

Projekt: Niveaucontrole op de laboratoria van het Centraal Orgaan voor
Melkhygiëne

Onderwerp: Conservering van boerderijmelk

Doel:

Onderzoek naar de mogelijkheid of boerderijmelk enige dagen te conserveren is om zo mogelijkheden te scheppen om een herhaling van een totaalkiemgetalbepaling verantwoord uit te voeren.

Samenvatting:

Een 15-tal tankmelkmonsters zijn onderzocht gedurende een 7-tal dagen achter elkaar door het totaalkiemgetal te bepalen in een geconserveerd gedeelte en in een niet geconserveerd gedeelte van elk monster. Vervolgens is enig aanvullend onderzoek verricht met geïsoleerde micro-organismen die al of niet afsterven in aanwezigheid van het bij dit onderzoek toegepaste conserveermiddel.

Conclusie:

Na toevoeging van het conserveermiddel was bij een aantal monsters een reductie van het kiemgetal van ca. een log eenheid waar te nemen. Het kiemgetal van de geconserveerde monsters bleef zeker 6 dagen redelijk stabiel. Bij de uit tankmelk geïsoleerde stammen bleken er nog enkele te zijn die afsterven na toevoegen van het conserveermiddel.

Verantwoordelijk: N.J.G. Broex

Samenstellers : N.J.G. Broex, R. Bakker *RB*

Projectleider : N.J.G. Broex

1. Algemeen

Vanuit de praktijk, de kwaliteitscontrole van boerderijmelk, is er behoefte om de mogelijkheid te hebben om in geval van twijfel of bij overschrijding van een bepaald kiemgetal dit nogmaals te kunnen bepalen in het zelfde monster. De vraag is dus "Is boerderijmelk zodanig te conserveren dat deze gedurende meerdere dagen (6) microbiologisch stabiel blijft?".

Uit de literatuur (1) is conservering van melk bekend. Na toevoeging van boorzuur/glycerol is melk bij 20°C langer te bewaren dan niet geconserveerde melk. In de Nederlandse situatie is naast een eventuele toevoeging van een of ander conserveermiddel een temperatuursbeheersing op 1 à 2°C mogelijk. Er is daarom besloten om een oriënterend onderzoek uit te voeren met een 15-tal tankmelkmonsters.

In dit verslag worden de resultaten weergegeven van dit onderzoek en enig aanvullend onderzoek met uit de melk geïsoleerde stammen die wel of niet afsterven onder invloed van het conserveermiddel.

2. Materiaal

Door het melkcontrolestation Oost-Nederland werden een 15-tal tankmelkmonsters verzameld waarvan er mogelijk een aantal een redelijk hoog ($> 10^4$ /ml) kiemgetal hadden. Deze monsters werden elk in 7-voud afgevuld in buizen met 2 ml conserveermiddel en in 7-voud in buizen met 2 ml fysiologische zoutoplossing. Na afvullen werden de buizen zorgvuldig gemengd en tot het moment van onderzoek bewaard op smeltend ijs in een koelcel van 2°C.

3. Methoden

3.1 Conservering

Conserveermiddel

boorzuur	50 g
glycerol	10 g
water	1000 ml

In de buizen werd voordat er 10 ml melk in werd afgevuld 2 ml van het conserveermiddel afgevuld.

Ter compensatie van de verdunningsfout werd bij de niet geconserveerde monsters 2 ml fysiologische zoutoplossing gevoegd.

3.2 Kiemgetal

Op de tijdstippen 0, 24, 48, 72, 96, 120 en 144 uur na ontvangst van de tankmelkmonsters werd met de zg. gietplaatmethode het kiemgetal bepaald in het geconserveerde en het niet geconserveerde monster. Tijdstip 0 is het moment onmiddellijk nadat de melk aan het conserveermiddel was toegevoegd.

3.3 Reinkweken

Van een aantal monsters werden kolonies reingestreken om deze micro-organismen nader te onderzoeken.

4. Resultaten

4.1 De log kiemgetallen van de geconserveerde monsters en de niet geconserveerde monsters staan weergegeven op tabel 1. Deze resultaten zijn tevens grafisch weergegeven in de grafieken 1 en 2.

4.2 De verschillende bacteriesoorten met hun herkomst en een aantal eigenschappen staan weergegeven in tabel 2.

Tabel 1 Conserveringstest rauwe melk

Code- nummer	Aantal uren/log kiemgetal						
	0	24	48	72	96	120	144
1	5,04	5,04	5,18	5,53	5,81	6,58	6,99
16.	5,00	4,92	4,95	4,97	4,94	5,00	4,82
2.	5,20	5,26	5,41	5,27	6,20	6,36	7,08
17.	5,67	5,00	4,95	4,95	4,97	4,91	4,83
3.	5,08	5,11	5,49	5,87	6,00	6,67	6,92
18.	5,12	5,00	4,90	4,85	4,94	4,77	4,75
4.	6,65	5,75	7,04	7,61	7,70	7,76	8,00
19.	6,82	6,40	6,54	6,45	6,52	6,34	6,25
5.	5,08	5,32	5,57	6,20	6,62	7,18	7,34
20.	5,00	4,89	4,85	4,84	5,79	5,04	4,66
6.	5,56	5,73	6,26	7,18	7,30	7,43	7,70
21.	5,28	4,54	4,46	4,43	4,45	4,32	4,20
7.	5,48	5,46	5,41	5,38	5,63	5,83	6,32
22.	5,45	5,49	5,34	5,34	5,48	5,48	5,34
8.	6,92	7,15	7,48	7,72	7,78	8,08	7,11
23.	7,11	6,96	6,95	7,40	6,87	7,00	6,87
9.	7,15	7,32	7,26	7,96	7,95	8,11	7,28
24.	6,82	5,88	6,20	5,93	6,91	5,47	6,74
10.	5,28	5,26	5,53	5,57	5,46	5,83	6,15
25.	5,23	5,26	5,23	5,26	5,23	5,20	4,69
11.	5,15	4,71	4,76	4,89	5,04	5,45	5,70
26.	4,76	4,79	4,54	4,79	4,70	4,67	4,59
12.	5,86	5,84	6,57	6,15	7,15	7,52	7,56
27.	5,78	4,58	4,57	4,92	4,26	4,65	4,60
13.	6,53	6,62	7,18	7,45	7,73	7,92	7,97
28.	6,23	5,18	4,95	5,11	4,97	4,88	4,87
14.	5,85	5,97	6,18	6,86	7,15	7,45	7,51
29.	5,64	5,74	4,72	4,76	4,65	4,62	4,58
15.	6,32	6,18	6,23	6,34	6,46	6,90	7,07
30.	6,28	6,18	6,26	6,20	6,18	6,08	6,20

Opmerkingen:

Monsters code 1 t/m 15 zijn zonder conserveermiddel

Monsters code 16 t/m 30 zijn dezelfde monsters echter met conserveer-
middel

Tabel 2

In deze tabel zijn een aantal eigenschappen weergegeven van 16 bacterien geïsoleerd van kiemgetalplaatjes waarbij wel en waarbij geen afsterving plaats vond. De eerste 7 bacterien zijn van plaatjes waar geen afsterving plaats vond. Bij de andere werd wel afsterving geconstateerd.

