Connaissance Vigne Vin, 1982, **16,** N° 4, 241-256.

APPLICATION DE LA BIOLUMINESCENCE AU DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES VIVANTS DANS LES VINS

Aline LONVAUD-FUNEL et Annick JOYEUX

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

INTRODUCTION

En Œnologie, l'analyse microbiologique est de plus en plus largement utilisée. Elle s'applique soit au contrôle des fermentations alcoolique et malolactique soit à l'analyse des vins lors de la mise en bouteilles. Par ailleurs, en cas d'altération du vin, il est important de déterminer si l'origine des troubles est de nature microbiologique.

Pour dénombrer les microorganismes vivants dans les vins, on utilise actuellement leur capacité à former des colonies visibles à l'œil nu par culture sur milieu gélosé. En 1979, LAFON-LAFOURCADE et JOYEUX décrivent une technique qui permet de dénombrer sélectivement les levures, les bactéries lactiques et les bactéries acétiques. Cette méthode est bien adaptée au contrôle des vins, mais présente l'inconvénient de ne donner le résultat qu'après un délai de plusieurs jours. C'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point une méthode aussi fiable mais plus rapide.

Les techniques faisant appel à la bioluminescence ont déjà fait leurs preuves dans d'autres domaines de l'agroalimentaire : en laiterie (BOSSUYT, 1981), en brasserie (HYSERT et *al.,* 1976) et dans le contrôle des eaux minérales (BAUMGART et *al.,* 1980). Par contre, à notre connaissance, elle n'a pas été utilisée en œnologie. Cette technique semble pouvoir répondre à notre problème ; nous en avons donc entrepris la mise au point pour le contrôle microbiologique des vins.

PRINCIPE DU DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES PAR BIOLUMINESCENCE

En 1947, Mc ELROY établit que la bioluminescence des lucioles est ATP — dépendante et montrait plus tard (Mc ELROY et GREEN, 1956) que l'ATP réagit avec la luciférine qui est le substrat de la réaction enzymatique.

Le mécanisme complet de la réaction de la luciférine en présence de luciférase peut être schématisé ainsi :

$$LHCOOH + ATP \underset{Mg^{2+}}{\overset{\text{luciférase}}{\rightleftharpoons}} [LHCOOH - AMP] + PPi$$

$$[LHCOOH - AMP] + O_2 \longrightarrow L = O + AMP + CO_2 + \text{lumière}$$

ATP : adénosine triphostate
LHCOOH : luciférine
AMP : adénosine monophosphate
L = O : oxyluciférine
PPi : pyrophosphate

Il s'agit d'une réaction enzymatique où l'ATP est un des substrats ; si les autres sont en excès (luciférine et oxygène), la vitesse de la réaction dépend seulement de la concentration en ATP. Cette réaction peut donc être utilisée pour doser l'ATP d'une solution.

Toute cellule vivante contient de l'ATP, cofacteur impliqué dans de nombreuses réactions du métabolisme. Son taux varie en fonction de la nature de la cellule et quelquefois avec son état physiologique. Par contre, lorsque la cellule meurt l'ATP est hydrolysé rapidement.

Le principe du dénombrement des microorganismes vivants est donc simple. On libère, par perméabilisation, l'ATP qui est ensuite déterminé par la mesure de la luminescence provoquée par l'addition de luciférine et de luciférase. Connaissant la quantité moyenne d'ATP par cellule il est alors possible d'en déduire le nombre des microorganismes vivants présents dans l'échantillon.

MATERIELS

Plusieurs constructeurs proposent des appareils pour ce type de dosage. Nous utilisons le Biocounter M 2010 ® (lumac) ; c'est un détecteur de photons couplé à un photomultiplicateur.

L'échantillon (0,1 ml) à analyser est placé dans un tube. On ajoute soit manuellement soit automatiquement 0,1 ml de réactif Lumit PM ^{R} (Lumac) constitué de luciférine et de luciférase dans un tampon approprié. Dès le mélange du réactif avec l'échantillon, l'émission lumineuse est optimum, puis elle se stabilise. On mesure les « URL » (Unités Relatives de Lumière) pendant un temps d'intégration de 10 secondes et à 25 °C.

