

Deze uitgave kwam tot stand met steun van het Produktschap voor Groenten en Fruit, het Produktschap voor Vee en Vlees en het Produktschap voor Zuivel.

De voordrachten uitgesproken tijdens het symposium 'Sporevormende bacteriën in voedingsmiddelen' vormen de basis van deze uitgave.

Het symposium heeft op 1 november 1977 plaatsgevonden in het Internationaal Agrarisch Centrum te Wageningen, en werd georganiseerd door de Nederlandse Sporengroep ter gelegenheid van haar vijfjarig bestaan in samenwerking met de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie en de Sectie Levensmiddelen-microbiologie.

MM *Mich-00-1* *200-1*

Sporevormende bacteriën in voedingsmiddelen

H. Stegeman, H.M.C. Put en L.P.M. Langeveld (red.)



Wageningen

Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie
1980

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUW HOGESCHOOL
WAGENINGEN

inv. 119912-01

In de redactiecommissie hadden zitting: ir. H. Stegeman (voorzitter), mevr. H.M.C. Put, ir. L.P.M. Langeveld en ir. J.A.M. van den Hauvel (Pudoc).

Omslagfoto: *C. sporogenes* met zijn buitengewoon meerlagige coat. Bron: Dring et al., 1976. Zie ook p. 8 en 9.

ISBN 90 220 0650 6

© Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, 1980.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.
No part of this book may be reproduced or published in any form by print, photoprint, microfilm or any other means without written permission from the publishers.

Inhoud

D.A.A. Mossel	
DE BESLISSENDE ROL VAN ENDOSPOREN VAN BACTERIËN IN DE STRATEGIE VAN DE BESCHERMING VAN DE CONSUMENT TEGEN MICROBIËLE RISICO'S VAN HET LEVENSMIDDELENPAKKET EENS EN THANS	1
 H. Stegeman	
DE BACTERIESPORE	6
Inleiding	6
De structuur van een bacteriespore	7
Sporevorming	12
Ontkieming en uitgroei	16
Resistentie en subletale beschadigingen	21
 G.W. Gould	
HET MECHANISME VAN DE SPORERESISTENTIE EN -DORMANCY	26
Inleiding	26
Compartimentenvorming tijdens de vorming van de spore	26
Osmotische beheersing van de resistentie	28
Dormancy en activering	33
Initiatie van de kieming als een chemisch-osmotisch proces	35
Conclusies	36
Samenvatting	37
 H.M.C. Put	
BACTERIE-, GIST- EN SCHIMMELSPOREN: ENKELE OVEREENKOMSTEN EN VERSCHILLEN	39
Inleiding	39
Taxonomie	40
Morfologie	43
Sporevorming	46

Dormancy	57
Ontkieming	58
Resistentie	60
Slotopmerking	70
J. Haagsma	
PATHOGENE SPOREVORMENDE BACTERIËN BIJ MENS EN DIER	72
Inleiding	72
Algemeen overzicht pathogene sporevormende bacteriën	72
Botulismus bij de mens	75
Botulismus bij dieren	82
Voedselvergiftiging door <i>C. perfringens</i> type A bij de mens	84
Voedselvergiftiging door <i>B. cereus</i>	86
W.J. Kooiman	
INACTIVERING VAN BACTERIESPOREN	88
Inleiding	88
Hitte-inactivering van bacteriesporen	88
Stralingsinactivering van bacteriesporen	102
Chemische inactivering van bacteriesporen	105
Slotopmerking	112
M.J.M. Michels	
HET BEPALEN VAN SPOREVORMENDE BACTERIËN IN VOEDINGS-	
MIDDELEN	113
Inleiding	113
Beperkingen bij het bepalen van sporevormende bacteriën	115
Vorbewerking en verhitting van het monster bij spore-	
tellingen	119
Aantonen van sporevormende bacteriën in verhitte voe-	
dingsmiddelen	120
Bepalen van <i>Bacillus</i> -soorten	121
<i>Sporolactobacillus</i>	125
Bepalen van <i>Clostridium</i> -soorten	126
Bepalen van <i>Desulfotomaculum</i>	133
<i>Sporosarcina</i>	134
Slot	135

H. Labots	
SPOREVORMENDE BACTERIËN IN VLEESPRODUKTEN	136
Inleiding	136
Besmetting van vleesprodukten met bacteriesporen	138
Verhinderling van de ontwikkeling van sporevormende bacteriën in vleesprodukten	140
Radappertisatie	147
L.P.M. Langeveld	
SPOREVORMENDE BACTERIËN IN ZUIVELPRODUKTEN	148
De grondstof melk	148
Toevoegingen	150
Beïnvloeding van het aantal sporen en de ontwikkeling van sporevormende bacteriën	150
Sporevormende bacteriën en verschillende produkten	155
Sporulering ten gevolge van fabricageprocessen of in produkten	180
Het aantonen van sporevormende bacteriën en de steriliteitscontrole van gesteriliseerde of geappertiseerde zuivelprodukten	182
E. Steinbuch	
SPOREVORMENDE BACTERIËN IN TUINBOUWPRODUKTEN	184
Inleiding	184
Factoren die de initiële bacteriesporenbesmetting in groente- en fruitprodukten bepalen	186
Factoren die de inactivering van bacteriesporen door warmte in groente- en fruitprodukten bepalen	193
Alternatieve conserveringsmethoden	204
Sporevormende bacteriën bij de vergisting van plantaardige produkten	206
Toepassing van sporevormende bacteriën bij de fabricage van voedingsmiddelen	207
LITERATUUR	208
GLOSSARIUM	227
REGISTER	230

De beslissende rol van endosporen van bacteriën in de strategie van de bescherming van de consument tegen microbiële risico's van het levensmiddelenpakket eens en thans

D.A.A. Mossel, *Leerstoel Medische Levensmiddelenmicrobiologie, Faculteit Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Utrecht*

Van oudsher heeft de mens er behoefte aan gehad zijn voedingsmiddelen te beschermen tegen bedreigingen van microbiële aard. Dit betrof zowel risico's voor zijn gezondheid, voedselvergiftiging en voedselbesmetting, als ook verliezen voortvloeiende uit microbiel bederf, die in tijden van schaarste bijzonder ernstige gevolgen konden hebben. De gevolgde strategie was dikwijls primitief, en daardoor weinig effectief. In feite duurde het tot de eerste helft van deze eeuw voordat een systeem tot ontwikkeling kwam dat de consument werkelijk afdoende beschermde.

Dit systeem berust op een preventieve aanpak, waarbij het kwaad wordt bestreden vóór het optreedt. Dat geschiedt dan door middel van het vastleggen van voorschriften voor de bewerking, fabricage en distributie van voedingsmiddelen, de intussen algemeen bekende 'Good Manufacturing and Distribution Practices', afgekort tot GMP. Eén van de kardinale onderdelen van GMP is wat in de Angelsaksische literatuur wordt aangeduid als 'Processing for safety', waarvoor de Nederlandse term 'beveiligende bewerking' wordt voorgesteld. Bij dergelijke fabricageprocessen worden fysische of chemische behandelingen toegepast met een dusdanig microbicide effect dat, bij de erop volgende bewaring en distributie overeenkomstig de daarvoor van toepassing zijnde voorschriften, producten de consument bereiken in een uitstekende microbiologische conditie. Beveiligende bewerkingen van dit type kunnen berusten op verhitting, microbiële verzuuring of behandeling met ioniserende straling.

Van dergelijke behandelingen is verhitting één der oudste; inzicht in het microbicide effect van de vele, sterk uiteen-

lopende thermische behandelingen van voedingsmiddelen is eerst sedert de periode 1920 - 1950 verworven. Bij het naderen van de jaren tachtig zijn voor het exact-analyseren van microbenletaliteit indrukwekkende computerprogramma's ontwikkeld (Ross, 1977). Niettemin is het beginsel hiervan verbluffend simpel. Uitgaande van de in gebruikelijke grondstoffen voorkomende hoogste aantallen kolonievormende eenheden (kve) en de mogelijkheden tot vermeerdering in het eindprodukt bij het strikt volgen van GMP wordt de vereiste brutoletaliteit berekend. De enige parameter die hierbij nog problemen biedt, is de mate van zekerheid dat gegeven aantallen overlevende micro-organismen geen risico van enige betekenis inhouden, de 'gevaarschatting' ('Risk Analysis'). Maar ook hiervoor zijn recent in de praktijk bruikbare modellen uitgewerkt (Mossel & Drion, 1979).

Vertaling van vereiste letaliteit in tijd-temperatuurcombinaties van verhitting berust uiteraard op de intrinsieke thermoresistentie van de betrokken groep micro-organismen. De term intrinsiek betekent in dit verband dat de thermoresistentie sterk beïnvloedende parameters van het voedingsmiddel dat verhit wordt, met name pH, a_w en karakter van de opgeloste stoffen die de a_w beïnvloeden, zijn geëlimineerd. Dit geschiedt met vrucht door thermoresistentie uit te drukken in de tijd-temperatuurcombinatie die bij $a_w = 0,98 - 1,00$ en $pH = 6,6 - 7,0$ het aantal kve met n logarithmische cycli reduceert. Als regel varieert n van 6 tot 12, afhankelijk van de omvang van het risico dat een gegeven micro-organisme met zich meebrengt (Mossel & Drion, 1979). Deze benadering wordt gekenmerkt door het grote voordeel dat de aard van de overlevingscurve de berekening van de vereiste letaliteit niet beïnvloedt (Mossel & de Groot, 1965).

In tabel 1 zijn de intrinsieke thermoresistentiewaarden van de belangrijkste groepen, in rauwe voedingsmiddelen min of meer frequent voorkomende micro-organismen verzameld. De daaruit naar voren komende verschillen zijn enorm. Aan het ene uiterste treft men bij niet-fermentatieve Gram-negatieve staafvormige bacteriën een waarde van 20 s bij 60 °C; het andere uiterste vormen de zogenaamde thermofiele sporevormers met thermoresistentiewaarden van 80 min bij 120 °C. Dit betekent dat er sprake is van een tijdsfactor van 240 bij een temperatuurstijging van 60 °C.

Tabel 1. Indeling van micro-organismen op grond van hun thermoresistentie.

Organismen	Maximale letale combinatie voor 10^6 - 10^7 kolonievormen- de eenheden, bij pH = 6,8 $\pm$ 0,2 en $a_w = 0,99 \pm 0,01$		Types of stammen die deze verhitting over- leven, doch niet de daarop volgende
	Temperatuur (°C)	Tijd (min)	
Schimmels	65	30	<i>Byssoschlamys</i> types <i>Penicillium</i> types <i>Aspergillus</i> types
Gisten			<i>Alcaligenes tolerans</i> <i>Streptococcus faecalis</i> en verwante bacteriën
Niet-sporevormende bacteriën	30	1	<i>Corynebacterium</i> <i>Microbacterium</i> speciës Sporen van de groepen 1-4 hieronder
Sporen met thermo- resistentie van de klasse:			
1. laag	90	10	<i>Clostridium botulinum</i> type E <i>Bacillus macerans</i> types <i>Bacillus megaterium</i> types <i>Bacillus mycoides</i> types Sporen van de groepen 2-4 hieronder
2. middelmatig	110 120	30 3	<i>Clostridium botulinum</i> types A en B Enkele <i>Bacillus</i> typen Sporen van de groepen 3-4 hieronder
3. hoog	115 120	10 4	<i>Bacillus stearothermo-</i> <i>philus</i> <i>Clostridium nigrificans</i> <i>Clostridium sporogenes</i> types Sporen van de groep 4
4. zeer hoog	120	45	<i>Clostridium thermo-</i> <i>saccharolyticum</i>

Om een meer op de praktijk gerichte indruk van deze verschillen te krijgen stelle men zich eens voor welk een onderscheid genoemde warmtebehandelingen zouden inhouden met betrekking tot behoud van voedingswaarde en organoleptische aantrekkelijkheid

van een gegeven voedingsmiddel.

Een nadere bestudering van de gegevens in tabel 1 leert dat het voornaamste breekpunt ligt bij het al of niet vormen van endosporen. Dit geldt voornamelijk voor aërobe en anaërobe Bacillaceae, maar eveneens voor schimmels en in geringere mate voor gisten (Put et al., 1977). Het is daarom wellicht zinvol zich te realiseren hoe ons voedselpakket er zou uitzien, indien endosporulering niet bestond. Uiteraard is dit, in pragmatische zin, even zinloos als het filosoferen over de verrukkelijke maatschappij die zou ontstaan, wanneer de mens niet zou zondigen tegen religieuze of ethische grondregels. Ter illustratie van het belang van het verschijnsel endosporulatie in voedingswetenschappelijke zin is het genoemde romantiseren wel verhelderend en derhalve nuttig.

Indien endosporen niet zouden bestaan zou een verhitting van voedingsmiddelen met een neutrale pH gedurende enkele minuten op een temperatuur van ongeveer 80 °C deze even effectief apertiseren (Goresline et al., 1964) als voedingsmiddelen met een pH beneden 4,5 (Mossel et al., 1973, 1974). Wanneer een dergelijk proces op melk zou worden toegepast, zou men een vrijwel vers produkt, in organoleptische zin, verkrijgen met een onbeperkte houdbaarheid in microbiologische zin. Zou het verschijnsel endosporulering niet bestaan, dan zou de geschetste warmtebehandeling van vleeswaren in de darm deze zeer lang houdbaar maken, ook bij kamertemperatuur en zonder de noodzaak de produkten sterk te zouten of zonder toevoeging van het niet-onbedenklijke nitriet (Preusmann et al., 1977).

Wanneer het genus *Byssochlamys* niet begiftigd zou zijn met het vermogen tot ascosporenvorming, zouden in glas verpakte, door middel van hitte verduurzaamde aardbeien dezelfde structuur kunnen hebben als het geblancheerde, bevroren produkt, in plaats van de totaal gedenatureerde waar die men in werkelijkheid moet fabriceren. De bestraling van gebraden roast beef zou tenslotte kunnen leiden tot een ook bij tropische temperaturen houdbaar, in thermostabiele foelie verpakt produkt, ware het dat endosporen bij clostridia en bacilli niet bestonden (Mossel, 1977a).

Het moge dan zijn dat de Heer in Zijn wijsheid endosporen

van allerlei aard schiep; Hij heeft ons niet ongewapend gelaten tegen deze, ons hedonistisch geluk verstorende structuren. Want Hij zond ook Zijn Heilige Geest, die ons verlichtte om allerlei oplossingen te vinden teneinde de consument te beschermen tegen zijn gezondheid bedreigende of zijn voedsel bedervende sporevormende organismen zonder daarbij de betrokken voedingsmiddelen ten gevolge van de behandeling voedingsfysiologisch waardeeloos of erg onaantrekkelijk te maken. Met name de blikconservenindustrie heeft enorme vorderingen gemaakt met betrekking tot die tak van microbiologie die thermobacteriologie wordt genoemd. Dit betreft niet alleen het vaststellen van de aard van de afstervingscurve (Cerf, 1977), maar ook het boeiende aspect van de sublethale beschadiging van verhitte sporen, tot uitdrukking komende in 'dormancy' (Gould, 1977), en de moleculair-microbiologische grondslagen van het overwinnen hiervan (Bradshaw et al., 1977). Het is echter teleurstellend te moeten constateren dat ondanks deze indrukwekkende vorderingen, van een werkelijk beheersen van de sporevorming nog steeds geen sprake is. Met name Tyndall's geniale principe om voedingsmiddelen te steriliseren door gesynchroniseerde sporekieming en een daarop volgende pasteurisatie is nog niet met succes in praktijk gebracht.

Het is ongetwijfeld een immense taak om met dezelfde zekerheid als de gebruikelijke fantoomdoding van *Clostridium botulinum* volledig beheerste ontkieming van endosporen te bereiken. Niettemin hebben bijdragen aan dit symposium getoond dat de vereiste cytologische en colloïdchemische basiskennis aanwezig is. Voorts beschikken wij over voldoende, uitstekend uitgeruste laboratoria en – stellig nog belangrijker – over gemotiveerde, bekwame onderzoekers. In beginsel is het dus mogelijk een geprogrammeerde kieming te bereiken, daarmee de uitschakeling van het fenomeen endospoor als 'het ideaal verstorende' verschijnsel na te streven en de boven geschetste essentiële veranderingen van enkele belangrijke elementen van het voedselpakket aan de horizon te zien. Het is van het allergrootste belang dat microbioloog en produktdeskundige in teamverband deze uitdaging aanvaarden. Want alle ideologieën kennen als één der voornaamste idealen vergroting en verbetering van de voorziening van de medemens met deugdelijk voedsel.

De bacteriespore

H. Stegeman, Instituut voor Toepassing van Atoomenergie in de Landbouw, Wageningen

INLEIDING

Bacteriën vermenigvuldigen zich door deling; bij de geslachten *Bacillus* en *Clostridium* kan de cel zich tevens binnen enkele uren differentiëren tot een *spore* die alle eigenschappen van een ruststadium vertoont en die gekenmerkt wordt door een grote resistentie tegen hitte, droogte, straling en chemicaliën waaronder desinfectantia. Bacteriesporen, ook wel endosporen genoemd vanwege hun vorming in de cel, zijn in staat gedurende vele jaren hun rusttoestand of dormancy in stand te houden, maar kunnen eveneens binnen enkele minuten tot ontkieming overgaan en weer uitgroeien tot een normale vegetatieve cel. Bacteriesporen differentiëren onder ogenschijnlijk gunstige omstandigheden echter niet zonder meer tot actief groeiende en delende cellen; eerst dient door activering de dormancy verbroken te worden, bijvoorbeeld door een korte subletale hittebehandeling.

Bacteriesporen zijn microscopisch waarneembaar. De grootte varieert van 0,5-3 μm bij 0,5-1,3 μm . Onder de gewone lichtmicroscopie kunnen de sporen beter zichtbaar gemaakt worden door ze onder verwarming te kleuren met malachietgroen. Zonder kleuring zijn ze zeer goed waarneembaar onder de fasecontrastmicroscopie als sterk lichtbrekende ronde tot ovale lichamen.

De ligging van de spore in de staafvormige cel kan een bijdrage leveren tot de determinatie. Men onderscheidt centrale sporen, indien ze in het midden van de cel zijn gelegen (*C. perfringens*), subterminale sporen, indien ze zich nabij een der uiteinden van de cel bevinden (*B. subtilis*) en terminale sporen, indien ze geheel zijn gelegen aan een uiteinde van de cel (*C. tetani*). Bij het geslacht *Clostridium* zijn de cellen gewoonlijk opgezwollen als gevolg van de aanwezigheid van sporen met een grotere diameter dan die van de vegetatieve cellen. De inwendige structuur

van sporen kan alleen met behulp van de elektronenmicroscopie vastgesteld worden.

DE STRUCTUUR VAN EEN BACTERIESPORE

In figuur 1 wordt een schematisch overzicht gegeven van de interne structuur van een typische bacteriespore. De *protoplast*, ook wel *core* genoemd, bevat de voor een bacterie normale cytoplasmabe-standdelen, zoals DNA, RNA, ribosomen, mesosomen en het merendeel van de spore-enzymen, en wordt door twee specifieke spore-lagen omgeven, namelijk de binnenste laag, de *cortex*, die een rol speelt bij de handhaving van de hiteresistentie en de *coat* die de vorm en de stevigheid aan de spore geeft en samen met het *exosporium* de spore tegen de werking van enzymen en chemicaliën beschermt. De *protoplast* wordt van de *cortex* gescheiden door het *plasmamembraan* en de *kiemcelwand* (Gould & Hurst, 1969 Warth, 1978a).

Het *exosporium* is zeer dun en heeft een regelmatige kristal-structuur. Deze kan zeer los om de spore heen zitten (fig.2) of zo dicht tegen de sporecoat aan dat het nauwelijks waarneembaar is. Bij *Bacillus subtilis* vormt het *exosporium* zelfs één geheel met de sporecoat. Daardoor dacht men vroeger dat deze sporen geen *exosporium* bezaten. Niet alle sporen bezitten een *exosporium*. Het eiwitgehalte van het *exosporium* is zeer hoog. De functie van

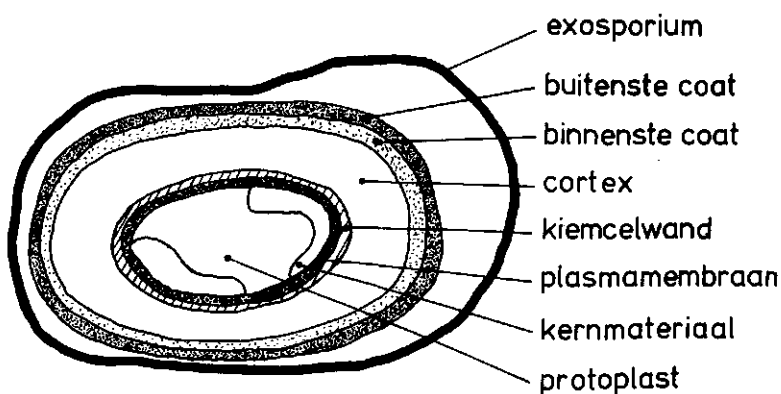


Fig. 1. Schematisch overzicht van de structuur van een bacteriespore.

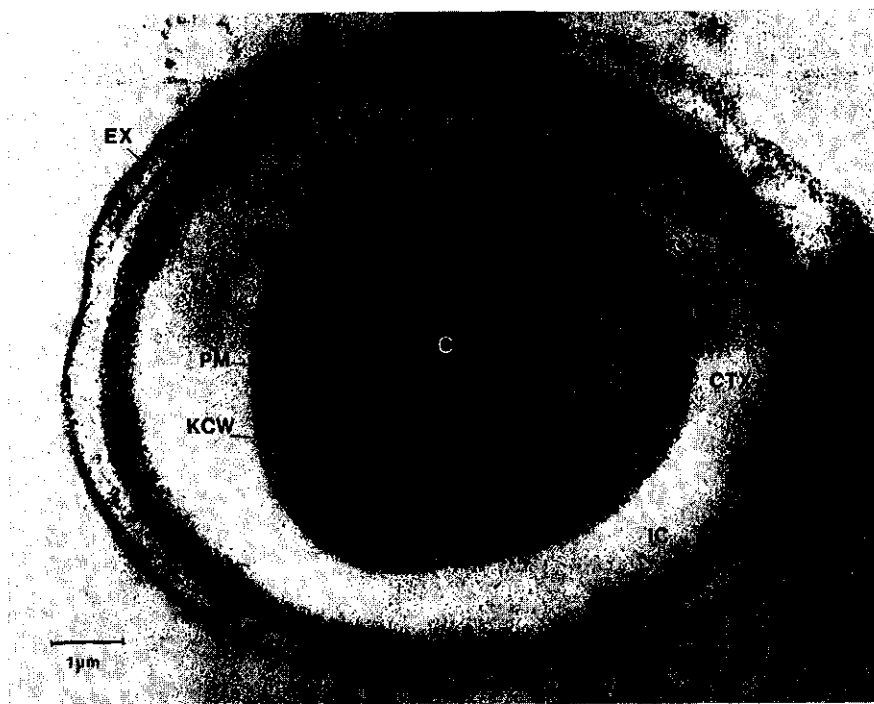


Fig. 2. Elektronenmicroscopische opname van *B. cereus*. C = core; PM = plasmamembraan; KCW = kiemcelwand; CTX = cortex; IC = binnenste sporecoat; OC = buitenste sporecoat; EX = exosporium.

het exosporium is op het ogenblik nog niet duidelijk. Men neemt wel aan dat het de spore een extra bescherming geeft tegen de werking van enzymen en chemicaliën, maar hiervoor bestaan geen directe aanwijzingen.

De coat of sporewand is gelaagd (fig.3) en kan soms onderverdeeld worden in een binnenste en buitenste gedeelte. De coat geeft het karakteristieke uiterlijk aan de spore. Zij heeft een vezelachtige structuur. (fig.4). Bij *B. subtilis* en *B. coagulans* zijn de vezels regelmatig gerangschikt; bij *B. cereus* zijn de vezels veel korter en komen in kleine pakketjes voor. De coat maakt 30 to 60% van het drooggewicht van de spore uit en bestaat voor 80% uit eiwit. Het eiwit van de coat is rijk aan glycine, lysine, asparaginezuur, glutaminezuur en niet-polaire aminozuren. Vooral het cysteïnegehalte is bijzonder hoog. Deze samenstelling wijst erop dat de aanwezige polypeptiden gemakkelijk zowel intra-

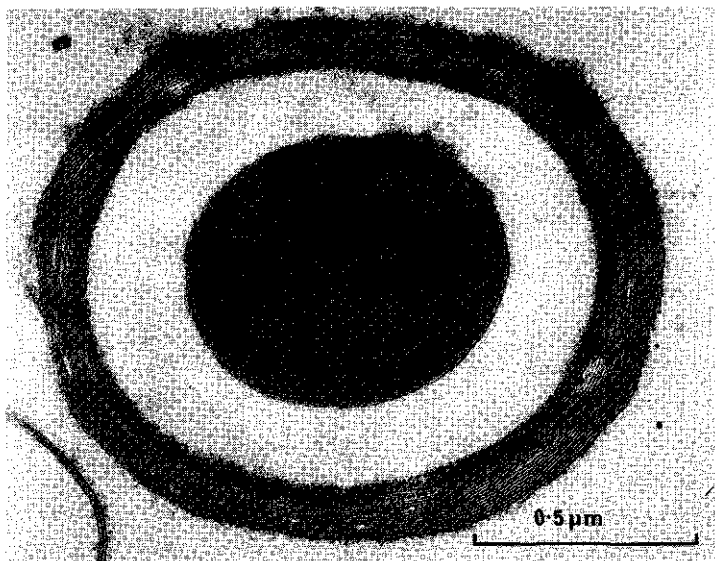


Fig. 3. *C. sporogenes* met zijn buitengewoon meerlagige coat. Bron: Dring et al., 1976.

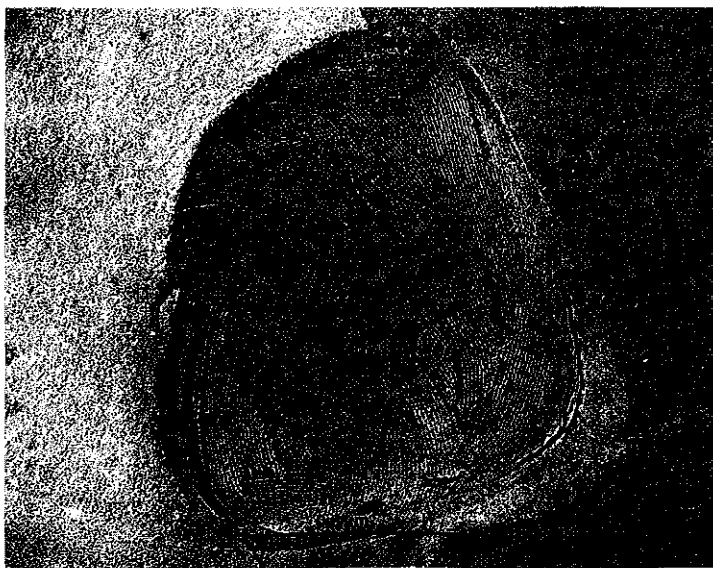


Fig. 4. Freeze etching van *B. coagulans* die de vezelachtige structuur van de buitenste laag van de sporecoat laat zien. Bron: Dring et al., 1976.

en intermoleculaire hydrofobe bindingen als intramoleculaire zwa-
velbruggen en ionparen kunnen vormen. De eigenschappen van de
coateiwitten komen overeen met die van het nageleiwit keratine.
De coat geeft de vorm en de stevigheid aan de spore, en draagt
bij tot de resistentie van de spore tegen chemicaliën en enzy-
men.

De cortex neemt ongeveer de helft van het sporevolume in
(fig.5). De cortex bestaat voor 90% uit peptidoglycan, een poly-
meer dat als een fibrillair netwerk de protoplast omhult. Dit
netwerk bestaat uit parallelle ketens van twee elkaar afwisselende
suikerachtige verbindingen glucosamine en muraminezuur. Deze ke-
tens hebben dwarsverbindingen in de vorm van korte peptidebruggen
tussen de muraminezuurmoleculen (fig.6). De bouw komt in meer of
mindere mate overeen met het peptidoglycan in de celwand van ve-



Fig. 5. Freeze etching van *B. cereus*. Zichtbaar is het exosporium, de diepte
van de sporecoat en het gladde oppervlak van de cortex. Bron: Dring et al.,
1976.

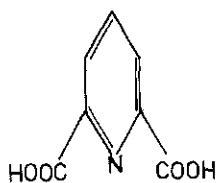


Fig. 7. Dipicolinezuur (DPA).

DPA-gehalte, maar tegenwoordig wordt DPA een rol toebedacht bij de handhaving van de sporedormancy en bij de ontkieming.

De protoplast wordt door het *plasmamembraan* omsloten. Dit is een lipoproteïne membraan dat de permeabiliteit regelt. De protoplast is permeabel voor water en kleine in vet oplosbare moleculen. Men neemt aan dat de grote stabiliteit van dit membraan in de spore ontleend wordt aan het hoge calciumgehalte. Tijdens de ontkieming is het plasmamembraan betrokken bij de synthese van materiaal voor de vegetatieve celwand.

De *kiemcelwand* ontwikkelt zich tijdens de ontkieming van de spore tot de celwand van de dan gevormde vegetatieve cel.

SPOREVORMING

Morfologie

In figuur 8 wordt een schematisch overzicht gegeven van de morfologische veranderingen die kenmerkend zijn voor de verschillende sporuleringsstadia. Het hele sporuleringsproces kan binnen acht uur plaatsvinden. De eerste stadia worden wel opgevat als een gemodificeerde celdeling.

Aan het einde van de groei bevat de vegetatieve cel twee chromosomen (stadium nul). In plaats van door een symmetrische instulping van het cytoplasmamembraan twee dochtercellen te vormen, zoals bij de binaire deling van bacteriën gebruikelijk is, gaan de twee chromosomen zich samenvoegen en ontstaat er een axiale draad van chromatine in het midden van de cel (stadium I). Deze draad is waarschijnlijk via membraanorganellen, de zogenaamde mesomen, met het cytoplasmamembraan verbonden. Vervolgens split-

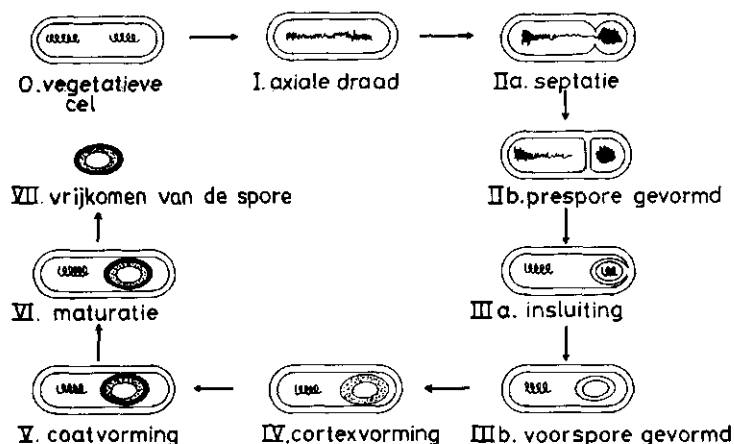


Fig. 8. Schematisch overzicht van de opeenvolgende stadia in de sporulering.

sen de chromosomen zich en begeven ze zich naar het uiteinde van de cel. Onder control van een mesoom wordt gelijktijdig door een asymmetrische instulping van het cytoplasmamembraan een septum gevormd (stadium IIa) en wordt de prespore, waarin zich een volledig genoom bevindt, van de rest van de cel afscheiden (stadium IIb) en door de vegetatieve moeder cel ingesloten (stadium IIIa). Hierdoor wordt de prespore door twee membranen omhuld; het buitenste membraan zit dus als het ware binnenstebuiten. Een volledig ingesloten prespore wordt een voorspore genoemd (stadium IIIb). In tegenstelling tot de prespore hangt de voorspore voor zijn voeding volledig van de in de moeder cel aanwezige verbindingen af. Tussen het binnenste en buitenste voersporemembraan wordt de cortex en de kiemcelwand gesynthetiseerd (stadium IV; fig.8). Aan de buitenzijde van het buitenste voersporemembraan ontstaat de coat (stadium V; fig.8), wat gepaard gaat met het resistent worden van de voorspore tegen enzymen en chemicaliën. Tijdens het rijpings- of maturatiestadium ontstaat de resistentie tegen hitte en straling (stadium VI). Na een gedeeltelijk of volledige lysis van de moeder cel komt de spore vrij te liggen (stadium VII).

Inductie

De vorming van een endospore in een bacteriecel wordt geïnduceerd door het opraken van één of meerdere nutriënten in het medium. Dit kan een koolstof-, stikstofbron of micronutriënt zijn. Toch kan men niet zeggen dat de inductie tot sporevorming uitsluitend het gevolg is van ongunstige milieu-omstandigheden. Vaak vindt er een betere sporulering plaats in een medium dat rijk is aan aminozuren. Tijdens de sporulering worden er hogere eisen aan de pH, de temperatuur en het zuurstofgehalte gesteld dan voor de vegetatieve vermeerdering noodzakelijk is. Aërobe sporevormende bacteriën hebben tijdens dit proces een grotere behoefte aan mangaan en hebben een sterkere beluchting nodig, terwijl anaërobe sporevormende bacteriën juist gevoeliger voor zuurstof zijn dan tijdens de groei.

De biochemische processen die met de sporulering in verband staan, worden gereguleerd door genen of operon-achtige groepen van genen (operon = complex van genen op het DNA die de omzetting van een bepaald substraat coördineert). De sporulering begint aan het einde van de logaritmische groeifase en aan het einde van een celdeling. Men neemt aan dat tijdens de groei deze sporegenen geblokkeerd zijn en dat, wanneer aan het begin van de stationaire groeifase de groei vertraagd wordt doordat de nutriënten in het medium uitgeput raken, deze genen gedeblokkeerd worden. Aan de hand van mutanten heeft men statistisch berekend dat er waarschijnlijk 42 operons bij de sporevorming van *Bacillus subtilis* betrokken zijn (Hoch, 1976). Hieruit blijkt duidelijk hoe ingewikkeld het sporuleringsproces is. Er zijn aanwijzingen dat de inductie tot sporevorming alleen mogelijk is tijdens de replicatie van het DNA-molekuul (Piggot & Coote, 1976, Young, 1978).

Commitment

Tijdens de beginstadia kan de inductie tot sporulering opgeheven worden door de sporulerende cellen naar een vers medium over te brengen of door het toevoegen van nutriënten. Het sporuleringsproces is reversibel zolang de prespore nog niet volledig door twee membranen omgeven wordt en daardoor zelf nutriënten uit het

medium kan opnemen (stadium IIIa) (Cooney et al., 1977). Het vervangen van de opgebraakte nutriënten heeft tot gevolg dat de synthese van celwandmateriaal in het sporeseptum mogelijk wordt en daardoor zowel de prespore als de vegetatieve moedercel weer in staat zijn zich tot normale cellen te ontwikkelen die elk tot celdeling kunnen overgaan. Na de vorming van de voorspore is het moment bereikt dat het sporuleringsproces niet meer onderbroken kan worden. Dit bepaalde moment wordt wel aangeduid met de term 'commitment' (Szulmajster, 1973).

Endotrofe sporulering

Een vegetatieve cel kan een spore vormen zonder nutriënten uit het medium op te nemen. Deze endotrofe sporulering kan plaatsvinden, wanneer men vegetatieve cellen die zich aan het einde van de groeifase bevinden uit het medium haalt, zorgvuldig wast en suspendeert in water of in een bufferoplossing. Aangenomen wordt dat de voor de synthese van de spore benodigde componenten gedeeltelijk al in de moedercel voorhanden zijn en gedeeltelijk vrijgemaakt worden door degradatie van celbestanddelen die de moedercel niet meer nodig heeft. Sommige *Bacillus*-soorten synthetiseren aan het einde van de groeifase intracellulaire reservestoffen in de vorm van polysacchariden en vetten en gebruiken deze stoffen in de beginstadia van de sporulering.

Microcyclische sporulering

Een bacteriespore kan wanneer er te weinig nutrienten in zijn omgeving aanwezig zijn om een gewone cel te vormen onmiddellijk na de ontkieming opnieuw een spore gaan vormen zonder zich eerst te delen. Volgens Keynan et al. (1976) is dit alleen mogelijk, indien de sporeprotoplast twee chromosomen bezit. Sporen die slechts over één chromosoom beschikken, zoals het geval is bij *B. subtilis* dienen eerst via een celdeling hun kernmateriaal te verdubbelen.

ONTKIEMING EN UITGROEI

Onder gunstige omstandigheden kan een spore zich weer tot een actief groeiende vegetatieve cel ontwikkelen. Hierbij zijn drie opeenvolgende stadia te onderscheiden: activering, ontkieming en uitgroei. Deze drie stadia verschillen in fundamenteel opzicht van elkaar. Zij worden door verschillende factoren geïnduceerd, door verschillende remstoffen geblokkeerd en gaan met verschillende soorten biochemische reacties gepaard. *Activering* is een proces dat als regel reversibel is en dat tot gevolg heeft dat de spore gemakkelijker gaat ontkiemen. *Ontkieming* is een irreversibel proces dat gekenmerkt wordt door een serie afbraakreacties, waarbij sporespecifieke verbindingen in grote hoeveelheden vrijkomen uit de spore en waarbij de kenmerkende spore-eigenschappen verloren gaan. *Uitgroei* is een proces van groei en differentiatie dat vooral gepaard gaat met de synthese van nieuwe macromoleculen en dat uit de ontkiemde spore een nieuwe vegetatieve cel doet ontstaan.

Activering

Bacteriesporen ontkiemen niet zonder meer onder gunstige omstandigheden als gevolg van de dormancy of rusttoestand waarin zij verkeren. Deze dormancy ontwikkelt zich tijdens de sporulering in het maturatie- of rijpingsstadium en zo wordt voorkomen dat pasgevormde sporen voortijdig ontkiemen onder omstandigheden die ongunstig zouden zijn voor uitgroei en celdeling. Individuele verschillen in dormancy doen sporen op uiteenlopende tijdstippen ontkiemen, zodat de overlevingskansen worden gespreid.

De dormancy kan doorbroken worden door activering. Geactiveerde sporen zijn niet langer dormant, maar behouden de andere belangrijke en kenmerkende spore-eigenschappen, zoals de buitengewoon grote resistentie tegen hitte, de slechte kleurbaarheid en de sterkere lichtbreking. Sporen kunnen geactiveerd worden door subletale verhitting, lage pH (1,0-1,5), reducerende en oxyderende stoffen, en CaDPA (Keynan & Evenchik, 1969). Een activering die van nature in een spore wordt teweeggebracht, wordt veroor-

zaakt door veroudering. Veroudering is een in de tijd voortschrijdend proces dat uiteindelijk zelfs kan leiden tot een spontane ontkieming. Van bovengenoemde methoden wordt hitte-activering het meest toegepast.

Activering van sporen is vooral van belang bij het tellen, omdat hierdoor de mate en/of de snelheid van ontkieming vergroot kan worden. Het vaststellen van de juiste activeringscondities wordt echter bemoeilijkt, omdat hierbij zowel de soort of soms zelfs de stam als de voorgeschiedenis en de ouderdom van de sporepopulatie een rol spelen. Activering is meestal een reversibel proces. Hitte-activering kan bijvoorbeeld tenietgedaan worden door de geactiveerde sporen te bewaren bij temperaturen beneden het ontkiemingsminimum.

Op welk mechanisme activering van sporen berust is nog niet duidelijk. Men veronderstelt dat activering samenhangt met veranderingen in de configuratie van spore-macromoleculen en dat dientengevolge de ontkieming gemakkelijker geïnitieerd kan worden (Keynan & Evenchik, 1969).

Ontkieming

Het ontkiemingsproces speelt zich geheel af binnen de sporecoat. Men kan echter de ontkieming waarnemen, doordat de sporen gemakkelijker kleurstoffen gaan opnemen, het hoge refractievermogen verdwijnt waardoor de sporen onder een fasecontrastmicroscop donker worden, en de extinctie van een sporesuspensie afneemt.

De ontkieming kan vrij gemakkelijk geïnitieerd worden door het toevoegen van bepaalde verbindingen, zelfs in een milieu waar geen voedingsstoffen aanwezig zijn, zoals in water. Geactiveerde sporen ontkiemen na initiëring binnen een tijdsduur van een paar seconden tot enkele minuten. Als initiators kunnen functioneren nutriënten (bepaalde aminozuren, suikers, nucleosiden), stoffen die niet gemetaboliseerd worden (ionen, chelaten, oppervlakte-actieve stoffen) en enzymen (Gould, 1970a). Daarnaast kan de ontkieming met fysische methoden teweeggebracht worden, bijvoorbeeld door sporen onder een hoge hydrostatische druk te brengen (Murrell & Wills, 1977) of door ze te schudden met glasparels (Lewis et al., 1960). In tegenstelling tot de andere initiators

hebben nutriënten de neiging meer soort- of soms zelfs stamspecifiek te zijn. Glucose en L-alanine zijn het meest universeel en worden daardoor ook het meest toegepast. De effectiviteit van de initiators kan dikwijls verbeterd worden door gebruik te maken van combinaties en door een voorafgaande activering.

Het ontkiemingsmechanisme is nog niet opgehelderd. Recente waarnemingen maken het echter aannemelijk te veronderstellen dat de ontkiemingsinitiator kleine veranderingen in bepaalde moleculen (receptor-moleculen) in het plasmamembraan aanbrengt, waardoor de permeabiliteit verandert (Keynan, 1978). Hierdoor kan door een uitwisseling van ionen en organische zuren de core water opnemen, zodat de aanwezige enzymen van een latente in een actieve toestand kunnen overgaan. Tijdens de ontkieming worden geen nieuwe enzymen of andere celbestanddelen gesynthetiseerd. Remmers van de eiwit- of nucleïnezuursynthese zoals chlooramfenicol en actinomycine D hebben dus geen effect op de ontkieming.

De geactiveerde enzymen beginnen met de afbraak van de cortex, de core-eiwitten en een gedeelte van de sporecoat. Als gevolg hiervan komen in grote hoeveelheden sporespecifieke substanties, zoals fragmenten van het gehydrolyseerde peptidoglycan uit de cortex en Ca^{2+} en DPA uit de core vrij. Tijdens de ontkieming scheidt de spore 30% van haar droge-stofgewicht uit in het medium. De veranderingen in de sporestructuur gaan gepaard ondermeer met het verlies aan resistentie tegen hitte, straling en chemische stoffen.

Uitgroei

Indien de ontkieming plaatsvindt in water, zonder nutriënten, zal de ontkiemde spore zich niet verder ontwikkelen. Wanneer echter de voor de groei noodzakelijke nutriënten worden toegevoegd, ook al geschiedt dit enkele dagen later, dan zwelt de ontkiemde spore, de nucleïnezuur- en eiwitsynthese komt op gang, en op een gegeven moment komt uit de spore de nieuwe cel tevoorschijn, die zich verder door celstrekking tot een normale vegetatieve cel ontwikkelt (fig. 9). Onder optimale omstandigheden ontwikkelt een ontkiemde spore zich binnen 100 minuten tot een nieuwe vegetatieve cel. Wanneer onvoldoende nutriënten aanwezig zijn, kan

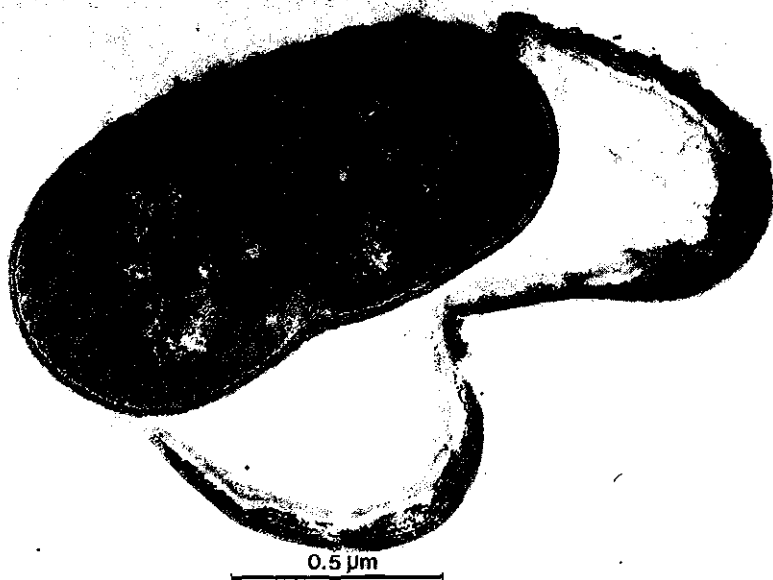


Fig. 9. Uitgroei van de spore van *B. polymyxa*. Zichtbaar zijn de laterale wijze van naar buiten komen, de verlenging en het begin van celdeling van de nieuwe vegetatieve cel, samen met het afwerpen van de sporecoat. Bron: Dring et al., 1976.

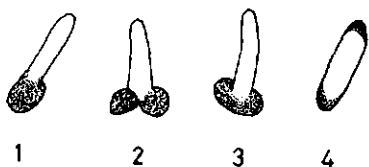


Fig. 10. Verschillende wijzen van het naar buiten komen van de nieuwe vegetatieve cel tijdens het stadium van uitgroei.

de uitgroeiende cel meteen opnieuw tot sporevorming overgaan (microcyclische sporulering) dan wel een cyste-achtige cel vormen (Keynan, 1973).

De zwelling van de ontkiemde spore die het gevolg is van wateropname door de sporeprotoplast, doet het sporevolume gemiddeld met een factor 2 à 3 toenemen. De gezwollen protoplast blijft nog binnen het sporeomhulsel totdat de celwand zich in voldoende mate ontwikkeld heeft en bescherming kan bieden tegen osmotische drukken, hetgeen meestal halverwege het uitgroeiproces het geval is. De cel kan, zoals in figuur 10 schematisch is weergegeven, op

verschillende manieren naar buiten treden: 1. polair (*Bacillus cereus*), 2. lateraal door splijting van de sporecoat (*B. subtilis*) 3. lateraal zonder splijting (*B. licheniformis*) 4. door absorptie van de sporecoat (*B. megaterium*).

Biochemisch kan men de uitgroei volgen aan de hand van de RNA-, de eiwit- en de DNA-synthese. De ademhaling en het energie-metabolisme starten tegelijkertijd met de ontkieming. De RNA-synthese begint bij *B. cereus* onder optimale omstandigheden 2,5 minuut na het initiëren van de ontkieming, de eiwit-synthese na 4 minuten en de DNA-synthese pas na 120 minuten, vlak voor de eerste celdeling (Hanson et al. 1970).

In de sporeprotoplast van een dormante spore zijn de voor een bacteriecel essentiële cytoplasmabestanddelen aanwezig; alleen m-RNA ontbreekt. De ribosomen zijn niet functioneel; zij worden tijdens het ontkiemingsproces tegelijkertijd met de enzymen voor de ademhaling en de eiwitsynthese geactiveerd, zodat na de ontkieming een intact systeem voor de eiwitsynthese naast die voor de nucleïnezuursynthese voorhanden is.

Door de afbraak van spore-RNA komen tijdens de ontkieming nucleotiden vrij en door de afbraak van core-eiwitten aminozuren. Deze worden opnieuw benut tijdens de uitgroei voor de nucleïnezuur- en eiwitsynthese (Settlow, 1977). Daardoor kan direkt na de ontkieming de synthese van m-RNA aanvangen, spoedig gevolgd door eiwitsynthese.

Er zijn aanwijzingen dat de regulatieve processen die de ontkiemende spore doet uitgroeien tot een normale vegetatieve cel, zich afspelen op het niveau van de transcriptie van RNA (Keynan, 1973). Tijdens de uitgroei vindt een continue synthese van niet-stabiele m-RNA plaats. Het labiele karakter van m-RNA is noodzakelijk voor het bijsturen van de eiwitsynthese. Op deze wijze ontstaat er een opeenvolgende en tijdsgeordende verandering in het synthesepatroon van eiwitten die in de vorm van enzymen de samenstelling en structuur van de cel bepalen.

Resistentie

In een spore zijn geen essentiële celbestanddelen aanwezig die van nature een verhoogde resistentie bezitten tegen ongunstige invloeden van het milieu. Vele van de in de spore aanwezige enzymen, het DNA, het RNA, de ribosomen en andere vitale bestanddelen zijn in vitro niet of nauwelijks resistenter dan de overeenkomstige verbindingen uit de vegetatieve moedercel. Dit impliceert dat de spore over een mechanisme moet beschikken die de stabiliteit van bovengenoemde essentiële macromoleculen verhoogt. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat de buitengewoon grote resistentie samenhangt met de bijzondere morfologische sporestructuur. De sporeprotoplast, het plasmamembraan en de kiemcelwand doen de spore lijken op een gecondenseerde vegetatieve cel die door de coat en de cortex tegen ongunstige invloeden van buitenaf wordt beschermd.

De coat speelt een rol bij de mechanische bescherming van de spore en de resistentie tegen de inwerking van verschillende enzymen en chemische stoffen, hetgeen onder meer samenhangt met het hoge gehalte aan keratineachtige eiwitten in de coat (Aronson & Pandey, 1978). Wanneer de coatstructuur door mutatie, remming van de synthese of extrahering van coateiwitten wordt verbroken, neemt de gevoeligheid voor enzymen, zoals lysozym, en voor chemische stoffen, zoals octanol, aanzienlijk toe, maar de resistentie tegen hitte blijft onveranderd. Hieruit blijkt dat de coat geen directe rol speelt bij de handhaving van de hitteresistentie (Warth, 1978a).

Dit in tegenstelling tot de cortex. Wanneer men aan bovengenoemde enzympermeabele sporen het enzym lysozym toevoegt, verdwijnt de hitteresistentie, zodra het peptidoglycanpolymeer uit de cortex door hydrolyse gedepolymeriseerd wordt (Gould, 1970). Verondersteld wordt dat de verhoogde stabiliteit van essentiële spore-macromoleculen voor een gedeelte samenhangt met een laag watergehalte in de protoplast en dat de cortex een functie heeft bij de handhaving van dit lage watergehalte. Men neemt in het algemeen aan dat bij micro-organismen de dodende werking van hitte

berust op coagulatie van essentiële macromoleculen, zoals eiwitten en nucleïnezuren (Pflug & Schmidt, 1968); in droge toestand coaguleren deze macromoleculen minder snel.

Pasteur toonde in 1861 al aan dat door drogen de hitteresistentie van micro-organismen toeneemt en op grond hiervan schreef Cohn (1877) de hitteresistentie van sporen toe aan een laag watergehalte. Lewith (1890) berekende zelfs op grond van zijn onderzoeken naar de stabiliteit van het wit van kippe-eieren dat het binnenste gedeelte van een spore ongeveer voor 10% uit water moest bestaan; een waarde die tegenwoordig algemeen gehanteerd wordt. Directe aanwijzingen voor een gedehydrateerde toestand van de protoplast vormen de hoge refractiewaarde (1,5) en de hoge soortelijke dichtheid (1,4) die sporen bezitten. Deze waarden kunnen alleen verklaard worden door aan te nemen dat de protoplast een gecondenseerde structuur bezit. Experimentele steun voor de opvatting van Cohn kwam uit het onderzoek van Murrell & Scott (1966). Zij bestudeerden de invloed van de wateractiviteit (a_w) op de hitteresistentie en namen waar dat bij lage a_w sporen veel resistenter waren dan bij hoge a_w . Vooral bij meer hittegevoelige sporen, zoals *Clostridium botulinum* type C, nam de hitteresistentie enorm toe door verlaging van de a_w ; dit in tegenstelling tot de zeer hitteresistente sporen van *Bacillus stearothermophilus*, zodat het grote verschil in hitteresistentie tussen deze sporen bijna verdween. Aangenomen werd dat de protoplast van *C. botulinum*, gezien de lage hitteresistentie, in een waterig milieu meer water bevatte dan die van *B. stearothermophilus*, waardoor een verandering hierin door a_w -verlaging een veel groter effect op de hitteresistentie zou hebben.

Over de moleculaire achtergrond van de verhoogde stabiliteit van essentiële verbindingen, zoals enzymen, nucleïnezuren, ribosomen en de celmembranen bij een laag watergehalte, is nog weinig bekend (Gould & Measures, 1977). Mogelijkerwijs draagt het hoge gehalte aan elektrolyten, zoals calcium en mangaan, en andere laag-moleculaire verbindingen, zoals glutaminezuur, in de protoplast bij tot deze stabilisering.

Over de wijze waarop de cortex betrokken is bij de totstandkoming en handhaving van een gedehydrateerd protoplast kan men chronologisch de volgende hypothesen onderscheiden:

- *De contraherende cortex-theorie.* Deze werd geformuleerd door Lewis et al. (1960) en houdt in dat de dikke peptidoglycanlaag in de cortex zich tijdens de sporulering samentrekt en voldoende mechanische druk uitoefent om het water uit de ingesloten protoplast te persen en zo dit gedeelte gedehydrateerd te houden. Het peptidoglycan dat als het ware één reusachtig zakvormig macromolecuul om het protoplast vormt en dat voornamelijk uit parallelle ketens van suikerachtige verbindingen bestaat, bevat veel vrije carboxylgroepen. In niet-zuur milieu zijn de carboxylgroepen gedissocieerd, zodat het polymeer dan negatief geladen is. Het netwerk van ketens zal een minder verdichte structuur aannemen, doordat de individuele ladingsplekken elkaar afstoten. Lewis et al. namen aan dat aan het einde van de sporulering een actief transport van calcium-ionen naar de cortex plaatsvond en het peptidoglycanpolymeer zou krimpen en daardoor de ingesloten protoplast samenpersen als gevolg van de vorming van Ca^{2+} -bruggen tussen de negatief geladen carboxylgroepen.

- *De expanderende cortex-theorie.* Uitgaande van de contraherende cortex-theorie zou verwacht mogen worden dat, wanneer de dissociatie van de carboxylgroepen sterk teruggedrongen wordt door sporen met zuur te behandelen, waardoor de onderlinge afstoting kleiner wordt en het polymeer krimt, de hitteresistentie toeneemt. Alderton & Snell (1963) vonden daarentegen dat de hitteresistentie door een zuurbehandeling afnam. Op grond hiervan stelden zij de hypothese op dat het peptidoglycan zich tijdens de sporulering niet samentrekt, maar door onderlinge elektrostatistische afstoting van de geïoniseerde carboxylgroepen zwelt, zich afzet tegen de onbuigzame sporecoat en zo een mechanische druk op de protoplast uitoefent om het water weg te persen. Aanvullende argumenten voor een geëxpandeerde cortex werden door Gould & Dring (1975a) naar voren gebracht.

- *De geëxpandeerde osmoregulerende cortex-theorie.* Gould & Dring (1975) werkten de hypothese van Alderton & Snell (1963) verder uit en waren van mening dat naast de mechanische expansie van de cortex de handhaving van een laag watergehalte in de protoplast mede gewaarborgd wordt, doordat de cortex een osmotische druk in stand houdt. Deze theorie wordt door Gould verder besproken in de hierna volgende bijdrage.

- *De anisotropische gezwollen cortex-theorie.* Deze omvat een andere uitwerking van de hypothese van Alderton & Snell (1963) door Warth (1978a). Het door elektrostatistische afstoting gezwollen peptidoglycan behoeft zich niet tegen de coat af te zetten, maar zwelt tijdens de sporulering in radiale richting, waardoor de ingesloten protoplast wordt samengedrukt. Deze anisotropische zwellling, dat wil zeggen een zwellling die niet in alle richtingen gelijk groot is, zou tot stand kunnen komen door verwijdering van peptide-dwarsverbindingen in het peptidoglycan aan het einde van de sporulering door hydrolytische enzymen en de vorming van muraminelactam-, l-alanine-, en tetrapeptide-subeenheden door transaminasen (fig.6). Volgens Warth neemt het volume van de cortex slechts weinig toe. Omdat tegelijk met de vorming van de cortex DPA gesynthetiseerd wordt, zal een gedeeltelijke vervanging van water door DPA mede tot de dehydratering van de protoplast bijdragen.

Geen enkele van bovenstaande theorieën is in staat het mechanisme van de hitteresistentie volledig te verklaren.

Vroeger dacht men dat DPA, dat ongeveer 30% van het drooggewicht van de protoplast uitmaakt, van essentieel belang was voor de hitteresistentie. Deze opvatting kwam naar voren na de ontdekking van Powell (1953). Hij constateerde dat sporen wél en vegetatieve cellen géén DPA bevatten en werd hierin gesteund door de waarnemingen dat het verlies van hitteresistentie tijdens de ontkieming gepaard gaat met het vrijkomen van DPA en dat onder bepaalde omstandigheden een goede correlatie bestaat tussen de hitteresistentie en het DPA-gehalte. Men was echter gedwongen van dit standpunt af te stappen na de ontdekking van Hanson et al. (1972). Zij vonden dat sporemutanten welke DPA-negatief waren, niettegenstaande toch dezelfde hitteresistentie bezaten als DPA-positieve sporen van het wilde fenotype. Uit het feit dat deze mutanten tijdens opslag snel hun dormancy-eigenschappen verloren en moeilijk met de gebruikelijke ontkiemingsinitiators tot ontkieming gebracht konden worden, trok men de conclusie dat DPA mogelijk een rol speelt bij de handhaving van de dormancy en de initiëring van de ontkieming.

Evenals andere micro-organismen kunnen bacteriesporen door een hitte- of andere procesbehandeling zodanig beschadigd worden dat zij niet langer in staat zijn onder dezelfde milieucondities tot herkenbare kolonies uit te groeien als onbehandelde sporen. Bij sporen kunnen deze subletale beschadigingen zowel bij de celdeling als bij de ontkieming en de uitgroei tot uiting komen (Hurst, 1977).

Bij sporen wordt meestal door een hittebehandeling eerst het vermogen tot celdeling aangetast. Zo vonden Levinson & Hyatt (1971) dat bij *B. megaterium* tenminste 94% van de sporen die bij temperaturen van 75 tot 85 °C verhit werden, hun ontkiemingsvermogen behielden, maar geen herkenbare kolonies meer konden vormen. Minder dan 6% ontkiemde niet. Voortzetting van de hittebehandeling had tot gevolg dat tenslotte alle sporen hun ontkiemingsvermogen verloren. Een andere beeld wordt echter verkregen, indien de verhitting bij ultrahoge temperaturen geschiedt (Busta, 1976). Bij een kort-hoog-verhitting neemt het percentage sporen dat niet kan ontkiemen aanzienlijk toe. Deze beschadigingen zijn echter van subletale aard, want door aan de voedingsbodem lysozym (*C. botulinum* en *C. perfringens*) of CaDPA (*B. subtilis*) toe te voegen ontkiemen de sporen en vormen herkenbare kolonies. Men neemt aan dat bij deze hoge temperaturen allereerst het gebruikelijke ontkiemingsmechanisme beschadigd wordt en dat door toevoeging van niet-voedingsachtige ontkiemingsinitiators de sporen in de gelegenheid gesteld worden via een andere weg tot ontkieming over te gaan.

Subletale beschadigingen van andere aard kunnen resulteren in een wijziging in de optimale ontkiemings- of uitgroei temperatuur, vergroting van de gevoeligheid voor bepaalde stoffen, zoals zouten, antibiotica of andere remstoffen, dan wel in een grotere behoefte aan micro- of macronutriënten (Adams, 1978). Een gedeelte van bovengenoemde subletale beschadigingen bij sporen, in het bijzonder die tijdens de uitgroei tot uiting komen, herstellen zich door een resuscitatiebehandeling in een niet-selectief medium onder optimale omstandigheden.

Het mechanisme van de sporeresistentie en -dormancy

G.W. Gould, Unilever Research Laboratory, Colworth House,
Sharnbrook, Bedford, MK44 1LQ, United Kingdom

INLEIDING

Om de resistentie van bacteriesporen in voedingsmiddelen te verlagen staan ons slechts enkele bruikbare methoden ter beschikking. Dit zijn volgens Roberts & Hitchins (1969): verhitting bij lage pH-waarden, blootstelling aan lage pH-waarden voorafgaande aan verhitting bij hogere pH-waarden (Alderton & Snell, 1963), verhitting in aanwezigheid van pekelzouten (NaCl , NaNO_3), verhitting in aanwezigheid van het antibioticum nisine, bestraling voorafgaande aan verhitting en toepassing van hydrostatistische druk (Clouston & Wills, 1969; Gould & Sale, 1970). De mogelijkheid om een keuze te doen uit een groter aantal methoden dan hierboven genoemd, zou voor voedingsmiddelenmicrobiologen van nut kunnen zijn. Het is daarom te hopen dat ieder nieuw verworven inzicht in de aan de resistentie en de dormancy ten grondslag liggende mechanismen uiteindelijk tot de ontwikkeling van nieuwe sporebeheersingsmethoden zal leiden. In deze bijdrage worden enkele nieuwe ideeën beschreven met betrekking tot de wijze waarop sporen hun buitengewone resistentie en dormancy kunnen handhaven, samen met enkele hieruit voortvloeiende praktische implicaties en enkele mogelijk nieuwe benaderingswijzen tot sporebeheersing die de moeite waard zijn nader onderzocht te worden.

COMPARTIMENTENVORMING TIJDENS DE VORMING VAN DE SPORE

Tijdens de beginstadia van de sporevorming heeft de asymmetrische deling van de protoplast en de daaropvolgende insnoering tot gevolg dat er een cellulaire structuur ontstaat die uniek is voor prokaryonten (fig. 1). Het compartiment dat later de sporeprotoplast zal worden, wordt geheel omgeven door het moeder-

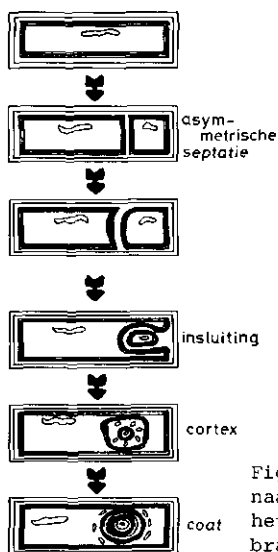


Fig. 1. Sporevorming. Schematische weergave van de voor-
naamste morfologische veranderingen die plaatsvinden, in
het bijzonder ten aanzien van de plaatsing van de mem-
branen (dikke lijnen).

celcompartiment en wordt tevens van de omgeving afgescheiden door drie membranen, namelijk het binnenste voorsporemembraan, het buitenste voorsporemembraan en het moedercelmembraan. De insluiting heeft tot gevolg dat de ligging van het buitenste voorsporemembraan zodanig is dat de polariteit van dit membraan is omgekeerd (Fitz-James & Young, 1969; Wilkinson et al., 1975).

Voor de resistentie en dormancy is het belangrijk te weten dat de moedercel door deze ongebruikelijke compartimentenvorming in staat is de omgeving van de ingesloten voorspore onder controle te houden. Blijkbaar speelt het watergehalte van de ingesloten cel hierin een belangrijke rol. Er zijn belangrijke aanwijzingen dat het watergehalte van de voorspore tijdens de vorming van de spore afneemt. De grootte van de voorspore neemt af en de gevoeligheid voor ultraviolet licht van het DNA verandert op een wijze die vergelijkbaar is met de reductie van het watergehalte, juist voordat de verhoogde lichtbreking van de spore tot stand komt (Germaine et al., 1973).

