

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN

EEN METHODE VOOR HET AANTOONEN VAN BOTER-
ZUURBACTERIËN, SPECIAAL GESCHIKT VOOR HET
ONDERZOEK VAN MELK

DOOR

J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE

(Ingezonden 8 Juni 1940)

Inleiding

Boterzuurbacteriën van het type *Clostridium tyrobutyricum* zijn voor de kaasmakerij schadelijk. Zij kunnen in de kaas gebreken van ernstigen aard veroorzaken door de gasvorming, welke bij hun stofwisselingsproces optreedt. Deze gebreken zijn vroeger beschreven, zoowel voor Edammer (1) als voor Goudsche (2) kaas. Het nadeel is daarom zoo groot, omdat de gasvorming nog langen tijd na de bereiding kan beginnen. Daarom komt het voor, dat kaas in goeden toestand afgeleverd wordt en pas daarna de verschijnselen van boterzuurgisting gaat vertoonen. Hierin bestaat een groot verschil met de door de bacteriën der coli-aerogenes-groep in kaas veroorzaakte gasontwikkeling. Deze laatste gisting vindt in de eerste dagen na de bereiding van de kaas plaats, b.v. reeds onder de pers of tijdens de pekeling. Dit verschil wordt veroorzaakt door de omstandigheid, dat de gisting door coliachtigen een suikervergisting is en dus alleen kan geschieden zoolang in de kaas nog melksuiker aanwezig is; dat is dus slechts gedurende korten tijd, omdat weldra de lactose in de kaas door de melkzuurbacteriën geheel in melkzuur omgezet is. De in kaas werkzame boterzuurbacteriën daarentegen vormen hun gistingsgas, bestaande uit waterstof en koolzuur, uit melkzuur of melkzure zouten, zoodat ook in oudere kaas nog altijd de stof, die de boterzuurbacteriën voor hun gisting noodig hebben, beschikbaar is en, indien de omstandigheden hiervoor gunstig zijn, een gasvorming kan optreden.

Ook in andere landen worden de boterzuurbacteriën als een groot gevaar voor de kaas beschouwd, b.v. in Zwitserland. In een recent artikel van ORLA JENSEN (3) worden zij door hem zelfs „vijand n°. 1 in de kaasbereiding” genoemd.

De besmetting met boterzuurbacteriën kan op verschillende wijzen tot stand komen. Boterzuurbacteriën komen zeer verbreid voor in grond- en slootwater. De mest der koeien, welke een der belangrijke besmettingsbronnen voor de melk is, zal dus ook steeds boterzuurbacteriënsparen

bevatten, omdat bij het grazen steeds met het gras eenige grond meegaat. De hierdoor mogelijke besmetting is echter in het algemeen slechts gering, omdat het aantal door de koe op deze wijze opgenomen boterzuurbacteriënsporen slechts gering is en bovendien de meeste der in den grond aanwezige boterzuurbacteriën tot het voor kaas ongevaarlijke type *Cl. saccharobutyricum* behooren. De besmettingskans wordt groot als de melk in het melkwinnings- of -verwerkingsbedrijf met stoffen in aanraking komt, waarin een sterke ontwikkeling van boterzuurbacteriën heeft plaats gehad en de melk dus a. h. w. aan een infectie met cultures van boterzuurbacteriën is blootgesteld. Dan is er dus kans, dat de melk of de kaas grotere aantallen van deze bacteriën zal bevatten. Deze mogelijkheid kan in de practijk op twee wijzen vervuld worden, nl. door de aanwezigheid van vuilhaarden in melk- of kaasmaakgereedschap en door de voeding met silage (kuilvoer), waarin een boterzuurgisting heeft plaats gehad. Wat de eerste wijze betreft, hebben b.v. naden in kliener of roerhek en kaasbak een zekere beruchtheid gekregen. Over de aanwezigheid van *Cl. tyrobutyricum* in silage hebben wij reeds een aantal mededeelingen gedaan (4).

Met het oog op het gevaar van boterzuurgisting in de kaas is het dus gewenscht boterzuurbacteriënvrije melk te gebruiken. Dit geldt voornamelijk in den zomer en in de lente, als de kans op hoogere buitentemperatuur grooter wordt, want de boterzuurgisting is zeer gevoelig voor hoogere temperatuur.

Het is daarom nuttig een methode te bezitten, waarmede op zoo eenvoudig mogelijke wijze bepaald kan worden of melk merkbaar met boterzuurbacteriën besmet is. Een dergelijke methode zou gebezigd kunnen worden bij de kwaliteitsbeoordeling van melk en bij de contrôle aan de fabriek op de geleverde melk.

Oudere methoden

Voor het aantonen en eventueel kwantitatief bepalen van boterzuurbacteriën kan een directe methode, b.v. door plaatcultuur, niet gebruikt worden, daar de boterzuurbacteriën anaerob zijn. Men is dus gedwongen om de methoden der electieve cultuur te hulp te roepen, d. w. z. zoodanige voorwaarden voor de kweeking te scheppen, dat alleen de boterzuurbacteriën tot ontwikkeling komen. Deze methode is van oudsher door bacteriologen gebruikt om speciale bacteriën uit mengsels van vele bacteriesoorten te isoleeren. Boterzuurbacteriën werden b.v. door PASTEUR en later door BEYERINCK verkregen door grond te enten in speciaal samengestelde

voedingsvloeistoffen en deze op bijzondere manier te behandelen. BEYERINCK verkreeg boterzuurgistingen door suikerhoudende vloeistoffen met grond even en op te koken en deze van de lucht afgesloten te bewaren.

BOEKHOUT en OTT DE VRIES (1) gebruikten voor het aantoonen van boterzuurbacteriën in kaas buizen vleeschbouillon met $\frac{1}{2}$ % pepton, $\frac{1}{2}$ % glucose en $\frac{1}{2}$ % galactose. Na de enting met kaas worden deze buizen luchtledig gepompt en dichtgesmolten, waarna gepasteuriseerd wordt om de niet-sporevormende bacteriën te doden. Na plaatsen bij 20°C gaat men na of gisting optreedt en bij opening der buizen na het einde der gisting kan aan den geur beoordeeld worden of de gisting een boterzuurgisting was.

BURRI (5) gebruikte een soortgelijke methode, doch in plaats van in vleeschbouillon-suiker entte hij in vleeschbouillon-glucose-agar. Ook dan wordt gepasteuriseerd en bij kweken op een temperatuur van 30°C wordt gisting zichtbaar door spleten in de agar. Door met verschillende hoeveelheden (1; 0,1; 0,01 enz. g) te enten, kon hij een oordeel over het aantal in het te onderzoeken materiaal aanwezige boterzuurbacteriën krijgen. Deze methode werd gebruikt voor silage- en kaasonderzoek.