En utilisant des solutions d'ATP standard, nous avons établi la relation entre la concentration en ATP et les URL obtenues. Il existe une proportionnalité presque parfaite pour une zone de concentration en ATP de 2 pg à 2 ng dans 0,1 ml, correspondant au volume du réactif ; les droites d'étalonnage tracées avec 4 lots différents de Lumit et d'ATP sont pratiquement parallèles (fig. 1). Une standardisation interne par addition d'ATP étalon s'impose pour chaque mesure.

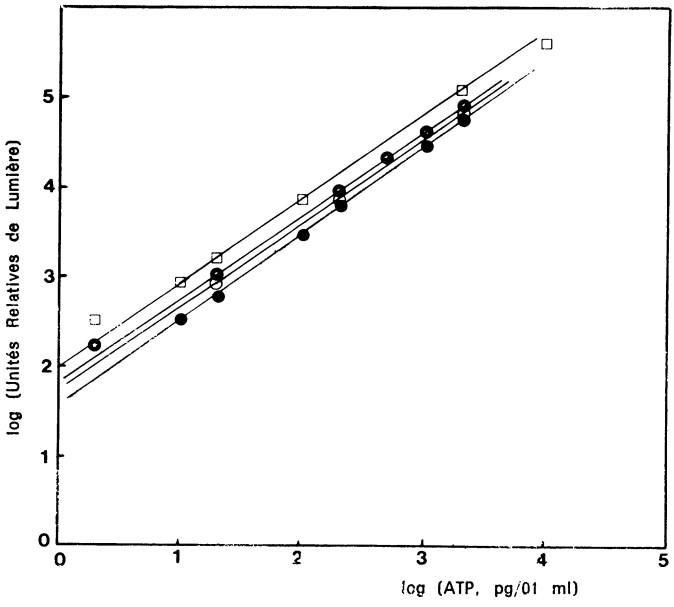


Fig. 1. — Correspondance entre la quantité d'ATP et les Unités Relatives de Lumière pour quatre lots de réactifs différents

Des répétitions de mesures avec les solutions étalons montrent que le pourcentage de variation passe de 0,6 p. 100 pour les solutions à 2 ng d'ATP à 2,5 p. 100 pour les solutions à 2 pg.

RESULTATS

I. — DOSAGE DE L'ATP INTRACELLULAIRE.

Nous distinguons deux cas : a) les populations microbiennes sont importantes ; le dosage est réalisé après dilution du milieu ; b) les populations sont faibles ; on concentre les microorganismes par filtration sur des membranes qui sont ensuite traitées pour le dosage.

La dilution dans un cas, l'élimination du milieu liquide dans l'autre cas permettent de supprimer ou d'atténuer l'inhibition provoquée par certains constituants du milieu sur l'activité de la luciférase. De même on supprime l'effet de masque provoqué par la couleur du milieu, notamment dans le cas des vins rouges.

1°) *Mesure après dilution du milieu.*

L'échantillon est dilué dans de l'eau stérile, donc dépourvue d'ATP. Le taux de dilution est tel que le nombre d'URL affiché soit compris entre 500 et 100.000, zone linéaire avec l'appareil que nous utilisons.

L'échantillon dilué (0,1 ml) est traité par 0,1 ml de perméabilisant NRB® (Lumac) qui a pour effet d'altérer les parois cellulaires. L'ATP

intracellulaire passe dans le milieu et sert de substrat à la réaction enzymatique déclenchée par l'addition du réactif Lumit. L'intégration pendant 10 secondes de la lumière émise constitue la mesure URL_1 ; elle correspond à la somme de l'ATP intracellulaire et de l'ATP présent dans le milieu. Cette mesure est immédiatement étalonnée par addition d'ATP standard ; la réponse de l'appareil est URL_2.

Pour ne prendre en compte que l'ATP intracellulaire libéré lors de la perméabilisation on doit déterminer l'ATP libre du milieu. Pour cela l'échantillon dilué est débarrassé des microorganismes par filtration sur membrane de porosité de 0,45 µm. Sur le filtrat on effectue la même détermination que précédemment ; soit URL_0, la valeur de la mesure. La présence de NRB n'est théoriquement pas indispensable ; cependant ce réactif accélère la réaction de la luciférase. Son addition est donc nécessaire afin que la réaction se produise dans les mêmes conditions que le dosage de l'ATP total.

La quantité d'ATP (x), exprimée en pg, provenant des microorganismes de 0,1 ml d'échantillon dilué est :

$$x = \frac{URL_1 - URL_0}{URL_2 - URL_1} \cdot a$$

où a est la quantité en pg, d'ATP standard rajoutée.