De reductie van het watergehalte hangt zeer waarschijnlijk samen met een reductie van de hoeveelheid oplosbare laagmoleculaire verbindingen in de voorspore. Als gevolg hiervan wordt de osmotische druk kleiner, zodat water vanuit de voorspore naar

het cytoplasma van de moedercel gaat, totdat het osmotisch evenwicht hersteld is. Op een later tijdstip wordt de cortex om de gecontraheerde protoplast, tussen het binnenste en buitenste membraan van de voorspore, gesynthetiseerd. De cortex, die elektronegatief peptidoglycan en positief geladen tegenionen bevat, houdt een osmotische druk in stand (fig. 2) die waarborgt dat de ingesloten protoplast een betrekkelijk laag watergehalte handhaaft, wanneer de spore zich van de moedercel vrijmaakt, zelfs wanneer de spore zich in zuiver water bevindt (Gould & Dring, 1975). Warth (1978a) heeft het idee van expansie en contractie van de cortexpolymeer verder uitgewerkt tot het concept van een hoog geordende anisotrope expansie in radiale richting waardoor de ingesloten protoplast zou worden samengedrukt. Het idee van de expansie en de osmotische activiteit van de cortex sluit goed aan bij de meeste feiten die over sporen bekend zijn, maar is nog niet verenigbaar met de waarnemingen van Cartensen & Marquis (1975) die uit elektrochemische gegevens concludeerden dat ionen in sporen onbeweeglijk zijn.

OSMOTISCHE BEHEERSING VAN DE RESISTENTIE

Uit onderzoeken naar de invloed van oplossingen met een hoge osmotische druk op de resistentie van sporen, ontkiemde sporen

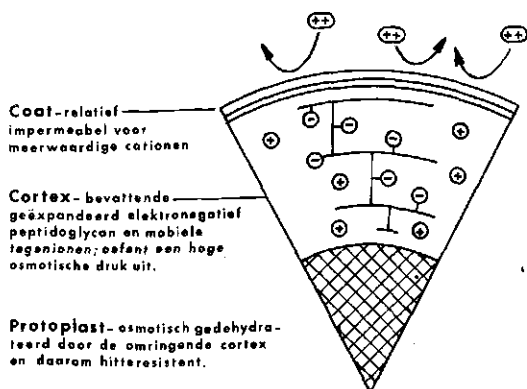


Fig. 2. Schematische weergave van de osmoregulerende cortex en de compartimentenvorming in een resistente en dormante spore. $\ominus$ negatief geladen groepen aan het cortexpeptidoglycan; $+$ positief geladen eenwaardige tegenionen; $\oplus$ meerwaardige kationen (Gould & Dring, 1975).

en vegetatieve cellen is naar voren gekomen dat osmose een belangrijke rol speelt. Zo kunnen bijvoorbeeld sporemutanten met onvolkomen 'lekke' coats en sporen die met mercapto-ethanol/ureum behandeld zijn om de permeabiliteit van de coats te vergroten, gevoelig voor hitte gemaakt worden door deze sporen in oplossingen van meerwaardige kationen zoals Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} en La^{3+} te suspenderen. Aangenomen wordt dat de kationen de elektronegatief geladen carboxylgroepen ($-\text{COO}^-$) van het peptidoglycan-polymeer in de cortex neutraliseren, waardoor de osmotische druk in de cortex afneemt en er een gedeeltelijke hydratatie van de ingesloten sporeprotoplast plaatsvindt. Dergelijke sporen worden door sterk geconcentreerde sucrose-oplossingen (boven 1,5 M) tegen hitte-activering beschermd, zeer waarschijnlijk door herstel van de verloren gegane osmotische druk (Gould & Dring, 1975). De polykationische (meervoudig positief geladen) kleurstof 'alcian blue', die zich bindt aan zure polysacchariden en verwante verbindingen, waaronder peptidoglycanen (Grula & Hartsell, 1954) kleurt 'lekke' sporen en maakt deze sporen eveneens op zeer doeltreffende wijze hittegevoelig. Met behulp van sucrose kunnen de gekleurde sporen weer osmotisch beschermd worden (tabel 1).

Het is algemeen bekend dat de thermoresistentie van sporen

Tabel 1. Het hitte-gevoelig maken van *Bacillus megaterium*-sporen door kleuring met 'alcian blue', en bescherming door sucrose. Sporen van een coat-deficiënte stam van *B. megaterium* ATCC 9885; Mercapto-ethanol-ureum-behandeling: gedurende 60 min bij 60 °C in β -mercapto-ethanol (10 % V/V) plus ureum (8 mol l^{-1} ; pH 7,0) 'Alcian blue'-kleuring (2 % m/V; pH 2,5) gedurende 30 min bij 20 °C; De behandelde en gekleurde sporen werden goed met water gewassen; De sporensuspensies werden in een water of sucrose-oplossing (2 mol l^{-1}) van 80 °C geïnjecteerd. Na 30 min werd het aantal overlevende sporen bepaald met behulp van de gebruikelijke telplaatmethode.

	Overlevende sporen (%)			
	verhit in water		verhit in sucrose	
	ongekleurd	gekleurd	ongekleurd	gekleurd
Onbehandeld	81	2.4	100	34
Behandeld met mercaptoethanol-ureum	84	0.0006	100	20

bij lage pH-waarden geringer wordt en bovendien dat na een voldoende lange incubatieperiode bij lage pH (sporen in de 'H-vorm'; Alderton & Snell, 1963) de sporen relatief hittegevoelig blijven, zelfs wanneer de pH verhoogd wordt, waarna ze weer langzaam hun resistentie herkrijgen. Deze hittegevoeligheid ten gevolge van een lage pH kan men nu als volgt verklaren. In zuur milieu wordt de dissociatie van de carboxylgroepen van het peptidoglycan sterk teruggedrongen. Dientengevolge neemt de expansie van de cortex af en verdwijnen de positief geladen tegenionen uit de cortex, waardoor de osmotische druk in de cortex lager wordt en er een gedeeltelijke rehydratatie van de ingesloten protoplast optreedt. Door Smelt et al. (1977) is heel duidelijk aangetoond dat sporen van bepaalde soorten sporevormers tegen hitte-inactivering bij lage pH beschermd kunnen worden door ze te suspenderen in oplossingen die een hoge osmotische druk bezitten. Het effect kan zeer geprononceerd zijn. Sporen van *Bacillus cereus* T werden door een 3 M sucrose-oplossing volledig beschermd tegen een hittebehandeling bij 80 °C gedurende 30 minuten bij een pH van 1,5 (tabel 2).

De osmoregulahypothese houdt in dat een hoge ladingsdichtheid in de cortex zou moeten resulteren in een maximale bescherming tegen hitte. Aanwijzingen hiervoor komen uit de chemische analyses van in thermoresistentie variërende sporen uitgevoerd door Murrell et al. (1969). Het gehalte aan diamino-pimelinezuur (DAPA), een elektronegatief hoofdbestanddeel van de cortex, varieerde met een factor 4 en deze variatie vertoon-

Tabel 2. Osmotische bescherming van sporen van *Bacillus cereus* T tegen hitte-inactivering bij lage pH-waarden. De pH werd met HCl ingesteld; zie voor verdere gegevens tabel 1.

pH	Overlevende sporen (%) na verhitting (30 min, 80 °C)	
	met 3M sucrose	zonder sucrose
5,0	85	34
4,0	70	23
3,0	65	4,3
2,0	70	0,001
1,5	80	0,001

de een goede correlatie met de thermoresistentie. Bovendien zou men kunnen verwachten dat een hoge thermoresistentie gepaard gaat met een hoge concentratie aan totaal peptidoglycan. Dit heeft waarschijnlijk tot gevolg dat, wanneer sporen bij lage a_w -waarden bewaard worden, hetgeen Murrell & Scott (1966) lieten zien, de thermoresistentie van sporen van sommige bacteriesoorten aanzienlijk kan toenemen.

Een overtuigend bewijs voor de belangrijkheid van de grootte van de cortex werd gegeven door Pearce & Fitz-James (1971) en door Imae & Strominger (1976a, 1976b) die cortexloze en cortex-deficiënte mutanten en mutanten waarin de hoeveelheid peptidoglycan experimenteel kon worden gevarieerd, isoleerden, zij toonden aan dat de thermoresistentie op kritische wijze afhing van de aanwezige hoeveelheid peptidoglycan.

Onmiddellijk na het initiëren van de kieming en het ermee gepaard gaande gevoelig worden voor hitte expandeert de spore-protoplast in sterke mate.

Een aanvullend bewijs voor de belangrijkheid van osmose voor de thermoresistentie kwam naar voren uit experimenten waarin ontkiemde sporen werden verhit in sterk geconcentreerde oplossingen die niet gemakkelijk plasmamembranen permeëren (bijvoorbeeld sucrose). Deze oplossingen zijn in staat de pas gehydrateerde protoplast osmotisch te dehydrateren en de thermoresistentie van de juist ontkiemde sporen volledig te herstellen (Dring & Gould, 1975a). Aan de andere kant gaf glycerol, waarvan verwacht kan worden dat het gemakkelijk het membraan permeëert en daarom geen osmotische gradiënt teweeg zou brengen, geen bescherming bij equivalente osmotische waarden.

De resistentie van bacteriesporen tegen gammabestraling, die tijdens de kieming verloren gaat, werd hersteld, wanneer de ontkiemde sporen snel in sterk geconcentreerde sucrose-oplossingen werden gesuspenseerd, voordat de bestraling werd uitgevoerd. Bovendien werd de schouder die kenmerkend is in de overlevings-curve van *B. cereus*-sporen en die verdwijnt tijdens de kieming, hersteld door sucrose (Gould, 1978).

De effectiviteit van sucrose ter bescherming van ontkiemde sporen tegen verhitte en gammabestraling was het grootst onmiddellijk nadat de kieming was begonnen. Deze effectiviteit

nam af naarmate meer tijd verliep na de aanvang van de ontkieming, hetgeen vooral naar voren kwam in een rijk medium (Dring & Gould, 1975a). Aangenomen wordt dat door een toename van het gehalte aan laagmoleculaire verbindingen in de metabolisch actieve ontkiemde spore, de osmotische dehydratatie, veroorzaakt door extern toegevoegde stoffen, steeds minder effectief zal worden.

Er zijn soortgelijke aanwijzingen uit onderzoeken met vegetatieve cellen. De concentratie aan oplosbare laagmoleculaire verbindingen in het cytoplasma van vegetatieve cellen van *Bacillus subtilis* kan veranderd worden, van beneden 0,1 tot een eind boven 1,0 M, door de cellen te laten groeien in de aanwezigheid van een oplopende concentratiereeks van stoffen die niet gemakkelijk de cel binnendringen, zoals natriumchloride of sucrose, maar niet door stoffen zoals glycerol die dat gemakkelijk doen (Measures, 1975). De cellen voeren hun osmoregulatie zodanig uit dat hun interne gehalte aan oplosbare stoffen, dat hoofdzakelijk uit proline bestaat, omhoog gaat om het osmotisch evenwicht met het omringende medium te handhaven. Op deze wijze voorkomt de cel dat door osmose water wordt verloren (Gould & Measures, 1977). Deze cellen met een hoog gehalte aan oplosbare laagmoleculaire verbindingen worden in tegenstelling tot cellen met een laag gehalte aan oplosbare laagmoleculaire verbindingen niet door sterk geconcentreerde sucrose-oplossingen tegen hitte-inactivering beschermd (Gould & Dring, 1977).

Corry (1974, 1976a, 1976b) liet zien dat de thermoresistentie van niet-sporevormende organismen (*Salmonella*-soorten en osmofiele gisten) kon toenemen, soms wel bijna duizendvoudig, door de cellen te suspenderen in sterk geconcentreerde oplossingen van impermeabele stoffen en dat deze cellen plasmolyse vertoonden, dat wil zeggen water verloren.

De bovengenoemde onderzoeken hebben aangetoond dat het watergehalte van de cellen dat door osmose geregeld wordt, de thermoresistentie in sterke mate kan beïnvloeden en dat een laag gehalte aan laagmoleculaire cytoplasmacomponenten essentieel is voor de effectieve werking van extern toegevoegde, osmotisch actieve stoffen op de thermoresistentie van de cel.

Singh et al. (1977) wezen erop dat bacteriesporen een aantal substraten met de daarvoor specifieke enzymen bevatten, soms in hogere concentraties dan de moedercel. Toch reageren deze enzymen in de dormante spore niet met de corresponderende substraten. Voor ieder enzym zou deze inactiviteit een specifieke oorzaak kunnen hebben. Een meer algemene oorzaak zou echter kunnen zijn dat het watergehalte in de sporeprotoplast te laag is om deze enzymreacties mogelijk te maken. Zelfs in vegetatieve cellen verliezen de meeste enzymen hun activiteit, wanneer de cellen gedroogd worden tot ze een watergehalte lager dan ongeveer 20% hebben (Koga et al., 1966). De inactieve enzymen en hun substraten zullen waarschijnlijk in sporen snel actief worden tijdens de ontkieming, voornamelijk doordat het watergehalte in de sporeprotoplast begint te stijgen.

De mogelijkheid dat het lage watergehalte van de sporeprotoplast, gehandhaafd door osmose, de basis vormt voor het handhaven van zowel de sporedormancy als de sporeresistentie, roept de vraag op: 'hoe zouden behandelingen die de dormancy verminderen, de osmotische eigenschappen van sporen kunnen beïnvloeden?' Van bijzonder belang is hitte-activering. Hitte-activering komt wijd verspreid in de natuur voor, zowel bij de meeste (hoewel niet alle) bacteriesporen als bij veel sporen van gisten en schimmels en zelfs bij hogere zich in een rustfase bevindende plantaardige (zaden) en dierlijke (cysten) leefvormen (Sussman, 1969). Met vrij grote zekerheid kan voorspeld worden dat de concentratie aan laagmoleculaire in de cel in oplossing zijnde stoffen, waarschijnlijk groter zal worden, wanneer een spore verhit wordt, ten eerste omdat de hoeveelheid van deze stoffen in de spore zo groot is en het volume van de protoplast zo klein, zodat deze stoffen gewoonweg voor het merendeel in onoplosbare vorm aanwezig moeten zijn en ten tweede omdat de oplosbaarheid van de meeste stoffen met de temperatuur zal stijgen.

Zo zijn in tabel 3 de concentraties van verzadigde oplossingen van enkele bekende sporeprotoplastbestanddelen als functie van de temperatuur weergegeven. Deze tabel laat zien dat deze sporebestanddelen, met uitzondering van mangaandipicolinaat,

Tabel 3. Oplosbaarheidsveranderingen van sporecomponenten met een laag moleculuulgewicht als functie van de temperatuur. De door precipitatie verkregen zouten werden gewassen en in water geresuspendeerd of anders zoals aangegeven, daarna bij de aangegeven temperaturen geschud tot de evenwichten waren ingetreden. Vervolgens werden droge-stofbepalingen in de supernatanten uitgevoerd.

Component	Molariteit (circa) bij temperaturen ($^{\circ}\text{C}$) van:					
	0	20	40	60	80	93
Ca DPA	0,04	0,04	0,09	0,12	0,15	0,18
Mg DPA	0,06	0,06	0,06	0,12	0,25	0,40
Mn DPA	0,007	0,008	0,01	0,01	0,01	0,012
Glutaminezuur	0,03	0,06	0,2	0,28	0,39	0,45
DPA	0,04	0,04	0,06	0,12	0,23	0,34
Ca DPA plus Glutaminezuur (pH 5)*	0,02	0,025	0,03	0,03	0,04	0,07

*Gegevens voor CaDPA plus glutaminezuur zijn in g ml^{-1} .

door verhoging van temperatuur aanzienlijk verder in oplossing gaan (Gould, 1978). In een spore zal de situatie natuurlijk veel complexer zijn dan bij de zojuist genoemde experimenten, aangezien er tussen de verschillende laag- en hoogmoleculaire componenten die in een spore naast elkaar voorkomen, interacties zullen optreden die van invloed zijn op de uiteindelijke, totale osmotische druk bij iedere afzonderlijke temperatuur. Toch wijzen de gegevens erop dat de osmotische druk in de protoplast vijf tot tien maal zo hoog zal worden bij het verhogen van de temperatuur van circa 20°C naar circa 70°C . Deze stijging van de osmotische druk zou een zodanige verandering in de verdeling van het water in de spore kunnen veroorzaken dat het watergehalte van de protoplast stijgt totdat het osmotisch evenwicht met de cortex weer hersteld is. Door afkoeling zal een zekere mate van herkristallisatie of precipitatie van de opgeloste stoffen plaatsvinden, zodat het watergehalte van de protoplast weer zal afnemen en de oorspronkelijke toestand van de verdeling van het water in de onverhitte spore hersteld wordt. Evenals bij enkele aspecten van de hitte-activering zullen de osmotische veranderingen reversibel zijn. De uitkomsten van onderzoeken op het gebied van de activering door middel van differentiële scanningscalorimetrie (Maeda et al., 1975) en magnetische resonantie-technieken (Eaton, 1975) zijn niet onverenigbaar met deze opvatting.

De reversibele activering van sporen die tot stand gebracht kan worden door blootstelling aan lage pH-waarden (Lewis et al., 1965) is bovendien in overeenstemming met deze hypothese, want een lage pH zal door de protonering van de carboxylgroepen aan het peptidoglycan leiden tot een verlaging van de osmotische druk in het cortexcompartiment. Als gevolg hiervan zal het watergehalte van de protoplast kunnen toenemen.

INITIATIE VAN DE KIEMING ALS EEN CHEMISCH-OSMOTISCH PROCES

Sedert het uitgebreide werk van Foerster & Foster (1966) wordt ingezien dat ionen in belangrijke mate betrokken zijn bij de initiatie van de ontkieming. Hoewel de beginreacties van sporen met ontkiemingsagentia en de daarop volgende reacties nog nauwelijks begrepen worden, zijn er aanwijzingen dat een beweging van kationen door het sporemembraan, mogelijk door tussenkomst van gebruikelijke ATP aangedreven mechanismen, hierbij betrokken is (Dring & Gould, 1975b). Mogelijk vloeit het verlies van de resistentie en de dormancy dat met de initiatie van de ontkieming gepaard gaat, in de eerste plaats voort uit een toename van het watergehalte van de sporeprotoplast ten gevolge van een verstoring van het osmotische evenwicht binnen de spore door ionenbewegingen. Mogelijke ionenbewegingen zouden die van H^+ en Ca^{2+} vanuit de sporeprotoplast naar de cortex kunnen zijn om daar elektronegatieve groepen te neutraliseren, en van Na^+ , K^+ of andere tegenionen vanuit de cortex (of vanuit de omgeving buiten de spore) naar de protoplast om daar de oplosbaarheid en de osmotische druk van de aanwezige verbindingen te verhogen.

Er zijn nog geen directe aanwijzingen voor de juistheid van deze ionenbewegingen. Indirecte aanwijzingen zijn er echter in overvloed. Zo wijst de remming van de ontkiemingsinitiatie door stoffen, waarvan bekend is dat zij protonen- of kationengradiënten door membranen doen verdwijnen (Ando, 1974; Dring & Gould, 1975b), sterk in de richting van bepaalde verplaatsingen van kationen. Een overtuigende aanwijzing is bovendien de waarneming dat sporen van sommige soorten die een uitzonderlijk 'lichte' dormancy blijken te hebben, na hitte-activering alleen al door zoutoplossingen tot ontkieming aangezet kunnen worden (Foerster & Foster, 1966).

CONCLUSIES

Indien het osmoregulerend vermogen van de cortex één van de belangrijkste factoren is die de resistentie en dormancy in sporen beheerst, dan is een logische benaderingswijze in de ontwikkeling van nieuwe sporebeheersingsmethoden te trachten het osmoregulerend mechanisme te beïnvloeden. Iedere methode die de concentratie aan negatief geladen groepen in de cortex reduceert, zou enig resistentie- en dormancyverlies moeten veroorzaken. De behandeling waarbij de pH aanzienlijk wordt verlaagd, brengt dit waarschijnlijk juist teweeg, evenals de behandeling van lekke of coatdefecte sporen met meerwaardige kationen. Stegeman et al. (1977) hebben erop gewezen dat de door straling geïnduceerde breuken - of decarboxylering - in het cortexpolymeer, misschien verantwoordelijk zijn voor het feit dat sporen na een behandeling met ioniserende straling gevoeliger voor hitte worden. Een werkwijze die een verhoging van de concentratie aan oplosbare stoffen in de protoplast veroorzaakt, zou eveneens een verhoging van het watergehalte van de protoplast moeten veroorzaken en daarom eveneens een verlaging van resistentie en een vermindering van dormancy. Een dergelijke solubilisatie, die zich tijdens verhitting voordoet, kan mogelijk voor een deel het verschijnsel van hitte-activering verklaren. De effectiviteit van een hoge hydrostatische druk bij het destabiliseren van sporen kan misschien voortkomen uit een toeneming van de concentratie aan stoffen met een laag molekulgewicht in de protoplast, hetgeen teweeggebracht wordt door een toeneming van hun oplosbaarheid, veroorzaakt door elektrostrictie (Clouston & Wills, 1969; Gould & Sale, 1970; Murrell & Wills, 1977).

Een aantrekkelijk aspect van de osmoregulatiehypothese is dat deze niet eist dat er een uniek mechanisme in bacteriesporen bestaat. Het tot stand brengen van dormancy door reductie van het watergehalte in de cel komt immers wijd verspreid bij planten en dieren voor, en in enkele gevallen zijn er aanwijzingen dat osmotisch actieve polymeren hierbij een rol kunnen spelen, analoog met hetgeen voorgesteld is voor de cortex in de bacterie-endospore. Zo hebben microcysten van *Myxococcus* (White et al., 1968) en sporen van *Streptomyces* (Bradley & Ritzi, 1968) dikke celwanden

die peptidoglycan bevatten. Cysten van *Azotobacter* bevatten in plaats daarvan polyuronzuren (Sadoff, 1975). Dormante cysten van enkele amoeben hebben dikke wanden die negatief geladen polysacchariden bevatten, die gefosforyleerd zijn (Neff & Neff, 1969), en sterk kleuren met 'alcian blue'. In andere rustende vormen zijn dikke wanden en een gecondenseerd protoplast algemene kenmerken die soms gepaard gaan met hitteresistentie en dormancy (bijvoorbeeld *Byssoschlamys*-ascosporen), en soms met dormancy doch geringe hitteresistentie (bijvoorbeeld de meeste bacteriecysten, gist- en schimmelsporen en cysten van protozoën). In slechts enkele gevallen echter zijn in deze en andere dormante vormen de wandbestanddelen volledig gekarakteriseerd, of de watergehalten van de verschillende compartimenten nauwkeurig gemeten.

Veel van het werk en de overwegingen die aan de ideeën in deze bijdrage ten grondslag liggen, werden in samenwerking met dr. G.J. Dring ontwikkeld. Voortreffelijke technische hulp werd verleend door mw G.B. Gibson.

SAMENVATTING

Heel wat feiten betreffende de resistentie en dormancy van bacteriesporen geven aan dat de verdeling van het water tussen de hoofdcompartimenten binnen de spore van bijzonder belang is. Aangenomen wordt dat tijdens de sporevorming, volgend op de insluiting van de voorspore door de moedercel, het gehalte aan osmotisch actieve laagmoleculaire stoffen in de voorspore daalt. Dit heeft tot gevolg dat water vanuit het voorsporecompartiment zich zal verplaatsen naar de moedercel, zodat het osmotisch evenwicht aan weerskanten van de protoplastmembraan gehandhaafd zal blijven. Op een later tijdstip tijdens de sporevorming wordt de cortex om de voorspore gesynthetiseerd. De cortex bevat onderling vrij los verbonden elektronegatief geladen peptidoglycan-polymeer die zich gedraagt als een zwakke kationenuitwisselaar. Het peptidoglycan, met zijn geassocieerde tegenionen, is osmotisch actief en neemt daarom water op en zwelt, totdat het daarin wordt beperkt door mechanische krachten opgelegd door de sporecoat of door de moleculaire structuur van de cortex zelf.

Aangenomen wordt dat de cortex vervolgens optreedt als een osmoregulerend organel dat de handhaving van een laag watergehalte in de ingesloten protoplast waarborgt zelfs na het vrijkomen van de spore uit de moedercel.

Vele factoren die de resistentie en dormancy beïnvloeden kunnen dit doen doordat ze het osmotisch evenwicht in de spore verstoren. Als voorbeelden kunnen worden genoemd: het gevoelig maken van sporen door zuren en door sommige meerwaardige kationen; het destabiliseren van sporen door hydrostatische druk; de verhoogde resistentie ten gevolge van het gedeeltelijk drogen, of het suspenderen van sporen in bepaalde oplossingen met een lage wateractiviteit; het verschijnsel van de hitte-activering dat het gevolg kan zijn van een temperatuurafhankelijke verhoging van de oplosbaarheid van laagmoleculaire stoffen in de sporeprotoplast en een daaruit voortvloeiende verhoging van het watergehalte in dat deel van de spore.

Tenslotte is het waarschijnlijk dat een sleutelreactie in het proces van de kiemingsinitiatie een chemisch-osmotische verandering is die het mogelijk maakt dat de sporeprotoplast water begint op te nemen.

Bacterie-, gist- en schimmelsporen: enkele overeenkomsten en verschillen

H.M.C. Put, Carl C. Conway Laboratorium, Thomassen & Drijver-Verblifa N.V., Deventer

INLEIDING

Dankzij Ferdinand Cohn (1877) en Robert Koch (1877) heeft de bacteriesporologie zich in 1977 een eeuw oud kunnen noemen. In de sporologie als wetenschap, heeft het woord spore een pluri-forme betekenis, zowel in letterlijke zin als in taxonomische zin. Er zijn immers vele duidelijk onderscheiden vormen van sporen (fig. 1). Bovendien komen sporen voor bij duidelijk onderscheiden groepen micro-organismen, zoals bacteriën, gisten en schimmels.

In het hiernavolgende zal in het kort besproken worden:

- (1) de taxonomie en de morfologie van fungi en van bacteriegeslachten, niet behorend tot de genera *Bacillus* en *Clostridium*;
- (2) de vergelijking van de levenscyclus van enkele belangrijke fungus- en bacteriegeslachten; (3) enkele kenmerken waarin spore-

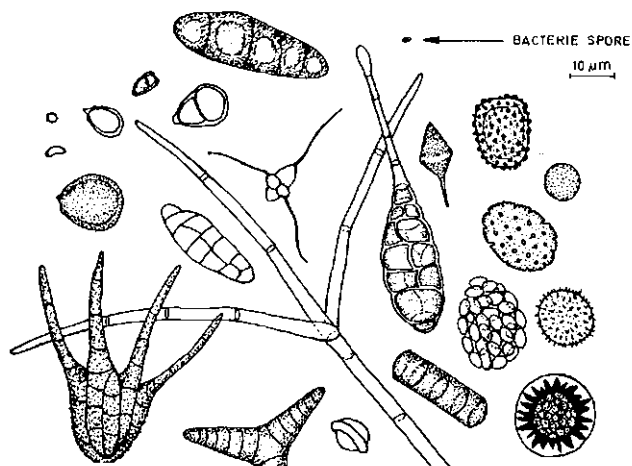


Fig. 1. Morfologie: bacteriespore versus fungussporen.
Bron: Weber & Hess, 1975.

vorming, sporedormancy en spore-ontkieming overeenkomen of zich onderling onderscheiden; (4) enkele voor de voedingsmiddelen-microbiologie belangrijke eigenschappen van sporen.

TAXONOMIE

Taxonomisch zowel als binnen de lijn van de evolutie zijn bacteriën en fungi duidelijk te onderscheiden groepen micro-organismen. Bacteriën behoren tot de prokaryonten en zijn derhalve van een lagere rangorde dan de eukaryotische fungi. Van de fungi (gisten en schimmels) vertonen unicellulaire gisten de meeste overeenkomst met bacteriën. Van de bacteriën vertonen myceliumvormende Actinomycetes de meeste overeenkomst met fungi.

Belangrijke taxonomische verschillen tussen bacteriën enerzijds en fungi anderzijds zijn gelegen in de bouw, de vorm en de functie van de celkern, het celplasma en de celorganellen, en in de wijze en het mechanisme van de celbeweeglijkheid, de celdeling en de sporevorming. De classificatie van schimmels is overwegend gebaseerd op morfologische kenmerken binnen de levenscyclus. Bij gisten en in meerdere mate bij bacteriën steunt de taxonomie vooral op biochemische celkenmerken, zoals fermentatie en assimilatie (Lodder, 1970; Buchanan & Gibbons, 1974).

Taxonomisch te onderscheiden groepen sporevormende bacteriën zijn:

- myxosporevormende Myxobacterales, die circa 50 species omvatten;
- circa 500 species van de Actinomycetales en de familie Bacillaceae met circa 120 species.

Veel fungi zijn 'tube dwellers' of buisbewoners. Het vegetatieve leven van de meeste fungi speelt zich immers af binnen starre buisvormige draden, hyfen genaamd. Deze hyfen kunnen een netwerk of mycelium vormen. Een uitzondering hierop vormt een klein aantal schimmels en vele gisten. De meeste gisten zijn namelijk ééncellig en knopvormend; zij vormen pseudomycelium dat door knopvorming ontstaat, terwijl bij een gering aantal tevens echt mycelium wordt gevormd (Lodder, 1970). Mycelium van

lagere fungi is veelal tweedimensionaal; dat van hogere fungi driedimensionaal (Alexopoulos, 1962).

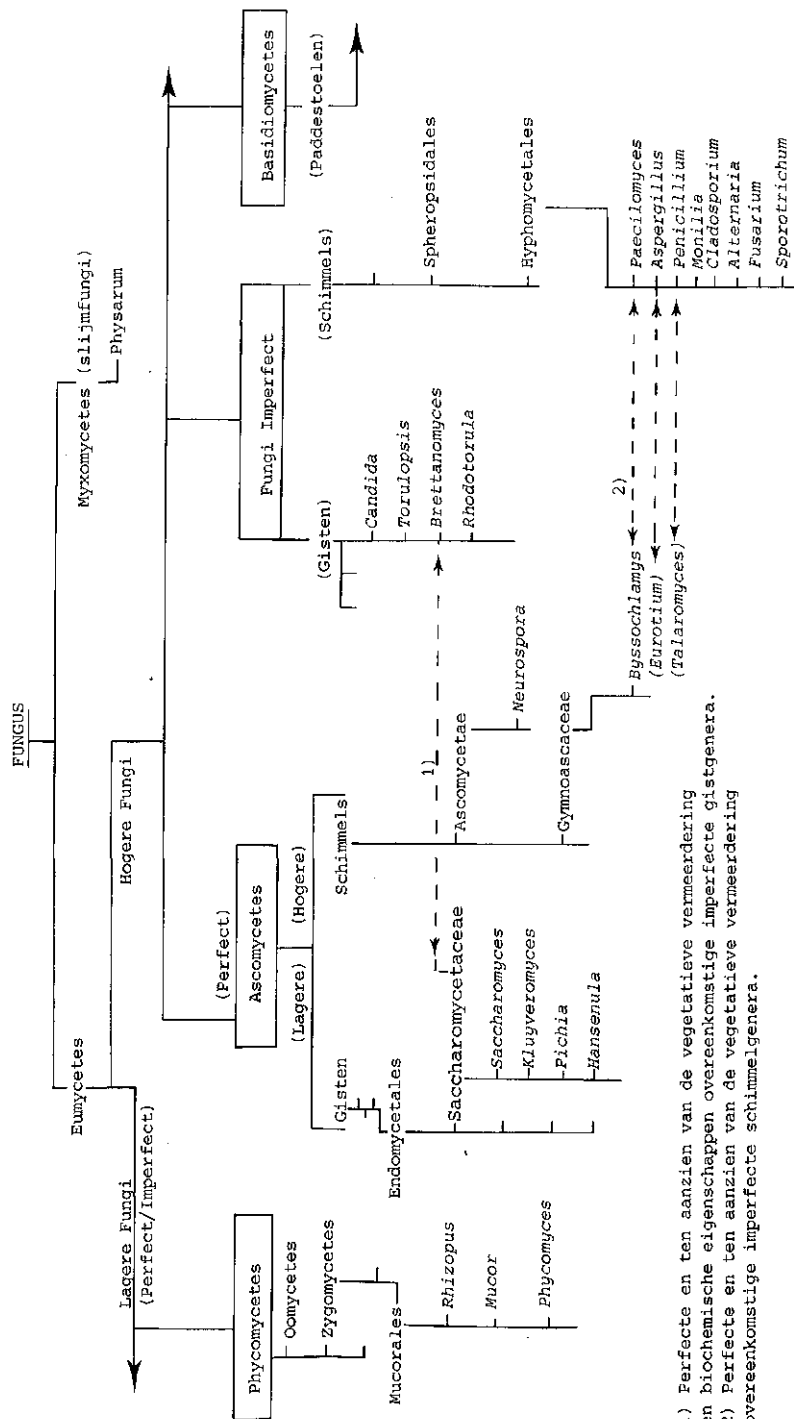
De reproductie van de meeste fungi vindt plaats door sporen die aan of in generatieve of vruchtbare hyfen, exogeen of endogeen, worden gevormd. Sporevorming kan ongeslachtelijk (imperfecte fungi) en geslachtelijk (perfecte fungi) plaatsvinden (fig. 2). Met uitzondering van circa 200 gisten en een aantal schimmels zijn alle fungi in staat ongeslachtelijk, of ongeslachtelijk zowel als geslachtelijk sporen te vormen. Het aantal sporevormende fungi bedraagt ongeveer 100 000. Tot de geslachtelijke, perfecte schimmels behoren onder andere ongeveer 15 000 Ascomycetae en circa 200 ascosporevormende gisten (fig. 2). Afhankelijk van, en geprikkeld door milieu-omstandigheden zijn veel fungi in staat meerdere soorten sporen te vormen, zoals macroconidia, microconidia, chlamydosporen, ascosporen (Madelin, 1966).

Hogere en lagere fungi worden onderscheiden door de morfologie van de hyfe (fig. 2). Bij hogere fungi worden de cilindervormige hyfen regelmatig onderbroken door dwarswanden, ook wel tussenschotjes of septa genoemd. Bij lagere fungi ontbreken deze septa of er worden uitsluitend pseudosepta gevormd, waarin veel poriën voorkomen, hetgeen dit septum het karakter van een zeef geeft. De functie van de hyfen binnen de levenscyclus van de fungi wordt nog nader besproken.

In figuur 2 worden tevens Myxomycetes of slijmfungi genoemd. Deze fungusgroep bestaat uit circa 500 species. Myxomycetes vertonen enige overeenkomst met Myxobacterales (slijmbacteriën). Deze slijmvormende bacterie- en schimmelsoorten komen vooral voor in het aardoppervlak en het daaraan grenzende water. Ze zijn derhalve van meer belang voor de landbouwkundig ecoloog dan voor de voedingsmiddelenmicrobioloog (Hohl, 1976; Hook, 1977).

Van ondergeschikt belang in het kader van dit boek, zijn tevens de klasse der Basidiomycetes, die circa 15 000 species omvat, waaronder macrofungi (zoals paddestoelen). De overige in figuur 2 genoemde fungusgenera zijn alle van belang voor de voedingsmiddelenmicrobioloog. Deze fungi vormen mycotoxinen en/of ver-

Fig. 2. Classificatie van fungi (gisten en schimmels).



1) Perfecte en ten aanzien van de vegetatieve vermeerdering en biochemische eigenschappen overeenkomstige imperfecte gistgenera.
 2) Perfecte en ten aanzien van de vegetatieve vermeerdering overeenkomstige imperfecte schimmelgenera.

oorzaken bederf van voedingsmiddelen. Een aantal van deze fungi kan een voor de mens nuttige functie hebben, zoals bij wijn- en bierfermentatie, bij de produktie van vitaminen, organische zuren en antibiotica.

MORFOLOGIE

Bacillaceae-sporen zijn microscopisch gezien vrij uniforme (diameter 1-3 μm). Sporen van actinomyceten hebben een vrij grote vormverscheidenheid (diameter 0,5-10 μm) en vertonen bovendien veel overeenkomst met sporevormen van imperfecte schimmels, hetgeen bij de classificatie verwarring kan veroorzaken. Een uitzondering hierop zijn *Actinobifidium*- en *Thermoactinomyces*-sporen, waarvan de morfologie en de structuur identiek zijn aan die van *Bacillaceae*-sporen (Cross, 1970; Cross & Goodfellow, 1973).

Slijmbacteriesporen, myxosporen genaamd, hebben een diameter van circa 1,5 μm , hetgeen beduidend geringer is dan de diameter van slijmfungusmyxosporen die 5-10 μm bedraagt.

De grootte van gistsporen verschilt weinig (diameter 1-4 μm), doch de vorm van gistsporen is vrij sterk gevarieerd evenals de oppervlaktestructuur die zowel glad kan zijn als toegerust met uitsteeksels.

De schimmelsporen vertonen de grootst denkbare verscheidenheid (fig. 1) zowel ten aanzien van de vorm, de grootte (diameter 1,5-200 μm) als de oppervlaktestructuur.

In het kader van deze publikatie is het niet mogelijk van alle belangrijke te vergelijken bacterie-, gist- en schimmelgenera ook de levenscyclus weer te geven. Ik beperk me tot de levenscyclus van één lagere fungus, namelijk *Mucor* (fig. 3; Bergman et al, 1969; Gooday, 1973) en twee hogere fungi: de gist, *Saccharomyces* (fig. 4; Mortimer & Hawthorne, 1969) en de schimmel, *Byssoschlamys* (fig. 5; Kuehn, 1957).

De levenscyclus van *Bacillaceae*, reeds uitvoerig besproken in de bijdrage van H. Stegeman, is nog betrekkelijk eenvoudig in vergelijking met de levenscyclus van de diverse fungusgenera. Tevens onderscheidt de levenscyclus van *Bacillaceae* zich in hoge

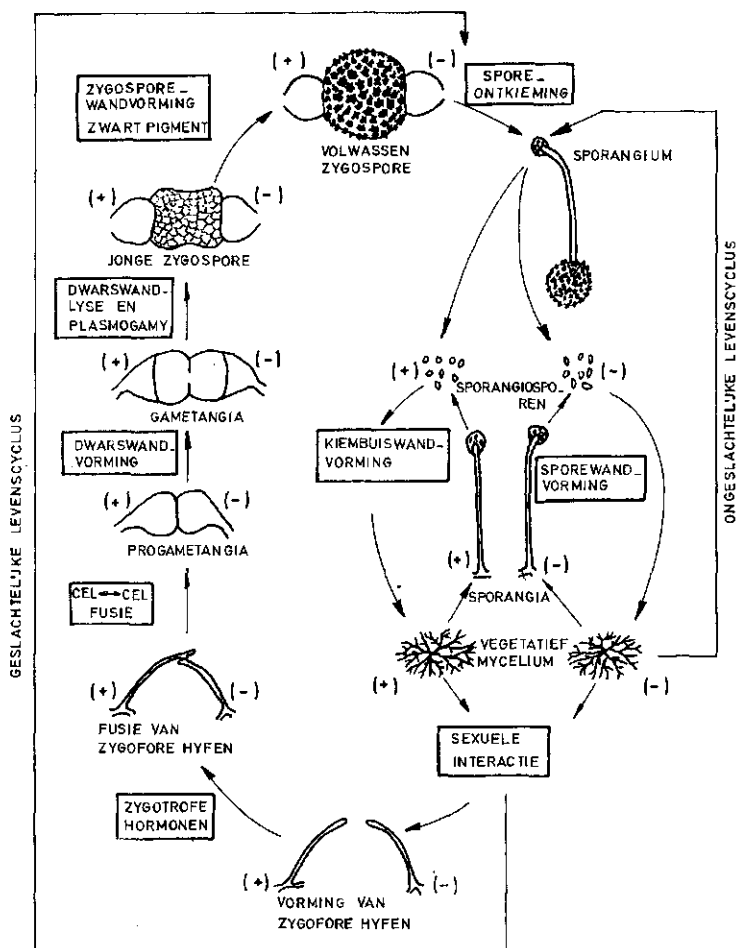


Fig. 3. Levenscyclus van *Mucor*. Bron: Gooday, 1973.

mate van die van de overige sporevormende bacteriesoorten Myxobacteriales en Actinomycetales. De levenscyclus van laatstgenoemde vertoont overeenkomsten met die van lagere imperfecte fungi. Dit betekent: geen geslachtelijke reproductie, de vegetatieve hyfen worden veelal niet onderbroken door septa, de generatieve hyfen van actinomyceten veelal wel; luchtmycelium is veelal voorwaarde voor sporulering (Kalakoutskii & Agre, 1976).

Zowel bij gisten als bij schimmels komen voor wat de vegetatieve voortplanting betreft identieke imperfecte en perfecte

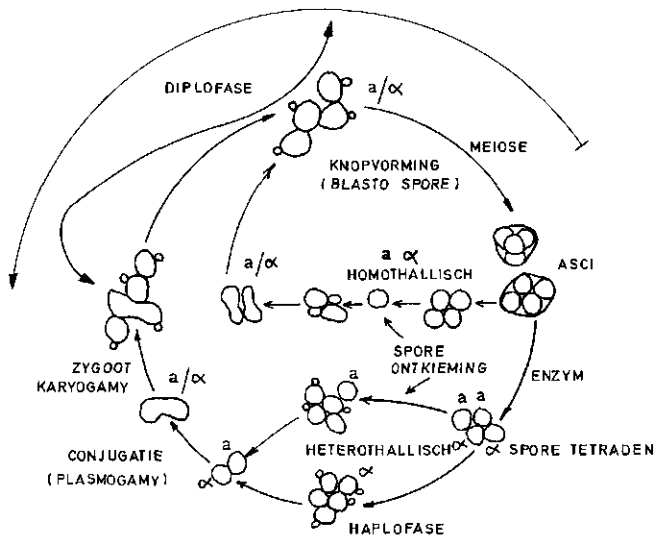


Fig. 4. Levenscyclus van *Saccharomyces*. Bron: Mortimer & Hawthorne, 1969.

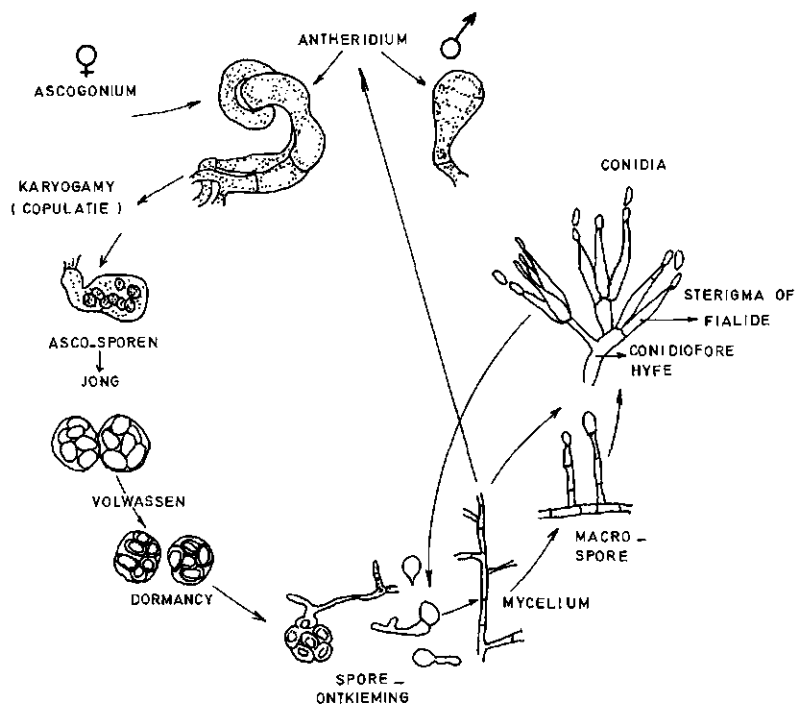


Fig. 5. Levenscyclus van *Byssosclamyces*. Bron: Kuehn, 1957.

species voor (fig. 2). Dit betekent dat tegenover de imperfecte schimmels, zoals *Aspergillus amstelodami*, *Penicillium luteum* en *Paecilomyces fulva*, de perfecte vormen *Eurotium amstelodami*, *Talaromyces luteus* en *Byssoschlamys fulva* geplaatst kunnen worden (Benjamin, 1955, Kuehn, 1957).

De taxonomie van gisten is gecompliceerder dan die van schimmels en voor wat de vegetatieve vermeerdering betreft ook de nomenclatuur van de imperfecte en perfecte gistspecies met identieke biochemische eigenschappen. De perfecte vorm van de *Brettanomyces bruxellensis* is weliswaar de *Dekkera bruxellensis*, doch die van de *Klbeckera apiculata* is de *Hanseniaspora uvarum*; de *Candida lumbica* staat tegenover de perfecte *Pichia fermentans*, en de *Torulopsis mogii* tegenover de perfecte *Saccharomyces rouxii* (Barnett & Pankhurst, 1974).

Tevens moet worden opgemerkt dat binnen de levenscyclus van Myxobacterales en Myxomycetes, ongeslachtelijk respectievelijk geslachtelijk myxosporen worden gevormd die zich inkapselen in een macroscopisch waarneembare cyste of slijmig vruchtlichaam dat boven het groeisubstraat uitsteekt (Dworkin, 1973, Weber & Hess, 1976).

SPOREVORMING

Sporevorming kan geslachtelijk en ongeslachtelijk plaatsvinden. Bacteriesporevorming is altijd ongeslachtelijk. Schimmelsporevorming is ongeslachtelijk bij de imperfecte schimmels en tevens geslachtelijk bij de perfecte schimmels. Imperfecte gisten daarentegen zijn asporogeen, terwijl perfecte gisten geslachtelijke sporevorming vertonen.

Sporevorming wordt geactiveerd en gereguleerd door specifieke genomen en is derhalve een genetisch specifiek proces. Sporevorming kan plaats vinden in de moedercel (endogene sporevorming), gekenmerkt door een serie veranderingen in de moedercel. Er is dan sprake van cellulaire differentiatie (Ashworth & Smith, 1973). Exogene sporevorming vindt uitsluitend plaats buiten de moedercel, aan de top of de zijwand van een sporofore bacterie- of schimmelhyfe. De door de moedercel gevormde exogene en endogene sporen verschillen van de moedercel zowel in de vorm, die klei-

ner is als in de complexere en gemaskeerde structuur, de tragere stofwisseling en de grotere fysisch-chemische en mechanische resistentie.

Bacteriesporevorming

In vergelijking met de endosporevorming bij Bacillaceae is over de exo- en endosporevorming bij actinomyceten vrij weinig bekend. Voorwaarden voor sporulering bij alle actinomyceten is, evenals voor die van de meeste schimmels, de aanwezigheid van genetisch actief celkernmateriaal in de zogenoemde generatieve of fertiele luchthyfen. Een laag vochtgehalte a_w ver van de voedingsbron is een prikkel tot sporuleren. Bij een aantal genera *Thermoactinomyces*, *Actinobifida*, *Actinoplanes* en *Micropoly-spora* kunnen tevens sporen gevormd worden aan of in het substraatmycelium in een ionenrijk medium, hetgeen bij fungi veelal niet mogelijk is (Kalakoutskii & Agre, 1976). Activering van de sporulering is mogelijk door een laag vochtgehalte, een relatief hoge O_2 - en een relatief lage CO_2 -druk en de aanwezigheid van bepaalde mineralen, aminozuren en plantextracten.

In tabel 1 is weergegeven welke typen sporen door actinomyceten gevormd kunnen worden. De antigene structuur van deze sporen verschilt van die van de vegetatieve cellen. Evenals bij *Bacillus*-sporen blijven bij Actinomycetes tijdens het sporuleringsproces zowel de vegetatieve groei-regulerende genen als de sporulerings-specifieke genen actief. Het bacteriesporuleringsproces is derhalve een genetisch complexer mechanisme dan de vegetatieve vermeerdering.

Tijdens het sporuleringsproces van Actinomycetes zowel als bij *Bacillus*-species vindt vaak vorming van antibiotica plaats. Deze antibiotica bieden de sporen in wording bescherming tegen de omgeving. Alhoewel dit wel is verondersteld, hebben deze antibiotica geen onontbeerlijke functie binnen het sporuleringsproces zelf. (Kalakoutskii & Agre, 1976; Levinson et al. 1978).

Van dit mechanisme wordt gebruik gemaakt bij de massaproductie van klinisch toepasbare antibiotica, waarvan circa 90% door Actinomycetes wordt geproduceerd (Hopwood & Merrick, 1977). Van ongeveer 3000 bekende antibiotische stoffen worden circa

Tabel 1. Taxonomische classificatie van Actinomycetes-genera.

Part 17	Actinomycetes ¹	Sporevorm
Order I	Actinomycetales	
fam I	Actinomycetaceae	geen sporen, geen luchthyfen
genus I	<i>Actinomyces</i>	
fam IV	Actinoplanaceae	endosporen in een vlies; aplanosporen of zoösporen; sporangiofore sporen aan/in luchtmycelium omgeven door een vlies
genus III	<i>Streptosprangium</i>	
VII	<i>Planomonospora</i>	
VIII	<i>Planobispora</i>	
X	<i>Dactylosporangium</i>	
fam VII	Streptomycetaceae	arthrosporen; endosporen in/aan luchthyfen
genus I	<i>Streptomyces</i>	
fam VIII	Micromonosporaceae	aleuriospore; Mono-exospore aan sporofore hyfen
genus I	<i>Micromonospora</i>	
genus II	<i>Thermoactinomyces</i>	endosporen ² (2) aan korte sporofore hyfen
genus III	<i>Actinobifida</i>	endosporen ² (4) aan sporofore hyfen
genus IV	<i>Thermomonospora</i>	aleuriospore; Mono-exospore aan sporofore hyfen

1. Circa 500 species (Cross & Good Fellow, 1973; Buchanan & Gibbons, 1974).

2. Endosporen sensu stricto (Cross, 1970).

56% door Actinomycetes gevormd, circa 10% door Eubacteriales (Bacillaceae) en circa 17% door Eumycetes, uitsluitend schimmels (Kurytowicz, 1976).

De prikkel tot sporevorming bij Myxobacterales is het gebrek aan de benodigde macromoleculaire voedingsstoffen. Het glijdend vermogen van de cellen neemt hierdoor af, beweeglijke staaform verdwijnt en maakt plaats voor onbeweeglijke kokvormige cellen (myxosporen) met een dikke lichtbrekende buitenwand omgeven door een kapsel. Deze myxosporen hebben het vermogen samen te ballen tot een grote massa (aggregaatvorming), die vervolgens wordt omgeven door een door myxosporen gevormde cystewand of slijm laag. Deze cyste, ook wel vruchtlichaam genaamd, steekt veelal boven het groeisubstraat uit (Dworkin, 1973).

Gist-ascosporevorming

Tijdens de gist-ascosporevorming, die in vijf fasen verloopt,

wordt na conjugatie en kernversmelting, plasmogamy en karyogamy genaamd, in de celkern onder andere het genetisch materiaal verdubbeld en vervolgens gedeeld. Dit proces wordt meiose of reductiedeling genoemd. Er ontstaan vier kernlobben, die haploïd zijn. Daaromheen worden na afsnoering de ascosporewandlagen gevormd (Fowell, 1969a, b). In tegenstelling tot bacteriesporen, die door enzymactiviteit (lysozym) snel vrijkomen uit de moeder-cel, sporangium genaamd, blijven veel gist-ascosporesoorten ook na het rijpingsproces ingesloten in de moedercel of ascus. Het is zelfs mogelijk dat spore-ontkieming, knopvorming en conjugatie in deze ascus plaatsvinden.

Door toepassing van fasecontrast, doch ook zonder dat, zijn gistascosporen in de ascus microscopisch goed te onderscheiden. Door de elektronenmicroscoop is de opbouw van gist-ascosporen en de ligging in de ascus zeer gedetailleerd waar te nemen (fig. 6a, 6b; Kreger-van Rij, 1978). Deze transmissie-elektronen-microscopische opname laat duidelijk zien dat in de ascus, buiten de gevormde haploïde ascosporen, vrij moedercelplasma aanwezig is (epiplasma genaamd). Dit epiplasma bestaat onder andere uit: vacuolen, mitochondria endoplasma-reticulum, hydrolytische enzymen (protease), voedingsstoffen (lipiden en glyco-geen) en soms een rest nucleolus waarvan de meiose gefaald heeft (Fowell, 1975). Bij gist-ascosporen die niet vrij komen uit de moedercel, kunnen deze epiplasmafactoren van invloed zijn op het gedrag (resistentie) bij opslag van gewassen ascosporensuspensies.

Schimmel-asci bevatten over het algemeen weinig epiplasma (fig. 7). Er zijn echter ook gistsoorten met weinig epiplasma in de rijpe ascus, en gistsoorten waarbij de sporen zeer snel vrij komen uit de moedercel of ascus (*Klugveromyces*). Opvallend in figuur 6 is tevens de vrij brede grijzige laag tussen het gist-ascospore-plasmamembraan of plasmalemma en de 2-4 ascosporewandlagen (Besson, 1966). Tussen het plasmalemma en de sporewandlagen van *Byssoschlamys*-ascosporen komt microscopisch gezien ook een brede grijzige laag voor. Deze wordt bij *Byssoschlamys*-ascosporen tevens nog onderbroken door een dunne donkere tussenlaag (fig. 7). Bij ongeslachtelijk gevormde *Byssoschlamys*-conidia daarentegen komt een dergelijke brede en onder-

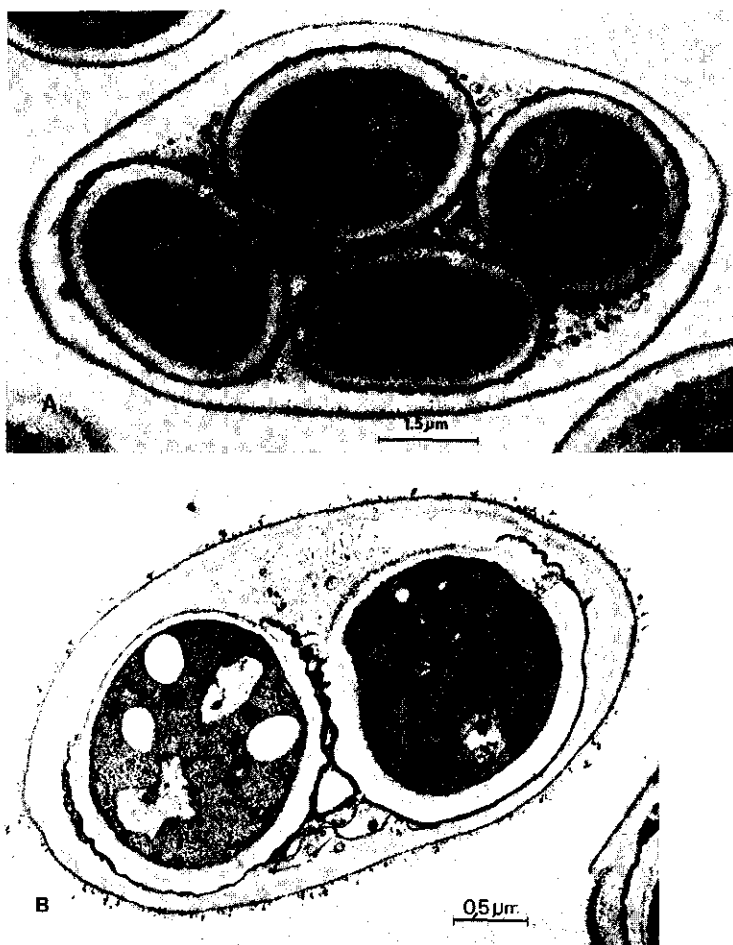


Fig. 6. a. *Saccharomyces fragilis* dormant ascosporen.
 b. *Saccharomyces cerevisiae* ascospore-ontkieming.
 Bron: Kreger-van Rij, 1978.

broken laag niet voor (fig. 8). Deze wordt daarom wel in verband gebracht met een typische, cortexachtige structuur die bepalend zou kunnen zijn voor de veel hogere thermoresistentie (tabel 2) van *Byssoschlamys*-ascosporen versus die van de conidia (Partsch et al., 1969).

De gist-ascosporewand is samengesteld uit lipiden (fosfolipiden), proteïnen en polysacchariden. De gist-ascospore(wand)



Fig. 7. *Bassochlamys nivea*-asci en -ascosporen. Bron: Put & Kruiswijk, 1968. Vergroting: 2300 x.

is hydrofoob, lipofiel, glusulaseresistent (glusulase is celwand hydrolyserend enzym B-glucuronidase), zuurvast, lichtbrekend; ze is bovendien donker onder de elektronenmicroscop en heeft een geringe vochtdoorlaatbaarheid (Fowell, 1969b, 1975).

Evenals bacteriën vertonen gisten het 'commitment'-fenomeen in een vrij vroeg stadium: na de tweede fase van het sporuleringsproces. In tegenstelling tot bacteriën heeft de goed gevoede gistcel geen genetische informatie nodig om te sporuleren. Dit betekent dat het sporulerend vermogen van de gistcel sterk afhankelijk is van de wijze waarop en de mate waarin de voorafgaande plasma- en kernparing tot stand is gekomen (Hartwell, 1974); Spontane sporulering in een voor vegetatieve vermeerdering geschikt medium is daarom nooit volledig uitgesloten.

De kans op sporulering kan bovendien toenemen, nadat de sta-



Fig. 8. *Byssoschlamys fulva*-conidiofore, -fialide en -conidia. Vergroting: 2100 x. Bron: Put & Kruiswijk, 1968.

tionaire groeifase is bereikt en de benodigde stikstof voor de instandhouding van de vegetatieve vermeerdering minder toegankelijk is geworden (Bernlohr & Leitzmann, 1969). Zo kan bestudering van het gedrag (onder andere thermoresistentie) van vegetatieve gistcellen versus dat van gist-ascosporen bemoeilijkt worden, als in de vegetatieve cultuur spontaan een microscopisch niet of nauwelijks waarneembaar aantal sporen is gevormd, hetgeen een ongewenste versluiering van de mogelijk te verwachten gedragsverschillen tot gevolg heeft (Put et al., 1977, 1980). Omdat nog relatief weinig bekend is over het mechanisme van gist-ascosporevorming, is bovendien het synchroon, massaal produceren van een homogene gist-ascospore cultuur moeilijk realiseerbaar. (Hartig & Breitenbach, 1977).

Schimmelsporevorming

In de mycologie, de leer van de fungi (gisten, schimmels en paddestoelen), heeft het begrip vegetatieve, asexuele of ongeslachtelijke vermeerdering vier betekenissen: 1. deling (frag-

mentering van een hyfecel, oidium, gevolgd door vorming van een nieuwe zelfstandige cultuur; dus los van de moedercultuur. 2. deling van cellen in dochtercellen, veelal als deel van de moedercultuur. 3. knopvorming van cellen (gisten) en sporen (blastosporen), gevolgd door vorming van een nieuwe zelfstandige cultuur. 4. sporevorming, gevolgd door ontkieming, kiembuis-, en myceliumvorming (Alexopoulos & Mims, 1979).

Over het mechanisme van de vele schimmelsporuleringsprocessen is relatief weinig gepubliceerd (Weber & Hess, 1976). Een uitgesproken verschil met endosporevorming van de Bacillaceae is de belangrijke functie van het schimmelmycelium binnen het sporuleringsproces (Madelin, 1966; Weber & Hess, 1976).

Zoals reeds eerder werd opgemerkt is de hyfe de vegetatieve levensvorm van de meeste schimmels. Hyfen zijn cylindervormige langgerekte starre cellen. Voedingsstoffen doch ook celplasma en celkernen stromen vrij door de hyfen van lagere schimmels en kunnen zich verplaatsen via poriën in de tussenschotjes van hogere schimmels. Iedere hyfecel bevat één of meerdere celkernen. Celkernen van lagere fungi kunnen zich in de hyfen verplaatsen met een snelheid van ongeveer 2 mm per uur tot maximaal 6 cm per uur tijdens het sporuleringsproces (Madelin, 1966). Aan de top of apex van een hyfe kan anastomose plaatsvinden; een fusie van 2 hyfen, waardoor een netwerk of mycelium ontstaat. Anastomose kan over een relatief grote afstand ($> 10 \mu\text{m}$) gestimuleerd worden. De apex speelt tevens een belangrijke rol in de diverse sporuleringsprocessen (Bartnicki-Garcia, 1973).

Ongeslachtelijke exogene sporevorming

In de apex van een generatieve of vruchtbare hyfe bevindt zich genetisch-actief celkernmateriaal. Uit een generatieve hyfe (top) kunnen sporedragers ontstaan. Deze worden ook conidiofore of sporofore hyfen genoemd. Aan of rondom de top van een sporofore multinucleaire hyfe kunnen sterigmata of fialiden gevormd worden; bij Euscomycetae zijn dit flesvormige cellen. Vanuit de eindstandige top van de sterigmata is vervolgens na herhaalde reductiedeling van een celkern of vanuit een reeks nuclei die in de sporedrager zijn gevormd, ongeslachtelijke exogene

sporulering mogelijk (fig. 5).

De aldus ongeslachtelijk gevormde schimmelspore is, in tegenstelling tot het vegetatieve mycelium, een nucleair deel dat zich afscheidt van de sporofore hyfe waardoor stilstand in de beweeglijkheid van het cytoplasma ontstaat. Bovendien wordt het celvochtgehalte lager en het metabolisme trager, mede ten gunste van de vorming van hoog-moleculaire verbindingen. Tevens worden de vacuolen kleiner of verdwijnen, terwijl het endoplasmatisch reticulum nog nauwelijks zichtbaar zal zijn. De volwassen spore heeft een grotere weerstand tegen invloeden vanuit de omgeving dan het moedermycelium, waaruit de spore is voortgekomen (Smith & Berry, 1974).

De morfologie en de structuur van de sporen en sporofore hyfen zijn van essentieel belang voor de classificatie van schimmels. Exogeen gevormde ongeslachtelijke schimmelsporen dragen de verzamelnaam conidia. Uit één sporedrager kunnen duizenden conidia gevormd worden.

Ongeslachtelijke endogene sporevorming

Bij lagere fungi, zoals bij de Mucorales (fig. 3) kan asexuele endogene sporevorming plaatsvinden aan de top van een vruchtbare hyfe. Deze verdikt zich tot een knotsachtige structuur, columella of sporangiëndrager genoemd. Tevens ontstaat een zakachtig vlies waarin zich celplasma en fertiele celkernen bevinden, waaruit sporangiosporen worden gevormd. Deze endogeen gevormde sporangiosporen zijn dus aanvankelijk omgeven door een dun vlies en ingesloten in het sporangium. Dit sporangiumvlies is zeer kwetsbaar, hetgeen de verspreiding van de sporangiosporen bevordert.

Geslachtelijke sporevorming

Perfekte lagere en hogere fungi hebben twee levenscycli: 1. die waarin sporevorming geslachtelijk is, 2a. die van ongeslachtelijke (vegetatieve) sporevorming of 2b. die, zoals bij gisten waarin uitsluitend vegetatieve asporogene vermeerdering plaatsvindt.

Geslachtelijke sporen bezitten eigenschappen gericht op overleving van de soort onder ongunstige milieu-omstandigheden. De eigenschappen van ongeslachtelijke sporen zijn gericht op snelle en verre verspreiding van de soort. Ongeslachtelijke sporen worden immers in de natuur vele malen per seizoen in grote aantallen gevormd, terwijl geslachtelijke sporulering slechts een enkele maal per jaar, gedurende een voor vegetatieve vermeerdering ongunstig wordend micro- of makroklimaat, een gering aantal sporen voortbrengt (Alexopoulos & Mims, 1979).

Geslachtelijke endogene sporevorming

Een apex waarin generatief, sexueel gedifferentieerd celkernmateriaal aanwezig is, wordt gameet of gametangium genoemd. De mannelijke gameet is het antheridium, de vrouwelijke gameet het ascogonium of oögonium (fig. 5). Door anastomose van antheridium en ascogonium gevolgd door vermenging van het celplasma (plasmogamie), ontstaat dikaryontisch mycelium.

Dit zijn myceliumcellen, waarvan het celplasma zowel mannelijke (α) als vrouwelijke (a) celkern(en) bevat. Deze dikaryontische fase van het vegetatieve schimmelmycelium kan gedurende een lange periode binnen de levenscyclus gehandhaafd blijven ($N+N$ fase). Vervolgens kan, geprikkeld door uitwendige omstandigheden, kernfusie of karyogamie plaatsvinden: het samensmelten van twee sexueel gedifferentieerde α - en a -celkernen. Hiermee is de diploïde $2N$ -fase aangebroken. Bij lagere schimmels kan kernfusie direct gevolgd worden door meiose en zygosporievorming (fig. 3). Bij hogere schimmels kan karyogamie of direct of na herhaalde diploïde mitose (genetisch volwaardige celdeling) gevolgd worden door meiose (reductiedeling) en ascosporievorming. De ascus bevat één tot vele ascosporen (Alexopoulos & Mims, 1979).

