

Application d'une variante turbidimétrique du test Limulus à l'évaluation de la flore à Gram négatif du lait cru

D Rongvaux-Gaïda, C Piton-Malleret

INRA, station de recherches en technologie et analyses laitières,
BP 89, 39801 Poligny Cedex, France

(Reçu le 2 janvier 1991; accepté le 4 juin 1991)

Résumé — Cent-quarante échantillons de lait cru de grand mélange ont été soumis d'une part, au test Limulus, selon la technique turbidimétrique, et d'autre part, au dénombrement de la flore à Gram négatif (GN) sur milieu Nutrient Agar additionné de 2 mg/l de cristal violet, après une agitation de 30 s à l'aide d'une turbine tournant à 20 000 t/min. La fraction de l'échantillon soumise au test turbidimétrique a été diluée au 10 000^e dans de l'eau exempte d'endotoxine, et la dernière dilution a été chauffée pendant 1 h à 80 °C. Le seuil de détermination de la technique turbidimétrique a été fixé, dans les conditions expérimentales de l'étude, à 29 000 UFC/ml de bactéries à Gram négatif. L'écart type de répétabilité du test turbidimétrique calculé au-dessus du seuil de détermination est en moyenne de 0,082 log EU/ml, mais varie en fonction de la concentration en endotoxine du lait. L'écart type résiduel des écarts à la régression GN sur Limulus (en log unités d'endotoxine/ml) calculée au-dessus du seuil de détermination est de 0,626 log UFC/ml. La pente de la droite de calibrage n'est pas statistiquement différente de 1,000 au seuil de 5%. Enfin, un modèle mathématique a été proposé pour le calcul du seuil de détermination d'une technique expérimentale.

Limulus / turbidimétrie / seuil de détermination / répétabilité / justesse / lait cru / flore à Gram négatif

Summary — Application of a Limulus turbidimetric assay for the evaluation of the Gram-negative flora in raw milk. One hundred and forty raw milk samples were analysed in duplicate by the Limulus turbidimetric assay, using the following experimental conditions: dilution of the sample with endotoxin-free water (1/10 000) and heating the last dilution at 80 °C for 1 h. Using the spiral plater, enumeration was also carried out of the Gram-negative flora (GN) on nutrient agar supplemented with crystal violet (2 mg/l), after homogenization with an Ultra-Turrax for 30 s at 20 000 rpm. Under these experimental conditions, the turbidimetric test determination limit was 29 000 CFU/ml for the Gram-negative flora. The repeatability standard deviation of the turbidimetric assay averaged 0.082 log EU/ml and varied with the endotoxin concentration. The residual standard deviation of the regression GN on Limulus (in log endotoxin units/ml) calculated over the determination limit was 0.626 log CFU/ml. The slope of the calibration line did not differ statistically from 1.000 at the 5% level. Finally, a model is proposed to estimate the determination limit of an experimental technique.

Limulus / turbidimetric assay / determination limit / repeatability / accuracy / raw milk / Gram-negative flora

INTRODUCTION

L'extrait lyophilisé de cellules du sang du *Limulus polyphemus*, ou lysat d'amébo-cytes de *Limulus* (LAL), est utilisé pour la détection des lipopolysaccharides présents dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif. En présence d'ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} , les lipopolysaccharides activent une proenzyme coagulante qui réagit avec une protéine présente dans le LAL (le coagulogène) pour former un gel ferme de coaguline. Cette réaction est à la base du test *Limulus* qui initialement, s'est surtout développé dans l'industrie pharmaceutique.

Cependant, ce test peut également avoir des applications intéressantes en industrie laitière. En effet, compte tenu de la grande résistance thermique des lipopolysaccharides bactériens, cette technique devrait permettre de connaître la qualité bactériologique initiale de la matière première employée pour la fabrication de produits à base de lait traité thermiquement. Par ailleurs, ce test peut être utilisé comme méthode rapide d'évaluation de la flore psychrotrophe d'échantillons de lait cru conservés à basse température, puisqu'elle est constituée essentiellement de bactéries à Gram négatif (Richard, 1981). L'évaluation du niveau de cette flore revêt un intérêt technologique, car la plupart des bactéries psychrotrophes sont capables de produire des enzymes protéolytiques et/ou lipolytiques thermostables, qui peuvent être responsables de la dégradation de la qualité organoleptique des produits laitiers (Law, 1979).