Bact nummer	Gram en soort bact.	Oxidase	Beweeglijkheid van schuine buis	Groei op V.R.B.G.	Groei op Mc Conkey
				evt. kleur kolonie	
1.	neg coc	+	-	-	-
2.	neg staafje	-	-	+ rood	+ rose
3.	neg staafje	-	-	+ rood	+ rood
4.	neg staafje	-	+	+ rood	+ rose
5.	neg staafje	-	-	+ rood	+ rose
6.	neg staafje	-	-	+ rood	+ rose
7.	neg staafje	-	-	+ rood	+ rose
8.	neg staafje	+	++	-	-
9.	neg staafje	+	++	-	-
10.	pos streptococ	-	-	-	-
11.	neg staafje	+	+	-	-
12.	neg staafje	-	-	-	-
13.	neg staafje	-	-	-	-
14.	neg staafje	+	++	-	-
15.	neg staafje	+	+	-	-
16.	neg staafje	+	++	-	-

- = niet beweeglijk

+ = beweeglijk

++ = zeer beweeglijk

Herkomst van de reingestreken kolonies:

1. Monster 30 na 24 uur met conserveermiddel.
2. Monster 30 na 0 uur met conserveermiddel.
3. Monster 30 na 0 uur met conserveermiddel.
4. Monster 23 na 24 uur met conserveermiddel.
5. Monster 23 na 24 uur met conserveermiddel.
6. Monster 23 na 0 uur met conserveermiddel.
7. Monster 23 na 0 uur met conserveermiddel.
8. Monster 29 na 0 uur met conserveermiddel.
9. Monster 29 na 0 uur met conserveermiddel.
10. Monster 29 na 0 uur met conserveermiddel.
11. Monster 28 na 0 uur met conserveermiddel.
12. Monster 28 na 0 uur met conserveermiddel.
13. Monster 28 na 0 uur met conserveermiddel.
14. Monster 27 na 0 uur met conserveermiddel.
15. Monster 27 na 0 uur met conserveermiddel.
16. Monster 24 na 0 uur met conserveermiddel.

4.3 Met de geïsoleerde stammen werd enig vervolgonderzoek uitgevoerd door deze eerst op te kweken in een oplossing van NILAC poeder om deze vervolgens te conserveren met het bij de tankmelkmonsters gebruikte conserveermiddel. Om zo na te gaan of er o.i.v. toevoegen van het conserveermiddel bij die stammen afsterving plaatsvindt. Bij deze vergelijking werd er gestreefd naar een start kiemgetal van ca. 10^5 /ml. Resultaten zie onderstaande tabel.

In deze tabel zijn de log van de kiemgetallen weergegeven van de 16 geïsoleerde bacterien met en zonder conserveringsmiddel na 0, 24 en 48 uur.

Bact.	0 uur		24 uur		48 uur	
	met	zonder	met	zonder	met	zonder
1.	6,11	6,36	6,32	6,23	6,18	6,18
2.	>7,48	>7,48	8,00	7,93	7,56	8,00
3.	6,76	6,90	6,62	6,81	6,77	6,70
4.	>7,48	>7,48	7,72	8,18	7,70	8,11
5.	>7,48	>7,48	7,88	8,04	7,85	7,26
6.	>7,48	<7,48	7,74	8,15	7,90	8,20
7.	>7,48	<7,48	7,85	8,11	7,73	8,20
8.	6,75	7,11	6,68	7,30	7,72	7,38
9.**	7,04	7,30	5,18*	7,23	5,32	7,23
10.	5,34	5,38	5,34	5,20	5,45	5,43
11.**	6,08	7,04	6,58	7,34	6,11	7,23
12.	>7,48	<7,48	7,28	7,87	7,59	7,88
13.	>7,48	<7,48	7,30	7,46	7,30	7,95
14.**	6,98	7,08	6,69	7,15	6,08	7,08
15.	6,94	7,18	6,78	7,36	7,18	7,34
16.**	6,87	7,28	7,11	7,32	6,61	7,30

* Bij dit kiemgetal was het aantal kolonies minder dan 10 zodat dit niet erg nauwkeurig is.

** Bij deze bacterien werd in het monster met conserveringsmiddel een afsterving met een factor 10 geconstateerd, zodat deze bacteriesoorten voor verder onderzoek werden gebruikt zie grafiek 3.

4.4 Met een aantal van deze stammen werd nogmaals een conservering proef uitgevoerd maar nu werd de concentratie van het conserveermiddel gereduceerd tot resp. 1/2 en 1/4.

Deze stammen werden ook weer opgekweekt in een oplossing van NILAC poeder en vervolgens wel en niet geconserveerd.

Resultaten van de log kiemgetal zie onderstaande tabel.

Grafische weergave zie grafiek 4 en 5.

In deze tabel zijn de resultaten weergegeven van vier bacteriestammen die een sterke afname vertoonden bij de normale sterkte van het conserveermiddel. Weergegeven is de log van de kiemgetallen in de monsters met fysiologisch zout, de gebruikelijke, de halve en een kwart van de sterkte. Dit na 0, 24 en 48 uur.

