

HET AANTOONEN VAN GASVORMENDE BACTERIËN IN KAAS

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE

(Ingezonden 16 October 1942)

1. Gasvorming in kaas

De gistingen in kaas, welke met gasvorming gepaard gaan en welke daardoor openingen in het zuivel veroorzaken, die in aantal, grootte en vorm kunnen verschillen, verdeelen we naar het tijdstip van ontstaan van deze openingen in *vroeg optredende* en *laatoptredende gasvorming*. Deze verdeeling heeft niet alleen een practischen grond doch hangt nauw samen met den aard der gisting.

De vroeg optredende gasvorming vindt n.l. plaats op een tijdstip, dat de kaas nog melksuiker bevat; het is dan ook een *suikervergisting*, waarbij de lactose voor een deel tot gasvormige producten (waterstof en koolzuur) wordt omgezet. Daar in pas gemaakte kaas de melksuiker door de melkzuurbacteriën snel wordt omgezet, kan een vroeg optredende gasvorming alleen door bacteriën, die tot snelle ontwikkeling in staat zijn, teweeg gebracht worden. Hoewel er verschillende soorten van microörganismen bestaan, die suikers onder gasvorming kunnen vergisten, wordt deze in kaas altijd veroorzaakt door *Escherichia coli* (*Bacterium coli commune*) of door *Aerobacter aerogenes* (*Bacterium lactis aerogenes*).

Deze vroeg optredende gasvorming staat bekend onder de namen: heft, rijzing, pekelheft of vroeg-los en vindt in de kaas plaats onder de pers, tijdens het omloopen of tijdens de pekeling.

De laat optredende gasvorming is een vergisting van lactaat, hetwelk door de melkzuurbacteriën uit de melksuiker gevormd is. Zij treedt pas op na afloop van de melkzuurgisting, in ieder geval na de pekeling; soms zelfs begint zij pas lang daarna. Daarom kunnen wij haar *nagisting* noemen.

Deze gasvorming wordt dus veroorzaakt door bacteriën, die het vermogen bezitten om lactaten te ontleden en daarbij gasvormige producten doen ontstaan. Wij kennen in de zuivelbacteriologie thans 3 soorten van dergelijke bacteriën, n.l. boterzuurbacteriën (*Clostridium tyrobutyricum*), lactaatvergistende melkzuurbacteriën (waarvoor wij den naam *Lactobacillus bifermantans* invoeren ¹⁾), ook wel boekelscheurbacteriën (1) genoemd) en propionzuurbacteriën (*Propionibacterium shermanii*). De beide eerstgenoemde soorten vormen waterstof en kooldioxyde, de laatstgenoemde soort alleen kooldioxyde als gistingsgas.

Er zijn aanwijzingen, dat in een zeldzaam geval ook coliachtige bacteriën verschijnselen van nagisting kunnen veroorzaken. Dit zal kunnen gebeuren als de melkzuurgisting in de jonge kaas zóó slecht of zóó langzaam verloopt, dat na de pekeling

¹⁾ Over de eigenschappen van deze bacterie stellen wij ons voor weldra nadere mededeelingen te doen.

454 251

nog melksuiker in de kaas is achter gebleven. Dan is dus ook in een later stadium nog gelegenheid tot suikervergisting, vooral omdat na de pekeling het zoutgehalte een verdere werking der melkzuurbacteriën sterk vertraagt (2).

Bij vroeg optredende gasvorming zijn de openingen onregelmatig van vorm daar het ontstane gistingsgas zich tusschen de wrongeldeeltjes perst. De kaas is dan n.l. nog geen homogene massa. Een zeer snelle coligisting uit zich door zeer vele uiterst kleine openingen; men spreekt dan van „fijngaterig“.

Door zuring en pekeling wordt de kaas tot een meer homogene massa. Bij de laat optredende gasvorming hangt de vorm der gasopeningen van de mechanische eigenschappen van het zuivel af. Als het zuivel soepel of plastisch is en dus vloeïngsverschijnselen kan vertoonen, wordt het op de plaats, waar het gistingsgas vrijkomt, door het gas gelijkmatig in alle richtingen weggedrukt, zoodat ronde (bolvormige) openingen met gladden wand ontstaan. Bij sterke gisting worden deze openingen groot; men spreekt dan van „laat-los“. Bij geringe gisting ontstaat een klein aantal kleine openingen, die men „oogjes“ of „vetoogjes“ noemt. Als het zuivel kort of bros is zullen echter grootere of kleinere scheuren ontstaan. Een kaas met groote scheuren noemt men een „knijper“. Kleinere scheurtjes noemt men wel boekelscheurtjes. Het vóórkomen van scheurtjes wordt als ongewenscht beschouwd. Soms treft men in één kaas zoowel scheurtjes als ronde openingen aan.

De vroeg optredende gasvorming wordt steeds als ongewenscht voor kaas beschouwd, de laat optredende niet altijd. Een nagisting, waarbij slechts enkele openingen van ronden vorm en geringe grootte in het zuivel ontstaan, ziet men graag. Wordt evenwel veel gas gevormd, dan is de nagisting een gebrek.

Het moet voor een bedrijf, waar men met te sterke gasvorming in de kaas te kampen heeft, van groot belang geacht worden te weten welk microorganisme hiervoor verantwoordelijk is, daar deze kennis voor de bestrijding van het gebrek noodig is. Een te groot aantal propionzuurbacteriën is bijna altijd het gevolg van een onjuiste kaاسبereiding, waarbij de kaas een te hoogen pH krijgt; de aanwezigheid van boterzuurbacteriën en boekelscheurbacteriën daarentegen wijst op een besmettingsbron, waaruit de kaasmelk met deze bacteriën geïnfecteerd wordt. Zeer veel coliachtige bacteriën in de kaas wijzen er op, dat de melkzuurvorming te langzaam verlopen is, hetzij door de minder goede kwaliteit van het zuursel, hetzij door een te hooge nawarmtemperatuur, waarvan de zuurselmelkzuurbacteriën schade ondervonden, of dat de kaasmelk zeer veel coli of aerogenes bevatte, zooals dit bij oude melk of bij sterke besmetting het geval kan zijn.

2. Bestaat er verband tusschen den vorm der openingen en den aard der gisting?

Het zou zeker gemakkelijk zijn als men aan den vorm der gasopeningen kon zien welke bacterie de oorzaak ervan was. Men kan b.v. aan den onregelmatigen vorm der openingen en hun regelmatige verspreiding over

de geheele kaasdoorsnede een plaats gehad hebbende coligisting onderkennen, doch als in zoo'n kaas bij het ouder worden ook nagistingsverschijnselen gaan optreden, kunnen door het dan ontstane gas de oorspronkelijk onregelmatige gaatjes tot ronde openingen worden opgeblazen, waardoor de beoordeeling niet wel doenlijk meer is. Men kan in zoo'n geval met eenige oefening dan soms nog de voorafgegane coligisting herkennen aan de gistingsgaatjes in het randdeel, omdat in tegenstelling met de vroeg optredende gasvorming, die plaats vindt als de kaas nog niet of nog slechts weinig gezouten is, de nagisting niet in het randdeel geschiedt. Ook het voorkomen van *een zeer groot aantal* nagistingsopeningetjes in kaas is een aanwijzing voor een plaats gehad hebbende coligisting. Eenvoudig is de beoordeeling van coligisting echter niet, daar in z.g. doorgewerkte of doorgehaalde wrongel lucht ingesloten wordt, die later in de kaas in een vorm zichtbaar is, die veel op dien der coligaatjes lijkt (maakgaatjes).

Groote scheuren, hetzij door de geheele kaas, hetzij op de grens van het randdeel of tot daarin doorlopend, wijzen gewoonlijk op boterzuurgisting. De boterzuurgisting is n.l. mogelijk in kaas met hoogen en in kaas met lagen pH. In het laatste geval wordt door de felle gisting de kaas over groote lengte gescheurd. Bij hoogen pH ontstaan in de plastische kaas groote ronde openingen, waardoor de korst moet uitwijken. Bij Goudsche kaas moet de uitwijking in het midden van de platte zijde geschieden, omdat de gisting als gevolg van het geringere vocht- en hooge zoutgehalte in den rand alleen in het middendeel der kaas plaats heeft. Als de gisting sterk en de uitwijking dus groot is, krijgt de platte zijde daardoor in het midden een verhooging (deze verhooging is zeer karakteristiek voor sterke nagisting; men spreekt wel van een „kattenrug”), waardoor in het door het hoogere zoutgehalte brossere randdeel spanningen kunnen ontstaan, die een mechanische uitscheuring bewerkstelligen.

Zeer groote gasholten in kaas worden volgens onze ervaring steeds door boterzuurbacteriën veroorzaakt.

Propionzuurbacteriën doen gewoonlijk ronde openingen van matige grootte ontstaan. Of zij in staat zijn in kaas van lageren pH scheurtjes te vormen is minder zeker.

De boekelscheurbacteriën zijn veroorzakers der boekelscheurtjes, doch in kazen met plastisch zuivel kan het door hen gevormde gas ook in den vorm van ronde oogen verschijnen. Als de gisting door deze bacteriën heel sterk is, kunnen zelfs knijperachtige scheuren ontstaan, die van die door boterzuurbacteriën niet te onderscheiden zijn.

Hoewel uit het bovenstaande volgt, dat bij de beoordeeling van kaas soms wel een vermoeden omtrent de oorzaak der gasvorming kan worden uitgesproken, is in den loop van het onderzoek wel gebleken, dat het niet mogelijk is op deze wijze met zekerheid te bepalen welk organisme of welke organismen voor de aangetroffen ongewenschte gasontwikkeling verantwoordelijk gesteld moeten worden. Dan blijft dus de bacteriologische analyse over om dit uit te maken.

Wij hebben getracht voor dit bacteriologisch onderzoek een techniek te ontwerpen, welke in het volgende hoofdstuk beschreven wordt.

3. Bacteriologische analysemethoden

Het onderzoek geschiedt volgens het principe, dat van de te onderzoeken kaas kleine hoeveelheden geënt worden in voedingsbodems, die zoodanig van samenstelling zijn en waarmede behandeling en kweeking zóó uitgevoerd worden, dat in den eene bodem het eene, in den anderen bodem het andere microorganisme tot ontwikkeling kan komen of, indien een bodem geschikt is voor meer dan één soort, toch nog een gemakkelijke herkenning mogelijk is. Wij steunen hierbij op vroeger aan dit station verrichte onderzoekingen over de afzonderlijke hier in aanmerking komende bacteriesoorten.

Om een kwantitatieve beoordeeling mogelijk te maken worden in de voedingsbodems verschillende hoeveelheden kaas geënt, te beginnen met 0,1 g, afdalend in reden van 10.

A. *Het bemonsteren der kaas en het maken der verdunningen*

Voor het onderzoek heeft men een stuk kaas noodig van ongeveer 1 kg, dus b.v. een halve Edammer of een sector uit een Goudsche kaas. Bij een stuk van dergelijke grootte kan men den verschijningsvorm van het gebrek goed zien en is men in staat enkele boorsels onder steriele voorzorgen te nemen. Het te onderzoeken stuk moet voldoende van het middendeel der kaas bevatten om daaruit de boorsels te kunnen nemen, daar dit deel der kaas de meeste nagistingsbacteriën bevat.

Bij Edammer kaas wordt de boor loodrecht op het oppervlak ingestoken, bij Goudsche kaas steeds schuin op de platte zijde, daar men anders te veel van het randdeel bemonstert. Men gebruikt geflambeerde kaasboren en brandt het kaasoppervlak op de plaats, waar men wil boren, af met een gasbrander. Het is om toevalligheden te vermijden gewenscht om minstens 2 boorsels uit 1 kaasmonster te nemen. Uit deze boorsels, die op de boor blijven liggen, worden nu met een geflambeerd mesje schijfjes gesneden, waarvan er zooveel op een geflambeerd horlogeglas worden afgewogen tot 2 g bij elkaar is. Men neme daarbij alleen schijfjes uit het middendeel (dieper dan 1½ cm onder de korst). De 2 g kaasschijfjes worden in een van te voren op 40° à 50° C verwarmd, gesteriliseerd mortier tot een dunne vloeistof verwreven met 18 ml 2 % Natriumcitraatoplossing, die eveneens een temperatuur van 40° à 50° C heeft. De citraatoplossing wordt in het begin slechts in kleine hoeveelheden tegelijk toegevoegd. 1 ml der suspensie vertegenwoordigt 0,1 g kaas; 0,1 ml 0,01 g kaas. Uit de aldus verkregen homogene suspensie kunnen de volgende verdunningen worden bereid.

