

METODA BIOLUMINESCENCYJNA OZNACZANIA ATP – JAKO ALTERNATYWNA METODA DETEKCJI DROBNOUSTROJÓW W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

Anna Szosland-Fałtyń, Joanna Królasik

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego

Zakład Jakości Żywności

ul. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź

anna.szosland@och-ibprs.pl

Streszczenie

Rozwój nowych technologii przetwórstwa spożywczego oraz pojawianie się innowacyjnych produktów wiąże się z olbrzymim naciskiem, jaki kładzie się na bezpieczeństwo żywności. Dlatego też stale poszukuje się szybkich i czułych technik monitorujących obecność drobnoustrojów w środowisku produkcyjnym i gotowych produktach spożywczych. Wśród dostępnych na rynku testów coraz większą popularność zyskuje bioluminescencyjna metoda oznaczania ATP. W artykule przedstawiono charakterystykę, zastosowanie, zalety i wady tej metody. Pomimo wielu korzyści płynących z omawianej techniki nie może ona zastąpić klasycznych metod mikrobiologicznych.

Słowa kluczowe: bioluminescencja, ATP, bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności

ATP-BIOLUMINESCENCE – AS ALTERNATIVE DETECTION METHOD IN FOOD INDUSTRY

Summary

The development of new food processing technologies and the appearance of innovative food products, is associated simultaneously with a huge emphasis on food safety. Therefore, continuously looking for a rapid and sensitive techniques for monitoring the presence of microorganisms in the production environment and finished food products. Among the available on the market methods ATP-bioluminescence is gaining popularity. The article presents the characteristics, the use and the advantages and disadvantages of the method. Despite the many benefits of implementing the ATP-bioluminescence in research, at the moment, discussed technique, is not able to replace classical microbiological methods.

Key words: bioluminescence, ATP, microbiological food safety

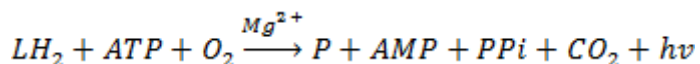
WSTĘP

Rozwój nowych technologii przetwórstwa żywności oraz pojawianie się innowacyjnych produktów spożywczych wiążą się z olbrzymim naciskiem, jaki kładzie się na bezpieczeństwo żywności. Jednocześnie, jak wynika z raportów EFSA, z roku na rok rośnie liczba odnotowywanych zatruc pokarmowych wywoływanych przez nieznanne szczepy patogenów. Dlatego też stale wdraża się efektywne i rygorystyczne procedury kontroli higieny produkcji. Producenci branży spożywczej poszukują szybkich i czułych metod monitorujących czystość mikrobiologiczną surowców, urządzeń i powierzchni produkcyjnych oraz gotowych produktów spożywczych. Tradycyjne metody mikrobiologiczne są czasochłonne. To powoduje, że alternatywne metody wykorzystujące reakcje immunologiczne lub opierające się na przemianie materii, a dające precyzyjny wynik w krótkim czasie, zyskują na atrakcyjności. Spośród szybkich testów mikrobiologicznych coraz większą popularność zdobywa bioluminescencyjna metoda oznaczania ATP. Adenozyno-5-trifosforan (ATP) jest nukleotydem zbudowanym z adeniny, rybozy i trifosforanu. Wykorzystywany jest przez komórki jako uniwersalny nośnik energii niezbędnej do przebiegu wielu biochemicznych reakcji endoergicznych. Detekcja tego związku w środowisku świadczy o obecności żywych organizmów. Istnieje wiele metod wykrywania ATP, np. wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej, jednakże najpopularniejsza jest metoda bioluminescencyjnego oznaczania ATP [Shama, Malik 2013].

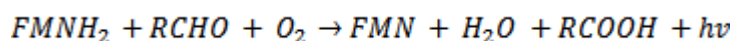
Wyjaśnienie pojęcia

Luminescencja, czyli „zimne świecenie”, jest to zjawisko emisji fal świetlnych przez ciała (luminofory), zachodzące pod wpływem różnych rodzajów energii z pominięciem energii cieplnej. Istotą zjawiska jest wzbudzenie elektronów pod wpływem pochłaniania energii, które – powracając na niższe orbity – emitują fotony, czyli cząstki światła. Zależnie od rodzaju czynnika wzbudzającego wyróżnia się: fotoluminescencję, elektroluminescencję, sonoluminescencję, krystaloluminescencję, tryboluminescencję, termoluminescencję oraz chemiluminescencję, której jedną z form jest bioluminescencja. Bioluminescencja jest to emisja promieniowania świetlnego przez organizmy żywe (bakterie, grzyby, pierwotniaki, bezkręgowce, ryby). Po raz pierwszy zjawisko bioluminescencji zostało wyjaśnione w 1947 r. przez McElroy. W zależności od organizmu można wyróżnić dwa rodzaje mechanizmów. W pierwszym, charakterystycznym dla organizmów wyższych (np. chrząszczy), lucyferaza (monomeryczny enzym o masie 61 kDa) katalizuje dekarboksylację oksydatywną

