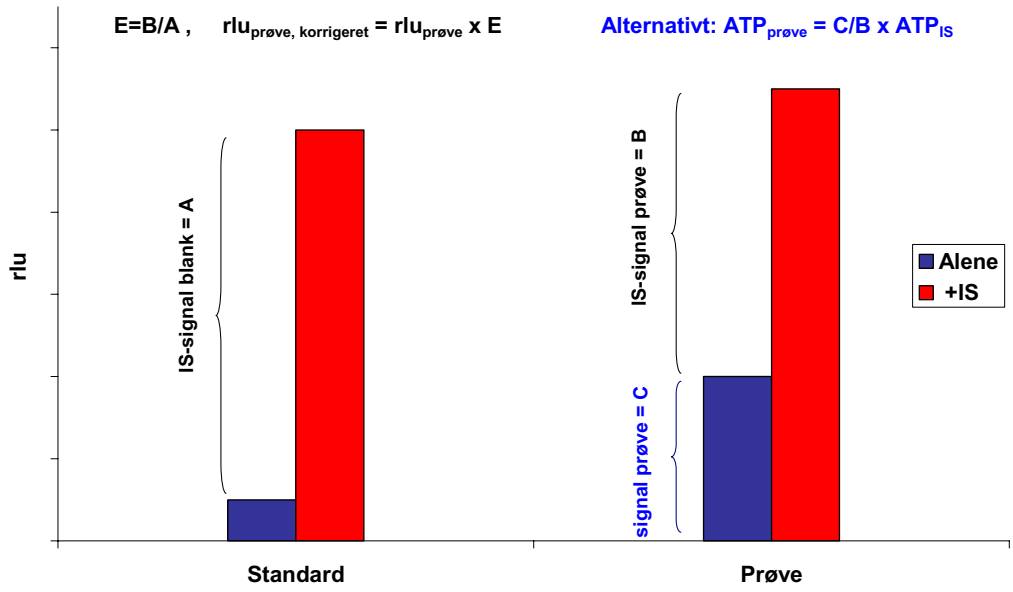
Intern standard kan generelt udføres på to måder:

1. Måling på parallelprøve
2. Gentaget (fortsat) måling på samme prøve

Ved måling på parallel identisk prøve måles både prøven alene og en parallel prøve tilsat IS. Difference imellem de to rlu-signaler er det rlu-signal, som IS bidrager med. Ved at måle på parallelle prøver vil der selvfølgelig altid skulle tages højde for usikkerheden imellem replikater.

Såfremt der anvendes CLS reagenser kan IS målingen gennemføres på selve prøven, så man derved eliminerer usikkerheden imellem replikater. Efter registrering af signalet for selve prøven tilsættes IS, og målingen fortsættes med registrering af signal for prøve+IS. Som nævnt tidligere vil eksisterende CLS-produkter formodentlig ikke have tilstrækkelig følsomhed i forbindelse med drikkevandsanalyse.

Ved at anvende IS kan man beregne ATP-koncentrationen direkte ud fra IS-målingen i stedet for at anvende en ATP-standardkurve. Idet ATP-mængden kendes i IS, kendes rlu-signalet for bestemt ATP-mængde, og prøvens ATP-koncentration kan derfor bestemmes ved forholdsregning – se illustration af metoder i Figur 15.



Figur 15: Illustration af princip af beregning med intern standard. 'Standard' kan principielt være en hvilken som helst koncentration, men man anvender i reglen en 0-prøve, som er det medie ATP-standarderne er fremstillet med.

Anvendelse af intern standard i E&R DTU's procedure

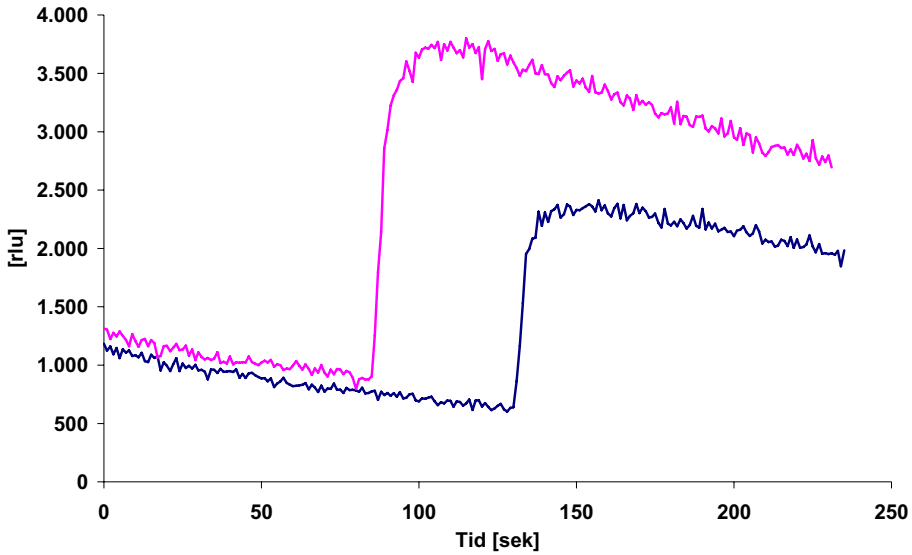
På E&R DTU tilsættes IS efter tilsætning af ekstraktionsreagenset og før tilsætning af luciferin/luciferase-reagenset. Efter endt ekstraktion tilsætter apparatet automatisk 25 µL (relativ standard afvigelse = 1%) IS (f.eks. 10.000 pg/mL) og efter 7 sek tilsættes luciferin/luciferase-reagenset. Der måles på parallelle prøver (i duplikater). Erfaringer fra E&R DTU viser, at drikkevandsprøver fra distributionsnet giver E-værdier på 90-100%, når ATP-standarder er fremstillet med sterilt drikkevand, mens stærkt farvede biofilmsuspensioner i den anden ende af skalaen giver E-værdier på 15-65%.