RUSCHMANN (6) beval voor het aantoonen van boterzuurbacteriën aardappelbrij, gemengd met calciumcarbonaat, aan en kon eveneens door enting van de te onderzoeken stof in verschillende verdunningen een schatting maken van het aantal boterzuurbacteriën. RITTER (7) vergeleek deze met de methode BURRI en achtte de laatste beter. VAN BEYNUM en PETTE (8) achtten het een bezwaar van de aardappelbrijmethode, dat de gebruikte voedingsbodem aan *Cl. saccharobutyricum* betere ontwikkelingskansen biedt dan aan *Cl. tyrobutyricum*.

De nieuwe methode

Bij onze studies over boterzuurbacteriën (8), waarbij wij boterzuurbacteriën isoleerden uit verschillende bronnen, maakten wij van verschillende isolatiemethoden gebruik. Bij één dezer methoden bezigden wij melk als hoofdbestanddeel van den voedingsbodem en in den loop der jaren zijn wij ons bewust geworden van het groote voordeel, dat melk in voedingsvloeistoffen voor boterzuurbacteriën heeft. Het is een goedkope stof en de bereiding van den voedingsbodem is geen tijdroovende bezigheid, zooals b.v. bij vleeschbouillon. Een bijzonder voordeel van het gebruik van melk is gelegen in de omstandigheid, dat voor het aantoonen van boterzuurbacteriën in melk de te onderzoeken melk zelf als hoofdbestanddeel der voedingsvloeistof gebruikt kan worden. Voor het geval men de hieronder nader te beschrijven methode gebruiken wil voor het aantoonen van

boterzuurbacteriën in grond, silage, kaas, water enz. gebruike men in den voedingsbodem dus gesteriliseerde melk.

Melk alleen echter is niet geschikt als voedingsvloeistof voor de boterzuurbacteriën. Wij weten nl., dat reincultures van de soort *Cl. tyrobutyricum*, die ons uit een oogpunt van kaasbereiding juist het meest interesseert, in melk niet groeien, daar *Cl. tyrobutyricum* lactose niet aantast. De melk moet dus voor de ontwikkeling van deze bacterie uit het oogpunt der koolstofvoeding geschikt gemaakt worden door toevoeging van glucose. Wij voegen hiervan 0,5 % toe, nl. door per 50 ml melk met een steriele pipet 1 ml gesteriliseerde 25 % glucose-oplossing toe te voegen.

Hoewel de melk hierdoor een goede voedingsbodem voor alle boterzuurbacteriën is geworden, is zij eveneens, met of zonder glucose, een goede bodem voor tal van andere bacteriën. Om de ontwikkeling van deze andere bacteriën onmogelijk te maken, moeten nog meer maatregelen genomen worden.

Door een pasteurisatie worden alle niet-sporevormende bacteriën vernietigd. Coliachtige bacteriën, die ook gistingverschijnselen zouden veroorzaken, en melkzuurbacteriën, die door zuring den groei der boterzuurbacteriën zouden verhinderen, worden op deze wijze onschadelijk gemaakt. De pasteurisatie geschiedt door verhitting op 80° C gedurende 10 minuten.

Door anaerob kweeken, hetgeen voor boterzuurbacteriën noodzakelijk is, worden aerobe sporevormers onderdrukt.

We hebben nu de groeimogelijkheid beperkt tot die van anaerobe sporevormers, maar dit is nog niet voldoende, daar melk of andere stoffen, die wij op boterzuurbacteriën wenschen te onderzoeken, veelal anaerobe sporevormende rottingsbacteriën bevatten, die ons veel hinder bezorgen, omdat zij ook wat gas vormen en een geur veroorzaken, die den boterzuurgeur geheel bedekt. Deze bacteriën zijn dikwijls in nog grooter aantal aanwezig dan de boterzuurbacteriën, zoodat zij in een boterzuurbacteriënproef gemakkelijk de overhand krijgen. Dit is b.v. het geval bij kuilvoer van slechte kwaliteit. Rottingsbacteriën zijn echter tamelijk gevoelig voor zuur en daar boterzuurbacteriën een hooger zuurgraad kunnen verdragen, ligt hier de mogelijkheid om den groei der eerstgenoemde te belemmeren. Theoretisch zou een voedingsbodem met pH 4,5—4,2 geschikt zijn. Wij constateerden bij onze silageonderzoekingen nl. groei van rottingsbacteriën bij pH-waarden boven 4,5 à 4,6. HOSTETTLER en ZOLLIKOFER (9) geven aan, dat de pH-grens voor rottingsbacteriën bij 4,76 ligt. Doch bij dergelijk hooge zuurgraden wordt de groei der boterzuurbacteriën sterk vertraagd. Het bleek ons, dat het brengen van den voedingsbodem op een pH van ongeveer 5,5 reeds voldoende is om den groei der rottingsbacteriën genoegzaam

te onderdrukken, terwijl de boterzuurbacteriën hierbij niet noemenswaard in hun ontwikkeling geremd worden. Men bereikt den goeden zuurgraad door per 50 ml melk 1 à 1,5 ml n/l zuur toe te voegen. Men kan hiervoor melkzuur, zoutzuur of zwavelzuur gebruiken.

Ook DORNER (10) vond, dat bij gebruik van zuur in de voedingsvloeistof de rottingsbacteriën benadeeld werden.

De temperatuur, waarbij gekweekt moet worden, is niet zoo belangrijk. Zij wordt hier in hoofdzaak bepaald door den practischen eisch het resultaat der proef zoo snel mogelijk te weten. Een temperatuur van 35° à 40° C is hiervoor het beste.

Met den beschreven voedingsbodem kan men gemakkelijk in melk of andere stoffen boterzuurbacteriën aantoonen. Wij willen er echter den nadruk op leggen, dat nog twee bezwaren niet ondervangen zijn. Het eerste bezwaar betreft den groei van facultatief anaerobe sporevormers van het type *Bacillus pabuli* (11), het tweede, dat in de gebruikte vloeistof zoowel *Cl. tyrobutyricum* als *Cl. saccharobutyricum* groeit. Wat dit laatste bezwaar betreft, kan men wel na het uitvoeren der proef door overenting in manniet-pepton, resp. gistautolysaat-natriumlactaat, zooals vroeger beschreven werd (8), nader trachten te differentieeren, doch dit kost veel tijd. Een directe methode, waarbij alleen *Cl. tyrobutyricum* wordt aangetoond, is nog niet gevonden.

Boterzuurbacteriën van het gelatine vervloeiende type vinden in de gekozen voedingsvloeistof een minder geschikten bodem. Daar zij bovendien blijkbaar in niet groote aantallen voorkomen, wordt de proef er in het algemeen niet nadeelig door beïnvloed.