D-lucyferyny (LH_2), która jest przekształcana w oksylucyferynę (P). Do zajścia reakcji niezbędna jest obecność ATP, który ulega rozpadowi do adenozynomonofosforanu (AMP) i pirofosforanu (PPi) oraz jonów metali na +2 stopniu utlenienia (np. jonów magnezu, manganu, żelaza, niklu, cynku lub kobaltu) [Shama, Malik 2013]. Reakcji towarzyszy wydzielenie energii świetlnej, a schematyczny jej przebieg przedstawiono poniżej:



W drugim, spotykanym u bakterii, lucyferynę stanowi alifatyczny aldehyd R-CHO. Cykl bioluminescencji rozpoczyna się od zredukowania FMN (flawinomononukleotydu) do FMNH₂, który następnie tworzy kompleks z lucyferazą. Dalej w obecności tlenu dochodzi do utlenienia lucyferyny R-CHO do kwasu R-COOH oraz utlenienia FMNH₂ z powrotem do FMN, co powoduje aktywację enzymu lucyferazy. Wzbudzona lucyferaza, wracając do poprzedniego stanu, wydziela foton. Schematyczny przebieg reakcji przedstawiono poniżej:



Bioluminescencja u bakterii może być również regulowana poprzez zjawisko autoindukcji lub quorum sensing. Po raz pierwszy zjawisko to zostało odkryte w komórkach bakterii *Vibrio fischeri*. Zdolność do luminescencji jest związana z aktywnością kompleksu enzymatycznego lucyferazy, syntetyzowanego w komórkach, pod kontrolą operonu luxCDABE. Za regulację procesu bioluminescencji odpowiedzialne są dwa białka regulatorowe LuxI oraz LuxR, z których pierwsze kontroluje syntezę autoinduktora, a drugie odpowiedzialne jest za przyłączenie autoinduktora do operonu lucyferazy i indukcję transkrypcji strukturalnego genu lucyferazy [Nunes-Halldorson, Duran 2003].

Z chemicznego punktu widzenia lucyferyna i lucyferaza różnych gatunków mogą być zupełnie odmiennymi związkami, wykazującymi jednak podobne właściwości i działającymi w podobny sposób. Aby reakcje te mogły zajść w sposób prawidłowy, potrzebują nie tylko substratów, lecz także odpowiednich warunków (pH i temperatura).

Zawartość ATP w komórkach organizmów

Zależność pomiędzy stężeniem ATP w próbce analizowanej metodą bioluminescencyjną a wielkością emitowanego światła jest liniowa. Należy jednak podkreślić, że zawartość ATP w komórkach organizmów oznaczanych tym testem zależy od wielu czynników, między innymi od rodzaju drobnoustroju, wielkości komórki, fazy wzrostu, stanu fizjologicznego, jak również od uszkodzeń subletalnych [Vogel i in. 2013]. Komórki drożdży, zarodników pleśni oraz alg zawierają więcej ATP niż komórki bakterii, podczas gdy spory bakterii posiadają

znacznie mniejszą ilość tego związku niż komórki wegetatywne. Ponadto komórki drobnoustrojów izolowane z naturalnych środowisk zawierają mniej ATP w porównaniu z komórkami hodowanymi w warunkach laboratoryjnych. Przykładowe wartości ATP oznaczone w komórkach bakterii, drożdży oraz zarodników pleśni przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość ATP w komórkach mikroorganizmów [Shama, Malik 2013]

