Comparaison de trois méthodes de dosage de l'ATP par bioluminescence pour l'estimation de la qualité bactériologique du lait cru

D Rongvaux-Gaïda, C Piton

INRA, station de recherches en technologie et analyses laitières, BP 89, 39800 Poligny, France

(Reçu le 1^{er} février 1991; accepté le 22 avril 1991)

Résumé — Deux-cent-quatorze échantillons de lait cru ont été prélevés dans les citernes de ramassage de quatre grandes entreprises laitières, dès leur arrivée au quai. Après agitation, les échantillons ont été soumis au dénombrement de la flore totale à l'aide de l'ensemencement Spiral et au dosage de l'ATP bactérien par trois méthodes reposant sur la bioluminescence. Cent-vingt échantillons ont été analysés en double par les techniques rapides de dosage de l'ATP : l'ATP platform (ATP-p) et le Δ ATP. Les quatre-vingt-quatorze autres échantillons ont été soumis à ATP-F, qui comprend une étape de filtration. Les paramètres statistiques de répétabilité et de justesse ont été établis pour chacune des trois méthodes. L'écart type relatif géométrique de répétabilité (en % UFC/ml) est égal à 14% pour l'ATP-p, 51% pour le Δ ATP et 43% pour l'ATP-F. En ce qui concerne les techniques ATP-p et Δ ATP, les écarts types résiduels de la régression numération sur teneur en ATP sont respectivement de 0,637 et 0,623 log UFC/ml (différence non significative au seuil de 5%). Pour l'ATP-F, l'écart type résiduel est significativement plus faible ($s_{y,x} = 0,301$ log UFC/ml) avec une pente de droite de calibrage significativement supérieure à 1,000 au seuil de 5%.

ATP / bioluminescence / lait cru / flore totale / justesse / répétabilité

Summary — Comparison of three methods of measurement of ATP content by bioluminescence to assess the bacteriological quality of raw milk. Two hundred and fourteen milk-tanker road samples were collected from 4 dairy plants to evaluate the analytical performance of different methods of measurement of ATP content used to assess the bacteriological quality of milk. All samples were analysed in duplicate by Spiral standard reference method. One hundred and twenty samples were analysed in duplicate by rapid methods to determine ATP level by bioluminescence: the ATP platform test (ATP-p) and Δ ATP test (Δ ATP). Ninety-four other samples were tested by a new method including a filtration step: the ATP-F test (ATP-F). The geometric relative standard deviation of repeatability (in % CFU/ml) was 14% for the ATP-p test, 51% for the Δ ATP test and 43% for the ATP-F test. The residual standard deviations from the regression of the reference method on the ATP level were 0.637 and 0.623 log CFU/ml respectively for the ATP-p and the Δ ATP (not significantly different at the 5% level). The ATP-F test residual standard deviation was much lower ($s_{y,x} = 0.301$ log CFU/ml), and the slope of the regression line was significantly above 1.000 at the 5% level.

ATP / bioluminescence / raw milk / total flora / accuracy / repeatability

INTRODUCTION

L'ATP (Adénosine-5'-triphosphate) étant un intermédiaire énergétique universel au sein des cellules vivantes, son dosage par bioluminescence peut présenter un grand intérêt pour l'estimation de la biomasse dans de nombreux domaines. Son application en industrie laitière a déjà fait l'objet de différentes études, soit comme méthode rapide d'estimation du nombre de cellules somatiques (Bossuyt, 1978), soit pour estimer le niveau de contamination bactérienne du lait cru (Britz *et al*, 1980; Bossuyt, 1981 et 1982; Theron *et al*, 1986a et b; Botha *et al*, 1985; Langeveld et Van der Waals, 1988; Van Crombrugge *et al*, 1989). Ce test a également été utilisé pour la détection de la postcontamination de lait ou de crème pasteurisés (Waes et Bossuyt, 1981; Griffiths *et al*, 1984), ou comme test de stérilité de lait UHT (Waes *et al*, 1984).

