

# 基于 ATP 生物发光法的微生物数量快速检测技术的研究进展

王丽芸<sup>1,2</sup>, 李新<sup>1</sup>, 杨佳生<sup>1,2</sup>, 罗珊<sup>1,2</sup>, 曾好<sup>2,3</sup>, 陈杨武<sup>2</sup>, 谭周亮<sup>\*2</sup>

1 绵阳师范学院资源环境工程学院, 四川 绵阳 621000

2 中国科学院环境与应用微生物重点实验室, 四川 成都 610041

3 中国科学院大学, 北京 100049

王丽芸, 李新, 杨佳生, 罗珊, 曾好, 陈杨武, 谭周亮. 基于 ATP 生物发光法的微生物数量快速检测技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3451-3468

Wang Liyun, Li Xin, Yang Jiasheng, Luo Shan, Zeng Hao, Chen Yangwu, Tan Zhouliang. Research progress in rapid detection of microbial count based on ATP bioluminescence[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3451-3468

**摘 要:** 微生物数量的快速检测一直是工业生产与食品行业需要解决的问题, 腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 生物发光法具有操作简便、检测周期短等优点, 可满足一般微生物检测的需求。然而, ATP 生物发光法的准确性也受到不同因素的影响, 如微生物的 ATP 检测限值较高、微生物自身及其他因素(如非微生物 ATP、提取剂种类、荧光素酶活性等)均对微生物数量的检测产生影响。本文简述了不同微生物数量检测方法的优缺点, 介绍了 ATP 生物发光法的发展历程及原理, 综述了非微生物 ATP 与游离 ATP、微生物量、ATP 提取剂、荧光素酶等因素对 ATP 生物发光法灵敏度与稳定性的影响, 归纳总结了 ATP 生物发光法及检测设备在食品、医疗、污水处理等领域的应用现状, 并就 ATP 生物发光法体系的优化及 ATP 在线检测的应用等方面进行了展望, 以期 ATP 生物发光法的高效应用提供新的思路。

**关键词:** ATP 生物发光法; 微生物数量检测; 提取剂; 荧光素酶; ATP 检测设备

基金项目: 中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20180002); 成都市重大科技创新项目(2019-YF08-00132-GX); 四川省重大科技专项(2019YFS0502)

**Supported by:** Instrument Developing Project of Chinese Academy of Sciences (YJKYYQ20180002); Chengdu Key Scientific and Technological Innovation Project (2019-YF08-00132-GX); Key Point Research and Invention Program of Sichuan Province (2019YFS0502)

**\*Corresponding author:** E-mail: tanzhl@cib.ac.cn

**Received:** 2021-08-06; **Accepted:** 2022-05-07; **Published online:** 2022-06-07

## Research progress in rapid detection of microbial count based on ATP bioluminescence

WANG Liyun<sup>1,2</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, YANG Jiasheng<sup>1,2</sup>, LUO Shan<sup>1,2</sup>, ZENG Hao<sup>2,3</sup>, CHEN Yangwu<sup>2</sup>, TAN Zhouliang<sup>\*2</sup>

1 College of Resources and Environment Engineering, Mianyang Teachers' College, Mianyang 621000, Sichuan, China

2 CAS Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, Chengdu 610041, Sichuan, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The rapid detection of microbial count has always been an issue to be solved in industrial production and food industry. Adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence method with simple operation and short detection period can meet the needs of general microbial detection. However, this method still has some limitations, such as the high limit of detection, the influence of microorganisms and other factors (non-microbial ATP, extractants, luciferase activity, etc.), all of which impact the detection results. This paper first introduced the common methods for detecting the microbial count and reviewed the development history and principle of ATP bioluminescence; expounded the effects of non-microbial ATP, free ATP, microbial biomass, ATP extractants, and luciferase on the sensitivity and stability of ATP bioluminescence method. Furthermore, summarized the application status of this method in food industry, medical services, and sewage treatment. Finally, we discussed the optimization of the detection system and the application of ATP online detection. Through this review, we aim to provide a new idea for the efficient application of ATP bioluminescence method.

**Keywords:** ATP bioluminescence; detection of microbial count; extractant; luciferase; ATP measurement

随着人们生活质量的提高, 食品安全、卫生消毒监测与环境治理等行业越来越受到人们的重视<sup>[1-2]</sup>。在食品与卫生行业, 细菌数量通常是其质量评价的重要标准; 而在环境领域, 活性污泥中微生物的活性是反映污水处理系统性能优劣的重要依据。传统的微生物数量检测方法一般采用平板计数法, 具有检测准确度高、化学试剂用量较少等优点, 但存在测定周期长、耗时耗力的缺点, 难以满足当前快速、高效检测的分析要求。近年来, 以腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)为媒介的检测方法正以快速、灵敏、操作简便等优势在食品、医疗、废水处理等领域获得广泛应用。如食品行业中的灭菌评价及乳制品的细菌数测量; 医疗

行业中的器械消毒、药品成品检测及医疗室内空气污染评价等; 而在废水处理领域中, ATP可表征微生物的活性、代谢水平及污水处理系统的运行状态; Chen等研究结果也表明, 微生物降解污染物的过程中, 微生物细胞内ATP的含量与污染物的去除效果间存在线性关系<sup>[3-5]</sup>。

ATP广泛存在于一切活的生命体中, 为机体组织细胞提供所需能量<sup>[6]</sup>。据报道, 每个活的微生物细胞中的ATP含量基本相同, 一般为 $5 \times 10^{-16} - 5 \times 10^{-15} \text{ g}$ <sup>[7]</sup>, 因此, 在实际应用过程中可通过检测ATP的含量来判断微生物数量<sup>[8-9]</sup>。目前, ATP的检测方法包括层析法、电泳法与光学分析法。其中, 光学分析法中的ATP生物发光法因其对微生物检测具有快速、简便、高

灵敏度的优点<sup>[10]</sup>, 逐渐在各行业的微生物检测中受到重视。然而, ATP 生物发光法的检测结果准确性易受到一些因素的影响, 如溶液 pH 对反应体系的影响、荧光素酶的稳定性不高、提取剂对反应体系具有抑制作用、ATP 生物发光法的检测灵敏度低或检测限值较高等, 进而影响反应体系中 ATP 发光值的测量。本文简要介绍常见微生物量的检测方法、ATP 生物发光法的发展历程、原理及检测步骤, 重点论述 ATP 检测技术的影响因素及应用现状, 并对 ATP 生物发光法的发展趋势进行展望。

## 1 微生物数量的检测方法

目前, 国内外检测微生物数量的方法多种多样(表 1), 以传统平板菌落计数法为例, 该法通常需在 37 °C 恒温培养 24–48 h 获得结果, 而检测酵母及霉菌等需要 4–7 d。由此可知, 传统微生物检测法操作烦琐且用时长, 已难以适应不同行业微生物数量快速检测需求; 其他方法如血细胞计数板计数法、膜过滤计数法等具有操作简便、结果较准确的优点, 但上述方法并不适用于复杂体系(如污泥、沉积物等)中微生物数量的检测; 荧光原位杂交-流式细胞术、高光谱成像技术等能快速、准确测定, 但操作烦琐、易受测量条件影响。如今, 微生物数量的检测方法逐渐朝着高科技智能化方向发展, 这些方法共有的特征就是快速、简便和准确。与传统检测方法相比较, ATP 生物发光法具有无需培养、操作简便快速等优点, 而且检测结果与平板菌落计数有较好的相关性<sup>[23]</sup>, 更适用于微生物量的快速检测, 在不同行业或领域(食品卫生、医学、生态环境科学等)中获得广泛应用。

## 2 ATP 生物发光法的发展历程

生物发光的研究始于 1885 年 Dubois 的实

验, 他首次证实荧光素酶与荧光素之间产生的化学反应能引起生物发光现象<sup>[24]</sup>; ATP 生物发光法的反应机理最早由 McElroy 和 Strehler<sup>[25]</sup>于 1949 年提出, 他们证实 ATP 含量与荧光发光强度成正相关。ATP 生物发光技术起源于 20 世纪 70 年代, 是以 ATP 为检测对象的一种生物检测方法。1983 年, Moyer 等提出所有微生物细胞内都存在 ATP 且含量一定, 可通过细胞内源性 ATP 的含量来表征细胞活性及活细胞的数量<sup>[26]</sup>, ATP 生物发光技术可用于细胞活性的检测<sup>[27]</sup>。20 世纪 80 年代, ATP 检测仪由英国人首先研制并逐步发展到欧洲、美国和日本<sup>[28]</sup>。20 世纪末 ATP 生物发光技术引入中国。此后, ATP 生物发光技术不断建立和完善, 并开始研制定量测定的检测仪, 目前已广泛用于食品卫生、医学、生态环境科学等重要领域。