De nombreux travaux ont déjà été consacrés à l'utilisation du test *Limulus* au lait cru. Avec un écart type résiduel des écarts à la régression d'environ 0,40 à 0,50 log UFC/ml (Hansen *et al*, 1982; Hansen et Moller-Madsen, 1983), la technique basée

sur la formation d'un gel donne des résultats encourageants, mais elle présente cependant quelques inconvénients majeurs. En effet, comme il s'agit d'une technique du «tout ou rien», elle nécessite plusieurs analyses par échantillon, provoquant ainsi une augmentation du coût de la détermination et de la durée d'analyse. Par ailleurs, la justesse d'une telle technique semi-quantitative est limitée par le choix des dilutions et le nombre d'analyses effectuées par échantillon. Certains auteurs ont donc tenté de miniaturiser la technique en gel (Südi *et al*, 1981; May *et al*, 1989), afin d'abaisser le coût de l'analyse.

D'autres auteurs ont appliqué une technique chromogénique au lait cru (Mottar, 1987; Svensson et Hahn-Hägerdal, 1987). Dans celle-ci, le coagulogène est remplacé par un polypeptide qui est hydrolysé par l'enzyme coagulante au niveau d'une liaison entre l'arginine et le p-nitroaniline, ce qui développe une coloration jaune. D'après Mottar (1987), cette technique quantitative présente une très bonne précision d'estimation ($s_{y,x} = 0,29 \log \text{UFC/ml}$). Elle reste cependant assez délicate à effectuer, en raison de la succession de durées d'incubation courtes et précises, nécessitant un décalage des échantillons dans le temps, et donc une attention très soutenue du manipulateur.

Dans le cas de la technique chromogénique, ou de celle en gel, tous les travaux antérieurs sur le lait cru ont impliqué une préparation de l'échantillon, qui tend à supprimer l'effet possible d'activation ou d'inhibition de la réaction par certains composants du lait (Forster, 1985). Cette préparation impose généralement une précipitation des caséines à l'acide lactique, une double centrifugation, un ajustement du pH et des dilutions, le tout à l'aide de matériel et de solutions apyrogènes, c'est-à-dire débarrassés de toutes traces d'endotoxine par chauffage intense (4 h à

180 °C). Elle est donc trop lourde et trop coûteuse pour être appliquée en routine sur le lait cru.

Nous avons voulu tester une technique quantitative assez simple dérivée de la technique en gel et décrite par Coates (1977), la turbidimétrie cinétique, en tant que méthode rapide d'évaluation de la flore à Gram négatif sur des échantillons de lait cru prélevés à l'arrivée à l'usine. Pour cela, nous avons utilisé du matériel et des réactifs commercialisés par Amilabo. De plus, nous avons voulu simplifier au maximum la préparation de l'échantillon, en nous limitant à une dilution très poussée de l'échantillon dans de l'eau apyrogène, suivie d'un choc thermique, de façon à limiter les phénomènes d'activation et/ou d'inhibition de la réaction.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine et conservation des échantillons de lait

Cent-quarante 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 dans de la glace fondante, au plus 24 h après leur prélèvement.

Après homogénéisation, les échantillons ont été séparés en 2 fractions : l'une de 25 ml et l'autre de 5 ml. La fraction de 25 ml, destinée à la numération microbienne, a été conditionnée dans un flacon de 60 ml, et conservée dans de la glace fondante jusqu'à l'analyse. La fraction de 5 ml, destinée à la réalisation du test *Limulus*, a été congelée dans un tube plastique stérile de 10 ml et conservée à -20 °C pendant une durée maximale d'une année.

