

Bestimmung des ATP-Gehaltes von Böden

Version 1.2 (2020)

Code der Referenzmethode	B-BM-ATP		Mögliche Einsatzbereiche	
Einsatzbereich	Düngeberatung	Ackerkulturen und Grasland		
		Gemüsebau (Freiland / Gewächshaus)		
		Weinbau, Obstbau, Beerenanbau, Gewürz- und Medizinalpflanzen		
	Standortcharakterisierung		x	
	Schadstoffbeurteilung			
	Düngeruntersuchungen	Recyclingdünger	Kompost	
			Gärgut fest	
			Gärgut flüssig	
			Klärschlamm	
		Hofdünger	Mist	
	Gülle			
Mineraldünger				
Pflanzkohle				
Forschungsmethoden				
Analysenprogramm	Probennahme	B-M-PN		
	Probenaufbereitung	B-PAL		
	Aufschluss			
	Messung	B-BM- ATP, TS		

Konzentrations- / Messbereich	
Angabe der Ergebnisse	Angaben in mg ATP / g Trockensubstanz (TS) auf 3 Kommastellen.
Bemerkungen für äquivalente Methoden	
Sicherheit / Umwelt	



1. Prinzip

Adenosin-triphosphat (ATP) wird mit 0.6 N H₂SO₄ - unterstützt durch einen mechanischen Aufschluss - aus frischem Boden extrahiert. Nach Abfiltrieren des Bodens wird das Filtrat neutralisiert und die Biolumineszens nach Zugabe von Glühwürmchenextrakt (Luciferin / Luciferase) in einem Aliquot gemessen. Bei der enzymatischen Reaktion wird ATP aus dem Bodenfiltrat vollständig als Energiequelle verbraucht. Die dabei freigesetzten Lichtimpulse (relative light units = RLUs) sind der ATP-Menge direkt proportional. Die Umrechnung von Lichtimpulsen in ng ATP erfolgt mit Hilfe von Kalibrierkurven.

Zur Berechnung des ATP-Verlustes (vor allem durch Bodenadsorption) werden jeweils Parallelbestimmungen mit identischem Boden nach Zugabe einer bekannten ATP-Menge durchgeführt.

2. Durchführung

Apparaturen und Geräte:

- (A) Biocounter
- (B) Autoklav
- (C) Spectrophotometer
- (D) Rundschtüttler
- (E) Ultraschallbad
- (F) Automatisches pH-Einstellungsgerät
- (G) 50 ml Standflaschen, Polypropylen
- (H) Micro-Tuben "Eppendorf" (pp) mit Deckel
- (I) Rundfilter (S & S 520B Ø 125 mm)
- (J) Einmal-Filterhalter 0.45 µm
- (K) Sterilfilter 0.2 µm
- (L) 10 ml-Vials, 30 ml-Vials
- (M) Lumacuvette P
- (N) 250 ml Polyethylenflaschen
- (O) Achatkugeln Ø 2 cm
- (P) 100 ml Scheidetrichter mit dazu passenden Filtergestellen
- (Q) Faltenfiltern S & S 512 ½ Ø 185 mm
- (R) Plastikzylinder 27 x 50 mm

Reagenzien:

- (1) Demineralisiertes Wasser (H₂O, Leitfähigkeit < 2 µS/cm); einen Teil 20 Min. bei 121 °C autoklavieren.
- (2) Extraktionslösung: 5 l
In 5 l Messkolben ca. 2 l H₂O vorlegen; Zugabe von
83.3 ml H₂SO₄ konz.,
4.85 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (= Tris),
33.05 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (= Tris HCl),
mit H₂O auf 5 l auffüllen.

