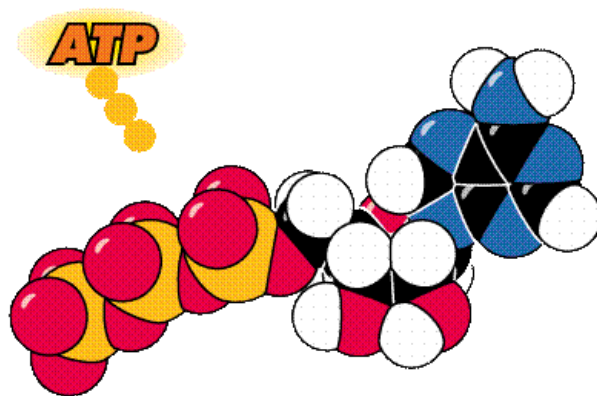


BTO 2005.031  
september 2005

# Optimalisatie van de bepaling van het gehalte adenosinetriphosfaat (ATP) in water en in biofilm



**BTO 2005.031**  
september 2005

# **Optimalisatie van de bepaling van het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) in water en in biofilm**

© 2005 Kiwa N.V.  
Alle rechten voorbehouden.  
Niets uit deze uitgave mag  
worden verveelvoudigd,  
opgeslagen in een  
geautomatiseerd  
gegevensbestand, of  
openbaar gemaakt, in enige  
vorm of op enige wijze,  
hetzij elektronisch,  
mechanisch, door  
fotokopieën, opnamen, of  
enig andere manier, zonder  
voorafgaande schriftelijke  
toestemming van de  
uitgever.

**Kiwa N.V.**  
**Water Research**  
Groningehaven 7  
Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein

Telefoon 030 60 69 511  
Fax 030 60 61 165  
Internet [www.kiwa.nl](http://www.kiwa.nl)

# Colofon

**Titel**

Optimalisatie van de bepaling van het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) in water en in biofilm

**Projectnummer**

111.514.100.003

**Projectmanager**

Wiel Senden

**Kwaliteitsborgers**

Harm Veenendaal

Dick van der Kooij

**Auteur**

Stefan Voost

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.

# Voorwoord

Optimalisatie van de bepaling van het gehalte adenosinetriphosfaat (ATP) in water en in biofilm is in dit onderzoek uitgevoerd als onderdeel van het BTO-programma. De resultaten van dit onderzoek zullen waar mogelijk gebruikt worden bij diverse onderzoeksprojecten en doeleinden waar de ATP-bepaling van toepassing is.

Het onderzoek is begeleid door Harm Veenendaal en een deel van de analyses zijn uitgevoerd door Anke Brouwer en Anita Lugtenberg, allen werkzaam op het Laboratorium voor Microbiologie (LMB) van Kiwa N.V.

Doordat in dit onderzoek gebruik is gemaakt van nieuwe chemicaliën en apparatuur is diverse malen contact geweest met de productspecialisten van Promega.



# Samenvatting

Adenosinetriphosfaat (ATP) bevindt zich in elk levend micro-organisme en het ATP-gehalte is een maat voor de hoeveelheid aanwezige actieve biomassa. Al jaren gebruikt Kiwa de ATP-bepaling voor diverse doeleinden. Soms is het ATP-gehalte van het geteste drinkwater onder de bepalingsgrens van de ATP-bepaling (1 ng ATP/l). Omdat het toch van belang is om van dergelijke monsters het juiste ATP-gehalte te bepalen, is aandacht besteed aan het verlagen van de bepalingsgrens. Het bewaren van monsters, ten behoeve van de ATP-bepaling, is in bepaalde gevallen nodig en/of handig (bv. in het weekend of bij kleine meetseries). Omdat het nog niet geheel duidelijk is wat de minst onjuiste omstandigheden zijn voor het bewaren van een monster is ook aandacht besteed aan het zoeken van een geschikte bewaarmethode.

Bij de huidige methode om het ATP-gehalte in een monster te bepalen, worden diverse controles uitgevoerd. Er is tot op heden echter geen controle op de lysisstap, het vrijmaken van het ATP uit de micro-organismen, van de ATP-bepaling. Omdat dit toch een essentiële stap is van de ATP-bepaling is er gezocht naar een controle om deze stap te verifiëren.

De bepalingsgrens van de huidige ATP-bepalingmethode, die gebruik maakt van chemicaliën (luminat/luminex) en apparatuur (Advance) van Celsis, is niet te verlagen door apparatuurstellingen te wijzigen. Met een recent ontwikkelde luminometer (Glomax TD 20/20n) en bijbehorende chemicaliën (Enliten) in combinatie met luminex is de bepalingsgrens wel te verlagen. Met deze nieuwe ATP-bepalingmethode is een onderste bepalingsgrens haalbaar van 0,05 ng ATP/l.

In dit onderzoek zijn verschillende soorten monsters (stamculturen en bacteriepopulaties) bewaard bij verschillende temperaturen en is er vervolgens gekeken naar het effect van deze temperaturen op het ATP-gehalte. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat het bewaren van monsters altijd, ongeacht de bewaartemperatuur, een verandering in het ATP-gehalte veroorzaakt. Het bewaren van monsters gedurende hooguit 2 dagen bij 4°C (0°C voor oppervlaktewater) veroorzaakte in de meeste gevallen de minste verandering in het ATP-gehalte.

Ook is gebleken dat het ATP-gehalte van een stamcultuur van *P.fluorescens* (P17), bewaard bij -80°C, na 7 dagen een variatiecoëfficiënt (VC) van < 5% heeft. Doordat het ATP-gehalte van stam P17 bekend is (na 7 dagen bij -80°C) en stabiel (VC <5%), kan stam P17 bruikbaar zijn als controle voor de ATP-bepaling.



# Inhoud

	<b>Voorwoord</b>	<b>1</b>
	<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
	<b>Inhoud</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>7</b>
1.1	Achtergrond en chemie van de ATP-bepaling	7
1.1.1	Achtergrond	7
1.1.2	Chemie	7
1.2	Onderdelen van de ATP-bepaling die geoptimaliseerd kunnen worden	8
1.2.1	Bepalingsgrens verlagen	8
1.2.2	Bewaarmethode	9
1.2.3	ATP-controle	9
1.3	Doelstellingen	10
<b>2</b>	<b>Verlagen van de bepalingsgrens</b>	<b>11</b>
2.1	Apparatuurstellingen: methode en resultaten met interpretatie	11
2.2	Chemicaliën en apparatuur: methode en resultaten met interpretatie	13
2.3	Conclusie	20
<b>3</b>	<b>Ontwikkelen van een bewaarmethode en een ATP-controle voor monsters waarvan het ATP-gehalte bepaald moet worden</b>	<b>21</b>
3.1	Methode en opzet onderzoek	21
3.2	Resultaten en interpretatie	22
3.3	Discussie	30
<b>4</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>31</b>
4.1	Conclusies	31
4.2	Aanbevelingen	31
	<b>Bijlagen</b>	<b>33</b>





# 1 Inleiding

## 1.1 Achtergrond en chemie van de ATP-bepaling

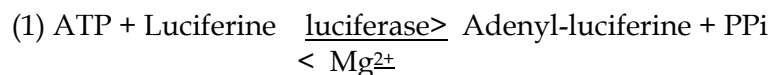
### 1.1.1 Achtergrond

Elk levend (actief) (micro-)organisme bevat adenosinetrifosfaat (ATP), waardoor het bepalen van het ATP-gehalte van een monster, een interessante parameter voor verschillende toepassingen is. Zo wordt in de levensmiddelenbranch ATP vaak gebruikt als kwalitatieve parameter (het wel of niet aanwezig zijn van biocontaminatie). Kiwa gebruikt al jaren de ATP-bepaling als kwantitatieve parameter voor de biomassa in (drink-) water en biofilmmonsters. Ondanks dat Kiwa de ATP-bepaling al jaren uitvoert zijn er nog steeds onderdelen die geoptimaliseerd kunnen worden. Drinkwater vormt een belangrijk deel van de monsters bij Kiwa waarvan het ATP-gehalte bepaald moet worden. Drinkwater heeft een laag ATP-gehalte en in sommige typen drinkwater is het ATP-gehalte soms onder de bepalingsgrens van de huidige analysemethode. Toch kan het interessant en waardevol zijn om van monsters met een dergelijk laag ATP-gehalte het juiste ATP-gehalte te bepalen. Daarom is in dit onderzoek o.a. aandacht besteed aan het verlagen van de bepalingsgrens van de ATP-bepaling. Naast het verlagen van de bepalingsgrens, zijn nog andere onderdelen van de ATP-bepaling te optimaliseren. Deze onderdelen zijn beschreven in hoofdstuk 1.2.

### 1.1.2 Chemie

De ATP-bepaling is gebaseerd op de reactie van ATP met een substraat met als gevolg het vrijkomen van fotonen. Het vrijkomen van fotonen heet luminescentie en kan gemeten worden met een luminometer die de luminescentie vervolgens weergeeft in Relatieve Licht Eenheden (RLE's). ATP kan zich zowel intracellulair (gebonden ATP) als extracellulair (vrije ATP) in een monster bevinden. Het intracellulaire ATP dient dus vrijgemaakt te worden voordat het ATP zich kan binden aan het substraat, van de ATP-bepaling. Door de cellen van de micro-organismen te lyseren (bv. met een lysisbuffer) kan het intracellulaire ATP vrijgemaakt worden.

De meeste ATP-bepalingsmethoden zijn gebaseerd op de reactie van luciferine/luciferase (afkomstig van vuurvliegjes) met ATP:



Reactie 1 is omkeerbaar maar heeft een evenwicht dat sterk naar rechts ligt (Sigma, productinformatie).

Het licht dat bij reactie 2 vrijkomt (luminescentie) wordt gemeten m.b.v. een luminometer en uitgedrukt in Relatieve Licht Eenheden (RLU's). Onder optimale omstandigheden komt in theorie, 1 lichtfoton per molecuul ATP vrij. De huidige ATP-bepalingsmethode maakt ook gebruik van bovenstaande enzymreacties en hiervoor worden chemicaliën (luminat en luminex ; vroegere benaming is NRB) en apparatuur (Advance) van Celsis gebruikt.

## 1.2 Onderdelen van de ATP-bepaling die geoptimaliseerd kunnen worden

### 1.2.1 Bepalingsgrens verlagen

De huidige bepalinggrens van de ATP-bepaling is 1 ng ATP/l. Omdat het nogal eens voorkomt dat de hoeveelheid ATP in drinkwater lager is dan de huidige bepalinggrens is het wenselijk om de bepalinggrens te verlagen. Mogelijke manieren om de bepalinggrens te verlagen zijn:

- gebruik van andere chemicaliën dan de huidige (Celsis).
- gebruik van een ander luminometer dan de Advance (Celsis) of andere instellingen van de Advance.
- de micro-organismen in het monster, waarvan de hoeveelheid ATP bepaald moet worden, concentreren d.m.v. filtratie.
- combinatie van bovenstaande methoden.

#### Chemicaliën

De chemicaliën die bij de ATP-bepaling gebruikt worden spelen een belangrijke rol daar ze o.a. het ATP vrijmaken uit de cellen zodat dit ATP gemeten kan worden. Door gebruik van andere (of meer) chemicaliën kan er mogelijk meer ATP uit de cellen vrijkomen en/of een betere reactie van substraat met de enzymen plaatsvinden, waardoor de bepalinggrens lager kan zijn dan 1 ng ATP/l.

#### Apparatuur

Voor het bepalen van het ATP-gehalte in een monster wordt gebruik gemaakt van een bioluminescentie-apparaat (luminometer). De fotonen, die vrijkomen bij de reactie van ATP met de gebruikte chemicaliën, kunnen m.b.v. dit apparaat gemeten worden. Door gebruik te maken van een luminometer die gevoeliger is dan de huidige (Advance), kunnen lagere concentraties ATP bepaald worden en kan zo de bepalinggrens verlaagd worden. Ook door instellingen van de luminometer te wijzigen kan mogelijk de gevoeligheid worden beïnvloed.

#### Filtratie

Door het monster te filtreren kan de hoeveelheid ATP in het oorspronkelijke monster geconcentreerd worden in een kleiner volume. Hierdoor kunnen lage concentraties ATP in monsters toch worden waargenomen. Cruciale punten bij filtratie zijn de keuze van de poriëgrootte en de filtratiedruk. ATP bevindt zich zowel binnen als buiten (vrije ATP) de cellen. Door de poriëgrootte te verkleinen vergroot men de filtratiedruk. Vrije ATP zal waarschijnlijk tijdens de filtratie

verloren gaan en bij een te hoge filtratiedruk kan ook ATP uit de cellen vrijkomen en door de filter heen gaan.

### 1.2.2 *Bewaarmethode*

Als het monster, waarvan het ATP-gehalte bepaald moet worden, niet meteen ingezet (bv. in het weekend) kan worden is het noodzakelijk om het te bewaren onder condities waarbij het ATP-gehalte het minst verandert en/of waarvan bekend is wat de verandering is. Behalve dat het bewaren van monsters soms noodzakelijk is kan het ook nuttig of handig zijn (bv. bij kleine meetseries).