		<u>0 uur</u>	<u>24 uur</u>	<u>48 uur</u>
<u>Stam nr. 9</u>	Fys. zout	6,23	6,48	6,74
	Normale sterkte	5,65	3,70	3,11
	Halve sterkte	6,32	5,32	4,23
	Kwart sterkte	6,08	6,23	6,11
<u>Stam nr. 11</u>	Fys. zout	6,38	6,81	6,34
	Normale sterkte	6,28	5,04	3,78
	Halve sterkte	6,26	5,65	6,08
	Kwart sterkte	6,43	5,73	4,85
<u>Stam nr. 14</u>	Fys. zout	6,41	6,61	6,81
	Normale sterkte	6,34	5,71	5,34
	Halve sterkte	6,48	6,40	5,18
	Kwart sterkte	6,46	6,46	6,30
<u>Stam nr. 16</u>	Fys. zout	6,70	6,62	6,18
	Normale sterkte	5,85	3,95	3,28
	Halve sterkte	5,71	5,92	3,70
	Kwart sterkte	6,53	6,45	6,34

5. Discussie

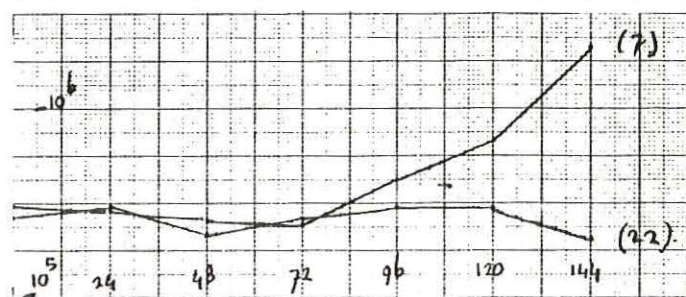
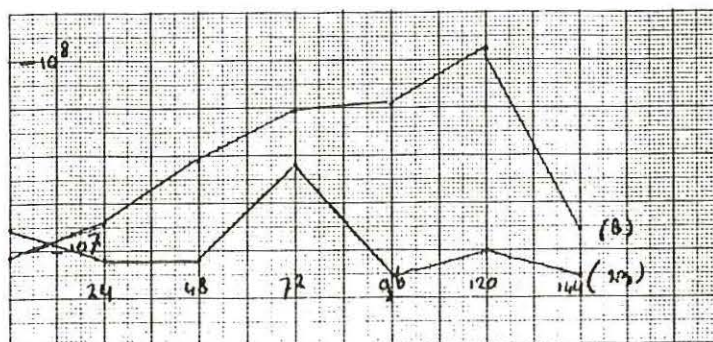
