# OVER DE VROEG BEGINNENDE GASVORMING IN KAAS

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS, DR IR
S. C. J. OLIVIER, HOOGLEERAAR IN DE SCHEIKUNDE,
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN EEN
COMMISSIE UIT DEN SENAAT DER LANDBOUW-
HOOGESCHOOL TE WAGENINGEN OP WOENSDAG
8 MEI 1946 TE 15 UUR DOOR

TH. E. GALESLOOT

H. VEENMAN & ZONEN • WAGENINGEN • 1946

Bij het verschijnen van dit proefschrift maak ik gaarne van de gelegenheid gebruik om allen te bedanken, die medegewerkt hebben aan de tot standkoming ervan. Allereerst dank ik U, Hooggeleerde SMIT, dat Gij het promotorschap hebt willen aanvaarden. Uw welgemeende critiek heeft bij mij voor een groot deel het gemis goed gemaakt, dat U door de omstandigheden tot mijn spijt zoo weinig in de gelegenheid was leiding te geven aan dit onderzoek. Verder ben ik U zeer erkentelijk voor de wijze waarop U er voor gezorgd hebt dat mijn werk in zoo korten tijd in druk kon verschijnen.

Ook U, overige Hoogleeraren aan de Landbouwhoogeschool, die aan mijn opleiding hebt medegewerkt, betuig ik mijn dank voor het genoten onderwijs.

In het bijzonder dank ik U, Zeergeleerde WIERINGA, voor de leiding, die Gij mij bij deze studie hebt gegeven. Uw belangstelling en Uw rijke ervaring zijn mij deze jaren een groote steun geweest. Dat tenslotte de microbiologie voor mij het meest gewaardeerde studieterrein is geworden, is voor een belangrijk deel aan U te danken.

Zeer veel dank ben ik ook verschuldigd aan de STICHTING „FONDS LANDBOUW EXPORT BUREAU 1916/1918". Zij stelde mij in staat dit onderwerp te bestudeeren en schonk mij bovendien de gelegenheid om op deze studie te promoveeren.

Bij enkele proeven werd ik geholpen door den Heer C. A. M. VAN DEN HOUT, die voor zijn ingenieursstudie op het Laboratorium voor Microbiologie werkzaam was.

Tenslotte dank ik het personeel van het Laboratorium voor Microbiologie voor de bekwame en prettige wijze, waarop het mij steeds geholpen heeft.

INHOUD

Blz.

*Inleiding* . . . . . 7

HOOFDSTUK I

*Het gebruikte bacteriënmateriaal* . . . . . 9
§ 1. Isoleering van de bacteriën . . . . . 9
§ 2. Determineering en klassificeering van de geïsoleerde stammen . . . . . 11
§ 3. De vergisting van lactose door de coli-aërogenesbacteriën 14
§ 4. Iets over de verspreiding van de verschillende typen in de natuur . . . . . 16

HOOFDSTUK II

*Een oriënteerend onderzoek naar de typen die vroeg-los kunnen veroorzaken* . . . . . 19
§ 1. Welke typen kunnen vroeg-los veroorzaken? . . . . . 19
§ 2. Het gedrag van combinaties van verschillende typen bij de gistingsproeven . . . . . 22

HOOFDSTUK III

*Over de oorzaak van het afwijkende gedrag der colitypen bij de lebgistingsproef* . . . . . 27
§ 1. De invloed van het citroenzuur in de melk . . . . . 27
§ 2. Eenige oriënteerende waarnemingen over de invloed van citroenzuur op de gasvorming uit lactose . . . . . 29
§ 3. Over de bepaling van citroenzuur in voedingsvloeistoffen 34
§ 4. Over de oorzaak van het verschil in invloed dat citroenzuurtoevoeging uitoefent op de gasvorming uit lactose door coli-aërogenesbacteriën . . . . . 39
§ 5. Verdere onderzoekingen over de invloed van citroenzuur op de suikervergisting van de los-negatieve stammen . . 44

HOOFDSTUK IV

*Proeven met kaas, welke aansluiten bij de onderzoekingen in de vorige hoofdstukken beschreven* . . . . . 50
§ 1. Een overzicht van de methodes, die we bij deze proeven gebruikt hebben . . . . . 50

Blz.

§ 2. Een onderzoek naar de mate, waarin de verschillende typen van de coli-aërogenesgroep vroeg-los kunnen veroorzaken 54
§ 3. Over eenige factoren, die van belang zijn bij de gasvorming in kaas door los-positieve stammen . . . . . 57
§ 4. De invloed van combinaties van typen van coli-aërogenesbacteriën op de gasvorming in kaas . . . . . 59
§ 5. Over het afsterven van de coli-aërogenesbacteriën in kaas 62
§ 6. Over proeven met kaas, welke in verband staan met de invloed van citroenzuur op de suikervergisting der coli-aërogenesbacteriën . . . . . 64
§ 7. Een vergelijking tusschen de werking van eenige zuursels 70

HOOFDSTUK V

*Oriënteerende proeven met eenige middelen die kunnen dienen bij de bestrijding van het vroeg-los* . . . . . 73
§ 1. Over de in aanmerking komende middelen . . . . . 73
§ 2. Over de in de volgende paragraaf te gebruiken bepalingsmethoden . . . . . 74
§ 3. Nitraatreductie door bacteriën van de coli-aërogenesgroep 80
§ 4. De invloed van $KNO_3$ en $KNO_2$ op de gasvorming uit lactose door coli-aërogenesbacteriën . . . . . 89
§ 5. De invloed van $KClO_3$ op de gasvorming uit lactose door coli-aërogenesbacteriën . . . . . 103

HOOFDSTUK VI

*De bestrijding van het vroeg-los in kaas met behulp van $KNO_3$, $KNO_2$ en $KClO_3$* . . . . . 108
§ 1. De werking van $KNO_3$ . . . . . 108
§ 2. De werking van $KNO_2$ . . . . . 113
§ 3. De werking van $KClO_3$ . . . . . 114
§ 4. Welk middel is het meest aan te raden? . . . . . 116

*Samenvatting* . . . . . 117

*Summary* . . . . . 119

*Litteratuurlijst* . . . . . 122

# INLEIDING

De gistingen in kaas, welke met gasvorming gepaard gaan, kunnen we, naar het tijdstip van ontstaan van de gaten, verdeelen in een vroeg beginnende en een laat beginnende gasvorming. Deze verdeeling is niet alleen gebaseerd op het tijdstip van aanvang, maar hangt ook nauw samen met de aard van de gisting. De vroeg beginnende gasvorming staat hier bekend onder de namen heft, rijzing, pekelheft of vroeg-los en vindt plaats in de kaas onder het persen, tijdens het omloopen of gedurende het begin van het pekelen. Gedurende deze tijd bevat de kaas nog lactose en het vroeg beginnend los is dan ook te wijten aan een suikervergisting, waarbij de lactose voor een deel wordt omgezet tot de gasvormige producten koolzuur en waterstof. Daar in pas gemaakte kaas de lactose snel door de melkzuurbacteriën wordt omgezet, kan deze gasvorming alleen veroorzaakt worden door micro-organismen, die zich snel kunnen ontwikkelen. Meestal schijnen hier alleen maar de coli-aërogenesbacteriën van belang, alhoewel DEMETER (1941) eenige gevallen noemt, waarbij gisten een rol speelden. Daar bij het vroeg-los de kaasmassa nóg niet gerijpt is en dus nog geen homogene, plastische massa vormt, zijn de ontstaande gaten onregelmatig van vorm. Soms ontstaan er zeer veel kleine gaten.

Bij het laat beginnend los ligt de zaak een weinig anders. De melksuiker is dan reeds omgezet tot melkzuur, zoodat men hier dan ook wel van nagisting spreekt. Het laat-los kan alleen veroorzaakt worden door bepaalde bacteriën, die een deel van het lactaat omzetten tot gasvormige producten. Hiervoor komen slechts enkele bacteriën in aanmerking: de propionzuur-, de boterzuur- en enkele melkzuurbacteriën. In 1907 isoleerden VON FREUDENREICH en ORLA JENSEN propionzuurbacteriën uit kaas. Deze bacteriën, die lactaat onder koolzuurvorming kunnen vergisten, werden later in allerlei kaassoorten aangetroffen, waarbij VAN BEYNUM en PETTE (1941) aangaven, dat ze ook betrokken kunnen zijn bij de gasvorming in Nederlandsche kaassoorten. Een deel van de boterzuurbacteriën, nl. die waaraan VAN BEYNUM en PETTE (1934, 1935) de naam *Clostridium tyrobutyricum* gaven, kan ook lactaat vergisten, waarbij waterstof en koolzuur gevormd worden.

De zgn. boekelscheurbacteriën, welke ook lactaat kunnen vergisten onder vorming van koolzuur en waterstof, behooren niet tot deze beide groepen. Ze werden voor het eerst geïsoleerd door

BOEKHOUT en OTT DE VRIES (1917, 1918). PETTE en VAN BEYNUM (1943) bestudeerden de werking van deze bacteriën nauwkeuriger en vonden, dat ze verwant zijn met de melkzuurbacteriën, doch zich van de meeste vertegenwoordigers daarvan onderscheiden, doordat ze het uit suiker gevormde lactaat weer voor een deel vergisten kunnen. Ze gaven hen de naam *Lactobacillus bifermentans*.

Bij de nagisting is de kaasmassa meestal plastisch, zoodat er dan ronde gaten ontstaan. Treedt het gebrek in erge mate op, dan kunnen zich ook scheuren vormen. Een kaas met dergelijke scheuren noemt men een knijper.

Bij dit onderzoek hebben we ons, zooals reeds de titel aangeeft, beperkt tot de vroeg beginnende gasvorming, welke we voortaan vroeg-los noemen. Ze wordt altijd als een gebrek beschouwd, hetgeen we niet van alle vormen van laat-los kunnen zeggen. Verder hebben we alleen bacteriën van de coli-aërogenesgroep in ons onderzoek betrokken.

In het eerste deel van het onderzoek, beschreven in de hoofdstukken I tot en met IV, is nagegaan, welke bacteriën van de coli-aërogenesgroep het vroeg-los kunnen veroorzaken en werden tevens eenige factoren bestudeerd, welke hierop invloed uitoefenen.

In het tweede deel, beschreven in de hoofdstukken V en VI, hebben we de manier bestudeerd, waarop we met eenige bestrijdingsmiddelen de vroeg beginnende gasvorming kunnen tegengaan en is, met behulp van proeven met kaas bepaald, welk middel voor de practijk het meest geschikt is. Bij de genomen proeven beperkten we ons tot de wijze van kaasmaken, welke voor de Nederlandsche, harde kaassoorten gebruikelijk is.

HOOFDSTUK I

# HET GEBRUIKTE BACTERIËNMATERIAAL

## § 1. ISOLEERING VAN DE BACTERIËN

Alvorens de isoleering van de in dit onderzoek gebruikte stammen te bespreken, dient te worden vastgesteld, wat we hier onder coliaërogenesbacteriën hebben verstaan. Deze bacteriën hebben de vorm van een kort staafje, ze zijn gramnegatief, facultatief anaëroob en missen het vermogen tot sporevorming. Terwille van dit onderzoek, waarbij het gaat om een vergisting van lactose, hebben we ons nog de voorwaarde gesteld, dat lactose vergist moet worden onder de vorming van zuur en gas.

Bij de isoleering zijn we uitgegaan van verschillend materiaal. We gebruikten de methode van WILSON (1935), waarbij gebruik wordt gemaakt van een voedingsvloeistof volgens MC CONKEY met de volgende samenstelling:

| | |
|---|---|
| Rundergal | 30 $cm^3$ |
| Lactose | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Pepton Witte | 10 g |
| Water | 1000 $cm^3$ |
| Neutraalrood | 10 $cm^3$ van een waterige 1 % oplossing |
| pH | 7,4 |

Om een vaste voedingsbodem te verkrijgen, voegden we dan nog 15 g gewasschen agar toe.

Bij de isoleering uit rauwe melk werd een oogje hiervan uitgezaaid op deze agar, waarna de plaat gedurende 24 uur bij 37 °C werd geplaatst. Hierna entten we iets van een alleen liggende coli-kolonie over in bouillon. Nadat de bouilloncultuur 2–3 uur bij 37 °C had gestaan, zaaiden we weer een oogje hiervan uit op de agar. De volgende dag entten we iets van een alleen liggende, nu als rein beschouwde kolonie over op een schuingestolde bouillonagarbuis, waarop we de reincultures gedurende het onderzoek bewaarden. Bij de isoleering uit faeces zaaiden we een oogje van een waterige suspensie uit op de agar en handelden we verder als hierboven beschreven. Bij de isoleering uit kaas wreven we eerst 1 g kaas in een

steriele mortier fijn met 9 $cm^3$ van een steriele 2 % natriumcitraat-oplossing van 50 °C, waarna we een cultuurbuis, gevuld met de voedingsvloeistof volgens Mc CONKEY, entten met een geschikte hoeveelheid van deze suspensie. Trad er in een dergelijke buis gasvorming op, welke werd aangetoond met een buisje volgens DURHAM, dan zaaiden we een oogje van de inhoud uit op een agarplaat. De verdere gang van zaken was dan gelijk aan die beschreven bij de isoleering uit melk. Verder isoleerden we nog eenige stammen uit grond, afgevallen bladeren en gras. Een hoeveelheid hiervan brachten we in een cultuurbuis gevuld met vloeistof volgens Mc CONKEY, waarna we de buizen, waarin gasvorming optrad, op dezelfde manier behandelden als bij de isoleering uit kaas. Tenslotte betrokken we nog eenige stammen van het Laboratorium voor Microbiologie te Wageningen en een stam van het Microbiologische Laboratorium der Technische Hoogeschool te Delft in ons onderzoek.

Tabel 1 geeft een overzicht van de herkomst van de verschillende cultures.

TABEL 1 *Herkomst van de geisoleerde stammen*

| Stam No | Herkomst | Stam No | Herkomst |
|---|---|---|---|
| 1 | Faeces mensch | 22 | Melk |
| 2 | Lab. Microb., Wageningen | 23 | Faeces koe |
| 3 | Kaas | 24 | Faeces koe |
| 4 | Kaas | 25 | Lab. Microb., Wageningen |
| 5 | Kaas | 26 | Melk |
| 6 | Kaas | 27 | Melk |
| 7 | Kaas | 28 | Melk |
| 8 | Kaas | 29 | Melk |
| 9 | Lab. Microb., Wageningen | 30 | Melk |
| 10 | Lab. Microb., Wageningen | 31 | Melk |
| 11 | Lab. Microb., Wageningen | 32 | Gras |
| 12 | Lab. Microb., Wageningen | 33 | Grond |
| 13 | Afgevallen bladeren | 34 | Afgevallen bladeren |
| 14 | Gras | 35 | Afgevallen bladeren |
| 15 | Gras | 36 | Grond |
| 16 | Melk | 37 | Melk |
| 17 | Afgevallen bladeren | 38 | Lab. Microb., Wageningen |
| 18 | Grond | 39 | Lab. Microb., Delft |
| 19 | Grond | 40 | Afgevallen bladeren |
| 20 | Melk | 41 | Gras |
| 21 | Melk | 42 | Grond |

## § 2. DETERMINEERING EN KLASSIFICEERING VAN DE GEISOLEERDE STAMMEN

In de loop der jaren zijn er veel methodes en proeven beschreven om de bacteriën van de coli-aërogenesgroep te determineeren. Uit de gegevens van tabel 2, afkomstig van PARR (1939), blijkt echter dat het eerstgenoemde viertal proeven het meest gebruikt worden.

TABEL 2 *Proeven, die in recente publicaties (22) gebruikt werden, om de coli-aërogenes bacteriën te determineeren*

| Proef | Aantal malen gebruikt: |
|---|---|
| Indolproef | 15 |
| Methylroodproef | 20 |
| Reactie volgens Voges-Proskauer | 22 |
| Gebruik van citroenzuur | 20 |
| Gebruik van urinezuur | 6 |
| Vergisting van cellobiose | 4 |
| Vervloeiing van gelatine | 3 |
| Proef van Eijkman | 2 |
| Productie van $H_2S$ | 2 |
| Vergisting van saccharose | 1 |
| Vergisting van inositol | 1 |
| Vergisting van $\alpha$-methylglucoside | 1 |

PARR (1938, 1939) gaf deze vier proeven, uitgaande van de vier beginletters, de naam Imvic-groep. Hij gebruikte alleen deze vier, maar vele andere onderzoekers gebruiken daarnaast voor een verdere differentieering nog een paar andere.

Behalve van deze vier proeven der Imvic-groep hebben we dan ook nog gebruik gemaakt van de vervloeiing van gelatine en van de proef van EIJKMAN, waarbij nagegaan wordt of de te onderzoeken bacterie glucose kan vergisten bij 45 °C.

Bij ons onderzoek hebben we gebruik gemaakt van de door WILSON (1935) gegeven indeeling van de coli-aërogenesbacteriën, welke indeeling door tabel 3 wordt weergegeven (blz. 12).

Deze indeeling is gemaakt aan de hand van een onderzoek van 496 stammen, waarbij echter 3 stammen niet geplaatst konden worden. Met behulp van de methylroodproef, de proef van VOGES en PROSKAUER en de citraatproef wordt hier de groep in drie gedeelten verdeeld, waarna met behulp van de andere proeven in elk gedeelte nog onderverdeelingen worden gemaakt. Deze methode lijkt ons beter dan de vele andere, waarover hier nog enkele opmerkingen volgen. BERGEY (1939) verdeelt de coli-aërogenesbacte-

TABEL 3 *Indeeling van de coli-aërogenesbacteriën volgens Wilson*

| Type | Afkorting | Indol | M.R. | V.P. | Citraat | Eijkman | Vervloeien van de gelatine |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bact. coli I . . . . . | C 1 | + | + | − | − | + | − |
| Bact. coli II . . . . . | C 2 | − | + | − | − | − | − |
| Coliachtig type 1 . . . | Ca 1 | + | + | − | − | − | − |
| Coliachtig type 2 . . . | Ca 2 | − | + | − | − | + | − |
| Coliachtig type 3 . . . | Ca 3 | − | + | − | − | − | + |
| Intermediair type I . . | I 1 | − | + | − | + | − | − |
| Intermediair type II . | I 2 | + | + | − | + | − | − |
| Intermediairachtig type | Ia | − | + | − | + | − | + |
| Bact. aërogenes I . . . | A 1 | − | − | + | + | − | − |
| Bact. aërogenes II . . | A 2 | + | − | + | + | − | − |
| Bact. cloacae . . . . | Cl | − | − | + | + | − | + |
| Aërogenesachtig type 1 | Aa 1 | − | − | + | − | − | − |
| Aërogenesachtig type 2 | Aa 2 | − | − | + | + | + | − |

riën over twee geslachten, nl. *Escherichia* en *Aerobacter*, waarbij de colitypen en de intermediaire typen gerangschikt worden in het eerste en de aërogenes- en cloacaetypen in het tweede genus. Hierbij wordt echter niet tot uitdrukking gebracht, dat de intermediaire typen een overgangstype vormen tusschen de coli- en de aërogenesbacteriën. Een dergelijke forsche scheiding in twee geslachten lijkt ons dan ook niet gewenscht. Bovendien maakt BERGEY gebruik van de $H_2S$-productie bij de indeeling en uit de publicatie's van WILSON (1935) en VAUGHN en LEVINE (1936) blijkt, dat allerlei omstandigheden op het resultaat van deze proef invloed hebben.

KLINE (1935) rekent de intermediaire typen ook tot het genus *Escherichia*, waarbij hij zich beroept op het feit dat, wanneer colibacteriën in steriele grond worden uitgezaaid, er na eenige tijd intermediaire typen uit kunnen worden geïsoleerd. Dit feit is ook waargenomen door MINKEWITSCH, RABINOWITSCH en JOFFE (1936) en MINKEWITSCH (1930) wil het intermediaire type dan ook *Bact. coli citrovorum* noemen. Daar hierbij ook weer geen rekening wordt gehouden met het overgangskarakter van de intermediaire groep, willen CARPENTER en FULTON (1937) een gedeelte van de groep overbrengen naar het genus *Escherichia* en een ander gedeelte naar het genus *Aerobacter*. TITTSLER en SANDHOLZER (1935) onderzochten de intermediaire typen met behulp van het al of niet vergisten van vele koolhydraten, polyalcoholen en glucosiden en trokken daaruit

TABEL 4 *Resultaten van de determineering van de geïsoleerde stammen*

| Stam | M.R. | V.P. | Citraat | Indol | Eijkman | Vervloeien van de gelatine | Naam |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 2 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 3 | + | – | + | + | – | – | Intermediair type II |
| 4 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 5 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 6 | + | – | + | + | – | – | Intermediair type II |
| 7 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 8 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 9 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 10 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 11 | – | + | + | – | – | – | Bact. aërogenes I |
| 12 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 13 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 14 | + | – | – | – | – | – | Bact. coli II |
| 15 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 16 | + | – | – | – | – | – | Bact. coli II |
| 17 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 18 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 19 | – | + | + | – | – | – | Bact. aërogenes I |
| 20 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 21 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 22 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 23 | + | – | – | + | – | – | Coliachtig type 1 |
| 24 | + | – | – | + | – | – | Coliachtig type 1 |
| 25 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 26 | + | – | – | – | – | – | Bact. coli II |
| 27 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 28 | + | – | + | + | – | – | Intermediair type II |
| 29 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 30 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 31 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 32 | + | – | + | + | – | – | Intermediair type II |
| 33 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 34 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 35 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 36 | + | – | – | + | + | – | Bact. coli I |
| 37 | + | – | + | + | – | – | Intermediair type II |
| 38 | + | – | + | – | – | – | Intermediair type I |
| 39 | – | + | + | – | – | + | Bact. cloacae |
| 40 | – | + | – | – | – | – | Aërogenesachtig type 1 |
| 41 | – | + | – | – | – | – | Aërogenesachtig type 1 |
| 42 | – | + | – | – | – | – | Aërogenesachtig type 1 |

de conclusie, dat de intermediaire groep zoo heterogeen is, dat ze geen recht van bestaan heeft. Deze methode van onderzoek is echter minder juist, daar hierdoor de diagnose der bacteriën op zoovele kenmerken komt te rusten dat, telkens bij de isoleering van nieuwe stammen, er voor vele van deze weer geen plaats zou zijn in het systeem.

We zijn echter met WERKMAN en GILLEN (1932), PARR (1938, 1939) en WILSON (1935) van meening, dat de intermediaire groep wel recht van bestaan heeft en dat uit de plaats in de indeeling van de geheele groep moet blijken, dat de intermediaire typen een tusschenpositie innemen tusschen de colitypen en de aërogenestypen. Vandaar dat we bij ons onderzoek de indeeling van WILSON gebruikt hebben. In het vervolg maken we bovendien vaak gebruik van de afkortingen die tabel 3 vermeldt.

Voor een nadere omschrijving van de methodes, welke wij gebruikt hebben bij de determineering verwijzen we naar de Voorschriften voor de bacteriologische keuring van drinkwater, uitgegeven door de hoofdcommissie voor de normalisatie in Nederland.

Tabel 4 (blz. 13) laat de resultaten van de determineering zien. Ter contrôle hebben we een jaar na de eerste determineering deze nog eens herhaald. De resultaten waren gelijk. Sommige intermediaire stammen hebben een zwakke reactie op acetyl-methyl-carbinol, zooals ook WERKMAN en GILLEN aangeven (1932). Hieruit blijkt weer eens, dat deze typen volkomen tusschen de coli- en de aërogenesbacteriën instaan.

## § 3. DE VERGISTING VAN LACTOSE DOOR DE COLI-AËROGENESBACTERIËN

Voor ons onderzoek is deze eigenschap van groot belang, daar we bij de vroeg beginnende gasvorming in kaas ook te doen hebben met een lactosevergisting. Tabel 5 geeft de resultaten van een onderzoek van WILSON (1935) weer, waarbij hij naging, welk gedeelte van de verschillende typen lactose kon vergisten onder zuur- en gasvorming.

TABEL 5

*De lactosevergisting door de coli-aërogenesbacteriën (volgens Wilson)*

| Type | Vergisting van lactose door |
|---|---|
| Coli | 99 % |
| Intermediair | 98 % |
| Aërogenes | 93 % |
| Cloacae | 78 % |

We zien dus dat bijna alle coli-aërogenesbacteriën lactose kunnen vergisten. In het begin van ons onderzoek hebben we bepaald, hoeveel gas onze stammen uit lactose konden vormen. Hiertoe namen we gistingsfleschjes van 120 cm³, voorzagen deze met 1 cm³ van een 3 uur oude bouilloncultuur van elke stam en vulden hen dan met 2% lactosebouillon. De fleschjes werden bij 30 °C geplaatst en het gevormde gas werd opgevangen in met verzadigde pekel gevulde buretten. Tabel 6 toont de verkregen resultaten van deze proef, welke eenige malen met hetzelfde resultaat werd herhaald.

TABEL 6 *Gasvorming uit lactose door de geïsoleerde stammen*

| Stam | cm³ gas na | | | Stam | cm³ gas na | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24 uur | 48 uur | 68 uur | | 24 uur | 48 uur | 68 uur |
| 1 | 21,7 | 28,5 | 30,9 | 22 | 32,0 | 37,6 | – |
| 2 | 24,3 | 30,4 | 32,2 | 23 | 21,9 | 28,7 | – |
| 3 | 36,2 | 40,4 | 42,1 | 24 | 20,2 | 29,2 | – |
| 4 | 37,8 | 47,5 | 50,2 | 25 | 22,5 | 33,0 | – |
| 5 | 41,9 | 51,6 | 54,2 | 26 | 27,3 | 33,7 | 34,7 |
| 6 | 32,4 | 37,0 | 38,3 | 27 | 25,8 | 33,4 | 34,4 |
| 7 | 19,6 | 30,8 | 33,8 | 28 | 8,1 | 23,9 | 31,1 |
| 8 | 18,8 | 25,1 | 27,0 | 29 | 27,5 | 35,0 | 35,9 |
| 9 | 29,4 | 35,7 | 36,9 | 30 | 18,1 | 28,7 | 31,3 |
| 10 | 1,6 | 22,3 | 26,7 | 31 | 27,6 | 31,5 | – |
| 11 | 41,4 | 91,2 | – | 32 | 15,6 | 33,0 | – |
| 12 | 20,8 | 23,0 | 23,5 | 33 | 19,4 | 25,5 | – |
| 13 | 22,5 | 28,0 | 29,2 | 34 | 6,6 | 18,4 | – |
| 14 | 3,9 | 22,9 | 29,0 | 35 | 7,8 | 22,5 | – |
| 15 | 20,0 | 24,7 | 25,2 | 36 | 21,9 | 29,3 | 30,3 |
| 16 | 35,1 | 41,8 | 43,3 | 37 | 28,2 | 37,8 | 41,4 |
| 17 | 32,2 | 37,0 | – | 38 | 8,0 | 12,0 | 13,3 |
| 18 | 22,0 | 27,6 | – | 39 | 18,9 | 40,5 | 47,5 |
| 19 | 22,8 | 48,4 | 65,0 | 40 | 5,6 | 15,5 | 26,9 |
| 20 | 30,0 | 37,6 | – | 41 | 19,2 | 24,6 | 28,3 |
| 21 | 33,6 | 42,6 | 44,5 | 42 | 20,2 | 25,0 | 29,6 |

Het blijkt, dat er niet veel verschil is in de hoeveelheid gas, die door elke stam gevormd wordt. De intermediaire typen, *Bact. aërogenes* en *Bact. cloacae* produceeren wel iets meer gas dan de andere typen, maar we moeten er rekening mee houden, dat deze typen, door hun kleine zuurproductie, onder deze omstandigheden meer lactose kunnen vergisten dan de colitypen. We hebben ook de samenstelling van het gas bepaald en vonden in overeenstemming met de gegevens van de litteratuur, dat het gas gevormd door de

coli en intermediaire typen meer waterstof bevatte dan dat van de aërogenes-cloacaetypen. Tenslotte geven we, met behulp van een publicatie van SCHEFFER (1928), een overzicht van de producten, die de verschillende typen uit suiker kunnen maken. Tabel 7 laat eenige resultaten van dezen onderzoeker zien, waarbij de gevormde hoeveelheden aangegeven zijn in gewichtspercenten van de vergiste glucose. We zien groote verschillen tusschen de suikervergisting van het colitype en het intermediaire type eenerzijds en het aërogenes- en cloacaetype anderzijds, waardoor we gemakkelijk het verschillende gedrag kunnen begrijpen bij de methylroodproef en bij de reactie volgens VOGES-PROSKAUER.

TABEL 7

*De suikervergisting door de coli-aërogenesbacteriën (volgens Scheffer)*

| Producten | Bact. coli | Intermediair type | Bact. aërogenes | Bact. cloacae |
|---|---|---|---|---|
| Koolzuur | 10,7 % | 10,9 % | 39,3 % | 42,3 % |
| Waterstof | 0,5 % | 0,5 % | 0,5 % | 0,5 % |
| Melkzuur | 42,4 % | 41,8 % | 5,6 % | 1,6 % |
| Barnsteenzuur | 20,2 % | 20,1 % | 2,1 % | – |
| Mierenzuur | 0,6 % | – | 1,9 % | 2,2 % |
| Azijnzuur | 14,3 % | 12,1 % | 0,5 % | – |
| Aethylalcohol | 11,0 % | 9,3 % | 17,0 % | 16,8 % |
| Acetyl-methyl-carbinol | – | – | sporen | 0,3 % |
| 2-3 butyleen glycol | – | – | 26,4 % | 28,8 % |

## § 4. IETS OVER DE VERSPREIDING VAN DE VERSCHILLENDE TYPEN IN DE NATUUR

Voor ons onderzoek is het van belang te weten op welke manier en met welke bacteriën van de coli-aërogenesgroep de melk gedurende de winning besmet kan worden. Daarom volgt hier, samengesteld met behulp van eenige litteratuurgegevens, een overzicht van de verspreiding van de verschillende typen in de natuur. Tabel 8, overgenomen uit de publicatie van WILSON (1935), laat zien welke typen zooal voorkomen in de naaste omgeving van de koe.

DORNER (1925) vestigt er echter de aandacht op, dat koemest niet altijd bijna uitsluitend colibacteriën bevat, maar dat er soms overheerschend veel aërogenesbacteriën in voorkomen.

Een andere mogelijkheid voor een plotselinge, sterke besmetting van de melk met aërogenesbacteriën is de door hen veroorzaakte uierontsteking. STOCKER (1936) beschrijft dergelijke gevallen, waarbij de verschijnselen dezelfde zijn als bij de door de Streptococcen

TABEL 8

*Over de verspreiding van de coli-aërogenesbacteriën over eenige stoffen (volgens Wilson)*

| Van het totaal aantal behoort tot het: | Koemest | Stroo, hooi, gras granen, meel, veekoeken |
|---|---|---|
| Colitype | 98,4 % | 32,6 % |
| Intermediaire type | 0,0 % | 11,2 % |
| Aërogenestype | 1,6 % | 31,2 % |
| Cloacaetype | 0,0 % | 23,8 % |

veroorzaakte uierontsteking, nl. alkalisch reageerende melk, die veel katalase en chloor en weinig suiker bevat. Bij deze ontsteking, die vooral optreedt in de herfst bij plotselinge weersveranderingen, is de melk bijna een reincultuur van *Bact. aërogenes*.

Over het voorkomen van de verschillende typen in rauwe melk zijn ook veel onderzoekingen gepubliceerd. Eenige gegevens, voorkomend bij WILSON (1935) en DEMETER (1941), verwerkten we in tabel 9.

TABEL 9

*Over het voorkomen van de verschillende typen coli-aërogenesbacteriën in rauwe melk*

| Auteur | Van het totaal aantal behoort tot het | | |
|---|---|---|---|
| | Colitype | Intermediaire type | Aërogenes type |
| Kline | 35,0 % | 14,0 % | 51,0 % |
| Kon | 29,6 % | 22,4 % | 48,0 % |
| Yale | 63,0 % | 11,0 % | 26,0 % |
| Zavagli | 46,0 % | 10,0 % | 44,0 % |
| Demeter en Sauer | 25,3 % | 55,5 % | 19,2 % |
| Lipska | 45,5 % | 35,0 % | 15,5 % |
| Malcolm: | | | |
| Stalperiode | 71,0 % | 21,5 % | 7,5 % |
| Weiperiode | 40,4 % | 37,2 % | 22,4 % |
| Oeser | 38,3 % | 56,8 % | 4,9 % |
| Bartram en Black | 57,0 % | 21,0 % | 22,0 % |
| Tarrel | 53,0 % | 7,0 % | 40,0 % |
| Wilson | 30,2 % | 31,8 % | 37,5 % |
| Gemiddelde | 44,0 % | 26,6 % | 29,4 % |

We zien dat in rauwe melk alle typen regelmatig voorkomen. Tenslotte geeft tabel 10 nog een overzicht, weer gemaakt met behulp van gegevens van WILSON, van de waarschijnlijke herkomst van de verschillende typen die in rauwe melk voorkomen.

TABEL 10

*Over de waarschijnlijke herkomst van de coli-aërogenesbacteriën in melk (volgens Wilson)*

| Type | Afkomstig van |
|---|---|
| Bact. coli I | faeces |
| Bact. coli II | hooi, stroo |
| Coliachtige typen 1 en 2 | faeces |
| Intermediair type I | hooi, grond |
| Intermediair type II | onbekend |
| Bact. aërogenes I | granen, meel, veekoeken |
| Bact. aërogenes II | onbekend |
| Bact. cloacae | veevoeder en besmet gereedschap |

WILSON vond het intermediaire type II en Bact. aërogenes II alleen in melk, zoodat hij hiervan niet de herkomst kon aangeven. Wij hebben echter ook van gras een intermediair type II kunnen isoleeren.

HOOFDSTUK II

# EEN ORIËNTEEREND ONDERZOEK NAAR DE TYPEN, DIE VROEG-LOS KUNNEN VEROORZAKEN

## § 1. WELKE TYPEN KUNNEN VROEG-LOS VEROORZAKEN?

Alvorens met behulp van proeven met kaas na te gaan welke typen van de coli-aërogenesgroep vroeg-los kunnen veroorzaken, hebben we eerst met behulp van eenvoudige laboratoriumproeven eenige oriënteerende onderzoekingen verricht.

Allereerst hebben we hiervoor gebruik gemaakt van de lebgistingsproef, daar hierbij de bacteriën ongeveer onder dezelfde omstandigheden leven als in kaas. Wijde, steriele cultuurbuizen met een inhoud van 125 $cm^3$ werden voorzien van 1 $cm^3$ van een 3 uur oude bouilloncultuur van elke stam en van 50 $cm^3$ melk, die eerst was gekookt en waaraan we, na afkoeling tot 15 °C, 1 $cm^3$ van een 35% oplossing van $CaCl_2$ en 0,3 $cm^3$ stremsel (sterkte 1 : 16.000) per liter toevoegden. De gevulde buizen plaatsten we bij 30 °C, waarbij de melk na een half uur gestremd was. Na 24 uur beoordeelden we het resultaat. Daar zonder de hulp van gasbellen de stremselwerking blijkbaar niet sterk genoeg was om de wrongel te doen samentrekken, bleven de buizen, waarin geen of zeer weinig gas gevormd was, gevuld met gelijkmatig gestremde melk. Bij de buizen met een positief resultaat had de wrongel zich, tengevolge van de stremselwerking en de gasvorming, sterk samengetrokken en dreef de wrongelmassa boven op de uitgetreden wei. We hebben deze proef vele malen herhaald, zelfs met cultures die gedurende een jaar waren gekweekt op bouillonagar, maar de resultaten, welke worden weergegeven door tabel 11 (zie blz. 20), waren steeds gelijk.

Bij de beoordeeling „iets gas" bevatte de overigens nog niet samengetrokken wrongelmassa toch eenige openingen, terwijl de beoordeeling „iets positief" wil zeggen, dat er reeds een tamelijk ver samengetrokken wrongelmassa was ontstaan met tamelijk veel gaten.

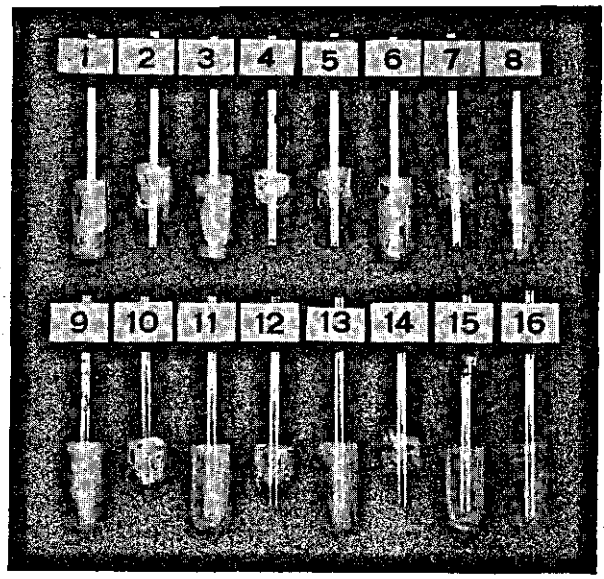
Figuur 1 laat eenige negatieve en positieve lebgistingsproeven zien en figuur 2 een doorsnede van de wrongelmassa van een positieve en een negatieve proef.

Uit tabel 11 blijkt, dat de colitypen, met uitzondering van stam 31, onder deze omstandigheden geen gasvorming veroorzaken. De $C_2$-typen vallen naast de $C_1$-typen op doordat zij in de wrongel nog wel

TABEL 11 *Lebgistingsproef met reincultures*

| Stam | Type | Resultaat | Stam | Type | Resultaat |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | C 1 | – | 22 | C 1 | – |
| 2 | C 1 | – | 23 | Ca 1 | – |
| 3 | I 2 | + | 24 | Ca 1 | – |
| 4 | I 1 | + | 25 | C 1 | – |
| 5 | I 1 | + | 26 | C 2 | – (iets gas) |
| 6 | I 2 | + | 27 | C 1 | – |
| 7 | C 1 | – | 28 | I 2 | + |
| 8 | C 1 | – | 29 | C 1 | – |
| 9 | C 1 | – | 30 | C 1 | – |
| 10 | C 1 | – | 31 | C 1 | iets positief |
| 11 | A 1 | + | 32 | I 2 | + |
| 12 | C 1 | – | 33 | I 1 | iets positief |
| 13 | C 1 | – | 34 | I 1 | – |
| 14 | C 2 | – (iets gas) | 35 | I 1 | – |
| 15 | I 1 | – | 36 | C 1 | – |
| 16 | C 2 | – (iets gas) | 37 | I 2 | + |
| 17 | C 1 | – | 38 | I 1 | – |
| 18 | C 1 | – | 39 | Cl | + |
| 19 | A 1 | + | 40 | Aa 1 | + |
| 20 | I 1 | + | 41 | Aa 1 | + |
| 21 | I 1 | + | 42 | Aa 1 | + |

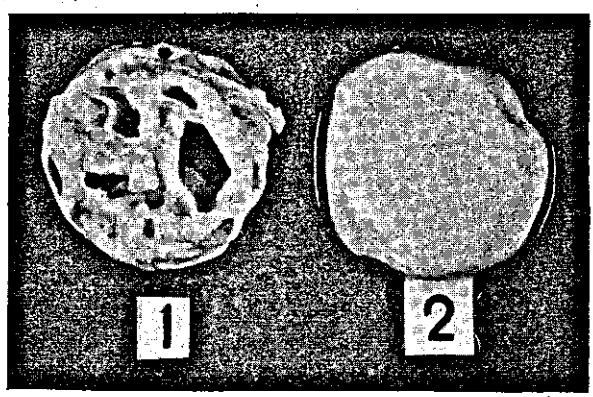
eenige openingen kunnen maken. Van de intermediaire typen kunnen sommige stammen bij deze proef gas produceeren en sommige niet. Tenslotte zien we dat de aërogenes- en cloacaetypen alle gas kunnen vormen. Het gedrag van de verschillende stammen bij deze lebgistingsproef is niet te verklaren met de resultaten vermeld in tabel 6, waarin we aangaven, hoeveel gas de verschillende stammen konden vormen uit lactosebouillon. De colitypen produceerden immers bijna evenveel gas als de andere typen, terwijl het gas veel meer waterstof bevatte dan dat der andere typen. Daar waterstof veel minder oplosbaar is in water dan koolzuur, is het eerstgenoemde gas bovendien veel werkzamer. Om voor deze kwestie de oplossing te vinden bepaalden we, op dezelfde manier als bij de lactosebouillon, hoeveel gas onze stammen konden vormen uit wei, daar deze gasvorming beter te vergelijken is met die bij de lebgistingsproef. Het volume van de gistingsfleschjes was nu echter maar 40 cm³. In tabel 12, waar we de resultaten van deze proef kunnen zien, zijn ter vergelijking eveneens de resultaten van de lebgistingsproef nog eens opgenomen.



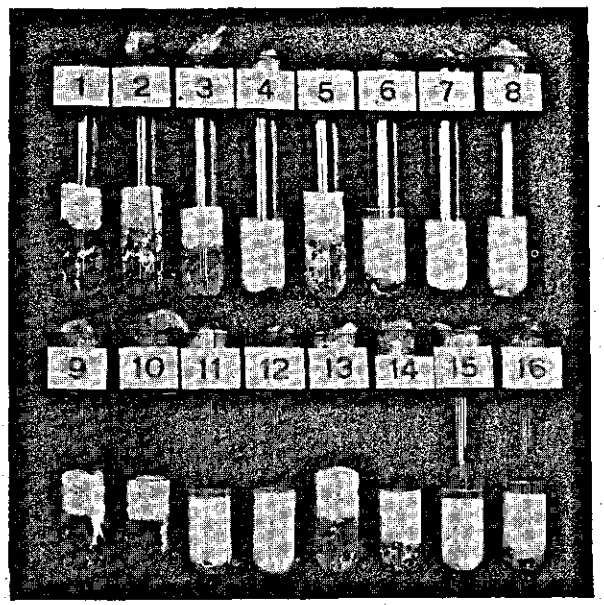

Figuur 1. Lebgistingsproef met reincultures

| No | Geënt met | Type | No. | Geënt met | Type |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | stam 17 | C 1 | 9 | stam 25 | C 1 |
| 2 | „ 19 | A 1 | 10 | „ 4 | I 1 |
| 3 | „ 14 | C 2 | 11 | niet geënt | – |
| 4 | „ 20 | I 1 | 12 | stam 11 | A 1 |
| 5 | „ 21 | I 1 | 13 | „ 12 | C 1 |
| 6 | „ 22 | C 1 | 14 | „ 6 | I 2 |
| 7 | „ 3 | I 2 | 15 | „ 1 | C 1 |
| 8 | „ 24 | Ca 1 | 16 | „ 16 | C 2 |

Alleen de vertegenwoordigers van de aërogenes- en de intermediaire groep geven een typische gisting, de coli-bacteriën niet.




Figuur 2. Doorsnede van de wrongel van een positieve en een negatieve lebgistingsproef
no 1 geënt met stam 20 (I 1) no 2 geënt met stam 22 (C 1)




Figuur 3. Lebgistingsproef met combinaties van typen.

| No foto | Combinatie van: | Verhouding | Resultaat |
|---|---|---|---|
| 1 | stam 11 en stam 2 | 1 : 0 | + |
| 2 | „ 11 „ „ 2 | 1 : 10 | + |
| 3 | „ 11 „ „ 2 | 1 : 100 | ± |
| 4 | „ 11 „ „ 2 | 1 : 1000 | – |
| 5 | stam 20 en stam 2 | 1 : 0 | + |
| 6 | „ 20 „ „ 2 | 1 : 10 | iets gas |
| 7 | „ 20 „ „ 2 | 1 : 100 | – |
| 8 | „ 20 „ „ 2 | 1 : 1000 | – |
| 9 | stam 37 en stam 2 | 1 : 0 | + |
| 10 | „ 37 „ „ 2 | 1 : 10 | + |
| 11 | „ 37 „ „ 2 | 1 : 100 | – |
| 12 | „ 37 „ „ 2 | 1 : 1000 | – |
| 13 | stam 20 en stam 15 | 1 : 0 | + |
| 14 | „ 20 „ „ 15 | 1 : 10 | iets gas |
| 15 | „ 20 „ „ 15 | 1 : 100 | – |
| 16 | „ 20 „ „ 15 | 1 : 1000 | – |

Het blijkt dus, dat de gasvorming door een los-positieve stam kan worden stopgezet door toevoeging van los-negatieve bacteriën.

