

ATP BİYOLÜMİNESANS YÖNTEMİ VE GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDEKİ UYGULAMALARI

ATP BIOLUMINESCENCE METHOD AND APPLICATIONS IN FOOD MICROBIOLOGY

Fulya TURANTAŞ

Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu, Bornova-İZMİR

ÖZET: Biyoluminesans yöntemi ile herhangi bir örnekteki mikroorganizma sayısının tahminlenmesi ateş böceklerinde görülen lusiferin-lusiferaz reaksiyonuna bağlı hızlı ve duyarlı bir tekniktir. ATP bioluminesans yönteminde en fazla 1 saat içinde sonuç alınabilmektedir. Ancak bu yöntemde bazen gıda orijinli somatik ATP, mikrobiyal ATP'nin saptanmasında bazı interferanslara neden olmakta ve sağlıklı sonuçlar elde edilememektedir. Bu yöntemle spesifik bir takım mikroorganizmaların ve patojenlerin analizinin de yapılabilmesi için şu anda mevcut çalışmaların dışında değişik çalışmalar yapılmalıdır.

SUMMARY: Bioluminescent measurement of microbial ATP using the firefly luciferin-luciferase system is a rapid and sensitive technique for the estimation of microbial populations which may be completed within 1 hr. This represents considerable time-savings in comparison to conventional microbial enumeration techniques requiring 2-3 days for completion. It is reported that there are some difficulties in applying microbial ATP measurements to foods including interference from ATP of nonmicrobial origin. Various developments are necessary to increase the acceptance of the method, in particular automation and the provision of more detailed information such as analysing of some pathogenic and specific microorganisms.

GİRİŞ

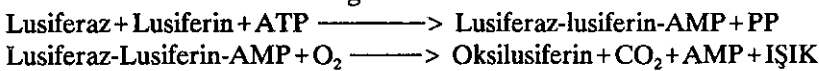
Gıda mikrobiyolojisinde önem taşıyan indikatör, bozulmaya neden olan ve patojen mikroorganizmaların en kısa zamanda, basit ve ucuz yöntemlerle saptanması hem işletmede maliyetin düşürülmesi ve daha fazla üretim anlamına gelmekte hem de kalite kontrole harcanan zaman ve emeği azaltmaktadır. Bu nedenle son yıllarda daha fazla zaman ve işgücü gerektiren maliyeti yüksek klasik yöntemlerin yerine kullanılacak daha ucuz, basit ve hızlı yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla klasik yöntemlerin yerine kullanılacak hızlı yöntemler araştırılırken lipopolisakkarit, heamatin ve adenosin trifosfat (ATP) gibi bazı hücre komponentlerinin saptanması yoluyla mikroorganizma sayısının tahmin edilmesine dayalı bu tür analizlerde de bu maddelerin gıdada bulunma olasılığı problem yaratabilmektedir (STANNARD, 1989).

ATP tüm yaşayan hücrelerde mevcut, hücrenin enerji transfer reaksiyonlarında önemli bir işleve sahip en önemli yapı taşlarından birisidir. Gıdadaki ATP'nin ekstraksiyonla uzaklaştırılması sonrası örnekteki mikrobiyal ATP miktarı ile mikroorganizma sayısı arasında direkt bir ilişki kurulabilmektedir. Bu yöntem mikrobiyal hücrelerde bulunan ATP'nin mikrobiyal olmayan gıda orijinli ATP'den ayrılarak lusiferin-lüsiferaz enzimi ile reaksiyona girmesi sonucu bioluminesans ışık vermesi ve açığa çıkan bu bioluminesansın bir lüminometre (fotometre) ile ölçülmesi esasına dayanır (THERON ve ark., 1986; STANNARD, 1989). Herhangi bir örnekteki mikrobiyal yükün saptanabilmesi için ATP yönteminin önceden plak sayım metodu ile elde edilen sonuçlarla kalibre edilmesi gerekir. Her uygulama için ayrı bir kalibrasyon eğrisi elde edilerek değişik ürünlerdeki mikroorganizma sayısı tahmin edilebilmektedir.