Anvendelse af intern standard i CU-Test's procedure

MCCU'en kan ikke måle kontinuert på parallel prøver, fordi der måles på vandprøver opsamlet gennem en vis tidsperiode. CU-Test eksperimenterede derfor med at overføre konceptet fra anvendelse af CLS-reagenser til anvendelse af HS-reagenser, så IS tilsættes prøven efter den målt, hvorefter den måles igen (prøve+IS).

Arbejdstesen var, at selvom effektiviteten af luciferin/luciferase-reagenset hastigt aftager ved brug af HS-reagenser, vil effektiviteten aftage konstant over tid i alle prøver. Forskellen i signal fra IS-tilsætningen imellem prøver og blank vil derved kunne sammenlignes og prøvens E-værdi bestemmes, idet et estimeret bidrag fra prøven fratrækkes. Prøvens bidrag under IS-målingen findes ved at tilpasse en eksponentiel funktion de sidste 10 signal-værdier forud for IS-tilsætning.

Der blev foretaget en række målinger i laboratorie-opstillingen, hvor en peristaltisk pumpe (12 hjul, lille slangediameter, udvalgt for at minimere den relative standardafvigelse på IS-tilsætningen) til tilsætning af IS blev inkluderet i opstillingen. Strålespidsen var overfladebehandlet, så den doserede IS-opløsning slap ensartet. IS-opløsningen blev opbevaret ved 15°C, og slangelængden afpasset, så opløsningen blev tempereret til 20-22°C ved passage af slangen. Efter dosering, pumpes IS-opløsningen i slangen tilbage til beholderen ved 15°C.



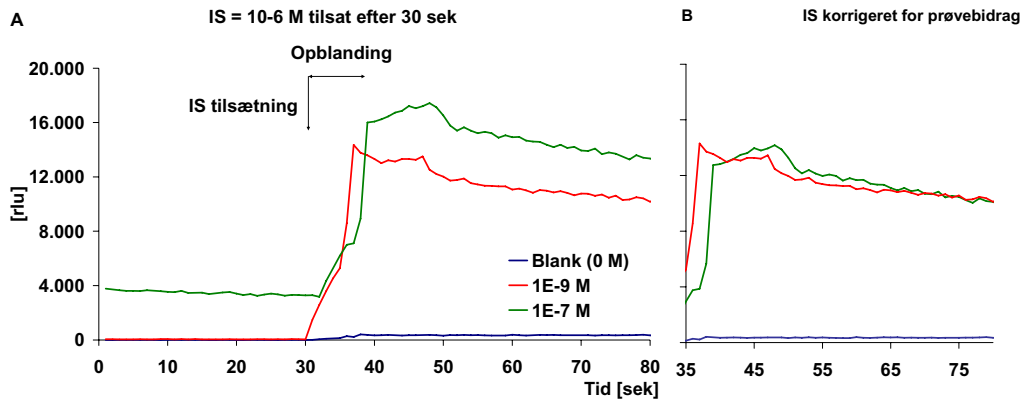
Figur 16: Eksempel på effekt af hvornår IS tilsættes efter tilsætning af luciferin/luciferase-reagenset. Målinger foretaget med 10^{-7} M ATP-standard som prøve og tilsætning af IS på 10^{-6} M efter henholdsvis 85 sek og 130 sek.

Tiden fra tilsætning af luciferin/luciferase-reagenset til tilsætningen af IS havde betydelig indflydelse på signalet for IS, idet signalet blev mindre, jo senere IS blev tilsat. I Figur 16 er givet et eksempel, hvor en ATP-standard på 10^{-7} M blev anvendt som prøve, og IS (10^{-6} M) blev tilsat efter henholdsvis 85 og 130 sek. For at få et så kraftigt IS-signal som muligt, må integrationstiden for selve prøven være så kort som muligt uden at signal/støj-forholdet bliver kritisk. Af

tekniske årsager (pumper, slanger, temostatering) kunne integrationstiden i laboratorie-opstillingen ikke reduceres til mindre end 30 sek.

I prøver uden ATP eller med ekstremt lavt ATP-indhold resulterede IS-tilsætningen ikke i et signal på højde med prøver med højere ATP-indhold (eksempel med ATP-standarder vist i Figur 17). Dette indikerer, at effektiviteten af luciferin/luciferase-reagenset henfalder hurtigere, hvis det ikke 'aktiveres' af ATP, hvorved arbejdstesen ikke gælder.

Indenfor projektets rammer blev der ikke fundet en løsning til måling af IS i MCCU'en. I MCCU'en resuspenderes de isolerede celler i et relativt stort buffervolumen (2000 µL i modsætning til 100 µL i laboratorie-opstillingen), så selve prøvens karakteristika forventes at have langt mindre betydning. En procedure for måling med IS i MCCU'en bør dog undersøges nærmere i et fremtidigt udviklingsarbejde.



Figur 17: Eksempel på effekt af prøvens eget ATP-niveau. 28 µL IS på 10^{-6} M tilsat til ATP-standarder 30 sek efter tilsætning af luciferin/luciferase-reagenset. A: Måling prøve+IS; B: IS-måling korrigeret for prøvens eget bidrag.

3.3.3 Udvælgelse af filtre

Med henblik på videreudvikling af MCCU'en og til brug i laboratorie-opstillingen afprøvede CU-Test en række filtre.

Arbejdet blev fokuseret om en serie relativt nye 'centrifuge-filtre', der typisk består af en cylindrisk beholder af et transperant materiale med et membranfilter monteret i bunden, Figur 18 viser et typisk centrifuge-filter.

Figur 18: Eksempel på et typisk centrifuge filter (Lida – Macrospin).

Væske presses igennem filteret under tryk, men væsker løber ikke igennem filteret af sig selv, så når der ikke sættes tryk på filteret, kan det benyttes som reaktionskammer og målekuvette. Der anvendes et nyt filter til hver prøver, hvorved afsmitning mellem prøver elimineres. Desuden opnås maksimal følsomhed, da ATP frigives i et minimalt volumen og således fortyndes mindst muligt.