Numérations microbiennes

Avant ensemencement, les échantillons ont été agités pendant 30 s à l'aide d'un homogénéisa-

teur à turbine (Ultra-turrax, type 18/10) tournant à 20 000 tr/min. Ce mode d'agitation est actuellement celui qui assure la meilleure dispersion des amas microbiens. En effet, plus de 95% des bactéries à Gram négatif se présentent sous forme isolée ou de doublets (Richard, 1980; Piton et Richard, 1983).

Ils ont ensuite été soumis au dénombrement de la flore à Gram négatif (GN), sur milieu Nutrien Agar (Institut Pasteur) additionné de 2 mg/l de cristal violet, après 3 j d'incubation à 30 °C. Les ensemencements ont été effectués à la surface de la gélose, à l'aide de l'appareil Spiral (Anonyme, 1985b et 1987). Ils ont été effectués en double pour chaque échantillon, afin d'obtenir une meilleure précision des résultats. Ceux-ci sont exprimés en «unités formant colonies» (UFC) par ml de lait.

Principe et description de la technique turbidimétrique

Le principe de la technique turbidimétrique est le suivant (Coates, 1977) : l'échantillon est additionné de Lysat d'Amébocytes de *Limulus polyphemus* (ou LAL) à une concentration telle qu'en présence d'une quantité suffisante d'endotoxine, il se forme un trouble, et non un gel; la vitesse de développement de la turbidité est alors directement proportionnelle à la concentration en endotoxine de l'échantillon.

Toutes les mesures ont été réalisées grâce à un appareil automatique, le LAL 5000 (Amilabo, 1, rue Jacquard, BP 53, 69684 Chassieu Cedex), qui permet de suivre l'évolution de la turbidité du milieu au cours du temps. Cet appareil est un spectrophotomètre thermostaté à $37 \pm 0,5$ °C, capable d'effectuer des mesures sur 32 échantillons simultanément. Il enregistre la turbidité de chaque échantillon toutes les 30 s, puis transmet les valeurs à un microordinateur qui assure leur stockage et leur traitement. La série d'analyses est terminée quand tous les échantillons ont atteint un niveau fixé de turbidité. L'ordinateur peut alors calculer la concentration en endotoxine de chaque échantillon à partir du temps qu'il a fallu pour atteindre ce niveau. Ce temps est ensuite converti en concentration, grâce à une courbe étalon établie avec une solution d'endotoxine de référence contenant de 0,1 à 10 EU/ml (unités d'endotoxine/ml).

Détermination de la concentration en endotoxine du lait

Traitement des échantillons

Dans une première étape, l'échantillon de lait (conservé à -20°C) a été plongé pendant 5 min dans un bain-marie à 30°C , afin d'assurer sa décongélation dans des conditions reproductibles. Après une agitation de 1 min au vortex, l'échantillon a subi 4 dilutions successives au dixième, dans de l'eau apyrogène. Chacune des dilutions a été agitée pendant 1 min au vortex, afin d'assurer une bonne mise en suspension des endotoxines, qui ont tendance à s'adsorber sur les parois du tube. Enfin, la dernière de ces dilutions a été chauffée pendant 1 h à 80°C , pour libérer les lipopolysaccharides de la paroi cellulaire des bactéries.

Réalisation du test

Après chauffage et agitation, l'échantillon dilué ($450\ \mu\text{l}$) est placé dans un tube à réaction exempt d'endotoxine, et $50\ \mu\text{l}$ de LAL sont ajoutés. Le mélange est agité puis placé rapidement dans le LAL 5000, qui assure le reste du test. Chaque échantillon de lait a été soumis à 4 tests : 2 directement et 2 après addition à l'échantillon d'une quantité connue d'endotoxine (environ 2 EU/ml), de façon à mettre en évidence la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs de la réaction. De plus, pour chaque série de tests, 2 contrôles négatifs (eau apyrogène) et 2 contrôles positifs (eau apyrogène additionnée d'environ 2 EU/ml) ont été effectués, pour vérifier le bon déroulement du test.

Calcul de la concentration corrigée de l'échantillon en endotoxine

Le degré d'activation de la réaction est très variable d'un échantillon à l'autre. C'est pourquoi nous avons, dans chaque cas, corrigé la concentration de l'échantillon en endotoxine.