ATP YÖNTEMİNİN PRENSİBİ

Biyoluminesans olayı doğada deniz bakterilerinde, mantarlarda, bazı deniz canlılarında, ateş böceklerinde ve tuzlu su balıklarında yaygın olarak görülmektedir. Ateş böceklerinin meydana getirdiği bu reaksiyon ATP'ye özel bir reaksiyondur ve bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için enzim-substrat sistemine, oksijene ve bazı ko-faktörlere gereksinim vardır (McELROY ve SELIGER, 1962). Örneğin ateş böceklerinde ATP'ye bağımlı bioluminesans olayı aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir (STANDARD, 1989).

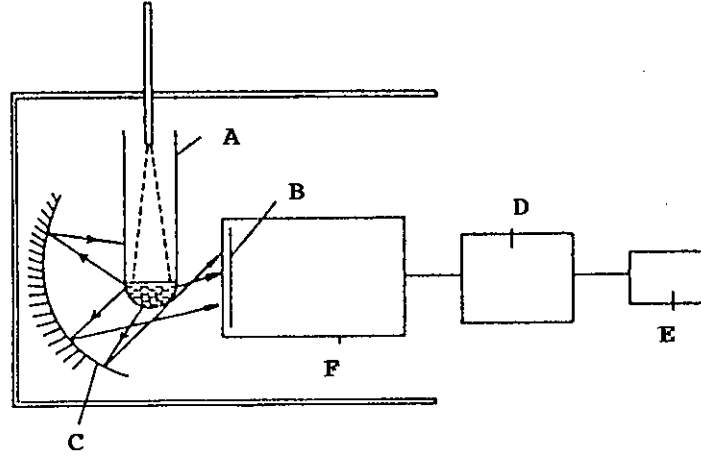
Mg⁺⁺



Birinci reaksiyonda substrat olan lüsiferin normalde ateşböcekerinin kuyruk kısımlarında bulunmaktadır. Bu reaksiyonda açığa çıkan ışık spektrumu içinde 560 nm dalga boyundaki ışık maksimum düzeydedir ve reaksiyon için optimum sıcaklık 15-25°C, optimum pH ise 7,4-8,2 arasındadır. Ortamda çinko, kalsiyum, klor, iyot gibi iyonların bulunması ışığı azaltır. Bu reaksiyon sonucu lüsiferaz enzimi inaktive olur ve tekrar yeni bir reaksiyonu katalizleyebilmesi için koenzim A ve pirofosfat ile rejenere edilmesi gerekir. Sonuç olarak, her lüsiferin-lüsiferaz reaksiyonu sonunda açığa çıkan ışık tek bir fotondur. Bu nedenle de üretilen toplam ışık şiddeti lüsiferin-lüsiferaz tepkimede kısıtlayıcı faktör olmadığı sürece, ortamdaki ATP miktarıyla direkt orantılıdır. Ortamdaki ATP miktarına bağlı olarak açığa çıkan ışık lüminometrede (Şekil 1) ölçülebilir. ATP testiyle mikrobiyal biyomasın ölçülmesi üç ilkeye dayanmaktadır.

- Bütün yaşayan organizmalar ATP içerir.
- Oldukça saf reaktifler ve duyarlı lüminometre kullanmak suretiyle ATP çok düşük konsantrasyonlarda da saptanabilir.
- Bütün mikroorganizmalarda hücre içi ATP konsantrasyonu belirli bir değer aralığında bulunur.

Saf reaktif ve hassas lüminometre kullanmak suretiyle 0,1 pikogram 10^{-12} gram) ATP saptanabilir ki bu miktar yaklaşık 100 bakteri hücresine karşı gelir (LAROCCO ve ark., 1986; STANNARD, 1989).