TABEL 12 *Gasvorming uit wei door de geïsoleerde stammen*

| Stam | cm³ gas na: | | | | Resultaat van de lebgistingsproef |
|---|---|---|---|---|---|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | |
| 1 | 1,0 | 7,0 | 7,2 | 7,2 | – |
| 2 | 2,0 | 5,5 | 6,1 | 6,1 | – |
| 3 | 17,5 | 29,0 | 31,9 | 32,6 | + |
| 4 | 17,5 | 70,0 | 110,0 | 137,0 | + |
| 5 | 2,5 | 13,5 | 22,6 | 30,3 | + |
| 6 | 14,5 | 24,5 | 28,1 | 29,5 | + |
| 7 | 1,5 | 3,0 | 4,3 | 4,7 | – |
| 8 | 1,5 | 4,0 | 4,6 | 4,7 | – |
| 9 | 1,5 | 7,5 | 8,6 | 9,0 | – |
| 10 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | – |
| 11 | 10,0 | 55,0 | 92,5 | 120,0 | + |
| 12 | 0,3 | 2,5 | 3,6 | 3,6 | – |
| 13 | 0,3 | 1,5 | 2,0 | 2,1 | – |
| 14 | 0,3 | 1,3 | 2,9 | 2,9 | – |
| 15 | 1,0 | 3,5 | 6,5 | 7,5 | – |
| 16 | 1,4 | 6,4 | 8,0 | 8,6 | – |
| 17 | 1,0 | 3,7 | 3,5 | 3,5 | – |
| 18 | 5,9 | 7,6 | 7,6 | 7,5 | – |
| 19 | 2,0 | 25,0 | 51,5 | 67,0 | + |
| 20 | 5,4 | 57,8 | 121,0 | 180,0 | + |
| 21 | 7,7 | 25,5 | 45,5 | 65,5 | + |
| 22 | 1,4 | 3,1 | 4,2 | – | – |
| 23 | 0,5 | 2,5 | 3,8 | 4,0 | – |
| 24 | 0,7 | 1,6 | 1,9 | – | – |
| 25 | 2,2 | 4,0 | 5,2 | 5,6 | – |
| 26 | 1,2 | 4,5 | 6,8 | 12,6 | – |
| 27 | 1,5 | 4,0 | 4,5 | 4,5 | – |
| 28 | 10,0 | 19,3 | 35,0 | 45,6 | + |
| 29 | 3,3 | 5,3 | 6,9 | 7,0 | – |
| 30 | 0,6 | 1,0 | 2,4 | 2,5 | – |
| 31 | 7,3 | 9,4 | 10,6 | 11,6 | ± |
| 32 | 6,0 | 9,7 | 12,6 | 14,5 | + |
| 33 | 1,0 | 3,6 | 4,6 | 5,0 | ± |
| 34 | 0,8 | 1,0 | 1,4 | 2,0 | – |
| 35 | 0,3 | 1,0 | 1,5 | 1,5 | – |
| 36 | 2,6 | 2,7 | 2,8 | 2,8 | – |
| 37 | 15,6 | 26,1 | 39,5 | 45,3 | + |
| 38 | 0,4 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | – |
| 39 | 2,8 | 35,6 | 61,6 | 83,0 | + |
| 40 | 7,0 | 10,1 | 15,5 | 18,5 | + |
| 41 | 8,6 | 22,2 | 40,1 | 50,5 | + |
| 42 | 8,2 | 17,3 | 32,1 | 41,2 | + |

We zien dat de resultaten van deze proef, welke bij herhaling steeds gelijk waren, goed overeenkomen met de resultaten van de lebgistingsproef. De stammen, die bij deze proef een positief resultaat opleverden, produceerden veel gas uit wei. Voor de verklaring van het gedrag van de colitypen bij deze gistingsproeven verwijzen we naar hoofdstuk III.

Wanneer we de getallen van tabel 12 nog even bekijken, vooral die behoorende bij de stammen 5, 19, 20 en 39, dan zien we, dat de gasproductie uit wei van de stammen met een positief resultaat bij de lebgistingsproef, zich na 24 uur nog niet veel onderscheidt van de gasproductie van de stammen die een negatief resultaat gaven. Bij de gasvorming uit wei komen de verschillen meestal pas na meer dan 24 uur te voorschijn, terwijl de resultaten van de lebgistingsproef na 24 uur reeds definitief waren.

Daar de omstandigheden waaronder de bacteriën gas vormen bij de lebgistingsproef toch nog verschillen van die in kaas, kunnen we hier nog niet beweren, dat de resultaten van de gistingsproef ook precies gelden voor de vroeg beginnende gasvorming in kaas. Bij de hier beschreven proeven komen immers alleen maar coli-aërogenesbacteriën voor in de cultuurvloeistof, die het tenslotte zich zelf onmogelijk maken om nog verder suiker te vergisten. In kaas daarentegen komen ook nog melkzuurbacteriën voor, welke bacteriën ook de suiker vergisten en wel tot melkzuur. Door dit zuur worden dan de werkzaamheden van de coli-aërogenesbacteriën stopgezet.

Een ander verschil in omstandigheden is het veel grootere gehalte van kaas aan eiwitachtige, zuur-bufferende stoffen. In hoofdstuk IV worden proeven met kaas beschreven, waarbij we de resultaten van de lebgistingsproef hebben vergeleken met die van de gasvorming in kaas.

## § 2. HET GEDRAG VAN COMBINATIES VAN VERSCHILLENDE TYPEN BIJ DE GISTINGSPROEVEN

Nadat we bij de onderzoekingen, beschreven in de vorige paragraaf, alleen reincultures gebruikten, zijn we later overgegaan tot het uitvoeren van dezelfde proeven met combinaties van verschillende typen. Bij deze proeven wilden we nagaan of de gasproductie, door een stam met een positief resultaat bij de lebgistingsproef, kon worden verhinderd door toevoeging van een bepaalde hoeveelheid van een stam met een negatief resultaat. Van de los-positieve [1])

[1]) Stammen, die een positief resultaat gaven bij de lebgistingsproef, noemen we voortaan los-positief en de andere stammen los-negatief. In hoofdstuk IV zal blijken waarom we deze namen gegeven hebben.

TABEL 13

*De werking van combinaties van verschillende typen bij de lebgistinsproef*

| Combinatie van | | Verhouding | Resultaat van de lebgistingsproef |
|---|---|---|---|
| Los-positieve stam | Los-negatieve stam | | |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 0 | + |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 10 | + |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 100 | ± |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 1000 | – |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 0 | + |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 10 | + |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 100 | + |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 1000 | ± |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 0 | + |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 10 | + |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 100 | + |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 1000 | ± |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 0 | + |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 10 | iets gas |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 100 | – |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 1000 | – |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 0 | + |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 10 | iets gas |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 100 | – |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 1000 | – |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 0 | + |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 10 | – |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 100 | – |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 1000 | – |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 0 | + |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 10 | + |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 100 | – |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 1000 | – |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 0 | + |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 10 | + |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 100 | – |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 1000 | – |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 0 | + |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 10 | + |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 100 | – |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 1000 | – |

stammen gebruikten we de nos 11 (A 1), 20 (I 1) en 37 (I 2) ,van de los-negatieve stammen de nos 2 (C 1), 15 (I 1) en 26 (C 2). Voor de bestudeering van de invloed van elke combinatie namen we vier cultuurbuizen. Bij het enten, waarbij we bouilloncultures gebruikten die gedurende 16 uur bij 37 °C gestaan hadden, bedeelden we eerst alle vier buizen met 0,001 $cm^3$ van een los-positieve cultuur. Aan één buis voegden we dan niets meer toe, aan de tweede buis voegden we 0,01 $cm^3$ toe van een los-negatieve cultuur, aan de derde buis 0,1 $cm^3$ en aan de vierde 1 $cm^3$ van dezelfde los-negatieve cultuur. Zoo kregen we dan de verhoudingen $^1/_0$, $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ en $^1/_{1000}$. De uitvoering van de proef, waarvan tabel 13 (zie blz. 23) de resultaten vermeldt, was gelijk aan die beschreven in de vorige paragraaf.

Deze proef, waarvan een gedeelte wordt weergegeven door fig. 3, laat zien, dat een los-positieve cultuur geen gas meer kan produceeren als er een voldoende hoeveelheid van een los-negatieve cultuur mede aanwezig is. De verschillende combinaties vertoonen onderling nog wel verschillen, zooals uit de gegevens van tabel 13 blijkt. Zoo zien we, dat de werking van stam 11 (A 1) door toevoeging van een los-negatieve cultuur bijna niet verminderd kan worden, terwijl stam 20 (I 1) sterk beïnvloed wordt. Om de invloed van de los-negatieve stammen op de gasvorming van de los-positieve te verklaren, zouden we twee oorzaken kunnen overwegen:

1. de meer zuur produceerende los-negatieve stammen belemmeren de los-positieve in hun activiteit door middel van dit zuur.
2. een of meer stofwisselingsproducten van de los-negatieve stammen zijn in staat de suikervergisting van de los-positieve stammen te veranderen, zoodat er minder gas ontstaat. Wij denken hier aan azijnzuur, hetgeen nogal een belangrijke plaats inneemt onder de stofwisselingsproducten van de los-negatieve stammen, zooals tabel 7 aangeeft. Nu vonden REYNOLDS, JACOBSSON en WERKMAN (1937) dat azijnzuur, toegevoegd aan een glucose vergisting door *Aerobacter indologenes*, een aërogenestype, gereduceerd werd, waardoor er door deze bacterie geen waterstof meer uit suiker geproduceerd kon worden. Het gereduceerde acetaat werd kwantitatief teruggevonden als 2-3-butyleenglycol. MICKELSON en WERKMAN (1938) toonden verder aan, dat deze azijnzuurreductie alleen gebeurt in een zuur milieu met een pH lager dan 6,3. Daar we ook bij de lebgistingsproef te maken hebben met een zuur milieu, is het zeer waarschijnlijk dat ook hier deze acetaatreductie van belang is bij de gevonden onderdrukking van de gasproductie.

Ook hier moeten we de vraag, of de resultaten van deze proef op gelijke wijze gelden voor de gasvorming in kaas, nog onbeantwoord

TABEL 14 *Gasvorming uit wei door combinaties van verschillende typen*
*Inhoud gistingsfleschjes: 40 cm³*

| Combinatie van | | Verhouding | Cm³ gas na : | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Los-positieve stam | Los-negatieve stam | | 24 | 48 | 72 uur |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 0 | 4,2 | 15,9 | 25,0 |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 10 | 2,0 | 13,7 | 48,4 |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 100 | 2,3 | 5,5 | 11,4 |
| 11 (A 1) | 2 (C 1) | 1 : 1000 | 0,7 | 1,9 | 2,5 |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 0 | 4,2 | 15,9 | 25,0 |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 10 | 1,5 | 4,5 | 5,2 |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 100 | 1,5 | 3,7 | 5,0 |
| 11 (A 1) | 15 (I 1) | 1 : 1000 | 2,3 | 4,5 | 5,5 |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 0 | 5,6 | 25,0 | 32,2 |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 10 | 2,1 | 20,8 | 55,5 |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 100 | 3,8 | 9,0 | 11,2 |
| 11 (A 1) | 26 (C 2) | 1 : 1000 | 0,8 | 2,2 | 2,8 |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 0 | 5,2 | 21,4 | 44,0 |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 10 | 1,2 | 2,4 | 3,0 |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 100 | 1,5 | 3,2 | 4,1 |
| 20 (I 1) | 2 (C 1) | 1 : 1000 | 1,5 | 2,6 | 3,0 |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 0 | 5,7 | 14,9 | 24,6 |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 10 | 2,5 | 5,5 | 6,8 |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 100 | 1,1 | 2,5 | 3,1 |
| 20 (I 1) | 15 (I 1) | 1 : 1000 | 3,1 | 6,2 | 6,8 |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 0 | 5,7 | 14,9 | 24,6 |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 10 | 2,9 | 6,0 | 7,9 |
| 20 (I 1) | 26 (C 2) | 1 : 100 | 1,6 | 4,0 | 4,6 |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 0 | 6,9 | 15,2 | 21,2 |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 10 | 0,7 | 2,0 | 3,3 |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 100 | 0,5 | 1,7 | 2,5 |
| 37 (I 2) | 2 (C 1) | 1 : 1000 | 1,2 | 2,2 | 3,0 |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 0 | 6,9 | 15,2 | 21,2 |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 10 | 1,0 | 4,5 | 5,9 |
| 37 (I 2) | 15 (I 1) | 1 : 100 | 2,7 | 6,2 | 7,5 |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 0 | 6,5 | 13,9 | 17,5 |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 10 | 0,8 | 2,5 | 3,6 |
| 37 (I 2) | 26 (C 2) | 1 : 1000 | 1,2 | 2,8 | 3,3 |

laten. In hoofdstuk IV, waarin we onze proeven met kaas beschrijven, kunnen we deze vraag wel beantwoorden.

Dezelfde invloed van combinaties van typen hebben we ook gevonden bij de gasvorming uit wei. De resultaten van deze proeven, waarvan de uitvoering gelijk was aan die welke we reeds eerder beschreven, worden vermeld in tabel 14 (blz. 25).

Ook hier valt het weer op dat, terwijl bij de overeenkomstige lebgistingsproef de resultaten na 24 uur reeds definitief waren, hier de verschillen pas na meer dan 24 uur duidelijk worden.

HOOFDSTUK III

# OVER DE OORZAAK VAN HET AFWIJKENDE GEDRAG DER COLITYPEN BIJ DE LEBGISTINGSPROEF

## § 1. DE INVLOED VAN HET CITROENZUUR IN DE MELK

In het vorige hoofdstuk zagen we, dat de colitypen, alhoewel in staat gas te vormen uit lactosebouillon, bijna geen gas konden vormen uit wei. Daar dit feit niet kon worden verklaard door een verschil in ontwikkeling van deze bacteriën in de beide cultuurvloeistoffen, hebben we aangenomen dat er in melk stoffen voorkomen, die de colitypen noodzaken hun suikervergisting zoodanig te veranderen dat er weinig gas kan ontstaan. De samenstelling van melk nagaande, kwamen we op de gedachte, dat het citroenzuur hier wel eens een dergelijke invloed zou kunnen uitoefenen. Melk bevat namelijk 0,15–0,20 % van dit zuur. Ten einde deze veronderstelling te toetsen aan een experiment, hebben we een vloeistof gemaakt, die in samenstelling en eigenschappen de ondermelk zoo goed mogelijk benadert. Citroenzuur werd dan bij een deel der proeven wel, en bij een ander deel niet toegevoegd. Deze synthetische ondermelk maakten we op de volgende, door PORCHER (1929) aangegeven manier.

Onder omroeren losten we 30 g caseïne, bereid volgens de methode van HAMMARSTEN, met behulp van 1,100 gram CaO op in 1 liter water. De pH lag dan boven de 7, daar er ongeveer 600 mg CaO noodig is om onder deze voorwaarden een neutrale caseïneoplossing te krijgen. Vervolgens voegden we druppelsgewijs 0,2 N $H_3PO_4$ toe, tot de vloeistof een pH 7 had verkregen. Hiervoor waren ongeveer 40 $cm^3$ noodig. Door het ontstaande caseïne-calciumphosphorzuurcomplex werd de vloeistof wit en ondoorzichtig. Om de gelijkenis met ondermelk verder te vervolmaken voegden we nog toe:

| | | |
|---|---|---|
| 45 | g | lactose |
| 5 | g | albumine |
| 1,190 | g | $CaCl_2$ |
| 2.300 | g | $K_2HPO_4$ |
| 1,030 | g | $Mg(H_2PO_4)_2$ |
| 0,500 | g | $CaHPO_4$ |

Aan een gedeelte van de aldus verkregen synthetische ondermelk

voegden we dan nog 0,16 % citroenzuur toe in de vorm van natriumcitraat. De pH was tenslotte 6,8.

Met deze ondermelk hebben we, op dezelfde manier als vroeger beschreven, een lebgistingsproef uitgevoerd. De ondermelk kon niet gesteriliseerd of gekookt worden, daar er dan coagulatie optrad. In verband met de resultaten van de lebgistingsproef met combinaties van typen, mochten we echter aannemen dat een lichte infectie hier geen invloed zou uitoefenen. De resultaten van deze proef worden weergegeven in tabel 15.

TABEL 15

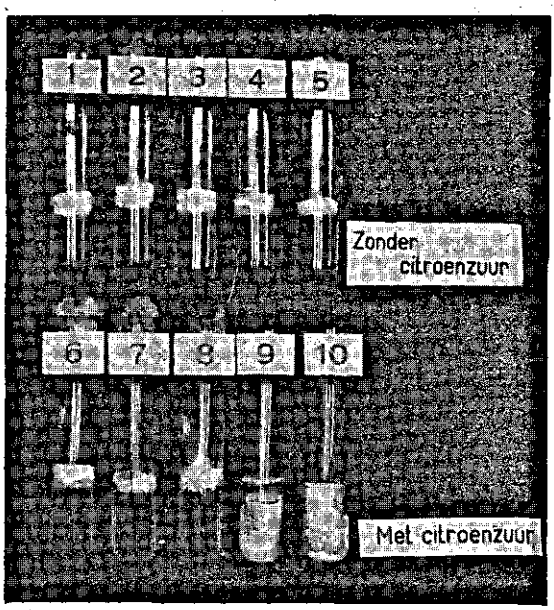
*Lebgistingsproef met synthetische ondermelk met en zonder citroenzuur*

| Stam | Type | Resultaat van de lebgistingsproef met synthetische ondermelk | | Resultaat van dezelfde proef met koemelk |
|---|---|---|---|---|
| | | zonder citroenzuur | m. 0,16% citroenzuur | |
| 11 | A 1 | + | + | + |
| 20 | I 1 | + | + | + |
| 37 | I 2 | + | + | + |
| 2 | C 1 | + | – | – |
| 24 | Ca 1 | + | – | – |
| 22 | C 1 | + | – | – |
| 16 | C 2 | + | – | – |
| 7 | C 1 | + | – | – |
| 26 | C 2 | + | – | – |

Een gedeelte van de proef wordt weergegeven door figuur 4. Bij een proef met een negatief resultaat was de wrongelmassa door de stremselwerking vaak wel gedeeltelijk samengetrokken (nos 9 en 10), maar er waren dan geen of bijna geen gaten aanwezig, terwijl bij een positief resultaat de sterk samengetrokken wrongel boven op de uitgetreden wei dreef. Figuur 5 laat eenige doorsneden van de wrongel zien, waarbij het opvalt, dat in dit geval, door de andere eigenschappen van het coagulum, de gaten veel kleiner maar veel talrijker zijn dan bij de proeven met koemelk.

*Zoo wordt dus waarschijnlijk, dat het gedrag van de colitypen bij de lebgistingsproeven, beschreven in het vorige hoofdstuk, veroorzaakt wordt door het citroenzuurgehalte van de melk,* alhoewel we niet de mogelijkheid willen uitsluiten, dat in melk niet nog meer stoffen voorkomen met een dergelijke werking.

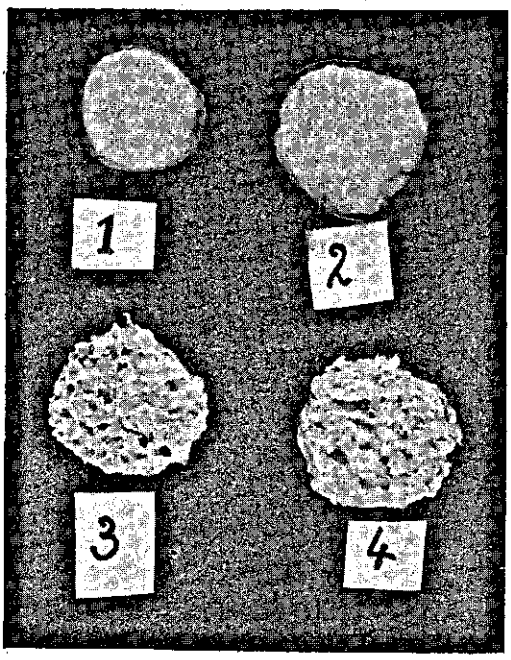
Verder hebben we nog nagegaan, hoeveel gas onze stammen konden vormen uit de van deze synthetische ondermelk gemaakte wei. Ook uit de resultaten van deze proef, vermeld in tabel 16,




Figuur. 4. Lebgistingsproef met synthetische ondermelk zonder en met 0,16 % citroenzuur.

| No. | Geënt met stam |
|---|---|
| 1 en 6 | 11 (A 1) |
| 2 en 7 | 20 (I 1) |
| 3 en 8 | 37 (I 2) |
| 4 en 9 | 2 (C 1) |
| 5 en 10 | 24 (Ca 1) |

Zonder citroenzuur kunnen alle stammen gas vormen, met citroenzuur vallen de colitypen uit.




Figuur 5. Doorsneden van de wrongel bij de lebgistingsproef met synthetische ondermelk.

| No. | Geënt met | Ondermelk |
|---|---|---|
| 1 | stam 24 (Ca 1) | met citroenzuur |
| 3 | stam 24 (Ca 1) | zonder citroenzuur |
| 2 | stam 2 (C 1) | met citroenzuur |
| 4 | stam 2 (C 1) | zonder citroenzuur |

blijkt, dat het citroenzuur de gasvorming der colitypen belemmert.

TABEL 16 *Gasvorming uit synthetische wei met en zonder citroenzuur*
*Volume gistingsfleschjes 120 cm³*

| Stam | Type | cm³ gas gevormd uit wei | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Met 0,16 % citroenzuur | | Zonder citroenzuur | |
| | | Na 24 uur | Na 48 uur | Na 24 uur | Na 48 uur |
| 11 | A 1 | 18,6 | 64,5 | 52,8 | 121,5 |
| 6 | I 2 | 49,8 | 70,8 | 46,5 | 56,4 |
| 4 | I 1 | 33,6 | 67,2 | 58,8 | 91,2 |
| 2 | C 1 | 3,5 | 7,0 | 27,2 | 48,9 |
| 7 | C 1 | 5,3 | 7,4 | 25,7 | 40,9 |
| 16 | C 2 | 9,1 | 11,9 | 26,1 | 34,3 |
| 22 | C 1 | 3,9 | 6,0 | 18,6 | 29,2 |
| 24 | Ca 1 | 5,3 | 10,0 | 22,4 | 34,1 |

## § 2. EENIGE ORIËNTEERENDE WAARNEMINGEN OVER DEN INVLOED VAN CITROENZUUR OP DE GASVORMING UIT LACTOSE

In verband met het voorgaande leek het van belang na te gaan, hoeveel gas de verschillende typen kunnen vormen uit een lactose-voedingsvloeistof, waaraan toenemende hoeveelheden citroenzuur werden toegevoegd. We gebruikten gistingsfleschjes met een inhoud van 40 cm³, welke we voorzagen van een ½ cm³ van een paar uur oude bouilloncultuur van de te onderzoeken stam en toenemende hoeveelheden van een neutrale, steriele 10 % citroenzuuroplossing en daarna vulden met lactosebouillon of lactosegistwater. Eenige gegevens, verkregen met behulp van stam 9 (C 1) en stam 1 (C 1), worden weergegeven door de tabellen 17 en 18.

TABEL 17

*Gasvorming door stam 9 (C I) uit lactosegistwater waaraan citraat werd toegevoegd*

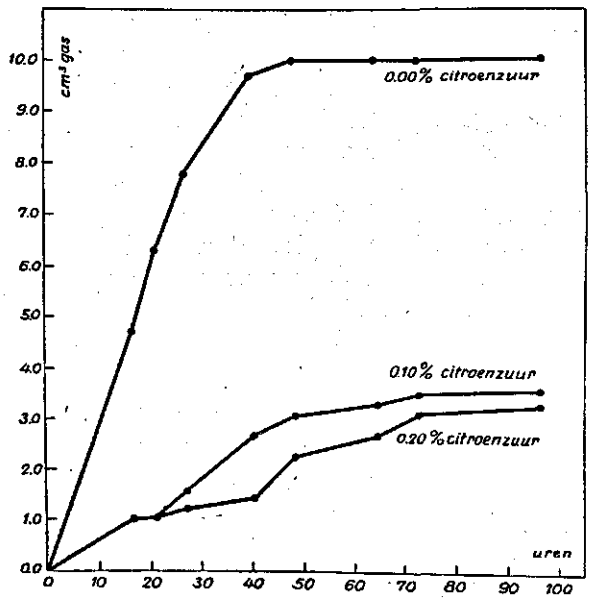
| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16,5 uur | 21 uur | 27 uur | 40 uur | 48 uur | 64 uur | 72 uur | 96 uur |
| – | 4,7 | 6,3 | 7,8 | 9,7 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| 0,025 % | 3,0 | 4,5 | 5,5 | 6,4 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| 0,050 % | 1,3 | 2,8 | 4,2 | 5,3 | 5,5 | 5,6 | 5,6 | 5,6 |
| 0,100 % | 1,0 | 1,0 | 1,5 | 2,6 | 3,0 | 3,2 | 3,4 | 3,5 |
| 0,200 % | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 2,2 | 2,6 | 3,0 | 3,2 |

TABEL 18

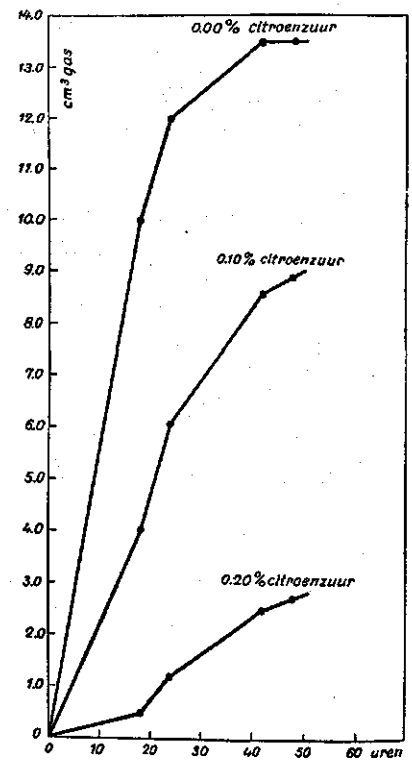
*Gasvorming door stam 1 (C 1) uit lactosegistwater waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 uur | 21 uur | 28 uur | 40 uur | 48 uur | 64 uur | 72 uur | 96 uur |
| – | 2,5 | 3,5 | 4,5 | 5,7 | 6,3 | 7,0 | 7,4 | 7,6 |
| 0,025 % | 0,8 | 1,3 | 2,0 | 3,0 | 3,4 | 4,1 | 4,4 | 5,0 |
| 0,050 % | 0,8 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,3 | 3,2 | 3,7 | 4,4 |
| 0,100 % | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 1,5 | 1,5 | 2,2 | 2,5 | 3,6 |
| 0,200 % | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 2,6 |

Het blijkt dat toenemende hoeveelheden citroenzuur de gasproductie steeds meer doen dalen. De gegevens van tabel 17 worden ten deele nog weergegeven door figuur 6. De gegevens van tabel 19 laten zien, dat citroenzuur dezelfde invloed heeft op de gasvorming der intermediaire, los-negatieve stammen.




Figuur 6. Invloed van citroenzuur op de gasvorming door stam 9 (C 1) uit lactosegistwater




Figuur 7. Invloed van citroenzuur op de gasvorming door stam 15 (I 1) uit lactosebouillon

TABEL 19

*Gasvorming door stam 15 (I 1) uit lactosebouillon waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 18 uur | 24 uur | 42 uur | 48 uur |
| – | 10,0 | 12,0 | 13,5 | 13,5 |
| 0,05 % | 7,9 | 9,7 | 11,3 | 11,4 |
| 0,10 % | 4,0 | 6,1 | 8,6 | 8,9 |
| 0,20 % | 0,5 | 1,2 | 2,5 | 2,7 |

Eenige gegevens van tabel 19 worden tevens weergegeven door figuur 7. De gasproductie van stam 31 (C 1), een stam die bij de lebgistingsproef een zwak positief resultaat gaf, werd op dezelfde manier beïnvloed door citroenzuurtoevoegingen. De gegevens, verkregen met deze stam, worden weergegeven in tabel 20.

TABEL 20

*Gasvorming door stam 31 (C 1) uit lactosegistwater waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 uur | 24 uur | 40 uur | 48 uur | 64 uur | 72 uur | 96 uur |
| – | 3,2 | 7,4 | 9,5 | 9,8 | 10,2 | 10,4 | 10,7 |
| 0,025 % | 0,5 | 1,4 | 3,6 | 4,3 | 5,3 | 5,6 | 6,3 |
| 0,050 % | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 1,8 |
| 0,100 % | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 1,5 | 1,5 | 2,0 |
| 0,200 % | 0,5 | 0,5 | 1,3 | 1,5 | 1,7 | 1,7 | 2,0 |

Het blijkt dat in dit geval de totale gasproductie bij een citroenzuurtoevoeging van 0,10 en 0,20 % iets grooter is dan die bij een toevoeging van 0,05 %. Bij deze onderzoekingen hebben we dit verschijnsel vaker waargenomen, waarbij we tevens konden opmerken dat het niet aan bepaalde stammen gebonden is. Het trad nu en dan bij een bepaalde proef op, maar het was niet reproduceerbaar. De tabellen 21 en 22 geven een paar voorbeelden weer, die duidelijker spreken dan tabel 20.

TABEL 21

*Gasvorming door stam 13 (C 1) uit lactosegistwater waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

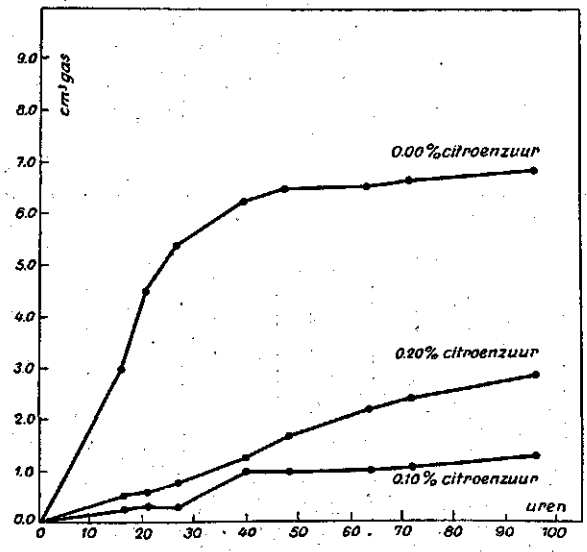
| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16½ uur | 21 uur | 27 uur | 40 uur | 48 uur | 64 uur | 72 uur | 96 uur |
| – | 3,0 | 4,5 | 5,4 | 6,3 | 6,5 | 6,6 | 6,7 | 6,9 |
| 0,025 % | 1,0 | 1,2 | 1,6 | 2,5 | 3,0 | 3,2 | 3,5 | 4,0 |
| 0,050 % | 0,5 | 0,8 | 1,2 | 1,7 | 2,0 | 2,2 | 2,5 | 3,0 |
| 0,100 % | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,3 |
| 0,200 % | 0,5 | 0,6 | 0,8 | 1,3 | 1,7 | 2,2 | 2,4 | 2,9 |

TABEL 22

*Gasvorming door stam 26 (C 2) uit lactosegistwater waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16 uur | 24 uur | 40 uur | 48 uur | 64 uur | 72 uur | 96 uur |
| – | 3,0 | 6,1 | 8,2 | 8,6 | 8,7 | 9,0 | 9,0 |
| 0,025 % | 1,0 | 2,5 | 4,5 | 4,6 | 5,2 | 5,6 | 5,8 |
| 0,050 % | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 1,6 | 1,8 | 2,0 |
| 0,100 % | 0,4 | 0,5 | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,5 | 1,8 |
| 0,200 % | 0,4 | 1,2 | 1,6 | 2,5 | 3,5 | 4,1 | 5,3 |

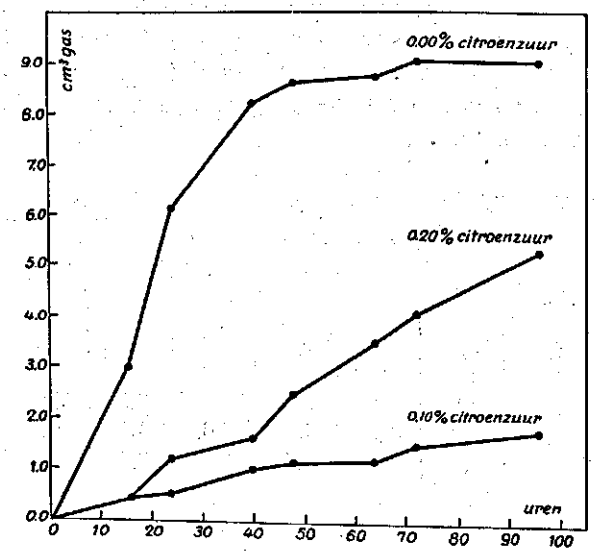
Ten deele worden deze voorbeelden nog weergegeven door de figuren 8 en 9.




Figuur 8.

Invloed van citroenzuur op de gasvorming door stam 13 (C 1) uit lactosegistwater.

Bij een toevoeging van 0,20 % ontstond er meer gas dan bij een van 0,10 %




Figuur 9.

Gasvorming door stam 26 (C 2) uit lactosegistwater waaraan citroenzuur werd toegevoegd.

Bij een toevoeging van 0,20 % ontstond er meer gas dan bij een van 0,10 %

Bij alle tot nu toe beschreven proeven hebben we alleen gebruik gemaakt van stammen, die bij de lebgistingsproef een negatief resultaat gaven. Analoge proeven volgen met stammen, die bij deze proef wel tot gasvorming in staat waren, van welke proeven de resultaten worden weergegeven in de tabellen 23, 24 en 25.

TABEL 23

*Gasvorming door stam 11 (A 1) uit lactosebouillon waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 18 uur | 24 uur | 32 uur | 42 uur | 48 uur |
| – | 8,6 | 11,4 | 14,0 | 16,4 | 17,6 |
| 0,05 % | 11,4 | 16,7 | 24,1 | 33,0 | 38,1 |
| 0,10 % | 7,6 | 12,4 | 19,8 | 27,9 | 32,4 |
| 0,20 % | 9,1 | 17,0 | 28,3 | 40,6 | 48,2 |
| 0,50 % | 4,8 | 14,4 | 28,3 | 42,7 | 50,9 |

TABEL 24

*Gasvorming door stam 4 (I 1) uit lactosebouillon waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

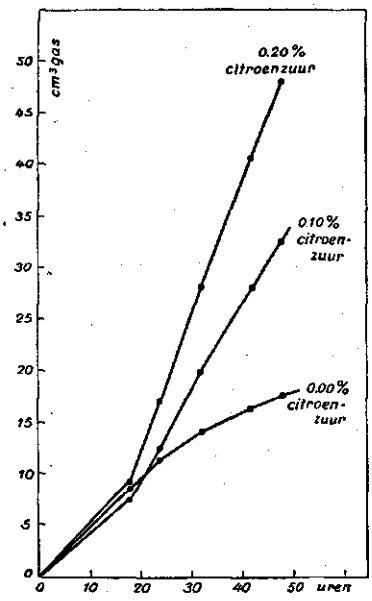
| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 18 uur | 24 uur | 42 uur | 48 uur |
| – | 7,2 | 9,2 | 12,8 | 14,0 |
| 0,05 % | 10,5 | 13,4 | 18,4 | 19,7 |
| 0,10 % | 10,6 | 14,8 | 20,1 | 22,1 |
| 0,20 % | 9,7 | 13,7 | 22,6 | 26,1 |
| 0,50 % | 8,1 | 13,3 | 28,3 | 35,5 |

TABEL 25

*Gasvorming door stam 37 (I 2) uit lactosebouillon waaraan citroenzuur werd toegevoegd*

| Toegevoegd citroenzuur | cm³ gas gevormd na: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 18 uur | 24 uur | 42 uur | 48 uur |
| – | 7,1 | 8,9 | 11,5 | 12,2 |
| 0,05 % | 9,0 | 11,2 | 14,4 | 15,0 |
| 0,10 % | 8,9 | 11,8 | 15,6 | 16,6 |
| 0,20 % | 10,0 | 13,4 | 16,4 | 17,3 |
| 0,50 % | 5,5 | 9,2 | 17,4 | 20,0 |

Figuur 10 geeft eenige gegevens van tabel 23 weer. Bij deze stammen heeft een citroenzuurtoevoeging dus een geheel andere invloed op de gasvorming.




Figuur 10. Invloed van citroenzuur op de gasvorming van stam 11 (A ) uit lactosebouillon
De invloed van het zuur doet zich pas na 18 uur gelden

Bij de los-negatieve stammen wordt door citroenzuurtoevoeging het begin van de gasvorming eenige tijd uitgesteld. Na deze periode begint de gasproductie, waarbij deze soms bij een grootere citroenzuurtoevoeging grooter wordt dan bij een kleinere. Bij de los-positieve stammen daarentegen, heeft het citroenzuur de eerste tijd geen invloed op de gasvorming. Er zijn wel verschillen zichtbaar in de grootte, na b.v. 18 uur (vgl. de tabellen 23, 24 en 25), maar deze zijn toevallig. Zulke verschillen traden ook op als er geen citroenzuur werd toegevoegd. Het belangrijkste is echter, dat het begin van de gasvorming niet door een citroenzuurtoevoeging werd uitgesteld. Later neemt echter bij deze stammen de hoeveelheid gas toe met toenemende hoeveelheden toegevoegd citroenzuur en daardoor is de gasproductie van los-positieve stammen uit een citroenzuur bevattende lactosecultuurvloeistof veel grooter dan die van de andere stammen.

## § 3. OVER DE BEPALING VAN CITROENZUUR IN VOEDINGSVLOEISTOFFEN

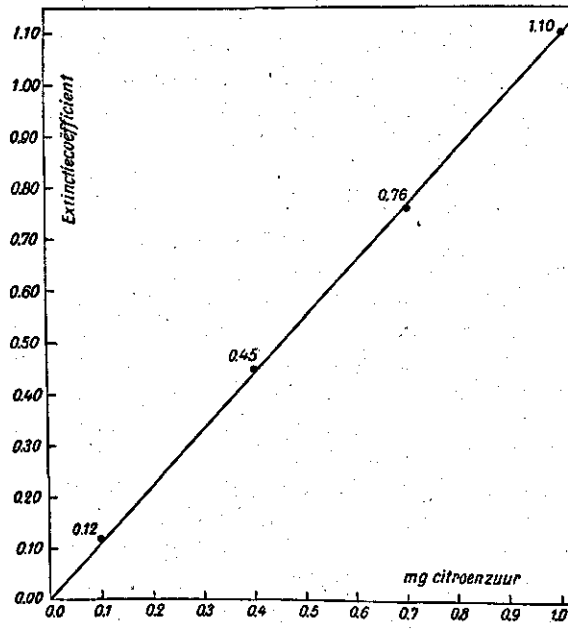
Alvorens de invloed van het citroenzuur verder te kunnen bestudeeren, moesten we eerst nagaan op welke wijze we in de cultures citroenzuur konden bepalen. We hebben gebruik gemaakt van een methode waarbij citroenzuur door oxydatie en bromeering overgevoerd wordt in pentabroomaceton. Daar het vele voordeelen bood om de hoeveelheid citroenzuur in kleine hoeveelheden cultuurvloeistoffen te kunnen bepalen, maakten we bij de bepaling van de hoeveelheid gevormd pentabroomaceton gebruik van een colorimetrische methode, daar de gewichtsanalytische methode hier dan niet gevoelig genoeg is. De methode van PUCHER, SHERMAN en VICKERY (1936) leek ons wel bruikbaar voor onze omstandigheden. Hierbij wordt het citroenzuur door $KMnO_4$ in tegenwoordigheid van broom overgevoerd in pentabroomaceton. Uit deze waterige oplossing

wordt het pentabroomaceton uitgeschud met behulp van petroleumaether. De verkregen oplossing wordt dan geschud met een waterige oplossing van $Na_2S$, waardoor de waterige phase een geelachtige kleur krijgt. Door toevoeging van pyridine wordt deze kleur gestabiliseerd. De extinctie van de gekleurde oplossing blijkt recht evenredig te zijn met de hoeveelheid citroenzuur. Wij hebben de methode in iets gewijzigde vorm gebruikt, omdat bij de pyridinetoevoeging de gele, waterige oplossing troebel werd. Bovendien hebben we eenige veranderingen aangebracht in de hoeveelheden $Na_2S$-oplossing die moeten worden gebruikt.De bepalingen werden tenslotte als volgt uitgevoerd.

We namen van de citroenzuur bevattende vloeistof een zoodanige hoeveelheid, dat de hoeveelheid citroenzuur zich bevond binnen de grenzen 0,1 en 1,0 mg. In een bekerglas van 150 $cm^3$ werd deze aangevuld met water tot ongeveer 75 $cm^3$ en dan voegden we 3 $cm^3$ 50 % $H_2SO_4$ en eenige stukjes puimsteen toe. Ter verwijdering van nog onbekende, storende organische stoffen, kookten we dan de oplossing gedurende 10 minuten, waarbij we er voor moesten zorgen dat het volume na dit koken ongeveer 40 $cm^3$ was. Na het koken koelden we de oplossing snel af tot kamertemperatuur en lieten we de oplossing, na toevoeging van overmaat broomwater, meestal 3 $cm^3$, gedurende 10 minuten staan. Na deze 10 minuten brachten we de oplossing over in een peervormige scheitrechter en voegden dan 2 $cm^3$ KBr-oplossing (11,9 g KBr verdund tot 100 $cm^3$) en 10 $cm^3$ $KMnO_4$-oplossing (47,4 g $KMnO_4$ verdund tot 1000 $cm^3$) toe. Na weer 10 minuten ontkleurden we de oplossing met behulp van de juist benoodigde hoeveelheid 3 % $H_2O_2$. PUCHER, SHERMAN en VICKERY geven wel de voorkeur aan een ontkleuring met 20 % ferrosulfaatoplossing, maar hierdoor krijgt de $Na_2S$-oplossing ook reeds een kleur zonder de aanwezigheid van citroenzuur.

Vervolgens schudden we de ontkleurde oplossing met 25 $cm^3$ petroleumaether (kooktraject 35–50 °C), waarna we de waterige laag uit de trechter lieten vloeien. De petroleumaether werd dan gewasschen met 10 $cm^3$ water. De petroleumaether brachten we dan over in een tweede scheitrechter en de waterige oplossing en het waschwater goten we dan weer in de eerste. Aan de eerste scheitrechter voegden we dan nogmaals 25 $cm^3$ petroleumaether toe. Na het schudden verwijderden we weer de waterige laag en waschten we de petroleumaether weer met 10 $cm^3$ water. Daarna voegden we deze hoeveelheid petroleumaether bij de eerste hoeveelheid in de tweede scheitrechter. De 50 $cm^3$ petroleumaether waschten we dan vier maal met 10 $cm^3$ water. Vervolgens schudden we de petroleumaether met 6 $cm^3$ $Na_2S$-oplossing (4 g gekristalliseerd $Na_2S$ ver-

dunnen tot 100 cm³). De meer of minder geel gekleurde, waterige phase brachten we dan over in een reageerbuis. Dan werd de petroleumaether nogmaals geschud met 6 cm³ $Na_2S$-oplossing, waarna de waterige phase bij de vorige in de reageerbuis werd gebracht. Van de geel gekleurde oplossing in de reageerbuis bepaalden we dan direct de extinctiecoëfficiënt met de photometer van PULFRICH, voorzien van het filter S 47. We willen er nog even aan toevoegen, dat we altijd een versch bereide $Na_2S$-oplossing gebruikten. Uit de bepaalde extinctiecoëfficiënt konden we dan met behulp van de ijklijn, samengesteld met behulp van waterige citroenzuuroplossin-




Figuur 11.
Verband tusschen de extinctiecoëfficiënt en het aantal mg citroenzuur bij de door ons gebruikte citroenzuurbepaling

gen, de hoeveelheid citroenzuur berekenen. We konden namelijk uit de gevonden ijklijn, weergegeven door figuur 11, bepalen dat de hoeveelheid citroenzuur in mg gevonden wordt door de extinctiecoëfficiënt te deelen door 1,10.

Nadat uit deze ijklijn was gebleken, dat de bepaling bruikbaar was voor waterige citroenzuuroplossingen, moesten we echter eerst nog nagaan of deze methode ook betrouwbare uitkomsten gaf als zij werd gebruikt voor de bepaling van citroenzuur in cultuurvloeistoffen, waarin coli-aërogenesbacteriën geleefd hadden.

Allereerst werd gecontroleerd of de resultaten van bepalingen in cultures van los-negatieve stammen in lactosegistwater betrouw-

baar waren. We gebruikten een cultuur, die tegelijk geënt was met de stammen 2 (C 1) en 14 (C 2) en die gedurende 48 uur bij 37 °C bebroed was. Tweemaal hebben we een bepaling uitgevoerd in 3 $cm^3$ van deze vloeistof en in beide gevallen vonden we een extinctiecoëfficiënt van 0,00, waaruit blijkt dat de los-negatieve bacteriën geen storende stofwisselingsproducten maken. Voegden we aan deze 3 $cm^3$ cultuurvloeistof 0,40 mg citroenzuur toe, dan werd een extinctiecoëfficiënt van 0,46 gevonden, waarmee een hoeveelheid citroenzuur van 0,42 mg correspondeert. Hieruit mocht dus de conclusie getrokken worden, dat de methode geschikt was voor de hierboven genoemde bepalingen. Gebruikten we in plaats van de los-negatieve stammen de los-positieve stammen 20 (I 1) en 37 (I 2), dan gaf de proef een extinctiecoëfficiënt van 0,76 bij een blancobepaling van 0,33. Het verschil 0,43, correspondeert met 0,39 mg citroenzuur, dus ook hier kan de hoeveelheid toegevoegd citroenzuur (0,40 mg) kwantitatief teruggevonden worden. Gezien de blancowaarde van 0,33, komen we tot de conclusie, dat een of ander stofwisselingsproduct van de los-positieve stammen meedeed bij de door ons gebruikte bepaling. Bij cultures van deze stammen in lactosegistwater konden we dus de methode alleen toepassen als we ook in staat waren een dergelijke blancobepaling te doen. Inderdaad hebben we onder deze voorwaarden de methode toch nog kunnen gebruiken. Bij gebruik van stam 11 (A 1) vonden we hetzelfde verschijnsel.

Deze foutieve, te hooge uitkomsten zouden op twee manieren kunnen worden veroorzaakt. De eene mogelijkheid is, dat er in deze cultures stofwisselingsproducten voorkomen, welke onder de invloed van $KMnO_4$ en broom ook in pentabroomaceton overgaan. De mogelijke andere oorzaak is gelegen in de colorimetrische bepaling van de hoeveelheid pentabroomaceton. Misschien komen naast het pentabroomaceton in de petroleumaether nog andere stoffen voor, die meedoen bij de reactie met het $Na_2S$. We hebben geprobeerd dit na te gaan, door met behulp van een gravimetrische pentabroomaceton-methode citroenzuur te bepalen in cultures van los-positieve en los-negatieve stammen. We gebruikten de volgende, door VAN BEYNUM (1934) beschreven, methode.

We brachten 50 $cm^3$ cultuurvloeistof in een maatkolf van 200 $cm^3$. Dan voegden we achtereenvolgens toe:

10 $cm^3$ 50 % $H_2SO_4$.

5 $cm^3$ $K_4Fe(CN)_6$-oplossing (106 g $K_4Fe(CN)_6$ aangevuld met water tot 1000 $cm^3$).

5 $cm^3$ Zn-acetaatoplossing (238 g Zn-acetaat en 30 g ijsazijn met water aanvullen tot 1000 $cm^3$).

150 of 50 mg citroenzuur.

We vulden de maatkolf verder met water, waarna we de vloeistof, na goed omschudden, filtreerden met behulp van vouwfilters van Schleicher en Schüll no. 572½. Van het heldere filtraat brachten we 150 $cm^3$ over in een Erlenmeyer van 300 $cm^3$, die gesloten kon worden met een ingeslepen glazen stop, waarna we hieraan toevoegden:

2 $cm^3$ 40 % KBr-oplossing.
50 $cm^3$ 50 % $H_2SO_4$.
25 $cm^3$ broomwater.