Apparatuur

De eischen, welke aan de te gebruiken apparatuur gesteld moeten worden, zijn de volgende.

1. Anaerobe cultiveering moet mogelijk zijn.
2. Het gistingsgas moet zichtbaar zijn.
3. De geur der gegiste vloeistof moet bepaald kunnen worden.
4. Pasteurisatie moet kunnen geschieden.
5. De apparaatjes moeten gemakkelijk schoongemaakt kunnen worden.

De bekende Durhambuisjes zijn onbruikbaar, omdat de vloeistof ondoorzichtig is. Gistingsbuizen volgens Eichhorn zijn minder goed bruikbaar, omdat het tijdens de pasteurisatie of de gisting ontstane caseïnestolsel het schoonmaken bemoeilijkt. De uitvoeringswijze van Weinzirl (gewone cultuur-

buizen met paraffinepropafsluiting) heeft ons nooit voldaan, omdat: 1°. dikwijls gistingsgas ontsnapt; 2°. het beoordeelen van den geur zeer moeilijk is, daar de bovenlaag dikwijls bedorven is door tussehen glas en paraffineprop doorgeperste vloeistof, en 3°. de paraffineprop een snelle reiniging belemmert.

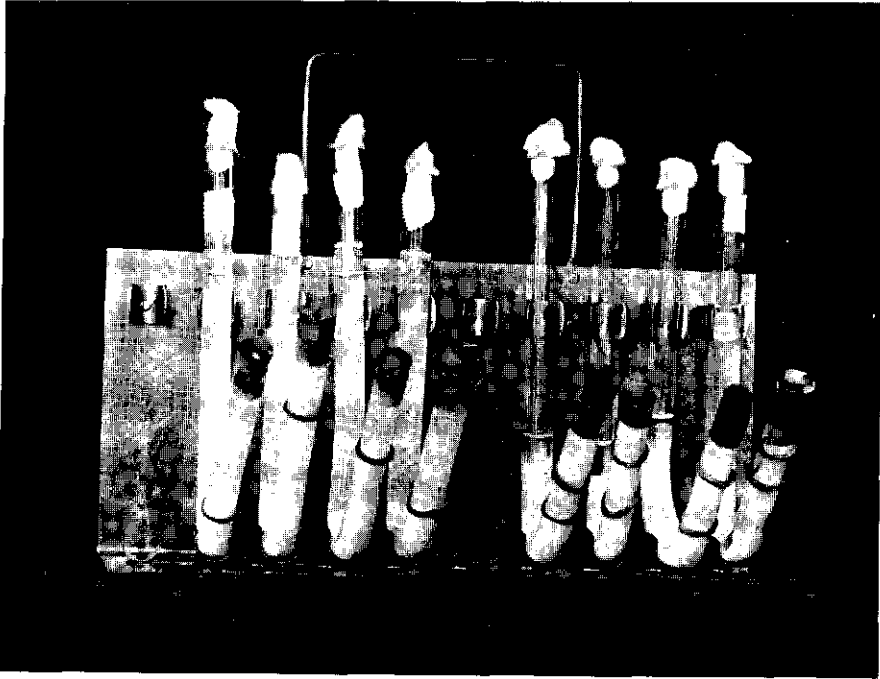
Wij gebruiken V-vormige glazen buizen, welke aan één zijde (het lange been) met watteprop en aan de andere zijde (het korte been) met rubberstop gesloten zijn. De grootte is zoodanig, dat de ruimte onder de rubberstop tot aan de bocht 10 ml inhoud heeft; de inwendige diameter der buizen zij niet kleiner dan 9 mm. Zij voldoen aan de bovengenoemde 5 voorwaarden. Anaerobe cultiveering is mogelijk, omdat de vloeistof in het lange been van de lucht kan worden afgesloten met een weinig paraffineolie. Het gistingsgas verzamelt zich zichtbaar in het korte been onder de rubberstop. De geur der gegiste vloeistof kan bepaald worden door afnemen van de rubberstop en eventueel uitgieten in een schaalpje. Pasteurisatie kan geschieden door zoo diep mogelijke indompeling in een waterbad; het lange been moet daarbij verticaal staan, opdat de met vloeistof gevulde deelen van de V-buizen geheel onder het waterniveau blijven. Door de afsluiting met rubberstop is schoonmaken van twee kanten af zeer eenvoudig en doeltreffend uit te voeren.

Uitvoering der boterzuurbacteriënproef

Verschillende wijzen van uitvoering zijn mogelijk. Bij alle moet evenwel de nadruk gelegd worden op steriliteit van het gebruikte glaswerk. V-buizen, pipetten en kolfjes moeten dus alle gesteriliseerd zijn. Wij bevelen zelfs aan om na de proef de buizen, welke een positieve boterzuurreactie gaven, vóór het schoonmaken ook te steriliseeren om besmetting van het laboratorium te voorkomen.

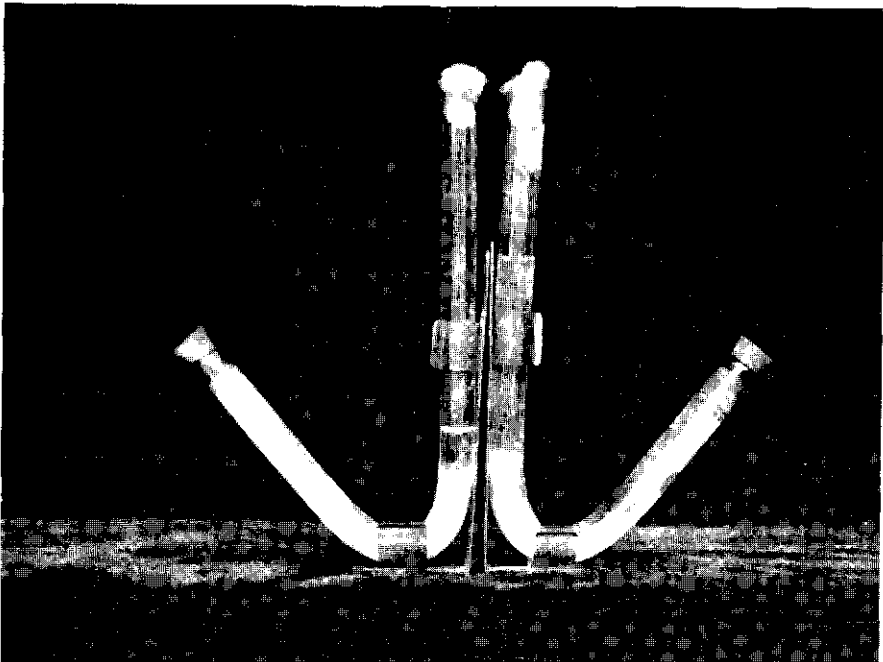
Het is noodzakelijk de proef in meervoud te nemen. Drievoud is wel het minimum. Wij voerden haar altijd in viervoud uit.