- (3) Pufferlösung pH 7.4: 1 l
 In 1 l Becherglas H₂O vorlegen; Zugabe von
 1.62 g Tris,
 6.61 g Tris HCl,
 1.2 g EDTA 2 Na,
 0.86 g Mg SO₄ * 7 H₂O
 pH-Kontrolle und ev. Korrektur auf pH 7.4. In 1 l Kolben umgiessen und bis zur Marke mit H₂O auffüllen.
 Die Lösung ist im Kühlschrank 1 Woche haltbar.
- (4) Neutralisationslösungen
 Aethanolamin ca. 15 %: 250 ml
 In 250 ml Kolben 38 ml Aethanolamin 99 %, dann mit H₂O bis zur Marke auffüllen.
 Aethanolamin ca. 2 %: 250 ml
 In 250 ml Kolben 5 ml Aethanolamin 99 %, dann mit H₂O bis zur Marke auffüllen.
- (5) Natriumazid 2 %: 100 ml
 In 100 ml Kolben 2.02 g NaN₃ 99 % einwiegen und mit H₂O bis zur Marke auffüllen.
- (6) Ionenaustauscherharz
 Das Harz (Dowe x 50W x 8; 16 - 40 mesh; H.+ -form in einem Becherglas während 2 bis 3 Tagen bei 80 °C trocknen. Nachher im Exsikkator aufbewahren.
- (7) Sterile Stammlösung ATP 10⁻³ M (für Dauerlagerung)
 1 l (ev. kleinere Menge) herstellen:
 3.3 g Tris HCl in einem Becherglas mit H₂O lösen und mit Tris-Puffer pH 7.4 (3) auf pH 5.5 einstellen. In 1 l Kolben umgiessen und mit H₂O bis zur Marke auffüllen. 15 Min. bei 121 °C autoklavieren. Mit sterilem Tris-Puffer pH 5.5 eine 10⁻³ M ATP-Lösung herstellen.
 Konzentration im Spektrometer beim Absorptionsmaximum (259 nm) messen und nötigenfalls korrigieren (Extinktionskoeffizient siehe Analysenblatt ATP).
 ATP 10⁻³ M Stammlösung à 1.1 ml in sterile Micro-Tuben (H) abfüllen und bei -20 °C lagern.
- (8) Sterile ATP-Lösung 10⁻⁵ M (für kurzfristige Lagerung bis zu 2 Monaten)
 Ca. 4 bis 5 Micro-Tuben ATP 10⁻³ M (7) auftauen.
 1 ml ATP 10⁻³ M in sterilen 100 ml Kolben pipettieren und mit sterilem Tris-Puffer pH 7.4 (3) bis zur Marke auffüllen; die genaue Konzentration spektrometrisch bei 259 nm bestimmen (Extinktionskoeffizient siehe ATP-Analysenblatt).
 Je 12 ml in sterile Standflaschen (G) abfüllen und bei -20 °C aufbewahren.
- (9) Kalibrierlösungen
 Zusatzlösung: 100 ml
 In Becherglas 25 ml Extraktionslösung (2),
 25 ml Tris-Puffer pH 7.4 (3),
 5 ml Aethanolamin 15 % (4a) geben.
 pH-Wert mit Aethanolamin 2 % (4b) auf 7.4 einstellen.
 5 ml NaN₃ 2 % (5) hinzufügen, in 100 ml Kolben umgiessen und mit Tris-Puffer pH 7.4 (3), bis zur Marke auffüllen.
 Mit der Zusatzlösung die ATP-Lösung 10⁻⁵M auf folgende Kalibrierkonzentrationen verdünnen:
- | | |
|---|---------------------|
| 10 ⁻⁶ M:1.0 ml der 10 ⁻⁵ M Lösung + | 9.0 ml Zusatzlösung |
| 2 x 10 ⁻⁷ M:1.0 ml der 10 ⁻⁶ M Lösung + | 4.0 ml Zusatzlösung |
| 10 ⁻⁷ M:1.0 ml der 10 ⁻⁶ M Lösung + | 9.0 ml Zusatzlösung |
| 5 x 10 ⁻⁸ M:2.5 ml der 10 ⁻⁷ M Lösung + | 2.5 ml Zusatzlösung |
| 10 ⁻⁸ M:1.0 ml der 10 ⁻⁷ M Lösung + | 9.0 ml Zusatzlösung |
| 5 x 10 ⁻⁹ M:2.5 ml der 10 ⁻⁸ M Lösung + | 2.5 ml Zusatzlösung |
| 2 x 10 ⁻⁹ M:1.0 ml der 10 ⁻⁸ M Lösung + | 4.0 ml Zusatzlösung |
- falls nicht sofort verwendet bei -20 °C einfrieren. Die Zusatzlösung dient als Blindwert-Lösung

(10) Enzymlösung (Vorbereitung am Vorabend des Messtages)

In die Flasche mit Enzym (FLE-50) ca. 10 ml H₂O steril pipettieren und 3 x 1 Minute sanft schütteln (Schaumbildung vermeiden), dazwischen 1 - 2 Min. stehenlassen. Zur Entfernung grober Schwebeteilchen Lösung durch den mit H₂O steril angefeuchteten Rundfilter (I) in ein kleines Becherglas filtrieren. Feine Schwebeteilchen und mikrobielle Verunreinigungen durch eine Feinfiltration in 2 Stufen entfernen:

a) in Einwegspritze aufgenommenes Grobfiltrat durch Einmal-Filterhalter 0,45 µm (J) filtrieren.

b) 0,45 µl Filtrat mit Einwegspritze durch ein Sterilfilter 0,2 µm (K) in ein steriles Vial filtrieren.