Dan lieten we onder flink schudden uit een buret 10 $cm^3$ 5 % $KMnO_4$ toevloeien. Na 5 minuten ontkleurden we de vloeistof met behulp van 20 % ferrosulfaatoplossing. De vloeistof lieten we een nacht overstaan, waarna we het neerslag affiltreerden met de door FATTON (1939) voor dit doel aanbevolen glazen filterkroes (Jena 1 G 4). Na het neerslag uitgewasschen te hebben met $H_2SO_4$-houdend water en met gedestilleerd water, droogden we de kroesjes door ze gedurende 24 uur te plaatsen in een exsiccator gevuld met phosphorpentoxyde. Voor het berekenen van de hoeveelheid citroenzuur maakten we gebruik van de formule: mg citroenzuur = 0,5629 (p + 10), waarin p is het aantal mg gevonden pentabroomaceton. Hierbij hebben we dan rekening gehouden met een volumecorrectie van 1 $cm^3$ voor het neerslag en met het feit, dat onder deze omstandigheden ongeveer 10 mg pentabroomaceton in oplossing blijft. Tabel 26 laat de resultaten van eenige bepalingen zien.

TABEL 26 *De bepaling van citroenzuur met behulp van een gewichtsanalytische pentabroomacetonmethode in coli-aërogenescultures*

| Cultuurvloeistof | Geënt met | Citroenzuur | |
|---|---|---|---|
| | | Toegevoegd | Gevonden |
| Lactosegistwater . . . . . | stam 2 (C 1) | 50 mg | 50,6 mg |
| „ . . . . . | stam 14 (C 2) | 150 mg | 147,7 mg |
| „ . . . . . | stam 20 (I 1) | 50 mg | 54,7 mg |
| „ . . . . . | stam 11 (A 1) | 150 mg | 161,7 mg |

Ook hier zien we, dat de citroenzuurbepaling, toegepast op cultures van los-positieve stammen, te hooge uitkomsten geeft. Het is dus zeer waarschijnlijk, dat die bacteriën in een dergelijke cultuurvloeistof stoffen produceeren, die door de behandeling met $KMnO_4$ en broom ook pentabroomaceton vormen. Aangezien de gewichtsanalytische methode dezelfde resultaten gaf als de colorimetrische, hebben we de eerste verder niet meer gebruikt, daar er voor deze bepaling veel te groote hoeveelheden cultuurvloeistof noodig zijn.

## § 4. OVER DE OORZAAK VAN HET VERSCHIL IN INVLOED, DAT CITROENZUURTOEVOEGING UITOEFENT OP DE GASVORMING UIT LACTOSE DOOR COLI- EN DOOR AËROGENESBACTERIËN

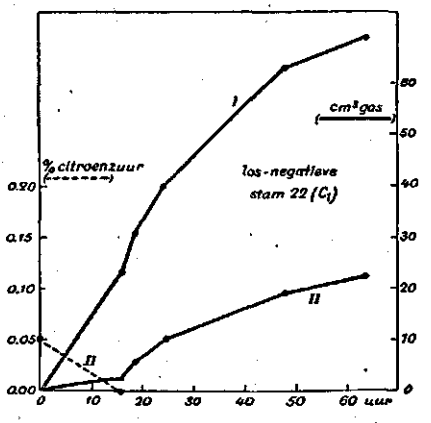
Het leek van belang na te gaan, waarom citroenzuurtoevoeging aan een lactosegistwatercultuur bij los-negatieve stammen zoo een geheel andere invloed had dan bij los-positieve. We hebben daartoe bij een aantal gistingsproeven, naast de bepalingen van de gasproductie, ook citroenzuurbepalingen verricht. Hier volgen dan de resultaten van eenige proeven met los-negatieve stammen.

We gebruikten twee gistingsflesschen met een inhoud van 550 cm³ (genummerd I en II), welke beide werden gevuld met lactosegistwater. Aan no II voegden we bovendien nog 0,05 % citroenzuur toe in de vorm van natriumcitraat. Aan elke flesch werd 4 cm³ van een paar uur oude bouilloncultuur van de los-negatieve stam 22 (C 1) toegevoegd, waarna zij tenslotte bij 30 °C werden weggezet. Tabel 27 en figuur 12 geven de resultaten van deze proef weer.

TABEL 27

*Invloed van citroenzuur op de gasvorming door de los-negatieve stam 22 (C 1) uit lactosegistwater*

| Gistings-flesch | Cultuurvloeistof | cm³ gas na: | | | | | Flesch II mg citroenzuur in 3 cm³ cultuurvloeistof. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 16 uur | 18 uur | 24 uur | 48 uur | 64 uur | |
| I | lactosegistwater | 23,5 | 31,2 | 39,9 | 63,0 | 69,0 | begin 1,5 mg |
| II | idem + 0,05 % citroenzuur | 2,5 | 6,0 | 10,5 | 19,5 | 22,5 | na 16 uur 0,0 mg |




Figuur 12.
Verband tusschen de citroenzuurverdwijning en de gasvorming uit lactosegistwater door een los-negatieve stam
I = gas gevormd uit lactosegistwater
II = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater + 0,05 % citroenzuur

Het blijkt, dat de bacteriën van deze los-negatieve stam het citroenzuur snel verwerken bij hun suikervergisting, en dat, zoolang

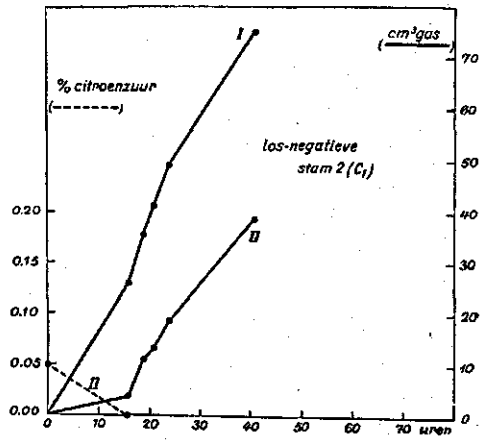
er citroenzuur aanwezig is, geen gas gevormd wordt uit lactose. De conclusie, dat het citroenzuurverbruik samenhangt met de vergisting van lactose, wordt getrokken uit het feit, dat die vergisting blijkens de gasproductie anders verloopt. Ter aanvulling is er nog een proef genomen met de eveneens los-negatieve stam 2 (C 1). Nu werden er drie flesschen gebruikt, no I kreeg geen citroenzuur, no II 0,05 % en no III 0,20 %. Voor de resultaten verwijzen we naar tabel 28 en figuur 13 en 14.

TABEL 28

*Invloed van citroenzuur op de gasvorming door de los-negatieve stam 2 (C 1) uit lactosegistwater*

| Gistingsflesch | Cultuurvloeistof | cm³ gas na: | | | | | mg citroenzuur in 3 cm³ cultuurvloeistof | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 16 uur | 19 uur | 21 uur | 24 uur | 41 uur | van II | van III |
| I | Lactosegistwater | 26.0 | 35,2 | 41,0 | 49,0 | 75,0 | begin 1,5 | begin 6,0 |
| II | idem + 0.05 % citroenzuur | 4,0 | 11,2 | 13,2 | 18,5 | 38,5 | na 16 uur 0.0 | na 16 uur 0.0 |
| III | idem + 0.20 % citroenzuur | 3,0 | 5,0 | 5,7 | 11,5 | 23,0 | | |

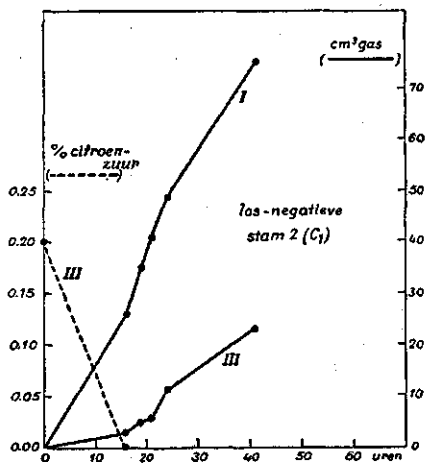
Ook bij deze proef kunnen de los-negatieve bacteriën eerst dan gas vormen uit lactose als zij het citroenzuur verwerkt hebben. Bovendien blijkt, dat onder deze omstandigheden een toevoeging van 0,05 % citroenzuur niet veel minder invloed heeft dan een toevoeging van 0,20 %. Dit verschijnsel wordt verklaard in de volgende paragraaf, waar tevens nader wordt ingegaan op de vraag, hoe het citroenzuur invloed kan uitoefenen op de gasproductie uit lactose. Om nu de geheel andere invloed van citroenzuur op de gasproductie van de los-positieve stammen te verklaren, maken we gebruik van de gegevens van een onderzoek van BREWER en WERKMAN (1939). Deze onderzoekers werkten met *Aerobacter indologenes*, een aëro-




Figuur 13.
Verband tusschen de citroenzuurverdwijning en de gasvorming uit lactosegistwater door een los-negatieve stam

I = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater

II = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater met 0,05% citroenzuur




Figuur 14.
Verband tusschen de citroenzuurverdwijning en de gasvorming uit lactosegistwater door een los-negatieve stam
I = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater
III = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater met 0,20 % citroenzuur

genes-, dus ook een los-positief, type. Zij gingen na, welke producten deze bacterie maakt uit citroenzuur, glucose en uit een combinatie van beide. Tabel 29 geeft hun resultaten weer over de vergisting van beide stoffen afzonderlijk.

TABEL 29
*De vergisting van glucose en citroenzuur door Aerobacter indologenes (volgens Brewer en Werkman)*

| Substraat | Per 100 m. molen vergist substraat ontstaan. (eveneens in m. molen) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $H_2$ | $CO_2$ | HCOOH | $CH_3$—COOH | Acetyl methyl-carbinol | Butyleen-glycol | Barn-steen-zuur | Melk-zuur | $CH_3$—$CH_2OH$ |
| Citroenzuur . . | 31,9 | 173,1 | 4,3 | 152,5 | 3,5 | 3,9 | 13,1 | 6,2 | – |
| Glucose . . . . | 28 | 153 | 28 | 1 | 0,1 | 64 | 0 | 3 | 67 |

De gasvorming per 100 m.mol vergist citroenzuur is dus ongeveer dezelfde als die uit glucose. Wat echter de overige producten betreft treden er typische verschillen op. Voor ons onderzoek zijn echter de gegevens van de vergisting van glucose tezamen met citroenzuur van grooter belang. De vergisting werd uitgevoerd in een vloeistof, welke per liter 100 m.mol glucose, 50 m.mol citroenzuur en 5 g pepton bevatte. Tabel 30 geeft hiervan de resultaten (blz. 42).

Het citroenzuur blijkt dus slechts zeer langzaam vergist te worden naast suiker. We mogen aannemen, dat het feit, dat BREWER en WERKMAN met glucose werkten en wij met lactose, geen verschil maakt. Dit niet gebruiken van citroenzuur bij het begin van de suikervergisting door los-positieve stammen is dus wel een groot verschil met de snelle citroenzuurverdwijning bij de los-negatieve stammen

TABEL 30 *De gezamenlijke vergisting van glucose en citroenzuur door Aerobacter indologenes (volgens Brewer en Werkman)*

| Tijd na: | Verdwenen (m. molen) | | Gevormd: (m. molen) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glucose | Citroenzuur | $H_2$ | $CO_2$ | HCOOH | $CH_3$—COOH | Acetylamethylcarbinol | Butyleenglycol | Barnsteenzuur | Melkzuur | $CH_3$—$CH_2OH$ |
| 17 uur | 41,8 | 0,83 | 4,5 | 58,2 | 16,2 | 2,00 | 0,21 | 26,2 | 0 | 1,73 | 21,4 |
| 23 „ | 55,6 | 1,54 | 7,5 | 78,1 | 22,2 | 2,89 | 0,06 | 35,4 | 0 | 4,58 | 28,8 |
| 36 „ | 78,3 | 2,73 | 18,6 | 120,0 | 19,1 | 2,21 | 0 | 52,2 | 0 | 5,22 | 41,3 |
| 50 „ | 100,0 | 3,46 | 36,5 | 166,1 | 5,63 | 10,8 | 0 | 64,3 | 0 | 6,18 | 53,9 |
| 161 „ | 100,0 | 49,4 | 63,3 | 252,2 | 3,75 | 75,4 | 5,18 | 60,1 | 16,3 | 6,64 | 51,0 |
| 306 „ | 100,0 | 50,0 | 67,1 | 266,2 | 1,36 | 81,3 | 1,67 | 67,4 | 16,4 | 4,85 | 43,9 |

(vergelijk de tabellen 27 en 28 en de figuren 12, 13 en 14). Hiermede is het te verklaren, dat toevoeging van citroenzuur aan een lactosegistwatercultuur van een los-positieve stam gedurende de eerste tijd geen invloed uitoefent op de gasproductie (vergelijk de tabellen 23, 24 en 25 en figuur 10).

Later begint echter ook het citroenzuur te verdwijnen en als we de gegevens van tabel 29 en 30 met elkaar vergelijken, dan blijkt de citroenzuurvergisting de totale gasproductie te verhoogen. De gistingen verloopen echter toch niet geheel onafhankelijk van elkaar, hetgeen ook weer blijkt bij een vergelijking van tabel 29 met 30. Uit citroenzuur wordt nl. minder mierenzuur, minder butyleenglycol en minder alcohol gevormd dan uit glucose, maar daarentegen meer azijnzuur. Zoodra de vergisting van citroenzuur in de gegevens van tabel 30 van beteekenis begint te worden, zien we, in overeenkomst met de door tabel 29 aangegeven verschillen, dat dan de productie van mierenzuur en van de alcohol daalt. De invloed van de citroenzuurtoevoeging bij de door ons genomen proeven met los-positieve stammen kan nu geheel verklaard worden met dit onderzoek van BREWER en WERKMAN. Gedurende de eerste tijd wordt er practisch geen citroenzuur vergist, zoodat er dan ook geen verschil is tusschen de gasproductie uit het lactosegistwater zonder of met citroenzuur (zie figuur 10). Later begint de citroenzuurvergisting, waardoor in de fleschjes met citroenzuur meer gas gevormd wordt dan in die zonder dit zuur. Nu hebben we bij onze proeven met een overmaat lactose te doen, nl. 2 %, terwijl er onder deze omstandigheden ruim 0,5 % kan worden vergist, daar dan de dalende pH het proces stopzet. Echter zal in de fleschjes met citroenzuur door de vergisting hiervan de pH minder snel dalen, waardoor in deze gevallen meer suiker kan worden omgezet. Zoodoende worden

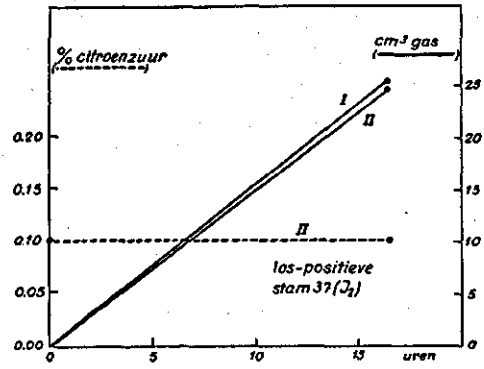
tenslotte de verschillen in de gasproductie uit lactosegistwater zonder en met citroenzuur nog grooter.

Op dezelfde manier als bij de los-negatieve stammen zijn door ons ook eenige proeven uitgevoerd met los-positieve. Bij elke proef gebruikten we twee gistingsfleschjes (I en II), nu echter met een inhoud van 120 cm³, welke eerst werden voorzien van 1 cm³ van een eenige uren oude bouilloncultuur van een los-positieve stam. Dan werden de fleschjes gevuld met lactosegistwater en kreeg no. II bovendien nog 0,10 % citroenzuur in de vorm van natriumcitraat. We gingen de gasproductie na en namen uit de fleschjes met een steriele pipet van tijd tot tijd een monster, waarin we het citroenzuurgehalte bepaalden. In verband met het feit, dat los-positieve stammen in lactosegistwater stoffen maakten die ook meededen bij de door ons gebruikte citroenzuurbepaling, verrichtten we ook telkens in het fleschje no. I een bepaling. Uit het verschil van de extinctiecoëfficiënten, gevonden bij de bepalingen in I en II, berekenden we het citroenzuurgehalte van II. Later bleek ons echter, dat de herhaalde monsterneming storend had gewerkt op het verloop van de gisting en daar we door omstandigheden niet in staat waren deze proeven te herhalen op een andere en betere manier, konden we slechts het gedeelte tot en met de eerste monsterneming

TABEL 31

*Over den invloed van citroenzuur op de gasvorming uit lactosegistwater van stam 37 (I 2)*

| Tijd na: | cm³ gas gevormd uit | | Gevonden extinctie-coëfficient bij 'n bepaling in 0.6 cm³ vloeistof | | Citroenzuur in II |
|---|---|---|---|---|---|
| | I lactosegistwater | II lactosegistwater met citroenzuur | I lactosegistwater | II lactosegistwater met citroenzuur | |
| 0 uur | 0 | 0 | 0,00 | 0,66 | 0,100 % |
| 16½ uur | 25,5 | 24,3 | 0,14 | 0,83 | 0,105 % |




Figuur 15.

Over de invloed van citroenzuur op de suikervergisting door los-positieve stammen

I = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater

II = gegevens betrekking hebbende op lactosegistwater met 0,10 % citroenzuur

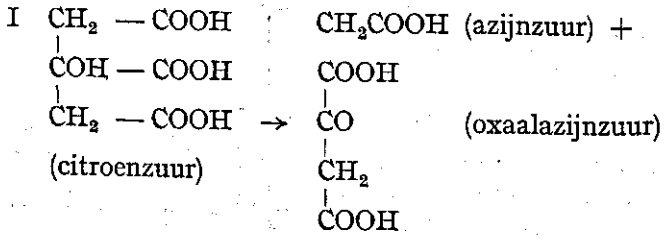
als juist aanvaarden. Tabel 31 en figuur 15 geven de resultaten weer van dit deel van de proef met de los-positieve stam 37 (I 2) (blz. 43).

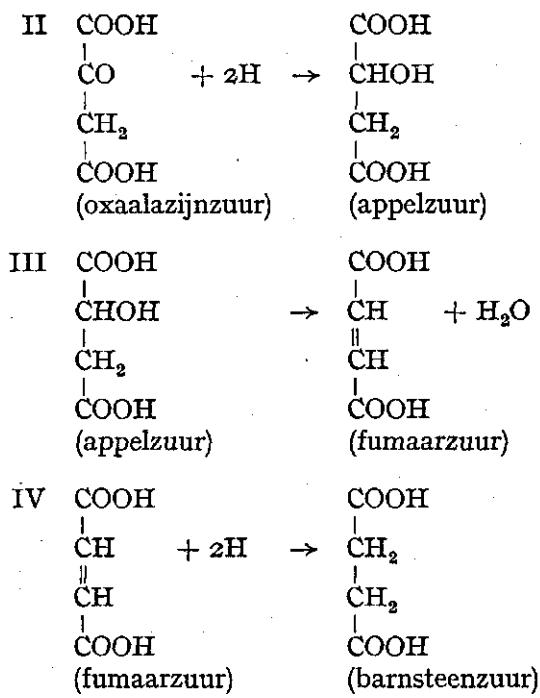
Ook uit onze proef blijkt dus, dat gedurende de eerste tijd het citroenzuur niet wordt vergist en dat het dan ook geen invloed uitoefent op de gasproductie uit lactose. Op dezelfde manier en met hetzelfde resultaat konden we dit tevens aantoonen bij de los-positieve stammen 4 (I 1) en 11 (A 1).

Thans wordt het gedrag der verschillende typen van de coliaërogenesgroep bij de lebgistingsproeven ook duidelijk. Bij de proef met reincultures belemmert het citroenzuur de gasvorming van de los-negatieve stammen, terwijl het geen of een eenigszins bevorderende invloed uitoefent op de gasproductie van de los-positieve. Eveneens zijn nu de resultaten van de gistingsproeven met combinaties van typen te verklaren (zie tabel 13 en 14 en figuur 3). Gedurende de eerste tijd (minstens ± 16 uur, zie tabel 37) laten de los-positieve stammen het citroenzuur onaangetast, zoodat de los-negatieve stammen over dit zuur kunnen beschikken om daarmee de lactose zonder een noemenswaardige gasproductie om te zetten. De laatstgenoemde stammen maken het dan de andere ook nog onmogelijk om gas te vormen. Over de wijze waarop dit zou kunnen gebeuren zijn op bladzijde 24 reeds eenige veronderstellingen geuit.

## § 5. VERDERE ONDERZOEKINGEN OVER DE INVLOED VAN CITROENZUUR OP DE SUIKERVERGISTING VAN DE LOS-NEGATIEVE STAMMEN

Uit de reeds beschreven onderzoekingen is gebleken, dat de los-negatieve stammen bijna geen gas kunnen vormen uit lactose als er citroenzuur aanwezig is. Beziet men dit in het licht der tegenwoordige opvattingen, waarbij de suikervergisting wordt beschouwd als een aantal in elkaar grijpende oxydatie-reductiereacties, waarbij de waterstof een zeer belangrijke rol speelt, dan kunnen we ons denken dat citroenzuur hier als waterstofacceptor dienst doet. Hier door krijgen de reacties gedeeltelijk een ander verloop en wordt de suiker zonder gasvorming verwerkt. Op de volgende manier zou citroenzuur waterstof kunnen accepteeren:






Er zijn nu een aantal argumenten, welke pleiten voor deze zienswijze. Reactie I is niet vreemd in het rijk der coli-aërogenesbacteriën, want BREWER en WERKMAN (1939) beschouwen dit als de eerste reactie bij de citroenzuurdissimilatie van *Aerobacter indologenes*, een aërogenestype. KREBS (1937) geeft aan, dat colibacteriën oxaalazijnzuur kunnen reduceeren tot fumaarzuur, waarbij gebruik wordt gemaakt van het enzym fumarase voor de omzetting van appelzuur tot fumaarzuur. Dezelfde auteur deelt mede, dat colibacteriën met behulp van het enzym succinodehydrogenase het fumaarzuur verder kunnen reduceeren tot barnsteenzuur.

Als de boven aangegeven zienswijze juist is, dan moeten de intermediair gevormde producten oxaalazijnzuur, appelzuur en fumaarzuur dezelfde invloed uitoefenen op de gasvorming uit lactose als citroenzuur. Het moet dan mogelijk zijn, om met behulp van deze stoffen het begin van de gasvorming uit lactose door de los-negatieve colibacteriën te verschuiven tot het moment waarop deze stoffen verdwenen zijn. Dit verschuiven van het begin van de gasvorming hebben we dan ook kunnen aantoonen. Gebruikt werden gistingsfleschjes met een inhoud van 120 $cm^3$, welke we alle voorzagen van 1 $cm^3$ van een eenige uren oude bouilloncultuur van de te onderzoeken stam. Aan een gedeelte van de fleschjes voegden we

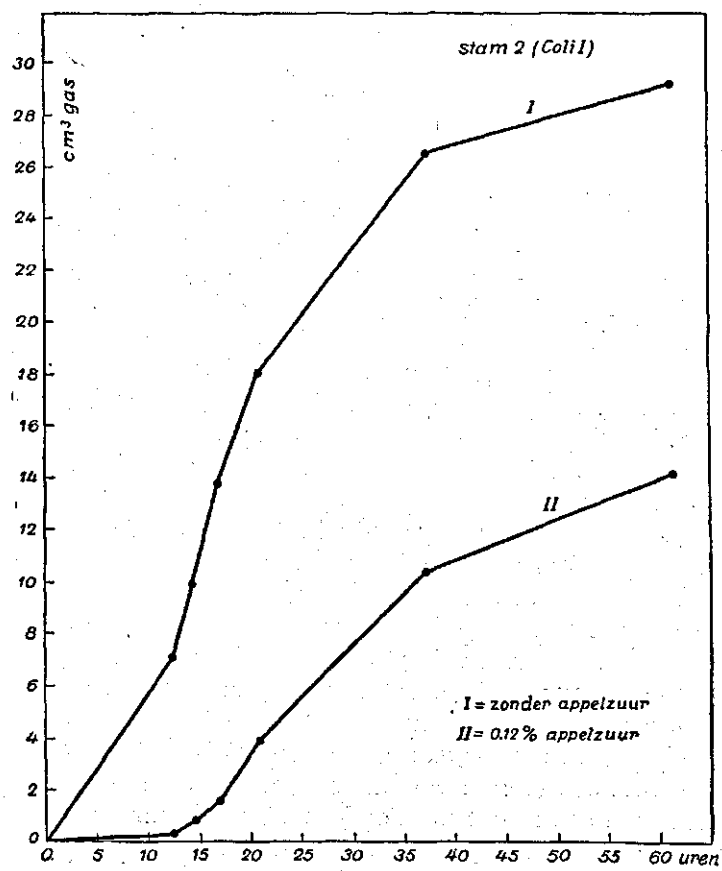
dan 1½ cm³ toe van een neutrale, steriele 10 % oplossing van oxaalazijnzuur, appelzuur of fumaarzuur. De fleschjes werden dan verder gevuld met lactosegistwater en weggezet bij 30 °C.

Tabel 32 laat eenige resultaten zien van proeven, waarbij de invloed van appelzuur werd nagegaan.

TABEL 32

*Invloed van appelzuur op de gasvorming uit lactosegistwater door los-negatieve stammen*

| Stam | Toegevoegd | cm³ gas gevormd na: | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12½ uur | 14½ uur | 17 uur | 21 uur | 37½ uur | 61½ uur |
| 2 (C 1) | – | 7,2 | 10,0 | 13,8 | 18,1 | 26,5 | 29,2 |
| 2 | 0,12 % appelzuur | 0,3 | 0,8 | 1,6 | 4,0 | 10,5 | 14,2 |
| 22 (C 1) | – | 3,5 | 5,5 | 8,0 | 10,5 | 15,5 | 17,5 |
| 22 | 0,12 % appelzuur | 0,2 | 0,9 | 1,5 | 2,5 | 5,0 | 7,0 |




Figuur 16
Invloed van appelzuur op de gasvorming uit lactosegistwater door los-negatieve stammen. Toevoeging van appelzuur stelt dus evenals citroenzuur de gasvorming eenige tijd uit

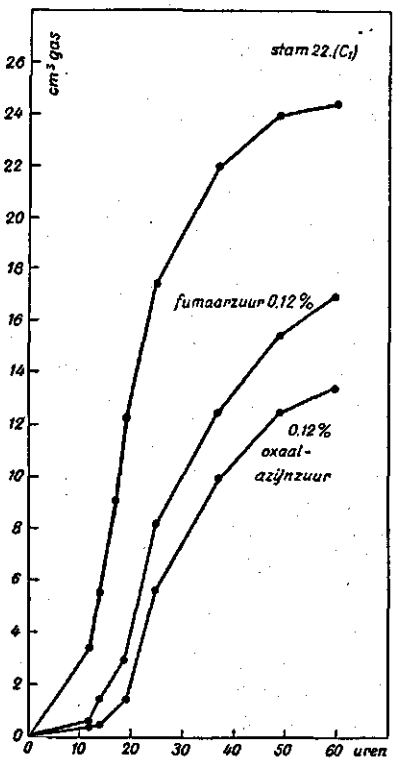
De resultaten verkregen met stam 2 (C 1) worden door figuur 16 weergegeven. Tabel 33 laat eenige resultaten zien, verkregen door toevoeging van oxaalazijnzuur en fumaarzuur.

TABEL 33 *Invloed van oxaalazijnzuur en fumaarzuur op de gasvorming uit lactosegistwater door los-negatieve stammen*

| Stam | Toegevoegd | cm³ gas gevormd na: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12 uur | 14 uur | 17 uur | 19 uur | 25 uur | 37 uur | 49 uur | 60 uur |
| 22 (C 1) | – | 3,5 | 5,6 | 9,1 | 12,3 | 17,5 | 22,0 | 24,0 | 24,5 |
| 22 | 0,12% oxaalazijnzuur | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 2,8 | 5,7 | 10,0 | 12,5 | 13,5 |
| 22 | 0,12% fumaarzuur | 0,6 | 1,5 | 3,0 | 5,0 | 8,2 | 12,5 | 15,5 | 17,0 |
| 7 (C 1) | – | 2,5 | 5,0 | 8,5 | 12,0 | 17,5 | 25,0 | 27,5 | 28,5 |
| 7 | 0,12% fumaarzuur | 0,3 | 0,7 | 1,5 | 2,5 | 4,8 | 8,2 | 10,0 | 11,0 |

De resultaten verkregen met stam 22 (C 1) worden bovendien nog weergegeven door figuur 17. Inderdaad blijkt uit deze gegevens, dat oxaalazijnzuur, appelzuur en fumaarzuur dezelfde invloed op de gasvorming hebben als citroenzuur.

Tenslotte kunnen we nog contrôleeren of er door de citroenzuurtoevoeging een grootere barnsteenzuurproductie ontstaat. Elk molecuul citroenzuur zou een molecuul barnsteenzuur moeten leveren. We entten lactosegistwater en dezelfde vloeistof, voorzien van 0,15 % citroenzuur, met de stammen 2, 22 en 7 en bepaalden direct na het verdwijnen van het citroenzuur het barnsteenzuurgehalte van deze




Figuur 17.
Invloed van oxaalazijnzuur en fumaarzuur op de gasvorming uit lactosegistwater van los-negatieve stammen. Toevoegingen van oxaalazijnzuur en fumaarzuur stellen dus evenals citroenzuur het begin van de gasvorming uit

cultuurvloeistoffen.[1]) Per 100 cm³ was er 150 mg citroenzuur aanwezig, waardoor er in de tweede vloeistof een meerproductie van 92 mg barnsteenzuur zou moeten ontstaan. We hebben aangenomen, dat de barnsteenzuurproductie uit de lactose en uit de bestanddeelen van het gistwater in beide gevallen hetzelfde was. Tabel 34 geeft de resultaten.

TABEL 34

*Meerproductie van barnsteenzuur tengevolge van een citroenzuurtoevoeging aan lactosegistwater*

| Stam | mg barnsteenzuur per 100 cm³ | | Meerproductie aan barnsteenzuur door citroenzuurtoevoeging |
|---|---|---|---|
| | lactosegistwater | lactosegistwater met 0,15 % citroenzuur | |
| 2 (C 1) | 98,2 | 219,8 | 111,6 mg |
| 22 (C 1) | 99,2 | 190,1 | 90,9 mg |
| 7 (C 1) | 96,2 | 186,9 | 90,7 mg |

De goede overeenstemming pleit ook weer voor de hier beschreven zienswijze. Toch blijven er nog een paar vragen over en wel:

1. hoe is het mogelijk, dat 0,20 % citroenzuur maar weinig meer invloed heeft dan 0,05 % (zie tabel 28 en figuur 13 en 14)?
2. hoe te verklaren, dat er bij een toevoeging van 0,20 % citroenzuur aan een lactosegistwatercultuur van sommige los-negatieve stammen tenslotte meer gas ontstaat dan bij een van 0,10 % (zie tabel 21 en 22 en figuur 8 en 9)?

In verband met deze vragen lijkt het redelijk te veronderstellen, dat bij hooge citroenzuurgiften niet al het zuur gebruikt wordt op deze manier, maar dat er dan na eenige tijd ook een deel van het citroenzuur door de los-negatieve bacteriën wordt vergist, zooals ook de los-positieve stammen tenslotte met de suiker ook het citroenzuur vergisten. Dit aannemende kan er gemakkelijk een antwoord worden gegeven op de bovenstaande vragen. Het is natuurlijk heel goed mogelijk, dat deze vergisting van citroenzuur anders verloopt dan die beschreven voor de los-positieve stammen (zie tabel 29 en 30). Nu bleek ons, dat de los-negatieve colibacteriën, die, geënt van een gewone voedingsbodem, niet kunnen groeien in de citraatvloeistof volgens Koser, dit laatste wel kunnen als voor de enting bacteriën worden gebruikt, die gegroeid zijn in een vloeistof welke naast lactose ook citroenzuur bevat (bijvoorbeeld wei). Dit is ook weer een argument voor de veronderstelling, dat zij op den duur ook een deel van het citroenzuur vergisten.

Hoeveel citroenzuur gebruikt wordt als waterstofacceptor hangt

[1]) Aan het einde van de paragraaf wordt de gebruikte methode beschreven.

waarschijnlijk ook nauw samen met de hoeveelheid suiker, welke de los-negatieve bacteriën in de cultuurvloeistof kunnen omzetten. Kan er meer suiker worden vergist dan zal er ook meer van dit zuur gebruikt worden. In verband hiermee mogen we aannemen, dat bij de lebgistingsproeven en in kaas, waar de bacteriën meer suiker kunnen vergisten door de bufferende werking van het milieu, van het beschikbare citroenzuur in het algemeen een grooter deel, zoo niet alles, zal worden gebruikt om de gasvorming tegen te gaan.

De colistam 31 (C 1) gaf een zwak positief resultaat bij de lebgistingsproef (zie tabel 11), maar volgens tabel 20 was het gedrag ten opzichte van citroenzuur in lactosegistwater hetzelfde als van de andere colistammen. Deze colistam zou dus juist in melk eerder het citroenzuur gaan vergisten dan in lactosegistwater. Blijkbaar zijn hier ook nog andere, onbekende factoren van invloed. Geënt uit wei groeiden de bacteriën van deze stam veel beter in de citraatvloeistof dan de andere, los-negatieve colistammen. Dit wijst ook wel op een grootere geschiktheid om citroenzuur te vergisten.

Bij de barnsteenzuurbepaling namen we 100 $cm^3$ cultuurvloeistof, waarvan na aanzuren door middel van een stoomstraaldestillatie de vluchtige vetzuren verwijderd werden. Na instelling van een alkalische reactie met behulp van soda, werd de vloeistof tot een volume van eenige $cm^3$ ingedampt. Dan voegden we zooveel 50 % $H_2SO_4$ toe tot de vloeistof zuur reageerde met congorood. Door toevoeging van watervrij $Na_2SO_4$ werd de vloeistof omgezet tot een vaste stof. In een Soxhletapparaat werd dan de massa met aether uitgetrokken. Nadat de aether verwijderd was namen we het residu op in 100 $cm^3$ 96 % alcohol. Hierin bepaalden we dan het barnsteenzuur volgens de methode aangegeven door Smit (1913). Na toevoeging van een paar druppels phenolphtaleïne werd de oplossing aan de kook gebracht, waarna we druppelsgewijs helder koud verzadigd barytwater toevoegden tot rose kleuring. We moesten hierbij zorgen dat de alcoholconcentratie boven de 70 % bleef, daar anders ook bariumlactaat zou neerslaan. Daarna lieten we de vloeistof even doorkoken, waarbij het bariumsuccinaat zich op de bodem verzamelde. Na afkoeling, waarbij ervoor moest worden gezorgd dat de vloeistof niet in aanraking kwam met het koolzuur uit de lucht, brachten we het neerslag over in een gewogen glazen filterkroes (Jena 1 G 4). Het werd uitgewasschen met alcohol en aether en tenslotte, na bij 100 °C gedroogd te zijn, gewogen. Een mg barnsteenzuur komt overeen met 2,14 mg bariumsuccinaat.

Om deze methode te controleeren voerden we twee maal een bepaling uit met 250 mg barnsteenzuur, waarbij we 253,1 en 251,7 mg terugvonden.

HOOFDSTUK IV

# PROEVEN MET KAAS, WELKE AANSLUITEN BIJ DE ONDERZOEKINGEN IN DE VORIGE HOOFDSTUKKEN BESCHREVEN

## § 1. EEN OVERZICHT VAN DE METHODES, DIE WE BIJ DEZE PROEVEN GEBRUIKT HEBBEN

In het tweede hoofdstuk hebben we eenige oriënteerende proeven beschreven aan de hand waarvan we de bacteriën van de coliaërogenesgroep hebben ingedeeld in los-positieve en los-negatieve typen. In dit hoofdstuk worden nu proeven beschreven, waarbij we hebben nagegaan in hoeverre de resultaten van deze oriënteerende proeven ook gelden voor het vroeg-los in kaas. Verder hebben we nagegaan of citroenzuur op de suikervergisting in kaas door coliaërogenesbacteriën dezelfde invloed heeft als in de proeven die we reeds beschreven hebben.

We maakten kaasjes van ongeveer 250 gram uit 2,5 liter melk. Als kaastobbe gebruikten we een pan met een inhoud van 5 liter. Voor het kaasmaken werd het kaasgerei gesteriliseerd door het gedurende 10 minuten bij 110 °C te verhitten. De te verkazen melk werd eerst verhit tot 85 °C, om de wisselende invloed van de bacteriën, waarmee de melk reeds besmet was, te vermijden. Dat deze invloed groot kan zijn bewijzen de proeven van HÜTTIG (1934), waarbij bleek, dat sommige monsters rauwe melk, voorzien van 0,05 % van een aërogenescultuur, toch nog geen gistingsverschijnselen te zien gaven. Dit werd veroorzaakt door de werking van de melkzuurbacteriën, die zich in de eenige uren oude melk reeds zoozeer hadden vermenigvuldigd, dat de aërogenesbacteriën hun achterstand niet meer konden inhalen en in de tijd, die dan voor hun ontwikkeling beschikbaar was, geen gas meer konden vormen. Na afkoeling tot 32 °C werd de melk geënt met een cultuur van de te onderzoeken stam, welke cultuur gedurende 16–18 uur bij 37 °C gestaan had. Doordat deze cultures steeds ongeveer evenveel bacteriën bevatten, waren we in staat om de besmetting van de melk met gistingsbacteriën, zooals wij de bacteriën van de coliaërogenesgroep ook wel zullen noemen, eenigszins te regelen. Na het enten plaatsten we de melk gedurende 1 uur bij 31 °C, om een zoo nauw mogelijke aansluiting te krijgen aan de gang van zaken in de

practijk. Daar heeft de besmetting van de melk ook meestal plaats eenige tijd vóór het begin van het kaasmaken. Immers pas overgeënte bacteriën vermeerderen zich in de nieuwe voedingsbodem gedurende de eerste tijd, de zoogenaamde „lag-phase", niet. Na deze phase beginnen de bacteriën zich snel te vermenigvuldigen, waarbij zij in de „log-phase" komen. Met de door ons genomen maatregel waren we er zekerder van, dat de bacteriën zich in dezelfde toestand bevonden als in de practijk bij een natuurlijke besmetting van de melk. Na dit uur werd de melk in strem gezet, waarbij we aan de melk toevoegden:

1e 3 $cm^3$ 35 % $CaCl_2$-oplossing, waardoor de stremming geen nadeelige invloed zou ondervinden van de voorafgaande verhitting van de melk.
2e 5–10 $cm^3$ zuursel.
3e een hoeveelheid stremsel voldoende om de wrongel, na 35 minuten stremtijd bij 31 °C, geschikt te doen zijn voor de verdere bewerking.

Na het stremmen gingen we over tot het snijden. Gedurende die bewerking, die 25 minuten duurde en waarbij we de wrongel bewerkten met een klein kaasmesje, voerden we de temperatuur op tot 34 °C. Na het snijden tapten we 1000 $cm^3$ wei af. Na vervolgens 200–400 $cm^3$ water te hebben toegevoegd, voerden we de temperatuur op tot 39 °C. Gedurende de verdere behandeling daalde de temperatuur telkens, maar zoodra de thermometer 36 °C aangaf, werd opnieuw nagewarmd tot 39 °C. Gedurende het nawarmen, dat 30–40 minuten duurde, roerden we de wrongel met behulp van een ebonieten lepel dooreen. Na het roeren tapten we alle wei af en brachten we de wrongel over in het kaasvat. Een paar minuten later werd om de wrongel een kaasdoek aangebracht. Nadat de kazen 15 minuten gestaan hadden, werden ze onder de pers geplaatst. Gedurende het persen, dat 5 uur duurde, brachten we langzamerhand op de kaas een druk aan van 28 kg, hetgeen neerkwam op een druk van 0,4 kg per $cm^2$ van de kaasdoorsnede, welke nl. 70 $cm^2$ groot was. We hebben ernaar gestreefd om vele uitwendige omstandigheden zoo te regelen, dat het vroeg-los een goede kans kreeg om zich te ontwikkelen. Daarom was de temperatuur in het perslokaal 22–23 °C. Na het persen verwijderden we de kaasdoek en de bij het persen gevormde kaasrand en plaatsten we de kaas omgekeerd in het vat. Ook gedurende dit omloopen was de temperatuur nogal hoog, namelijk weer 22–23 °C. Na het omloopen, de kaas was dan 24 uur oud, beoordeelden we haar naar de mate waarin vroeglos was opgetreden. Ook werd op dit moment de pH van het kaas-

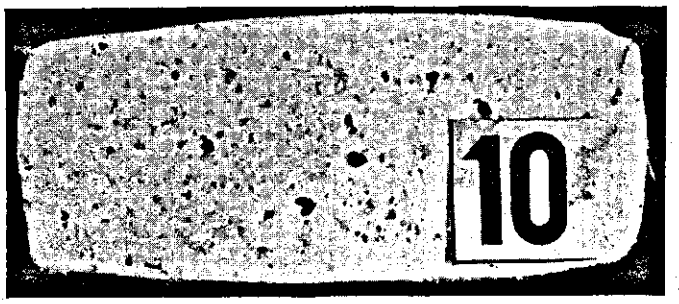
vocht bepaald. We mochten de kaas na 24 uur reeds definitief beoordeelen, omdat ons, door middel van de nog te beschrijven lactosebepalingen, was gebleken, dat dan reeds alle suiker was verdwenen. Na de beoordeeling verbleef de kaas gedurende 4 uur in een 20 % zoutoplossing. In de practijk komt de kaas wel iets eerder in de pekel, maar door de veel grootere omvang der practijkkaas heeft het zout veel meer tijd noodig om in het binnenste van de kaas door te dringen. We wilden niet dat het ontstaan van vroeg-los kon beïnvloed worden door het pekelen, daar dit in de practijk bij een voldoend snelle melkzuurgisting ook niet gebeurt.

De wijze van beoordeeling was als volgt. Allereerst werd nagegaan of de kaas gerezen was. Daarna werd de kaas doorgesneden en beoordeelden we het aantal openingen in de kaasdoorsnede. Daarna werd aan de hand van de hier volgende schaal een cijfer gegeven voor de mate waarin vroeg-los was opgetreden.

| | |
|---|---|
| De kaas is niet gerezen . . . . . | 0 = hoogstens een paar gaatjes<br>1 = tamelijk veel gaatjes<br>2 = veel gaten |
| De kaas is wel gerezen en wel in toenemende mate in de door de pijl aangegeven richting | 3 = veel gaten<br>4 = idem<br>5 = idem ↓ |

Om een indruk te geven van het uiterlijk van een kaasdoorsnede, die voor vroeg-los een bepaalde beoordeeling gekregen heeft, verwijzen we naar de foto's.