I projektet blev fem centrifugefilter-typer undersøgt (Tabel 3). Undersøgelserne forgik hos CU-Test i laboratorie-opstillingen, hvor detektorens målebrønd blev tilpasset hvert enkelt centrifugefilter-types ydre diameter.

Nr.	Producent Mærke	Membran materiale	Pore størrelse [µm]	Hus materiale	Ydre diameter [mm]	Max tryk [g]
1	Frisenette National Scientific	PVDF	0,45	PP	13,4	
2	Millipore Durapore	PVDF	0,45	PP	13,8	12.000
3	Frisenette Whatman	PVDF	0,45	PP	14,4	
4	Lida Macrospin	PVDF	0,45	PP	13,5	
5	Sartorius Vivascience	PES	0,2	PC?	16,2	4.000

Tabel 3: Filtre afprøvet i projektet.
PVDF: Polyviylidendifluorid, PES: Polyethersulphon, PP: Polypropylen, PC: Polycarbonat.

Alle de undersøgte filtre blev fundet egnet, men måling på replikater af bakteriekulturer afslørede stor variation i, hvor effektivt de forskellige filtre tilbageholdte bakterierne. CU-Test udviklede en simpel ”integrity tester”, som

ved at påføre hvert enkelt filter et luftryk i 30 sek kunne afgøre, om et filter var tæt. Instrumentet blev tilpasset hvert enkelte filtertypes specifikationer.

Der var fejlbehæftede filtre blandt alle de undersøgte filtermærker. For filter nr. 1: Frisenette, National Scientific måtte 50 % af de testede filtre kasseres. Årsagen var formentlig fejl under produktionen, f.eks. at membranen ikke hæftede tæt i hele periferien.

Der blev i projektet således identificeret flere centrifugefiltre egnet til brug i laboratorie-opstillingen og i fremtidige apparatkonstruktioner. Det blev belyst, at en vis procentdel fejlbehæftede filtre må påregnes. Fremtidige apparatkonstruktioner vil derfor rutinemæssigt blive udstyret med en 'integrety tester" til identifikation af fejlbehæftede filtre, der således kan kasseres før de benyttes til analyser.

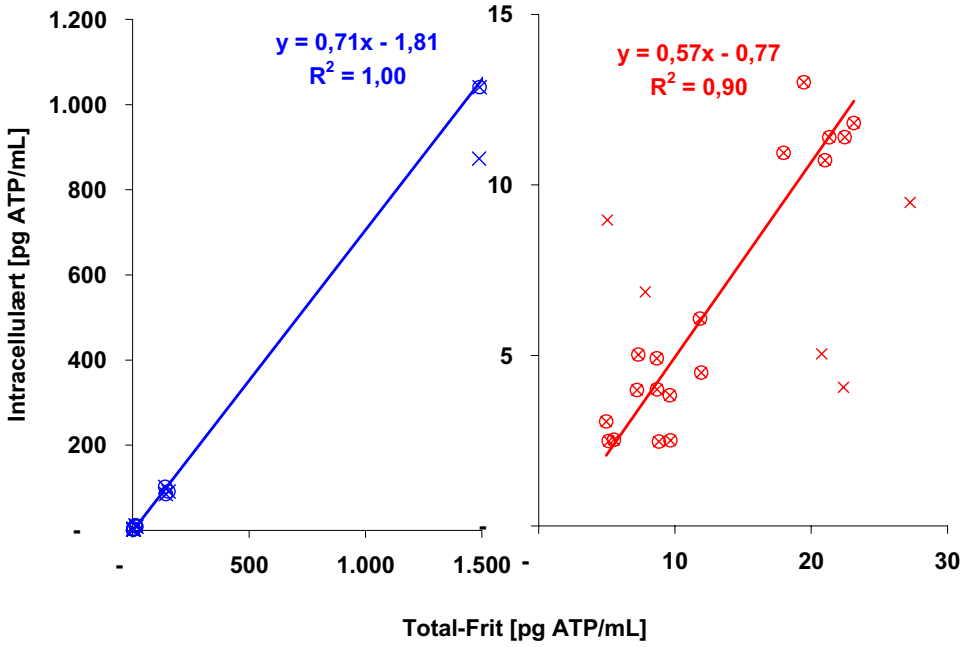
3.3.4 Evaluering af metoder til måling af Intracellulært-ATP

Mængden af Frit-ATP kan variere meget imellem prøver. Erfaringer fra E&R DTU viser, at der i reglen kun er en er meget lille andel Frit-ATP i friskt produceret drikkevand, men at andelen kan være større (over 50%) ude på forsyningsnettet, især ved henstand i installationer. Ligeledes er der større andel Frit-ATP ved vækstforsøg, hvor (ren)kulturer er dyrket med substrattilsætning.

Ønskes der udelukkende at måle for aktive celler vil det være optimalt at måle Intracellulært-ATP direkte på filtrerede prøver.

Ved separat analyse af alle tre ATP-fraktioner (Intracellulært, Frit og Total) på E&R DTU ved metoden beskrevet i afsnit 3.2.3 og med brug af intern standard blev der overraskende ikke fundet fuld overensstemmelse imellem de tre fraktioner. Intracellulært-ATP målt direkte på celler opsamlet på filter resulterede i lavere værdier end når denne fraktion blev beregnet som Total-ATP minus Frit-ATP. Ved de to afprøvninger beskrevet i afsnit 4 udgjorde Intracellulært-ATP kun 60-70% af værdien beregnet som differencen imellem Total-ATP og Frit-ATP (Figur 19).