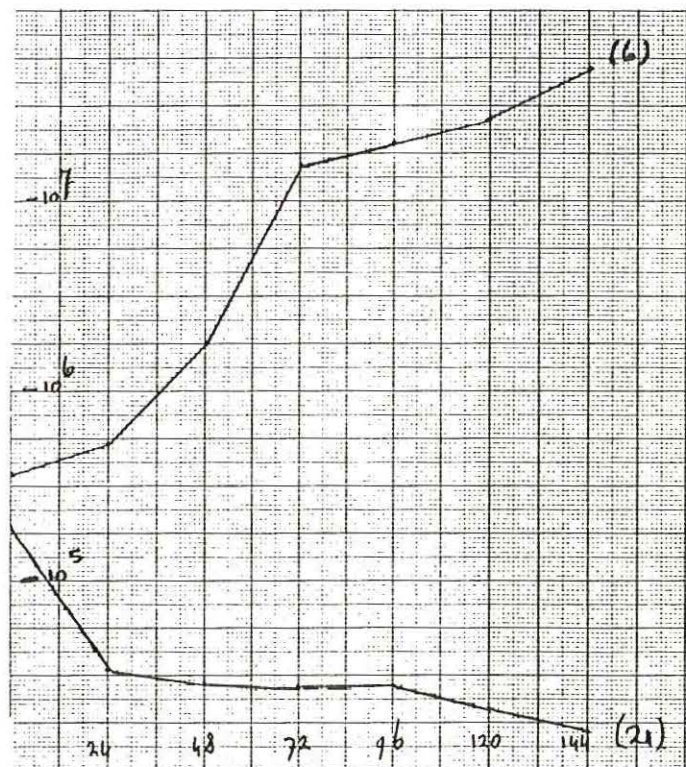
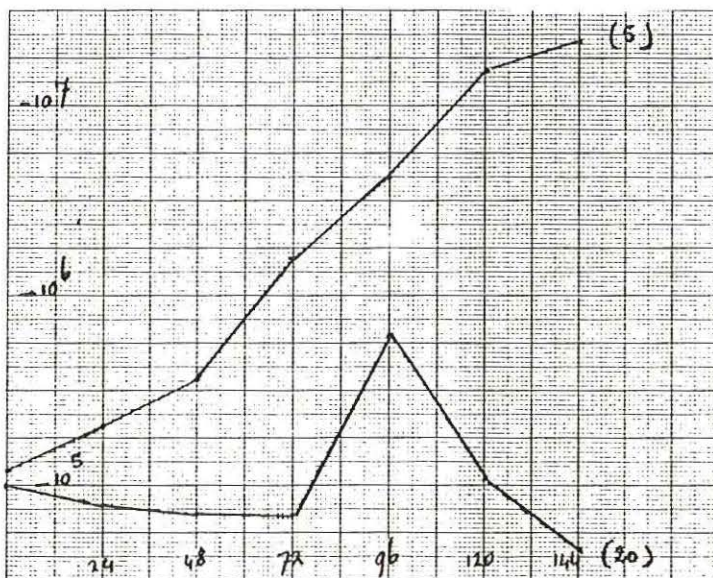
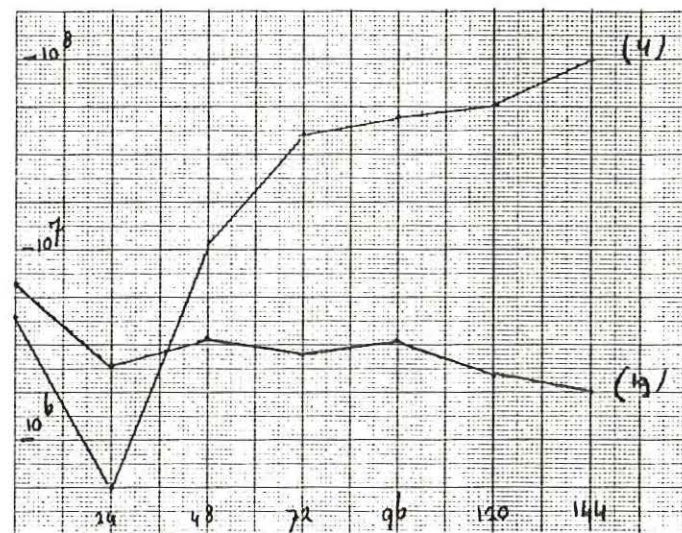
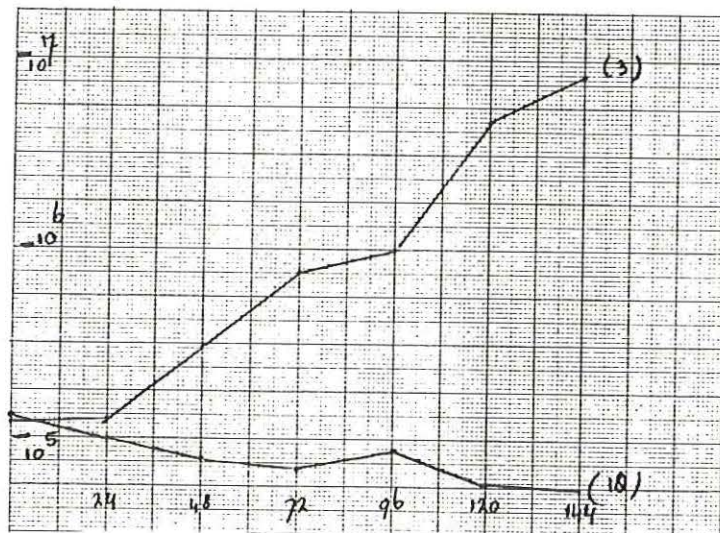
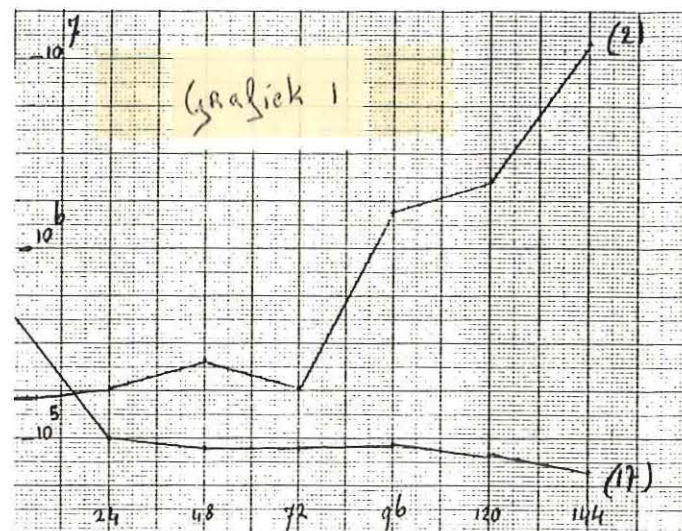
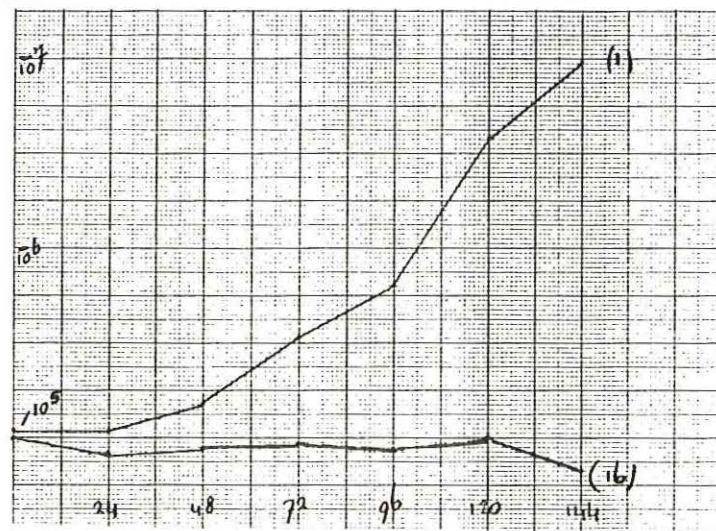
Uit de resultaten blijkt dat tankmelk te conserveren is met een boorzuur glyceroloplossing. Wel blijkt dat er een aantal micro-organismen (*Pseudomonas*?) zijn die meteen gedeeltelijk afsterven. Deze afsterving is duidelijk minder bij een 1/4 van de oorspronkelijke concentratie aan conserveermiddel. In dit onderzoek is niet onderzocht of de conservering met 1/4 van de oorspronkelijke concentratie wel het gewenste effect van 7 dagen heeft.