## 3 ATP 生物发光法原理及检测步骤

ATP 生物发光法的主要原理为<sup>[29]</sup>: 在有氧环境中, 荧光素在荧光素酶、 $Mg^{2+}$ 的催化作用下与 ATP 发生反应生成荧光素-AMP 复合体并释放出焦磷酸(pyrophosphoric acid, PPI); 荧光素-AMP 复合体在  $O_2$  的作用下, 进一步生成氧化荧光素并释放出  $CO_2$ 、 $H_2O$  和 AMP; 最终, 激发态的氧化荧光素回归基态, 发出光子(图 1), 光子数量可换算成 ATP 的含量<sup>[30]</sup>。ATP 生物发光法检测步骤主要包括样品中 ATP 的提取、荧光素-荧光素酶溶液的添加与反应、生物发光值检测 3 个部分<sup>[31]</sup>, 通过 ATP 生物发光法标准曲线计算, 进而反映样品中微生物的量。

## 4 ATP 生物发光法影响因素

ATP 生物发光的主要反应物质包括荧光素、荧光素酶和 ATP 提取剂。尽管 ATP 生物发光法具有操作简便、反应迅速和灵敏度高的优

表 1 不同微生物量检测方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of different microbial biomass detection methods

序号 Serial No.	方法 Methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
1	ATP 生物发光法 ATP bioluminescence	可自动化操作; 测定范围广; 快速简便, 重复性较好 Can be automated; Wide measurement range; Fast and easy, with good repeatability	受盐、pH、温度、离子等干扰; 有时灵敏度达 不到要求 Affected by salt, pH, temperature, ions, etc; Sometimes the sensitivity does not meet the requirements	[11]
2	平板菌落计数法 Coliform plate count method	适用范围广、准确度高 Wide application range and high accuracy	微生物选择特异性高, 烦琐耗时、效率低、 成本较高, 测定值比实际值偏低 Microorganism selection has high specificity, tedious and time-consuming, low efficiency, high cost, and the measured value is lower than the actual value	[12]
3	高光谱成像技术 Hyperpectral imaging technology	快速无损检测 Fast nondestructive testing	需建立模型, 易受周围环境及测量条件影响 Need to build a model, easily affected by the surrounding environment and measurement conditions	[13]
4	荧光原位杂交-流式细胞术 Fluorescence <i>in situ</i> hybridization and flow cytometry	快速准确、灵敏度高 Fast and accurate, high sensitivity	探针不稳定、操作烦琐 The probe is unstable and the operation is cumbersome	[14]
5	核酸含量测定法 Nucleic acid assay	相对准确 Relatively accurate	DNA 提取烦琐, 耗时长 DNA extraction is cumbersome and time-consuming	[15]
6	荧光分光光度法 Fluorescence spectrophotometry	灵敏度较高, 快速简便, 适于大批量测定 High sensitivity, fast and simple, suitable for high-volume determination	光强不高, 线性不理想; 荧光发散方向不集中; 易受某些离子干扰, 试验速度需快 The light intensity is not high, and the linearity is not ideal; The fluorescence divergence direction is not concentrated; It is easily interfered by some ions, and the test speed needs to be fast	[16]
7	血细胞计数板计数法 Blood cell count	快速准确 Fast and accurate	局限性、浓度高时误差大 Limitation, large error when the concentration is high	[17]
8	细菌计数板计数法 Bacterial count plate	快速准确 Fast and accurate	局限性、浓度高时误差大 Limitation, large error when the concentration is high	[18]
9	膜过滤计数法 Membrane filtration counting	简便快捷 Simple and fast	测定值比实际值偏低 The measured value is lower than the actual value	[19]
10	比浊法 Turbidimetry	适用范围广、快速准确简便 Wide range of applications, fast, accurate and simple	需作标准曲线, 不适于颜色深的样品 A standard curve is required, not suitable for dark samples	[20]
11	霉菌计数法 Mold count	专用于丝状微生物 Dedicated to filamentous microorganisms	操作烦琐 Cumbersome operation	[21]
12	凯氏定氮计数法 Kjeldahl method	可测定菌丝类 Mycelium can be measured	操作烦琐, 误差较大 The operation is complicated and the error is large	[22]

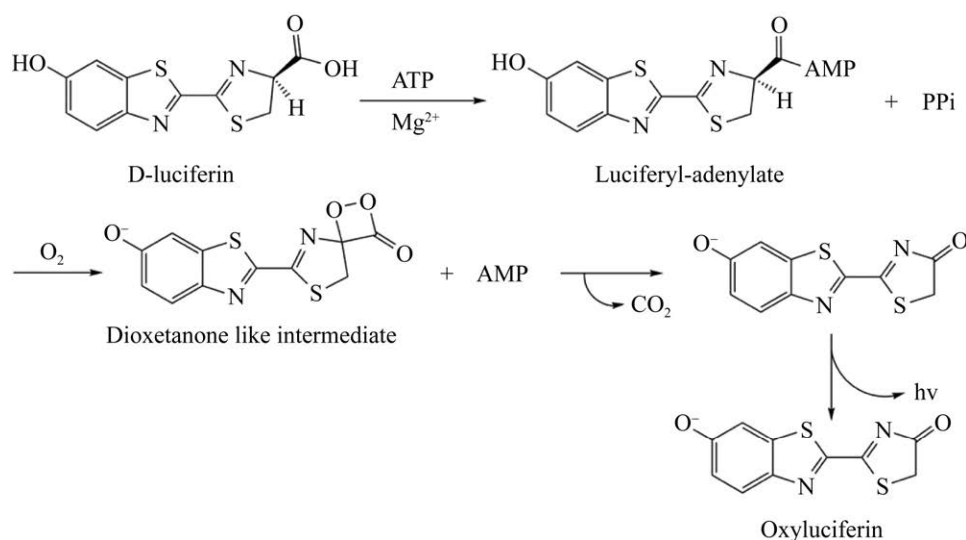


图 1 萤火虫的生物发光反应原理图

Figure 1 Schematic diagram of bioluminescence reaction of fireflies.

点,但其检测灵敏度易受到诸多因素的影响。ATP 生物发光技术要求细菌浓度不低于  $10^3$  CFU/mL,因此部分细菌检测需进行过滤或预培养以满足卫生学要求<sup>[32]</sup>。国内外就如何提高 ATP 生物发光技术的检测灵敏度开展了大量工作,目前已报道的影响生物发光体系的因素主要包括样品处理时间、荧光素酶活性、提取剂种类、反应体系的温度、反应时间与缓冲液 pH 等。

#### 4.1 非微生物 ATP 的影响

ATP 生物发光法主要应用于测定微生物的量,而待测样品中的非微生物 ATP,如游离 ATP 及动物体细胞中的 ATP 是影响测量结果准确性的主要因素。目前,降低游离 ATP 的方法主要包括过滤法(采用滤膜器对样品进行过滤,然后清洗滤膜以去除游离 ATP)和酶解法(利用酶裂解去除游离 ATP),但这两类方法均不能完全去除游离 ATP<sup>[33]</sup>。李利霞等<sup>[33]</sup>提出了使游离 ATP 沉淀及利用多种 ATP 水解酶水解 ATP,并确定了最适合游离 ATP 的去除方法,为之后的精准测量提供了较好的思路。近年来,应用较广的非微生物 ATP 去除的方法是利用非离子表面活性

剂 Triton X-100 与三磷酸腺苷双磷酸酶(adenosine triphosphate double, Apyrase)结合的方法,作用原理是: Triton X-100 不破坏细菌细胞壁,主要破坏哺乳动物细胞(体细胞)膜,促进胞内 ATP 的释放,然后释放的胞内 ATP 被 Apyrase 耗尽而去除;随后, Apyrase 被灭活,细菌细胞同时被表面活性剂提取,释放胞内 ATP 进行定量检测<sup>[34]</sup>。尽管每个细菌细胞中的胞内 ATP 约为 2 amol ( $10^{-18}$  mol),但哺乳动物细胞的胞内 ATP 含量要比细菌胞内 ATP 高出  $10^4$ – $10^5$  倍<sup>[35]</sup>。因此,在大量哺乳动物细胞或大量胞外 ATP 存在的样品中检测相对较少的细菌细胞 ATP 含量十分困难<sup>[36-37]</sup>。鉴于此, Pavankumar 等开发了一种重组 *Shigella flexneri* Apyrase (RSFA),并与 5 种商业化酶(马铃薯脱酪酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、己糖激酶和甘油激酶)的 ATP 消耗潜力进行了对比,结果显示, RSFA 可完全消除细胞外 ATP 和 ATP 的复合物,甚至在尿液和血清等生物样本中也显示出优越的活性<sup>[38]</sup>。