Soient C_s la concentration du contrôle positif (moyenne de 2 mesures), C_i la concentration mesurée sur l'échantillon (moyenne des 2 mesures), et C_{i+s} la concentration de l'échantillon additionné d'endotoxine (moyenne de 2 mesures).

Le pourcentage d'activation A de la réaction par l'échantillon peut être obtenu à partir de la formule suivante :

$$A = \frac{(C_{i+s} - C_i) - C_s}{C_s} \times 100$$

Nous avons donc calculé la concentration corrigée C_{ic} de l'échantillon de la façon suivante :

$$C_{ic} = C_i \times 100 / (100 + A)$$

Calculs statistiques

Conformément aux recommandations de la norme FIL 128 (Anonyme, 1985a), l'évaluation du test turbidimétrique a été basée sur la détermination de 3 caractéristiques analytiques importantes : le seuil de détermination, la répétabilité et la justesse. Les calculs statistiques ont été effectués après transformation logarithmique en base 10 des résultats (UFC/ml et EU/ml). Cette transformation est destinée à normaliser la distribution.

Les paramètres statistiques ont été établis à partir de la moyenne de 2 déterminations de la concentration en endotoxine réalisées pour chaque échantillon.

Les modes de calcul de la répétabilité et de la justesse ont été largement détaillés dans un précédent article (Piton et Rongvaux-Gaïda, 1990), aussi, nous ne rappelons ici que les points les plus importants pour la compréhension des résultats.

Seuil de détermination

Le seuil de détermination d'une technique expérimentale correspond à la limite au-dessus de laquelle cette technique permet d'évaluer la valeur vraie de la grandeur à mesurer avec une incertitude acceptable. Il n'existe pas actuellement de norme pour le calcul de ce seuil. Nous nous sommes donc inspirés d'une méthode proposée par Reichmut *et al*, dans un document de travail du groupe FIL E29 (Anonyme, 1990). Ces auteurs suggèrent d'évaluer le seuil de détermination par itérations successives, en utilisant un

modèle de régression quadratique progressive. Ce seuil correspond alors au niveau à partir duquel le modèle devient et reste linéaire, c'est-à-dire à partir duquel le coefficient de régression de la variable $(\log \text{ UFC/ml})^2$ devient non significativement différent de zéro.

Nous avons donc procédé de la façon suivante : les logarithmes décimaux des concentrations en endotoxine du lait sont placés en variable expliquée, de façon à pouvoir fixer le seuil de détermination en UFC/ml. À chaque itération, l'observation correspondant au plus faible niveau de concentration microbienne est supprimée et une régression quadratique progressive est effectuée sur les observations restantes, jusqu'à ce que le modèle devienne et reste linéaire.

La limite de détermination est exprimée en $\log \text{ UFC/ml}$ et son équivalence en EU/ml (x_0) est calculée à partir de la droite de régression.

Répétabilité

L'écart type de répétabilité des logarithmes décimaux des concentrations en endotoxine (s_r , en $\log \text{ EU/ml}$) a été établi à partir de 2 mesures effectuées sur chaque échantillon (Anonyme, 1985a). Pour pouvoir comparer la répétabilité de la méthode à celle des autres techniques, nous l'avons également exprimée en $\log \text{ UFC/ml}$ (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 du test Limulus a été évaluée en comparant la valeur vraie, c'est-à-dire le nombre de bactéries à Gram négatif (Spiral), avec la moyenne de deux déterminations de la concentration en endotoxine (Anonyme, 1985a).

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 des concentrations en endotoxine comme variable indépendante, pour donner une estimation de l'écart type résiduel dans l'unité de la technique de référence.

La précision d'estimation de la technique expérimentale est donnée par les limites de l'intervalle de confiance 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, $\log y \pm 1,96 \cdot s_{y,x}$ où $s_{y,x}$ est l'écart type résiduel des écarts à la droite de régression. En données non transformées, ces limites sont $y \cdot 10^{1,96s_{y,x}}$ pour la limite inférieure et $y \cdot 10^{1,96s_{y,x}}$ pour la limite supérieure.