De ascuswand is een voortzetting van de vegetatieve celwand. De ascosporiewand is uit nieuw celwandmateriaal gevormd en bestaat uit meerdere lagen. Asci kunnen in groepjes ingesloten worden door een of meerdere lagen steriele hyfecellen met een laag vochtgehalte, ascocarp genaamd. De vorm van het ascocarp is type-specifiek en wordt afhankelijk daarvan cleistothecium, perithecium, apothecium of locule genoemd (fig. 9).

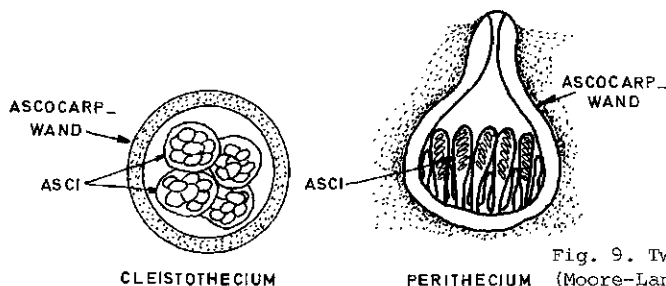


Fig. 9. Twee typen ascocarp. Bron: (Moore-Landecker, 1972).

Hyfedelen waarin de nucleï ontbreken, zijn steriel en niet meer levensvatbaar. Door middel van bepaalde laboratorium-technieken is het mogelijk sporen of hyfedelen van perfecte fungi te oogsten die uitsluitend haploïde cellen bevatten van één genetisch sexueel soort. Hieruit ontstaan imperfecte varianten (Weber & Hess, 1976). Bij deze cultures, in aanraking gebracht en gekruist met cellen van het andere geslacht, kan de perfecte diploïde fase opnieuw intreden en is geslachtelijke reproductie weer mogelijk. Op deze wijze kunnen ook nauw verwante fungussoorten gekruist worden. In de industriële microbiologie wordt veelvuldig gebruik gemaakt van gekruiste fungussoorten waarin bepaalde biochemische eigenschappen in versterkte mate aanwezig zijn (Fowell, 1969b).

Geslachtelijke exogene sporevorming

Deze sporevorming komt uitsluitend voor bij Basidiomycetes. Nadat fusie (plasmogamie) heeft plaatsgevonden van geslachtelijk gedifferentieerde hyfedelen, ontstaat, zoals reeds eerder is beschreven, een dikaryontische fase, waarbij het versmolten mycelium veranderingen ondergaat en een basidiocarp en basidiën vormt. In de basidiën vindt kernfusie plaats gevolgd door meiose en basidio-sporevorming aan de top of sterigmata van het basidium (Moore-Landecker, 1972).

Tenslotte nog een opmerking over *homothallische fungusvormen*. Deze komen vooral voor bij lagere fungi, doch ook, zij het in mindere mate, bij hogere fungi. Een homothallische fungus heeft

een geslachtelijk hermafrodit gedifferentieerde a/a celkern, zodat seksuele reproductie mogelijk is zonder voorafgaande plasma- en celkernversmelting.

Bij gisten echter komen ook haploïde homothallische soorten voor (*Saccharomyces bailii*). Deze moeten eerst conjugeren om a/a diploid te worden en te kunnen sporuleren.

DORMANCY

Dormancy is een vorm van resistentie tegen ontkieming en andere de-stabiliserende factoren (Gerhardt & Murrell, 1978). Bij fungussporen kan men twee vormen van dormancy onderscheiden: *constitutionele dormancy*, zoals ook bij bacteriesporen voorkomt, en *exogene dormancy* (Sussman & Halvorson, 1966, Weber & Hess, 1976).

Constitutionele dormancy is een rustperiode inherent aan de levenscyclus van de spore zelf. Ze wordt gekenmerkt door blokkering van de penetratie van water en nutriënten, blokkering van het metabolisme en de reproductie door in de spore gevormde inhibitoren. Ontkieming kan veelal niet plaatsvinden in het medium waarin sporevorming heeft plaatsgevonden, en is bovendien pas mogelijk, nadat een buiten de spore aanwezige contra-inhibitor de dormancy heeft doorbroken. Constitutionele dormancy komt vooral voor bij endogeen gevormde sporen van bacteriën, gisten en schimmels. Constitutioneel rustende fungus-sporen worden ook wel *memnosporen* genoemd. Een memno- of standvastige spore blijft dicht bij de plaats van de sporevorming en is veelal nog verbonden met de moedercel (ascus) of met de moederstructuur (mycelium) en heeft een lange tot zeer lange overlevings-tijd van minstens 1 maand tot meer dan 2500 jaar. (Unsworth et al., 1977).

Exogene dormancy is een rustperiode die door uitwendige omstandigheden aan de spore opgelegd wordt. Gebrek aan vocht speelt hierbij een belangrijke rol. Wordt dit vochtgebrek opgeheven, dan ontkiemt de exogeen rustende spore spontaan (Weber & Hess, 1976). De meeste exogeen gevormde sporen vertonen ook exogene dormancy. Veel exogeen dormante fungussporesoorten behoren tot de zogenaamde xenosporen (vreemdeling-, gastsporen). Xenosporen

worden in zeer grote aantallen gevormd en hebben geen of slechts een zwakke binding met de moederstructuur (de sporofore hyfe). Het dispergerend vermogen van xenosporen is zeer groot; ze kunnen ver verwijderd van de plaats van herkomst tot ontkieming en groei komen (4 m - 800 km; Madelin, 1966). Bovendien is de overlevingskans van xenosporen in hogere luchtlagen, rijk aan ultraviolette stralen, vrij groot. Voor de voedingsmiddelen-microbioloog hebben de bijzondere eigenschappen van exogeen dormante fungus-xenosporen belangrijke consequenties, te meer daar zij veelal in zeer grote massa's worden gevormd. Ze zijn verspreiders van planteziekten (fytopathogene fungi), kunnen bovendien aanleiding geven tot bederf van voedselvoorraden, en tot vorming van mycotoxinen in nog te verwerken voedingsmiddelen (Rodricks, 1976).

ONTKIEMING

Het ontkiemingsproces van bacterie-, gist- en schimmelsporen waarvan de endogene dormancy is doorbroken, wordt gekenmerkt door verlies van resistentie ten opzichte van de omgeving (hitte, uitdroging, radiatie, enzymen en chemische stoffen), hetgeen microscopisch zichtbaar is door verlies aan lichtbrekend vermogen (de dormante spore was fase-helder, de ontkiemende spore is fase-donker). Mede ten gevolge van veranderingen in de sporewandstructuur nemen de osmotische gevoeligheid, de doorlaatbaarheid voor onder andere elektrolyten en kleurstoffen en de uitscheiding van celmaterialen, zoals die van hoog- en laagmoleculaire verbindingen, toe. Ook de ademhalingsactiviteit (uitgedrukt in ademhalingsquotiënt $Q: O_2/CO_2$ in mm^3 per uur per mg celdrooggewicht) en de opname van vocht, waardoor de spore zwelt, nemen toe. Er ontstaat tenslotte een deelbare vegetatieve bacteriecel, gistcel of schimmelhyfe. De spontane inzet en het minder complexe verloop van de ontkieming van exogeen dormante Actinomycetes en fungussporen kunnen reeds plaatsvinden bij een relatief lage temperatuur (vanaf $2^\circ C$) en bij een relatief laag vochtgehalte (Kalakoutskii & Agre, 1973).

Een ontkiemende spore is een vorm van cellulaire differentiatie. Immers, zowel de morfologische en biochemische eigenschap-

pen als de resistentie van een ontkiemde spore vertonen uitgesproken verschillen met enerzijds de corresponderende dormante spore en anderzijds de corresponderende vegetatieve cel (Ashworth & Smith, 1973).

Myxococcus

Ontkieming van myxosporen is evenals myxosporevorming het resultaat van uitwendige omstandigheden in combinatie met het resultaat van een celinteractie die bij andere sporevormende bacteriën en fungi niet voorkomt. Deze myxospore-interactie heeft tot gevolg dat ontkieming en zwermvorming van geactiveerde myxosporen alleen (massaal) kan plaatsvinden, indien het aantal ontkiembare myxosporen voldoende is om een 'zwerm' te vormen (minimaal $5 \cdot 10^9$ ml⁻¹) en een complex groeimedium aanwezig is waardoor de DNA-synthese zodanig kan zijn, dat de ontkiemende myxosporen homogeen van opbouw zijn en dus voldoende DNA bevatten om tot volwaardige deelbare vegetatieve cellen uit te kunnen groeien (Dworkin, 1973).

Warmte heeft geen effect op de ontkieming van myxosporen. Tijdens het ontkiemingsproces gaan de myxosporen van fase-helder en refractiel over in fase-donkere cellen, die van bolvormig langwerpig worden en het kapsel verliezen.

Actinomycetes

Door activering van Actinomycetes-sporen ontstaan condities waarbij de kiemspleet, die aanvankelijk door een of meerdere sporewandlagen was bedekt, zich opent en een kiembuis, een eerste aanzet tot een myceliumhyfe, gevormd wordt (Alexopoulos & Mims, 1979). De kiembuiswand bestaat deels uit reeds in de spore gevormd materiaal, deels uit nieuw celwandmateriaal. Het ontkiemingsproces van endo- en exosporen van Actinomycetes komt morfologisch sterk overeen met dat van schimmelsporen, doch biochemisch zijn veel overeenkomsten met het ontkiemingsproces van *Bacillus*-sporen aan te wijzen. Hiervan is in het bijzonder sprake bij de thermofiele genera *Thermoactinomyces* en *Actinobifida*, waarvan de sporen een cortex bezitten. Tijdens de ont-

kieming van deze sporesoorten verdwijnt de cortex; de spore zwelt op tot het dubbele volume en de sporewandlagen fragmenteren. Vervolgens verschijnt de eerste aanzet van de kiembuis.

Een typisch verschil tussen deze cortex bevattende thermofiele Actinomycetessporen en *Bacillus*-sporen is het feit dat ontkoppeling van dormante *Thermoactinomyces*-sporen mogelijk is in water bij een relatief lage temperatuur (20 °C), terwijl voor de activering van het ontkiemingsproces zelf vervolgens Ca^{2+} - en Mg^{2+} -ionen en een optimale temperatuur voor groei (55-60 °C) voldoende zijn. Het ontkiemingsproces is voltooid op het moment dat in de kiembuis volwaardig - dus deelbaar - celkernmateriaal aanwezig is (Kalakoutskii & Agre, 1976). *Streptomyces*-exosporen vertonen overwegend exogene dormancy en zullen dus bij gunstige milieu-omstandigheden spontaan tot ontkieming komen.

Fungi

Schimmelspore-ontkieming kenmerkt zich morfologisch door toename van het celvolume; de sporewand wordt gespannen, de buitenste wandlaag breekt, de kiemspleet of kiemporie wordt geopend, en de kiembuis verschijnt als voortzetting van één van de inwendig gelegen sporewandlagen. De ontkieming is voltooid, nadat zich in de kiembuis genetisch actief celkernmateriaal heeft gevormd.

Gistspore-ontkieming kenmerkt zich veelal door toename van celvolume en cellengte; de buitenste sporewand breekt op diverse plaatsen en wordt tenslotte afgestoten. De daarbinnen gelegen sporewandlaag wordt deel van de wand van de jonge vegetatieve cel (fig. 6b).

RESISTENTIE

Voedselconservering is gebaseerd op 'hurdles': een netwerk van elkaar onderling beïnvloedende factoren die in positieve of negatieve zin kunnen bijdragen tot de gewenste microbiologische houdbaarheid. Enkele van deze factoren zijn: de initiële sporebesmetting; sporesoorten; de *F*-waarde van de toegediende hitte-

behandeling; de stralingsdosis; de soort en de concentratie van de toegevoegde conserveermiddelen; de wateractiviteit, zuurgraad, de redoxpotentiaal en de samenstelling van het voedingsmiddel als verhittings-, stralings- en groeisubstraat voor beschadigde bacterie-, gist- en schimmelsporen; de opslagtemperatuur en de opslagtijd.

Voor de bestudering van de (thermo)resistentie van bacterie-, gist- en schimmelsporen in voedingsmiddelen dient de basis voor een modelsysteem derhalve bij voorkeur het voedingsmiddel zelf te zijn. In het hiernavolgende zullen een viertal van de genoemde sporeresistentie beïnvloedende factoren vergeleken worden: de hitteresistentie, de wateractiviteit, de zuurgraad en het adaptatievermogen.

Thermoresistentie

Het afstervingspunt (Thermal Death Point of TDP) van een aantal bacterie-, gist- en schimmelsporen is samengevat in tabel 2. Ten aanzien van het gegeven cijfermateriaal moet worden opgemerkt dat alleen de voor *Bacillus*- en *Clostridium*-sporen gegeven TDP-waarden afkomstig zijn van onderling vergelijkbare gestandaardiseerde testmethoden. De voor schimmels verzamelde TDP-waarden dienen met enige voorzichtigheid gehanteerd te worden, daar de gevolgde techniek voor sporevorming, oogsten van sporen, en de bepaling van de thermoresistentie niet op onderling vergelijkbare methoden berust. Bovendien blijkt uit de verzamelde gegevens dat de hitte-inactivering van schimmelsporen vaak niet-logaritmisch verloopt en vrij abrupt geschiedt bij een bepaald afstervingspunt. Van deze schimmelsporen zijn de *D*- en *z*-waarden derhalve niet nauwkeurig vast te stellen (van der Spuy et al., 1975; Splittstoesser & Splittstoesser, 1977). Wel kan met enige zekerheid worden geconcludeerd dat het afstervingspunt van sporen minimaal 10 °C (gisten) en maximaal 50 °C (fungus ascosporen in een intacte ascocarp en *Bacillus stearothermophilus*) hoger is dan het afstervingspunt van de corresponderende vegetatieve bacterie-, gist- en schimmelcellen (van der Spuy et al., 1975; Put et al., 1977, 1980; Warth, 1978a,b).

Uit de gegeven TDP-waarden van fungussporen kan worden af-

Tabel 2. Thermoresistentie van een aantal bacterie-, gist- en schimmelsoorten.

Bacteriesporesoort	TDP ¹ bij pH 6,8		z ^o (C)	Fungussporesoort	TDP ¹ bij pH 4,5		z ^o (C)
	min. (°C)	max. (°C)			min. temp. (°C)	max. temp. (°C)	
Bacillaceae 2							
<i>Sporosargina</i> 2		99,5	7-14	Gisten ⁶	60	66	4,5-5,5
<i>Bacillus</i>				<i>Saccharomyces</i>	60	70	5-7
<i>Clostridium</i> 3				<i>Kluyveromyces</i>			
psychrofiel	70	80		Schimmels ⁷			
mesofiël	75	117,5		<i>Aspergillus</i>	55	65	3,5-4
thermofiël	117,5	140		conidia	75	100	6-8
Actinomycetes 4				ascosporen			
<i>Streptomyces</i>				ascocarp	100	100	
mesofiël	50	60		sclerotium	90		
thermofiël	60	70		<i>Penicillium</i> ⁸			
<i>Micromonospora</i>				conidia	55	60	6-12
mesofiël	70	90		ascosporen	80	90	6-8
thermofiël	80	95		ascocarp	100	110	10-12
thermofiël (endo-	100	130		sclerotium	85	100	6
sporen senau				<i>Byssoclamys</i> ⁹			
stricto)				conidia	65	72	6-8
<i>Myxococcus</i> ⁵				macrosporen	60	70	
	60	65		ascosporen	80	95	
				Myxomycetes ¹⁰	50	60	
				<i>Neurospora</i> ¹¹			
				conidia	55	60	
				ascosporen	75	95	

1. TDP (Thermal Death Point) is de temperatuur in °C waarbij 10^5 sporen gesuspenseerd in 1 ml buffer met een pH 4,5 op 6,8 na 10 min verhitten juist volledig worden geïnactiveerd. $D_{6,8} = 2$ min.

2. Bron: Buchanan & Gibbons, 1974.
3. Bron: Xezones, Segmiller & Hutchings, 1965; Roberts & Hutchins, 1969; Russel, 1971; Davies, 1975; Michels & Visser, 1976; Burton et al., 1977.
4. Bron: Kalakoutskii & Agre, 1976.
5. Bron: White, 1975.
6. Bron: Put et al., 1976, 1977, 1980.
7. Bron: Marshall & Walkley, 1952; McEvoy & Stuart, 1970; Doyle & Marth, 1975.
8. Bron: Williams et al., 1941; Benjamin, 1955; Spuy et al., 1975.
9. Bron: Put & Krulswijk, 1968; Anderson & Smith, 1976; Splittstoesser & Splittstoesser, 1977.
10. Bron: Cotter, 1975.
11. Bron: Schmit & Brody, 1976.

geleid dat produkten die bij 65-90 °C worden gepasteuriseerd eerder overlevingskansen zullen bieden aan schimmel- dan aan gist-ascosporen. De hitteconserveringspraktijk lijkt echter het tegenovergestelde uit te wijzen, hetgeen verband zal houden met de differentiatie in het O₂-behoeftepatroon. Veel ascosporevormende gisten zijn immers facultatief anaëroob, terwijl schimmels overwegend obligaat aëroob zijn. Dit betekent dat produkten die ontlucht zijn gedurende het verwerkingsproces (blancheren, evacueren, exhausteren), onvoldoende restzuurstof zullen bevatten, of wel een te lage redoxpotentiaal (Eh) zullen hebben om ontkieming en groei van overlevende schimmelsporen te initiëren. Hetzelfde geldt voor ontluchte gecarboniseerde frisdranken. Een uitzondering hierop vormen onder andere enkele *Penicillium*-soorten (Williams, et al., 1941; van der Spuy et al., 1975) en *Byssoschlamys*-ascosporen, die nog bij een zeer gering rest O₂-gehalte, vertraagd tot ontkieming en myceliumvorming kunnen komen. Bij *Byssoschlamys nivea* is circa 0,1 ml O₂ in een 100 ml recipiënt gemeten bij 1 bar en 25 °C nog voldoende. *Byssoschlamys* vertoont tevens een relatief grote CO₂-resistentie. Deze schimmel kan daardoor fermentatieprocessen, zoals die bij appelcider en pickles, in ernstige mate verstoren en daarbij tevens patuline, een mycotoxine, vormen (Put & Kruiswijk, 1968; Rice et al., 1977).

Bederf door schimmelontwikkeling in door hitte geconserveerde voedingsmiddelen kan bovendien gemaskeerd zijn: 1. In een niet-optimaal groeimilieu zullen beschadigde schimmelsporen een vertraagde ontkieming en myceliumvorming vertonen. In produkten met een korte omlooptijd (1-4 weken) zal dan derhalve nog geen of in uiterst geringe mate myceliumvorming hebben plaats gevonden. 2. Door hitte beschadigde schimmelsporen zullen in een O₂-arm milieu aanvankelijk wel tot ontkieming komen en mycelium gaan vormen, doch vervolgens bij gebrek aan groei-stimulerende factoren afstervingsverschijnselen gaan vertonen. Deze geremde schimmelvorming zal dan slechts geringe sensorisch en fysisch-chemisch waarneembare veranderingen in het groeimilieu hebben teweeggebracht. Dit betekent dat veel ervaring en analytische vaardigheid vereist zijn om een dergelijke vorm van bederf op te kunnen sporen. 3. Bij bepaalde fungi kan dimorfisme optreden:

een fenotypische celdifferentiatie, waarbij onder anaërobe omstandigheden het gevormde mycelium een gistachtige structuur krijgt (Smith & Berry, 1974).

Volgens eigen ervaring komt dit groeipatroon voor bij *Mucor*-achtige fungi in zacht fruit met suikerhoudende opgiët. Het optredende bederf kan gepaard gaan met sterke CO₂-ontwikkeling, hetgeen aanleiding kan zijn tot een onjuiste diagnose, doordat de oorzaak van het bederf aan gisten toegeschreven wordt. Het afstervingspunt van deze *Mucor*-soorten in vruchtensap ligt bij circa 65 °C (Marshall & Walkley, 1952), in aardbeien op sap bij circa 72,5 °C (eigen waarneming).

Vanuit de levenscyclus van schimmels gezien, is de kans op de aanwezigheid van hittegevoelige conidia en sporangiosporen aanmerkelijk groter dan de kans op de aanwezigheid van hitte-resistente ascosporen en van ascosporen die zijn ingesloten in een ascocarp (Alexopoulos, 1962; Smith & Berry, 1974); doch deze zal aanmerkelijk groter worden indien de te verwerken gewassen minder vers of minder gaaf zijn en een voorbehandeling hebben ondergaan zoals pulpen, concentreren, indampen, drogen. Worden bovendien zowel de transport-, opslag- en bedrijfshygiëne, als de verwerkingstechniek en procestechnologie in onvoldoende mate beheerst, dan zijn ascospore- en ascocarpvorming te verwachten op het geoogste produkt en het daarmee in contact komende verpakkings- en transportmateriaal binnen het produktieproces.

Bestudering van de thermoresistentie van fungussporen eist een speciale vaardigheid en is gecompliceerder naarmate een fungussoort meerdere soorten sporen kan vormen. Bij de resistentere sporevormen - ascosporen en cleistothecia - is bovendien de maximale resistentie pas aanwezig, relatief lang nadat microscopisch volwassen ascosporen zijn waar te nemen. *Byssochlamys-asci* zijn binnen één week gevormd, doch de maximale thermoresistentie is pas na 4 weken incubatie aanwezig. In deze 4 weken wordt de thermo-resistentie langzaam opgebouwd (eigen waarneming). Dit fenomeen kan verband houden met het watertransport binnen de cel en de opbouw van complexere verbindingen of membranen die bepalend zijn voor de resistentie. Voor de vorming van *Penicillium cleistothecia* is een incubatie van ongeveer 6 weken vereist (van der Spuy et al., 1975). Voor *Aspergillus*-

soorten zelfs 28 weken (McEvoy & Stuart, 1970).

De keuze van sporuleringsmedium gekoppeld aan de incubatietemperatuur en -tijd is bij thermoresistentie-onderzoek bij fungi veelal intuïtief experimenteel vastgesteld, en kan niet, zoals bij de Bacillaceae, steunen op kennis over factoren die bepalend zijn voor het sporulerend vermogen en de opbouw van de thermoresistentie. Bovendien is over het mechanisme en over de factoren die herstel of revivificatie van sub-letaal beschadigde fungussporen kunnen bewerkstelligen, nog weinig bekend.

Wateractiviteit

Zoals reeds is opgemerkt ten aanzien van Bacillaceae-sporen, is ook de minimale a_w voor spore-ontkieming en uitgroei van fungussporen veelal hoger dan die voor vermenigvuldiging van de corresponderende vegetatieve cellen. Bovendien is de wijze waarop de a_w fysisch tot stand is gekomen van invloed op de minimale ontkiemingswaarde (Acott & Labuza, 1975; Lubieniecki-von Schelhorn & Heiss, 1975; Corry, 1976a, b).

De minimale a_w voor bacteriespore-ontkieming bedraagt 0,95. Dit betekent dat produkten met een a_w -waarde kleiner dan 0,95 veilig zijn ten aanzien van de kans op ontkieming, groei en toxinevorming door *C. botulinum* en andere toxinogene Bacillaceae.

De meeste fungussporen ontkiemen nog bij een a_w van 0,85-0,90. De groep van osmotolerante fungi vertonen nog spore-ontkieming bij een a_w van 0,75-0,80. Voor typische osmofiele en xerofiele fungi is de minimale a_w voor spore-ontkieming 0,65 (Leistner & Rödel, 1976).

Voedingsmiddelen kunnen naar het vochtgehalte worden ingedeeld in: vochtige-, halfdroge- en droge voedingsmiddelen. Hier van bedraagt de a_w respectievelijk 1,0-0,90; 0,90-0,60 en 0,60-0,00. Uit het voorgaande volgt dat de houdbaarheid van vochtige, neutrale, door hitte gesteriliseerde volconserven vooral bedreigd kan worden door overlevende bacteriesporen. Vochtige, zure, door hitte gepasteuriseerde voedingsmiddelen bieden vooral bedreigingskansen voor overlevende gisten en voor schimmelsoorten die bij een lage O_2 -spanning tot ontkieming en groei kunnen komen.

Halfdroge voedingsmiddelen zijn een ideale voedingsbodem

voor fungussporen. Onkundig behandelde droge voedingsmiddelen zullen vooral groeikansen bieden aan osmofiele en xerofiele fungi. (Pitt, 1975).

Over de mate van toename van de thermoresistentie (D - en z -waarden) van gist- en schimmelascosporen bij verlaging van de a_w en de relatie tot het a_w -verlagend agens is weinig vergelijkbaar cijfermateriaal gepubliceerd. Uit nog niet gepubliceerd onderzoek blijkt dat in dit kader het gedrag van gist-ascosporen veel overeenkomst vertoont met dat van *Bacillus*-sporen (Put & de Jong, 1980).

Het onderzoek heeft onder andere het volgende aangetoond:

1. NaCl als a_w -verlagend agens zal bij een a_w van 0,90-0,95 geen of slechts een geringe vertraging in de hitte-inactivering van gist-ascosporen bewerken.
2. Saccharose daarentegen zal bij een a_w van 0,90-0,95 de hitte-inactiveringssnelheid van gist-ascosporen ongeveer halveren.
3. In gesuikerde aardbeien-opgiet met een a_w van 0,95-0,975 is de vertraging van de hitte-inactivering zelfs driemaal zo groot.
4. De z -waarde ondergaat hierbij nauwelijks enige verandering.

Beuchat & Toledo (1977) nemen ten aanzien van *Byssochlamys*-ascosporen en saccharose als a_w -verlagend agens dezelfde tendens waar voor wat betreft de toename van de D -waarde bij afname van de a_w tot 0,90-0,98. Bij vergelijking van diverse gesuikerde vruchtensappen blijkt veenbes de geringste en ananas de grootste ontkiemingsgroei- en sporuleringskansen te bieden. D -waarden in relatie tot de a_w worden door deze auteurs alleen voor grape-sap gegeven. Afname van de a_w tot 0,95 resulteert in een $D_{75}^{\circ C}$ -waarde die ongeveer viermaal zo groot is dan die bij a_w van 0,995. De z -waarde werd niet vastgesteld.

Het onderzoek van Splittstoesser & Splittstoesser (1977) toont voor *Aspergillus*- en *Byssochlamys fulva*-ascosporen eveneens een verhoogde thermoresistentie aan in een suikerhoudend substraat. Ook Baumgart & Stocksmeyer (1976) en Eckardt & Ahrens (1977) nemen dit waar.

Uit het bovenstaande volgt dat ook bij fungussporen de thermoresistentie gerelateerd zal zijn aan de a_w zowel als aan het a_w -verlagend agens van het verhittings- en recovery-substraat.

Verlaging van de pH van het verhittingssubstraat van pH 7,5 tot pH 4,5 resulteert in een progressieve versnelling van de hitte-inactivering van bacterie-endosporen. Een uitzondering hierop vormen acidofiele Bacillaceae-species.

De afstervingsnelheid van deze bacterie-endospore-soorten zal in een 0,025 M fosfaatcitraat buffer pH 4,5-pH 7,5 niet of nauwelijks beïnvloed worden. In tegenstelling tot de geringe zuurresistentie van bacterie-endosporen, bezitten fungussporen een vrij grote zuurresistentie. Deze is niet alleen gekoppeld aan de pH, doch tevens aan het pH-verlagend zuur zelf. In een fosfaat-citraat buffer 0,025 M pH 2,5-pH 8,0 zullen fungussporen geen of nauwelijks enige verandering van de hittegevoeligheid ondergaan; mede afhankelijk van het pH-verlagend zuur en de concentratie ervan bij een bepaald pH kunnen echter zowel de afstervingsnelheid als de ontkieming en groei van door hitte beschadigde fungussporen beïnvloed worden.

Gesuspenderd in 0,05 M tartaarzuur pH 3 en verhit bij 85 °C gedurende 120 min, zullen *Byssoschlamys fulva*-ascosporen nauwelijks worden aangetast; in fumaarzuur echter zal na een verhitting gedurende 120 min bij 85 °C het overlevende aantal ascosporen tot ongeveer 10^{-4} zijn gereduceerd (Schumann & Werner, 1973). Dezelfde auteurs toonden aan dat *Aspergillus*-ascosporen onder dezelfde omstandigheden in de aanwezigheid van de genoemde organische zuren ongevoelig zijn voor een dergelijke hittebehandeling. Deze waarnemingen zijn later door Splittstoesser & Splittstoesser (1977) bevestigd.

Over de invloed van pH en organische zuren op de hitte-gevoeligheid van gistascosporen is nog maar weinig gepubliceerd (Dawes, 1976). Gisten zijn gevoeliger voor azijnzuur dan voor appelzuur bij pH 3 (Wucherpfennig & Franke, 1968). Over het algemeen is de gevoeligheid van fungi voor appelzuur vrij gering (Marshall & Walkley, 1952; Baumgart & Stocksmeyer, 1976). Boven- genoemde waarnemingen bieden een mogelijke verklaring voor het feit dat bepaalde vruchtesappen (ananas en zwarte bessen) sneller bederven en een intensiever pasteurisatieproces dienen te ondergaan dan bijvoorbeeld citrussappen (eigen waarneming).

De minimale pH voor spore-ontkieming en uitgroei is veelal hoger dan die voor vermenigvuldiging van de corresponderende vegetatieve cellen (Schumann & Werner, 1973). De optimale pH voor spore-ontkieming is zowel afhankelijk van het substraat als incubatietemperatuur. Sommige Bacillaceae-sporen ontkiemen nog bij pH 4,5 (Ito et al., 1976). Voor acidofiele Bacillaceae-sporen is de minimale pH voor spore-ontkieming ongeveer pH 3,8 (eigen waarneming). Fungussporen ontkiemen nog bij pH 1,5-2,5 (Sussman & Halvorson, 1966; Schumann & Werner, 1973). Bovendien kunnen ontkieming en uitgroei van door hitte beschadigde bacterie- en fungussporen in belangrijke mate wederkerig beïnvloed worden door de a_w en de pH van het medium (Braithwaite & Perigo, 1971; Adams & Ordal, 1976).

Adaptatie

Door zowel milieu-omstandigheden en gewenning (fenotypische adaptatie) als door genetische veranderingen (varianten) kan de thermoresistentie, de osmotische gevoeligheid, de zuurgevoeligheid en de gevoeligheid van bacterie- gist- en schimmelsporen voor andere factoren (hurdles) in zekere mate beïnvloed worden.

Er zijn tendensen in de thermoresistentie en het thermoresistentie-adaptatievermogen van bacterie- gist- en schimmelsporen die veel overeenkomsten vertonen. Voor Bacillaceae-sporen is duidelijk aangetoond dat naarmate de maximale groeitemperatuur hoger is, ook de thermoresistentie van de sporen groter zal zijn. Dit betekent dat sporen van psychrofiele Bacillaceae minder resistent zullen zijn dan die van mesofiele soorten, terwijl thermofiele Bacillaceae-sporen de hoogste thermoresistentie bezitten (Warth, 1978a,b). Ook sporevormende actinomyceten vertonen dit fenomeen (tabel 2).

Alhoewel de thermoresistentie bij fungi niet systematisch is bestudeerd, blijkt toch ook bij fungussporen een zekere relatie aanwezig te zijn tussen de maximale groeitemperatuur en de thermoresistentie van de sporen. Ascosporen van thermotolerante fungusspecies, zoals *Byssoschlamys nivea* (Put & Kruiswijk, 1968), *Aspergillus fischeri* var. *glaber* (McEvoy & Stuart, 1970), *Penicillium vermiculatum* dangeard en *P. brefeldianum* dodge

(van der Spuy, 1975), *Saccharomyces cerevisiae* en *S. chevalieri* (Put et al., 1977) met een groei-optimum van circa 35 °C, bezitten een aanmerkelijk hogere thermoresistentie dan mesofiele en psychrofile fungusspecies met veel lagere groei-optima.

Doch tevens kan binnen één bepaald soort, zoals *Bacillus subtilis* en *Saccharomyces cerevisiae*, een vrij grote spreiding van de sporethermoresistentie worden waargenomen. Bij nadere bestudering van dit fenomeen blijkt dat de stammen van de sporen die een relatief hoge thermoresistentie bezitten, afkomstig zijn van produkten die een hitteproces hebben ondergaan. Er is dan sprake van thermoselectie en hitte-adaptatie. Dit betekent dat sporen met een hoge thermoresistentie en sporen die zich aangepast hebben aan het toegepaste hitteproces dit als sub-optimaal ondergaan en derhalve overleven met behoud van deze 'aangepaste' thermoresistentie.

De hitteconserveringsindustrie is rijk aan voorbeelden van boven beschreven hitteselectie- en hitte-adaptatie-fenomenen. Doch ook in het laboratorium is het mogelijk hitte-adaptatie van bacterie- en gistsporen tot stand te brengen. Tevens kan men deze verloren doen gaan door herhaalde overentingen van cultures die dan niet of slechts in zwakke mate aan bepaalde inactiverende factoren (hurdles) zoals hitte, worden blootgesteld.

De voedselconserveringsindustrie is niet alleen een belangrijk milieu voor hitte-adaptatie van micro-organismen, doch ook andere vormen van adaptatie kunnen er ontstaan of geactiveerd worden. Dit betekent dat de voedingsmiddelen-microbioloog er op bedacht moet zijn dat bacterie-, gist en schimmelsporen die langdurig in een sub-optimaal milieu aanwezig zijn, sterk aangepaste eigenschappen kunnen gaan vertonen. Hierdoor kunnen bederfmogelijkheden en bederfpatronen ontstaan die men theoretisch gezien niet voor mogelijk zou houden. Enkele voorbeelden hiervan zijn: 1. de ontkieming en groei van *B. stearothermophilus* in een doperwtenmilieu bij 25 °C (eigen waarneming); 2. de ontkieming en groei van *C. sporogenes* in abrikozen en peren op sap pH 3,5-3,8 (eigen waarneming); 3. de ontkieming en groei van *Saccharomyces bailii* in vruchtensappen bij een benzoëzuurconcentratie van $>500 \mu\text{g g}^{-1}$ (Sand, 1973; Warth, 1977). De aanpassing van *Saccharomyces*-species, vooral van *S. bailii* aan een lage a_w

en een lage pH is bovendien relatief groot; 4. de ontkieming en groei van obligaat aërobe schimmelsoorten bij een lage O_2 -spanning (Marshall & Walkley, 1952; McEvoy & Stuart, 1970).

De minimale pH, a_w en maximale thermo-resistentie kan ook schijnbaar laag respectievelijk hoog zijn, doordat binnen een niet-homogeen voedselprodukt plaatselijk een zogenaamd microklimaat heerst: dit is een hogere pH, hogere a_w en tragere warmtedoordringing dan 'ogenschoijnlijk' is waargenomen. Een dergelijk microklimaat kan ook microbiologisch ontstaan, doordat in een gepasteuriseerd zuur produkt (vruchten op sap) ter plaatse van schimmelmyceliumvorming een hogere pH ontstaat, hetgeen overlevende *C. botulinum*-sporen ontkiemingskansen biedt en toxinevorming mogelijk maakt (Huhtanen et al., 1976).

SLOTOPMERKING

Onschadelijke, smaakafwijkingen-veroorzakende stoffen die tijdens de groei van actinomyceten en veel schimmelsoorten op en in land- en tuinbouwgewassen kunnen ontstaan, verdwijnen veelal niet tijdens de verdere bewerkingen van deze gewassen. Veel exosporenvormende schimmelsoorten (circa 500) kunnen in en op verse zowel als gedroogde land- en tuinbouwgewassen en in de daaruit bereide voedings- en genotmiddelen, schadelijke stofwisselingsprodukten vormen (mycotoxinen). Deze mycotoxinen (ongeveer 90 soorten) veroorzaken veelal niet-acuut optredende voedselvergiftigingsverschijnselen in organen die buiten het maagdar kanaal zijn gelegen van mens en dier (mycotoxicosen). Deze mycotoxicosen zijn vaak van ernstige aard (kankerverwekkend). De kans op mycotoxicosen door industrieel verwerkte voedingsmiddelen is veel groter dan de kans op botulisme (Jarvis, 1976; Frank et al., 1976; Lynt et al., 1975).

Mycotoxinen hebben een zeer hoge chemische- en thermoresistentie. Inactivering van mycotoxinen tijdens de industriële verwerking van voedingsmiddelen is praktisch uitgesloten. Ook andere processen zoals fermentatie, indikken, drogen, pekelen en marinieren, hebben weinig of geen invloed op mycotoxinen; bovendien zijn ze ongevoelig voor straling en traditionele conserveermiddelen (Rodricks, 1976). Dit betekent dat de bestrij-

ding ervan in eerste instantie daar dient te geschieden waar binnen de keten van bewerkingen (van gewas tot eindprodukt) mycotoxinevorming plaatsvindt of plaats kan vinden.

De daarbij te hanteren normen zijn in grote lijnen vastgelegd in de internationaal geldende Codex Alimentarius, waarin het begrip 'Good Manufacture Practice' (GMP) alle hygiënische maatregelen omvat die tijdens de verwerking van voedingsmiddelen noodzakelijk zijn om een onschadelijk eindprodukt te verkrijgen (Olson, 1978). Deze GMP voor de bestrijding van ongewenste schimmel- en bacterievermeerdering binnen de keten van bewerkingen van voedsel voor mens en dier mag nimmer ontsnappen aan het oog en de aandacht van de voedingsmiddelenmicrobioloog.

Pathogene sporevormende bacteriën bij mens en dier

J. Haagsma, Centraal Diergeneeskundig Instituut, Rotterdam

INLEIDING

Sporevormende bacteriën komen wijd verspreid in ons milieu voor en kunnen zich daar in de resistente sporevorm zeer lang handhaven. Mens en dier worden vooral besmet door opname van uit de bodem of via de vegetatie. Meestal worden de bacteriesporen met voedsel of drinken via de mond opgenomen, maar dit kan ook geschieden door verwondingen van de huid of slijmvlies. Deze besmetting leidt gelukkig slechts onder bepaalde omstandigheden tot ziekteprocessen, mede doordat maar enkele van deze bacteriesoorten een pathogeen vermogen bezitten.

Voor een goed inzicht in de rol van pathogene sporevormende bacteriën in voedingsmiddelen van de mens is ook voldoende kennis van de pathogene sporevormende bacteriën bij dieren noodzakelijk. Epidemiologische gegevens wijzen er namelijk op dat een hoog percentage van alle door voedingsmiddelen overgebrachte infecties en/of intoxicaties van microbiële aard van dierlijke origine zijn. De ziekteprocessen komen als regel tot stand doordat naast de primaire besmetting van het voedsel tevens een vermeerdering van het pathogene agens heeft kunnen plaatsvinden door ondeskundige behandeling, met name door bewaring van het voedsel bij te hoge temperatuur en door onvoldoende verhitte.

ALGEMEEN OVERZICHT PATHOGENE SPOREVORMENDE BACTERIËN

Taxonomisch behoren de sporevormende bacteriën tot twee geslachten: *Clostridium* en *Bacillus*. Bij *Clostridium* zijn de sporevormende bacteriën ingedeeld die alleen onder anaërobe omstandigheden groeien, en bij *Bacillus* de sporevormende bacteriën die in elk geval bij de aanwezigheid van zuurstof groeien,

maar waarvan sommige ook anaëroob gedijen. De meeste pathogene sporevormende bacteriën bij mens en dier behoren tot het geslacht *Clostridium*, terwijl van het geslacht *Bacillus* slechts twee soorten een pathogene betekenis hebben.

Clostridium

Het pathogene vermogen van de *Clostridium*-soorten is gebaseerd op sterk uiteenlopende mechanismen. Sommige soorten produceren zeer krachtig werkende exotoxinen die verantwoordelijk zijn voor de specifieke pathogeniteit. Andere soorten produceren toxinen die minder potent zijn, maar hebben tevens het vermogen de lichaamsweefsels van mens of dier binnen te dringen en zich daar te vermeerderen waardoor lokale ontstekingsprocessen ontstaan.

In tabel 1 is een overzicht gegeven van de belangrijkste ziekten bij mens en dier die door *Clostridium* worden veroorzaakt. Op grond van de klinisch-pathologische symptomen kunnen globaal de volgende vier ziektebeelden worden onderscheiden (Sterne & Batty, 1975):

- Neurotrope intoxicaties (vergiftiging van het zenuwstelsel) bij mens en dier, veroorzaakt door de specifieke exotoxinen van *C. botulinum* en *C. tetani*, waardoor respectievelijk botulismus en tetanus ontstaan. Botulismus is een specifieke voedselvergiftiging waarbij het botulinumtoxine reeds vóór de opname in het voedsel is gevormd; er wordt daarom wel gesproken van 'pre-formed toxine'. Tetanus ontstaat daarentegen doordat *C. tetani* zich kan vermeerderen in wonden of anderszins beschadigde weefsels waarin anaërobe omstandigheden aanwezig zijn.
- Voedselvergiftiging bij de mens als gevolg van de opname van voedsel dat sterk besmet was met *C. perfringens* type A. Deze aandoening is bij dieren niet bekend.
- Acuut verlopende darmaandoeningen bij mens en dier, in de medisch-veterinaire literatuur bekend onder benamingen als necrotiserende enteritis (ontsteking van de ingewanden, die met weefselversterf gepaard gaat) en enterotoxemie (aanwezigheid van bepaalde bacterievergiften in de ingewanden). Deze ziektebeelden worden vooral veroorzaakt door de verschillende typen

Tabel 1. Overzicht van de belangrijkste door *Clostridium*-bacteriën veroorzaakte ziekten bij mens en dier.

Ziekteverwekkende <i>Clostridium</i> -soort	Ziekte bij de mens	Ziekte bij dieren
<i>C. botulinum</i>	type A botulismus	botulismus
	type B botulismus	botulismus
	type C -	botulismus
	type D -	botulismus
	type E botulismus	botulismus
	type F botulismus	-
	type G -	-
<i>C. tetani</i>	tetanus	tetanus
<i>C. perfringens</i>	type A voedselvergiftiging, gasgangreen	gasgangreen, enterotoxemie
	type B -	enterotoxemie
	type C necrotiserende enteritis	enterotoxemie
	type D enteritis	enterotoxemie
	type E -	-
	type F necrotiserende enteritis	-
<i>C. novyi</i>	type A gasgangreen	gasgangreen
	type B gasgangreen	'black disease'
	type D -	bacillaire hemoglobulinurie
<i>C. septicum</i>	gasgangreen	gasgangreen, paraboutvuur
<i>C. chauvoei</i>	-	boutvuur
<i>C. sordellii</i>	gasgangreen	gasgangreen
<i>C. histolyticum</i>	gasgangreen	-

van *C. perfringens*, bij schapen soms ook door *C. septicum*. Op grond van de geproduceerde letale toxinen, aangeduid met letters van het Griekse alfabet - alfa, bèta, epsilon en jota - worden bij *C. perfringens* namelijk de typen A, B, C, D, E en F onderscheiden, die alle een specifieke pathogene betekenis hebben (zie tabel 1). De door *C. perfringens* gevormde toxinen zijn veel minder potent dan het botulinum- of tetanustoxine.

- Infecties bij mens en dier van wonden en van spierweefsel waarin anaërobe omstandigheden heersen, bekend onder benamingen als gasgangreen (weefselversterf met gasvorming), boutvuur en paraboutvuur. Deze infecties kunnen door verschillende *Clostridium*-soorten worden veroorzaakt, waarvan de belangrijkste zijn *C. novyi* type A en B, *C. perfringens* type A, *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. sordellii* en *C. histolyticum*. Tot deze groep kunnen ook enkele specifieke infecties van de lever bij her-

kauwers worden gerekend, veroorzaakt door *C. novyi* type B en D (syn. *C. haemolyticum*) en bekend onder benamingen als black disease en bacillaire hemoglobininurie (zie tabel 1).

Bacillus

Van dit geslacht hebben alleen *B. anthracis* en *B. cereus* een duidelijke pathogene betekenis. *B. anthracis* is de verwekker van anthrax (miltvuur) bij mens en dier, een ziekte die zich kan voordoen als een acuut verlopende algemene septicemie (bloedvergiftiging) of als een heftige lokale ontsteking, het zogenaamde miltvuurcarbunkel. *B. cereus* kan sporadisch eveneens worden aangetroffen in bepaalde ontstekingsprocessen, doch is vooral bekend als veroorzaker van een acuut verlopende voedselvergiftiging bij de mens.

Uit het bovenstaande overzicht blijkt dat door pathogene sporevormende bacteriën bij mens en dier zeer uiteenlopende ziekteprocessen kunnen worden opgewekt. In het kader van dit boek zal alleen bijzondere aandacht worden besteed aan botulisme bij mens en dier en aan voedselvergiftigingen bij de mens veroorzaakt door *C. perfringens* type A en *B. cereus*.

BOTULISMUS BIJ DE MENS

Beschrijving van de ziekte

Als algemene definitie kan gelden dat botulismus een specifieke voedselvergiftiging is, veroorzaakt door de orale opname van toxinen die door de bacterie *C. botulinum* zijn gevormd. De naam botulismus is afgeleid van het Latijnse woord botulus, wat worst betekent. De ziekte was in de 19e eeuw namelijk vaak een gevolg van het nuttigen van giftige worst.

In tegenstelling tot andere vormen van voedselvergiftiging, waarbij gastro-intestinale symptomen (ziekteverschijnselen van het maagdarmkanaal) op de voorgrond treden, is botulismus gekenmerkt door het optreden van nerveuze afwijkingen, zoals verlamingsverschijnselen en spierzwakte. Na opname wordt het botulinumtoxine vooral geabsorbeerd in de maag en de dunne darm. Via

het lymfevatenstelsel komt het toxine in de bloedsomloop en ontplooit haar activiteit in de 'motorische eindplaten'. In deze neuromusculaire verbindingen vindt de prikkeloverdracht plaats van de zenuwvezel naar de spiervezel via acetylcholine. Dit proces wordt door het botulinumtoxine specifiek en irreversibel verhinderd, zonder dat het werkingsmechanisme exact bekend is.

Ondanks de neurotoxiciteit van de botulinumtoxinen, hebben de eerste symptomen toch meestal betrekking op de digestie-tractus (spijsverteringskanaal), zoals misselijkheid, braken en koliekaanvallen, vaak 12 tot 18 uur na de voedselopname optredend. Typisch kunnen de klachten over een droge mond zijn. Spoedig ontwikkelen zich ook symmetrisch neurologische symptomen, zoals oogafwijkingen met onder andere accommodatiemoeilijkheden en pupildilatatie, slikbezwaren, spraakmoeilijkheden en algehele spiermoeheid. Er is geen koorts aanwezig. Het bewustzijn en het pijngevoel worden niet aangetast. Als de ziekte voortschrijdt kan de patiënt niet meer staan en in fataal verlopen de gevallen voeren ademhalings- en circulatiestoornissen meestal na 3 tot 6 dagen tot de dood (Foster et al., 1965).

Het ziekteverloop is afhankelijk van de hoeveelheid opgenomen toxine. Bij opname van een veelvoud van de dodelijke dosis zal het ziekteproces snel verlopen en kan het slachtoffer binnen 24 uur sterven, terwijl bij weinig toxine de klachten vaag kunnen zijn en zich een meer chronisch ziektebeeld gaat ontwikkelen waarbij herstel mogelijk is, dat echter verscheidene weken kan vergen. De lichte ziektegevallen worden vaak niet als botulismus onderkend, mede doordat het klachtenbeeld de patiënt niet bij de goede specialist doet belanden.

Etiologie

Het ontstaan van botulismus is in 1896 opgehelderd door de Belg van Ermengem, die een voedselvergiftiging bestudeerde bij mensen die tijdens een feestmaal allen hadden gegeten van ongekookte, door zout geconserveerde ham. Hij isoleerde uit deze ham en uit de milt van een der overleden patiënten een obligaat anaëroob groeiende toxine-producerende bacterie, die hij *Bacil-*

lus botulismus noemde en waarvoor sinds 1917 algemeen de naam *C. botulinum* is aanvaard. Toen er meer *C. botulinum*-culturen werden geïsoleerd, bleek al spoedig dat er immunologisch verschillende toxinetypen waren en momenteel onderscheidt men 7 toxinetypen, die met de letters A tot en met G worden aangeduid. Mens en dier hebben voor deze toxinetypen een verschillende gevoeligheid; zo is de mens zeer gevoelig voor de toxinetypen A, B, E en F, terwijl de typen C en D vooral verantwoordelijk blijken te zijn voor het optreden van botulismus bij dieren. Van type G, pas in 1970 geïsoleerd uit een grondmonster in Argentinië, is alleen de gevoeligheid van laboratoriumproefdieren bekend (Gimenez & Ciccarelli, 1970). De 7 toxinetypen hebben nogal sterk uiteenlopende culturele en biochemische eigenschappen (tabel 2); de taxonomie van *C. botulinum* is om praktische redenen gebaseerd op het vermogen botulinumtoxine te kunnen produceren.

Ook bij één toxinetype kunnen nog opvallende verschillen bestaan. Zo zijn bij type B en type F proteolytische en non-proteolytische stammen beschreven; de Europese B-stammen zouden meestal non-proteolytisch zijn en de in Amerika geïsoleerde B-stammen steeds proteolytisch. Het verschil in proteolytische activiteit heeft een grote praktische betekenis, omdat de groei van de proteolytische stammen in het voedsel meestal organolep-

Tabel 2. Biochemische eigenschappen van de verschillende toxinetypen van *C. botulinum*

	type A	B prot.	B nonprot.	C	D	E	F prot.	F nonprot.	G
Proteolyse	+	+	-	-	-	-	+	-	+
H ₂ S-vorming	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sucrose	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Adonitol	-	-	+	-	-	+	-	?	-
Glycerine	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Dextrine	-	-	+	-	-	+	+	?	-
Inositol	-	-	+	+	+	-	-	?	-
Ribose	-	-	-	+	+	+	-	?	-
Mannose	-	-	-	+	-	+	-	+	-

+ = positieve reactie; - = negatieve reactie; + = verschillende reacties;
? = reactie onbekend

tisch wel herkenbaar is door de afwijkende geur en smaak, terwijl de groei van non-proteolytische stammen het voedsel in het algemeen organoleptisch niet afwijkend doet zijn.

Het botulinumtoxine is het sterkst werkende gif dat bekend is. De letale dosis van zuiver A- of B-toxine voor de mens zou slechts 0,01 mg of nog minder bedragen. Alhoewel de chemische structuur nog niet volledig is opgehelderd, heeft onderzoek uitgewezen dat de botulinumtoxinen zuivere eiwitten zijn, uitsluitend opgebouwd uit aminozuren, met een globulaire structuur (Lamanna, 1959). Over het moleculairgewicht van de diverse toxinetypen bestaan nogal uiteenlopende gegevens, veroorzaakt door de omstandigheid dat het toxine bij verregaande zuivering de neiging heeft in brokstukken uiteen te vallen. Van de meeste toxinen is bekend dat er een fractie met hemagglutinerende eigenschappen is. Na wegvallen van dit hemagglutinine zou het resterende toxine bij alle toxinetypen volgens de nieuwste inzichten een moleculairgewicht hebben van 141 000 tot 160 000, bestaande uit een zware en een lichte keten, die verbonden zijn door één of meer disulfide-bruggen (Syuto & Kubo, 1977).

De botulinumtoxinen zijn goed bestand tegen de inwerking van zuur; in alkalisch milieu is de stabiliteit geringer. Verwarmen gedurende 30 minuten bij 80 °C inactieveert de toxinen, waarbij het C- en D-toxine nog het meest warmteresistent zijn (Prévot & Brygoo, 1953; Foster et al., 1965). De inwerking van trypsine doet de toxiciteit van type B-toxine (geproduceerd door nonproteolytische stammen, type E- en F-toxine toenemen, niet echter van type A-, B-(geproduceerd door proteolytische stammen), C- en D-toxine.

De optimale groeitemperatuur van *C. botulinum* bedraagt 27 tot 33 °C; dan vindt ook de grootste toxineproductie plaats. De laagste temperatuur waarbij nog groei- en toxinevorming optreedt, loopt nogal uiteen bij de verschillende toxinetypen. Van *C. botulinum* type E en non-proteolytische B-stammen is bekend dat de minimumgroeitemperatuur 3,3 °C bedraagt. Het botulinumtoxine wordt tijdens de groei in de vegetatieve cellen gevormd en afgegeven aan het omringende medium. Het vermogen botulinumtoxine te vormen wordt bij sommige typen van *C. botulinum* bepaald door de aanwezigheid van specifieke bacteriofagen (zie

ook par. 'Botulismus bij dieren').

Botulismus bij de mens is volgens Foster et al. (1965) meestal te wijten aan 3 factoren:

1. een inadequate voorbehandeling van het voedsel, zoals onvolgende zouten, pekelen, roken, drogen en verhitten;
2. het bewaren van het voedsel bij temperaturen die de groei van *C. botulinum* mogelijk maken;
3. het nuttigen van voedsel zonder dat dit tevoren voldoende verhit is.

Voorkomen van botulismus

Alhoewel botulismus bij de mens een mondiale verspreiding heeft, zijn de meeste gevallen toch geregistreerd op het noordelijk halfrond, met name in Europa en in Noord-Amerika (Meyer, 1956; Riemann, 1973). In Europa zijn de meeste gevallen veroorzaakt door vleesgerechten die van het varken afkomstig waren; hierbij werd vooral type B-toxine aangetoond. Kauf et al. (1974) beschreven echter onlangs een botulismus-uitbraak waarbij kaas van het type brie de toxinebron bleek te zijn. In de Verenigde Staten zijn veel gevallen veroorzaakt door thuis ingemaakte groenten en vruchten, waarbij vaak type A was betrokken en daarnaast type B. Verder zijn in Rusland, de Scandinavische landen, Japan en Noord-Amerika veel botulismegevallen beschreven die verband hielden met het nuttigen van visgerechten, waarbij type E was betrokken. Van type F zijn slechts enkele botulismegevallen bekend geworden in Denemarken en de Verenigde Staten.

Het risico van botulismus is voor de mens steeds aanwezig in gebieden waar de besmettingsgraad van de bodem met *C. botulinum* type A, B, E en F hoog is. Door de grote resistentie van de bacteriesporen zal een eenmaal bestaande besmetting zich zeer lang kunnen handhaven.

Botulismus wordt van oudsher vooral veroorzaakt door thuis geconserveerd voedsel. Bij de opkomst van de conservenindustrie fungeerde botulismus lange tijd als het zwaard van Damocles; het is dan ook begrijpelijk dat deze bedrijfstak het onderzoek sterk heeft gestimuleerd. Ondanks alle voorzorgsmaatregelen blijken toch ook zo nu en dan botulismusgevallen te moeten worden toege-

schreven aan fabrieksmatig bereid voedsel (tabel 3).

In tegenstelling tot België, waar in de periode 1961 tot 1974 24 botulismus-uitbraken met 75 aangetaste personen zijn vastgesteld (Famerée et al., 1974), zijn in Nederland bij de mens maar enkele gevallen van botulismus bekend geworden. Zo worden over de periode 1918 tot 1940 maar 7 gevallen vermeld, waarbij 19 patiënten waren betrokken; bij 4 personen had de ziekte een fatale afloop. In slechts 2 gevallen werd het toxine-type bepaald, waarbij in beide gevallen sprake bleek te zijn van type B-toxine. De laatste onderkende uitbraak deed zich voor in 1943 bij Nijmegen, waarbij 24 personen ziek werden en 9 patiënten aan botulismus stierven. Het gelukte niet het aangetoonde toxine te typeren met antitoxine type A of B.

Diagnostiek

De klinische en epidemiologische gegevens kunnen belangrijke aanwijzingen verschaffen. De bevestiging van de diagnose vindt in het laboratorium plaats en is gebaseerd op het aantonen van het botulinumtoxine, zowel in het verdachte voedsel als bij de patiënten. De meest betrouwbare en gevoeligste methode is de bioassay, waarbij de aanwezigheid van het toxine wordt vastgesteld door het te onderzoeken materiaal intraperitoneaal te appliceren bij muizen. Andere methodieken, waaronder de immunofluorescentietechniek en de 'enzyme-linked immunosorbent assay', blijken minder gevoelig en/of minder specifiek te zijn. De typering van het toxine vindt eveneens plaats bij muizen door

Tabel 3. Overzicht van botulismus-uitbraken in de Verenigde Staten met betrekking tot de herkomst van het voedsel, 1900-1973.
Bron: Center for Disease Control, June 1976. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers, Table 3, p. 19.

Herkomst van het voedsel	1900-1909	1910-1919	1920-1929	1930-1939	1940-1949	1950-1959	1960-1969	1970-1973	Totaal
Thuis geconserveerd	1	48	77	135	120	50	42	21	494
Conservenindustrie	1	14	26	6	1	2	10	2	62
Onbekend	0	8	13	13	13	51	26	7	131
Totaal	2	70	116	154	134	103	78	30	687

middel van een serumneutralisatietest met behulp van specifieke monovalente antisera. Bij patiënten kan men trachten het toxine aan te tonen in het bloed, braaksel, maaginhoud, urine en faeces. Na de dood kunnen ook de lever of andere organen in het onderzoek worden betrokken.

Men kan tevens een onderzoek instellen naar het oorzakelijke micro-organisme *C. botulinum*. Een positief uitgevallen onderzoek is evenwel niet bewijzend, maar kan ten hoogste als een verdachte omstandigheid worden beschouwd, omdat veel gebieden min of meer intensief besmet zijn met *C. botulinum*.

Bij herstellende patiënten kan getracht worden antitoxinen in het bloed aan te tonen; de kans op een positief resultaat is zeer klein, omdat het verschil tussen de ziekmakende dosis en de immuniserende dosis zeer groot is (Wilson & Miles, 1975).

Preventieve en therapeutische maatregelen

De beste preventie bij botulismus is een adequate behandeling van het voedsel, bestaande uit een goede conserveringstechniek, een juiste bewaartemperatuur en voldoende verhitting kort voor het nuttigen. Belangrijke factoren zijn de temperaturen bij de voorbehandeling en het bewaren van het voedsel, de zoutconcentratie, de wateractiviteit, de zuurgraad, de oxydatie-reductie-potentiaal en de contaminatie met andere, zuurproducerende micro-organismen zoals *Escherichia coli* en *Streptococcus faecalis* (Riemann, 1973). Hierbij is een goede voorlichting aan het publiek zeer belangrijk te achten.

De therapeutische behandeling van botulismuspatiënten biedt slechts beperkte mogelijkheden, omdat het toxine dat de neuromusculaire prikkeloverdracht blokkeert, onbereikbaar is. Het succes van een behandeling met antiserum is dan ook problematisch en bij de mens voornamelijk een psychotherapeutische maatregel; het antiserum kan echter wel werkzaam zijn tegen toxine dat nog in het bloed circuleert of nog uit de digestie-tractus wordt geresorbeerd. Daarbij is de keuze van het juiste antiserum-type nog een extra complicatie (Lamanna, 1959). Verder kunnen antibiotica worden aangewend, terwijl de laatste jaren de behandeling met guanidine de aandacht heeft getrokken.

Dat de mortaliteit bij botulismus toch een geleidelijke daling vertoont, is vooral toe te schrijven aan een sterk verbeterde symptomatische behandeling, waaronder kunstmatige beademing.

BOTULISMUS BIJ DIEREN

Bij dieren kan min of meer uitgebreide sterfte door botulismus optreden. In het begin der 20e eeuw zijn in de Verenigde Staten de toxinetypen A en B wel verantwoordelijk gesteld voor botulismusevallen bij paarden, runderen en kippen. Na de ontdekking van de toxinetypen C en D is gebleken dat botulismus bij dieren voornamelijk door deze typen wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn ook nog enkele gevallen toegeschreven aan de toxinetypen A, B en E*.

Het type C-toxine werd vroeger vaak onderverdeeld in de subtypen C_α en C_β terwijl in Europa het type D wel met het type C is verward. Deze onduidelijke situatie is opgelost na het gebruik van monospecifieke antisera bij de typering van de toxinen en nadat was aangetoond dat de toxiciteit van *C. botulinum* type C en D afhankelijk was van de aanwezigheid van specifieke bacteriofagen. Het bleek toen dat het subtype C_α hoofdzakelijk toxinefactor C_1 produceert en soms kleine hoeveelheden van de toxinefactoren C_2 en D; het subtype C_β produceert alleen tamelijk kleine hoeveelheden van factor C_2 en type D hoofdzakelijk toxinefactor D, maar soms ook iets C_1 . De toxinefactor C_1 wordt niet langer geproduceerd als subtype C_α de specifieke bacteriofaag verliest; de cultuur is dan non-toxisch geworden of produceert nog kleine hoeveelheden van factor C_2 , die meestal pas aantoonbaar zijn na een behandeling met het enzym trypsine (Eklund & Poysky, 1972; Jansen, 1971).

Het ziektebeeld komt in grote lijnen overeen met dat van de mens. De locomotiestoornissen en ademhalingsbezwaren treden meer op de voorgrond, evenals het verlies van agressiviteit.

* In 1977 zijn evenwel in Nederland diverse gevallen van botulismus Type B bij runderen voorgekomen, die veroorzaakt werden door de bijvoeding van toxische bierbostel.

Bij vogels is de aantasting van het vliegvermogen en de verlamming van de halsspieren kenmerkend.

Herkauwers en paarden zijn zeer gevoelig voor de toxinetypen C en D, vogels en Mustilidae, zoals nertsen en fretten, alleen voor type C. Varkens, carnivoren en roofvogels zijn evenals aasetende dieren van nature zeer ongevoelig of helemaal refractair voor de botulinumtoxinen. Uitgebreide sterfte door botulismus is vroeger voorgekomen bij runderen en schapen in Zuid-Afrika en Australië en in mindere mate in de Verenigde Staten in gebieden met extensieve veeteelt. In Europa is slechts sporadisch sterfte door botulismus vastgesteld bij herkauwers en paarden. Bij farmnertsen, die met vlees- en visafval worden gevoederd, is botulismus een typische voedselvergiftiging die in alle belangrijke nertsfokkende landen veelvuldig is voorgekomen. Bij vogels is het voorkomen van botulismus bekend bij kippen en fazanten, doch vooral bij watervogels. Massale sterfte door botulismus bij watervogels, met name bij eendachtigen, is sinds 1910 bekend in de Verenigde Staten en op veel kleinere schaal in Zuid-Afrika en Australië. In Europa is voor het eerst een incidentele uitbraak vastgesteld in 1965 in Zweden, in 1967 in Denemarken, in 1969 in Engeland en in 1970 in Nederland. Alleen in Nederland is sprake van een jaarlijkse recidive, waarvan de ernst sterk afhankelijk is van de temperaturen gedurende de zomermaanden. Er zijn aanwijzingen dat de toenemende verstoring van het milieu hieraan mede schuldig is. Uit de ontwikkelingen en diverse onderzoeken blijkt dat de volksgezondheid niet direct in het geding is, maar dat er wel een toename is in de botulismusproblematiek bij nutsdieren (Haagsma & ter Laak, 1977).

Bij het optreden van botulismus bij dieren door de toxinetypen C en D blijkt steeds weer dat de toxinevorming plaats vindt in kadavermateriaal, waarna zeer toxische deeltjes al of niet bij toeval met het normale voedsel worden opgenomen. Bij de preventie van botulismus bij dieren is daarom de tijdige opruiming van dood dierlijk materiaal van essentieel belang. Daarnaast kunnen nertsen en in potentiële botulismusgebieden runderen en schapen uitstekend actief worden geïmmuniseerd door toepassing van een vaccin.

Beschrijving van de ziekte

De betekenis van deze bacterie - vroeger ook wel *C. welchii* genoemd - voor de volksgezondheid is pas in en na de tweede wereldoorlog goed onderkend.