#### 4.2 微生物量的影响

样品中的细菌数量是影响 ATP 生物发光法

测量准确性的重要因素之一。传统的 ATP 生物发光法要求 ATP 的含量不低于  $10^{-16}$  mol, 其检测限值须达到  $10^3$ – $10^4$  CFU/mL<sup>[39]</sup>, 在医疗器械清洁水平检测、食品安全等领域该方法难以直接应用。常规的解决方法包括过滤浓缩法、前培养法及利用 PCR 或荧光原位杂交技术<sup>[40]</sup>, 虽具有准确性高的优点, 但存在耗时长、难以实现快速检测等缺点, 不易于推广使用。

研究证实, ATP 扩增技术具有灵敏度高与快速检测的优点, 可有效克服样品中微生物 ATP 含量低而导致检测结果不准确的难题。ATP 扩增技术有两条扩增路线<sup>[41]</sup>, 即焦磷酸(PPi)扩增与 AMP 扩增(图 2)。针对 AMP 扩增技术, Satoh 等<sup>[42]</sup>通过利用腺苷酸激酶(ADK)催化 ATP 与 AMP 反应生成 2 分子的 ADP, 再利用聚磷酸激酶(PPK)催化 2 分子 ADP 与 2 分子磷酸烯醇丙酮酸(PEP)生成 2 分子 ATP, 以此类推, 最终可实现对细菌的 CFU 进行测量。Sakakibara 等<sup>[43]</sup>通过扩增技术并利用磷酸腺苷脱氨酶消除内源性干扰, 无需培养就可检测出啤酒中的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、短乳杆菌, 检测限达到了 1 CFU/mL。对于 PPi 扩增, 常超等<sup>[39]</sup>利用基于 PPi 扩增途径的 ATP 生物发光法检测了乳制品中微生物的含量, 当腺苷酰硫酸(adenosine-5'-phosphosulfate, APS)浓度为 10  $\mu$ mol/L、

ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase, ATPS)活力为 0.15 U/mL、反应 pH 7.8 时, ATP 生物发光法的灵敏度提高了 10 倍。Lee 等<sup>[41]</sup>将 ATP 与荧光素反应生成的产物 PPi 与 AMP 同时进行扩增, 形成指数型扩增, 可检测至 10 CFU/mL 细菌。由此可知, 在要求较高的医疗环境微生物检测应用领域, ATP 扩增技术具有良好应用前景。

### 4.3 ATP 提取剂的影响

ATP 生物发光法中的 ATP 提取剂主要有以下特点:(1) 可快速杀死活细胞并破碎细胞膜以获得最大 ATP 的量;(2) 使 ATP 水解酶(Apyrase)失活并且不影响 ATP 的性质;(3) 不影响或轻微影响荧光素酶的活性。

目前, 提取微生物 ATP 的方法有很多, 主要包括缓冲液煮沸法<sup>[44]</sup>、超声<sup>[45]</sup>、微波<sup>[7]</sup>、各种酸碱、表面活性剂及一些有机溶剂<sup>[46]</sup>等(表 2)。现阶段针对液体样品应用较多的提取剂主要包括三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)及表面活性剂这两类, 而针对土壤中 ATP 的提取, 则是二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)<sup>[57]</sup>的应用较多, 并且通过 DMSO 与磷酸、尿素、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)等的联合应用, 可增强土壤 ATP 的提取效果。为了消除 TCA 对荧光素酶的抑制作用, 一般使用的试剂有环糊精( $\beta$ -CD)、二乙氨基基

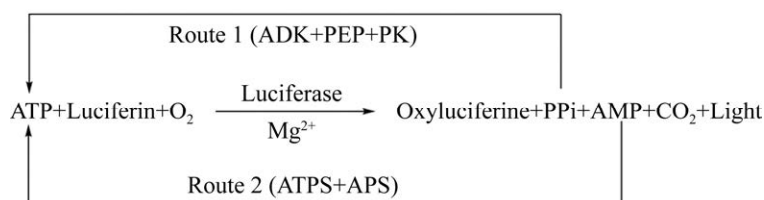


图 2 ATP 扩增路线 ADK: 腺苷酸激酶; PEP: 磷酸烯醇丙酮酸; PK: 丙酮酸激酶; ATPS: ATP 硫酸化酶; APS: 腺苷酰硫酸

Figure 2 ATP amplification route. ADK: Acetatekinase; PEP: Phosphoenolpyruvate; PK: Pyruvatekinase; ATPS: ATP sulfurylase; APS: Adenosine-5'-phosphosulfate.

表 2 不同微生物细胞 ATP 的提取

Table 2 Extraction of ATP from different microorganisms

序号 No.	提取方法 Extraction methods	提取剂名称 Name of extractant	提取样品 Extract samples	提取最佳条件 Extract the best conditions	参考文献 References
1	缓冲液煮沸法 Buffer boiling method	Tris 缓冲液 Tris buffer	活性污泥 ATP ATP of activated sludge	pH 7.8 Tris 缓冲液 Tris buffer with pH 7.8	[47]
2	缓冲液煮沸法 Buffer boiling method	McIlvaine 缓冲液 McIlvaine buffer	微型生物细胞内 ATP Intracellular ATP of microbes	pH 7.70 McIlvaine 缓冲液 McIlvaine buffer with pH 7.70	[48]
3	超声法 Ultrasonic method	超声波能量 Ultrasonic energy	嗜酸乳杆菌 ATP ATP of <i>Lactobacillus acidophilus</i>	40 kHz, 13.5 W/cm <sup>2</sup> 标称频率 Nominal frequency with 40 kHz and 13.5 W/cm <sup>2</sup>	[49]
4	微波法 Microwave method	微波能量 Microwave energy	活性污泥 ATP ATP of activated sludge	微波功率 800 W, 微波辐射时间 15 s The microwave power is 800 W and the microwave radiation time is 15 s	[7]
5	酸、碱提取法 Acid and alkali extraction method	硫酸、磷酸 Sulfuric, phosphoric	微型生物细胞内的 ATP Intracellular ATP of microorganisms		[50]
6	酸、碱提取法 Acid and alkali extraction method	三氯乙酸 Tricarboxylic acid (TCA)	土壤微生物 ATP ATP of soil microorganisms	1.10 mol/L TCA, 0.25 mol/L P, 0.6 mol/L 咪唑 1.10 mol/L TCA, 0.25 mol/L P, 0.6 mol/L imidazole	[51]
7	酸、碱提取法 Acid and alkali extraction method	三氯乙酸 Tricarboxylic acid (TCA)	活性污泥 ATP ATP of activated sludge	2.5% TCA, 冰浴时间 10 min, Tris-EDTA 缓冲液 pH 值为 7.5 2.5% TCA, ice bath time 10 min, Tris-EDTA buffer with pH 7.5	[7]
8	有机溶剂提取法 Organic solvent extraction method	十六烷基三甲基溴化铵 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	细菌总数 Total number of bacteria	150 $\mu$ L 5 mmol/L CTAB, 150 $\mu$ L 7.5 mmol/L $\beta$ -CD	[52]
9	有机溶剂提取法 Organic solvent extraction method	十六烷基三甲基溴化铵 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	布拉氏酵母菌总数 Total number of <i>Saccharomyces boulardii</i>	0.015% CTAB, 作用 4 min Acting for 4 min with 0.015% CTAB	[53]
10	有机溶剂提取剂 Organic solvent extraction method	十六烷基三甲基溴化铵 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	面粉细菌总数 Total bacteria in flour	0.015% CTAB, 提取时间 3 min, 0.25% $\beta$ -CD Acting for 3 min with 0.015% CTAB and 0.25% $\beta$ -CD	[31]
11	有机溶剂提取法 Organic solvent extraction method	十二烷基三甲基溴化铵 Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)	分枝杆菌 ATP ATP of <i>Mycobacteria</i>	2% Tris-EDTA, 热水浴 100 $^{\circ}$ C 2% Tris-EDTA, and hot water bath at 100 $^{\circ}$ C	[54]
12	表面活性剂法 Surfactant active solvent method	苯扎氯铵 Benzalkonium chlorides (BAC)	霉菌孢子 ATP ATP of mold spores	0.1% BAC, 反应时间 3 min Acting for 3 min with 0.1% BAC	[55-56]
13	表面活性剂法 Surfactant active solvent method	苯扎溴铵 Benzalkonium bromide (BAB)	天然水体细菌总数 Total bacteria in natural water	0.05% BAB	[34]

