

EZ-ATP® White Paper

EZ-ATP® 식수, 냉각수, 폐수의 세균오염 여부를 빠르게 확인하기 위해 반딧불 루시퍼린/루시퍼레이즈 반응을 이용한 빠른 온라인 ATP (Adenosine Triphosphate, 아데노신 삼인산) 시험법 (ASTM D401-81 시험법에 준함)

개정판 1.1, 2017 1 페이지

조기 경보

급수원의 미생물학적 오염을 조기에 탐지하여 특정 검출방법을 통한 오염원 확인을 위한 추가적인 조사를 가능하게 함으로써 시정조치를 적시에 취할 수 있도록 한다

소개

식용수의 세균학적 품질 및 안전성은 인체건강위험을 확인하기 위해 수인성 병원균을 탐지하여 평가된다.



그림 : 세균오염

배양에 근거한 실험실 방법

현 미생물학적 표준은 수년 동안 사용되어 온 수중 총 미생물군의 양을 측정하는 시간이 많이 소요되는 실험실 방법에 근거한다. 사람이 직접 채취한 샘플은 일반적으로 취급 상의 실수 또는 오염의 발생이 쉬운 여러 단계의 절차[Dip Slide의 미생물 일반 세균 집계(HPC, Heterotrophic Plate Counting)]에 따라 실험실에서 처리되며 시간 소모가 크다.

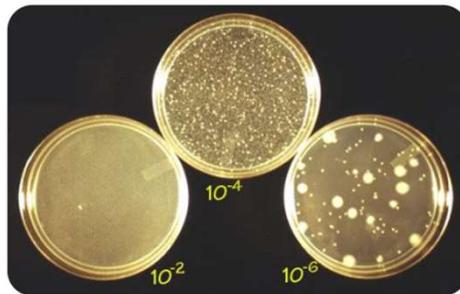


그림 : 미생물 일반 세균 집계(HPC)를 사용한 배양에 근거한 실험실 방법

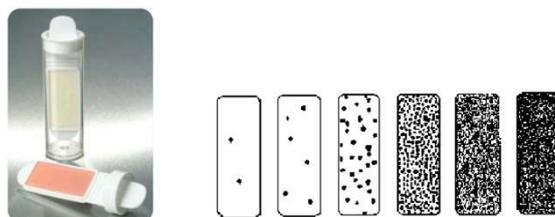


그림 : Dip slide를 사용한 배양에 근거한 실험실 방법

샘플링에 소요되는 시간 + 배양에 소요되는 시간 + 작업에 소요되는 시간
= 결과 확인까지 느린 응답 시간!!

배양에 근거한 방법은 제한적이거나 다양한 요인에 의해 영향을 받는다:

- 샘플링 빈도(샘플링 후 다음 샘플링 시간까지 발생할 수 있는 오염을 발견할 수 없다.)
- 종 선택적인 배양 배지의 사용(비용 상승)
- 박테리아 종에 따른 인위적인 배양 가능 여부(전체 박테리아 종 중에서 0.1 - 1.0 %만 배양 가능)
결과가 분석되기 전에 오염 가능성이 있는 식용수는 고객이 이미 마신다!

EZ-ATP® 소개

AppliTek은 현 실험실 분석 방법의 대안으로 반딧불 루시페린/루시페레이즈 반응을 이용한 **EZ-ATP®**의 신속한 온라인 ATP (Adenosine TriPhosphate, 아데노신 삼인산) 측정을 통해 세균오염 징후를 포착할 수 있음을 소개한다(ASTM D401-81 표준 시험법에 준함).

ATP (아데노신 삼인산, Adenosine Triphosphate)는 무엇인가?:

모든 생명체에 통용되는 에너지 중앙 통화이다.

ATP(아데노신 삼인산)은 간단한 박테리아에서 인간까지 모든 생명체들이 주 에너지 통화로 사용한다. ATP는 박테리아 세포 내에서 생존, 물질대사 및 증식을 위해 필요한 화학적 에너지를 운반한다.