Voor de pH-bepaling hebben we een colorimetrische methode gebruikt. We maakten 10 g kaas fijn in, en met behulp van, 50 $cm^3$ water. Nadat dit mengsel eenige tijd gestaan had, verwijderden we de kaasdeeltjes met behulp van een vouwfilter (Schleicher en Schüll no. 588). Van het filtraat bepaalden we de pH met behulp van een comparator, methylrood en bufferoplossingen volgens WALPOLE. Wilden we de resultaten van de proeven toepassen op het kaasmaken in de practijk, dan mochten de pH-waarden niet te veel afwijken van die van practijkkazen. We konden echter niet verhinderen dat de pH, tengevolge van het enten met gistingsbacteriën en de maatregelen die we namen om het ontstaan van vroeg-los te bevorderen, vaak iets te hoog was. Vaak was het noodig dat bij een proef twee kaasjes tegelijk gemaakt werden uit twee porties melk. Als de pH-waarden van deze kaasjes nu gelijk of bijna gelijk waren, dan waren we er zeker van, dat een eventueel verschil in de mate van vroeg-los niet kon zijn veroorzaakt door een verschil in pH. Bij gelijktijdig gemaakte kaasjes konden we wel voor gelijke pH-waarden zorgen, maar het bleek ons onmogelijk om constante waarden te krijgen

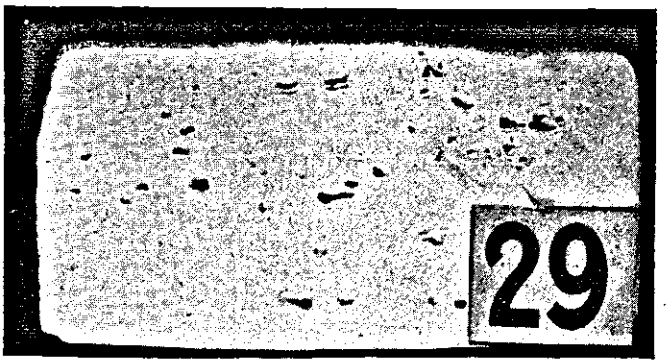



Figuur 18

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 1 (C 1). Los = 1

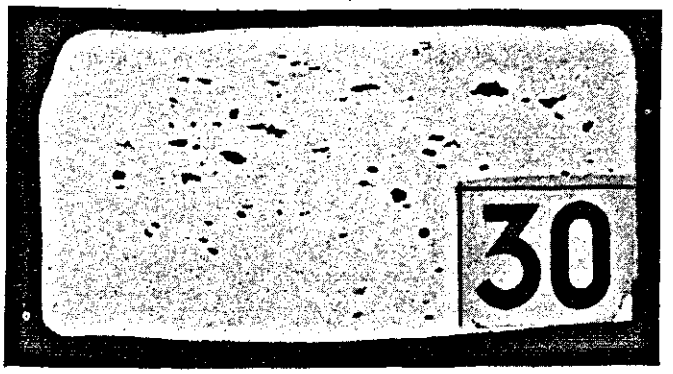
Figuur 19

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 2 (C 1). Los = 1–2



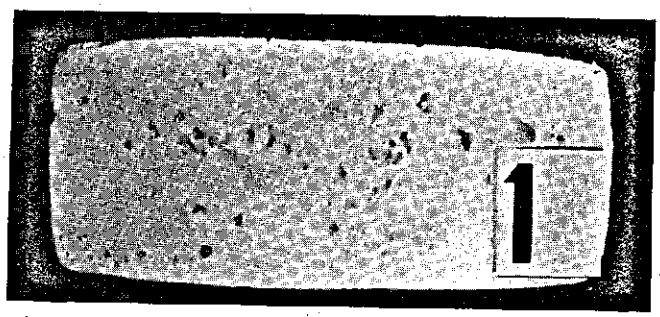

Figuur 20

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 23 (Ca 1). Los = 0



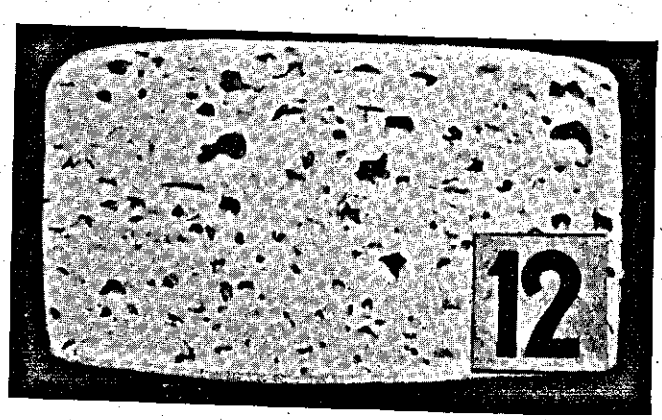

Figuur 21

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 34 (I 1). Los = 0



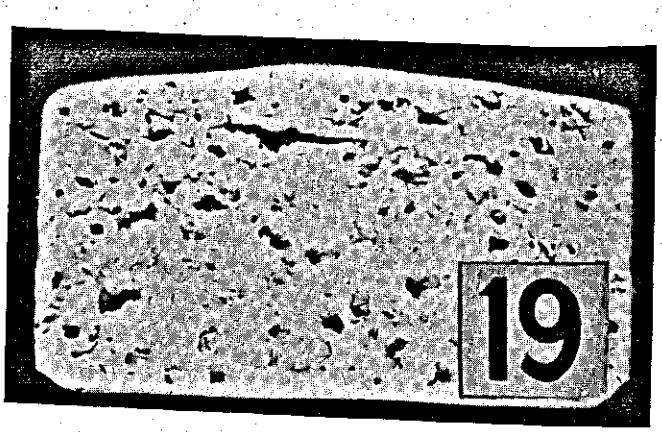

Figuur 22

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 26 (C 2). Los = 0



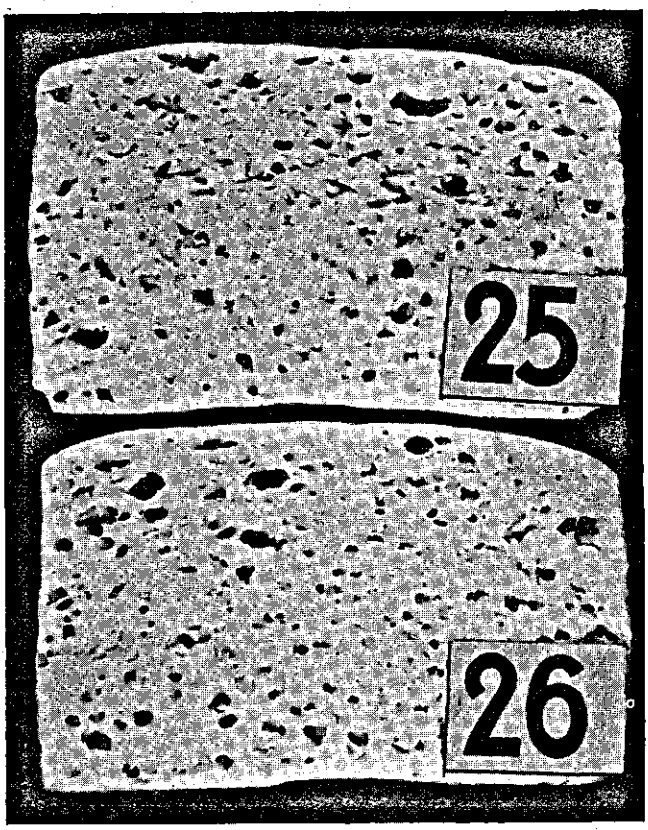

Figuur 23

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 11 (A 1). Los = 4




Figuur 24

Melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 5 (I 1). Los = 4



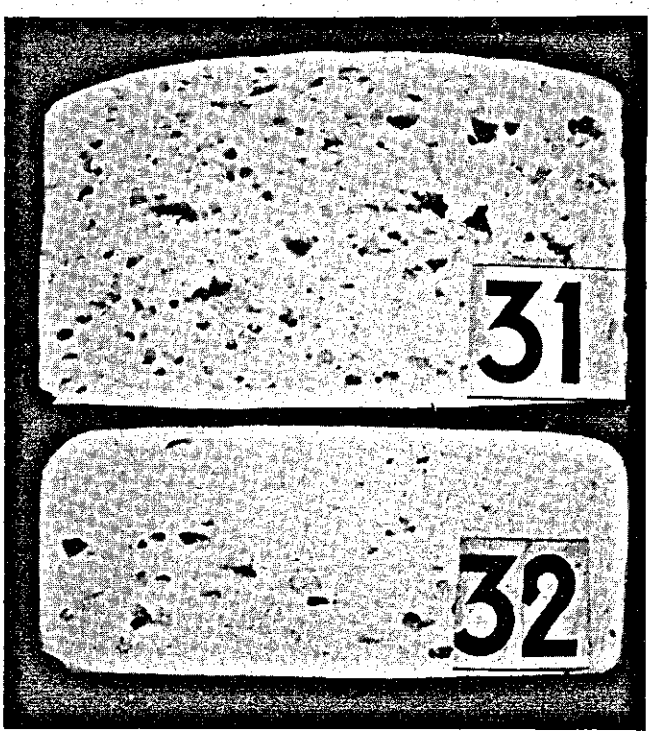

Figuur 25

Invloed van combinaties van typen op het vroeg-los

no 25 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 11 (A 1). Los = 4–5

no 26 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 11 (A 1) en $^5/_2$ cm³ cultuur van stam 26 (C 2). Los = 4–5

De gasvorming van deze aërogenesstam werd dus niet beïnvloed door deze toevoeging van los-negatieve bacteriën



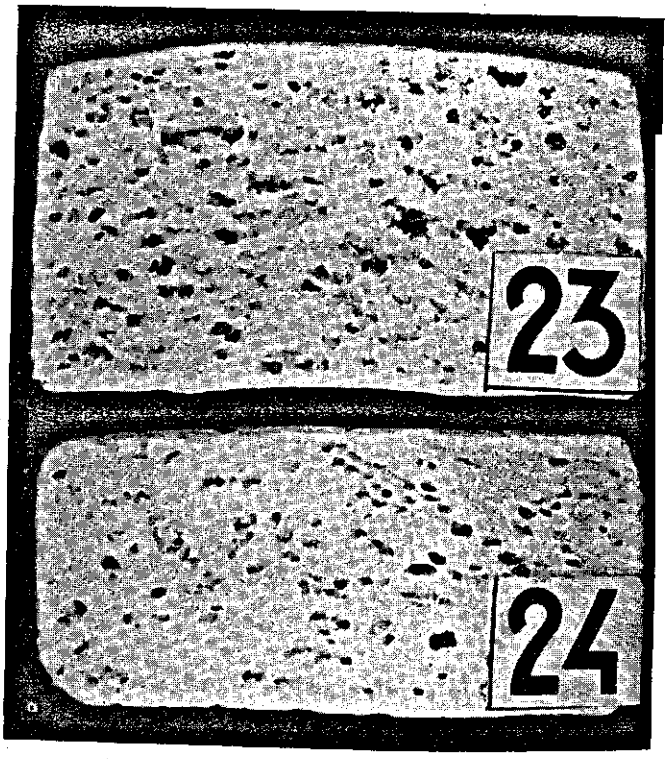

Figuur 26

Invloed van combinaties van typen op het vroeg-los

no 31 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 19 (A 1). Los = 4

no 32 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 19 (A 1) en $^5/_2$ cm³ cultuur van stam 30 (C 1). Los = 0

De gasvorming van deze aërogenesstam is wel te beïnvloeden door een toevoeging van los-negatieve bacteriën.

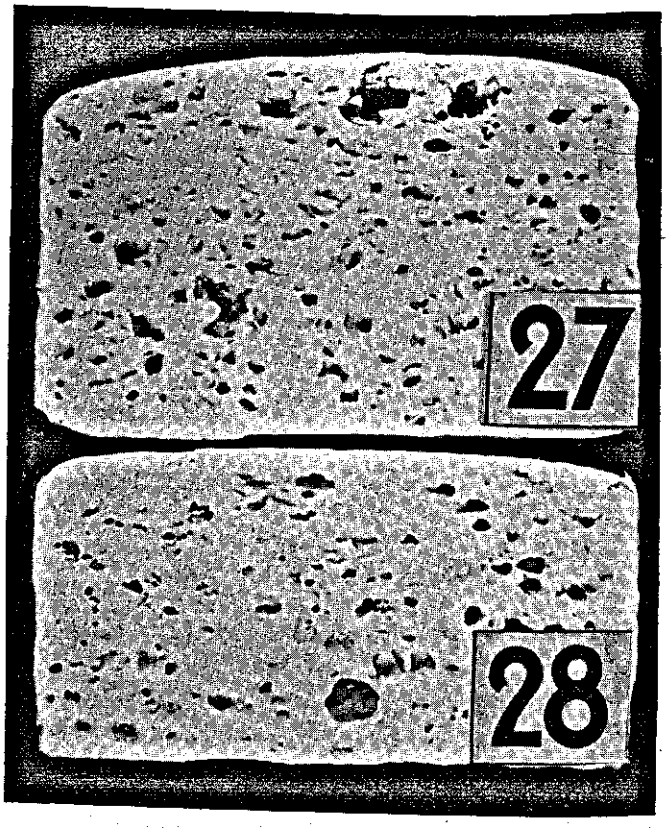



Figuur 27

Invloed van combinaties van typen op het vroeg-los

no 23 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 37 (I 2). Los = 4

no 24 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 37 (I 2) en $^5/_2$ cm³ cultuur van stam 26 (C 2). Los = 1–2

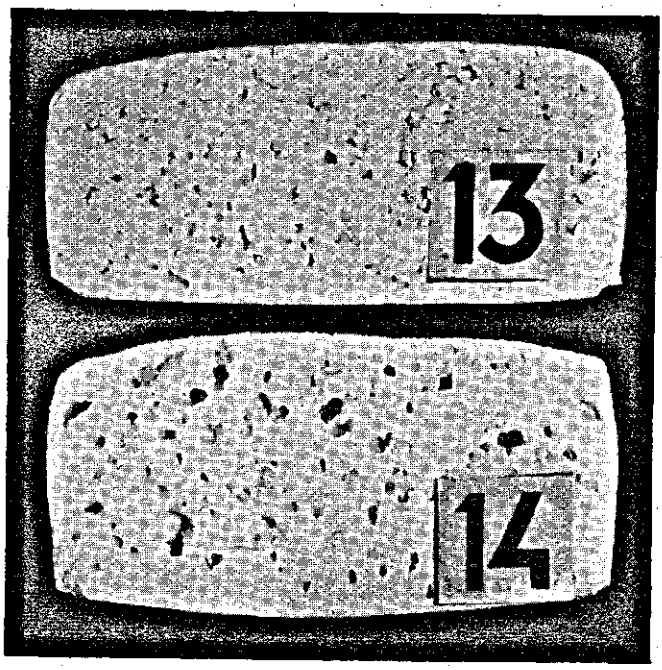



Figuur 28

Invloed van combinaties van typen op het vroeg-los

no 27 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 37 (I 2). Los = 4–5

no 28 melk geënt met $^1/_2$ cm³ cultuur van stam 37 (I 2) en $^5/_2$ cm³ cultuur van stam 2 (C 1). Los = 3

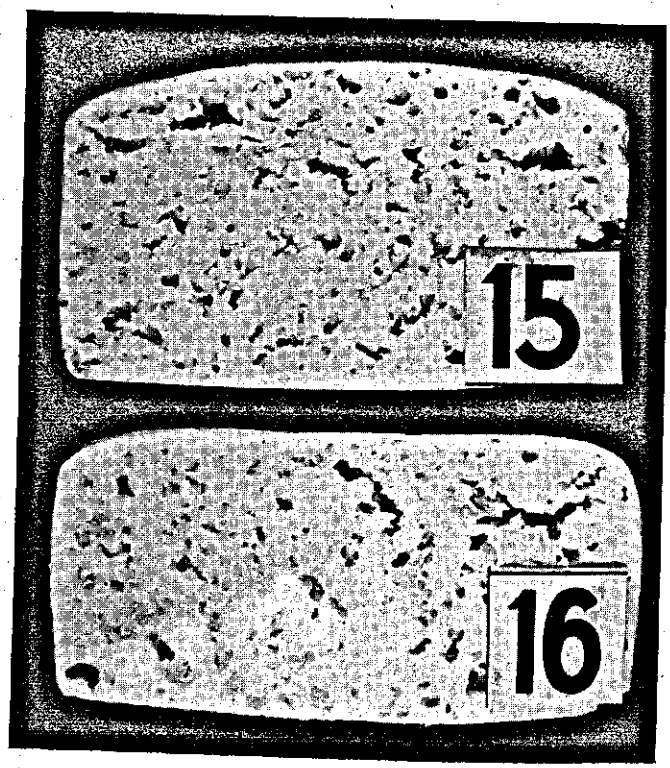



Figuur 29. Invloed van citroenzuur op de gasproductie door colibacteriën (stam 1, C 1) in kaas met een tekort aan citroenzuur

no 13. toegevoegd bij de bereiding 400 cm³ 0,18 % citroenzuuroplossing. Los = 0–1

no 14. toegevoegd bij de bereiding 400 cm³ water. Los = 1–2

Door de groote watertoevoeging is een eenigszins losse kaas ontstaan (no 14), maar toevoeging van citroenzuur heft de invloed van die watertoevoeging weer op

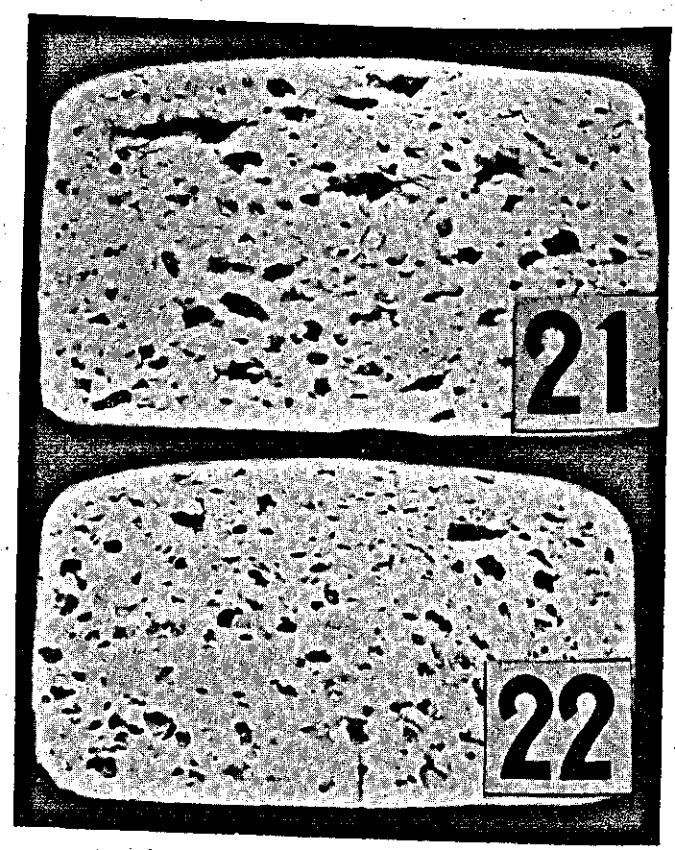



Figuur 30

Invloed van citroenzuur op de gasvorming van los-positieve bacteriën in kaas

no 15 melk geënt met 5 $cm^3$ cultuur van stam 11 (A 1)
Toegevoegd bij het nawarmen 400 $cm^3$ 0,18% citroenzuuroplossing.
Los = 4.

no 16 melk geënt met 5 $cm^3$ cultuur van stam 11 (A 1)
Toegevoegd bij het nawarmen 400 $cm^3$ water.
Los = 3–4




Figuur 31

Invloed van citroenzuur op de gasvorming van los-positieve bacteriën in kaas

no 21 melk geënt met 5 $cm^3$ cultuur van stam 4 (I 1)
Toegevoegd bij het nawarmen 400 $cm^3$ van een oplossing die 2,1 g citroenzuur bevatte (pH 5,8). Los = 4–5.

no 22 melk geënt met 5 $cm^3$ cultuur van stam 4 (I 1)
Toegevoegd bij het nawarmen 400 $cm^3$ water.
Los = 4

voor de kaasjes, die gedurende de geheele periode gemaakt werden. Dit werd veroorzaakt door de onmogelijkheid om, onder onze omstandigheden, van dag tot dag op precies dezelfde manier kaas te maken.

Om de lactose te bepalen, wreven we 15 g kaas fijn in een mortier met 105 $cm^3$ van een 0,1 N soda-oplossing van 50 °C, die zeer geleidelijk werden toegevoegd. Aan de verkregen kaasemulsie voegden we achtereenvolgens 15 $cm^3$ $K_4Fe(CN)_6$-oplossing en 15 $cm^3$ zinkacetaatoplossing toe.[1]) Na flink te hebben geschud verwijderden we met behulp van vouwfilters (Schleicher en Schüll no. 572½) het neerslag. Van het filtraat werden 2 × 25 $cm^3$ voor de lactosebepaling volgens SCHOORL (1929) gebruikt. Het volume van de kaassuspensie was ongeveer 150 $cm^3$. Rekening houdende met het volume van de neergeslagen stoffen, hielden we 140 $cm^3$ oplossing over, waarvan ongeveer 60 $cm^3$ filtraat verkregen werd. 25 $cm^3$ filtraat correspondeerden dus met 2,68 g kaas, waarin in het begin 50 mg lactose aanwezig waren. Het verdwijnen van de lactose kon op deze manier dus goed gevolgd worden. Hoeveelheden suiker, toegevoegd aan het filtraat van een kaas, waarvan de lactose reeds verdwenen was, konden we precies terugvinden, waardoor we mogen aannemen dat deze methode nauwkeurige resultaten geeft.

Aanvankelijk klaarden we de kaassuspensie met behulp van 10 % trichloorazijnzuuroplossing, maar het geneutraliseerde filtraat was onbruikbaar, daar onder deze omstandigheden de lactose niet in staat was tot reductie van de oplossing van LUFF.

We hebben de beschreven methode toegepast op de eerste 20 kaasjes, maar het bleek ons dat er altijd een kleine reductie van de oplossing volgens LUFF overbleef, overeenkomende met 0,2–1,0 $cm^3$ 0,1 N thiosulfaat. Daar er geen reden was om aan te nemen, dat er, na het verdwijnen van de grootste hoeveelheid van de lactose, een zeer klein gedeelte zich aan de vergisting onttrekken zou, hebben we aangenomen, dat deze kleine reductie niet door lactose veroorzaakt werd. Waarschijnlijk speelden stofwisselingsproducten van de coli-aërogenesbacteriën, b.v. acetyl-methyl-carbinol, hier een rol. Daar bleek dat in deze 20 gevallen de lactose steeds binnen 24 uur verdwenen was, hebben we onze kazen na 24 uur definitief beoordeeld naar de mate waarin vroeg-los was opgetreden.

---

[1]) Zie voor de samenstelling van deze oplossingen bladzijde 37.

## § 2. EEN ONDERZOEK NAAR DE MATE, WAARIN DE VERSCHILLENDE TYPEN VAN DE COLI-AËROGENESGROEP VROEG-LOS KUNNEN VEROORZAKEN

Over dit onderwerp zijn reeds eenige onderzoekingen gepubliceerd. DORNER (1925) vond dat bij het ontstaan van het vroeg-los de excrementen van de koeien overheerschend veel aërogenesbacteriën bevatten. Daarom schreef hij aan de aërogenesbacteriën de grootste invloed toe bij de vroeg-beginnende gasvorming in kaas. WHITEHEAD (1931) onderzocht de invloed van de coli-aërogenesbacteriën bij cheddarkaas en hij vond, dat ze geen van alle in staat waren vroeg-los te veroorzaken. Daarentegen kreeg HÜTTIG (1933) bij zijn onderzoekingen een geheel ander resultaat. Deze onderzoeker maakte zachte kaasjes uit melk, geënt met verschillende typen van de coli-aërogenesgroep. De aërogenesbacteriën veroorzaakten in erge mate vroeg-los, de echte colibacteriën heelemaal niet. Hier tusschenin stonden, wat de gasvorming in kaas betreft, de paracolibacteriën, waarmee HÜTTIG colibacteriën bedoelde, die een of andere karakteristieke eigenschap van de echte colibacteriën misten, zooals de indolvorming of de coagulatie van melk.

Dat men aan deze publicaties tot nu toe weinig aandacht besteedde, blijkt wel uit het feit, dat in 1942 VAN BEYNUM en PETTE nog aangaven, dat het kaasgebrek vroeg-los door *Bacterium coli* of door *Bacterium aërogenes* veroorzaakt wordt. Het leek ons daarom van belang na te gaan hoe de verschillende typen van de coli-aërogenesgroep zich gedragen in kazen, bereid op de manier welke gebruikelijk is voor de Nederlandsche harde kaassoorten. Bovendien konden we dan tevens zien in hoeverre de resultaten van de lebgistingsproeven overeenkomen met die verkregen bij de proeven met kaas. Op bladzijde 22 hebben we er nl. reeds op gewezen, dat er groote verschillen bestaan tusschen de omstandigheden, waarin de bacteriën werkzaam zijn bij de lebgistingsproef en in kaas.

Eerst volgt een beschrijving van de proeven waarbij we gebruik hebben gemaakt van colistammen, en van intermediaire stammen met een negatief resultaat bij de lebgistingsproef.

De 2,5 liter melk werd geënt met 5 cm³ cultuur van de te onderzoeken stam. Het gebruikte zuursel (7 cm³) was een reincultuur van *Streptococcus cremoris*.

Bij het nawarmen werd 200 cm³ water gebruikt.

Het aantal gistingsbacteriën werd geteld door in duplo verdunningen over te brengen in buizen gevuld met de voedingsoplossing

volgens Mc CONKEY. [1]) Voor de interpreteering van de verkregen gegevens maakten we dan gebruik van de tabellen van Mc CRADY. [2])

Tabel 35 laat eenige verkregen resultaten zien.

TABEL 35

*Over de invloed van colitypen en sommige intermediaire typen op de gasvorming in kaas*

| Kaas | Stam | Type | Aantal coli-aërogenesbacteriën | | Beoordeeling | Foto no | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Bij het stremmen* | *In 24 uur oude kaas* | | | |
| 14 | 1 | C 1 | 19.000.000 /cm3 | 1.600.000.000 /g | 1 | 10 | 5,15 |
| 79 | 2 | C 1 | 1.900.000 „ | – | 1–2 | 33 | 5,20 |
| 59 | 27 | C 1 | 1.900.000 „ | 6.000.000.000 „ | 0 | – | 5,15 |
| 60 | 30 | C 1 | 8.000.000 „ | 6.000.000.000 „ | 0 | – | 5,15 |
| 54 | 31 | C 1 | 800.000 „ | – | 3 | – | 5,35 |
| 53 | 16 | C 2 | 4.160.000 „ | – | 0 | – | 5,25 |
| 57 | 23 | Ca 1 | 800.000 „ | – | 0 | 29 | 5,10 |
| 49 | 15 | I 1 | 800.000 „ | – | 1–2 | – | 5,30 |
| 58 | 34 | I 1 | 2.000.000 „ | – | 0 | 30 | 5,10 |
| 44 | 26 | C 2 | 1.300.000 „ | 600.000.000 „ | 0 | 1 | 5,20 |

Met uitzondering van stam 31, die ook een afwijkende kaas leverde, vormden geen dezer stammen gas bij de lebgistingsproef. Stam 31 (C 1) kreeg echter bij deze proef de beoordeeling „iets positief". We zien dat de resultaten der lebgistingsproef volkomen in overeenstemming zijn met die gevonden bij de proeven met kaas. Alleen zouden we nog eraan willen toevoegen, dat de $C_2$-typen, die bij de lebgistingsproef de beoordeeling „iets gas" kregen, nu in de kaas in het geheel geen gas kunnen vormen. De figuren 18, 19, 20, 21 en 22 geven de gemaakte foto's weer.

Tabel 36 (blz. 56) laat de resultaten zien van proeven, waarbij de melk geënt werd met 5 $cm^3$ cultuur van stammen die bij de lebgistingsproef een positief resultaat gaven. Hier gebruikten we 10 $cm^3$ zuursel en de hoeveelheid water die we toevoegden bedroeg 200–300 $cm^3$.

Het blijkt, dat de stammen, die gas vormden bij de lebgistingsproef, alle tot een los-vorming in kaas in staat waren. De figuren 23 en 24 laten de beide foto's zien.

Van de 22 door ons geïsoleerde colistammen kan er dus maar één (stam 31) een vroeg-losse kaas geven. Sommige intermediaire typen, in ons geval 4 van de 14 stammen, kunnen ook geen vroeg-los veroorzaken. De overige intermediaire typen en de typen van de aërogenes-cloacaegroep zijn daartoe wel in staat.

[1]) De manier waarop uit kaas verdunningen werden gemaakt wordt vermeld op bladzijde 62.

[2]) Zie K. J. DEMETER, Bakteriologische Untersuchungsmethoden, Berlijn 1934.

TABEL 36

*Over de invloed van stammen met een positief resultaat bij de lebgistingsproef op de gasvorming in kaas*

| Kaas | Stam | Type | Aantal coli-aërogenesbacteriën | | Beoordeeling | Foto no | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Bij het stremmen | In 24 uur oude kaas | | | |
| 2 | 21 | I 1 | – | – | 4 | – | 4,90 |
| 5 | 5 | I 1 | 13.000.000 /cm³ | 250.000.000 /g | 4 | – | 5,40 |
| 6 | 20 | I 1 | 2.500.000 „ | 13.000.000 „ | 4 | – | 5,30 |
| 9 | 11 | A 1 | 600.000 „ | 190.000.000 „ | 4 | – | 5,20 |
| 16 | 11 | A 1 | 8.000.000 „ | – | 4 | 12 | 5,10 |
| 24 | 19 | A 1 | 19.000.000 „ | – | 4 | – | – |
| 50 | 41 | Aa 1 | 1.800.000 „ | – | 4 | – | 5,35 |
| 10 | 39 | Cl | 2.500.000 „ | 80.000.000 „ | 4 | – | 5,10 |
| 23 | 5 | I 1 | 400.000 „ | – | 4 | 19 | 5,10 |

Wel geven alle typen der negatieve stammen aan de kaas een onaangename gistingssmaak, waarbij we, evenals WHITEHEAD (1931), geen verband vonden tusschen de indolvorming en de door de stammen veroorzaakte gistingssmaak.

We kunnen dus met behulp van de lebgistingsproef nagaan of een bepaalde coli-aërogenescultuur in staat is een gasvorming in kaas te veroorzaken.

Wanneer we onze resultaten vergelijken met die vermeld in het litteratuuroverzicht, dan blijkt direct dat DORNER (1925) zeer terecht veronderstelde, dat de aërogenesbacteriën de meeste invloed uitoefenden op het vroeg-los. De resultaten van WHITEHEAD (1931) zijn echter anders dan de onze. In verband echter met de geheel andere bereidingswijze van cheddarkaas en de gebrekkige determineering van de door hem gebruikte stammen, kunnen zijn onderzoekingen niet vergeleken worden met de onze. De resultaten van HÜTTIG (1933) zijn bijna gelijk aan de onze. Het is alleen lastig na te gaan wat hij bedoelde met paracolibacteriën. Hoogstwaarschijnlijk vallen de $C_2$- en I-typen hieronder, maar volgens deze onderzoeker stonden de bacteriën wat de mate van los betreft tusschen de echte colibacteriën en de aërogenesbacteriën. Bij de door ons genomen proeven kon een deel van deze bacteriën (de $C_2$- en sommige I-typen) heelemaal geen vroeg-los veroorzaken, maar was de werking van het andere deel (de overige I-typen) even sterk als die van de aërogenesbacteriën.

## § 3. OVER EENIGE FACTOREN, DIE VAN BELANG ZIJN BIJ DE GASVORMING IN KAAS DOOR LOS-POSITIEVE STAMMEN

Uit de gegevens van de tabellen 35 en 36 blijkt, dat de coliaërogenesbacteriën zich in kaas gedurende de eerste 24 uur zeer goed kunnen ontwikkelen. Als gevolg daarvan zien we (zie tabel 36), dat er geen verschil in gasvorming is bij de kazen 5 en 23, beide geënt met stam 5, en bij de kazen 9 en 16, beide geënt met stam 11, alhoewel er wel groote verschillen waren in het aantal bacteriën in de melk. Bij andere proeven met kaas, die nog worden beschreven, is vaak maar met ½ cm³ cultuur, soms zelfs maar met 0,1 cm³ cultuur, van een los-positieve stam geënt, terwijl de gasvorming toch even groot was. Tabel 37 laat eenige resultaten zien. We gebruikten in bijna al deze gevallen 7 cm³ zuursel en voegden 200–300 cm³ water toe.

TABEL 37 *Over het verband tusschen de gasvorming in kaas en het aantal bacteriën, waarmee de 2,5 liter melk geënt werd*

| Kaas | Stam | Type | Geënt met | Aantal coliaërogenesbacteriën bij het stremmen | Beoordeeling | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | 11 | A 1 | 5 cm³ | 8.000.000 /cm³ | 4 | 5,10 |
| 9 | 11 | A 1 | 5 „ | 600.000 „ | 4 | 5,20 |
| 33 | 11 | A 1 | 0,25 „ | 40.000 „ | 4 | 5,10 |
| 127 | 11 | A 1 | 0,1 „ | – | 4 | 5,10 |
| 23 | 5 | I 1 | 5 „ | 400.000 „ | 4 | 5,10 |
| 5 | 5 | I 1 | 5 „ | 13.000.000 „ | 4 | 5,40 |
| 55 | 37 | I 2 | 0,5 „ | 40.000 „ | 4–5 | 5,15 |
| 47 | 37 | I 2 | 0,5 „ | – | 4 | 5,40 |
| 137 | 37 | I 2 | 0,1 „ | – | 4 | 5,10 |
| 46 | 4 | I 1 | 0,5 „ | 19.000.000 „ | 4 | 5,15 |
| 133 | 4 | I 1 | 0,1 „ | – | 5 | 5,10 |
| 24 | 19 | A 1 | 5 „ | 19.000.000 „ | 4 | – |
| 65 | 19 | A 1 | 0,5 „ | 1.900.000 „ | 4 | 5,15 |

Inderdaad zien we weinig verband tusschen de gasvorming in de kaas en het aantal bacteriën in de melk bij het stremmen. Dit wordt veroorzaakt doordat de gistingsbacteriën een groote voorsprong in hun ontwikkeling kregen ten opzichte van de melkzuurstreptococcen. Voordat de melkzuurbacteriën zich hebben kunnen ontwikkelen en door hun zuurproductie de pH doen dalen, hebben de

gistingsbacteriën toch nog gelegenheid zich te vermeerderen en een deel van de suiker te vergisten. Met behulp van proeven, die beschreven worden in hoofdstuk VI, hebben we kunnen bepalen, dat de coli-aërogenesbacteriën onder deze omstandigheden van de ongeveer 3,9 % lactose, die het kaasvocht in het begin bevat, 0,2–0,3 % suiker vergisten. De overblijvende 3,6–3,7 % wordt dan door de melkzuurstreptococcen omgezet tot melkzuur. De groote voorsprong in ontwikkeling, die de coli-aërogenesbacteriën krijgen op de melkzuurstreptococcen gedurende het kaasmaken, zal wel in belangrijke mate veroorzaakt worden door de gebruikte temperaturen, die zeer gunstig zijn voor de ontwikkeling van de coli-aërogenesbacteriën; ze liggen echter tamelijk ver boven de optimumtemperatuur van de melkzuurstreptococcen.

Alhoewel we niet veel proeven genomen hebben over het verband tusschen de mate van vroeg-los en het aantal los-positieve bacteriën in de melk, kunnen we wel zeggen, dat, onder omstandigheden gunstig voor het optreden van vroeg-los (b.v. hooge temperaturen in de zomermaanden), een infectie van enkele 10 duizenden los-positieve bacteriën per $cm^3$ melk reeds in erge mate het vroeg-los kan veroorzaken.

Een kaas, die een lage pH heeft tengevolge van de vele suiker die de pas gemaakte kaas bevatte, kan nog in erge mate het vroeg-los hebben (kaas no. 2, tabel 36). Ook als we eenige gegevens van tabel 37 met elkaar vergelijken (b.v. kaas no. 23 met kaas no. 5 en kaas no. 55 met kaas no. 47), dan blijkt er weinig verband te bestaan tusschen de mate van vroeg-los en de pH.

Deze resultaten kunnen we ook verklaren met het feit, dat de coli-aërogenesgisting plaats heeft vóór de hoofdzaak van de melkzuurgisting. Het maakt geen verschil voor de gasvorming in de kaas of de melkzuurbacteriën, na het de gistingsbacteriën onmogelijk te hebben gemaakt om nog gas te vormen, dan nog de beschikking hebben over 120 mg of over 80 mg lactose per 10 g kaas. Maar in dergelijke gevallen zijn er na 24 uur, als alle suiker is omgezet, groote verschillen in de pH aan te toonen. Om het vroeg-los tegen te gaan is de snelheid van de melkzuurgisting veel belangrijker dan de uiteindelijk gevormde hoeveelheid zuur en de snelheid wordt veel meer beïnvloed door de eigenschappen van de melkzuurbacteriën dan door de grootte van de zuurseltoevoeging. Bij eenige proeven konden we dan ook geen verschil in de mate van vroeg-los vinden toen we de werking van een toevoeging van 5 $cm^3$ zuursel vergeleken met een van 10 $cm^3$. Dat de snelheid waarmee de melkzuurbacteriën zich ontwikkelen een veel grootere rol speelt dan de grootte van de zuurseltoevoeging, kunnen we verklaren met het door DEMETER (1941,

blz. 302) aangegeven verschijnsel, dat de melkzuurbactiën pas beginnen met een merkbare zuurproductie als de bacteriën zich hebben ontwikkeld tot het bijna maximale aantal (ongeveer 200.000.000 per $cm^3$). De getallen van DEMETER hebben betrekking op melk, maar dit verschijnsel zal zeker ook wel voor onze omstandigheden gelden. Gebruiken we per 2,5 liter melk 5 $cm^3$ zuursel, dan bevat, aannemende dat het 24 uur oude zuursel ongeveer 250.000.000 bacteriën per $cm^3$ bezit, 1 $cm^3$ van de te verkazen melk 500.000 melkzuurstreptococcen. Bij een toevoeging van 10 $cm^3$ zuursel bevat elke $cm^3$ melk 1.000.000 melkzuurbacteriën. Daar de zuurproductie pas begint bij een aantal van ± 200.000.000 per $cm^3$, moeten er eerst nog vele deelingen van de bacteriecellen plaats vinden, waarbij we kunnen inzien, dat het niet veel verschil maakt of we beginnen met een aantal van 500.000 of 1.000.000 per $cm^3$. Dit eenvoudige getallenvoorbeeld laat wel op een duidelijke manier zien, hoe belangrijk de groeisnelheid van de melkzuurbacteriën is. Behalve door de eigenschappen van de bacteriën, blijkt de ontwikkeling van de melkzuurbacteriën ook sterk beïnvloed te worden door de hoedanigheid van de melk. Volgens DEMETER (1941, pag. 185) vonden MARSHALL, PORCHER en LAMBERT en COX en WHITEHEAD, dat de aanwezigheid van *Bac. subtilis* bevorderend werkt op de groei van melkzuurstreptococcen in melk. De groei van deze bacteriën wordt belemmerd als de koeien die deze melk leverden, gevoerd werden met spoeling, bieten zonder voldoende kalk en silage (zie DEMETER, pag. 398). Op dezelfde plaats kunnen we verder nog lezen, dat de melkzuurbacteriën zich ook slecht ontwikkelen in melk, afkomstig van koeien lijdende aan mastitis of de ziekte van BANG. Tenslotte kunnen we dus zeggen, dat, behalve door het aantal los-positieve bacteriën en de hoeveelheid gebruikt zuursel, de mate waarin vroeg-los kan ontstaan in nog sterkere mate wordt beïnvloed door de snelheid van de melkzuurgisting en door de hoogte van de temperaturen, waaraan de wrongel en de jonge kaas blootgesteld worden.

In de volgende paragraaf wordt echter nog een invloedrijke factor besproken, namelijk de aanwezigheid van los-negatieve bacteriën van de coli-aërogenesgroep.

## § 4. DE INVLOED VAN COMBINATIES VAN TYPEN VAN COLI-AËROGENESBACTERIËN OP DE GASVORMING IN KAAS

In hoofdstuk II hebben we met behulp van oriënteerende proeven kunnen aantoonen, dat de gasvorming door de los-positieve stammen kan worden tegengegaan door toevoeging van los-negatieve. Met behulp van proeven, die in deze paragraaf worden beschreven,

hebben we nagegaan of dit ook geldt voor de gasvorming in kaas. We maakten telkens tegelijk twee kazen uit twee porties melk, waarvan de eene hoeveelheid werd geënt met een los-positieve stam en de andere portie met een los-positieve en een los-negatieve. We gebruikten 7 cm³ zuursel, hetzelfde als dat bij de proeven in paragraaf 2, en we voegden 250 cm³ water toe na het aftappen van de wei. De resultaten van de genomen proeven worden weergegeven in tabel 38.

TABEL 38

*Over de invloed van combinaties van los-positieve en los-negatieve stammen op de gasvorming in kaas*

| Kaas | Toegevoegd van een cultuur van een: | | Beoordeeling | Foto no. | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| | Los-positieve stam | Los-negatieve stam | | | |
| 27 | $^1/_2$ cm³ stam 11 (A 1) | – | 4 | – | – |
| 28 | idem | $^3/_2$ cm³ stam 2 (C 1) | 4 | – | – |
| 44 | $^1/_4$ cm³ stam 11 (A 1) | $^{10}/_4$ cm³ stam 2 (C 1) | 3–4 | – | 5,20 |
| 43 | idem | – | 3–4 | – | 5,20 |
| 51 | $^1/_2$ cm³ stam 11 (A 1) | – | 4–5 | 25 | 5,40 |
| 52 | idem | $^5/_2$ cm³ stam 26 (C 2) | 4–5 | 26 | 5,40 |
| 65 | $^1/_2$ cm³ stam 19 (A 1) | – | 4 | 31 | 5,15 |
| 66 | idem | $^5/_2$ cm³ stam 30 (C 1) | 0 | 32 | 5,15 |
| 83 | $^1/_2$ cm³ stam 19 (A 1) | – | 3–4 | – | 5,30 |
| 84 | idem | $^5/_2$ cm³ stam 26 (C 2) | 1–2 | – | 5,30 |
| 61 | $^1/_2$ cm³ stam 39 (Cl) | – | 4– | – | 5,10 |
| 62 | idem | $^5/_2$ cm³ stam 26 (C 2) | 2 | – | 5,10 |
| 47 | $^1/_2$ cm³ stam 37 (I 2) | – | 4 | 23 | 5,40 |
| 48 | idem | $^5/_2$ cm³ stam 26 (C 2) | 1–2 | 24 | 5,40 |
| 55 | $^1/_2$ cm³ stam 37 (I 2) | – | 4–5 | 27 | 5,15 |
| 56 | idem | $^5/_2$ cm³ stam 2 (C 1) | 3 | 28 | 5,15 |

De figuren 25, 26, 27 en 28 laten de foto's zien. We zien dat de werking van de stam 11 (A 1) niet werd belemmerd door toevoeging van een los-negatieve stam. Dat dit geen algemeen verschijnsel is bij aërogenescultures, blijkt uit de resultaten verkregen met de aërogenesstam 19. De werking hiervan werd volkomen onderdrukt door de toevoeging van stam 30 (C 1). Ook het vroeg-los, veroorzaakt door de andere stammen, werd minder door toevoeging van een

los-negatieve stam. Bij de proeven, genomen met een intermediaire stam, 37 (I 2), bleek dat de eene los-negatieve cultuur meer invloed heeft dan de andere. Het mede aanwezig zijn van los-negatieve bacteriën oefent dus in de meeste gevallen een groote invloed uit op de gasvorming door de los-positieve.

Bij sommige kazen was het mogelijk van beide typen de ontwikkeling na te gaan gedurende de eerste 24 uur. Dit ging alleen bij combinaties van los-positieve stammen, die kunnen groeien in de citraatoplossing volgens KOSER, met bacteriën van het $C_1$-type, die een positief resultaat geven bij de proef van EIJKMAN. Allereerst werden verdunningen van de kaas in duplo geënt in buizen gevuld met voedingsoplossing volgens MC CONKEY. [1]) Van de buizen, waarin gasvorming had plaats gehad, entten we een oogje over in een buis gevuld met citraatoplossing volgens KOSER en een oogje in een nieuwe buis gevuld met vloeistof volgens MC CONKEY. De eerste plaatsten we gedurende drie dagen bij 37 °C. Hiermee konden we dan bepalen in welke oorspronkelijke verdunning van de kaas nog aërogenes- of intermediaire bacteriën aanwezig waren. De buis met de vloeistof volgens MC CONKEY plaatsten we 48 uur bij 45 °C, waarna we in staat waren vast te stellen in welke oorspronkelijke verdunning van de kaas nog bacteriën van het $C_1$-type aanwezig waren. Deze methode kan dus alleen gebruikt worden als we los-negatieve bacteriën van het $C_1$-type gebruiken, daar de proef van EIJKMAN wordt gebruikt om het aantal hiervan te bepalen. De verkregen resultaten worden door tabel 39 weergegeven.

TABEL 39 *Ontwikkeling van coli-aërogenesbacteriën in kaas*

| Kaas | Stam | Type | Aantal bacteriën van elke stam | | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Bij het stremmen | In 24 uur oude kaas | |
| 28 | 11 | A 1 | 600.000 /cm³ | 60.000.000 /g | |
| | 2 | C 1 | 600.000 „ | 60.000.000 „ | |
| 44 | 11 | A 1 | 40.000 „ | 160.000.000 „ | 5,20 |
| | 2 | C 1 | 800.000 „ | 3.200.000.000 „ | |
| 66 | 19 | A 1 | 1.900.000 „ | 770.000.000 „ | 5,15 |
| | 30 | C 1 | 8.000.000 „ | 3.000.000.000 „ | |
| 56 | 37 | I 2 | 40.000 „ | 8.000.000 „ | 5,15 |
| | 2 | C 1 | 400.000 „ | 3.200.000.00 „ | |

Het blijkt, dat de ontwikkeling van de aërogenesbacteriën gelijke tred hield met de ontwikkeling van de toegevoegde colibacteriën.

[1]) Het maken van verdunningen van kaas wordt beschreven op bladzijde 62.

In kaas 56 bleef echter de ontwikkeling van de bacteriën van het $I_2$-type achter bij die van de toegevoegde stam 2.

Over de wijze, waarop de los-negatieve stammen de gasvorming in kaas door de andere stammen kunnen tegengaan, hebben we op bladzijde 24 reeds iets gezegd. Hierbij wezen we op de mogelijkheid, dat sommige stofwisselingsproducten van de colitypen (bijvoorbeeld azijnzuur) de gasvorming door de andere typen zouden doen verminderen. Een andere mogelijkheid is de zuurvorming door de colitypen. Zonder de aanwezigheid van los-negatieve typen wordt de gasvorming door de los-positieve stopgezet door de dalende pH, waarvoor de melkzuurbacteriën zorgen. De colibacteriën ontwikkelen zich echter veel sneller dan de melkzuurbacteriën en zij zijn eveneens in staat de pH zoover te doen dalen, dat de gasvorming der los-positieve bacteriën daardoor wordt stopgezet. Door toevoeging van los-negatieve typen wordt de periode gedurende welke de andere gas kunnen vormen dus veel kleiner. Hoewel overigens de colibacteriën ook ongewenscht zijn, doordat zij een gistingssmaak veroorzaken, fungeeren zij, wat de gasvorming betreft, als nuttige voorloopers van de melkzuurstreptococcen.

De in deze paragraaf beschreven proeven laten ook duidelijk zien, waarom we bij onze proeven met kaas de melk moesten pasteuriseeren. Verder zal een infectie, veroorzaakt door koemest, in de regel niet tengevolge hebben, dat de kaas, gemaakt uit die melk, last krijgt van vroeg-los. In koemest komen meestal uitsluitend bacteriën voor van het $C_1$-type en deze bacteriën zijn juist in staat het vroeg-los, veroorzaakt door de andere typen, tegen te gaan.

## § 5. OVER HET AFSTERVEN VAN DE COLI-AËROGENESBACTERIËN IN KAAS

Bij onze proeven bleek, dat de coli-aërogenesbacteriën zich gedurende de eerste 24 uur in kaas zeer goed kunnen ontwikkelen. Daarnaast deed zich de vraag voor, hoe lang de bacteriën van de verschillende typen in kaas kunnen blijven leven.

De wijze waarop wij het aantal coli-aërogenesbacteriën in kaas bepaalden was de volgende. Met behulp van een steriele boor namen we een monster kaas. Met een steriel mesje sneden we er schijfjes af, die we overbrachten in een steriel horlogeglas. Hiermee werd doorgegaan tot 1 g kaas was afgewogen. Deze hoeveelheid kaas brachten we over in een steriele mortier, waarna we 9 $cm^3$ van een 2 % natriumcitraatoplossing van 50 °C toevoegden. De kaasschijfjes werden met behulp van deze oplossing, welke we steeds in kleine hoeveelheden tegelijk toevoegden, tot een vloeistof verwreven. 1 $cm^3$

hiervan kwam dus overeen met 0,1 g kaas. Met behulp van deze emulsie werden vervolgens verdunningen gemaakt. Zij werden overgebracht in buizen gevuld met vloeistof volgens Mc CONKEY. Alles gebeurde in duplo en we gebruikten de tabellen van Mc CRADY [1]) om de resultaten in cijfers uit te drukken.