胆固醇、磷脂酰胆碱<sup>[48]</sup>及二乙氨基乙基葡聚糖(diethylaminoethyl-dextran, DEAE-DX)<sup>[45]</sup>。现阶段的研究结果表明,阳离子表面活性剂苯扎溴铵(benzalkonium bromide, BAB)和苯扎氯铵(benzalkonium chlorides, BAC)对菌类的提取效果较好,并可通过添加相应的解抑制剂来减少其其对 ATP 生物发光系统的抑制作用,因此可将 BAB 和 BAC 作为菌类 ATP 提取的主要试剂<sup>[58-60]</sup>。值得注意的是, BAB 与 BAC 在污水厂活性污泥 ATP 提取中的应用较少,此类表面活性剂对活性污泥 ATP 提取效果的影响有待系统深入研究。

#### 4.4 荧光素酶活性的影响

当前,无论基于何种荧光素的发光体系,其催化反应都是由 ATP、荧光素酶、荧光素、二价金属离子等共同完成,荧光素酶的催化起主要作用。因此,优化荧光素酶的反应条件是必要的。目前已知的荧光素酶活性影响因素包括离子浓度、pH、温度及制备方法等。

Gilles 等<sup>[61]</sup>研究了盐和缓冲液中的离子对荧光素-荧光素酶系统测定三磷酸腺苷的影响,对于荧光素-荧光素酶的反应体系来说,阴离子比阳离子抑制作用更强且  $\text{Ac}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^-$ 。阳离子在 ATP 生物发光法反应体系中一般起催化作用,如  $\text{Mg}^{2+}$  主要与 ATP 结合提高 ATP 与酶分子的结合能力<sup>[62]</sup>。此外,其他二价金属离子如  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  与  $\text{Mg}^{2+}$  有相同作用,并且具有较大的浓度范围,但某些金属离子如  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  对荧光素酶活性有明显抑制作用<sup>[63]</sup>。

荧光素酶的制备方法显著影响荧光素酶的活性,主要体现在荧光素酶活性改变与荧光素酶活性保护两方面。改变荧光素酶活性一般采用遗传突变或定点突变的方法<sup>[64-66]</sup>。如 Dale 等<sup>[67]</sup>利用虫荧光素酶突变分析证明缓慢向酶供应荧光素腺苷酸增加底物荧光素腺苷酸发射的光子总数,突变型萤火虫荧光素酶发射的光子总量平

均比野生型萤火虫荧光素酶发射的光子总量高 50 倍。利用 PLG2 新型荧光素酶,Branchini 等<sup>[68]</sup>研究了嵌入酶 PpyLit 的增强催化性能,发现嵌入酶具有比原 *P. pyralis* 酶高 2.9 倍的催化效率和高 1.4 倍的生物发光量子产率,并不是简单的加法。

荧光素酶的保护主要是针对荧光素酶对温度及 pH 的敏感性所选的保护剂与适配离子浓度进行酶活性的保护<sup>[69]</sup>。如刘艳杰<sup>[70]</sup>在 37 °C、pH 7.8 时,通过单因素试验获得几种荧光酶保护剂的最佳用量:BSA、DTT、蔗糖、甘油与海藻糖的最佳浓度分别为 30 μg/mL、0.6 mmol/L、10%、30%和 0.10 mol/L。将上述最佳浓度的各种保护剂混合,以此提高荧光素酶的储运稳定性。罗展浩<sup>[71]</sup>对北美萤火虫荧光素酶的纯化与特性进行了研究,并考察了荧光素酶一系列的保护剂与发光增强剂的配比,为今后的规模化生产奠定了基础。

目前,荧光素酶活性的长效保持(尤其是常温条件下酶活性的维持)仍是一大挑战,解决酶活性长效保持这一关键技术问题将有效推动该方法在不同行业的大规模应用。

#### 4.5 其他因素的影响

消毒剂残留、样品性质、提取剂颜色及检测设备的差异均会对 ATP 生物发光法检测结果造成不同程度的影响。在医疗消毒和其他环境表面清洁度的研究中,ATP 生物发光法易受到表面消毒剂残留的影响,从而出现假阳性或假阴性的结果<sup>[72]</sup>。在评价医院清洁度时,发现材料表面的物理性质也会影响 ATP 的积累<sup>[73]</sup>;而通过对重症监护室消毒后的环境表面监测,发现不同的检测仪所测的 ATP 值差异也较大<sup>[74]</sup>。此外,提取剂的颜色对 ATP 检测也具有干扰作用。如冯敏等<sup>[75]</sup>研究表明,添加柠檬黄溶液的对照组与实验组(未添加柠檬黄)结果出现偏差,



而且色素的含量越高偏差越大, 颜色对光子的淬灭作用越强。

综上所述, ATP 生物发光法检测微生物 ATP 含量过程中受到众多因素的影响, 现有研究成果为提高微生物 ATP 含量的准确检测提供了一定的理论依据与方法参考, 实际应用过程中, 应结合行业特征与检测要求分别制定不同检测策略, 从而实现不同行业中微生物 ATP 的有效检测。

## 5 ATP 生物发光法的应用

近年来, ATP 生物发光法应用广泛, 前景广阔。在食品方面, ATP 十分适合食品行业的危害分析和关键点控制(hazard analysis critical control point, HACCP)体系中的细菌学检测, 广泛应用于食品生产线、食品器件的清洁度评价, 以及奶制品、蔬菜与调味品的灭菌效果; 在医疗方面, 主要用于医疗器件的消毒效果评

价、医疗室的空气洁净度评价, 以及药敏性实验的结果评价; 在废水生物处理工艺中, ATP 生物发光法主要通过测定微生物量来判断废水的可生化性与评价工艺运行性能。此外, 在土壤、文件资料的真菌污染等方面也有相关应用案例见诸报道(表 3)。

## 6 ATP 检测设备的应用

ATP 荧光检测仪基于萤火虫发光原理, 利用“荧光素-荧光素酶体系”快速检测 ATP。国内 ATP 荧光检测仪的研制较晚, 但随着技术的提高及需求的日益上升, ATP 检测技术已经成熟, 相应的 ATP 检测仪产品正在逐渐成熟, 并开发了便携式 ATP 检测仪。目前, 市场上已有了较多的手持式 ATP 荧光检测仪, 具有检测快速(通常只需要 5–20 s)、操作方便等优点。其已经在食品、医药卫生、医药、日化、造纸、工业水处理、国防以及环保、水政、海关出入境检疫

表 3 ATP 生物发光法的部分应用

Table 3 Partial application of ATP bioluminescence method

应用领域 Application areas	检测内容 Test content	检测目的 Testing purpose	参考文献 References
食品 Food	乳制品中 ATP 含量检测 ATP in milk product	乳制品变质监测 Milk product deterioration monitoring	[50]
	橄榄比目鱼肌肉中 ATP 含量检测 ATP detection in olive flounder muscle	生鱼片死亡间隔判断 The death interval of sashimi	[76]
	UHT 牛奶中的微生物检测 Microbial detection in UHT milk	UHT 牛奶中的微生物质量 Rapid monitoring of microbial quality in UHT milk	[77]
	啤酒中的乳酸菌检测 Lactic acid bacteria detection in beer	啤酒质量控制 Beer quality control	[78]
	浓缩肉汤中的霉菌检测 Mold detection in concentrated broth	探究生物发光法快速检测霉菌的适用性 Explore the applicability of bioluminescence method for rapid detection of mold	[79]
	纤维支气管镜中的铜绿假单胞菌、核杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Bacilli</i>	纤维支气管镜清洗消毒效果现场评价 Field evaluation of cleaning and disinfection effect of fiberoptic bronchoscope	[80]
	<i>tuberculosis</i> in fiberoptic bronchoscopy		

(待续)

(续表 3)