Şekil 1. Lüminometrenin şematik gösterimi (A: küvet, B: Fotokatot, C: ayna veya yansıtıcı, D: yüksek voltaj ünitesi, E: printer, F: fotomultiplier) (STANNARD, 1989)

LÜMINOMETRE (=FOTOMETRE)

Bu amaçla çeşitli firmalarca değişik lüminometreler ve bu reaksiyonda kullanılacak reaktifler kit halinde üretilmektedir (Hollanda, Finlandiya ve Amerika gibi değişik ülkelerde değişik tip lüminometreler üretilmektedir). Lüminometrelerin elle veya otomatik olarak enjeksiyon yapılanları, bir veya birden fazla (sadece bir firmanın ürettiği lüminometrede 48 adet örnek analiz edilebilmektedir) örneğin analiz edilebildiği tipleri vardır. Bu cihazlar ATP miktarını otomatik kompüter çıktısıyla Relative Light Unit (RLU, relatif ışık ünitesi) veya Colony Forming Unit (CFU, g veya ml'deki mikroorganizma sayısı) olarak verebilmektedir (LAROCCO ve ark., 1986).

Lüminometrelerin merkezinde bir ışık dedektörü mevcuttur, bazı taşınabilir tip küçük lüminometrelerin ise ışık dedektörleri farklı yapıdadır ve bunların hassasiyeti fazla değildir. Bu lüminometrelerle minimum 10^{-10} g veya 10^5 fg (fg = femtogram $1 \text{ fg} = 10^{-15}$ g) ATP saptanabilmektedir. Buna karşın hassasiyeti daha yüksek lüminometrelerle minimum 10^2 - 10^3 fg ATP saptanabilir. Son sistem lüminometrelerde ışığı geçirmez dedektörden yansıyan ışıklar fotomultiplierin fotokatodunda toplanır. İlk üretilen lüminometrelerde tek örnek inokülasyonu söz konusuken daha sonra üretilenlerde daha fazla örnek analize alınabilmektedir. Lüminometrelerin çoğu kompütüre bağlanabilmekte böylece işlem ve dataların toplanabilmesi otomatik olarak yapılabilir (STANNARD, 1989).

SOMATİK (İNTRİNSİK) ATP'NİN MİKROBİYAL ATP'DEN AYRILMASI

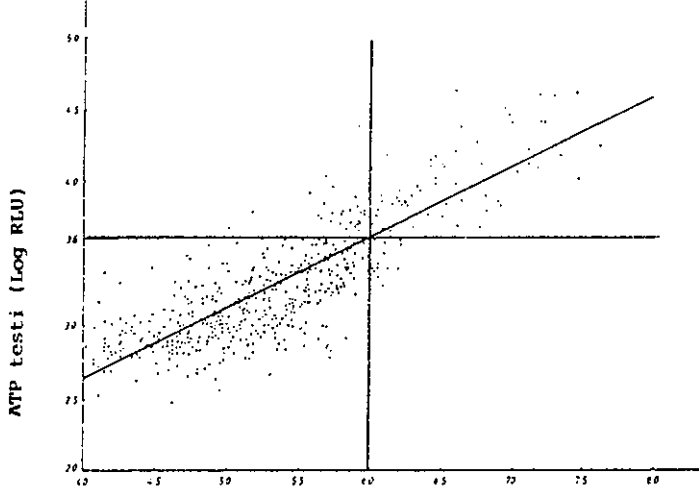
Mikrobiyal ATP'nin saptanabilmesi için gıda orijinli ATP'nin gıdadan elemine edilmesi gerekir. Gıda orijinli (somatik) ATP'nin mikrobiyal ATP'den ayrılmasında iki yaklaşım sözkonusudur. Bunlardan birincisi somatik ATP'nin enzimatik yolla parçalanması daha sonra mikrobiyal ATP'nin saptanması, ikinci yaklaşım ise mikrobiyal hücrelerin somatik ATP'den fiziksel olarak ayrılmasıdır. Gıda orijinli ATP'nin örnekten uzaklaştırılması bazı durumlarda örneğin hazırlanması aşamasında mümkün olmaktadır. Su, gazoz ve fermente içecekler gibi mikrobiyal orijinli olmayan ATP miktarının çok düşük olduğu örneklerde örneğin hazırlanması oldukça kolaydır. Bu durumlarda küçük hacimde örnek alınarak membran filtreden geçirilir ve filtre üzerinde kalan mikroorganizmalar olası inhibitör maddelerin uzaklaştırılması amacıyla yıkanır. Daha sonra filtre üzerindeki ATP uygun bir yöntemle ekstrakte edilerek ATP miktarı saptanır (STANNARD, 1989).