Mogelijke bewaarmethodes:

- bewaren bij bepaalde temperatuur
- gebruik van chemicaliën
- vriesdrogen

### 1.2.3 *ATP-controle*

Bij de huidige ATP-bepaling worden verschillende controles meegenomen zoals een lege cuvet, een cuvet met ATP-vrij drinkwater, een cuvet met alleen de reagentia en twee controles met een bekend ATP-gehalte (2 ng ATP/l en 100 ng ATP/l). De eerste drie van bovengenoemde controles worden gebruikt om de achtergrondluminescentie te bepalen. De twee standaardconcentraties ATP worden gebruikt om te bepalen of de ATP-bepaling naar behoren functioneert en het juiste ATP-gehalte weergeeft. De controles met een standaardconcentratie ATP bestaan uit vrij ATP opgelost in een buffer. Hierdoor wordt de lysisstap van de ATP-bepaling echter niet geïntegreerd. Naast deze controles is er dus behoefte aan een controle van een monster met micro-organismen waarvan het ATP-gehalte bekend is. Dit monster kan een cultuur zijn van een micro-organisme maar ook een populatie bacteriën zoals een oppervlaktewatermonster of een monster van een biofilm. M.b.v. dit controlemonster kan men dan mede controleren of de lysisbuffer voldoet. Ook zou het nuttig zijn als dit extra controlemonster een ATP-gehalte heeft boven de 100 ng ATP/l zodat tegelijkertijd geïntegreerd kan worden of het meten van hogere ATP-gehalten juist gaat.

### 1.3 Doelstellingen

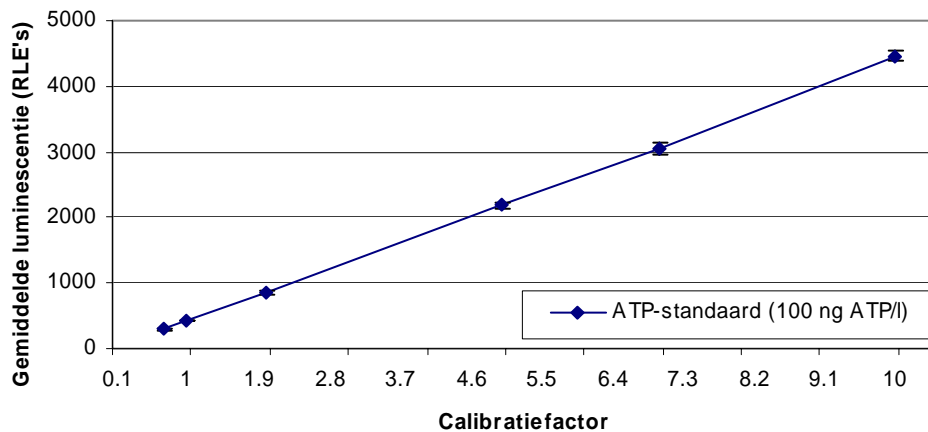
De doelstellingen in dit rapport beschreven onderzoek waren:

- De bepalingsgrens van de huidige ATP-bepaling (1 ng ATP/l) te verlagen naar 0,1 ng ATP/l of lager.
- Het ontwikkelen van een bewaarmethode voor monsters waarvan het ATP-gehalte bepaald moet worden.
- Een extra ATP-controle ontwikkelen voor de ATP-bepaling waarbij ook de lysisstap geverifieerd kan worden.

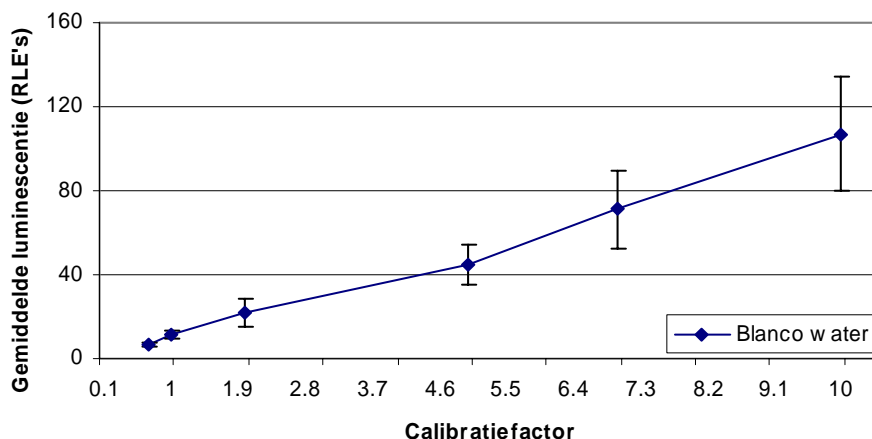
## 2 Verlagen van de bepalingsgrens

### 2.1 Apparatuurstellingen: methode en resultaten met interpretatie

Bij de huidige luminometer (Advance) is een calibratiefactor instelbaar. Deze calibratiefactor heeft invloed op de hoeveelheid gemeten RLE's. Hoe hoger deze factor des te groter is het aantal gemeten RLE's bij een bepaalde hoeveelheid ATP. Er zijn bij dit onderzoek verschillende calibratiefactoren getest. Dit is gedaan door blanco water en een ATP-standaard (100 ng ATP/l) in 7-voud te testen bij verschillende calibratiefactoren (zie figuren 1 en 2)

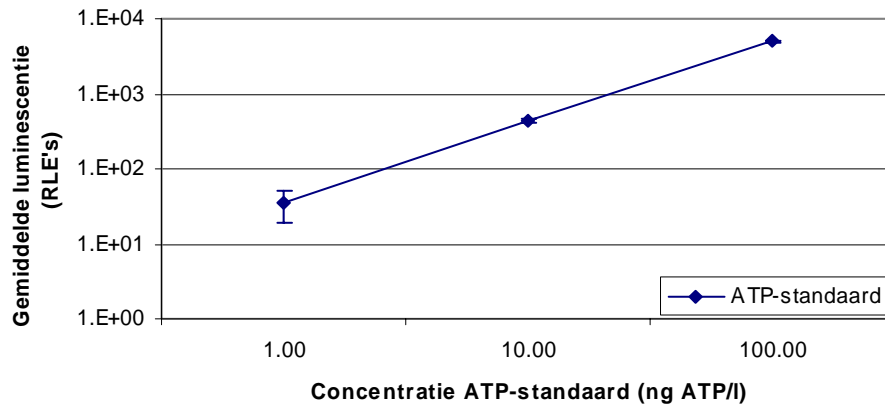


Figuur 1 Gemiddelde luminescentie van een ATP-standaard bij verschillende calibratiefactoren

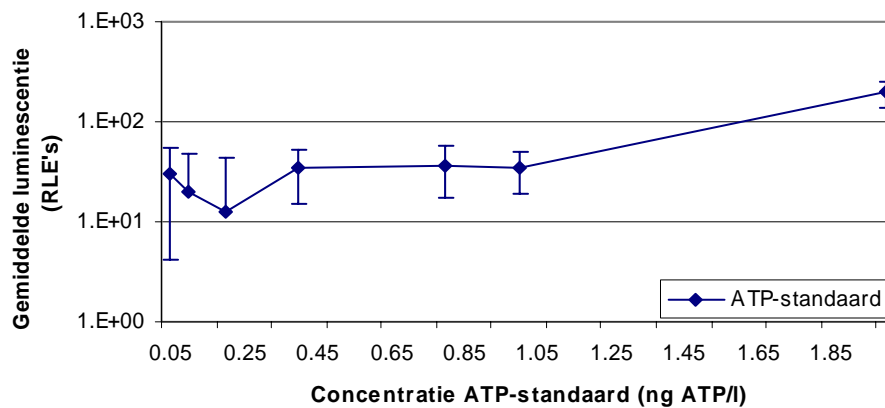


Figuur 2 Gemiddelde luminescentie van blanco water bij verschillende calibratiefactoren

Het aantal RLE's neemt zowel bij het blanco water als bij de ATP-standaard toe met het verhogen van de calibratiefactor en dat is ook wat werd verwacht. Om te kijken of dit effect heeft op de gevoeligheid van de bepaling is bij een hogere calibratiefactor (factor 10) een verdunningsreeks gemaakt van een ATP-standaard (figuur 3 en 4).



Figuur 3 Gemiddelde luminescentie van een ATP-verdunningsreeks bij calibratiefactor 10



Figuur 4 Gemiddelde luminescentie van lage ATP-concentraties bij calibratiefactor 10

Uit figuur 1 t/m 4 blijkt dat men het aantal gemeten RLE's kan verhogen door de calibratiefactor te verhogen. Uit figuur 4 en de ruwe data in bijlage I blijkt echter dat hierdoor niet de bepalingsgrens verlaagd wordt want lager dan 1 ng ATP/l is er geen significant verschil (getoetst met de T-toets) van de gemeten luminescentie, tussen de verschillende concentraties ATP. De T-toets is een algemeen gebruikt statistisch rekenmodel waarmee significante verschillen tussen een reeks resultaten aangetoond kan worden.

## 2.2 Chemicaliën en apparatuur: methode en resultaten met interpretatie

In de literatuur staan veel methoden beschreven, met verschillende chemicaliën en apparatuur, om ATP te meten. Veel van deze methoden worden gebruikt om biocontaminatie aan te tonen. En dan gaat het vaak om het wel of niet aanwezig zijn van (meestal grote hoeveelheden) micro-organismen (o.a. in de voedselindustrie). Vaak zijn deze methoden robuust en is minder aandacht besteed aan de kwaliteit van de bepaling.

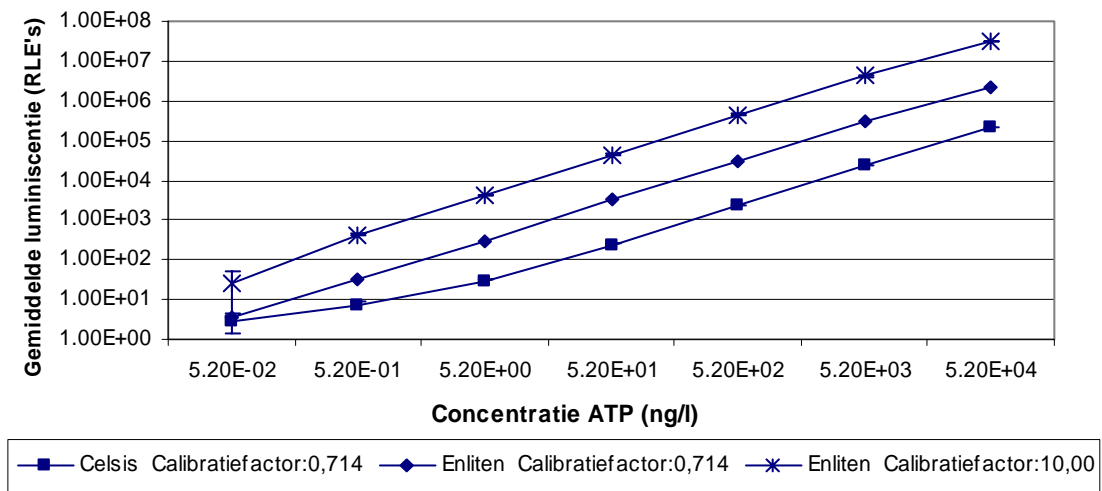
Een recent ontwikkelde methode om lage concentraties ATP te meten komt van Turner Biosystems in samenwerking met Promega. De chemicaliën (Enliten-kit) zouden in combinatie met een nieuwe luminometer van Turner een bepalingsgrens halen van 0,05 - 0,5 ng ATP/l. Er zijn 2 versies van deze nieuwe luminometer beschikbaar, een enkelvoudige (Glomax 20/20n) waarbij 1 monster tegelijk gemeten kan worden en een 96wells versie (Veritas) waarbij het mogelijk is om meerdere monsters in 1 run te meten. Beide luminometers hebben dezelfde lichtsensor/systeem dus de gevoeligheid zou bij beide hetzelfde moeten zijn bij identieke omstandigheden. De Glomax 20/20n zou ook nog eens makkelijk te hanteren zijn (vooral voor kleine aantallen monsters). Daarom is deze getest i.p.v. de Veritas.

De Glomax 20/20n kan geleverd worden met een automatisch injectiesysteem. Het injectiesysteem van het demo-apparaat, dat bij dit onderzoek is getest, bleek bij levering verontreinigd te zijn. De verontreinigde injectiesysteem zorgde voor een verhoogd ATP-gehalte waardoor de gemeten ATP-gehalten onjuist waren. De verontreiniging was niet te verwijderen met de huidige reinigingsmethoden en ook niet met de methoden voorgeschreven door de leverancier. Daarom is overgegaan op handmatig testen.

De Enlitenkit bevat alleen de Luciferase/Luciferine reagentia en geen lysisbuffer om de cellen van de micro-organismen te lyseren. Daarom is de Enlitenkit getest in combinatie met Luminex (Celsis) en lysisbuffer van de Enliten biocontamination detection kit.

Omdat er eerst onduidelijkheden waren over de lysisstap is de Enlitenkit zonder lysisstap getest op zowel de Advance als de Glomax 20/20n.