Het ziektebeeld wordt gekenmerkt door een acute maagdarms-toornis met plotseling optreden van koliekverschijnselen en diarree; de patiënt voelt zich misselijk, maar braken, hoofdpijn of koorts zijn meestal niet aanwezig. De incubatieperiode kan variëren van 8 tot 22 uur en bedraagt meestal 10 tot 12 uur. De ziekte heeft bij gezonde mensen uiterst zelden een dodelijk verloop en herstel treedt meestal binnen een dag op (Benenson, 1975; Genigeorgis, 1975).

Etiologie

Dit type voedselvergiftiging ontstaat door de opname van voedsel dat verontreinigd is met grote aantallen bacteriën van *C. perfringens* type A. De oorzakelijke bacterie is in tegenstelling tot de andere *Clostridium*-soorten onbeweeglijk en bezit een kapsel; de bacteriestaven zijn kort maar dik. Groei kan plaatsvinden tussen 6,5 en 50 °C, met als optimale temperatuur 45 °C. De *C. perfringens* type A-stammen die voedselvergiftiging veroorzaken, zijn meestal non-hemolytisch op bloedagar, produceren weinig alfa-toxine en bezitten sporen die zeer hitte-resistent zijn. Deze thermische resistentie kan overigens sterk variëren; soms wordt 100 °C maar enkele minuten verdragen, doch de sporen van andere stammen kunnen 100 °C gedurende 1 tot 6 uur overleven (Prevot & Brygoo, 1953). Het ziektebeeld wordt niet door de bacterie opgewekt, maar door een enterotoxine dat deze type A-stammen kunnen produceren. Dit enterotoxine komt vrij tijdens sporulering van de bacteriën en veroorzaakt de vochtophoping in de darm. *C. perfringens* sporuleert weinig in het voedsel, zodat er in tegenstelling tot botulisme niet direct sprake is van 'pre-formed enterotoxine'. Pas in de darmtractus vindt massaal sporulering plaats. Het dan vrijkomende enterotoxine is ongevoelig voor trypsine en is thermolabiel.

Het is een eiwit met een moleculairgewicht van ongeveer 36 000 en bezit antigene eigenschappen, zodat specifieke antisera zijn ontwikkeld voor serodiagnostische doeleinden.

Het reservoir van *C. perfringens* is de bodem en het maagdarmkanaal van de mens en van dieren zoals runderen, varkens en kippen. De contaminatie van het voedsel komt dus vooral tot stand via faeces of aarde. Bij vrijwel alle uitbraken is een vleesprodukt betrokken, dat bij te hoge temperatuur is bewaard en koud of onvoldoende verhit is geserveerd, zoals vleespasteien, salades, gebak, vla's en soepen.

Voorkomen

Voedselvergiftiging door *C. perfringens* komt wijd, verspreid voor in landen met inadequate behandeling van het voedsel. De meeste gevallen zijn beschreven in de Verenigde Staten en Engeland. Van Nederland zijn geen exacte cijfers bekend. Meestal zijn er meerdere mensen bij betrokken; in de Verenigde Staten gemiddeld 23 tot 55 mensen, met als grootste aantal bij één uitbraak 13 500 (Genigeorgis, 1975). Dit is te verklaren uit het feit dat bij de meeste uitbraken cafetaria's, restaurants, scholen, internaten, tehuizen voor bejaarden en voedselleverende bedrijven waren betrokken. In slechts 16% der gevallen was thuis genuttigd voedsel de oorzaak. In de zomermaanden komen nauwelijks meer gevallen voor dan in de rest van het jaar.

Diagnostiek

Naast de klinische ziekteverschijnselen en de epidemiologie is de diagnose gebaseerd op laboratoriumonderzoek, bestaande uit een semi-kwantitatief onderzoek op *C. perfringens* type A in het verdachte voedsel en faeces van de patiënten. Per gram voedsel moeten minstens 100 000 kiemen aanwezig zijn (Anon., 1975b).

Preventieve en therapeutische maatregelen

Omdat *C. perfringens* type A overal voorkomt, is het niet te voorkomen dat voedsel wordt gecontamineerd. Kleine aantallen

van het micro-organisme zijn echter ongevaarlijk. De preventie moet berusten op een goede behandeling van het voedsel, waarbij voorkomen moet worden dat *C. perfringens* zich te sterk vermeerderd. Dit kan door het voedsel tevoren voldoende te verhitten, daarna snel te nuttigen of snel af te koelen. Aan grote stukken vlees en dergelijke moet extra aandacht worden geschonken. Goede hygiënische voorzieningen en duidelijke voorlichting zijn verder van groot belang.

Specifieke therapeutische maatregelen zijn normaliter niet noodzakelijk omdat deze vorm van voedselvergiftiging zelden fataal afloopt.

VOEDSELVERGIFTIGING DOOR *BACILLUS CEREUS*

Beschrijving van de ziekte

Het ziektebeeld is gekenmerkt door acuut optredende maagdarmklachten. Soms is het voorste deel van de digestietractus meer aangetast waarbij klinisch misselijkheid en braakneigingen op de voorgrond treden; de incubatietijd varieert bij deze patiënten van 1 tot 5 uur. In andere gevallen is vooral het achterste deel van de darmtractus in het ziekteproces betrokken met als gevolg heftige buikpijn en diarree; bij deze patiënten is de incubatietijd langer, meestal 6 tot 16 uur. De ziekteduur is meestal korter dan 24 uur en bij gezonde mensen is de afloop uiterst sporadisch fataal (Benenson, 1975).

Etiologie

Deze ziekte kan ontstaan doordat *B. cereus* zich in voedsel sterk heeft kunnen vermeerderen als gevolg van een inadequate behandeling. De hitteresistente sporen kunnen de verhitting, bij de bereiding van het voedsel toegepast, overleven en na ontkieming sterk in aantal toenemen als dit voedsel te lang bij te hoge temperaturen wordt bewaard. Er zijn aanwijzingen dat een cellulair enterotoxine verantwoordelijk is voor de ziektesymptomen. *B. cereus* komt wijd verspreid in de natuur voor, vooral in de bodem.

Voorkomen

Voedselvergiftigingen door *B. cereus* zijn vooral vastgesteld in een aantal Westeuropese landen en schijnt in Amerika veel minder voor te komen. De ziekte is vooral geassocieerd met bepaalde soorten voedsel zoals rijst, groente- en vleesgerechten. Recent onderzoek heeft aangetoond dat *B. cereus* zich sterk kan ontwikkelen, indien de manier van werken in Chinese restaurants te wensen overlaat (Gilbert, 1976). In Nederland komt deze voedselvergiftiging ook zo nu en dan voor; er zijn enkele goed onderzochte gevallen beschreven (Van Zijl & Wolff, 1975). Officiële jaarcijfers ontbreken echter.

Diagnostiek

Het opsporen van de oorzaak van de ziekte steunt, naast de klinische en epidemiologische gegevens, op een kwalitatief en kwantitatief onderzoek van het verdachte voedsel en van faeces van de patiënten. Aan de aanwezigheid van 10^5 of meer *B. cereus*-kiemen in voedsel wordt diagnostische betekenis gehecht (Anon., 1975).

Preventieve en therapeutische maatregelen

Voedsel dat met *B. cereus* kan zijn gecontamineerd, moet op de juiste manier worden behandeld, waarbij vooral gelet moet worden op een snelle afkoeling na het verhitten, plaatsen in de koelkast als het voedsel langer bewaard moet worden en kort tevoren voldoende snel op temperatuur brengen als het voedsel weer moet worden verwarmd. De preventieve maatregelen komen dus overeen met die bij *C. perfringens*. De therapeutische maatregelen kunnen zich beperken tot een symptomatische behandeling van de patiënten.

Inactivering van bacteriesporen

W.J. Kooiman, Unilever Research Duiven, Zevenaar. Huidig adres: Hogere School voor Levensmiddelen-technologie, 's-Hertogenbosch

INLEIDING

De aanwezigheid van bacteriesporen in levensmiddelen, op verpakkingsmaterialen en op medische artikelen kan, indien de omstandigheden voor groei gunstig zijn of worden, aanleiding zijn tot bederf, toxinevorming of infecties. In veel gevallen moeten die sporen, om deze problemen te voorkomen, worden geïnactiveerd (een 'sporicide'-behandeling ondergaan). Maar dat is niet altijd gemakkelijk, doordat de sporen, in vergelijking met de normale vegetatieve bacteriën, veel resistenter zijn tegen de meest gangbare antimicrobiële behandelingen, zoals het gebruik van desinfectantia, verhitting en bestraling.

In het navolgende wordt een beeld gegeven van de effectiviteit van verschillende sporicide-behandelingen; aan de orde komt het gebruik van verhitting, ioniserende en ultraviolette straling, waterstofperoxyde, glutaaraldehyde en formaldehyde, en ethyleen- en propyleenoxyde. De effectiviteit van een bepaalde sporicide-behandeling wordt als regel uitgedrukt in grootheden die het verband aangeven tussen parameters van de inactiverende behandeling (bijvoorbeeld verhittingstemperatuur, verhittingstijd, concentratie van een desinfectans, stralingsdosis) en het aantal sporen dat die inactiverende behandeling heeft overleefd. Die effectiviteit kan grafisch voorgesteld worden als een *overlevingscurve*. Omdat de kwantificeringsmethode in wezen onafhankelijk is van het type inactivatie, zal hij alleen uiteengezet worden aan de hand van de hitte-inactivering.

HITTE-INACTIVERING VAN BACTERIESPOREN

Inactivering van bacteriesporen door middel van verhitting is waarschijnlijk de meest onderzochte en meest toegepaste methode.

De belangrijkste basis voor onze huidige kennis op dit terrein en de methoden ter kwantificering werd gelegd door Bigelow & Esty (1920), Esty & Meyer (1922) en Esty & Williams (1924).

In figuur 1 is de overlevingscurve weergegeven van sporen van *Clostridium botulinum*, type A, na verhitting in 1/15 M fosfaatbuffer (pH = 7,0) bij 106 °C. Een dergelijke overlevingscurve is meestal logaritmisch: de lijn die het verband aangeeft tussen de logaritme van het aantal overlevende sporen en de verhittingstijd is een rechte lijn. De helling van deze lijn is een maat voor de snelheid waarmee de sporen worden geïnactiveerd; als de verhittingstemperatuur hoger wordt, zal de afsterving sneller verlopen en dus de helling van de lijn steiler worden. De helling van deze lijn wordt nu weergegeven als de 'decimale reductietijd' of D-waarde.

Decimale reductietijd

De decimale reductietijd (of D-waarde) wordt gedefinieerd als de tijd die nodig is om, bij een bepaalde temperatuur, het oorspronkelijk aantal organismen tot 10% te reduceren. In ons voor-

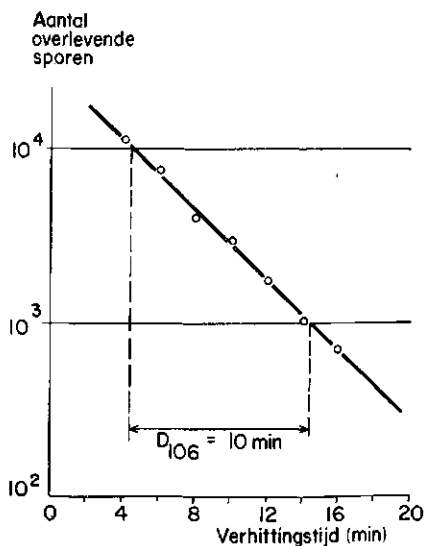


Fig. 1. Overlevingscurve voor sporen van *Clostridium botulinum* na verhitting bij 106 °C in 1/15 mol l⁻¹ fosfaatbuffer (pH 7,0).

beeld (fig. 1) duurt het 10 minuten alvorens bij 106 °C het aantal sporen van 10^4 tot 10^5 is teruggebracht. De D_{106} °C-waarde is dus 10 minuten. Zoals reeds opgemerkt, zal de inactivering bij hogere temperaturen (bijvoorbeeld 110 °C) sneller, bij lagere temperaturen (bijvoorbeeld 103 °C) langzamer verlopen. Dit is geïllustreerd in figuur 2. De overlevingscurves, zoals weergegeven in de figuren 1 en 2, zijn om twee redenen niet geheel in overeenstemming met de realiteit:

1. Indien een curve geconstrueerd moet worden op basis van reële meetgegevens, zullen de meetpunten spreiden rond de verwachte rechte lijn. Toepassing van de methode der kleinste kwadraten (de regressie-analyse) is in deze gevallen de (statistisch) enig verantwoorde methode om vast te stellen:

- of een 'rechte lijn' de beste beschrijving is van het verband tussen de meetpunten; en

- hoe groot de helling van de lijn (en dus de D-waarde) is.

Daarbij is het 95% betrouwbaarheidsinterval (dat wil zeggen D-waarden waarbinnen de gemeten hitteresistentiewaarde met 95% betrouwbaarheid zal vallen) een belangrijk gegeven voor verdere statistische toetsen.

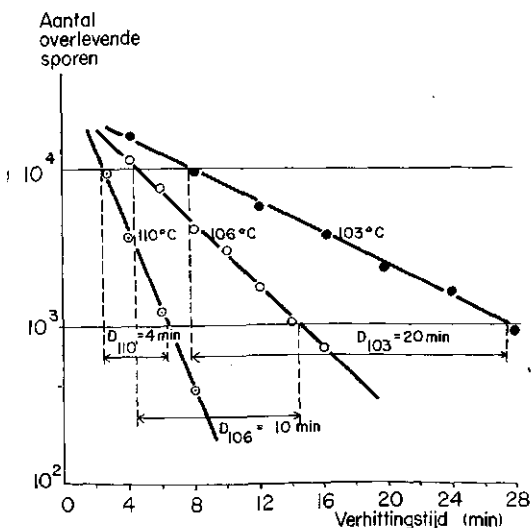


Fig. 2. Overlevingscurve voor sporen van *Clostridium botulinum*, type A, na verhitting bij 103, 106 en 110 °C in 1/15 mol l⁻¹ fosfaatbuffer (pH 7,0).

2. Een rechte lijn, die het verband aan zou moeten geven tussen de logaritme van het aantal overlevende sporen en de verhittingstijd, blijkt niet altijd de beste beschrijving van dat verband. De literatuur maakt vaak melding van afwijkingen in de overlevingscurven, zoals initiële schouders, initiële 'lag-fasen' in de inactivering, zeer snel verlopende afsterving in het begin gevolgd door een 'normale rechte lijnige afsterving', 'staart' aan de curve enz. Een overzicht van deze 'afwijkende' overlevingscurven en de mogelijke verklaring wordt onder andere gegeven door Stumbo (1965).

Omdat de overlevingscurven dus vaak verschillende hellingen hebben, is het onder die omstandigheden onmogelijk een adequate D -waarde te berekenen. In deze gevallen zal men er veelal toe overgaan om de tijd vast te stellen die, bij een bepaalde temperatuur, nodig is om een bepaalde initiële sporenbelasting tot nul te reduceren (zie onder andere Stumbo, 1965 en Mossel, 1977b).

z -waarde

De hitteresistentie van een bepaald type bacteriesporen is, indien de sporen verhit zijn onder gedefinieerde omstandigheden, pas dan volledig omschreven, als naast een bepaalde D -waarde ook de relatie tussen de D -waarden en de temperatuur gedefinieerd is. Dit gebeurt nu via de zogenaamde thermische-destructiecurve: als van een bepaalde sporensuspensie de D -waarden (bijvoorbeeld die van figuur 2: $D_{103\text{ }^{\circ}\text{C}} = 20$, $D_{106\text{ }^{\circ}\text{C}} = 10$, $D_{110\text{ }^{\circ}\text{C}} = 4$ min) op logaritmische schaal worden uitgezet tegen de overeenkomstige verhittingstemperaturen, is de resulterende figuur als regel wederom een rechte lijn. Een voorbeeld van zo'n thermische-destructiecurve is gegeven door de getrokken lijn in figuur 3. De helling van deze rechte lijn wordt voorgesteld door de z -waarde. Deze z -waarde stelt de temperatuurstijging of -daling voor (uitgedrukt in $^{\circ}\text{C}$ of $^{\circ}\text{F}$) die nodig is om de D -waarde met een factor 10 te verkleinen, respectievelijk te vergroten. De in figuur 3 genoemde $z = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ betekent dus, indien bijvoorbeeld de $D_{110\text{ }^{\circ}\text{C}}$ -waarde 4 minuten is, dat de $D_{120\text{ }^{\circ}\text{C}}$ dan tien maal zo klein is, namelijk 0,4 minuten.

De helling van de curve, de z -waarde, kan berekend worden

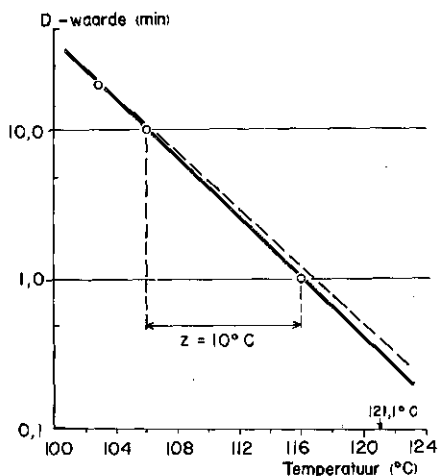


Fig. 3. Thermische-destructiecurve; de relatie tussen de logaritme van de *D*-waarden van *Clostridium botulinum*, type A, en de verhittingstemperatuur (getrokken lijn). Dezelfde relatie, indien de Arrhenius-vergelijking als uitgangspunt wordt genomen (stippellijn).

volgens de formule

$$z = (T_1 - T_2) / (\lg D_2 - \lg D_1),$$

waarbij D_2 de *D*-waarde is bij de laagste temperatuur T_2 , en D_1 de *D*-waarde is bij een hoogste temperatuur T_1 .

Zoals reeds vermeld bij de berekening van *D*-waarden, zullen ook in de thermische-destructiecurve de meetpunten (namelijk *D*-waarden) spreiden rond de verwachte rechte lijn. Ook nu is de regressielijn, bepaald via de berekening van de kleinste kwadraten, de beste methode om de meest betrouwbare *z*-lijn vast te leggen en te berekenen.

Werd in ons voorbeeld de meest voorkomende *z*-waarde van 10 °C gebruikt, voor andere sporetypen kunnen hogere of lagere *z*-waarden worden gevonden. De *z*-waarde is een reactiekinetische grootte, die in een bepaalde verhouding staat tot de Q_{10} -waarde. Deze Q_{10} -waarde is een grootte die aangeeft met welke factor de reactiesnelheid toe- of afneemt bij een temperatuursverhoging, respectievelijk -verlaging van 10 °C. In formule is de relatie tussen Q_{10} en *z*-waarden als volgt te definiëren:

$$z (^{\circ}\text{C}) = 10 / (\lg \varrho_{10})$$

Dit betekent dus dat, indien $z = 10^{\circ}\text{C}$, de ϱ_{10} -waarde 10 is; bij $z = 8^{\circ}\text{C}$ is de ϱ_{10} -waarde 18. In het algemeen betekent dit dat de invloed van een kleine temperatuursverandering op de inactiveringssnelheid sterker is naarmate de ϱ_{10} -waarde groter is.

De grootte van de z -waarde hangt niet alleen af van de soort sporen, maar is soms ook afhankelijk van de omstandigheden tijdens de verhitting. Zo is die z -waarde bijvoorbeeld hoger, indien wordt verhit bij lagere a_w -waarden (Murrell & Scott, 1966; Kooiman & Jacobs, 1977). Daarnaast zijn er aanwijzingen dat bij de zeer hoge temperaturen waarbij UHT-sterilisatie plaatsvindt, de z -waarden eveneens toenemen.

Er is ook een verband tussen z -waarden en de activeringsenergie (E) in de Arrhenius-vergelijking. Deze vergelijking kan worden gebruikt om het verband tussen de snelheid van inactivering en de temperatuur meer fundamenteel weer te geven (Gerritsen & Stamhuis, 1975).

$$k = A e^{-E/RT}$$

Hierin is:

k = reactieconstante van de inactivering (tijd^{-1});

A = constante, verschillend per sporesoort (tijd^{-1});

E = activeringsenergie (J.mol^{-1}), verschillend per sporesoort; voor sporen van *Clostridium botulinum* bedraagt deze circa 270 J.mol^{-1} (Kampen, 1975);

R = gasconstante ($0.008319 \text{ J.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);

T = absolute temperatuur (K)

Omdat $k = (\ln 10)/D$, kan men afleiden dat:

$$D = (\ln 10) \frac{1}{A} e^{E/RT}$$

of:

$$\lg D = 0,36 - \lg A + 215 E/T$$

of:

$$\lg D = c + 215 E/T \quad (1)$$

Hierbij is D de decimale reductietijd (s).

Het verband tussen $\lg D$ en de temperatuur in $^{\circ}\text{C}$, dat dus wordt uitgedrukt in de thermische-destructiecurve, wordt volgens deze benadering niet een geheel rechte lijn, maar een lijn die enigszins concaaf gebogen is. In figuur 3 is dit weergegeven door de stippellijn. De afwijking van de rechte lijn is, over een temperatuurgebied van ongeveer 25°C , gering.

Omdat verder geldt dat:

$$Q_{10} = \frac{k_{\text{bij } T+10}}{k_{\text{bij } T}} \quad (2)$$

en

$$z = \frac{10}{\lg Q_{10}} \quad (3)$$

kan uit (1), (2) en (3) worden afgeleid dat

$$z = \frac{(\ln 10) R T (T+10)}{E} \approx \frac{0,0046 T^2}{E}$$

(zie ook Pflug & Holcomb, 1977) en Kampen 1975.)

De betekenis van grootheden als D - en z -waarde kan als volgt worden geïllustreerd. Indien voor een bepaald verhittingsproces de exacte condities (tijd en temperatuur) moeten worden vastgesteld, geschiedt dat als volgt:

- leg het maximaal aantal sporen vast dat mag overleven in termen als: de uitval na het proces mag, bijvoorbeeld maximaal 1 op 10^5 verpakkingseenheden zijn;
- bepaal het aantal hitteresistente sporen dat, indien overlevend, het produkt zou doen bederven; kwantificeer hun D - en z -waarden;
- beschrijf de procescondities op basis van deze gegevens zoals

in het hiervolgende voorbeeld.

In een champignonsoep, die verpakt wordt in blikken, komen in totaal 1000 (thermoresistente) sporen voor van mesofiele bederfverwekkende sporevormers, met als thermoresistentiewaarden:

$D_{121,1}^{\circ C} = 0,9 \text{ min}$, $z = 10^{\circ C}$. De maximale uitval ten gevolge van bederf mag zijn: 1 op 10^5 blikken. Dit betekent dat het oorspronkelijk aantal sporen (1000 per blik) moet worden teruggebracht tot 10^{-5} sporen per blik. Hiervoor zijn 8 decimale reducties nodig, ofwel een verhitting gedurende $8 \times 0,90$ minuten (= 7,2 minuten) bij $121,1^{\circ C}$. Daar de z -waarde $10^{\circ C}$ is, worden die 8 decimale reducties ook bereikt, indien verhit wordt gedurende $8 \times 9,00$ minuten (= 72 min) bij $111,1^{\circ C}$. Voor *Clostridium botulinum* type A en B heeft men, aannemende dat deze (thermoresistente) toxigene sporevormers voorkomen met een frequentie van 1 per blik, een proces vastgelegd dat minimaal 12 decimale reducties moet realiseren (de zogenaamde 'botulinum cook').

Toepassing van D- en z-waarden in hittesterilisaties: de F_0 -waarde

Gebruik makend van de bovenomschreven D- en z-waarden als grootheden om een hitte-inactivatie te kwantificeren zoals geïllustreerd in het voorbeeld van de champignonsoep, is het mogelijk om het steriliserend effect van een bepaalde tijd-temperatuurbehandeling (bijvoorbeeld 7,2 minuten bij $121,1^{\circ C}$) te vergelijken met eenzelfde tijdsduur bij een andere temperatuur, bijvoorbeeld 72 minuten bij $111,1^{\circ C}$. Bij hitte-sterilisaties wordt voor dit doel gebruik gemaakt van de F_0 -waarde. De F_0 -waarde is een procesbeschrijvende eenheid, gedefinieerd als het aantal minuten bij $121,1^{\circ C}$ dat - berekend met een z van $10^{\circ C}$ - equivalent is met de door het produkt ondergane hittebehandeling. Een sterilisatieproces met een F_0 van 5 minuten kan dus gerealiseerd worden door een verhitting gedurende 5 minuten bij $121,1^{\circ C}$ of ook wel door 50 minuten te verhitten bij $111,1^{\circ C}$ of ook door 0,5 minuut bij $131,1^{\circ C}$.

Indien we, zoals in figuur 4 is geïllustreerd, door het punt $D_{121,1}^{\circ C} = 1 \text{ min}$ een lijn trekken, evenwichtig aan de reeds aangegeven thermische-destructiecurve (de z -lijn), verkrijgen we

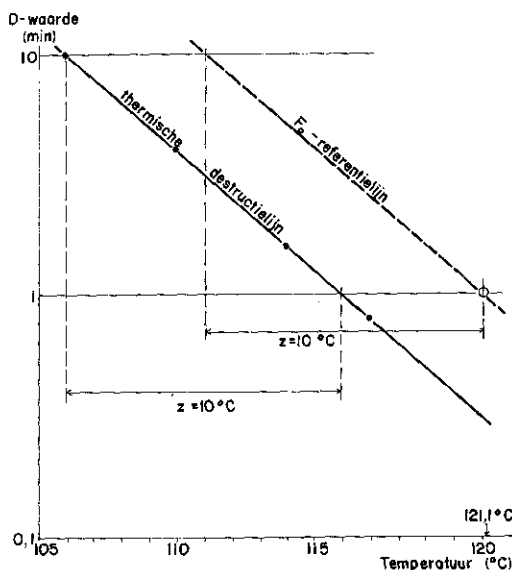


Fig. 4. Constructie van F_0 -referentielijn uit een gegeven thermische-destructie lijn.

de zogenaamde F_0 -referentielijn. Deze lijn is dus een verzameling van punten waarvoor geldt dat het inactiverend effect equivalent is aan een F_0 -waarde van 1 minuut. Via deze F_0 -referentielijn kunnen we aflezen dat 1 minuut bij $121,1^\circ\text{C}$ ($F_0 = 1$ minuut) hetzelfde inactiverende of letale effect heeft als 10 minuten bij $111,1^\circ\text{C}$ als 8 minuten bij 112°C enz. De reciproque van deze tijden, de zogenaamde letaliteitsfactor, wordt gebruikt bij de berekening van het steriliserende effect:

- bij $121,1^\circ\text{C}$ is die letaliteitsfactor gelijk aan $1/1 = 1$;
- bij 112°C is hij gelijk aan $1/8 = 0,125$.

Dit wil dus zeggen, dat een verhitting van 1 minuut bij 112°C slechts $1/8$ van de effectiviteit heeft van een verhitting van 1 minuut bij $121,1^\circ\text{C}$. Met andere woorden: we moeten 8 minuten verhitten bij 112°C voordat we hetzelfde letale effect hebben bereikt als een verhitting gedurende 1 minuut bij $121,1^\circ\text{C}$.

Langs deze weg is het dus mogelijk om de bijdrage van elke tijd-temperatuurcombinatie (dus zowel die tijdens de opwarming van het te steriliseren produkt, als die tijdens de houdtijd en tijdens het koelen) tot de eigenlijke sterilisatiewaarde van het

proces (de F_0 -waarde) te berekenen. De uiteindelijke procesberekening, waarbij de microbiologische gegevens (D - en z -waarden) moeten worden vertaald in de technologische grootheid F_0 -waarde, kan op twee manieren worden uitgevoerd, namelijk volgens de additiemethode (de 'gelijke-tijdsinterval'-procedure van Patashnik, 1953) of volgens de grafische methode.

Berekening van F_0 -waarden volgens de additiemethode: de 'gelijke-tijds-interval'-procedure

Bij de 'gelijke-tijdsinterval'-methode kunnen aan de hand van de op gelijke tijdsintervallen uitgevoerde 'koudste-punt'-temperatuurmetingen de F_0 -waarden, ook tijdens de voortgang van het proces, nauwkeurig worden berekend. Hiervoor worden, zoals in tabel 1 met een voorbeeld is geïllustreerd, de letaliteitsfactoren voor ieder gelijke-tijdsinterval (in het voorbeeld 5 minuten) genoteerd en opgeteld. De in dit voorbeeld verwerkte letaliteits-

Tabel 1. Sterilisatieberekening, weer te geven als F_0 -waarde, volgens de 'equal-time interval'-methode van Patashnik (1953). Voorbeeld¹: soep; sterilisatie gedurende 60 minuten bij 120 °C (houdtijd)

Tijdstip aflezing (min)	Gemeten temperatuur (°C)	Letaliteitsfactor ² (Ft^{-1})
1	102,4	0,013
6	112,5	0,138
11	114,4	0,214
16	115,7	0,288
21	116,9	0,380
26	117,7	0,457
31	118,3	0,525
36	118,7	0,575
41	119,0	0,617
46	119,2	0,646
51	119,3	0,661
56	119,3	0,661
		totaal: 5,127
		F_0 -waarde = 5 x 5,127 = 25,635

1. Gebaseerd op experimentele gegevens van Shapton et al. (1971).

2. Zie paragraaf 'Berekening van F_0 -waarden volgens de additiemethode: de 'gelijke-tijdsinterval'-procedure'.

factoren zijn genomen uit tabel 2. Indien voor een bepaalde temperatuur de letaliteitsfactor niet bekend is, kan hij berekend worden aan de hand van de navolgende formule:

$$\text{letaliteitsfactor} = 1 / [10^{(T-t)/z}]$$

waarin T = referentietemperatuur, t = gemeten temperatuur en z = z -waarde.

Bij een referentietemperatuur van $121,1^{\circ}\text{C}$ en rekenend met een z -waarde van 10°C , kan zo berekend worden dat bij $115,7^{\circ}\text{C}$ de letaliteitsfactor gelijk is aan:

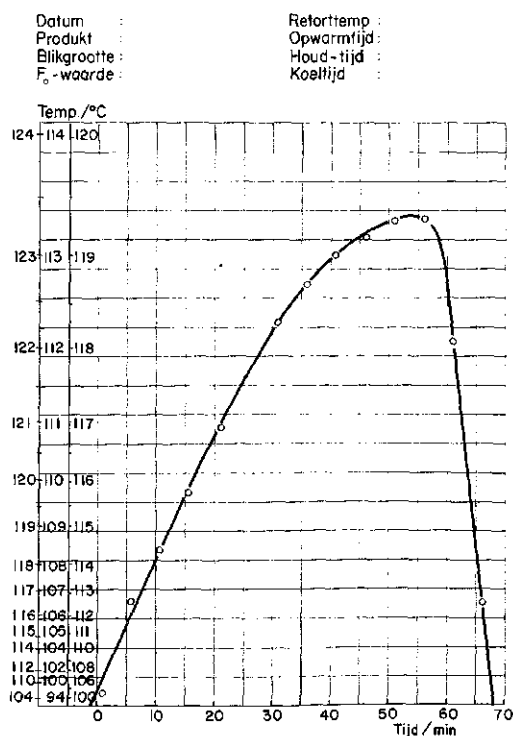
$$1 / [10^{(121,1-115,7)/10}] = 0,288$$

Tabel 2. Letaliteitsfactoren bij verschillende temperaturen met $121,1^{\circ}\text{C}$ als referentietemperatuur en berekend op basis van een z -waarde van 10°C .

Temp.	Letaliteitsfactor bij temperatuur ($^{\circ}\text{C}$) + fractie ($^{\circ}\text{C}$)									
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
101	0,010	0,010	0,010	0,010	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012
102	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015
103	0,015	0,016	0,016	0,017	0,017	0,017	0,018	0,018	0,019	0,019
104	0,019	0,020	0,020	0,021	0,021	0,022	0,022	0,023	0,023	0,024
105	0,025	0,025	0,026	0,026	0,027	0,028	0,028	0,029	0,030	0,030
106	0,031	0,032	0,032	0,033	0,034	0,035	0,035	0,036	0,037	0,038
107	0,039	0,040	0,041	0,042	0,043	0,044	0,045	0,046	0,047	0,048
108	0,049	0,050	0,051	0,052	0,054	0,055	0,056	0,058	0,059	0,060
109	0,062	0,063	0,065	0,066	0,068	0,069	0,071	0,072	0,074	0,076
110	0,078	0,079	0,081	0,083	0,085	0,087	0,089	0,091	0,093	0,095
111	0,098	0,100	0,102	0,105	0,107	0,110	0,112	0,115	0,117	0,120
112	0,123	0,126	0,129	0,132	0,135	0,138	0,141	0,145	0,148	0,151
113	0,155	0,158	0,162	0,166	0,170	0,174	0,178	0,182	0,186	0,191
114	0,195	0,200	0,204	0,209	0,214	0,219	0,224	0,229	0,234	0,240
115	0,245	0,251	0,257	0,263	0,269	0,275	0,282	0,288	0,295	0,302
116	0,309	0,316	0,324	0,331	0,339	0,347	0,355	0,363	0,372	0,380
117	0,389	0,398	0,407	0,417	0,427	0,437	0,447	0,457	0,468	0,479
118	0,490	0,501	0,513	0,525	0,537	0,550	0,562	0,575	0,589	0,603
119	0,617	0,631	0,646	0,661	0,676	0,692	0,708	0,724	0,741	0,759
120	0,776	0,794	0,813	0,832	0,851	0,871	0,891	0,912	0,933	0,955
121	0,977	1,00	1,02	1,05	1,07	1,10	1,12	1,15	1,17	1,20
122	1,23	1,26	1,29	1,32	1,35	1,38	1,41	1,45	1,48	1,51
123	1,55	1,58	1,62	1,66	1,70	1,74	1,78	1,82	1,86	1,91
124	1,95	2,00	2,04	2,09	2,14	2,19	2,24	2,29	2,34	2,40
125	2,45	2,51	2,57	2,63	2,69	2,75	2,82	2,88	2,95	3,02
126	3,09	3,16	3,24	3,31	3,39	3,47	3,55	3,63	3,72	3,80

Berekening van F_0 -waarden volgens de grafische methode

De grafische methode geeft ook een geïntegreerd beeld van het totale inactiverende effect van een warmtebehandeling: uitgaande van de gemeten temperaturen worden die temperaturen overgezet op het zogenaamde letaliteitspapier. Op dit letaliteitspapier (zie fig. 5), waarbij uitgegaan is van een z-waarde van 10°C , zijn de temperaturen zodanig op de verticale as uitgezet dat de onderlinge schaalverhoudingen overeenkomen met de voornoemde letaliteitsfactoren. Omvat het traject $120\text{--}121^{\circ}\text{C}$ een afstand van 5 cm, dan is het 10°C lager liggende traject ($110\text{--}111^{\circ}\text{C}$) slechts



$$114^{\circ}\text{C schaal: } F_0 = \frac{An}{100} \quad (A = \text{opp. onder produkt-temperatuurcurve in cm}^2)$$

$$120^{\circ}\text{C schaal: } F_0 = \frac{An}{25} \quad (n = \text{aantal minuten per cm op tijdschaal})$$

$$124^{\circ}\text{C schaal: } F_0 = \frac{An}{10}$$

Fig. 5. Een voorbeeld van letaliteitspapier. Temperatuurschaal op basis van een z-waarde van 10°C .

0,5 cm. Door de gemeten temperaturen uit te zetten op dit papier, is via een eenvoudige oppervlaktemeting (planimetrisch, door hokjes te tellen, of via uitknippen en wegen) het zo verkregen oppervlak te relateren aan een standaardoppervlak voor $F_0 = 1$.

Hitteresistentie van bacteriesporen

De hitteresistentie van bacteriesporen is, zoals reeds aangege-
duid, vaak zeer hoog. In figuur 6 is een beknopt overzicht ge-
geven van de hitteresistentie van een aantal verschillende spore-
vormers. Genoemde figuur is gebaseerd op de gegevens zoals die
door Russell (1971) zijn verzameld. Om de vergelijkbaarheid van
de verschillende gegevens te vergemakkelijken is in deze figuur
de temperatuur weergegeven waarbij, voor de desbetreffende spore-
vormer, een decimale reductietijd van één minuut werd gevonden
of berekend. De hoogste hitteresistentie staat daar voor *Bacil-
lus stearothermophilus*, namelijk een $D_{132}^{\circ C}$ -waarde van 1 min;

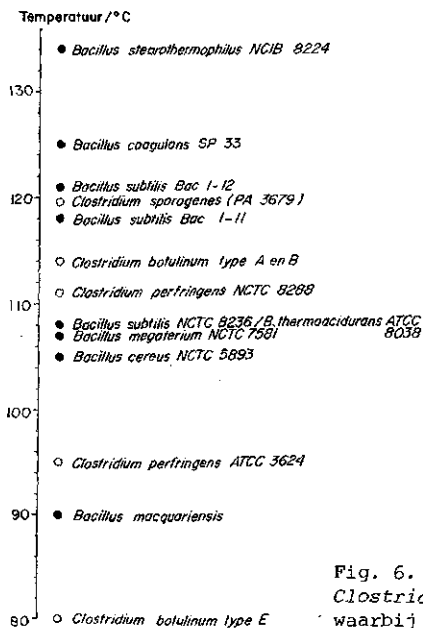


Fig. 6. Hitteresistentie van *Bacillus*- en *Clostridium*-sporen; overzicht van temperaturen waarbij de D -waarde 1 min is.

de laagste voor *Clostridium botulinum* type E, namelijk $D_{80}^{\circ C} = 1$ min.

Genoemde waarden zijn slechts oriënterend. Er blijken niet alleen grote verschillen te bestaan in D -waarden van de verschillende soorten, maar ook binnen de typen of stammen van één soort. Niet alleen het genotype maar ook de condities tijdens de sporulatie spelen een belangrijke rol. Daarnaast worden de gemeten resistentiewaarden sterk beïnvloed door de condities tijdens het verhitten (zoals zuurgraad, wateractiviteit, eiwit-, vet- en koolhydraatgehalte van verhitingsmedium, aanwezigheid van zouten) en die tijdens de 'recovery'-periode.

Het effect van de zuurgraad van het verhitingsmedium is duidelijk gedemonstreerd door onder andere Xezones & Hutchings (1965) en Löwik & Anema (1972); naarmate de pH van het verhitingsmedium lager wordt, wordt ook de D -waarde kleiner.

Ook de wateractiviteit blijkt de hitteresistentie van sporen sterk te beïnvloeden (Murrell & Scott, 1966; Härnultv & Snygg, 1972; Kooiman & Jacobs, 1977); naarmate de a_w van het verhitingsmedium lager wordt, wordt de hitteresistentie aanmerkelijk hoger. Hierbij blijkt echter dat de D -waarde bij een a_w tussen 0,2 en 0,5 maximaal is. Verdere daling van de a_w tot vrijwel 0,0 doet de D -waarden weer dalen, soms zelfs tot lagere waarden dan die welke bij $a_w = 1,0$ worden gevonden.

Hoge koolhydraatgehaltes en daarnaast hoge vet- en eiwitgehaltes blijken (Alstrand & Ecklund, 1952) een beschermend effect op sporen te kunnen uitoefenen.

De recovery-condities (de omstandigheden na de verhitting) spelen een belangrijke rol in de eventuele uitgroei van overlevende, maar meestal door hitte beschadigde sporen. Deze beschadigde sporen zijn als regel gevoeliger voor verlaagde pH-waarden, minder optimale a_w -waarden, een sub-optimale omgevings-temperatuur, de aanwezigheid van antimicrobiële stoffen (zoals nitriet) enz. Met name van het effect van nitriet wordt gebruik gemaakt bij de hitteconservering van sommige vleeswaren.

Voor inactivering door ioniserende of ultraviolette straling en door chemische middelen kan dezelfde wijze van kwantificering worden toegepast. Zo kunnen de effectiviteit van een bestraling, een waterstofperoxydebehandeling en dergelijke ook in D -waarden

uitgedrukt worden. In plaats van de z-waarde wordt in die gevallen vaak de reeds genoemde D_{10} -waarde opgegeven.

STRALINGSINACTIVERING VAN BACTERIESPOREN

Ioniserende straling

Ioniserende stralen zijn energierijke stralen die bij passage door het bestraalde materiaal ionisatie doen ontstaan, dat wil zeggen elektronen uit de atomen verwijderen. Ze bestaan uit röntgenstralen (kortgolvlige elektromagnetische straling), gammastralen (zeer kortgolvlige elektromagnetische straling), elektronen en heliumkernen. Ultraviolette straling bezit als regel niet voldoende energie om ioniserend te kunnen werken, maar brengt atomen in een aangeslagen toestand.

Als kwantitatieve eenheid van straling wordt de rad (of gray als SI-eenheid) gebruikt. Hierbij is de rad of gray een eenheid om de energie die door het bestraalde materiaal wordt geabsorbeerd, te kwantificeren: één rad (radiation absorbed dose) komt overeen met 100 erg geabsorbeerd per gram materiaal. De SI-eenheid is de gray (Gy), een energie van 1 joule geabsorbeerd in 1 kg van een stof; 1 Gy = 100 rad.

Ioniserende straling veroorzaakt DNA-beschadigingen. Een door bestraling geïnactiveerde spore kan nog wel ontkiemen en uitgroeien, maar celdeling is niet meer mogelijk. In Nederland worden gammastralen onder andere gebruikt voor het ontsmetten van specerijen (10 kGy), het steriliseren van diervoeders voor laboratoriumproefdieren (25 kGy), het voorsteriliseren van verpakkingsmateriaal (5 kGy) en het steriliseren van medische appendages, zoals wegwerp-sputten en -petrischalen (25 kGy).

Analoog aan het systeem dat wordt gebruikt om de hitteresistentie van sporen te kwantificeren, wordt bij bestraling de overlevingscurve vastgesteld door de logaritme van het aantal overlevende sporen uit te zetten tegen de bestralingsdosis, uitgedrukt in Gy of kGy (voorheen in krad of Mrad). De D_{10} -waarde van een organisme is in dit geval gedefinieerd als de dosis die nodig is om de oorspronkelijke sporenpopulatie tot 10% te reduceren. Indien een initiële schouder aanwezig is in de overlevings-

curve, wordt het rechte stuk van de curve gebruikt voor de kwantificering. De D_{10} -waarde wordt dus berekend volgens de formule:

$$D_{10}\text{-waarde} = \text{bestralingsdosis} / (\lg N_0 - \lg N),$$

waarbij N_0 en N de aantallen zijn respectievelijk vóór en na de bestraling. Goldblith (1971) geeft naast de decimale reductiewaarden ook de lengte van de 'schouder' op.

De verschillen in stralingsresistentie tussen bacteriesporen zijn niet zo groot als bij de hitteresistentie. De D_{10} -waarden liggen meestal tussen 10 en 30 kGy. Factoren die de stralingsresistentie van bacteriesporen beïnvloeden, zijn: soort, medium, gasatmosfeer, temperatuur en a_w -waarde (Goldblith, 1971). Sporen van het geslacht *Clostridium* zijn iets resistenter tegen straling dan *Bacillus*-sporen. Onder aërobe omstandigheden zijn bacteriesporen een factor 2 à 3 gevoeliger voor ioniserende straling dan onder anaërobe omstandigheden. Bij hogere bestralingstemperaturen (50-65 °C) neemt de stralingsresistentie toe. Verhoging van het watergehalte in de sporen heeft een lagere stralingsresistentie tot gevolg.

Ultraviolette straling

De golflengte van ultraviolette straling ligt tussen 210 en 328 nm. De hoeveelheid stralingsenergie is relatief laag, waardoor ook de sporicide activiteit en het doordringend vermogen laag is. Maximale effecten liggen bij golflengten tussen 240 en 280 nm. Evenals bij inactivering door middel van verhitting en ioniserende straling, is de overlevingscurve, waaruit we de D_{10} -waarden zouden willen aflezen, in veel gevallen niet geheel logaritmisch.

De gevoeligheid van de verschillende groepen micro-organismen voor deze straling is sterk verschillend:

- Gram-negatieve staafjes hebben de grootste gevoeligheid;
- Stafylokokken en streptokokken zijn een factor 5 à 10 minder gevoelig, terwijl bacteriesporen ongeveer 10 maal ongevoeliger zijn;

- schimmelsporen vertonen in de meeste gevallen de hoogste UV-resistentie, ongeveer 50 maal zo hoog dan die van Gram-negatieve bacteriën.

D_{10} -waarden, als regel uitgedrukt in $J\ m^{-2}$, voor verschillende typen micro-organismen zijn niet overvloedig voorhanden. Durban & Grecz (1969) vonden dat *Clostridium botulinum*, stam 33A, een sigmoïde curve heeft, met een schouder van circa $70\ J\ m^{-2}$ en een D_{10} -waarde van ongeveer $300\ J\ m^{-2}$. Een analoog type overlevingscurve ontstaat als *B. megaterium*-sporen worden blootgesteld aan UV-straling. In figuur 7 is het één en ander geïllustreerd.

Naast de voornoemde verschillen tussen de verschillende micro-organismen, is de aanwezigheid van vuil op het bestraalde oppervlak en de temperatuur waarbij bestraald wordt, van groot belang voor de gemeten stralingsgevoeligheid. In bevroren toestand zijn de meeste bacteriën veel gevoeliger voor UV-straling dan bij kamertemperatuur. Binnen het temperatuurgebied van 5 tot $40\ ^\circ C$ heeft de temperatuur geen duidelijke invloed.

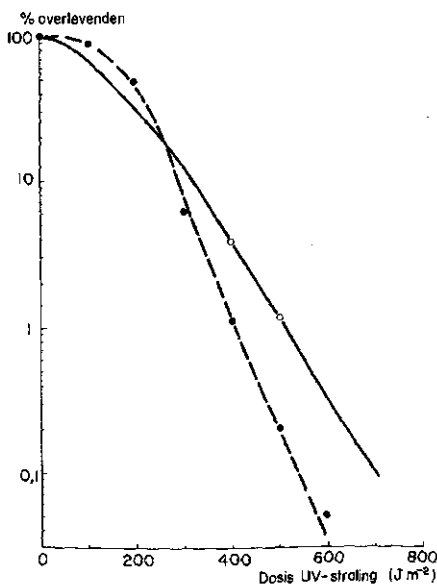


Fig. 7. Resistentie van sporen tegen ultraviolette straling; overlevingscurve van *Clostridium botulinum* 33 A (getrokken lijn) en *Bacillus megaterium* (stippellijn).

Een belangrijk verschijnsel dat in het kader van de UV-inactivering genoemd moet worden, is de *fotoreactivering*. Hieronder verstaat men het verschijnsel dat beschadigingen die door de UV-bestraling zijn veroorzaakt in een biologisch systeem, gedeeltelijk kunnen worden hersteld door bestraling met licht van een grotere golflengte. De fotoreactiveerbaarheid van micro-organismen is sterk afhankelijk van het desbetreffende type micro-organisme en het stadium (bijvoorbeeld vegetatieve cel of spore). Daarbij blijkt dat tijdens de ontwikkeling van UV-resistentie in de spore de fotoreactiveerbaarheid tegelijkertijd verdwijnt (Goldblith, 1971).

CHEMISCHE INACTIVERING VAN BACTERIESPOREN

De resistentie van bacteriesporen tegen verschillende antimicrobiële componenten wordt beschreven met begrippen als 'sporo-statische' en 'sporicide' activiteit van het middel, naar analogie van 'bacteriostatische' en de 'bactericide' activiteit. Bij testen op de *sporostatische activiteit* van een bepaalde component wordt, als regel, de laagste concentratie bepaald waarbij, in een geïnoculeerde testbouillon met oplopende concentraties van de te onderzoeken stof, nog groeiremming optreedt. Deze concentratie heet dan de MIC (minimal inhibitory concentration). Voor bacteriesporen kan, daarenboven, ook de concentratie waarbij geen kieming meer optreedt van belang zijn. Dit laatste wordt meestal via een microscopische methode bepaald (Lund, 1962), waarbij de lichtbrekende eigenschap van een spore het beoordelingscriterium is. Omdat de ontwikkeling van een spore verschillende stadia kent (kieming, ontwikkeling tot vegetatieve cel, vermeerdering van vegetatieve cellen), is in feite de term 'sporostatisch' weinig informatief en zegt in elk geval niets over het werkingsmechanisme.

Voor de vaststelling van de *sporicide activiteit* van een component worden, analoog aan de procedures tijdens hitte-inactivering of bestraling, de te onderzoeken bacteriesporen gedurende bepaalde tijden blootgesteld aan de component (Briggs, 1966). Vervolgens wordt het aantal overlevende sporen geteld. Een belangrijk nadeel van deze techniek is dat de sporicide component

na afloop van de blootstelling moet worden geïnactiveerd of geneutraliseerd.

In de filtratietechniek (Busta & Speck, 1965) worden de sporen in contact gebracht met het sporicide agens. Na afloop van de contacttijd wordt het gehele mengsel gefiltreerd door een membraanfilter. Na wassen van het filter in zijn houder (verwijdering van de resten van de sporicide agens) worden de overlevende sporen geteld door het filter op een geschikt telmedium te incuberen. Het sporicide effect van een bepaalde handeling wordt veelal aangegeven als het aantal decimale reducties dat door de desbetreffende behandeling is gerealiseerd.

Waterstofperoxyde

Waterstofperoxyde (H_2O_2) is een sporicide component die reeds rond 1920 werd toegepast bij de sterilisatie van onder andere melkleidingen. Sindsdien is de component intensief onderzocht op zijn antimicrobiële eigenschappen en, mede als resultaat van die onderzoeken, op uitgebreide schaal toegepast voor sterilisatie van verpakkingsmateriaal in aseptische verpakkingsmachines.

De sporicide-activiteit van H_2O_2 blijkt des te groter naarmate de temperatuur tijdens de behandeling hoger, de concentratie hoger en de contacttijd langer is (Ito et al., 1973; von Bockelmann & von Bockelmann, 1972; Swartling & Lindgren, 1968; Toledo et al., 1973; Cerny, 1976). Ook de pH is van invloed, waarbij de inactivering door H_2O_2 sneller is bij lagere pH-waarden.

In de meeste gevallen kunnen decimale reductiewaarden berekend worden uit de overlevingscurven. Ook bij H_2O_2 -inactivering wordt vaak, zoals bij ioniserende straling, een initiële 'lag-fase' in de inactivering aangetroffen. Een voorbeeld van een overlevingscurve is gegeven in figuur 8. Een recent overzicht van de inactiverende werking van H_2O_2 op voornamelijk *Bacillus subtilis*-sporen wordt gegeven door Cerny (1976). Hij kwam tot de volgende conclusies:

- De met H_2O_2 behandelde *B. subtilis*-sporen hebben een betere recovery na incubatie bij 30 °C dan bij 37 °C; bij onbehandelde sporen is dit effect niet aanwezig.

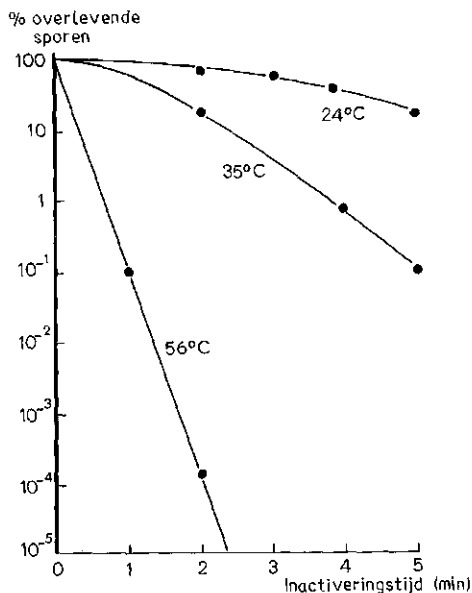


Fig. 8. Effect van de temperatuur, op de inactivering van sporen van *Bacillus subtilis* met 25,8% waterstofperoxyde, gebaseerd op gegevens van Toledo et al. (1973).

- De inactiveringssnelheid van H_2O_2 blijkt, na een concentratieverhoging van bijvoorbeeld 100 g l^{-1} tot $200 \text{ à } 250 \text{ g l}^{-1}$ ongeveer te verdubbelen. Bij een waterstofperoxydeconcentratie boven 400 g l^{-1} is dat effect veel minder sterk. Een concentratie van $400 \text{ à } 500 \text{ g l}^{-1}$ lijkt, met betrekking tot die inactiveringssnelheid, optimaal.
- De afhankelijkheid van de inactiverende werking van H_2O_2 van de temperatuur van de H_2O_2 -oplossing kan worden uitgedrukt als de z-waarde of D_{10} -waarde. (Verschillende andere auteurs, waaronder Toledo, Swartling en ook Cerny maken melding van z-waarden voor *B. subtilis* van $35 \text{ à } 50 \text{ }^\circ\text{C}$).
- Een voor de meeste aseptische verpakkingssystemen voldoende snelle inactivering (namelijk binnen enkele seconden) is slechts dan voldoende verzekerd als de H_2O_2 -concentratie minimaal 300 g l^{-1} is en de temperatuur tijdens die inactivering $80\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$.

De verschillende typen bacteriesporen vertonen grote variaties in resistentie tegen H_2O_2 . Daarbij komt het verschijnsel dat *B. stearothermophilus* bij $20 \text{ }^\circ\text{C}$ een hogere resistentie heeft

den vergroot door verhoging van de concentratie, de temperatuur en de pH.

Hoewel nog veelvuldig toegepast voor desinfectiedoeleinden en voor sterilisatie van bedrijfsruimten, is *formaldehyde* minder effectief als sporicide agens dan *glutaaraldehyde* (Rubbo et al., 1967; Trujillo & David, 1972). De *D*-waarden van sporen zijn, indien blootgesteld aan *formaldehyde*, ongeveer 10 maal zo hoog als bij inwerking van *glutaaraldehyde*. Ook voor *formaldehyde* blijkt dat verhoging van temperatuur en concentratie de effectiviteit aanzienlijk doet toenemen.

Ethyleenoxyde

Ethyleenoxyde, waarvan de structuurformule is:

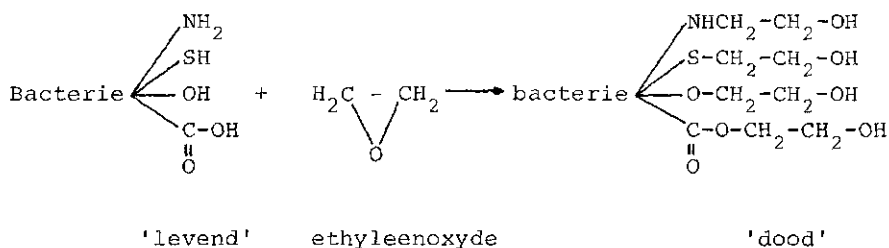


wordt algemeen toegepast voor de sterilisatie van medische apparatuur, zoals slangen, wegwerpspuiten en dialyse-apparatuur. Daarnaast vindt het toepassing bij de ontsmetting van kruiden en specerijen. Voor de industriële toepassing van ethyleenoxyde worden de te steriliseren produkten of apparaten, in karton, papier of kunststof verpakt, in afgesloten ruimtes behandeld met het gas. Mengsels van lucht en ethyleenoxyde zijn explosief, indien het ethyleenoxyde voorkomt in concentraties van 3 tot 80 volumeprocenten. Menging met koolzuurgas of freon doet dit explosiegevaar teniet.

Ter verwijdering van zuurstof wordt de sterilisatieruimte vooraf geëvacueerd, waarna ethyleenoxyde toegelaten wordt. Na afloop wordt afwisselend enkele keren geëvacueerd en weer belucht met het doel resten ethyleenoxyde uit het gesteriliseerde materiaal te verwijderen. Een probleem hierbij is dat ethyleenoxyde de neiging heeft zich aan het te steriliseren materiaal te hechten. Deze sorptie kan fysisch van aard zijn of van chemische aard. In dit laatste geval treedt er geen desorptie, maar een veelal irreversibele chemische reactie op tussen ethyleenoxyde

en het te steriliseren materiaal. Vooral materialen met weekmakers, zoals het polyvinylchloride met zijn ftaalzure ester, nemen veel ethyleenoxyde op, waarbij vaak chemische sorptieverschijnselen kunnen worden waargenomen. Een goed overzicht over de werking van ethyleenoxyde, de toepassing en de belangrijkste factoren die de werking en toepasbaarheid beïnvloeden, is gegeven door Driessen & Van Duin (1975).

Ethyleenoxyde heeft een alkylerende werking op zeer veel essentiële, chemische componenten van de cel, waaronder DNA, aminozuren en eiwitten (Kelsey, 1967; Phillips, 1952, Kereluk et al., 1970). Met name thiol-, amino-, carboxyl-, hydroxyl- en fenolgroepen zijn zeer gevoelig voor dit soort alkylerende stoffen. Schematisch kan dat als volgt worden weergegeven:



De inactiveringssnelheden die gevonden worden bij ethyleenoxyde-behandelingen van sporen, en die ook nu mogen worden uitgedrukt in D -waarden, blijken afhankelijk te zijn van de volgende factoren:

- De ethyleenoxyde-concentratie in het gebruikte gasmengsel. Phillips (1949) vond voor *Bacillus globigii* D -waarden van 7,2 uur bij 22 mg l^{-1} en van 0,35 uur voor 884 mg l^{-1} , beide bij 25°C .
- De temperatuur tijdens de behandeling. Bij elke temperatuurstijging van 10°C neemt de inactiveringssnelheid toe met een factor 2-3 (Phillips, 1949). Later onderzoek (Ernst & Shull, 1962) toonde aan dat er in feite twee verschillende Q_{10} -waarden zijn: indien de tijdsduur die nodig is om een bepaalde inactivering te krijgen wordt uitgezet tegen de temperatuur, vertoont de zo verkregen grafiek een knik. Dit verschijnsel is daaruit te verklaren dat in eerste instantie absorptie en diffusie van

het gas een beperkende invloed hebben.

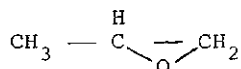
- Het type sporevormer. Freeman & Barwell (1960) vonden dat sporen van *Bacillus stearothermophilus* een lagere resistentie tegen ethyleenoxyde hadden dan een aantal vegetatieve bacteriën. Sporen van *Bacillus subtilis* var. *niger* hebben de hoogste ethyleen-oxyde-resistentie, circa 5 minuten bij een concentratie van 500 mg l^{-1} , een relatieve vochtigheid van 40% en een temperatuur van 54°C (Kereluk et al., 1970).

- Relatieve vochtigheid. De hoogste inactiveringssnelheden voor ethyleenoxyde worden gevonden bij relatieve vochtigheden van 30-40%. Zowel bij de hogere als de lagere relatieve vochtigheids-waarden verloopt de inactivering minder snel (Gilbert et al., 1964).

- Het dragermateriaal. Indien sporen gedroogd worden op harde dragermaterialen, blijkt hun ethyleenoxyde-resistentie vervolgens hoger te zijn dan na droging op zachte ondergrond, zoals katoenen lapjes. Poeder, stofdeeltjes, vet en dergelijke hebben een beschermende werking.

Propyleenoxyde

Propyleenoxyde heeft de volgende structuur:



Hoewel het minder effectief is dan ethyleenoxyde, wordt ook propyleenoxyde toegepast voor ontsmettingsdoeleinden. Bruch & Koesterer (1961) vonden voor *Bacillus globigii*-sporen, indien blootgesteld aan een propyleenoxydeconcentratie van 410 mg l^{-1} , een relatieve vochtigheid van 80-90% en een temperatuur van $36-38^\circ\text{C}$, D_{10} -waarden van 144-216 minuten. Daarbij werd ook vastgesteld dat de D_{10} -waarde ongeveer gehalveerd wordt als de concentratie wordt verdubbeld. Verder bleek dat toename van de relatieve vochtigheid het letale effect van propyleenoxyde verkleint (Himmelfarb et al., 1962).

Andere chemische verbindingen

De verbindingen waterstofperoxyde, glutaaraldehyde en formaldehyde zijn slechts voorbeelden van sporicide stoffen die kunnen worden toegepast. Bekende voorbeelden van andere sporicide componenten zijn:

- antibiotica, zoals nisine (Campbell & Sniff, 1959) en subtiline;
- alcoholen;
- kwikverbindingen en halogenen;
- quarternaire ammoniumverbindingen;
- loog en zuur.

Een overzicht van het werkingsspectrum van dit soort verbindingen wordt gegeven door Russell (1971).

SLOTOPMERKING

In het voorafgaande kon slechts een beperkt overzicht worden gegeven van datgene wat bekend is over de inactivering van bacteriesporen. De verscheidenheid in sporicide en sporostatische behandelingen is dermate groot dat uitputtende bespreking onmogelijk was.

Voor meer details over de behandelende onderwerpen kan verwezen worden naar de geciteerde literatuur; daarnaast kan het handboek 'Inhibition and destruction of the microbial cell' (Hugo, 1971) in veel gevallen een goede hulp zijn om enigszins een overzicht te krijgen over de bestaande gegevens.

Het bepalen van sporevormende bacteriën in voedingsmiddelen

M.J.M. Michels, Unilever Research Duiven, Zevenaar

INLEIDING

Sporevormende bacteriën worden volgens de 8ste editie van Bergey's 'Manual of Determinative Bacteriology' (1974) alle ingedeeld in de familie van de Bacillaceae: endosporevormende staafjes en kokken. Deze familie is op basis van celvorm, zuurstofbehoefte, katalasereactie en sulfaatreductie (tabel 1) onderverdeeld in 5 geslachten: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* en *Sporosarcina*.

Het geslacht *Bacillus* (= staafje) wordt gevormd door strikt aërobe of facultatief anaërobe, meestal beweeglijke, Gram-positieve, Gram-variabele of Gram-negatieve, meestal katalase-positieve, sporevormende staafjes. Tot dit geslacht behoren volgens Bergey's Manual (1974) 48 soorten, onderverdeeld in 22 welomschreven, goed bekende en 26 minder goed bekende soorten. Enkele van de bekendste *Bacillus*-soorten zijn *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. circulans*, *B. coagulans* en *B. stearothermophilus*. Voor identificatie van *Bacillus*-soorten wordt verwezen naar Bergey's Manual (1974), 'Aerobic Spore-forming Bacteria' van Smith et al. (1952), 'The Genus *Bacillus*'

Tabel 1. Indeling van de geslachten binnen de familie van de Bacillaceae volgens Bergey's 'Manual of Determinative Bacteriology', 8ste editie (1974).

Geslacht	Celvorm	Zuurstofbehoefte	Overige kenmerken
1. <i>Bacillus</i>	staafje	aëroob of facultatief anaëroob	katalase-positief
2. <i>Sporolactobacillus</i>	staafje	microaërofiel	katalase-negatief
3. <i>Clostridium</i>	staafje	anaëroob	geen reductie van sulfaat tot sulfide
4. <i>Desulfotomaculum</i>	staafje	anaëroob	reductie van sulfaat tot sulfide
5. <i>Sporosarcina</i>	bol	aëroob	katalase-positief

van Gordon et al. (1973) en 'The Genus *Bacillus*: Aids to the Identification of its Species' door Wolf & Barker (1968).

Het geslacht *Sporolactobacillus* - spore(vormende) lactobacil - kent maar één vertegenwoordiger, *S. inulinus*, een micro-aërofiele, beweeglijke, Gram-positieve, katalase-negatieve, melkzuurvormende staafvormige sporevormende bacterie. Omdat deze bacterie alleen in sporevorming en beweeglijkheid afwijkt van de familie der *Lactobacillaceae* en evenals de *Clostridium*-soorten katalase-negatief is, werd *Sporolactobacillus* door Kitahara & Suzuki (1963) beschreven als een tussenvorm tussen *Lactobacillus* en *Clostridium*. Latere gegevens (Suzuki & Kitahara, 1964) hebben echter duidelijke verschillen in DNA-samenstelling aangetoond tussen *Sporolactobacillus* en *Clostridium*, terwijl er wat celwandsamenstelling betreft juist overeenkomst met *Bacillus* vastgesteld is (Kandler, 1967).