Wij gaan steeds als volgt te werk. Bij het onderzoek van melk wordt 50 ml van het te onderzoeken, goed gemengde monster met een gesteriliseerde pipet in een gesteriliseerd kolfje gebracht. Hierbij wordt onder voortdurend schudden met steriele pipetten 1 ml n/l zuur en 1 ml gesteriliseerde 25 % glucoseoplossing gevoegd. Met dit mengsel worden nu 4 V-buizen gevuld, zoodanig, dat na zwenken het geheele korte been onder de rubberstop en een zeer klein deel van het lange been gevuld is. Op het vloeistofoppervlak in het lange been wordt 1 ml gesteriliseerde paraffineolie gepipeteerd om de vloeistof van de lucht af te sluiten. Hierna worden de klaargemaakte buisjes in een rek geplaatst en gedurende 10 minuten in een waterbad van



Afb. 1

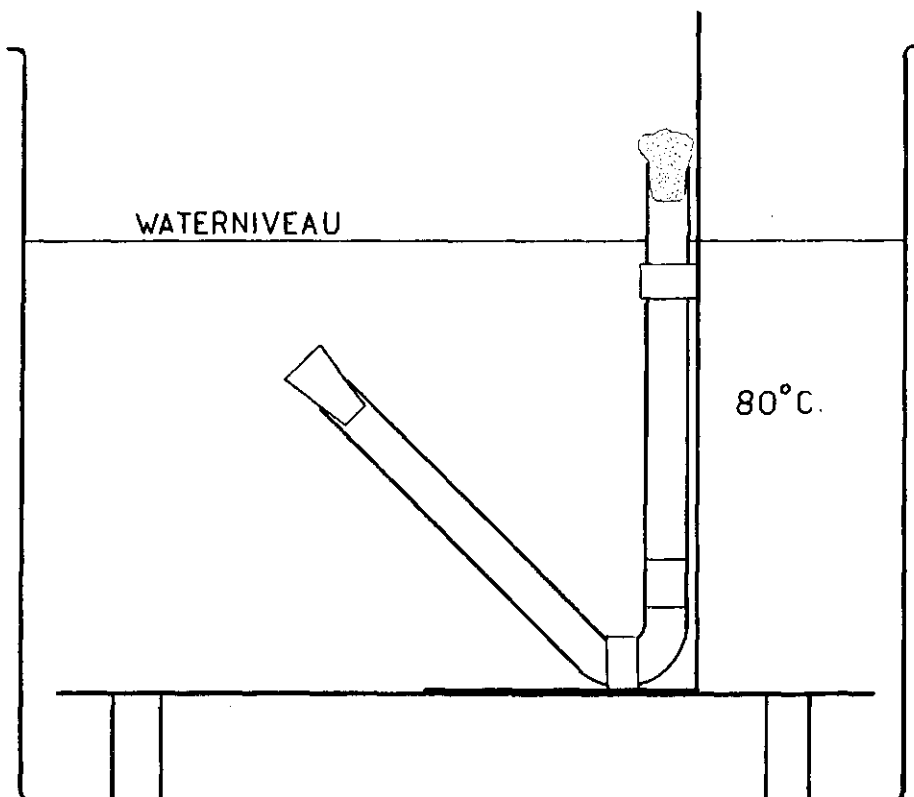
Rek met V-buizen. De 4 buizen links hebben alle gegist. De 4 buizen rechts zijn van een melkmonster met een zeer geringe boterzuurbacteriëninfectie; slechts 1 der 4 buizen vertoont gisting.



Afb. 2

2 V-buizen, waarvan in de eene wel en in de andere geen gisting opgetreden is. De gisting is ook duidelijk te constateeren door het gestegen vloeistofniveau in het lange been.

80° C gedompeld. Het niveau van het water in dit waterbad moet zóó hoog staan, dat slechts een klein deel (1 à 1,5 cm) van het lange been van de V-buis boven het wateroppervlak uitsteekt en het korte been geheel ondergedompeld is, zooals de figuur aangeeft. Na 10 minuten wordt het rek met



PASTEURISATIEWATERBAD

buisen in water van ongeveer 40° C afgekoeld en in een thermostaat van 35°—40° C geplaatst.

Tijdens het pasteuriseren stremt de melk door het toegevoegde zuur, doch dit is voor het verloop van de proef geen bezwaar.

Voor het onderzoeken van kleinere hoeveelheden melk (1 ml of 0,1 ml) wordt bij porties van 50 ml gesteriliseerde centrifugemelk 1 ml zuur en 1 ml glucoseoplossing gevoegd en een aantal van 4 V-buisen gevuld. In deze wordt nu 1 ml of 0,1 ml der te onderzoeken melk gebracht en door zwenken gemengd, waarna de verdere behandeling als boven geschiedt.

Voor het onderzoek van andere stoffen dan melk kan men op dezelfde wijze te werk gaan.

Een nadeel der bovenbeschreven methode is het gebruik van een gesteriliseerde pipet van 50 ml voor elk te onderzoeken monster melk. Men kan om dit te vermijden ook gebruik maken van kolfjes van b.v. 100 ml, waarop een merkstreep voor 50 ml is aangebracht, deze kolfjes door overschenken (met steriele voorzorgsmaatregelen) met 50 ml vullen en dan verder handelen als boven.

Ten slotte kan men de pasteurisatie ook uitvoeren vóórdat glucose en zoutzuur zijn toegevoegd, dus in het kolfje, waarin men 50 ml der te onderzoeken melk heeft gegoten. Men dompele daarbij dit kolfje dan ook weer zoo diep mogelijk in het pasteurisatiewaterbad om te verkrijgen, dat aan den wand van het kolfje geen melkdruppels ongepasteuriseerd blijven. Wij kunnen deze methode echter niet aanraden, omdat de pasteurisatie hierbij minder betrouwbaar is uit te voeren. Wij hebben echter ondervonden, dat bij deze methode minder last ondervonden wordt van den groei van de bovengenoemde facultatief anaerobe sporevormers (*B. pabuli*).

Beoordeeling der boterzuurbacteriënproef

Indien in de V-buizen boterzuurgisting optreedt, vindt deze plaats na 1 tot 5 dagen. Nagenoeg het geheele korte been vult zich daarbij met gas. Wij zagen, dat de ernst der besmetting b.v. ook afgelezen kan worden uit den tijd, na welken de gisting optreedt. Om echter de proef niet te onpractisch lang te geven, kan men haar na 3 dagen beëindigen. Een verblijf in den thermostaat gedurende 4 dagen is beter, doch het verschil met een driedaagsch verblijf is gering. Na 4 dagen wordt slechts in zeldzame gevallen nog een kleine toeneming van het aantal gistende buizen waargenomen.