Si F est la dilution, la concentration d'ATP en pg par ml est 10 x F.

2°) *Mesure après concentration du milieu.*

Un volume de 10 ml d'échantillon, ou plus si c'est nécessaire, est filtré sur une membrane d'une porosité de 0,45 µm et d'un diamètre de 13 mm. Les microorganismes retenus sur la membrane sont lavés par passage de 1 ml d'eau stérile. La membrane est placée dans une petite boîte de Petri et arrosée de 0,25 ml de milieu Lumacult ™. On laisse incuber quelques minutes pour permettre le rétablissement d'un taux normal d'ATP dans la cellule, après le choc provoqué par la filtration. La perméabilisation nécessaire est réalisée par addition directe sur la membrane de 0,25 ml de réactif NRB®. On prélève alors 0,2 ml dans un tube de mesure et après addition de 0,1 ml de réactif de bioluminescence on lit le nombre d'URL correspondant aux microorganismes de la prise d'essai, soit URL_1. La standardisation interne par addition d'ATP conduit à la valeur URL_2, la quantité d'ATP, en pg pour la prise d'essai est :

$$\frac{URL_1}{URL_2 - URL_1} \cdot a$$

Si l'on a filtré n ml d'échantillon pour le dosage, la quantité d'ATP en pg par ml est :

$$\frac{URL_1}{URL_2 - URL_1} \cdot \frac{a}{n} \cdot 2{,}5$$

II. — DETERMINATION DU TAUX D'ATP PAR CELLULE DE MICROORGANISME VIVANT.

Le dosage de l'ATP intracellulaire après dilution du milieu a été appliqué pour le dénombrement de levures et de bactéries lactiques de vin cultivées dans les milieux de culture habituels au laboratoire. La comparaison de ces résultats à ceux de la méthode de numération par comptage de colonies formées sur milieu solide a permis de calculer le taux d'ATP par cellule.

1°) *Cas des levures.*

Les premiers essais ont été effectués avec une souche de *Saccharomyces cerevisiae.* Les divers échantillons ont été prélevés en même temps pour les deux déterminations. La figure 2 indique la corrélation existant entre les résultats obtenus.

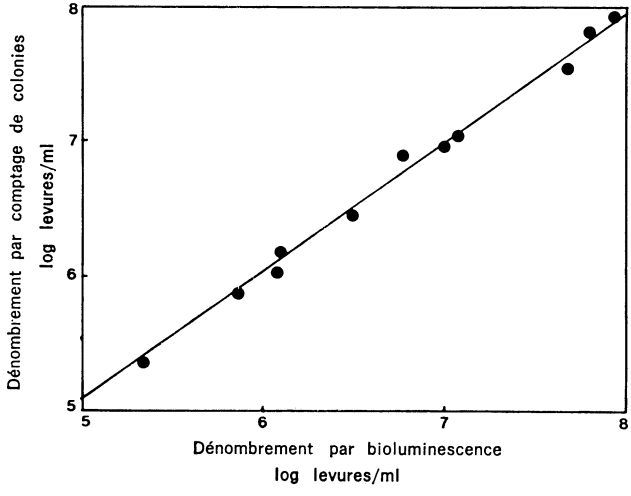


Fig. 2. — Corrélation entre la méthode traditionnelle et la méthode par bioluminescence après dilution, pour le dénombrement de levures

Lorsqu'on rapporte les résultats des dénombrements par dosage de l'ATP au comptage des colonies de *Saccharomyces cerevisiae,* on constate que l'on peut attribuer une concentration moyenne voisine de 100 fg d'ATP par cellule de levures (1 fg = femtogramme 10^{-15} g). (Tableau I).

Cette concentration est restée constante pendant 24 jours de culture de la levure. La figure 3 montre l'évolution de la population levurienne

TABLEAU I

Teneur moyenne en ATP des cellules de Saccharomyces cerevisiae

Teneur en ATP des cellules en suspension dans 1 ml	Nombre de colonies par ml	Teneur moyenne d'ATP par cellule (fg)
$4,7.10^9$	$3,4.10^7$	138
$9,8.10^8$	9.10^6	109
14.10^9	12.10^7	116
$5,7.10^8$	8.10^6	71
12.10^8	11.10^6	109
74.10^6	75.10^4	99
22.10^7	23.10^5	96
13.10^8	15.10^6	87
33.10^8	30.10^6	110
31.10^8	29.10^6	107
$48,5.10^8$	45.10^6	108
80.10^6	70.10^6	114
84.10^6	75.10^6	112
$11,5.10^9$	$9,6.10^7$	119
$85,5.10^8$	86.10^6	99
$61,7.10^8$	65.10^6	95