Nader onderzoek is wenselijk b.v. door weer praktijkmonsters te onderzoeken en dan de concentratie boorzuur/glycerol te variëren in concentratie.

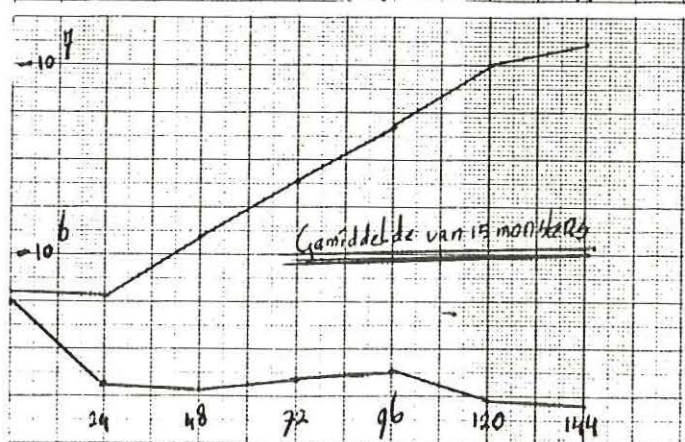
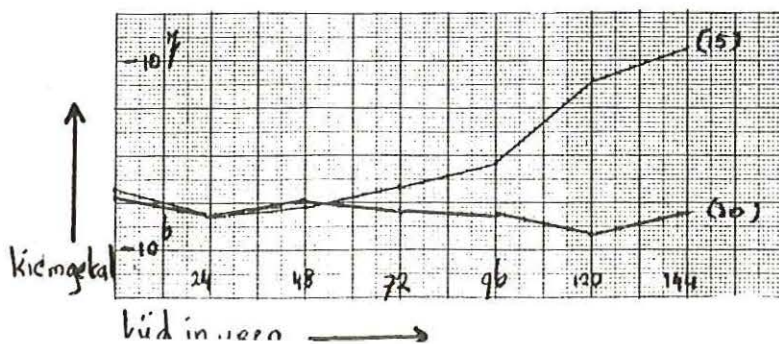
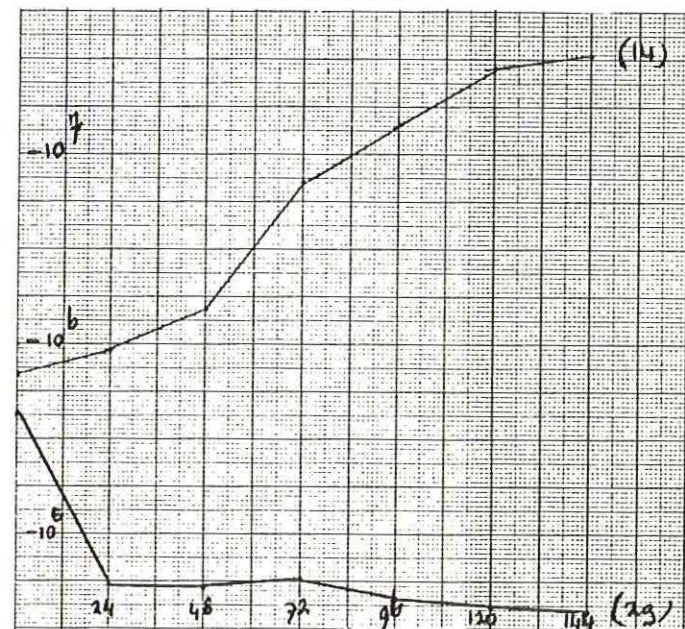
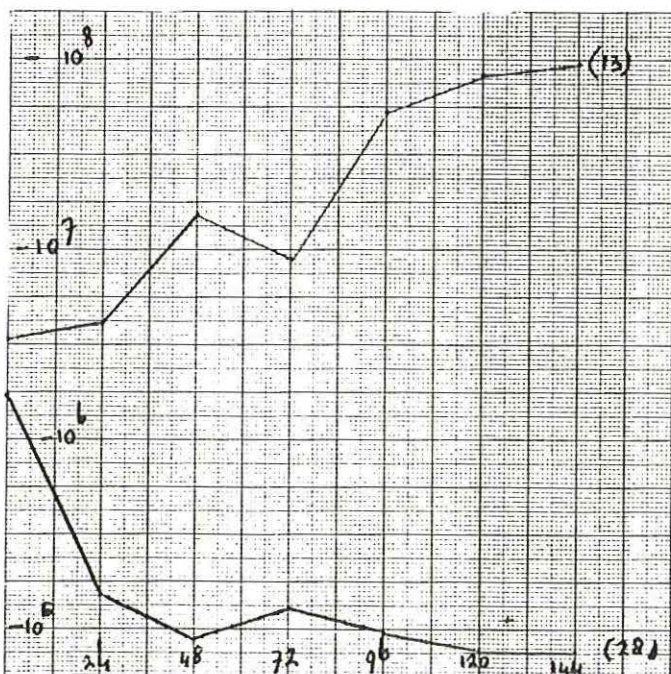
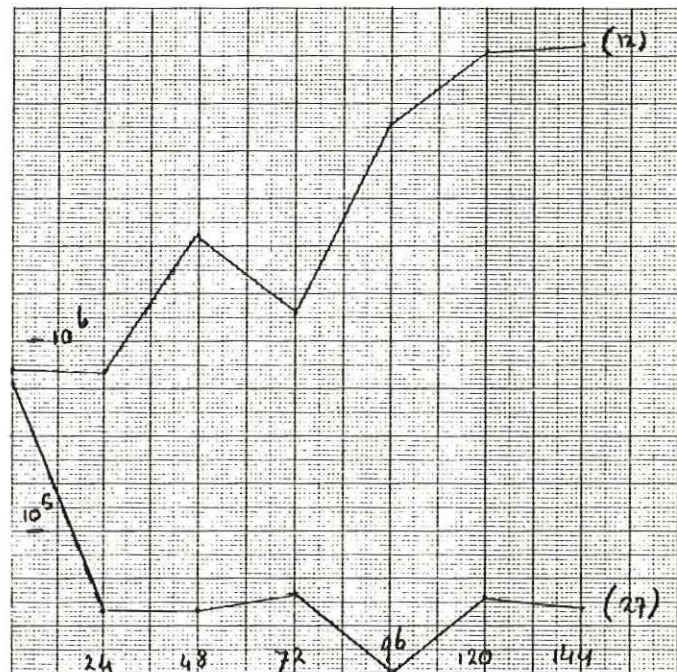
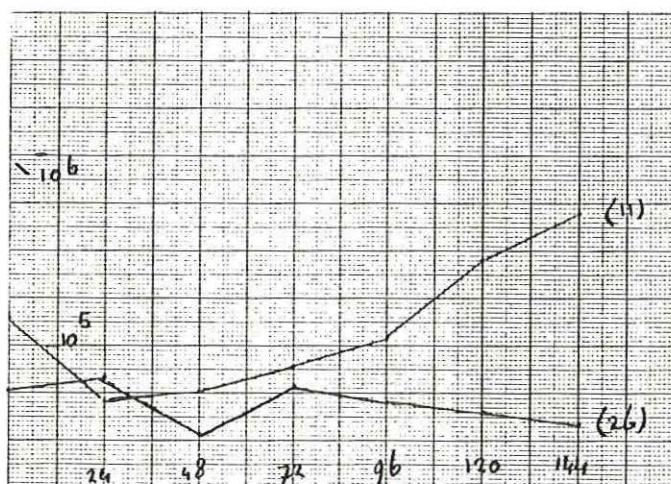
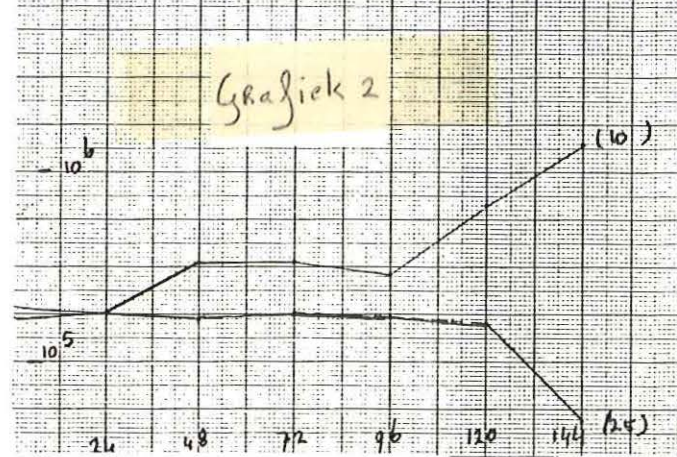
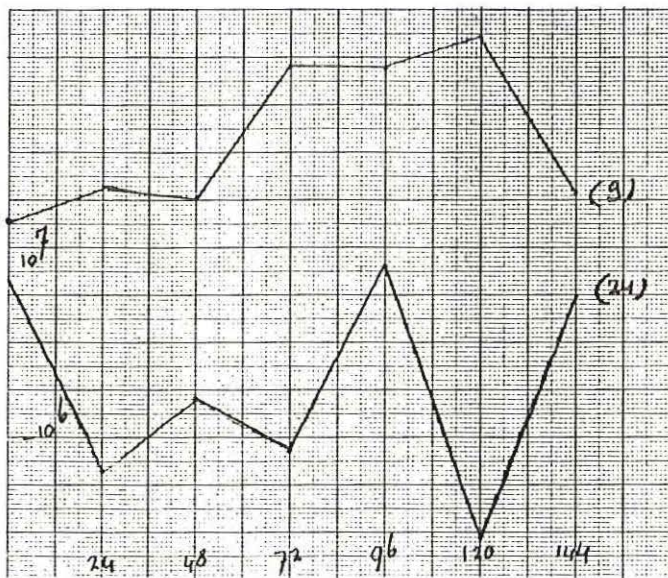
6. Literatuur