RÉSULTATS

Seuil de détermination

La figure 1 présente la relation obtenue sur les 140 échantillons, entre les niveaux de la flore à Gram négatif du lait cru et les concentrations en endotoxine dosées à l'aide du test turbidimétrique; on a appliqué à l'ensemble du nuage de points un modèle de régression quadratique progressive (A) et un modèle de régression linéaire (B). On ne peut rejeter aucun des 2 modèles sur la base des écarts types résiduels, car ils ne sont pas significativement différents (respectivement 0,448 et 0,456 UFC/ml). Cependant, avec le modèle de régression quadratique progressive, le coefficient de régression en x^2 se révèle hautement significatif; nous avons donc retenu le modèle quadratique pour décrire la relation entre les 2 variables. Après suppression des 39 premiers échantillons (tableau I) le modèle devient et reste linéaire, c'est-à-dire au-dessus de 28 900 UFC/ml de bactéries à Gram négatif (ou 41,3 EU/ml).

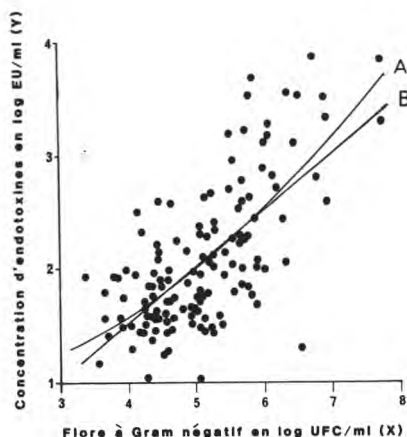


Fig 1. Relation entre les niveaux de la flore à Gram négatif en log UFC/ml (en abscisse) et les concentrations en endotoxine du lait mesurées à l'aide du test turbidimétrique en log EU/ml (en ordonnée). A: modèle quadratique : $y = 0,048 x^2 + 0,825$; $r = 0,696$; $s_{y,x} = 0,448$. B: modèle linéaire : $y = 0,500 x - 0,451$; $r = 0,714$; $s_{y,x} = 0,456$.

Relationship between the numbers of Gram-negative bacteria in log CFU/ml (abscissa) and the endotoxin concentrations in log endotoxin units/ml (vertical axis). A: quadratic model; B: linear model.

Répétabilité

Les écarts types de répétabilité des concentrations corrigées du lait en endotoxine augmentent quand la concentration diminue (tableau II). Au-dessous du seuil de détermination, soit environ 50 EU/ml, cette augmentation devient particulièrement importante. Au-delà du seuil de détermination, l'écart type de répétabilité est en moyenne de 0,082 log EU/ml, ou de 0,083 en log UFC/ml après conversion par l'intermédiaire de la droite de calibrage, ce qui correspond à un écart type relatif géométrique de 21%.

Justesse

La figure 2 présente la relation entre les concentrations en endotoxine et les niveaux de la flore à Gram négatif. La droite de calibrage a été calculée après élimination des échantillons situés au-dessus du seuil de détermination. Le coefficient de régression de la droite de calibrage n'est pas statistiquement différent de 1,000, au seuil de 5%. Il suffit donc d'appliquer aux concentrations en endotoxine, un facteur de multiplication pour obtenir le nombre de bactéries à Gram négatif en UFC/ml; ce facteur est égal à 10^a (a étant l'ordonnée à l'origine), soit 842.

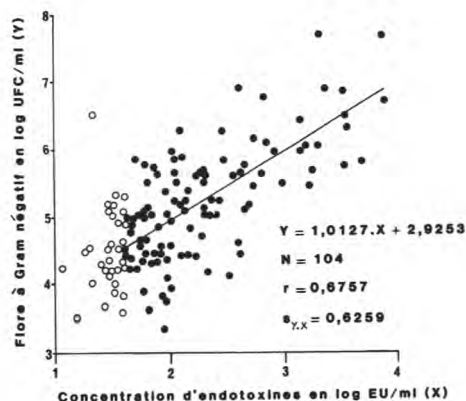


Fig 2. Relation entre les concentrations en endotoxine du lait cru en log EU/ml (en abscisse) et les niveaux de la flore à Gram négatif en log UFC/ml (en ordonnée). (O) Échantillons situés au-dessous du seuil de détermination et éliminés pour le calcul de la droite de calibrage. *Relationship between the endotoxin concentrations in log endotoxin units/ml (abscissa) and the numbers of Gram-negative micro-organisms in log CFU/ml (vertical axis). (O) Samples under the determination limit excluded for calculation of the regression line.*