Der var ikke grund til at tro, at ekstraktionen på filteret ikke var tilstrækkelig effektiv, men måske stresses cellerne ved filtreringen, og omsætter derved en del af deres ATP i processen. Dette vil i så fald være en generel problematik ved filtreringer, som der bør tages højde for, men da procentdelen var relativ konstant, vil det have mindre indflydelse i en moniteringsmæssig sammenhæng, hvor det primære mål er at registrere ændringer i niveauer.



Figur 19: Intracellulært-ATP målt direkte på celler opsamlet på filter som funktion af samme fraktion beregnet som differencen imellem Total- og Frit-ATP ved to forskellige lejligheder: A: Afprøvning refereret i afsnit 4.1 – baseret på 17 prøver; B: Afprøvning refereret i afsnit 4.2 – baseret på 23 prøver. X: outlier-værdier, der ikke er medtaget i tendenslinie.

3.3.5 Celleoplukning

Analyser af intracellulært mikrobielt materiale er dybt afhængigt af en ensartet og fuldstændig celleoplukning. Effektivitet af celleoplukning ved forskellige metoder er derfor blevet undersøgt. Visse detergenter kan hæmme Luciferin/Luciferase-reaktionen (tidligere upublicerede undersøgelser - CU-Test), og flere anvendte af de undersøgte detergenter er ikke i stand til at oplukke alle bakterieceller ved temperaturer mellem 15 og 25° C. Hæves temperaturen, vil celleoplukning-effektiviteten generelt stige.

Alle undersøgelser blev udført af CU-Test med laboratorie-opstillingen og kulturer opdyrket fra frysetørrede ampuller af en standardiseret bakterieblanding (relevant for drikkevand) fra "Sveriges Levsmedels Verket" (DW 2005:A[1]). Effektiviteten blev undersøgt for fire kommercielle ATP detergenter:

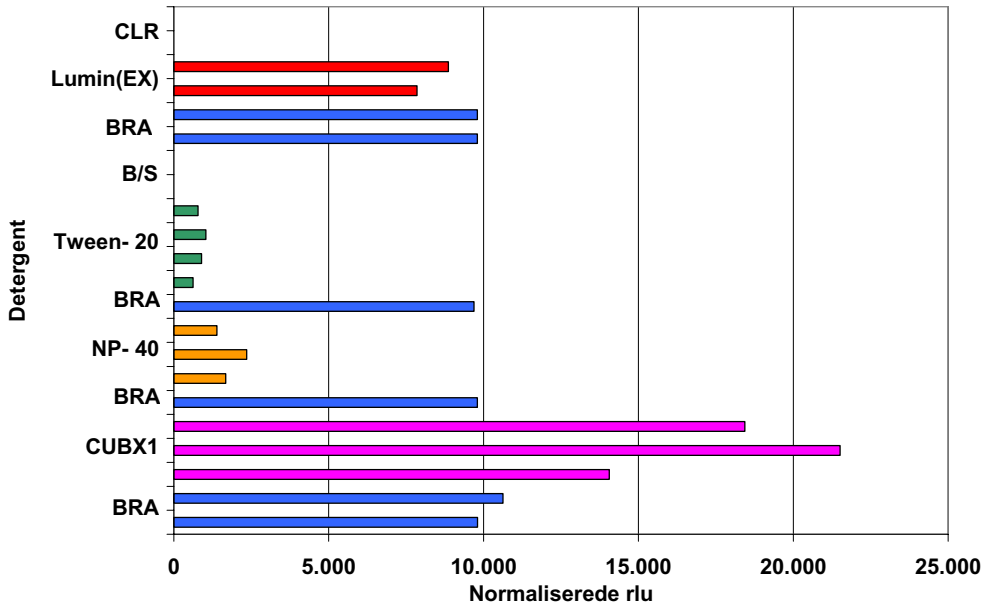
- Bacterial Releasing Agent (BRA) fra New Horizons Diagnostics
- Lumin(EX) fra Celsis
- Cell Lysis Reagent (CLR) fra Roche Diagnostics
- Extractant B/S (B/S) fra Biothema

[1] E. coli SLV-084// Enterococcus durans SLV-078// Pseudomonas aeruginosa SLV-395// Clostridium perfringens SLV-442

Samt tre kat-ioniske detergenter:

- Tween-20
- NP-40
- CUBX1 0,01%

Resultater i form af rlu-værdier normaliseret i forhold til rlu-værdien for BRA-reagenset er vist i Figur 20. De opnåede rlu-værdier udtrykker en kombination af oplukningseffektivitet og mediets quenching af lysudsendelsen. CUBX1 samt Lumin(EX) gav de højeste værdier og derved størst analyseføls omhed. Der blev arbejdet videre med disse to detergenter i CU-Test's laboratorie-opstilling. Det viste sig, at begge detergenter (selv i kraftige fortyndinger) hæmmede (> 50%) luciferin/luciferase-reaktionen, formentlig primært pga. quenching. Lumin(EX) tilsat blindprøve (buffer) gav kornet bundfald med luciferin/luciferase-reagenset fra Roche, hvilket formentlig skyldes, at reagenserne stammer fra to forskellige reagens-kit, og således ikke er optimeret til at kunne bruges sammen.



Figur 20: Sammenlignende undersøgelse af detergenters relative celleopluknings-effektivitet. Undersøgelser udført ved 23º C med SLV-bakteriekultur i eksponentiel vækstfase. Rlu-værdier er normaliseret for SLV-kulturens koncentration i forhold til rlu-værdier for gentagende målinger med detergenten BRA.

Det er dog almindeligt kendt og understreget i det produktblad, som følger leverancen af ATP-kit fra Roche Diagnostics, at kogning (dvs. 90º C) i få minutter (f.eks. 3 min.) er den mest effektive metode til 100% celleoplukning (uden negativ effekt på luciferin/luciferase-reaktionen).