Figuur 5 Chemicaliën getest op de Advance

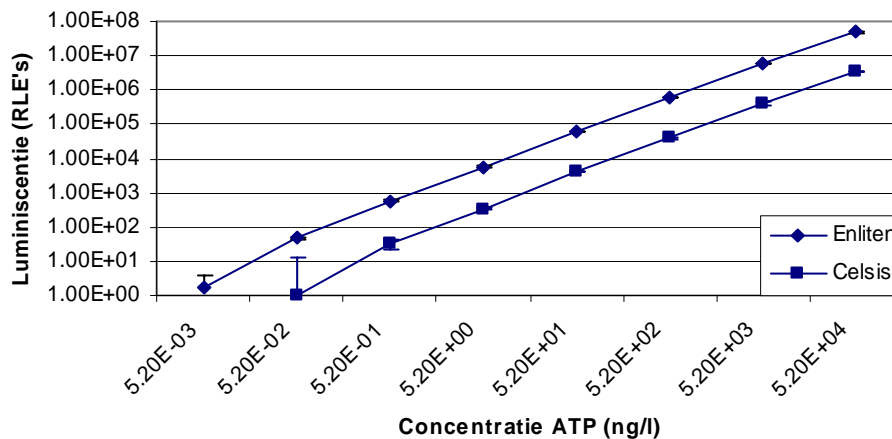
In figuur 5 is duidelijk te zien dat de luminescentie, van de verschillende concentraties ATP, hoger is bij de Enlitenkit dan bij de Celsiskit. Ook bevestigt figuur 5 dat een hogere calibratiefactor de gemeten luminescentie verhoogt. Door de verhoogde luminescentie kan er eerder een onderscheid gemaakt worden tussen lage concentraties ATP (zie ook ruwe data in bijlage II-1), waardoor de bepalingsgrens verlaagd wordt (tabel 1). De bepalingsgrens kan men bepalen door m.b.v. de statistische T-toets de laagste concentratie ATP te bepalen die significant te onderscheiden is.

Tabel 1 Bepalingsgrenzen van de geteste chemicaliën op de Advance

Chemicaliën	Calibratiefactor	Bepalingsgrens* (ng ATP/l)
Celsis	0,714	>1,0 en < 5,0
Enliten	0,714	0,8
Enliten	10,00	0,2

\* Laagste ATP-concentratie die getest is en significant te onderscheiden is van het blanco water en de overige geteste ATP-concentraties.

Ook op de Glomax 20/20n zijn beide enzymkits getest en de resultaten daarvan zijn verwerkt in figuur 6. Uit de ruwe data (bijlage II-2) kan men vervolgens de bepalingsgrens bepalen. Door te kijken welke ATP-concentraties een luminescentie hebben boven de gemeten luminescentie van het blanco water en die een significant verschil (toetsen met de T-toets) hebben in luminescentie, kan men de bepalingsgrens bepalen (tabel 2).



Figuur 6 Chemicaliën getest op de Glomax 20/20n

Tabel 2 Bepalingsgrenzen van verschillende chemicaliën op de Glomax 20/20n

Chemicaliën	Bepalingsgrens (ng ATP/l)*
Celsis	1,00
Enliten	0,026

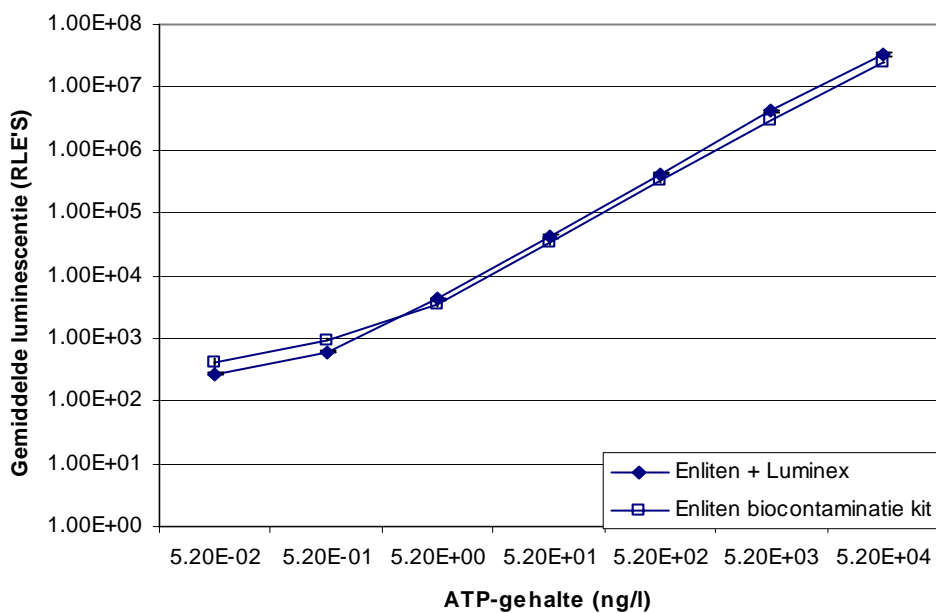
\* Laagste ATP-concentratie die getest is en significant te onderscheiden is van het blanco water en de overige geteste ATP-concentraties.

De bepalinggrens van de ATP-bepaling kan niet worden verlaagd m.b.v. de Celsis-kit op de Glomax 20/20n. Dit in tegenstelling met de Enliten-kit die op de Glomax 20/20n nog lagere concentraties ATP kan meten dan op de Advance (zie tabel 2), wat al lager was dan de Celsis-kit.

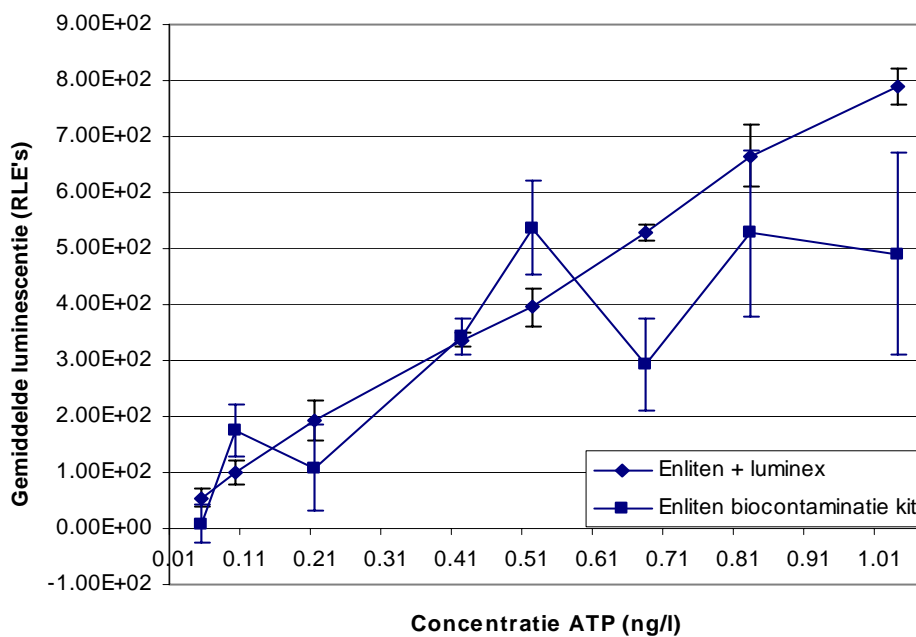
Uit bovenstaande resultaten blijkt dat de Enlitenkit lagere concentraties ATP kan meten dan de Celsis-kit wanneer getest wordt op dezelfde luminometer en omstandigheden. Ook blijkt dat de Glomax 20/20n een hogere luminescentie meet dan de Advance als de geteste omstandigheden identiek zijn, hetgeen te danken is aan een gevoeliger lichtsensor.

Toen de Enliten-kit getest werd op monsters bleek dat de ATP-gehalten lager uitvielen dan verwacht werd op grond van eerder behaalde resultaten met de huidige ATP-methode. Een lysisstap bleek toch nodig in tegenstelling tot wat de leverancier (Promega) in eerste instantie beweerde.

De leverancier van Enliten en de Glomax 20/20n luminometer raadde vervolgens de Enliten biocontaminatie-kit aan die bestaat uit de Enliten-chemicaliën en een lysisbuffer. Naast de Enliten biocontaminatie-kit is de Enlitenkit getest in combinatie met Luminex. Beide enzym/substraat-combinaties zijn getest op gevoeligheid en lineariteit m.b.v. calibratiecurven.



Figuur 7 Calibratiecurven met alleen 10-voudige verdunningsstappen gemeten op de Glomax 20/20n



Figuur 8 Calibratiecurven van alleen lage ATP-concentraties gemeten op de Glomax 20/20n

Tabel 3 Bepalingsgrenzen van verschillende chemicaliën met lysisstap op de Glomax 20/20n

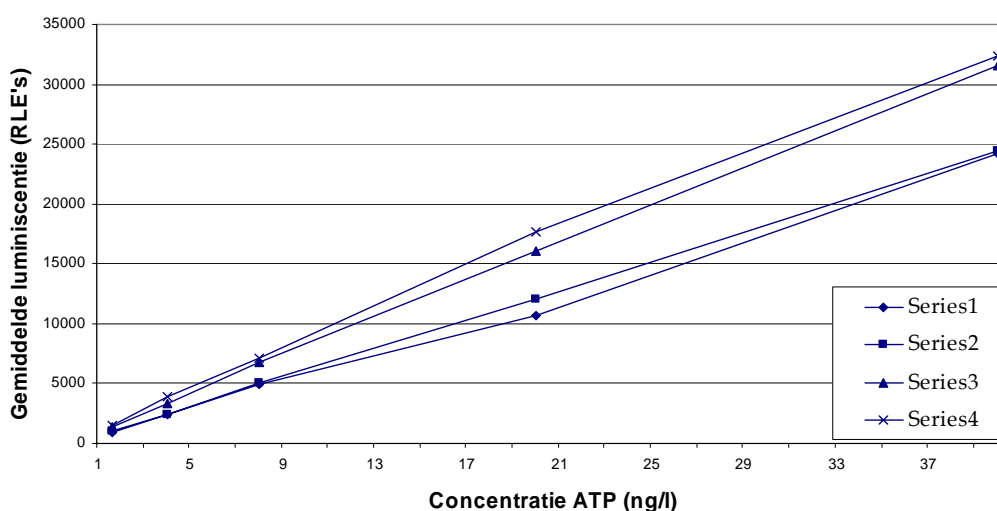
Chemicaliën	Bepalingsgrens (ng ATP/l)*
Enliten-kit + Luminex	0,05
Enliten biocontamination-kit	5,00

\* Laagste ATP-concentratie die getest is en significant te onderscheiden is van het blanco water en de overige geteste ATP-concentraties.

De Enliten biocontamination-kit heeft moeite om ATP-concentraties onder de 5 ng ATP/l significant te onderscheiden (getoetst m.b.v. de T-toets) (figuur 8). Deze bepalingsgrens ligt hoger dan de huidige methode en is dus niet bruikbaar voor deze toepassing. Daarentegen heeft de Enlitenkit i.c.m. Luminex een bepalingsgrens van 0,05 ng ATP/l wat een stuk lager ligt dan de huidige methode. Door het gebruik van een lysisstap (Luminex) wordt de bepalingsgrens verhoogd van 0,02 naar 0,05 ng ATP/l, maar dat is nog steeds ver onder de 1 ng ATP/l (huidige bepalingsgrens). D.m.v. de statistische T-toets is aangetoond dat er een significant verschil is tussen de ATP-concentraties van 0,05 ng ATP/l en hoger (zie bijlage II-3 voor de ruwe data).

Van een calibratiecurve kan men de hellingshoek berekenen m.b.v. lineaire regressie en deze factor wordt weer gebruikt bij het berekenen van het ATP-gehalte uit het aantal gemeten RLE's (Kiwa huisvoorschrift LMB-002).

Er zijn 4 calibratiecurven (figuur 9 en bijlage II-4), volgens het huidige ATP-voorschrift (Kiwa huisvoorschrift LMB-002), gemaakt op de Glomax 20/20n (i.c.m. Enliten + Luminex). Met de gemiddelde hellingshoek (tabel 4) van deze calibratiecurven kan vervolgens het ATP-gehalte van de gemeten monsters berekend worden.



Figuur 9 Calibratiecurven volgens Kiwa huisvoorschrift LMB-002 op de Glomax 20/20n.

Tabel 4 Gemiddelde hellingshoek van de calibratiecurven

Gemiddelde hellingshoek	700,91 ± 9,79
-------------------------	---------------

Om te beoordelen of met de Enlitenkit +Luminex ook juist en nauwkeurig het ATP-gehalte kan worden bepaald zijn een aantal monsters met de huidige methode en met de nieuwe methode onderzocht (tabel 5).