B. *Cl. tyrobutyricum, de kaasboterzuurbacterie*

Voor het aantoonen van deze bacteriën wordt de kaas geënt in glucose-vleeschbouillon (vleeschbouillon met 0,5 % NaCl; 0,5 % pepton Witte en 0,5 à 0,75 % glucose). Na pasteurisatie gedurende 10 min. op 80° C om niet-sporevormende bacteriën te dooden, wordt anaerob bij 30° C gekweekt.

Bij de wijze van uitvoering, zooals wij die toepassen, wordt de voedings-

bodem in cultuurbuizen gebracht. welke na de enting luchtledig gepompt worden en waarin men een eventueele gasvorming goed kan waarnemen (zie foto 1). De zichtbare gasvorming duurt gewoonlijk 1 à 2 dagen. De beoordeeling, welke na 14 dagen geschiedt, is bij deze methode eenvoudig. Bij het openen der buizen in de nabijheid van een vlam explodeert het waterstofgas, dat zich gedurende de boterzuurgisting gevormd heeft. Een tweede kenmerk is de typische geur van boterzuur.

Een zeer enkele keer wordt wel eens zwakke gisting door andere bacteriën dan de boterzuurbacteriën waargenomen. Daar dan evenwel geen boterzuurgeur te constateeren valt, kan men zich daarmee niet vergissen.

Hoewel bij de onderzoekingsmethode behalve *Cl. tyrobutyricum* ook *Cl. saccharobutyricum* in den voedingsbodem kan groeien, heeft men van laatstgenoemde soort geen last, omdat deze in kaas bijna nooit voorkomt en zeer zeker niet in groote aantallen.

C. Lactobacillus bifermentans, de lactaatvergistende melkzuurbacterie of boekelscheurbacterie

De kaasverdunningen worden geënt in een voedingsbodem, welke bereid wordt door in 1 l water 20 g pepton (Witte), 2 g dikaliumphosfaat, 5 g keukenzout en 20 g calciumlactaat op te lossen. Na opkoken en afkoelen wordt de pH, die gewoonlijk 5,5 is, met behulp van zoutzuur op 4,5 gebracht. Bij het aftappen moet het zich in de vloeistof bevindende neerslag van te voren opgeroerd worden, opdat het met de vloeistof mee over de buizen verdeeld wordt.

Het kweeken geschiedt anaerob bij 30° C.

Het is van voordeel om ook deze proeven in luchtledig gepompte en dichtgesmolten buizen te doen. Dagelijks kan dan worden nagegaan of er gisting plaats vindt. Men begint hier echter niet eerder mede dan na 3 dagen, omdat vóór dien tijd opstijgende bellen niet het gevolg van gisting zijn. De gisting van de betreffende bacterie in dezen voedingsbodem is gekenmerkt door een vrij langdurigen, regelmatigen stroom van fijne gasbelletjes. De bodem is door den lagen pH (4,5) vrij selectief voor *Lb. bifermentans*. In de buizen met 0,1 g kaas vindt men meestal ook propionzuurbacteriën, doch in de hogere verdunningen groeien deze niet of blijven op den achtergrond. Als de kaas veel boterzuurbacteriën bevat, treedt in de zwaarst geënte buizen ook wel boterzuurgisting op; in de buizen met minder dan 0,01 g kaas heeft men daarvan echter geen last.

De beoordeeling der geënte buizen geschiedt na 14 dagen. Ontwikkeling van gas, uit ongeveer gelijke deelen koolzuur en waterstof bestaande, en een zoetige, eenigszins aan bouillon herinnerende geur wijzen op de aanwezigheid van boekelscheurbacteriën. Soms is de hoeveelheid gas maar zeer gering.

Bij onze uitvoering, waarbij de buisjes 8 ml voedingsbodem bevatten op een totaal volume van de dichtgesmolten buisjes van ongeveer 16 ml, worden gasspanning en -samenstelling bepaald door afbreken van de punt van een buisje onder een natriumhydroxydeoplossing. *Lb. bifermentans* ontwikkelt uit 8 ml voedingsbodem onder de omstandigheden der proef hoogstens 8 ml gistingsgas. Men sluit nu de gemaakte opening van het buisje met den vinger af en zwenkt het buisje, waardoor het aanwezige koolzuur in de binnengetreden loog oplost. Neemt men nu onder water den

vinger van de opening, dan treedt evenveel water binnen als koolzuur oploste. Meestal bestaat de helft van de hoeveelheid gistingsgas uit kooldioxyde. De rest is waterstof, hetgeen men aantoonen kan door de buis te laten afspringen en de monding bij een vlam te houden, waarna een kleine explosie volgt. Als (in de buizen met 0,1 en 0,01 g kaas) boterzuurgisting heeft plaats gehad, is de gasspanning veel hooger en wordt bij openen onder een vloeistofniveau de geheele vloeistofinhoud van het buisje uitgedreven.

Als alle entingen in duplo zijn geschied, kan men van elk paar één buisje bestemmen voor de bovenbeschreven gasanalyse en het andere voor het bepalen van den geur.

D. *Propionibacterium shermanii*, de propionzuurbacterie

Als voedingsbodem voor deze bacteriën gebruiken wij een pepton-gist-autolysaat-natriumlactaat-agar in buizen.

Deze wordt bereid met behulp van z.g. uitgewassen agar. 20 g agarpoeder met 500 ml water wordt 3 dagen bij 20° C bewaard, waarbij men iederen dag een keer omschudt. Na affiltreeren door een neteldoekje in een Buchner-trechter wordt de agar nog eens 3 dagen bij 20° C geplaatst met 500 ml water en weer dagelijks omgeschud. Na filtreren als voren en eenigszins uitwasschen wordt de gezwollen agar in water opgelost tot een volume van ongeveer 700 ml. Hierbij voegt men 250 ml vloeistof, die 50 ml onverdunde gistautolysaat (verkregen door 1 deel persgist met 1 deel water te autolyseeren), 15 g Na-lactaat (= 25 g 60 % Na-lactaatstroop) en 5 g pepton Witte bevat. Het mengsel wordt gedurende een half uur gekookt. Daarna koelt men af tot 50° C, vult met water aan tot het vloeistofgewicht 1 kg is, voegt 5 g albuminepoeder, aangeroerd met weinig water, toe, verhit dan 20 minuten in een stoompot en filtreert door een verhitte trechter. De pH wordt nu op 6,5 gebracht en de vloeistof in porties van 10 ml in buizen getapt, welke dan gesteriliseerd worden.

Bij het gebruik worden de buizen in een stoompot geplaatst tot de agar gesmolten is en tot de enting in een waterbad van ongeveer 50° C bewaard. Na de enting laat men ze afkoelen, drukt de watteprop in de buis, bevochtigt deze met 0,5 ml 20 % pyrogalloloplossing, daarna met 0,5 ml verzadigde sodaoplossing en sluit dadelijk daarop met een rubberstop. Het verdient aanbeveling om na de enting de buis niet te schudden, met het oog op schuimvorming, doch door te roeren met een platinadraad, daaraan een oog gemaakt is, waarvan het vlak loodrecht op den draad staat.

In plaats van agar kan men ook een kiezelzuurvoedingsbodem gebruiken. Voor de bereiding van dezen verwijzen wij naar ons artikel over propionzuurbacteriën (3).

Het kweken geschiedt bij 30° C en de beoordeeling vindt plaats na 10—14 dagen. De propionzuurbacteriën vormen in den agar groote koloniën van karakteristieken vorm (lenzen, drievleugelig en vier-, soms meer-vleugelig) en gele tot roode kleur. Men kan het aantal koloniën tellen in die buizen, waarin er van 5—50 voorkomen.

Ook boekelscheurbacteriën vormen in dezen agar koloniën. Deze koloniën zijn echter veel kleiner en de vleugels zijn niet zoo diep ingesneden. De kleur is meestal vuil-geelgroen. De aanwezigheid van boekelscheurbacteriën verraadt zich bovendien door gasvorming in de buizen, waardoor de agarkolom soms in stukken verdeeld wordt. Propionzuurbacteriën vormen niet genoeg gistingsgas om den agar te doen scheuren, ook al niet omdat het gas dezer bacteriën koolzuur is en dus in het water opgelost blijft. Indien boekelscheurbacteriën aanwezig zijn, kan men ook door telling van het aantal koloniën in de voor telling geschikte buizen het aantal van deze bacteriën in de kaas bepalen.

Boterzuurbacteriëngroei vindt in dezen agar moeilijk plaats. Bij aanwezigheid van zeer veel boterzuurbacteriën in de kaas is er soms eenige boterzuurgisting in de buizen met 0,1 of 0,01 g kaas.

E. Escherichia coli en Aerobacter aerogenes, de coliachtige bacteriën

Voor het aantonen van deze bacteriën worden de kaassuspensies geënt in buizen met voedingsbodem van Mc. Conkey, welke bestaat uit een oplossing van 20 g pepton Witte en 5 g Na-taurocholaat in 1 l leidingwater, waaraan na verhitten, afkoelen en filtreren wordt toegevoegd 0,5 % glucose en 0,0025 % neutraalrood (2,5 ml van een 1 % oplossing per l). De pH wordt ingesteld op 7,2. Deze vloeistof wordt gesteriliseerd in cultuurbuizen, waarin zich een omgekeerd nauwer glasbuisje van ongeveer 4 cm lengte bevindt (Durhambuisje).

Na enting worden de buizen bij 37° à 38° C geplaatst en na 2 dagen beoordeeld. Het ontstaan van gistingsgas en zuur (roodkleuring) wijst op coliachtige bacteriën. Een zuurvorming alleen wordt veroorzaakt door melkzuurbacteriën. In de buizen, welke met 0,1 g kaas geënt worden, blijft gasvorming somtijds achterwege al is er ontwikkeling van coliachtigen in. Daarom is het nuttig van deze buizen na 2 dagen een uitstrijking te maken op b.v. glucose-vleeschgelatine of Endo-agar om op deze wijze het al of niet aanwezig zijn van coliachtigen te constateeren.

In plaats van de genoemde Mc. Conkey-vloeistof kan men ook andere voedingsbodems, geschikt voor coli, gebruiken, b.v. gentiaanviolet- of brilliantgroen voedingsvloeistof.

F. Overzicht van de beschreven methode

Voedingsbodem	Kweeking	Bewerking	Aangetoonde bacteriën	Beoordeelings-kenmerken
Mc Conkey-vloeistof	Durhambuizen 37°—38° C	—	Coliachtige bacteriën	Gas + zuur
Glucose-vleeschbouillon	Luchtledig gepompte en dichtgesmolten buisjes 30° C	Pasteuriseren op 80° C	Boterzuurbacteriën	Gistingsgas: koolzuur en waterstof. boterzuurgeur.
Pepton-Ca-lactaat pH 4,5		—	Boekelscheurbacteriën	Gistingsgas: koolzuur en waterstof. zoete geur.
Pepton-gistauto-lysaat-Na-lactaat-agar	Buizen met pyrogallolen rubberstop 30° C	—	Propionzuurbacteriën en boekelscheurbacteriën	Groote koloniën: propionzuurbacteriën. Kleine vuilgroene koloniën en gasvorming in de buis: boekelscheurbacteriën.

G. Uitdrukking van het analyseresultaat in cijfers

Het is niet mogelijk om de resultaten van deze bacteriologische analyse in zeer nauwkeurige cijfers op te geven. Bacterietellingen zijn nooit zeer nauwkeurig. De beste resultaten krijgt men als het mogelijk is om koloniën te tellen, dus b.v. in de agarbuizen voor propionzuurbacteriën. De analyse met de verdunningsmethode in vloeistoffen is minder nauwkeurig, tenzij men de verschillende verdunningen in veelvoud zou enten. Bij enting in duplo of triplo is het niet mogelijk om een groote nauwkeurigheid te krijgen. Toch heeft het voordeel om het resultaat der analyse in cijfers uit te drukken, omdat men anders tot omschrijvingen komt, die in eenigszins onduidelijke termen vervat zijn. Men dient echter bij de cijfers te bedenken, dat zij slechts een waarschijnlijkheid uitdrukken.