Tableau I. Évaluation du seuil de détermination du test turbidimétrique pour la numération de la flore à Gram négatif du lait cru.
Calculation of the determination limit of the turbidimetric assay for the enumeration of the Gram-negative flora in raw milk.

Nombre d'observations supprimées	Niveau de contamination ^a	Variable significative	Équation du modèle retenu
0	2,3	GN ²	ENDO = 0,0 476.GN ² + 0,8 250
10	8,1	GN ²	ENDO = 0,0 502.GN ² + 0,7 395
20	17,8	GN ²	ENDO = 0,0 525.GN ² + 0,6 588
30	24,5	GN ²	ENDO = 0,0 523.GN ² + 0,6 682
37	27,5	GN ²	ENDO = 0,0 528.GN ² + 0,6 481
38	28,8	GN ²	ENDO = 0,0 534.GN ² + 0,6 258
39	28,9	GN	ENDO = 0,6 261.GN - 1,1 775
40	29,5	GN	ENDO = 0,6 462.GN - 1,2 967
41	29,5	GN	ENDO = 0,6 529.GN - 1,3 366
42	30,2	GN	ENDO = 0,6 572.GN - 1,3 624
50	38,9	GN	ENDO = 0,6 464.GN - 1,2 974
60	75,9	GN	ENDO = 0,7 006.GN - 1,6 256

^a Valeur minimale de concentration microbienne (en UFC/ml x 10³); GN : nombre de bactéries à Gram négatif (en log UFC/ml); ENDO : concentration du lait en endotoxine (en log EU/ml).

^a Lower level of micro-organisms (in CFU/ml x 10³); GN : number of Gram-negative bacteria (in log CFU/ml); ENDO : endotoxin concentration (in log endotoxin units/ml).

Tableau II. Répétabilité du test turbidimétrique.
Repeatability of the turbidimetric assay.

Concentration en endotoxine (en EU/ml)	N	Équivalence UFC/ml x 10 ³	s _r (en log EU/ml)	GRSD (en % UFC/ml)
Moins de 50	45	44	0,181	52,5
50–100	35	44–89	0,099	26,0
100–1 000	45	89–920	0,078	19,9
> 1 000	15	920	0,051	12,6

s_r : écart type de répétabilité; N : nombre d'échantillons; GRSD : écart type relatif géométrique de répétabilité.

s_r : repeatability standard deviation; N : sample number; GRSD : geometric relative standard deviation of repeatability.

DISCUSSION

La précision d'estimation du test Limulus obtenue dans nos conditions expérimentales pour l'évaluation de la flore à Gram négatif du lait cru ($s_{y,x} = 0,626 \log \text{ UFC/ml}$), est très éloignée des résultats de Hansen *et al* (1982) ($s_{y,x} = 0,39 \log \text{ UFC/ml}$) ou de Mottar (1987) ($s_{y,x} = 0,29 \log \text{ UFC/ml}$). Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ces résultats peu satisfaisants : tout d'abord, l'utilisation d'une technique différente (turbidimétrie cinétique) et la simplification du protocole; d'autre part, on peut également évoquer la nature de la flore microbienne des échantillons analysés car il a déjà été largement montré que les concentrations en lipopolysaccharides varient dans des proportions assez larges en fonction de la souche et/ou de son état physiologique (Forster, 1985; Sühren *et al*, 1986a). Enfin la technique de dénombrement de la flore à Gram négatif peut également être mise en cause, bien que Mottar (1987) ait utilisé le même inhibiteur, mais à une concentration qui n'est pas précisée dans son étude, et à une température de 21 °C. Le cristal violet, à la concentration de 2 mg/l, inhibe certaines espèces de bactéries à Gram négatif et à l'inverse, permet la croissance de certaines souches de levures (Richard *et al*, 1983). Enfin, la température de 30 °C est peut être trop élevée pour permettre la croissance de certaines espèces à Gram négatif psychrotrophes en présence de cristal violet.