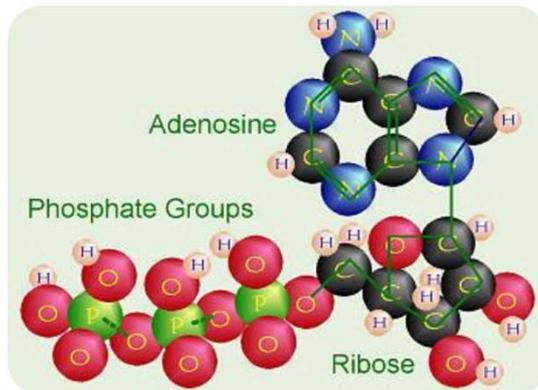


그림 : ATP= 아데노신 삼인산, Adenosine Triphosphate

루시페린/루시페레이즈 반응을 통한 ATP (아데노신 삼인산, Adenosine Triphosphate)의 측정(ASTM D401-81 표준 시험법에 준함):

EZ-ATP® 온라인 신속 ATP 분석기는 루시페린/루시페레이즈 반응을 통해 생성된 발광 단위(light unit)를 측정하여 샘플 내의 ATP 농도를 정량화한다. 광출력이 높을수록 ATP 함량이 높으며 샘플의 미생물 부하 또한 높다



물 샘플의 ATP 함량은 반응의 광출력을 통해 측정된다.

높은 광출력= 높은 ATP 함량= 높은 미생물 부하.

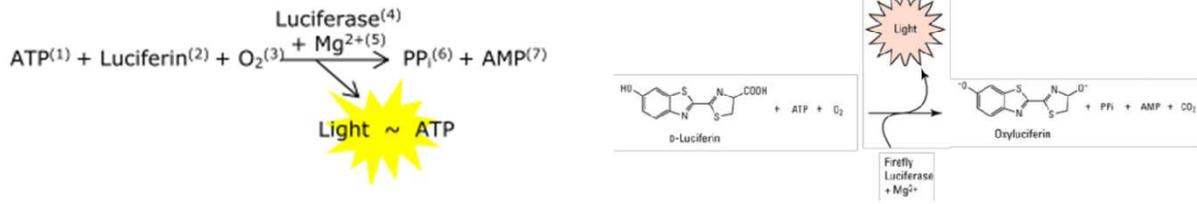


그림 : 반딧불 루시퍼린-루시퍼레이즈 반응

ATP ⁽¹⁾	Adenosine Triphosphate, 아데노신 삼인산= 관심 변수
Luciferin ⁽²⁾	기질(반딧불 시약)
O ₂ ⁽³⁾	산소
Luciferase ⁽⁴⁾	(촉매) 반딧불 효소
Mg ²⁺⁽⁵⁾	(시약) 마그네슘
PP _i ⁽⁶⁾	무기성 인산염
AMP ⁽⁷⁾	Adenosine Monophosphate, 아데노신 일인산

표 : 루시퍼린-루시퍼레이즈 반응, 범례

루시퍼린-루시퍼레이즈 반응은 온라인으로 자동화 된 분석기 메인 프레임에서 시행된다. 샘플 채취, 분석, 및 보고 과정의 자동화 덕분에 0.05 – 200 pg/mL ATP의 범위 내의 수역(water body)에 함유된 미생물 하중에 대한 빠른 피드백을 받을 수 있다.

세포 내/외의 ATP

세포 내의 ATP: 박테리아 또는 살아있는 세포 안에 함유된 ATP.

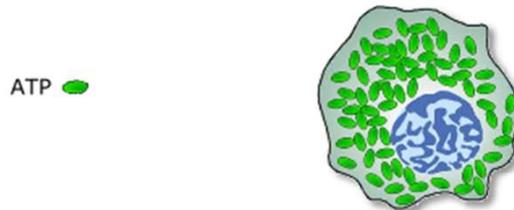


그림 6: 세포 내 ATP를 함유하는 건강한 세포

세포 외 또는 자유 ATP: 박테리아 또는 살아있는 세포 밖에 함유된 ATP. 이 ATP는 수중에 자유롭게 위치 하며 손상된(죽거나 스트레스를 받고 있는 상태) 세포에서 나온다.

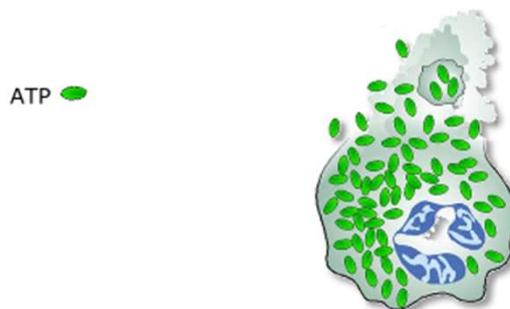


그림 6: 세포 외 ATP를 함유하는 죽거나 스트레스를 받고 있는 세포

자유 및 총 ATP

ATP 측정은 자유 ATP 측정 및 총 ATP 측정의 두 부분으로 구성된다. 물 샘플 안에는 손상된 세포에서 나온 ATP가 자유롭게 위치할 수 있다. 이 ATP는 세포 외 ATP 또는 자유 ATP로 불린다. 또 다른 가능성은 박테리아 또는 다른 세포 안에 존재하는 ATP이다. 생물학적 부하에 대한 명확한 파악을 위해서는 이 두 종류의 ATP를 구별하는 것이 중요하다.