Voor de bepaling der cijfers uit de gistingsresultaten der vloeistofculturen gebruiken we de tabellen van Mc. Crady, die wij hieronder laten volgen voor bepalingen in tweevoud en in drievoud. ¹⁾

Gistingsbuizen in tweevoud

Kengetal	Aantal	Kengetal	Aantal	Kengetal	Aantal	Kengetal	Aantal
000	0,0	100	0,6	121	3,0	212	20,0
001	0,5	101	1,2	200	2,5	220	25,0
010	0,5	110	1,3	201	5,0	221	70,0
011	0,9	111	2,0	210	6,0		
020	0,9	120	2,0	211	13,0		

Gistingsbuizen in drievoud

Kengetal	Aantal	Kengetal	Aantal	Kengetal	Aantal	Kengetal	Aantal
000	0,0	120	1,1	221	3,0	311	7,5
001	0,3	121	1,5	222	3,5	312	11,5
010	0,3	130	1,6	223	4,0	313	16,0
011	0,6	200	0,9	230	3,0	320	9,5
020	0,6	201	1,4	231	3,5	321	15,0
100	0,4	202	2,0	232	4,0	322	20,0
101	0,7	210	1,5	300	2,5	323	30,0
102	1,1	211	2,0	301	4,0	330	25,0
110	0,7	212	3,0	302	6,5	331	45,0
111	1,1	220	2,0	310	4,5	332	110,0

Voor het gebruik van deze tabellen schrijft men het resultaat van de enting in iedere verdunning op als een cijfer, dat het aantal buizen aan-

¹⁾ Overgenomen uit: K. J. DEMETER, Bakteriologische Untersuchungsmethoden, Berlin 1934.

geeft, dat een positief gistingresultaat gaf. De cijfers der verdunningen worden achter elkander geschreven. Men kiest uit deze reeks van cijfers de 3 opeenvolgende, waarvan de voorste betrekking heeft op de grootste verdunning, waarvan nog alle buizen een positief resultaat geven. Deze 3 cijfers vormen samen het kengetal. In de tabellen vindt men naast het kengetal opgegeven het aantal bacteriën in de verdunning, waarop het voorste cijfer van het kengetal betrekking heeft.

Indien dus bij een analyse, waarbij de kaasverdunningen in drievoud werden geënt, van de geënte buizen er in de 1e (0,1 g kaas), 2e en 3e er 3 een positief resultaat gaven, in de 4e verdunning 2, in de 5e 1 en in de 6e en 7e 0, is dus de gisting voor te stellen als 3332100. Het kengetal is $321 = 15$ bacteriën in de 3e verdunning = 15 000 bacteriën per g kaas.

Bij proeven in enkelvoud kan men slechts opgeven: minstens 10, 100, 1000, enz.

H. Voorbeeldanalyse

Als voorbeeld van het in dit hoofdstuk besprokene geven wij de volledige analyse van een kaas XA2, bereid op 20 Maart 1940, bewaard bij ongeveer 20° C en onderzocht op 1 Mei 1940.

De doorsnede vertoonde talrijke ronde openingen van 7 mm middellijn en 1 groote opening van 30 mm. De pH was in den rand 5,87 en in het midden 5,41; het zoutgehalte (berekend op het vocht van de kaas) resp. 3,0 en 2,6 %.

Mc. Conkey in triplo.

Verd.	a	b	c
1	gas + zuur	gas + zuur	gas + zuur
2	zuur	zuur	zuur
3	„	„	„
4	„	„	„

Gistingsgetal 3000. Kengetal 300. Aantal coliachtigen 25 per g.

Na-lactaat-agar in duplo.

Verd.	Propionzuurbacteriën	Boekelscheurbacteriën
2	ontelbaar vele	niet waargenomen
3	„ „	„ „
4	„ „	„ „
5	7 en 10	„ „
6	1 en 1	„ „
7	0 en 0	„ „

Aantal propionzuurbacteriën 900 000 per g.

Pepton-Ca-lactaat-vloeistof in duplo.

Verd.	Buis	Gisting van	Bij openen
2	a	3 tot 7 Mei	
	b	3 „ 8 „	explosie, boterzuurgeur
3	a	5 „ 9 „	explosie, geen boterzuurgeur

	b	5	„	11	„	12 ml gas, w.o. de helft waterstof
4	a	6	„	11	„	geen explosie, zoete- en azijnzuurgeur
	b	7	„	11	„	6 ml gas, w.o. waterstof.
5, 6 en 7	—					—

Uit gasanalyse en geur van verdunning 4 wordt afgeleid, dat ongeveer 25 000 boekelscheurbacteriën per g aanwezig zijn. Daar het aantal propionzuurbacteriën veel hoger was, konden de koloniën der boekelscheurbacteriën niet in de agarbuizen worden gevonden.

Glucose-bouillon in enkelvoud.

Verd.	Gisting van	Bij openen
1	4 tot 5 Mei	explosie, boterzuurgeur
2	idem	„ „
3	5 „ 7 „	„ „
4	6 „ 7 „	„ „
5 en 6	—	— „

Aantal boterzuurbacteriën minstens 10 000 per g.

Wij vonden dus in deze kaas per g: 25 coliachtige bacteriën, 900 000 propionzuurbacteriën, 25 000 boekelscheurbacteriën en 10 000 boterzuurbacteriën.

4. Resultaten van het onderzoek van verschillende kazen

Op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze werden in de jaren 1939, 1940 en 1941 tal van kazen onderzocht. Hierbij waren 85 kaasmonsters uit de praktijk, welke wij tot het verkrijgen van meer inzicht in de gistingsverschijnselen op kaaskeuringen verzamelden of welke ons werden toegezonden om de oorzaak der gisting op te sporen, en 289 proefkazen, welke wij zelf voor verschillende doeleinden op het bedrijf der Proefzuivelboerderij bereidden.

Uit dit groote materiaal bespreken wij hieronder 75 praktijkkazen en 80 proefkazen, n.l. die, welke ongeveer 5—7 weken oud waren; wij mochten wel aannemen, dat de gistingsverschijnselen op dien tijd reeds duidelijk waren en dat aan de andere zijde de bacteriën, die de gistingen veroorzaakt hadden, nog niet in de periode van afsterven waren, behalve de coliachtige bacteriën.

Bij de allermeeeste analyses werd nog niet gebruik gemaakt van de pepton-Ca-lactaat-vloeistof van pH 4,5, doch van een van pH 5,5.

A 1. Kazen met **weinig propionzuurbacteriën**; boekelscheur- en boterzuurbacteriën afwezig

In deze groep rangschikten wij 45 kazen, n.l. 21 praktijkkazen en 24 proefkazen, waarvan het aantal propionzuurbacteriën en coliachtige bacteriën beneden 10 000 per g was.

De gemiddelde pH der kazen was 5,17 in het midden en 5,15 in den rand met een spreiding als in figuur 1 aangegeven.

Al deze kazen waren gekarakteriseerd door weinig openingen in het zuivel. 8 waren geheel gesloten; sommige hadden maakgaatjes, andere kleine ronde openingen en ongeveer de helft vertoonde kleine scheurtjes.

Het tamelijk veelvuldig voorkomen van scheurtjes hangt samen met den lagen pH der kazen. Door de onbeteekenende gasvorming konden de in de wrongel ingesloten maakgaatjes onveranderd van vorm in de kaas blijven bestaan, zoodat zij ook in deze oudere kaas nog als maakgaatjes herkend konden worden.

In de foto's 2, 3 en 4 geven wij enkele voorbeelden van kazen uit deze groep met vermelding van het analyseresultaat.

A 2. Kazen met tamelijk veel propionzuurbacteriën; boekelscheur- en boterzuurbacteriën afwezig

Deze groep bestond uit 21 kazen, n.l. 9 praktijkkazen en 12 proefkazen en wij brachten er die onder, die minder dan 10 000 coliachtige bacteriën per g bevatten en 10 000 à 100 000 propionzuurbacteriën.

De gemiddelde pH dezer kazen was 5,29 in het midden en 5,25 in den rand met een spreiding als blijkt uit figuur 1.

In deze kazen was reeds iets van gasvorming te bespeuren. Dichte kazen en kazen met alleen maakgaatjes kwamen in deze groep niet voor. In 5 kazen kwamen scheurtjes voor; meestal waren dit de kazen van den laagsten pH in deze groep. In 15 gevallen waren ronde openingen aanwezig, welke bij 2 duidelijk herkend konden worden als later door de zwakke gisting opgeblazen maakgaatjes en 4 waar ronde openingen en maakgaatjes naast elkaar voorkwamen. De ronde openingen waren bij de meeste kazen klein; slechts bij 3 kazen waren enkele openingen van meer dan 6 mm doorsnede aanwezig.

Voorbeelden vindt men in de foto's 5 en 6.

A 3. Kazen met veel propionzuurbacteriën; boekelscheur- en boterzuurbacteriën afwezig

In deze groep verzamelden wij 7 kazen, n.l. 3 praktijk- en 4 proefkazen, met minder dan 10 000 coliachtige en 100 000 tot 1 000 000 propionzuurbacteriën per g.

De gemiddelde pH der kazen was 5,41 in het middendeel en 5,35 in het randgedeelte met een spreiding als in figuur 1 is aangegeven.

De gasvorming was in deze groep duidelijk sterker dan in de vorige groep. Scheurtjes kwamen niet voor; slechts ronde openingen en gedeeltelijk opgeblazen maakgaatjes werden aangetroffen.

Zie foto 7.

A 4. Kazen met zeer veel propionzuurbacteriën; boekelscheur- en boterzuurbacteriën afwezig

Van de onderzochte kazen waren er 16, n.l. 9 praktijk- en 7 proefkazen, die per g minder dan 10 000 coliachtigen en meer dan 1 000 000 propionzuurbacteriën bevatten.

Bij 12 dezer kazen was het aantal propionzuurbacteriën minder dan 10 miljoen, bij 2 was het meer dan 100 miljoen.

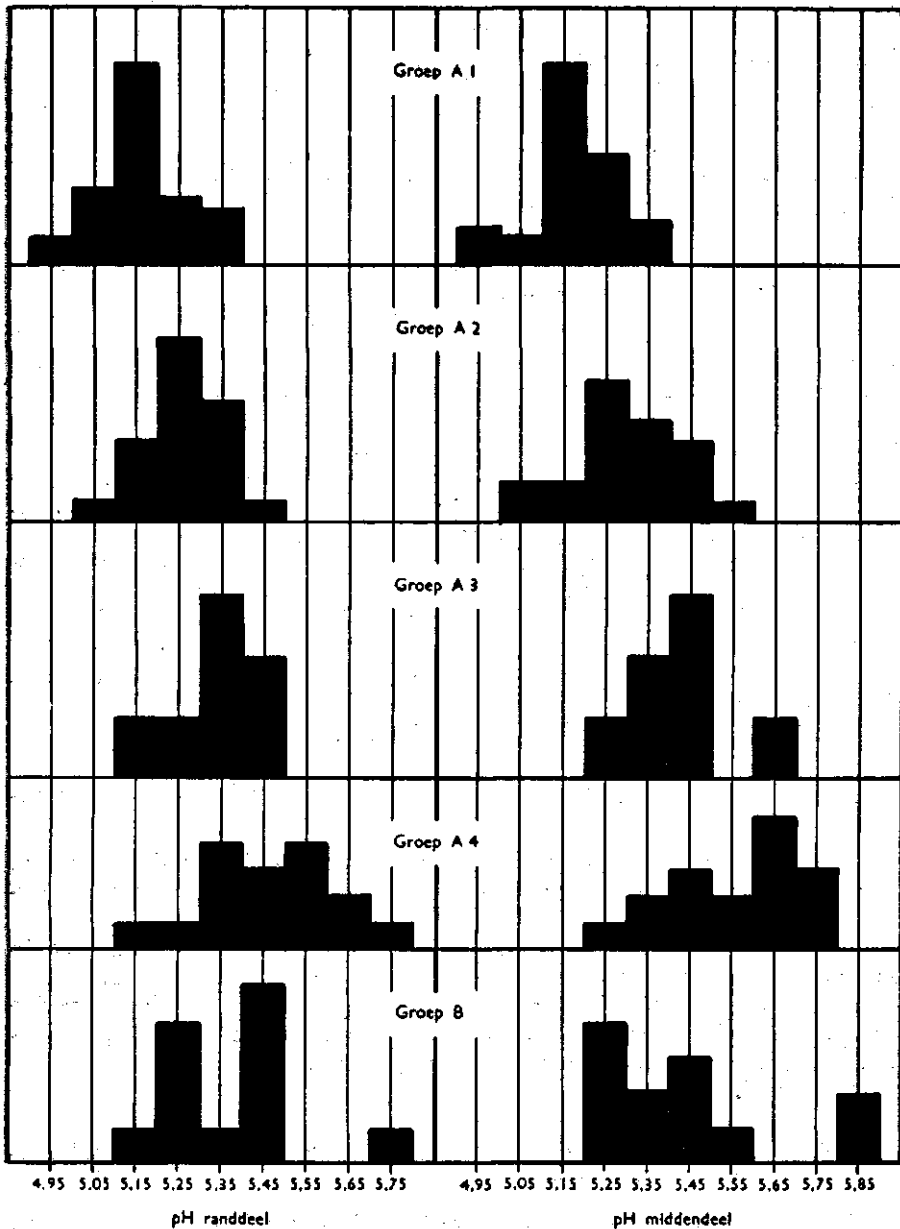


Fig. 1. Percentage der kazen in de groepen A 1, A 2, A 3, A 4 en B, vallende in de pH-gebieden 4,90—4,99; 5,00—5,09 enz., zoowel voor rand- als middendeel.