Het geslacht *Clostridium* (= weefspoeltje) bestaat uit strikt anaërobe of soms ook aërotolerante, meestal beweeglijke, meestal Gram-positieve, katalase-negatieve, sporevormende staafjes, waarbij de spore gewoonlijk een opzwellling van de cel veroorzaakt. De in Bergey's Manual (1974) genoemde 61 *Clostridium*-soorten worden op basis van sporeligging (terminaal of subterminaal), hydrolyse van gelatine en bijzondere voedingseisen onderverdeeld in 5 groepen. De in de levensmiddelenmicrobiologie bekendste *Clostridium*-soorten zijn *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. botulinum*, *C. perfringens* en *C. thermosaccharolyticum*. Identificatie van geïsoleerde *Clostridium*-soorten kan plaatsvinden aan de hand van tabellen met biochemische karakteristieken uit Bergey's Manual (1974).

Tot het geslacht *Desulfotomaculum* - zwavelreducerende worst- (vormige bacterie) - behoren strikt anaërobe, beweeglijke, Gram-negatieve, sporevormende, rechte of gebogen staafjes, die sulfaat, sulfiet en reduceerbare zwavelverbindingen tot zwavelwaterstof reduceren. Het geslacht *Desulfotomaculum* kent 3 soorten (Campbell & Postgate, 1965) met als bekendste vertegenwoordiger *D. nigrificans*, die voorheen als *Clostridium nigrificans* bekend stond.

Het geslacht *Sporosarcina* - spore(vormende) sarcina - bestaat uit strikt aërobe, beweeglijke of onbeweeglijke, Gram-positieve,

katalase-positieve, sporevormende kokken, die voorkomen in pakketjes van 2, 4 of 8 cellen. Het geslacht kent maar één soort, *S. ureae*, en is een tussenvorm tussen de geslachten *Micrococcus* en *Bacillus*, waarbij *S. ureae* biochemisch veel op *B. pasteurii* lijkt (MacDonald & MacDonald, 1962).

Volgens het uitstekende overzicht van Slepecky (1972), 'Ecology of Bacterial Sporeformers', komen van de genoemde vijf geslachten van sporevormers in de natuur vooral veel *Bacillus*- en *Clostridium*-soorten voor. In het volgende zal de aandacht daarom juist op deze sporevormers gericht zijn, waarbij de overige geslachten echter niet onbesproken blijven. Omdat bovendien in de levensmiddelenmicrobiologie veelal de sporen van sporevormende bacteriën procesbepalend zijn, willen we ons voornamelijk richten op het tellen van deze sporen en minder op het bepalen van vegetatieve cellen van deze sporevormende bacteriën. Wel wordt het bepalen van beide verschijningsvormen beschreven voor de voedselvergiftiging veroorzakende sporevormers *Clostridium perfringens* en *Bacillus cereus*.

BEPERKINGEN BIJ HET BEPALEN VAN SPOREVORMENDE BACTERIËN

Sporevormende bacteriën kunnen dermate van elkaar verschillen in temperatuuroptimum (psychrofiel, mesofiel, thermofiel), zuurstofbehoefte (aëroob, microaërofiel, anaëroob) en voedingseisen (pantotheenzuur voor *B. pantothenicus*, ammonia voor *B. pasteurii*, reduceerbare zwavelverbindingen voor *D. nigrificans*) dat het hierdoor van meet af aan onmogelijk is alle sporevormende bacteriën via één universele methode te bepalen. De logische consequentie hiervan is dat met de gebruikelijke methoden maar een beperkt gedeelte van de aanwezige sporevormers bepaald zal worden. Het bestaan van een dergelijke beperking telt voor de levensmiddelenmicrobioloog echter niet te zeer, omdat deze in het algemeen niet alle sporevormende bacteriën zal willen bepalen, maar zich zal willen beperken tot die sporevormers die in een bepaalde situatie van belang zijn. Voor een gepasteuriseerd produkt, zoals tomatenpuree in blik met een pH van 4,2-4,5, zal de houdbaarheid vooral bepaald worden door *B. coagulans*-sporen en is daarom het bepalen van niet-zuurtolerante sporevormers

voor de houdbaarheid niet van belang. Dit en enkele andere voorbeelden zijn samengevat in tabel 2, die laat zien dat in elke situatie maar een bepaalde categorie sporevormers van belang is.

Bij elke analyse zal men zich dus vooraf moeten afvragen welke sporevormers in de gegeven situatie van belang zijn en zal men die condities moeten kiezen die voor het bepalen van deze sporevormers optimaal zijn. Hierdoor wordt het nadeel dat niet zo maar alle sporevormers geteld kunnen worden eerder een voordeel, omdat door een weloverdachte keuze van de bepalingsmethode de kans toeneemt dat de juiste sporen bepaald worden en het verzamelen van onbruikbare gegevens vermeden wordt. Zo zal men voor grondstoffen voor te steriliseren produkten niet moeten kijken naar de totale sporenbelasting van deze ingrediënten, maar zal men zich moeten richten op het bepalen van de werkelijk thermoresistente sporen, bijvoorbeeld de groep sporen die 20 min bij 100 °C overleeft.

Van oudsher heeft men bij het bepalen van bacteriesporen vooraf een hittebehandeling toegepast om storende niet-sporevormers te elimineren. Evans & Curran (1943) merkten daarbij op dat sporen van mesofiele *Bacillus*-soorten na een hittebehandeling sneller ontkiemden, hoewel hiermee geen hogere tellingen verkregen werden. Voor sporen van thermotolerante en thermofiele bacteriesoorten bleek echter een hittebehandeling vooraf te resulteren in veel hogere tellingen (Curran & Evans, 1945). Zij constateerden voor een thermotolerante *B. subtilis*-stam (nr. 4149) een toename van het aantal kolonies met een factor drie na verhitting van de sporen gedurende 10 min bij 95 °C. Voor een andere stam (nr. 154) was de toename ruim een factor 20. Sutton et al. (1971) vonden voor faeces na verhitting gedurende 10 min

Tabel 2. Voorbeelden van de soort sporevormende bacteriën die voor de houdbaarheid van enkele categorieën levensmiddelen bepalend kunnen zijn.

Type levensmiddel	Type sporevormende bacterie
Zure produkten (pH < 4,6)	zuurtolerant
Koudbewaarde, gepasteuriseerde produkten	psychotroof
Tropenconserven	thermofiel
Kaas	lactaatvergistende <i>Clostridium</i> -soorten

bij 80 °C aantallen *C. perfringens* die zelfs meer dan 1000 maal hoger waren dan die bepaald zonder verhitting. Intussen weten we dat in voedingsmiddelen voorkomende sporen vaak in een 'rust-toestand' verkeren (Engels: dormant), dat wil zeggen dat deze sporen niet ontkiemen onder ogenschijnlijk gunstige condities. Om deze rustende sporen in vegetatieve cellen te doen overgaan moeten de volgende fasen doorlopen worden: (1) activering van de spore, (2) kieming van de spore, (3) uitgroei van de gekiemde spore tot een vegetatieve cel.

Een goed overzicht over activering wordt gegeven door Keynan en Evenchik (1969). Van de door hen genoemde mogelijkheden tot activering van de spore wordt de hitte-activering in de levensmiddelenmicrobiologie het meest toegepast. De voor activering vereiste warmtebehandeling is volgens deze auteurs sterk afhankelijk van de soort sporevormer en kan variëren van een paar minuten bij 60 °C (voor *B. megaterium*) tot een verhitting bij 105-115 °C (voor *B. stearothermophilus*).

Ook binnen één soort sporevormer kunnen grote verschillen voorkomen. Zo isoleerde Ridgway (1958) uit gesteriliseerde melk een aantal *B. subtilis*-stammen die qua hitte-activering in 3 typen ingedeeld konden worden. Bij type A namen de sporetellingen nog toe na een voorafgaande verhitting van de sporen van 30 min bij 100 °C. Bij type C namen de sporetellingen juist snel af door verhitting bij 100 °C en bij type B was er nauwelijks verschil in tellingen na verhittingen van 35 min bij 63,5 °C en 30 min bij 100 °C. Figuur 1 geeft een beeld van deze resultaten.

Het mooiste onderzoek naar hitte-activering is misschien wel dat van Busta & Ordal (1964), die de hitte-activering bestudeerden van *B. subtilis*-sporen bij 5-94 °C. Na correctie voor hitte-activering tijdens de incubatie van de telplaten en voor inactivering tijdens de verhitting bleek dat de activering bij elke temperatuur optreedt, zij het dan dat bij lage temperatuur langere tijden nodig zijn. Uit hun resultaten kan bijvoorbeeld afgelezen worden dat één jaar bewaren van de sporen bij 5 °C dezelfde activering (40%) geeft als 9-10 dagen bij 30 °C, 33 uur bij 37 °C of 10 min bij 74 °C. Hieruit blijkt dat sporen ook tijdens de incubatie nog geactiveerd kunnen worden, al zal dat wel vragen om een wat langere incubatietijd.

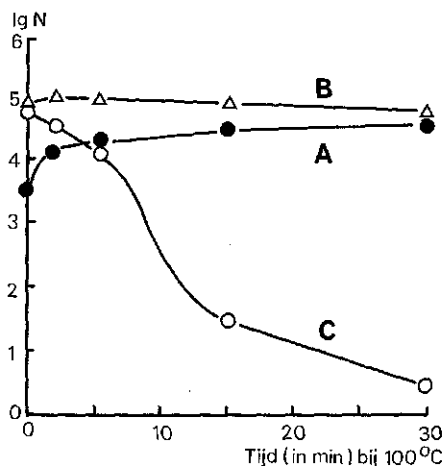


Fig. 1. Effect van verhitting op de sporetellingen van drie typen *Bacillus subtilis* (type A, B, C). De verhitting op $t = 0$ min was 35 min bij $63,5^{\circ}\text{C}$. Bron: Ridgway (1958).

Twee factoren maken het vaststellen van de juiste hittebehandeling van een te onderzoeken monster soms nog extra gecompliceerd. Eén factor is dat door de toegepaste hittebehandeling sommige van de aanwezige sporen gedood kunnen worden. Dit kan bijvoorbeeld gebeuren bij weinig thermoresistente sporen, maar ook bij thermoresistente sporen die een zware activeringsbehandeling vragen. De tweede factor is dat *B. stearothermophilus*-sporen door een suboptimale hittebehandeling (enkele minuten bij 80 tot 100°C in plaats van 115°C) extra dormant kunnen worden, waardoor te lage tellingen verkregen worden (Keynan & Evenchik, 1969).

Na het voorgaande zal het niet meer verbazen dat in de literatuur voor het tellen van sporen in levensmiddelen verschillende verhittingscondities vermeld worden en dat het eigenlijk onmogelijk is condities te formuleren die in elke situatie bruikbaar zijn. Feitelijk zou men voor elk nieuw onderzoek meerdere tijd-temperatuurcombinaties moeten toepassen om zo de beste activeringsconditie vast te stellen. In de dagelijkse praktijk is dat veelal te omslachtig en worden daarom pasteurisatie-activeringscondities gebruikt die niet eerst getest zijn. De hierna te noemen pasteurisatiecondities zijn in feite voorbeelden van zulke veel gebruikte tijd-temperatuurcombinaties; het zal duidelijk zijn dat deze maar een beperkte geldigheid hebben.

Een alternatief voor optimale, van geval tot geval verschillende activeringsomstandigheden zou zijn het gebruik van standaardverhittingscondities, wat, met al zijn beperkingen, zou kunnen leiden tot meer vergelijkbare resultaten tussen microbiologen onderling. De ISO (International Organisation for Standardization) werkt wel aan standaardmethoden voor het tellen van aërobe en anaërobe sporevormende bacteriën, maar het zal nog wel enige tijd duren voordat deze methoden uitgewerkt zijn in een standaardvoorschrift. Totdat deze ISO-methoden beschikbaar zijn, zal men er goed aan doen bij de vermelding van sporetellingen tevens aan te geven welke pasteurisatie-hitteactiveringsconditie men toegepast heeft.

VOORBEWERKING EN VERHITTING VAN HET MONSTER BIJ SPORETELLINGEN

Niet-vloeibare monsters worden veelal één op tien verdund in pepton/zout-verdunningsvloeistof [pepton (1 g l^{-1})/NaCl ($8,5 \text{ g l}^{-1}$)] en gehomogeniseerd met een Stomacher, mixer of Ultra-Turrax. Vloeibare monsters worden dikwijls in onverdunde toestand onderzocht, waarbij homogenisatie echter wel nodig kan zijn, bijvoorbeeld bij melk, om de sporen goed over de vloeistof te verdelen. Bij produkten met een lage pH verdient het aanbeveling de pH van het gehomogeniseerde monster met steriele loog bij te stellen op 6,5-7,0 om een ongewenste pH-daling van het telmedium te voorkomen (dit is natuurlijk niet nodig wanneer men voor deze produkten juist een voedingsbodem met een lagere pH wil toepassen, om daarna de zuurtolerante sporevormers te bepalen). De activering van de in het gehomogeniseerde monster aanwezige sporen kan goed uitgevoerd worden door 10 ml hiervan in een steriele schroefdopbuis te pipetteren zonder daarbij de wand van de buis met de pipet te raken. Aangezien het meestal de bedoeling is tevens alle vegetatieve cellen te doden, is het nodig het gedeelte van de buis boven het vloeistofniveau goed te flamberen, de schroefdop te bevestigen en de gesloten buis gedurende de gewenste tijd in een waterbad van de juiste temperatuur te plaatsen. Het niveau van de vloeistof in de buis moet hierbij 2 cm onder het niveau van het waterbad staan.

Voor temperaturen boven 100°C kan de verhitting uitgevoerd

worden in een glycerolbad of in een 'pressure cooker'. Bij verhittingstijden van 15 minuten en meer zal men bij gebruik van een water- of glycerolbad de opwarmingstijd van circa 2 minuten wel mogen verwaarlozen. Bij kortere verhittingstijden verdient het aanbeveling met een thermometer of thermokoppel het werkelijke temperatuurverloop van het monster te bepalen, waarbij men erop bedacht moet zijn dat in de buis een temperatuurgradiënt kan ontstaan.

AANTONEN VAN SPOREVORMENDE BACTERIËN IN VERHITTE VOEDINGSMIDDELEN

Hoewel het volgende voornamelijk zal handelen over het bepalen van bacteriesporen in voedingsmiddelen, kan het toch ook vereist zijn vast te stellen of in een verhit produkt sporevormers gegroeid zijn. Wil men nagaan of sporevormende bacteriën in een produkt zijn gegroeid of dat een produkt erdoor bedorven is, dan dient men te bedenken dat veel sporevormers in produkten niet of slechts in geringe mate tot sporevorming komen. Het is daarom onverantwoord om teneinde dit te kunnen aantonen het produkt te verhitten, bijvoorbeeld 10 minuten bij 80 of 85 °C, met de bedoeling daarna de sporen van de sporevormende bacteriën te tellen. Vaak zal men dan niets vinden, terwijl het produkt toch door sporevormende bacteriën bedorven was.

Het is daarom nodig eerst de eventueel aanwezige bacteriën te kweken in verdunningen van het produkt in een telplaat of een vloeibaar medium, zonder voorafgaande verhitting, en daarna na te gaan of de bacteriën die zich ontwikkeld hebben, sporevormers zijn. Men brengt daartoe reïnculturen van deze bacteriën in of op een medium waarvan bekend is of verwacht mag worden dat het sporevormers tot sporulering brengt. Wat betreft aërobe sporevormers kan meestal goede sporulering verkregen worden met Nutrient Agar van Oxoid. Men kan, nadat koloniën enkele dagen op platen met deze voedingsbodem gegroeid zijn, de sporen meestal wel met behulp van een microscopisch preparaat waarnemen, waarbij het overbodig is een speciale sporenkleuring toe te paasen, omdat de sporen als regel goed te zien zijn, indien de eenvoudige negatieve kleuring met nigrosine wordt toegepast.

Vaak is het maken van een reïncultuur niet nodig en neemt

men al sporen in het microscopisch preparaat waar, indien men een uitstrijkje van een weinig produkt of verdunningen van het produkt bebroedt op een sporulering bevorderende voedingsbodem. Het kan zijn dat er bij de poging om sporen te laten vormen toch zo weinig sporulering is opgetreden, dat sporen in het microscopisch preparaat niet te vinden zijn. Dan moet een suspensie of een geringe verdunning van een reïncultuur in een voor de groei van de betreffende bacterie geschikt groeimedium zodanig verhit worden dat de vegetatieve cellen zeker zullen worden gedood, doch eventueel aanwezige sporen overleven. Daarna gaat men na of in het verhitte groeimedium weer groei van dezelfde bacterie optreedt.

BEPALEN VAN *BACILLUS*-SOORTEN

De bepalingencondities voor sporen van psychrofiele, mesofiele en thermofiele *Bacillus*-soorten zijn nogal verschillend en worden daarom apart behandeld. Verder worden enkele media voor *B. cereus* besproken.

Psychrofiele Bacillus-soorten

Bacillus-soorten die zich bij lage temperatuur kunnen vermenigvuldigen komen in hoge aantallen in grond voor en worden ook in voedingsmiddelen aangetroffen (Michels & Visser, 1976). Deze koudetolerante sporevormers staan bekend als psychrofiel of psychrotroof, waarbij voor deze begrippen meerdere definities bekend zijn.

Bacteriën worden volgens een gangbare definitie als psychrofiel beschouwd, wanneer ze in 2 weken bij 0 °C goed zichtbare groei geven. Het woord psychrotroof wordt dikwijls gebruikt voor organismen die bederf kunnen geven van levensmiddelen die onder de gangbare koelcondities bewaard worden. Bij tellingen van psychrotrofe bacteriën wordt daarom meestal gekozen voor incubatie bij 5 of 7 °C.

Psychrofiele/psychrotrofe sporevormers zijn belangrijk voor de houdbaarheid van gepasteuriseerde, niet-nabesmette, koel bewaarde levensmiddelen, zoals gepasteuriseerde melk (Langeveld,

1970; bijdrage van Langeveld in dit boek) en gepasteuriseerde maaltijdcomponenten (Michels & Anema, 1974).

Meestal wordt bij sporetellingen van deze groep sporevormers, die geen erg thermoresistente sporen vormt, gekozen voor een lichte pasteurisatie van 5 of 10 min bij 80 °C. Het telmedium bij uitstek is Trypticase Soy Agar (BBL). De te kiezen incubatietijd en -temperatuur zijn sterk afhankelijk van het doel van het onderzoek. Bij koud bewaarde levensmiddelen worden psychrotrofe sporen wel bepaald met incubaties van 1 week bij 5 °C of 10 dagen bij 7 °C. Wil men selectief alleen de psychrofiele sporen bepalen, dan kan 14 dagen bij 0 °C geïncubeerd worden. Optimale groei van deze koudetolerante *Bacillus*-soorten vindt plaats bij 20 à 25 °C, maar bij 30 °C zullen deze *Bacillus*-soorten zich niet meer alle kunnen vermenigvuldigen. De uitgroei van psychrofiele/psychrotrofe sporevormers in koud bewaarde levensmiddelen zal men daarom niet controleren met incubatie bij 30 °C, maar met 20 °C als incubatietemperatuur, waarbij 2 dagen al voldoende is om goed zichtbare kolonies te geven.

Mesofiele Bacillus-soorten

Voor de pasteurisatie-activering van mesofiele *Bacillus*-sporen wordt in de literatuur een heel scala van verschillende tijd-temperatuurcombinaties vermeld. Een veel gebruikte verhitting is 10 min bij 80 °C, terwijl binnen de ISO 15 min bij 80 °C wel als standaard voorgesteld is. De keuze van een verhittingsconditie kan echter sterk afhangen van het doel van het onderzoek. Wil men bijvoorbeeld alleen thermoresistente sporen tellen dan zal men via een intensievere hittebehandeling selecteren. Voor het tellen van thermoresistente sporen in melk koos Ridgway (1958) bijvoorbeeld condities variërend van 2 min bij 100 °C tot 40 min bij 110 °C. Als bepalmingsmedium wordt veel gebruik gemaakt van Nutrient Agar, Plate Count Agar of ook wel Trypticase Soy Agar, met incubatie gedurende 2-3 dagen bij 30 °C. Men moet zich hierbij bewust zijn dat niet alle mesofiele *Bacillus*-soorten op deze media kunnen groeien.

Een gedetailleerde opgave van de opbrengst op Nutrient Agar van een reeks *Bacillus*-soorten samen met alternatieve media en

ophopingsmethoden vindt men bij Knight & Proom (1950) en Emburger (1970). Van de genoemde 3 media wordt Nutrient Agar ex Oxoid (CM 3) veel gebruikt, omdat op dit medium gemakkelijk sporen gevormd worden, wat als bevestiging van de sporetelling kan dienen. Vergeleken met Plate Count Agar heeft Trypticase Soy Agar naar onze ervaring het voordeel dat hierop minder spreiders voorkomen, die tellingen kunnen bemoeilijken.

Thermofiele Bacillus-soorten (B. stearothermophilus, B. coagulans)

De bekendste groep van thermofiele *Bacillus*-soorten wordt gevormd door de veroorzakers van 'flat sour'-bederf, een type bederf van (bij hoge temperatuur bewaarde) conserven, waarbij wel microbiële verzuring optreedt, maar geen gas gevormd wordt. Tot de 'flat-sour'-sporevormers rekent men de thermofiele *B. stearothermophilus* (groeit bij 55 °C en niet bij 37 °C) en de facultatief thermofiele, ook wel thermotolerant genoemde *B. coagulans*, die zich bij 55 en bij 37 °C kan vermeerderen. Een goed overzicht over deze 'flat-sour'-bacteriën wordt gegeven door Fields (1970).

Voor het tellen van sporen van thermofiele 'flat-sour'-*Bacillus*-soorten wordt meestal een activering toegepast van 20 of 30 min bij 100 °C, hoewel ook wel 5 min bij 100 °C gebruikt wordt (Richmond & Fields, 1966). Als telmedium wordt algemeen Dextrose Trypton Agar gebruikt (bijvoorbeeld Difco B 80), welk medium naast glucose broomkresolpurper als pH-indicator bevat, waardoor na incubatie gedurende 48 uur bij 55 °C de zuurvormende kolonies door een gele hof van de niet-zuurvormende kolonies te onderscheiden zijn. Naast *B. coagulans* en *B. stearothermophilus* komen op dit medium ook andere, facultatief thermofiele sporevormers tot ontwikkeling. Incubatie bij 60 °C maakt de omstandigheden meer selectief voor *B. stearothermophilus* en *B. coagulans*, maar heeft de beperking dat dan niet meer alle *B. coagulans*-stammen geteld worden (Richmond & Fields, 1966). Verdere details over het tellen van 'flat-sour'-thermofielen vindt men bij Maunder (1976).

Wil men speciaal de zuurtolerante *B. coagulans* tellen, bijvoorbeeld bij onderzoek van tomatenprodukten, dan wordt Thermoacidurans Agar (Difco B 303) gebruikt. Op dit medium met een pH

van 5,0 groeit *B. stearothermophilus* niet, omdat deze sporevormer zich niet bij deze pH kan vermeerderen. Voor *B. coagulans* wordt dit medium 2 dagen bij 55 °C geïncubeerd. Als activeringsconditie voor de sporen van *B. coagulans* vermeldt Speck (1976a) een hittebehandeling (exclusief opwarmtijd) van 5 min bij 88 °C.

Bacillus cereus

Naast de eerder genoemde *Bacillus*-soorten verdient *B. cereus* nog vermelding als een veel voorkomende aërobe sporevormer die voedselvergiftiging kan veroorzaken. Een goed overzicht over *B. cereus* vindt men bij Goepfert et al. (1972) en bij Gilbert & Taylor (1976). Het *B. cereus*-enterotoxine is recentelijk nader beschreven door Spira & Goepfert (1975). Naast zijn belang als mogelijke veroorzaker van voedselvergiftiging is *B. cereus* ook bekend als veroorzaker van bederf van melk en melkprodukten (Labots & Hup, 1964; bijdrage van Langeveld in dit boek).

Veel media voor het tellen van *B. cereus* maken gebruik van het feit dat de meeste *B. cereus*-stammen lecithinase-positief zijn, waardoor in een medium met eigeel een ondoorschijnende zone rond de kolonie ontstaat. Een bekend *B. cereus*-medium is mannitol-eigeel-phenolrood-agar volgens Mossel et al. (1967), verkrijgbaar als 'Cereus-Selektivagar nach Mossel', Merck 5267. *B. cereus*, die mannitol-negatief is, geeft op dit paarsrode medium na 1 à 2 dagen bij 30 °C droge kolonies met een wijde precipitatie-zone ten gevolge van hydrolyse van lecithine. Andere lecithinase-positieve *Bacillus*-soorten die op dit medium tot ontwikkeling komen, zijn herkenbaar, doordat ze mannitol vergisten en er door het gevormde zuur een kleuromslag van de pH-indicator (phenolrood) van paars naar geel optreedt, waardoor een geel hof rond de kolonie ontstaat. Door de aanwezigheid van 10 mg polymixine-B sulfaat is het medium niet alleen geschikt voor sporetellingen, maar ook voor het bepalen van vegetatieve cellen van *B. cereus*. Een bij de sporetelling goed bruikbare verhittingsconditie is 10 min bij 80 °C (Labots & Hup, 1964; Labots et al., 1965). Daarnaast worden ook wel minder intensieve verhittingen aanbevolen, zoals 15 min bij 70 °C (Goepfert, 1976).

Een beperking van dit medium is dat, wanneer veel andere mannitol-positieve sporevormers aanwezig zijn, de hele plaat geel wordt, waardoor de mannitol-negatieve kolonies niet meer herkenbaar zijn en ook de eigeelreactie moeilijker afleesbaar wordt. Een andere beperking is dat het medium alleen als strijkplaat gebruikt kan worden, waarbij 0,1 ml suspensie opgebracht wordt. Gaat men uit van een 1 op 10 verdund monster dan kan men op deze manier alleen aantallen *B. cereus* groter dan 100 per gram bepalen. Daarom worden er ook wel eenvoudiger *B. cereus*-media gebruikt, waarin alleen de eigeelreactie als middel dient om *B. cereus* te herkennen en die wel als mengplaat toegepast kunnen worden.

Bij onderzoek van melkprodukten blijkt Nutrient Agar (Oxoid CM 3) met 50 ml l^{-1} Oxoid-eigeelemulsie goed te voldoen voor het tellen van *B-cereus*-sporen (Labots et al., 1965). Zelf heb ik bij onderzoek van droge produkten goede ervaringen opgedaan met mengplaten van McClung-agar met 100 ml l^{-1} Oxoid-eigeelemulsie. Deze voedingsbodem was eigenlijk ontwikkeld als strijkplaat-medium met 20 g l^{-1} agar voor lecithinase-positieve *Clostridium*-sporen (McClung & Toabe, 1947), maar voldoet goed als mengplaat voor *B. cereus*, wanneer de agarconcentratie verlaagd wordt van 20 tot 15 g l^{-1} . Deze McClung-agar met 15 g l^{-1} agar wordt onder nr. 10861 geleverd door Merck. Bij incubatie bij 30 °C geeft *B. cereus* op de laatste twee media al na één dag kolonies met een wijde precipitatiezone er omheen en is daardoor wel te onderscheiden van andere lecithinase-positieve *Bacillus*-soorten. De ontstane typische kolonies kunnen als *B. cereus* bevestigd worden op basis van sporeligging en biochemische eigenschappen zoals beschreven door Goepfert (1976).

SPOROLACTOBACILLUS

Sporolactobacillus inulinus is volgens de ontdekkers (Kitahara & Suzuki, 1963) uiterst zeldzaam, en ofschoon deze sporevormer uit kippevoer geïsoleerd werd, neemt men toch aan dat de betekenis voor voedingsmiddelen erg beperkt is. In het volgende worden enkele eigenschappen vermeld die voor een beter begrip van deze sporevormer essentieel zijn.

Sporolactobacillus werd door Kitahara & Suzuki (1963) gekweekt in een medium met glucose (20 g l^{-1}), gistextract (5 g l^{-1}) en pepton (5 g l^{-1}). De optimale groeitemperatuur was 35°C , terwijl er geen groei was binnen 8 dagen bij 10 of 45°C . Jonge cellen bleven alleen beweeglijk als het medium gebufferd was met natriumacetaat of calciumcarbonaat. In het glucose-gist-pepton-medium werden zo weinig sporen gevormd dat deze microscopisch niet waarneembaar waren. Pas in een met calciumcarbonaat gebufferd medium met 10^{-4}M mangaansulfaat werden meer dan 10^6 sporen per ml gevormd. De sporevorming op dit medium was echter niet goed reproduceerbaar en daarom werd later een speciaal sporuleringsmedium ontwikkeld - met onder meer ammoniumsulfaat, calciumcarbonaat en tomatenserum - dat bij incubatie in een CO_2 -atmosfeer bij 37°C leidde tot sporulering van 10% van de aanwezige cellen (Kitahara & Lai, 1967). De ontstane sporen overleefden een temperatuur van 80°C gedurende 10 min nagenoeg ongedeerd, maar 10 min bij 90°C gaf al een reductie van 10^6 tot 10^3 sporen per ml. Op een met calciumcarbonaat gebufferde glucose-gist-pepton-agar worden heel kleine kolonies gevormd, die herkenbaar zijn door een heldere hof rond de kolonie van door melkzuur opgelost calciumcarbonaat.

BEPALEN VAN *CLOSTRIDIUM*-SOORTEN

In deze paragraaf worden enkele methoden en media beschreven voor het bepalen van psychrofiele, mesofiele en thermofiele *Clostridium*-soorten. Het bepalen van *C. perfringens* wordt wel behandeld, maar bij *C. botulinum* wordt alleen verwezen naar de desbetreffende literatuur. Deze laatste beperking is gemaakt, omdat bij op *C. botulinum* gericht onderzoek speciale veiligheidsmaatregelen vereist zijn en het zeker niet aan te bevelen is dit soort onderzoek ter hand te nemen zonder hiervoor eerst opgeleid te zijn. Omdat bij het bepalen van *Clostridium*-soorten in grond of voedingsmiddelen de toevallige isolatie van *C. botulinum* niet uit te sluiten is, dient men in het algemeen zeer voorzichtig te zijn met hieruit verkregen plaat- of vloeistofcultures van onbekende *Clostridium*-sporen. Tevens is na het onderzoek een betrouwbare sterilisatie of desinfectie van de gebruikte materialen en cultures vereist.

Psychrofiele Clostridium-soorten

Psychrofiele *Clostridium*-sporen zijn een tiental jaren geleden voor het eerst door Sinclair & Stokes (1964) geïsoleerd uit monsters zand, modder en rioolslik, na pasteurisatie van de monsters gedurende 15-20 min bij 80 °C en anaërobe ophoping van de *Clostridium*-sporen in Trypticase Soy Broth bij 0 °C. Hoewel bij dit onderzoek in vlees of melk geen psychrofiele *Clostridium*-sporen werden aangetoond, werden deze later toch wel geïsoleerd in een vloeistofcultuur bij 4 °C (Bhadsavle et al., 1972). Van de vier geïsoleerde stammen waren er twee psychrofiel (minimale groeitemperatuur 0 °C), terwijl de andere twee psychrotroof waren, met een minimale groeitemperatuur van 4 °C. Doordat deze koudetolerante *Clostridium*-sporen weinig in voedingsmiddelen schijnen voor te komen zijn er ook geen methoden beschreven voor een directe telling van deze sporen op een selectief of differentieel medium. Voor de bepaling ervan wordt daarom verwezen naar de door genoemde onderzoekers gebruikte ophopingsmethoden. Voor bepalingmethoden voor de hier niet genoemde, maar in voedingsmiddelen soms zeer belangrijke, psychrotrofe *C. botulinum*-typen, zoals type E met een minimale groeitemperatuur van 3,3 °C, wordt verwezen naar de paragraaf over *C. botulinum*.

Mesofiele Clostridium-soorten

De gebruikelijke media voor het bepalen van *Clostridium*-sporen berusten op hun vermogen om sulfiet tot sulfide te reduceren, waarna uit dit sulfide bij aanwezigheid van ijzerionen zwart ijzersulfide gevormd wordt. Hierdoor worden vloeibare media met sulfiet en ijzer door *Clostridium*-sporen zwart gekleurd, terwijl bij agarcultures de *Clostridium*-sporen door een zwarte hof rond de kolonie gekenmerkt worden. Volgens Mossel & de Waart (1968) is deze sulfietreductie - onder aan de *Clostridium*-soort aangepaste condities - voor alle *Clostridium*-soorten aantoonbaar. Bij gebruik van een medium met een vaste samenstelling kunnen ook niet-sulfietreducerende *Clostridium*-soorten aangetroffen worden, zoals *C. pectinovorum* (Gibbs & Freame, 1962) en *C. teta-*

nomorphum en *C. nauseum* (Put & Wybenga, 1961).

In de praktijk gaat men ervan uit dat nagenoeg alle *Clostridium*-soorten sulfiet reduceren en worden de *Clostridium*-soorten bepaald op media met sulfiet en ijzer. Van belang hierbij is nog wel de gebruikte sulfietconcentratie. Gebleken is namelijk (Put & Wybenga, 1961) dat sommige soorten, zoals *C. sporogenes*, sulfietgevoelig zijn en bij te hoge sulfietconcentraties ($1 \text{ g l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) onvoldoende tot ontwikkeling komen, waardoor te lage tellingen verkregen worden. Maar ook bij een goede sulfietconcentratie is de zwartkleuring van het medium door sulfietreductie nog in twee opzichten kritisch (De Waart, 1971):

- de incubatie moet strikt anaëroob plaatsvinden, omdat het enzym sulfietreductase door lage zuurstofconcentraties nog geremd kan worden;
- de glucoseconcentratie van het medium mag niet boven de 1 g l^{-1} liggen, omdat anders uit glucose gevormde zuren reeds geprecipiteerd ijzersulfide kunnen oplossen of storen bij de vorming van voldoende sulfide.

Om sporen van mesofiele *Clostridium*-soorten te tellen worden de te onderzoeken monsters in het algemeen gepasteuriseerd gedurende 30 min bij 75°C (Gibbs & Freame, 1965) of gedurende 10 min bij 80°C (Hobbs et al., 1971). Voor het bepalen van de aantallen sporen kan men gebruik maken van vloeibare media (Most-Probable-Number-Techniek), van agarmedia in dieptecultuur (Miller-Prickett-buizen), of van gietplaten.

a. *Most-Probable-Number-techniek (MPN)*. Omdat *Clostridium* meestal maar in lage aantallen in voedingsmiddelen voorkomt, is een telling via de MPN-methode een veel gebruikte manier, omdat hiermee ook lage aantallen bepaald kunnen worden. Als medium wordt hiervoor Differential Reinforced Clostridial Medium gebruikt, kortweg DRCM genoemd. DRCM is door Gibbs & Freame (1962, 1965) ontwikkeld uit een voor *Clostridium* optimaal medium, Reinforced Clostridial Medium, dat door Hirsch & Grinsted (1954) beschreven was. Sulfietreducerende *Clostridium*-soorten geven zwartkleuring van DRCM door de aanwezigheid in dit medium van natriumsulfiet en ferricitraat (waarbij in plaats van het moeilijk oplosbare ferricitraat beter het goed oplosbare ferriammoniumcitraat gebruikt kan worden). Deze zouten kunnen niet met het medium mee

gesteriliseerd worden, maar worden kort voor gebruik als steriele oplossingen toegevoegd aan het gesteriliseerde basismedium. Omdat *Bacillus*-soorten geen sulfiet reduceren kan men ervan verzekerd zijn dat uitgaande van een gepasteuriseerd monster zwartkleuring van het medium op de aanwezigheid van *Clostridium*-sporen wijst. DRCM wordt voor MPN-tellingen afgevuld in schroefdopflesjes (geheel gevuld) of in cultuurbuizen, die met paraffineolie van de luchtzuurstof afgesloten worden. De incubatietijd is 5-7 dagen bij 30 °C. Van DRCM zijn geen handelsvormen bekend.

b. *Miller-Prickett*-buizen (MP-buizen). Een andere techniek waarbij op eenvoudige wijze de voor *Clostridium*-soorten vereiste anaërobie gerealiseerd kan worden is die waarbij plat-ovale cultuurbuizen (MP-buizen) gebruikt worden, die met agar of slappe agar gevuld worden, waarna de agar met paraffineolie, vet of vaseline van de lucht afgesloten wordt. Deze techniek is onder meer beschreven door Mossel et al. (1956). Voor gebruik in MP-buizen is door Mossel sulfiet-agar ontwikkeld (Mossel et al., 1956; Mossel, 1959), waarbij het in eerste instantie ontwikkelde medium nog te veel sulfiet bevatte, waardoor tegenwoordig alleen sulfiet-agar volgens de latere formulering (Mossel, 1959) toegepast wordt. Dit medium wordt 1-3 dagen bij 30 °C geïncubeerd. Hierbij is het zaak vroegtijdig het aantal zwarte kolonies in de buizen te tellen, omdat anders de gehele buis zwart kan kleuren. Een ander nadeel is dat gasvorming in de agar op kan treden, waardoor de tellingen bemoeilijkt kunnen worden. Ondanks de elegante techniek is het daarom toch een methode met duidelijke beperkingen, vooral wanneer men wat langer wil incuberen, wat bijvoorbeeld bij het bepalen van door hitte beschadigde sporen vereist is. Door Merck wordt een sulfiet-ijzer-agar (art. nr. 10864) op de markt gebracht die erg veel lijkt op de sulfiet-ijzer-agar van Mossel. Ten onrechte staat hierbij vermeld dat het door Merck gevoerde medium door de ISO aanbevolen wordt door het tellen van *Clostridium*-sporen in vlees en vleeswaren; een dergelijke ISO-methode bestaat namelijk nog niet.

c. *Gietplaten*. Sporen van *Clostridium* kunnen ook goed bepaald worden met gietplaten die anaëroob geïncubeerd worden. Als medium hiervoor kan men DRCM kiezen, dat met 15 g l⁻¹ agar omgezet wordt in een vaste voedingsbodem (Gibbs & Freame, 1965). De

platen incubceert men enkele dagen bij 30 °C, waarna de zwarte kolonies geteld worden. De commercieel verkrijgbare voorloper van DRCM - Reinforced Clostridial Agar (RCA) - kan, ook na toevoeging van sulfiet en ijzer, niet als alternatief voor DRCM gebruikt worden, omdat RCA te veel glucose bevat (5 g l⁻¹), waardoor de vorming van ijzersulfide gestoord kan worden en er geen zwarte kolonies ontstaan. Voor het anaëroob incuberen van de platen is er een reeks mogelijkheden, variërend van een chemische zuurstofbinding met alkalische pyrogallol tot een microbiologische zuurstofconsumptie door *Micrococcus albus*. Een overzicht van de diverse methoden vindt men bij Willis (1969). Voor degene die niet dagelijks *Clostridium*-sporen telt, blijkt de gemakkelijkste en betrouwbaarste methode het werken met anaërobe potten te zijn. De platen worden hierbij in een doorzichtige plastic pot geplaatst, waarin tevens een generator geplaatst is die chemicaliën bevat waaruit na toevoeging van water, waterstofgas en kooldioxyde gevormd wordt. De zuurstof in de intussen gesloten pot wordt via een palladium-katalysator door de ontstane waterstof omgezet in water, waardoor anaërobe condities ontstaan. Door het gevormde kooldioxide wordt de groei van enkele soorten *Clostridium* bevorderd. Het bekendste op deze manier werkende commerciële systeem is dat van BBL, dat onder de naam Gaspak 100 Anaerobic System uitgebracht wordt, compleet met pot, H₂/CO₂-generatoren, katalysator en anaëroobindicator. Daarnaast zijn er sinds kort ook H₂/CO₂-generatoren van Oxoid op de markt die voor dit systeem geschikt zijn (Oxoid Gas-Kit). Bij het gebruik van deze potten is het aan te bevelen telkens een nieuwe hoeveelheid katalysator te gebruiken - de palladium-katalysator kan vergiftigd worden met door *Clostridium*-cellen geproduceerd H₂S - of anders in elk geval via een methyleenblauw anaëroobindicator te controleren of anaërobe condities opgetreden zijn. Een punt dat nog van belang kan zijn bij tellingen van *Clostridium*-sporen is dat door hitte sterk beschadigde *Clostridium*-sporen dikwijls niet ontkiemen, wanneer geen lysozym aanwezig is (Adams, 1973; Alderton et al., 1974). Verwacht men dergelijke sporen aan te treffen, dan doet men er goed aan vóór gebruik bijvoorbeeld 5 mg lysozym per liter medium toe te voegen.

De drie hier beschreven methoden voor het tellen van *Clostridium*-sporen hebben elk hun voordelen en nadelen - zie voor een discussie hiervan Mossel et al. (1956) en Gibbs & Freame (1965) - en een keuze wordt meestal gemaakt op basis van persoonlijke voorkeur. Hierbij prefereer ikzelf de gietplaatmethode, die handig werkt en goede resultaten geeft (nauwkeuriger dan MPN-tellingen). Het voordeel van MPN-tellingen dat hiermee lagere aantallen *Clostridium*-sporen geteld kunnen worden, is veelal een schijnvoordeel, omdat zulke lage aantallen (2-10 per gram) maar zelden werkelijk van belang zijn.

Tot slot nog een opmerking over het bepalen van vegetatieve cellen van *Clostridium*. De door Mossel (1959) en Gibbs & Freame (1965) beschreven methoden zijn onder zekere voorwaarden ook voor dit doel geschikt. Nadere details hierover zijn bij de genoemde auteurs te vinden.

Thermofiele Clostridium-soorten (C. thermosaccharolyticum)

De enige in de voedingsmiddelenmicrobiologie belangrijke thermofiele *Clostridium*-soort is *C. thermosaccharolyticum*, die veel gas (H_2 en CO_2) vormt uit zetmeel, suiker en dergelijke, en die bekend staat om zijn zeer thermoresistente sporen. Deze *C. thermosaccharolyticum* vormt niet makkelijk kolonies in agar, komt in ingrediënten maar in lage aantallen voor en wordt daarom meestal met vloeibare media bepaald. Een medium dat door meerdere onderzoekers gebruikt wordt, is Liver Broth (Oxoid CM 77). Het medium wordt anaëroob geïncubeerd door buizen met Liver Broth af te dekken met een laagje agar. Het medium is niet selectief, maar door de agarprop in de buis is gasontwikkeling goed waar te nemen, waardoor *C. thermosaccharolyticum* van andere thermofiele sporevormers (bijvoorbeeld *B. stearothermophilus*) te onderscheiden is. Ter selectie en activering van de sporen wordt het gehomogeniseerde monster meestal 5 à 10 min verhit in kokend water. Bij het onderzoek van ingrediënten wordt 20 g gehomogeniseerd maar nog onverhit monster verdeeld over 6 buizen met Liver Broth, die dan tot 100 °C verhit worden, waarna de buizen vervolgens 3 dagen bij 55 °C geïncubeerd worden.

Voor het tellen van sporensuspensies kan men MPN-tellingen

gebruiken. Een werkvoorschrift voor het onderzoek van ingrediënten vindt men bij Ashton (1976). Naast vloeibare media is er ook wel gewerkt met agarmedia. Attenborough & Scarr (1957) bepaalden *C. thermosaccharolyticum* in suiker via membranen bedekt met RCM-agar, terwijl Langeveld (1967) een *C. thermosaccharolyticum*-stam uit gesteriliseerde chocolademelk telde op Oxoid Nutrient Agar met melk (100 ml l⁻¹).

Clostridium perfringens

Een compleet overzicht over *C. perfringens* als veroorzaker van voedselvergiftiging vindt men bij Walker (1975). In dit overzicht vindt men ook de media die ontwikkeld zijn voor het bepalen van *C. perfringens*. Omdat men bij *C. perfringens* dikwijls juist vegetatieve cellen wil bepalen, worden er hoge eisen gesteld aan de selectiviteit van het medium. Van alle bekende media zijn waarschijnlijk alleen die met D-cycloserine als selectieve component behoorlijk betrouwbaar. Van deze media is Egg-Yolk-Free-Tryptose-Sulfite-Cycloserine-Agar van Hauschild & Hilsheimer (1974) het meest geaccepteerd.

Op dit door cycloserine selectieve en door sulfiet en ijzer differentiële medium is *C. perfringens* herkenbaar, doordat zwarte kolonies gevormd worden. Omdat ook enkele andere *Clostridium*-soorten (bijvoorbeeld *C. bifermentans*) op dit gedurende 20 uur bij 37 °C geïncubeerde medium tot ontwikkeling kunnen komen, is een nadere bevestiging van zwarte kolonies als *C. perfringens* gewenst. Details hierover vindt men bij de eerder genoemde auteurs en in het hoofdstuk over *C. perfringens* van Duncan & Harmon (1976). Recente ervaringen met dit medium zijn beschreven door Harmon (1976), Hauschild et al. (1977), Emswiler et al. (1977) en Orth (1977).

Tryptose-Sulfite-Cycloserine-Agar is niet als zodanig verkrijgbaar, maar het basismedium - zonder cycloserine, sulfiet en ijzer - komt overeen met de door Difco geleverde SFP-agar-base 0811.

Informatie over het *Clostridium botulinum* en het tellen of aantonen van de sporen daarvan vindt men bij Kautter & Lynt (1976) en in recente artikelen van Kautter & Solomon (1977) en Hauschild & Hilsheimer (1977).

BEPALEN VAN DESULFOTOMACULUM

Van de drie soorten binnen het geslacht *Desulfotomaculum* is alleen *D. nigrificans* voor levensmiddelen van belang. *D. nigrificans* (vroeger *C. nigrificans*) is een thermofiele sporevormer met zeer thermoresistente sporen die uit reduceerbare zwavelverbindingen zwavelwaterstofgas vormt en daarom bekend staat als een 'sulfide-stinker' (Speck, 1976b). Doordat het gevormde zwavelwaterstofgas goed oplosbaar is treedt bij *D. nigrificans* geen bombage van de blikken op.

Desulfotomaculum nigrificans

Voor het bepalen van *D. nigrificans*-sporen in ingrediënten, zoals suiker, meel en melkpoeder, zijn door de National Canners Association gedetailleerde methodes uitgewerkt, zoals beschreven door Speck (1976b). In principe wordt hierbij van een gehomogeniseerd monster 20 ml verdeeld over een aantal buizen met een sulfiet-ijzer-agar, waarbij de hitteactivering van de sporen plaats kan vinden door verhitting tot 100 °C van het gehomogeniseerde monster of van de beënte buizen. De buizen met sulfiet-ijzer-agar worden 1-2 dagen bij 55 °C geïncubeerd, waarna *D. nigrificans*-kolonies herkenbaar zijn als gitzwarte bolletjes in de agar. Van deze sulfiet-ijzer-agar zijn twee varianten bekend, namelijk de BBL Sulfite Agar nr. 11680, met 1 g l⁻¹ natriumsulfiet en een spijker als ijzerbron, en de Oxoid Iron Sulphite Agar CM 79, met 0,5 g l⁻¹ natriumsulfiet en ijzercitraat als ijzerbron. De Oxoid-agar bevat maar 0,5 g l⁻¹ sulfiet, omdat een hoger gehalte groeiremmend zou werken. De genoemde media laten de groei toe van *C. thermosaccharolyticum*, die ook zwartkleuring kan geven door reductie van sulfiet. Doordat deze sporevormer veel

gas produceert scheurt daarbij de agar, waardoor de gehele buis zwart wordt en de groei van *C. thermosaccharolyticum* in dit medium daarmee van *D. nigrificans* te onderscheiden is.

Als alternatief voor de voor *D. nigrificans* niet specifieke sulfiet-agar zou men misschien beter gebruik kunnen maken van de door Lin & Lin (1970) ontwikkelde Beef-Extract-Trypton-Iron-Agar (BETI-agar). Deze agar bevat geen sulfiet, maar sulfaat als zwavelbron, waardoor alleen sulfaatreducerende bacteriën zwartkleuring rond de kolonies geven. BETI-agar kan toegepast worden in buizen of volgens Lin & Lin zelfs in petrischalen die aëroob geïncubeerd worden, wanneer een deklaag van 10 mm BETI-agar (met 20 g l⁻¹ agar) aangebracht wordt. Een vereiste bij deze laatste procedure is waarschijnlijk wel dat glazen petrischalen gebruikt worden, omdat plastic petrischalen zuurstof-doorlatend zijn.

SPOROSARCINA

Het geslacht *sporosarcina* kent maar één vertegenwoordiger, namelijk *S. ureae* (Bergey, 1974), zo genoemd omdat deze sporevormende *Sarcina ureum* kan omzetten, waarbij ammoniumcarbonaat gevormd wordt. *S. ureae* komt voor in grond en werd daaruit na een pasteurisatie bij 80 °C door Gibson (1935) geïsoleerd door directe tellingen op een agar met (100 g l⁻¹) ureum, die bij 22 °C geïncubeerd werd. Naast *S. ureae* komen ook andere ureum-hydrolyserende bacteriën op dit medium tot ontwikkeling, die echter microscopisch makkelijk van *sporosarcina* te onderscheiden zullen zijn (*sporosarcina* is kok-vormig en beweeglijk!). Gibson (1935) telde rond de 10 000 cellen van *S. ureae* per gram vruchtbare grond, waardoor *S. ureae* ook in met grond besmette levensmiddelen zoals groente verwacht zou kunnen worden; onderzoek op dit gebied is echter niet bekend.

S. ureae groeit optimaal in een pepton-bouillon met ammoniumchloride (5 g l⁻¹) en een pH van 8,8. Beneden pH 6,4 en boven pH 9,4 treedt geen groei op. De optimale temperatuur voor groei is 22-30 °C, terwijl er geen groei is bij 37 °C. Volgens Gibson (1935) was de sporevorming optimaal bij 22 °C op agar met (5 g l⁻¹) pepton, (5 g l⁻¹) vleesextract en ammoniumchloride

(5 g l⁻¹) met een pH van 6,8-7,0. Wijzelf vonden bruikbare sporevorming op TSA, die bij 20 °C geïncubeerd werd. MacDonald & MacDonald (1962) testten 31 sporuleringsmedia, waarvan er 9 sporulering gaven van 50% of meer der cellen. Van deze 9 media gaf maar één medium nagenoeg 100% sporulering. Gibson (1935) vond na verhitting van een sporensuspensie gedurende 5 min bij 100 °C nog overlevende sporen bij 6 van 15 onderzochte stammen. MacDonald & MacDonald (1962) lieten zien dat slechts een zeer kleine fractie van de sporen een temperatuur van 100 °C gedurende 10 min overleefden, maar dat 10 min bij 85 °C nog nagenoeg geen vermindering van het aantal sporen opleverde. Vermeldenswaard is verder nog dat normaliter geen vrije sporen gevormd worden, maar dat deze in de vorm van pakketjes van 2, 4 of 8 sporen voorkomen, juist zoals de vegetatieve cellen van deze sarcina. Doordat de sporen fasehelder zijn, zijn ze met fasecontrast-microscopie makkelijk van de vegetatieve cellen te onderscheiden.

SLOT

Informatie over samenstelling en bereiding van de in dit hoofdstuk genoemde media vindt men - behalve in de genoemde literatuur - dikwijls ook in de hierna te noemen handboeken van medialeveranciers, terwijl bovendien Leininger (1976) een goede beschrijving geeft van de meeste van deze media. Handboeken over media:

- BBL, 1973. Manual of Products and Laboratory Procedures. 5th ed.; BBL Division of Becton, Dickinson and Company. Cockeysville, Maryland, USA.
- Difco Manual, 1953. 9th ed.; Difco Laboratories, Detroit, USA.
- Difco, 1962. Supplementary literature, Difco Laboratories, Detroit, USA.
- Merck, Mikrobiologisches Handbuch, E. Merck, Darmstadt.
- Merck, Mikrobiologisches Handbuch, 1. Ergänzung, E. Merck, Darmstadt.
- Merck, 1976. Mikrobiologisches Handbuch, 2. Ergänzung, E. Merck, Darmstadt.
- The Oxoid Manual, 1979. 4th ed.; Oxoid Ltd., London.

Sporevormende bacteriën in vleesprodukten

H. Labots, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO

INLEIDING

De huidige vleesverwerking is voortgekomen uit oeroude technieken die werden toegepast bij het verwerken van gedood wild en geslachte dieren. Deze technieken zijn tijdens de ontwikkeling van het slagersambacht verfijnd. Oude vondsten tonen aan dat reeds vroeg gereedschappen werden gebruikt voor het uitsnijden van gedode dieren en voor het bewerken van huiden. De vrouw van de jager behoorde bedreven te zijn in de kunst van het koken en braden van vlees. Drogen, zouten en roken van vlees waren reeds in de tijd van Homerus bekend.

In de moderne industrie spelen die oude technieken van zouten, drogen, roken en verhitten nog steeds een belangrijke rol. Op grond van deze conserveringsmethoden kunnen vleesprodukten in de volgende categorieën worden ingedeeld:

1. Vers vlees (niet geconserveerd): grote of kleine stukken, verpakt of onverpakt, gekoeld of diepgevroren. Voorbeelden hiervan zijn technische delen (onderdelen van een karkas), geportioneerd (voorverpakt) vlees en gehakt.
2. Licht gezouten gepasteuriseerde vleeswaren: deelstukken of verkleind, onverpakt of in gesloten verpakking. Voorbeelden hiervan zijn gekookte ham en schouder (in blik of kunststof-folie), licht gezouten rundvlees, kookworstsoorten en andere vergelijkbare worsten (in natuur- of kunstdarm). Deze produkten bevatten ongeveer 2% (m/m) keukenzout, d.w.z. 3-4% (m/m) op de waterfase, en de pH varieert van 6,0 tot 6,5. Het aanvangsnitrietgehalte is 100-150 mg kg⁻¹. Tijdens de pasteurisatie wordt de temperatuur in het hart meestal niet hoger dan 70 °C; de daarbij behorende F_0 -waarde is erg klein en wordt niet berekend.
3. Licht gezouten geappertiseerde vleeswaren: deelstukken of

verkleind. Voorbeelden hiervan zijn kleine hammen, luncheon meat en leverpastei. Zout- en aanvangsnitrietgehalten alsmede de pH zijn vergelijkbaar met die van groep 2. De verhitting is zodanig dat in het hart een F_0 -waarde van 0,5 tot 1,0 wordt bereikt.

4. Matig tot sterk gezouten rauwe stukken vlees: al dan niet in gesloten verpakking. Voorbeelden hiervan zijn rookvlees, bacon en sommige speksoorten. De zoutgehalten van deze produkten variëren nogal; licht gezouten bacon heeft ongeveer 4% (m/m) keukenzout in de waterfase, bij matig gezouten bacon is dit 5 à 6% (m/m) terwijl de in Nederland verkrijgbare bacon gewoonlijk ca. 10% (m/m) zout op de waterfase bevat. Rookvlees bevat vaak nog meer zout. Doordat bij de bereiding ook vaak nitraat wordt gebruikt, worden soms hoge nitrietgehalten gevonden (50-100 mg kg^{-1}). De pH ligt meestal in de buurt van 6,0.

5. Rauwe gerijpte vleeswaren: bij deze produkten wordt een bepaalde indroging toegepast en soms is er sprake van een pH-daling. Voorbeelden hiervan zijn rauwe ham, snijworst, salami. In de produkten met een lage pH ($\leq 5,0$) is het zoutgehalte in de waterfase nog betrekkelijk laag (6-9% m/m); de langzaam gerijpte worstsoorten waarin de pH niet zo sterk is gedaald (5,3-5,6) bevatten meer dan 10% (m/m) keukenzout in de waterfase. Het restnitrietgehalte is gewoonlijk laag ($< 10 \text{ mg kg}^{-1}$).

Het roken wordt tegenwoordig nauwelijks meer toegepast als conserveermethode, maar voornamelijk voor het verkrijgen van een rookaroma. Het wordt vooral gebruikt voor produkten in de categorieën 2, 4 en 5.

Bovengenoemde conserveertechnieken zijn bedoeld om de ontwikkeling van micro-organismen in vleesprodukten tegen te gaan. Op vlees komen vele soorten micro-organismen voor die bederf en soms voedselvergiftiging kunnen veroorzaken. De sporen van de sporevormende bacteriën zijn vooral van betekenis, wanneer andere micro-organismen zijn uitgeschakeld, bijvoorbeeld door verhitting.

De bacteriesporen zijn nauwelijks van betekenis voor rauw vlees (groep 1) dat in diepgevroren toestand bacteriologisch gezien oneindig lang houdbaar is en dat in gekoelde toestand

bederft door niet-sporevormende bacteriën. De situatie is evenwel anders, wanneer vlees na het braden erg langzaam afkoelt of bij te hoge temperatuur wordt bewaard. Onder die omstandigheden kunnen bijvoorbeeld de sporen van *Clostridium perfringens* gemakkelijk uitgroeien en voedselvergiftiging veroorzaken.

In sterk gezouten en rauwe, gerijpte vleeswaren (groepen 4 en 5) krijgen de sporevormende bacteriën geen kans door de verlaagde wateractiviteit en de soms verlaagde pH. Bij die vleesprodukten zijn het vooral gisten en schimmels of microkokken en melkzuurbacteriën die bederf kunnen veroorzaken.

Problemen als gevolg van de ontwikkeling van sporevormende bacteriën zijn vooral te duchten bij in gesloten verpakking verhitte vleesprodukten en bij matig gezouten rauwe vleeswaren, wanneer deze laatste niet voldoende gekoeld worden opgeslagen.

BESMETTING VAN VLEESPRODUKTEN MET BACTERIESPOREN

Er zijn verschillende manieren waarop vleesprodukten met bacteriesporen besmet kunnen worden: via het vlees zelf, via de hulpstoffen en via de bewerking.

Vleesgrondstoffen

De primaire bron van bacteriesporen is grond, maar voor bepaalde anaërobe sporevormende bacteriën, zoals *Clostridium perfringens*, is de darminhoud van warmbloedige dieren een natuurlijke omgeving (Slepecky, 1972). Het aërobe-sporegehalte van koemest kan erg hoog zijn; het is een afspiegeling van de opname van deze sporen via het voer (Labots et al., 1965).

Besmetting van het vlees met bacteriesporen vindt voor het grootste deel plaats tijdens het slachten, door direct of indirect contact van het karkas met de door grond en mest bevuilde huid. Het is daarom zeer belangrijk dat besmetting tijdens het slachten zo veel mogelijk wordt voorkomen; in dit opzicht is bij het slachten van runderen de wijze van onthuiden van betekenis.

De besmetting van het karkas met bacteriesporen geschiedt niet homogeen; pas na vërgaande verkleining is er sprake van

een enigszins homogene verdeling. De heterogeniteit is onder andere de oorzaak van de uiteenlopende onderzoeksresultaten betreffende het sporenghalte van vlees. Toch kan bij benadering worden gesteld dat het aantal mesofiele *Bacillus*-sporen ongeveer 100 en het aantal mesofiele *Clostridium*-sporen 1-10 per gram bedraagt (Mol & Timmers, 1970). *C. perfringens* vormt een belangrijk deel van de anaërobe-sporenflora (Ladiges et al., 1974), terwijl *Clostridium botulinum* slechts in zeer kleine aantallen wordt gevonden (Roberts & Ingram, 1976).

Hulpstoffen

Hoewel zeer vele hulpstoffen en andere materialen worden gebruikt bij de bereiding van vleesprodukten, wordt in het onderstaande alleen aandacht besteed aan keukenzout (NaCl), nitriet (NaNO_2), specerijen en meel (meestal tarwezetmeel). Er zijn aanwijzingen dat zout en nitriet geen belangrijke bijdrage leveren aan de besmetting van vleesprodukten met bacteriesporen, hetgeen bepaald niet kan worden gezegd van meel en specerijen.

Tarwezetmeel kan enkele duizenden mesofiele aërobe sporen per gram bevatten en waarschijnlijk ook anaërobe sporen, zodat deze bron van sporenbesmetting bij toepassing van meel bij een aantal vleeswaren (4%) zeker niet verwaarloosd mag worden. Aan het thermofiele-sporenghalte van een aantal grondstoffen worden wel eisen gesteld (National Canner's Association, 1968).

De sterkste sporenbesmetting kan echter van de zijde van de specerijen worden verwacht. Winning en eerste verwerking van specerijen geschiedt vaak onder primitieve omstandigheden; mede als gevolg daarvan kunnen de bacteriesporengelalten van specerijen hoog tot zeer hoog zijn. Zo kan het aantal mesofiele *Bacillus*-sporen in zwarte peper 10^8 per gram zijn, het aantal thermofiele *Clostridium*-sporen 10^4 per gram en het aantal mesofiele *Clostridium*-sporen 10^3 per gram; ook thermofiele aërobe sporen en sporen van *C. perfringens* en *Bacillus cereus* worden aangetroffen (Labots, 1968; Julseth & Deibel, 1974; Powers, 1975).

Bij normaal gebruik (circa 0,3%; m/m) zullen kruidenmengsels die geen kiemdodende behandeling hebben ondergaan het bacterie-

sporengelalte van het vleesprodukt kunnen verhogen met 100 à 1000 mesofiele *Bacillus*-sporen en 1 à 10 mesofiele *Clostridium*-sporen per gram. Het aandeel dat kruidenmengsels in de besmetting hebben is vaak groter dan dat van het vlees zelf. Om die reden worden soms op kruiden kiemdodende behandelingen toegepast en worden ook wel kiemarme kruidenextracten gebruikt. De in dit opzicht meest bekende behandelingen zijn die met ethyleen-oxyde en met ioniserende straling. De effectiviteit van ethyleen-oxyde hangt af van de concentratie, de temperatuur en de inwerkingstijd en wordt mede bepaald door produkt, verpakking en werkwijze (Driessen & Van Duin, 1975). Een bestralingsdosis van circa 8 kGy (0,8 Mrad) is meestal voldoende om het sporenaantal van de kruiden tot minder dan 100 per gram te reduceren (Van Dijck, 1970; Vajdi & Pereira, 1973).

Verwerking

Tijdens de bewerking en verwerking van vlees tot vleesprodukten zijn er legio mogelijkheden van besmetting met allerlei soorten micro-organismen. Om vele redenen dient de besmetting zo gering mogelijk te zijn, en daartoe zijn goede, hygiënische werkwijzen gewenst. Onder de micro-organismen zullen zich ook bacteriesporen bevinden, afkomstig van het produkt zelf. Er is alleen gevaar voor ernstige besmetting met sporen, wanneer de omstandigheden zodanig zijn dat op oppervlakken achtergebleven sporen via ontkieming, uitgroei en hernieuwde sporulering in aantal kunnen toenemen. Het is niet bekend of deze laatstgenoemde situatie zich bij de bereiding van vleesprodukten voordoet.

VERHINDERING VAN DE ONTWIKKELING VAN SPOREVORMENDE BACTERIËN IN VLEESPRODUKTEN

In de inleiding is reeds uiteengezet dat de voornaamste hulpmiddelen bij de conservering van vleesprodukten zijn: zout, natriet, verhitting en koelen of invriezen. Omdat de aandacht vooral is gericht op sporen, zal in het vervolg het accent vallen op die produkten waarin de ontwikkeling van sporevormende bacteriën een gevaar inhoudt, dat wil zeggen de matig gezouten rauwe vlees-

produkten en de gepasteuriseerde en geappertiseerde vleesprodukten. Voor deze groepen produkten is vooral van betekenis de combinatie van zout, nitriet, pH en opslagtemperatuur, respectievelijk de combinatie van zout, nitriet, pH, verhitting en opslagtemperatuur.

Zout

Het is reeds lang bekend dat zout (keukenzout, NaCl) remmend werkt op de groei van vele groepen micro-organismen (Ingram & Kitchell, 1967). Door het werk van Scott (1957), die het begrip wateractiviteit (a_w) invoerde, is duidelijk geworden waarom zouten en suikers conserverend kunnen werken. De wateractiviteit (a_w) van een produkt is per definitie de relatieve evenwichtsvochtigheid, dat wil zeggen het quotiënt van de waterdampdruk van het produkt en de dampdruk van zuiver water bij dezelfde temperatuur en druk. De a_w is een maat voor de beschikbaarheid van water voor micro-organismen (Leistner & Rödel, 1976).