Na het beëindigen der proef moet in ieder geval de geur van de gegiste vloeistoffen vastgesteld worden, liefst na uitgieten in een schaalje. Is er gasontwikkeling, dan kan men 4 soorten van geuren verwachten, nl. boterzuurgeur, geur van butylalkohol gemengd met boterzuur (soms ook aceton-geur), een zwak zuren geur (gelijkend op dien van melkzuur) en rottingsgeur. De buizen met een zwak zuren geur worden negatief gerekend, omdat in deze buizen de gisting veroorzaakt is door facultatief anaerobe bacteriën, de buizen met de andere genoemde geuren rekent men positief. De rottingsgeur, die in enkele buizen kan optreden bij zeer zware infecties met sporevormende rottingsbacteriën, is in de enkele gevallen, die men tegenkomt, zóó zwak, dat dikwijls boterzuur ook daarnaast geroken kan worden.

Ondervindt men moeilijkheden bij de geurbepaling, dan verdient het aanbeveling om in het schaalteje een weinig verdund zwavelzuur toe te voegen. Eventueele boterzuurgeur wordt dan veel krachtiger en is dus gemakkelijker te constateeren.

De niet gegiste buizen en die, waarin slechts weinig gas gevormd werd, worden niet verder onderzocht en als negatief beschouwd.

Gevoeligheid der boterzuurbacteriënproef

Wij mogen niet verwachten, dat men met de beschreven proef in staat is 1 boterzuurbacteriënspore per 10 ml melk aan te toonen. Niet alle boterzuurbacteriënsporen hebben een gelijk vermogen tot ontkieming en daarop volgende ontwikkeling in voedingsbodems. Wij namen vroeger bij onze studie over boterzuurbacteriën (8) herhaaldelijk waar, hoe bij verschillende boterzuurbacteriënstammen heel verschillende percentages cellen in de voedingsbodems tot ontwikkeling komen. DORNER (10) vermeldt in zijn onderzoek, dat bij 4 stammen in een agarvoedingsbodem slechts 0,09 tot 5 pro mille der sporen tot koloniën uitgroeide. Hierdoor is het onmogelijk om met enige thans bestaande methode, ook met de hier beschrevene, een bepaling uit te voeren van het aantal boterzuurbacteriën. Wij moeten er ons dus mede vergenoegen onderscheid te maken tusschen een negatieve proef, een zwak positieve en een positieve proef. Het practisch onderzoek, dat wij met behulp van deze boterzuurbacteriënproef hebben uitgevoerd en hetwelk in het hierop volgende artikel beschreven wordt, heeft evenwel doen zien, dat de proef negatief is in die tijden, dat geen besmetting met boterzuurbacteriën optreedt en positief als merkbare besmetting geschiedt. Hierdoor is men dus in staat de duidelijke besmettingen op te sporen en dit is voor de practijk voldoende.

Enkele gegevens over de boterzuurbacteriënproef

In het volgende geven wij enkele voorbeelden uit onze proefreeksen ter illustratie van het voorgaande.

Om te laten zien welken gunstigen invloed de toevoeging van het zuur op de onderdrukking van de rottingsbacteriën uitoefent, geven we in tabel I een overzicht van de proef in melk alleen en in dezelfde melk met glucose en zuur. Hierin beteekent een cijfer na hoeveel dagen een gisting optrad, welke later bij het openen der buis als boterzuurgisting werd herkend; *r* beteekent rottingsgeur (ook de niet-gegiste buizen werden hier dus op geur beoordeeld) en *r*, gevolgd door een cijfer, rottingsgeur en gisting na het aantal dagen als door het cijfer aangegeven. In het laatste geval kon

soms naast den rottingsgeur ook boterzuurgeur geconstateerd worden. Een geval van negatief verloop, dus geen gisting en geen geur, wordt voorgesteld door —.

Deze proeven werden genomen met versche melk van de Proefzuivelboerderij.

TABEL 1

Melk van	Proef in viervoud in							
	melk				melk-glucose-zuur			
28 Juli 1937	r	r	—	—	—	—	—	—
24 Aug. 1937	r	r	—	—	3	—	—	—
1 Sept. 1937	r	r	r	r	—	—	—	—
15 „ 1937	r	r	r	r	r 3	—	—	—
23 „ 1937	2	r	r	r	2	—	—	—
30 Nov. 1937	r 2	r 2	r 2	r	2	2	2	2
21 Dec. 1937	r 2	r 2	r	r	2	2	2	2
28 „ 1937	r 2	r 4	r 4	r	2	3	3	3
4 Jan. 1938	2	2	r 2	r	2	2	2	2
18 „ 1938	r 2	r 2	r 2	—	2	2	3	3
15 Febr. 1938	2	2	r 2	r	2	2	2	2
16 Maart 1938	2	r 2	r	r	2	2	3	3
23 „ 1938	r 3	r 3	r	r	2	3	3	r 4
1 April 1938	r	r	—	—	r 4	—	—	—
8 „ 1938	2	2	r	r	2	2	2	3
23 „ 1938	2	r	r	r	2	2	2	r 3
2 Mei 1938	r	r	—	—	3	—	—	—
16 „ 1938	r	—	—	—	—	—	—	—
30 „ 1938	r	r	—	—	—	—	—	—
15 Juni 1938	r	r	—	—	—	—	—	—
27 „ 1938	r	r	r	r	—	—	—	—
4 Juli 1938	r	—	—	—	—	—	—	—
13 „ 1938	—	—	—	—	—	—	—	—
10 Aug. 1938	r 3	r	—	—	3	—	—	—
2 Sept. 1938	r	r	—	—	5	—	—	—
30 „ 1938	r	r	r	—	r	—	—	—
19 Oct. 1938	r	r	—	—	r 2	—	—	—
28 „ 1938	r	r	r	r	—	—	—	—

In tabel 2 wordt een uittreksel gegeven uit proeven, waarin vergeleken werd een uitvoering in melk + zuur met eene in melk-glucose-zuur, om te laten zien hoe met de laatste voedingsvloeistof in het algemeen een grooter aantal buizen positief is. De aanduidingen hebben dezelfde beteekenis als in tabel 1.

In deze tabel zijn alle proeven uit de twee perioden, 4 Augustus 1937 tot 30 November 1937 en 14 Maart 1938 tot 30 April 1938, opgenomen. Vooral in de tweede der beide perioden, waarin de melk sterker besmet was dan in de eerste, is het verschil duidelijk.