Opvarmning blev anvendt som celleopluknings-metode i laboratorie-opstillingen i resten af projektet. Det er ligeledes denne opvarmning, der indgår i MCCU'ens mikrobølgefelt. For en automatiseret enhed som MCCU'en er det endvidere en fordel at reducere reagensforbrug, og opvarmning er således at foretrække frem for tilsætning af ekstraktionsreagens.

3.4 Optimering af MCCU'en

MCCU'en blev udviklet og konstrueret som en "alfa-2 version" velvidende, at videre udvikling og optimering ville være påkrævet. MCCU'en indeholder et stort antal ventiler og slanger til doseringer og transport af prøve, hvilket selvsagt kan give anledning til en del mekaniske problemer. Ved projektets start var de største problemer ved MCCU'en, at der var afsmitning imellem prøverne pga. utilstrækkelig rengøring af slanger mm. imellem prøver samt fejl på flere ventiler. Desuden var der en uafklaret problematik vedrørende køleblokenhederne til reagensopbevaring. Der har i projektet været lagt et meget stort arbejde i at udbedre disse mangler og at optimere MCCU'en.

3.4.1 Minimering af afsmitning imellem prøver

Afsmitning mellem prøver blev minimeret ved at optimere desinfektion og rensning af systemet (især overfladerne) mellem hver prøvetagning og analyse. En række detergenter og rensemidler blev afprøvet og på baggrund af effekten på efterfølgende måling af en ATP-standard, blev 70% ethanol valgt. Lige før prøvetagning eller lige efter analyse (valgfrit) pumpes 70% ethanol igennem alle glas, ventiler, filter og slanger, undtagen reaktionskammeret. Derefter gennemskylles hele systemet med den anvendte standard-buffer (25 mM Tricine). Filterhuset (med filter) i mikrofeltet opvarmes over 40 sek (800 W), og alle slanger tømmes/renses for skylle-buffer ved overtryk og vakuum. Processen gentages tre gange. Som konsekvens af denne procedure-ændring er væskebehovet selvsagt øget og reservoiret til opbevaring af skylle-buffer er forøget med en faktor 10.

3.4.2 Fordobling af antal analyser udført i automatisk modus

Samtidig med forbedring af rensningsprocedurer og øgning af voluminet for skylle-buffer blev termoblokken til reservoiret for luciferin/luciferase-reagenset ligeledes fordoblet. Disse tiltag betyder, at MCCU'en automatisk uden tilsyn kan foretage 25 analyser i træk plus 3 ATP-standarder jævnt fordelt over det valgte tidsrum. Herefter skal der tilføres friskt luciferin/luciferase-reagens. Hver gang der foretages ATP-standard kalibrering, kontrolleres filteret og skiftes om nødvendigt (må fortsat foretages manuelt).

3.4.3 Forbedring af termostatering

I MCCU'ens termostat er der monteret fem termosensorer (termoelementer): Luciferin/luciferase-reagenset skal opbevares ved 4ºC og ATP-kalibreringsopløsning, standard- og skylle-buffer, "sample container" og reaktionskammeret ved 20ºC. Ved starten af projektet var der fejl på alle termofølere. Hver enkelt føler er udskiftet og installeret på både mekanisk og elektronisk mere forsvarlig måde.

3.4.4 Reparation af ventiler og slangeforbindelser

MCCU'en er udstyret med 22 ventiler. Ved projektets start viste det sig, at 15 ventiler ikke fungerede. Disse blev identificeret, afmonteret, adskilt og renset.

4 Afprøvninger

I projektet blev metoderne afprøvet. Der blev undersøgt effekten af en simuleret spildevandsindtrængning ved ATP-analyse samt gennemført en 3-døgns monitering med Fys-Pack og MCCU.

4.1 Simulering af spildevandsindtrængen

Ved en forureningssituation, hvor spildevand trænger ind i drikkevands-distributionen, kan kontinuert ATP-måling være et værktøj til at opdage forureningen udenfor de lovpligtige prøvetagninger.

Indtrængende spildevand vil tilføre distributionssystemet både bakterier og substrat. En forurening vil derfor kunne detekteres

1. direkte ved at måle på de indtrængende bakterier
2. indirekte ved at måle den bakterievækst, det indtrængende substrat vil give anledningen til

Forureningen vil i distributionsnettet udgå som koncentrationsfane fra indtrængningsstedet, og vækst forårsaget af substrat vil først blive registreres efter en vis inkubationstid. For at illustrere såvel en kontinuert forurening som en puls-forurening blev der udført en batch-undersøgelse med måling af ATP på fortyndinger af spildevand over tid.

4.1.1 Opsætning

Der blev anvendt ubehandlet spildevand udtaget efter grovfilteret (før rensning) på Lundtofte Rensningsanlæg. Vandet blev filtreret igennem et filterpapir før brug for at fjerne større partikler og fortyndet (simulerende vandet i det forurenede distributionsnet) med vand udtaget fra rentvandstanken på Lyngby Vandværk.

PYREX-flasker (1 L) blev glødet og tilsat fem fortyndinger: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, hvor fortyndingsgrad 10^{-1} modsvarer en indtrængen på ca. 100 L/min i en rørføring med rørdiameter på 400 mm og flow på 0,15 m^3/s, fortyndingsgrad 10^{-2} ca. 10 L osv. En flaske med rent drikkevand blev medtaget som kontrol.