Mikrobiyal ATP'nin saptanabilmesi için somatik ATP'yi parçalayan apiraz gibi bir enzim kullanılabilir. Bu amaçla apiraz enzimi süt, meyve suyu, et gibi gıdalarda denenmiştir. İşletmeye gelen tanker sütlerinin kalitesinin saptanması amacıyla apiraz enziminin konsantrasyonu artırılarak analiz süresi 5 dakikaya kadar indirilmiştir (BOUSSUYT, 1982). Bu çalışmada çiğ sütler için ATP testi ve klasik sayım yöntemi arasında elde edilen korelasyon (kalibrasyon eğrisi) Şekil 2'de görülmektedir. Meyve suları ile yapılan çalışmada ise düşük pH'nın apiraz aktivitesini büyük ölçüde engellediği ve bu etkinin meyve sularının kuvvetli tampon özelliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Buna bağlı olarak meyve sularının pH'sının 3,5'dan 6,5'a yükseltilmesinin apirazın fonksiyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (STANNARD, 1989). Ette apiraz enziminin kullanıldığı çalışmalarda etteki mikroorganizma sayısının gramda 10^5 CFU'den daha fazla olduğu denemelerde sonuçta elde edilen ATP değerleri ile örnekteki mikroorganizma sayısı arasında oldukça yüksek düzeyde bir korelasyon ($r = 0,97-0,99$) olduğu saptanmıştır. Buna karşın sütte ATP testinin mililitredeki mikroorganizma sayısının 10^5 CFU'den daha yüksek olduğu durumlarda sağlıklı sonuçlar verdiği mikroorganizma sayısının daha düşük olduğu örneklerden somatik ATP'nin enzimle uzaklaştırılma işleminin tam olarak başarısız olduğu bildirilmektedir (BOUSSUYT, 1981).

Mikrobiyal ATP'nin somatik ATP'den ayrılması amacıyla uygulanabilecek diğer bir yaklaşım ise mikrobiyal olmayan ATP'nin ekstraksiyon öncesi gıdadan ayrılmasıdır. Bu amaçla berrak, partiküler yapıya sahip olmayan, örneğin CO₂'li içecekler gibi gıdalar kolaylıkla filtre edilerek mikroorganizmalar filtre yüzeyinde tutulur. Bu tip gıdalarda ATP biyoluminesans yöntemi ile saptanan mikrobiyal ATP düzeyi ile mikroorganizma sayısı arasında oldukça yüksek düzeyde bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Partiküler yapıya sahip pek çok gıdada mikrobiyal olmayan ATP'nin mikroorganizmalardan dolayısıyla mikrobiyal ATP'den ayrılabilmesi amacıyla çift filtre sistemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde birinci filtrasyon işlemi gıda partikülleri tutulmakta, ikinci filtrasyon işlemiyle ise mikroorganizmalar yüzeyde tutulmaktadır. Ancak bu yöntemde de bazen ikinci filtre yüzeyinde mikrobiyal olmayan somatik ATP tutulabilmektedir. Bu dezavantajın ortadan kaldırılabilmesi için ikinci filtre somatik ATP'yi hidroliz eden bir enzimle yıkanıldıktan sonra mikrobiyal ATP filtre yüzeyinden ekstrakte edilebilmektedir (STANNARD, 1989).