De gemiddelde pH van deze kazen was 5,56 in het midden en 5,45 in den rand met een spreiding als in figuur 1.

De kazen uit deze groep hadden alle sterke gasvorming, die zich uitte òf door een groot aantal kleine ronde openingen òf door tamelijk veel groote ronde oogen. In de gevallen van groote openingen waren deze oogen door het liggen der kaas dikwijls eenigszins vervormd. In de kazen van Goudsch model waren meer of grooter openingen aanwezig dan in de kazen van Edammer model, wat wel samenhangt met de geringere mogelijkheid van volumevergroting van een bolvormige kaas, waardoor een grootere gasdruk noodig is om openingen te vormen.

De foto's 8 en 9 geven enkele voorbeelden.

B. Kazen met **veel coliachtige bacteriën**; boekelscheur- en boterzuurbacteriën afwezig

Onder de onderzochte kazen van 5—7 weken oud kwamen er 12 voor, n.l. 8 practijk- en 4 proefkazen, waarin meer dan 10 000 coliachtige bacteriën per g aangetroffen werden. Hierbij waren er 8 met 10 000 à 100 000, 2 met 100 000 à 1 000 000 en 2 met meer dan 1 000 000 coliachtige bacteriën.

Slechts bij 2 kazen lag het aantal propionzuurbacteriën beneden 1000 per g; voor de anderen was het boven 10 000; bij 6 was het boven 1 000 000.

De pH van het middendeel was bij deze 12 kazen gemiddeld 5,45; die van het randdeel 5,38. De spreiding was als in figuur 1. Zien we af van een paar kazen met abnormaal hoge pH-waarden, dan was de gemiddelde pH dezer kazen in het middendeel 5,36 en in het randdeel 5,34. Zelfs als we de gevallen met den hoogsten pH niet mederekenen, is de pH der colibevattende kazen tamelijk hoog en valt ongeveer samen met dien van groep A 3.

In alle kazen van deze groep was tamelijk veel gasvorming zichtbaar. Zie foto's 10 en 11. Vele kazen hadden niet het aanzien van vroeg-los-kazen, omdat door de later opgetreden propionzuurgisting de eventueel na de coligisting aanwezige onregelmatige coligistingsgaatjes tot ronde of bijna ronde oogen of oogjes waren opgeblazen. Door de propionzuurgisting was dus het karakter van coligisting verloren gegaan, hoewel toch nog in 8 van de 12 kazen hier en daar onregelmatig gevormde gaatjes werden gevonden. Een typische vroeg-los-doorsnede ziet men slechts in oudere kaas, waarin geen nagistingen optraden of in jonge kaas, waarin nog geen nagisting plaats had. Bij 2 van zulke jonge vroeg-los-kazen vonden wij 450 000 coliachtige bacteriën bij een pH van 5,29, resp. 5,34 in het middendeel.

C. Kazen met **boekelscheurbacteriën**; boterzuurbacteriën afwezig

Van de onderzochte kazen behoorden er 23 tot deze groep, n.l. 13 practijk- en 10 proefkazen. Naast boekelscheurbacteriën waren in deze kazen steeds propionzuurbacteriën aanwezig, omdat propionzuurbacteriën nu eenmaal altijd in kaas voorkomen.

In 8 kazen was het aantal boekelscheurbacteriën beneden 10 000 per g (10—6000). Het aantal propionzuurbacteriën in deze kazen was ook laag; n.l. beneden 2000; slechts in 2 kazen was dit 20 000 en 100 000. In overeenstemming met dit geringe aantal gistingsbacteriën kwamen deze kazen in eigenschappen veel overeen met die in groep A 1. Er waren dus kazen bij met maakgaatjes, met enkele ronde openingen en met enkele kleine scheurtjes. De gemiddelde pH van deze kazen was dan ook 5,21 in het midden en 5,18 in den rand.

Bij deze groep kazen waren er enkele met onregelmatige openingen van tamelijk groote afmetingen. Daar de aantallen gistingsbacteriën (ook coliachtigen, die slechts tot een aantal van hoogstens 500 per g voorkwamen) zóó gering zijn, dat moeilijk kan worden aangenomen, dat deze gaten gistingsopeningen zijn, zijn dus ook deze openingen waarschijnlijk maakgaatjes.

Enkele voorbeelden geven de foto's 12 en 13.

In 8 kazen werden meer dan 10 000 boekelscheurbacteriën per g aangetroffen naast slechts weinig propionzuurbacteriën (hoogstens 2500). Gemiddelde pH dezer kazen 5,25 in het midden, 5,15 in den rand. Voor zoover deze kazen een lagen pH hadden en maakgaatjes afwezig waren, waren er scheuren in ontstaan (zie foto 14). De kazen met hooger pH hadden echter ronde openingen. Bij een der kazen waren, hoewel 250 000 boekelscheurbacteriën per g gevonden werden, geen nagistingsverschijnselen waar te nemen. Deze kaas had echter zeer groote onregelmatige openingen, zoodat het weinige door de gisting ontstane gas zich over deze openingen kon verdeelen zonder deze van karakter te veranderen.

Het grootste aantal in deze groep kazen gevonden boekelscheurbacteriën bedroeg 10 000 000 per g kaas. Deze kaas, een van Goudsch model, had een scheur, evenwijdig aan de vlakke zijden, die bijna door de geheele kaas heenliep.

Bij 7 kazen werd naast een aantal boekelscheurbacteriën van meer dan 10 000 per g ook een aantal propionzuurbacteriën boven 10 000 gevonden. In deze kazen, die alle een hoogen pH hadden (gemiddeld 5,55 in het midden en 5,40 in den rand), had de gemengde gisting van boekelscheuren propionzuurbacteriën in het algemeen ronde gistingsopeningen doen ontstaan (zie foto 15).

Het hoogste aantal boekelscheurbacteriën, bij deze 7 kazen aangetroffen, was 1 000 000 per g. De sterkste gisting had plaats gevonden in een kaas met 600 000 boekelscheurbacteriën per g, die er geheel als een knijper uitzag (zie foto 16).

Groote aantallen coliachtige bacteriën werden niet gevonden. Het hoogste aantal was 4500.

D. Kazen met **boterzuurbacteriën**; boekelscheurbacteriën afwezig

Er waren 28 kazen, die in deze groep vielen, n.l. 11 praktijkkazen en 17 proefkazen. Het aantal boterzuurbacteriën, dat gevonden werd, liep uiteen van 10 tot 2 500 000, n.l.:

- in 4 kazen 100 of minder,
- in 6 kazen 100 à 1000,



Foto 1. Buizen met voedingsvloeistof na vernauwing tot een capillair en na luchtledig pompen en dichtsmelten, de laatste in gisting

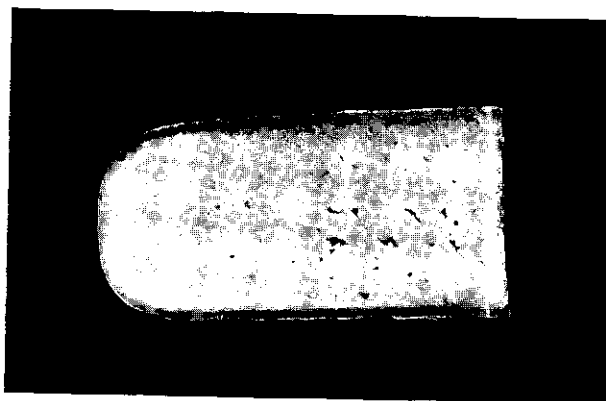


Foto 2. Practijkaas Z O U
 Geen colibacteriën
 700 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

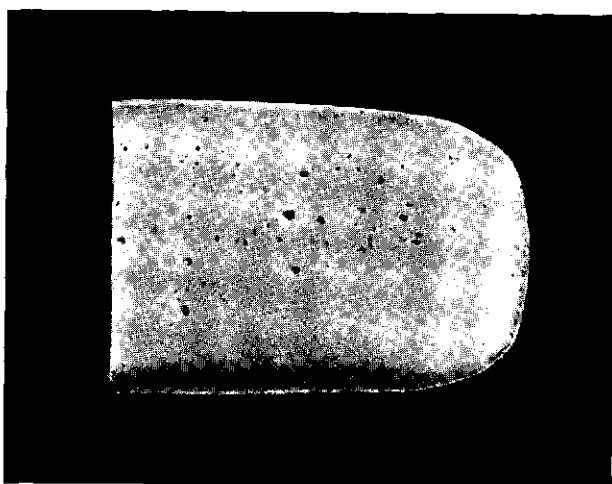


Foto 3. Practijkaas U I 10
 250 colibacteriën
 100 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

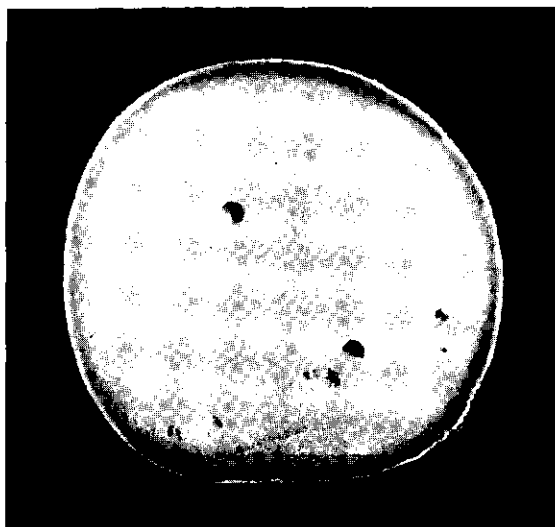


Foto 4. Proefkaas D a 1
 450 colibacteriën
 5000 propionzuurbacteriën
 Geen boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën



Foto 5. Practijkaas U II 3
 45 colibacteriën
 60 000 propionzuurbacteriën
 Geen boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

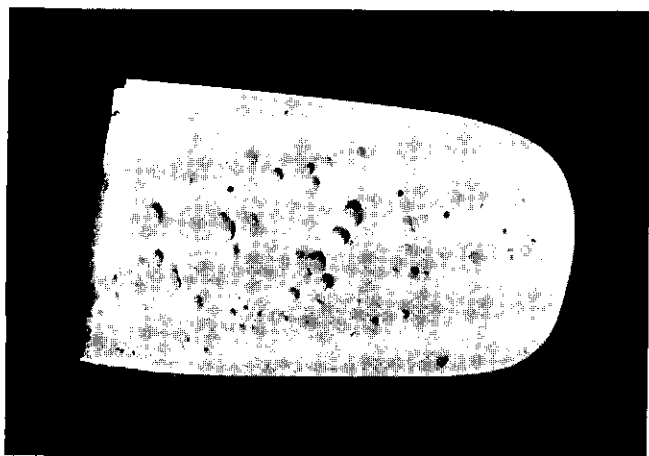


Foto 6. Practijkaas U I 22
 450 colibacteriën
 13 000 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën



Foto 7. Practijkaas U III 9
 45 colibacteriën
 300 000 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

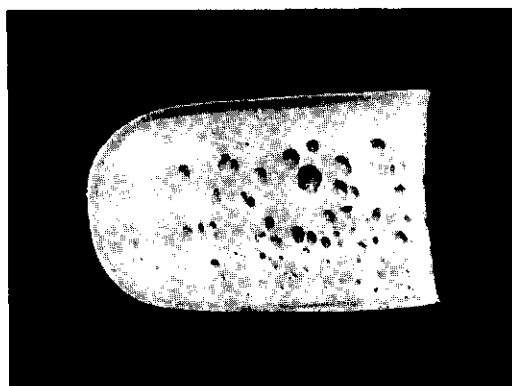


Foto 8. Practijkaas U II 7
 Geen colibacteriën
 3 000 000 propionzuurbacteriën
 Geen boekelscheurbacteriën
 5 boterzuurbacteriën



Foto 9. Proefkaas B 1
 250 colibacteriën
 300 000 000 propionzuurbacteriën
 Geen boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën



Foto 10. Practijkaas U III 33
 15 000 colibacteriën
 33 000 propionzuurbacteriën
 Geen boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën



Foto 11. Practijkaas XIV
 250 000 colibacteriën
 3 700 000 propionzuurbacteriën
 Geen boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

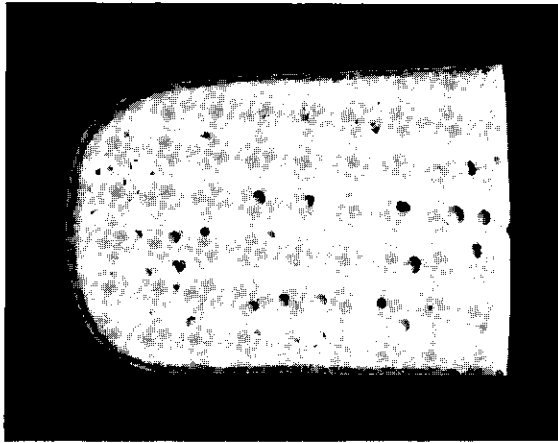


Foto 12. Practijkskaas F I 54
 450 colibacteriën
 1500 propionzuurbacteriën
 250 boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

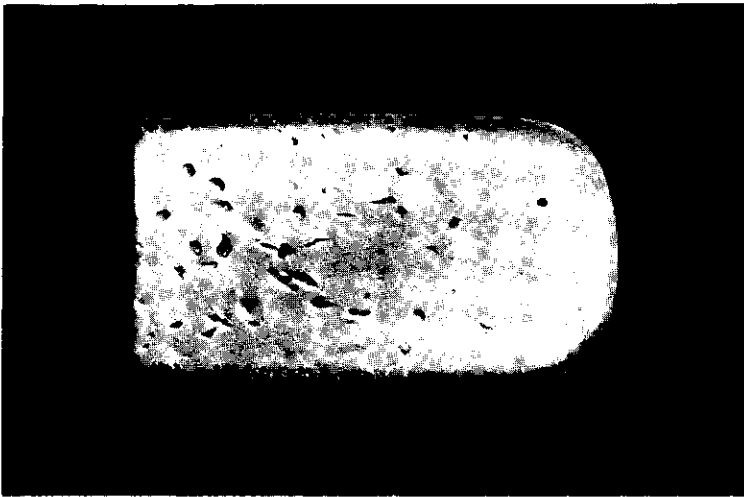


Foto 13. Practijkskaas F II 50
 75 colibacteriën
 1000 propionzuurbacteriën
 6000 boekelscheurbacteriën
 6 boterzuurbacteriën

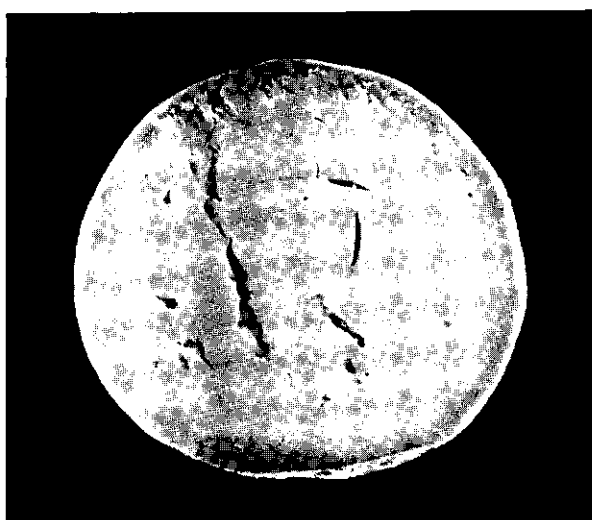


Foto 14. Proefkaas V 5
 Geen colibacteriën
 1000 propionzuurbacteriën
 2 000 000 boekelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën

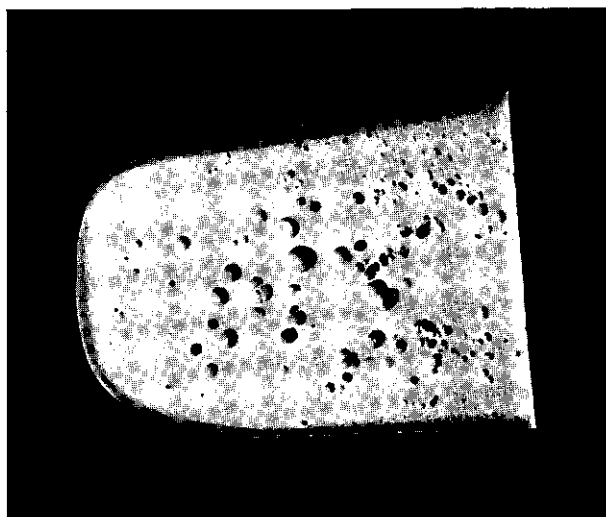


Foto 15 Practijkaas VIII
 450 colibacteriën
 140 000 propionzuurbacteriën
 600 000 boekelscheurbacteriën
 13 boterzuurbacteriën



Foto 16. Practijkaas X
 Geen colibacteriën
 15 000 propionzuurbacteriën
 600 000 boeckelscheurbacteriën
 Geen boterzuurbacteriën



Foto 17. Practijkaas 8
 Kaas met ronde openingen en randseheur

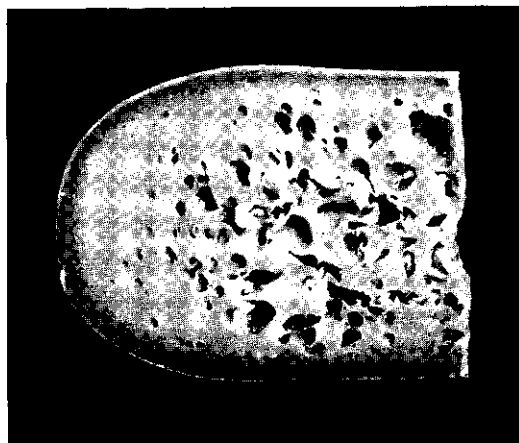


Foto 18. Practijkaas IX
 Geen colibacteriën
 10 000 000 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 2 500 000 boterzuurbacteriën

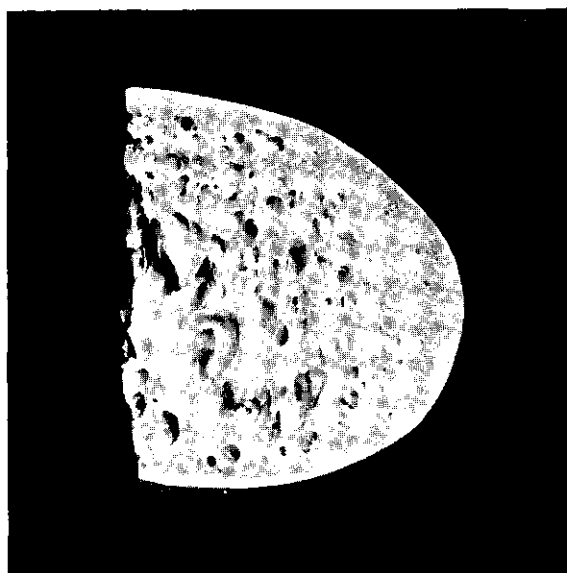


Foto 19. Practijkaas V
 Geen colibacteriën
 30 000 000 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 600 000 boterzuurbacteriën

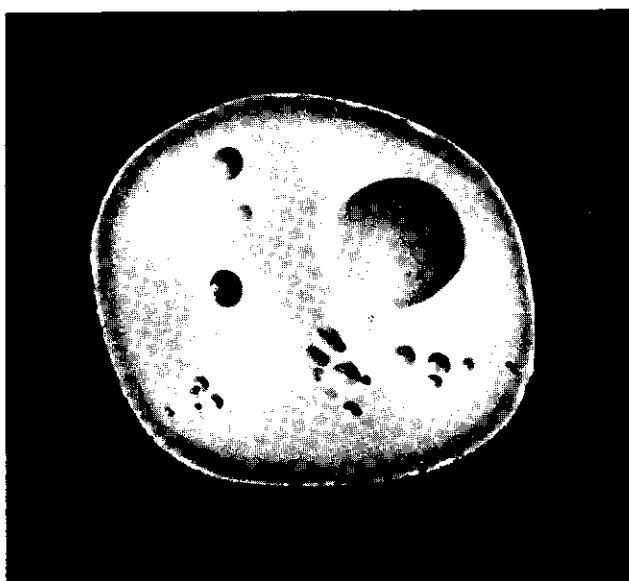


Foto 20. Proefkaas D b 1
 45 colibacteriën
 19 000 000 propionzuurbacteriën
 Geen boeckelscheurbacteriën
 1000 boterzuurbacteriën

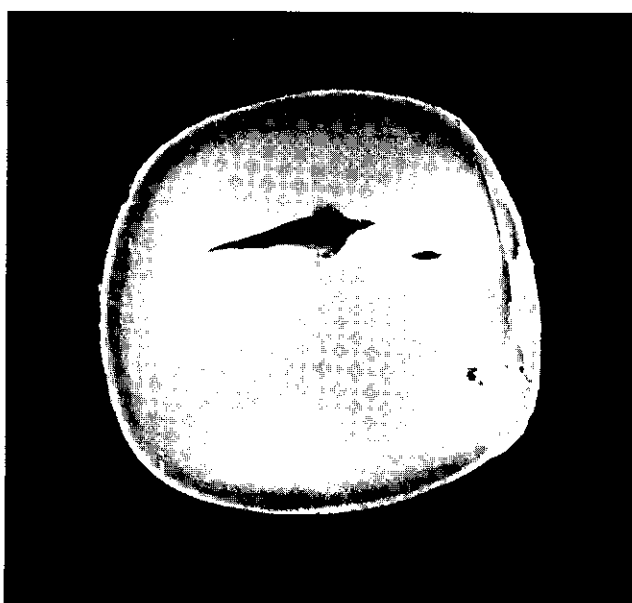


Foto 21. Proefkaas V b 1
 Plaatselijke boterzuurgisting

in 5 kazen 1000 tot 10 000,
 in 3 kazen 10 000 tot 100 000,
 in 8 kazen 100 000 tot 1 000 000 en
 in 2 kazen meer dan 1 000 000 per g.

Voor al bij boterzuurbacteriën moet men de aantallen niet letterlijk nemen. De werkelijke aantallen aanwezige levende boterzuurbacteriën of sporen kunnen zeer veel hooger zijn, daar het percentage sporen, dat in de onderzoekingsvoedingsbodems tot ontkieming en groei komt, betrekkelijk klein is en voor verschillende boterzuurbacteriënstammen sterk uiteen kan loopen. Toch kwam in de onderzochte kazen wel in groote trekken tot uiting, dat de gasvorming op het oogenblik van onderzoek sterker was naarmate meer boterzuurbacteriën werden gevonden.

De verschijningsvorm van de gisting was zeer verschillend. De typische knijper, waarbij door enkele groote scheuren het zuivel uiteen gereten wordt, kwam slechts zelden voor. Wel werden herhaaldelijk in de kazen met boterzuurbacteriën kleinere of grootere scheurtjes aangetroffen, doch meestal uitte de gisting zich door de vorming van ronde gaten, soms door het liggen eenigszins onregelmatig geworden. Dit hangt samen met den zuurgraad van de kaas. De kazen met scheurtjes hadden alle een lagere pH, die met ronde openingen een hooger pH. Toch komt het bij kazen, waarvan de pH zóó hoog is, dat men slechts ronde openingen zou verwachten, voor, dat scheuren gevormd worden. Deze scheuren bevinden zich dan echter in het overgangsgebied naar het randgedeelte van de kaas, omdat de kaas daar door het hogere zoutgehalte minder plastisch is. Dikwijls zijn deze scheuren in of bij het randgedeelte zelfs geen eigenlijke gistingsscheuren, zooals de knijperscheuren dat zijn, maar ontstaan zij door een mechanische oorzaak, n.l. door de spanningen, die in de kaasmasa optreden bij het wegdrukken van het zuivel door de gasholten (zie ook hoofdstuk 2). Door de grootere uitwijkmogelijkheid van de kaasmasa bij Goudsche kaas komen dergelijke scheuren meestal bij deze kaassoort voor. Zij loopen dan ook bijna altijd uit het middendeel naar een punt, waar de platte zijde overgaat in den bollen zijkant (foto 17).

Bij een flinke boterzuurgisting komen in de kaas ook steeds veel propionzuurbacteriën voor, daar de boterzuurgisting pH-verhoogend werkt en dus het midden van de kaas beter geschikt maakt voor een sterken groei van propionzuurbacteriën. Het algemeene verband tusschen pH en aantal propionzuurbacteriën blijft ook bij kazen met boterzuurgisting bestaan.