L'estimation du niveau de pollution microbienne du lait cru par dosage d'ATP rencontre quelques difficultés principalement liées à la présence de cellules somatiques et de micelles de caséines qui contiennent aussi de l'ATP (Bossuyt, 1978; Richardson *et al*, 1980; Theron *et al*, 1986a). L'ATP d'origine somatique représente 96% de l'ATP total du lait cru, et son élimination est très difficile, voire même impossible sans altérer l'ATP d'origine bactérienne (Theron *et al*, 1986a).

En 1981, Bossuyt a proposé une méthode de dosage de l'ATP microbien du lait cru qui comprend deux étapes. La première étape consiste à éliminer l'ATP d'origine non bactérienne, à l'aide d'un détergent (NRS) qui agit spécifiquement au niveau des parois des cellules somatiques. Celles-ci deviennent perméables aux petites molécules, rendant ainsi possible la libération de l'ATP, qui est alors

détruit dans le milieu réactionnel par une ATPase appelée somase. Au cours de la deuxième étape, l'ATP bactérien est libéré par un extractant universel (NRB), puis dosé par réaction avec le complexe luciférine-luciférase. L'extraction et la digestion de l'ATP d'origine somatique doivent être conduites de façon à ne pas altérer l'ATP bactérien. À cette fin, Bossuyt (1981) utilise un traitement de 15 min à 25 °C, en présence de 1 U/ml de somase. Dans ces conditions, Bossuyt a fixé arbitrairement le seuil de détermination de cette technique à 10^5 UFC/ml; il a par ailleurs obtenu un coefficient de corrélation entre le taux d'ATP et le nombre d'UFC/ml de 0,93, mais sans préciser l'ensemble des caractéristiques de justesse et de répétabilité de la méthode.

En 1982, Bossuyt a tenté d'augmenter la rapidité de ce dosage en proposant un test en 5 min destiné au tri des laits à leur arrivée au quai : l'ATP platform (ou ATP-p). Cependant, cette technique possède un seuil de détermination très élevé; de ce fait, elle peut uniquement différencier les échantillons contenant un nombre de bactéries supérieur ou inférieur à 1 million de cellules/ml.

Le manque de précision de ces différents tests est essentiellement lié à l'importance du bruit de fond constitué par les cellules somatiques (rapport signal/bruit faible), lequel joue un rôle relativement important pour les faibles niveaux de pollution microbienne du lait. Pour pallier ce problème, Langeveld et Van der Waals (1988) ont proposé d'effectuer, parallèlement au dosage rapide de l'ATP (ATP-p), un dosage de l'ATP résiduel d'origine somatique, après le traitement NRS/apyrase (ATP-w). Par différence entre l'ATP-p et l'ATP-w, ces auteurs obtiennent la quantité d'ATP d'origine strictement bactérienne ou Δ ATP. Ils ont fixé arbitrairement le seuil de

détermination du Δ ATP à 10^5 UFC/ml, mais la relation entre les 2 techniques ne devient étroite qu'au-delà de 5×10^5 UFC/ml.

Enfin, la justesse du dosage de l'ATP bactérien du lait cru a connu une amélioration très significative grâce à la filtration (ATP-F) qui permet d'une part, une séparation physique des différentes sources d'ATP et d'autre part, une concentration de l'ATP d'origine bactérienne (Van Crombrugge *et al*, 1989). En conditions réelles, c'est-à-dire sur des échantillons prélevés à la ferme ou en fromagerie, ces auteurs ont fixé le seuil de détermination de cette technique à 2×10^4 UFC/ml, avec un écart type résiduel de 0,27 log UFC/ml.

Dans le cadre de cette étude, nous avons voulu établir et comparer tous les paramètres de justesse et de répétabilité de ces 3 techniques de dosage de l'ATP (ATP-p, Δ ATP et ATP-F) pour l'estimation de la qualité bactériologique du lait cru à son arrivée au quai, dans les conditions des usines françaises.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des échantillons

Deux-cent-quatorze échantillons de lait cru ont été prélevés dans des citernes de ramassage, dès leur arrivée au quai, dans 4 grandes entreprises laitières. Les échantillons ont été conservés à 0 °C au plus 24 h avant analyse.