Çiğ et gibi gıdalarda ayırma işlemi için katyon değiştirici reçineler kullanılmaktadır. İlk aşamada büyük et partiküllerini ayırmak için bir santrifüjleme işlemi uygulanır. Bir grup araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada koloidal et partiküllerinin 5,8 pH'da katyon değiştirici reçine ile uzaklaştırıldığı, et proteinlerinin bu reçine üzerinde adsorbe olduğu ancak soğukta depolanan çiğ etlerde mikrobiyal bozulmalardan birincil derecede sorumlu gram negatif bakterilerin ise katyon değiştirici reçinelerde adsorbe edilemediği saptanmıştır. Filtre edilen süspansiyonda mevcut mikroorganizmalar filtre yüzeyinde toplanırken eriyebilir özelliğe sahip ATP filtreden geçer. Bu şekilde mikrobiyal ATP daha sonradan filtreden ekstrakte edilebilmektedir. Bu şekilde uygulanan ayırma işleminin oldukça etkili olduğu, homojenataki ATP'nin başlangıçtaki ATP miktarının % 97-99'unu oluşturduğu saptanmıştır. Bu ayırma yöntemi uygulanarak ATP biyoluminesans tekniğinin kullanıldığı çiğ domuz, sığır ve koyun etlerinde mikrobiyal ATP düzeyi ve aynı örneklerle uygulanan plak sayım yöntemleri arasında 0,94 oranında oldukça yüksek düzeyde bir korelasyon saptanmıştır (STANNARD, 1989).

ATP BİYOLÜMİNESANS YÖNTEMİNİN GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDEKİ UYGULAMALARI



Şekil 2. Çiğ sütte ATP testinden elde edilen değerlerle (log RLU) toplam mikroorganizma sayısı arasındaki ilişki (BOSSUYT, 1982)

(1985) karbondioksitli içeceklerde maya sayımında ATP yönteminin klasik sayım yöntemi ile korelasyonunun 0,90'ın üzerinde olduğunu bildirmiştir. BOSSUYT (1981) çiğ sütlerin en kısa zamanda mikrobiyal kalitesinin saptanması amacıyla yaptığı çalışmada ATP biyoluminesans yönteminin bu amaçla süt fabrikalarında kullanılabileceğini plak sayım yöntemi ile ATP yöntemi arasında korelasyonun süütün mililitresindeki mikroorganizma sayısının 10^5 'in üzerinde olan örneklerde 0,93 olduğunu ortaya koymuştur. Yine BOSSUYT (1982) çiğ sütle yaptığı çalışmada ATP biyoluminesans yöntemini hem plak sayım metodu ile hem de impedans metodu ile karşılaştırmış, yöntemler arasında 0,83 düzeyinde bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle araştırmacı ATP yönteminin süt fabrikalarında çiğ sütlerin en kısa zamanda mikrobiyal kalitesinin saptanması amacıyla kullanımını önermiştir. Bu araştırmacının hazırladığı kalibrasyon eğrisi daha sonra yapılan pek çok çalışmada çiğ süte toplam canlı sayısının ATP biyoluminesans yöntemi ile saptanması amacıyla kullanılmıştır. Yine BOSSUYT (1978) ve HAN ve ark. (1985) çiğ sütte toplam canlı sayımında ATP yöntemi ile klasik sayım yönteminden elde edilen sonuçlar arasında sırasıyla 0,91 ve 0,74 düzeyinde korelasyon saptamışlardır.