1. Proceedings of the symposium on the purchase of milk in a quality basis.

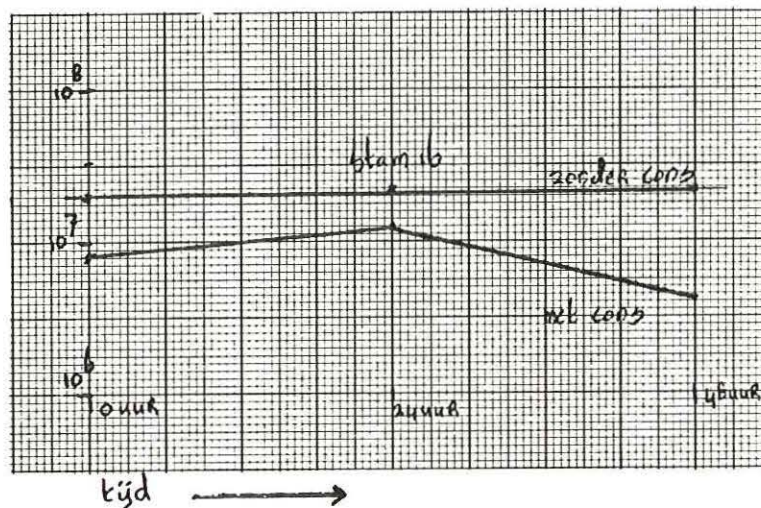
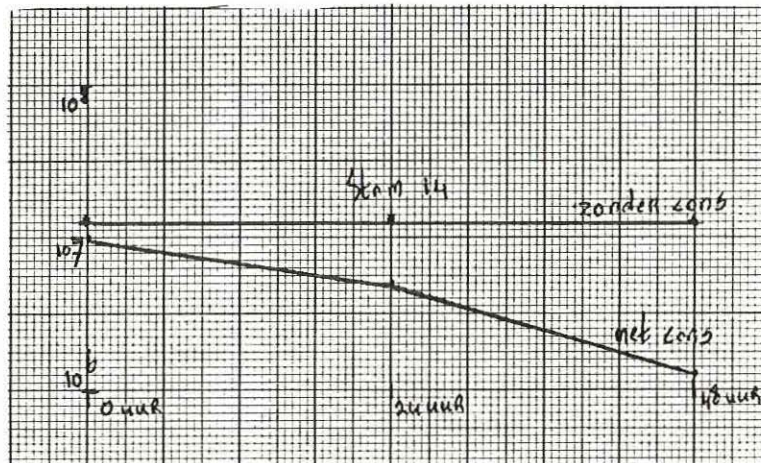
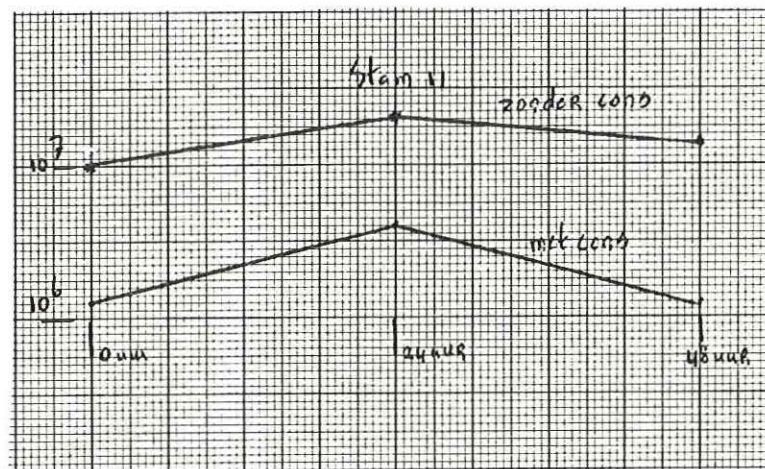
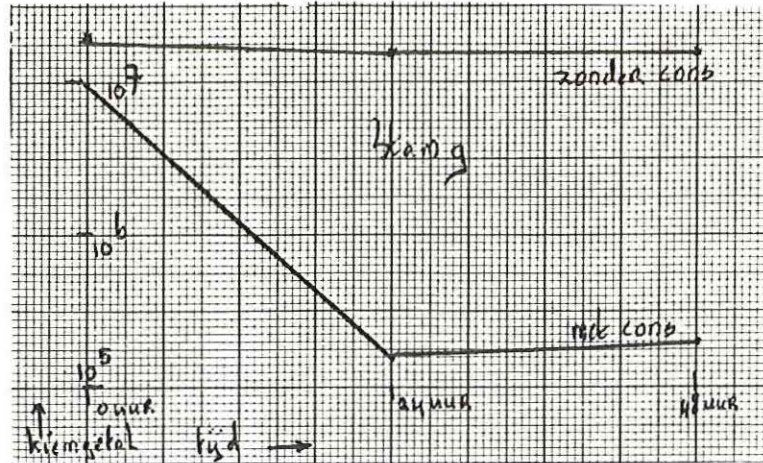
Tegniese mededeling no. 188. Republiek van Zuid Afrika.