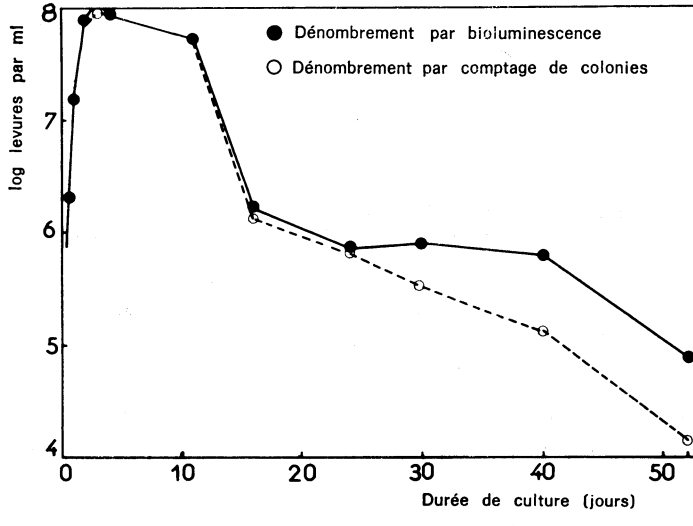


Fig. 3. — Evolution de la population levurienne pendant une culture dénombrée par la méthode traditionnelle et la bioluminescence

mesurée par les deux méthodes. A partir du 24e jour on constate que les résultats sont légèrement différents.

Par ailleurs, on a mesuré le taux d'ATP par cellule pour d'autres souches de levures de la collection de l'Institut d'Œnologie. Les mesures sont réalisées pour chacune des souches après un temps de culture identique. Les résultats (tableau II) pour toutes les souches testées sont voisins de 100 fg par cellule, ce qui correspond aux données d'autres auteurs (HYSERT et *al.*, 1976).

TABLEAU II

Teneur en ATP des cellules de différentes levures

Levures		Teneur en ATP d'une cellule (fg)
Genre et espèce	Souche n°	
Sacch. cerevisiae	76	100
Sacch. cerevisiae	74	124
Sacch. cerevisiae	5	104
Sacch. rosei	29	118
Sacch. rosei	77	116
Sacch. rosei	44	110
Sacch. bayanus	16	100
Sacch. bayanus	18	106
Sacch. bayanus	20	104
Sacch. bayanus	21	112
Sacch. bailii	24	83
Sacch. bailii	26	102
Saccharomycodes	38	111

Finalement, le nombre de cellules par millilitre est calculé en divisant par 100 le résultat du dosage de l'ATP. En reprenant les calculs précédents, le nombre de levures par millilitres est de :

$$\frac{URL_1 - URL_0}{URL_2 - URL_1} \cdot a \cdot F \cdot 10^2$$

2°) *Cas des bactéries lactiques.*

Des souches de différentes bactéries lactiques sont cultivées en milieu synthétique. Les populations sont dénombrées par comptage des colonies

sur boîte de Petri et on dose l'ATP. Il apparaît (tableau III) que le taux moyen d'ATP par cellule est de l'ordre de 1 fg, pour toutes les souches.

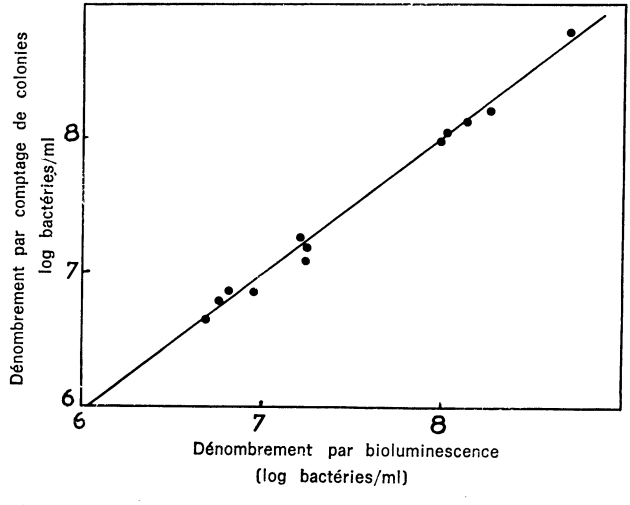
Pour une population bactérienne le résultat du dénombrement, exprimé en bactéries par millilitre, par bioluminescence après dilution est donné par la formule suivante :