Tabel 5 Vergelijking ATP-methoden m.b.v. monsters

Monsternr.	ATP-gehalte (ng/l)		Verhouding tussen de beide methoden
	Celsis (Advance)	Enliten +Luminex (Glomax 20/20n)	
M050997	61,68 ± 1,19	69,95 ± 1,72	0,88
M050999	3,05 ± 0,74	2,63 ± 0,16	1,16
M051001	<1,00	0,05 ± 0,02	-
M051003	<1,00	0,09 ± 0,02	-
M051005	8,32 ± 1,94	7,72 ± 0,54	1,08
M051007	2,84 ± 0,45	2,77 ± 0,13	1,02
M051009	1,16 ± 0,45	0,50 ± 0,04	2,32
M051012	1,47 ± 0,60	1,08 ± 0,03	1,36
M051015	<1,00	1,04 ± 0,11	-
M050925	34,53 ± 0,74	32,54 ± 1,97	1,06
M050926	75,05 ± 4,76	73,20 ± 4,62	1,03
M050927	2,21 ± 1,19	0,90 ± 0,13	2,46
M050928	2,63 ± 0,30	0,92 ± 0,11	2,86
M050929	3,26 ± 0,89	2,65 ± 0,12	1,23
M050930	3,47 ± 0,60	2,84 ± 0,09	1,22
M050913	1,58 ± 0,30	0,58 ± 0,09	2,72
M050916	<1,00	0,70 ± 0,15	-
M050919	1,47 ± 0,15	1,11 ± 0,14	1,32
M051493	8,84 ± 0,45	7,95 ± 0,08	1,11
M051494	9,89 ± 0,30	8,47 ± 0,58	1,17
M051495	4,21 ± 0,30	3,96 ± 0,45	1,06
M051496	4,84 ± 0,45	4,51 ± 0,46	1,07
M051483	14,74 ± 0,60	12,09 ± 0,96	1,22
M051485	6,32 ± 0,30	5,75 ± 0,14	1,10
M051487	<1,00	0,15 ± 0,05	-
M051489	10,74 ± 0,89	9,68 ± 0,78	1,11
M051491	3,37 ± 0,00	2,44 ± 0,02	1,38

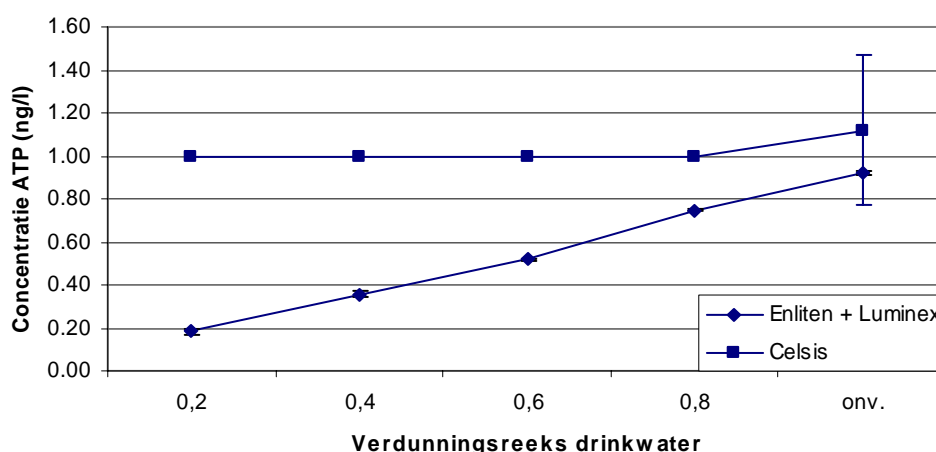
In tabel 5 is duidelijk te zien dat de huidige methode vrijwel altijd een wat hoger ATP-gehalte geeft dan de nieuwe methode. Ook valt op dat bij enkele monsters de nieuwe methode wel het ATP-gehalte kan meten dat bij de huidige methode onder de bepalingsgrens ligt. Van 95% van de resultaten heeft bij de nieuwe methode een variatiecoëfficiënt (VC) < 33%. Dit is iets lager dan bij de huidige methode waarvan 95% van de resultaten een VC < 41% heeft. Vooral bij lage ATP-gehalten zijn de VC-waarden van de metingen bij beide methodes het hoogst. Bij ATP-gehalten hoger dan 2 ng ATP/l is bij 95% van de resultaten bij de nieuwe methode de VC < 11% en bij de oude methode is de VC < 28% (Bijlage II-5).

Het ATP-gehalte, bepaald met de nieuwe methode, is berekend met een calibratiefactor die het gemiddelde is van de 4 uitgevoerde calibratiecurven. Dit aantal is zeer beperkt t.o.v. de huidige methode waarbij de calibratiefactor voortkomt uit een gemiddelde van jarenlang uitgevoerde calibratiecurven. Dit verschil zou een oorzaak kunnen zijn voor het verschil in het ATP-gehalte bij dezelfde monsters uitgevoerd met beide methoden.

Er zijn ook verdunningsreeksen gemaakt van twee monsters (oppervlaktewater en drinkwater) om na te gaan in hoeverre, met de verschillende methoden, ATP kan worden gemeten bij steeds kleinere concentraties (tabel 6). De monsters zijn verdund met ATP-vrij water.

Tabel 6 Vergelijking ATP-methoden m.b.v. verdunningsreeksen van twee monsters

Monsternr.	ATP-gehalte (ng/l)	
	Celsis (Advance)	Enliten +Luminex (Glomax 20/20n)
<b>Oppervlaktewater onverdund</b>	78,95 ± 6,94	92,23 ± 12,62
10x verdund	8,70 ± 0,68	14,60 ± 0,52
50x verdund	2,03 ± 0,24	2,36 ± 0,39
100x verdund	<1,00	1,21 ± 0,42
500x verdund	1,05 ± 1,09	0,07 ± 0,01
1000x verdund	<1,00	<0,05
1500x verdund	<1,00	<0,05
<b>Drinkwater onverdund</b>	1,12 ± 0,35	<b>1,04 ± 0,03</b>
1,25x verdund	<1,00	<b>0,84 ± 0,03</b>
1,67x verdund	<1,00	<b>0,58 ± 0,01</b>
2,50x verdund	<1,00	<b>0,40 ± 0,02</b>
5x verdund	<1,00	<b>0,21 ± 0,03</b>



Figuur 10 ATP-concentraties bij een verdunningsreeks van drinkwater

De resultaten in tabel 6 en figuur 10 laten duidelijk zien dat de nieuwe methode een lagere bepalingsgrens heeft dan de huidige methode want zodra het ATP-gehalte lager dan 1 ng/l werd, kon de nieuwe methode in veel gevallen (tot 0,05 ng ATP/l) gewoon het ATP-gehalte bepalen.

Bij oppervlaktewater zijn de verdunningsstappen van de verdunningsreeks niet geheel terug te vinden in de ATP-gehalten. Dit is mogelijk te wijten aan deeltjes in het water. Dit kan mogelijk voorkomen worden door het water te filteren (bv. 0,2 µm filter).

### 2.3 Conclusie

Uit de onderzoeksresultaten blijkt dat de huidige ATP-bepaling, met een bepalingsgrens van 1 ng/l, niet te optimaliseren is met andere calibratiefactoren. Een nieuwe ATP-bepaling, met andere chemicaliën (Enliten +Luminex) en apparatuur (Glomax 20/20n), haalt daarentegen wel een lagere bepalingsgrens en kan ATP meten van 0,05 ng ATP/l en hoger. De VC is < 33% bij 95% van de geteste monsters, wat lager is dan de huidige methode (<41%).

# 3 Ontwikkelen van een bewaarmethode en een ATP-controle voor monsters waarvan het ATP-gehalte bepaald moet worden

## 3.1 Methode en opzet onderzoek

Het bewaren van monsters kan, alvorens het ATP-gehalte bepaald wordt, handig (bv. i.v.m. het weekend) of nuttig (bv. bij kleine meetseries) zijn. In het verleden is door Kiwa ook onderzoek verricht naar een bewaarmethode, voor monsters waar het ATP-gehalte van bepaald moet worden, (vd Rijst,1994) maar dit onderzoek leverde geen geschikte bewaarmethode op. Daarom is in dit onderzoek naar een geschikte bewaarmethode gezocht.

De temperatuur kan een groot effect hebben op microbiologische processen en dus invloed hebben op het ATP-gehalte. De invloed van verschillende temperaturen op de stabiliteit van het ATP-gehalte in de loop der tijd is getest.

Verschillende soorten monsters zijn bij verschillende temperaturen bewaard en na bepaalde tijden is enkele malen het ATP-gehalte bepaald. De geteste temperaturen variëren van -80 tot 21°C en gedurende 29 dagen is enkele malen het ATP-gehalte bepaald. Door gebruik van verschillende soorten monsters kan men de invloed van temperatuur vergelijken per soort monster. De verschillende monsters bestaan uit culturen van *P.fluorescens* (P17) en gist, uit een bacteriepopulatie van een biofilm, uit oppervlaktewater en uit drinkwater. Voor de cultuur van P17 is gebruik gemaakt van een entflesje dat gebruikt voor de AOC-bepaling (Kiwa huisvoorschrift KLMB-016) en de gist is opgekweekt m.b.v. een vaste voedingsmedium en na opkweken gesuspendeerd in steriel water. Het biofilmmonster is afkomstig uit een biofilmmonitor en verkregen d.m.v. ultrasoon trillen volgens Kiwa huisvoorschrift LMB-010. Het geteste drinkwater is afkomstig uit het waterleidingnet van Kiwa en het oppervlaktewater uit de Lek.

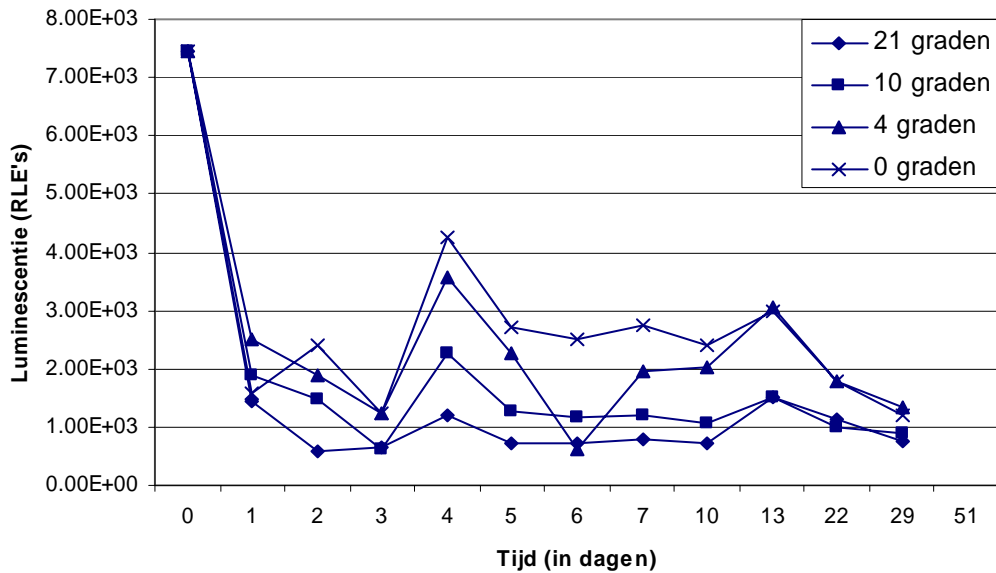
De metingen zijn op alle testdagen volgens het huidige ATP-voorschrift (Kiwa huisvoorschrift LMB-002) in drievoud door dezelfde analist (op dag 1 na) uitgevoerd.

Met deze methode kan ook gekeken worden of één van de geteste monsters geschikt is als controlemonster. Om als ATP-controle te dienen is het gewenst dat het ATP-gehalte stabiel is na een bepaalde methode, waardoor bij afwijkende ATP-gehalten duidelijk is dat er iets mis is met de ATP-bepaling (bv. met de chemicaliën).



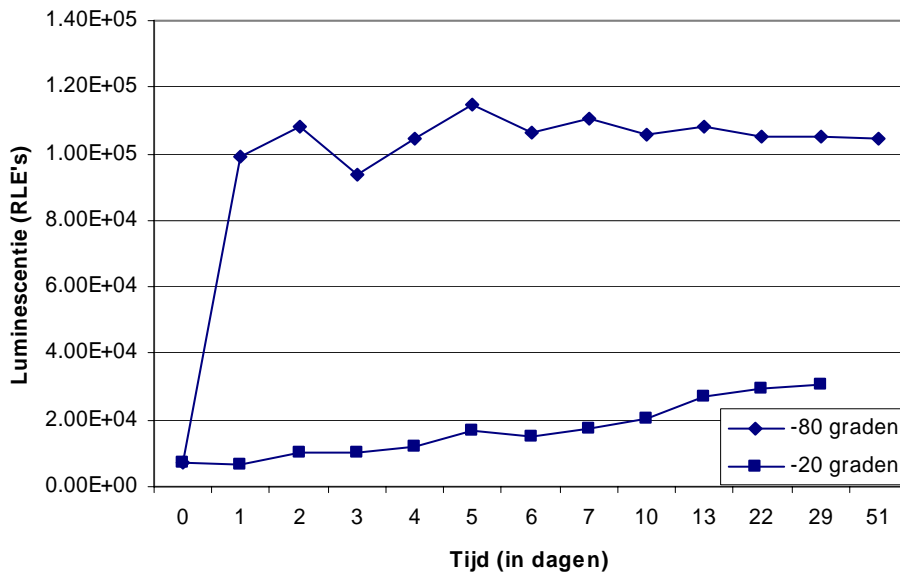
### 3.2 Resultaten en interpretatie

Per monster zijn de ATP-gehalten in de loop der tijd weergegeven in de onderstaande figuren, waarbij van gist twee figuren zijn gebruikt wegens de grote verschillen in het ATP-gehalte bij de verschillende temperaturen.