	医院病房室空气中的细菌数	医院病房室内空气复杂性评价	[81]
	Detect the number of bacteria in the air in hospital wards	Evaluation of indoor air complexity in hospital wards	
	医院频繁接触面的微生物	医院频繁接触面的清洁度评价	[82]
	Microorganisms at frequent hospital contacts	Cleanliness evaluation of hospital frequent contact surfaces	
	尿液中的 ATP	判断前列腺肥大严重程度	[83]
	ATP in urine	Determine the severity of prostatic hypertrophy	
	不同多环己酮(PHMB)浓度下的体外生物活性检测	不同 PHMB 浓度下体外微生物抗厌氧活性	[84]
	<i>In vitro</i> biological activity detection at different PHMB concentrations	Anti-anaerobic activity of microbes in vitro at different PHMB concentrations	
	检测药物保存系统中的微生物	非无菌药品中的微生物污染情况评价	[85]
	Detection of microorganisms in drug storage systems	Evaluate microbial contamination in non-sterile drugs	
	外科器械表面的 ATP 检测	医疗器械清洗效果评估	[86]
	ATP detection on the surface of surgical instruments	Evaluation the cleaning effect of medical devices	
	生物气溶胶检测 ATP	空气环境中的气溶胶监测	[87]
	ATP detection in bioaerosols	Aerosol monitoring in the air environment	
	活化的血小板释放的 ATP 检测	血小板抑制剂的高通量筛选	[88]
	ATP detection released by activated platelets	High throughput screening of platelet inhibitors	
废水生物处理工艺	印染废水生物处理工艺中 ATP 检测	反映活性污泥的代谢状态	[89]
	Biological treatment process	Reflect the metabolic state of activated sludge	
	污泥细胞中的 ATP 检测	能量不足对污泥性能的影响	[90]
	ATP detection in sludge	The effect of energy deficiency on sludge performance	
	废水和污泥中的 ATP 浓度检测	活性污泥中纳米颗粒毒性评价	[91]
	ATP detection in wastewater and sludge	To evaluate the toxicity of nanoparticles in activated sludge	
	造纸废水处理工艺中的 ATP	判断工艺中是否含有有害物质与缺乏营养素	[92]
	ATP in papermaking wastewater treatment process	Determine whether the process contains harmful substances and lacks nutrients	
	活性污泥中的 ATP 检测	评价二氧化硅纳米粒子的生物毒性	[93]
	ATP detection in activated sludge	Determine the toxicity of silica nanoparticles on microorganisms in wastewater treatment facilities	
其他	哺乳动物细胞中的 ATP 检测	生物分析	[94]
	ATP detection in mammalian cells	Biological analysis	
Others	细菌悬浮液中 ATP 的检测	抗菌药物敏感性实验	[95]
	Detection of ATP in bacterial suspension	Antimicrobial susceptibility test	
	壁画上的微生物量	壁画的污染程度评价	[96]
	Microbial biomass on the mural	Evaluation mural pollution degree	
	抗碳青霉烯耐药革兰氏阴性菌中的 ATP 检测	指导选择抗碳青霉烯耐药革兰氏阴性菌(CR-GNB)的抗生素组合	[97]
	ATP detection in Gram-negative bacteria resistant to carbapenem	Guide the selection of carbapenem resistant Gram-negative bacteria (CR-GNB) antibiotic combinations	

及其他执法部门等领域。2007 年, 龚大江等<sup>[98]</sup>设计并开发出用于现场微生物快速检测的手持式 ATP 荧光检测系统, ATP 检测极限达  $1 \times 10^{-13}$  mol, 单次检测不超过 20 s, 可记录 1 000 条检测结果。周爱玉等<sup>[99]</sup>设计的手持式 ATP 生物荧光检测仪检测限能达到  $1 \times 10^{-14}$  mol, 检测时间为 10 s, 仪器响应值与标准 ATP 样品浓度在对数坐标下呈线性相关, 相关系数达到了 0.990 2。董曼曼等<sup>[100]</sup>对目前市场上常见的 10 家公司的手持式 ATP 荧光检测仪的主要性能指标, 包括线性、重复性、检出限及衰减率等进行检测, 结果显示各项性能指标均达到要求的产品只有 3 家公司。ATP 快速检测仪还存在检测灵敏度不高、精密度差等缺点, 而且不同公司生产的仪器的线性范围不同, 因此测定值不能进行相互比较。在今后的研究中, 除了提高仪器灵敏度、精准度等, 还需要有制定相关标准, 便于相互参考分析。

虽然 ATP 快速检测仪能提供快速便捷的 ATP 检测, 但污水处理系统中 ATP 的检测要求能及时、连续监测微生物的活性变化以指导污水处理系统的稳定运行, 便携式 ATP 快速检测仪器难以满足需求。最近, LuminUltra Technologies 公司推出了 BugCount<sup>®</sup>在线 ATP 检测仪, 在工业循环水、冷却塔、膜法回用水、反渗透除盐等水处理过程中实现了微量/痕量微生物的在线检测。然而, 活性污泥工艺中的样品十分复杂, 如何排除活性污泥样品检测过程中各种干扰物质的影响, 强化活性污泥微生物细胞 ATP 的提取效果与 ATP 检测效率, 实现活性污泥中 ATP 的实时、精准检测, 目前国内外几乎未见报道。本实验室针对活性污泥等复杂样品, 研制出了活性污泥 ATP 在线检测设备, 优化了 ATP 提取剂组成, 减小了活性污泥样品检测过程中各种干扰物质的影响, 强化活性污泥微生

物细胞 ATP 的提取效果与 ATP 检测效率, 实现活性污泥中 ATP 的实时、精准检测, 也可实现水质和活性污泥中微生物数量的在线检测<sup>[101]</sup>。

综上所述, 尽管 ATP 快速检测仪的研制使得 ATP 的检测更为便捷, 但该方法仍不能满足活性污泥工艺等复杂体系中微生物 ATP 含量的实时、动态检测需求。此外, 使用 ATP 生物发光法通常需要具有高素质人员和昂贵设备的专业实验室, 检测设备仍然是限制其广泛应用的关键因素。随着 ATP 检测系统的自动化性能不断改进和提高, 适用于现场 ATP 检测的仪器研制是必然趋势, 基于 ATP 生物发光法的在线检测仪器设备的研发与应用是一个十分有潜力的发展方向。

## 7 结论与展望

目前, ATP 生物发光法已在食品、医疗、卫生消毒及生态环境科学等领域中微生物的检测方面获得了广泛发展与应用, 在食品安全、医疗消毒与废水处理效果评价方面发挥了重要作用。尽管该方法对于微生物的检测具有快速、灵敏、广谱等优点, 但其易受到各种因素(样品性质、荧光素酶活性与稳定性、提取剂与解抑制剂等)的影响, 检测结果的准确性仍存在挑战。为提升 ATP 生物发光法检测结果的准确性与适用性, 以下几方面的问题值得关注:

(1) 整个 ATP 生物发光法检测体系中, 荧光素酶各试剂间的相互作用对检测结果影响较大, 然而目前的研究主要集中在对单一提取剂或荧光素酶的优化与调整方面。因此, 在今后的研究中, 应根据样品的性质与特征, 更加注重整个 ATP 发光反应体系中提取剂、解抑制剂、荧光素酶活性等的有机组合与优化, 以进一步提高检测的准确性与灵敏度。

(2) 对于微生物含量较少的样品, 现有的 ATP 扩增技术基本能满足检测要求, 但 ATP 扩增技术本身存在内源性污染从而产生背景干扰, 今后需根据内源性污染产生的来源采取相关措施解决背景干扰的问题。

(3) 目前各行业针对微生物数量检测缺乏明确的计量体系, 同时不同检测设备的检测限度存在差异, 而且实际应用中均需要与平板计数法等标准计数法进行比对, 效率较低。因此, 未来各行业可根据实际情况推行单独的行业计量体系。

(4) 在环境治理方面, ATP 生物发光法的应用主要用于反映活性污泥工艺中微生物的活性, 进而判断活性污泥系统的运行状态。然而现阶段的 ATP 检测仪器主要以实验室与便携式为主, 缺乏实时在线的监测手段, 难以对活性污泥系统运行状态起到实时监测与预警作用。因此, 在当前微生物量快速、简捷和准确检测的要求下, 基于 ATP 生物发光法的原位在线监测仪器设备的研发与应用是一个十分有潜力的发展方向。