Les prélèvements se sont déroulés sur 3 périodes (avril à juin 1989, septembre à octobre 1989 et septembre à novembre 1990). Les 120 échantillons des 2 premières périodes, couvrant une gamme de 10^4 à 10^7 UFC/ml ont été utilisés pour l'étude de l'ATP-p et du Δ ATP; l'étude de l'ATP-F a concerné 94 échantillons couvrant la même gamme, et prélevés au cours de la troisième période.

Numérations bactériennes

Les échantillons ont subi une agitation standard, consistant en 25 mouvements aller-retour, d'une amplitude de 25–30 cm effectués en 7–10 s (Anonyme, 1978).

Les échantillons de lait ont ensuite été soumis au dénombrement de la flore aérobie méso-ophile sur milieu Plate Count Agar (Difco), après 3 j d'incubation à 30 °C.

Lesensemencements étaient réalisés à la surface de la gélose à l'aide de l'appareil Spiral (Gilchrist *et al*, 1973). Nous avons choisi cette méthode, car elle est maintenant reconnue comme technique de référence (Anonyme 1985b et 1987). Lesensemencements ont été effectués en double, afin d'obtenir une meilleure précision des résultats. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par millilitre de lait (UFC/ml).

Description des méthodes ATP-p et Δ ATP

Pour l'ATP-p, nous nous sommes basés sur la technique décrite par Bossuyt (1982) et pour le Δ ATP, sur celle proposée par Langeveld et Van der Waals (1988). Les analyses ont été effectuées avec les réactifs du kit n° 9286-9, commercialisé par Lumac (PO Box 31101, 6370 AC Landgraaf, Pays-Bas), et avec le luminomètre Lumac Biocounter 2010.

La figure 1 présente le protocole utilisé pour l'ATP-p et le Δ ATP. Le Δ ATP test consiste donc en 2 déterminations successives : la première correspondant à l'ATP-p, tandis que la seconde permet le dosage de l'ATP résiduel d'origine somatique (ATP-w). À cette fin, l'extraction de l'ATP bactérien par le réactif L-NRB est remplacée par une simple addition d'eau stérile. Le Δ ATP ou ATP d'origine strictement bactérienne est calculé en soustrayant à la valeur ATP-p, la valeur de l'ATP-w. Comme Bossuyt (1981) avait montré que le temps d'extraction et de digestion de l'ATP d'origine somatique de 15 min était optimal, nous avons allongé de 10 min le temps d'incubation préconisé par Langeveld et Van der Waals (soit 5 min).

Fig 1. Protocole expérimental de l'ATP-p (colonne de gauche) et du Δ ATP (ensemble du schéma).

Schematic representation of the ATP platform test (on the left) and the Δ ATP test (complete scheme).

Les résultats fournis par le luminomètre sont exprimés en unité lumineuse arbitraire (ULA).

Description de l'ATP-F

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un luminomètre Lumac (Biocounter M 2500) et avec les réactifs du kit n° 9390-9 (Lumac, Pays-Bas). Les membranes de filtration utilisées (N66 Posidyne Nylon 66) avaient une porosité de 0,65 µm et un diamètre de 47 mm (Pall, NKZ 47100, commercialisé par Lumac). Le système de filtration inox à 3 postes (Sartorius) était relié à une pompe assurant une dépression de 80 kPa.

Le protocole utilisé est celui décrit par Van Crombrugge *et al* (1989) : un volume de 5 ml de lait conservé à 0 °C dans de la glace fondante est ajouté à 5 ml préchauffés à 37 °C de NRS-FT contenant 10 unités d'apyrase, de façon à assurer l'extraction et la digestion de l'ATP non bactérien (4 min à 37 °C). Pendant cette incubation, la tour de filtration est préchauffée avec de l'eau stérile à 50 °C. Peu de temps avant la filtration, la membrane de filtration est mise en place et préchauffée à l'aide de 9 ml de liquide de Ringer stérile dilué au 1/4, et maintenu à 37 °C. Les 4 min d'incubation écoulées, le mélange lait/NRS/apyrase est filtré, puis la membrane est rincée avec 9 ml de liquide de Ringer dilué au 1/4 (37 °C). La membrane est ensuite placée dans une boîte de Petri de 50 mm de diamètre contenant 1 ml d'extractant bactérien (ou L-NRM). L'extraction de l'ATP présent sur le filtre est effectuée sous une agitation douce pendant 30 s. Ensuite, un volume de 200 µl est prélevé dans la boîte de Petri et placé dans une cuvette de mesure. Cette cuvette est aussitôt mise en place dans le Biocounter, où 100 µl de réactif luciférine-luciférase (ou Lumit-QM) sont injectés. La quantité de lumière émise par le mélange réactionnel est intégrée pendant 10 s.