세포 내 ATP가 차지하는 부분은 살아있는 박테리아 생물량과 연관관계에 있으며, 자유 ATP가 차지하는 부분은 이전에 있었던 세포 성장을 보여준다. 총 ATP의 양은 자유 ATP 및 세포 내 ATP의 합계이다.

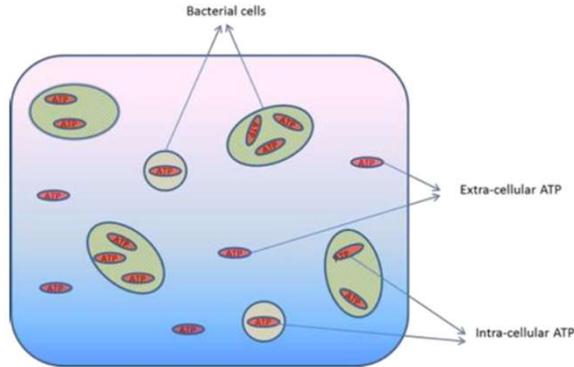


그림 : 자유 및 총 ATP

미생물학적 오염의 온라인 측정을 위한 EZ-ATP®의 측정 원리

(반딧불 루시페레이즈 분석- ASTM D4012-81 표준시험법:



그림 : EZ-ATP® 분석기

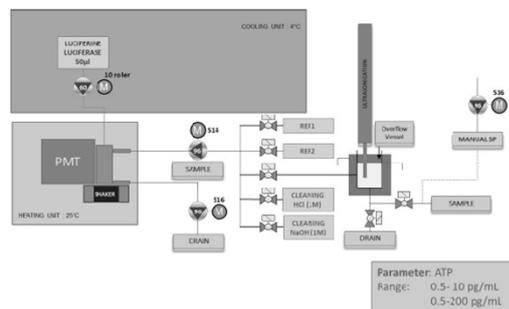


그림 : EZ-ATP® 분석기의 구조도

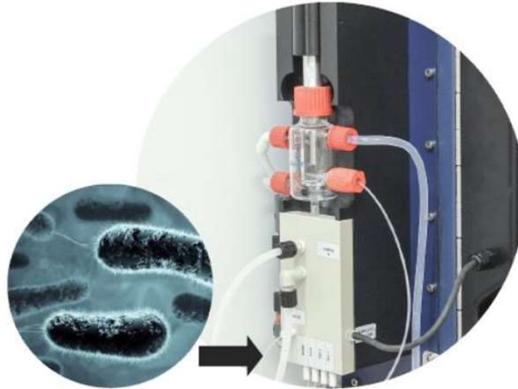


그림 : EZ-ATP® 분석기의 구성

EZ-ATP® 분석기의 샘플 처리 장치는 샘플링 챔버에 초음파 탐침이 구비되어 있어, 세포벽을 파괴하여 살아 있는 미생물 안의 세포 내 ATP를 방출시킨다.

EZ-ATP®의 분석 사이클

분석 사이클은 초음파를 이용한 세포 용해(세포 분해)를 포함 그리고 포함하지 않은 측정을 수반하기 때문에 살아 있는 세포로부터 나온 ATP가 차지하는 양을 구별하고 측정할 수 있도록 한다.

1 단계- 세포 외 또는 자유 ATP:

- ☞ 빠른 루프 및 분석 용기의 수세
- ☞ 샘플링 및 레벨링
- ☞ 루시퍼린/루시퍼레이즈의 첨가
- ☞ 교반
- ☞ PMT (광전증폭관, Photo Multiplier Tube) 측정
- ☞ 결과값 계산

2 단계- 세포 내 ATP:

- ☞ 빠른 루프 및 분석 용기의 수세
- ☞ 샘플의 초음파 처리
- ☞ 분석 용기의 수세
- ☞ 샘플링 및 레벨링
- ☞ 루시퍼린/루시퍼레이즈의 첨가
- ☞ 교반
- ☞ PMT (광전증폭관, Photo Multiplier Tube) 측정
- ☞ 결과값 계산

3 단계- 세정 사이클:

- ☞ 염산(HCl), 수산화나트륨(NaOH) 및 정수를 이용한 내부 배관 및 분석 용기의 대규모 3 단계 세척 공정
- ☞ 자유로운 프로그래밍 가능

EZ-ATP®의 사양:

시험방법: 루시페레이즈 효소에 의해 촉진된 루시퍼린(기질)의 화학 발광 반응을 이용한 배치 별 ATP 측정은 ASTM D4012-81 표준 시험법을 따른다.