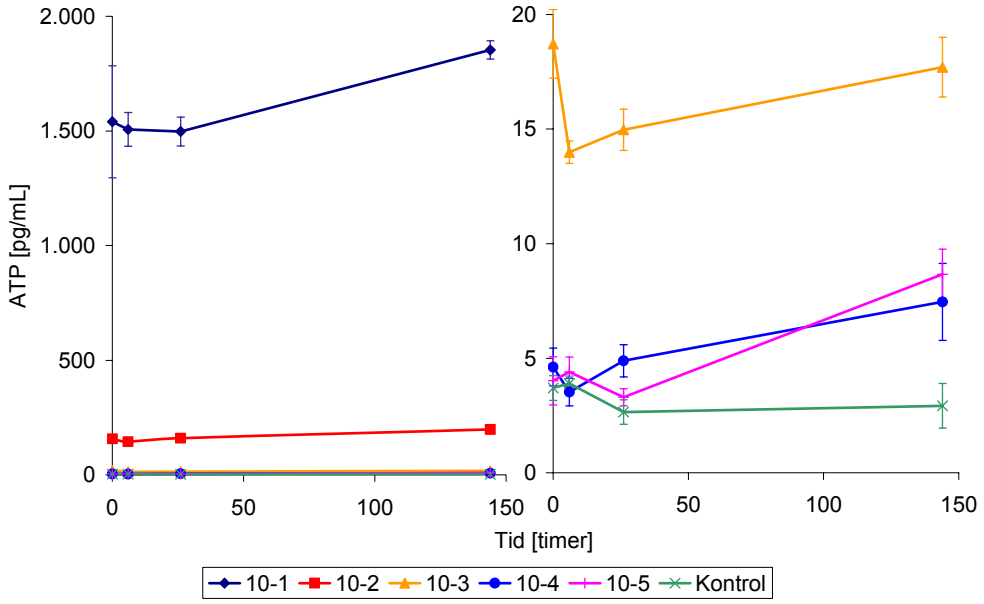
Der blev analyseret for ATP (Totalt, Frit og Intracellulært [filtrering af 10 mL] ved brug af intern standard ved E&R DTU-proceduren – afsnit 3.2.3), $HPC_{Gær,22°C,72\ timer}$, coliforme ved membranfiltreringsmetoden (MLS medie) til tiden 0, 6, 26 og 144 timer.

Vand og spildevand blev tempereret til 10°C før forsøgsstart og der blev inkuberet ved 10°C.

4.1.2 Resultater

Frit-ATP udgjorde generelt mindre end 10% af Total-ATP. Fortyndingerne 10^{-1}, 10^{-2} og 10^{-3} (dvs. 1 L per m^3) resulterede allerede direkte efter tilsætning i et forhøjet niveau i forhold til kontrollen, som vil have afsløret en forurening (Figur 21). De to øvrige fortyndinger lå på niveau med kontrollen (rent vand).

Variationerne i Total-ATP over tid i fortyndingerne er vist i Figur 21. Efter 26 timer havde substratet tilført med spildevandet givet anledning til så meget vækst, at også ATP-værdierne i 10^{-4}-fortyndingen var forhøjet i forhold til kontrollen, og efter længere henstand (op til seks døgn) var ATP-niveauet i de to sidste fortyndinger også forhøjet og ville give anledning til mistanke om forurening.



Figur 21: Total-ATP målt i fortyndinger af spildevand og kontrol (drikkevand uden spildevand). Bacth blev inkuberet ved 10°C over seks døgn. Fejllinier angiver e.o.m.-værdien for bestemmelsen.

	$HPC_{Gær,22C,3døgn}$ [CFU/mL]			Coliforme [CFU/mL]		
Fortynding	0 timer	6 timer	26 timer	0 timer	6 timer	26 timer
10^{-1}	>20.000	>20.000	1.420.000	>20.000	>20.000	>20.000
10^{-2}	6.750	>20.000	206.000	>20.000	>20.000	>20.000
10^{-3}	808	1.450	18.000	>20.000	>20.000	3.550
10^{-4}	127	127	1.400	>20.000	>20.000	18
10^{-5}	14	12	145	135	110	16
Kontrol	4	3	0	0	0	0

Tabel 4: HPC-værdier og coliform antal i de målte prøver. Grænseværdien for HPC på ledningsnet er <200 CFU/mL og for coliforme <1/100 mL.

En prøvetagning direkte i forbindelse med forureningen med traditionelle metoder ville dog også have fanget forureningen, da grænseværdien for coliforme var overskredet selv i 10^{-5} fortyndingen (Tabel 4). Den øgede bakterievækst over tid, som følge af substrat fra spildevandet, kunne også tydeligt ses på HPC-værdierne (Tabel 4).

Kontinuert ATP-måling ville således afsløre en forurening, og selvom følsomheden umiddelbare ikke er helt så høj som med de traditionelle metoder, vil den kontinuerte analyse kunne påvise forureningen, når den sker, og give alarm med det samme. Desuden er der formentlig yderligere mulighed for optimering af følsomheden ved filtrering af større vandvolumener.

4.2 3-døgns kontinuert måling

Efter optimering af Fys-Pack og MCCU blev de afprøvet ved en samtidig kontinuert registrering af fysiske parametre og ATP på Symbions ledningsnet over tre døgn.

4.2.1 Opsætning

Symbion er en stor virksomhedsbygning med lille aktivitet over weekenden og om aftenen, og tidligere analyser har vist svingende vandkvalitet over ugen og døgnet. Den kontinuerte måling forløb fra søndag middag (26/11-2006) til onsdag middag (29/11-2006). Fysiske parametre blev registreret hvert minut ved brug af 'FYS-pack'-enheden og hver 3. time opsamlede MCCU'en over fem minutter en vandprøve (ca. 100 mL), som blev analyseret for Intracellulært-ATP. Parallelt med MCCU'en opsamlede en autosampler diskrete prøver, som blev opbevaret ved 5°C. Disse diskrete prøver blev leveret til E&R DTU én gang i døgnet til analyse for ATP (Total, Frit, Intracellullært) og kimtal-22 ($HPC_{Gærekstrakt,22C,72\ h}$).