Calculs statistiques

La répétabilité et la justesse des mesures d'ATP ont été calculées conformément aux recommandations de la norme FIL 128 (Anonyme, 1985a). Les calculs statistiques ont été effectués après transformation logarithmique en base 10 des résultats (UFC/ml et ULA). Cette transformation est destinée à normaliser la distribution.

Tous les modes de calcul statistique ont été largement détaillés dans un précédent article (Piton et Rongvaux-Gaïda, 1990); aussi, nous n'en rappelons que les points les plus importants, pour la compréhension des résultats.

Répétabilité

L'écart type de répétabilité des dosages d'ATP (s_r , en log ULA) a été établi à partir de 2 mesures, effectuées sur chaque échantillon (Anonyme, 1985a). Pour pouvoir comparer la répétabilité

bilité de la méthode à celles des autres techniques, nous l'avons également exprimée en log UFC/ml (s_r^*), par l'intermédiaire de la droite de calibrage.

Enfin, nous avons calculé l'écart type relatif géométrique de répétabilité, ou GRSD, qui exprime la variabilité des résultats au-dessus de la moyenne géométrique, en données non transformées (Piton et Grappin, 1991).

Justesse

La justesse représente l'étroitesse de l'accord entre la vraie valeur de la grandeur à mesurer et le résultat moyen qui serait obtenu en appliquant la technique expérimentale un grand nombre de fois (Anonyme, 1985a).

La justesse des différentes techniques expérimentales a été évaluée en comparant la valeur vraie (Spiral) avec la moyenne de deux déterminations, effectuées pour chaque méthode de dosage de l'ATP.

L'équation de calibrage ($y = bx + a$) a été établie conformément à la norme FIL. Le logarithme décimal du nombre d'UFC/ml est considéré comme variable dépendante, et le logarithme décimal du nombre d'ULA, comme variable indépendante.

La précision d'estimation de la technique expérimentale est donnée par les limites de l'intervalle statistique de dispersion à l'intérieur duquel se situe, avec une probabilité de 95%, la vraie valeur donnée par la méthode de référence. Si y est le nombre d'UFC/ml calculé à partir de la droite de calibrage, ces limites sont, en valeur logarithmique, $\log y \pm 1,96 \times s_{y,x}$, où $s_{y,x}$ est l'écart type résiduel de la droite de régression. En données non transformées, ces limites sont $y/10^{1,96} \times s_{y,x}$ pour la limite inférieure et $y \times 10^{1,96} \times s_{y,x}$ pour la limite supérieure.

RÉSULTATS

Le tableau I présente les écarts types de répétabilité des différentes techniques, exprimés en log UFC/ml, ainsi que les écarts types relatifs géométriques. Les écarts

types obtenus pour le Δ ATP et l'ATP-F ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (test F de comparaison des variances; Dagnélie, 1970). En revanche, il est significativement plus faible pour l'ATP-p.

La figure 2 présente les relations entre la quantité d'ATP déterminée par les techniques ATP-p et Δ ATP, et le niveau de la flore totale du lait cru. On constate que la précision d'estimation n'est pas meilleure après soustraction du bruit de fond d'origine somatique (ATP-w). En effet, la différence entre les écarts types résiduels obtenus pour l'ATP-p et le Δ ATP n'est pas significative au seuil de 5% (test F de comparaison des variances).