In de vorige paragraaf werd aangegeven, hoe we bij sommige combinaties de bacteriën van elk type apart konden tellen.

Van een 37-tal kazen werd het aantal coli-aërogenesbacteriën per g kaas bepaald na 24 uur, na 7 dagen, na 14 dagen en na 4 weken. We zagen dat de $C_1$-typen zich zeer lang in kaas konden handhaven. Na 4 weken waren er vaak nog millioenen over per g kaas. De bacterën van het $C_2$-type stierven snel in kaas, zoodat zij na 4 weken meestal in 1 g niet meer aan te toonen waren. De los-positieve bacteriën konden zich ook zeer slecht handhaven. Na 4 weken waren er meestal maar enkele honderden per g kaas over, alleen van stam 11 bedroeg het aantal iets meer, namelijk enkele duizenden. VAN BEYNUM en PETTE (1942) schrijven dat een kaas, die na 5–7 weken nog veel coli-aërogenesbacteriën bevat, vroeg-los moet zijn geweest. In verband met onze resultaten kunnen we echter zeggen, dat er in het geheel geen verband is tusschen de mate van vroeg-los en het aantal coli-aërogenesbacteriën in eenige weken oude kaas. Kazen, die na 4 weken nog millioenen coli-bacteriën (van het $C_1$-type) bevatten per gram, waren in het geheel niet los, terwijl sterk vroeglosse kazen, die na 24 uur eenige honderden millioenen coli- of aërogenesbacteriën per gram bevatten, na 4 weken nog maar enkele honderden of vaak geen enkele bacterie meer per gram bezaten. Het feit, dat de los-positieve typen zich veel slechter kunnen handhaven in kaas dan de los-negatieve, maakt het trekken van een conclusie uit het aantal coli-aërogenesbacteriën in 4 weken oude kaas onmogelijk.

Onze bevindingen over den duur, waarmee de verschillende typen van de coli-aërogenesgroep in kaas kunnen blijven leven, komen overeen met die van HÜTTIG (1933). Tenslotte worden enkele resultaten van onze tellingen weergegeven door tabel 40 (blz. 64), waarbij we alleen tellingen nemen van kazen, waarvan de melk geënt was met combinaties van los-positieve typen en $C_1$-typen, omdat we er hier zeker van zijn dat eventueele pH-verschillen geen invloed uitoefenden.

De resultaten van deze tellingen, die overeenkomen met die gevonden bij de overige 33 kazen, geven zeer duidelijk aan, dat de los-positieve typen, in tegenstelling tot de andere, in kaas zeer snel afsterven.

---

[1]) Zie noot 2 op bladzijde 55.

TABEL 40

*Over het afsterven van de verschillende typen coli-aërogenesbacteriën in kaas*

| Kaas | Stam | Type | Aantallen per g in kaas van | | | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 24 uur | 2 weken | 4 weken | |
| 28 | 11 | A 1 | 60.000.000 | 400.000 | 240 | |
| | 2 | C 1 | 60.000.000 | 160.000.000 | 1.900.000 | |
| 44 | 11 | A 1 | 160.000.000 | 20.000 | 2.400 | 5,20 |
| | 2 | C 1 | 3.200.000.000 | 190.000.000 | 2.100.000 | |
| 66 | 19 | A 1 | 770.000.000 | 100 | – | 5,15 |
| | 30 | C 1 | 3.000.000.000 | 19.000.000 | – | |
| 56 | 37 | I 2 | 8.000.000 | 240 | – | 5,15 |
| | 2 | C 1 | 3.200.000.000 | 380.000.000 | – | |

## § 6. OVER PROEVEN MET KAAS, WELKE IN VERBAND STAAN MET DE INVLOED VAN CITROENZUUR OP DE SUIKERVERGISTING DER COLI-AËROGENESBACTERIËN

Door middel van eenige proeven konden we aannemelijk maken, dat het citroenzuur in kaas een invloed uitoefent gelijk aan die, beschreven in de vorige hoofdstukken. Het leek ons het eenvoudigst om dit met behulp van citroenzuurbepalingen aan te toonen. In kazen, geënt met colibacteriën, zou het citroenzuur dan snel moeten verdwijnen, waarbij de bacteriën met behulp van dit zuur de suikervergisting zoodanig veranderen, dat er geen gas ontstaat. Daarentegen zou het citroenzuur in kazen, geënt met los-positieve bacteriën, niet of slechts zeer langzaam mogen verdwijnen, daar deze bacteriën het citroenzuur niet gebruiken bij hun lactosevergisting en het slechts in zeer geringe mate kunnen vergisten.

We waren hier, wegens de kleine hoeveelheden citroenzuur, weer aangewezen op de methode van PUCHER, SHERMAN en VICKERY (1936). Voor de bepaling maakten we gebruik van een filtraat, verkregen op de manier, beschreven bij de lactosebepaling in kaas. We losten kaas op met behulp van soda-oplossing en we sloegen het vet en het eiwit neer met behulp van een oplossing van $K_4Fe(CN)_6$ en van Zn-acetaat. [1]) Het citroenzuur blijft dan achter in het verkregen filtraat, daar VAN BEYNUM (1934) aangeeft dat dit neerslag geen citroenzuur vasthoudt. We hebben vroeger ook berekend, dat 25 $cm^3$

[1]) Zie voor de samenstelling van deze oplossingen bladzijde 37.

van dit filtraat correspondeerde met 2,68 g kaas, waaruit we kunnen bepalen dat in het begin, als er nog geen citroenzuur was omgezet, in deze 25 cm³ filtraat ± 2,15 mg citroenzuur voorkwam. Aangezien we met deze citroenzuurbepaling hoeveelheden van 0,1–1,0 mg konden bepalen, leek zij dus uitermate geschikt om het verdwijnen van dit zuur te volgen. De methode kon echter niet gebruikt worden voor bepalingen in kazen geënt met los-positieve stammen, daar we vroeger zagen, dat dergelijke stammen stoffen vormen, die ook meedoen bij de citroenzuurbepaling. Bij ons onderzoek, beschreven in hoofdstuk III, konden we hiervoor een correctie aanbrengen door ook een bepaling te verrichten in eenzelfde cultuurvloeistof zonder citroenzuur, maar dit ging hier niet. Het was dus onmogelijk om met behulp van citroenzuurbepalingen aan te toonen, dat in kazen, geënt met los-positieve bacteriën, het citroenzuur niet werd gebruikt bij de suikervergisting, zoodat alleen overbleef te laten zien, dat citroenzuur in kazen, geënt met los-negatieve stammen, snel verdween. We moesten echter eerst nog de bruikbaarheid van de methode voor bepalingen in kaas aantoonen. Voor de contrôle maakten we gebruik van een 4 weken oude kaas, die was bereid met een zuursel, dat naast de melkzuurstreptococcen ook de citroenzuursplitsende aromabacteriën bevatte, waardoor we met groote waarschijnlijkheid konden aannemen, dat er in een dergelijke kaas geen citroenzuur meer aanwezig was. We voerden citroenzuurbepalingen uit in 25 cm³ filtraat, gemaakt van deze kaas en in 25 cm³ van hetzelfde filtraat, waaraan echter 0,40 mg citroenzuur was toegevoegd. Tabel 41 laat de resultaten zien.

TABEL 41 *Over de bepaling van citroenzuur in kaas*

| Bepaling uitgevoerd in | Extinctiecoëfficient | mg citroenzuur |
|---|---|---|
| 25 cm³ filtraat | 0,11 | 0,11 |
| idem | 0,12 | 0,11 |
| 25 cm³ filtraat + 0,40 mg citroenzuur | 0,57 | 0,52 |
| idem | 0,56 | 0,51 |

De toegevoegde 0,40 mg kon dus wel precies worden teruggevonden, maar we zien ook, dat de gebruikte kaas volgens deze methode nog citroenzuur zou moeten bevatten. Daar we dit moeilijk konden aannemen, waren we er reeds op verdacht, dat de gevolgde methode in kaas te hooge resultaten gaf.

We hebben de methode toegepast op een tweetal kazen, geënt met de los-negatieve stam 2 (C 1). Voor de bepaling namen we 5 cm³ filtraat. We zagen een snelle daling van het citroenzuurgehalte tot

een bepaald niveau, waarna volgens deze bepalingsmethode de hoeveelheid citroenzuur weer begon toe te nemen en dan lange tijd (7 dagen) constant bleef. Hieruit bleek wel, dat we de resultaten, verkregen met deze methode, niet konden vertrouwen. Ook bij eenige andere kazen, bereid met een zuursel met citroenzuursplitsende aromabacteriën, kregen we bij het volgen van de citroenzuurverdwijning hetzelfde resultaat te zien. We konden dus aannemen, dat in kaas stoffen gevormd worden die meedoen bij de citroenzuurbepalingen.

Daar het met citroenzuurbepalingen niet ging, hebben we een andere methode gebruikt om iets te weten te komen over de invloed van citroenzuur op de suikervergisting in kaas door coli-aërogenesbacteriën. Aangezien de colitypen geen vroeg-los konden veroorzaken, moest de hoeveelheid citroenzuur in kaas voldoende zijn om de gasvorming tegen te gaan. Zouden we nu gedurende het kaasmaken citroenzuur aan de wrongel onttrekken, dan zouden colibacteriën, na het resteerende citroenzuur verwerkt te hebben, in kaas gemaakt van die wrongel toch nog vroeg-los kunnen veroorzaken. We hebben een dergelijke proef genomen met stam 2 (C 1). We maakten twee kaasjes uit twee porties melk van 2,5 liter. Om in beide gevallen evenveel bacteriën in de melk te hebben, voegden we aan 5 liter melk 10 $cm^3$ cultuur van stam 2 (C 1) toe. Vlak voor het stremmen verdeelden we de 5 liter melk dan in twee porties van 2,5 liter. Onder het kaasmaken tapten we eenige malen wei af, waarna we in het eene geval een oplossing van lactose, melkzouten en citroenzuur toevoegden en in het tweede geval eenzelfde oplossing zonder citroenzuur. Op deze manier zouden de bacteriën in de tweede kaas een citroenzuurtekort krijgen en overgaan tot een gasvorming. De gebruikte oplossingen hadden de volgende samenstelling:

1. oplossing met citroenzuur.
   1000 $cm^3$ water, 45 g lactose, 1,19 g $CaCl_2$, 2,30 g $K_2HPO_4$, 1,00 g $Mg(H_2PO_4)_2$, 1,8 g citroenzuur, temperatuur 37 °C, pH 6,4.
2. oplossing zonder citroenzuur, samenstelling als onder 1, echter geen citroenzuur aanwezig.

De verdere wijze van werken en het verkregen resultaat kunnen we vinden in tabel 42 (blz. 67).

Inderdaad zien we, dat we door citroenzuuronttrekking de bacteriën van de los-negatieve stam 2 (C 1) ertoe konden krijgen om ook vroeg-los in kaas te veroorzaken. Dit bewijst wel dat ook in kaas de colitypen het citroenzuur gebruiken om met behulp daarvan de lactose zonder gasvorming te vergisten. Ook door gebruik te maken van meer water bij de kaasbereiding, konden we vaak een, zij het

TABEL 42

*Gasvorming in kaas door coli-bacteriën tengevolge van een citroenzuurtekort*

| Methode van kaasmaken | Bij kaas 67 | Bij kaas 68 |
|---|---|---|
| Toegevoegd cultuurstam 2 (C 1) | 5 cm³ | 5 cm³ |
| Toegevoegd zuursel | 7 cm³ | 7 cm³ |
| Stremtijd | 35 min | 35 min |
| Duur snijden | 25 min | 25 min |
| Wei aftappen | 1000 cm³ | 1000 cm³ |
| Toegevoegd oplossing met citroenzuur | 300 cm³ | – |
| Toegevoegd oplossing zonder citroenzuur | – | 300 cm³ |
| Nawarmen tot | 37–40 °C | 37–40 °C |
| Duur roeren | 20 min | 20 min |
| Aftappen | 1000 cm³ | 1000 cm³ |
| Toegevoegd oplossing met citroenzuur | 700 cm³ | – |
| Toegevoegd oplossing zonder citroenzuur | – | 700 cm³ |
| Roeren | 20 min | 20 min |
| Alles aftappen, stoppen, doeken, persen, omloopen | | |
| pH van 24 uur oude kaas | 5,35 | 5,35 |
| Vroeg-los, beoordeeling | 1–2 | 3 |

ook geringe, vorm van vroeg-los krijgen bij kazen geënt met colibacteriën. Tabel 43 laat eenige gegevens zien. De melk was steeds geënt met 5 cm³ cultuur.

TABEL 43

*Geringe vorm van gasproductie in kaas door colibacteriën na het gebruik van veel water*

| Kaas | Stam | Type | Toegevoegd | Beoordeeling | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| 14 | 1 | C 1 | 200 cm³ water | 1 | 5,15 |
| 3 | 1 | C 1 | 400 „ „ | 2 | 5,20 |
| 59 | 27 | C 1 | 200 „ „ | 0 | 5,15 |
| 8 | 27 | C 1 | 400 „ „ | 1–2 | 5,25 |
| 4 | 26 | C 2 | 200 „ „ | 0 | 5,20 |
| 21 | 26 | C 2 | 400 „ „ | 0 | 5,25 |
| 79 | 2 | C 1 | 200 „ „ | 1–2 | 5,20 |
| 80 | 2 | C 1 | 400 „ „ + + 9 g lactose | 2 | 5,20 |

Blijkbaar wordt er door de los-negatieve colibacteriën in kaas iets meer gas gevormd als er bij de bereiding veel water werd toegevoegd.

Waarschijnlijk kregen de bacteriën ook hier dan een tekort aan citroenzuur, alleen stam 26 had blijkbaar toch nog citroenzuur genoeg. Bij de proef met de kazen 79 en 80 is ook nog lactose toegevoegd, omdat door de toevoeging van meer water het lactosegehalte van de kaas lager werd. Deze verlaging bij de andere proeven had echter geen invloed op de door de colibacteriën vergiste hoeveelheid suiker, daar deze bacteriën toch alleen maar in het begin suiker konden vergisten. In een paar proeven met stam 1 (C 1), welke stam volgens de gegevens van tabel 43 het meest reageerde op een grootere watertoevoeging, hebben we de geringe vorm van vroeg-los, ontstaan door het gebruik van 400 cm³ water, weer kleiner kunnen maken door een citroenzuurtoevoeging. Bij deze proeven, waarvan de resultaten vermeld worden in tabel 44, hebben we op de reeds eerder beschreven manier ervoor gezorgd, dat beide porties melk evenveel bacteriën bevatten. [1]) Per 5 liter melk voegden we 10 cm³ cultuur toe. Per 2,5 liter melk gebruikten we 10 cm³ zuursel.

TABEL 44 *Verkleining van de gasproductie van colibacteriën in kaas, met een tekort aan citroenzuur, door citroenzuurtoevoeging*

| Kaas | Stam | Type | Toegevoegd na het aftappen van de wei | Beoordeeling | Foto no | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 11 | 1 | C 1 | 400 cm³ 0,18 % citroenzuuroplossing | 0–1 | – | 5,20 |
| 12 | 1 | C 1 | 400 cm³ water | 1–2 | – | 5,20 |
| 17 | 1 | C 1 | 400 cm³ 0,18 % citroenzuuroplossing | 0–1 | 13 | 4,90 |
| 18 | 1 | C 1 | 400 cm³ water | 1–2 | 14 | 4,90 |

De foto's worden weergegeven door figuur 29. Werd er echter, om de invloed van de groote watertoevoeging te compenseeren, in plaats van 400 cm³ 0,18 % citroenzuur evenveel gebruikt van een oplossing die 2,1 g citroenzuur per 400 cm³ bevatte (0,52 %) en met een pH van 5,8 (NaOH toegevoegd), dan werd de gasvorming weer grooter. Tabel 45 laat de resultaten zien van een dergelijke proef, waarvan de uitvoering overigens hetzelfde was, als die van de vorige.

Dit komt overeen met datgene wat we vonden bij de proeven met gistwatercultures. Hierbij gebeurde het ook vaak, dat de hoeveelheid gas, gevormd door een los-negatieve stam uit lactose na een toevoeging van 0,20 %, soms grooter werd dan na een van 0,10 % (zie de tabellen 21 en 22 en de figuren 8 en 9). We hebben toen ver-

[1]) Zie hiervoor bladzijde 66.

TABEL 45 *Invloed van een groote citroenzuurtoevoeging op de gasvorming van colibacteriën in kaas met een tekort aan citroenzuur*

| Kaas | Stam | Type | Toegevoegd na het aftappen van de wei | Beoordeeling | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| 41 | 1 | C 1 | 400 cm³ oplossing, waarin 2,1 g citroenzuur. pH = 5,8 | 1–2 | 5,45 |
| 42 | 1 | C 1 | 400 cm³ water | 1–2 | 5,45 |

ondersteld dat de los-negatieve stammen bij groote citroenzuurgiften niet al het zuur gebruiken om daarmee de suiker zonder gas te vergisten, maar dat zij tenslotte ook het citroenzuur beginnen te vergisten (zie verder bladzijde 48 en 49).

Gezien de resultaten van al deze proeven, kunnen we aannemen, dat het citroenzuur in kaas, geënt met los-negatieve bacteriën, dezelfde invloed heeft als in vloeistofcultures van dezelfde bacteriën en dat onder onze omstandigheden de hoeveelheid citroenzuur ongeveer juist voldoende is om in kaas de gasvorming door colibacteriën tegen te gaan.

Het vroeg-los in kaas, veroorzaakt door de los-positieve typen werd, gezien het resultaat van enkele proeven, niet beïnvloed door een toevoeging van 400 cm³ water. Bij de proeven beschreven in hoofdstuk III § 2 en § 4 bleek, dat deze stammen in een citroenzuur en lactose bevattend milieu tenslotte overgaan tot het vergisten van citroenzuur, waardoor dan de totale gasproductie grooter wordt. In kaas is echter de tijd dat ze werkzaam kunnen zijn beperkt, daar de melkzuurbacteriën door hun productie de pH doen dalen. Blijkbaar werd er door de los-positieve stammen bij deze proeven dan zoo weinig citroenzuur vergist, dat deze verlaging van de citroenzuurconcentratie geen merkbare invloed had op de mate van vroeglos. Bij de proeven in lactosegistwater begon de invloed van citroenzuurtoevoegingen op de gasproductie pas merkbaar te worden na 24 uur (zie tabel 23, 24 en 25 en figuur 10) en tevens konden we aantoonen, dat er na 16½ uur nog geen citroenzuur was vergist (zie tabel 37 en figuur 15). Toch mogen deze resultaten niet zonder eenige beperking worden toegepast op de lactosevergisting in kaas. Evenals bij de lebgistingsproef (zie bladzijde 22) verloopen de processen in kaas veel sneller dan in lactosegistwater. Immers in vloeistofcultures werden de verschillen tusschen de los-positieve en los-negatieve bacteriën pas duidelijk na meer dan 24 uur (zie tabel 11 en 14). Maar in kaas zijn in minder dan 24 uur reeds de definitieve verschillen te zien tusschen de los-positieve en los-negatieve stammen. Onder onze omstandigheden zijn de los-positieve bacteriën dan vaak ook al

eenige tijd begonnen met de citroenzuurvergisting, voordat hun werkzaamheden worden stopgezet door de melkzuurbacteriën. Dit blijkt uit het feit, dat soms deze bacteriën wel reageerden op een citroenzuurtoevoeging bij het kaasmaken. Eenige malen (7) hebben we dergelijke proeven genomen en alhoewel bij iets meer dan de helft van de proeven (4) er nog geen invloed van citroenzuurtoevoeging te zien was, konden we toch in de andere gevallen (3) een duidelijk merkbare invloed waarnemen. Het citroenzuurgehalte van de contrôlekaas hebben we verlaagd door vrij veel water te gebruiken bij het nawarmen. Overigens werden de proeven op dezelfde manier uitgevoerd als die over de invloed van citroenzuurtoevoeging bij de los-negatieve stam no. 1. Per 5 liter melk werd geënt met 10 cm³ cultuur en per 2,5 liter gebruikten we 7 cm³ zuursel. Tabel 46 en de figuren 30 en 31 laten de resultaten zien van twee proeven, waarbij de bacteriën positief reageerden.

TABEL 46

*Invloed van citroenzuurtoevoeging op de gasproductie in kaas van los-positieve stammen*

| Proef | Kaas | Stam | Type | Toegevoegd na het aftappen van de wei | Beoordeeling | Foto no | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 19 | 11 | A 1 | 400 cm³ 0,18 % citroenzuuropl. | 4 | 15 | 5,35 |
| | 20 | 11 | A 1 | 400 cm³ water | 3–4 | 16 | 5,40 |
| 2 | 45 | 4 | I 1 | 400 cm³ opl., waarin 2,1 g citroenzuur. pH = 5,8 | 4–5 | 21 | 5,15 |
| | 46 | 4 | I 1 | 400 cm³ water | 4 | 22 | 5,15 |

De mogelijkheid, dat het effect te danken zou zijn aan toevallige verschillen, wordt kleiner door het feit, dat in geen enkel van de vier gevallen, waarbij citroenzuurtoevoeging geen invloed had, door deze toevoeging een minder losse kaas ontstond.

## § 7. EEN VERGELIJKING TUSSCHEN DE WERKING VAN EENIGE ZUURSELS

Bij de tot nu toe beschreven proeven hebben we gebruik gemaakt van een zuursel, dat alleen bacteriën bevatte van de soort Streptococcus cremoris. In de practijk gebruikt men echter vaak zuursels, welke naast de melkzuurstreptococcen ook de citroenzuursplitsende aromabacteriën bevatten. Daar de citroenzuurontleding door aromabacteriën volgens VAN BEYNUM (1934) in zuur milieu zeer snel kan verloopen, zouden bij een gebruik van een dergelijk zuursel de los-negatieve stammen misschien toch nog los kunnen veroorzaken,

daar we zagen dat de hoeveelheid citroenzuur in kaas ongeveer juist voldoende is om een gasvorming door deze stammen te verhinderen. Daarom hebben we de werking van een zuursel, dat naast melkzuurstreptococcen ook aromabacteriën bevatte, vergeleken met de werking van het door ons gebruikte zuursel. We hebben echter eerst de activiteit van de aromabacteriën in het eerstgenoemde zuursel onderzocht met behulp van de kreatineproef. Aromabacteriën maken nl. in zuursels acetyl-methyl-carbinol en diacetyl en reduceeren deze verbindingen later tot butyleenglycol. De tijd noodig voor het reduceeren van die verbindingen is een maat voor de activiteit van de aromabacteriën in het zuursel. Met de kreatineproef kunnen we nu het ontstaan en verdwijnen van acetyl-methylcarbinol en diacetyl volgen. Bij aanwezigheid van deze stoffen ontstaat er een rose kleur, wanneer we bij $2\frac{1}{2}$ cm³ zuursel 1 cm³ van een 1 % kreatineoplossing en $2\frac{1}{2}$ cm³ 40 % NaOH voegen. Bij het door ons onderzochte zuursel was de kreatineproef na 24 uur positief en na 48 uur reeds negatief, waaruit we mochten besluiten, dat er in dit zuursel zeer actieve aromabacteriën voorkwamen.

We hebben eenige kazen gemaakt uit melk geënt met 5 cm³ cultuur van stam 1 (C 1) per 2,5 liter en daarbij gebruik gemaakt van dit zuursel met aromabacteriën. Ook dan waren de colibacteriën niet in staat vroeg-los te veroorzaken. We kunnen de resultaten van deze proeven verklaren met het door ons reeds meer genoemde feit, dat de suikervergisting in kaas door colibacteriën in hoofdzaak plaats heeft vóór de melkzuurgisting. Het citroenzuurverbruik door de colibacteriën heeft reeds plaats gehad als de aromabacteriën zich voldoende ontwikkeld hebben om met de citroenzuurontleding te beginnen.

In eenige streken van Zuid-Holland gebruikt men bij de kaasbereiding, in plaats van de gekweekte zuursels, bij voorkeur spontaan zuur geworden melk. We hebben de werking van een drietal van dergelijke zuursels, ontvangen van den rijkszuivelconsulent te Gouda, vergeleken met de werking van het door ons gebruikte zuursel. Bij de genomen proeven entten we de melk met $\frac{1}{2}$ cm³ cultuur van stam 11 (A 1) per 2,5 liter en we zorgden ervoor, dat alle porties melk evenveel bacteriën bevatten. Kazen, waarvan de bereiding geschiedde met spontaan gezuurde melk, waren echter even los als die waarbij we ons eigen zuursel gebruikten. Bovendien werd in laatstgenoemde de melksuiker iets sneller door de bacteriën tot melkzuur omgezet dan in de andere kazen. Het zou echter toch mogelijk zijn dat spontaan zuur geworden melk in sommige gevallen het vroeg-los in kaas kan tegengaan, want het bleek ons dat uit onzindelijk gewonnen melk zuursels kunnen ontstaan met zeer veel

colibacteriën per $cm^3$. Gedurende het zuren sterven de los-positieve bacteriën echter snel af. Alhoewel dergelijke zuursels, door hun gehalte aan colibacteriën, het vroeg-los veroorzaakt door de andere typen zouden kunnen tegengaan, is het gebruik ervan dan nog niet aan te raden. Het is echter niet onmogelijk, dat er andere eigenschappen zijn waardoor in de practijk dit zuursel soms de voorkeur geniet boven het gekweekte zuursel.

HOOFDSTUK V

# ORIËNTEERENDE PROEVEN MET EENIGE MIDDELEN, DIE KUNNEN DIENEN BIJ DE BESTRIJDING VAN HET VROEG-LOS

## § 1. OVER DE IN AANMERKING KOMENDE MIDDELEN

We zijn nu aan het tweede deel van ons onderzoek gekomen, namelijk de bestrijding van het vroeg-los. Is de te verkazen melk besmet met los-positieve bacteriën, dan kan men verschillende middelen gebruiken om het ontstaan van het gebrek tegen te gaan. Vaak wijzigt men de methode van kaasmaken eenigszins, waardoor de omstandigheden voor het ontstaan van vroeg-los ongunstiger worden. We denken hier o.a. aan het gebruik van meer zuursel en aan het vlug in de pekel brengen van de kaas. In de warmere jaargetijden is het echter niet altijd mogelijk om met behulp van deze middelen het vroeg-los te vermijden. We hebben reeds gezien, dat een kleine vermeerdering van de hoeveelheid zuursel weinig of geen invloed heeft. Door het gebruik van zeer veel zuursel kan men het vroeg-los dan wel tegengaan, maar dan krijgt men kazen met een te lage pH, waarvan het zuivel ongewenschte eigenschappen heeft.

Ter bestrijding van vroeg-los gebruikt men in de practijk reeds zeer lang kaliumnitraat, welke stof dan meestal bij het stremmen aan de melk wordt toegevoegd. Met behulp van eenige proeven met kaas hebben HÜTTIG (1933), alsmede HAGLUND, SANDBERG en BARTHEL (1933) aangetoond, dat het mogelijk is met deze stof het vroeg-los te bestrijden. Ze vonden echter ook, dat er nadeelen aan het gebruik van nitraat waren verbonden (o.a. een verhoogde pH van de kaas). Daarom hebben we allereerst nitraat in ons onderzoek betrokken. Verder heeft WOJTKIEWICZ (1933) voorgesteld om in plaats van nitraat nitriet te nemen. Om deze reden hebben we ook de invloed van nitriet bestudeerd. Bij eenige proeven heeft HÜTTIG (1933) $KClO_3$ en $K_2S_2O_8$ gebruikt, waarbij bleek dat de eerste stof ook invloed uitoefende op de gasvorming der los-positieve bacteriën, maar dat $K_2S_2O_8$ hiertoe niet in staat was. Ook deze beide stoffen werden in dit onderzoek betrokken. Tenslotte werd ook nog de invloed van $KBrO_3$ nagegaan. Ter oriënteering is allereerst met behulp van lebgistingsproeven bepaald, welke stoffen in aanmerking kwamen voor een uitgebreider onderzoek. De uitvoering van de leb-

gistingsproef was hetzelfde als die in de vorige hoofdstukken beschreven. Na de melk geënt te hebben met een bruikbare cultuur voegden we bepaalde hoeveelheden van de hierboven genoemde stoffen toe en vergeleken we het tijdstip van beginnen en de grootte van de gasvorming met die in buizen zonder eenige toevoeging. We moesten echter wel aandacht besteden aan het feit, dat de omstandigheden bij deze lebgistingsproeven anders waren dan die in kaas. Bij de eerste hebben de bacteriën overvloed van tijd en suiker om gas te vormen en in kaas hebben de bacteriën maar korte tijd gelegenheid om suiker te vergisten. Het was dus reeds voldoende als ons bij de lebgistingsproeven bleek, dat een bepaalde stof het begin van de door de bacteriën veroorzaakte gasvorming uit lactose eenige tijd kon uitstellen. Dit uitstel kan namelijk in kaas al voldoende zijn om het vroeg-los tegen te gaan, wanneer wij er maar in kunnen slagen dit begin uit stellen tot het oogenblik waarop de gasvorming, door de werking van de melkzuurbacteriën, toch al niet meer kan beginnen.

Voegden we $KNO_3$ en $KNO_2$ toe bij de lebgistingsproeven dan zagen we, dat bij hoeveelheden van 5–50 g per 100 liter melk het begin van de gasvorming eenige tijd werd uitgesteld. Voegden we meer toe, bijvoorbeeld 100 g, dan ontstond er in het geheel geen gas meer. Een toevoeging van 5 g $KClO_3$ per 100 liter melk was reeds voldoende om de gasvorming geheel stop te zetten. Toevoegingen van $KBrO_3$ en $K_2S_2O_8$ hadden echter geen invloed op de gasvorming van los-positieve bacteriën. De werkingen van $KNO_3$, $KNO_2$ en $KClO_3$ waren dus een nadere bestudeering waard. In dit hoofdstuk wordt nagegaan op welke wijze deze stoffen invloed uitoefenen op de gasvorming. In hoofdstuk VI worden dan proeven met kaas beschreven, waarmee we hebben bepaald welk middel voor de practijk het meest aan te raden is.

## § 2. OVER DE IN DE VOLGENDE PARAGRAAF TE GEBRUIKEN BEPALINGSMETHODEN

Hier volgt een beschrijving van eenige methoden, welke we noodig hadden bij de bestudeering van de werking van $KNO_3$ en $KNO_2$.

Allereerst moesten we de beschikking hebben over een methode om nitraat kwantitatief te bepalen naast nitriet in weicultures. Hierbij konden we niet gebruik maken van de reactie met diphenylamine, daar deze reactie te gevoelig is en we dan genoodzaakt waren telkens onze cultures met groote hoeveelheden water te verdunnen, hetgeen de betrouwbaarheid van de bepalingen niet ten goede kwam. Verder was het zeer lastig een volkomen kleurloos diphenylaminereagens te

maken. Ook de kleurreactie met brucine was voor onze doeleinden onbruikbaar, daar er in de weicultures, door het bij deze bepaling te gebruiken sterke zwavelzuur, reeds een gele kleur ontstond zonder de aanwezigheid van nitraat. Tenslotte hebben we dan in weicultures nitraat kunnen bepalen met behulp van een door BLOM en TRESCHOW (1929) aangegeven methode. Hierbij lieten we het nitraat in een omgeving van zwavelzuur nitreerend werken op xylenol, welke verbinding gemakkelijk nitreerbaar is in de ortho- en paraplaats. Door gebruik te maken van 2–4 of 3–4 xylenol ontstaat bij de nitreering alleen maar o-nitroxylenol. Deze verbinding is vluchtig en kon door destillatie verwijderd worden uit het zwavelzure milieu. Door het vluchtige nitroxylenol op te vangen in een NaOH-oplossing ontstond een sterk gekleurde gele oplossing van het alkalizout van nitroxylenol. Er bestaat nu een rechtlijnig verband tusschen de met behulp van een photometer te bepalen extinctiecoëfficiënt en de hoeveelheid nitroxylenol. Daar er ook een dergelijk verband bestaat tusschen de hoeveelheid nitroxylenol en nitraat, konden we op deze manier het nitraat kwantitatief bepalen. Niet al het nitraat gaat over in o-nitroxylenol, maar wel telkens een bepaald gedeelte, waarvan ALTEN en WEILAND (1933) aangeven dat het bij gebruik van verschillende xylenolpreparaten kan varieeren van 63–83 %. We moesten dus steeds gebruik maken van hetzelfde xylenolpreparaat. Met behulp van waterige oplossingen van $KNO_3$ van bekende sterkte hebben we eerst op de hier volgende manier een ijklijn gemaakt.

In een kolf van 500 $cm^3$ brachten we achtereenvolgens:

1e 10 $cm^3$ van een $KNO_3$-oplossing, waarin zich een hoeveelheid $KNO_3$ bevond van $10^{-4}$, $4{,}10^{-4}$, $7{,}10^{-4}$ of $10{,}10^{-4}$ g,

2e 50 $cm^3$ 78 % $H_2SO_4$, waardoor de zwavelzuurconcentratie 65 % werd hetgeen de beste concentratie is volgens BLOM en TRESCHOW (1929),

3e 0,1 $cm^3$ xylenoloplossing, welke oplossing was gemaakt naar een voorschrift van TEMME [1]), waarbij we door 10 g 2–4 xylenol op te lossen in 100 $cm^3$ 50 % alcohol een heldere, zeer lang houdbare oplossing kregen. Vergeleken met de grootste hoeveelheid $KNO_3$ was er zoodoende toch nog een 10-voudige overmaat xylenol aanwezig. De kolf werd dan goed gesloten met een gummi stop en gedurende 1–1½ uur bij 30 °C geplaatst. Na het nitreeren voegden we 150 $cm^3$ water en een paar stukjes puimsteen toe en destilleerden het ontstane vluchtige o-nitroxylenol over. Het destillaat vingen we op in een maatkolfje, waarin zich reeds 25 $cm^3$ 0,2 N NaOH-oplossing bevond. Het nitroxylenol ging reeds spoedig over en na

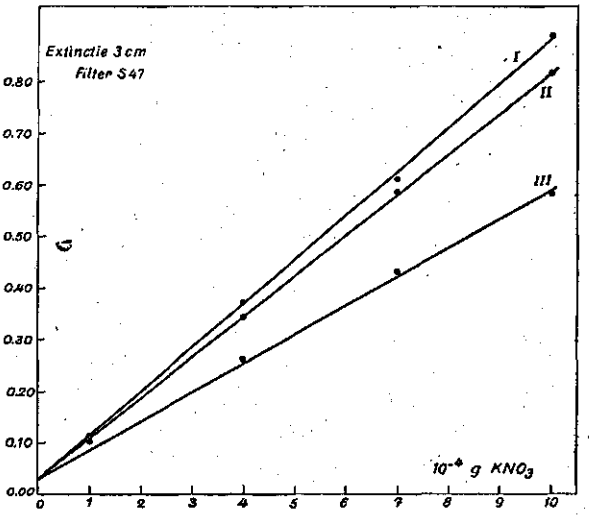
[1]) Proefschrift. Wageningen 1946.

het overdestilleeren vulden we het maatkolfje verder tot de streep. Daar ALTEN, WANDROWSKY en HILLE (1936) aangaven, dat de kleurintensiteit van de alkalische nitroxylenoloplossing na ½ uur maximaal was en dit dan gedurende 5 uur bleef, hebben we in dit tijdsbestek de extinctie bepaald met behulp van de photometer van PULFRICH, waarbij we gebruik maakten van een cuvet van 3 cm en het filter S 47. De verkregen resultaten worden weergegeven door lijn I van figuur 32. We zien dat er inderdaad een rechtlijnig verband bestaat tusschen de gemeten extinctie en de hoeveelheid nitraat. Evenals DE BOER (1940) vonden we hier een fout van 1–2 %.

Bij de bepaling van nitraat in weicultures deden zich echter door de aanwezigheid van organische stoffen moeilijkheden voor. BLOM en TRESCHOW (1929) gaven aan, dat organische stoffen door oxydatie met $KMnO_4$ vooraf moesten worden verwijderd. Daarentegen beweerden TRESCHOW en GABRIELSEN (1933), dat er door deze oxydatie nitraat ontstaat uit sommige organische stoffen. Volgens hen is nitroxylenol niet bestendig naast organische stoffen, maar door het nemen van een kortere nitreeringstijd kunnen de storende invloeden van de organische stoffen worden vermeden. Tenslotte gaven ALTEN, WANDROSWKY en HILLE (1936) aan, dat de organische stoffen toch storen, niet door een reductie van het nitroxylenol te veroorzaken, maar door het vasthouden van deze stof bij het destilleeren.

In verband met de gevoeligheid van de methode en de hoeveelheid $KNO_3$ die we bij de proeven wilden gebruiken, konden we volstaan met het nitraat te bepalen in 2 $cm^3$ weicultuur. Ter oriënteering vervingen we eenige malen de 10 $cm^3$ $KNO_3$-oplossing door 2 $cm^3$ van een 24 uur oude weicultuur van stam 11 (A 1) en 8 $cm^3$ $KNO^3$-oplossing, zoodat we dan eigenlijk eenige bepalingen uitvoerden in 2 $cm^3$ weicultuur. We vonden dan echter te lage extinctiewaarden, maar het bleek ook dat naar verhouding de extinctiewaarden alle evenveel kleiner waren geworden, hetgeen blijkt uit het verloop van lijn III van figuur 32. We konden ook aantoonen dat de stoffen, die de aërogenesbacteriën uit lactose maken, alsmede lactose en citroenzuur, niet storend werkten bij deze nitraatbepaling. Vervolgens hebben we op dezelfde manier bepalingen uitgevoerd in 2 $cm^3$ weicultuur, nadat we deze op de volgende manier geklaard hadden. Aan 50 $cm^3$ weicultuur voegden we 5 $cm^3$ $K_4Fe(CN)_6$-oplossing toe en daarna 5 $cm^3$ zinkacetaatoplossing. [1]) Na omschudden filtreerden we met behulp van een vouwfilter van SCHLEICHER en SCHÜLL no 572½. Het bijna heldere filtraat schudden we dan nog

[1]) Zie voor de samenstelling van deze oplossingen bladzijde 37.




Figuur 32.

Bepaling van $KNO_3$ volgens de xylenolmethode. Verband tusschen de gemeten extinctie en de hoeveelheid $KNO_3$

I. Bepaling uitgevoerd in 10 cm³ waterige oplossing

II. Bepaling uitgevoerd in 2 cm³ geklaarde weicultuur

III. Bepaling uitgevoerd in 2 cm³ weicultuur

met 1,5 g kaolien, waarna we weer filtreerden met behulp van eenzelfde filter. Zoodoende kregen we een volkomen helder filtraat. Bij de contrôlebepalingen in 2 cm³ van deze geklaarde weicultuur vonden we weer te lage extinctiewaarden, waarbij echter ook weer bleek dat zij naar verhouding alle evenveel kleiner waren geworden, hetgeen te zien is uit het verloop van lijn II van figuur 32. Tevens bleek ons echter, dat we bij de bepalingen in geklaarde weicultures van andere stammen en in geklaarde steriele wei dezelfde extinctiewaarden vonden. Daarom hebben we lijn II gebruikt als ijklijn bij onze nitraatbepalingen in weicultures, welke dan voor de bepalingen eerst op de aangegeven manier werden geklaard.

Een andere moeilijkheid, waarover in de litteratuur nooit gesproken wordt, is de aanwezigheid van $KNO_2$. Kaliumnitriet geeft echter ook voor een gedeelte o-nitroxylenol. Het $KNO_2$ is verwijderd door aan de 2 cm³ geklaarde weicultuur eerst 8 cm³ ½ % $H_2SO_4$ en een mespuntje ureum toe te voegen en na aansluiting aan een terugvloeikoeler gedurende 15 minuten te koken. Hierdoor verdween het nitriet volgens de vergelijking:

$$CO(NH_2)_2 + 2HNO_2 \rightarrow CO_2 + 3H_2O + 2N_2 \uparrow.$$

Het ureum hinderde niet bij de bepaling en gedurende deze behandeling verdween er geen nitraat.

Hier volgt in het kort de door ons gebruikte bepaling. De weicultuur, waarin we het nitraat wilden bepalen, klaarden we op de hierboven aangegeven manier. Van het heldere filtraat brachten we 2 cm³ over in een kolf van 500 cm³. Vervolgens voegden we 8 cm³ ½ % $H_2SO_4$ en een mespuntje ureum toe en kookten we na aanslui-

ting aan een terugvloeikoeler, gedurende 15 minuten. Na afkoeling voegden we dan 50 cm³ 78 % $H_2SO_4$ en 0,1 cm³ xylenoloplossing toe. Daarna volgden we verder de methode aangegeven bij de bepalingen in waterige $KNO_3$-oplossingen. Met behulp van lijn II van figuur 32 konden we uit de gevonden extinctie bepalen hoeveel $KNO_3$ er in deze 2 cm³ geklaarde wei aanwezig was. Door deze uitkomst te vermenigvuldigen met 1,18 vonden we de hoeveelheid $KNO_3$ aanwezig in 2 cm³ weicultuur. Dit laatste hangt samen met de door het klaren veroorzaakte verdunning. Door de toevoegingen brachten we nl. het volume van 50 cm³ op 60 cm³ en we filtreerden een neerslag af dat een volume had van 1 cm³.

De gebruikte $KNO_2$-bepaling was de methode van URBACH (1932). Hierbij reageerden we op nitriet met het op de volgende manier te maken naphtolreagens: 2 g 1–4 naphtionzure natrium en 1 g $\beta$-naphtol werden met 200 cm³ water krachtig geschud, waarna het filtraat, dat bewaard in een donkere flesch zeer lang bruikbaar bleef, kon worden gebruikt. Voor de bepaling namen we 10 cm³ $KNO_2$-oplossing, bevattende een hoeveelheid $KNO_2$ gelegen tusschen $2,10^{-3}$ en $20,10^{-3}$ mg. Hieraan voegden we ½ cm³ naphtolreagens en 1–2 druppels geconcentreerd zoutzuur toe en vervolgens, na omschudden, ½ cm³ 25 % ammonia. Als de vloeistof dan weer werd dooreengeschud ontstond er een roode kleur, waarvan bij bewaring in het donker de kleurintensiteit gedurende 48 uur onveranderd bleef. Met behulp van de photometer van PULFRICH bepaalden we de extinctiecoëfficiënt, waarbij we dan gebruik maakten van een cuvet van 2 cm en het filter S 50. De waterige oplossingen met bekende hoeveelheden $KNO_2$, noodig voor het maken van de ijklijn, verkregen we door verdunningen te maken van een meer geconcentreerde oplossing, waarvan we de sterkte bepaalden met behulp van een titratie met $KMnO_4$. Ook hier gold weer de wet van BEER, d.w.z. er was weer een rechtlijnig verband tusschen de extinctiecoëfficiënt en de hoeveelheid $KNO_2$.

Voor de nitrietbepaling in cultures moesten we eerst de cultuurvloeistoffen weer klaren. Daar het klaringsmiddel, gebruikt bij de nitraatbepaling hier onbruikbaar was (het heldere filtraat verkregen na het klaren werd nl. troebel bij de ammoniaktoevoeging), hebben we een methode gebruikt aangegeven door TILLMANS (1932). Aan 50 cm³ cultuurvloeistof voegden we 1 cm³ soda-natronloog toe (100 g gekristalliseerde soda en 50 g NaOH opgelost in 300 cm³ water) en een paar druppels van een 10 % zinkacetaatoplossing. Na filtreeren kregen we dan een heldere vloeistof, welke geen moeilijkheden meer opleverde bij de nitrietbepaling In verband met de grootte van de nitriethoeveelheden, welke bij onze proeven voorkwamen in de

vloeistofcultures, moest de geklaarde cultuurvloeistof altijd nog verdund worden met water, waardoor de zwak gele kleur die soms overbleef na het klaren van weicultures of gistwatercultures geen invloed meer uitoefende. Tengevolge van het klaren moesten de uitkomsten met 2 % verhoogd worden. Verder moesten we er altijd voor zorgen, dat de geklaarde cultuurvloeistof in voldoende mate verdund werd. Bevond zich in de 10 $cm^3$, die we bij de bepaling gebruikten, teveel $KNO_2$ dan ontstond er een andere, minder intensieve roode kleur, waardoor dus te lage uitkomsten zouden worden verkregen. Bekende hoeveelheden $KNO_2$ toegevoegd aan cultuurvloeistoffen, konden we altijd met deze methode terugvinden.

Voor het aantoonen van zeer kleine hoeveelheden hydroxylamine gebruikten we een door BLOM (1928, I; 1928, II) beschreven methode. In de te onderzoeken cultuurvloeistof mocht dan echter geen nitriet meer aanwezig zijn. Het hydroxylamine werd in azijnzure vloeistof door jodium tot nitriet geoxydeerd, welke stof we dan konden aantoonen met behulp van sulfanylzuur en $\alpha$-naphtylamine Met deze zeer gevoelige reactie konden we dus ook zeer kleine hoeveelheden hydroxylamine aantoonen. We gebruikten de volgende reagentia:

1. Sulfanylzuuroplossing. 10,5 g sulfanylzuur, 6,8 g natriumacetaat en 300 g ijsazijn werden gedurende 3 minuten gekookt met 600 $cm^3$ water.
2. $\alpha$-Naphtylamineoplossing. We verhitten iets meer dan 1 liter water tot koken, voegden dan 5 g $\alpha$-naphtylamine toe en zetten het koken gedurende 5 minuten voort. Na filtratie namen we iets minder dan 1000 $cm^3$ van het filtraat, waarvan we het volume, na toevoeging van 5 $cm^3$ geconcentreerd zoutzuur, tot 1000 $cm^3$ aanvulden.
3. Jodiumoplossing. 1,3 g jodium in 100 $cm^3$ ijsazijn.
4. Thiosulfaatoplossing. 2,5 g $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ in 100 $cm^3$ water.

BLOM gebruikte deze methode niet altijd op precies dezelfde wijze, maar wij hebben haar als volgt toegepast: Aan 100 $cm^3$ van de hydroxylamine bevattende cultuurvloeistof voegden we 10 $cm^3$ van de sulfanylzuuroplossing en 1 $cm^3$ jodiumoplossing toe. Twee minuten later namen we met behulp van de thiosulfaatoplossing de overmaat jodium weg. Dan voegden we 5 $cm^3$ van de $\alpha$-naphtylamineoplossing toe. Bij aanwezigheid van hydroxylamine ontstond er dan een roode kleur.