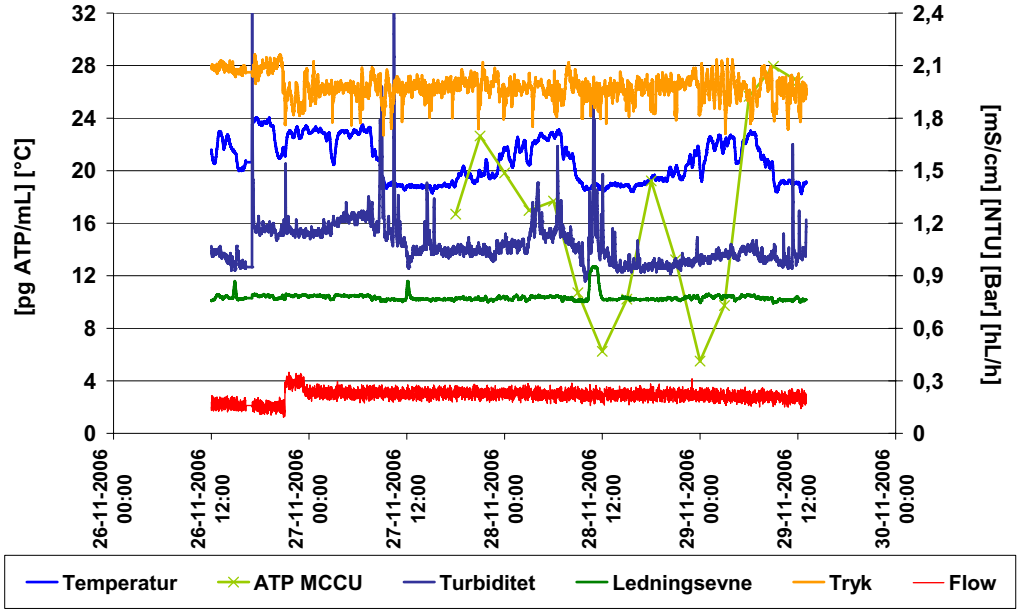
4.2.2 Resultater

Flow igennem Fys-Pack blev efter 9 timers drift med 9-13 L/h indstillet til 14-21 L/h. Tidsforløbet af temperaturen (Figur 22) afspejlede vandforbruget i bygningen med højeste temperaturer (20-25ºC) over weekenden og om natten, når der var et lille forbrug, og faldende temperaturer (laveste temperatur 17ºC) om morgenen og over frokost.

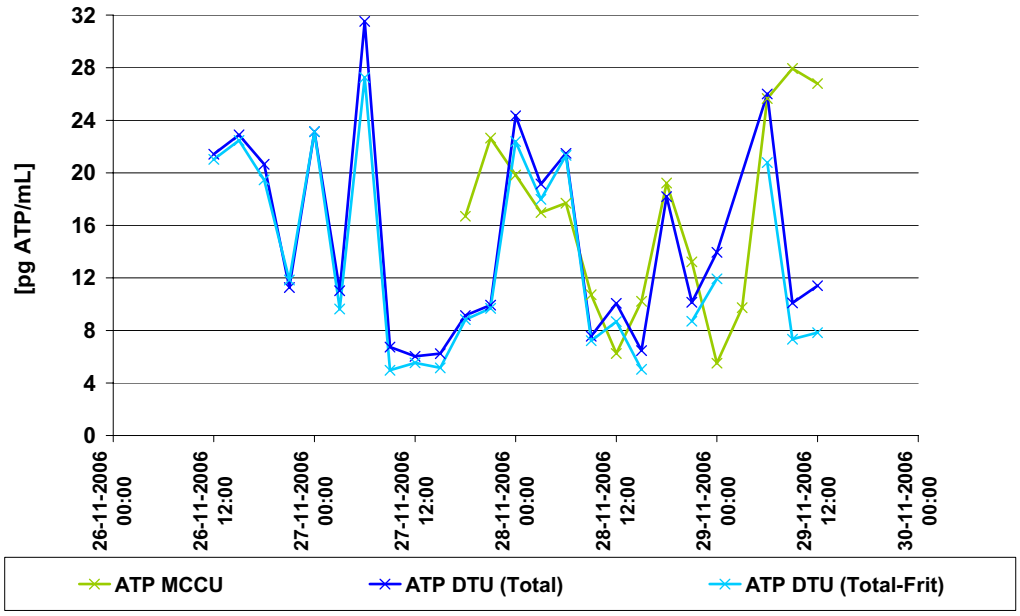
Turbiditeten afspejlede ligeledes forbruget, idet peak-udslag forekom, når forbruget var størst omkring frokost, dvs. når der var størst ophvirvling i rørsystemet (Figur 22). Ledningsevnen var relativ konstant (ca. 0,7 mS/cm) med udslag sammenfaldende med udslagene i turbiditet.

Generelt fulgte MCCU'ens målinger af ATP-koncentrationerne ligeledes forbruget, hvilket gav samme tendenser over tid imellem temperatur og ATP.

Laveste værdier blev registreret over frokostperioden (<10 pg ATP/mL) og højeste værdier over natten (>20 pg ATP/mL) (Figur 22 - måling fra MCCU'en gik tabt det første døgn pga. utæthed i filterhus).



Figur 22: Logningsresultater fra 3-døgns kontinuert monitering med Fys-Pack og MCCU på Symbions ledningsnet.



Figur 23: ATP-analyser fra 3-døgns monitering på Symbions ledningsnet foretaget dels kontinuert med MCCU'en (Total-ATP) og dels på diskret opsamlede prøver analyseret én gang i døgnet af E&R DTU.

Frit-ATP udgjorde mindre end 30% af Total-ATP, og generelt udgjorde Frit-ATP en større andel af total ATP'en i perioder med forbrug (dagtimer). Selvom prøverne til analyse på DTU blev opbevaret ved 5ºC i 2-26 timer før analyse,

var der generelt god overensstemmelse imellem ATP-målinger med MCCU'en og hos E&R DTU (Figur 23).

Opholdstiden i Symbions ledningsnet er generelt høj, hvilket giver anledning til en ringere vandkvalitet i form af højere bakterieantal, end hvad der kan forventes i forsyningsnettet. Dette kunne også ses på kimtal-22 bestemmelserne, der alle var > 200 CFU/mL (grænseværdi i distributionsnettet = 200 CFU/mL).