Son yıllarda somatik ATP miktarı yoğun olan et gibi gıdalarda da ATP yönteminin toplam canlı sayımında kullanımını sağlamak amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Araştırmacılar bu tip gıdalarda somatik ATP'nin uzaklaştırılması amacıyla hem fiziksel hem de enzimatik yöntemi beraber kullanmışlar ve bu yöntemle ette bulunan somatik ATP'nin yaklaşık % 99,99'unun uzaklaştırıldığını bildirmişlerdir (LAROCCO ve ark., 1986; STANNARD, 1989). Yine Lumac firmasının ürettiği ticari kitler kullanılarak et örnekleri ile yapılan bir çalışmada toplam canlı sayımında ATP yönteminin klasik sayım yöntemi ile çiğ et ve kıyma örneklerinde 0,91, vakum paketlenmiş et ürünlerinde ise 0,94 düzeyinde korelasyon verdiği saptanmıştır (LABOTS ve STEKELENBURG, 1985).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarla ATP yöntemiyle sadece çiğ süt gibi gıdalarda toplam mikroorganizma sayısı, meyve suyu ve steril süt gibi gıdalarda ise mikrobiyal gelişme saptanabilmektedir. Ancak son yıllarda ATP yöntemi spesifik mikroorganizma cinslerinin ve patojenlerin bu yöntemle saptanması yönüne doğru kanalize edilmektedir. Belirli cins bakterilerin ve dolayısıyla patojen mikroorganizmaların ATP yöntemi ile saptanmasında bu mikroorganizmalara bazı besiyerlerinin zenginleştirme amacıyla kullanımı ve farklı gözenek çapına filtrelerle iki aşamalı filtrasyon işlemi uygulanarak farklı büyüklüklere

ATP biyoluminesans yöntemi ile bugüne kadar değişik gıdalarda yapılan çalışmalar elde edilen biyoluminesans değerleri ile örnekteki mikroorganizma sayıları arasında yüksek düzeyde bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin GRAUMLICH (1985) portakal suyu ile yaptığı çalışmada aktif mikrobiyal popülasyon içeren sulandırılmış örneklerde biyoluminesans değerleri ile plak sayım yöntemleri arasındaki korelasyonun ($r = 0,92$) yüksek olduğunu, ancak konsantrattan sulandırılan örneklerde ise bu korelasyonun 0,58'e düştüğünü saptamıştır. Yine LAROCCO ve ark. (1985) ve LITTEL ve LAROCCO

sahip mikroorganizmaların birbirinden ayrılması gibi değişik yaklaşımlar mevcuttur (LAROCCO ve ark., 1986; STANNARD, 1989).

Mikroorganizma cinslerinin birbirinden ayrılması amacıyla henüz araştırma düzeyindeki diğer bir yaklaşımda belirli cinslerin hücre duvarını etkileyen ancak diğer mikroorganizmaların hücre duvarını etkilemeyen bazı ekstraktların kullanılmasıdır. Örneğin bu amaçla *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarını parçalayan bir enzimler çalışılmaktadır. değişik cins mikroorganizmaların birbirinden ayrılması amacıyla santrifüj ve kromatografik yöntemlerin de kullanılması düşünülmektedir. Ancak bu yöntemlerin kullanımı ile diğer cinslerden ayrılmış bir mikroorganizmanın ATP yöntemi ile saptanmasının ya da sayımının klasik sayım yöntemlerinden daha az iş gücü, zaman ve maliyet gerektiren, daha pratik bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir (LAROCCO ve ark., 1986; STANNARD, 1989).

Yapılan en son çalışmalarda ATP biyoluminesans yönteminin gıda işletmelerinde özellikle kritik kontrol noktalarındaki mikrobiyolojik analizlerde (HACCP: Hazard Analysis Critical Control Points) ve işletmelerde hijyen ve sanitasyonla ilgili uygulamaların etkinliğinin belirlenmesinde hızlı, kolay ve duyarlı bir yöntem olması nedeniyle yaygın şekilde kullanıldığı bildirilmektedir (BAUTISTA ve ark., 1993; GRIFFITHS, 1993; LEIFE, 1993; POULIS ve ark., 1993; BAUTISTA ve ark., 1994; BELL ve ark., 1994; HUIS ve ark., 1994; SEEGER ve GRIFFITHS, 1994).