$$\frac{URL_1 - URL_0}{URL_2 - URL_1} \cdot a \cdot F \cdot 10^4$$

TABLEAU III

Teneur moyenne en ATP des cellules de différentes bactéries lactiques

Bactéries lactiques		Teneur en ATP d'une cellule (fg)
Genre et espèce	Souche N°	
Leuconostoc mesenteroïdes	L 771	1,0
Pediococcus cerevisiae	Y_9 791	0,8
Lactobacillus hilgardii	BC_2	1,2
Lactobacillus hilgardii	Y_9 792	1,3
Lactobacillus brevis	Saut.772	1,1
Lactobacillus plantarum	A 8014	1,1



Rig. 4. — Corrélation entre la méthode de comptage de colonies sur boîtes et la bioluminescence après dilution pour le dénombrement de bactéries lactiques.

Une souche de *Leuconostoc mesenteroïdes* et une de *Lactobacillus hilgardii* sont cultivées en milieu synthétique, on a dénombré les populations par comptage de colonies sur boîte et par bioluminescence en prenant comme valeur moyenne d'ATP, 1 fg par cellule. Les résultats représentés sur la figure 4, pour l'ensemble des deux souches, indiquent une bonne corrélation entre les deux méthodes de numération.

TABLEAU IV

Répétabilité du dénombrement des bactéries lactiques par ccmptage des colonies et par bioluminescence

N°	Nombre ($x10^8$) de bactéries lactiques par ml	
	Méthode par bioluminescence	Méthode par comptage des colonies
1	41	42
2	46	50
3	38,4	42
4	34,4	40
5	36,1	43
6	40,8	45
7	38,7	36
8	32,2	40
9	40,4	39
10	41,3	40
Moyenne	38,9	41,7
Ecart-type	3,9	3,8
Coefficient de variation (%)	10%	9%

On a également comparé les résultats de séries de répétitions de dénombrement sur une suspension de coques (tableau IV). Les tests statistiques de comparaison des moyennes et des variances montrent qu'il n'existe aucune différence entre les résultats et les performances des deux méthodes comparées.

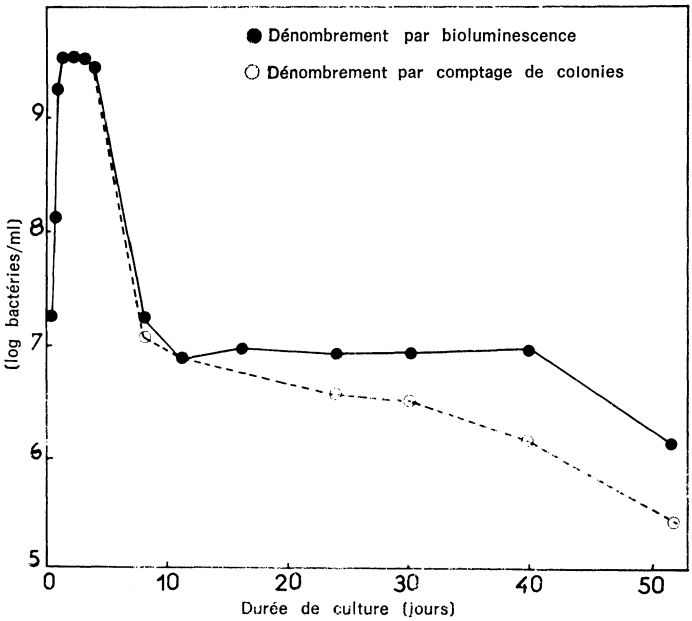


Fig. 5. — Evolution de la population de *Lactobacillus hilgardii* pendant une culture dénombrée par la méthode traditionnelle et bioluminescence