In vleeswaren wordt de verlaging van de a_w van het vlees bewerkstelligd door het toevoegen van zout in combinatie met andere hulpstoffen (polyfosfaten, koolhydraten). Het is voor wat betreft de groei van de micro-organismen niet onbelangrijk of de verlaging van de a_w wordt bereikt door toevoeging van natriumchloride, een andere alkalichloride of andere anorganische zouten of suikers. Zo toonden Jakobsen et al. (1972) aan dat bij gelijke a_w -waarden de remming van *B. cereus*, veroorzaakt door natriumchloride en kaliumchloride, veel sterker was dan de remming door glycerol. Deze alkalizouten zouden een specifieke remming uitoefenen.

Algemeen wordt aangenomen dat ontwikkeling van aërobe en anaërobe sporevormende bacteriën niet mogelijk is bij a_w -waarden lager dan 0,95 (Leistner & Rödel, 1976); deze waarde wordt bereikt door 8 à 9% (m/v) NaCl in water op te lossen. Grenswaarden van de a_w voor verscheidene micro-organismen verschilden nogal eens bij de door diverse auteurs gedane onderzoeken. De grenswaarden zijn bovendien gewoonlijk bepaald onder optimale condities. In vleeswaren zijn de omstandigheden gewoonlijk minder gunstig.

Nitriet (NaNO_2) wordt als middel om de groei van bacteriën te remmen vrijwel steeds toegepast in combinatie met keukenzout. Vroeger werd geen nitriet gebruikt maar nitraat, dat door bacteriën in pekels of op vlees in nitriet werd omgezet. Het nitriet zet het van nature in vlees aanwezige myoglobine om in de stabiele kleurstof nitrosomyoglobine. Hoewel men geneigd is te veronderstellen dat het nitraat als een verontreiniging van het oorspronkelijk gebruikte zeezout in de vleeswarenbereiding is terechtgekomen, is het ook mogelijk dat nitraat als zodanig werd toegevoegd. Nitraat zou al in de 13^e eeuw in behoorlijke hoeveelheden beschikbaar zijn geweest in verband met de buskruit-fabricage en in die tijd ook al een aantal medische toepassingen hebben gehad (Jensen, 1945). De conserverende werking werd toegeschreven aan het vermogen van nitraat om het anaërobe milieu, dat tot rotting aanleiding zou kunnen geven, om te zetten in een aëroob milieu. Een latere verklaring van de remming van micro-organismen door het nitriet was dat deze samenhang met het niet-gedissocieerde HNO_2 . De remmende invloed was immers sterker naarmate de pH lager was (Castellani & Niven, 1955).

Een heel andere conclusie trokken Perigo et al., (1967) op grond van hun experimenten met voedingsmedia. Zij ontdekten namelijk dat in vloeibare media voor het afremmen van *Clostridium sporogenes* veel minder nitriet nodig was wanneer dit werd meegesteriliseerd, dan wanneer, zoals gebruikelijk, een door filtratie gesteriliseerde nitrietoplossing na de sterilisatie werd toegevoegd. Uit nitriet en bepaalde componenten van het medium zouden dus verbindingen gevormd worden met een sterke remmende invloed.

Het sinds 1967 verrichte onderzoek naar een 'Perigo'-factor in vleesprodukten is beschreven in de rapporten en discussies van de beide nitrietsymposia (Krol & Tinbergen, 1974; Tinbergen & Krol, 1977). Tot nu toe is echter niet duidelijk geworden welke de aard is van de remmende factor die gevormd wordt door de inwerking van nitriet op de componenten van het vleesprodukt.

Verschillende malen is waargenomen dat *Bacillus*-soorten minder gevoelig zijn voor nitriet dan *Clostridium*-soorten (Mol &

Timmers, 1970; Grever, 1974). Dit betekent dat uitgroei van aërobe sporevormende bacteriën nog mogelijk is onder omstandigheden waarbij anaërobe sporevormende bacteriën geheel geremd worden. In produkten die een betrekkelijk geringe warmtebehandeling hebben ondergaan, is dit verschijnsel dan ook niet zeldzaam. Het gaat dan meestal om *B. licheniformis* en *B. circulans* of *B. coagulans*.

Wanneer produkten door anaërobe sporevormende bacteriën bederven, betreft dit gewoonlijk *C. sporogenes* en aanverwante proteolitische *Clostridium*-soorten.

Zout, nitriet, pH en opslagtemperatuur

Voor de ontwikkeling van sporevormende bacteriën in matig gezouten rauwe vleeswaren is vooral de combinatie van zout, nitriet en pH van betekenis samen met de opslagtemperatuur. Vroeger werden de meeste rauwe produkten zo zwaar gezouten, dat daardoor reeds de ontwikkeling van sporevormende bacteriën bij ongekoelde opslag werd voorkomen. De wens om dit soort produkten met een lager zoutgehalte te kunnen produceren en de ontwikkeling van de koelketen en verpakkingstechniek hebben produkten doen ontstaan die bij onvoldoende koeling de ontwikkeling van sporevormende bacteriën nauwelijks verhinderen. Omdat deze produkten toch vaak onder minder goede koeling worden bewaard, kunnen er reële mogelijkheden aanwezig zijn voor de ontwikkeling van minder gewenste micro-organismen, zoals *C. perfringens* en buitengewoon toxische *C. botulinum*-soorten. Dat deze matig gezouten produkten toch nog betrekkelijk veilig zijn, is te danken aan de invloed van zout, nitriet en een lage pH, die samen een gunstig effect op de houdbaarheid hebben. Zout, nitriet en pH-verlaging zijn gelijkwaardige 'partners' die elkaar wederzijds versterken onder andere ten aanzien van de remming van de groei van *C. botulinum*, hetgeen duidelijk blijkt uit figuur 1. De aanwezigheid van een blokje geeft aan dat onder die omstandigheden groei is opgetreden. Soortgelijke diagrammen kunnen worden samengesteld voor het gedrag van *C. sporogenes* (Roberts, 1974).

Wanneer deze diagrammen worden samengesteld van proeven bij

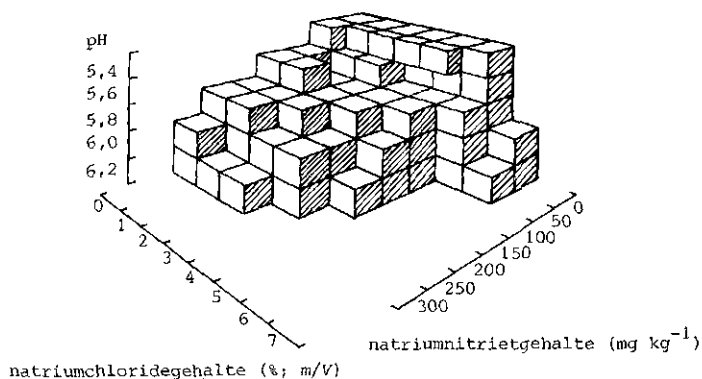


Fig. 1. Het effect van pH, NaCl en NaNO_2 op de groei van 10^3 vegetatieve cellen van *C. botulinum* bij 35 °C. Bron: Roberts (1974).

verschillende incubatietemperaturen, dan blijkt bij vergelijking dat de remmende factoren des te sterker werken naarmate de temperatuur verder verwijderd is van de optimale temperatuur voor het micro-organisme (Baird-Parker & Baillie, 1974; Roberts, 1974). Bepaalde combinaties van zout- en nitrietgehalten en pH stoppen de ontwikkeling van *C. botulinum* en *C. perfringens* volledig bij lage temperatuur, maar laten wel groei toe bij hogere opslagtemperatuur.

Een nog niet volledig opgehelderde factor is die van de initiële infectie. Bij een geringe mate van besmetting wordt de volledige remming bij lagere zout- en nitrietgehalten en hogere pH, gerealiseerd dan bij een hoge mate van besmetting.

Tenslotte nog een opmerking over snijworst. Dit produkt wordt tegenwoordig in Nederland volgens een snelle bereidingswijze gemaakt (Mulder, 1977). Dat houdt in dat verkleind vlees snel verzuurd wordt tot een pH lager dan 5,0 na toevoeging van glucose en – vaak – een speciale entcultuur of entworst (melkzuurbacteriën) en door toepassing van een verhoogde rijpingstemperatuur (27 °C). Het produkt heeft een zodanig lage pH dat ook bij de matige zoutgehalten die worden toegepast, geen ontwikkeling van sporevormende bacteriën mogelijk is. Natuurlijk dient ervoor gezorgd te worden dat de pH-daling snel en zonder storingen verloopt, omdat anders tijdens de bereiding, gezien de betrekkelijk hoge temperaturen, wel degelijk ontwikkeling van sporevormende bacteriën kan plaatsvinden.

Voor de stabiliteit en de veiligheid van verhitte vleesprodukten, zowel gepasteuriseerde als geappertiseerde, zijn vier factoren van betekenis, die elkaar wederzijds beïnvloeden: zout, nitriet, pH en de intensiteit van de verhitting. Juist in die combinatie schuilt het grote geheim van de stabiliteit van vleesprodukten die, in vergelijking met andere conserven, een vrij matige verhitting ondergaan.

De wederzijdse beïnvloeding kan gemakkelijk worden gedemonstreerd door middel van de gecombineerde werking van zout en verhitting. Wanneer een sporensuspensie van *B. cereus* bij 90 °C wordt verhit, en de verhitte suspensie na verschillende verhittingsperioden wordt uitgezaaid in een medium zonder zout en in eenzelfde medium met 3,5% (m/m) keukenzout - een gebruikelijke zoutconcentratie in de waterfase van vleeswaren - dan blijkt dat het zout de ontkieming van de sporen sterker gaat remmen naarmate de suspensie langer verhit is geweest (fig. 2). Hetzelfde is waargenomen voor *C. botulinum*-sporen (Ingram, 1976). Wanneer de bacteriesporen zich bevinden in vleeswaren met een normaal zoutgehalte (circa 2% m/m) en deze vleeswaren worden verhit, dan is de schijnbare afsterving groter (kleinere D-waarde) dan wanneer geen zout aanwezig zou zijn geweest (grote D-waarde). In geappertiseerde vleesprodukten is de verhittingsintensiteit voldoende om vegetatieve cellen volledig te doden. De bacteriesporen worden evenwel slechts ten dele gedood; het resterende deel blijft weliswaar onder optimale omstandigheden kweekbaar, maar kan door de opgelopen beschadiging in vleeswaren niet meer ontkiemen en/of uitgroeien, mede door de aanwezigheid van zout, nitriet (in de vorm van nog onbekende verbindingen) en een enigszins verlaagde pH (meestal circa 6,2).

Het natriumchloride kan niet zonder meer door andere zouten worden vervangen. Bij eigen onderzoek bleken equimoleculaire hoeveelheden kaliumchloride in vergelijking met 3,5% (m/m) natriumchloride nauwelijks de afsterving van *B. cereus*-sporen te beïnvloeden.

Voor geappertiseerde vleeswaren geldt, evenals voor rauwe vleeswaren, dat de initiële sporenbesmetting zo laag mogelijk

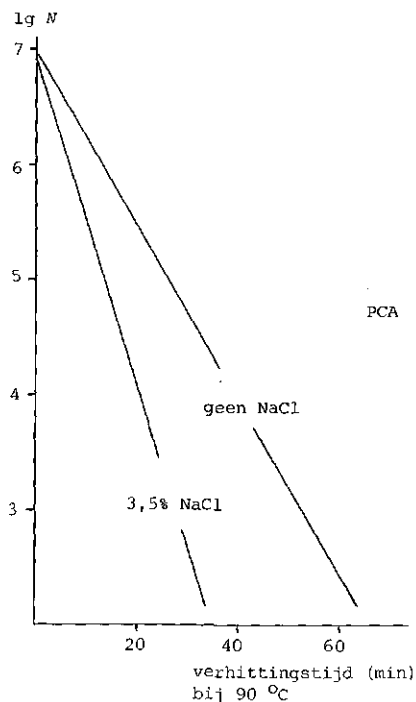


Fig. 2. Invloed van 3,5% (m/m) NaCl in Plate Count Agar als telmedium voor verhitte *Bacillus cereus*-sporen.

moet zijn: een combinatie van remmende factoren geeft meer veiligheid naarmate het aantal bacteriesporen geringer is. Het is erg belangrijk ervoor zorg te dragen dat zowel de extrinsieke verhittingsfactor als intrinsieke factoren zoals zout- en nitrietgehalte en pH op het gewenste niveau worden gehandhaafd.

Bij gepasteuriseerde, normaal gezouten vleeswaren, zoals ham, schouder, kookworst en leverworst is de verhitting betrekkelijk gering; zout en nitriet vertonen daardoor ook een minder sterk remmende werking. Deze vleesprodukten moeten dan ook bij lage temperaturen worden bewaard om uitgroei van bacteriesporen te voorkomen. Door een uitgebalanceerde combinatie van zout, nitriet, verlaagde pH en verhitting kan evenwel een produkt als vacuümverpakte gepasteuriseerde rookworst vaak lange tijd ongekoeld worden bewaard zonder dat bacteriegroei optreedt ($\text{pH} \leq 5,8$, zout in waterfase 4-5%, aanvangsnitrietgehalte 150 mg kg^{-1}).

RADAPPERTISATIE

Een nieuwe methode voor het houdbaar maken van vlees, waarbij het van belang is ook alle sporen te vernietigen, is de zogenaamde radappertisatie (Rowley et al., 1974). Door produkten als ham en bacon na een thermische pasteurisatie bij lage temperatuur te bestralen met gamma-stralen (dosis ongeveer 40 kGy (4 Mrad)) kunnen onder bepaalde omstandigheden produkten verkregen worden die stabiel zijn bij opslag en een acceptabel aroma bezitten. Deze conserveringswijze heeft tot nu achter alleen toepassing gevonden voor militair gebruik en in de ruimtevaart in de USA.

Sporevormende bacteriën in zuivelprodukten

L.P.M. Langeveld, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Ede

DE GRONDSTOF MELK

In rauwe melk komen sporen van zowel aërobe als anaërobe sporevormende bacteriën in sterk wisselende aantallen voor. Sporen van aërobe sporevormers treft men soms aan tot aantallen van enkele duizenden per ml, maar gewoonlijk tussen 1 en 100 per ml. Voor sporen van anaërobe sporevormers liggen de gehalten meestal wat lager namelijk tussen 0,1 en 10 per ml. De aantallen sporen van zowel aërobe als anaërobe sporevormers hangen vooral af van de mate waarin besmetting tijdens het melken optreedt. Bij een goede techniek van machinaal melken vindt besmetting praktisch alleen plaats vanaf de spenen (Underwood et al., 1974). Besmetting van de spenen met grond, mest en voer moet daarvan wel de oorzaak zijn. Niet bekend is of sporevormende bacteriën ook op de uier tot sporevorming kunnen komen. Door de uiers constant goed te wassen vóór het melken is het mogelijk het sporenaantal te reduceren. Incidenteel wassen of het wassen af en toe overslaan schijnt weinig effect te hebben op een hoge respectievelijk lage sporeafgifte (Waes, 1975). Slordige melktechnieken, waarbij bijvoorbeeld tepelhouders op de grond vallen, kunnen verhoogde aantallen tot gevolg hebben (De Vries & Stadhouders, 1977). Sporen komen namelijk in grote aantallen in grond en mest voor (10^4 - 10^7 per gram), waarbij sporen van aërobe soorten in het algemeen talrijker zijn dan die van anaërobe, hetgeen wordt weerspiegeld in de onderlinge verhouding ervan in melk. Hooi en kuilvoer zijn doorgaans ook rijk aan sporen. Wat betreft de aantallen is er een verband tussen voer en mest; doordat vertering van voedselcomponenten plaats vindt, is het gehalte in mest hoger (Labots et al., 1965). Ten aanzien van de meeste soorten sporevormende bacteriën is het nog een open vraag of en in hoeverre groei en sporulering in het spijsverteringskanaal kan op-

treten. Een 'normaal' aantal sporen in de melk kan al door besmetting met 10 mg mest of grond per l melk verklaard worden.

Na het melken tot aan de verwerking in de fabriek neemt het aantal sporen niet meer toe door sporulering. Er is eerder sprake van een geringe afname ten gevolge van ontkieming. Wel kan nog besmetting optreden ten gevolge van contact met vaatwerk en apparatuur. Zo vonden Atwal et al. (1974) bij gebruik van melkbussen een verontreiniging van 15 sporen per ml melk en Labots et al. (1965) stelden vast dat melkbussen een even grote besmetting met sporen van *Bacillus cereus* konden veroorzaken. Verderop in dit hoofdstuk zal nog worden ingegaan op de besmetting van produkt door sporen afkomstig van apparatuur.

In verschillende delen van de wereld is aandacht besteed aan de concentratie waarmee sporen van verschillende sporevormers in melk voorkomen. Wat betreft het geslacht *Bacillus* is *B. licheniformis* het meest talrijk, gevolgd door de soorten *subtilis*, *pumilus* en *brevis*. Plaatselijk echter kan de situatie wel verschillen, want Abo-Elnaga (1968) vermeldt dat sporen van *B. cereus* het meest talrijk voorkomen in wintermelk in Egypte, terwijl Atwal (1974) in India hoofdzakelijk *B. subtilis*-sporen in melk vond. De veel hogere concentratie in melk van sporen van *B. licheniformis* ten opzichte van soorten van *B. cereus* is een weerspiegeling van de onderlinge verhouding van de sporen in de grond (Labots et al., 1965). Van het geslacht *Clostridium* zijn *C. perfringens* en *C. sporogenes* het meest talrijk in melk aanwezig.

Het feit dat sporen van bepaalde soorten frequenter voorkomen betekent nog niet dat deze ook meer aanleiding tot problemen geven. De aard van een produkt en de bewaringsmethode bepalen welke naar voren komen; dit kunnen soorten zijn waarvan de sporen in een relatief laag aantal aanwezig zijn, zoals bijvoorbeeld vaak het geval is met die van *B. cereus* en *C. tyrobutyricum*. In vele gevallen treedt geen groei van sporevormers in zuivelprodukten op, maar geven aanwezige sporen later problemen, wanneer ze in andere voedingsmiddelen verwerkt worden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn bij toepassing van gedroogde produkten, zoals melkpoeder in soepen en bij het gebruik van kaas in smeltkaas.

TOEVOEGINGEN

Toevoeging van ingrediënten kan het aantal sporen in produkten doen toenemen en kan zo soms een rol spelen bij het bederf van het eindprodukt. Over gehalten van sporen in ingrediënten is geen uitgebreide literatuur voorhanden. Men kan, indien men wil weten of een bepaalde toevoeging een noemenswaardige verhoging van sporen zal leveren, de concentratie bacteriesporen bepalen en dit vergelijken met de concentratie ervan in de hoofdgrondstof, de melk.

Met de door Mossel et al. (1974) gegeven benadering kan men berekenen of de eventuele toename van sporen van belang is; indien de fractie die van een ingrediënt wordt toegevoegd gelijk is aan x , het gehalte aan sporen gelijk is aan n per gram, en dat van de melk N per gram, dan is het sporengehalte van de toevoeging van geen belang, indien

$$(1 - x)N + x.n \leq N + 0,1 N$$

Deze benadering kan men ook toepassen voor een specifieke groep van sporen. Is n zo hoog dat niet meer aan bovengenoemde voorwaarde wordt voldaan, dan dient men te overwegen in hoeverre het hogere gehalte nadelig zou kunnen zijn voor de houdbaarheid van het produkt en of maatregelen zouden moeten worden genomen.

BEÏNVLOEDING VAN HET AANTAL SPOREN EN DE ONTWIKKELING VAN SPORE-VORMENDE BACTERIËN

De aanwezigheid van sporen in melk is een gegeven dat men bij de verwerking in de regel voor lief moet nemen, omdat men op korte termijn weinig invloed op de mate van besmetting tijdens de melkwinning kan uitoefenen. Bij de industriële verwerking kan men trachten het aantal sporen alsnog terug te brengen of de bewerking, produktie-omstandigheden of de bewaring zodanig aan te passen dat zo weinig mogelijk hinder wordt ondervonden van sporevormende organismen.

Indien men het aantal sporen in melk wil verlagen, kan men de door Simonart & Debeer (1954) in samenwerking met Alfa Laval ontwikkelde bactofuge toepassen. Dit is een centrifuge met capaciteiten tussen 6000 en 13 000 liter per uur, waarbij bacteriën en sediment, waarin ook een deel van de caseïne, van de melk worden gescheiden en via gaatjes in de wand van de centrifugetrommel worden afgevoerd. De hoeveelheid eiwitrijk slib bedraagt 20 à 30 g kg⁻¹. Ten einde dit niet te verliezen wordt dit tegenwoordig vaak met een kleine UHT (ultra high temperature)-sterilisator gesteriliseerd en weer aan de behandelde melk toegevoegd. De eigenschappen van deze melk veranderen hierdoor niet noemenswaardig. De sporenreductie door deze behandeling ligt tussen 95 en 98%. Het aantal *C. tyrobutyricum*-sporen kan daardoor zodanig worden verlaagd dat weinig of geen nitraat meer nodig is voor de bestrijding van boterzuurgisting in kaas. Bij toepassing voor laaggepasteuriseerde melk kan de houdbaarheidsperiode met circa 25% worden verlengd mits geen nabesmetting plaats vindt. Het aantal vlokken van *B. cereus* in de roomlaag van niet-gehomogeniseerde laaggepasteuriseerde melk kan drastisch worden verlaagd. Bij de produktie van gesteriliseerde melk levert een voorafgaande behandeling met de bactofuge geen groot voordeel op, omdat het aantal decimale-reducties nauwelijks 2 bedraagt, terwijl minimaal 8 decimale reducties nodig zijn om steriliteit te verkrijgen. De intensiteit van de hittebehandeling zou dus met slechts circa 20% kunnen worden gereduceerd. Behandeling van melk met de bactofuge voor de bereiding van melkprodukten heeft weinig of geen zin, indien via daarna toegevoegde ingrediënten weer veel sporen worden toegevoegd.

Een andere mogelijkheid voor het verlagen van het aantal sporen is behandeling van de melk met waterstofperoxyde gevolgd door een behandeling met het enzym katalase. Het bij 60 °C gedurende een half uur laten inwerken van 1 g H₂O₂ per 1 melk heeft een verlaging van het aantal sporen tot gevolg die globaal in de orde van 2 decimale reducties ligt. Dit procédé wordt niet veel toegepast, maar kan bij de kaasbereiding bijdragen aan de bestrijding van boterzuurgisting en bij de produktie van ge-

steriliseerde melk een minder intensieve hittebehandeling mogelijk maken.

Indien rauwe melk of melk die slechts zodanig is gepasteuriseerd dat het enzym alkalisch fosfatase juist onwerkzaam is gemaakt, bij kamertemperatuur of kouder worden bewaard, roomt de melk binnen enkele uren op, waardoor 90 tot 95% van de sporen en de bacteriën omhoog gevoerd worden door de trossen stijgende vetbolletjes. Van dit verschijnsel wordt in Nederland nauwelijks gebruik gemaakt. Door deze oproming vindt uitgroei van sporen en toename van vegetatieve cellen aanvankelijk vooral in de roomlaag plaats, totdat deze groei ten gevolge van onderlinge beïnvloeding afremt, terwijl op dat moment in de onderstaande melk het kiemgetal nog betrekkelijk laag is. Dit betekent dat de houdbaarheid over de gehele melkhoeveelheid berekend wordt verhoogt. Hierop berust waarschijnlijk de grotere houdbaarheid van niet-gehomogeniseerde ten opzichte van wel-gehomogeniseerde laaggepasteuriseerde melk.

Gebruik van remmende factoren

In veel gevallen kan het gebruik van remmende factoren ertoe bijdragen bederf door sporevormende bacteriën te voorkomen. Als remmende factoren kunnen worden genoemd een verlaagde pH, verlaagde redoxpotentiaal, ontoegankelijkheid van zuurstof, verlaagde wateractiviteit ten gevolge van indampen of toevoegen van zout of suiker, aanwezigheid van nisine en verhoging van viscositeit. De meeste punten komen nog aan de orde bij de bespreking van de diverse produkten. Een zodanige verlaging van de wateractiviteit dat sporevormende bacteriën niet meer kunnen groeien wordt bij gesuikerde gecondenseerde melk bereikt door het hoge gehalte aan saccharose. Heeft een produkt een puddingachtige structuur, dan kunnen vele sporevormende bacteriën niet verder uitgroeien dan tot een kolonie van beperkte omvang. Dit kan soms van praktisch belang zijn, als de produktie-omstandigheden en/of de bewaartemperatuur al zodanig zijn dat nog slechts incidenteel een spore tot ontwikkeling komt.

Door laagpasteurisatie worden geen sporen onwerkzaam gemaakt. Bij toenemende intensiteit van hittebehandelingen verdwijnen successievelijk de sporen van *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. circulans* en ten slotte van *B. subtilis*. Doordat een hittebehandeling ook sporen tot kieming kan activeren, is er bij kortdurende verhittingen van 10 à 20 seconden een temperatuurgebied van ongeveer 75-90 °C, waarbij bijna geen sporen van *B. cereus* worden gedood, maar waarin door activering van deze sporen de houdbaarheid van een produkt juist iets kan worden verminderd. Worden bij iets meer intensieve verhittingen de sporen van *B. cereus* juist gedood, dan neemt de houdbaarheid van produkten bij bewaring onder 25 °C toe, niet alleen ten gevolge van het geringer aantal sporen dat overblijft, maar ook doordat andere *Bacillus*-soorten langzamer groeien. Het effect van verschillende pasteurisatie- en sterilisatiemethoden komt in volgende paragrafen nog aan de orde.

Door warmtebehandeling van melk kunnen sporen ook zodanig worden geactiveerd dat een deel ervan bij opvolgende bewaring bij niet al te lage temperatuur sneller ontkiemt. Door daarna weer een warmtebehandeling toe te passen worden deze ontkiemde sporen gedood. Dit idee is door Shehata & Collins (1972) en door Florenz (1976) al enigszins uitgewerkt voor gepasteuriseerde melk. Zelfs indien de eerste behandeling licht is, bijvoorbeeld een temperatuur van 65 °C gedurende 30 s, en de melk daarna 6 uur lang bij 10 °C wordt bewaard, kan bij opvolgende pasteurisatie bij 72 °C het aantal sporen van *B. cereus* al met 90% worden gereduceerd (Florenz, 1976).

Bij ontvangst aan de melkfabrieken wordt rauwe melk vaak gethermiseerd. Thermisatie is een hittebehandeling gedurende circa 10 s bij een temperatuur van 65 °C en heeft tot doel het aantal gram-negatieve bacteriën zodanig te reduceren dat de melk alvorens te worden gepasteuriseerd nog 1 à 2 dagen gekoeld bewaard kan worden. Gezien bovenstaande ervaring zou thermisatie een enigszins gunstig effect kunnen hebben op de houdbaarheid van niet nabesmette gepasteuriseerde melk en ook op het aantal vlokken van *B. cereus* dat bij bewaring kan ontstaan.

Door gereede produkten koel (7°C of lager) te bewaren kan ontwikkeling van een groot deel van de in een produkt aanwezige sporen worden tegengegaan en in sommige produkten waarin al veel remmende factoren zijn ingebouwd, zoals in kaas en smeltkaas, zelfs geheel worden voorkomen. De soorten die bij temperaturen van 5 à 7°C en lager nog kunnen groeien worden wel psychrotrofe sporevormende bacteriën genoemd, maar over de juiste definitie bestaat nog geen eensluidende opvatting.

Uit onderzoekingen van Shehata & Collins (1972) en Michels & Visser (1976) is gebleken dat sporen van sporevormers die bij 5°C kunnen groeien minder thermoresistent zijn dan die van mesofiele soorten. Indien men zuivelprodukten zodanig produceert dat een lange gekoelde bewaring bij 5°C of lager mogelijk is, bijvoorbeeld voor puddingen in portieverpakking of slagroom in blik, dan moet gezien die ervaring kunnen worden volstaan met een verhitting met een F_0 -waarde van circa 0,1. Voor veel melkprodukten is de bewaringstemperatuur vaak ongeveer 10°C , waarvoor wel een wat intensievere verhitting wenselijk zal zijn. Veel is hierover echter nog niet bekend.

Het is niet zo dat na het toepassen van verhitting nog slechts sporevormende bacteriën en eventueel overgebleven andere thermoresistente micro-organismen een rol kunnen spelen. Na een pasteurisatie- en zelfs na een sterilisatiebehandeling kan besmetting met allerlei micro-organismen optreden; dit ongewild gebeuren wordt aangeduid met de term nabesmetting of na-infectie. Het verloop van het bederf kan daardoor in sterke mate worden veranderd, meestal versneld, en de rol van de sporevormende bacteriën kan geheel op de achtergrond geraken. Ook het effect van de behandeling met de bactofuge en andere behandelingen of maatregelen kan ten gevolge van nabesmetting geheel teniet worden gedaan. Remmende factoren bouwt men vaak in als aanvullende maatregel op een hittebehandeling. Er kan gemakkelijk nabesmetting optreden met organismen die niet of nauwelijks beïnvloed worden door deze remmende factoren.

Door heet af te vullen met grondig gereinigde apparatuur of

door aseptisch af te vullen met voorgesteriliseerde apparatuur kan nabesmetting voor een groot deel, respectievelijk geheel worden voorkomen. De laatste tijd komen er ook vulmachines aan de markt waarmee bijna aseptisch kan worden afgevuld. Door speciale maatregelen, zoals het reinigen zonder dat demontage en weer montage nodig is (cleaning in place: CIP), door het toepassen van gefiltreerde lucht en door een kiemgetal reducerende behandeling van het verpakkingsmateriaal, wordt de nabesmetting tot een laag niveau teruggebracht.

SPOREVORMENDE BACTERIËN EN VERSCHILLENDE PRODUCTEN

Gepasteuriseerde melk

In veel landen wordt de melk voor de dagelijkse consumptie zodanig verhit dat het enzym alkalisch fosfatase onwerkzaam wordt gemaakt, maar het enzym peroxidase nog niet of nog niet helemaal wordt geïnactiveerd. De behandeling is minimaal gelijkwaardig aan een verhitting gedurende 15 s op een temperatuur van 72 °C. Deze behandeling wordt in de zuivel, nogal verwarrend, HTST (high temperature short time)-pasteurisatie genoemd, dit echter om de tegenstelling aan te geven ten opzichte van de oorspronkelijk gebruikelijke pasteurisatie gedurende een half uur op 63 °C. In Nederland spreekt men van laagpasteurisatie. Indien de melk wordt gehomogeniseerd, wordt wel een iets intensievere hittebehandeling toegepast, bijvoorbeeld 15 s bij een temperatuur van 77 °C, ten einde het melklipase voldoende onwerkzaam te maken.

Indien melk op deze wijze gepasteuriseerd is en wordt bewaard bij temperaturen tussen 7 °C en kamertemperatuur, treedt bederf op door *B. cereus* waarvoor een beginsporenconcentratie lager dan 1 per ml ruimschoots voldoende is. Bij een concentratie van enkele miljoenen cellen per ml brengt *B. cereus* meestal zoetstremming teweeg. Na genoemde pasteurisatiebehandeling zijn behalve sporen van sporevormende bacteriën ook nog levende cellen van thermoresistente bacteriën aanwezig. Bij bewaartemperaturen boven 20 °C kunnen enkele soorten hiervan nog met *B. cereus* concurreren, namelijk sommige *Streptococcus*-soorten en *Alcaligenes*

tolerans, vooral indien de pasteurisatiebehandeling zodanig is geweest dat het alkalisch fosfatase juist is geïnactiveerd.

Bij bewaring bij temperaturen lager dan 7 °C treedt, indien het hoeveelheden melk van een halve liter of meer betreft, voornamelijk bederf op door *B. circulans* (Langeveld et al., 1973), maar volgens onderzoekingen elders zouden ook andere psychrotrofe sporevormers naar voren kunnen komen (Grosskopf & Harper, 1969; Chung & Cannon, 1971). Het gehalte aan sporen van psychrotrofe sporevormers ligt in de orde van 1 per 10 ml melk. De generatietijd van *B. cereus* bedraagt bij 7 °C 10 uur; van *B. circulans* bij 5 °C 20 uur. Indien gesteld wordt dat melk zeker consumeerbaar is tot een kiemgetal van 10^6 per ml, kan berekend worden dat, inclusief een ontkiemingsperiode van enkele dagen voor de eerst ontkiemende sporen, de houdbaarheid bij 7 °C ongeveer 12 dagen is en bij 5 °C ongeveer drie weken.

Hetgeen in de twee voorgaande alinea's is gezegd, gaat alleen op, indien de melk niet is nabesmet. Als dit wel het geval is, zullen bij lage temperatuur Gram-negatieve bacteriën de mate van bederf bepalen. Bij kamertemperatuur kunnen behalve deze ook melkzuurbacteriën aan het bederf bijdragen. Figuur 1 geeft

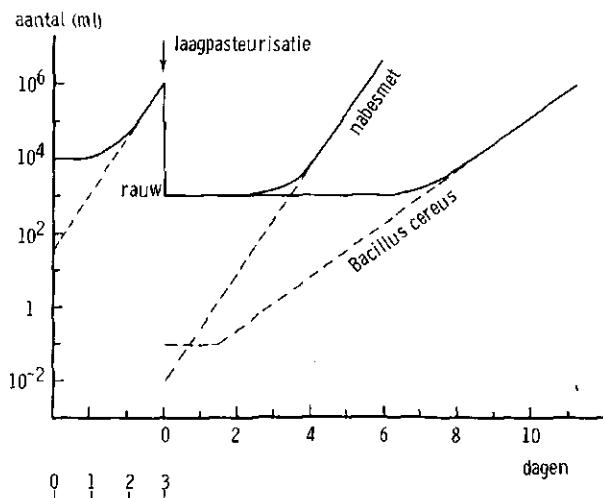


Fig. 1. Ontwikkeling van de bacterieflora in rauwe en laaggepasteuriseerde melk bij een bewaartemperatuur van 7 °C en het effect van laagpasteurisatie en nabesmetting met psychrotrofe Gram-negatieve bacteriën. *B. cereus*: verloop van het kiemgetal, indien geen nabesmetting heeft plaatsgehad; nabesmet: verloop van het kiemgetal bij nabesmetting.

weer hoe het kiemgetalverloop in melk kan zijn vóór en na de pasteurisatie bij een bewaring bij 7 °C. Er is uitgegaan van een concentratie van 1 spore van een psychrotrofe *B. cereus* per 10 ml en een nabesmettingsniveau van 1 psychrotrofe Gram-negatieve bacterie per 100 ml.

Door het aantal sporen in de melk voor pasteurisatie te verlagen kan de houdbaarheid van gepasteuriseerde melk, mits nabesmetting achterwege blijft, verbeterd worden. Door behandeling met de bactofuge kan een ongeveer 40-voudige reductie van het aantal sporen, ook van de soorten van *B. cereus*, worden verkregen. Er zijn ook onderzoeken verricht naar het effect van dubbele verhitting, waarbij de twee behandelingen gescheiden zijn door een bewaring bij lagere temperatuur. De mogelijkheden van deze werkwijze zijn reeds onder 'Warmtebehandelingen' op pagina 153 besproken. Aangaande het te verwachten effect van een verlaging van het aantal sporen kan een schatting gemaakt worden. Om van een vrij normale beginconcentratie van 0,1 spore per ml naar een concentratie van 10^6 cellen per ml nabij het bederfpunt te komen is een 10^7 -voudige vermeerdering nodig. Hiervan uitgaande kan men inzien dat elke tienvoudige reductie van het beginaantal sporen tot gevolg heeft dat de houdbaarheid met circa 1/7 wordt verlengd; aangenomen is dat de ontkiemingsperiode slechts een klein gedeelte van de totale houdbaarheidsperiode uitmaakt. Als de reductie van bepaalde sporen van een soort zo groot is dat niet meer iedere verpakte eenheid een spore bevat, dan kan in een dergelijke eenheid de houdbaarheid sprongsgewijs aanmerkelijk beter worden, omdat dan het bederf veroorzaakt moet worden door tragere soorten.

Melk die niet is gehomogeniseerd en zodanig is gepasteuriseerd dat het alkalisch fosfatase juist is geïnactiveerd, vertoont bij bewaring al snel een duidelijke roomlaag. Bij bewaring bij temperaturen vanaf 7 °C kan bij deze melk het verschijnsel 'bitty cream' optreden. In de roomlaag van de melk zijn dan sporen van *B. cereus* die bij het opromen zijn meegevoerd in de roomlaag, tot een kolonie uitgegroeid. De cellen van *B. cereus* blijven bij elkaar en doen om de kolonie een roomvlok ontstaan ten gevolge van de werking van het door de cellen geproduceerde enzym lecithinase. Deze roomvlokken komen na uit-

schenken weer op de melk drijven en smelten niet bij verwarming. In Engeland waar men veel niet-gehomogeniseerde laaggepasteuriseerde melk in thee en koffie gebruikt is dit gebrek zeer ongewenst. Er is daar aan dit probleem veel onderzoek verricht; in Nederland is door Labots & Galesloot (1959) aandacht aan dit probleem gegeven. In gehomogeniseerde laaggepasteuriseerde melk komt men dit niet tegen omdat op deze melk geen roomlaag wordt gevormd. De ontwikkelingsmogelijkheden van *B. cereus* zijn daarin echter minstens even groot.

Labots et al. (1965) stelden vast dat het verschijnsel 'bitty cream' wordt veroorzaakt door wat zij noemden snel-ontkiemende sporen van *B. cereus*; dat zijn sporen die in melk bij bewaring bij 20 °C binnen een dag ontkiemen. Dergelijke sporen werden vooral in grond en mest aangetroffen. In melkbussen en op gereedschap vond men, indien daar sporen van *B. cereus* aanwezig waren, vooral sporen die een langere ontkiemingstijd nodig hadden. De voor de houdbaarheid van laaggepasteuriseerde melk en voor 'bitty cream' nadelige sporen van *B. cereus* zijn dus vooral uit grond en mest afkomstig.

Gepasteuriseerde melkprodukten

De niet-zure produkten, waarvan slagroom, vla en havermoutpap voorbeelden zijn, worden aanmerkelijk intensiever verhit dan meestal bij melk het geval is, maar indien de verhitting minder intensief geweest is dan overeenkomend met 30 min bij een temperatuur van 92 à 95 °C en geen nabesmetting heeft plaatsgevonden, is de bederfveroorzakende bacterie meestal nog wel *B. cereus*. Bij vla en pap, waarbij de hittebehandeling tevens voor de zwellen van de zetmeelkorrels moet dienen en daardoor nogal intensief is, kan het voorkomen dat geen levende *B. cereus*-sporen meer in een verpakkingseenheid voorkomen; dan kan *B. licheniformis* als bederfveroorzaker gaan optreden, hetgeen dan ook met een iets langere houdbaarheid gepaard gaat. Vroeger werd vaak heet afgevuld in flessen waardoor sporevormende bacteriën de enige waren die aan het bederf bijdroegen. Bij uitzondering werd naverhit in de fles. Tegenwoordig wordt het produkt meestal gekoeld en daarna afgevuld in eenmalige verpakkin-

gen. Daarbij is de kans op besmetting met andere dan sporevormende bacteriën groter.

Indien vla en pap niet gekoeld worden bewaard, kunnen al of niet naast *B. cereus* ook *B. licheniformis* en *B. circulans* tot ontwikkeling komen. Bij vanillevla geeft *B. licheniformis* aanleiding tot een carbolachtige geur. *B. circulans* geeft in vanillevla en enkele andere vla-soorten aanleiding tot witte vlekken, hoewel deze ook kunnen ontstaan ten gevolge van de groei van melkzuurbacteriën die door nabesmetting in het produkt zijn gekomen.

Indien melkprodukten zodanig zijn verhit dat *B. cereus*-sporen nog niet al te sterk in aantal zijn gereduceerd, tussen 7 en 25 °C worden bewaard, kan zich vooral *B. cereus* ontwikkelen. In het geval van slagroom moet men bedenken dat de groei zich tussen opkloppen en consumptie kan voortzetten.

In Nederland ondergaan produkten die als gepasteuriseerd worden verkocht, zoals vla, vaak een UHT-sterilisatie. Het gaat daarbij meer om de voordelen van het continu-werken dan om de steriliteit, hoewel het produkt direct na de hittebehandeling wel steriel is. Tijdens de enkele seconden dat het grondstoffenmengsel op hoge temperatuur komt, komt de swelling van het aan deze behandeling aangepaste zetmeel tot stand. Er wordt meestal niet-heet en niet-aseptisch afgevuld en als deze produkten bederven, geschiedt dit meestal door andere micro-organismen dan sporevormers.

Gesteriliseerde melk en melkprodukten

Voor sterilisatie worden een drietal typen behandelingen toegepast:

1. Lang-laag sterilisatie in glas, blik, polyetheen of andere verpakking. De verhitting vindt plaats tot temperaturen tussen 125 en 110 °C. De verhittingsduur is 10 min tot 1 uur. Het steriliserend effect (SE) moet 8 of hoger zijn.
2. Kort-hoog of wel UHT (ultra high temperature)-sterilisatie. De verhittingstemperatuur ligt tussen 135 en 150 °C. De verhittingsduur ligt tussen 1 seconde bij de hogere temperaturen tot enkele tientallen seconden bij de laagste temperatuur. Het SE moet 8 of hoger zijn. Hierna wordt aseptisch afgevuld.

3. Het twee-etappenprocédé waarbij het produkt eerst kort-hoog wordt voorgesteriliseerd (SE=6 of hoger) en daarna in lichte mate in de verpakking lang-laag nagesteriliseerd (SE=3 à 5). De sterilisatie in de verpakking dient slechts om sporen die na de sterilisatie en tijdens het vullen in het produkt geraken te in-activeren.

Lang-laag sterilisatie geeft veel sterilisatiesmaak. Kort-hoog-sterilisatie met eenzelfde sporedodend effect geeft dit nauwelijks. Dit wordt verklaard door de lage Q_{10} (2-3) voor chemische processen, zoals het ontstaan van verbindingen die sterilisatiesmaak veroorzaken, ten opzichte van de hoge Q_{10} (8-13) die geldt voor het doden van bacteriesporen (Pien, 1972; Perkin et al., 1977). Bij het twee-etappen-procédé dat eigenlijk alleen veelvuldig in de zuivel wordt toegepast, kan de intensiteit van de sterilisatie in de verpakking zodanig worden gereduceerd dat de nadelige chemische effecten, zoals bruinkleuring en het ontstaan van sterilisatiesmaak, tenminste kunnen worden gehalveerd.

In de zuivel wordt voor de weergave van de intensiteit van sterilisatieprocessen in plaats van met F_0 -waarden meestal met het door Galesloot (1956a, 1962) ingevoerde begrip steriliserend effect (SE) gewerkt, vooral ook doordat technieken voor een goede meting van het temperatuurverloop in het produkt tijdens het verblijf in de sterilisatieruimte nog niet algemeen beschikbaar zijn. Het steriliserend effect wordt weergegeven met de formule $SE = \lg N_1 - \lg N_2$, waarin N_1 de concentratie aan levende sporen voor de verhitting en N_2 de concentratie daarna. Als referentie worden sporen van de vrij resistente stam *B. subtilis* 125-0 genomen. Als men aanneemt dat in onverhitte melk 10 sporen per ml met eenzelfde resistentie zouden voorkomen, hetgeen al een uitzonderlijke situatie is, dan zou een verhitting met een SE van 8 ten gevolge hebben dat in 1 op 10 000 liter nog een spore zou overleven. Een steriliserend effect van 8 à 10 wordt in de zuivel, voldoende bevonden, indien alleen op mesofiel bederf behoeft te worden gelet. Het komt overeen met een F_0 -waarde van 2-2,5.

Er zijn in verschillende landen onderzoeken gedaan om na te gaan of de hitte-intensiteit bij lang-laag sterilisatie kan worden teruggebracht. Proeven van Wajid & Kalra (1976) en van Ra-daeva et al. (1974, 1975) wijzen erop dat door toevoeging van nisine in een concentratie van 100 Reading Eenheden per ml de benodigde intensiteit tot ongeveer de helft kan worden teruggebracht. Volgens Shehata et al. (1977) zou dit effect nog groter zijn. Dit zou voor het twee-etappenprocédé kunnen betekenen dat men de voorsterilisatie zou kunnen weglaten of, wat met het oog op de smaak meer zin heeft, dat men bij handhaving van de voorsterilisatie de F_0 -waarde van de nasterilisatie in de verpakking tot ongeveer 0,5 zou kunnen terugbrengen. Dit geldt voor wat betreft het bederf door mesofiele micro-organismen. Ook door voorbehandeling van de melk met waterstofperoxyde kan de intensiteit van de sterilisatie worden teruggebracht. Volgens Khalfalla et al. (1977) zou de benodigde F_0 -waarde tot ongeveer de helft worden gereduceerd door op melk of chocolademelk vooraf per liter 3 g waterstofperoxyde gedurende 30 min bij een temperatuur van 60 °C te laten inwerken. Een overzicht van de effecten van waterstofperoxyde op melkeigenschappen en melkcomponenten is recent gegeven door Santha & Ganguli (1976). Voorzover bekend worden waterstofperoxyde of nisine in de ons omringende landen niet toegepast ter beperking van de intensiteit van de hittebehandeling van melk en melkprodukten.

Wordt bij het twee-etappenprocédé afgevuld in glazen flessen, dan koelt men uit warmte-economische overwegingen na het voorsteriliseren liever niet te ver terug en vult men heet af in hete flessen. Geschiedt dit bij temperaturen tussen 45 en 75 °C, dan kan in de vulmachine en in de tussen de doorstroomsterilisator en de vulmachine aanwezige buffertank groei en sporulering van een aantal soorten sporevormende bacteriën optreden. Bij een temperatuur tussen 45 en 55 °C treden vooral *B. coagulans* en intermediaire typen van *B. coagulans* en *B. circulans* op de voorgrond (Galesloot & Labots, 1959a). Door doelmatige reiniging kan het niveau van het aantal overblijvende sporen zodanig worden verlaagd dat het bij een volgend vulproces lang duurt, voordat besmetting van enig belang met nieuw gevormde sporen optreedt.

Bij de veel toegepaste vultemperaturen tussen 65 en 75 °C treedt vooral groei op van thermofiele sporevormers. Ook na goed reinigen van regelmatig bij deze temperatuur gebruikte apparatuur herbergt deze waarschijnlijk altijd nog wel enkele van deze sporen. De groeisnelheid van deze sporevormers is groter dan van de hiervoor genoemde soorten en hernieuwde sporevorming is na 6-10 uur werken met de apparatuur een feit (Hermier, 1961). Men moet op een iets hogere temperatuur dan 80 °C gaan afvullen om besmetting met deze sporen geheel te voorkomen. De thermofiele sporevormers waarmee besmetting tijdens heet vullen kan optreden, zijn andere dan die welke in de rauwe melk voorkomen en verschillen daarvan vooral, doordat ze wel lactose kunnen fermenteren. Zij kunnen niet groeien bij temperaturen lager dan 30 °C en hun voorkomen in gesteriliseerde melk in landen met een gematigd klimaat blijft onopgemerkt (Galesloot & Labots, 1959b). Alleen als de melk na het sterilisatieproces zeer langzaam zou afkoelen, zou bederf door deze bacteriën kunnen plaatsvinden. In warme landen kan wel groei van thermofiele sporevormers optreden tijdens de distributie van de gesteriliseerde melk.

Het kan dus een gevaar betekenen bij het steriliseren volgens het twee-etappensysteem als de afgefulde voorgesteriliseerde melk sterker met sporen besmet raakt dan het lage niveau waarop men gerekend had. Dit kan ook het geval zijn, indien in retourflessen veel sporen aanwezig zijn van een bepaald type van *B. circulans* dat goed sporen kan vormen in melk.

Tijdens de distributie en bewaring van de ongeopende fles en in de melkresten in de gebruikte fles kan uitgroei en wederom sporevorming door deze bacterie optreden. Gedeeltelijk overleven de sporen het normale flessenwasproces en het is niet uitgesloten dat in de flessenwasmachine kruisbesmetting plaatsvindt. Doordat bij het twee-etappenprocédé de sterilisatie in de fles betrekkelijk licht is, kunnen gemakkelijk enkele sporen per fles overleven. Zo ontstaat een vicieuze cirkel die kan worden doorbroken door van nieuwe flessen uit te gaan, of door de flessen tweemaal achtereenvolgens te reinigen bij een temperatuur van 80 °C, waarbij de loogconcentratie wordt verhoogd tot 20 g l⁻¹. De betreffende variant van *B. circulans* verschilt van

andere stammen van *B. circulans*, doordat hij altijd onbeweeglijk is, aan de melk een carbolsmaak geeft en goed sporen vormt in melk bij 25 °C. Na bewaring gedurende een week bij deze temperatuur kan men in een microscopisch preparaat van de melk na een eenvoudige kleuring met methyleenblauw het typische beeld van deze sporevorming waarnemen (fig. 2) en Galeslout & Labots (1959a). Van deze waarneming kan men gebruik maken bij het stellen van een diagnose.

Bij het twee-etappenprocédé kan ook worden afgevuld in polyetheenflessen. Men vult deze niet bij hoge temperatuur, omdat het materiaal dan te weinig vormvast is. Iets lagere temperaturen zijn ook ongewenst, omdat dan bij bufferen en afvullen het gevaar van groei en sporulering bestaat. Men vult daarom bij 30 °C of nog lagere temperatuur. De polyetheenflessen zijn eenmalig en komen niet meer in het bedrijf terug. Indien de vulmachine voor deze flessen bovendien dagelijks goed gereinigd wordt, bestaat er weinig gevaar voor besmetting met sporen na de kort-hoog-sterilisatie.

Tegenwoordig worden veel melk en melkprodukten kort-hoog gesteriliseerd om ze vervolgens aseptisch af te vullen. Er wordt wel eens gevreesd dat in het temperatuurgebied tussen 135 en 150 °C de z-waarde hoger is dan in het gebied waarin lang-laag gesteriliseerd wordt. Onderzoek heeft op deze vraag nog geen duidelijk



Fig. 2. Melk waarin na bebroeding bij 25 °C gedurende 4 dagen groei is opgetreden van het carbolsmaak producerende type van *B. circulans*. Kleuring: methyleenblauw; vergroting 2000 x. Bron: Galeslout & Labots, 1959.

antwoord gegeven. Van een sterilisatie van netto 10 min bij een temperatuur van 115 °C, waarmee in de zuivel ter voorkoming van mesofiel bederf in de regel goede resultaten worden bereikt, is de F_0 -waarde 2,4 min. Uitgaande van een z-waarde van 11 °C kan worden berekend dat een verhitting van 4 s bij een temperatuur van 138 °C een daarmee gelijkwaardige behandeling is. Bij UHT-sterilisatie van melk en melkprodukten is een verhitting van 4 s bij 140 à 142 °C zeer gebruikelijk en overleving van sporen schijnt geen rol van betekenis te spelen. Hieruit en uit recent onderzoek van Perkin et al. (1977) lijkt te mogen worden geconcludeerd dat in het UHT-gebied de TDT-curve niet een geheel andere helling heeft. Komt in een partij UHT-gesteriliseerde produkten toch bederf door sporevormende bacteriën voor, dan moeten misschien eerder andere oorzaken in ogenschouw worden genomen, zoals onvoldoende voorsterilisatie van de apparatuur (eventueel plaatselijk, ten gevolge van vervuiling), onregelmatigheden tijdens de sterilisatie van het produkt en besmetting tijdens het verpakken. Kort-hoog sterilisatie wordt in Nederland veel bij de vlabereiding toegepast.

Er is reeds opgemerkt dat men de intensiteit van een sterilisatieproces kan vaststellen door het steriliserend effect te bepalen. Indien SE groter is dan 8 en indien voor deze meting een grote hoeveelheid melk van sporen moet worden voorzien, heeft men zoveel sporen van *B. subtilis* 125-0 nodig dat het kweken bezwaarlijk wordt. Men kan dan gebruik maken van meer resistente sporen, bijvoorbeeld van *B. stearothermophilus*, nadat eerst experimenteel de omrekeningsfactor is bepaald voor SE ten aanzien van sporen van *B. stearothermophilus* naar SE ten aanzien van *B. subtilis* 125-0. De verhouding kan bijvoorbeeld zo zijn dat een SE van 4 ten opzichte van sporen van een stam van *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* overeenkomt met een SE van 8 ten opzichte van sporen van *B. subtilis* 125-0.

Geëvaporeerde melk

Dit produkt heeft de meeste bekendheid gekregen onder de naam koffiemelk. Het bevat ongeveer tweemaal de hoeveelheid droge stof van melk en alle sporevormers kunnen er nog in groeien.

Het produkt wordt gesteriliseerd in de handel gebracht. Bij uitzondering komt bederf voor door *B. subtilis* of *B. circulans*, indien ondersterilisatie heeft plaatsgehad. Gedurende een deel van het jaar zou geëvaporeerde melk zonder toevoeging zodanig instabiel zijn, dat adequate sterilisatie niet mogelijk is. Men past echter dagelijks proefsterilisaties toe om vast te stellen hoeveel fosfaat als stabilisator nodig is. Ten gevolge van die toevoeging is het vrijwel altijd mogelijk voldoende intensief te steriliseren. Een F_0 -waarde van 2,5 lijkt ook hier voldoende te zijn. Bij het indampproces bestaat het gevaar voor groei en sporulering van thermofiele sporevormende bacteriën. Vooral bij produktie voor warme landen moet hiertegen worden gewaakt en het kan daarom nodig zijn te steriliseren tot een hogere F_0 -waarde dan 2,5.

Het aanvankelijke aantal sporen van genoemde sporevormende bacteriën kan in het gesteriliseerde produkt vanzelf afnemen. Indien bijvoorbeeld blikjes gesteriliseerde koffiemelk waarin nog levende sporen van *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* voorkomen, worden opgeslagen bij temperaturen die liggen onder de minimumgroei-temperatuur van deze sporevormer (37 °C of lager), dan valt waar te nemen dat het aantal sporen van *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* afneemt naarmate de duur van opslag toeneemt. Het kan zelfs zo ver afnemen dat de blikjes bij latere incubatie bij 55 °C niet meer bederven.

Tabel 1 geeft een voorbeeld van een proef uitgevoerd met sporen van *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* die vóór het

Tabel 1. Sporen van stam C953 van *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* per l koffiemelk die een sterilisatie van de koffiemelk hebben overleefd, direct geteld en geteld bij dezelfde temperaturen na verschillende bewaartijden. Het aantal toegevoegde sporen voor de sterilisatie bedroeg 10^9 per l koffiemelk. De tellingen zijn uitgevoerd door verdunningen te maken in lakmoesmelk. Bron: Galesloot & Hassing (niet gepubliceerd).

Bewaarperiode (weken)	Bewaartemperatuur (°C)		
	20	30	37
0	2600	2600	2600
1	210	30	20
4	40		
8	10		

steriliseren aan koffiemelk waren toegevoegd. De sterilisatie had een F_0 -waarde tussen 2,5 en 5. Duidelijk blijkt het effect van de bewaartijd en de bewaartemperatuur. Bij enting met andere stammen van deze bacterie, maar ook onder praktische omstandigheden waarbij sporen van thermofiele sporevormers vanuit de indampapparatuur in het produkt zijn geraakt, wordt de hier beschreven afsterving na het steriliseren steeds waargenomen. Voor dit verschijnsel is door Schmidt & Nank (1957) de term deactivering gebruikt, maar uitgesteld-afsterven zou een juistere benaming zijn.

Melkpoeder

De melkpoederbereiding bestaat uit twee continu verlopende, elkaar opeenvolgende processen. Het eerste, het indampen, vindt onder vacuüm plaats, waarbij na een voorverhitting van de melk de temperatuur daalt naar 70 à 80 °C, als de melk de indampinstallatie binnentreedt. Tijdens het indampproces daalt de temperatuur verder totdat de ingedikte melk bij 30 à 40 °C de installatie verlaat. Het drogen zelf geschiedt tegenwoordig door de ingedampde melk fijn te vernevelen in lucht van ongeveer 180 °C. De hittebehandeling bij het indampen is zodanig, dat van enige sporedoding nauwelijks sprake kan zijn. Bij het droogproces zelf blijft de temperatuur van de drogende vloeistof betrekkelijk laag, waardoor evenmin doding van sporen optreedt. Vandaar dat het sporengelalte in het poeder als regel overeenkomt met dat van de uitgangsmelk, wanneer men rekening houdt met de concentratiefactor. Zou men het sporengelalte van poeder om de een of andere reden willen verlagen, dan zou men maatregelen moeten nemen om besmetting tijdens de melkwinning te voorkomen. Een andere mogelijkheid is een intensivering van de voorverhitting; indien men een kort-hoog-verhitting toepast, zal het optreden van kooksmak weinig betekenis hebben. Als men poeder wil bereiden met een extra laag gelalte aan sporen van *B. cereus* is een verhitting van enkele seconden op 125 °C (Stadhouders & Hup, 1976) voldoende om de concentratie van deze sporen tot minder dan 1% van het oorspronkelijke aantal terug te brengen.

In principe zou er tijdens het indampproces een verhoging van het sporenaantal kunnen optreden, indien in enige fase van deze bewerking de omstandigheden gunstig zouden zijn en lang genoeg gehandhaafd zouden worden om sporulering van bepaalde soorten mogelijk te maken. Dit is waarschijnlijk voor de meeste sporevormers niet het geval; wel is dit verschijnsel bekend voor de melksuikeromzettende varianten van thermofiele sporevormende bacteriën. Dit is vooral van belang in omloopverdamper, omdat daar de spreiding van de verblijftijd groot is, maar ook in de moderne valstroomverdamper vindt groei en sporulering plaats, vooral indien de temperatuur tussen 55 en 75 °C ligt. Ook bij indampen van andere produkten, bijvoorbeeld zoete wei, kunnen thermofiele sporevormers naar voren komen. Tabel 2 laat zien hoe ten gevolge van het indampproces het aantal sporen van deze bacterie in het melkpoeder plotseling toeneemt. Hernieuwde reiniging van de indampinstallatie is dan noodzakelijk. Op zich is de aanwezigheid van deze sporen in produkten weinig bezwaarlijk, maar ze kunnen een probleem gaan vormen, indien poeders worden gebruikt voor de fabricage van gesteriliseerde produkten die later aan vrij hoge bewaartemperaturen zullen worden blootgesteld (bijvoorbeeld soepen).

Roeryoghurt

Yoghurt is een zuur produkt waarin geen groei van sporevormende bacteriën kan optreden. Bij de roeryoghurtbereiding wordt na het

Tabel 2. Toename van het aantal aërobe thermofiele sporevormers in melkpoeder veroorzaakt door groei en sporulering tijdens het verloop van het indampproces. Bron: Stadhouders & Hup (niet gepubliceerde gegevens).

Bemonsteringstijd (aantal bedrijfs- uren na in bedrijf- stelling)	Aantal thermofiele sporen en sporevormende bacteriën per gram poeder	
	totaal	sporen
0,25	<10	<10
6	<10	<10
9	30	<10
12	160	140
15	3100	2200

pasteuriseren van de melk (bijvoorbeeld gedurende 3 min bij een temperatuur van 90 °C) deze tot 30 à 32 °C afgekoeld en slechts zeer licht geënt, met 0,2 à 0,5 ml yoghurtcultuur per liter. Bij deze temperatuur wordt de yoghurt ook gekweekt gedurende circa 15 uur. Gedurende de eerste helft van deze periode, als de pH nog nagenoeg onveranderd is, is uitgroei mogelijk van sporen van *B. cereus* die de verhitte hebben overleefd. Er kan vervolgens een aanmerkelijke vermeerdering optreden, zelfs in die mate dat de cellen van *B. cereus* in een gekleurd microscopisch preparaat van de gerede yoghurt gevonden kunnen worden. *B. cereus* is echter dan niet meer via een telplaat aantoonbaar. Er bestaan aanwijzingen dat deze groei een brijachtige structuur en een minder fijne smaak van de yoghurt tot gevolg heeft (Galesloot & Hassing, 1973). *B. cereus* kan vooral een voorsprong op de yoghurtbacteriën krijgen, indien men na het pasteuriseren de melk enige tijd op de kweektemperatuur houdt alvorens te enten.

Kaas

In kaas kunnen in principe alleen anaërobe sporen tot ontwikkeling komen omdat de redoxpotentiaal laag is (-100 tot -150 mV). Doordat er nog verdere beperkingen zijn, namelijk de vrij lage pH en de afwezigheid van suikers, en er alleen lactaat is als energiebron, kan van de sporevormende bacteriën eigenlijk alleen *C. tyrobutyricum* tot ontwikkeling komen. Deze bacterie zet door melkzuurbacteriën uit melksuiker (lactose) gevormd lactaat om in boterzuur, koolzuurgas en waterstofgas. De sporen worden door de kaasmelkpasteurisatie niet aangetast. Indien er sporen tot uitgroei komen, gebeurt dit enige tijd na de bereiding. Ten gevolge van de gasvorming ontstaan er gaten of scheuren in de kaas en men spreekt van het gebrek 'laat-los' of 'boterzuurgisting'. Naast de term 'laat-los' wordt gebruik gemaakt van de term 'vroeg-los'; een gebrek dat direct na de bereiding van kaas kan ontstaan, indien coli-achtige bacteriën gas uit melksuiker maken op een moment dat dit laatste nog in de kaas aanwezig is.

De gasvorming bij boterzuurgisting kan zich uiten in enkele

niet zeer grote gaten tot zeer veel of zeer grote gaten en scheuren, afhankelijk van de mate waarin de gisting optreedt. De mate van gisting hangt samen met de hoeveelheid boterzuur die gevormd wordt. Kenmerkend voor de boterzuurgisting is steeds het aanwezig zijn van koloniën van *C. tyrobutyricum* in het zuivel (fig. 3), al zijn het er soms maar enkele per kaas. Deze koloniën zijn groengeel van kleur en hebben meestal een harde kern. Hun doorsnede varieert van enkele tienden van een millimeter, als er veel aanwezig zijn tot circa een millimeter als er weinig zijn. Als er op een zeker moment *C. tyrobutyricum*-sporen tot uitgroei komen, hetgeen enige dagen tot enige weken na de bereiding kan zijn, dan daalt eerst de redoxpotentiaal. Deze daling wordt enige dagen later gevolgd door de vorming van gas, het ontstaan van koloniën en verhoging van het boterzuurgehalte. Omdat er uit twee molekulen melkzuur slechts een molecuul boterzuur ontstaat en boterzuur een zwak zuur is, loopt de pH van de



Fig. 3. Koloniën van *Clostridium tyrobutyricum* in kaas waarin boterzuurgisting is opgetreden (ware grootte). Een aantal koloniën is met een pijl aangegeven. Gasvorming vindt niet altijd onmiddellijk naast de kolonie plaats.

kaas op, waardoor de pH in het centrum 0,3 hoger kan worden dan aan de rand van de kaas.

C. tyrobutyricum is de belangrijkste lactaatvergistende anaërobe sporevormende bacterie die in vele kaassoorten tot uitgroei kan komen. In silage met een hoog vochtgehalte en een niet te lage pH kunnen sporen van deze bacterie in aantallen tot 10^6 g^{-1} voorkomen, maar ook in silage van goede kwaliteit kunnen hoge aantallen gevonden worden. Het is nog onvoldoende bekend hoe groei en sporulering van *C. tyrobutyricum* in silage kan worden voorkomen. Het onderscheid tussen *C. tyrobutyricum* en *C. butyricum* is niet zeer scherp en nog onderwerp van discussie. Ook laatstgenoemde bacterie kan soms lactaat vergisten, maar als *C. tyrobutyricum* aangemerkte stammen fermenteren een geringer aantal suikers dan *C. butyricum*, meestal slechts weinig meer dan glucose en fructose (Roux & Bergère, 1977). Gibson (1965) noemt nog enkele andere steeds opgaande verschillen. *C. butyricum* is doorgaans iets zuur- en zoutgevoeliger. Het geringe verschil tussen de twee bacteriesoorten bemoeilijkt het vinden van een selectieve telmethode.