La figure 3 présente la relation entre la quantité d'ATP déterminée par l'ATP-F et le niveau de la flore totale du lait cru, sur une population de 94 échantillons. L'équation de calibrage a été calculée après élimination de 2 échantillons qui s'écartaient de plus de 3 écarts types résiduels de cette droite. Cette technique nécessite un calibrage, car la pente et l'ordonnée à l'ori-

Tableau I. Caractéristiques analytiques de répétabilité des trois techniques de dosage de l'ATP bactérien du lait cru. GRSD : écart type relatif géométrique de répétabilité (log UFC/ml).

Repeatability of 3 methods of determination of the bacterial ATP content in raw milk. Geometric relative standard deviation of repeatability (log CFU/ml).

Méthode	s_r^*	GRSD
ATP-p	0,059	14,55
Δ ATP	0,180	51,36
ATP-F	0,157	43,55

S_r^* : écart type de répétabilité (log UFC/ml).

Standard deviation of repeatability (log CFU/ml).

gine de la droite de calibrage sont significativement supérieures à 1,000 et zéro respectivement, au seuil de 5%. En revanche, la précision d'estimation de cette technique ($s_{y,x} = 0,301$) est nettement meilleure que celle obtenue dans le cas des techniques classiques (ATP-p et Δ ATP).

Si y est le nombre d'UFC/ml estimé à partir de la droite de calibrage, les limites de l'intervalle statistique de dispersion de y (à $P = 0,95$) sont, en données non transformées, pour les techniques classiques de dosage de l'ATP : $y/10^{1,221}$, soit $y/16,637$ pour la limite inférieure, et $y \times 10^{1,221}$, soit $y \times 16,637$ pour la limite supé-

rieure. Pour l'ATP-F, les limites de l'intervalle de dispersion sont beaucoup plus étroites, puisqu'elles sont égales à $y/3,89$ et à $y \times 3,89$.

DISCUSSION

En ce qui concerne la répétabilité de la technique ATP-F, il est très difficile d'expliquer la différence très importante entre nos résultats ($s_r = 0,157$ UFC/ml) et ceux de Van Crombrugge *et al* (1989) ($s_r = 0,048$ UFC/ml). Une des raisons provient sans doute des variations que nous avons constatées au niveau de la vitesse de filtration pour un même échantillon. Ces variations entraînent ainsi des temps de contact plus ou moins longs avec le NRS et l'apyrase. Compte tenu des possibilités d'altération de l'ATP d'origine bactérienne, ces décalages de temps peuvent expliquer ce défaut de répétabilité.

Fig 2. Relation entre la teneur en ATP (log ULA) et le niveau de la flore totale du lait cru (log UFC/ml). A: ATP platform (ATP-p); B: Δ ATP (Δ ATP).

Relationship between the ATP content (log ULA) and the level of total flora in raw milk (log CFU/ml). A: ATP platform test (ATP-p); B: Δ ATP test (Δ ATP).

Fig 3. Relation entre la teneur en ATP déterminée par la technique ATP-F (log ULA) et le niveau de la flore totale du lait cru (log UFC/ml). La droite de calibrage a été calculée après élimination de deux échantillons (o) qui s'écartaient de plus de trois écarts types résiduels de cette droite.

Relationship between the results of the ATP-F test (log ULA) and the levels of total flora in raw milk (log CFU/ml). o : 2 samples omitted for calculation of the regression line.

Conformément aux résultats obtenus par Bossuyt (1982), la relation obtenue entre le dosage d'ATP par la technique rapide (*ATP platform test*) et le niveau de pollution microbienne du lait cru ne permet qu'un tri des laits. En effet, sur 500 échantillons de laits prélevés à la ferme ou dans des citernes de ramassage, cette technique a permis de classer correctement 90% des laits en 2 classes comprenant un nombre de bactéries au-dessus ou en dessous de 10^6 UFC/ml (Bossuyt, 1982).