Le test turbidimétrique possède une précision d'estimation sensiblement identique à d'autres techniques de dosage d'un constituant bactérien, comme le dosage de l'ATP, selon les techniques rapides ATP-platform et ΔATP (Bossuyt, 1982; Langeveld et Van der Waals, 1988; Rongvaux-Gaïda et Piton, 1991). Par contre, la

précision d'estimation de ce test est moins bonne lorsque l'ATP bactérien est dosé après concentration sur une membrane par filtration ($s_{y,x} = 0,27 \log \text{ UFC/ml}$, d'après Van Crombrugge *et al*, 1989; $s_{y,x} = 0,30 \log \text{ UFC/ml}$, d'après Rongvaux-Gaïda et Piton, 1991). Malgré une justesse peu satisfaisante, le test Limulus peut tout de même avoir des applications intéressantes en industrie laitière, puisque c'est actuellement le seul qui permette d'évaluer la qualité microbiologique initiale du lait traité thermiquement. Cependant, dans le cadre de cette utilisation, il serait nécessaire de connaître l'effet du traitement thermique sur la libération des endotoxines; en effet, les traitements technologiques, et en particulier le traitement UHT, provoquent une libération plus importante des lipopolysaccharides de la paroi cellulaire (Sühren *et al*, 1986b; Mottar, 1987).

Actuellement, il n'existe pas de méthode reconnue pour calculer le seuil de détermination d'une technique expérimentale. Ainsi, souvent, ce seuil n'est pas fixé, ou il l'est de façon arbitraire, comme par exemple pour le Bactoscan (Grappin *et al*, 1985). Plusieurs propositions ont déjà été faites (Anonyme, 1990). C'est le cas par exemple du calcul de l'écart type résiduel de la régression par tranches de niveaux de contamination, où le seuil de détermination correspond au niveau au-dessous duquel cet écart type augmente de façon significative. Cette technique présente cependant des inconvénients majeurs. Tout d'abord, dans le cas des techniques microbiologiques, les écarts types résiduels sont généralement très grands; il en résulte qu'il est très difficile de mettre en évidence des variations significatives. Par ailleurs, pour fixer le seuil de détermination de façon précise, il est nécessaire de réaliser des tranches de niveau de contamination très petites (par exemple 0,1 unité de

log) et donc d'analyser un très grand nombre d'échantillons aux faibles niveaux de contamination. La voie explorée au cours de cette étude, qui est basée sur l'utilisation de la régression quadratique progressive, s'est révélée très intéressante, mais ces résultats encourageants demanderaient à être confirmés avec d'autres techniques microbiologiques.

Avec cette procédure de calcul, nous avons fixé le seuil de détermination du test turbidimétrique, dans nos conditions d'analyse, à 28 900 UFC/ml en bactéries à Gram négatif. Au-dessous de ce niveau, il est probable que des signaux parasites masquent le signal bactérien. Compte tenu de la grande sensibilité du test Limulus, ce seuil peut paraître élevé; cela est dû essentiellement à la simplification du protocole d'analyse que nous avons adopté, pour en réduire la lourdeur. L'abaissement de ce seuil nécessite de revenir à une méthodologie très lourde; en effet, une dilution moins poussée de l'échantillon entraîne une activation trop importante de la réaction, en raison de la forte concentration de certains composants du lait (Forster, 1985).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement la société Amilabo, 1, rue Jacquard, BP 53, 69684 Chassieu Cedex, pour son assistance technique et le prêt de l'appareil LAL 5 000. Les auteurs tiennent aussi à remercier les entreprises laitières 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 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 et de la Forêt (Contrat DGAL n° R88/11).