BLOM gaf aan dat hij nog hoeveelheden van 0,000,003 g hydroxylamine per liter kon aantoonen. Wij konden met deze methode echter 0,000,005 g $NH_2OH$ per liter nog niet aantoonen. Bij aanwezigheid van 0,000,010 g $NH_2OH$ per liter ontstond er echter een duidelijk

waarneembare rose kleur. Uit de gang van zaken blijkt wel, waarom er geen nitriet meer aanwezig mag zijn. Sporen nitriet kunnen echter verwijderd worden door de oplossing na de toevoeging van de sulfanylzuuroplossing even te koken. Hierdoor verdwijnt de diazoverbinding, welke zich gevormd heeft tusschen het nitriet en het sulfanylzuur.

## § 3. NITRAATREDUCTIE DOOR BACTERIËN VAN DE COLI-AËROGENESGROEP

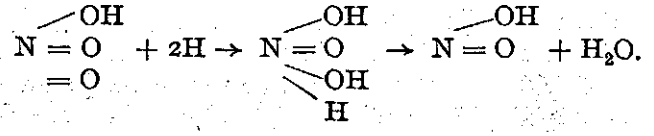
Alvorens de invloed van nitraat- en nitriettoevoegingen op de gasvorming te bestudeeren, hebben we eerst nagegaan wat er met het toegevoegde nitraat en nitriet gebeurde.

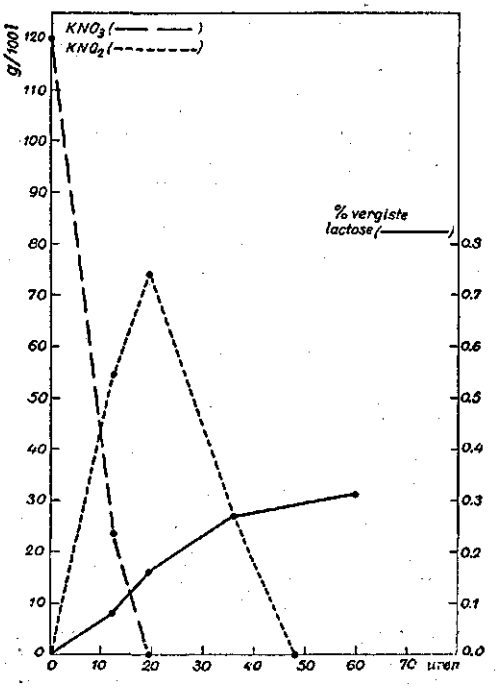
Stopfleschjes van 60 $cm^3$, voorzien van $^1/_{20}$ $cm^3$ van een eenige uren oude bouilloncultuur van de te onderzoeken stam en een bepaalde hoeveelheid $KNO_3$, werden gevuld met wei en weggezet bij 30 °C. We volgden het reductieproces door af en toe de hoeveelheid $KNO_3$, $KNO_2$ en lactose te bepalen op de manier beschreven in de vorige paragraaf. Tabel 47 laat eenige resultaten zien.

TABEL 47 *Nitraatreductie door coli-aërogenesbacteriën*

| Stam | Tijd | Aanwezig $KNO_3$ in g/100 l | Aanwezig $KNO_2$ in g/100 l | Lactoseverbruik |
|---|---|---|---|---|
| 11 (A 1) | na 0 uur | 120 | 0,0 | 0,00 % |
| | „ 12½ „ | 23,0 en 24,2 | 54,0 en 55,0 | 0,08 % |
| | „ 19½ „ | 0,0 en 0,0 | 74,0 en 74,0 | 0,16 % |
| | „ 36 „ | – | 26,3 en 26,3 | 0,27 % |
| | „ 48 „ | – | 0,0 en 0,0 | – |
| | „ 60 „ | – | – | 0,31 % |
| 4 (I 1) | na 0 uur | 60 | 0,0 | 0,00 % |
| | „ 12½ „ | 0,0 en 0,0 | 42,0 en 43,0 | 0,12 % |
| | „ 19½ „ | – | 18,9 en 18,7 | 0,19 % |
| | „ 36 „ | – | 0,0 en 0,0 | 0,19 % |

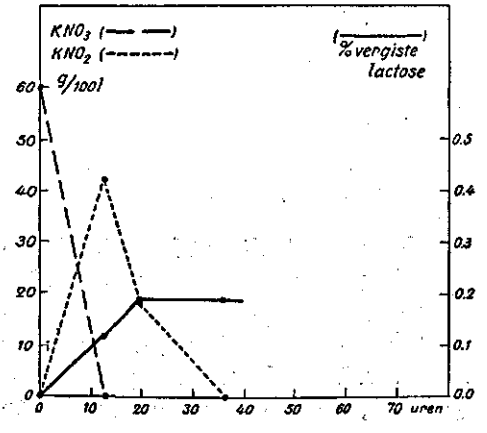
De verkregen gegevens worden bovendien nog weergegeven door de figuren 33 en 34. We zien dat het nitraat snel gereduceerd werd tot nitriet. GREEN, STICKLAND en TARR (1934) noemden het enzym dat bij de reductie betrokken was nitratase. Van deze reactie geeft KLUYVER (1942) de folgende voorstelling:






Figuur 33.
Nitraatreductie door bacteriën van Stam 11 (A 1)

Terugkeerende naar de resultaten van de beide proeven, blijkt dat ook het nitriet snel verdween. Daar het milieu zwak zuur was zou het mogelijk zijn, dat het salpeterigzuur op chemische wijze verdween, vooral daar de temperatuur nogal hoog was en er in het milieu veel — N = $H_2$-groepen voorkwamen. We bepaalden daarom in hoeverre en hoe snel nitriet chemisch kon verdwijnen onder




Figuur 34.
Nitraatreductie door bacteriën van Stam 4 (I 1)

dergelijke omstandigheden. Stopfleschjes werden gevuld met aangezuurd gistwater waaraan bepaalde hoeveelheden nitriet waren toegevoegd. De fleschjes werden bij verschillende temperaturen weggezet en van tijd tot tijd bepaalden we de hoeveelheden nitriet die nog aanwezig waren. Wat toluol werd toegevoegd om de inhoud van de fleschjes steriel te houden. De resultaten worden weergegeven door tabel 48.

TABEL 48 *Verdwijnen van $HNO_2$ in zure, steriele cultuurvloeistoffen*

| Duur | Aanwezig $KNO_2$ in g/100 l bij een | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | temperatuur van 30 °C | | | temperatuur van 20 °C | | |
| | pH 5,5 | pH 5,2 | pH 4,7 | pH 5,5 | pH 5,2 | pH 4,7 |
| na 0 uur | 23,7 | 24,5 | 22,5 | 23,7 | 24,5 | 22,5 |
| „ 20 „ | 23,0 | 22,7 | 19,7 | 23,0 | 23,0 | 21,0 |
| „ 43 „ | 21,1 | 21,6 | – | 22,0 | 22,2 | – |
| „ 70 „ | – | – | 19,4 | – | – | 20,1 |
| „ 92 „ | 20,9 | 20,4 | – | 21,6 | 21,6 | – |

We zien dat er op deze manier niet veel $KNO_2$ kon verdwijnen, alhoewel een lage pH en een hooge temperatuur het bevorderden. Bij onze proeven was de pH gedurende het proces gelegen boven 5,2, zoodat we de bacteriën voor de verdere omzetting van het nitriet verantwoordelijk moesten stellen. Gebruik makende van het feit dat de bacteriën van de coli-aërogenesgroep nitraat konden gebruiken als eenige stikstofbron, was het ons mogelijk te bepalen waar de nitraatstikstof bleef. We lieten dan de bacteriën groeien in een cultuurvloeistof welke geen andere stikstof bevatte dan die van nitraat. We gebruikten hiervoor de volgende oplossing:

| | | |
|---|---|---|
| 1000 | $cm^3$ | water |
| 0,2 | g | $MgSO_4$ |
| 1,0 | g | NaCl |
| 20 | g | lactose |
| 6,8 | g | $KH_2PO_4$ |
| 14,85 | g | $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ |

Aan deze cultuurvloeistof voegden we het nitraat later toe in de vorm van een steriele $KNO_3$-oplossing (1,6 g $KNO_3$ per 50 $cm^3$). De phosphaatbuffer, welke de vloeistof een pH gaf van 6,9, werd toegevoegd om te zorgen voor een flinke suikeromzetting, waardoor er ook veel nitraat kon worden verwerkt. Voor de proeven gebruikten we steriele stopflesschen van 320 $cm^3$, welke we, na ze voorzien te

hebben van 1 $cm^3$ van een eenige uren oude bouilloncultuur van de te onderzoeken stam en een bepaald aantal $cm^3$ (4–10) van de steriele $KNO_3$-oplossing, vulden met de genoemde cultuurvloeistof. De flesschen werden bij 30 °C geplaatst en wanneer dan al het nitraat en het daaruit gevormde nitriet verdwenen was, gingen we na waar de stikstof gebleven was. We voegden zooveel nitraat toe, dat het binnen de 30 uur verwerkt kon worden, waardoor er nog geen noemenswaardige autolyse van het gevormde bacterie-eiwit kon hebben plaats gehad. Daar oriënteerende waarnemingen ons lieten zien, dat de nitraatstikstof practisch geheel terug te vinden was in het bacterie-eiwit en in de gevormde ammoniak, hebben we verder alleen de eiwit- en ammoniakstikstof bepaald.

Bij de bepaling van de eiwitstikstof voegden we aan 150 $cm^3$ van de krachtig dooreengeschudde cultuur 10 $cm^3$ van een 10 % $Ca(OH)_2$-suspensie en daarna 10 $cm^3$ 20 % $CuSO_4$-oplossing toe. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd met behulp van een vouwfilter van SCHLEICHER en SCHÜLL no 572½ en uitgewasschen met water tot de doorloopende waschvloeistof geen reactie meer gaf met $BaCl_2$. Met de methode van KJELDAHL-LAURO bepaalden we dan de hoeveelheid eiwitstikstof. De uitkomsten werden herleid op 100 $cm^3$ cultuur. Bij de ammoniakbepaling gingen we uit van het filtraat, overgebleven bij de eiwitbepaling. Na het volume hiervan gemeten te hebben, brachten we de vloeistof over in een bekerglas en bepaalden we de ammoniakstikstof volgens BAYER (1903). Daartoe werd met water het volume aangevuld tot 250 $cm^3$. Dan voegden we toe 15–20 $cm^3$ 10 % $MgCl_2$-oplossing, een paar druppels phenolphtaleïne en 5 g poedervormig secundair-natriumphosphaat. Vervolgens werd in de vloeistof geroerd tot het phosphaat was opgelost. Al roerende voegden we daarna zooveel N. NaOH toe tot de oplossing blijvend lichtrose gekleurd werd. Er ontstond nu een vlokkig neerslag van $MgNH_4PO_4$, dat na een kwartier staan overging in een kristallijn neerslag, dat geen vreemde bestanddeelen in zich opsloot en zich met behulp van een vouwfilter gemakkelijk liet affiltreeren. Neerslag en filter werden in een destillatiekolf gebracht en na toevoeging van voldoende hoeveelheden MgO, puimsteen en water werd de ammoniak overgedestilleerd, opgevangen in een bepaalde hoeveelheid 0,05 N zwavelzuur en bepaald door terugtitratie met 0,05 N loog. Bij deze methode hadden we geen last van aminozuur- en aminestikstof.

Om de betrouwbaarheid te contrôleeren, voegden we bij een blanco proef aan 100 $cm^3$ filtraat, verkregen na klaring, 5,0 en 2,0 mg ammoniakstikstof toe. Bij de bepalingen vonden we 4,97 en 1,98 mg terug.

Tenslotte herleidden we de verkregen uitkomst op 100 cm³ cultuurvloeistof met behulp van de betrekking:

$$\text{mg } NH_3 - N \text{ per } 100 \text{ cm}^3 = \frac{100}{150} \cdot \frac{170}{V} \text{ mg gevonden } NH_3 - N$$

waarin V aangaf het volume in cm³ van de hoeveelheid filtraat waarin we de bepaling uitvoerden.

Op deze manier vonden we de gegevens van tabel 49.

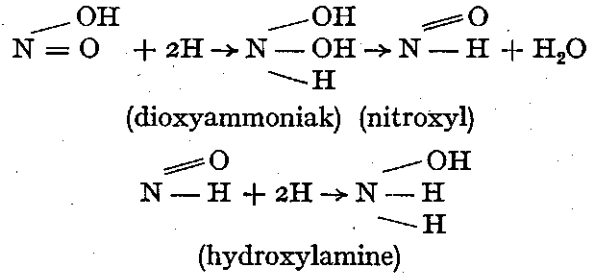
TABEL 49 *Omzetting van nitraatstikstof door bacteriën van de coli-aërogenesgroep. Getallen geven mg aan per 100 cm³*

| Proef No | Stam | Type | Toegevoegde $NO_3$-N | Terug gevonden | | | Verbruikte suiker | Duur proces |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | N | Eiwit-N | $NH_3$-N | | |
| 1 | 11 | A 1 | 14 | 14,20 | 8,95 | 5,25 | – | 24 uur |
| 2 | 11 | A 1 | 10 | 10,17 | 10,10 | 0,07 | – | 21 „ |
| | 11 | A 1 | 14 | 13,88 | 10,10 | 3,78 | – | 26 „ |
| 3 | 39 | Cl | 10 | 9,51 | 7,59 | 1,92 | 762,6 | 26 „ |
| | 39 | Cl | 14 | 13,05 | 7,56 | 5,49 | 772,6 | 27 „ |
| 4 | 4 | I 1 | 10 | 10,48 | 8,64 | 1,84 | – | 21 „ |
| | 4 | I 1 | 14 | 15,09 | 8,55 | 6,54 | – | 24 „ |
| 5 | 4 | I 1 | 10 | 9,78 | 8,33 | 1,54 | – | 24 „ |
| | 4 | I 1 | 14 | 14,10 | 8,51 | 5,59 | – | 26 „ |
| 6 | 11 | A 1 | 10 | 9,63 | 7,03 | 2,60 | 587,4 | 23 „ |
| | 11 | A 1 | 14 | 13,44 | 9,22 | 4,22 | 759,0 | 25 „ |
| 7 | 21 | I 1 | 10 | 9,73 | 7,89 | 1,84 | 755,7 | 24 „ |
| | 21 | I 1 | 14 | 13,84 | 7,86 | 5,98 | 798,6 | 29 „ |
| 8 | 37 | I 2 | 14 | 13,27 | 7,63 | 5,64 | 795,5 | 28 „ |
| 9 | 2 | C 1 | 10 | 10,09 | 5,73 | 4,36 | – | 28 „ |
| 10 | 22 | C 1 | 5,7 | 5,62 | 4,89 | 0,73 | 293,0 | 22 „ |

Het blijkt, dat practisch alle stikstof, die niet verwerkt werd tot eiwit, als $NH_3$-stikstof terug te vinden was. Wanneer we de hoeveelheid eiwit – N en $NH_3$ – N, gevormd uit 10 mg $NO_3$ – N, vergelijken met de hoeveelheden die waren ontstaan uit 14 mg $NO_3$ – N, dan zien we dat in een dergelijke cultuurvloeistof eerst bijna alleen eiwit gemaakt werd en dat daarna als er een bepaalde hoeveelheid eiwit was geproduceerd de rest van de nitraatstikstof werd verwerkt tot ammoniak. De laatste 4 mg bij een toevoeging van 14 mg $NO_3$ – N kwamen dan in hun geheel bij de ammoniak terecht. Verder zien we ook, dat in een vloeistof met 14 mg $NO_3$ – N evenveel suiker werd omgezet als in een cultuur met maar 10 mg $NO_3$ – N. Alleen in het geval van proef 6 werd er bij aanwezigheid van 14 mg toegevoegde stikstof meer suiker omgezet dan bij een toevoeging van 10 mg. Maar hier blijkt dan ook, dat er in het geval van de 14 mg meer eiwit was gevormd. Colibacteriën konden in deze vloeistof door

hun grootere zuurproductie minder suiker omzetten, hetgeen blijkt uit het suikerverbruik bij proef 10, en begonnen reeds eerder de nitraatstikstof te verwerken tot ammoniak.

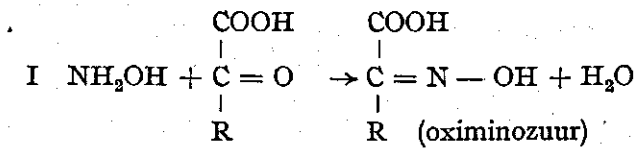
We stellen ons nu voor, dat het nitriet eerst wordt gereduceerd tot hydroxylamine op de volgende door KLUYVER (1942) aangegeven wijze:



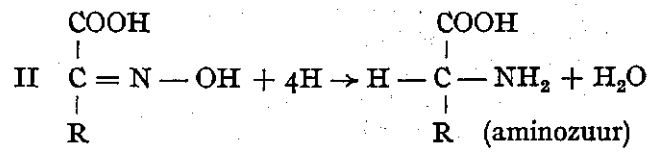
(dioxyammoniak) (nitroxyl)

(hydroxylamine)

Het hydroxylamine hebben we kunnen aantoonen hetgeen beschreven wordt op bladzijde 86 e.v. Hydroxylamine reageert reeds in uiterst verdunde concentraties zeer snel met aldehyden en ketonen. Wij stellen ons voor, dat bij onze proeven het hydroxylamine reageerde met de ketozuren die ontstonden bij de lactoseomzetting, waardoor oximinoverbindingen gevormd werden. Zoodoende kon het giftige hydroxylamine zich niet ophoopen. Evenals BLOM (1928, II) stellen we ons voor, dat deze oximinozuren verder werden gereduceerd tot aminozuren, welke dan werden gebruikt bij de opbouw van bacterie-eiwit. De assimilatie van de hydroxylaminestikstof verliep dan volgens de vergelijkingen:



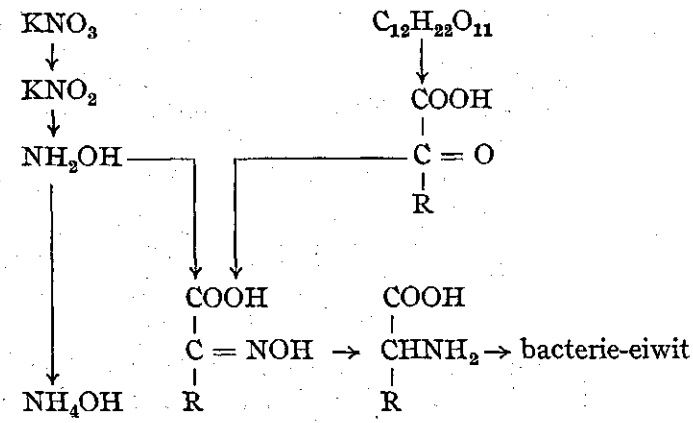
(oximinozuur)



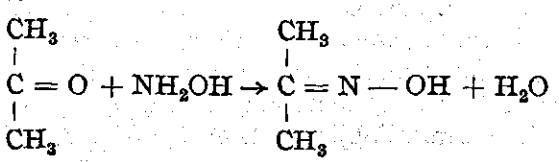
(aminozuur)

Zoodra er in deze vloeistof geen suiker meer werd omgezet, waren er ook geen ketozuren meer voorhanden waarmee het hydroxylamine zich kon verbinden. Het komt ons waarschijnlijk voor dat de hydroxylamine dan verder wordt gereduceerd tot ammoniak. Dit zou ook al voor een deel plaats kunnen hebben gedurende de opbouw van eiwit door de vermeerdering der bacteriën, maar de gegevens van tabel 49 maken dit niet waarschijnlijk. De hoeveelheid suiker die werd om-

gezet bepaalde de hoeveelheid eiwit die kan worden opgebouwd en na de eiwitsynthese werd het hydroxylamine, dat geen gelegenheid had gevonden te reageeren met een ketozuur, verder gereduceerd tot $NH_4OH$. Het totale proces kan dus als volgt worden weergegeven




BLOM (1928, II) toonde met behulp van een door hem uitgewerkte methode, die we in de vorige paragraaf beschreven hebben, aan, dat hydroxylamine ontstaat bij de assimilatie van nitraatstikstof. Hij gebruikte echter geen reincultures, maar entte de vloeistof met grond. Verder toonde hij niet aan, dat het hydroxylamine niet ontstaat bij de assimilatie van ammoniakstikstof en van organisch gebonden stikstof. Met behulp van zijn methode hebben we ook bij onze proeven het ontstaan van hydroxylamine kunnen aantoonen, maar ook dat bij de assimilatie van ammoniakstikstof en van de stikstof zich bevindende in gistwater geen hydroxylamine ontstond. We lieten daartoe de bacteriën groeien in de reeds bij de assimilatie proeven beschreven cultuurvloeistof. Alleen gebruikten we hier stopflesschen van 1200 $cm^3$. Bij de proeven met nitraat voorzagen we elke flesch eerst met 5 $cm^3$ van een eenige uren oude bouilloncultuur van een bepaalde stam en met 10 $cm^3$ steriele $KNO_3$-oplossing (6 g $KNO_3$ per 50 $cm^3$), waarna we de flesch vulden met de genoemde cultuurvloeistof. In de vorige proeven bleek, dat het hydroxylamine snel verder werd verwerkt. Daarom hebben we aan de flesch nog 1 $cm^3$ aceton toegevoegd. Gedurende het proces verbond een deel van het hydroxylamine zich met de aceton tot acetoxim volgens:



Als er geen nitraat en nitriet meer was aan te toonen, neutraliseerden we 500 $cm^3$ van de cultuur met NaOH en destilleerden we 100 $cm^3$ over. Het acetoxim is vluchtig bij neutrale reactie. Het destillaat vingen we op in 10 $cm^3$ van het sulfanylzuurreagens, waarvan de samenstelling beschreven werd in § 2. De aldus verkregen 110 $cm^3$ acetoximoplossing werd gedurende 5 minuten zacht gekookt. Hierbij trad hydrolyse op, het aceton vervluchtigde en het vrijgekomen hydroxylamine bleef achter in de oplossing. Na afkoeling voegden we aan deze 110 $cm^3$ 1 $cm^3$ van de jodiumoplossing toe. Twee minuten later namen we met de thiosulfaat-oplossing de overmaat jodium weg en werd 5 $cm^3$ van de oplossing van $\alpha$-naphtylamine toegevoegd.

We hebben deze proeven eenige malen uitgevoerd met bacteriën van stam 11 (A 1) en stam 4 (I 1). In alle gevallen konden we in de verkregen 110 $cm^3$ hydroxylamine aantoonen. Er ontstond een donkerroode kleur en naar schatting was er telkens in deze 110 $cm^3$ 0,05–2 mg hydroxylamine aanwezig. Werd de oxydatie met jodium weggelaten, dan was de proef negatief. Gedurende de nitraat en nitrietverwerking, welke bij 30 °C meestal binnen de 36 uur geeindigd was, bleven de flesschen in het donker, omdat we hierdoor de mogelijkheid uitsloten dat het aangetoonde hydroxylamine afkomstig zou zijn van een reductie van $KNO_3$ door de lactose, welke reductie onder deze omstandigheden door licht mogelijk zou worden gemaakt. Daarom werd het nitraat ook later apart toegevoegd, omdat een dergelijke reductie ook mogelijk was gedurende het steriliseeren van de cultuurvloeistof.

Werd het nitraat bij deze proeven vervangen door ammoniumchloride, waarvan we dan 10 $cm^3$ van een oplossing namen die 3 g $NH_4Cl$ per 50 $cm^3$ bevatte, zoodat er evenveel stikstof werd toegevoegd, dan konden we in het verkregen destillaat van de cultuur in geen enkel geval ook maar de geringste hoeveelheid hydroxylamine aantoonen.

Bij een reeks andere proeven lieten we de bacteriën groeien in gistwater, waaraan per liter 6,8 g $KH_2PO_4$ en 14,85 g $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ was toegevoegd. De proeven werden verder op dezelfde manier uitgevoerd. Voegden we bij het vullen van de flesschen behalve de cultuur en de aceton nog 10 $cm^3$ van de $KNO_3$-oplossing toe, dan was er in het gewonnen destillaat na hydrolyse steeds hydroxylamine aan te toonen. Voegden we geen andere stikstofbron toe, zoodat de bacteriën moesten leven van de stikstof die zich in het gistwater bevond, dan was er in zoo een destillaat nooit hydroxylamine te vinden. Coli-aërogenesbacteriën vormden dus ook tijdens de reductie van nitraat in gistwater hydroxylamine, welke stof niet optrad bij het gebruik van gistwater alleen.

Eenige malen hebben we ook geprobeerd in de cultuurvloeistof hydroxylamine aan te toonen zonder van een acetontoevoeging gebruik te maken. Overigens was de proef hetzelfde ingericht. Na het verdwijnen van het nitraat en het nitriet pasten we de methode direct toe op 100 $cm^3$ cultuur. We konden dan echter geen hydroxylamine vinden. Het reageerde dus zoo snel met de ketozuren of werd zoo snel gereduceerd tot ammoniak, dat er niet voldoende was overgebleven om een positieve reactie te geven. Wel hebben we zonder acetontoevoeging waarschijnlijk oximinozuren kunnen aantoonen. Aan 100 $cm^3$ van de cultuur voegden we dan 5 $cm^3$ van het sulfanylzuurreagens toe, waarna we de oplossing gedurende 5 minuten zacht kookten. De nog niet verder tot aminozuur verwerkte oximinozuren ontleedden dan weer volgens de vergelijking:

$$\begin{array}{l} COOH \\ | \\ C = N - OH \\ | \\ R \end{array} + H_2O \rightarrow \begin{array}{l} COOH \\ | \\ C = O \\ | \\ R \end{array} + NH_2OH$$

Na afkoeling werd dan weer de aangegeven methode gevolgd. Gebruikten we bij het inzetten van de proef nitraat, dan konden we direct na het verdwijnen van het nitraat en nitriet dit hydroxylamine aantoonen, doordat de oplossing zeer licht, doch duidelijk waarneembaar, rose werd gekleurd. Voegden we bij het begin aan de cultuurvloeistof ammoniumchloride toe, dan kon in 100 $cm^3$ op bovenstaande manier nooit oximinozuren worden aangetoond.

Blom (1928, II) vermeldt echter, dat bij deze laatste proeven een positief resultaat ook kan worden veroorzaakt door hydroxylamine gevormd uit hydroxyaminozuren, welke zuren volgens hem op de volgende manier ontstaan zouden kunnen uit dioxyammoniak, waarschijnlijk ook een tusschenproduct van de nitraatreductie, en een aldehyde:

$$CH_3CHO + OH - NH - OH \rightarrow CH_3 - CO - NHOH + H_2O$$

Deze zuren geven na hydrolyse namelijk hydroxylamine volgens de vergelijking:

$$CH_3.CO - NHOH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + H_2NOH.$$

Daarom hebben we bij de eerste proeven acton toegevoegd, daar volgens Blom ketonen alleen kunnen reageeren met hydroxylamine en niet met dioxyammoniak.

Tenslotte kunnen we dus zeggen, dat coli-aërogenesbacteriën het toegevoegde nitraat en nitriet reduceeren tot hydroxylamine. Zoolang er suiker wordt omgezet verbindt het hydroxylamine zich met

de daarbij gevormde ketozuren, welke verbindingen worden gereduceerd tot aminozuren. Daarna wordt de rest van het hydroxylamine verder gereduceerd tot $NH_4OH$.

## § 4. DE INVLOED VAN $KNO_3$ EN $KNO_2$ OP DE GASVORMING UIT LACTOSE DOOR COLI-AËROGENESBACTERIËN

Nu konden we overgaan tot een bestudeering van de invloed van nitraat en nitriet op de gasvorming uit lactose door de bacteriën van de coli-aërogenesgroep. Hierover zijn echter reeds eenige onderzoekingen gepubliceerd, waarvan de resultaten hier volgen.

BOEKHOUT en OTT DE VRIES (1904) verklaarden het dalen van de gasproductie door nitraattoevoeging door aan te nemen, dat dan de coli-aërogenesbacteriën de suiker onaangetast lieten. Zij beschouwden de suikervergisting nl. als een onttrekking van zuurstof aan de suiker, waardoor er koolzuur en waterstof overbleef. Als er nitraat werd toegevoegd gaven de bacteriën aan de zuurstof van het nitraat de voorkeur. WEIGMANN, GRUBER en HUSS (1906) namen deze verklaring over, welke daarna nog eens door SCHLAG (1930) en door VAN DER BURG en HARTMANS (1943) naar voren werd gebracht. Deze verklaring strookt echter niet met de tegenwoordige inzichten inzake de suikervergisting en de nitraatreductie. Bovendien wordt er tijdens de nitraatreductie toch nog suiker verbruikt (zie tabel 47 en 49 en de figuren 33 en 34).

In 1933 kwam er een nieuwe verklaring naar voren. Het bij de nitraatreductie intermediair gevormde nitriet zou door zijn giftige werking de ontwikkeling van de coli-aërogenesbacteriën stopzetten en zoodoende de gasvorming belemmeren. De verdediger van deze verklaring was WOJTKIEWICZ (1933) en bij oppervlakkige beschouwing schijnt zijn onderzoek die opvatting te steunen. Hij voegde toenemende hoeveelheden nitraat toe aan weicultures van coli-aërogenesbacteriën en zag, dat er bij een bepaalde hoeveelheid, ongeveer 60 g per 100 liter, geen gas gevormd werd en de bacteriën afstierven. Volgens hem was het nitriet hiervan de oorzaak en vandaar zijn advies om aan de te verkazen melk dan maar meteen $KNO_2$ toe te voegen en wel dezelfde hoeveelheid, die bij zijn proeven met wei de gasvorming voorgoed onmogelijk maakte en de dood van de bacteriën veroorzaakte. Bij zijn onderzoek was dit 40 g per 100 liter. De melkzuurstreptococcen, die voor de kaasmakerij zoo belangrijk zijn (zie bladzijde 59 en 60) zouden van het nitriet bijna geen hinder ondervinden. BÖTEL, KNIEFALL en HENNEBERG (1933) vonden ook dat toevoegingen van nitraat en nitriet in voldoend groote concentraties de bacteriën van de coli-aërogenesgroep ten-

slotte doodden en ook zij kwamen tot de conclusie, dat de gasvorming alleen verhinderd kon worden door de bacteriën te vergiftigen. Aangezien we voor de weerlegging van deze opvatting gebruik moeten maken van de resultaten van ons onderzoek, kunnen we er thans nog niet nader op ingaan.

Bij deze verklaring is er in het geheel geen rekening gehouden met het feit, dat de reductie van nitraat waterstof vereischt, welke aan de suikervergisting wordt onttrokken. HÜTTIG (1933) en SCHWARZ, FISCHER, LEMBKE en JENSEN (1938) hebben dan ook op dit feit gewezen.

Bij onze proeven over de invloed van nitraat en nitriet op de gasvorming gebruikten we gistingsfleschjes van 40 $cm^3$, welke we, na ze voorzien te hebben van $^1/_{20}$ $cm^3$ van een eenige uren oude bouilloncultuur van een bepaalde stam en een bepaalde hoeveelheid, variëerende van 0–1 $cm^3$, van een steriele $KNO_3$- of $KNO_2$-oplossing, vulden met wei. Bij het begin van de proef waren er zoodoende 100.000–500.000 bacteriën per $cm^3$ aanwezig. De fleschjes werden bij 30 °C geplaatst en van tijd tot tijd werd de gasproductie opgenomen en werd er met het reagens van GRIESS-ROMIJN op nitriet en, als dit er niet was, op nitraat gereageerd. Dit laatste gebeurde eerst na toevoeging van wat zinkstof. Bij alle proeven was er als het nitriet verdwenen was ook geen nitraat meer aan te toonen. Blijkbaar verloopt de reductie van nitraat tot nitriet sneller dan de verwerking van nitriet (zie tabel 47 en figuur 33 en 34).

Tabel 50 en figuur 35 laten de resultaten zien van een proef, waarbij we de invloed van $KNO_3$ op de gasproductie uit wei door bacteriën van stam 11 (A 1) nagingen.

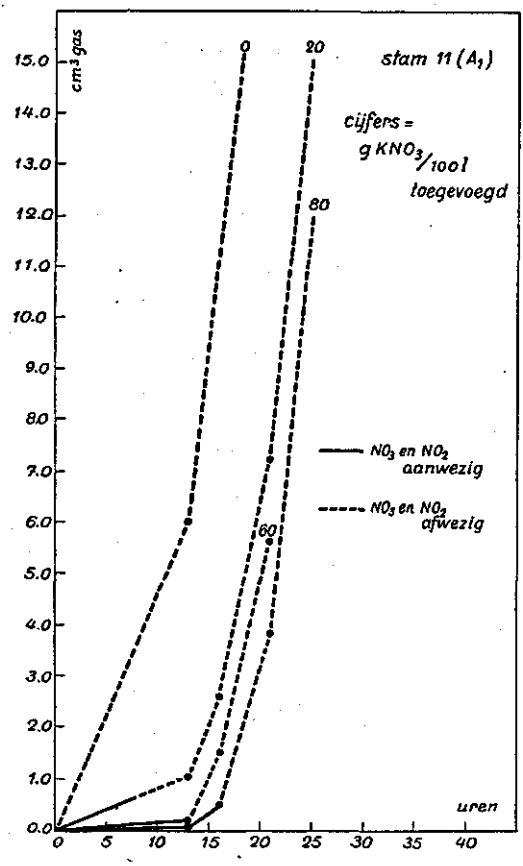
TABEL 50

*Invloed van $KNO_3$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 11 (A 1)*

| Tijd | $cm^3$ gas gevormd in flesjes waaraan was toegevoegd per 100 liter | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 g $KNO_3$ | 20 g $KNO_3$ | 40 g $KNO_3$ | 60 g $KNO_3$ | 80 g $KNO_3$ | 100 g $KNO_3$ |
| na 13 uur | 6,0 | 1,0 [1]) | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| „ 16 „ | 10,3 | 2,6 | 2,0 | 1,5 | 0,5 | 1,0 |
| „ 21 „ | 25,6 | 7,2 | 8,1 | 5,6 | 3,8 | 2,6 |
| „ 37 „ | 98,5 | 40,0 | 62,5 | 47,5 | 41,5 | 12,0 |
| „ 42 „ | 115,0 | 53,8 | 79,9 | 63,0 | 64,5 | 24,2 |
| „ 48 „ | 130,0 | 66,6 | 97,0 | 77,4 | 86,2 | 43,6 |

[1]) Bij deze concentratie is het tijdstip van de verdwijning van het nitraat en nitriet niet precies bepaald daar het plaats vond binnen de 13 uur.

Figuur 35
Invloed van $KNO_3$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 11 (A 1)




De horizontale strepen in de tabel geven aan op welk tijdstip al het nitraat en het daaruit gevormde nitriet verdwenen was. In de figuur is dit moment aangegeven door de overgang van de getrokken lijn in de stippellijn. 40 g $KNO_3$ waren na 13 uur verwerkt, 80 g pas na 16 uur en 100 g eerst na 21 uur. Ook bij de andere nog te beschrijven proeven wordt op deze manier de verdwijning van het nitraat en nitriet aangegeven.

Uit de gegevens van tabel 50 en figuur 35 blijkt, dat door nitraattoevoeging de gasvorming uit wei eenige tijd werd uitgesteld en dat deze gasproductie pas kon beginnen als het nitraat en het daaruit gevormde nitriet omgezet waren tot eiwit en $NH_3$. Dat dit uitstellen van het begin van de gasvorming niet werd veroorzaakt door een giftige invloed van het nitraat of van hieruit ontstane producten, blijkt uit de gegevens van tabel 51, waarin resultaten worden weergegeven van verrichte tellingen met behulp van bouillonagarplaten.

TABEL 51

*Invloed van nitraattoevoeging op het aantal bacteriën van stam 11 (A 1) in wei*

| Toegevoegd $KNO_3$ | Aantal bacteriën na 20,5 uur | Troebeling na 68 uur |
|---|---|---|
| 0 g/100 l | $50.10^8$ per $cm^3$ | IV |
| 20 „ | $41.10^8$ „ „ | IV |
| 40 „ | $38.10^8$ „ „ | IV |
| 60 „ | $36.10^8$ „ „ | IV |
| 80 „ | $31.10^8$ „ „ | IV |
| 100 „ | $52.10^8$ „ „ | IV |

Tevens hebben we na afloop van de proef de troebeling van de cultures, welke ook een maat was voor het aantal bacteriën, met elkaar vergeleken. Aan de cultuur zonder nitraattoevoeging gaven we een IV. Aan de hand hiervan kregen de andere cultures een cijfer dat kon varieeren van I tot IV, waarbij lagere cijfers dan IV aangeven dat de betrokken cultuur minder troebel was en dus minder bacteriën bevatte. In wei kunnen de bacteriën van stam 11 (A 1) dus 100 g $KNO_3$ per 100 liter verwerken zonder een giftige invloed te ondervinden van het nitraat en de gevormde tusschenproducten. Tabel 52 en figuur 36 laten de invloed van $KNO_3$ zien op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 20 (I 1).

TABEL 52

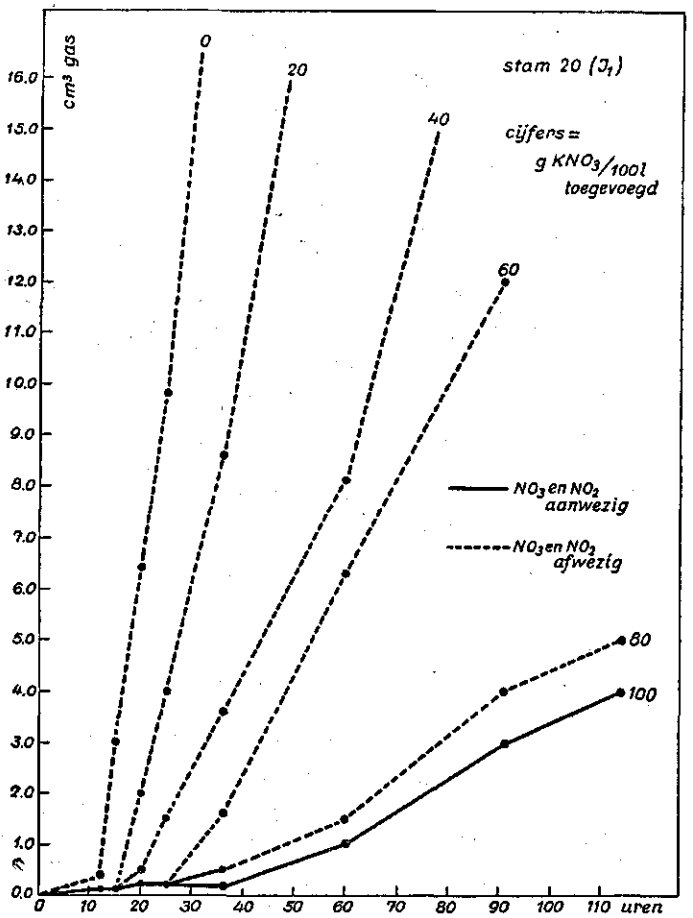
*Invloed van $KNO_3$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 20 (I 1)*

| Tijd | $cm^3$ gas gevormd in fleschjes waaraan was toegevoegd per 100 liter | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 g $KNO_3$ | 20 g $KNO_3$ | 40 g $KNO_3$ | 60 g $KNO_3$ | 80 g $KNO_3$ | 100 g $KNO_3$ |
| na 12 uur | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 15 „ | 3,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 20 „ | 6,4 | 2,0 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| „ 25 „ | 9,8 | 4,0 | 1,5 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| „ 36 „ | 21,0 | 8,6 | 3,6 | 1,6 | 0,5 | 0,2 |
| „ 60 „ | 82,0 | 22,8 | 8,1 | 6,3 | 1,5 | 1,0 |
| „ 91 „ | 120,0 | 42,8 | 20,0 | 12,0 | 4,0 | 3,0 |

Ook hier zien we weer een uitstel van het begin van de gasproductie tot het nitraat en het daaruit gevormde nitriet verwerkt waren. De bacteriën konden echter bij een toevoeging van 100 g $KNO_3$ het gevormde nitriet niet geheel reduceeren. Tabel 53 laat eenige

Figuur 36

Invloed van $KNO_3$ op de gasvorminguit wei door bacteriënvanstam 20 (I 1)




TABEL 53

*Invloed van nitraattoevoeging aan wei op het aantal bacteriën van stam 20 (I 1)*

| Toegevoegd $KNO_3$ | Aantal bacteriën na 21 uur | Troebeling na 91 uur |
|---|---|---|
| 0 g/100 l | $28.10^8$ per $cm^3$ | IV |
| 20 „ | $30.18^8$ „ „ | IV |
| 40 „ | $37.10^8$ „ „ | IV |
| 60 „ | $65.10^8$ „ „ | III |
| 80 „ | $24.10^8$ „ „ | II |
| 100 „ | $25.10^8$ „ „ | I |

gegevens zien over de invloed van $KNO_3$ op het aantal bacteriën.

Het blijkt, dat er na 21 uur nog niets van een daling van het aantal bacteriën per $cm^3$ te zien was. De kleine verschillen zullen wel te wijten zijn aan het tellen. De verdaging van de gasvorming gedurende deze tijd berustte dus niet op een remming van de bacterieontwikkeling. Door groote nitraattoevoegingen werd echter later wel de ontwikkeling van de bacteriën geschaad, hetgeen ons bleek uit de troebeling van de cultures na 91 uur. In het fleschje, waaraan zooveel nitraat was toegevoegd, dat de bacteriën het niet konden verwerken, ontstond later toch ook wel een beetje gas, maar dit werd niet door de bacteriën uit suiker gevormd (deze waren toen nl. grootendeels reeds dood) maar is vermoedelijk ontstaan uit een reactie van het $HNO_2$ met de $NH_2$-groepen van het milieu waardoor een geringe hoeveelheid $N_2$ is gevormd. De hoeveelheid gas was echter te klein om te analyseeren.

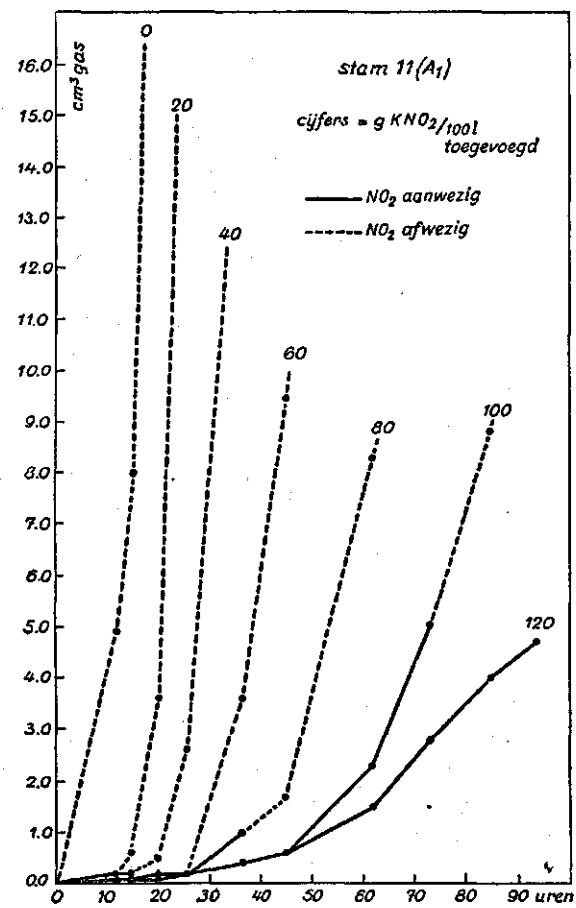
Bovengenoemde proeven hebben we eenige malen met hetzelfde resultaat herhaald. Ook met vele andere stammen, waarbij we ons uit de aard der zaak beperkten tot los-positieve bacteriën, kregen we deze resultaten, welke we nog eens in het kort zullen herhalen.

De gasvorming uit wei door de los-positieve stammen kan met behulp van een $KNO_3$-toevoeging worden uitgesteld tot het moment, waarop het nitraat en het daaruit gevormde nitriet door de bacteriën gereduceerd zijn. Dit uitstel wordt niet veroorzaakt door een mindere ontwikkeling van de bacteriën tengevolge van deze nitraattoevoeging. Alleen als er veel nitraat wordt toegevoegd, zoodat de bacteriën het daaruit gevormde nitriet niet of bijna niet kunnen verwerken, beginnen de bacteriën na ongeveer 24 uur langzaam af te sterven, waardoor de troebeling van de cultures, welke eerst normaal is, achterblijft bij die in de vloeistoffen met minder nitraat.

Hieruit blijkt, dat dit middel gebruikt kan worden bij de bestrijding van vroeg-los in kaas. We moeten dan zooveel nitraat toevoegen, dat hierdoor de gasvorming wordt uitgesteld tot het moment waarop de melkzuurbacteriën in staat zijn de gasvorming tegen te houden. Tijdens de nitraat- en nitrietreductie maken de bacteriën geen gas uit de omgezette lactose. De suikervergisting, bestaande uit een aantal oxydatie- en reductiereacties, waarbij de waterstof een belangrijke rol speelt, krijgt door het verlies van de waterstof, welke gebruikt wordt om het nitraat te reduceeren tot de niet verder te reduceeren eindproducten, een ander verloop, waardoor er bijna geen gas ontstaat. Afgezien van de gasproductie hebben we deze

veranderingen in de suikervergisting niet nader onderzocht. TIKKA (1933) heeft echter aangegeven welke veranderingen nitraattoevoeging bij de glucosevergisting door colibacteriën teweegbrengt en zijn resultaten zullen ook wel grootendeels gelden voor de suikervergisting door onze typen. Door de nitraattoevoeging werd er bijna geen waterstof, minder koolzuur, minder alcohol, minder melkzuur en meer azijnzuur gevormd dan zonder $KNO_3$. De hoeveelheid mierenzuur bleef gelijk.

Toevoeging van nitriet zou volgens deze zienswijze ook de gasvorming moeten uitstellen. Ook hiermede zijn een aantal proeven genomen, waarvan de verkregen resultaten overeenkwamen met die van de nitraatproeven. Tabel 54 en figuur 37 laten de resultaten zien van een proef genomen met stam 11 (A 1).