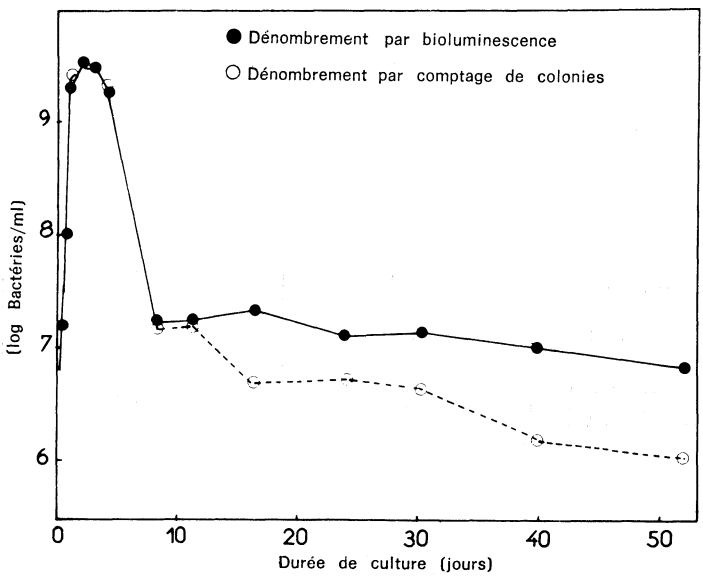


Fig. 6. — Evolution de la population de *Leuconostoc mesenteroïdes* pendant une culture dénombrée par la méthode traditionnelle et bioluminescence

Les figures 5 et 6 montrent les résultats des deux méthodes de comptage au cours des cultures de deux souches bactériennes pendant plusieurs semaines. On constate une bonne concordance entre les deux méthodes au début de la culture et pendant 11 jours. Les résultats sont différents par la suite. En effet, le nombre de bactéries viables, c'est-à-dire capables de former une colonie sur boîte de Petri, diminue ; au contraire la population déterminée par dosage de l'ATP reste pratiquement constante. CHAPELLE et *al.* (1978) ont également observé ce phénomène sur une culture d'*Escherichia coli* prolongée pendant plus de 15 jours. Ces auteurs pensent que les bactéries perdraient leur viabilité tout en conservant un métabolisme actif.

Les relations entre la teneur en ATP, ,la capacité à former des colonies et l'activité métabolique des microorganismes de cultures âgées doivent être précisées. Il est important de savoir si les microorganismes restant dans le vin plusieurs mois après leur phase de croissance active sont encore capables de métaboliser certains substrats alors qu'ils ne sont plus viables.

III. — DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES PAR BIOLUMINESCENCE APRES CONCENTRATION DE L'ECHANTILLON.

La concentration des microorganismes par filtration sur membrane est la technique la mieux adaptée au contrôle des vins finis ; la filtration permet en même temps de concentrer les microorganismes et d'éliminer le milieu.

Les essais sont conduits avec les mêmes souches de levures et de bactéries lactiques que précédemment. Les souches pures cultivées sur les milieux habituels sont mises en suspension dans des vins stériles, afin de constituer les échantillons à doser. Quelques déterminations sont réalisées avec des vins qui contenaient naturellement des levures, c'est-à-dire dans des conditions normales de la pratique. Une première série de manipulations a permis de tester le rôle du Lumacult ™. Des répétitions de 10 dosages sont réalisées pour chaque échantillon ; dans une série le filtre chargé des microorganismes est incubé dans le Lumacult ™ avant traitement au NRB®, dans l'autre, la perméabilisation suit directement la filtration. Une étude préalable a permis de préciser que le temps convenable d'incubation du filtre dans le Lumacult est de 40 minutes pour les levures et 10 minutes pour les bactéries.

La comparaison de ces séries de mesures montre que l'utilisation du Lumacult ™ est nécessaire et possède deux effets positifs, sur la répétabilité de la mesure et sur le résultat lui-même.

Les écarts-types des séries sont plus importants lorsqu'on n'utilise pas le Lumacult (tableau V).

TABLEAU V

Influence du Lumacult sur les coefficients de variation pour le dénombrement par bioluminescence après filtration

Sans Lumacult	Avec Lumacult
0,39	0,16
0,23	0,09
0,25	0,16
0,20	0,16
0,23	0,05
0,12	0,21
0,29	0,025
0,14	0,19
0,34	0,02
-	0,07
moyenne = 0,24	moyenne = 0,11

La mesure est donc plus répétable si le filtre est incubé dans le Lumacult. Mais ce phénomène peut être un artefact provoqué par le transfert des microorganismes du milieu de culture à un milieu favorable tel que le vin. En effet, lorsque les échantillons concernent des microorganismes qui s'y étaient développés normalement, les coefficients de variations sont identiques.