TABEL 2

Melk van	Proef in viervoud in							
	melk + zuur				melk-glucoso-zuur			
4 Aug. 1937	2	—	—	—	—	—	—	—
11 " 1937	—	—	—	—	2	—	—	—
24 " 1937	—	—	—	—	3	—	—	—
1 Sept. 1937	—	—	—	—	—	—	—	—
15 " 1937	2	—	—	—	—	—	—	—
23 " 1937	2	2	r	r	2	2	—	—
29 " 1937	—	—	—	—	2	2	4	r
6 Oct. 1937	—	—	—	—	3	—	—	—
13 " 1937	r	—	—	—	2	r	—	—
26 " 1937	—	—	—	—	—	—	—	—
2 Nov. 1937	—	—	—	—	—	—	—	—
9 " 1937	—	—	—	—	—	—	—	—
16 " 1937	—	—	—	—	3	3	—	—
23 " 1937	—	—	—	—	—	—	—	—
30 " 1937	4	r	r	—	2	2	2	2
<hr/>								
14 Maart 1938	2	2	r 2	—	2	2	2	—
18 " 1938	2	2	—	—	3	3	3	3
23 " 1938	—	—	—	—	2	3	3	r 4
28 " 1938	—	—	—	—	3	3	—	—
1 April 1938	2	—	—	—	r 4	—	—	—
6 " 1938	—	—	—	—	3	3	—	—
11 " 1938	—	—	—	—	2	2	3	3
19 " 1938	3	—	—	—	3	3	3	3
25 " 1938	3	—	—	—	2	2	r 3	r 3
29 " 1938	2	r	—	—	3	3	4	—

Ook op andere wijze kunnen wij het verschil tusschen beide bodems demonstreeren. Tabel 3 geeft de uitkomsten van alle boterzuurbacteriën-

TABEL 3

Periode	Aantal proeven	Aantal proeven, waarin 1 of meer buizen positief was	Aantal proeven, waarbij		
			een hoger resultaat verkregen werd in		beide gelijk waren
			melk + zuur	melk-glucose-zuur	
28 Juli 1937 t/m 30 Nov. 1937	17	10	2	7	1
7 Dec. 1937 " 8 Maart 1938	14	14	0	6	8
11 Maart 1938 " 29 April 1938	10	10	1	8	1
2 Mei 1938 " 31 Oct. 1938	77	14	4	7	3
<hr/>					
Totalen	118	48	7	28	13

proeven, welke van 28 Juli 1937 tot en met 31 October 1938 genomen werden, verdeeld over 4 tijdvakken, zooals in kolom 1 vermeld is. Kolom 2 geeft aan hoeveel proeven in ieder dezer tijdvakken genomen werden. Hierbij was een aantal proeven, die in beide bodems negatief resultaat gaven. Het aantal proeven, waarbij in 1 of meer van het achttal buizen (als gewoonlijk werden de proeven zoowel met melk + zuur als met melk + glucose + zuur in viervoud gedaan) een positief resultaat genoteerd werd, vindt men in kolom 3. De daarop volgende kolommen geven een overzicht van het aantal gevallen, waarbij met melk + zuur een grooter aantal buizen giste, waarbij met melk + glucose + zuur een grooter aantal buizen een positief resultaat gaf en waarbij het resultaat in beide reeksen gelijk was.

De uitkomsten in deze tabel zijn overeenkomstig de verwachting. In de eerste periode, waarin een matige besmetting der melk bestaat, is de methode met melk-glucose-zuur duidelijk gevoeliger. In de tweede periode is het verschil tusschen beide niet groot (in 8 gevallen gelijke uitkomst). Doch dit vindt zijn verklaring in het feit, dat in deze periode de melk zeer sterk besmet was, waardoor bij onderzoek van hoeveelheden van 10 ml melk het verschil ook niet groot kan zijn. In deze periode zou de vergelijking eigenlijk gemaakt moeten zijn bij onderzoek van hoeveelheden van 1 ml melk. In de derde periode is de besmetting weer matig en hier is dus de methode met melk-glucose-zuur duidelijk aantoonbaar beter. In de vierde periode is het verschil niet zoo sprekend. Doch in deze periode was de besmetting der melk zeer gering, zoodat hier het toeval beheerscht in welke der 8 buizen de geringe infectie merkbaar wordt. Toch leidt ook zelfs hier het gebruik van glucose tot een beter resultaat.

Ten slotte geeft tabel 4 het resultaat van enkele proeven, waarbij vergeleken werd een pasteurisatie na de toevoeging van glucose en zuur en een pasteurisatie van de te onderzoeken melk vóór de toevoeging van deze stoffen. Deze proeven zijn genomen in een tijd, dat in vele V-buizen een gisting door facultatief anaerobe bacteriën (*B. pabuli*) optrad.

Indien wij in de twee helften dezer tabel het aantal buizen vergelijken, dat wel gisting vertoonde, doch geen boterzuurgeur had, dan blijkt daaruit, dat inderdaad een pasteurisatie van de melk vóór de toevoeging van glucose en zuur minder hinder van gisting door andere sporevormende bacteriën dan boterzuurbacteriën geeft. Daar echter de hinderende bacterie lang niet altijd in melk voorkomt en de uitvoering der boterzuurbacteriënproef eenvoudiger is als na de toevoeging gepasteuriseerd wordt in de V-buizen zelf, blijven wij de voorkeur geven aan een pasteurisatie na de toevoeging, vooral

TABEL 4

Proef van:	Toevoeging vóór pasteurisatie						Toevoeging na pasteurisatie									
	10 ml melk			1 ml melk			10 ml melk			1 ml melk						
23 Januari 1939:																
gisting na dagen . . .	2	2	2	2	2	3	—	—	2	2	2	2	2	3	—	—
boterzuurgeur.	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		
30 Januari 1939:																
gisting na dagen . . .	2	2	r2	2	2	3	—	—	2	2	2	—	—	—	—	—
boterzuurgeur.	+	+	+	—	—	—			+	+	+					
6 Februari 1939:																
gisting na dagen . . .	2	r2	2	2	2	—	—	—	2	2	4	—	—	—	—	—
boterzuurgeur.	+	—	—	—	—				+	+						
13 Februari 1939:																
gisting na dagen . . .	2	—	—	—	2	2	—	—	r2	r3	—	—	4	—	—	—
boterzuurgeur.	+				—	—			+	+						

omdat door den geur zeer goed geconstateerd kan worden of boterzuurgisting opgetreden is of niet.