센서: 광자 증폭관(PMT, Photo Multiplier Tube)

측정 범위: 0.5 - 200 pg/mL ATP 및 0.05 - 10 pg/mL ATP

측정 한계: 0.05 pg/mL ATP

정밀도: 표준 시험 용액에 대해서는 전체 범위 내에서 3 % 미만

사이클 시간: 1 사이클 당 15 분

스트림 선택: 1 스트림 (최대 8 개의 스트림까지 가능)

EZ-ATP®의 온도 제어:

1. 시약 냉각기:

루시퍼린/루시페레이즈 반응에 필요한 검출 시약은 온라인 가동 중의 안정성(최대 1 년까지)을 높이기 위해 내부적으로 4 °C - 8 °C로 조정된 온도 상에서 보관된다.

2. 분석 용기 가열:

화학 발광 반응을 위해 이상적인 온도는 25 °C - 30 °C로 분석용기 및 PMT를 지지하는 알루미늄 블록을 가열하는 것을 통해 도달시킨다.

EZ-ATP®의 고유한 기능:

EZ-ATP® 분석기는

- 최대 8 개의 스트림을 순차적으로 분석하여 생산 또는 처리 공정 상의 다른 단계에 대한 감시를 할 수 있다.
 - 유연하게 설계된 소프트웨어 인터페이스 덕분에 분석 구간 및 스트림 선택의 간편한 변경이 가능하다.
 - 시약 보관 및 반응 온도를 위한 온도 조절 장치가 내장되어 있다.
 - 분석 프로그램 실행 중에 외부 선택 밸브를 통제할 수 있다.
 - 샘플 스트림 상태에 따라 가변적인 세포 용해 처리가 가능하다.
 - 직접 주입 또는 대기 중의 오버플로우 용기를 통해 샘플링이 가능하다.
 - Grab 샘플에 대한 분석 옵션이 있다.
 - 구간 설정이 유연하게 프로그래밍 가능한 자동화된 3 단계의 세척 공정이 있다.
 - 간편한 미리 만들어진 교체 가능한 시약 키트가 있다.
 - 원격으로 시작할 수 있다.
 - 분석기 상태에 대한 간편한 관찰을 위해 활성화된 출력이 시각화되어 있다.
 - 사용자 친화적인 146 mm (5.75 inch) 컬러 터치 스크린 산업용 컴퓨터로 구성된 독특한 제어 장치가 있다.
- ↳ 결과는 메모리 스틱에 기록할 수 있으며 엑셀과 같은 스프레드시트 프로그램에서 사용할 수 있다.
- **EZ-ATP®** 분석기의 터치 스크린 제어 권한은 다른 PC에서 VNC™ 이더넷 소프트웨어를 사용하여 근거리 통신망(Local Area Network, LAN)을 통해 원격으로 넘겨 받을 수 있다.

➤ Ethernet 10 M (RJ45) NE 2000 호환 가능, 콤팩트 플래쉬 슬롯, IP65 평면 스크린 → 직경 146 mm (5.75 인치) 컬러 TFT 터치 스크린

➤ 메모리 스틱 접속을 위한 1 x USB 포트 (결과 & 경보 데이터 송출, 샘플 스트림, 날짜 & 시간을 포함하는 1,000 개의 결과)

EZ-ATP®의 현장 샘플 결과

식용수 제조 시설:

식용수 제조 시설의 부양 설비 통과 이후 물 샘플에 대한 온라인 ATP 분석을 매 시간 수행한다.