KAYNAKLAR

- BAUTISTA, D.A., McINTYRE, L., LALEYE, L. ve GRIFFITHS, M.W. 1993. Rapid determination of milk quality and factory hygiene using bioluminescence. *Milk-Industry*, UK. 95(4).
- BAUTISTA, D.A., VAILLANCOURT, J.P., CLARKE, R.A., RENWICK, S., GRIFFITHS, M.W. 1994. Adenosine triphosphate bioluminescence as a method to determine microbial levels in scald and chill at a poultry abattoir. *Poultry-Science*. 73(11) 1673-1678.
- BELL, C., STALLARD, P.A., BROWN, S.E., STANDLEY, J.T.E. 1994. ATP Bioluminescence techniques for assessing the hygienic condition of milk transport tankers. *Inter. Dairy Journal* 4(7) 629-640.
- BOUSSUYT, R. 1978. Usefulness of an ATP assay technique in evaluating the somatic cell content of milk. *Milchwissenschaft*. 33(1) 11-13.
- BOSSUYT, R. 1981. Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *milchwissenschaft*, 36(5) 257-260.
- BOSSUYT, R. 1982. A 5-minute ATP platform test for judging the bacteriological quality of raw milk. *Neth. Milk Dairy J.* 36, 355-364.
- GRAUMLICH, T.R. 1985. Estimation of Microbial populations in Orange Juice by Bioluminescence. *J. of Food Sci.* 50, 116-117.
- GRIFFITHS, M.W. 1993. Application of bioluminescence in the dairy industry. *J. of dairy Sci.* 76(10) 3118-3125.
- HAN, S.H., KIM, C.H., KIM, J.B., SHIN, H.K., LEE, S.B. 1985. Determination of bacterial number in a raw milk by ATP assay monitored by luciferin-luciferase bioluminescence reaction. *Korean Journal of Animal Science*. 27(12) 782-784.
- HUIS, VELD, J.H.J., STEKELENBURG, F.K. ve DEBEVERE, J. 1994. HACCP and modern microbiology detection and identification technics. *Voedingsmiddelentechnologie*. 27(7) 11-15 s.
- LABOTS, H., STEKELENBURG, F.K. 1985. ATP Bioluminescence: a rapid method for the estimation of microbial contamination in meat and meat products. *Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers*. 31, 5.10, 401-405.
- LaROCCO, K.A., GALLIGAN, P., LITTEL, K.J., SPURGASH, A. 1985. A rapid bioluminescent ATP method for determining yeast contamination a carbonated beverage. *Food Technology* 39(7) 49-52.
- LaROCCO, K.A., LITTEL, K.J. ve PIERSON, M.D. 1986. The Bioluminescent ATP Assay for Determining the Microbial Quality of Foods "in Foodborne Microorganisms and Their Toxins: Developing Methodology, Eds M.D. Pierson; N. J. Stern "Marcel Dekker, Inc. New York.
- LEIFE, A. 1993. ATP bioluminescence as an indicator of wine quality. *Livsmedelsteknis*. 35(6/7) 14-15.
- LITTEL, K.J. ve LaROCCO, K.A. 1985. Bioluminescent standart curves for quantitative determination of yeast contaminants in carbonated bevarages. *J. of Food Protec.* 48(12) 1022-1024.
- McELROY, W.D. ve SELIGER, H.H. 1962. Biological Luminescence. *Scientific American* Dec. 2-14.
- POULIS, J.A., PLJPER, M., MOSSEL, D.A.A., DEKKERS, P.P.A. 1993. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue contamination test and a conventional microbiological method. *Int. J. of Food Microbiol.* 20(2) 109-116.
- SEEGER, K. ve GRIFFITHS, M.W. 1994. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene monitoring health care institution. *J. of Food Protection*. 57(6) 509-512.
- STANNARD, C.J. 1989. ATP estimation. "in Rapid Methods in Food Microbiologg. Eds. M.R. Adams ve C.F.A. Hope "Elsevier. Amsterdam.
- THERON, D.P., PRIOR, B.A. ve LATEGAN, P.M. 1986. Determination of bacterial ATP levels in raw milk: selectivity of non-bacterial ATP hydrolysis. *J. of Food Protec.* 49(1) 4-7.