Figuur 11 ATP verloop van een gistsuspensie bij 0 t/m 21°C

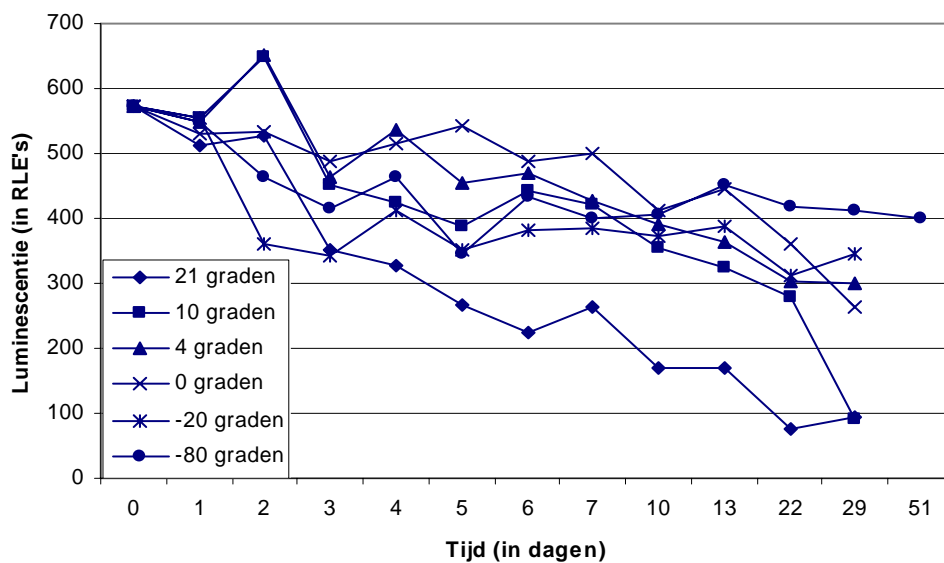
Bij gist is duidelijk te zien dat er een grote afname is van het ATP-gehalte bij 0 t/m 21 graden na 1 dag bewaren. Na dag 1 blijft het ATP-gehalte van gist bij 0 t/m 21 graden schommelen en er zijn bij deze 4 temperaturen na dag 1 geen duidelijke stijgingen of dalingen te meer te zien. De variatiecoëfficiënten bij deze 4 temperaturen van dag 1 t/m 29 zijn bij alle > 35 % .



Figuur 12 ATP verloop van een gistsuspensie bij -20 en -80°C

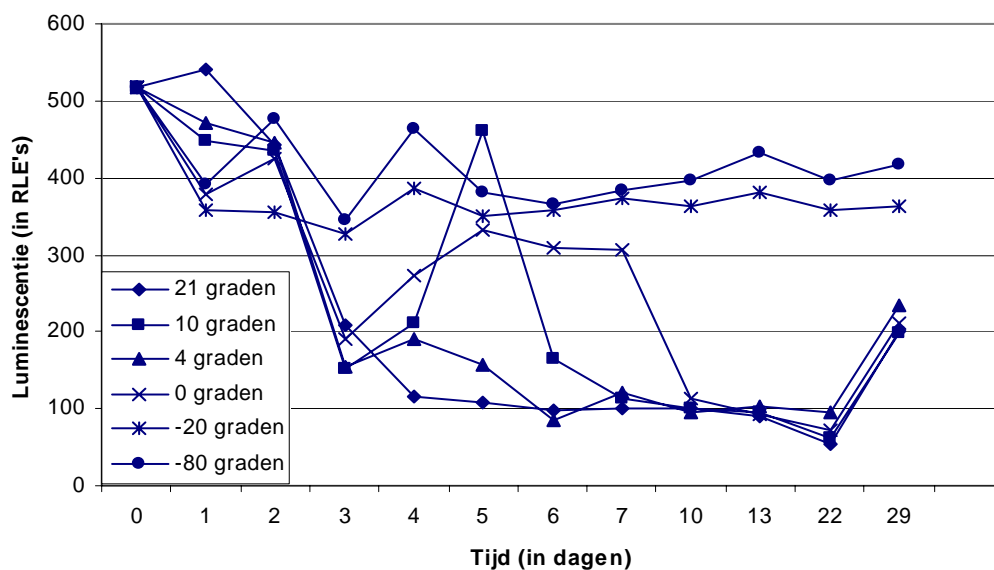
Na opslag van gist bij -20 en -80°C loopt het ATP-gehalte na 1 dag op. Na 1 dag bewaren bij -80 graden is het ATP-gehalte zelfs 10 maal hoger dan dag 0 en blijft dan redelijk constant (VC van 5,02% van dag 1 t/m 51). Het ATP-gehalte is bij -20°C na 1 dag gestegen maar in veel mindere mate dan bij -80°C. Daarentegen blijft het ATP-gehalte wel toenemen, zelfs nog na 29 dagen.

De stijging van het ATP-gehalte kan meerdere oorzaken hebben. Een mogelijke oorzaak is dat, door het invriezen (en het ontdooien voor het meten), metabolische reacties plaatsvinden in de gisten waarbij ATP geproduceerd wordt. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat de gisten niet volledig gelyseerd worden. Het zou kunnen zijn dat invriezen bij -80°C de celwand zo verzwakt dat cellysis nu vollediger zal zijn. Bij -20°C zou dit effect dan ook aanwezig kunnen zijn maar minder sterk en naarmate de tijd vordert zou dit aanwezig blijvende effect voor een verdere stijging van het ATP-gehalte kunnen zorgen.



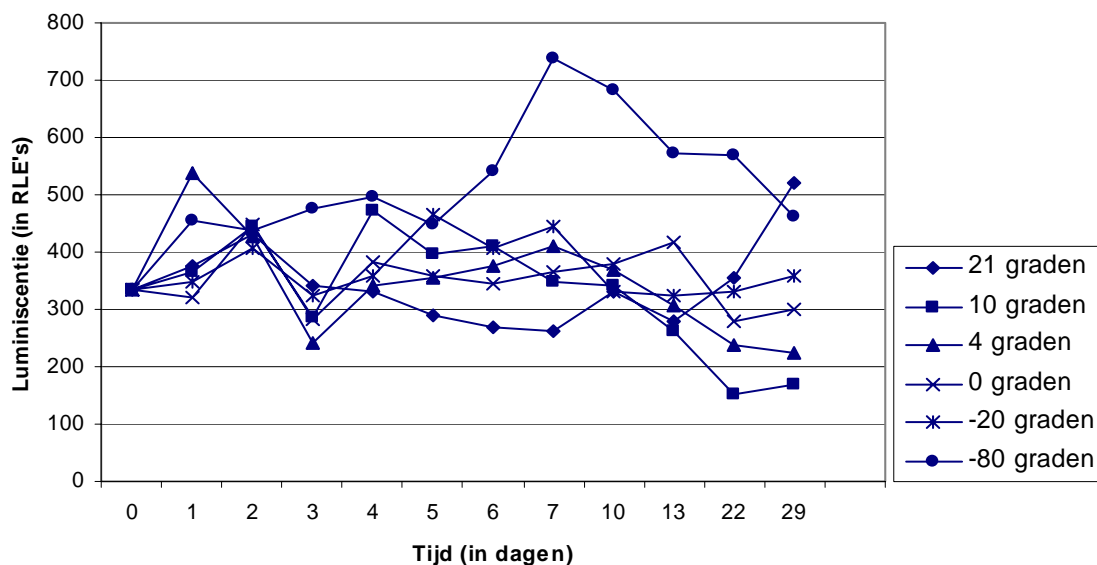
Figuur 13 ATP verloop van een suspensie van stam P17 bij -80 t/m 21°C

In figuur 13 is goed te zien dat het ATP-gehalte van stam P17 bij alle geteste temperaturen afneemt in de loop der tijd. De afname is het sterkst bij de hoogste temperatuur (21°C) en gedurende 1 week het minst bij 0°C.



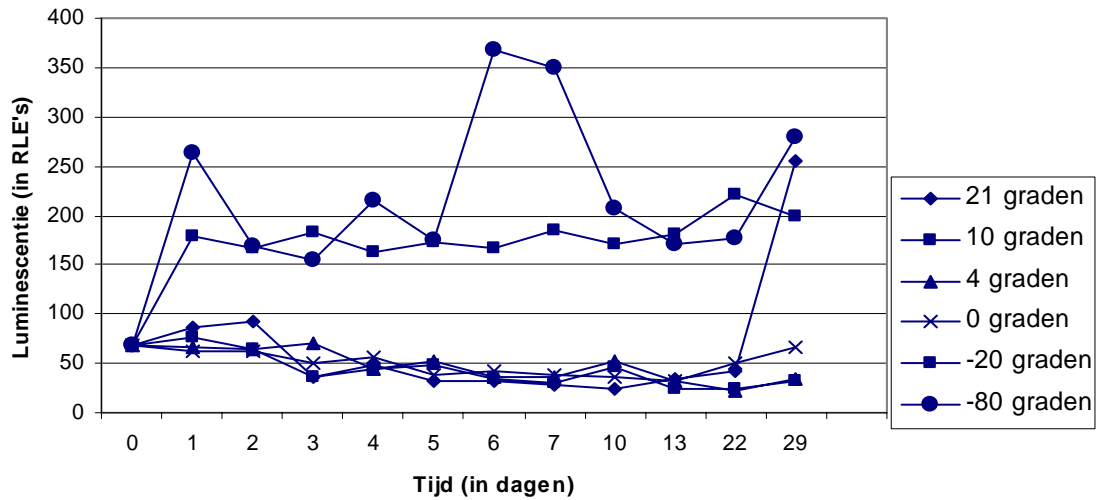
Figuur 14 ATP verloop van biofilm bij -80 t/m 21°C

Ook in figuur 14 is een afname van het ATP-gehalte te zien waarbij vooral opvalt dat na dag 2 een sterke afname van het ATP-gehalte te zien is bij 0 t/m 21 graden. Na 4 dagen blijft het ATP-gehalte van het biofilmmonster vooral bij -20 en -80°C constant, maar is beduidend lager dan op dag 0.



Figuur 15 ATP verloop van oppervlaktewater bij -80 t/m 21°C

Het ATP-gehalte van oppervlaktewater blijft bij 0°C het meest constant maar heeft nog steeds een VC van 14,82% (dag 0 t/m 29). Bij de andere temperaturen vinden soms grote schommelingen en/of uitschieters plaats.



Figuur 16 ATP verloop van drinkwater bij -80 t/m 21°C

Het ATP-gehalte van drinkwater (figuur 16) neemt toe na 1 dag bewaren bij -20 en -80°C. Bij 0 t/m 21 graden vindt geen grote stijging van het ATP-gehalte plaats maar is de VC (dag 0 t/m 29) nog wel boven de 25%.

Als men de luminescentie op de verschillende dagen vergelijkt t.o.v. dag 0 (Bijlage IV) wordt deze afwijking bij de meeste gevallen groter na dag 2 en is de afwijking in de meeste gevallen het kleinst bij 4°C (zie ook tabel 7).

Tabel 7 Luminescentie t.o.v. dag 0 (%)

T (°C)	Gist		P17		Biofilm		Oppervlaktewater		Drinkwater	
	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2	Dag 1	Dag 2
<b>21</b>	19	8	89	92	105	86	112	128	125	134
<b>10</b>	26	20	97	113	87	84	109	132	111	93
<b>4</b>	34	25	96	114	91	86	160	127	98	95
<b>0</b>	21	32	92	93	73	82	96	134	92	90
<b>-20</b>	89	140	97	63	69	69	104	121	259	242
<b>-80</b>	1330	1456	96	81	76	92	135	130	384	245

Om te controleren of de gemeten toename van het ATP-gehalte bij gist (bij -80°C) veroorzaakt wordt door vrije ATP is het ATP-gehalte opnieuw bepaald maar dan ook zonder Luminex om zo te kijken wat het gehalte vrije ATP is. Behalve van gist is het gehalte vrije ATP ook van stam P17 (bij -80°C) bepaald. Deze metingen zijn verricht op dag 51 waardoor tegelijkertijd gekeken kan worden of de ATP-gehalte's sterk verschillen t.o.v. eerdere dagen.