Bij de kazen met boterzuurbacteriën was bij die, welke een pH in den rand hadden van:

5,10—5,25 de gemiddelde pH in den rand	5,20	en die in het midden	5,29,
5,26—5,40	5,33		5,47 en
boven 5,40	5,53		5,68.

De verschillen tusschen de in het randgedeelte en in het middengedeelte gevonden pH-waarden waren bij deze kazen dus niet zoo groot als vroeger bij proefkazen wel geconstateerd waren (2).

De foto's 18, 19 en 20 geven enkele voorbeelden.

E. Kazen met alle gistingsorganismen

In 3 kazen, waarvan 1 praktijkkaas, werden duizenden propionzuurbacteriën, boekelscheurbacteriën en boterzuurbacteriën gevonden. In deze kazen kwamen slechts 25 coliachtigen per g voor. Daar van deze kazen de pH tamelijk hoog was, werden hoofdzakelijk ronde openingen aangetroffen.

5. Conclusies der verrichte analyses

Het is bij het bacteriologisch onderzoek der kazen gebleken, dat de gebruikte methode voor het opsporen van gistingsbacteriën bevredigende resultaten geeft, zoodat zij goede diensten kan bewijzen om bij bedrijfsstoornissen aan te wijzen aan welke bacteriesoort de storing geweten moet worden, hetgeen bij de bestrijding van belang is. De wijze van bestrijding is n.l. afhankelijk van de bacteriesoort.

Hoe hardnekkig zich boekelscheurbacteriën b.v. in een bedrijf kunnen vastzetten, bleek uit een onderzoek van 2 kazen uit eenzelfde bedrijf. Bij de eerste kaas, onderzocht in Maart (de kaas was bereid in December), werden bij een pH in het randgedeelte van 5,39 en in het middengedeelte van 5,59 gevonden per g: 25 coliachtige bacteriën, 18 000 propionzuurbacteriën, 10 000 boekelscheurbacteriën en 100 boterzuurbacteriën. De tweede kaas, in den zomer bereid, werd in September onderzocht. Toen werden bij pH-waarden van 5,30 en 5,46 per g 450 coliachtige, 140 000 propionzuur-, 600 000 boekelscheur- en 13 boterzuurbacteriën gevonden.

Anderzijds werden bij kazen uit eenzelfde bedrijf, waarvan de bereidingsdata 2 maanden verschilden, dikwijls groote verschillen in de aantallen gistingsbacteriën gevonden, waarvan onderstaande tabel een duidelijk beeld geeft.

	pH		Zout- gehalte	Bacteriën per g			
	rand	midden		Coliachtige	Propionzuur-	Boekel- scheur-	Boter- zuur-
1e kaas	5,42	5,50	4,3	1 000 000	4 000 000	0	0
2e "	5,15	5,21	5,3	0	3 000 000	0	5
1e "	5,28	5,35	5,5	0	80 000	0	0
2e "	5,29	5,41	3,0	4 000	17 000	0	0
1e "	5,37	5,49	5,4	1 000 000	300	0	0
2e "	5,17	5,28	3,7	95	100	0	0
1e "	5,25	5,32	4,6	14 000	120 000	0	0
2e "	4,98	5,11	5,2	9	3 100	0	0

Hoewel de methode van onderzoek een goed beeld van den bacteriologischen toestand van kaas kan geven, kent zij toch ook hare beperkingen. Bij aanwezigheid van een der nagistingsbacteriën in overmaat is het dikwijls moeilijk de anderen aan te toonen. Vooral boekelscheurbacteriën zijn dan moeilijk te vinden.

Ook moet men zich b.v. verder wel bewust zijn, dat zij bij oude kaas

niet meer toegepast kan worden om een verklaring te geven van opgetreden gasvorming, omdat in oude kaas de bacteriën, die de gasvorming veroorzaakten, kunnen zijn afgestorven. Wel krijgt men een oordeel over den toestand op het oogenblik van onderzoek, doch men mag bij oudere kaas uit de afwezigheid van bepaalde bacteriën niet besluiten, dat deze eerder ook niet aanwezig waren. Wij hebben daarom gezocht of de bacteriologische analyse door een scheikundige kon worden aangevuld en vervolmaakt. Met name leek het mogelijk om door een analyse van vluchtige vetzuren in kaas door het aantoonen van boterzuur en propionzuur een plaats gehad hebbende boterzuur- of propionzuurgisting aan het licht te brengen. Dit mocht echter niet slagen, omdat bij het ouder worden van kaas ook door vetsplitsing lagere vluchtige vetzuren ontstaan. De gasanalyse kan ons hierin evenmin verder brengen, omdat de aanwezigheid van waterstof in het gistingsgas aan 3 verschillende gasvormende bacteriën kan worden toegeschreven. Dikwijls is een groot pH-verschil tusschen rand- en middendeel der kaas een aanwijzing voor boterzuurgisting. Het verschil hangt echter af van de intensiteit der gisting en de meer of mindere uitbreiding van de gisting naar den rand toe.

Tenslotte willen wij nog een aantal conclusies opsommen, die bij het onderzoek der kazen aan het licht zijn gekomen.

I. De oude ervaring, dat de kans op scheurtjes in de kaas grooter is bij lagen pH en de kans op ronde gistingsopeningen bij hoogen pH, werd ook weer bij de onderzochte kazen bevestigd. Daar scheuren of scheurtjes naar verhouding van hun afmetingen minder gistingsgas kunnen bergen dan bolvormige (ronde) openingen, kan reeds een zeer geringe gasontwikkeling in kazen van lagen pH aanleiding geven tot het ontstaan van scheurtjes van eenige afmeting. Ook in de kazen van de groep A 1, dat waren kazen met weinig gistingsbacteriën en waarin geen boekelscheur- of boterzuurbacteriën konden worden aangetoond, vinden we er zelfs reeds met scheurtjes.

II. Alle onderzochte kazen bevatten propionzuurbacteriën. In ons artikel over propionzuurbacteriën (3) hebben wij reeds de aandacht gevestigd op het feit, dat deze bacteriën altijd in het zuivelbedrijf voorkomen. Het aantal in kaas voorkomende propionzuurbacteriën is zeer verschillend en kan varieeren tusschen 0 en enkele honderden millioenen.

Uit de gemiddelde pH-cijfers voor de kazen uit de groepen A 1, A 2, A 3 en A 4, waarin slechts propionzuurbacteriën als nagistingsbacteriën werden aangetroffen, blijkt, dat meer propionzuurbacteriën aanwezig zijn, naarmate de pH van de kaas hooger is, zulks in overeenstemming met wat wij hierover vroeger vonden. Propionzuurbacteriën zijn inderdaad nagistingsbacteriën, hetgeen daaruit blijkt, dat in deze 4 groepen de gasvorming toeneemt, naarmate het aantal propionzuurbacteriën grooter is. Voor individueele gevallen gaat deze regel evenwel niet op, zooals wij in ons artikel over propionzuurbacteriën reeds verklaard hebben. Sterke gistingsverschijnselen treden pas op bij groote aantallen propionzuurbacteriën. Daar groote aantallen gewoonlijk gepaard gaan met een hoogen pH der

kaas, zal een flinke propionzuurgisting altijd ronde openingen in het zuivel veroorzaken. Daar in zure kaas slechts weinig propionzuurbacteriën tot ontwikkeling kunnen komen, waardoor slechts weinig gistingsgas kan ontstaan, welk gas bovendien het gemakkelijk oplosbare koolzuur is, is de kans op het ontstaan van scheurtjes door propionzuurbacteriën gering. Wij bezitten wel enkele aanwijzingen, dat het in sommige gevallen mogelijk is.

III. Boekelscheurbacteriën (lacaatvergistende melkzuurbacteriën) zijn niet in alle kazen aantoonbaar. Van 75 practijkkazen vonden wij in 14 kazen uiteenlopende aantallen van deze bacteriën. Daaruit besluiten wij, dat zij niet tot de normale flora van het zuivelbedrijf behooren, doch dat hun voorkomen moet samenhangen met een besmetting van de kaasmelk, die blijkbaar vermeden kan worden.

Het voorkomen en de groei van boekelscheurbacteriën in kaas is onafhankelijk van den pH. Men kan ze zoowel in kaas van hoogen als in kaas van lagen pH vinden. Daarom kunnen zij ronde openingen en scheurtjes in kaas veroorzaken. Omdat ronde openingen in kaas met hoogen pH ontstaan, moet men aannemen, dat dan ook propionzuurbacteriën aan de gasvorming hebben deelgenomen. Daar de boekelscheurbacteriën in kaas van lagen pH kunnen groeien, zullen scheurtjes in kaas, voor zoover ze niet door boterzuurbacteriën veroorzaakt zijn, dus veelal aan boekelscheurbacteriën geweten kunnen worden, juist ook omdat in hun gistingsgas de in kaasvocht onoplosbare waterstof voorkomt. De gisting door deze bacteriën neemt slechts in weinig gevallen een ernstig karakter aan.

IV. In 12 practijkkazen vonden wij boterzuurbacteriën. Dit aantal mag hoog lijken (16 %), doch men moet bedenken, dat de onderzochte kazen geen beeld geven van de gemiddelde productie, daar zij of door ons wegens hun gasvorming voor onderzoek werden uitgekozen of voor dit doel werden ingezonden.

Boterzuurbacteriën, die zeer gevaarlijk in het zuivelbedrijf zijn, komen in de kaas als gevolg van een besmetting.

Boterzuurbacteriëngroei kan men aantreffen in kaas met hoogen pH en in kaas met lagen pH. De gistingsverschijnselen, die zij in kaas veroorzaken, hebben een zeer verschillend aanzien. Bij lagen pH overwegen de scheuren (knijper), bij hoogen pH de ronde openingen. Zeer groote ronde holten en groote onregelmatig gevormde gistingsopeningen treft men eveneens aan.

V. Coliachtige bacteriën kunnen ook in kazen van 5 à 7 weken nog in groote aantallen voorkomen. Van de 75 onderzochte practijkkazen waren er 16 geheel vrij van, terwijl 23 kazen wel coliachtigen, doch minder dan 100, en 27 meer dan 100, doch minder dan 10 000 per g bevatten. Slechts 9 der kazen bevatten meer dan 10 000 coliachtige bacteriën. In geen enkele der 75 kazen was een coligisting als zoodanig te herkennen. Daar de kazen met veel coli alle een tamelijk hoogen pH hadden, was ten gevolge van de nagisting door propionzuurbacteriën het voor coligisting karakteristieke beeld van onregelmatige openingen overgegaan in ronde openingen. Slechts in enkele gevallen kon door het voorkomen van onver-

anderde coligaatjes in het randdeel of door het groote aantal ronde openingetjes besloten worden tot een voorafgegane coligisting, doch in dergelijke kaas zijn coligaatjes dikwijls moeilijk van maakgaatjes te onderscheiden.

De kazen, welke bij een ouderdom van 6 weken nog een groot aantal coliachtige bacteriën bevatten, hadden vrijwel alle een tamelijk hoogen pH. Dit kan twee oorzaken hebben. De eene oorzaak betreft de mogelijkheid van een sneller afsterven van coli naarmate de pH van de kaas lager is, de tweede betreft een verbruik van melksuiker door coliachtigen, hetwelk daardoor aan de zuurvorming door melkzuurbacteriën wordt onttrokken.

Bij analyses van proefkazen zagen wij steeds een regelmatig afsterven van colibacteriën tijdens het bewaren, b.v. als in de navolgende tabel:

Ouderdom	Kaas N		Kaas X		Kaas O	
	pH midden	coli per g	pH midden	coli per g	pH midden	coli per g
5 dagen	4,98	750	5,11	45 000	5,16	450 000
20 "	5,11	95	5,10	15 000	5,32	250 000
40 "	5,23	45	5,23	25	5,45	9 500
60 "	5,33	0	5,28	4	5,53	4 500

Er bleek hierbij echter niet duidelijk, dat de snelheid van afsterven van den pH der kaas afhankelijk is. Wel kan geconcludeerd worden dat, als kaas van 6 weken oud nog veel colibacteriën bevat, het coliaantal in de kaas, toen deze nog jong was, zeer hoog geweest moet zijn. De kazen uit de groep B zijn dus ongetwijfeld vroeg-los geweest, al viel dit door de later opgetreden nagisting niet gemakkelijk meer te herkennen. Uit den hoogen gemiddelden pH dezer kazen volgt dus, dat de tegelijk met de melkzuurgisting verloopende coligisting door de ongewenschte ontleding van melksuiker een nadeeligen invloed op den pH der kaas heeft. Er is bij deze beschouwing sprake van een gemiddelden pH. Er mag dus niet uit afgeleid worden, dat alle kazen met vroeg optredende gasvorming een hoogen pH zullen bezitten.