Bei 4 °C mindestens 1 Nacht stehenlassen. Haltbarkeit: 3 bis 4 Tage im Kühlschrank.

- *Anmerkung: Nach dieser Vorbereitung sind keine Schwebeteilchen mehr in der Lösung, die zu einer raschen Verschmutzung des Biocounter-Injektors inklusive Schläuche führen könnten. Enzymlösungen dürfen nie eingefroren werden.*

Arbeitsvorschrift:

Extraktionsprozess

allgemeine Bemerkungen:

Von jeder Bodenprobe werden 2 Extraktionen durchgeführt:

- a) ohne ATP-Zusatz
- b) mit ATP-Zusatz

Es ist wichtig, dass der Extraktionsprozess ohne Unterbruch innerhalb von 2 bis 2 ½ Stunden durchgeführt wird. Sämtliche Extraktionsschritte müssen für a und b gleichzeitig erfolgen.

Einwaage für a-Extraktion: 2 bis 2.5 g feuchter Boden (= Ta)

für b-Extraktion: 3 bis 3.5 g feuchter Boden (= Tb)

in verschliessbare 250 ml Polyethylenflaschen (N). Bodengewicht notieren!

a-Extraktion: Zugabe von 50 ml Extraktionslösung (2)

b-Extraktion: Zugabe von 48 ml Extraktionslösung (2) und 2 ml ATP 10⁻⁵ M (8)

- In jede Flasche 2 Achatkugeln (O) geben. Flaschen gut verschliessen und während 3 Minuten auf dem Schüttler (D) bei 395 RPM schütteln.
- Anschliessend Flaschen 3 Minuten in ein Ultraschallbad (E) stellen und während dieser Zeit die Filtrationsanlage vorbereiten:
- 100 ml Scheidetrichter (P) in ein Filtergestell hängen; auf den Scheidetrichter Trichter mit Faltenfiltern (Q) aufsetzen.
- Je 2 Polylöffel getrocknetes Harz (1 bis 2 g Reagenz 6) in 25 ml Plastikzylinder (R) geben und diese unter die Scheidetrichter stellen.
- Extrakte auf die Filter giessen und mindestens 15 bis 20 ml filtrieren. Die Hahnen der Scheidetrichter öffnen und Filtrate in die mit Harz versehenen Plastikzylinder abfliessen lassen. Die Zylinder gut verschliessen und während 6 Min. in ca. 2 Min.-Abständen von Hand schütteln.
- 5 ml Tris-Puffer pH 7,4 (3), 5 ml ionenausgetauschtes Bodenfiltrat und danach 1 ml Aethanolamin 15 % (4a) in saubere 25 ml Plastikzylinder pipettieren.
- Die Lösungen mit Aethanolamin 2 % (4b) auf pH 7.4 einstellen - wenn möglich automatisch (F) - und in 20 ml Messkolben umgiessen.
- 0,1 ml NaN₃ 2 % (5) beifügen und mit Tris-Puffer pH 7.4 (3) bis zur Marke auffüllen.
- Die Lösungen in die 25 ml Plastikzylinder zurückgiessen, Zylinder verschliessen und bis zur Messung bei -20 °C aufbewahren.
- gelöstes ATP ist bei Raumtemperatur nur während 24 Std. stabil; Wird die Messung nicht sofort vorgenommen, müssen Extrakte, Kalibrierlösungen sowie die Zusatzlösung bei -20 °C eingefroren werden.

Messung

Vorbereitung:

Extrakte und Kalibrierlösungen - falls Messung nicht am Tag der Extraktion erfolgt - auftauen und gut schütteln; zur Messung werden jeweils 100 µl einer ATP-Lösung oder eines Extraktes in spezielle Küvetten (M) für den Biocounter (A) pipettiert.

Enzymlösung (10) während ½ - ¾ h auf Raumtemperatur temperieren

Kalibrierlösungen messen:

Background mit leerer Küvette überprüfen

Kalibrierlösung $2 \cdot 10^{-7}$ M messen, darf 100 000 RLU nicht überschreiten; bei grösseren RLU-Werten muss Enzym-Lösung mit H₂O steril verdünnt werden.