Ook al zijn sporen van *C. tyrobutyricum* in de kaasmelk aanwezig, eventueel zelfs in grote aantallen, dan hoeft dit nog niet te betekenen dat deze sporen tot ontwikkeling komen. Dit hangt namelijk af van een combinatie van de volgende factoren: sporenghalte, pH, nitraatconcentratie, zoutgehalte en bewaar-temperatuur (Galesloot, 1964). Als in een bepaalde kaas één van deze factoren zeer gunstig is voor het optreden van boterzuurgisting, moet met een of meer van de andere gecompenseerd worden om die ontwikkeling tegen te gaan. Over de verschillende factoren zal hier het een en ander worden gezegd.

- Sporenghalte van de melk. In Nederland bevat de melk meestal tussen 100 en 10 000 sporen van *C. tyrobutyricum* per l. Men kan deze concentratie door een behandeling met de bactofuge met ongeveer 98% verlagen, maar dit is onvoldoende om van nitraat-toevoeging bij de kaasbereiding geheel te kunnen afzien, zeker wanneer kuilvoer gevoederd wordt. Door melk met 500 mg waterstofperoxyde per l gedurende een half uur op 54°C te houden schijnt een reductie van circa 90% van het aantal *Clostridium*-sporen verkregen te kunnen worden (Naquib & Hussein, 1972), maar van het

effect op de sporen van *C. tyrobutyricum* zijn geen betrouwbare gegevens bekend. In ieder geval kan men door het toepassen van een waterstofperoxyde-katalasebehandeling de kans op boterzuurgisting verkleinen; een behandeling die intensief genoeg is om nitraat geheel achterwege te kunnen laten, heeft nadelige gevolgen voor de structuur van kaas. Op de boerderij ligt de oorzaak van de besmetting met de sporen vrijwel altijd in het gebruik van silage. Uit hetgeen in de inleiding van dit hoofdstuk is gezegd valt af te leiden wat men ter beperking van de besmetting kan doen, maar ook dat er bij de normale melkwinning niet gemakkelijk aan besmetting is te ontkomen. In Zwitserland bijvoorbeeld is daarom in verschillende gebieden het gebruik van silage niet toegestaan.

- pH. In figuur 4 (Galesloot, 1964) is de invloed van de pH op het moment dat de kaas 24 uur oud is op de ontwikkeling van boterzuurgisting in ongepekeld maar wel van nitraat voorziene kaas weergegeven. Het optreden van boterzuurgisting werd gevolgd door het verloop van de redoxpotentiaal te meten en het tijdstip van beginnende gasvorming vast te stellen. Galesloot (1964) geeft dergelijke figuren ook voor andere parameters, waarbij bijvoorbeeld bij de curven van links naar rechts oplopende nitraat-

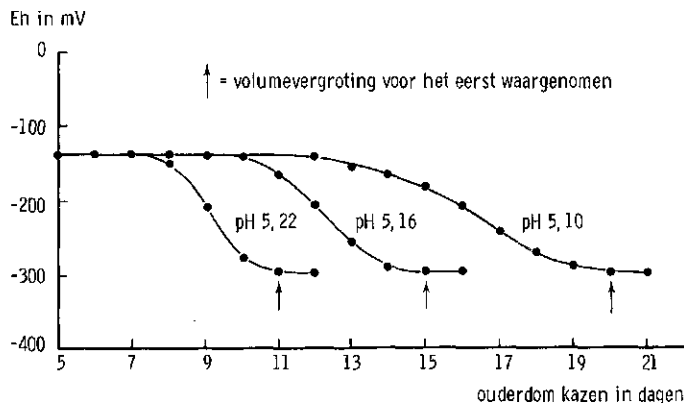


Fig. 4. Invloed van de pH (op een ouderdom van 24 uur) op het optreden van boterzuurgisting in kaas, gemeten aan het verloop van de redoxpotentiaal van ongepekeld bij kamertemperatuur bewaarde kaas. De kazen waren gemaakt uit melk die per liter 100 mg KNO_3 bevatte en waaraan circa 10 sporen van een stam van *C. tyrobutyricum* per ml waren toegevoegd.

concentraties of toenemende concentraties van sporen van *C. tyrobutyricum* vermeld staan. Tabel 3 laat de invloed van de pH na 24 uur zien op de mate van boterzuurgisting in gepekeldde kaas.

- Het zoutgehalte van de kaas. Als in normale kaas snel een zoutgehalte van circa 35 mg g^{-1} in het vocht bereikt zou zijn, dan zou boterzuurgisting zonder toepassing van nitraat niet optreden. Hierdoor kan bij de bereiding van lunchkaasjes die een gewicht van 0,5 kg hebben de hoeveelheid nitraat die wordt toegevoegd aanmerkelijk worden gereduceerd. Bij Cheddar, waar het zout aan de reeds verzuurde wrongel wordt toegevoegd, komt boterzuurgisting nauwelijks voor. Bij vele andere kaassoorten echter is toevoeging van nitraat onmisbaar. Tabel 3 laat zien hoe naast de pH ook de pekelduur invloed heeft op het optreden van boterzuurgisting.

- Nitraattoevoeging. Bij een toevoeging van NaNO_3 aan kaasmelk van 150 mg l^{-1} kan voldoende effect worden gesorteerd, indien de omstandigheden niet al te ongunstig zijn. Bij een overigens normale samenstelling van de kaas zou bij weglaten van nitraat al boterzuurgisting kunnen optreden, indien de melk 10 sporen

Tabel 3. Invloed van pH en de pekelduur van Edammer kaas van 2 kg op het ontstaan van boterzuurgisting. De kazen waren gemaakt uit melk die per 1 100 mg KNO_3 bevatte en waaraan circa 10 sporen van een stam van *C. tyrobutyricum* per ml waren toegevoegd. Bewaartemperatuur van de kaas 18°C . Mate van boterzuurgisting: 0, geen gisting; 10, zeer sterke gisting.

Proef	pH van de 24 h oude kaas	Pekelduur (h)	Zoutgehalte (mg per g droge stof)	Mate van boterzuurgisting
BG 50	5,10	48	26	2
	5,10	64	30	1
	5,10	72	37	0
	5,16	48	26	3
	5,16	64	30	2
	5,16	72	37	1
	5,22	48	26	10
	5,22	64	30	5
	5,22	72	37	4
BG 62	5,06	24	18	0
	5,20	24	18	4
	5,20	48	26	3
	5,20	72	35	2
	5,20	96	42	1

van *C. tyrobutyricum* per l bevat.

Nitraat op zich heeft geen invloed op de boterzuurgisting. Tijdens de rijping van de kaas wordt het aanvankelijk vooral door melkzuurbacteriën langzaam, maar later soms ook door andere bacteriën en dan meest sneller, omgezet in nitriet. Dit nitriet wordt voor een deel weer chemisch en/of bacterieel omgezet; het overige deel van het nitriet lijkt in zeer lage concentraties van circa 1 mg kg^{-1} in combinatie met of bevorderd door het enzym xanthine-oxidase remmend te werken op de ontkieming van *C. tyrobutyricum*. Door middel van sommige bacteriën kan nitraat te snel via nitriet verder worden omgezet en dus onwerkzaam worden; onder andere door coli-achtige bacteriën die zich eigenlijk alleen gedurende de eerste dag na de kaasbereiding kunnen ontwikkelen, als er nog melksuiker aanwezig is. Ook sommige *Lactobacillus*-soorten kunnen het nitraat te snel omzetten indien ze zich gedurende de eerste weken na de bereiding voldoende ontwikkelen. In deze gevallen kan er op zeker moment onvoldoende nitriet over zijn om ontkieming van de sporen van *C. tyrobutyricum* tegen te kunnen gaan (Nieuwenhof, 1977). Na een bepaalde tijd is nitriet niet meer nodig, omdat het zout de remmende rol overneemt. Het duurt echter enkele dagen tot een aantal weken, afhankelijk van de grootte van de kaas, voordat het zout in voldoende hoge concentratie tot in het centrum van de kaas is doorgedrongen.

- Bewaartemperatuur. Bij bewaring van kaas onder 10°C treedt geen boterzuurgisting op; bij een normale bewaartemperatuur van 15°C moet men echter met die mogelijkheid rekening houden. Bij ongekoelde bewaring is het gevaar veel groter (niet-gekoelde pakhuizen).

Er zijn onderzoeken verricht om na te gaan of andere stoffen nitraat kunnen vervangen. Lysozyme of eiwit van kippeieren en nisine bleken alternatieven. Proeven van Wasserfall (1976) toonden aan dat boterzuurgisting in veel gevallen zal kunnen worden tegengegaan indien per ml kaasmelk 550 Eenheden lysozyme worden toegevoegd als zuiver enzym of in de vorm van een toevoeging van kippeiwit, terwijl goede kaas kan worden verkregen. Deze behandeling is echter kostprijsverhogend.

Nisine kan worden toegepast in een concentratie van circa

15 Reading Eenheden per ml kaasmelk, waardoor de kaas circa 50 Reading Eenheden per gram zal bevatten. Hierdoor kan boterzuurgisting worden voorkomen (Lipinska et al., 1975), waarschijnlijk alleen indien andere factoren niet te gunstig zijn voor boterzuurgisting en nisine niet door andere bacteriën wordt afgebroken. Het ligt misschien eerder voor de hand bij de bereiding gebruik te maken van een nisinevormend zuursel, alleen of in combinatie met een ander nisine-resistent zuursel. Een nisinevormend zuursel is steeds een reincultuur en men moet bij het gebruik ervan maatregelen nemen om besmetting met bacteriofagen te voorkomen. Kaas bereid met uitsluitend nisinevormend zuursel kan worden toegepast als grondstof voor nisinebevattende smeltkas, meestal geschiedt dit in combinatie met andere kaas, omdat het nisinegehalte in de smeltkas lager kan zijn dan dat van met nisinevormend zuursel gemaakte kaas meestal is. Bij de bereiding van nisinehoudende kaas is pasteurisatie van de kaasmelk noodzakelijk. Men moet tevens meer dan de gebruikelijke hygiëne betrachten bij het kaasmaken. Dit is nodig teneinde besmetting te voorkomen met melkzuurbacteriën die in staat zijn in de kaas te groeien en nisine af te breken (Galesloot, 1956b).

Zoals reeds eerder in deze paragraaf is opgemerkt is nog geen voldoende selectieve methode gevonden om *C. tyrobutyricum* te tellen. In veel gevallen kan men gebruik maken van een methode waarbij men sporen van zogenaamde lactaatvergistende clostridia telt, waarbij men mogelijk een deel van de sporen van *C. butyricum* meetelt. Maar juist in monsters waarin *C. tyrobutyricum* in overmaat voorkomt, zoals in kuilvoer en mest, en melk van koeien die met kuilvoer gevoederd worden, is dat meestal geen bezwaar en voldoet deze methode goed. Er wordt gebruik gemaakt van melk waaraan 5 mg glucose per ml is toegevoegd en waarvan de pH door toevoeging van 2 mg melkzuur per ml tot 5,5 is verlaagd teneinde de groei van andere *Clostridium*-soorten dan de twee hier genoemde tegen te gaan. Na enten met hoeveelheden van het te onderzoeken monster of verdunningen ervan wordt verhit tot 75 à 80 °C. Gebruik van paraffine zorgt voor anaërobe afsluiting. Na bebroeden wordt nagegaan of zich duidelijk gas heeft ontwikkeld

en of bij aanzuren met zwavelzuur een boterzuurgisting wordt waargenomen (Pette & Sjollem, 1951; FNZ, 1962). Bij de proef van Weinzirl, die in buitenlandse literatuur vaak wordt vermeld en waarbij geen aanzuring plaats vindt, telt men ook sporen van andere anaërobe boterzuur- en rottingsbacteriën mee, terwijl *C. tyrobutyricum* door het afwezig zijn van een vergistbare energiebron vaak aan de waarneming zal ontsnappen. Er zijn voor het tellen van lactaatvergistende boterzuurbacteriën ook andere meer verfijnde media beschreven waarin alleen lactaat als energiebron gebruikt wordt. Men voegt vaak circa 5 mg acetaat per ml toe; deze stof doet dienst als waterstofacceptor bij de fermentatie van lactaat. De literatuur aangaande de eigenschappen van *C. tyrobutyricum* in relatie tot andere boterzuurbacteriën is recent besproken door Bergère & Hermier (1970).

Smeltkaas

Hetgeen in deze paragraaf over smeltkaas wordt uiteengezet is hoofdzakelijk afkomstig uit werk van Galesloot (1975). In normaal bereide smeltkaas zijn de omstandigheden voor de ontwikkeling van anaërobe sporevormers gunstiger dan in kaas, omdat doorgaans de pH en het vochtgehalte hoger zijn en ten gevolge van het laatste het zoutgehalte lager. Toch is als regel ontwikkeling van niet meer dan drie soorten mogelijk, namelijk *Clostridium tyrobutyricum*, *C. sporogenes* en *C. tetanomorphum* (Galesloot, 1961). In de literatuur uit andere landen worden nog wel enkele andere *Clostridium*-soorten als bederfveroorzakers genoemd (Hobrecht, 1975).

Toch is smeltkaas vooral ten gevolge van de nog tamelijk lage pH en het nog vrij hoge gehalte aan keukenzout en 20 à 30 mg smeltzouten per gram waarvan polyfosfaten nog een extra remming van de bacteriegroei geven, geen gunstig medium voor de sporen die zich hierin nog wel kunnen ontwikkelen. Vandaar dat van de sporen van de soorten die zich in smeltkaas zouden kunnen ontwikkelen slechts een klein gedeelte tot ontwikkeling komt.

De duurzaamheid van halfconserven, zoals smeltkaas, wordt eigenlijk bepaald door de lengte van de periode in welke de sporen nog niet ontkiemen. Eenmaal ontkiemd groeit een spore vrij snel

(in enkele dagen) uit tot een kolonie. De groeisnelheid na het ontkiemen zal slechts in geringe mate afhangen van de remmende eigenschappen van het produkt. Figuur 5 laat een en ander schematisch zien. De duur van de dormancy die voorafgaat aan de ontkieming, wordt sterk bepaald door de produkteigenschappen en daarnaast, doch in veel mindere mate, door het aantal sporen dat aanwezig is. De bewaarstemperatuur heeft een grote invloed.

In smeltkaas waarvan de groeiremmende eigenschappen voor wat betreft de sporevormende bacteriën gering zijn, treedt uiteraard snel bederf op. In zulke gevallen bederven alle verpakkingseenheden nagenoeg gelijk en worden er in de kaas veel koloniën gevormd. Dit beeld verandert als de produkteigenschappen voor de bacteriegroei ongunstiger worden. Dan worden er per eenheid slechts een of enkele koloniën gevormd en het aantal

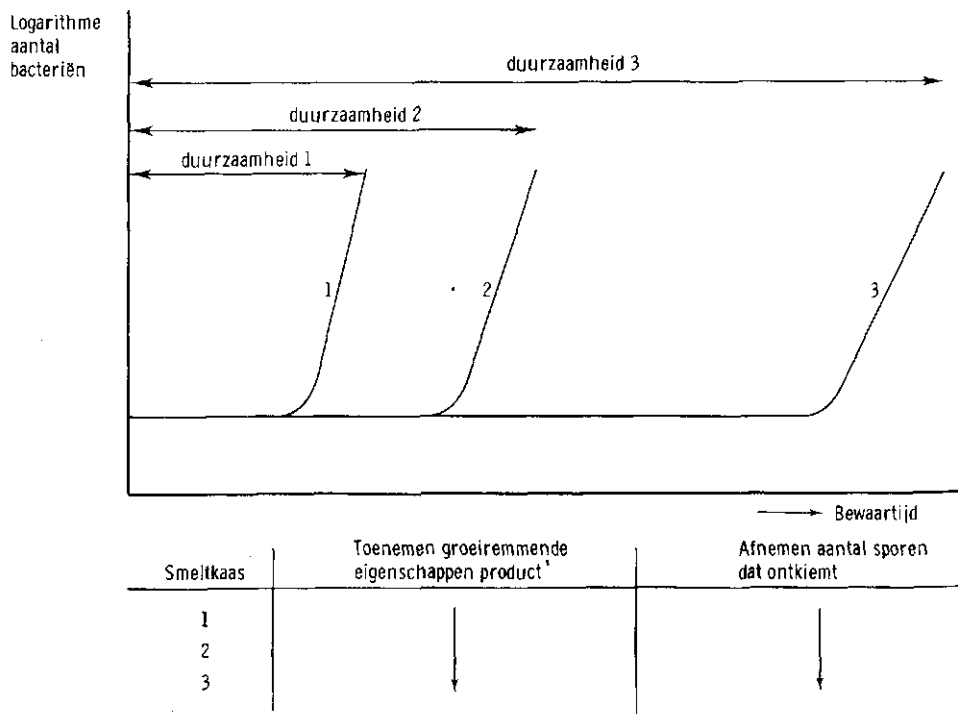


Fig. 5. Schematische weergave van het verband tussen duurzaamheid van smeltkaas, de rustperiode van sporen en snelheid van bacteriegroei na ontkieming van de sporen.

eenheden dat bederft neemt langzaam toe met de bewaartijd. Als de produkteigenschappen voor de bacteriegroei nog ongunstiger worden dan duurt het uiteraard nog langer voor het bederf begint en dan verloopt ook het voortschrijden van het bederf trager. Bij nog ongunstiger produkteigenschappen ontstaat de situatie dat in lang niet alle eenheden meer een spore aanwezig is die, ook bij zeer lange bewaring, kan ontkiemen. Tenslotte kan het produkt zo zijn dat geen enkele eenheid zal bederven, ook niet bij een hoge bewaartemperatuur.

De produkteigenschappen bepalen echter niet alleen snelheid en omvang (deel van een partij) van het bederf maar ook in zekere mate welke sporevormende bacterie naar voren komt. *C. tyrobutyricum* is het best bestand tegen een lagere pH. *C. tetanomorphum* komt relatief het sterkst naar voren in kazen met een lage wateractiviteit. *C. sporogenes* heeft voor zijn ontwikkeling een hoge wateractiviteit en een hoge pH nodig. Daar staat tegenover dat deze bacterie het best bestand is tegen polyfosfaat en eventueel toegevoegde nisine. Bewaring bij niet al te hoge temperaturen (lager dan 30 °C) doet *C. tyrobutyricum* sterker naar voren komen; temperaturen tussen 30 en 40 °C bevorderen beide andere soorten.

Indien de temperatuur bij het smeltproces niet hoger is dan voor het smeltproces op zich nodig is, worden nauwelijks sporen gedood. Door echter de smelt extra te verhitten kan men sporen doden, maar, hetgeen ook belangrijk is, ze een zodanige hittebeschadiging geven dat deze een aanvulling kan vormen op de produkteigenschappen. Om dezelfde reden kan men naverhitting in de verpakking toepassen, waarbij men ook nog een invloed kan uitoefenen op sporen die bij het vullen in het produkt geraken. Het effect op geur en smaak van smeltkaas is zodanig dat men er naar moet streven de intensiteit te minimaliseren. Het meest effectief en het minst nadelig voor de smaak is een verhitting van de smelt in doorstroming gedurende bijvoorbeeld 1 min op een temperatuur van circa 110 °C. Er is ook apparatuur ontwikkeld voor UHT-sterilisatie van de smelt tot 140 °C (Mann, 1974, 1975).

Naverhitting van in blik verpakte smeltkaas wordt wel toegepast, indien het produkt aan een hoge bewaartemperatuur geduren-

de lange tijd zou kunnen worden blootgesteld, een eis die soms wordt gesteld voor smeltkaas bestemd voor militaire voorraden. Er behoeft weliswaar geen sterilisatie plaats te vinden, maar de sporen moeten een zodanige verhitting ondergaan dat er geen ontkieming bij de gegeven produktomstandigheden plaats kan vinden. Een verhitting waarbij een temperatuur van circa 105 °C in de kern van de smeltkaas wordt bereikt is meestal voldoende. Bij het toepassen van deze naverhitting dient men erop te letten dat de vereiste temperatuur in de kern van alle blikken wordt bereikt en het kan daartoe nodig zijn de eerst afgefulde blikken zodanig te bewaren, bijvoorbeeld in water met een temperatuur gelijk aan de afvultemperatuur, dat alle blikken met een gelijke temperatuur in de autoclaaf gaan.

Voor snijdbare smeltkaas geeft tabel 4 enkele combinaties van produkteigenschappen en verhittingstemperaturen die onbeperkte houdbaarheid ook bij bewaring onder tropische omstandigheden opleveren. Voor een lokale markt kunnen minder hoge eisen gehanteerd worden. De wetenschap dat de smeltkaas, vermeld in tabel 4 houdbaar is, berust op proefondervindelijke ervaring die is opgedaan met langdurige bewaarproeven. Een andere methode is er eigenlijk niet en dat komt doordat men de bederfveroorzakende sporevormers niet anders versneld kan activeren dan door de bewaartemperatuur tot 30 à 37 °C op te voeren. Men kan niet zijn toevlucht nemen tot overenten in een voedingsmedium met gunstiger eigenschappen, maar dient de sporen in hun milieu te houden, omdat juist dit bepaalt welke en hoeveel sporen er tot ontwikkeling kunnen komen.

Er kunnen ook minder houdbare smeltkaasconserven dan de hier beschrevene worden bereid. Zo is smeerbare smeltkaas door zijn hogere vochtgehalte en hogere pH in principe minder houdbaar dan snijdbare. Hobrecht (1975) spreekt over smeltkaas in tubes die een pH van 5,8 tot 6,1 bezit. Behalve dat de smelt gedurende 1 min op 108 °C wordt verhit, vindt nog een naverhitting op 117 °C gedurende 3,5 min plaats.

Bij het bereiden van smeltkaas wordt soms nog enig melk- of weipoeder toegevoegd. Over het effect van deze toevoeging op aard en snelheid van bederf is weinig bekend. Toevoegingen van plantaardig materiaal kunnen een enigszins nadelige invloed op

Tabel 4. Produkteigenschappen en hittebehandelingen die resulteren in een onbeperkt houdbare smeltkaas (480 mg vet per g droge stof, normaal gehalte aan keukenzout, 20-25 mg smeltzout per g smeltkaas).

Smelt- kaas	Kaas bereid uit al of niet met de bacteriële be- handelde melk	Smelt- temperatuur (°C)	pH	Smeltzout	Nisine toegevoegd (Reading eenheden per g)	Vochtgehalte (%) ¹	Bereikte kern- temperatuur in blik indien na- verhitting plaats vindt (°C)
1	-	80	5,4	polyfosfaat	-	50	-
2	-	80	5,4	citraat	150	50	-
3	-	80	5,5	polyfosfaat	150	50	-
4	+	80	5,5	citraat	-	50	-
5	+	80	5,5	polyfosfaat	-	59	-
6	-	80	5,6	polyfosfaat	-	50	93
7	-	80	5,5	citraat	150	50	97
8	-	80	5,5	polyfosfaat	-	50	104
9	-	80	5,5	citraat	-	50	104
10	-	90	5,5	polyfosfaat	-	47	-

1. 50% Vocht betekent dat het vocht circa 35 mg keukenzout per g bevat.

59% Vocht betekent dat het vocht circa 25 mg keukenzout per g bevat.

de houdbaarheid van smeltkaas hebben, ook al zouden deze toevoegingen steriel zijn. Pulay (1974) maakte aannemelijk dat de oorzaak kan liggen in de in toevoegingen aanwezige suikers.

Een voorwaarde voor hetgeen hiervoor is gezegd, is dat de smeltkaas verpakt wordt in een goed gesloten, voor zuurstof ondoorlaatbare verpakking. De gesmolten kaas moet heet in de verpakking gebracht worden, zodat eventuele besmetting met niet-sporevormende bacteriën die anaëroob in de kaas zouden kunnen groeien, zoals sommige *Lactobacillus*- en *Pediococcus*-soorten en vertegenwoordigers van de familie Micrococcaceae, wordt te niet gedaan.

Men kan in smeltkaas en in de grondstoffen sporen van gasvormende anaërobe sporevormende bacteriën tellen. Hiervoor zijn methoden beschreven. Men kan, al of niet na suspenderen van het produkt, hoeveelheden smeltkaas van 1 gram en minder brengen in een glucose bevattend vloeibaar groeimeidium voorzien van een Durhambuisje. Het Reinforced Clostridial Medium van Hirsch & Grinsted (1954) is hiervoor geschikt. Na anaëroob afsluiten en bebroeding bij 37 °C beoordeelt men op duidelijk waarneembare gasvorming. Indien men meervoudige hoeveelheden bebroedt, kan men het 'most probable number' vaststellen. De uitslag moet echter beoordeeld worden in samenhang met de samenstelling (produkt-eigenschappen) en de toegepaste verhitte van de smeltkaas. De aanwezigheid van vrij veel sporen in smeltkaas 1 en 2 uit tabel 4, bijvoorbeeld 20 per gram kaas, is nauwelijks van belang; een aantal van 5 per gram in kaas 4 en 5 zou echter betekenen dat de kaas een slechte houdbaarheid heeft, omdat de houdbaarheid bij smeltkaas 4 en 5 meer berust op het verlaagde aantal sporen dan op ongunstige produkteigenschappen.

SPORULERING TEN GEVOLGE VAN FABRICAGEPROCESSEN OF IN PRODUCTEN

Een aantal proces- of produktomstandigheden waarbij groei en/of sporulering van sporevormende bacteriën kan optreden zijn reeds aan de orde gekomen bij de bespreking van gesteriliseerde melk, geëvaporeerde melk, melkpoeder, yoghurt en kaas. De vorming van sporen in produkten kan ook consequenties hebben voor andere

produkten die daaruit weer bereid worden. Zo moet kaas, welke boterzuurgisting vertoont ongeschikt worden geacht voor de bereiding van smeltkaas omdat de gevormde koloniën van *C. tyrobutyricum* vaak veel sporen bevatten.

Een nog ongenoemd verschijnsel is dat *B. cereus* in apparatuur sporen kan vormen. Donovan (1959) en later ook Labots et al. (1965) vonden soms hoge aantallen sporen van *B. cereus* in minder doelmatig gereinigde melkbussen. De aantallen konden zodanig hoog zijn dat de melk per ml met 25 sporen kon worden besmet. *B. cereus* kan tijdens rustperioden in apparatuur gaan groeien en sporuleren. Zo kan een platenpasteur aanleiding geven tot een besmetting van 10 sporen per ml melk. Als deze besmetting optreedt, is deze het grootst na een rustperiode van enkele dagen en kan door dagelijks gebruik en reiniging weer afnemen. Kennelijk vormen moeilijk bereikbare plaatsen, misschien spleten in of bij pakkingen, een reservoir voor deze sporen. Het is bekend dat de meeste aërobe sporevormende bacteriën, ook *B. cereus*, moeilijk of niet tot sporulering komen in melk. Donovan (1959) nam waar dat *B. cereus* goed sporen vormde in een mengsel van één deel melk op 50 delen water en dat een goede luchttoetreding daarbij bevorderend werkte. Aan deze voorwaarden zal in apparatuur plaatselijk worden voldaan, daar waar de reiniging door aanwezigheid van moeilijk bereikbare plaatsen onvoldoende is geweest. Door een pasteur gedurende rustperioden met de gebruikte reinigungsoplossing te laten staan wordt sporulering voorkomen.

Volgens Pette & Sjollem (1951) zouden *C. tyrobutyricum*-sporen gevormd kunnen worden in anaërobe resten van melkproducten in ondeugdelijk gereedschap. Ook in buitenlandse literatuur wordt een dergelijke gedachte wel geopperd. Cijfers die deze beweringen staven, worden echter niet gegeven.

In het voorgaande zijn slechts bekende voorbeelden behandeld. Het moet niet uitgesloten worden geacht dat er ook andere situaties zijn waaronder bepaalde aërobe of anaërobe sporevormers tot groei en sporulering zouden kunnen komen. Men dient hierop bedacht te zijn.

HET AANTONEN VAN SPOREVORMENDE BACTERIËN EN DE STERILITEITS- CONTROLE VAN GESTERILISEERDE OF GEAPPERTISEERDE ZUIVELPRODUKTEN

Om aan te tonen of bederf van zuivelprodukten door sporevormende bacteriën heeft plaatsgehad en om de veroorzaker van het bederf te isoleren, zij verwezen naar de bijdrage van Michels: 'Het bepalen van sporevormende bacteriën in voedingsmiddelen'.

Wat betreft de steriliteitscontrole van gesteriliseerde melk heeft Galesloot (1959) aangetoond dat een bebroeding van het gesteriliseerde produkt gedurende 5 dagen bij 30 °C reëler is dan een bebroeding van 3 dagen bij 37 °C, tenminste indien men produceert voor markten voor landen met een klimaat als in Nederland. Bij bebroeding bij 37 °C zou men facultatief thermofiele sporevormers mede bepalen, maar bederf door deze speelt in dit klimaat geen rol. Niet-steriliteit van in de verpakking gesteriliseerde melk en melkprodukten wordt meestal veroorzaakt door sporevormers die de sterilisatie hebben overleefd, al komt lekagebederf door niet-sporevormende bacteriën voor. Bij UHT-gesteriliseerde en aseptisch verpakte melk en melkprodukten komt bederf door niet-sporevormers naar verhouding frequenter voor. Voor de steriliteitscontrole van deze produkten is bebroeding van het produkt bij 30 °C het meest op zijn plaats, al onderkent men daarmee niet alle eventuele schimmel- en gistinfecties. Bij UHT-produkten is het noodzakelijk per partij honderd tot enkele honderden eenheden te onderzoeken. Uit oogpunt van werkbesparing is het praktischer van het bebroede produkt een kleine hoeveelheid van 0,01 à 0,001 ml op een voedingsbodem af te strijken en deze dan weer bij 30 °C te bebroeden, dan een telplaat te maken van het bebroede produkt. Langeveld et al. (1976) toonden aan dat deze afstrijkmethode aanmerkelijk betrouwbaarder is dan een beoordeling op visueel of organoleptisch waarneembare veranderingen.

Het is nog een open vraag of bij UHT-behandelde produkten in sommige gevallen zou moeten worden gecontroleerd op aanwezigheid van anaëroob bederf. Soms wordt namelijk na de UHT-behandeling het produkt gekoeld via een vacuümkoeler, waarna het kan worden verpakt in een voor gas ondoorlaatbare verpakking zonder kopruimte. Betreft het dan ook nog een produkt dat een zeker

zuurstofopnemend vermogen vertoont, zoals cacaohoudende producten, dan moet groei van anaërobe bacteriën, indien aanwezig, mogelijk worden geacht. Bederf van in een verpakking met kopruimte verpakte UHT-behandelde chocolademelk door een anaërobe sporevormende bacterie is door Langeveld al eens waargenomen.

Voor controle van de steriliteit van andere zuivelprodukten die geen intrinsieke remmende factoren hebben, zoals koffiemelk en vla, geldt hetzelfde als hierboven is gesteld. Anders ligt het bij het vaststellen of halfconserven met ingebouwde remmende factoren, zoals smelткаas, voldoende geappertiseerd of voldoende houdbaar zijn. Een benadering van een dergelijk produkt is aan de orde gekomen in de paragraaf over smelткаas (p. 175).

Sporevormende bacteriën in tuinbouwprodukten

E. Steinbuch, Sprenger Instituut, Wageningen

INLEIDING

Groenten en fruit zijn reeds bij de oogst besmet met grote aantallen en verschillende soorten micro-organismen. De mate en de soort van besmetting hangt nauw samen met de produktie-methoden van landbouwgewassen, namelijk in, op of boven de grond. Besmetting met bodemorganismen, waartoe verscheidene sporevormende bacteriën gerekend worden, vindt voornamelijk plaats bij produkten, die met gronddelen in aanraking komen, zoals bol-, knol-, wortel- en laaggroeiende gewassen. Daarentegen komen op aan hoogstam groeiende vruchten andere organismen voor, zoals schimmelsporen.

In het algemeen zijn sporevormende bacteriën nauwelijks van betekenis bij de houdbaarheid van verse groenten en fruit. De weinig optimale vermeerderingsomstandigheden voor deze organismen zoals het milieu en de lage opslagtemperaturen, spelen hierbij een overwegende rol. Een uitzondering hierop is de waarneming van Assnani et al. (1971); zij constateerden dat de sponsachtige structuur van mangovruchten veroorzaakt wordt door verschillende *Bacillus* soorten, zoals *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. macerans* en *B. megaterium*.

De geaardheid van de groentesoort bepaalt welke oogst- en voorbewerkingsmethoden toegepast moeten worden om het eindprodukt in de gewenste vorm te brengen. De verwerkingslijnen van een viertal groenten zoals schematisch aangegeven in figuur 1, tonen dit duidelijk aan.

Bij de industriële verwerking van groenten dient men er rekening mee te houden dat de machinale oogstmethoden bijdragen tot een sterke verontreiniging van het aangevoerde verse produkt met grondresten en andere vreemde bestanddelen. Bovendien treden bij machinaal geoogste groenten kneuzingen en beschadigingen

Fig. 1. De schematische verwerkingslijn van enkele groenten in blik (en glas).

	Produkt			
	doperwten tuinbonen	sperzie- bonen	spinazie	wortelen
Mechanisch oogsten	maaien en dorsen	plukken	maaien	rooien
Eventueel opslag (koeling)	enige uren	enige dagen	enige uren	enige dagen
Wassen	X	X	X	X
Schillen				X
Sorteren	X	X		X
Blancheren	X	X	X	X
Koelen	X	X		X
Wolven			X	
Afvullen	X	X	X	X
Sluiten	X	X	X	X
Steriliseren	X	X	X	X
Koelen	X	X	X	X
Opslag	X	X	X	X

op waarbij celvocht vrijkomt; vooral bij hogere temperaturen kunnen micro-organismen, waaronder sporevormende bacteriën, zich dan snel ontwikkelen. Dergelijke verschijnselen doen zich voornamelijk voor in gedorste doperwten en in ladingen gemaaide spinazie en andere bladgroenten.

Het grote aantal besmettende organismen bij knol- en wortelgewassen wordt tijdens de voorbereiding in belangrijke mate teruggebracht. Industriële schilmethoden met loog of stoom worden toegepast voor een afdoende verwijdering van de opperhuid en de daarop nog aanwezige grondresten; dergelijke behandelingen kunnen bovendien bijdragen tot het doden van micro-organismen.

De snelheid van het verwerkingsproces, met name in relatie tot de daarbij heersende temperaturen, is belangrijk in verband met de vermeerderingsmogelijkheden van sporevormende bacteriën. Na het stoomschillen, loogschillen en het blancheren kunnen de

groei-omstandigheden voor sporevormende bacteriën bijzonder gunstig zijn. Indien als gevolg van stagnatie in de verwerkingslijn een hogere temperatuur gedurende enige tijd gehandhaafd blijft, kan door een snelle vermenigvuldiging van deze organismen zowel voor als na het sterilisatie- of pasteurisatieproces bederf ontstaan.

De geaardheid van groenten en fruit maakt de toepassing van geavanceerde sterilisatieprocessen, zoals bij melk, niet mogelijk. Conventionele hittebehandelingen die noodzakelijk zijn voor het vernietigen van thermoresistente bacteriesporen, beïnvloeden de kwaliteit van het eindproduct in belangrijke mate. Methoden die ertoe kunnen bijdragen dat de sterilisatieomstandigheden gematigd zijn, bijvoorbeeld het gebruik van conserveermiddelen, zoals sulfiet (in het verleden bij gesteriliseerde bloemkool toegepast) en nitraat (zoals bij vleeswaren), zijn niet toegestaan. Bestraling en de toevoeging van antibiotica vinden (nog) geen praktische toepassing.

FACTOREN DIE DE INITIËLE BACTERIESPORENBESMETTING IN GROENTE- EN FRUITPRODUKTEN BEPALEN

Grondstof en wasproces

Het gehalte aan bacteriën in de grond bedraagt ongeveer 10^8 - 10^9 g^{-1} ; hierbij inbegrepen is het gehalte bacteriesporen (10^4 - 10^7 g^{-1}). Uit deze cijfers blijkt duidelijk hoe belangrijk het is de te steriliseren of te pasteuriseren groente- en fruitprodukten vooraf intensief schoon te maken en te wassen. Doyle et al. (1958) hebben vastgesteld dat er een duidelijk verband bestaat tussen de verontreiniging van tomaten met gronddelen en het aantal sporen van het 'flat-sour'-type in het gebruikte waswater. De term 'flat sour' heeft betrekking op de aard van het bederf dat deze organismen in groente- en fruitconserven kunnen veroorzaken en dat hoofdzakelijk gekenmerkt wordt door zuurvorming zonder gasproductie. Het is daarom belangrijk dat er een voldoende aanvoer is van vers water voor het wassen van de produkten en voor de verversing van het waswater, teneinde de concentratie van bacteriesporen zo laag mogelijk te houden.

Ook voor het tegengaan van de ontwikkeling van *Clostridium pasteurianum* op tomaten hebben Bowen et al. (1954a) gewezen op de grote betekenis van een efficiënt wasproces.

Uit onderzoek naar de invloed van het wassen op het kiemgetal van bladgroenten en doperwten blijkt dat de initiële infectie van deze produkten door een wasproces slechts met een factor 3 à 20 kan verminderen (tabel 1). Het effect van het wassen op het kiemgetal komt overigens overeen met de invloed ervan op de sporenconcentratie. Mercer et al. (1958) wijzen op de resultaten van een onderzoek bij tomaten door de National Canners Association (NCA) in de Verenigde Staten waaruit duidelijk blijkt dat de mate van verontreiniging van het waswater in verband staat met de mate van besmetting met bacteriesporen. De cijfers uit tabel 2 tonen aan dat door een onvoldoende verversing van het waswater het produkt na het wassen bacteriologisch meer verontreinigd is dan daarvoor.

Tabel 1. Effect van het wassen op het kiemgetal van enige groenten. Bron: Steinbuch (1974a).

Groente	Kiemgetal (aantal $\times 10^6$)	
	voor het wassen	na het wassen
Gesneden andijvie	33	2
Doperwten	180	30
Spinazie	26	7

Tabel 2. Bacteriesporenconcentraties op tomaten vóór en na dompeling in waswater met een toenemende verontreiniging. Bron: Mercer et al. (1958).

Concentratie drogestof in het waswater (mg l ⁻¹)	Aantal sporen van het type boterzuurvormende bacteriën per kg tomaten		
	voor het wassen	na het wassen	verschil (%)
1,329	363	51	-86
1,769	242	33	-86
2,795	95	167	75
3,215	242	359	48
4,220	365	805	120

Knock (1954) heeft gevonden dat het kiemverlagend effect van een industrieel wasproces bij sterk met 'flat sour'-organismen besmette doperwten teleurstellend is; het aantal 'flat sour'-sporen daalt daarbij slechts van 673 tot 266 per 300 gram doperwten. Hieruit blijkt zeer duidelijk dat doperwten na het dorren zeer snel verder verwerkt moeten worden, teneinde groei van 'flat sours' te voorkomen en bederf in het eindprodukt te beperken.

Bij een produkt zoals asperges dient het wassen met nauwgezetheid plaats te vinden. Mercer et al. (1960) wijzen erop dat bij het uitgroeien van de aspergestengels door de bodem grondresten achter de schubjes blijven zitten die moeilijk zijn te verwijderen.

Bij ongewassen verse groenten dient men er terdege mee rekening te houden, dat in de daarop aanwezige grondresten sporevormende bacteriën aanwezig zijn. Zo is in de Verenigde Staten gebleken dat champignons besmet kunnen zijn met *Clostridium botulinum*. Voorzover verse champignons in plastic zakjes verpakt worden, adviseren Sugiyama & Yang (1975) verpakkingsmaterialen toe te passen die een zodanige zuurstofevenwichtsconcentratie opleveren dat ontkieming en groei van *Clostridium botulinum* is uitgesloten.

Blancheren

Blancheurs spelen een belangrijke rol bij de besmetting van het produkt met thermofiele bacteriesporen. Hoogzand (1969) wijst erop dat temperaturen van 95 - 100 °C te laag zijn voor de vernietiging ervan en dat tijdens het blancheren het aantal thermoresistente bacteriesporen vrijwel gelijk blijft. Een gevaarlijk verschijnsel echter is de mogelijke toeneming van het aantal thermofiele bacteriesporen in de blancheur.

Tijdens het blancheren van groenten blijven oplosbare bestanddelen, zoals suikers en zouten, in de apparatuur achter; ze vormen een uitstekende voedingsbodem voor *Bacillus stearothermophilus*. Thermofiele organismen kunnen zich ontwikkelen aan de binnenzijde van continu werkende blancheurs boven het waterniveau, voornamelijk indien koude lucht kan toetreden

en ter plaatse temperaturen van 50 - 60 °C heersen. Deze temperaturen zijn optimaal voor de ontwikkeling van thermofiele 'flat sour'-organismen en kunnen de mate van besmetting van het geblancheerde produkt enorm verhogen (Hoogzand, 1969).

Hoogzand (1969) geeft vervolgens aan dat een toename van thermofiele bacteriesporen in de blancheur wordt voorkomen, indien alle onderdelen voldoende verhit blijven, bijvoorbeeld door stoominspuiting in de luchtruimte. Bovendien dient de terugvloeiende gecondenseerde waterdamp uit de afvoerpijp niet in het blancheerwater terecht te komen. Zowel vóór als na het blancheren dienen de groenten besproeid te worden met water van een uitstekende kwaliteit, bijvoorbeeld in een staaftrommelwasser, teneinde nabesmetting van het geblancheerde produkt uit te sluiten.

Het vermalen (wolven) van bladgroenten

Een complicatie kan optreden bij de verwerking van nitraatrijke groenten tot een puree, zoals spinazie. Drexler (1965) heeft aangetoond dat bepaalde aërobe sporevormers nitraatreductie in spinazie veroorzaken. Bij het blancheren worden de vegetatieve organismen in de grondstof weliswaar gedood, maar de sporen die de warmtebehandeling overleven, kunnen zich optimaal ontwikkelen, wanneer de temperatuur van de geblancheerde spinazie daalt. De vers aangevoerde spinazie wordt als gevolg daarvan bovendien continu geïnfecteerd. De reductie van NO_3 tot NO_2 en verder tot NO kan zich nog voortzetten tijdens de opwarmfase van de blikken in de autoclaaf. Afhankelijk van de mate van NO/NO_2 -gasvorming zal enig vacuumverlies of zelfs bombage van de blikken ontstaan gepaard gaande met bruine verkleuring van het produkt.

Aangezien deze bacterie-ontwikkeling bij temperaturen van 30-50 °C optimaal is, heeft men geconcludeerd dat het hier om een mesofiel organisme gaat. Ter vermijding van dergelijke bombage dient de spinazie tussen blancheren en steriliseren een temperatuur van 75-80 °C te behouden en snel verwerkt te worden.

Op de vraag welke *Bacillus*-soorten van belang zijn voor de nitraatreductie in spinazie is nog geen eensluidend antwoord gegeven. Uit Frans onderzoek (Anon., 1970) zou gebleken zijn

dat de NO-vorming een gevolg is van thermische dissociatie: het gasvormige NO ontstaat tijdens de sterilisatie uit nitriet dat door micro-organismen is gevormd, met name *Bacillus cereus*. Hawat & Achtzehn (1971) constateren echter dat ook bij kamertemperatuur NO-vorming kan plaatsvinden in nitraathoudende spinazie die met *Bacillus cereus* is geënt.

Van *Bacillus subtilis* is geconstateerd dat dit wel in spinazie groeit, maar geen nitriet vormt. Daarentegen heeft Put (pers. meded.) vastgesteld dat *B. subtilis* en *B. licheniformis* een zeer belangrijke rol spelen bij de nitraatreductie in spinazie en andere groene bladgroenten, zoals andijvie. Nitraat bevordert bovendien de groei van deze organismen.

Nitrietvorming die bij de verwerking van bladgroente tot diepvriesprodukt heeft plaatsgevonden, kan niet visueel worden geconstateerd, doordat na het blancheren geen verhitting meer plaatsvindt waardoor de bruine verkleuring, die een indicator kan zijn voor nitrietvorming, niet plaatsvindt. De industrie stelt eisen aan het maximaal toelaatbare nitraatgehalte van spinazie (1000 mg kg^{-1}) die bestemd is voor de bereiding van babyvoeding, aangezien een na reductie van nitraat tot nitriet optredend hoog nitrietgehalte schadelijk kan zijn voor zuigelingen; zuigelingen zijn namelijk aanmerkelijk gevoeliger voor nitriet dan kleuters en volwassenen. Een overmaat aan NO_2 in het bloed blokkeert de zuurstofopname door de rode bloedlichaampjes, hetgeen methemogloblinemie kan veroorzaken met mogelijk verstikking als gevolg.

Hygiënische maatregelen

Indien de sanitaire maatregelen binnen het verwerkingsbedrijf niet naar behoren worden uitgevoerd, kunnen verschillende sporevormende bacteriën zich ontwikkelen in produktresten die zich nog op of in de apparatuur bevinden. In zure produktresten zullen deze micro-organismen zich weliswaar niet kunnen ontwikkelen, maar wel indien schimmelvorming heeft plaatsgevonden en als gevolg daarvan de pH is gestegen. In dit opzicht wijzen Bowen et al. (1954a) erop dat de mate van reiniging van de verwerkingslijn mede bepalend is voor het optreden van bederf in

tomatenprodukten als gevolg van *Clostridium pasteurianum*. De periodieke reiniging van de voorberekings- en transportapparaatuur draagt daarom aanzienlijk bij tot de beperking van de initiële infectiegraad. Recirculatiesystemen en het hergebruik van water brengen het gevaar met zich mee dat organische stof zich daarin ophoopt en het besmettingsgevaar toeneemt. Aanvulling met voldoende vers water en/of chlorering van het retourwater kan dit in belangrijke mate voorkomen. Op bepaalde punten in de verwerkingslijn is het echter noodzakelijk, dat het produkt in aanraking komt met koel- en waswater van uitstekende kwaliteit. Dit geldt bijvoorbeeld voor de besproeiing van het produkt in staaftrommelwassers zowel vóór als na het blancheren. Een voortdurende besproeiing met koud water van bandtransporteurs en andere transportinrichtingen schept ongunstiger groeiomstandigheden voor sporevormende bacteriën.

Met enige nadruk moet erop gewezen worden dat de hygiëne in de industrie altijd voor die groente- en fruitprodukten die niet worden gesteriliseerd of geappertiseerd, van extra groot belang is. Er vindt namelijk tijdens het drogen of diepvriezen van groente en fruit geen destructie van bacteriesporen plaats.

De groentedrogerijen worden in toenemende mate geconfronteerd met strengere eisen wat betreft de microbiologische verontreiniging van het produkt, mede met het oog op de verdere verwerking tot babyvoeding, gedroogde en natte soepen, kant-en-klare maaltijden en maaltijdcomponenten. In tabel 3 zijn de normen vermeld waaraan gedroogde groenten volgens bepaalde afnemers dienen te voldoen. Door een zorgvuldige produktbehande-

Tabel 3. Normen voor het toegelaten aantal bacteriesporen in gedroogde groenten. De gegevens zijn ontleend aan een groentedrogerij.

Organisme	Aantal per gram
<i>Clostridium perfringens</i>	< 2
<i>Bacillus cereus</i>	<1000
Anaërobe sporevormers	< 10
Aërobe sporevormers met uitzondering van <i>B. cereus</i>	<15

ling en sanitaire maatregelen kunnen de groentedrogerijen in het algemeen aan deze microbiologische normen voldoen.

De aanwezigheid van sporevormende bacteriën in niet door verhitting geconserveerde produkten is dikwijls bevestigd; zo wijst Tanimura (1969) op het duidelijk aanwezige verband tussen de sanitaire omstandigheden in een voedselbereidingsbedrijf en de besmetting van gekookte bonen met *Bacillus*-soorten. De aanwezigheid van sporen van *Clostridium botulinum* in diepgevroren toebe-reide groenteprodukten is door Insalata et al. (1969) gesigna-leerd. De aanwezigheid van sporen in dergelijke voedingsmidde-len kan na watertoevoeging, ontdooien en verwarmen leiden tot groei van vegetatieve organismen. Indien het produkt niet in een bepaald tijdsbestek wordt geconsumeerd, kan dit vooral na een ondeskundige toebereiding aanleiding geven tot bederf en/of toxinevorming.

Ingrediënten

Het is gebruikelijk dat bij de conservering van groenten en fruit bepaalde ingrediënten worden toegevoegd, waarmee wordt beoogd de kwaliteit, en in het bijzonder de smakelijkheid van het eindprodukt, te verhogen. Daarbij moet men ermeë rekening houden dat toepassing van deze stoffen, zoals suikers, zetmeel, kruiden en specerijen, de initiële infectie door bacteriesporen aanzienlijk kan verhogen.

Suiker als oorzaak van thermofiel bederf werd voor het eerst vermeld door Cameron (1928) bij suikermajs in blik en later ook doperwten en wortelen in blik. De invloed van het aantal 'flat sour'-bacteriën in suiker op de houdbaarheid van gesteriliseer-de suikermajs blijkt uit tabel 4. De waarnemingen van Cameron

Tabel 4. Het percentage bederf bij majs in blik, in afhanke-lijkheid van de hoeveelheid 'flat sour'-sporen in de toege-voegde suiker en de sterilisatietijd. Bron: Cameron (1928).

Sterilisatie- tijd (min)	Geen suiker	Suiker met 6 sporen per gram	suiker met 250 sporen per gram
70	0	0	95,8
80	0	0	75,0
90	0	0	54,2

(1928) hebben ertoe geleid dat normen werden opgesteld ten aanzien van de microbiologische kwaliteit van suiker voor de conserverenindustrie. Door beheersing van het produktieproces bij de industriële suikerproduktie heeft men de mate van besmetting met bacteriesporen aanzienlijk kunnen beperken. De Nederlandse suikerindustrie baseert zich op de normen die door de National Canners Association (NCA) in het leven zijn geroepen (tabel 5).

Het veelvuldig voorkomen van thermoresistente organismen in kruiden en specerijen kan aanleiding geven tot grote problemen bij de sterilisatie van de produkten waaraan deze zijn toegevoegd. Uit het onderzoek van Richmond & Fields (1966) is naar voren gekomen dat in zwarte peper ongeveer 10^4 sporen per gram voorkomen die hoofdzakelijk tot de volgende soorten behoorden: *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* en *B. subtilis*. De besmetting kan echter voorkomen worden door de extracten van deze ingrediënten aan te wenden, of door de ingrediënten zelf tevoren door gasbehandeling of bestraling te ontsmetten, hetgeen een betere standaardisatie van het conserveringsproces mogelijk maakt.

FACTOREN DIE DE INACTIVERING VAN BACTERIESPOREN DOOR WARMTE IN GROENTE- EN FRUITPRODUKTEN BEPALEN

Proceskeuze

Bij de keuze van het warmtebehandelingsproces doet zich de vraag voor welke proceswaarde F_0 gewenst is en vervolgens op

Tabel 5. NCA-normen betreffende de aanwezigheid van thermofiele bacteriesporen in suiker. Bron: National Canner Association (1968).

Organisme	Norm (aantal per gram)
Totaal aantal thermofiele aërobe sporen	< 12,5
'flat-sour'-sporen	< 5,0
Anaërobe sporen	< 4 van de 5 buizen positief uit een monster
Thermofiele anaërobe sporen die H_2S vormen	< 3 van de 5 monsters positief

welke wijze men die gekozen waarde bij voorkeur zal bereiken. In de niet-zure of zwak-zure groep van voedingsmiddelen ($\text{pH} > 4,5$), waartoe de meeste groenten behoren, is de groei van *C. botulinum* mogelijk. Dergelijke produkten moeten altijd worden gesteriliseerd bij temperaturen boven 100°C , waarbij de sterilisatie-omstandigheden zo worden gekozen dat tenminste een F_0 -waarde van 2,45 min bij $121,1^{\circ}\text{C}$ wordt bereikt. Vaak neemt men hogere waarden, omdat men geen enkel risico wil nemen wat betreft *C. botulinum*. Daarnaast zijn er bederfverwekkers die veel thermoresistenter zijn dan *C. botulinum*, zoals *C. sporogenes*, *B. stearothermophilus*, *C. thermosaccharolyticum* en *C. nigrificans*.

Het is vrijwel onmogelijk om de benodigde F_0 -waarde op te geven voor de hitteconservering van bepaalde groenteprodukten, aangezien men in ieder bedrijf rekening dient te houden met de daarin voorkomende specifieke omstandigheden (tabel 6). Voor de sterilisatie van homogene produkten, die zowel van vloeibare als visceuze aard kunnen zijn, met een pH van 4,5-5,0 gaat men in het algemeen uit van een F_0 van 2,5, omdat de thermoresistentie van bacteriesporen in dit pH -gebied vrij laag is. Voor produkten met een $\text{pH} > 5$ wordt de F_0 -waarde verhoogd. Indien in de vloeibare fase vaste groentedelen voorkomen, zoals doperwten en sperziebonen, ligt de te hanteren F_0 -waarde hoger, omdat men rekening moet houden met een relatief geringere warmtedoordringing.

Er is reeds eerder op gewezen dat de mate van besmetting van het produkt afhangt van de verontreiniging van de grondstof, de sanitaire maatregelen binnen het bedrijf en het functioneren van de blancheur. Het is duidelijk dat de initiële infectie met thermoresistente bacteriesporen na afvullen en afsluiten van de verpakking mede bepalend is voor de benodigde F_0 -waarde. Bovendien spelen de temperatuur bij het afsluiten en de tijd tussen het afsluiten van de verpakkingen en het begin van de sterilisatie hierbij een rol, evenals de afkoelings-snelheid na beëindiging van het sterilisatieproces.

Hoewel doperwten en sperziebonen vergelijkbare produkten zijn wat de vloeibare- en vaste-faseverhoudingen betreft, worden hiervoor afwijkende F_0 -waarden gehanteerd. De relatief hoge

Tabel 6. Enkele aan de praktijk ontleende gegevens betreffende de sterilisatie van groenteprodukten.

Produkt	pH	F_0	Sterilisatie-omstandigheden in litersblikken	Opmerkingen
Doperwten	± 6	7,5-15	40 min 116 °C - 12 min 125 °C	voor tropen- conserven houdt men een F_0 van ± 15 aan
Sperziebonen	$\pm 5,5$	5-10	22 min 118 °C - 18 min 122 °C	
Champignons	5,0-5,5	4-5	30 min 116 °C	relatief lage F_0 -waarde hangt samen met lage pH
Spinazie	$\pm 5,5$	3,75	100 min 115 °C - 80 min 121 °C	typisch con- ductieprodukt, evenals bij andere blad- gewassen
Droge peul- vruchten	$\pm 6,0$	7,5	20 min 121 °C - 45 min 121 °C	dikwijls wor- den sterili- atie-omstan- digheden toe- gepast, die een hogere F_0 opleveren dan nodig is. Dit hangt samen met het ver- krijgen van de gewenste gaarheid van het produkt
Asperges	$\pm 5,5$	3,75	25 min 117 °C	lage F_0 in ver- band met gevoe- ligheid van as- perges voor hittebehande- lingen
Erwtensoepp	$\pm 6,0$	5-17,5	90 min 118 °C - 150 min 118 °C	hoge F_0 in ver- band met bes- metting van de grondstof. Voor tropen- conserven houdt men een F_0 van 17,5 aan
Tomatensoep	4,5-5	2,5	60 min 118 °C	lage F_0 in ver- band met vrij lage pH. Tij- dens sterilisa- tie treedt con- vectie op

F_0 -waarde voor doperwten is gebaseerd op de grotere kans op een hoog besmettingsniveau met bacteriesporen en op het feit dat de opgieter een betere voedingsbodem is voor micro-organismen dan bij sperziebonen het geval is.

Procesomstandigheden

Wanneer men eenmaal een bepaalde F_0 -waarde heeft gekozen, zijn er verschillende mogelijkheden om die waarde te bereiken. Reeds lang wordt er naar gestreefd de procesomstandigheden zodanig te kiezen dat met behoud van een zekere garantie van houdbaarheid een zo hoog mogelijke kwaliteit wordt verkregen. Factoren die hierbij een rol spelen zijn: aard van het produkt (convectie, conductietype), soort, grootte en vorm van de verpakking, mate van vulling en invloed van rotatie.

De invloed van enkele van deze factoren worden behandeld aan de hand van de resultaten van een dergelijk onderzoek bij asperges in blik (tabel 7). Vooral bij een produkt als asperges kan een te hoog invulgewicht leiden tot een te compacte inhoud van de verpakking. Ook bij een roterende sterilisatie heeft dit een zeer geringe warmtedoordringing tot gevolg, waardoor een lage F_0 -waarde wordt bereikt.

Tabel 7. De invloed van de sterilisatie-omstandigheden op de bereikte F_0 en kwaliteit van asperges in $\frac{1}{2}$ litersblikken. Bron: Steinbuch (1969).

Vulling		Sterilisatie-omstandigheden				Kwaliteitsbeoordeling		
invul- gewicht (g)	kop- ruimte (cm)	temp. (°C)	tijd (min)	beweging	F_0	kleur	smaak	consis- tentie
325	1	117	30	stilstaand	5	6,4	5,8	8,4
325	0	117	30		3,75	.	.	.
365	1	117	30		3	.	.	.
365	0	117	30		1,25	.	.	.
325	1	125	9	roterend	5	8,0	7,4	7,2
325	0	125	9		0	.	.	.
365	1	125	9		2,5	.	.	.
365	0	125	9		0	.	.	.

De snelle warmtedoordringing tijdens rotatie komt tot stand door de beweging van de omgevende opgiët, die aanzienlijk bevorderd wordt door de aanwezigheid van een kopruimte. Met een roterende sterilisatie waarbij relatief hoge temperaturen en korte verhittingstijden worden toegepast, kan een aanzienlijke kwaliteitsverbetering bereikt worden met behoud van een bepaalde proceswaarde.

Er doen zich bij de hitteconservering van groenteprodukten nog vele problemen voor. Dit wordt bewezen door het recente voorkomen van bederf en vergiftigingsgevallen door *Clostridium botulinum* in champignonconserven in de Verenigde Staten. Read & Kautter (1974) delen mee dat hierdoor de bemoeienis van instanties, zoals de Food and Drug Administration, technologische instituten alsmede de blikfabrikanten, met de Amerikaanse champignonverwerkende bedrijven aanzienlijk is toegenomen.

De resultaten van een omvangrijke inspectie van de bedrijven inclusief bemonstering en analyse van champignonconserven uit magazijnvoorraden gaven de stoot tot diepgaand onderzoek. Zo bleek dat één van de oorzaken van de ondersterilisatie van de champignonconserven het gebruik van een nieuwe schudvulmachine was, waardoor het produkt compacter werd afgevuld dan in voorgaande produktiegangen, de warmtedoordringing sterk werd gereduceerd en diensengevolge een F_0 van slechts een honderdste minuut werd bereikt. Overige factoren die hierbij een rol speelden, waren het gebruik van een waterige oplossing of een sausopgiët, de kwaliteit en de besmetting van de grondstof, de verwerkingswijze (hele, gesneden of stukjes champignon) en de blancheeromstandigheden.

Het zal duidelijk zijn dat, afhankelijk van de toegepaste procesomstandigheden, sporevormende bacteriën in gesteriliseerde en gepasteuriseerde conserven tot ontwikkeling kunnen komen. Tabel 8 geeft een overzicht van de eigenschappen van de organismen die tot bederf van conserven aanleiding kunnen geven. Het blijkt dat sporevormende bacteriën een zeer grote variabiliteit vertonen ten aanzien van de optimale pH en temperatuur voor de groei en ten aanzien van de hitteresistentie. De aard van de bederfverschijnselen kan in bepaalde gevallen een belangrijke aanwijzing zijn voor de herkenning van het organisme.

Bij een onderzoek naar het voorkomen van 'flat sour' organismen in gesteriliseerde groenteconserven komen Jakobsen & Nielsen (1973) tot de conclusie dat deze organismen industrieel toegepaste hittebehandelingen overleven. De betekenis van deze levensvatbare sporen voor de stabiliteit van het produkt wordt echter in sterke mate bepaald door onder andere pH, a_w , opslagtemperatuur, opslagtijd en de samenstelling van het produkt. De invloed van de a_w op de microbiologische stabiliteit van groenteconserven is echter in het algemeen van ondergeschikt belang, aangezien deze op een niveau van circa 0,98 ligt.

De kennis over de optimale ontkiemings- en groeitemperatuur voor sporen van bederfverwekkende organismen in groente- en fruitconserven alsmede de bestemming van de produkten hebben een aanzienlijke bijdrage geleverd aan de keuze voor het proces, zoals dat nu wordt toegepast bij de hitteconservering. De waarnemingen van Prescott & Underwood (1897) bij een partij ingeblikte suikermaïs kunnen in dit opzicht welhaast klassiek genoemd worden. Het gedeelte dat naar het noorden van de Verenigde Staten werd vervoerd was na een jaar nog in een goede conditie. Daarentegen vertoonden de conserven die naar het zuiden waren gezonden, bederf (flat sour) als gevolg van de daar heersende hoge temperaturen.

Thans is bekend dat niet-zure groenteconserven een meer ingrijpende sterilisatie moeten ondergaan teneinde deze als tropenconserven een zekere houdbaarheid mee te geven; dit staat in verband met de ontkieming en de groei van *Bacillus stearothermophilus* die bij hogere temperaturen plaatsvinden. Daarom is voor gematigde gebieden de absolute afwezigheid van thermofiele bacteriesporen niet vereist. De term appertiseren is derhalve voor een dergelijke conserveringsmethode niet onjuist.

Teneinde een indruk te krijgen van de aanwezigheid van thermofiele sporevormende bacteriën in het geconserveerde produkt, wordt een aantal monsters uit de partij genomen, bij bepaalde temperaturen in broedstoven bewaard (30-50 °C) en na enige tijd geanalyseerd (zie ook tabel 8). In dit verband is het interes-

Tabel 8. Eigenschappen van enige bederfveroorzakende sporevormende bacteriën.

Laagste pH-waarde voor groei	Temperatuurs- gebied voor groei (°C)	Zuurstofbehoefte	Globale hitteresistentie	Bederftype
<i>B. stearothermophilus</i>	6,0 37-70	facultatief	$D_{121}^{\circ C} \approx 4-5$ min	'flat sour' (verzuring zonder bombage)
<i>B. coagulans</i>	4,0 28-60	facultatief	$D_{121}^{\circ C} = 0,01-0,07$ min	'flat sour'
<i>B. polymyxa</i>	3,8 20-35	facultatief	$D_{100}^{\circ C} \approx 0,1-0,5$ min	zuur en gas
<i>B. macerans</i>	3,8 28-50	facultatief	$D_{100}^{\circ C} = 0,1-0,5$ min	zuur en gas
<i>C. botulinum</i> A en B	4,8 12,8-40,6	anaëroob	$D_{121}^{\circ C} = 0,1-0,2$ min	toxinevorming, gas
<i>C. botulinum</i> E	4,8 3,3-30	anaëroob	$D_{80}^{\circ C} \approx 0,3-3$ min	toxinevorming, gas
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	4,0 30-62,8	anaëroob	$D_{121}^{\circ C} = 3-4$ min	'hard swell' (sterke bombage)
<i>C. nigrificans</i>	5,3 30-70	anaëroob	$D_{121}^{\circ C} = 2-3$ min	'sulfide spoilage' (H ₂ S vorming, waardoor zwarte verkleuring)
<i>C. sporogenes</i>	6,0 20-50	anaëroob	$D_{121}^{\circ C} = 0,1-0,5$ min	'putrid swell' (rotting met bombage)
<i>C. butyricum</i>	4,0 30-45	anaëroob	$D_{100}^{\circ C} \approx 0,1-0,5$ min	zuur en gas
<i>C. pasteurianum</i>	3,6 20-40	anaëroob	$D_{100}^{\circ C} = 0,1-0,5$ min	zuur en gas (boterzuurbederf)

sant te wijzen op de zogenaamde 'Knockmethode' (Knock, 1954), met behulp waarvan de fractie 'flat sour'-bederf in gesteriliseerde doperwtconserveren voorspeld kan worden. Deze methode is gebaseerd op het aantal 'flat sour'-sporen in doperwtconserveren vóór het sterilisatieproces, de decimale reductietijd bij verschillende temperaturen en de berekening van het aantal 'flat sour'-sporen dat het proces overleeft, per verpakkingseenheid.