Mais, que les microorganismes soient indigènes ou non, les résultats des dénombrements sont toujours supérieurs lorsque le filtre est traité au Lumacult et correspondent mieux aux résultats des comptages de colonies sur boîtes (tableau VI). Dans la suite de ce travail, les dosages sont toujours réalisés après incubation du filtre dans le Lumacult ™.

Nous avons comparé les résultats de cette méthode et ceux de la numération sur boîtes. Les équations des droites de régression obtenues et les coefficients de corrélation sont indiqués dans le tableau VII.

Les résultats obtenus par dénombrement sur boîtes sont toujours légèrement plus élevés que les autres. La corrélation entre les deux méthodes est meilleure avec les levures indigènes ; on retrouve probablement là l'artefact déjà signalé pour les microorganismes de cultures transférés dans le vin.

Dans une dernière manipulation, on a comparé les répétabilités obtenues pour le dénombrement d'une population de coques par biolumi-

TABLEAU VI

Comparaison des résultats du dénombrement des micoorganismes par bioluminescence et par comptage des colonies

Les chiffres représentent le nombre de cellules par ml

Méthode par bioluminescence		Méthode par comptage des colonies
sans Lumacult	avec Lumacult	
$7,8.10^2$	29.10^2	54.10^2
2.10^2	8.10^2	15.10^2
6.10^2	12.10^2	48.10^2
2.10^2	6.10^2	12.10^2
7.10^3	10.10^3	20.10^3
5.10^2	$4,5.10^2$	5.10^2
2.10^2	3.10^2	$3,4.10^2$
$2,4.10^4$	5.10^4	15.10^4
18.10^3	58.10^3	66.10^3
11.10^4	16.10^4	18.10^4
14.10^4	13.10^4	18.10^4
5.10^4	9.10^4	$9,5.10^4$
$1,2.10^3$	26.10^3	60.10^3
$2,2.10^3$	40.10^3	85.10^3

nescence et méthode classique. Dix prélèvements de la même suspension ont été dosés. La moyenne des résultats obtenus et les coefficients de variation sont identiques pour les deux méthodes (tableau VIII) ; il n'y a aucune différence significative.

DISCUSSION

Les résultats obtenus au laboratoire sur milieux de culture et sur vin enrichi en levures et en bactéries montrent qu'il est possible de faire appel à la bioluminescence pour le dénombrement des microorganismes du vin. D'ores et déjà nous l'utilisons couramment au laboratoire pour contrôler les cultures des différents microorganismes étudiés. Pour l'appli-

cation au contrôle microbiologique des vins quelques mises au point sont nécessaires. Dans un premier temps nous devons trouver le moyen de différencier les levures et les bactéries. Le NRB, en effet, perméabilise de la même façon les deux types de microorganismes. Actuellement, nous pouvons suivre la population levurienne au cours de la fermentation alcoolique : la présence de bactéries dans l'échantillon intervient peu sur le résultat final puisqu'une bactérie contient cent fois moins d'ATP qu'une levure. La situation est différente lors de la fermentation malolactique. Les bactéries se multiplient mais les levures sont encore nombreuses ; compte tenu de leur taux d'ATP élevé leur présence rend le résultat du dosage par bioluminescence tout à fait erroné.

TABLEAU VII

Equations des droites de régression log y = a log x + b
y = dénombrement par comptage des colonies
x = dénombrement par bioluminescence après filtration

	Equation	Coefficient de corrélation
Saccharomyces cerevisiae	1,19 log x - 0,336	0,965
Levures "indigènes"	0,96 log x + 0,103	0,999
Bactéries lactiques	0,97 log x + 0,397	0,965

TABLEAU VIII

Comparaison des répétabilités des méthodes de dénombrement par comptage des colonies et par bioluminescence après filtration

	Moyenne cellules par millilitre	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
Bioluminescence	113.10^3	5,2	4,5
Comptage des colonies	117.10^3	5,6	4,8

Par ailleurs, il est indispensable d'abaisser le seuil de détection ; actuellement, nous ne pouvons pas dénombrer moins de 10 levures par millilitre. La filtration de volumes plus importants, lorsque la filtrabilité de l'échantillon le permet, est un moyen d'augmenter la sensibilité.