Figuur 37.
Invloed van $KNO_2$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 11 (A 1)

TABEL 54

*Invloed van $KNO_2$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 11 (A 1)*

| Tijd | cm³ gas gevormd in fleschjes waaraan was toegevoegd per 100 liter | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 g $KNO_2$ | 20 g $KNO_2$ | 40 g $KNO_2$ | 60 g $KNO_2$ | 80 g $KNO_2$ | 100 g $KNO_2$ | 120 g $KNO_2$ |
| na 12 uur | 4,9 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 15 „ | 8,0 | 0,6 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 20 „ | 22,3 | 3,6 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 25½ „ | 52,3 | 19,4 | 2,6 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| „ 36½ „ | 110,0 | 63,0 | 17,6 | 3,6 | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| „ 45 „ | 150,0 | 89,0 | 34,4 | 9,5 | 1,7 | 0,6 | 0,6 |
| „ 62 „ | 220,0 | 138,0 | 102,0 | 41,5 | 8,3 | 2,3 | 1,5 |
| „ 73 „ | 263,0 | 165,0 | 132,0 | 63,0 | 24,5 | 5,0 | 2,8 |
| „ 85 „ | 300,0 | 181,0 | 161,0 | 86,0 | 51,0 | 8,8 | 4,0 |
| „ 94 „ | 327,0 | 194,0 | 186,0 | 108,0 | 77,0 | 15,5 | 4,7 |

Om aan te toonen, dat het uitstel van de gasvorming niet werd veroorzaakt door een remming van de bacterie-ontwikkeling, hebben we een aantal tellingen verricht, waarvan de resultaten worden weergegeven door tabel 55.

TABEL 55

*Invloed van $KNO_2$-toevoeging aan wei op het aantal bacteriën van stam 11 (A 1)*

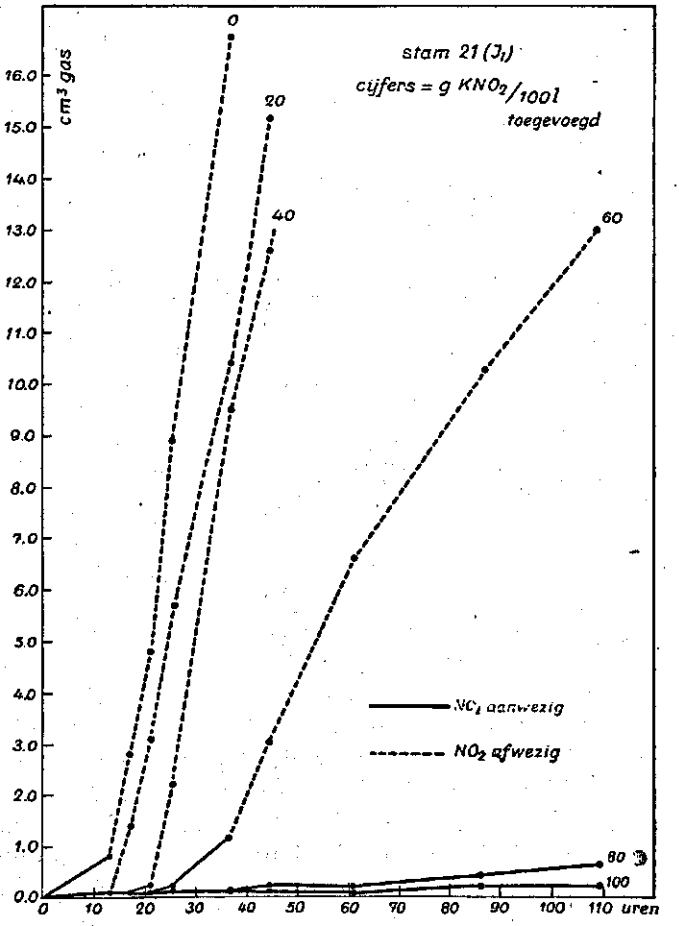
| Toegevoegd $KNO_2$ | Aantal bacteriën na 22 uur | Troebeling na 94 uur |
|---|---|---|
| 0 g/100 l | $18.10^8$ per cm³ | IV |
| 20 „ | $26.10^8$ „ „ | IV |
| 40 „ | $50.10^8$ „ „ | IV |
| 60 „ | $34.10^8$ „ „ | IV |
| 80 „ | $28.10^8$ „ „ | IV |
| 100 „ | $21.10^8$ „ „ | III |
| 120 „ | $25.10^8$ „ „ | I |

Ook hier blijkt weer, dat de hoeveelheid $KNO_2$ die niet of nog juist verwerkt kon worden, later giftig begon te worden voor de bacteriën. $KNO_2$ kon dus, bij niet te hooge concentraties, zonder giftig te worden de gasvorming uitstellen tot het moment, waarop al het nitriet verwerkt was. Tabel 56 en figuur 38 laten de resultaten zien van een proef, waarbij we gebruik maakten van stam 21 (I 1).

TABEL 56

*Invloed van $KNO_2$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 21 (I 1)*

| Tijd | cm³ gas gevormd uit fleschjes waaraan was toegevoegd per 100 liter | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 g $KNO_2$ | 20 g $KNO_2$ | 40 g $KNO_2$ | 60 g $KNO_2$ | 80 g $KNO_2$ | 100 g KNO |
| na 13 uur | 0,8 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 17 „ | 2,8 | 1,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 21 „ | 4,8 | 3,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 25½ „ | 8,9 | 5,7 | 2,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| „ 37 „ | 16,8 | 10,4 | 9,5 | 1,1 | 0,1 | 0,1 |
| „ 44½ „ | 22,0 | 15,2 | 12,6 | 3,0 | 0,2 | 0,1 |
| „ 61 „ | 34,8 | 27,8 | 23,1 | 6,6 | 0,2 | 0,1 |
| „ 87 „ | 46,9 | 43,8 | 38,0 | 10,3 | 0,4 | 0,2 |
| „109 „ | 52,2 | 52,6 | 45,4 | 13,0 | 0,6 | 0,2 |




Figuur 38
Invloed van $KNO_2$ op de gasvorming uit wei door bacteriën van stam 21 (I 1)

Ook hier trad weer hetzelfde verschijnsel op. Zoolang er $KNO_2$ aanwezig was kon er geen gas gevormd worden. Tabel 57 geeft eenige gegevens over de groei van de bacteriën bij deze proef.

TABEL 57

*Invloed van $KNO_2$-toevoeging aan wei op het aantal bacteriën van stam 21 (I I)*

| Toegevoegd $KNO_2$ | Aantal bacteriën na 22 uur | Troebeling na 109 uur |
|---|---|---|
| 0 g/100 l | $14.10^8$ per $cm^3$ | IV |
| 20 „ | $10.10^8$ „ „ | IV |
| 40 „ | $8.10^8$ „ „ | IV |
| 60 „ | $12.10^8$ „ „ | III |
| 80 „ | $4.10^8$ „ „ | I |
| 100 „ | $6.10^8$ „ „ | I |

Ook hier werd weer dezelfde invloed van het nitriet op de groei van de bacteriën gevonden. Het $KNO_2$, dat niet gereduceerd kon worden, werd later giftig voor de bacteriën.

Bij herhaling gaven deze proeven hetzelfde resultaat. We hebben verder deze proeven ook eenige malen genomen met de andere lospositieve stammen, waarbij steeds dezelfde resultaten verkregen werden.

Het moet dus ook mogelijk zijn met behulp van $KNO_2$ het vroeglos in kaas te bestrijden. Toevoeging van $KNO_2$ stelt de gasvorming uit zonder giftig te zijn voor de bacteriegroei. Bij hooge concentraties sterven de bacteriën later af, waardoor dan de gasvorming in het geheel niet meer kan beginnen. De werking van $KNO_2$ kunnen we op dezelfde manier verklaren als die van $KNO_3$. Het nitriet treedt bij de suikervergisting op als waterstofacceptor, waardoor de lactose anders wordt omgezet en er geen gas ontstaat.

We willen thans nog de kwestie bespreken van de giftige werking van het nitriet, dat door de bacteriën niet verwerkt kon worden. Wojtkiewicz (1933) nam aan dat nitriet een giftige invloed uitoefent op de bacteriën in die grootere concentraties. We gelooven niet dat deze kwestie zoo eenvoudig is, want na 22 uur was er nog niets van een giftige invloed van het nitriet te zien, zooals blijkt uit de gegevens van tabel 55 en 57. Ná deze tijd begonnen de bacteriën pas hinder te ondervinden van het nitriet. We hebben deze kwestie in verband gebracht met het verloop van de suikerstofwisseling. Als we de resultaten van de beschreven proeven nog eens nagaan dan valt het op, dat de aërogenes-

stam veel meer nitraat en nitriet kon verwerken dan de intermediaire stammen. Volgens ons hangt dit samen met het feit, dat in weicultures de suikerstofwisseling van aërogenesbacteriën veel langer actief blijft dan die van intermediaire stammen. Dit hebben we kunnen aantoonen met behulp van suikerbepalingen. In een weicultuur van een intermediaire stam werd na 24 uur bijna geen suiker meer vergist, terwijl in een weicultuur van een aërogenesstam gedurende eenige dagen suiker werd omgezet. Dit blijkt ook uit het suikerverbruik bij de proeven over de nitraatreductie, vermeld in de vorige paragraaf (figuur 33 en 34). Ook nog op een andere eenvoudigere manier konden we aantoonen, dat de stofwisseling in een weicultuur van een aërogenesstam langer actief bleef dan die van een intermediaire stam. Hiervoor gebruikten we een methode van LINDSEY en MECKLER (1932), waarbij we aan 24 uur oude weicultures wat waterige, verzadigde methyleenblauwoplossing toevoegden en de tijd maten, welke noodig was om deze hoeveelheid methyleenblauw te reduceeren. Een aërogenescultuur had hier veel minder tijd voor noodig dan een cultuur van een intermediaire stam.

In de vorige paragraaf zagen we, dat nitraat en nitriet werden gereduceerd tot hydroxylamine, welke stof zich verbond met de bij de suikerstofwisseling ontstane ketozuren, welke verbindingen werden gereduceerd tot aminozuren. Is er geen actieve suikerstofwisseling meer en zijn er dus ook geen ketozuren meer aanwezig, dan wordt de overmaat hydroxylamine verder gereduceerd tot ammoniak. We stellen ons voor, dat gedurende dit laatste proces de bacteriën afsterven, waarschijnlijk doordat de reductie van het giftige hydroxylamine niet zoo snel verloopt als het wegnemen van hydroxylamine met ketozuren en er dus gedurende de vorming van ammoniak ophoopingen van hydroxylamine ontstaan. Toegevoegd nitriet begon dan ook altijd pas later giftig te worden, als er bijna geen suiker meer werd omgezet en de ammoniakvorming begon. De giftige werking hing bij onze proeven niet samen met de grootte van de nitrietconcentratie, maar met het feit dat er nog nitriet over was na de suikerverwerking. We hebben nog eenige proeven genomen, welke steun verleenen aan deze zienswijze. De bacteriën van de intermediaire stammen konden in lactosegistwater 60 g $KNO_2$ per 100 liter niet verwerken en stierven af. Voegden we aan het lactosegistwater 6,80 g $KH_2PO_4$ en 14,85 g $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ per liter toe, waardoor de bacteriën meer lactose konden omzetten, dan konden de bacteriën 100 g $KNO_2$ per 100 liter spoedig verwerken zonder eenige schadelijke invloed van het proces te ondervinden.

Dat nitriet pas giftig wordt als er bijna geen suiker meer wordt omgezet, blijkt nog duidelijker uit de volgende proef. We vulden

eerst een stopflesch met lactosegistwater en een met lactosegistwater, waaraan per 100 liter 85 g $KNO_2$ was toegevoegd. Beide flesschen waren voor het vullen voorzien van evenveel bacteriën van stam 4 (I 1). Met behulp van deze cultures, welke werden weggezet bij 30 °C, gingen we het verband na tusschen de suikerverwerking, de nitrietverwerking en de giftige invloed van de reductie. Tabel 58 geeft eenige resultaten weer.

TABEL 58

*Over het verband tusschen de giftige invloed van nitriet en de suikerstofwisseling I*

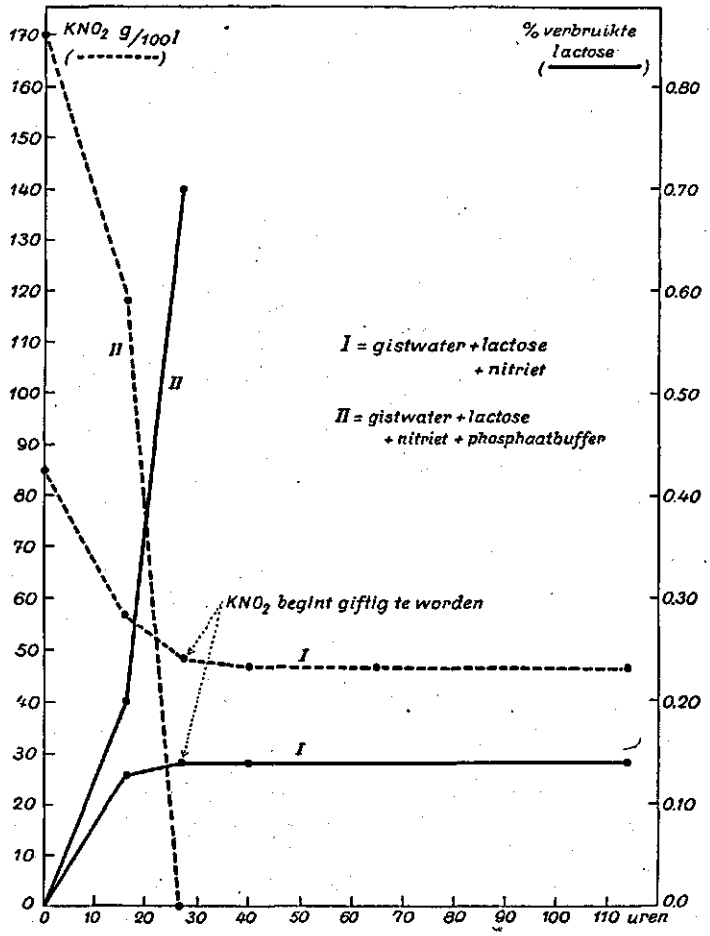
| Tijd | Lactosegistwater met $KNO_2$ | | Aantal bacteriën per cm³ | |
|---|---|---|---|---|
| | Suiker verwerkt | $KNO_2$ aanwezig | Lactosegistwater | Lactosegistwater met $KNO_2$ |
| na 0 uur | 0,00 % | 85,0 g/100 l | – | – |
| „ 16 „ | 0,13 % | 57,1 „ | 128.000.000 | 192.000.000 |
| „ 27 „ | 0,14 % | 48,5 „ | 2.400.000.000 | 1.200.000.000 |
| „ 40 „ | 0,14 % | 47,1 „ | 256.000.000 | 140.000 |
| „ 65 „ | – | 46,9 „ | 256.000.000 | < 400 |
| „ 114 „ | 0,14 % | 46,7 „ | 6.400.000 | < 2 |

Uit de resultaten van dit eerste deel van de proef, welke worden weergegeven door figuur 39, blijkt duidelijk, dat het nitriet, zoodra er niet veel suiker meer werd omgezet, giftig begon te worden. Bij het tweede deel van de proef voegden we aan het lactosegistwater 6,80 g $KH_2PO_4$ en 14,85 g $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ per liter toe. We vulden weer twee stopflesschen, welke weer van evenveel bacteriën van stam 4 waren voorzien, met deze cultuurvloeistof, waarbij we aan de tweede flesch 170 g $KNO_2$ per 100 liter toevoegden. De resultaten van het tweede deel van deze proef worden weergegeven door tabel 59 en figuur 39.

TABEL 59

*Over het verband tusschen de giftige werking van nitriet en de suikerstofwisseling, II*

| Tijd | Lactosegistwater met phosphaatbuffer en met $KNO_2$ | | Aantal bacteriën per cm³ | |
|---|---|---|---|---|
| | Suiker verwerkt | $KNO_2$ aanwezig | Lactosegistwater met phosphaatbuffer | Lactosegistwater met phosphaatbuffer en met $KNO_2$ |
| na 0 uur | 0,00 % | 170,0 g/100 l | – | – |
| „ 16 „ | 0,20 % | 118,3 „ | 1.300.000.000 | 1.300.000.000 |
| „ 27 „ | 0,70 % | 0,0 „ | 1.500.000.000 | 1.700.000.000 |




Figuur 39. Verband tusschen de suikerstofwisseling, de nitrietreductie en de giftige invloed van het reductieproces

Door de toevoeging van de phosphaatbuffer kon er meer suiker vergist worden en daardoor konden de bacteriën 170 g $KNO_2$ per 100 liter verwerken zonder er eenige schadelijke invloed van te ondervinden. Het nitriet zet dus niet door zijn giftige werking de suikerstofwisseling stop, maar de suikerstofwisseling vermindert na een bepaalde tijd door andere redenen en als gevolg daarvan begint het nitriet giftig te worden en sterven de bacteriën af.

Bovenstaande opvatting wil niet zeggen, dat er geen nitrietconcentraties bestaan, die ondanks de mogelijkheid van een actieve suikerstofwisseling toch giftig werken. $KNO_2$-toevoegingen van

300–400 g per 100 liter vertraagden van het begin af aan de groei van de bacteriën in lactosegistwater. Bij deze concentraties was het nitriet als zoodanig giftig.

Nu we gezien hebben, dat we met behulp van nitraat en nitriet de gasvorming uit lactose door coli-aërogenesbacteriën kunnen beletten, is de vraag, of alle coli-aërogenesbacteriën nitraat kunnen reduceeren, van belang. De meeste onderzoekers, die zich met de nitraatreductie door deze bacteriën hebben beziggehouden, geven aan, dat alle soorten nitraat kunnen reduceeren. Ook wij vonden dat al onze stammen daartoe in staat waren. WILSON (1935) is echter een andere meening toegedaan. Volgens hem kan van de coligroep maar 91 % nitraat reduceeren, van de intermediaire typen slechts 79 % en van de aërogenes-cloacaegroep 99 %. Daar deze getallen wel zeer sterk afwijken van de gangbare meening, zullen we zijn methode van onderzoek eens nader bekijken.

WILSON liet de bacteriën groeien in een voedingsvloeistof, waaraan 0,1 % nitraat was toegevoegd, hetgeen overeenkomt met 100 g per 100 liter. Nadat de cultures 5 dagen bij 37 °C hadden gestaan, reageerde hij op nitriet en als hij dan geen nitriet vond waren de bacteriën volgens hem niet in staat nitraat te reduceeren. Hij heeft er echter niet aan gedacht, dat het gevormde nitriet dan wel weer verdwenen kon zijn, daar hij te weinig nitraat toevoegde en te lang wachtte met het reageeren op nitriet. Zijn gegevens zijn dus hoogstwaarschijnlijk onjuist. Volgens zijn methode onderzocht zouden eenige stammen van ons (o.a. stam 11 (A 1), zie tabel 50) ook geen nitraat kunnen reduceeren. Wij voegden bij ons onderzoek ¼ % $KNO_3$ toe, een hoeveelheid die zeker niet verwerkt kon worden, en we reageerden na twee dagen op nitriet met het reagens van GRIESS-ROMIJN.

Nu we de resultaten van ons onderzoek vermeld hebben, kunnen we ook aangeven hoe WOJTKIEWICZ (1933) er toe kwam om zijn onjuiste verklaring over de werking van nitraat op te stellen. Dat er door toevoeging van veel nitraat of nitriet tenslotte in het geheel geen gas meer geproduceerd wordt is volkomen juist. Dit werd bij ons onderzoek ook gevonden (zie tabel 52, 54 en 56). Maar WOJTKIEWICZ maakte een fout toen hij beweerde, dat de gasvorming uit wei door los-positieve bacteriën alleen kon worden beïnvloed door zooveel nitraat of nitriet toe te voegen, dat dit de dood van de bacteriën veroorzaakte. En hierop baseerde hij zijn verklaring over de invloed van nitraat. De verdaging van het begin van de gasvorming door kleinere hoeveelheden en het feit, dat de bacteriën pas hinder ondervinden van het nitriet als er bijna geen suiker meer wordt vergist, ontgingen hem. Doordat hij ook nog een verkeerde

opvatting had over de eischen waaraan een bestrijdingsmiddel moet voldoen (hij stelde blijkbaar de voorwaarde dat de gasvorming voorgoed onmogelijk moet worden gemaakt), kwam hij er toe om te adviseeren de te verkazen melk te voorzien van een doodelijke dosis nitriet. Bij zijn proeven was dit 40 g per 100 liter, maar volgens onze onderzoekingen waren hiervoor hoeveelheden van 80–120 g noodig (zie tabel 54 en 56).

Afgaande op de hoeveelheid gas, die zijn twee stammen konden vormen uit wei (6,0 en 4,7 $cm^3$ per 20 $cm^3$ wei na 5 dagen bij 37 °C; zie onze getallen vermeld in tabel 12) kunnen we aannemen, dat geen van beide stammen in staat is vroeg-los te veroorzaken.

Voorts wees WOJTKIEWICZ erop, dat, terwijl de groei van de coli-aërogenesbacteriën in kaas voorgoed onmogelijk wordt gemaakt door 40 g $KNO_2$ te gebruiken per 100 liter melk (overigens onjuist, zie hoofdstuk VI), de melkzuurbacteriën er weinig hinder van ondervinden. Ten eerste wordt dit al weerlegd door zijn eigen gegevens, maar ook uit door ons ingestelde onderzoekingen bleek, dat de melkzuurstreptococcen wel degelijk hinder ondervinden van $KNO_2$. Tabel 60 laat eenige resultaten zien, waarbij we nog opmerken dat bij WOJTKIEWICZ de zuurvorming plaats vond in wei en bij ons in ondermelk.

TABEL 60

*Invloed van $KNO_2$ op de zuurvorming van melkzuurstreptococcen*

| Stam | Duur proef | Zuurheidsgraad in °THÖRNER na een toevoeging van | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 g $KNO_2$ per 100 liter | 10 g $KNO_2$ per 100 liter | 20 g $KNO_2$ per 100 liter | 40 g $KNO_2$ per 100 liter |
| Str. lactis Wojtkiewicz | 4 dagen | 48 | 38 | – | 26 |
| Str. lactis, S 2 . . . . | 17 uur | 60 | 54 | 46 | 42 |
| Str. lactis, S 3 . . . . | 17 uur | 75 | 67 | 59 | 54 |

We moeten er dus rekening mee houden, dat bij het gebruik van nitraat of nitriet bij de vroeg-losbestrijding in kaas het nitriet giftig is voor de melkzuurstreptococcen. $KNO_3$ had bij deze proeven geen invloed op de melkzuurgisting. In hoofdstuk VI beschrijven we de proeven met kaas, waarbij is nagegaan in hoeverre $KNO_3$ en $KNO_2$ bruikbaar zijn bij de bestrijding van vroeg-los.

## § 5. DE INVLOED VAN $KClO_3$ OP DE GASVORMING UIT LACTOSE DOOR COLI-AËROGENESBACTERIËN

Bij de oriënteerende lebgistingsproeven bleek al, dat dit middel een veel grootere invloed had op de gasvorming van de coli-aëro-

genesbacteriën dan nitraat en nitriet. Om deze invloed nader te bestudeeren vulden we gistingsfleschjes met $^1/_{20}$ cm³ van een bouilloncultuur van een los-positieve stam, 0,4 cm³ van een steriele $^1/_2$ % $KClO_3$-oplossing en verder met wei en dan zetten we ze weg bij 30 °C. Ter contrôle werd ook een reeks op dezelfde manier geënte en gevulde gistingsfleschjes ingezet, waaraan echter geen $KClO_3$ was toegevoegd. Tabel 61 laat eenige resultaten van dergelijke proeven zien.

TABEL 61

*Invloed van $KClO_3$ op de gasvorming uit wei door coli-aërogenesbacteriën*

| Stam | $KClO_3$ in g per 100 liter | cm³ gas gevormd na | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 16 uur | 21½ uur | 41 uur | 46 uur | 65 uur |
| 4 (I 1) | – | 7,4 | 16,2 | 74,0 | 87,0 | 130,0 |
| 4 (I 1) | 5 | 0,1 | 0,1 | 1,0 | 1,2 | 2,5 |
| 11 (A 1) | – | 3,5 | 8,0 | 45,5 | 54,0 | 81,0 |
| 11 (A 1) | 5 | 0,1 | 0,1 | 1,4 | 1,6 | 4,0 |
| 21 (I 1) | – | 1,8 | 5,0 | 14,5 | 15,5 | 21,0 |
| 21 (I 1) | 5 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,5 | 1,0 |
| 37 (I 2) | – | 2,6 | 7,0 | 17,5 | 19,0 | 23,5 |
| 37 (I 2) | 5 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,6 | 0,6 |

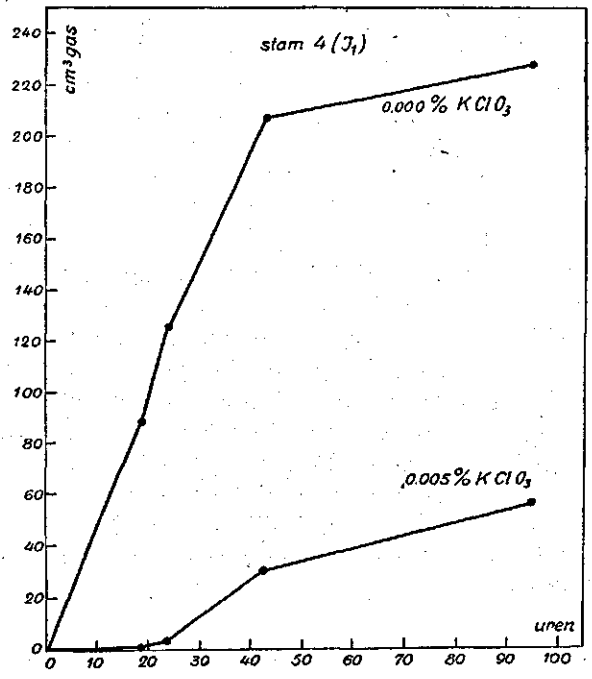
Door de toevoeging van maar 5 g $KClO_3$ per 100 liter werd er dus zeer weinig gas gevormd. Als we deze getallen vergelijken met die, verkregen bij de proeven met nitraat en nitriet, dan zien we, dat $KClO_3$ inderdaad veel meer invloed heeft. Gedurende de eerste tijd bevonden zich in de fleschjes, waaraan chloraat was toegevoegd, veel minder bacteriën dan in die waaraan deze stof niet was toegevoegd. Later werden deze verschillen minder en na 24 uur waren ze practisch niet meer aanwezig. Op dat moment begon er ook een zeer kleine gasproductie, welke echter bijna niet opviel.

Dat de coli-aërogenesbacteriën, na een toevoeging van 5 g chloraat, tenslotte toch weer gas gaan produceeren uit lactose konden we beter aantoonen met behulp van lactosegistwater, waaraan per liter 2,72 g $KH_2PO_4$ en 5,94 g $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ was toegevoegd, door welke toevoeging de vloeistof een pH van 6,9 kreeg. We namen gistingsfleschjes van 120 cm³, welke we eerst voorzagen van $^3/_{20}$ cm³ van een bouilloncultuur van de te onderzoeken stam en van 1,2 cm³ van een steriele $^1/_2$ % $KClO_3$-oplossing, en daarna vulden met bovengenoemde voedingsvloeistof. Ter contrôle werd ook een aantal op dezelfde manier geënte en gevulde fleschjes ingezet, waaraan echter geen chloraat was toegevoegd. Tabel 62 laat eenige resultaten zien.

TABEL 62 *Invloed van $KClO_3$ op de gasproductie door coli-aërogenesbacteriën uit lactosegistwater waaraan phosphaatbuffer was toegevoegd*

| Stam | $KClO_3$ in g per 100 liter | cm³ gas gevormd na: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 19 uur | 24 uur | 43 uur | 95 uur |
| 4 (I 1) | – | 89,0 | 126,0 | 207,0 | 227,0 |
| 4 (I 1) | 5 | 0,5 | 3,0 | 30,0 | 57,0 |
| 11 (A 1) | – | 10,0 | 20,0 | 140,0 | 220,0 |
| 11 (A 1) | 5 | 0,2 | 3,5 | 16,0 | 23,0 |

Uit de gegevens van deze tabel, welke nog gedeeltelijk worden weergegeven door figuur 40, blijkt duidelijk, dat de gasvorming tenslotte weer kan gaan beginnen. Een toevoeging van $KClO_3$ ver-




Figuur 40. Invloed van $KClO_3$ op de gasvorming door coli-aërogenesbacteriën uit lactosegistwater, waaraan phosphaatbuffer is toegevoegd

daagde dus in sterke mate de gasvorming der coli-aërogenesbacteriën. Ook bij deze laatste proeven vonden we weer dezelfde invloed van $KClO_3$ op het aantal bacteriën, hetgeen blijkt uit de gegevens vermeld in tabel 63.

TABEL 63

*Invloed van $KClO_3$ op de ontwikkeling van de coli-aërogenesbacteriën*

| Telling na | Aantal bacteriën per cm³ van stam 4 (I 1) | |
|---|---|---|
| | Zonder $KClO_3$ | Met 5 g $KClO_3$ per 100 liter |
| 0 uur | 600.000 | 600.000 |
| 5 „ | 60.000.000 | 6.000 |
| 14½ „ | 130.000.000 | 2.500 |
| 19 „ | 250.000.000 | 30.000.000 |
| 27 „ | 300.000.000 | 250.000.000 |

Hoe dit te verklaren? QUASTEL, STEPHENSON en WHETHAM (1925) vermelden, dat de coli-aërogenesbacteriën chloraat kunnen reduceeren tot chloriet, maar dat het gevormde chloriet door zijn giftige werking het proces stopzet. Bij de concentratie van 5 g per 100 liter gebeurt dit blijkbaar niet, want uit het beginnen van de gasvorming en uit de normale groei daarbij kunnen we besluiten, dat het chloriet verder wordt gereduceerd tot een niet-giftige, niet verder te reduceeren eindproduct, waarbij we wel moeten aannemen dat dit KCl is. Doordat we werkten met zeer kleine concentraties, nl. maar met 0,005 %, konden we echter de aard van de tusschenproducten en van het eindproduct niet nagaan.

Het $KClO_3$ treedt dus ook op als waterstofacceptor bij de suikervergisting en als zoodanig belemmert het dan de gasproductie. Doordat de bij de reductie gevormde tusschenproducten de bacteriegroei sterk tegengaan, wordt dit uitstel van het begin van de gasvorming nog veel langer gemaakt. Vandaar dat chloraat zoo veel beter helpt dan nitraat of nitriet. Dat het chloraat in deze concentratie niet giftig is voor de coli-aërogenesbacteriën, hetgeen we niet kunnen aantoonen daar de reductie een storende rol gaat spelen, kunnen we met groote waarschijnlijkheid concludeeren uit het feit, dat de melkzuurstreptococcen er ook geen hinder van ondervinden, hetgeen blijkt uit de gegevens van tabel 64.

TABEL 64

*Invloed van chloraat op de zuurvorming in ondermelk door melkzuurstreptococcen*

| Stam | $KClO_3$ | Zuurheidsgraad in °THÖRNER |
|---|---|---|
| S 2 (Str. lactis) | – | 54° na 21 uur bij 23 °C |
| S 2 (Str. lactis) | 5 g/100 l | 53° „ 21 „ „ 23 „ |
| S 3 (Str. lactis) | – | 68° „ 21 „ „ 23 „ |
| S 3 (Str. lactis) | 5 g/100 l | 67° „ 21 „ „ 23 „ |

In kaas zullen de melkzuurbacteriën dus geen hinder ondervinden van het $KClO_3$, maar daar we niet precies de aard en de hoeveelheid van de bij de $KClO_3$-reductie ontstaande tusschenproducten kennen, kunnen we op deze manier niet nagaan of deze bij de bestrijding van vroeg-los in kaas in ernstige mate de melkzuurgisting zullen belemmeren. Met behulp van de proeven met kaas, beschreven in hoofdstuk VI, hebben we dit wel kunnen bestudeeren. Bovendien zou het vooral bij deze kleine concentraties nog verschil kunnen geven of deze producten aan een cultuur van melkzuurstreptococcen worden toegevoegd of dat coli-aërogenesbacteriën ze in een dergelijke cultuur vormen.

Bij de bestudeering van de werking van $KClO_3$ hebben we alleen gebruik gemaakt van los-positieve stammen, waarbij ons bleek, dat al deze stammen chloraat konden reduceeren.

HOOFDSTUK VI

# DE BESTRIJDING VAN HET VROEG-LOS IN KAAS MET BEHULP VAN $KNO_3$, $KNO_2$ EN $KClO_3$

## § 1. DE WERKING VAN $KNO_3$

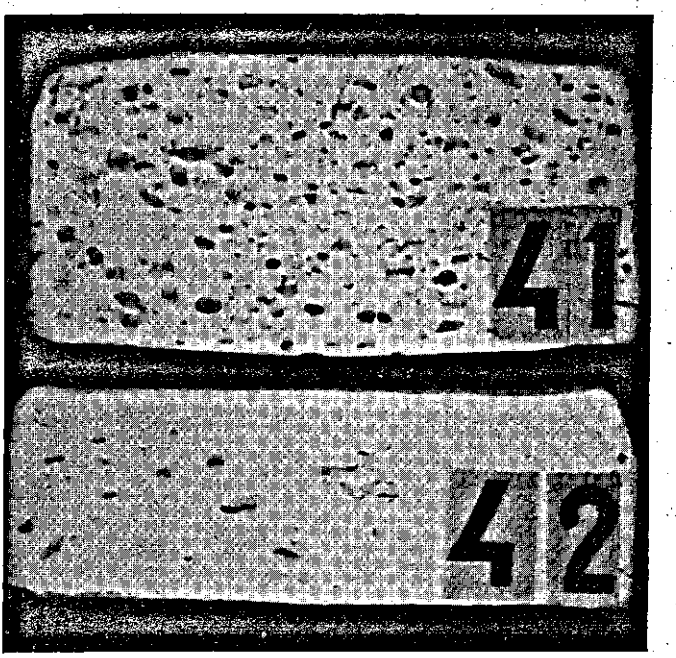
Vroeger hebben we gezien hoe $KNO_3$ in weicultures de gasvorming door coli-aërogenesbacteriën kon belemmeren, terwijl we nu in deze paragraaf beschrijven hoe $KNO_3$ zich gedraagt bij de bestrijding van vroeg-los in kaas. We maakten telkens twee kazen tegelijk, uit twee porties melk, waarbij we bij de een $KNO_3$ gebruikten en de andere als contrôle beschouwden. Het was natuurlijk noodig, dat beide porties melk evenveel bacteriën bevatten. 5 liter melk entten we met een ondermelkcultuur van de los-positieve stam, waarmee we de proef wilden uitvoeren. Evenals bij onze in hoofdstuk IV beschreven proeven plaatsten we dan de melk 1 uur bij 31 °C. Vlak voor het stremmen verdeelden we de 5 liter melk in twee porties van 2,5 liter. De methode van kaasmaken was gelijk aan die vroeger beschreven. Per 2,5 liter melk gebruikten we 7 $cm^3$ zuursel, hetwelk een reincultuur was van de reeds eerder genoemde Streptococcus lactis-stam S 3. [1]) Na het wei-aftappen voegden we 200 $cm^3$ water toe. Het $KNO_3$ werd bij het in strem zetten toegevoegd als een steriele 10 of 20 % $KNO_3$-oplossing. Tabel 65 geeft de resultaten weer van de eerste proef, waarbij we per 2,5 liter melk entten met 1 $cm^3$ van een ondermelkcultuur van stam 11, welke ongeveer 16 uur bij 37 °C gestaan had. Zoodoende waren er bij het in strem zetten ongeveer 1.000.000 aërogenesbacteriën per $cm^3$ melk aanwezig. Voor de wijze van beoordeeling en onderzoek van de kaas verwijzen we naar de eerste paragraaf van hoofdstuk IV.

De beide foto's worden weergegeven door figuur 41.

Het is dus inderdaad mogelijk met behulp van $KNO_3$ de vroeg beginnende gasvorming in kaas geheel tegen te gaan. We zien dat dit gebeurde zonder dat het $KNO_3$ een belangrijke invloed uitoefende op het aantal gistingsbacteriën. We kunnen aannemen, dat de verschillen wel grootendeels veroorzaakt werden door de wijze van tellen, waarbij we slechts met duplo's van elke verdunning werkten. Verder blijkt ook, dat we zooveel nitraat moesten toe-

---

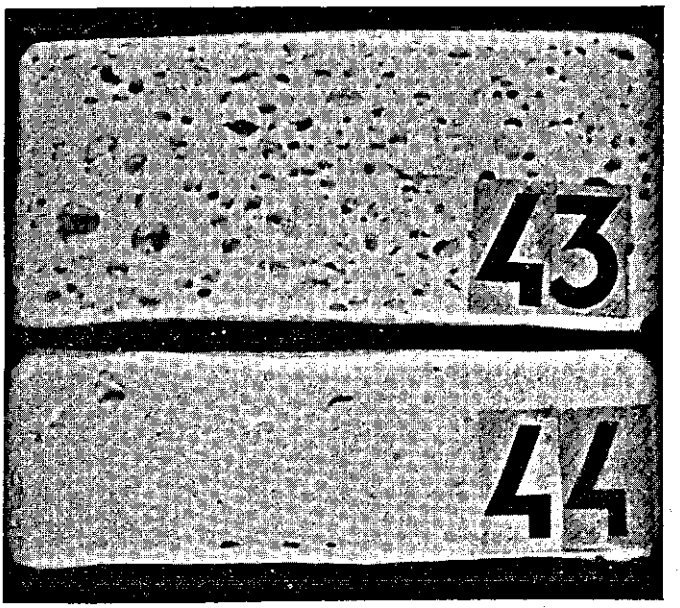
[1]) Zie tabel 60 op bladzijde 103.




Figuur 41. Bestrijding van vroeg-los met $KNO_3$

no 41. melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 11 (A 1) Los = 4

no 42. melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 11 (A 1) en voorzien van 100 g $KNO_3$ per 100 liter. Los = 0




Figuur 42. Bestrijding van vroeg-los met $KNO_3$

no 43. melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 21 (I 1). Los = 4

no 44. melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 21 (I 1). en voorzien van 80 g $KNO_3$ per 100 liter. Los = 0

TABEL 65 *Invloed van $KNO_3$ op de gasvorming in kaas*

| Kaas | Stam | Toegevoegd $KNO_3$ | Na 24 uur: | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Beoordeeling | $KNO_3$-reactie kaasvocht | pH | Vocht % | Aantal aerogenesbacteriën per gram | Foto no |
| 107 | 11 (A 1) | – | 4 | | 5,10 | 54,5 | 2.500.000 | |
| 108 | 11 (A 1) | 20 g/100 l | 4 | – | 5,15 | 52,9 | 60.000.000 | |
| 109 | 11 (A 1) | – | 4 | | 5,20 | 53,0 | 25.000.000 | |
| 110 | 11 (A 1) | 40 g/100 l | 3–4 | – | 5,15 | 52,9 | 60.000.000 | |
| 111 | 11 (A 1) | – | 4–5 | | 5,20 | 50,3 | 250.000.000 | |
| 112 | 11 (A 1) | 80 g/100 l | 3 | – | 5,30 | 52,7 | 2.500.000.000 | |
| 115 | 11 (A 1) | – | 4 | | 5,00 | 52,9 | 250.000.000 | 41 |
| 116 | 11 (A 1) | 100 g/100 l | 0 | + | 5,40 | 54,2 | 25.000.000 | 42 |

voegen, dat er gedurende de tijd dat de gistingsbacteriën suiker konden vergisten nitraat of nitriet aanwezig was. Als er na 24 uur nog nitriet in het kaasvocht aanwezig was, dan was de pH van deze kaas veel hooger dan die van een kaas bereid zonder toevoeging van nitraat. Was het nitriet reeds eerder verdwenen, dan had het geen, of bijna geen, invloed op de pH. De $KNO_3$-toevoeging had bijna geen invloed op het vochtgehalte.

De pH-verhooging werd veroorzaakt door een remming van de melkzuurgisting door het nitriet. Daar de melkzuurgisting hoofdzakelijk plaats heeft na de gisting door de los-positieve bacteriën, kan het nitriet, dat gedurende deze laatste gisting gereduceerd wordt, ook niet veel invloed uitoefenen op de melkzuurgisting. Daarom had de kaas, welke na 24 uur geen nitriet meer bevatte, een normale pH. Vroeger hebben we namelijk reeds aangetoond, dat er op chemische wijze niet veel nitriet kan verdwijnen bij deze pH-waarden.

De mogelijkheid bestond nog, dat de door de $KNO_3$-reductie gevormde basische stoffen invloed zouden kunnen uitoefenen op de pH van de kaas. Schematisch kunnen we de $KNO_3$-omzetting toch weergeven volgens de vergelijking:

$$KNO_3 \rightarrow NH_4OH \text{ of } NH_2 - R + KOH.$$

We kunnen echter berekenen, dat de gevormde basische lichamen niet veel invloed kunnen uitoefenen op de pH van de kaas.

Wanneer we 50 g $KNO_3$ per 100 liter melk toevoegen, ontstaat er een $^1/_2$ mol KOH en een $^1/_2$ mol van een $NH_3$-verbinding. In

100 liter melk komen echter ± 4500 grammen lactose voor, die 53 mol melkzuur leveren. [1])

Tabel 66 geeft resultaten weer van eenige proeven, waarbij we gebruik maakten van andere los-positieve stammen. Er werd weer met 1 $cm^3$ per 2,5 liter melk geënt.

TABEL 66 *Invloed van $KNO_3$ op de gasvorming in kaas*

| Proef | Kaas | Stam | Toegevoegd $KNO_3$ | Na 24 uur: | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Beoordeeling | $KNO_3$-reactie | pH | Vocht % | Aantal gistingsbacteriën per g | Foto no |
| 2 | 141 | 21 (I 1) | – | 5 | | 5,20 | | 250.000.000 | |
| | 142 | 21 (I 1) | 50 g/100 l | 3–4 | – | 5,20 | | 250.000.000 | |
| | 145 | 21 (I 1) | – | 4 | | 5,05 | | 60.000.000 | 43 |
| | 146 | 21 (I 1) | 80 g/100 l | 0 | + | 5,55 | | 10.000.000 | 44 |
| 3 | 121 | 37 (I 2) | – | 4 | | 5,15 | | 6.000.000 | |
| | 122 | 37 (I 2) | 25 g/100 l | 3 | – | 5,20 | | 2.500.000 | |
| | 117 | 37 (I 2) | – | 4 | | 5,10 | 53,9 | 6.000.000 | |
| | 118 | 37 (I 2) | 50 g/100 l | 0 | + | 5,35 | 53,9 | 25.000.000 | |
| 4 | 119 | 20 (I 1) | – | 3–4 | | 5,00 | 55,0 | 25.000.000 | |
| | 120 | 20 (I 1) | 30 g/100 l | 0 | + | 5,15 | 56,5 | 250.000.000 | |
| 5 | 123 | 39 (Cl) | – | 3–4 | | 5,10 | 52,2 | 60.000.000 | |
| | 124 | 39 (Cl) | 50 g/100 l | 0 | + | 5,45 | 54,1 | 13.000.000 | |
| 6 | 113 | 19 (A 1) | – | 3–4 | | 5,20 | 55,3 | 6.000.000 | |
| | 114 | 19 (A 1) | 100 g/100 l | 0 | + | 5,60 | 53,7 | 250.000 | |

Figuur 42 laat de beide foto's zien. De verkregen resultaten van deze vijf proeven komen volkomen overeen met die van de eerste proef, vermeld in tabel 65. Alleen in het geval van proef 6 zien we een vermindering van het aantal bacteriën door de nitraattoevoeging. Hier hadden we echter een groote overmaat nitraat toegevoegd, zoodat er veel nitriet was overgebleven. In het vorige hoofdstuk bleek, dat nitriet giftig begint te worden, zoodra de gistingsbacteriën geen suiker meer omzetten. Bij deze kaasjes werd er na 9 uur ongeveer geen suiker meer door de coli-aërogenesbacteriën vergist, zoodat het nitriet inderdaad kans had om daarna een daling van

[1]) Van deze lactose komt maar een klein deel in de kaas terecht, maar dat geldt in gelijke mate voor het nitraat.

het aantal bacteriën te veroorzaken. Zooals blijkt was deze meestal nog niet begonnen bij een normaal gebruik van $KNO_3$, waarbij er maar weinig nitriet overbleef.

De gegevens van tabel 67 laten ook nog eens duidelijk zien, dat het nitriet de eerste 9–10 uur geen invloed uitoefende op de melkzuurgisting, welke conclusie we ook reeds konden trekken uit de normale pH-waarden van kazen, waarbij we te weinig nitraat toevoegden, zoodat het nitriet reeds gedurende deze tijd gereduceerd werd door de coli-aërogenesbacteriën.

TABEL 67 *Invloed van nitraattoevoeging op de melkzuurgisting*

| Kaas | Stam | Toegevoegd $KNO_3$ | Na 24 uur: | | | | mg lactose per 10 g kaas na 9½ uur [1]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Beoordeeling | $KNO_2$-reactie | Lactose reactie | pH | |
| 115 | 11 (A 1) | – | 4 | | – | 5,00 | 60 |
| 116 | 11 (A 1) | 100 g/100 l | 0 | + | + | 5,40 | 62 |
| 117 | 37 (I 2) | – | 4 | | – | 5,10 | 70 |
| 118 | 37 (I 2) | 50 g/100 l | 0 | + | + | 5,35 | 77 |

De hoeveelheid nitriet, welke overblijft na de coli-aërogenesgisting, veroorzaakt echter wel een veel langzamere melkzuurgisting, hetgeen blijkt uit de veel hoogere pH en de positieve lactosereactie na 24 uur. Dat reeds kleine hoeveelheden nitriet voldoende zijn om de melkzuurgisting ernstig te hinderen, blijkt uit de gegevens vermeld in tabel 68, bij welke proeven we de melk niet geënt hebben met coli-aërogenesbacteriën, maar wel voorzien hebben van een bepaalde hoeveelheid $KNO_2$.