Blindwert (BW) mit 100 µl Zusatzlösung bestimmen, BW sollte 20 % des RLU-Wertes von Kalibrierlösung $2 \cdot 10^{-9}$ M nicht überschreiten, andernfalls ist die Qualität des Enzyms reduziert.

Danach Kalibrierlösungen messen.

Extrakte messen.

Nach Messung der Extrakte Messung von Kalibrierlösungen wiederholen, da häufig Messschwankungen auftreten. Eine temperierte Enzymlösung sollte innerhalb von 2 ½ h verbraucht werden, weil danach die Enzymaktivität nachlässt. Es empfiehlt sich deshalb, eine Messserie so zu planen, dass die Messung von Extrakten und Kalibrierlösungen 2 ½ h nach Temperieren der Enzymlösung beendet ist.

3. Berechnung

Berechnungsgrössen

bekannte Grössen:

x und y = gemessene Werte für a-Extraktion bzw. b-Extraktion (ng ATP / ml)

T_a und T_b = Boden-Einwaage in g Trockensubstanz (TS) für a-Extraktion bzw. b-Extraktion

d_a und d_b = ATP-Zusätze für a-Extraktion bzw. b-Extraktion (ng ATP / ml); d_a = 0

unbekannte Grössen:

A und B = ATP-Gehalt im Extrakt bei einem ATP-Verlust = 0 (ng ATP / ml)

α = Adsorptionskoeffizient von ATP im Boden

Beziehungen von Berechnungsgrössen

$$A + d_a = x + \alpha(A + d_a)^3 \sqrt{T_a} \quad (1)$$

$$B + d_b = y + \alpha(B + d_b)^3 \sqrt{T_b} \quad (2)$$

$$B = \frac{T_b}{T_a} \cdot A \quad (3)$$

aus (1) und (2):

$$\alpha = \frac{A + d_a - x}{(A + d_a)^3 \sqrt{T_a}} = \frac{B + d_b - y}{(B + d_b)^3 \sqrt{T_b}} \quad (4)$$

B ersetzen durch Ausdruck (3):

$$(A + d_a - x) \left(\frac{T_b}{T_a} A + d_b \right) \sqrt[3]{T_b} = \left(\frac{T_b}{T_a} A + d_b - y \right) (A + d_a) \sqrt[3]{T_a}$$

daraus ergibt sich:

$$\begin{aligned} & A^2 \left[T_b \sqrt[3]{T_b} - \sqrt[3]{T_a} \right] \\ & + A \left[d_b T_a \left(\sqrt[3]{T_b} - \sqrt[3]{T_a} \right) + d_a T_b \left(\sqrt[3]{T_b} - \sqrt[3]{T_a} \right) + y T_a \sqrt[3]{T_a} - x T_b \sqrt[3]{T_b} \right] \\ & + d_a d_b T_a \left(\sqrt[3]{T_b} - \sqrt[3]{T_a} \right) + y d_a T_a \sqrt[3]{T_a} - x d_b T_a \sqrt[3]{T_b} = 0 \end{aligned} \tag{5}$$

Dieser Ausdruck ist eine quadratische Gleichung vom Typ: $aA^2 + bA + c = 0$

mit der Lösungsformel $A = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$

Nach dieser Formel wird A aus (5) berechnet. A entspricht dem ATP-Gehalt in 1 ml Extrakt bei einem ATP-Verlust = 0

Der ATP-Gehalt in einem g Boden-TS ergibt sich folglich aus: $\frac{A \cdot 200}{T_a}$ (mg ATP / g TS)

Der Adsorptionskoeffizient α berechnet sich aus (4) nach Bestimmung des A -Wertes.

4. Resultatangabe

Angaben in mg ATP / g Trockensubstanz (TS) auf 3 Kommastellen.

5. Historie

Version	Art der Änderung	neu	bisher
Version 1 (1996)	Erstellung Methode		
Version 1.1 (1998)	Freigabe Methode		
Version 1.2 (2020)	Editorisch	Elektronische Veröffentlichung mit geändertem Layout	

Impressum

Herausgeber	Agroscope Reckenholzstrasse 191 8046 Zürich www.agroscope.ch/referenzmethoden
Auskünfte	Diane Bürge
Copyright	© Agroscope 2020