Tabel 8 Variatiecoëfficiënten van de meest constante monsters

Monster	Periode (in dagen)	VC (%)
Gist (-80°C)	1-51	5,02
Biofilm (-20°C)	1-29	4,41
P17 (-80°C)	7-51	4,89

Tabel 9 Gehalte vrije ATP van culturen bewaard bij -80°C

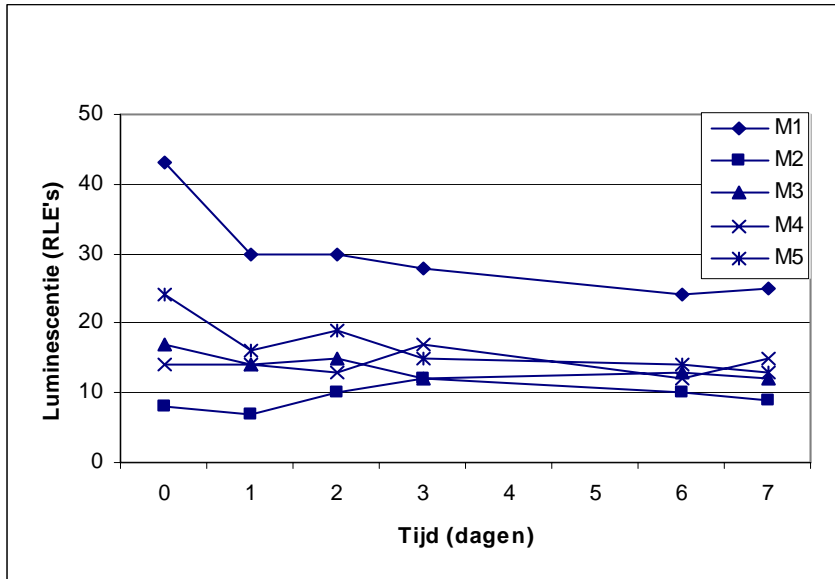
Monster	Gehalte vrije ATP (%)
Gist (-80°C)	99,5
P17 (-80°C)	51,8

Het ATP-gehalte van alle drie de monsters wordt na een bepaalde tijd redelijk constant met een variatiecoëfficiënt <6%. Stam P17 heeft alleen iets meer tijd nodig, 7 dagen i.p.v. 1 in vergelijking met gist en biofilm, om te stabiliseren.

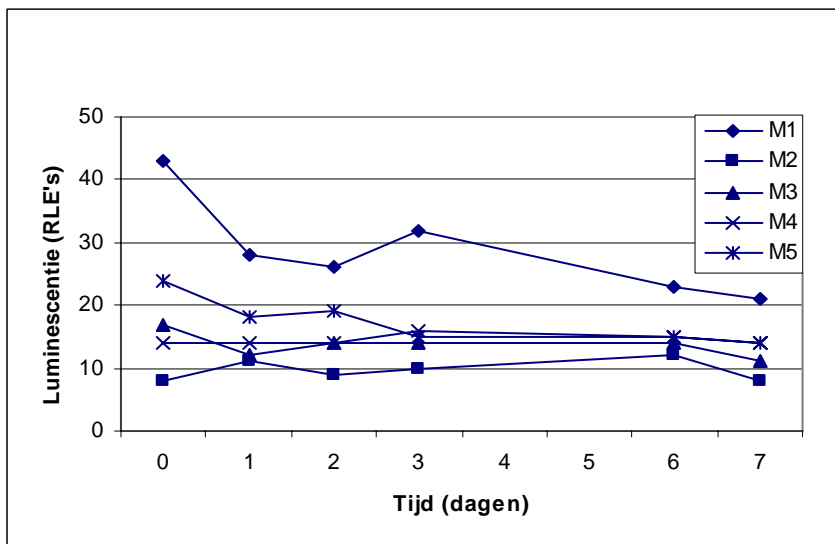
Het gebonden ATP (intracellulair) kan pas gemeten worden als de celwand gelyseerd wordt of als de celwand al kapot is waardoor het niet meer gebonden is (vrije ATP). Bij gist is het percentage gebonden ATP <1% waardoor het niet aantrekkelijk is om gist als controlestam te gebruiken. Bij stam P17 is +/- 50% vrije ATP aanwezig maar er blijft nog voldoende gebonden ATP over waarmee de lysisstap van de ATP-bepaling gecontroleerd kan worden.

Aangezien drinkwater en biofilmmonsters de belangrijkste monsters zijn bij Kiwa zijn er verdere experimenten uitgevoerd met dit type monsters. Opnieuw is er gekeken naar het ATP-verloop van monsters indien het bewaard wordt bij een bepaalde temperatuur. Een bewaartemperatuur van 0 en 4°C leverde de minste verandering op in het ATP-gehalte van het uitgevoerde bewaarexperiment. Daarom zijn in het vervollexperiment de monsters alleen bewaard bij deze temperaturen. Er zijn 5 drinkwatermonsters uit 5 verschillende drinkwatervoorzieningsgebieden genomen. Tevens is een aantal ringen, waar een biofilm aan gehecht zit, uit een biofilmmonitor gehaald en bewaard in 10ml ATP-vrij water bij 0 en 4°C. Op dag 0 is de biofilm van een ring m.b.v. ultrasoon trillen (Kiwa huisvoorschrift LMB-010) losgemaakt, en daar is vervolgens het ATP-gehalte van gemeten. Het losgemaakte biofilm (van dag 0) is vervolgens na het meten ook bewaard bij 0 en 4°C. Door zowel de biofilmringen als het losgemaakte biofilm te bewaren en te testen kan men bepalen of het bewaren van biofilmringen een optie is als bewaarmethode voor biofilmmonsters.

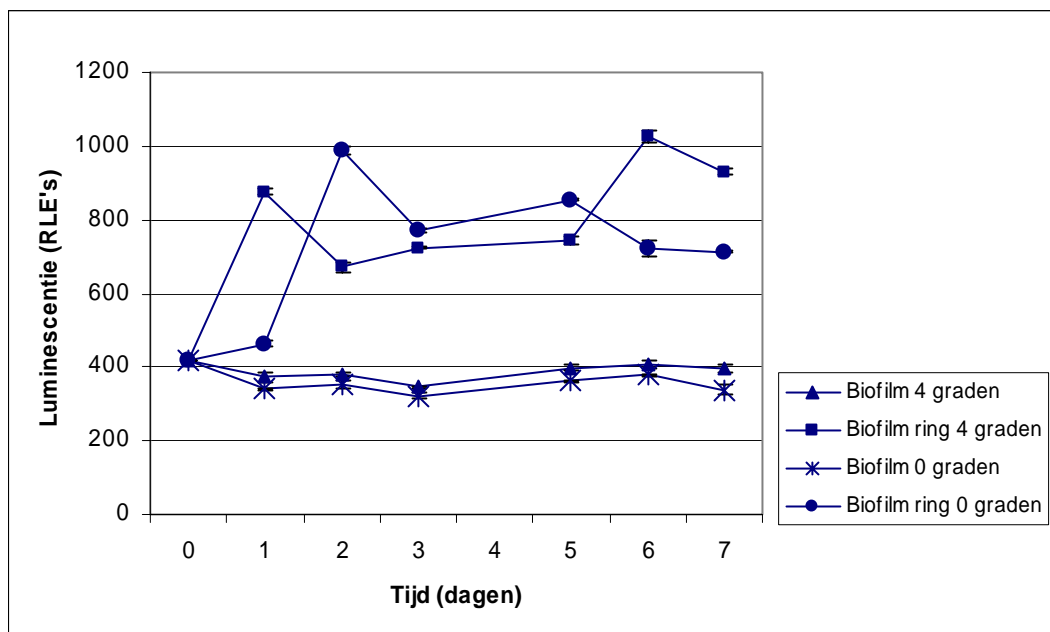
Gedurende 7 dagen is van de losgemaakte biofilm, de biofilmringen en van de drinkwatermonsters het ATP-gehalte diverse keren bepaald.



Figuur 17 ATP verloop van drinkwater bij 0°C



Figuur 18 ATP verloop van drinkwater bij 4°C



Figuur 19 ATP verloop van biofilm

Bij zowel drinkwater als biofilmmonsters vindt er een verandering plaats van het ATP-gehalte (fig. 17 t/m 19 en tabel 10 t/m 12). Opvallend is dat de drinkwatermonsters, met het hoogste ATP-gehalte (M1 en M5), de grootste terugloop van het ATP-gehalte hebben bij zowel 0 als 4°C. Drinkwatermonster M2 heeft op dag 0 een ATP-gehalte onder de bepalingsgrens van de ATP-methode. Op dag 1 bij 0°C na is er op alle andere dagen een verhoging van het ATP-gehalte bij monster M2 te zien. Over het algemeen is de verandering van het ATP-gehalte bij de drinkwatermonsters het minst groot bij een bewaartemperatuur van 0°C. Bij een bewaartemperatuur van 4°C is deze verandering bij een meerderheid van de geteste monsters wat groter.

Tabel 10 Luminescentie van drinkwater t.o.v. dag 0 (in %) bij 0°C.

Monster	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 6	Dag 7
M1	70	70	65	56	58
M2	88	125	150	125	113
M3	82	88	71	76	71
M4	100	93	121	86	107
M5	67	79	63	58	54

Tabel 11 Luminescentie van drinkwater t.o.v. dag 0 (in %) bij 4°C.

Monster	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 6	Dag 7
M1	65	60	74	53	49
M2	138	113	125	150	100
M3	71	82	82	82	65
M4	100	100	114	107	100
M5	75	79	63	63	58

De biofilmringen geven bij beide bewaartemperaturen zeer uiteenlopende ATP-gehaltenes (tabel 12). Een mogelijke oorzaak hiervoor is dat het biofilm zich niet gelijkmatig heeft gevormd over de verschillende ringen in dezelfde biofilmmonitor. De gegevens uit dit experiment zijn onvolledig om aan te geven of het bewaren van biofilmringen bij een bepaalde temperatuur wel of niet geschikt is. Verdere onderzoek betreffende dit aspect is nodig om een juiste beoordeling hierover te geven. Wel is duidelijk dat bij de biofilmmonsters, waarbij het losgemaakte biofilm bewaard werd, de verandering van het ATP-gehalte het minst is bij een bewaartemperatuur van 4°C.

Tabel 12 Luminescentie van biofilm t.o.v. dag 0 (in %)

Monster	Temperatuur (°C)	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 5	Dag 6	Dag 7
Biofilm	0	82	85	77	87	90	81
Biofilm	4	89	90	83	95	97	94
Biofilm op ring	0	111	236	185	204	173	170
Biofilm op ring	4	210	161	173	178	246	223



### 3.3 Discussie

Het ATP-gehalte gemeten na bewaren van het monster levert vrijwel altijd een ander resultaat op dan het ATP-gehalte dat op de dag van monsternamen is gemeten. De resultaten in bijlagen III, IV en tabel 7 laten duidelijk zien dat het bewaren van monsters bij -20 en -80°C, bij 3 van de 5 monsters, een toename van het ATP-gehalte veroorzaakt. Een mogelijke oorzaak is het veranderen van het metabolisme in de micro-organismen met een verandering van het ATP-gehalte als gevolg. Door het plotselinge invriezen/ontdooien vinden er dan mogelijke chemische reacties plaats waarbij ATP gevormd wordt. Het kan ook zijn dat door het invriezen/ontdooien de celwanden van de micro-organismen verzwakt c.q. beschadigd worden waardoor ze beter gelyseerd kunnen worden met als gevolg dat er meer ATP vrijkomt.

De eerste 2 dagen na het bewaren van het monster, bij de verschillende temperaturen, ligt het ATP-gehalte nog het dichtst in de buurt van het ATP-gehalte gemeten op dag 0 (zie tabel 7). Omdat drinkwater een belangrijk deel vormt van de monsters bij Kiwa N.V. is het bewaren van monsters bij -20, -80 en 21°C, wegens de grote afwijking van het ATP-gehalte t.o.v. dag 0, geen goede werkwijze. Bewaren bij 4°C is in de meeste gevallen, behalve bij oppervlaktewater, het gunstigst. De afwijking van het ATP-gehalte t.o.v. dag 0 is kleiner op dag 1 dan op dag 2. Voor oppervlaktewater is het beter om te bewaren bij 0°C en het liefst hooguit 1 dag.

Ook uit de vervolggexperimenten bij 0 en 4°C blijkt dat de verandering van het ATP-gehalte het kleinst is in de eerste 2 dagen en dat het bewaren bij 4°C een goede bewaarmethode is. Wel blijkt dat, bij de meerderheid van de geteste drinkwatermonsters, de verandering van het ATP-gehalte iets kleiner is bij een bewaartemperatuur van 0°C. Dit in tegenstelling tot de eerste resultaten.

Om geschikt te zijn als ATP-controle dient het monster een constant ATP-gehalte te hebben. De monsters waarvan het ATP-gehalte het meest constant blijft na een bepaalde tijd zijn gist bij -80°C, biofilm bij -20°C en stam P17 bij -80°C (tabel 7). Tevens hebben ze alle drie een lage variatiecoëfficiënt (<6%). Vanwege het gegeven dat biofilm moeilijk reproduceerbaar te maken is en het hoge vrije ATP-gehalte bij gist lijkt stam P17 het meest geschikt als mogelijke ATP-controle. Het ATP-gehalte van stam P17 ligt in dit experiment na dag 1 onder de 100 ng ATP/l maar indien gewenst kan dit makkelijk worden verhoogd door de uitgangshoeveelheid te vergroten. Doordat de celwand van P17 mogelijk verzwakt is door het invriezen/ontdooien is het nog wel aan te raden om het effect van lysisbuffer op de celwand te testen. Mogelijk is de verzwakte celwand bij een lagere concentratie lysisbuffer te lyseren waardoor P17 niet representatief is als controlemonster i.v.m. praktijkmonsters.