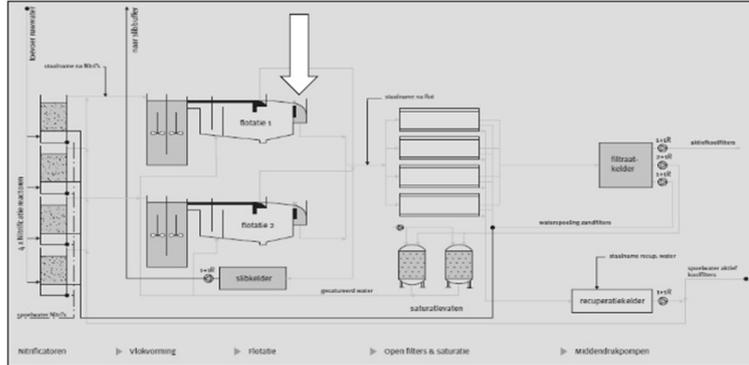


그림 : 샘플링 포인트에 대한 도식 개요

샘플이 분석되는 기간 동안 물 샘플 내에 함유된 자유 ATP 및 총 ATP의 증대한 증가를 발견할 수 있었다. 문제가 된 회사의 문의를 통해, 증가한 ATP 수준이 물 저장소 중 하나에서 감염이 발생한 것과 관련될 수 있음을 보여준다. 부양 설비 통과 이후의 물 샘플에 대한 ATP 수준을 혼탁도 측정결과와 비교했다. 비교 결과 총 ATP 양은 혼탁도 값을 따른다.

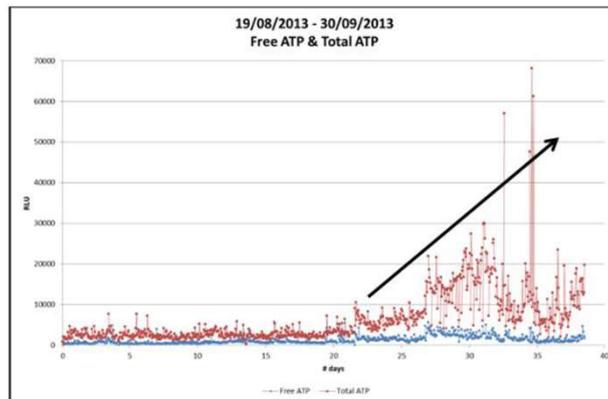


그림 : 식용수 제조 시설의 부양 설비 배출구에서의 온라인 EZ-ATP® 결과

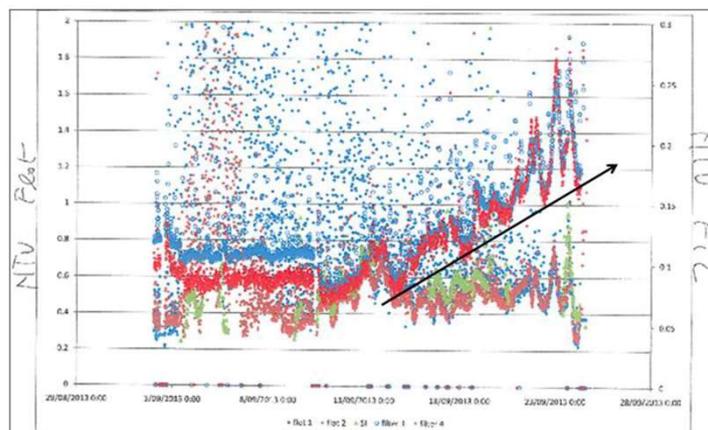


그림 : 식용수 제조 시설의 부양 설비 배출구에서의 온라인 EZ-ATP® 결과 및 혼탁도의 비교

ATP 표준 용액을 사용한 직선성 시험:

다른 농도의 ATP 표준 용액 몇 개를 준비하여 EZ-ATP®로 분석했다. 그리하여 얻어낸 결과는 기대했던 이론적인 농도와 밀접한 상관관계를 보였다.