Den 3-døgns kontinurt moniteringen demonstrerede, at ændringer i vandkvaliteten kunne moniteres med Fys-Pack og MCCU, men der er ikke grundlag for at konkludere, hvorvidt de fysiske parametre kan anvendes som kontrolparametre for vandkvaliteten. Fys-Pack målingerne forløb med stor robusthed og stabilitet. MCCU'ens automatik fungerede, men instrumentet kræver i sin nuværende form forsat en del tilsyn for at køre stabilt.

5 Diskussion og Konklusion

Et af hovedformålene i projektet var at renovere og optimere den eksisterende MCCU-α-2. Dette arbejde viste sig væsentlig mere krævende end antaget ved projektets start.

De væsentligste problemstillinger forbundet med MCCU'en i den nuværende version er:

- Vedligeholdelse af slanger og ventiler
- Rensning af kamre og slanger for at undgå afsmitning imellem prøver
- Tilstopning af filter (filter skal skiftes efter 10-15 analyser)

En del af problemerne er blevet løst i projektet, så MCCU-α-2 kan drives automatisk, men den anvendte laboratorie-opstilling illustrerede, hvorledes en fremtidig version af MCCU'en kan forbedres yderligere.

Teknikken med tilsætning af intern ATP-standard (IS) til målt prøve til at korrigere og kontrollere den almindelige ATP-bioluminescense-analyse blev undersøgt, men ikke implementeret i MCCU-α-2 indenfor projektets rammer. De opnåede erfaringer indikerede, at muligheden for fortsat måling af samme prøve er tvivlsom med HS-reagenser.

Til kontinuert måling af fem fysiske parametre blev fem sensorer udvalgt og monteret som en flytbar enhed: Fys-Pack, der kan opsamle data med meget stor hyppighed. Fys-Pack kan opkobles på ledningsnet hvor som helst, men fortrinsvis indendørs. Fys-Pack blev testet ved kontinuert kørsel på Søndersø Vandværk, Hvidovre Vandværk samt på Symbion, hvor der blev demonstreret stor robusthed og stabilitet af Fys-Pack. Signalerne fra Fys-Pack viser tydeligt variationer og er let tolkelig.

Intracellulært-ATP målt med MCCU-α-2 i tre timers intervaller gav tolkelige signaler, hvor flere på hinanden følgende analyser bekræftede hinanden mht. niveau og systematiske variationer over tid. Sammenlignende målinger mellem MCCU-α-2 og validerede analyser (E&R DTU) validerede MCCU-α-2-målingerne og bekræftede, at princippet med monitering ved måling af Intracellulært-ATP er hensigtsmæssigt.

Ved samtidig afprøvning af Fys-Pack og MCCU blev der ikke fundet direkte korrelationer imellem fysiske parametre og mikrobiologiske parametre. Det kan dog ikke på den baggrund udelukkes, at de fysiske parametre kan være indikatorer for kvalitetsændringer, specielt ved opkobling på udvalgte punkter ude i ledningsnettet.

Ved simuleringsforsøg blev det belyst, at ATP-analyse kan være et effektivt værktøj til detektion af forureninger i ledningsnet, f.eks. af spildevand. Kombineret med MCCU'ens kontinuerte måleteknik er der potentiale for en forbedring af overvågningen af mikrobiel drikkevandskvalitet.

5.1 Perspektivering

På baggrund af erfaringer gjort i projektet er en ny og mere simpel ”real-time” analyseautomat under udvikling og konstruktion. Den vil blive baseret på anvendelse af centrifugefiltre, hvor celleoplukning og luciferin/luciferase-reaktionen kan foregå direkte på filteret. Filteret udskiftes vha. en robotarm imellem hver enkelt analyse. Dette løser en række problematikker: Dels elimineres problematikken med afsmitning imellem prøver, da der benyttes nyt filter til hver prøve, og der vil ikke være transport af prøve igennem slanger og kamre. Dette betyder at hele renseproceduren kan fjernes, hvilket igen betyder et langt mindre reagensforbrug med tilsvarende mindre reservoirbehov. Da der ikke skal anvendes væskevolumen til transporten igennem slanger mm., kan der anvendes et langt mindre volumen til resuspension af cellerne efter filtrering, så ATP'en fortyndes minimalt, hvilket øger følsomheden på målingen. Analysevarigheden vil ligeledes kunne nedbringes til i størrelsesordenen 10 til 15 minutter mod de nuværende 30 minutter (især på grund af tidskrævende rengøringsprocedurer). Der vil forsat blive arbejdet på muligheden for at kalibrere hver enkelt måling ved tilsætning af intern ATP-standard.

Med de skitserede forbedringer vil analyseomkostningerne i sig selv formentlig kunne komme under 50 DKK per analyse.

Registreres der med en vis hyppighed, vil der formentligt kunne defineres et baseline-niveau, som hæves markant ved forureninger (som f.eks. spildevandsindtrængning). Alarmer kan indsættes, så der kun behøves personalemæssige indgreb ved overskridelse af et øvre alarm-niveau.

6 Referencer

Boe-Hansen, R.; Albrechtsen, H.-J.; Arvin, E.; Spliid, H. (2003) Mikrobielle forureninger – vi ser kun toppen af isbjerget, danskVand 2, pp. 86-90

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. (2006) Brock Biology of Microorganisms, 11 ed. Pearson Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ

Roche datablad: ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Version 3. JULY 1999. Cat. No. 1 699 709

Van der Kooij, D.; Baggelaar, P.K.; Veenendaal, H.R.; Moulin, L.; Corfitzen, C.B.; Albrchtsen, H.-J-; Holt, D.; Hambsch, B.(2006) Standardising the biomass production potential method for determining the enhancement of microbial growth by construction products in contact with drinking water – inter-laboratory testing; EC Grant Agreement nbr. S12,403889