# 4 Conclusies en aanbevelingen

## 4.1 Conclusies

- De bepalingsgrens van de ATP-analyse kan worden verlaagd van 1 ng ATP/l naar 0,05 ng ATP/l door gebruik van andere chemicaliën (Enliten +Luminex) en apparatuur (Glomax 20/20n). De variatiecoëfficiënt is <33% bij 95% van de metingen waardoor betrouwbaar en juist gemeten kan worden bij zowel hoge als lage ATP-gehaltenes.
- Bij het bewaren van monsters, ten behoeve van de ATP-bepaling, zal altijd een verandering in het ATP-gehalte plaatsvinden. De bewaarmethode, voor monsters waarvan het ATP-gehalte bepaald moet worden, die het minst voor een verandering in het ATP-gehalte veroorzaakt is het bewaren van monsters bij 4°C (0°C voor oppervlaktewater) voor hooguit 2 dagen (bij voorkeur 1). Vanwege de verandering in het ATP-gehalte bij het bewaren van monsters is het van belang om bewaren te voorkomen.
- Stam P17 is mogelijk te gebruiken als extra ATP-controle bij de ATP-bepaling om de lysisstap te controleren. Na 7 dagen is het ATP-gehalte van stam P17, bewaard bij -80°C, redelijk constant met een variatiecoëfficiënt van 4,89%.

## 4.2 Aanbevelingen

- Bij toepassing van de nieuwe ATP-methode in de praktijk is het noodzakelijk om, voor het in gebruikname, nog enkele malen een calibratiecurve uit te voeren zodat de gemiddelde hellingshoek voortkomt uit een respectabel aantal calibratiecurven. Hierdoor is het berekende ATP-gehalte, met behulp van de gemiddelde hellingshoek en de gemeten luminescentie, juist. Ook is het van belang om meer monsters op zowel de Advance als de Glomax 20/20n te testen om zo een beter beeld te krijgen over de verhouding tussen beiden methoden.
- Om meer duidelijkheid te verschaffen omtrent het bewaren van biofilmringen is nader onderzoek noodzakelijk. Hierbij is het van belang om biofilmringen te gebruiken met een biofilm die bij alle ringen ongeveer gelijk is.
- Het bewaren van biofilm na ultrasoon trillen kan een mogelijkheid zijn om biofilmmonsters te bewaren. Nader onderzoek kan daar uitsluitsel over geven.



# Bijlage I Ruwe data van de geteste instellingen van de Advance

**Tabel I-1 Gemeten luminescentie van 2 monsters bij verschillende calibratiefactoren**

Monsters	Gemiddelde luminescentie (RLE's) bij verschillende calibratiefactoren					
	0,714	1	2	5	7	10
ATP-standaard (100 ng ATP/l)	292 ± 10	433 ± 7	853 ± 27	2181 ± 33	3053 ± 92	4457 ± 82
Blanco water	7 ± 1	11 ± 2	22 ± 7	45 ± 10	71 ± 19	107 ± 27

**Tabel I-2 Gemeten luminescentie van verschillende concentraties ATP bij calibratiefactor 10**

	Concentratie ATP (ng ATP/l)									
	0	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,00	2,00	10,00	100,00
Gemiddelde luminescentie (RLE's)	100 ± 16	130 ± 26	120 ± 28	113 ± 31	134 ± 19	137 ± 20	134 ± 15	297 ± 59	539 ± 39	5121 ± 130



## Bijlage II Ruwe data van de geteste chemicaliën en apparatuur

**Tabel II-1 Calibratiecurven van verschillende chemicaliën op de Advance**

ATP-concentratie (ng ATP/l)	Gemiddelde luminescentie (RLE's)		
	Celsis (calibratiefactor 0,714)	Enliten (calibratiefactor 0,714)	Enliten (calibratiefactor 10)
0,00	5 ± 1	5 ± 2	117 ± 25
0,05	8 ± 2	9 ± 0	143 ± 25
0,10	9 ± 2	13 ± 2	167 ± 32
0,21	10 ± 1	18 ± 2	273 ± 29
0,42	11 ± 1	32 ± 2	470 ± 20
0,52	12 ± 2	39 ± 3	543 ± 15
0,68	13 ± 4	43 ± 3	667 ± 40
0,83	14 ± 5	57 ± 3	783 ± 12
1,04	13 ± 1	71 ± 3	917 ± 23
5,20	33 ± 4	300 ± 2	4300 ± 113
52,00	245 ± 6	3198 ± 153	44333 ± 1243
520,00	2355 ± 25	30942 ± 1021	437617 ± 27677
5200,00	23427 ± 161	309200 ± 5457	4171353 ± 332203
52000,00	209137 ± 1814	2155126 ± 161177	31776540 ± 327652

**Tabel II-2 Calibratiecurven van verschillende chemicaliën op de Glomax 20/20n**

ATP-concentratie (ng ATP/l)	Gemiddelde luminescentie (RLE's)	
	Celsis	Enliten
0,00	77 ± 4	88 ± 8
0,01	-	90 ± 2
0,02	-	103 ± 4
0,05	76 ± 12	136 ± 2
0,10	80 ± 5	193 ± 8
0,21	84 ± 4	328 ± 5
0,42	100 ± 6	547 ± 5
0,52	113 ± 10	679 ± 22
0,68	127 ± 2	837 ± 14
0,83	138 ± 17	997 ± 31
1,04	148 ± 7	1240 ± 33
5,20	421 ± 8	5879 ± 244
52,00	4050 ± 27	59769 ± 285
520,00	39143 ± 2328	595140 ± 12379
5200,00	405833 ± 37295	5937190 ± 49221
52000,00	3378384 ± 114381	47993124 ± 1872009

**Tabel II-3 Calibratiecurven van verschillende chemicaliën  
(met lysisbuffer) op de Glomax 20/20n**

ATP-concentratie (ng ATP/l)	Gemiddelde luminescentie (RLE's)	
	Biocontamination-kit	Enliten + luminex
0,00	403 ± 73	217 ± 5
0,05	411 ± 34	272 ± 17
0,10	577 ± 45	318 ± 23
0,21	512 ± 75	410 ± 36
0,42	745 ± 33	554 ± 13
0,52	940 ± 83	612 ± 36
0,68	695 ± 81	747 ± 15
0,83	931 ± 148	883 ± 56
1,04	893 ± 180	1005 ± 33
5,20	3328 ± 321	4233 ± 160
52,00	32571 ± 2327	42733 ± 2761
520,00	316916 ± 30484	420010 ± 14363
5200,00	2990866 ± 568312	4178724 ± 137050
52000,00	25039241 ± 3578043	32999678 ± 1713498

**Tabel II-4 Calibratiecurven volgens Kiwa huisvoorschrift LMB-002 op de Glomax  
20/20n.**

ATP-concentratie (ng ATP/l)	Gemiddelde luminescentie (RLE's)			
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4
1,6	939 ± 33	1005 ± 23	1381 ± 49	1499 ± 10
4	2362 ± 100	2429 ± 71	3338 ± 131	3858 ± 121
8	4895 ± 259	5008 ± 132	6820 ± 196	7172 ± 294
20	10627 ± 528	12039 ± 209	16077 ± 750	17700 ± 336
40	24204 ± 185	24439 ± 968	31609 ± 1332	32378 ± 547

**Tabel II-5 Vergelijking huidige methode met nieuwe methode**

Monsternr.	Huidige methode		Nieuwe methode	
	ATP-gehalte (ng/l)	VC (%)	ATP-gehalte (ng/l)	VC (%)
M050997	61,68 ± 1,19	1,93	69,95 ± 1,72	2,46
M050999	3,05 ± 0,74	24,26	2,63 ± 0,16	6,08
M051001	<1,00	-	0,05 ± 0,02	40,00
M051003	<1,00	-	0,09 ± 0,02	22,22
M051005	8,32 ± 1,94	23,32	7,72 ± 0,54	6,99
M051007	2,84 ± 0,45	15,85	2,77 ± 0,13	4,69
M051009	1,16 ± 0,45	38,79	0,50 ± 0,04	8,00
M051012	1,47 ± 0,60	40,82	1,08 ± 0,03	2,78
M051015	<1,00	-	1,04 ± 0,11	10,58
M050925	34,53 ± 0,74	2,14	32,54 ± 1,97	6,05
M050926	75,05 ± 4,76	6,34	73,20 ± 4,62	6,31
M050927	2,21 ± 1,19	53,85	0,90 ± 0,13	14,44
M050928	2,63 ± 0,30	11,41	0,92 ± 0,11	11,96
M050929	3,26 ± 0,89	27,30	2,65 ± 0,12	4,53
M050930	3,47 ± 0,60	17,29	2,84 ± 0,09	3,17
M050913	1,58 ± 0,30	18,99	0,58 ± 0,09	15,52
M050916	<1,00	-	0,70 ± 0,15	21,43
M050919	1,47 ± 0,15	10,20	1,11 ± 0,14	12,61
M051493	8,84 ± 0,45	5,09	7,95 ± 0,08	1,01
M051494	9,89 ± 0,30	3,03	8,47 ± 0,58	6,85
M051495	4,21 ± 0,30	7,13	3,96 ± 0,45	11,36
M051496	4,84 ± 0,45	9,30	4,51 ± 0,46	10,20
M051483	14,74 ± 0,60	4,07	12,09 ± 0,96	7,94
M051485	6,32 ± 0,30	4,75	5,75 ± 0,14	2,43
M051487	<1,00	-	0,15 ± 0,05	33,33
M051489	10,74 ± 0,89	8,29	9,68 ± 0,78	8,06
M051491	3,37 ± 0,00	0,00	2,44 ± 0,02	0,82





## Bijlage III Ruwe data van geteste bewaarmethoden

**Tabel III-1 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van gist bij verschillende temperaturen in de loop der tijd**

Bewaartemperatuur (°C)	Tijd (dagen)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	13	22	29
21	7438	1435	592	665	1211	726	708	790	737	1525	1146	743
10	7438	1901	1486	616	2273	1283	1180	1216	1058	1500	985	889
4	7438	2517	1874	1238	3582	2277	612	1951	2041	3062	1787	1355
0	7438	1592	2401	1238	4263	2713	2511	2731	2411	2999	1774	1201
-20	7438	6619	10387	10169	11857	16542	15315	17302	20687	27110	29389	30537
-80	7438	98903	108287	93980	104474	114757	106604	110745	105779	108352	105268	105170

**Tabel III-2 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van P17 bij verschillende temperaturen in de loop der tijd**

Bewaartemperatuur (°C)	Tijd (dagen)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	13	22	29
21	572	511	526	352	328	266	225	263	170	169	75	95
10	572	555	648	452	424	388	443	421	356	325	279	91
4	572	548	652	463	538	453	471	429	390	362	304	299
0	572	529	533	488	516	544	487	501	413	445	362	265
-20	572	555	361	341	413	352	381	386	372	389	313	345
-80	572	549	464	417	464	346	432	399	406	453	417	411

**Tabel III-3 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van biofilm bij verschillende temperaturen in de loop der tijd**

Bewaartemperatuur (°C)	Tijd (dagen)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	13	22	29
21	518	541	444	210	117	108	99	101	99	90	55	200
10	518	449	435	151	211	461	166	113	102	95	61	199
4	518	472	445	154	190	156	85	122	96	102	95	235
0	518	378	424	190	272	332	309	305	113	93	73	211
-20	518	358	355	327	385	351	358	374	362	382	358	363
-80	518	392	476	345	462	381	366	385	397	433	395	417

**Tabel III-4 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van oppervlaktewater bij verschillende temperaturen in de loop der tijd**

Bewaartemperatuur (°C)	Tijd (dagen)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	13	22	29
21	336	375	431	341	332	288	268	263	332	279	356	522
10	336	365	445	285	471	396	412	347	340	261	150	169
4	336	538	428	243	342	355	376	409	370	305	239	225
0	336	322	449	282	381	358	345	366	380	416	278	299
-20	336	350	407	325	357	466	408	445	332	324	331	358
-80	336	455	438	475	498	449	540	737	682	572	570	463

**Tabel III-5 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van drinkwater bij verschillende temperaturen in de loop der tijd**

Bewaartemperatuur (°C)	Tijd (dagen)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	13	22	29
21	7438	1435	592	665	1211	726	708	790	737	1525	1146	743
10	7438	1901	1486	616	2273	1283	1180	1216	1058	1500	985	889
4	7438	2517	1874	1238	3582	2277	612	1951	2041	3062	1787	1355
0	7438	1592	2401	1238	4263	2713	2511	2731	2411	2999	1774	1201
-20	7438	6619	10387	10169	11857	16542	15315	17302	20687	27110	29389	30537
-80	7438	98903	108287	93980	104474	114757	106604	110745	105779	108352	105268	105170

**Tabel III-6 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van drinkwater bewaard bij 0°C in de loop der tijd**

Monster		Tijd (dagen)						
		0	1	2	3	6	7	
M1		43 ± 2	30 ± 3	30 ± 4	28 ± 2	24 ± 0	25 ± 1	
M2		8 ± 1	7 ± 2	10 ± 2	12 ± 2	10 ± 1	9 ± 1	
M3		17 ± 2	14 ± 1	15 ± 1	12 ± 2	13 ± 4	12 ± 3	
M4		14 ± 1	14 ± 1	13 ± 1	17 ± 3	12 ± 1	15 ± 1	
M5		24 ± 2	16 ± 2	19 ± 2	15 ± 1	14 ± 2	13 ± 2	