TABEL 68 *Invloed van $KNO_2$ op de melkzuurgisting*

| Kaas | Toegevoegd $KNO_2$ | Na 24 uur | | mg lactose per 10 g kaas na 8½ uur [1]) |
|---|---|---|---|---|
| | | pH | lactosereactie | |
| 139 | – | 5,35 | – | |
| 140 | 5 g/100 l | 5,65 | + | |
| 135 | – | 5,30 | – | |
| 136 | 10 g/100 l | 5,75 | + | |
| 131 | – | 5,30 | – | 154 |
| 132 | 20 g/100 l | 5,80 | + | 164 |

[1]) In het begin is ongeveer 200 mg aanwezig.

Bij de proeven, waarvan de resultaten vermeld worden in de tabellen 65 en 66, was de melk met veel los-positieve bacteriën geënt, namelijk met 1 cm³ cultuur per 2,5 liter. Reeds eerder zagen we, dat binnen bepaalde grenzen de mate van vroeg-los tamelijk onafhankelijk was van de grootte van de enting (zie tabel 37). Bij de proeven met nitraat bleek eveneens, dat bij een enting, die tien maal zoo klein was, er toch veel meer dan het tiende gedeelte van het nitraat, dat bij de tien maal grootere voldoende was, toegevoegd moest worden. Tabel 69 laat eenige resultaten zien van dergelijke proeven.

TABEL 69

*Over het verband tusschen de enting van de melk en de hoeveelheid nitraat, voldoende om het vroeg-los tegen te gaan*

| Kaas | Stam | Geënt per 2,5 l met | Toegevoegd $KNO_3$ | Na 24 uur: | | | | Bij een enting met 1 cm³ was voldoende [1]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Beoordeeling | $KNO_2$-reactie | pH | Aantal gistingsbacteriën per g | |
| 127 | 11 (A 1) | 0,1 cm³ | – | 4 | | 5,10 | 2.500.000 | |
| 128 | 11 (A 1) | 0,1 cm³ | 10 g/100 l | 3 | – | 5,05 | 60.000.000 | 100 g/100 l |
| 129 | 11 (A 1) | 0,1 cm³ | – | 3–4 | | 5,10 | 2.500.000 | |
| 130 | 11 (A 1) | 0,1 cm³ | 20 g/100 l | 0 | – | 5,10 | 2.500.000 | 100 g/100 l |
| 151 | 21 (I 1) | 0,1 cm³ | – | 5 | | 5,10 | 250.000.000 | |
| 152 | 21 (I 1) | 0,1 cm³ | 20 g/100 l | 4 | – | 5,10 | 250.000.000 | 80 g/100 l |
| 137 | 37 (I 2) | 0,1 cm³ | – | 4 | | 5,10 | – | |
| 138 | 37 (I 2) | 0,1 cm³ | 20 g/100 l | 3–4 | – | 5,10 | – | 50 g/100 l |

Bij kaas no 130 was aan de melk de ideale hoeveelheid $KNO_3$ toegevoegd. De los-positieve bacteriën hebben toen, gelijk met de laatste hoeveelheid suiker die zij konden verwerken, ook de laatste hoeveelheid nitriet gereduceerd, zoodat er geen nitriet overbleef. Hierdoor is er ook geen pH-verhooging ontstaan.

Om bij het kaasmaken een eenigszins behoorlijke infectie van de melk met los-positieve bacteriën onschadelijk te kunnen maken moet er ongeveer 20–40 g $KNO_3$ per 100 liter gebruikt worden. Deze hoeveelheden komen overeen met die, welke ook in de litteratuur worden aangeraden. SCHLAG (1930) geeft aan, dat men 30–50 g $KNO_3$ per 100 liter moet gebruiken, maar MERGNER (1933) vindt 20–30 g reeds voldoende. Het zal natuurlijk ook veel afhangen van

[1]) Zie tabel 65 en 66 en figuur 41 en 42.

de omstandigheden, waaronder men kaas maakt. Er zijn echter aan het gebruik van nitraat vele nadeelen verbonden. Het bleek, dat we hiermede het vroeg-los kunnen tegengaan, maar daar de coliaërogenesbacteriën ongehinderd kunnen doorgroeien, kunnen we met dit middel niets doen tegen de door deze bacteriën veroorzaakte gistingssmaak. Daar we de grootte van de infectie niet kennen, zal er in de meeste gevallen nitriet overblijven, welke stof reeds in zeer kleine hoeveelheden in ernstige mate de melkzuurvorming belemmert, zoodat de kazen een te hooge pH krijgen. HÜTTIG (1933) en HAGLUND, SANDBERG en BARTHEL (1933) wezen ook reeds op de pH-verhoogende werking van nitraattoevoegingen.

Behalve dat het resteerende nitriet remmend op de melkzuurgisting werkt, kan het in kaas ook aanleiding geven tot verkleuringen. Zijn er geen gistingsbacteriën aanwezig, waardoor er dus in de kaas nitraat overblijft, dan kunnen deze verkleuringen aan de buitenkant van de kaas evengoed optreden, doordat tijdens het bewaren het nitraat gereduceerd wordt tot nitriet door zich op de korst bevindende bacteriën. Zoo ontstaan dan de zoogenaamde salpeterranden (BOEKHOUT, VAN DAM en VAN BEYNUM (1926)). Het nitriet reageert met bepaalde bestanddeelen van het eiwit, waardoor er gekleurde producten ontstaan. In het VIIe Zuiveljaarboek geven de schrijvers aan, dat er, bij een gebruik van meer dan 30 g $KNO_3$ per 100 liter melk, kans is op de vorming van salpeterranden.

Uitgaande van de hoeveelheden nitraat, welke bij deze proeven noodig waren om het vroeg-los tegen te gaan, konden we bepalen hoeveel suiker de los-positieve bacteriën in onze kaasjes konden vergisten: We vergeleken de hoeveelheden nitraat met die welke we gebruikten bij de weicultures. Daar we met behulp van suikerbepalingen hadden nagegaan hoeveel lactose onze stammen in een bepaalde tijd in wei konden vergisten, konden we berekenen, dat de los-positieve bacteriën van de ongeveer 3,9 % suiker in het kaasvocht 0,2–0,3 % vergisten onder de bij onze proeven heerschende omstandigheden.

## § 2. DE WERKING VAN $KNO_2$

Geleid door zijn verkeerde opvatting over de werking van $KNO_3$, stelde WOJTKIEWICZ (1933) het gebruik van $KNO_2$ voor. Een vervanging van $KNO_3$ door $KNO_2$ heeft echter geen zin, daar beide middelen op dezelfde manier werkzaam zijn en het nitraat meer waterstof kan accepteeren dan het nitriet.

Aan het gebruik van nitriet zijn zoo mogelijk nog grootere nadeelen verbonden daar er, bij een overschatting van de infectie met

gistingsbacteriën, veel nitriet overblijft, waarvan de nadeelige werking ons uit de vorige paragraaf reeds bekend is. We hebben echter toch eenige malen proeven genomen met $KNO_2$ om aan te toonen, dat men ook met dit middel vroeg-los in kaas kan bestrijden zonder de ontwikkeling van de coli-aërogenesbacteriën te schaden. De proeven werden op dezelfde manier uitgevoerd als die beschreven in de vorige paragraaf. De melk werd geënt met 1 $cm^3$ cultuur per 2,5 liter. De resultaten van deze proeven worden weergegeven door tabel 70 en gedeeltelijk ook nog door figuur 43.

TABEL 70 *Invloed van $KNO_2$ op de gasontwikkeling in kaas*

| Proef | Kaas | Stam | Toegevoegd $KNO_2$ | Na 24 uur: | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Beoordeeling | pH | $KNO_2$-reactie | Aantal gistingsbacteriën per g | Foto no |
| 1 | 143 | 21 (I 1) | – | 4 | 5,10 | | | |
| | 144 | 21 (I 1) | 50 g/100 l | 3 | 5,10 | – | | |
| | 147 | 21 (I 1) | – | 4 | 5,05 | | 60.000.000 | 45 |
| | 148 | 21 (I 1) | 80 g/100 l | 0 | 5,55 | + | 10.000.000 | 46 |
| 2 | 149 | 37 (I 2) | – | 4 | 5,05 | | 60.000.000 | |
| | 150 | 37 (I 2) | 50 g/100 l | 0 | 5,50 | + | 60.000.000 | |

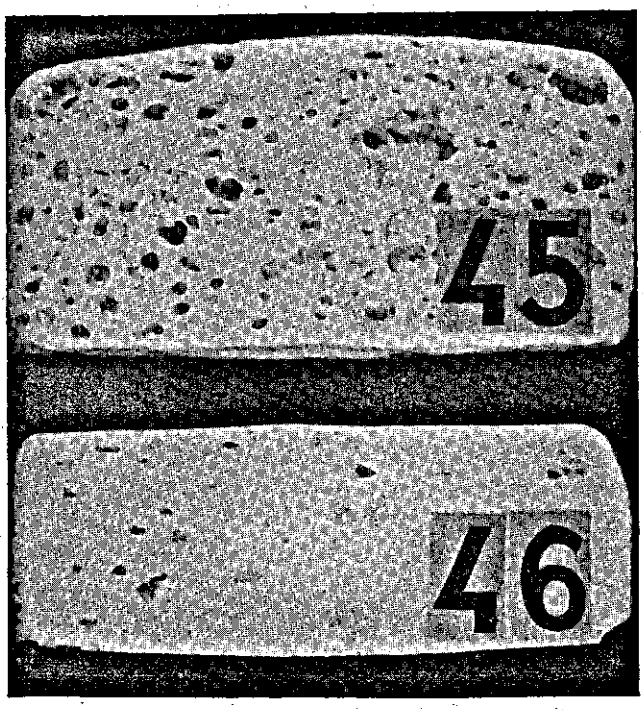
We zien dat de hoeveelheid nitriet, die door de gistingsbacteriën kon worden gereduceerd, niet remmend werkte op de melkzuurgisting. De overmaat nitriet veroorzaakte echter wel een flinke pH-verhooging. Wat het tegengaan van vroeg-los betreft, werkt nitriet op volkomen dezelfde manier als nitraat, hetgeen op grond van de proeven beschreven in het vorige hoofdstuk ook te verwachten was.

## § 3. DE WERKING VAN $KClO_3$

Op dezelfde wijze als die beschreven in de vorige paragrafen, hebben we ook de werking van $KClO_3$ bestudeerd. Alleen namen we veel kleinere hoeveelheden, daar bij de oriënteerende proeven bleek, dat chloraat veel meer invloed uitoefende op de gasvorming dan nitraat of nitriet. Het chloraat werd bij het in strem zetten toegevoegd als een steriele $^1/_2$ % $KClO_3$-oplossing. Tabel 71 geeft de verkregen resultaten weer. We entten met 1 $cm^3$ cultuur per 2,5 liter melk.

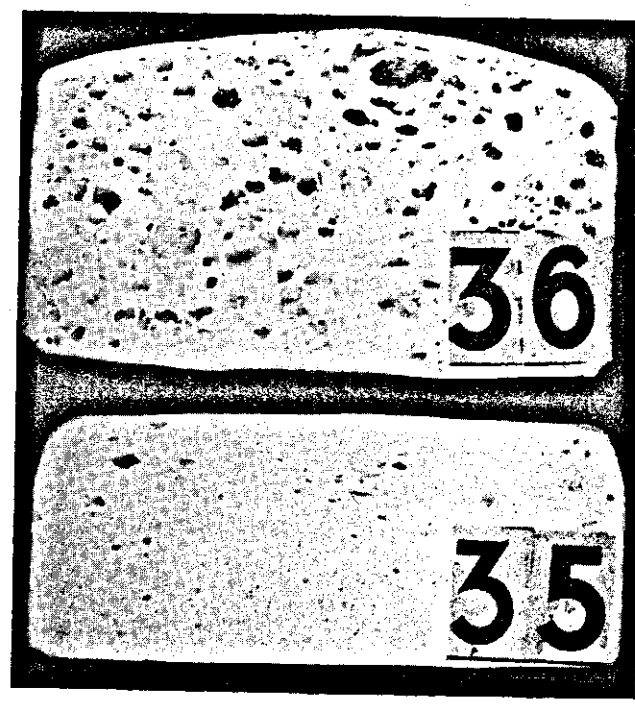
De figuren 44 en 45 geven de gemaakte foto's weer.

Bij deze infectie kunnen we met 2 g $KClO_3$ per 100 liter melk het vroeg-los geheel tegengaan, waarbij ook de ontwikkeling van de




Figuur 43. Bestrijding van vroeg-los met $KNO_2$

no 45. melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 21 (I 1). Los = 4
no 46. melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 21 (I 1) en voorzien van 80 g $KNO_2$ per 100 liter. Los = 0

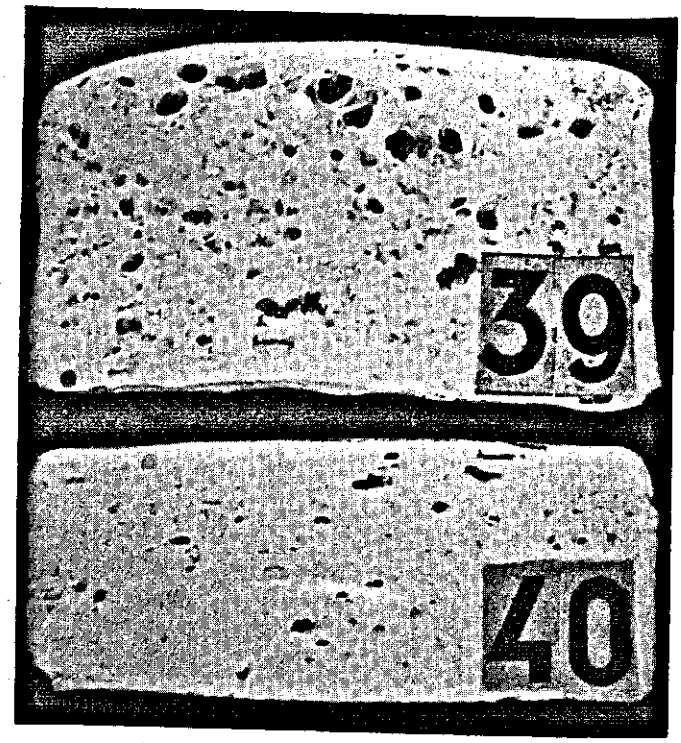



Figuur 44

Bestrijding van vroeg-los met $KClO_3$

no 36 melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 4 (I 1) Los = 4

no 35 melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 4 (I 1) en voorzien van 2 g $KClO_3$ per 100 liter. Los = 0




Figuur 45

Bestrijding van vroeg-los met $KClO_3$

no 39 melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 11 (A 1). Los = 4

no 40 melk geënt met 1 $cm^3$ cultuur van stam 11 (A 1) en voorzien van 2 g $KClO_3$ per 100 liter. Los = 0

TABEL 71 *Invloed van $KClO_3$ op de gasvorming in kaas*

| Kaas | Stam | Toegevoegd $KClO_3$ | Na 24 uur: Beoordeeling | pH | Vocht % | Aantal gistingsbacteriën per g | Foto no | mg lactose per 10 g kaas [1]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 87 | 37 (I 2) | – | 4 | 5,30 | 51,5 | 60.000.000 | | 82,0 na 10 uur |
| 88 | 37 (I 2) | ½ g/100 l | 1–2 | 5,25 | 50,4 | 2.500.000 | | 81,0 „ 10 „ |
| 89 | 39 (Cl) | – | 4 | 5,40 | 54,5 | 600.000.000 | | 113,8 na 9 uur |
| 90 | 39 (Cl) | 1 g/100 l | 1 | 5,45 | 52,4 | 250.000 | | 102,6 „ 9 „ |
| 91 | 21 (I 1) | – | 4 | 5,40 | 50,8 | 60.000.000 | | 81,2 na 9½ uur |
| 92 | 21 (I 1) | 1 g/100 l | 1 | 5,45 | 53,1 | 130.000 | | 86,7 „ 9½ „ |
| 93 | 11 (A 1) | – | 5 | 5,45 | 51,1 | 2.500.000.000 | | – |
| 94 | 11 (A 1) | 1½ g/100 l | 1–2 | 5,45 | 49,0 | 25.000.000 | | – |
| 81 | 11 (A 1) | – | 4 | 5,20 | 50,9 | 600.000.000 | | 96,0 na 10 uur |
| 82 | 11 (A 1) | 2 g/100 l | 0 | 5,15 | 50,4 | 6.000 | | 108,0 „ 10 „ |
| 85 | 4 (I 1) | – | 4 | 5,05 | 53,2 | 250.000.000 | 36 | – |
| 86 | 4 (I 1) | 2 g/100 l | 0 | 5,05 | 50,4 | 6.000 | 35 | – |
| 97 | 20 (I 1) | – | 4 | 5,35 | 52,1 | 250.000.000 | | 90,9 na 9½ uur |
| 98 | 20 (I 1) | 2 g/100 l | 0 | 5,35 | 51,8 | 60.000 | | 85,4 „ 9½ „ |
| 99 | 19 (A 1) | – | 4 | 5,25 | 51,3 | 60.000.000 | | 69,8 na 9 uur |
| 100 | 19 (A 1) | 2 g/100 l | 0 | 5,20 | 51,7 | 2.500 | | 69,8 „ 9 „ |
| 101 | 5 (I 1) | – | 4 | 5,30 | 50,9 | 25.000.000 | | 71,2 na 9½ uur |
| 102 | 5 (I 1) | 2 g/100 l | 0 | 5,30 | 50,8 | 6.000 | | 73,9 „ 9½ „ |
| 103 | 11 (A 1) | – | 4 | 5,30 | 52,0 | 250.000.000 | 39 | – |
| 104 | 11 (A 1) | 2 g/100 l | 0 | 5,25 | 52,8 | 2.500 | 40 | – |

gistingsbacteriën in sterke mate belemmerd wordt. Door de $KClO_3$-reductie, welke zoo giftig is voor de coli-aërogenesbacteriën, werden de melkzuurbacteriën niet gehinderd, hetgeen we kunnen zien aan de pH-waarden en de resultaten van de lactosebepalingen. Ook is er geen invloed op het vochtgehalte waar te nemen. De eventueele verschillen zijn hier toevallig. Doordat de bij de $KClO_3$-reductie ontstaande tusschenproducten zoo giftig zijn voor de coli-aërogenesbacteriën, kunnen we met dit middel, behalve het vroeg-los, ook de

[1]) In het begin is ongeveer 200 mg lactose aanwezig.

door deze bacteriën veroorzaakte gistingssmaak bestrijden.

Werd er aan de te verkazen melk te weinig $KClO_3$ toegevoegd, dan zagen we, dat de kazen weer meer gistingsbacteriën bevatten en dat daardoor ook een geringe gasontwikkeling had plaats gehad. Het $KClO_3$ werd dus ook in de kaas gereduceerd tot een niet-giftig eindproduct.

In het litteratuuroverzicht op bladzijde 73 werd er op gewezen dat HÜTTIG (1933) reeds enkele proeven had genomen met $KClO_3$. Hij bestudeerde echter niet de wijze, waarop chloraat invloed uitoefent op de gasvorming van de los-positieve bacteriën. Daardoor ontdekte hij ook niet, dat van dit middel veel minder behoeft te worden gebruikt dan van nitraat. Hij constateerde slechts, dat met 50 g $KClO_3$ per 100 liter het vroeg-los volkomen kon worden bestreden.

## § 4. WELK MIDDEL IS NU HET MEEST AAN TE RADEN?

Uit de proeven beschreven in de vorige paragrafen bleek, dat met nitraat, nitriet en chloraat het vroeg-los kan worden bestreden. Echter zagen we ook, dat aan het gebruik van nitraat en nitriet vele nadeelen verbonden zijn en dat we met deze middelen de door de coli-aërogenesbacteriën veroorzaakte gistingssmaak niet konden tegengaan. Voor zoover we konden nagaan zijn aan het chloraatgebruik geen nadeelen verbonden. Het blijft mogelijk dat het nog invloed op de rijping van de kaas zal uitoefenen, alhoewel we dit niet waarschijnlijk achten, daar de melkzuurgisting ook geen hinder ondervindt van de chloraatreductie. Om in de practijk het vroeg-los tegen te gaan kunnen we het gebruik van chloraat ten volle aanbevelen. Waarschijnlijk zal dan met een toevoeging van 1 g $KClO_3$ per 100 liter melk kunnen worden volstaan. Volgens het Kaasbesluit is het echter verboden om een andere stof dan nitraat te gebruiken. Het zou in hooge mate wenschelijk zijn, dat proeven in het groot met kaliumchloraat werden genomen om de uitwerking van deze toevoeging in het bedrijf te kunnen bestudeeren. Wij kunnen de resultaten van deze proeven met vertrouwen tegemoet zien en betwijfelen niet, dat een herziening van het Kaasbesluit het gebruik van deze stof als voorbehoedmiddel tegen vroeg-los spoedig mogelijk zal maken.

## SAMENVATTING

Bij ons onderzoek over de vroeg beginnende gasvorming in kaas, door ons vroeg-los genoemd, hebben we ons beperkt tot een bestudeering van de werkzaamheid van de coli-aërogenesbacteriën, daar het vroeg-los in de meeste gevallen door deze bacteriën wordt veroorzaakt. Verschillende typen dezer bacteriën werden door ons geïsoleerd en met behulp van een lebgistingsproef bleek, dat de colitypen en sommige intermediaire typen, ofschoon wel in staat lactose te vergisten onder zuur- en gasvorming, onder de bij deze proef heerschende omstandigheden geen gas konden vormen. Dezelfde typen waren ook niet in staat veel gas uit wei te vormen. Met behulp van een lebgistingsproef met synthetische ondermelk, welke geen citroenzuur bevatte, konden we aantoonen dat het citroenzuur in de melk de bovengenoemde typen belet om gas te vormen bij de genoemde lebgistingsproef. De typen die geen gas produceeren konden zelfs de gasvorming door de andere typen verhinderen. Met behulp van de lebgistingsproef hebben we onze stammen onderverdeeld in los-positieve en los-negatieve. Met eenvoudige gistingsproeven met lactosegistwater konden we aantoonen, dat citroenzuurtoevoeging bij de los-negatieve typen de gasvorming uit lactose onderdrukt. Na het verdwijnen van het zuur kan er weer gas gevormd worden. Het citroenzuur treedt bij de suikervergisting op als waterstofacceptor en gaat daarbij, waarschijnlijk via oxaalazijnzuur, appelzuur en fumaarzuur, over in barnsteenzuur. Hierdoor zetten de los-negatieve typen de suiker anders om, waardoor er geen gas gevormd wordt. Het citroenzuur wordt door de los-positieve typen niet gebruikt om met behulp hiervan de suiker zonder een noemenswaardige gasproductie te vergisten. Toevoeging van dit zuur vergroot juist de gasproductie van de los-positieve bacteriën uit lactose, daar ze na eenige tijd ook het citroenzuur vergisten onder de vorming van gas.

Wordt er veel citroenzuur toegevoegd dan gebruiken de los-negatieve bacteriën waarschijnlijk niet al het zuur om de lactose zonder gasvorming om te zetten, maar vergisten ze ook een deel ervan, waardoor de gasproductie weer toeneemt. Dit kon aannemelijk worden gemaakt door te wijzen op het verschijnsel, dat bij een citroenzuurtoevoeging van 0,05 % aan lactosegistwatercultures van los-negatieve stammen het begin van de gasvorming ongeveer even lang werd uitgesteld als bij een toevoeging van 0,20 % en dat de

weer beginnende gasproductie door deze typen uit lactosegistwater soms bij een toevoeging van 0,20 % grooter was dan die bij een toevoeging van 0,10 %. Bovendien konden colibacteriën, die eenige tijd gegroeid waren in een vloeistof welke lactose en citroenzuur bevatte, bijvoorbeeld wei, zich daarna ontwikkelen in de citraatvloeistof van KOSER.

Bij proeven met kaas bleek, dat de typen die bij de lebgistingsproef geen los konden veroorzaken, daartoe ook niet in staat waren in kaas. Het vroeg-los in kaas kan dus als regel alleen veroorzaakt worden door de aërogenes-cloacaetypen en door sommige intermediaire typen. We vonden ook, dat het vroeg-los, veroorzaakt door de los-positieve typen, minder werd door een medeaanwezigheid van los-negatieve bacteriën. In kaas bleven de los-negatieve bacteriën echter veel langer in leven dan de andere. We konden aannemelijk maken, dat het citroenzuur bij deze proeven met kaas dezelfde invloed uitoefende als bij de proeven met vloeistofcultures.

Met behulp van lebgistingsproeven konden we aantoonen, dat $KNO_3$, $KNO_2$ en $KClO_3$ de gasvorming door de los-positieve typen belemmeren, terwijl $KBrO_3$ en $K_2S_2O_8$ geen invloed hierop uitoefenen. Met behulp van gistingsproeven in wei hebben we nader de manier bestudeerd, waarop deze stoffen invloed uitoefenen op de gasproductie. Kaliumnitraat bleek de gasvorming tegen te kunnen houden, waarbij deze stof werd gereduceerd, eerst tot nitriet, later tot hydroxylamine. Zoolang de bacteriën in de cultuurvloeistof suiker omzetten, verbindt het hydroxylamine zich met de daarbij gevormde ketozuren tot oximinozuren, welke verbindingen, na een reductie tot aminozuren, worden gebruikt bij de assimilatie. Heeft er geen assimilatie meer plaats, dan wordt de rest van het hydroxylamine verder gereduceerd tot $NH_4OH$. Gedurende dit laatste proces sterven de bacteriën, die van al de overige reducties en reacties geen last ondervinden, af. Door deze reducties, waarvoor de waterstof van de suikerdissimilatie gebruikt wordt, wordt het de bacteriën onmogelijk gemaakt veel gas uit de suiker te vormen. $KNO_2$ werkt op dezelfde manier als $KNO_3$. $KClO_3$ bleek de gasvorming van de los-positieve typen veel beter te kunnen belemmeren. Het $KClO_3$ wordt daarbij waarschijnlijk gereduceerd tot KCl. Behalve door zijn werking als waterstofacceptor, houdt het $KClO_3$ de gasvorming ook nog tegen, doordat er bij de reductie tusschenproducten ontstaan die de bacterie-ontwikkeling belemmeren. Als deze reducties afgeloopen zijn kan de gasvorming beginnen. Met behulp van deze drie stoffen konden we het vroeg-los in kaas tegengaan. We moesten zooveel nitraat, nitriet en chloraat toevoegen, dat de gasvorming door de los-positieve gistingsbacteriën door de plaats hebbende

reductieprocessen werd uitgesteld tot het moment, dat de gasvorming door de melkzuurbacteriën voldoende onderdrukt kon worden. 2 g $KClO_3$ had daarbij dezelfde uitwerking als 50–80 g $KNO_3$ of $KNO_2$. Bij het gebruik van $KNO_3$ en $KNO_2$ deden zich nog ongewenschte pH-verhoogingen voor, doordat het nitriet in ernstige mate de melkzuurgisting belemmerde. Doordat de ontwikkeling van de coli-aërogenesbacteriën in kaas niet werd geschaad door de $KNO_3$- en $KNO_2$-toevoegingen, konden we met deze middelen echter niet de door de coli-aërogenesbacteriën veroorzaakte gistingssmaak bestrijden. Voor zoover we konden nagaan waren aan het gebruik van $KClO_3$ geen nadeelen verbonden en daar de bij de $KClO_3$-reductie ontstaande verbindingen zeer giftig zijn voor de coli-aërogenesbacteriën, konden we met dit middel wel de gistingssmaak bestrijden. De melkzuurgisting ondervindt echter geen hinder van deze reductie. We raden dan ook $KClO_3$ aan voor de vroeg-losbestrijding in kaas en voor de practijk zal een toevoeging van 1 g per 100 liter melk wel voldoende zijn om onder alle omstandigheden het vroeg-los tegen te gaan. Het is te hopen, dat een uitgebreide proefneming in de practijk zal kunnen worden genomen om dit resultaat te bevestigen.

## SUMMARY

In our investigation on the early production of gas in cheese, indicated by us as „blowing", we have limited ourselves to a study of the action of coli-aerogenes bacteria, as the phenomenon of blowing in early stages in most cases is caused by this group of bacteria. We have isolated a great many of these strains and in a combined fermentation and curdling test in milk it appeared that the colitypes and some intermediate types, although able to ferment lactose with the production of acid and gas, under the conditions of this experiment did not produce any gas. Neither were they able to produce a considerable amount of gas from whey. By means of the same test in synthetic skim milk, which did not contain any citric acid, we could prove that it is this acid in milk which prevents the latter types from producing gas in the above test. The types which do not produce any gas could even prevent the production of gas by the other types. By means of this test we have subdivided our strains in blowing-positive and blowing-negative ones. A simple fermentation test in yeastwater-lactose proved that a supply of citric acid prevents the production of gas from lactose by the blowing-negative types. After the acid has disappeared gas is again

produced. The citric acid evidently acts as a hydrogen acceptor and, presumably via oxalic, malic and fumaric acids, is reduced to succinic acid. As a result the blowing-negative types decompose the sugar present in such a way, that no gas is produced. The blowing-positive types, however, do not use citric acid in a similar manner. On the contrary the addition of this acid increases the gas production from lactose by these types, for, shortly after the beginning of the fermentation, they take to ferment the citric acid as well, giving an additional gas production.

When this acid has been given in abundance, the blowing-negative bacteria do not use all of it in changeing the decomposition of the lactose, but they also will take to ferment part of it, so that an increase in gas production occurs. This conclusion was drawn from the fact that, testing these strains in yeastwater-lactose with 0,05 % citric acid, the beginning of gas production was postponed for about the same lapse of time as when 0,20 % was given, and that the gas production was sometimes higher with 0,20 % than with 0,10 %. Moreover colibacteria which had developed for some time in a liquid containing lactose and citrate, such as whey, were able to grow in Koser's citrate solution.

In experiments with cheese it appeared that the types which could not induce the phenomenon of blowing in the fermentation-curdling test, neither could do so in cheese. Thus the blowing in cheese can as a rule be merely caused by the aerogenes-cloacae types and by some intermediate ones. Moreover we found that the blowing caused by blowing-positive types decreased when negative strains were also present. In cheese the blowing-negative types kept alive much longer than the others. We could furnish evidence that the citric acid in these cheese tests acted in the same way as in the experiments with liquid cultures.

By means of fermentation tests we could ascertain that $KNO_3$, $KNO_2$ and $KClO_3$ prevent gas production by blowing-positive types, whilst $KBrO_3$ and $K_2S_2O_8$ do not. By these tests we have studied more closely the way in which these substances inhibit gas formation. $KNO_3$ appeared to be reduced, first to nitrite, subsequently to hydroxylamine. As long as the bacteria convert sugar in the culture solution, this hydroxylamine combines with keto-acids, produced in this decomposition, forming oximinoacids. The latter compounds, after a reduction to aminoacids, are assimilated. When no further decomposition occurs, the remaining hydroxylamine is reduced to ammonia. During the latter process the bacteria, which are not damaged by previous reduction processes, die off. These processes, in which hydrogen from sugar dissimilation is used, render

it impossible for the bacteria to produce much gas from sugar. $KNO_2$ acts in the same way as does $KNO_3$. $KClO_3$ however, appeared to prevent gas production by the blowing-positive types much more efficiently, thereby being reduced, probably to KCl. Safe by its action as a hydrogen acceptor, $KClO_3$ also inhibited gas production because, along with the reduction, intermediate products occur, which prevent the development of bacteria. As soon as these reduction processes have come to a close the production of gas starts.

By means of adding these salts to the milk we could check the blowing phenomenon in the cheese made therefrom. We had to add nitrate, nitrite or chlorate in such amounts that the gas production from lactose was put off by the occurring reduction processes untill the moment in which gas production could be sufficiently checked by the lactic acid bacteria. 2 g of $KClO_3$ added to 100 l of milk acted as strongly as 50–80 g $KNO_3$ or $KNO_2$. When the latter substances had been supplied an unfavourable increase in pH occurred, as the nitrite strongly impedes the lactic acid fermentation. As the development of the coli-aerogenes bacteria in cheese was not hampered by the supply of $KNO_3$ or $KNO_2$ we could not by these means combat the fermentation taste caused by these bacteria. As far as we could ascertain, the use of $KClO_3$ does not cause any harm and as the compounds which are formed during the reduction of $KClO_3$ are very toxic to coli-aerogenes bacteria, we could successfully prevent the fermentation taste by means of this salt. The lactic acid fermentation, however, was not impeded by this reduction. We can recommend $KClO_3$ as a successful means of preventing the blowing of cheese. Under practical conditions the addition of 1 g to 100 l of milk may prove sufficient. It is to be recommended that an extensive experiment under practical conditions be put up in order to substantiate these results.

# LITTERATUURLIJST

De vermelde litteratuuropgaven zijn op alphabetische volgorde gerangschikt. Bij een door meer dan een onderzoeker geschreven publicatie is de eerste naam plaatsbepalend.


ALTEN, F. en WEILAND, H. (1933), Vergleichende Untersuchungen über die kolorimetrischen Methoden der Nitratbestimmung. Z. f. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, A *32*, 337.

ALTEN, F., WANDROWSKY, B. en HILLE, E. (1936), Die Bestimmung des Nitratstickstoffes in Pflanzensubstanzen als Nitroxylenol. Bodenkunde und Pflanzenernährung, 1, 340.

BAYER, A. (1903), Zie Tillmans (1932), pag. 168.

BERGEY, D. H. (1939), Manual of Determinative Bacteriology, 5th. Ed., Baltimore.

BEYNUM, J. VAN (1934), Aromavorming door boteraromabacteriën. Versl. Landbk. Onderz., *40*, 390.

BEYNUM, J. VAN en PETTE, J. W. (1934), Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën. Versl. Landbk. Onderz., *40*, 534.

——— (1935), Zuckervergärende und laktatvergärende Buttersäurebakterien. Centralbl. f. Bakt. II, *93*, 198.

——— (1941), Propionzuurbacteriën in Goudsche en Edammerkaas. Versl. Landbk. Onderz., *47*, 1101. Jaarverslag Proefzuivelboerderij, 23, 1941.

——— (1942), Het aantoonen van gasvormende bacteriën in kaas. Versl. Landbk. Onderz., *48*, 765.

BLOM, J. (1928, I), Zum Nachweis von Hydroxylamin. Biochem. Z., *194*, 385.

——— (1928, II), Bildung von Hydroxylamin bei der Reduktion von Nitraten durch Mikroorganismen. Biochem. Z., *194*, 392.

BLOM, J. en TRESCHOW, C. (1929), Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen von Nitraten in Boden und Pflanzen. Z. f. Planzenernährung Düngung und Bodenkunde, A XIII, 159.

BOEKHOUT, F. W. J. en OTT DE VRIES, J. J. (1904), Über die Blähung im Edamer Käse. Centralbl. f. Bakt. II, *12*, 89.

——— (1917), De normale gasvorming in kaas. Versl. Landbk. Onderz., *21*, 14.

——— (1918), Die normale Gasbildung im Edamer und Gouda Käse. Centralbl. f. Bakt. II, *48*, 130.

BOEKHOUT, F. W. J., DAM, W. VAN en BEYNUM, J. VAN (1926), Over het ontstaan van salpeterranden in kaas. Versl. Landbk. Onderz., XXXI, 1.

BOER, S. DE (1940), Nitrate Assimilation of Aspergillus niger Van Tieghem. Proc. Kon. Ac. Wetensch., Amsterdam, *43*, 715.

BÖTEL, KNIEFALL en HENNEBERG (1933), Beeinflussung verscheidener Bakterien durch Kaliumnitrat und Kaliumnitrit mit besonderer Berücksichtigung der „Kuhcolibakterien". Molkerei Z., *47*, 449.

BREWER, C. R. en WERKMAN, C. H. (1939), The anaerobic dissimilation of citric acid by Aerobacter indologenes. Enzymologia, VI, 273.

BURG, B. VAN DER en HARTMANS, S. (1943), Zuivelbereiding, IV. De kaasbereiding in de fabriek, pag. 182. Uitgave Algemeene Ned. Zuivelbond.

CARPENTER, P. L. en FULTON, MC D. (1937), Escherichia Aerobacter Intermediates from Human Feces. Amer. J. Public. Health, *27*, 822.

DORNER, W. (1925), Zur Frage der Entstehung geblähter Milch. Landw. Jahrb. der Schweiz, *39*.

DEMETER, K. J. (1941), Molkereibakteriologie. 1. Mikroorganismen in der Milch. Onderdeel van LÖHNIS, Handbuch der Landwirtschaftliche Bakteriologie, 2e druk, Berlijn.

FREUDENREICH, E. VON en ORLA JENSEN (1907), Über die im Emmentalerkäse stattfindende Propionsaüregärung. Centralbl. f. Bakt. II, *17*, 529.

FATTON, N. E. (1939), Citroenzuur en nicotinegehalte in enkele variëteiten van Nicotiana tabacum en Nicotiana rustica. Dissertatie Groningen.

GREEN, D. E., STICKLAND, L. H. en TARR, H. L. A. (1934), Studies on reversible dehydrogenasesystems, III. Biochem. J., *28*, 1812.

HAGLUND, E., SANDBERG, E. en BARTHEL, CHR. (1933), Sur l'influence de differents facteurs sur la tendance à la fermentation gazeuse précoce du fromage. Le Lait, *13*, 697 en 874.

HÜTTIG, C. (1933), Versuche über Blähungserscheinungen bei Weichkasen durch Bakterien der Coli-Aerogenes Gruppe. Molkerei Z., *47*, 1196.

——— (1934), Die Abhängigkeit der Käseblähung von der „Disposition" der Anlieferungsmilch. Molkerei Z., *48*, 295.

KLINE, E. K. (1935), Constancy of characters differentiating Intermediates in the Escherichia-Aerobacter Group and their Interpretation. Amer. J. Public Health, *25*, 833.

KLUYVER, A. J. (1942), In KONINGSBERGER, Leerboek der algemeene Plantkunde II, Amsterdam.

KREBS, H. A. (1937), The role of fumarate in the respiration of Bacterium coli commune. Biochem. J, *31*, 2095.

LINDSEY, G. A. en MECKLER, C. M. (1932), Two rapid methods for distinguishing between Escherichia coli and Aerobacter aerogenes. Journ. of Bact., *23*, 115.

MERGNER, H. (1933), Die wichtigsten Weichkäsefehler. Molkerei Z., *47*, 1013.

MICKELSON, M. en WERKMAN, C. H., Influence of pH on the dissimilation of glucose by Aerobacter indologenes. Journ. of Bact., *36*, 67.

MINKEWITSCH, I. E. (1930), Die Grundtypen der Bakteriengruppe coli-aerogenes und ihre Herkunft. Z. f. Hygiene und Infektionskrankh., *111*, 180.

MINKEWITSCH, I. E., RABINOWITSCH, D. J. en JOFFE, F. S. (1936), Beiträge zur Frage über die Herkunft und die sanitäre Bedeutung der zitratassimilierenden Abarten von Bacterium coli. Centralbl. f. Bakt. I, Orig., *137*, 152.

PARR, L. W. (1938), Coliform Intermediates in Human feces. Journ. of Bact., *36*, 1.

——— (1939), Coliform Bacteria. Bacteriol. Revs., *3*, 1.

PETTE, J. W. en BEYNUM, J. VAN (1943), Boekelscheurbacteriën. Versl. Landbk. Onderz. *49*, 315.

PORCHER, CH. (1929), Le lait au point de vue colloidal. Pag. 350, 463 en 40, Lyon.

PUCHER, G. W., SHERMAN, C. C. en VICKERY, H. B. (1936), A method to determine small amounts of citric acid in biological material. J. biol. chem., *113*, 235.

QUASTEL, J. H., STEPHENSON, M. en WHETHAM, M. D. (1925), Some reactions of resting bacteria in relation to anaerobic growth. Biochem. J., *19*, 304.

REYNOLDS, H., JACOBSSON, B. J. en WERKMAN, C. H. (1937), The dissimilation of organic acids by Aerobacter indologenes. Journ. of Bact., *34*, 15.

SCHEFFER, M. A. (1928), De suikervergisting door bacteriën der coligroep. Dissertatie Delft.

SCHLAG, H. (1930), Untersuchungen von geblähten Käsen. Molkerei Z., *44*, 131.

SCHOORL, N. (1929), Suikertitratie. Chem. Weekblad, *26*, 130.

SCHWARZ, G. FISCHER, O., LEMBKE, A. en JENSEN, H. (1938), Beitrage zur Frage der Käseblähung 1. Vorratspflege und Lebensmittelforschung, *1*, 399.

SMIT, JAN (1913), Bacteriologische en chemische onderzoekingen over de melkzuurgisting. Dissertatie Amsterdam.

STOCKER, W. (1936), Starke Blähungserscheinungen bei Weichkäsen. Deutsche Molkerei Z., *57*, 424.

TIKKA, J. (1933), Über die Einwirkung des Nitrats auf die Vergärung der Glukose durch Colibakterien. Acta Chemica Fennica, B VI.

TILLMANS, J. (1932), Die chemische Untersuchung von Wasser und Abwasser, pag. 171, Halle (Saale).

TITTSLER, R. P. en SANDHOLZER, L. A. (1935), Studies on the Escherichia-Aerobacter intermediates. Journ. of Bact., 29, 349.

TRESCHOW, C. en GABRIELSEN, E. K. (1933), Zur Bestimmung von Nitrat in Pflanzen und Böden. Z. f. Pflanzenernährung Düngung und Bodenkunde, A *32*, 357.

URBACH, C. (1932), Die Stufenphotometrische Mikroanalyse des Trink- und Nutzwasser. Mikrochemie, XI, 37.

VAUGHN, R. en LEVINE, M. (1936), Hydrogensulfideproduction as a differential test in the colongroup. Journ. of Bact., *31*, 24.

WEIGMANN, H., GRUBER en HUSS (1906), Einige bakteriologische Untersuchungen aus der milchwirtschaftlichen Praxis. Milchw. Zentralbl., 2, 441.

WERKMAN, C. H. en GILLEN, G. F. (1932), Bacteria producing trimethyleneglycol. Journ. of Bact., *23*, 167.

WHITEHEAD, H. R. (1931), The influence of bacilli of the colongroup on cheddar-cheese. J. of Dairy Res., *2*, 76.

WILSON, G. S. (1935), The bacteriological grading of milk. Medical Research Council Special Reports Series, No 206, London.

WOJTKIEWICZ, A. F. (1933), Die Rolle des Salpeters als des die Gasbildung hemmenden Faktors im Käse. Centralbl. f. Bakt. II, *87*, 349.

# STELLINGEN

I

De bewering van WOJTKIEWICZ, dat de coli-aërogenes-bacteriën nitraatstikstof assimileeren via ammoniak, is onjuist.

WOJTKIEWICZ, Centr. f. Bakt. II, 87, 349 (1932–1933).

II

Het door VAN BEYNUM en PETTE opgestelde schema van de wijze waarop de boteraromabacteriën het aroma produceeren is onjuist.

VAN BEYNUM en PETTE, Versl. Landb. Onderz. 44, 207 (1938).

III

Ten onrechte beweren KNUDSEN en JENSEN, dat men met behulp van het katalasegetal kan vaststellen of een bepaald botergebrek door bacteriën wordt veroorzaakt of van chemische aard is.

KNUDSEN en JENSEN, Le Lait 13, 708 (1933).

IV

Om de kwaliteit van de rauwe melk te beoordeelen is de bepaling van het kiemgetal een betere methode dan de bepaling van de colititer.

SMIT c.s., Handelingen van het Genootschap ter bevordering van Melkkunde, 1937, II.
SMIT c.s., Antonie van Leeuwenhoek 6, 1 (1939–1940).

V

WILSON heeft niet bewezen, dat de door hem voorgestelde gewijzigde reductaseproef beter geschikt is om rauwe melk in kwaliteitsklassen te verdeelen dan bepalingen van het kiemgetal.

WILSON, The bacteriological grading of milk. Londen (1935).

VI

Het is niet zeker, dat bij een geringere kristallisatieneiging van het melkvet, bijvoorbeeld bepaald door het dilatometercijfer van de room of door het joodgetal van het vet, steeds een minder stevige boter mag worden verwacht, ook al zijn de omstandigheden bij de bereiding gelijk.

## VII

De door TENDELOO c.s. opgestelde verklaring aangaande de wortelpotentialen dient eerst te worden getoetst aan experimenten met kunstmatige membranen.

TENDELOO c.s., Rec. Trav. chim. d. Pays Bas 63, 97 (1944).
Versl. Ned. Akad. v. Wetensch., afd. Natuurkunde 53, 169 (1944).

## VIII

De resultaten verkregen bij de fractionneering van caseïne zijn niet zoodanig, dat daaruit besloten kan worden dat caseïne uit een aantal fracties bestaat.

LINDERSTRØM-LANG, C.R. trav. lab. Carlsberg 17, no 9 (1929).
SVEDBERG c.s., J. Am. Chem. Soc. 52, 241 (1930).
GROH c.s., Z. physiol. chem. 226, 32 (1934).
JIRGENSONS, Biochem. Z. 268, 414 (1934).
CHERBULIEZ en JEANNERAT, Helv. Chim. Acta 22, 952 (1939).

## IX

Bij de proeven over de verhooging van de stevigheid van de boter in de zomer door bijvoedering in de weide, moet niet alleen gelet worden op de stevigheid, maar ook op eventueele smaakveranderingen van de boter, hetgeen in het algemeen niet of te weinig gebeurt.

BROUWER c.s., Versl. Landbk. Onderz. 49, 347 (1943).
VAN LAARHOVEN, Officieel Orgaan F.N.Z. 32, 676 (1937).
PASVEER, Officieel Orgaan F.N.Z. 33, 178 (1938).
MIDDELVELDT, Friesch Landbouwblad no 23 (1939).
ALDERKAMP, Friesch Landbouwblad no 27 (1940).

## X

Om tot juiste maatregelen te komen inzake de verbetering van ons rundvee, dient meer dan tot dusver gebruik te worden gemaakt van de wiskundige verwerking van de gegevens, die door stamboeken en fokvereenigingen verzameld zijn.

## XI

Behalve op het gebied van de zuivelbereiding wordt door de Landbouwhoogeschool te weinig aandacht besteed aan het onderwijs in de industrieele verwerking van landbouwproducten.

## XII

Kaliumchloraat is een beter middel om de vroeg beginnende gasvorming in kaas te bestrijden dan kaliumnitraat.

Dit proefschrift, hoofdstuk VI.