VI. Tusschen rand- en middendeel van kaas bestaat bijna altijd een pH-verschil. Dit verschil kan soms inzicht geven in de gistingen.

Beschouwen we de gemiddelde cijfers van den pH in de verschillende groepen, dan is in

groep A₁ de pH van het midden 0,02 hooger dan dien van den rand,

" A₂ " " " " " " 0,04 " " " " " "

" A₃ " " " " " " 0,06 " " " " " "

" A₄ " " " " " " 0,11 " " " " " "

Naarmate het aantal propionzuurbacteriën hooger is des te grooter is dus dit verschil.

Bij aanwezigheid van veel boekelscheurbacteriën is het gemiddelde verschil groter, n.l. 0,10 voor de kazen met daarnaast weinig, en 0,15 voor die met veel propionzuurbacteriën. In de kazen met slechts weinig boekelscheurbacteriën was het verschil uiteraard klein, n.l. 0,03, dus ongeveer als bij de groepen A 1 en A 2.

Ook bij boterzuurgisting is het verschil in pH tusschen rand- en midden, als gevolg van de lactaatvergisting in het midden der kaas, groter, n.l. bij de kazen met lagen pH 0,09 en die van hooger pH 0,15.

VII. Bij de onderzochte practijkkazen waren 58 afkomstig uit het gebied der Goudsche boerenkaasbereiding, terwijl 17 monsters Friesche fabriekskaas betroffen. De laatste vielen alle in groep A (weinig gistingsbacteriën). Zij bevatten dus ook weinig propionzuurbacteriën. Dit hangt samen met den gemiddeld lageren pH, dien deze kazen hadden. Merkwaardig was evenwel, dat bij 41 % van deze Friesche kazen boekelscheurbacteriën werden aangetoond en dat dit percentage bij de Goudsche kaas slechts 9 bedroeg. Het schijnt dus wel, dat deze bacteriën meer inheemsch zijn in Friesland dan in het Zuidhollandsche en Utrechtsche kaasdistrict.

6. Plaatselijke gistingen in kaas

Bij het onderzoek van de hierboven besproken kazen kregen wij enkele duidelijke aanwijzingen, dat in kaas ook plaatselijke gistingen kunnen optreden. Nu draagt iedere gisting in kaas in haar verschijningsvorm een min of meer plaatselijk karakter. Het gistingsgas ontstaat in de kaas nooit als een regelmatig verdeeld fijn schuim maar steeds in den vorm van met het bloote oog zichtbare gasopeningen, die van elkaar door „dichte” deelen gescheiden zijn en die sterk in grootte en vorm uiteen kunnen loopen. Wij moeten dus aannemen, dat er een diffusie is van het door de gisting ontstane gas in opgelosten toestand naar plaatsen, waar het in gasvorm overgaat. Men zou dan verwachten, dat het slecht oplosbare waterstofgas, dat door coli-, boterzuur- en boekelscheurbacteriën gevormd wordt, aanleiding geeft tot vele kleine openingen, doch hierbij speelt ook de snelheid, waarmede het gistingsgas ontstaat, d.w.z. de felheid van de gisting, een rol. Ook de aard van het zuivel is hierbij van belang. De coligisting (het vroeg-los) vindt plaats in een inhomogeen zuivel en vindt hierin zeer veel meer zwakke plaatsen, waarin het gistingsgas kan vrijkomen, dan de nagistingen, die geschieden in een homogene kaas. De langzame propionzuurgisting, die bovendien als gistingsgas het gemakkelijk oplosbare koolzuur vormt, is bij ontbreken van zwakke plaatsen in de kaas (als hoedanig b.v. kleine, reeds bestaande gasholten kunnen dienen) soms niet in staat om zelfs bij een groot aantal propionzuurbacteriën gasopeningen te veroorzaken. De nagistingen maken meestal minder doch grotere openingen dan de coligisting.

Ook in een ander opzicht heeft de nagisting een plaatselijk karakter. Men ziet haar n.l. altijd in het middendeel van de kaas. Het randdeel blijft vrij van nagisting, hoewel de breedte van het dichte randdeel zeer verschillend kan zijn. Dit verschijnsel wordt veroorzaakt door den veel minderen groei der nagistingsbacteriën in het zoute en droge randdeel.

De plaatselijke gisting, waarop wij hier speciaal de aandacht willen vestigen, wordt veroorzaakt door *plaatselijke infectie*. Een voorbeeld daarvan geeft foto 21.

Twee van dergelijke gevallen van typische boterzuurgisting met plaatselijke gisting werden nader geanalyseerd.

Het eene geval betrof een practijkaas van Goudsch model met een knijperscheur in den rand. In het knijperige randdeel werden per g gevonden: 250 000 boterzuurbacteriën en 20 000 propionzuurbacteriën; coliachtigen en boekelscheurbacteriën waren niet aanwezig. In het dichte middendeel van de kaas waren geen boterzuurbacteriën aantoonbaar; het aantal propionzuurbacteriën was er 4500; ook hier waren coliachtigen en boekelscheurbacteriën afwezig.

Het andere geval was een proefkaas in Edammer vorm, welke enkele ronde openingen en een groote breede knijperscheur in het zuivel had. In een boormonster door de scheur heen werden 1 000 000 boterzuurbacteriën per g gevonden en in een monster uit een dicht gedeelte der kaas bleken boterzuurbacteriën afwezig te zijn.

Deze analyses bewijzen, dat in kaas inderdaad plaatselijke infecties van boterzuurbacteriën voorkomen kunnen, die uitgroeien tot plaatselijke haarden van boterzuurgisting.

Bij het bacteriologische onderzoek van kaas moet men met dit verschijnsel wel rekening houden, omdat het oorzaak kan zijn, dat in een kaas met een knijperscheur toch geen boterzuurbacteriën worden gevonden als men n.l. toevallig in het dichte deel van de kaas boort. Ook daarom blijft het steeds aan te bevelen om bij het maken van de analyse de te onderzoeken kaas niet alleen te boren, maar tevens door te snijden en de doorsnede te beoordeelen.

Overzicht

De gasvorming in kaas wordt naar gelang van het tijdstip van verschijning van de gasholten of -spleten onderscheiden in „vroeg optredend los” en „laat optredend los”. De eerstgenoemde, steeds als ongewenscht beschouwd, wordt veroorzaakt door coliachtige bacteriën, die uit de melksuiker, zolang deze nog niet door de melkzuurbacteriën is omgezet tot melkzuur, het gistingsgas doen ontstaan. Het laat optredend los kan veroorzaakt worden door 3 verschillende bacteriesoorten, die melkzure zouten onder gasvorming ontleden: boterzuurbacteriën, boekelscheurbacteriën en propionzuurbacteriën. Daar deze gasvorming na de melkzuurgisting plaats vindt, kan men haar een nagisting noemen. Een zeer matige nagisting in de kaas, zich uitende in „oogjes” van ronden vorm, wordt vaak wel graag gezien; een te sterke nagisting is een gebrek.

Hoewel de laat optredende gasvorming door 3 verschillende bacteriesoorten kan worden veroorzaakt, is toch de verschijningsvorm ervan voor deze 3 soorten niet principieel verschillend. Ofschoon men in enkele gevallen door beoordeeling van de doorsnede der kaas kan concluderen, welke bacteriesoort werkzaam was, is dit toch in de meeste gevallen niet mogelijk.

Daar het ter bestrijding van gevallen van overmatige gasvorming nuttig is te weten welke der 4 genoemde bacteriesoorten in de kaas aanwezig is, kan slechts een bacteriologische analyse betrouwbaar uitsluitsel geven, mits de kaas niet zóó oud is, dat de bacteriën zijn afgestorven. In het artikel worden in hoofdstuk 3 de methoden beschreven, die voor het aantoonen der 4 bacteriesoorten door ons gebruikt worden.

Met behulp van deze methodiek werden meer dan 350 kaasmonsters onderzocht, waarvan 75 practijkkazen en 80 proefkazen, die ongeveer denzelfden ouderdom van 5 à 7 weken hadden, nader besproken werden. In deze kazen werden steeds propionzuurbacteriën gevonden, hetzij in klein of in groot aantal. Daarnaast waren in een aantal kazen coliachtige bacteriën, boterzuurbacteriën of boekelscheurbacteriën in verschillende aantallen aanwezig en dikwijls werd ook meer dan één van deze soorten gevonden. De conclusies van dit onderzoek vindt men in hoofdstuk 5, I—VII, opgesomd.

De aandacht werd gevestigd op het voorkomen van gelocaliseerde gasvorming in kaas als gevolg van plaatselijke infecties. Bij deze gevallen worden de gasvormende bacteriën wel bij de gasopeningen doch niet in de andere deelen der kaas gevonden.

UEBERSICHT

Der Nachweis gasbildender Bakterien im Käse

Die Gasbildung im Käse kann eine Frühgärung oder eine Spätgärung sein. Die Frühgärung, die immer unerwünscht ist, wird verursacht von Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe, welche aus Milchzucker, solange dieser noch nicht vollständig von den Milchsäurebakterien vergoren ist, das Gärungsgas bilden. Die Spätgärung kann von 3 verschiedenen Bakterienarten verursacht werden: Buttersäurebakterien (*Clostridium tyrobutyricum* (4)), laktatvergärende und dabei Wasserstoff bildende Milchsäurebakterien (*Lactobacillus bifermentans* ¹⁾), worüber wir noch nähere Mitteilungen veröffentlichen werden (1)) und Propionsäurebakterien (3). Alle diese 3 Bakterienarten vergären milchsaure Salze unter Gasbildung, wobei in den ersten zwei Fällen Kohlensäure und Wasserstoff entsteht, im letzteren Fall nur Kohlensäure. Weil diese Gasbildung nach der Milchsäuregärung auftritt, kann man sie als eine „Nachgärung“ bezeichnen.

Die Löcher, welche durch Frühgärung verursacht sind, haben eine unregelmässige Form und sind meistens klein; man findet sie auch im Randteil der Käses.

Bei der Spätgärung können runde Oeffnungen, grözere Spalten oder kleinere Risse entstehen. Dat hängt von der Konsistenz des Käses ab. Der Randteil des Käses bleibt immer frei von Lochung, aber es kommt vor, dasz bei starker Gärung die Spannungen im Käse so grosz werden, dasz er bis in den Randteil zerrissen wird.

Eine mässige Nachgärung, wobei nur wenige kleine runde Löcher

¹⁾ niederländisch: Boekelscheurbacteriën.

entstehen, ist im Gouda- und Edamer Käse erwünscht; eine starke Nachgärung ist ein Fehler.

Weil die Propionsäurebakterien nur in Käsen von höherem pH einen beträchtlichen Wachstum zeigen, äusert sich die Propionsäuregärung meistens im Entstehen von runden Löchern. Buttersäurebakterien und *Lb. bifermentans* wachsen auch bei höheren Säuregraden; darum können sie in Käsen von höheren pH runde Löcher, aber in Käsen von niedrigerem pH Risse und Spalten verursachen. Es ist nur in wenigen Fällen möglich aus dem Aussehen der Gärungserscheinungen zu schliessen welcher Erreger Ursache der Gärung war.

Es ist somit eine bakteriologische Analyse erforderlich. Wir impfen dazu mehrere Verdünnungen des zu untersuchenden Käses (0,1 bis 0,000 000 1 g) in Nährböden, welche für die verschiedenen Bakterienarten selektiv sind. Die erste Verdünnung wird hergestellt mit 2 g steril entnommenem Käse (aus zwei Bohrlingen der Käsemitte) und 18 ml warmem 2 % Na-Citrat; für die weiteren Verdünnungen werden Kolben mit Wasser gebraucht.

1. *Cl. tyrobutyricum*. Impfen in Röhrchen mit Traubenzucker-Pepton-Fleischwasser. Die Rörchen werden evakuiert, zugeschmolzen (Foto 1) und pasteurisiert (10' 80° C). Züchten bei 30° C. Gärung heftig und kurz dauernd. Gärungsgas explosiv (Wasserstoff und CO₂), Buttersäuregeruch.

2. *Lb. bifermentans*. Impfen in Röhrchen mit Pepton-Ca-Laktat-Lösung ¹⁾ vom pH 4,5. Anaerob züchten bei 30° C. Beurteilung nicht eher als nach 14 Tagen. Das Bakterium bildet Gärungsgas mit Wasserstoff und Kohlensäure. Süßlicher Geruch. Nur in den stark geimpften Röhrchen können sich Propionsäurebakterien oder Buttersäurebakterien vermehren. Das ist jedoch sogleich am Geruch oder an der Gasanalyse zu erkennen. Der Buttersäuregeruch ist sehr deutlich wenn man etwas verdünnte Schwefelsäure zusetzt.