**Tabel III-7 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van drinkwater bewaard bij 4°C in de loop der tijd**

Monster		Tijd (dagen)						
		0	1	2	3	6	7	
M1		43 ± 2	28 ± 2	26 ± 3	32 ± 1	23 ± 2	21 ± 0	
M2		8 ± 1	11 ± 1	9 ± 0	10 ± 1	12 ± 0	8 ± 2	
M3		17 ± 2	12 ± 2	14 ± 5	14 ± 1	14 ± 1	11 ± 1	
M4		14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	16 ± 0	15 ± 5	14 ± 0	
M5		24 ± 2	18 ± 2	19 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	14 ± 1	

**Tabel III-8 Gemiddelde luminescentie (RLE's) van biofilm bewaard bij 0 en 4°C in de loop der tijd**

Monster	Temperatuur (°C)	Tijd (dagen)						
		0	1	2	3	5	6	7
Biofilm	0	418 +/- 2	341 +/- 2	354 +/- 11	323 +/- 10	363 +/- 2	378 +/- 3	339 +/- 15
Biofilm	4	418 +/- 2	374 +/- 13	378 +/- 5	347 +/- 3	398 +/- 8	407 +/- 13	395 +/- 12
Biofilm ring	0	418 +/- 2	464 +/- 6	988 +/- 9	772 +/- 7	854 +/- 2	724 +/- 21	712 +/- 3
Biofilm ring	4	418 +/- 2	876 +/- 9	671 +/- 13	724 +/- 1	742 +/- 11	1028 +/- 16	931 +/- 10



# Bijlage IV Verwerkte data van geteste Bewaarmethoden

**Tabel IV-1 Luminescentievergelijking van gist in de loop der tijd waarbij dag 0, 100 % is**

Bewaartemperatuur (°C)	Luminescentie t.o.v. dag 0 (%)				
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 7	Dag22
21	19	8	9	11	15
10	26	20	8	16	13
4	34	25	17	26	24
0	21	32	17	37	24
-20	89	140	137	233	395
-80	1330	1456	1263	1489	1415

**Tabel IV-2 Luminescentievergelijking van P17 in de loop der tijd waarbij dag 0, 100% is**

Bewaartemperatuur (°C)	Luminescentie t.o.v. dag 0 (%)				
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 7	Dag22
21	89	92	62	46	13
10	97	113	79	74	49
4	96	114	81	75	53
0	92	93	85	88	63
-20	97	63	60	67	55
-80	96	81	73	70	73

**Tabel IV-3 Luminescentievergelijking van biofilm in de loop der tijd waarbij dag 0, 100% is**

Bewaartemperatuur (°C)	Luminescentie t.o.v. dag 0 (%)				
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 7	Dag22
21	105	86	41	19	11
10	87	84	29	22	12
4	91	86	30	24	18
0	73	82	37	59	14
-20	69	69	63	72	69
-80	76	92	67	74	76

**Tabel IV-4 Luminescentievergelijking van oppervlaktewater in de loop der tijd waarbij dag 0, 100% is**

Bewaartemperatuur (°C)	Luminescentie t.o.v. dag 0 (%)				
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 7	Dag22
21	112	128	102	78	106
10	109	132	85	103	45
4	160	127	72	122	71
0	96	134	84	109	83
-20	104	121	97	132	99
-80	135	130	142	220	170

**Tabel IV-5 Luminescentievergelijking van drinkwater in de loop der tijd  
waarbij dag 0, 100% is**

<b>Bewaartemperatuur (°C)</b>	<b>Luminescentie t.o.v. dag 0 (%)</b>				
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 7	Dag22
21	125	134	52	41	63
10	111	93	54	45	34
4	98	95	102	52	31
0	92	90	73	56	74
-20	259	242	267	270	322
-80	384	245	226	511	258

# Bijlage V Referenties en literatuuroverzicht

**Baggelaar, P.K.** Syllabus toegepaste statistiek voor waterlaboratoria, 2e versie, blz.27-38,67-82, Kiwa KOA 98.085, 1998:

Handboek waarin allerlei onderdelen uit de statistiek simpel en duidelijk uitgelegd wordt waarbij veelal de link met de laboratoriumpraktijk wordt gelegd. Zo wordt hierin o.a. uitgelegd hoe je gemiddelden en significante verschillen tussen meetserie's kan toetsen.

**Brouwer, A., H.R. Veenendaal.** Optimalisatie van de bepaling van het gehalte adenosinetriofosfaat (ATP) in drinkwater en biomassa-suspensies, Ontwikkelingsrapport ATP-bepaling, Kiwa rapport SWI 96.204, 1996:

De aard en oorzaken van en maatregelen tegen problemen veroorzaakt door chemicaliën, temperatuurverschillen en verontreinigingen zijn in dit ontwikkelingsrapport beschreven.

De beschreven en geteste ATP-bepalingsmethode heeft een meetgebied van 1 tot 10.000 ng ATP/l dus een aantoonbaarheidsgrens van 1 ng ATP/l. De herhaalbaarheid van de bepaling heeft, bij 95% van de monsters met een luminescentie tot 100 RLE's, een spreiding die kleiner is dan 25%. En bij monsters met een luminescentie >100 RLE's is de spreiding kleiner dan 15%.

Tevens is ook de variatiecoëfficiënt van de binnenlabreproduceerbaarheid van de bepaling bepaald en die is maximaal 20% waarbij de variatiecoëfficiënt van lagere ATP-concentraties hoger is dan bij hogere ATP-concentraties.

Ook is beschreven hoe en welke controle's (blanco water, 2 en 100ng ATP/l) met de ATP-bepaling meegenomen dienen te worden.

**Van der Kooij, D., J.S. Vrouwenvelder.** Assessment of the bacterial growth potential of seawater, blz 26-36, Kiwa rapport KWR 02 000, 2003:

In dit onderzoek zijn verscheidene aspecten van het zeewater onderzocht, waarbij ATP-analyse een belangrijke parameter was. Ook is bevestigd dat zouten in water de ATP-analyse remmen en dat een zoutconcentratie van  $\leq 0,23\%$  de bepaling niet meer verstoort. Om de zoutconcentratie van zeewater te verlagen/verwijderen zijn er 2 methoden getest: verdunnen en filtreren. Verdunnen van monsters blijkt een relatief simpele en robuuste methode met als belangrijkste nadeel dat de detectielimiet oploopt (afhankelijk van de toegepaste verdunningsstappen). De 2 geteste filtratiemethoden hadden een recovery van 50 tot 130% i.v.m. direct meten. Naast deze grote verschillen waren er ook nog een aantal praktische problemen waardoor deze 2 filtratiemethoden niet interessant bleken te zijn.

**Van der Rijst, R.** Optimalisatie van de ATP-bepaling, 1994:

Het vrijmaken van ATP uit bacteriële cellen is in dit onderzoek onderzocht (ook literatuuronderzoek) en beschreven. NRB bleek in vgl. met andere extractiemiddelen zoals o.a. DMSO, zuren, 1-butanol en koken de meest gunstige resultaten op te leveren.



Tevens is gebleken dat 100µl NRB voor de ATP-bepaling minimaal is en dat het verhogen van de hoeveelheid NRB een lichte verhoging van het aantal RLE's (gemiddeld hooguit 10 %) geeft. Deze minimale stijging weegt echter niet op tegen de hogere kosten.

Ook is het vrijmaken van ATP uit biofilm onderzocht en hieruit blijkt dat, met 3x ultrasoon trillen van een biofilmring, 96 tot bijna 100% van alle waarschijnlijke ATP is vrij te maken.

Een geschikte bewaarmethode is echter niet gevonden want de geteste bewaartemperaturen (-196 tot 4°C) lieten een variabele ATP-concentratie zien in de loop der tijd.

Als laatste is bij dit onderzoek duidelijk gebleken dat de Celsis kit gevoeliger was dan de Lumac-PM en Lumac-EL kit's.

**Veenendaal, H.R., J.S. Vrouwenfelder.** ATP-gehalte in leidingwater, Kiwa voordracht, 2004:

Het ATP-gehalte in leidingwater bij verschillende pompstations is gemiddeld lager dan 10ng ATP/l waarbij de Amersfoortseweg het laagste ATP-gehalte heeft (60% v/d monsters <1 ng ATP/l) Een duidelijke relatie tussen het ATP-gehalte en het koloniegetal bij 22 °C is niet gevonden wel is bevestigd dat het calciumgehalte een beperkende invloed heeft op de ATP-meting. Het voorstel is om correctie van de ATP-meting toe te passen indien het calciumgehalte > 100 mg/l (afwijking van het ATP-gehalte is dan > 13%) is.

**Technische informatie site van Celsis,**

[http://www.celsis.com/products/atp\\_technology.php](http://www.celsis.com/products/atp_technology.php), 2004 :

Duidelijke site waarbij de geschiedenis en het principe van de ATP-bepaling wordt beschreven. Ook wordt m.b.v. onderzoeksresultaten beschreven dat de optimale extractietijd van de geteste bacteriën 10 seconden is en dat een bacteriële cel gemiddeld  $1.4 \times 10^{-18}$  mol ATP bevat.

**ATP Luminescence, Rapid methods in microbiology, P.E. Stanley, B.J.McCarthy and R.Smither:**

Boek dat samengesteld is uit diverse artikelen met ATP als hoofdonderwerp en de interessantste staan hieronder beschreven.

**Stanley, P.E.** A Concise beginner's guide to rapid microbiology using adenosine triphosphate (ATP) and luminescence, 1989:

Dit artikel beschrijft uitvoerig het principe en de ontwikkeling van de ATP-bepaling. Het belang van het goed vrijmaken van ATP komt ook in dit artikel duidelijk naar voren en van de geteste extractiemiddelen leveren trichloorzuur (TCA) en koken met Tris-EDTA goede resultaten waarbij de laatste wel erg bewerkelijk blijkt te zijn. En TCA werkt op zijn beurt weer remmend op luciferase waardoor neutralisatie na extractie noodzakelijk is.

**Hammond, J.R.M., W.J. Simpson.** Cold ATP extractants compatible with constant light signal firefly luciferase reagents, 1989:

Ook hier worden weer verschillende extractiemethoden en middelen beschreven waarbij duidelijk wordt dat NRB een veel gebruikt extractiemiddel is in het ATP-bioluminescentie onderzoek. Maar dat NRB niet alle micro-organismen even goed kan lyseren (met name moeite met *Lact.brevis*) en dat BAX en DMSO ook goed te gebruiken zijn als extractiemiddel.

**Hammond, J.R.M., P.H. Jago, G. Stanfield, W.J. Simpson.** The effect of extractant and sample composition on the performance of a commercial firefly luciferase reagent, 1989:

NRB is als extractiemiddel uitvoerig getest op verscheidene aspecten waaronder de terugloop van licht "output" in de loop der tijd en het effect van NRB op de prestatie van Lumit PM (luciferase/luciferine) die op verschillende tijden is opgelost. Zo blijkt dat de licht output afneemt na verloop van tijd wat waarschijnlijk te wijten is aan de terugloop van de enzymen. En ook blijkt dat pas opgeloste lumit-PM voor een hogere lichtopbrengst zorgt dan wanneer het al een tijdje opgelost is (24h bij 20°C).

**McCarthy, B.J., P.E.Stanley.** Reagents and instruments for assays using ATP and luminescence: Present needs and future possibilities in rapid microbiology, 1989:

Als gekeken wordt naar het theoretische aantal aanwezige fotonen en het gemeten lichtsignaal blijkt dat de efficiëntie rond de 5% ligt en nog geoptimaliseerd moet worden.

Ook blijkt dat het mogelijk is om non-microbiologische ATP te verwijderen o.a. met apyrase maar dat het nog verder en uitgebreider onderzocht moet worden.

**Dirix, E., J.M. Steijns, H. Vanstaen.** ATP extraction and its relevance as applied to rapid microbial counting in food samples using bioluminescence techniques, 1989: 4 extractiemiddelen (DMSO, TCA, Tris/EDTA en NRB) zijn onderzocht op extractie-efficiëntie van ATP bij verscheidene bacteriën en voedselmonsters. DMSO bleek gemiddeld de hoogste efficiency te hebben. En NRB scoorde vooral laag bij gram-negatieve bacteriën wat veroorzaakt kan worden door het wijd verspreid

voorkomen van de desbetreffende bacteriën met eventuele resistentievorming tot gevolg.

**Campbell, A.K., C.Goodfield, A.N. Hampton, I.R.Johnson, P.G.Massey, G.B.Sala-Newby, D.A.Stafford.** Ultra-sensitive detection of microbes by ATP analysis,1989: De beschreven ATP-detectiemethoden hebben een aantoonbaarheidsgrens variërend van 0,5 tot 5 ng ATP/l waarbij gemeld moet worden dat deze methoden erg bewerkelijk zijn en waarbij contaminatie en achtergrondluminescentie een belangrijk aandachtspunt zijn.

De gevoeligheid van de ATP-bepaling is o.a. afhankelijk van het mogelijke ATP wat in de te gebruiken buffers, extractiemiddelen en oplossingen zit. Om dit te minimaliseren is apyrase gebruikt om het mogelijke ATP af te breken tot gemiddeld  $1 \times 10^{-16}$  mol ATP/100 $\mu$ l.