RÉFÉRENCES

- 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 microorganismes à l'aide du système «Spiral». Norme française NF V 08-100 Afnor, Paris
- Anonyme (1990) Evaluation of routine methods for the quantitative determination of the bacteriological quality of milk. Working document of the E29 IDF group, March 1990
- Bossuyt R (1982) A 5-minute ATP platform test for judging the bacteriological quality of raw milk. *Neth Milk Dairy J* 36, 355-364
- Coates DA (1977) Enhancement of the sensitivity of the Limulus assay for the detection of Gram-negative bacteria. *J Appl Bacteriol* 42, 445-449
- Forster MA (1985) Factors affecting the use of the Limulus amoebocyte lysate test in the food industry. *N Z J Dairy Sci Technol* 20, 163-172
- Grappin R, Dasen A, Favennec P (1985) Numération automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du Bacto-Scan. *Lait* 65, 123-147
- Hansen K, Moller-Madsen A (1983) Gram-negative bacterial lipopolysaccharide. A measure of the hygienic quality of dairy products. *Statens Forsogsmejeri Hillerod* 253, Beretning
- Hansen K, Mikkelsen T, Moller-Madsen A (1982) Use of the Limulus test to determine the hygienic status of milk products as characterized by levels of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide present. *J Dairy Res* 49, 323-328
- 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

- Law BA (1979) Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects in milk and milk products. *J Dairy Sci* 46, 573-588
- May SA, Mikolajcik EM, Richter ER (1989) Conventional tube and microplate Limulus amoebocyte lysate procedures for determination of Gram-negative bacteria in milk. *J Dairy Sci* 72, 1137-1141
- Mottar J (1987) A colorimetric endotoxin assay for the determination of the bacteriological quality of milk. *Neth Milk Dairy J* 41, 137-145
- Piton C, Richard J (1983) Influence de l'agitation des échantillons de lait cru sur les résultats de dénombrement de trois groupes microbiens d'intérêt technologique. *Lait* 63, 405-415
- 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
- Piton C, Rongvaux-Gaïda D (1990) Estimation par conductimétrie de la flore aérobie mésophile, des bactéries coliformes et de la flore psychotrophe du lait cru. *Lait* 70, 293-306
- Richard J (1980) Influence de l'agitation du lait cru sur les résultats de dénombrement de sa flore totale à l'aide d'une anse calibrée. *Lait* 60, 211-225
- Richard J (1981) Influence de diverses méthodes de nettoyage des machines à traire sur la «qualité de conservation» du lait cru à basse température. *Lait* 61, 354-369
- Richard J, Moller-Andersen H, Gratadoux JJ (1983) Rapid method for selecting appropriate solid media for the enumeration of aerobic micro-organisms. *J Appl Bacteriol* 54, 329-334
- Rongvaux-Gaïda D, Piton C (1991) Comparaison de trois méthodes de dosage de l'ATP par bioluminescence pour l'estimation de la qualité bactériologique du lait cru. *Lait* (sous presse)
- Südi J, Suhren G, Heeschen W, Tolle A (1981) Entwicklung eines miniaturisierten Limulus-Tests im Mikrotiter-System zum quantitativen Nachweis gram-negativer Bakterien in Milch und Milchprodukten. *Milchwissenschaft* 36, 193-198
- Sühren G, Heeschen W, Südi J (1986a) Evaluation of the lipopolysaccharide (LPS) content as determined by the Limulus test in milk and milk products. I. Investigations with pure cultures. *Milchwissenschaft* 41, 74-79
- Sühren G, Hesselbarth H, Heeschen W, Südi J (1986b) Evaluation of the lipopolysaccharide (LPS) content as determined by the limulus test in milk and milk products. II. Raw milk and influences of technological procedures. *Milchwissenschaft* 41, 156-160
- Svensson A, Hahn-Hägerdal B (1987) Comparison of a gelation and a chromogenic Limulus (LAL) assay for the detection of Gram-negative bacteria, and the application of the latter assay to milk. *J Dairy Res* 54, 267-273
- Van Crombrugge J, Waes G, Reybroeck W (1989) The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. *Neth Milk Dairy J* 43, 347-354