KORT OVERZICHT

Boterzuurbacteriën kunnen van groot nadeel zijn voor de kaasmakerij. Het is daarom gewenscht een methode te bezitten, waarmee op eenvoudige wijze in melk en andere stoffen boterzuurbacteriën kunnen worden aangetoond. Bij de beschreven methode wordt als hoofdbestanddeel van den voedingsbodem melk gebruikt. Het voordeel hiervan is, dat voor het onderzoek van melk hiervoor de te onderzoeken melk zelf gebruikt kan worden.

Voor het onderzoek van melk gaat men als volgt te werk. 50 ml worden gebracht in een kolfje en men voegt, onder schudden, 1 ml 25 % glucose-oplossing en 1 ml *n/l* zuur (melkzuur, zoutzuur of zwavelzuur) toe. Met dit mengsel vult men 4 V-vormige buizen zoodanig, dat het korte been onder de rubberstop door zwenken geheel gevuld is en in het andere, langere been slechts weinig vloeistof is. Op het vloeistofoppervlak wordt 1 ml paraffineolie gegoten. De buizen worden in een rek of bak geplaatst en door zoo diep mogelijke onderdompeling in een waterbad gedurende 10 minuten op 80° C verhit. Na afkoeling in een waterbad van 40° C worden de buizen in een thermostaat van 35° à 40° C geplaatst. Die buizen worden positief gerekend, waarvan binnen 3 etmalen het korte been nagenoeg geheel met gistingsgas gevuld is en waarvan de vloeistof boterzuur- of butylalkoholgeur

heeft. De geur wordt bepaald door de rubberstop af te nemen en de vloeistof uit te gieten in een schaalte. In een onduidelijk geval kan men in het schaalte nog iets verdund zwavelzuur toevoegen; de boterzuurgeur, zoo er boterzuur is, wordt dan duidelijker. Buizen zonder boterzuurgeur rekent men negatief, al is er gasvorming.

Bij sterke besmetting kan men ook kleinere hoeveelheden melk onderzoeken. Hiertoe wordt dezelfde bewerking als hierboven uitgevoerd met gesteriliseerde centrifugemelk en vóór de pasteurisatie in de V-buizen 1 ml of 0,1 ml van de te onderzoeken melk gepipeteerd en gemengd door omzwenken.

Voor het onderzoek van andere stoffen kan men op dezelfde wijze te werk gaan.

Het is noodzakelijk, dat het gebruikte glaswerk en de gebruikte vloeistoffen zorgvuldig gesteriliseerd zijn.

ZUSAMMENFASSUNG

EINE BUTTERSÄUREBAKTERIENPROBE, BESONDERS GEEIGNET FÜR DIE MILCHUNTERSUCHUNG

Buttersäurebakterien sind gefährliche Feinde für den Käsebetrieb. Sie können in den Käse gelangen wenn z. B. das Milch- oder Käsegerät verborgene Schmutzstellen aufweist oder wenn das Vieh mit buttersäurebakterienhaltigem Futter gefüttert wird. Es ist besonders in den wärmeren Jahreszeiten (Frühling, Sommer) erwünscht Milch zu verarbeiten, welche keine Buttersäurebakterien enthält. Deshalb wäre es nützlich über eine Methode zu verfügen, womit auf einfache Weise Buttersäurebakterien in Milch nachgewiesen werden können.

Bei der beschriebenen Methode, einer Gärungsprobe, wird die zu untersuchende Milch als Nährboden benutzt. Weil aber *Cl. tyrobutyricum* (8), das eigentliche käseschädigende Buttersäurebakterium, keinen Milchzucker vergärt, jedoch Traubenzucker wohl, musz $\frac{1}{2}$ % Traubenzucker (1 ml 25 %-ige Lösung pro 50 ml Milch) zugesetzt werden. Eine Pasteurisierung dient dazu, die nicht-sporenbildenden Bakterien, welche stören würden (z. B. Milchsäurebakterien, coliartige Bakterien), zu vernichten. Weil Milch öfters große Mengen von Fäulnisbakterien enthält (besonders wenn auch Buttersäurebakterien anwesend sind), die bei der Pasteurisation auch am Leben bleiben (*B. putrificus*) und sehr störend sind, soll die Entwicklung dieser Bakterien verhindert werden. Das kann man erreichen mit Säurezusatz.

Obwohl die Wachstumsgrenze der Fäulnisbakterien bei einem pH von

ungefähr 4,5 bis 4,7 liegt, ist ein so niedriges pH für die Wachstumshemmung der Fäulnisbakterien bei der kurzen Dauer des Versuches nicht notwendig, ja sogar unerwünscht, weil dann die Buttersäurebakterien zu schwierig angehen. Ein pH von 5,5 ist niedrig genug. Es wird darum zu 50 ml Milch auch noch 1 ml n/l Säure (Milchsäure, Salzsäure) zugesetzt.

Die Gärungsprobe wird ausgeführt in V-förmigen Röhrchen. Das kürzere Bein wird ganz gefüllt und soll ungefähr 10 ml enthalten. Dieses Bein ist geschlossen mit einem Gummistöpsel. Die Entwicklung aerober sporenbildender Bakterien wird unterdrückt indem die Flüssigkeit im längeren Bein mit Paraffinöl vor Luftzutritt geschützt wird.

Es ist ein Gummiverschluss gewählt damit die Röhrchen besser gereinigt werden können und der Geruch der Flüssigkeit am Ende des Versuches an der Seite festgestellt werden kann wo sich kein Paraffinöl befindet (Ausgiesen in ein Schälchen und riechen, bzw. nach Zusatz von ein wenig verdünnter Schwefelsäure). Es gibt nämlich fakultativ anaerobe Bakterien vom Typus *B. pabuli* (11), die eine Gärung hervorrufen aber keinen Buttersäuregeruch verursachen.

Die Probe ist positiv wenn nach höchstens 3 Tagen bei 35°—40° C eine deutliche Gärung beobachtet wird (das kürzere Bein ganz mit Gas gefüllt) und Buttersäure- oder Butylalkoholgeruch festgestellt wird. Leider kann man mit dieser Probe nicht *Cl. tyrobutyricum* allein nachweisen. Auch das nicht käsegefährliche *Cl. saccharobutyricum* wächst in Milch-Traubenzucker-Säure. Um zu entscheiden welche dieser Bakterienarten anwesend ist kann man überimpfen in Mannit- und Laktat-Nährboden (8). Dieses Verfahren nimmt aber viel Zeit in Anspruch.

Ausführung: Steriles Glasgerät ist unbedingt nötig.

Milch: In einem Kölbchen mit 50 ml der zu untersuchende Milch wird vorsichtig unter Schütteln 1 ml der Säure- und 1 ml der Traubenzuckerlösung zugesetzt. 3 bis 5 V-Röhrchen werden gefüllt und 1 ml Paraffinöl wird zugefügt um die Flüssigkeitsoberfläche von der Luft abzuschließen. Man stellt die Röhrchen in einen Gestell und erhitzt sie im Wasserbad während 10 Minuten auf 80° C. Nach Abkühlung zu 40° C werden sie bebrütet bei 35°—40° C. Nach 3 bis 4 Tagen wird festgestellt ob Gärung aufgetreten ist und wie der Geruch ist.