## REFERENCES

- [1] McLaggan D, Amezcaga MR, Petra E, Frost A, Duff EI, Rhind SM, Fowler PA, Glover LA, Lagido C. Impact of sublethal levels of environmental pollutants found in sewage sludge on a novel *Caenorhabditis elegans* model biosensor[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46503
- [2] Shama G, Malik DJ. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2013, 216(2): 115-125
- [3] Chen MX, Chen YW, Dong SY, Lan SH, Zhou HZ, Tan ZL, Li XD. Mixed nitrifying bacteria culture under different temperature dropping strategies: nitrification performance, activity, and community[J]. Chemosphere, 2018, 195: 800-809
- [4] Chen YW, Wang L, Dai FZ, Tao M, Li XD, Tan ZL. Biostimulants application for bacterial metabolic activity promotion and sodium dodecyl sulfate degradation under copper stress[J]. Chemosphere, 2019, 226: 736-743
- [5] 张彬, 邓佳, 陈杨武, 孟丹, 谭周亮. 游离氨对硝化过程的影响与定量表征[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(5): 1260-1267  
Zhang B, Deng J, Chen YW, Meng D, Tan ZL. Effect and quantitative characterization of free ammonia on nitrification process[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(5): 1260-1267 (in Chinese)
- [6] 曹昕昱, 章小英, 叶建平. 线粒体 ATP 合成酶抑制因子 1 在细胞能量代谢中的调节作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(4): 682-690  
Cao XY, Zhang XY, Ye JP. Regulation of mitochondrial ATP synthase inhibitor 1 in cellular energy metabolism[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(4): 682-690 (in Chinese)
- [7] 赵奕良, 杨慧文, 宋浩亮, 陈倩瑜. 三氯乙酸(TCA)提取法与微波提取法检测活性污泥中三磷酸腺苷(ATP)[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2714-2721  
Zhao YL, Yang HW, Song HL, Chen QY. Detecting adenosine triphosphate (ATP) in activated sludge by trichloroacetic acid (TCA) extraction and microwave extraction[J]. Microbiology China, 2017, 44(11): 2714-2721 (in Chinese)
- [8] Sanna T, Dallolio L, Raggi A, Mazzetti M, Lorusso G, Zanni A, Farruggia P, Leoni E. ATP bioluminescence assay for evaluating cleaning practices in operating theatres: applicability and limitations[J]. BMC Infectious Diseases, 2018, 18(1): 583
- [9] Hammes F, Goldschmidt F, Vital M, Wang YY, Egli T. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments[J]. Water Research, 2010, 44(13): 3915-3923
- [10] 唐倩倩, 叶尊忠, 王剑平, 盖铃, 应义斌, 李雁斌. ATP 生物发光法在微生物检验中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 460-465  
Tang QQ, Ye ZZ, Wang JP, Gai L, Ying YB, Li YB. Application of ATP bioluminescence in microbial detection[J]. Food Science, 2008, 29(6): 460-465 (in Chinese)
- [11] 易琳. 微生物检测中 ATP 生物发光法的应用研究现状[J]. 生物化工, 2019, 5(1): 124-126  
Yi L. Application of ATP bioluminescence in microbial detection[J]. Biological Chemical Engineering, 2019, 5(1): 124-126 (in Chinese)
- [12] 刘辉, 邵伟, 黄斌, 胡潘. 食品中细菌快速测定的方

- 法学研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 48-50
- Liu H, Shao W, Huang B, Hu P. Methodological study on quick examination of germs in foods[J]. Journal of Microbiology, 2002, 22(3): 48-50 (in Chinese)
- [13] 郑彩英. 基于高光谱成像技术的冷却羊肉表面微生物活细胞数量无损检测方法研究[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2014
- Zheng CY. Study on non-destructive assessment of microbial viable cells on chilled mutton surface based on hyperspectral imaging technology[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2014 (in Chinese)
- [14] 朱以军, 李向阳. 荧光原位杂交-流式细胞术法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(1): 144-147
- Zhu YJ, Li XY. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2008, 18(1): 144-147 (in Chinese)
- [15] 莫继先, 王志刚, 王昌河. 常见微生物数量测定方法比较[J]. 生物学教学, 2012, 37(1): 42-43
- Mo JX, Wang ZG, Wang CH. Comparison of common microbial quantity determination methods[J]. Biology Teaching, 2012, 37(1): 42-43 (in Chinese)
- [16] 曹鹏, 杨瑞丽, 徐小琳, 薛梅. 荧光分光光度计快速测定番茄酱中微生物数量[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 131-134
- Cao P, Yang RL, Xu XL, Xue M. Fluorophotometric determination of microorganisms in tomato paste[J]. Food Research and Development, 2012, 33(12): 131-134 (in Chinese)
- [17] 管明星. 血细胞计数板的构造和使用方法简介[J]. 中学生物教学, 2020(29): 48-50
- Guan MX. An introduction to the construction and use of blood cell counters[J]. Teaching of Middle School Biology, 2020(29): 48-50 (in Chinese)
- [18] 舒柏华, 孙丹陵, 王胜利, 徐顺清. 肉类食品细菌污染生物发光快速分析技术研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 483-484
- Shu BH, Sun DL, Wang SL, Xu SQ. Rapid bioluminescent technique to detect bacteria in meat[J]. China Public Health, 2003, 19(4): 483-484 (in Chinese)
- [19] 金伟琼. 产木聚糖嗜热真菌鉴定基因克隆及米曲霉表达系统构建[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2019
- Jin WQ. Identification of xylanase-producing thermophilic fungi, gene cloning and construction of *Aspergillus oryzae* expression system[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [20] 肖敏, 杨峰, 王旭荣, 罗金印, 李新圃, 贾宁, 李宏胜. 奶牛乳房炎无乳链球菌活菌数与吸光度之间相关性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(5): 271-274
- Xiao M, Yang F, Wang XR, Luo JY, Li XP, Jia N, Li HS. Relations between bacterial count and absorbance of *Streptococcus agalactiae* in bovine mastitis[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(5): 271-274 (in Chinese)
- [21] 李可喻, 王好贤. 基于图像处理的微生物数量估算方法[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2018, 34(6): 681-685, 691
- Li KY, Wang HX. Estimation method for microbial count based on image processing[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2018, 34(6): 681-685, 691 (in Chinese)
- [22] 姜雪. B17 菌株的鉴定及产纤维素酶的初步研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2017
- Jiang X. Identification of B17 strain and preliminary study on its cellulase[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [23] 连英姿, 董雪, 李勇, 李越, 安静, 李欣. ATP 生物发光技术快速检测水中细菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1859-1860
- Lian YZ, Dong X, Li Y, Li Y, An J, Li X. Study on measuring rapidly bacterium in water with ATP bioluminescence technique[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(10): 1859-1860 (in Chinese)
- [24] 毛映丹. ATP 生物发光法检测水中细菌数的研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2009
- Mao YD. Detection of biomass in water by ATP bioluminescence technique[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2009 (in Chinese)
- [25] McElroy WD, Strehler BL. Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate[J]. Archives of Biochemistry, 1949, 22(3): 420-433
- [26] Moyer JD, Henderson JF. Nucleoside triphosphate specificity of firefly luciferase[J]. Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Science, 1983, 131(1): 187-189
- [27] Grönroos M, Mäenpää J, Nieminen AL, Nieminen L,

- Kangas L. 548 Correlation of steroid receptor contents with medroxyprogesterone and tamoxifen effects in endometrial cancer assayed by barin vitro ATP-bioluminescence method[J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1983, 19: 194
- [28] 王茁. ATP 荧光微生物检测法在食品卫生监控领域中的应用与展望[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(3): 266-267
- Wang Z. Use of ATP fluorescence bioassay in surveillance of food safety[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2004, 16(3): 266-267 (in Chinese)
- [29] Garcia-Iriepea C, Navizet I. Effect of protein conformation and amp protonation state on fireflies' bioluminescent emission[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1565
- [30] 李旋. MTT 比色法及 ATP 生物发光法在鸡蛋蛋壳表面细菌总数检测中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016
- Li X. Application of MTT assay and ATP bioluminescence assay for detecting the total bacteria on eggshell surface[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [31] 李利霞. ATP 生物发光法检测食品细菌总数试剂盒的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2011
- Li LX. Development of ATP bioluminescent method and its kit for the detection of bacterial count in food[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2011 (in Chinese)
- [32] 唐倩倩, 王剑平, 叶尊忠, 盖玲, 应义斌. 免疫磁分离技术在 *E. coli* O157:H7 检测中的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(10): 2614-2618
- Tang QQ, Wang JP, Ye ZZ, Gai L, Ying YB. Application of immunomagnetic separation to *E. coli* O157:H7 detection[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, 29(10): 2614-2618 (in Chinese)
- [33] 李利霞, 常超, 伍金娥. ATP 生物荧光法及其应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(9): 394-397
- Li LX, Chang C, Wu JE. Research progress in the ATP bioluminescence assay and its applications[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(9): 394-397 (in Chinese)
- [34] 王佳欣, 崔璐璐, 谢冰. 生物发光法测定天然水体细菌数量中游离 ATP 的去除[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(6): 1091-1095
- Wang JX, Cui LL, Xie B. ATP bioluminescence for determining total bacteria in natural water to remove free ATP[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(6): 1091-1095 (in Chinese)
- [35] Selan L, Berlutti F, Passariello C, Thaller MC, Renzini G. Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30(7): 1739-1742
- [36] Thore A, Anséhn S, Lundin A, Bergman S. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1975, 1(1): 1-8
- [37] Hallander HO, Kallner A, Lundin A, Österberg E. Evaluation of rapid methods for the detection of bacteriuria (screening) in primary health care[J]. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica Section B: Microbiology*, 1986, 94(1/6): 39-49
- [38] Pavankumar AR, Zelenin S, Lundin A, Schulte T, Rajarathinam K, Rebellato P, Ardabili S, Salas J, Achour A, Russom A. Bioanalytical advantages of a novel recombinant apyrase enzyme in ATP-based bioluminescence methods[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1025: 118-123
- [39] 常超, 王凌, 伍金娥. 基于 ATP 再生体系快速检测乳品中微生物[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 320-324
- Chang C, Wang L, Wu JE. Development of a bioluminescence method combined with ATP amplification for detection of bacteria in dairy products[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 320-324 (in Chinese)
- [40] Lee HJ, Ho MR, Bhuwan M, Hsu CY, Huang MS, Peng HL, Chang HY. Enhancing ATP-based bacteria and biofilm detection by enzymatic pyrophosphate regeneration[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 399(2): 168-173
- [41] Lee HJ, Ho MR, Tseng CS, Hsu CY, Huang MS, Peng HL, Chang HY. Exponential ATP amplification through simultaneous regeneration from AMP and pyrophosphate for luminescence detection of bacteria[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 418(1): 19-23
- [42] Satoh T, Kato J, Takiguchi N, Ohtake H, Kuroda A. ATP amplification for ultrasensitive bioluminescence assay: detection of a single bacterial cell[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(6): 1216-1220
- [43] Sakakibara T, Murakami S, Imai K. Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly

- bioluminescence without cultivation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 312(1): 48-56
- [44] 高岩. 城市污水脱氮除磷系统 DHA 与 ATP 监测及其应用实验研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2009
- Gao Y. Monitoring and application of DHA and ATP in municipal wastewater biological phosphorus and nitrogen removal system[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2009 (in Chinese)
- [45] Ishida A, Yoshikawa T, Nakazawa T, Kamidate T. Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 305(2): 236-241
- [46] Narsaiah K, Jha SN, Jaiswal P, Singh AK, Gupta M, Bhardwaj R. Estimation of total bacteria on mango surface by using ATP bioluminescence[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 146: 159-163
- [47] Bulleid NC. An Improved Method for the extraction of adenosine triphosphate from marine sediment and seawater[J]. *Limnology and Oceanography*, 1978, 23(1): 174-178
- [48] Nakata N, Ishida A, Tani H, Kamidate T. Cationic liposomes enhanced firefly bioluminescent assay of bacterial ATP in the presence of an ATP extractant[J]. *Analytical Sciences*, 2003, 19(8): 1183-1185
- [49] Law KA, Derrick JP, Higson SPJ. Initial investigations into the ultrasonic lysis of microbial cells for the release of adenosine triphosphate[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 317(2): 266-267
- [50] Karl DM, Haugsness JA, Campbell L, Holm-Hansen O. Adenine nucleotide extraction from multicellular organisms and beach sand: ATP recovery, energy charge ratios and determination of carbon/ATP ratios[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1978, 34(2): 163-181
- [51] Redmile-Gordon M, White RP, Brookes PC. Evaluation of substitutes for paraquat in soil microbial ATP determinations using the trichloroacetic acid based reagent of Jenkinson and Oades (1979)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(5): 1098-1100
- [52] 黄彬, 余元善, 唐道邦, 徐玉娟, 刘忠义, 吴继军. CTAB 提取 ATP 的生物荧光法快速检测细菌总数准确性研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(2): 269-273
- Huang B, Yu YS, Tang DB, Xu YJ, Liu ZY, Wu JJ. The accuracy of rapid detection of bacterial count by bioluminescence assay with CTAB-extracted ATP[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(2): 269-273 (in Chinese)
- [53] 王凌, 伍金娥, 常超, 马治敏, 张超. ATP 生物发光法检测布拉氏酵母菌总数的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(7): 330-332, 369
- Wang L, Wu JE, Chang C, Ma ZM, Zhang C. Study on ATP bioluminescent method for the detection of total count of *Saccharomyces boulardii*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(7): 330-332, 369 (in Chinese)
- [54] Hoffner S, Jimenez-Misas C, Lundin A. Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing[J]. *Luminescence*, 1999, 14(5): 255-261
- [55] 丛苑, 卢彦廷, 杜奕君, 梁志宏, 李平兰. ATP 发光法快速检测玉米中的霉菌[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(8): 233-239
- Cong Y, Lu YT, Du YJ, Liang ZH, Li PL. Application of ATP bioluminescence technology for rapid detection of moulds in maize[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(8): 233-239 (in Chinese)
- [56] Tedsana W, Tuntulani T, Ngeontae W. A highly selective turn-on ATP fluorescence sensor based on unmodified cysteamine capped CdS quantum dots[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 783: 65-73
- [57] Ziyaina M, Rasco B, Sablani SS. Rapid methods of microbial detection in dairy products[J]. *Food Control*, 2020, 110: 107008
- [58] Hattori N, Sakakibara T, Kajiyama N, Igarashi T, Maeda M, Murakami S. Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 319(2): 287-295
- [59] 何艳. ATP 生物发光法中 ATP 提取剂的研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2007
- He Y. Study on ATP extractor in ATP-bioluminescence[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2007 (in Chinese)
- [60] 王志惠, 谭玉静, 杨雪霞, 赵曙辉. 纯棉织物上黑曲霉胞内 ATP 提取方法探索[J]. *东华大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(3): 324-328
- Wang ZH, Tan YJ, Yang XX, Zhao SH. Extraction methods of intracellular ATP in *Aspergillus niger* on cotton fabric[J]. *Journal of Donghua University: Natural Science*, 2015, 41(3): 324-328 (in Chinese)
- [61] Gilles R, Pequeux A, Saive JJ, Spronck AC,

- Thome-Lentz G. Effect of various ions on ATP determinations using the "luciferine-luciferase" system[J]. Archives Internationales De Physiologie et De Biochimie, 1976, 84(4): 807-817
- [62] Tanaka T, Hosaka K, Hoshimaru M, Numa S. Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme-A synthetase from rat liver[J]. European Journal of Biochemistry, 1979, 98(1): 165-172
- [63] Rodionova NS, Petushkov VN. Effect of different salts and detergents on luciferin-luciferase luminescence of the enchytraeid *Fridericia heliota*[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, 2006, 83(2): 123-128
- [64] Fujii H, Noda K, Asami Y, Kuroda A, Sakata M, Tokida A. Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 366(2): 131-136
- [65] 房佩佩. 定点突变提高萤火虫荧光素酶催化活力的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018
- Fang PP. Increase in enzymatic activity of firefly luciferase by site-directed mutagenesis[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese)
- [66] Sun XH, Tang X, Hu R, Luo M, Hill P, Fang BS, Xu CA. Biosynthetic bifunctional enzyme complex with high-efficiency luciferin-recycling to enhance the bioluminescence imaging[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 705-714
- [67] Dale R, Ohmuro-Matsuyama Y, Ueda H, Kato N. Non-steady state analysis of enzyme kinetics in real time elucidates substrate association and dissociation rates: demonstration with analysis of firefly luciferase mutants[J]. Biochemistry, 2019, 58(23): 2695-2702
- [68] Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Davis AL, Behney CE, Murtiashaw MH. A *Photinus pyralis* and *Luciola italica* chimeric firefly luciferase produces enhanced bioluminescence[J]. Biochemistry, 2014, 53(40): 6287-6289
- [69] 康洋. 意大利萤火虫荧光素酶的原核表达、纯化及酶稳定性研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2014
- Kang Y. Prokaryotic expression, purification of recombinant luciferase from the Italian firefly *Luciola italica* and study on its stability factors[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2014 (in Chinese)
- [70] 刘艳杰. 重组萤火虫荧光素酶及其稳定性研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2010
- Liu YJ. The reaserch of recombinant luciferase and its stability[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2010 (in Chinese)
- [71] 罗展浩. 北美萤火虫荧光素酶在毕赤酵母中的表达、纯化及其特性研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2018
- Luo ZH. Studies on expression, purification of recombinant *Photinus pyralis* luciferase in *Pichia pastoris* and its characteristics[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [72] Omidbakhsh N, Ahmadpour F, Kenny N. How reliable are ATP bioluminescence meters in assessing decontamination of environmental surfaces in healthcare settings?[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99951
- [73] Shimoda T, Yano R, Nakamura S, Yoshida M, Matsuo J, Yoshimura S, Yamaguchi H. ATP bioluminescence values are significantly different depending upon material surface properties of the sampling location in hospitals[J]. BMC research notes, 2015, 8(1): 1-8
- [74] Xu HQ, Liang JS, Wang YM, Wang B, Zhang TB, Liu XL, Gong L. Evaluation of different detector types in measurement of ATP bioluminescence compared to colony counting method for measuring bacterial burden of hospital surfaces[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0221665
- [75] 冯敏, 高岳, 吕海燕, 杨书华, 万定珍, 王泽港, 罗时石, 马飞, 葛才林. ATP 发光技术测定辐照前脱水蔬菜和调味品的含菌量[J]. 核农学报, 2005, 19(4): 282-285
- Feng M, Gao Y, Lü HY, Yang SH, Wan DZ, Wang ZG, Luo SS, Ma F, Ge CL. The rapid bioluminescence assay method for content of bacteria in dehydrated vegetable and condiment before radiation[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2005, 19(4): 282-285 (in Chinese)
- [76] Shim K. Estimating postmortem interval by bioluminescent determination of ATP content in the muscle of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(4): 703-709
- [77] Cunha AF, Lage AD, Pereira e Araújo MM, Abreu CF, Tassinari AR, Ferraz MA, Davenport K, Cerqueira MMOP. ATP-Bioluminescence as a method to evaluated microbiological quality of UHT milk[J]. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2014, 66(6): 1909-1916
- [78] Takahashi T, Nakakita Y, Nakamura T. Rapid single