The ATP content in microbial cells

Mikroorganizm	ATP [mol na komórkę]
<i>Escherichia coli</i> (w czystych pomieszczeniach)	$2,5 \times 10^{-15}$
<i>Campylobacter jejuni</i>	$3,4 \times 10^{-18} - 4,1 \times 10^{-18}$
<i>Listeria monocytogenes</i> (hodowla laboratoryjna)	$3,4 \times 10^{-21}$
<i>Pseudomonas paucimobilis</i> (hodowla laboratoryjna)	$3,2 \times 10^{-19} - 4,4 \times 10^{-18}$
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$0,6 \times 10^{-18} - 3,4 \times 10^{-18}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (hodowla laboratoryjna)	$1,4 \times 10^{-23} - 4,4 \times 10^{-17}$
basidiospory <i>Paecilomyces farinosus</i>	$3,0 \times 10^{-16}$

Zastosowanie bioluminescencyjnej metody oznaczania ATP w przemyśle spożywczym

Bioluminescencyjna metoda detekcji ATP z powodzeniem stosowana jest do monitoringu jakości mikrobiologicznej produktów: w przemyśle mleczarskim, mięsny, browarniczym, napojów i soków [Costa i in. 2006; Dostalek, Branyik 2005; Yue, Bai 2013; Vilar i in. 2008]. W mleku oznacza się nie tylko obecność bakterii, lecz także komórek somatycznych świadczących o zapaleniu wymienia [Dostalek, Branyik 2005]. Jednakże jednym z ważniejszych zastosowań bioluminescencyjnego pomiaru ATP jest wykorzystanie go w monitoringu czystości powierzchni produkcyjnych [Luick i in. 2013]. Wielkość emisji światła, mierzona za pomocą lumenometru, jest podstawą pomiaru, którego wynik we względnych jednostkach świetlnych (ang. *relative light unit*, RLU) otrzymuje się po kilku sekundach. Komercyjnie dostępne luminometry są w stanie wykryć mniej niż 0,1 pg ATP (10^{13} g), co odpowiada 100 komórkom bakterii. Całkowita ilość ATP obecnego na badanej powierzchni jest ekstrahowana metodą wymazu specjalnymi piórami, a po wprowadzeniu gotowych odczynników niezbędnych do zajścia reakcji bioluminescencji, dokonuje się odczytu. Ze względu na brak norm określających maksymalny dopuszczalny poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych, każdy zakład produkcyjny, na podstawie przynajmniej kilkudziesięciu wyników pomiarów ATP uzyskanych metodą bioluminescencji, powinien ustanowić własne poziomy graniczne. Jednocześnie zaleca się uwzględnienie tła

interferującego w oznaczenie, a wynikającego z odmienności przetwarzanych surowców, rodzaju powierzchni produkcyjnych itp. Przy przekroczeniu prawidłowo wyznaczonego limitu należy podjąć odpowiednie działania naprawcze lub korygujące. Lewis [2008] w swojej publikacji za wartość świadczącą o czystości powierzchni przyjmuje 250 RLU. Natomiast ISSA (The Worldwide Cleaning Industry Association) limit ten uzależnia od urządzenia pomiarowego. Według jej wytycznych dobrze umyte stoliki kawiarniane nie powinny przekraczać wartości 4951 RLU, mierzonej na luminometrze NovaLUM (Charm Sciences, INC, Lawrence, MA), a na pozostałych dwóch aparatach Uni-Lite NG (3M) oraz Hygiena SystemSure Plus zaleca się, aby wartości RLU wynosiły odpowiednio ≤ 141 i ≤ 9 . Brak spójności w wytycznych może spowodować błędną interpretację wyniku [Vogel i in. 2013].

Ograniczenia metody

Na wynik pomiaru może wpływać ATP „wewnętrzny” lub „somatyczny”, którego źródło stanowią pozostałości organiczne, np. roślinne, zwierzęce lub ludzkie. Dlatego też zaleca się zastosowanie wstępnej obróbki analizowanych próbek, polegającej na lizie komórek somatycznych i inkubacji z enzymem apyrazą inaktywującym somatyczny ATP. Dopiero po takiej procedurze można dokonać właściwego oznaczenia. Innym sposobem uniknięcia interferencji związanej z występowaniem somatycznego ATP może być fizyczna separacja mikroorganizmów od komórek somatycznych na drodze np. filtracji lub wirowania.

Kolejnym istotnym ograniczeniem metody jest zjawisko wygaszania emitowanego światła przez niektóre substancje zawarte w badanych próbkach, czyli tzw. *quenching*. Może mu również towarzyszyć inhibicja lucyferazy przez niektóre substancje. Badania Fujinami i in. [2004] wykazały, że w hodowlach *Escherichia coli* (o stężeniu 10^7 jtk/ml) z dodatkiem chlorku sodu i serum albuminy wołowej w ilości 0,5% obserwowano spadek luminescencji o odpowiednio 42,0% i 68,3%. Natomiast dodatek sacharozy w ilości 2% powodował wzrost emisji światła do 144,2%.