kiemgetal → tijd in uren



Grafiek 3

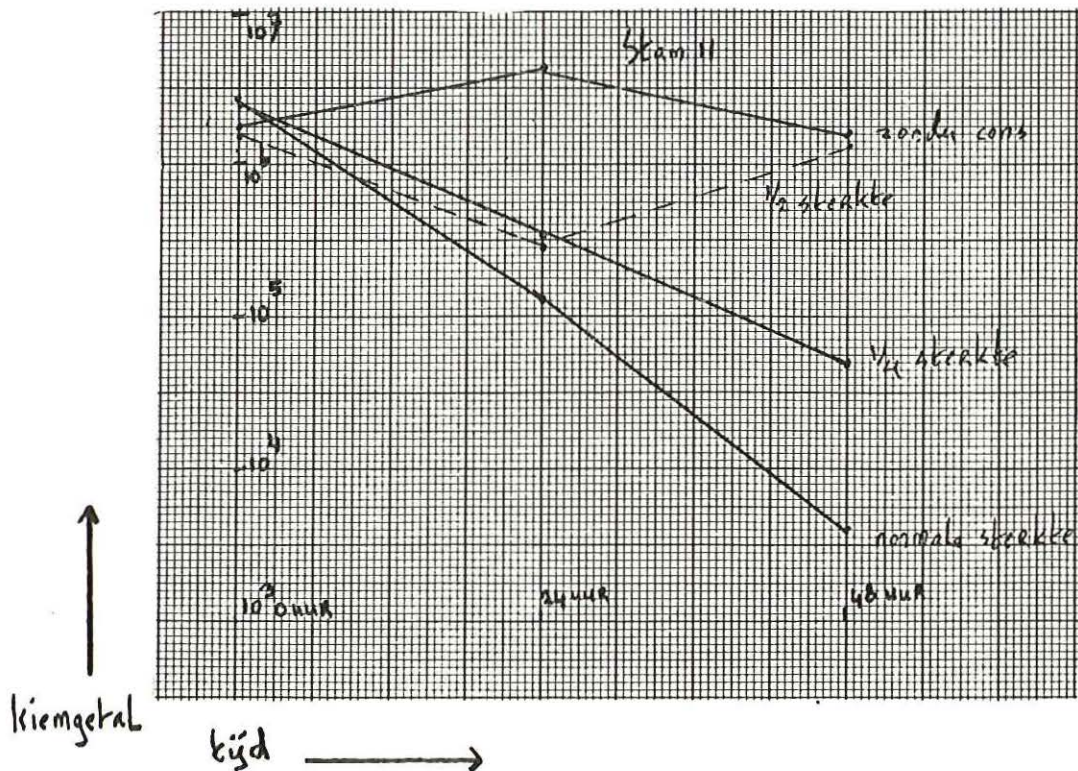
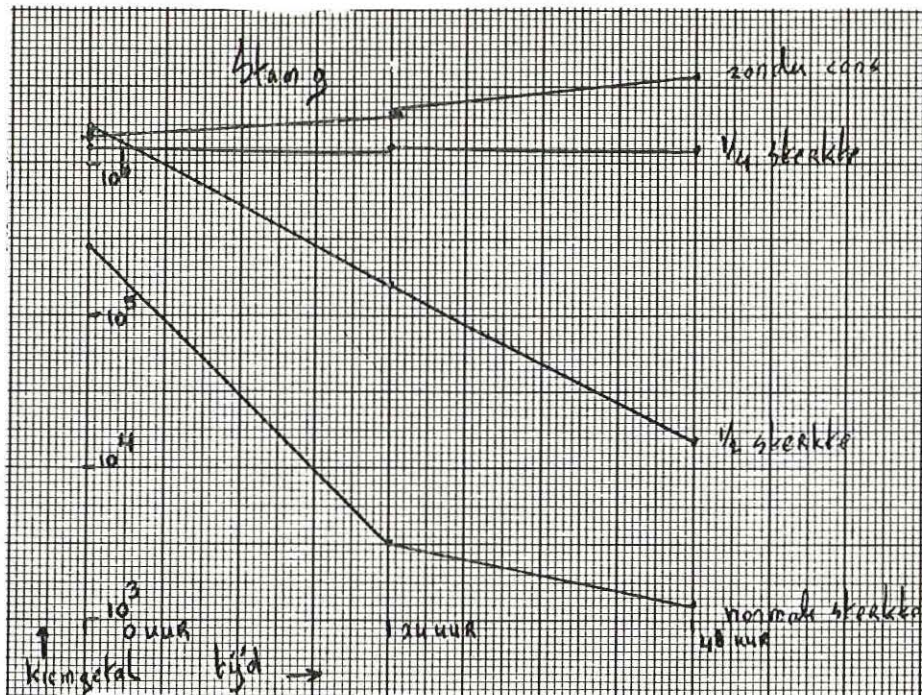


↑
kiemgetal

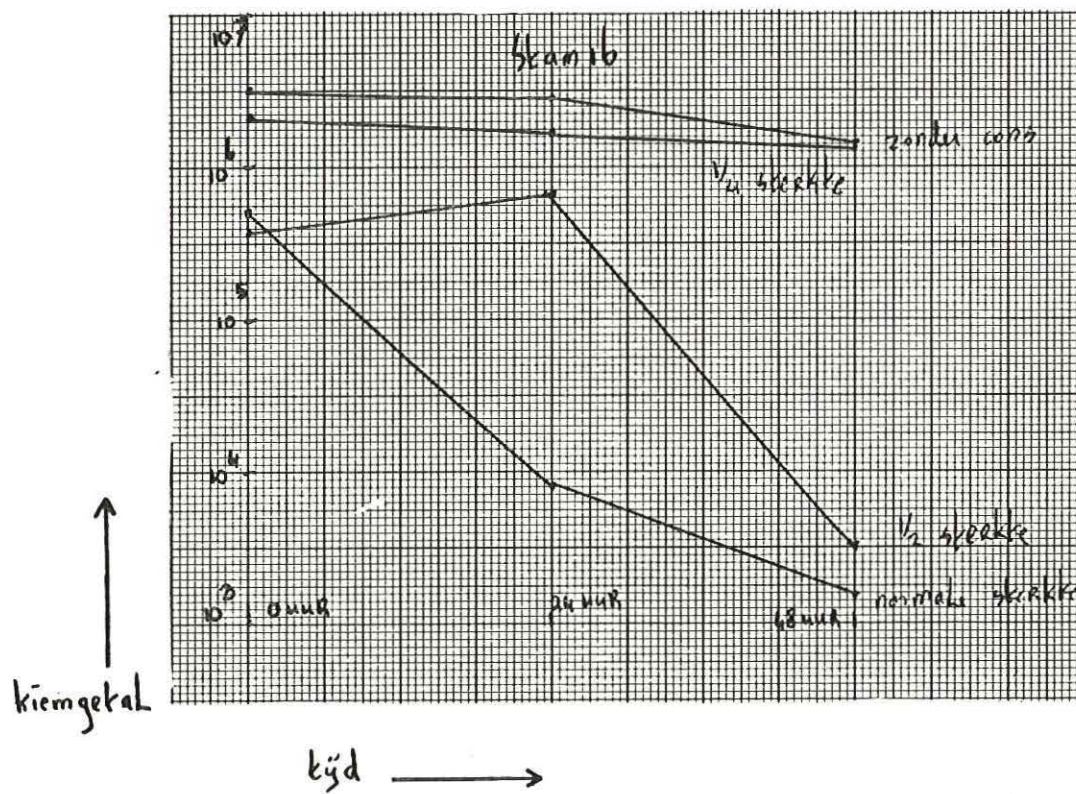
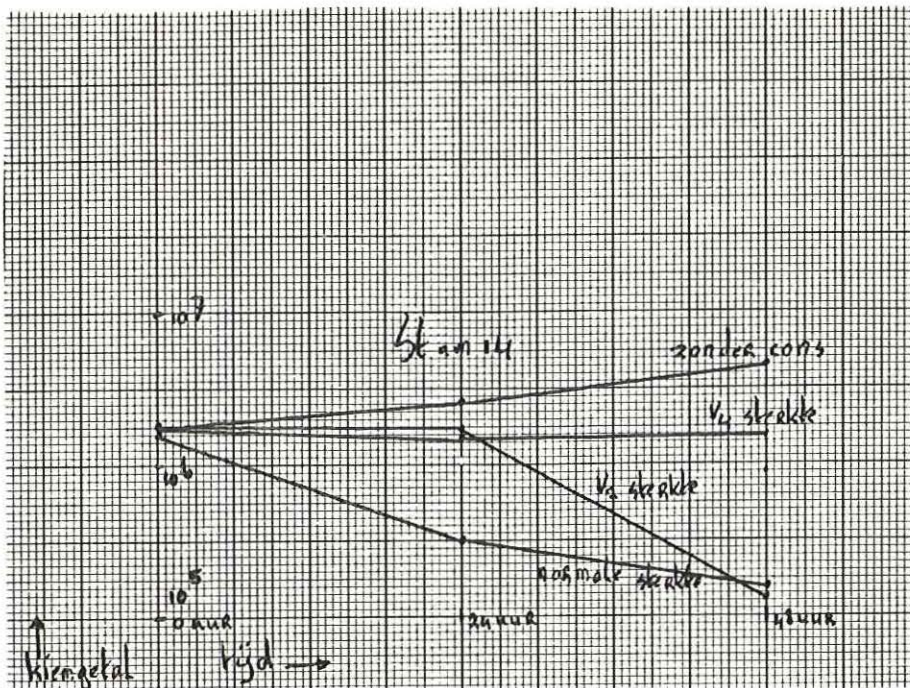
tijd →