La bioluminescence est applicable au contrôle de la stérilité des échantillons : on mesure l'ATP après multiplication des microorganismes pendant 10 à 20 heures. La méthode consiste à mettre en culture, dans un milieu optimum, la membrane après filtration de l'échantillon. Si la mesure d'ATP est nulle après incubation, on peut conclure à la stérilité complète de l'échantillon. A titre d'exemple, dans un cas particulier, nous avons obtenu une réponse équivalente à 10^3 bactéries par millilitre après 18 heures alors que le résultat du comptage sur boîtes était de 0 bactérie par millilitre avant incubation. On peut conclure que l'échantillon n'était pas stérile ; mais il n'est pas possible d'extrapoler pour connaître la population au temps zéro, à partir du chiffre obtenu après 18 heures d'incubation.

CONCLUSION

La technique présente plusieurs avantages par rapport à la méthode de comptage de colonies.

Les manipulations sont simples et consistent seulement à additionner des réactifs dans une cuve de mesure. Mais surtout, les résultats sont obtenus beaucoup plus rapidement qu'avec les méthodes traditionnelles qui nécessitent un délai de plusieurs jours. C'est évidemment ce qui constitue l'avantage primordial de la technique de numération par bioluminescence. Nous poursuivons les mises au point nécessaires à l'obtention des performances compatibles avec les impératifs de l'œnologie.

Manuscrit reçu le 6 septembre 1982 ; accepté pour publication le 28 octobre 1982.

RESUMÉ

La bioluminescence a été appliquée au dénombrement des microorganismes du vin. Il existe une excellente corrélation avec la numération par comptage des colonies sur boîtes de Petri. La simplicité de la manipulation et la rapidité d'obtention des résultats sont les principaux atouts de cectte méthode. Toutefois, des recherches sont encore nécessaires, d'une part, pour différencier les levures et les bactéries et, d'autre part, pour abaisser le seuil de détection.

SUMMARY

Bioluminescence was applied to enumerate the microorganisms present in wine. An excellent correlation is obtained by counting colonies grown in Petri dishes. The simplicity of the manipulations and the rapid obtention of results are the principal benifits of this method. Research is still necessary both in the differentiation of yeasts and bacteria and the reduction of te threshold of detection.

ZUSAMMENFASSUNG

Um die Zalh der Mikroorganismen im Wein festrustellen, wurde die Bioluminesczens angewandt. Diese Methode korreliert sehr gut mit der Kolonienzählung auf Petrischalen. Die einfache Handhabung sowie die Schnelligkeit, sind die

wichtigsten Fürsprecher dieser Methode. Durchaus muss noch erforscht werden wie einerseits die Hefen von den Bakterien differenziert werden können und andererseits um das Detektions-niveau noch herabzusetren.

RESUMEN

La bioluminiscencia se ha aplicado al recuento de los microorganismos del vino y existe una correlación excelente con el conteo de colonias realizado sobre placas Petri. La sencillez de manipulación y la rapidez en la obtención de los resultados son las principales ventajas de este método. No obstante, todavia es necesario profundizar, por un lado, para diferenciar levaduras y bacterias y por otro para rebajar el umbral de detección.

RIASSUNTO

La bioluminescenza é stata applicata al censimento dei microorganismi del vino. Esite un eccelente correlazione con la numerazione con conteggio delle colonie su scatole di Petri. La simplicità della manipolazione e la celerità d'obttenzione dei risultati sono i dati principali di questo metodo.

Tuttavia ricerche sono ancora necessarie, da una parte per distinguere i lieviti e le batterie, dall'altra per ridurre la soglia di rivelazione.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAUMGART J., FRICKE K. et HUY C., 1980. Schnellnach weeis von Mikroorganismen in naturlichen Mineralwässern durch bestimmung von ATP mit einem Biolumineszeuz-Verfahren. *Alimenta,* **19**, 37-40.

BOSSUYT R., 1981. Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *Milchwissenschaft,* **36**, N° 5, 257-260.

CHAPPELLE E.W., PICCIOLO G.L. and DEWING J.W., 1978. Determination of bacterial contents in fluids. In *Methods in Enzymology,* **57**, 65-72.

Mc ELROY W.D. et GREEN A., 1956. Function of ATP in the activation of luciferin. *Arch. Biochem. Biophys,* **64**, 257-271.

HYSERT D.W., KOVECSES and MORRISON N.M., 1976. A Firefly bioluminescence ATP assay method for rapid detection and enumeration of brewery microorganisms. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.,* **34**, N° 4, 145-150.

LAFON-LAFOURCADE S. et JOYEUX A., 1979. Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins. *Connaissance Vigne Vin,* **13**, N° 4, 295-310.