Wenn die Milch nur wenige Buttersäurebakterien enthält, wird Gärung nur in eins von 3 oder 4 Parallelröhrchen beobachtet; wenn die Milch stark verunreinigt ist mit Buttersäurebakterien, findet Gärung in allen Parallelröhrchen statt.

Wenn die Milch viele Buttersäurebakterien enthält, kann man auch kleinere Menge untersuchen. Dann gebraucht man sterile Magermilch mit

Säure- und Zuckerzusatz und impft 1 ml oder 0,1 ml in den V-Röhrchen (gut mischen).

Auch in anderen Stoffen kann man auf diese Weise Buttersäurebakterien nachweisen.

SUMMARY

A BUTYRIC ACID BACTERIA TEST FOR MILK AND OTHER SUBSTANCES

Butyric acid bacteria are dangerous enemies in cheese making. Cheese may be contaminated with them because of invisible dirt in the milking and cheese making apparatus or when the cows are fed on food which underwent a butyric acid fermentation (silage). It is desirable to make cheese from butyric acid bacteria free milk, especially in the warmer seasons (spring, summer). A simple method to detect these bacteria in milk may be useful.

With the described method, a fermentation test, the milk to be tested is used as the main constituent of the nutritive medium. However, *Cl. tyrobutyricum* (8), which causes the butyric acid fermentation in cheese, does not ferment lactose. So it is necessary to add 0,5 % dextrose (1 ml of a 25 % solution to 50 ml of milk). The milk must be pasteurised to get rid of the non spore forming bacteria (e. g. lactic acid bacteria, coliform bacteria) which would spoil the test. As milk may contain a large number of putrefactive bacteria, which would make it impossible to judge whether a butyric acid fermentation took place, the development of these must be checked. Though the pH-limit for the spore forming putrefactive bacteria is 4,5—4,7 a pH as low as this one is not necessary for the short period the test lasts. Moreover the lowest possible pH would cause a too slow growth of the butyric acid bacteria. An addition of 1 ml n/l acid (lactic acid, hydrochloric acid) to 50 ml of milk is sufficient (pH about 5,5).

Aerobic spore forming bacteria are checked by anaerobic cultivation, using liquid paraffine.

The fermentation test is carried out in V-shaped glass tubes. The shorter part of these is filled with the liquid and contains about 10 ml. This part is closed with a rubber stopper, the longer part with cotton wool. As a rubber stopper is used the cleansing of the tubes is very easily done. This rubber stopper allows to judge the odour of the fermented liquid. The liquid may be poured into a dish; an addition of some dilute sulphuric acid is useful for the estimation of the smell. This must be done because

sometimes there is a fermentation of facultative anaerobic bacteria (e. g. *B. pabuli* (11); however these do not produce butyric acid.

The test is positive when after three days at 35°—40° C a distinct fermentation has taken place and the smell of butyric acid or butyl alcohol can be observed in the fermentation liquid.

It is not possible to know whether the fermentation is effectuated by *Cl. tyrobutyricum* or by *Cl. saccharobutyricum*. This can only be proved by subsequent cultivation in mannite- and sodium lactate medium (8).

Procedure: The use of sterilised flasks and pipettes, etc. is absolutely necessary.

For milk: To 50 ml of the milk to be tested are added 1 ml of the acid solution and 1 ml of the dextrose solution (shaking is necessary to prevent the clotting of the milk). Then 3—5 V-tubes are filled; 1 ml liquid paraffine is put on the surface of the liquid (for anaerobic cultivation). The tubes are put into a frame and pasteurized in a water bath (the largest possible part of the tubes must be immersed) at 80° C during 10 minutes. After cooling in water of 40° C they are put into an incubator of 35°—40° C. Tubes which show fermentation within 3—4 days and the liquid of which has butyric acid or butyl alcohol smell are the positive ones.

If the milk contains few butyric acid bacteria, only one out of 3 or 4 tubes is positive. When the milk is seriously contaminated all of the tubes are positive.

Milk containing a large number of butyric acid bacteria may also be tested in smaller quantities e. g. 1 ml or 0,1 ml. In that case the V-tubes are filled with a mixture of sterilized tap milk to which acid and dextrose have been added and inoculated with 1 ml or 0,1 ml of the milk sample (mix well).

For other substances: Proceed in the same way as with small quantities of milk.

LITERATUUR

- (1) F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES, Over het gebrek „knijpers” in Edammer kaas. *Versl. v. landbk. onderz.* 14 (1913) 9. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1911, 81.
- (2) F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM, Over het „laat optredend los” bij Goudsche kaas. *Versl. v. landbk. onderz.* 34 (1929) 25. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1928, 1.
- (3) S. ORLA JENSEN, Théorie de la maturation des fromages durs. *Le Lait*, 20 (1940) 2.
- (4) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Resultaten van het bacteriologisch onderzoek van silages uit de praktijk, bereid met wei- of suikertoevoeging. *Versl. v. landbk. onderz.* 43 (1937) 119. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1936, 103. Zie tevens de in dit artikel opgenomen literatuur.
- (5) R. BURRI, W. STAUB und J. HOHL, Süszgrünfütter und Buttersäurebazillen. *Schweiz. Zentralbl. f. Milchwirtschaft*, 1919.
- (6) G. RUSCHMANN und L. HARDER, Die Buttersäuregärung im Silofütter und der Nachweis ihrer Erreger. *Die Futterkonservierung*, 3 (1931) 1.
- (7) W. RITTER, Eine Nachprüfung des Ruschmann'schen Kartoffelbreiverfahrens zum Nachweis von Buttersäurebazillen. *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, 1932, 601.
- (8) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën. *Versl. v. landbk. onderz.*, 40 (1934) 543. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1933, 119. *Z. f. B.* II, 93 (1935) 198.
- (9) H. HOSTETTLER und E. ZOLLIKÖFER, *Hoppe Seyler's Z. f. phys. Ch.*, 248 (1937) 183.
- (10) W. DORNER, Beobachtungen über das Verhalten der Sporen und vegetativen Formen von *Bacillus amylobacter* bei Nachweis- und Reinzuchtverfahren. *Landw. Jahrb. d. Schweiz*. 1924.
- (11) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Bacteriële processen in geconserveerd groenvoeder en hun invloed op de kaasbereiding. *Versl. v. landbk. onderz.* 40 (1934) 825. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1934, 49. *Z. f. B.* II, 94 (1936), 431.