Quant à Langeveld et Van der Waals (1988), ils ont obtenu une relation linéaire entre le taux d'ATP et le nombre d'UFC/ml pour des niveaux variant entre $2 \cdot 10^6$ et 10^8 UFC/ml. Cependant, une partie des échantillons analysés dans cette étude ont été stockés entre 3 et 7 °C, de façon à obtenir des niveaux de contamination très élevés. Cette relation ne présente donc qu'un intérêt limité, car on aboutit ainsi certainement à une homogénéisation des flores à haut niveau de contamination, ce qui n'est pas une situation représentative des échantillons prélevés à l'arrivée des citernes au quai de réception en usine.

En raison de son principe, la technique du Δ ATP aurait dû apporter une plus grande précision pour les faibles niveaux de pollution du lait. Or, contrairement à Langeveld et Van der Waals (1988), nous n'avons pas noté d'amélioration significative de l'écart type résiduel par rapport à la technique de l'ATP-p. Cela peut s'expliquer par un temps d'extraction et de digestion de l'ATP somatique relativement long (15 min), d'où peut-être une certaine altération de l'ATP bactérien. En effet, Bossuyt (1982) a constaté, lors de sa comparaison entre le dosage de l'ATP par une méthode qu'il qualifie de *normal ATP test* (45 min et 0,1 U/ml apyrase) et l'ATP-p (5 min et 0,5 U/ml), que les résultats obtenus par cette dernière technique étaient sous-estimés pour les hauts niveaux de contamination

microbienne, et surestimés pour les faibles niveaux. Il a alors conclu qu'une forte concentration en apyrase altérerait l'ATP bactérien, et qu'un temps de digestion trop court ne permettrait pas d'éliminer totalement l'ATP d'origine somatique. De plus, l'altération de l'ATP bactérien semble dépendre des souches microbiennes présentes dans l'échantillon (Theron *et al*, 1986a, Langeveld et Van der Waals, 1988).

Dans nos conditions expérimentales, la technique du Δ ATP ne présente aucun intérêt, car nous n'avons pas amélioré sa justesse. À l'inverse, sa fidélité s'est dégradée, conformément à ce qu'avaient noté Langeveld et Van der Waals (1988). Ce défaut de répétabilité du Δ ATP s'explique par l'addition des erreurs aléatoires sur les deux déterminations successives : ATP-p et ATP-w.

L'utilisation de la filtration, dans le but de séparer les différentes sources d'ATP du lait cru et de concentrer l'ATP bactérien, entraîne une amélioration très nette de la justesse des techniques de dosage de l'ATP, conformément aux résultats de Van Crombrugge *et al* (1989). Avec un écart type résiduel d'environ 0,30 log UFC/ml, cette technique possède alors une précision d'estimation sensiblement identique à la technique DEFT ($s_{y,x} = 0,25$ log UFC/ml; Dasen *et al*, 1987), ou aux techniques de mesure d'une activité microbienne comme la conductimétrie ($s_{y,x} = 0,39$ log UFC/ml; Piton et Rongvaux-Gaïda, 1990), ou la microrespirométrie ($s_{y,x} = 0,20$ log UFC/ml; Rongvaux-Gaïda *et al*, 1990).

Compte tenu du faible nombre d'échantillons au-dessous de $5 \cdot 10^4$ UFC/ml, notre étude n'a pas permis de fixer précisément le seuil de détermination de cette nouvelle technique, mais celui-ci est probablement assez faible : $2 \cdot 10^4$ UFC/ml d'après Van Crombrugge *et al* (1989).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient A Branger (École Nationale d'Industrie Laitière, 39800 Poligny) pour le prêt du Biocounter 2010. Ils adressent également leurs remerciements à P Philippot (Perstorp Analytical SA, Département Microbiologie Lumac, 1, rue Jean Carasso, BP 13, 95872 Bezons Cedex) pour le prêt du Biocounter M 2500, pour la fourniture des réactifs nécessaires à l'ATP-F, et pour son assistance technique.

Les auteurs tiennent aussi à remercier les entreprises laitières suivantes, pour le prélèvement et l'envoi des échantillons de lait :

— la société Bel : Centre de recherches, 21, avenue de Ronsard, 41100 Vendôme;

— la société Gervais-Danone (BSN), par l'intermédiaire de la société Stenval : 5, route de la Blanche, 59270 Bailleul;

— la société Yoplait : l'usine d'Amiens (Sully, 80000) et l'usine de Ressons/Matz (Elnor, 60490).