Kiemgetallen van 4 verschillende stammen met en zonder conserveringsmiddel en met de halve en een kwart van de normale sterkte. Dit na 0, 24 en 48 uur.

Grafiek 4



Grafiek 5



Proefopzet onderzoek pr.nr. 101.6040

1. Doel

Onderzoek naar de mogelijkheid om boerderijmelkmonsters voor bacteriologisch onderzoek te conserveren.

Nagaan of boerderijmelkmonsters bestemd voor bacteriologisch onderzoek met behulp van toevoeging van boorzuur en glycerol en temperatuurbheersing op $< 2^{\circ}\text{C}$ meerdere dagen (6) te conserveren zijn zodat regulier kiemgetalonderzoek mogelijk blijft.

2. Inleiding

Bij het onderzoek op de melkcontrolestations is de uitvoering van een herhaling op het kiemgetal, met de huidige bewaarcondities, niet mogelijk. Er is echter op de melkcontrolestations wel behoefte om deze mogelijkheid eventueel te hebben.

In de literatuur (8.1) zijn onderzoeken bekend dat met chemische conservering en temperatuur van 15 à 20°C , conservering mogelijk is van enkele dagen.

Wat het effect is van chemische conservering en bewaren bij $< 2^{\circ}\text{C}$ is niet bekend.

3. Onderzoek

Melkcontrolestation Oost-Nederland levert 15 tankmelkmonsters, waarvan de kans is dat ze een redelijk hoog kiemgetal (3 à $5 \times 10^5/\text{ml}$) hebben, op lab. microbiologie RIKILT.

Na ontvangst van de monsters wordt elk monster aseptisch verdeeld in 12 porties van elk ca. 10 ml in steriele buisjes. Te weten 6 met conserveermiddel (2 ml boorzuur/glyceroloplossing) en 6 zonder conserveermiddel (2 ml steriel water). Deze porties (15×12) worden bewaard op smeltend ijs bij $t < 2^{\circ}\text{C}$.

Op de dag van ontvangst wordt van ieder oorspronkelijk monster het begin kiemgetal bepaald.

Op zes opeenvolgende dagen wordt in de submonsters met en zonder conserveermiddel het kiemgetal bepaald.

4. Conserveermiddel

boorzuur 50 g
glycerol 10 g
water 1000 ml

Per 10 ml melk, 2 ml van deze oplossing toevoegen.

5. Methode van onderzoek

Monstervoorbehandeling

Na bewaring bij $t < 2^{\circ}\text{C}$ wordt monster zorgvuldig gemengd en vervolgens het kiemgetal bepaald.

Gietplaatmethode, 3 d. incuberen bij 30°C . Verdunningen 10^{-2} , 10^{-3} en 10^{-4} .

6. Beoordeling

Per ingezette serie aantal kolonievormende eenheden tellen en een globale beschrijving van de kolonies geven. Dit in samenwerking met dr J. Stadhouders.

7. Resultaten

Na deze proefperiode zullen de resultaten van deze 15 tankmelkmonsters geëvalueerd worden om te bekijken in hoever een onderzoek op praktijkschaal (MCS) zinvol en mogelijk is.

8. Literatuur

8.1 Proceedings of the symposium on the purchase of milk in a quality basis. Teghiese mededeling no. 188. Republiek van Zuid Afrika.

9. Tijdschema

Maandag 14-1 Monsters nemen, afleveren op RIKILT en kiemgetalbepaling inzetten en aseptisch afvullen in submonsters.
Dinsdag 15-1 Kiemgetalbepaling na 24 uur.
Woensdag 16-1 Kiemgetalbepaling na 48 uur.
Donderdag 17-1 Kiemgetalbepaling na 72 uur.
 Kiemtelling van maandag 14-1.

Vrijdag 18-1 Kiemgetalbepaling na 96 uur.
Kiemtelling van dinsdag 15-1.
Zaterdag 19-1 Kiemgetalbepaling na 120 uur.
Kiemtelling van woensdag 16-1.
Zondag 20-1 Kiemgetalbepaling na 144 uur.
Kiemtelling van donderdag 17-1.
Maandag 21-1 Kiemtelling van vrijdag 18-1.
Dinsdag 22-1 Kiemtelling van zaterdag 19-1.
Woensdag 23-1 Kiemtelling van zondag 20-1.

Vanaf donderdag 24-1 resultaten voor rapportage verwerken.

1984-12-27

N. Broex