W tabeli 2 przedstawiono przykładowe wyniki kontroli czystości powierzchni urządzeń produkcyjnych. Ocenę przeprowadzono dwiema metodami: klasyczną – płytkową oraz bioluminescencji ATP. Wymazy z powierzchni ograniczonej szablonem analizowane były za pomocą bioluminometru HY-LiTE[®]2 firmy Merck oraz wysiewane na płytki w celu określenia ogólnej liczby drobnoustrojów. Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 72 h w celu określenia ogólnej liczby drobnoustrojów [PN-ISO 4833:2004]. Wyniki stanowią średnią z trzech wymazów.

Tabela 2. Wartości RLU umytych powierzchni produkcyjnych
RLU values of production surfaces after cleaning

Badana powierzchnia	Bioluminescencja [RLU]	Ogólna liczba bakterii [jtk/cm ²]
Stół zasypowy	250	10
Pasteryzator 1	13	15
Pasteryzator 2	21	41
Pasteryzator 3	8	21
Mieszadło	57	5
Nabierak	44	0
Pojemnik	48	28

W warunkach laboratoryjnych, dysponując czystą hodowlą, w której komórki występują w jednakowym stanie fizjologicznym, obserwuje się pomiędzy logarytmicznymi wartościami RLU i jtk wysoką korelację rzędu $R^2 = 0,9806$. [Căpriță i in. 2006]. Natomiast w warunkach naturalnych współczynnik ten osiąga dużo niższą wartość. W badaniach Czaczyk i in. [2001] na mieszaninie drobnoustrojów odpowiedzialnych za procesy kompostowania, którą stanowiły mezofile, termofile, drożdże oraz pleśnie, omawiany współczynnik korelacji R^2 wynosił poniżej 0,3.

WNIOSKI

Metoda bioluminescencyjna oznaczania ATP jest szybka, nieinwazyjna, wysoce czuła, prosta w wykonaniu i stosunkowo tania. Należy jednak podkreślić, że nie jest to metoda do ilościowego oznaczania liczby bakterii w badanych próbkach i pomimo jej dużej popularności nie może zastąpić klasycznych metod mikrobiologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Căpriță R., Căpriță A., Vintilăa T., Ilia G. (2006). The ATP assay, a method for measuring biological activity in industrial water. *Rev. Roum. Chim.*, 51 (10), 1031-1036
2. Costa P. D., Andrade N. J., Brandão S. C. C, Passos F. J. V., Soares N. F. F. (2006). ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Braz. J. Microbiol.*, 37, 345-349
3. Czaczyk K., Trojanowska K., Stachowiak B., Dubisz H. (2001). Changes in cell number and the ATP content during the composting process. *Pol. J. Environ. Stud.*, 10 (3), 149-153

4. Dostalek P., Branyik T. (2005). Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry – a review. *Czech J. Food Sci.*, 23 (3), 85-92
5. Fujinami Y., Kataoka M., Matsushita K., Sekiguchi H., Itoi T., Tsuge K., Seto Y. (2004). Sensitive detection of bacteria and spores using a portable bioluminescence ATP measurement assay system distinguishing from white powder materials. *J. Health Sci.*, 50 (2), 126-132
6. Luick L., Thompson P. A., Looock M. H., Vetter S. L., Cook J., Guerrero D. M. (2013). Diagnostic assessment of different environmental cleaning monitoring methods. *Am. J. Infect. Control.*, 41 (8), 751-752
7. Nunes-Halldorson V., Duran N. L. (2003). Bioluminescent bacteria: *lux* genes as environmental biosensors. *Braz. J. Microbiol.*, 34, 91-96
8. Polska Norma PN-ISO 4833. (2004). Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny
9. Shama G., Malik D. J. (2013). The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 216, 115-125
10. Yue W., Bai C. (2013). Improved design of automatic luminometer for total bacteria number detection based on ATP-bioluminescence. *J. Food Saf.*, 33, 1-7
11. Vilar M. J., Rodriguez-Otero J. L., Fieguez F. J., Sanjuan M. L., Yus E. (2008). Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 357-361
12. Vogel S. J., Tank M., Goodyear N. (2013). Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1, 38-42