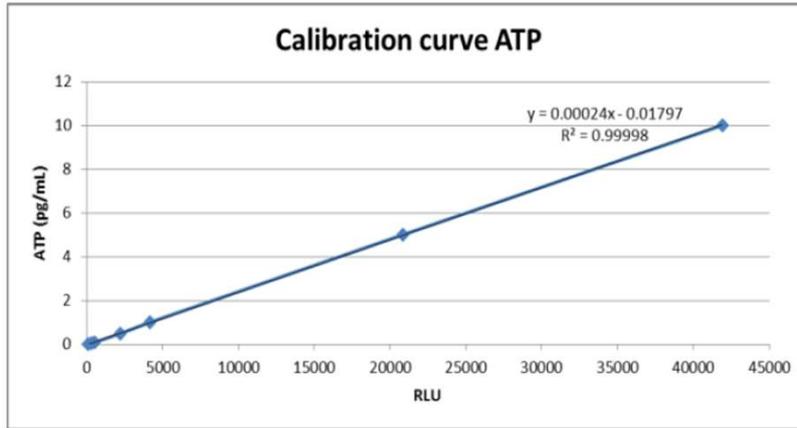


그림 : EZ-ATP®의 캘리브레이션 데이터

표준 용액 (in tris buffer)	pg/mL ATP	RLU	표준 용액 (in tris buffer)	pg/mL ATP	RLU
10 pg/mL ATP	10.15	42355	0.5 pg/mL ATP	0.50	2178
10 pg/mL ATP	9.93	41462	0.1 pg/mL ATP	0.12	570
5 pg/mL ATP	4.86	20318	0.1 pg/mL ATP	0.10	479
5 pg/mL ATP	5.11	21365	0.05 pg/mL ATP	0.06	313
1 pg/mL ATP	1.02	4328	0.05 pg/mL ATP	0.05	272
1 pg/mL ATP	0.96	4056	nanopure water	0.00	90
0.5 pg/mL ATP	0.53	2286	nanopure water	0.00	80

표 : EZ-ATP®의 캘리브레이션 데이터

ATP 검사 통과율의 비교:

식용수 제조 공정은 4 단계로 이루어져 있으며 ATP 측정은 각 단계별 물 샘플에 대해 진행된다. 샘플들은 EZ-ATP® 분석기 및 3M™ ATP 분석을 통해 두 방법 모두 별도로 캘리브레이션 한 후 분석했다. 두 방법 모두 다른 기술에 근거하지만 결과는 근접하게 일치한다.

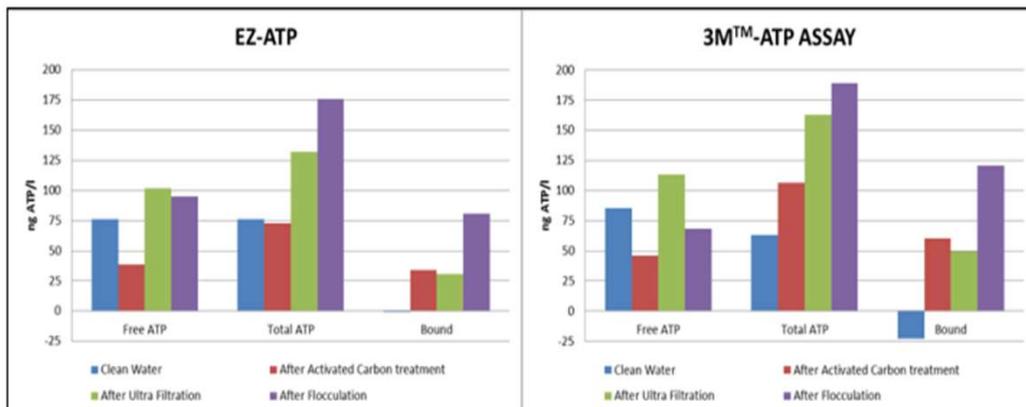


그림 : 물 샘플의 온라인 EZ-ATP® 결과 및 ATP 분석 틀 결과의 비교

EZ-ATP®의 수돗물 모니터링:

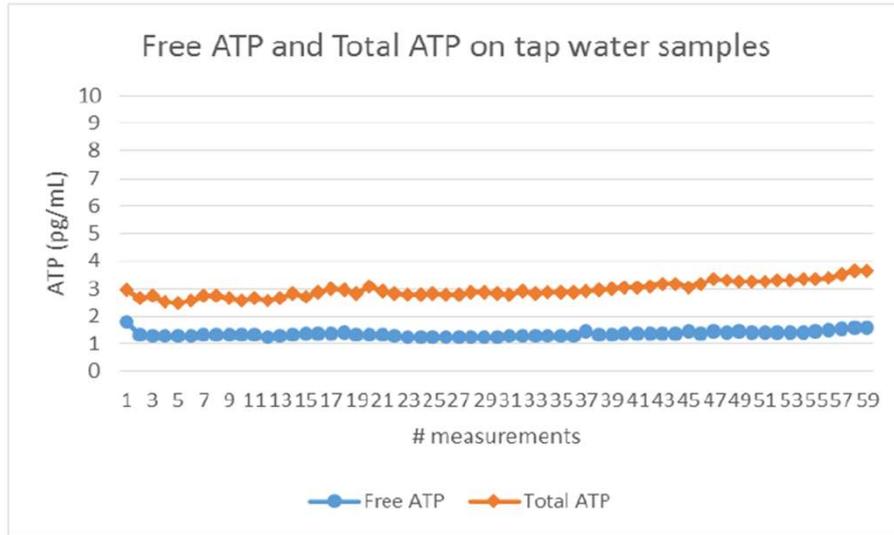


그림 : 수돗물 샘플의 온라인 EZ-ATP® 결과

수돗물의 자유 ATP 및 총 ATP 수준을 확인하기 위해 분석을 했다. ATP 수준은 식용수의 예상 범위 안에 들며 소비에 적합한 양질의 물임을 보여주었다.

목표 산업 분야:

- 식용수 제조 공정
- 식용수 분배 시설
- 담수화 공정
- 역삼투압 탈염화 시설
- 식음료 제조(HACCP) 산업
- 냉각탑 시설
- 환경 감시 시설
- 폐수 방류 시설
- 제약 분야
- 석유 및 가스 관련 산업

사용 목적

- 수질 개선
- 처리 수율 손실 방지
- 수질의 미생물 및 화학적 열화를 유발하는 생물오염 방지
- 오염방지 공정의 제어를 통한 운영비용 절감
- 담수화용 Membrane의 생물 오염
- 열 교환기 표면의 생물막 형성 방지
- 미생물에 의한 부식 방지

온라인 EZ-ATP® 모니터링의 장점:

EZ-ATP® vs. ATP 검사 툴

EZ-ATP®	ATP 검사 툴
온라인 측정	수동 측정
높은 분석 빈도	?
자동화 된 분석 사이클	수동 분석 사이클
온라인 분석	수동 샘플링 + 툴
온라인 동향 파악	?

표 : ATP 검사 툴 대비 EZ-ATP®의 장점

EZ-ATP® vs. HPC (종속 영양 세균 수 집계, Heterotrophic Plate Counting):

온라인 EZ-ATP®	(HPC) Heterotrophic Plate Counting
몇 분 이내에 결과 확인	결과 확인에 며칠 소요
높은 샘플링 빈도: 세균 증식의 모든 피크 검출	주기적 샘플링 빈도: 샘플 채취 주기 사이에 발생하는 세균 증식 피크를 알 수 없음
현장에서 온라인 측정	실험실(원격)에서 수동으로 측정
샘플링과 측정 사이의 지연 시간이 없음	거리 및 실험실 사용 여부에 따른 지연이 있음(추가적인 증식이 발생할 수 있음)
모든 박테리아 세포가 신호에 기여함.	모든 박테리아 종 중 단 0.1 - 1 %만 배양 가능(다른 배양액이 필요함)
자동 분석	훈련된 인원이 필요함
총 생물량 평가	수질 지표로서 종속 영양 세균 수 집계
분석기에 시약 보관용 냉각장치가 내장	배양 조건의 조절 및 유지가 필요
EZ-ATP®를 소독 공정의 실시간 모니터링 수단으로 사용 가능	적시의 시정 조치를 위한 실시간 데이터 없음
살생물화/살균 방법의 최적화로 인한 비용 절감	표준 용량/소독 프로토콜 사용
시간 경과에 따른 상세한 데이터베이스	낮은 샘플링 빈도로 인한 제한된 데이터베이스
최적화 된 살균으로 인한 낮은 잔류 화학물질 및 감소된 환경 영향	표준 용량/소독 프로토콜로 인한 잠재적으로 높은 환경 영향
4 - 8 °C의 분석기 내부 시약 보관실에서의 시약 저장 안정성이 최대 1 년.	

2014년 6월 Singapore International Water Week에 게재되었던 EZ-ATP® 포스터

Novel on-line monitoring of bacteriological safety of drinking and cooling water

H. Hoste*, W. Delva*, D. Laurier*

* AppliTek NV/SA, Venecoweg 19, Nazareth 9810, BE
(E-mail: team@applitek.com)

Introduction

Conventional methods to quantify bacterial content (e.g. heterotrophic plate counting) are known to assess only a fraction of the total bacterial population and take days to give results.

The long response time, low sample frequencies, handling errors and contaminations during transport and storage are severe limitations of these methods.

The need for rapid and reliable information of bacterial load of water samples led to the development of a novel on-line analyzer by AppliTek.