3. *Bact. propionici*. Impfen in Röhrchen mit Pepton-Hefeautolysat-Na-Laktat-Agar. Pyrogallolverschluss. Züchten bei 30° C. Nach 10—14 Tagen können die Kolonien gezählt werden (3). *Lb. bifermentans* bildet auch Kolonien in diesem Nährboden, aber diese sind kleiner und schmutzig grün. Wenn dieses Bakterium wächst wird der Agar wegen Wasserstoffbildung zerrissen.

4. *Escherichia coli* und *Aerobacter aerogenes*. Impfen in Durham-Röhrchen mit Mc. Conkey-Nährflüssigkeit. Züchten bei 37° C. Beurteilung auf Gasbildung nach 2 Tagen. Bisweilen versagt die Gasentwicklung in den Röhrchen mit 0,1 g Käse, obwohl darin doch coliartige Bakterien wuchsen; es ist darum zu empfehlen die Kulturen mittelst fester Nährböden näher zu untersuchen.

Von jeder Verdünnung werden 2 oder 3 Röhrchen geimpft und die Analysenergebnisse werden mit Hilfe der Mc. Crady'schen Tabellen in Zahlen bewertet.

¹⁾ Bei der Bereitung dieses Bodens bildet sich ein Niederschlag von Kalziumphosphat. Dieser soll mit benutzt werden.

Mit den beschriebenen Methoden untersuchten wir 374 Käseproben. 155 Edamer- und Gouda Käse von ungefähr gleichem Alter (5—7 Wochen) wurden eingeteilt in mehrere Gruppen:

- A 1 nur wenige Propionsäurebakterien (Foto 2, 3, 4),
- A 2 ziemlich viele Propionsäurebakterien (Foto 5, 6),
- A 3 viele Propionsäurebakterien (Foto 7),
- A 4 sehr viele Propionsäurebakterien (Foto 8, 9),
- B viele Colibakterien (Foto 10, 11),
- C mehr oder weniger *Lb. bif fermentans* (Foto 12, 13, 14, 15, 16),
- D mehr oder weniger *Cl. tyrobutyricum* (Foto 17, 18, 19, 20).

Fig. 1 zeigt die pH-Frequenzen der Gruppen A und B.

Es ergaben sich nun weiter nachstehende Schlussfolgerungen:

1. Die alte Erfahrung, dass die Gasbildung in Käsen von niedrigem pH Anlass gibt zur Bildung von Rissen, in Käsen von höherem pH dagegen von runden Löchern wurde bestätigt. Weil das Gasvolumen von Rissen sehr klein ist, können bei geringer Gasbildung schon Risse im Teig von niedrigem pH entstehen.

2. In allen Käsen wurden Propionsäurebakterien gefunden, jedoch in sehr verschiedenen Anzahlen. Aus Abb. 1 ist ersichtlich, dass Käse mit einer grösseren Anzahl von diesen Bakterien ein höheres pH aufweisen. Bei der Propionsäuregärung werden somit im Käse fast immer runde Löcher gebildet. Im grossen und ganzen war die Gasbildung in Käsen, worin die anderen Gärungserreger fehlten, stärker je nachdem die Propionsäurebakterienzahl höher war.

3. *Lb. bif fermentans* wurde in verschiedenen Mengen in wenigen der untersuchten Käse gefunden. Offenbar rührt ihr Vorkommen im Käse von einer Verunreinigung her. Ihre Entwicklung ist unabhängig vom pH des Käses. Sie können also Risse oder Löcher im Käse bilden. Nur in einzelnen Fällen verursachen diese Bakterien eine zu starke Gasbildung (Foto 16).

4. Buttersäurebakterien können sich auch in Käsen von niedrigem und von hohem pH vermehren. Im ersten Fall entstehen (bisweilen sehr grosse) Spalten, im letzten runde Löcher. Bei starker Buttersäuregärung findet man in Käse von hohem pH einige Spalten im Randteil, weil dieser Teil wegen des grösseren Salzgehaltes immer spröde ist.

5. In Käse von 5—7 Wochen können bisweilen noch viele coliartigen Bakterien vorkommen. Eine stattgefundene Coligärung ist in älteren Käse von etwas höherem pH schwierig mit dem Auge zu erkennen, weil die anfänglich unregelmässigen Gärungslöcher von der Propionsäuregärung nachträglich zu runden Oeffnungen aufgeblasen wurden.

6. Randteil und Mitte eines Käses weisen fast immer ein verschiedenes pH auf. Die kleinste Differenz findet man bei Käsen mit wenig Nach-

gärungsorganismen, die grösste bei Käsen mit Buttersäure- oder Bifermmentansgärung. Bei den letzten Gärungen wird nämlich das pH durch die Milchsäurevergärung erhöht, nicht aber im Randteil, weil die Bakterien sich dort nicht vermehren können.

7. Es kommen Fälle von örtlicher Buttersäuregärung (Foto 21) vor, wobei die Buttersäurebakterien nur in der Nähe der Risse und nicht an anderen Stellen gefunden werden. Offenbar liegt hier eine örtliche Infektion des Bruches mit nur ganz wenigen Buttersäurebakterien vor.

SUMMARY

The detection of gas forming bacteria in cheese

The gas formation in cheese may be an early occurring fermentation or a subsequent one. The first one, which is always regarded as noxious, is caused by coliform bacteria. They attack the lactose in the newly made cheese and the production of the fermentation gas ends when the lactic acid bacteria have decomposed the lactose totally. The subsequent gas formation, not occurring before all lactose has been converted to lactic acid and generally becoming manifest when the cheese is 10 days old or more, may be caused by 3 different species of lactate decomposing bacteria, viz. *Clostridium tyrobutyricum* (4), the butyric acid bacterium of cheese; *Lactobacillus bifermmentans* (1)¹⁾, a lactate fermenting, hydrogen gas forming lactic acid bacterium (on whose metabolism we shall soon publish more particulars) and *Propionibacterium shermanii*.

The gasholes in cheese are generally small and of irregular shape when they are caused by the coliform bacteria. They are also found in the edge of the cheese because this fermentation took place before the salting of the cheese.

The gasholes of the subsequent gas formation are fissures or rents or they may be spherous. This depends on the texture of the cheese. The fermentation gas is never liberated in the edge as the salt content prevents the fermentation in this part of the cheese. Sometimes the gas pressure in the inner parts of the cheese is so high that a mechanical slit proceeds into the edge.

A subsequent gas formation, forming only a limited number of small spherous holes is not unwelcome in Gouda- and Edam cheese; subsequent blowing however is a fault.

Propionic acid bacteria give rise to the formation of spherous holes (eyes), because they develop in large numbers only in cheese of high pH. Butyric acid bacteria and *Lb. bifermmentans* can develop at lower pH too, so they may cause the formation of rents and of spherous holes. It is therefore regarded impossible to conclude from the shape of the gasholes which bacterium was the cause of the gas formation. Only the bacteriological analysis can give an answer to this question. The following technique may be recommended:

¹⁾ netherland: boekelscheurbacteriën.

Several dilutions of the inner of the cheese (0,1; 0,01 0,000 000 1 g) are inoculated in various media, especially apt for the development of the 4 species of bacteria. The first dilution is made of 2 g cheese and 18 ml of a warm 2 % Na-citrate solution.

1. *Cl. tyrobutyricum*. Inoculation in tubes with dextrose-peptone-broth. The tubes are evacuated (Foto 1) and pasteurized at a temperature of 80° C (10 minutes). Cultivation at 30° C. The fermentation is vigorous and rapid. The fermentation gas is explosive (hydrogen) and the smell of butyric acid is strong.

2. *Lb. bifermentans*. Inoculation in tubes with peptone-Ca-lactate-medium, pH 4,5. (The precipitate of Ca-phosphates must not be filtered off.) Anaerobic cultivation at 30° C during 14 days. The fermentation gas, which is formed slowly, consists of equal parts of hydrogen and carbon dioxide. A sweetish smell is observed. In the tubes with 0,1 g cheese butyric acid bacteria and propionic acid bacteria may develop too, but this is easily detected (butyric acid or propionic acid smell).

3. *Pb. shermanii*. Inoculation in tubes with peptone-yeastautolysate-Na-lactate-agar. Anaerobic cultivation (pyrogallol and rubber stopper) at 30° C (3). The colonies may be counted after 10—14 days. *Lb. bifermentans* too forms colonies in this medium but these colonies are only small and have a dirty green colour. When this bacterium is present the agar is splitted because of the hydrogen formation.

4. *Esch. coli* and *Aer. aerogenes*. Inoculation in Durham tubes with Mc. Conkey medium. Cultivation at 37° C. Some times no gas is formed in the tubes with 0,1 g cheese though coli is present. It is therefore necessary to test the fermentation tubes with a solid medium afterwards.

All inoculations are made two- of threefold and bacterial numbers are calculated with the aid of Mc. Crady's tables.

With this technique we analysed 374 cheese samples. Of 155 Edam- and Gouda cheeses, which were 5—7 weeks old, the resultst are summed up in this article. We divided them in the following groups:

- A 1. Cheeses with only few propionic acid bacteria (foto 2, 3, 4),
- A 2. Cheeses with rather many propionic acid bacteria (foto 5, 6),
- A 3. Cheeses with many propionic acid bacteria (foto 7),
- A 4. Cheeses with a large number of propionic acid bacteria (foto 8, 9),
- B. Cheeses with many coliform bacteria (foto 10, 11),
- C. Cheeses with more or less *Lb. bifermentans* (foto 12, 13, 14, 15, 16),
- D. Cheeses with more or less *Cl. tyrobutyricum* (foto 17, 18, 19, 20).

The pH-deviations of the groups A and B are shown in fig. 1.

The following conclusions have been drawn:

1. The well known fact that the gas formation in cheeses of a low pH-value leads to the development of fissures and in those of high pH to that of round holes was again confirmed. As fissures contain relatively less gas than holes, a small quantity of gas may cause rather large fissures in cheese of low pH.

2. All cheeses contained propionic acid bacteria. The numbers of these bacteria varied widely. From fig. 1 may be derived that with higher pH the number of propionic acid bacteria was higher. As cheeses of a high pH have a smooth texture the propionic acid fermentation in cheese is accompanied by the formation of round holes (eyes). In cheeses with propionic acid bacteria as the only lactate fermenting organisms the gas formation was more pronounced when more of these bacteria were present.

3. *Lb. bifementans* was found in 24 cheeses and their numbers never were very high. It is therefore probable that they do not belong to the normal cheese flora, but that their presence in cheese is due to a contamination. They develop independently of the pH of the cheese. Thus they may give to the formation of fissures and of eyes. Only rarely a case of disastrous gas formation caused by these bacteria is met with (foto 16).

4. Butyric acid bacteria too may be found to have developed in cheese of low and of high pH. In the first case large rents may have formed, in the latter round holes.

5. Though coliform bacteria probably do not develop in cheese after the lactose has been decomposed by the lactic acid bacteria sometimes their number in cheeses of 5—7 weeks may be rather high. In young cheeses the coli fermentation is characterized by the presence of small holes of irregular shape. In older cheeses, especially those of higher pH, this criterion does not hold as the propionic acid fermentation afterwards enlarges these holes.

6. Edge and inner of a cheese generally show a pH-difference. This difference is low in cheeses with only a few lactate-fermenting organisms and greatest when a butyric acid fermentation or a *Lb. fermentans* development took place. The reason of this is that the fermentation only occurs in the middle of the cheese.

7. In a few cases a local butyric acid fermentation is observed (foto 21). In such cases the gas formation is localised to a certain area and butyric acid bacteria are only found in the neighbourhood of the gashole and absent everywhere else in the cheese. Probably this phenomenon is due to an infection of the milk with only a few butyric acid bacteria.

Literatuur

- (1) F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES, De normale gasvorming in kaas. Versl. van Landbk. Onderz. **21** (1917) 14. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1915, bldz. 73. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 48 (1918) S. 130.
- (2) F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM, Over het laat optredend los bij Goudsche kaas. Versl. van Landbk. Onderz. **34** (1929) 26. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1928. bldz. 2.
- (3) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Propionzuurbacteriën in Goudsche en Edammer kaas. Versl. van Landbk. Onderz. **47** (1941) 1101. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1941, bldz. 23.
- (4) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Zuckervergärende und laktatvergärende Buttersäurebakterien, Zentr.bl. f. Bakt. II **93** (1935) 198.