Ce travail a reçu le soutien financier de la Direction générale de l'alimentation du ministère de l'Agriculture (Contrat DGAL n°R88/11).

RÉFÉRENCES

- Anonyme (1978) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 14th edn, American Public Health Association, New York
- Anonyme (1985a) Milk. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis. Application to calibration procedure and quality control in dairy Laboratory. Norme provisoire FIL-IDF 128
- Anonyme (1985b) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 15th edn, American Public Health Association, New York
- Anonyme (1987) Microbiologie alimentaire. Ensemencement et dénombrement des micro-organismes à l'aide du système «Spiral». Norme française NF V 08-100 AFNOR, Paris
- Bossuyt R (1978) Usefulness of an ATP assay technique in evaluating the somatic cell content of milk. *Milchwissenschaft* 33, 11-13
- Bossuyt R (1981) Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *Milchwissenschaft* 36, 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
- Botha WC, Lück H, Jooste PJ (1985) The applicability of the adenosine triphosphate method as a rapid bacteriological platform test. *S Afr J Dairy Technol* 17, 59-64
- Britz TJ, Bezuidenhout JJ, Dreyer JM, Steyn PL (1980) Use of adenosine triphosphate as an indicator of the microbial counts in milk. *S Afr J Dairy Technol* 12, 89-91
- Dagnélie P (1970) *Théorie et Méthodes Statistiques. Vol 2. Les Méthodes de l'inférence statistique*. Duculot SA, Gembloux
- Dasen A, Piton C, Grappin R, Guerry P (1987) Évaluation de la technique DEFT associée à un comptage visuel ou à un comptage par analyseur d'images pour la numération de la flore totale du lait cru. *Lait* 67, 77-95
- Gilchrist JE, Campbell JE, Donnelly CB, Peeler JT, Delaney JM (1973) Spiral plate method for bacterial determination. *Appl Microbiol* 25, 244-252
- Griffiths MW, Phillips JD, Muir DD (1984) Methods for rapid detection of post-pasteurization contamination in cream. *J Soc Dairy Technol* 37, 22-26
- Langeveld LPM, Van der Waals CB (1988) The ATP platform test, the Δ ATP test and the direct microscopic count procedure as methods of estimating the microbial quality of raw milk. *Neth Milk Dairy J* 42, 173-182
- Piton C, Rongvaux-Gaïda D (1990) Estimation par conductimétrie de la flore aérobie mésophile, des bactéries coliformes et de la flore psychrotrophe du lait cru. *Lait* 70, 293-306
- Piton C, Grappin R (1991) A model for statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods : application to the dry rehydratable film methods and the IDF reference methods for the enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk. *J Assoc Off Anal Chem* 74, 92-103
- Richardson T, Mc Gann T, Kearney RD (1980) Levels and location of Adenosine 5'-Triphosphate in bovine milk. *J Dairy Res* 47, 91-96

- Rongvaux-Gaïda D, Peroz A, Verdier B, Piton C (1990) Estimation de la qualité bactériologique du lait cru par microrespirométrie. *Lait* 70, 23-36
- Theron DP, Prior BA, Lategan PM (1986a) Determination of bacterial ATP levels in raw milk: selectivity of non-bacterial ATP hydrolysis. *J Food Prot* 49, 4-7
- Theron DP, Prior BA, Lategan PM (1986b) Sensitivity and precision of bioluminescent techniques for enumeration of bacteria in skim milk. *J Food Prot* 49, 8-11
- Van Crombrugge JV, Waes G, Reybroeck W (1989) The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. *Neth Milk Dairy J* 43, 347-354
- Waes G, Bossuyt R (1981) A rapid method to detect postcontamination in pasteurized milk. *Milchwissenschaft* 36, 548-552
- Waes G, Bossuyt R, Mottar J (1984) A rapid method for the detection of non-sterile UHT milk by the determination of the bacterial ATP. *Milchwissenschaft* 39, 707-711