The EZ-ATP, compliant with ASTM D4012-81 standard test method is able to perform frequent automatic screenings of a water body, allowing timely corrective actions to ensure the safety of the products.

Methodology

ATP (adenosine triphosphate) content of a water sample is measured by the light output of the firefly luciferase assay. The complete analysis consists of two measurements in order to differentiate between intra- and extracellular ATP.

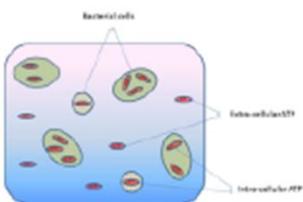


Fig. 1: Intra- and extracellular ATP in a water body

Cell lysis is obtained by ultrasonic treatment of the sample.

Reaction:
 $\text{luciferin} + \text{ATP} \rightarrow \text{luciferyl adenylylate} + \text{P}_i$
 $\text{luciferyl adenylylate} + \text{O}_2 \rightarrow \text{oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{light}$

Total ATP = free ATP + intracellular ATP

Higher light output = higher ATP content = higher bacterial load

AppliTek

Results and Discussion

Contamination of drinking water (unknown ATP-concentration) was simulated with rainwater, since rainwater has a higher biological load. Four samples were analyzed (0%, 10%, 50% and 100% contamination). The amount of produced light (RLU) is proportional with the degree of contamination.

A 10% contamination with rainwater can be detected

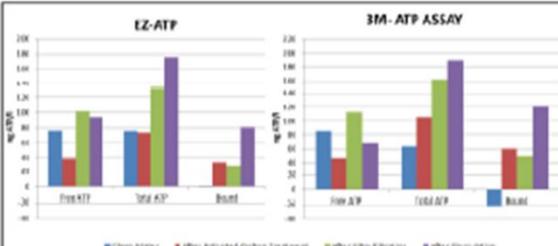


Fig. 3: Comparison of EZ-ATP with 3M® ATP-assay

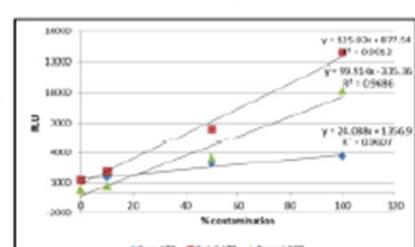


Fig. 2: Contamination of drinking water with rainwater

Samples of four different steps in a drinking water production process are analyzed with the EZ-ATP analyzer and the 3M® ATP-assay after separate calibration of both methods. Despite the differences between the two techniques (e.g. alternative methods of forcing the cell lysis), the results are very similar in outcome and trending.

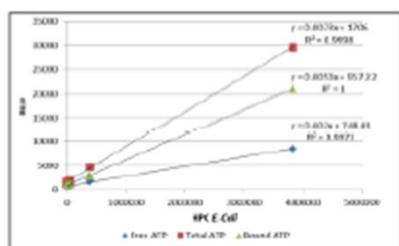


Fig. 4: ATP measurements for different contamination levels

Conclusions

The perceived need for more rapid methods for measuring water quality especially in the area of drinking water safety, has established new interest in the use of ATP bioluminescence. An EZ-ATP on-line analyzer is capable to detect biological contaminations in drinking water continuously within minutes. The results are similar with already commercially available manual ATP-tests. More research will be done for implementation of this technique in different fields.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the HOWEST, University College West Flanders (Kortrijk, BE) for their support during the initial test phase and development of this analyzer.

참고 및 확인자

Hannes Hoste/William Delve/Kristof Lievens/David Laurier/Chris Du Bois, www.applitek.com

Contact



(주)젬마

경기도 군포시 고산로 148번길 17, A동 2205호(당정동, 군포IT밸리), 우편번호: 15850
Tel. 070-7600-8577 | Fax 070-7834-5333

본 문서의 내용은 전적으로 구속력이 없는 외부 의견입니다. 본 내용을 이행함에 따라 발생할 수 있는 모든 사람, 제3자, 상품 및 재산 상의 피해에 대해서는 AppliTek NV 및 그 직원 중 그 누구도 책임을 질 의무가 없습니다. AppliTek NV는 모든 책임을 명시적으로 포기합니다. 본 문서 안에 기재된 모든 정보는 AppliTek NV/SA의 기밀 자산으로 요청에 따라 반환되어야 하며 서면 상의 승인 없이 공개 및 복제가 금지되어 있습니다. ©2015 - AppliTek NV/SA