- cell detection of lactic acid bacteria in the beer using bioluminescence method[J]. *Biocontrol Science*, 2019, 24(1): 29-37
- [79] Yang YY, English DJ. Use of L-Glutamic acid in a new enrichment broth (R-TATP Broth) for detecting the presence or absence of molds in raw ingredients/personal care product formulations by using an ATP bioluminescence assay[J]. *Journal of Cosmetic Science*, 2018, 69(1): 35-46
- [80] 杨绍丽, 吴文莉, 王静, 徐晶. ATP 荧光检测技术对纤维支气管镜清洗消毒效果评价的研究[J]. *当代医学*, 2018, 24(19): 55-58
- Yang SL, Wu WL, Wang J, Xu J. Study on the evaluation of the efficacy of ATP fluorescence detection for the cleaning and disinfection of bronchoscopy[J]. *Contemporary Medicine*, 2018, 24(19): 55-58 (in Chinese)
- [81] Ling S, Hui L. Evaluation of the complexity of indoor air in hospital wards based on PM2.5, real-time PCR, adenosine triphosphate bioluminescence assay, microbial culture and mass spectrometry[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 1-10
- [82] Mitchell BG, McGhie A, Whiteley G, Farrington A, Hall L, Halton K, White NM. Evaluating bio-burden of frequently touched surfaces using adenosine triphosphate bioluminescence (ATP): results from the researching effective approaches to cleaning in hospitals (REACH) trial[J]. *Infection, Disease & Health*, 2020, 25(3): 168-174
- [83] Chen ZH, Liu YX, Zhao MM, Zu SL, Li Y, Shi BK, Wang SY, Zhang XL. Urinary ATP may be a biomarker for bladder outlet obstruction and its severity in patients with benign prostatic hyperplasia[J]. *Translational Andrology and Urology*, 2020, 9(2): 284-294
- [84] Sudano Roccaro A, Asero A. An original use of a bioluminescence assay to test the *in vitro* efficacy of polihexanide in the eradication of *Acanthamoeba* cysts[J]. *Cornea*, 2020, 39(7): 892-897
- [85] Nasheed Hamad Almohammed Z, Moghani-Ghoroghi F, Ragerdi-Kashani I, Fathi R, Tahaei LS, Naji M, Pasbakhsh P. The effect of melatonin on mitochondrial function and autophagy in *in vitro* matured oocytes of aged mice[J]. *Cell Journal*, 2020, 22(1): 9-16
- [86] Fitts LN, Yegge J, Goris A, Vinson S, Dubberke E. How clean is clean enough? An observational pilot study to assess central sterilization processing efficacy with adenosine triphosphate levels[J]. *American journal of infection control*, 2020, 48(4): 420-422
- [87] Cho YS, Kim HR, Ko HS, Jeong SB, Chan Kim B, Jung JH. Continuous surveillance of bioaerosols on-site using an automated bioaerosol-monitoring system[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(2): 395-403
- [88] Wang LL, Li YQ, Guo R, Li SS, Chang AQ, Zhu ZX, Tu PF. Optimized bioluminescence analysis of adenosine triphosphate (ATP) released by platelets and its application in the high throughput screening of platelet inhibitors[J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223096
- [89] Bäckman G, Gytel U. Activated sludge optimization using ATP in pulp and paper industry[J]. *Water Science and Technology*, 2015, 71(8): 1173-1179
- [90] Nguyen LH, Chong NM. Development of an ATP measurement method suitable for xenobiotic treatment activated sludge biomass[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2015, 1000: 69-76
- [91] Sibag M, Kim SH, Kim C, Kim HJ, Cho J. Interference sources in ATP bioluminescence assay of silica nanoparticle toxicity to activated sludge[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 113: 65-71
- [92] 李兴. 印染废水生物处理系统活性污泥性质的检测方法比较研究[D]. 西安: 西安工程大学硕士学位论文, 2011
- Li X. Comparative study on detection methods of activated sludge on printing dyeing wastewater biological treatment system[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an Polytechnic University, 2011 (in Chinese)
- [93] Franciszek P, Alina P, Boguslaw W, Tomasz S. Using the ATP test in wastewater treatment in the Silesia province[J]. *Environment Protection Engineering*, 2016, 42(1): 17-32
- [94] Pelentir GF, Bevilacqua VR, Viviani VR. A highly efficient, thermostable and cadmium selective firefly luciferase suitable for ratiometric metal and pH biosensing and for sensitive ATP assays[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2019, 18(8): 2061-2070
- [95] Matsui A, Niimi H, Uchiho Y, Kawabe S, Noda H, Kitajima I. A rapid ATP bioluminescence-based test for detecting levofloxacin resistance starting from positive blood culture bottles[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 13565
- [96] Unković N, Ljaljević Grbić M, Stupar M, Vukojević J, Subakov-Simić G, Jelikić A, Stanojević D. ATP bioluminescence method: tool for rapid screening of

- organic and microbial contaminants on deteriorated mural paintings[J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(7): 1061-1069
- [97] Cai YY, Seah CL, Leck H, Lim TP, Teo JQ, Lee W, Tan TT, Koh TH, Ee PLR, Kwa AL. Rapid antibiotic combination testing for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria within six hours using ATP bioluminescence[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(9): 183-188
- [98] 龚大江, 刘家豪, 李春斌, 彭年才, 李明, 张镇西. 手持式 ATP 荧光检测仪的研制[C]. 中国生物医学工程进展: 2007 中国生物医学工程联合学术年会论文集(上册), 2007: 360-363
- Gong DJ, Liu JJ, Li CB, Peng NC, Li M, Zhang ZX. Development of a handheld ATP fluorescence detector[C]. *Advances in Chinese Biomedical Engineering: Proceedings of the 2007 China Biomedical Engineering Joint Academic Conference*, 2007: 360-363 (in Chinese)
- [99] 周爱玉, 罗金平, 岳伟伟, 何保山, 杨庆德, 蔡新霞. 手持式 ATP 生物荧光检测仪研制[J]. *传感技术学报*, 2008, 21(4): 543-546
- Zhou AY, Luo JP, Yue WW, He BS, Yang QD, Cai XX. Development of handheld ATP detecting system based on bioluminescence[J]. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, 2008, 21(4): 543-546 (in Chinese)
- [100] 董曼曼, 卫星华, 孙晓, 王涛, 贺立, 张亚锋. 手持式 ATP 荧光检测仪性能评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(11): 2627-2630
- Dong MM, Wei XH, Sun X, Wang T, He L, Zhang YF. Performance evaluation of handheld ATP fluorescence detector[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018, 9(11): 2627-2630 (in Chinese)
- [101] 谭周亮, 陈杨武, 周后珍, 罗珊, 李欣. 一种 ATP 在线检测方法及设备: CN113588612A[P]. 2021-11-02
- Tan ZL, Chen YW, Zhou HZ, Luo S, Li X. ATP online detection method and device: CN113588612A[P]. 2021-11-02 (in Chinese)