Zure en aangezuurde produkten

Zoals bekend, zijn voor vele groente- en fruitsoorten de conventionele sterilisatie-omstandigheden niet geschikt wegens de daardoor optredende kwaliteitsgebreken. Bij de vele pogingen om te komen tot minder ingrijpende warmtebehandelingen die de oorspronkelijke eigenschappen van het produkt meer intact laten, heeft men met de toevoeging van zuren succes kunnen behalen.

De conserverende werking van zuren zal ongetwijfeld reeds vóór onze jaartelling bekend zijn geweest; het is reeds lang bekend dat bijvoorbeeld zuurkool en andere vergiste groenten relatief lang en goed houdbaar zijn. Zowel bij de huishoudelijke als industriële verduurzaming heeft men van oudsher gebruik gemaakt van het effect, wellicht zonder het oorzakelijk verband te kennen.

Men kan bij de verduurzaming van zure produkten volstaan met pasteurisatie, dat wil zeggen een warmtebehandeling beneden 100 °C, omdat niet alleen de thermoresistentie van aanwezige micro-organismen met de pH daalt, maar bovendien eventueel overlevende sporen in het zure milieu niet tot ontwikkeling kunnen komen, met uitzondering van enkele acidiofielen.

Het effect van zuren op de remming van de ontwikkeling van micro-organismen wordt toegeschreven aan de waterstofionenconcentratie of aan de eventuele toxiciteit van het ongedissocieerde zuur of anion. Hierbij dient men onderscheid te maken tussen het sterke, geheel gedissocieerde zoutzuur en de zwakke, slechts gedeeltelijk gedissocieerde organische zuren. Men dient te bedenken dat de keuze van het toe te voegen zuur niet slechts wordt bepaald door de toxische werking, maar ook door de eigenschappen van het

te behandelen produkt en de smaak die het na conservering dient te bezitten. Het gebruik van bepaalde zuren bij de conservering van voedingsmiddelen is dus niet mogelijk door optredende smaak- en aromaveranderingen.

Bij produkten, zoals rode kool, augurken, komkommers, tomaten, zilveruien, rode bieten en sommige peresoorten maakt men gebruik van kunstmatige pH-verlaging door toevoeging van daarvoor geschikte zuren aan de opgiets (azijnzuur, melkzuur, citroenzuur). Ananas, citrusprodukten, appel(moes), frambozen, bramen, aardbeien, bessen en rabarber bezitten van nature een voldoende lage pH. Teneinde ongewenste smaakbeïnvloedingen tegen te gaan, tracht men een zo groot mogelijke groeiremming van sporevormende bacteriën te bereiken met een zo gering mogelijke toevoeging van zuur. Het ligt daarom voor de hand dat vooral op dit punt de groente- en fruitconservering de meeste problemen heeft opgeleverd.

In de literatuur wordt melding gemaakt van groei en toxinevorming van *C. botulinum* in vruchtenconserven met een pH lager dan 4,5 maar volgens Ingram & Robinson (1951) moet de oorzaak waarschijnlijk gezocht worden in het feit dat, voordat de betreffende waarnemingen gedaan werden, de zuurgraad toenam door langzame diffusie van zuur uit onvoldoende gekookte vruchten. Townsend et al. (1954) heeft aan de hand van een onderzoek naar de pH-waarde, waarbij nog ontkieming en toxinevorming in verschillende met citroenzuur aangezuurde produkten optrad, vastgesteld dat beneden pH 4,8 geen groei en toxinevorming optrad. Bij het gebruik van zuren dient men er rekening mee te houden dat het enige tijd duurt, voordat het zuur uit de opgiets in voldoende mate in de groente of vrucht gepenetreerd is. Onlangs werd in Canada een geval van botulisme gesignaleerd dat waarschijnlijk te wijten was aan onvoldoende aanzuring van het produkt (Todd et al. 1974). In glazen potten met gemarineerde champignons werd het toxine van *C. botulinum* type B aangetoond.

De pH waarbij *C. botulinum* nog tot ontwikkeling kunnen komen, wordt mede beïnvloed door stoffen die in groente- en fruitprodukten voorkomen, of eraan toegevoegd worden zoals koolhydraten (Alstrand & Ecklund, 1952) en zouten (Baird-Parker & Freame, 1967), zodat het eigenlijk onmogelijk is om uniforme verwerkings-

voorschriften op te stellen.

Een organisme dat een beduidend hogere resistentie blijkt te bezitten in een niet alleen zuur, maar ook suikerrijk milieu, is *Clostridium pasteurianum*. Bij een pH ≥ 4 is nauwelijks van een stagnatie van de groei van dit organisme sprake. Zelfs bij een pH van 3,6-4,0 kan deze sporevormer zich nog ontwikkelen. Townsend (1938) heeft aanzuring ter voorkoming van bederf door boterzuurgisting als de meest effectieve methode aanbevolen (tabel 8). De duidelijke invloed van pH-verlaging op de thermoresistentie van de sporen van *Clostridium pasteurianum* blijkt uit de decimale reductietijd bij 100 °C en pH 4,5 die tweemaal zo lang is als bij pH 4,1 en vijfmaal zo lang als bij pH 3,8.

Bowen et al. (1954b) en Casolari & Giannone (1966) hebben bevestigd dat voor de inactivering van de sporen van *C. pasteurianum* in tomatenprodukten bij een pH 4,2 een hittebehandeling bij een lagere temperatuur voldoende was dan bij een pH van 4,4. Een onderzoek van Jakobsen & Jensen (1975) heeft aangetoond dat behalve de pH, ook de a_w van grote invloed is op de groei van *C. pasteurianum* in peren in blik. Bij een a_w van 0,975-0,970 en een pH van 3,8-4,0 treedt geen groei op. Een geleidelijke stijging van a_w of pH bevordert de ontwikkelingsmogelijkheden. Glucose, fructose en saccharose beïnvloeden in gelijke mate de a_w van de siroop, waarin de peren verwerkt zijn. In Australië zijn uit bedorven vruchtenconserven, zoals peren in blik, organismen van het type *C. butyricum* geïsoleerd. *C. butyricum* is zeer zuurresistent en is in staat te groeien bij een pH van ongeveer 4,0.

De aanzuring van tomatensap met citroenzuur tot pH 4,0 ter voorkoming van bederf door *Bacillus coagulans* is eigenlijk het meest klassieke voorbeeld om de groei van sporevormende bacteriën doeltreffend tegen te gaan. *B. coagulans* is thermofiel en heeft de algemene eigenschappen van het 'flat sour'-type, maar is zuurtolerant (tabel 8). Aangezien dit organisme in tegenstelling tot *B. stearothermophilus* ook bij lagere temperaturen kan ontkiemen en groeien, wordt voor zure of aangezuurde produkten als tomaten naar een zodanige behandeling gestreefd dat het produkt bij alle gebruikelijke temperaturen houdbaar

blijft. Rice & Pederson (1954) onderzochten een aantal factoren die de groei van *B. coagulans* in tomaten beïnvloeden. Zij vonden dat naarmate het inoculum vermindert, de minimale pH waarbij groei mogelijk is, hoger is. De mate van zuurtolerantie varieerde bij de verschillende soorten. Vaughn et al. (1952) hebben bederf door de organismen van de *B. macerans* - *B. polymyxa*-groep bij vruchtenconserven waargenomen. Deze bacteriën waren in staat te groeien bij een pH van 3,8-4,0 en kwamen via het koelwater door lekinfectie in het produkt terecht.

Sporicide en antibacteriële stoffen van plantaardige herkomst

Er zijn interessante waarnemingen gedaan over de sporicide en antibacteriële effecten van enkele plantaardige stoffen. Labaw & Desrosier (1953) delen mee dat 'flat sour'-organismen die verhit worden in extracten van wortelen, tomaten en bonen, een geringere thermoresistentie vertonen dan bij verhitting in een fosfaatbuffer zonder toevoeging van deze extracten. Bekend is ook het verschijnsel dat bepaalde stoffen uit kruiden en specerijen die als aroma- en smaakversterker aan voedingsmiddelen worden toegevoegd, de ontwikkeling van micro-organismen, waaronder sporevormende bacteriën, kunnen afremmen. Het is opvallend dat men voornamelijk *Bacillus subtilis* heeft gebruikt als testorganisme. In 1961 delen Korzybski & Kurylowicz (1961) mee dat allicine met een concentratie van 8 mg l^{-1} (het werkzame bestanddeel uit de etherische olie van knoflook) de groei van *B. subtilis* remt. Zowel Rudat (1969) als Abdou et al. (1972) vermelden de gevoeligheid van dit organisme voor bepaalde stoffen, hoogst waarschijnlijk zwavelverbindingen, uit het perssap van uien.

Ramadan et al. (1972) onderzochten de antibacteriële effecten van etherische oliën van selderij, dille en kruidnagel. Het bleek dat een aantal van deze oliën een duidelijk remmende invloed uitoefende op de ontwikkeling van *Bacillus cereus*. Michener et al. (1959) hebben gevonden dat knoflookolie met een concentratie van $0,3 \text{ ml l}^{-1}$ in een daartoe geschikt medium de hittesteëntie van sporen van *Clostridium sporogenes* (PA 3679) met 50% vermindert. Met het oog op de vooralsnog beperkte doseer-

mogelijkheden bij de toediening van dergelijke extracten aan voedingsmiddelen mag echter de sporicide en bactericide-werking van deze stoffen onder praktijkomstandigheden niet overschat worden, aangezien de invloed van hittebehandelingen en de milieu-omstandigheden nog niet goed bekend is.

Het sporicide effect van plantaardige oliën is ondermeer onderzocht door Dallyn & Everton (1971) voornamelijk met het oog op de verwerking van visprodukten in blik. Men heeft daarbij vastgesteld dat olijfolie een zeer sterk sporicide werking heeft in vergelijking met bijvoorbeeld de olie van aardnoten. Indien echter een waterig extract werd bereid van deze plantaardige oliën, werd een omgekeerd verschijnsel waargenomen. De inactiverende werking op de sporen van *Clostridium sporogenes* PA 3679 wordt toegeschreven aan malonzuuraldehyde, dat bij auto-oxydatie van de oliën wordt gevormd. Dit sporicide effect kan uiteraard eveneens van groot belang zijn bij de verwerking van groenten. Het is bekend dat in enkele landen bepaalde groentesoorten in olijfolie worden geconserveerd.

ALTERNATIEVE CONSERVERINGSMETHODEN

De grote kwaliteitsgebreken die met behulp van hitte gesteriliseerde produkten vertonen, hebben het onderzoek naar alternatieve technieken gestimuleerd. Op grond van de bekende reacties van sporevormende bacteriën op warmtebehandelingen, zoals warmte-activering waarbij geen afsterving optreedt maar wel ontkieming wordt geïnitieerd, is de gedachte naar voren gekomen een dubbele verhitting toe te passen. Een dergelijke procedure, beter bekend als 'tyndallisatie' (Ingram, 1969), bestaat uit een matige temperatuurbehandeling, waarna de sporen ontkiemen en de thermoresistentie verliezen, gevolgd door een tweede matige verhitting die de pas ontkiemde organismen doodt. Helaas verloopt het activerings- en ontkiemingsproces van de sporen van verscheidene in deze produkten voorkomende bacteriespecies niet steeds synchroon. Deze methode wordt daarom nauwelijks toegepast, wellicht incidenteel bij de huishoudelijke conservering, zoals het wekken.

Zoals reeds eerder vermeld, brengt aanzuring van groente met zich mee dat de smaak van het eindprodukt sterk wordt gewijzigd.

Bij de verwerking van augurken, zilveruien, rode bieten, rode kool enz. tot pickles of andere zure produkten is dit beslist niet bezwaarlijk. Daar bij andere groenten de zure smaak als een inconveniënt wordt gezien, heeft men getracht methoden te ontwikkelen om de pH tot het oorspronkelijke niveau te verhogen en daarmee de smaak van het produkt te herstellen. In een patent van Nitschmann (1967) wordt een werkwijze beschreven waarbij aangezuurde gepasteuriseerde groente door de consument geneutraliseerd moet worden met een hoeveelheid loog die equivalent is aan de hoeveelheid zuur die in een verpakkingseenheid aanwezig is. Deze procedure vereist echter van de consument een zekere kennis omtrent de chemische achtergrond van deze conserveringsmethode.

Ook is naar voren gekomen dat niet slechts de kieming van bacteriesporen bij een lage pH is gestagneerd, maar dat er ook afsterving van sporen plaatsvindt. Bovendien is door Alderton (1967, 1969) vastgesteld dat de thermoresistentie van sporen van *Bacillus stearothermophilus* bij pH 1,5 niet alleen aanzienlijk verlaagd is, maar dat deze verminderde thermoresistentie enige tijd blijft bestaan, ook nadat de pH is gecorrigeerd tot het normale niveau. Op grond van dit verschijnsel is een werkwijze gepatenteerd voor de hitteconservering van groenten, waarbij het produkt in pH wordt verlaagd tot 1,5, na enige tijd wordt geneutraliseerd en tenslotte een matige-warmtebehandeling ondergaat. De in het voedingsmiddel aanwezige bacteriesporen die zich nog in een warmtegevoelige zuurvorm bevinden, worden hierbij gedood. Het is echter niet geheel duidelijk welke consequenties de toevoeging van de vrij grote hoeveelheden zuur en loog heeft op het zoutgehalte en derhalve op de smaak van het eindprodukt.

De afsterving van bacteriesporen in een zuur milieu is sterk afhankelijk van een groot aantal factoren. Naarmate de zure sporensuspensie bij een hogere temperatuur wordt verhit (activering), treedt tijdens de opslag bij lagere temperaturen (20-55 °C) een versnelde afsterving op. Het aantal kiembare sporen neemt bovendien sneller af bij een lagere pH of een hogere opslagtemperatuur. Aanzuring met een zwak zuur leidt tot een snellere afsterving dan bij een behandeling met een sterk

zuur, vooral bij een toenemende molariteit. Opvallend was de sporicide werking van H_2SO_4 , hetgeen waarschijnlijk verband houdt met een geforceerde Ca-onttrekking uit de sporen.

Deze afsterving van sporen in een verhit zuur milieu zou wellicht kunnen bijdragen tot een conserveringsmethode voor groenten met een gering zuurbufferend vermogen. Hierbij wordt gedacht aan het toevoegen van een zure opgieter aan geblancheerde groenten; de pH wordt verlaagd tot 2,5-3,0. Na afsluiting van de verpakking ondergaat deze een matige warmtebehandeling (bijvoorbeeld gedurende 30 min bij 110 °C). Vervolgens wordt het produkt gedurende enige maanden bewaard bij een bepaalde temperatuur. Tenslotte wordt aan de inhoud van de verpakking onder aseptische omstandigheden een equivalente hoeveelheid steriele loog toegevoegd en de verpakking opnieuw gesloten (Steinbuch 1968, 1974b).

SPOREVORMENDE BACTERIËN BIJ DE VERGISTING VAN PLANTAARDIGE PRODUKTEN

Bij de fermentatie is de pH van doorslaggevende betekenis voor de eventuele ontwikkeling van anaërobe sporevormende (niet-thermofiele) bacteriën die ongewenste stofwisselingsprodukten kunnen doen ontstaan. Het incidenteel voorkomen van een boterzuurachtige geur in zuurkool zou kunnen wijzen op groei van *Clostridium*-soorten als gevolg van een stagnerende melkzuurvergisting en dientengevolge een vertraagde pH-daling (Veldkamp, 1963).

Kawatomari & Vaughn (1956) hebben vastgesteld dat *Clostridium*-soorten tijdens de melkzuurvergisting van olijven bederf en een kaasachtige geurafwijking veroorzaken. In enkele gevallen veroorzaakte silage vergiftigingsgevallen bij het vee. Volgens Prescott & Dunn (1949) was groei van *Clostridium botulinum* in de silage hiervan meestal de oorzaak.

TOEPASSING VAN SPOREVORMENDE BACTERIËN BIJ DE FABRIKAGE VAN VOEDINGSMIDDELEN

In dit overzicht mag niet onvermeld blijven dat bepaalde organismen worden gebruikt voor de bereiding of vergisting van voedingsmiddelen van plantaardige oorsprong. Een illustratief voorbeeld hiervan is de toepassing van *Bacillus subtilis* voor de vergisting van natto, een bestanddeel van sojasaus (Joo, 1971; Kim & Cho, 1975). Een zeer interessante toepassing vindt men tenslotte bij de winning van groentesappen, waarbij van een cultuur van *Bacillus polymyxa* gebruik gemaakt zou kunnen worden. Men heeft gevonden dat een enzympreparaat van een gefiltreerde cultuur van dit organisme het groenteweefsel afbreekt, hetgeen een verhoogd saprendement oplevert (Anon., 1975a).

Literatuur

- Abdoe, I.A., A.A. Abou-Zeid, M.R. El Sherbeeney & Z.H. Abou-El-Gheat, 1972. Antimicrobial activity of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium currat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles* 22: 29-35.
- Abo-Elnaga, G., 1968. Sporenbildner in der Anlieferungsmilch. *MilchWissenschaft* 23: 559-560.
- Acott, K.M. & T.P. Labuza, 1975. Microbial growth response to water sorption preparation. *Journal of Food Technology* 10: 603-611.
- Adams, D.M., 1973. Inactivation of *Clostridium perfringens* type A spores at ultrahigh temperatures. *Applied Microbiology* 26: 282-287.
- Adams, D.M., 1978. Heat injury of bacterial spores. *Advances in Applied Microbiology* 23: 245-261.
- Adams, G.H. & Z.J. Ordal, 1976. Effect of thermal stress and reduced water activity on conidia of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science* 41: 547-550.
- Alderton, G., 1967. Method of sterilizing. United States Patent Office, No.3, 328, 178.
- Alderton, G., 1969. Process for sterilizing foods and other materials. United States Patent Office, No. 3, 454, 406.
- Alderton, G., J.K. Chen & K.A. Ito, 1974. Effect of lysozyme on the recovery of heated *Clostridium botulinum* spores. *Applied Microbiology* 27: 613-615.
- Alderton, G. & N.S. Snell, 1963. Base exchange and heat resistance in bacterial spores. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 10: 139-143.
- Alexopoulos, C.J. & C.W. Mims, 1979. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, London, 650 p.
- Alstrand, D.V. & O.F. Ecklund, 1952. The mechanics and interpretation of heat penetration tests in canned foods. *Food Technology* 6: 185-189.
- Anderson, J.G. & J.E. Smith, 1976. Effects of temperature on filamentous fungi. In: F.A. Skinner & W.B. Hugo (Eds). *Inhibition and activation of vegetative microbes*. Academic Press, London, p. 191-218.
- Ando, Y., 1974. Ionic germination of spores of *Clostridium perfringens* type A. *Japanese Journal of Microbiology* 18: 433-439.
- Anon., 1970. Etude de certains bombages observés lors de la fabrication de conserves d'épinards en purée. *Bulletin mensuel, Inacol* 21: 61-70.
- Anon. (Hoechst A.G.), 1975a. Process for the digesting of plant material. British Patent 1416 795.
- Anon., 1975b. Foodborne and Waterborne Diseases Outbreaks - Annual Summary 1975. Centre for Disease Control, Atlanta, USA, p. 50.
- Aronson, A.I. & N.K. Pandey, 1978. Comparative structural and functional aspects of spore coats. In: G.H. Chambliss & J.C. Vary (Eds). *Spores VII*. American Society for Microbiology, Washington, p. 54-61.
- Ashton, D.H., 1976. Thermophilic Anaerobes. In: M.L. Speck (ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington D.C., p. 263-269.

- Ashworth, J.M. & J.E. Smith, 1973. Microbial differentiation. Cambridge University Press, London, 450 p.
- Assnani, M.B., M.S. Chatpar, M.H. Kadri, A.K. Mattoo, & V.V. Modi, 1971. Microbial spoilage of mangoes. *Journal of Food Science and Technology* 8: 208-209.
- Attenborough, S.J. & M.P. Scarr, 1957. The use of membrane filter techniques for control of thermophilic spores in the sugar industry. *Journal of Applied Bacteriology* 20: 460-466.
- Atwal, J.S., D.N. Shroff, R. Chand & R.A. Srinivasan, 1974. Studies on aerobic sporeforming bacteria in milk and milk products. Part 1: Occurrence in raw and pasteurized milk. *Indian Journal of Dairy Science* 27: 22-27.
- Baird-Parker, A.C. & M.A.H. Baillie, 1974. The inhibition of *C. botulinum* by nitrite and sodium chloride. In: B. Krol & B.J. Tinbergen (Eds). *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat products* 1973, p. 77-90.
- Baird-Parker, A.C. & B. Freame, 1967. Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. *Journal of Applied Bacteriology* 30: 420-429.
- Barnett, J.A. & J.A. Pankhurst, 1974. A new key to the yeast. North-Holland publ. Co. Ltd., Amsterdam.
- Barnicki-Garcia, S., 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. In: J.M. Ashworth & J.E. Smith (Eds). *Microbial Differentiation*. Cambridge University Press, London. p. 245-294.
- Baumgart, J. & G. Stockmeyer, 1976. Hitzeresistenz von Ascosporen des genus *Byssoschlamys*. Abhängigkeit in Apfelsaft vom Saccharose- und Apfelsäuregehalt. *Alimenta* 15: 67-70.
- Benenson, A.S. (Ed.), 1975. In: *Control of Communicable Diseases in Man*. The American Public Health Association, Inc., Washington, p. 116-127.
- Benjamin, C.R., 1955. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* 47: 669-687.
- Bergère, J.L. & J. Hermier, 1970. Some properties of *Clostridia* occurring in cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 33: 167-179.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, 1974. Williams & Wilkins Company, Baltimore, p. 529-575.
- Bergman, K., V.P. Burke, E. Cerdá-Olmedo, C.N. David, M. Delbrück, K.W. Foster, M. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, M. Zalokar, D.S. Dennison & W. Shropshire jr., 1969. *Phycomyces* Bacteriological Reviews 33: 99-135.
- Bernlohr, R.W. & C. Leitzmann, 1969. Control of sporulation. In: G.W. Gould & A. Hurst (Eds). *The bacterial spore*. Academic Press, London, p. 183-213.
- Besson, M., 1966. Les membranes des ascospores de levures au microscope électronique. *Bulletin de la Société mycologique de France* 82: 489-503.
- Beuchat, L.R. & R.T. Toledo, 1977. Behaviour of *Byssoschlamys nivea* ascospores in fruit syrups. *Transactions of the British Mycological Society* 68: 65-71.
- Bhadsavle, C.H., T.E. Shehata & E.B. Collins, 1972. Isolation and identification of psychrophilic species of *Clostridium* from milk. *Applied Microbiology* 24: 699-702.
- Bigelow, W.D. & J.R. Esty, 1920. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *Journal of Infectious Diseases* 27: 602-617.
- Bockelmann, J. von & B. von Bockelmann, 1972. The sporicidal action of hydrogen peroxide. A literature review. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie* 5: 221-225.
- Bowen, J.F., C.C. Strachan & A.W. Moyls, 1954a. Butyric acid fermentation in canned pears and tomatoes. *Food Technology* 8: 239-241.
- Bowen, J.F., C.C. Strachan & A.W. Moyls, 1954b. Further studies of butyric fermentation in canned tomatoes. *Food Technology* 8: 471-473.

- Bradley, S.G. & D. Ritzi, 1968. Composition and ultra-structure of *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Bacteriology* 95: 2358-2364.
- Bradshaw, J.G., J.T. Peeler & R.M. Twedt, 1977. Thermal inactivation of ileal loop-reactive *Clostridium perfringens* type A strains in phosphate buffer and beef gravy. *Applied and Environmental Biology* 34: 280-284.
- Braithwaite, P.J. & J.A. Perigo, 1971. The influence of pH, water activity and recovery temperature on the heat resistance and outgrowth of *Bacillus* spores. In: A.N. Barker, G.W. Gould & J. Wolf (Eds). *Spore Research*. Academic Press, London, p. 289-302.
- Briggs, A. 1966. The resistance of spores of the genus *Bacillus* to phenol heat and radiation. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 490-504.
- Bruch, C.W. & M.G. Koesterer, 1961. The microbicidal activity of gaseous propylene oxide and its application to powdered or flaked foods. *Journal of Food Science* 26: 428-435.
- Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons, 1974. *Bergey's manual for determinative bacteriology* 8th Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1268 p.
- Burton, H., A.G. Perkin, F.L. Davies & H.M. Underwood, 1977. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures III. *Journal of Food Technology* 12: 149-161.
- Busta, F.F., 1976. Practical implications of injured micro-organisms in food. *Journal of Milk and Food Technology* 39: 138-145.
- Busta, F.F. & Z.J. Ordal, 1964. Heat-activation kinetics of endospores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Science* 29: 345-353.
- Busta, F.F. & M.L. Speck, 1965. Enumeration of *Bacillus stearothermophilus* by use of membrane filter techniques to eliminate inhibitors present in milk. *Applied Microbiology* 13: 1043-1044.
- Cameron, E.J., 1928. Bacteriological field studies in canning. Thermophilic contamination of peas and corn. National Cannery Association, Research Laboratory, Bulletin 25-L.
- Campbell, L.L. & J.R. Postgate, 1965. Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews* 29: 359-363.
- Campbell, L.L. & E.E. Sniff, 1959. Effect of subtilin and nisin on the spores of *Bacillus coagulans*. *Journal of Bacteriology* 77: 766-770.
- Carstensen, E.L. & R.E. Marquis, 1975. Dielectric and electrochemical properties of bacterial cells. In: P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow (Eds). *Spores VI*. American Society for Microbiology, Washington, p. 563-571.
- Casolari, A. & L. Fiannone, 1966. La fermentazione butirrica e la sterilizzazione dei pomodori pelati. *Industria Conserva* 41: 95-98.
- Castellani, A.G. & C.F. Niven, 1955. Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. *Applied Microbiology* 3: 154-159.
- Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology* 42: 1-19.
- Cerny, G., 1976. Entkeimung von Packstoffen beim aseptischen Abpacken. I. Mitteilung: Untersuchungen zur keimabtötenden Wirkung konzentrierten Wasserstoffperoxidlösungen. *Verpackungs-Rundschau* 4: 27-32.
- Chung, B.H. & R.V. Cannon, 1971. Psychotrophic sporeforming bacteria in raw milk supplies. *Journal of Dairy Science* 54: 448.
- Clouston, J.G. & P.A. Wills. 1969. Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilis* spores by hydrostatic pressure. *Journal of Bacteriology* 97: 686-690.
- Cohn, F., 1877. Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2: 249-276.
- Cooney, P.H., P. Fawcett Whiteman & E. Freese, 1977. Media dependence of commitment in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 129: 901-907.

- Corry, J.E.L., 1974. The effect of sugars and polyols on the heat resistance of salmonellae. *Journal of Applied Bacteriology* 37: 31-43.
- Corry, J.E.L. 1976a. The effect of sugars and polyols on the heat resistance and morphology of osmophilic yeasts. *Journal of Applied Bacteriology* 40: 269-276.
- Corry, J.E.L. 1976b. Sugar and polyol permeability of *Salmonella* and osmophilic yeast cell membranes measured by turbidimetry, and its relationship to heat resistance. *Journal of Applied Bacteriology* 40: 277-284.
- Cotter, D.A., 1975. Spores of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. In: P. Gerhardt, R.N. Costilow & H. Sadoff (Eds). *Spores VI*. American Society of Microbiology, Washington, p. 61-72.
- Cross, T., 1970. The diversity of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology* 33: 95-102.
- Cross, T. & M. Goodfellow, 1973. Taxonomy and classification of the Actinomycetes. In: G. Sykes & F.A. Skinner (Eds). *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. Academic Press, London, p. 11-113.
- Curran, H.R. & F.R. Evans, 1945. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. *Journal of Bacteriology* 49: 335-346.
- Dallyn, H. & J.R. Everton, 1971. Observations on the sporocidal action of vegetable oils used in fish canning. *Industria Conserve* 46(1): 19-21.
- Davies, F.L., 1975. Heat resistance of *Bacillus* species. *Journal of the Society of Dairy Technology* 28: 69-78.
- Dawes, I.W., 1976. Inactivation of yeast. In: F.A. Skinner & W.B. Hugo (Eds). *Inhibition and inactivation of vegetative microbes*. Academic Press, London, p. 279-304.
- Donovan, K.O., 1959. The occurrence of *Bacillus cereus* in milk and on dairy equipment. *Journal of Applied Bacteriology* 22: 131-137.
- Doyle, M.P. & E.H. Marth, 1975. Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* 1. Effects of moist heat, age of conidia, and sporulation medium. *Journal of Milk and Food Technology* 38: 678-682.
- Doyle, E.S., W.A. Mercer, J.N. Demrey, C.W. Bohrer, & J. Yesair, 1958. Sanitation of canning equipment. National Canners Association, Information Letter, p. 56-61.
- Drexler, H., 1965. Bombagen durch Nitrose Gase erzeugende Bakterien in Spinat. *Industrielle Obst- und Gemüseverwertung* 50: 855-856.
- Driessen, F.M. & H. van Duin, 1975. Steriliseren met ethyleenoxide. *Voedingsmiddelentechnologie* 8(32/33): 15-19.
- Dring, G.J. & G.W. Gould, 1975a. Reimposition of heat resistance on germinated spores of *Bacillus cereus* by osmotic manipulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66: 202-208.
- Dring, G.J. & G.W. Gould, 1975b. Electron transport-linked metabolism during germination of *Bacillus cereus* spores. In: P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow (Eds). *Spores VI*. American Society for Microbiology, Washington, p. 488-494.
- Duncan, C.L. & S.M. Harmon, 1976. *Clostridium perfringens*. In: M.L. Speck (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington D.C., p. 437-447.
- Durban, E. & N. Grecz, 1969. Resistance of spores of *Clostridium botulinum* 33A to combinations of ultraviolet and gamma rays. *Applied Microbiology* 18: 44-50.
- Dijck, L.G.M. van, 1970. Studie over toepassingsmogelijkheden van bestraling bij het ontsmetten van specerijen. Proefbedrijf voedselbestraling. Rapport nr. 3, 57 p.
- Dworkin, M., 1973. Interactions in Myxobacteria. In: J.H. Ashworth & J.E. Smits (Eds). *Microbial Differentiation*. Cambridge University Press, London, p. 125-142.

- Eaton, M., 1975. The Biochemistry of Bacterial Sporulation and Germination Ph.D. Thesis, University of Cambridge.
- Eckardt, C. & E. Ahrens, 1977. *Byssoschlamys fulva* Olliver and Smith as a potential spoilage agent in canned strawberries. II. Thermal resistance of the ascospores of *Byssoschlamys fulva*. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 5: 76-80.
- Eklund, M.W. & F.T. Poysky, 1972. Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. *Applied Microbiology* 24: 108-113.
- Emberger, O., 1970. A contribution to cultivation methods for the detection of aerobic sporeforming bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II* 125: 555-565.
- Emswiler, B.S., C.J. Pierson & A.W. Kotula, 1977. Comparative study of two methods for detection of *Clostridium perfringens* in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 735-737.
- Ernst, R.R. & J.J. Shull, 1962. Ethylene oxide gaseous sterilization. I. Concentration and temperature effects. *Applied Microbiology* 10: 337-341.
- Esty, J.R. & K.F. Meyer, 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and applied anaerobes. XI. *Journal of Infectious Diseases* 31: 650-663.
- Esty, J.R. & C.C. Williams, 1924. Heat resistance studies. I. A new method for the determination of heat resistance of bacterial spores. *Journal of Infectious Diseases* 34: 518-528.
- Evans, F.R. & H.R. Curran, 1943. The accelerating effect of sublethal heat on spore germination in mesophilic aerobic bacteria. *Journal of Bacteriology* 46: 513-523.
- Famerée, L., A. Marchal & C. Cotteleer, 1974. Contribution à l'étude des intoxications alimentaires. I. Le botulisme, ce mal connu. II. Le botulisme: une vilaine épine pour la gastronomie. *Ars Medici* 29: 2103-2144.
- Fields, M.L., 1970. The flat sour bacteria. *Advances in Food Research* 18: 163-217.
- Fitz-James, P.C. & E. Young, 1969. Morphology of sporulation. In: G.W. Gould & A. Hurst (Eds). *The Bacterial Spore*. Academic Press, London, p. 39-72.
- Florenz, J., 1976. Haltbarkeitsverbesserung der Konsummilch durch Hitzeschock und Reifung vor der Kurzzeiterhitzung. *Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover*, 70 p.
- FNZ, 1962. Voorschriften voor het onderzoek in de laboratoria van zuivel-fabrieken, FNZ, Den Haag, p. 99-100.
- Foerster, H.F. & J.W. Foster, 1966. Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. *Journal of Bacteriology* 91: 1168-1177.
- Foster, E.M., J.S. Deffner, T.L. Bott & E. McCoy, 1965. *Clostridium botulinum* food poisoning. *Journal of Milk and Food Technology*, 28, 86-91.
- Fowell, R.R., 1969a. Life cycles of yeasts. In: A.H. Rose & J.S. Harrison (Eds). *The yeasts* 1. Academic Press, London, p. 461-471.
- Fowell, R.R., 1969b. Sporulation and hybridization of yeasts. In: A.H. Rose & J.S. Harrison (Eds). *The yeasts* 1. Academic Press, London, p. 303-385.
- Fowell, R.R. (1975). Ascospores of yeasts. In: P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff (Eds). *Spores* VI. American Society of Microbiology, Washington, p. 124-131.
- Frank, H.K., R. Orth & R. Hermann, 1976. Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. *Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung* 162: 149-157.
- Freeman, M.A.R. & C.F. Barwell, 1960. Ethylene oxide sterilization in hospital practice. *Journal of Hygiene* 58: 337-345.

- Galesloot, T.E., 1956a. Een eenvoudige methode ter bepaling van het bacteriologisch effect van sterilisatieprocessen voor melk toegepast op het steriliseren van melk in doorstroom- en flessensterilisatoren. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 10: 79-100.
- Galesloot, T.E., 1956b. Melkzuurbacteriën die het antibioticum van *S. lactis* (nisine) onwerkzaam maken. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 10: 143-155.
- Galesloot, T.E., 1961. De anaërobe sporevormers die bederf van smeltkaas kunnen veroorzaken. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 15: 263-281.
- Galesloot, T.E., 1962. The sterilization of milk. In: *Milk Hygiene*. World Health Organization, Geneva, p. 269-302.
- Galesloot, T.E., 1964. Enkele factoren die invloed uitoefenen op de werking van nitraat als middel tegen boterzuurgisting in Edammer en Goudse kaas. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 18: 127-138.
- Galesloot, T.E., 1975. Onbeperkt duurzame smeltkaas in blik, bereiding en controle. Niet Openbaar Verslag Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Ede, NOV-488, 36 p.
- Galesloot, T.E. & F. Hassing, 1973. Kluitjes in roeryoghurt. In: *NIZO Mededeling*, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Ede, M7, p. 44-50.
- Galesloot, T.E. & H. Labots, 1959a. Over de bacteriologie van gesteriliseerde melk en melkprodukten. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 13: 16-37.
- Galesloot, T.E. & H. Labots, 1959b. Thermofiele sporevormers in melk, vooral met betrekking tot de bereiding van gesteriliseerde melk en chocolademelk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 13: 155-179.
- Genigeorgis, C., 1975. Public Health Importance of *Clostridium perfringens*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 167: 821-827.
- Gerhard, P. & W.G. Murrell, 1978. Basis and mechanism of bacterial spore-resistance: A seminar workshop report. *Spore Newsletter* 6: 1-75 (special issue).
- Germaine, G.R., E. Coggiola & W.G. Murrell, 1973. Development of ultraviolet resistance in sporulating *Bacillus cereus* T. *Journal of Bacteriology* 116: 822-831.
- Gerritsen, D.J. & E.J. Stamhuis, 1975. Chemische reactietechniek. *Prisma-Technica* 59, Uitgeverij Het Spectrum, Utrecht/Antwerpen.
- Gibbs, B.M. & B. Freame, 1962. The isolation and enumeration of *Clostridia* from foods. In: J.M. Leitch (Ed.). *Food Science and Technology*. Vol. II. Biological and microbiological aspects of foods. Gordon and Breach Science Publishers, New York/London, p. 605-614.
- Gibbs, B.M. & B.G. Freame, 1965. Methods for the recovery of *Clostridia* from foods. *Journal of Applied Bacteriology* 28: 95-111.
- Gibson, T., 1935. An investigation of *Sarcina ureae*, a spore-forming, motile coccus. *Archiv für Mikrobiologie* 6: 73-78.
- Gibson, T., 1965. *Clostridia* in silage. *Journal of Applied Bacteriology* 28: 56-62.
- Gilbert, G.L., V.M. Gambill, D.R. Spixner, R.K. Hoffman & C.R. Phillips, 1964. Effect of moisture on ethyleenoxide sterilization. *Applied Microbiology* 12: 496-503.
- Gilbert, R.J., 1976. Survey on Colony Counts and Predominant Organisms in Samples of Boiled and Fried Rice from Chinese and Indian Restaurants and "Take Away" shops. *Environmental Health* 84: 141-143.
- Gilbert, R.J. & A.J. Taylor, 1976. *Bacillus cereus* food poisoning. In: F.A. Skinner & J.G. Carr (Eds). *Microbiology in agriculture, fisheries and food*. Academic Press. London/New-York, p. 197-213.
- Gimenez, D.F. & A.S. Ciccarelli, 1970. Another type of *Clostridium botulinum*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 1, Originale* 215: 221-224.

- Goepfert, J.M., 1976. *Bacillus cereus*. In: M.L. Speck (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington D.C., p. 417-423.
- Goepfert, J.M., W.M. Spira & H.U. Kim, 1972. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *Journal of Milk and Food Technology* 35: 213-227.
- Goldblith, S.A., 1971. The inhibition and destruction of the microbial cell by radiations. In: W.B. Hugo (Ed.). *Inhibition and destruction of the microbial cell*. Academic Press, London/New York, p. 285-305.
- Gooday, G.W., 1973. Differentiation in *Mucorales*. In: J.M. Ashworth & J.E. Smits (Eds). *Microbiological differentiation*. Cambridge University Press, p. 269-294.
- Gordon, R.E., W.C. Haynes & C.H.-N. Pang, 1973. The Genus *Bacillus*. U.S. Department of Agriculture, Handbook No. 427, 283 p.
- Goresline, H.E., M. Ingram, P. Macuch, G. Mocquot, D.A.A. Mossel, C.F. Niven & F.S. Thatcher, 1964. Tentative classification of food irradiation processes with microbiological objectives. *Nature* 204: 237-238.
- Gould, G.W., 1970. Resistant structure of bacterial spores. *Chemistry and Industry* 45: 1430-1432.
- Gould, G.W., 1970a. Germination and the problem of dormancy. *Journal of Applied Bacteriology* 33: 34-49.
- Gould, G.W., 1977. Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology* 42: 297-309.
- Gould, G.W., 1978. Practical implications of compartmentalization and osmotic control of water distribution in spores. In: G.H. Chambliss & J.C. Vary (Eds). *Spores VII*. American Society for Microbiology, Washington, p. 21-26.
- Gould, G.W. & G.J. Dring, 1975. Heat resistance of bacterial endospores and the concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature, London* 258: 402-405.
- Gould, G.W. & G.J. Dring, 1977. Role of osmoregulation in the heat resistance of spores and vegetative cells. In: A.N. Barker, J. Wolf, D.J. Ellar, G.J. Dring & G.W. Gould (Eds). *Spore Research 1976*. Academic Press, London, p. 421-430.
- Gould, G.W. & G.J. Dring, 1975a. Role of an expanded cortex in resistance of bacterial endospores. In: P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff (Eds). *Spores VI*. American Society for Microbiology, Washington, p. 541-546.
- Gould, G.W. & J.C. Measures, 1977. Water relations in single cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London, Series B*: 153-166.
- Gould, G.W. & A.J.H. Sale, 1970. Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology* 60: 335-346.
- Grever, A.B.G., 1974. Minimum nitrite concentrations for inhibition of *Clostridia* in cooked meat products. In: B. Krol & B.J. Tinbergen (Eds). *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat products, 1973*. Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, p. 103-109.
- Grosskopf, J.C. & W.J. Harper, 1969. Role of psychrophilic sporeformers in long life milk. *Journal of Dairy Science* 52: 897.
- Gruia, E.A. & S.E. Hartsell, 1954. Lysozyme and morphological alteration induced in *Micrococcus lysodeikticus*. *Journal of Bacteriology* 68: 171-177.
- Haagsma, J. & E.A. ter Laak, 1977. Kanttekeningen bij het optreden van botulismus in Nederland in 1976. *Het Vogeljaar* 25: 74-78.
- Hanson, R.S., M.V. Curry, J.V. Garner & H.O. Halvorson, 1972. Mutans of *B. cereus* strain T that produce thermoresistant spores lacking dipicolinic acid and have low levels of calcium. *Canadian Journal of Microbiology* 18: 1139-1143.

- Hanson, J.N., G. Spiegelman & H.O. Halvorson, 1970. Bacterial spore outgrowth; its regulation. *Science* 168: 1291-1298.
- Harmon, S.M., 1976. Collaborative study of an improved method for the enumeration and confirmation of *Clostridium perfringens* in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 59: 606-612.
- Härnult, B.G., B.G. Snugg, 1972. Heat resistance of *Bacillus subtilis* spores at various water activities. *Journal of Applied Bacteriology* 35: 615-624.
- Hartig, A. & M. Breitenbach, 1977. Intracellular cAMP in synchronous sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Letters* 1: 79-82.
- Hartwell, L.H., 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological Reviews* 38: 164-198.
- Hauschild, A.H.W., R.J. Gilbert, S.M. Harmon, M.F. O'Keefe & R. Vahlefeld, 1977. ICMSF methods studies. VIII. Comparative study for the enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 884-892.
- Hauschild, A.H.W. & R. Hilsheimer, 1974. Enumeration of food-borne *Clostridium perfringens* in Egg Yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar. *Applied Microbiology* 27: 521-526.
- Hauschild, A.H.W. & R. Hilsheimer, 1977. Enumeration of *Clostridium botulinum* spores in meats by a pour-plate procedure. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 829-832.
- Hawat, H. & M.K. Achtzehn, 1971. Entstehung und Bestimmung von Stickstoffoxid in Spinat - Steril-konserven. *Nahrung* 15: 869-883.
- Hermier, J., 1961. L'origine des spores de thermophiles dans le lait stérilisé en bouteille. *Lait* 40: 129-144.
- Himmelfarb, P. H.M. El Bisi, R.B. Read & W. Litsky, 1962. Effect of relative humidity on the bactericidal activity of propylene oxide vapour. *Applied Microbiology* 10: 431-435.
- Hirsch, A. & E. Grindsted, 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *Journal of Dairy Research* 21: 101-110.
- Hobbs, G., K. Williams & A.T. Willis, 1971. Basic methods for the isolation of *Clostridia*. In: D.A. Shapton & R.G. Board (Eds). *Isolation of anaerobes*. Academic Press, London/New-York, p. 1-23.
- Hobrecht, R., 1975. Untersuchungen über Keimstatus und Haltbarkeit von Schmelzkäsekonserven. *Milchwissenschaft* 30: 681-684.
- Hoch, J.A., 1976. Genetics of bacterial sporulation. *Advances in Genetics* 18: 69-98.
- Hohl, H.R., 1976. Myxomycetes. In: P.S. Weber & W.M. Hess (Eds). *Fungal spores, Form & Function*. John Wiley & Sons, New York, p. 436-500.
- Hoogzand, C., 1969. Verduurzaming door warmte van groente en fruit. In: *Het verduurzamen van voedingsmiddelen, deel III*. AGON Elsevier, Amsterdam, p. 785-814.
- Hook, L.A., 1977. Distribution of Myxobacters in aquatic habitats of an alkaline bog. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 333-335.
- Hopwood, D.A. & M.J. Merrick, 1977. Genetics of antibiotic production. *Bacteriological Reviews* 41: 595-635.
- Hugo, W.B. (Ed.), 1971. Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, London/New York.
- Huhtanen, C.N., J. Nachski, C.S. Custer & R.W. Russell, 1976. Growth and toxin production by *C. botulinum* in moldy tomato juice. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 711-715.
- Hurst, A., 1977. Bacterial injury; a review. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 936-944.
- Imae, Y. & J.L. Strominger, 1976a. Relationship between cortex content and properties of *Bacillus sphaericus* spores. *Journal of Bacteriology* 126: 907-913.

- Imae, Y. & J.L. Strominger, 1976b. Cortex content of asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 126: 914-918.
- Ingram, M., 1969. Sporeformers as food spoilage organisms. In: Gould and Hurst (Eds). *The bacterial spore*. Academic Press, London, p. 449-610.
- Ingram, M., 1976. The microbiological role of nitrite in meat products. In: F.A. Skinner & J.G. Carr (Eds): *Microbiology in agriculture, fisheries and food*. Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 1-18.
- Ingram, M. & A.G. Kitchell, 1967. Salt as a preservative for foods. *Journal of Food Technology* 2: 1-15.
- Ingram, M. & R.H.M. Robinson, 1951. A discussion of the literature on botulism in relation to acid foods. *Proceedings of the Society of Applied Bacteriology* 14: 73-84.
- Insalata, N.F., J.S. Witzeman & J.H. Berman, 1969. The problems and results of an incidence study of the spores of *C. botulinum* in frozen vacuum pouch-pack vegetables. *Developments in industrial microbiology* 11: 330-334.
- Ito, K.A., J.K. Chen, P.A. Lerche, M.L. Seeger & J.A. Unverferth, 1976. Effect of acid and salt concentration in fresh-pack pickles on the growth of *Clostridium botulinum* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 121-124.
- Ito, K.A., B.C. Denny, C.K. Brown, M. Yao & M.L. Seeger, 1973. Resistance of bacterial spores to hydrogen peroxide. *Food Technology* 27(11): 58-66.
- Jakobsen, M. et al., 1972. Germination and outgrowth of the bacterial spore in the presence of different solutes. *Lebensmittelwissenschaft und Technologie* 5: 159-162.
- Jakobsen, M. & H.C. Jensen, 1975. Combined effect of water activity and pH on the growth of butyric anaerobes in canned pears. *Lebensmittelwissenschaft und Technologie* 8: 158-160.
- Jakobsen, M. & J.L. Nielsen, 1973. Thermophilic flat sour organisms. A study of their occurrence and significance for the stability of canned vegetables. *Nordisk Veterinærmedicin* 25: 554-561.
- Jansen, B.C., 1971. The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research* 38: 93-98.
- Jarvis, B., 1976. Mycotoxins in food. In: F.A. Skinner & J.G. Carr (Eds). *Microbiology in agriculture, fisheries and food*. Academic Press, London, p. 251-268.
- Jensen, L.B., 1945. *Microbiology of meats*. The Garrard Press, Champaign, ILL. 2e druk, 389 p.
- Joo, H.K., 1971. Studies on the manufacture of chungkukjang. *Korean Journal of Food Science and Technology* 3: 64-67.
- Julseth, R.M. & R.H. Deibel, 1974. Microbial profile of selected spices and herbs at import. *Journal of Milk and Food Technology* 37: 414-419.
- Kalakoutskii, L.V. & N.S. Agre, 1973. Endospores of actinomycetes: dormancy and germination. In: G. Sykes & F.A. Skinner (Eds). *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Academic Press, London, p. 179-193.
- Kalakoutskii, L.V. & N.S. Agre, 1976. Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. *Bacteriological Reviews* 40: 469-524.
- Kampen, W.H., 1975. Continu sterilisatie processen door middel van kort-hoog-verhitten. *Polytechnisch Tijdschrift (Ed. Procestechneik)* 30: 687-693.
- Kandler, O., 1967. Taxonomie und Technologische Bedeutung der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 1. Originale, Supplementheft* 2: 139-164.
- Kauf, C., J.P. Lorent, J. Mosimann, I. Schlatter, B. Somaini & J. Velvart, 1974. Botulismusepidemie vom Typ B. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 104: 677-685.

- Kautter, D.A. & R.K. Lynt, 1976. *Clostridium botulinum*. In: M.L. Speck (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington D.C., p. 424-436.
- Kautter, D.A. & H.M. Solomon, 1977. Collaborative study of a method for the detection of *Clostridium botulinum* and its toxins in foods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 60: 541-545.
- Kawatomari, T. & R.H. Vaughn, 1956. Species of *Clostridium* associated with zapatera spoilage of olives. Food Research 21: 481-490.
- Kelsey, J.C., 1967. Use of gaseous antimicrobial agents with special reference to ethylene oxide. Journal of Applied Bacteriology 30: 92-100.
- Kereluk, K., R.A. Gammon & R.S. Lloyd, 1970. Microbiological aspects of ethylene oxide sterilization. II. Microbial resistance to ethylene oxide. Applied Microbiology 19: 152-156.
- Keynan, A., 1973. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells. In: J.M. Ashworth & J.E. Smith (Eds). Microbial Differentiation. University Press, Cambridge, p. 85-123.
- Keynan, A., 1978. Spore structure and its relation to resistance, dormancy and germination. In: G. Chlambiss & J.C. Vary (Eds). Spores VII. American Society for Microbiology, Washington, p. 43-61.
- Keynan, J., A.A. Berns, G. Dunn, M. Young & J. Mandelstam, 1976. Resporulation of outgrowing *Bacillus subtilis* spores. Journal of Bacteriology 128: 8-14.
- Keynan, A. & Z. Evenchik, 1969. Activation. In: G.W. Gould & A. Hurst (Eds). The Bacterial spore. Academic Press, London/New-York, p. 359-396.
- Khalafalla, S.M., A.E. Shehata, M.N.I. El-Magdoub & A.A. Hofi, 1977. Effect of hydrogen peroxide-catalase treatment on the keeping quality of sterilized milk drinks. Milchwissenschaft 32: 403-405.
- Kim, Z.U. & S.H. Cho, 1975. A study on the manufacturing of soy sauce by the combined use of *Aspergillus sojae* and *Bacillus subtilis*. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society 18: 1-9.
- Kitahara, K. & C-L. Lai, 1967. On the spore formation of *Sporolactobacillus inulinus*. Journal of General and Applied Microbiology 13: 197-203.
- Kitahara, K., Suzuki, J., 1963. *Sporolactobacillus* nov. subgen. Journal of General and Applied Microbiology 9: 59-71.
- Knight, B.C.J.G. & H. Proom, 1950. A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. Journal of General Microbiology 4: 508-538.
- Knock, G.G., 1954. A technique for the approximate quantitative prediction of flat souring in canned peas. Journal of the Science and Food in Agriculture 5: 113-119.
- Koch, R., 1877. Untersuchungen über Bakteriën V. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 2: 277-310.
- Koga, S., A. Echigo & K. Nunomura, 1966. Physical properties of cell water in partially dried *Saccharomyces cerevisiae*. Biophysical Journal 6: 665-675.
- Koolman, W.J. & R.P.W.M. Jacobs, 1977. The heat resistance of *Bacillus subtilis* 1-12 in relation to the water activity during pre-equilibration and during exposure to heat. In: A.N. Barker, J. Wolf, D.J. Ellar, G.J. Dring & G.W. Gould (Eds). Spore Research 1976. Academic Press, London/New York, p. 477-485.
- Korzybski, T. & W. Kurylowicz, 1961. Antibiotica. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena.
- Kreger-van Rij, N.J.W., 1978. Electron microscopy of germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. Archiv für Mikrobiologie 117: 73-77.
- Krol, B. & B.J. Tinbergen (Eds), 1974. Proceedings of the International Symposium of Nitrite in Meat Products. Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen.

- Kuehn, H.H., 1957. Observations on Gymnoascaceae. IV. A new species of *Arachniotus* and a reconsideration of *Arachniotus triosporus*. *Mycologia* 49: 55-67.
- Kurytowicz, W., 1976. Antibiotics: A critical review. American Society for Microbiology, Washington, 204 p.
- Labaw, G.D. & N.W. Desrosier, 1953. Antibacterial activity of edible plant extracts. *Food Research* 18: 186-190.
- Labots, H., 1968. Kruiden ... bacteriologisch gevaarlijk? *Vleesdistributie & Vleestechnologie* 3: 211-213.
- Labots, H. & T.E. Galesloot, 1959. Vlokvorming in de roomlaag van gepasteuriseerde melk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 13: 79-99.
- Labots, H. & G. Hup, 1964. *Bacillus cereus* in rauwe en gepasteuriseerde melk. I. Bepaling van het aantal *B. cereus*-sporen in melk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 18: 112-126.
- Labots, H., G. Hup & Th.E. Galesloot, 1965. *Bacillus cereus* in rauwe en gepasteuriseerde melk. III. Over de besmetting van rauwe melk met *B. cereus*-sporen bij de melkwinning. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 19: 191-221.
- Ladiges, W.C. et al., 1974. Incidence and viability of *Clostridium perfringens* in ground beef. *Journal of Milk and Food Technology* 37: 622-623.
- Lamanna, C., 1959. The most poisonous poison. *Science* 130: 763-772.
- Langeveld, L.P.M., 1967. *Clostridium thermosaccharolyticum* in sterilized chocolate milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 21: 245-247.
- Langeveld, L.P.M., 1970. Houdbaarheid in de koelkast van wel en niet aseptisch verpakte gepasteuriseerde melk. *Officieel orgaan FNZ* 62: 544-546.
- Langeveld, L.P.M., F. Cuperus & J. Stadhouders, 1973. Bacteriological aspects of the keeping quality at 5 °C of reinfected and non-reinfected pasteurized milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 54-65.
- Langeveld, L.P.M., T. Robbertsen & J. Stadhouders, 1976. Steriliteitscontrole en bemonstering van stromend gesteriliseerde, aseptisch verpakte produkten. *NIZO-Mededelingen* M11, NIZO, Ede, 20 p.
- Leininger, H.V., 1976. Equipment, media, reagents, routine tests and stains. In: M.L. Speck (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington D.C., p. 10-94.
- Leistner, L. & W. Rödel, 1976. Inhibition of micro-organisms in food by water-activity. In: F.A. Skinner & W.B. Hugo (Eds). *Inhibition and inactivation of vegetative microbes*. Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 219-237.
- Levinson, H.S., F.E. Feeherry & G.R. Mandels, 1978. Base for application of bacteria and fungal spores. In: G. Chambliss & J.C. Vary (Eds). *Spores VII*. American Society for Microbiology, Washington, p. 3-17.
- Levinson, H.S. & M.T. Hyatt, 1971. Distribution and correlation of events during thermal inactivation of *B. megaterium* spores. *Journal of Bacteriology* 108: 111-121.
- Lewis, J.C., N.S. Snell & H.K. Burr, 1960. Water permeability of bacterial spores and the concept of a contractile cortex. *Science* 132: 544-545.
- Lewith, S., 1890. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 26: 341-354.
- Lewis, J.C., N.S. Snell & G. Alderton, 1965. Dormancy and activation of bacterial spores. In: L.L. Campbell & H.O. Halvorsen (Eds). *Spores III*. American Society for Microbiology, Ann Arbor, Michigan, p. 47-54.
- Lin, C-C. & K-C. Lin, 1970. Spoilage bacteria in canned foods. II. Sulfide spoilage bacteria in canned mushrooms and a versatile medium for the enumeration of *Clostridium nigrificans*. *Applied Microbiology* 19: 283-286.
- Lipinska, E., A.W. Gudkov & S.N. Karlikanowa, 1975. Verwendung von Nisin bei der Käseherstellung. *VEB Fachbuchverlag, Leipzig*, 104 p.

- Lodder, J., 1970. The yeasts: a taxonomic study. North Holland publ. Co, Amsterdam, 1385 p.
- Lówik, J.A.M. & P.J. Anema, 1972. Effect of pH on the heat resistance of C. sporogenes spores in minced meat. Journal of Applied Bacteriology 35: 119-121.
- Lubieniecki-von Schelhorn, M. & R. Heiss, 1975. The influence of relative humidity on the thermal resistance of mould spores. In: R.B. Duckworth (Ed.). Water relations of foods. Academic Press, London, p. 339-361.
- Lund, B.M., 1962. Ph.D. Thesis, University of London.
- Lynt, R.K., D.A. Kautter & R.B. Read jr. 1975. Botulism in commercially canned foods. Journal of Milk and Food Technology 38: 546-550.
- MacDonald, R.E. & S.W. MacDonald, 1962. The physiology and natural relationships of the motile, sporeforming Sarcinae. Canadian Journal of Microbiology 8: 795-808.
- Madelin, M.F. (Ed.), 1966. The fungus spore. 18th Symposium of the Colston Research Society. Butterworths, London, 338 p.
- Maeda, Y., Y. Teramoto & S. Koga. 1975. Calorimetric studies on heat activation of Bacillus cereus spores. Journal of General and Applied Microbiology 21: 119-122.
- Mann, E.J., 1974, 1975. Processed cheese, digest of world literature, part 1 and 2. Dairy Industries 39: 481-482, 40: 24-25.
- Marshall, C.R. & V.T. Walkley, 1952. Thermal death rates of spoilage organisms in apple juice. Food Research 17: 204-211.
- Maunder, D.T., 1976. Thermophilic flat sour sporeformers. In: M.L. Speck (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington D.C., p. 254-262.
- McClung, L.S. & R. Toabe, 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of Clostridium sporogenes and certain species of the gangrene and botulinum groups. Journal of Bacteriology 53: 139-147.
- McEvoy, I.J. & M.R. Stuart, 1970. Temperature tolerance of Aspergillus fisheri var. glaber in canned strawberries. Irish Journal of Agricultural Research 9: 59-67.
- Measures, J.C., 1975. The role of amino acids in the osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature, London 257: 398-400.
- Mercer, W.A., W.W. Rose, C.E. Butler & N.N. Appleman, 1958. National Canners Association, Information Letter N. 1666 (Convention Issue), p. 56.
- Mercer, W.A., W.W. Rose, L.W. Regier & J.E. Chapman, 1960. Better washing of asparagus to improve quality and prevent spoilage. National Canner Association, Research Laboratory. Report 60-W-46.
- Meyer, K.F., 1956. The situation of botulism as a world health problem. Bulletin of the World Health Organization 15: 281-298.
- Michels, M.J.M. & P.J. Anema, 1974. Cold tolerant sporeformers in pasteurized meals to be stored at 0-3 °C. In: International Symposium on Food Microbiology, FAST, Milan, 2nd volume, p. 77-86.
- Michels, M.J.M. & F.M.W. Visser, 1976. Occurrence and thermoresistance of spores of psychrophilic and psychrotrophic aerobic sporeformers in soil and foods. Journal of Applied Bacteriology 41: 1-11.
- Michener, H.D., P.A. Thompson & J.C. Lewis, 1959. Search of substances which reduce the heat resistance of bacterial spores. Applied Microbiology 7: 166-173.
- Mol, J.H.H. & C.A. Timmers, 1970. Assessment of the stability of pasteurized comminuted meat products. Journal of Applied Bacteriology 33: 233-247.
- Moore-Landecker, E., 1972. Fundamentals of the Fungi. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, USA, 482 p.
- Mortimer, R. & D. Hawthorne, 1969. Yeast genetics. In: A.H. Rose & J.S. Harrison (Eds). The Yeasts. Academic Press, London, p. 386-460.

- Mossel, D.A.A., 1959. Enumeration of sulphite-reducing Clostridia occurring in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10: 662-669.
- Mossel, D.A.A., 1977. Microbiology of foods. Occurrence, prevention and monitoring of hazards and deterioration. The University of Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht. Universiteit van Utrecht, Faculteit der diergeneeskunde, Utrecht.
- Mossel, D.A.A., 1977a. Health protection aspects of food irradiation at the pasteurization level. *Acta Alimentaria* 6: 253-261.
- Mossel, D.A.A., A.S. de Bruin, H.M.J. van Diepen, C.M.A. Vendrig & G. Zoute-welle, 1956. The enumeration of anaerobic bacteria, and of Clostridium species in particular, in foods. *Journal of Applied Bacteriology* 19: 142-154.
- Mossel, D.A.A. & E.F. Drion, 1979. Risk analysis. Its application to the pro- jection of the consumer against Food-transmitted diseases of microbial aetiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 321-323.
- Mossel, D.A.A. & A.P. de Groot, 1965. The use of pasteurizing doses of gamma radiation for the destruction of salmonellae and other Enterobacteriaceae in some foods of low water activity. Proceedings of the International Con- ference on Radiation Preservations of Foods, Publication 1273, National Academy of Sciences, Washington p. 232-264.
- Mossel, D.A.A., M.J. Koopman & E. Jongerius, 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Applied Microbiology* 15: 650-653.
- Mossel, D.A.A., E.H. Meursing & H. Slot, 1974. An investigation on the num- bers and types of aerobic spores in cocoa powder and whole milk. *Nether- lands Milk and Dairy Journal* 28: 149-154.
- Mossel, D.A.A., J.L. Shennan, E.H. Meursing, H. Slot & H.J. Pouw, 1973. The enumeration of 'all' spore bearing cells of Bacillaceae in heat-processed foods. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 656.
- Mossel, D.A.A. & J. de Waart, 1968. The enumeration of Clostridia in foods and feeds. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille* 19: 13-27.
- Mulder, S.J., 1977. Microbiologische aspecten van de bereiding van droge worst. *Voedingsmiddelentechnologie* 10(50): 10-13.
- Murrell, W.G., D.F. Ohye & R.A. Gordon, 1969. Cytological and chemical struc- ture of the spore. In: L.L. Campbell (Ed.). *Spores III*. American Society for Microbiology, Bethesda, Md, p. 1-19.
- Murrell, W.G. & W.J. Scott, 1966. Heat resistance of bacterial spores at various water activities. *Journal of General Microbiology* 43: 411-425.
- Murrell, W.G. & P.A. Wills, 1977. Initiation of *Bacillus* spore germination by hydrostatic pressure: effect of temperature. *Journal of Bacteriology* 129: 1272-1280.
- Naguib, K. & L. Hussein, 1972. The effect of hydrogen peroxide treatments on the bacteriological quality and nutritive value of milk. *Milchwissenschaft* 27: 758-762.
- National Canners Association, 1968. Laboratory Manual for Food Canners and Processors. Volume I. The AVI Publishing Co. Inc., Westport.
- Neff, R.J. & R.H. Neff, 1969. The biochemistry of amoebic encystment. In: H.W. Woolhouse (Ed.). *Dormancy and Survival* - Symposium of the Society for Experimental Biology XXIII. Cambridge University Press, Cambridge, p. 51-81.
- Nieuwenhof, F.F.J., 1977. Mesophilic lactobacilli as a cause of nitrate re- duction in Gouda cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 31: 153-162.
- Nitschmann, E., 1967. Verfahren zur Konservierung von Nahrungs- und Genuss- mitteln mittels Mineralsäuren. Deutsches Patentamt. Offenlegungsschrift 1692171.
- Olson, Jr. J.C., 1978. Microbiological specifications for foods: Internatio- nal activities. *Food Technology* 32: 55-57.

- Orth, D.S., 1977. Comparison of sulfite-polymixin-sulfadiazine medium and tryptose-sulfite-cycloserine medium without Egg Yolk for recovering *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 986-988.
- Partsch, G., H. Draxler & H. Altmann, 1969. The ultra-structure of spores of *Byssoschlamys fulva*. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 39: 305-313.
- Patashnik, M., 1953. A simplified procedure for thermal process evaluation. *Food Technology, Champaign* 7: 1.
- Pearce, S.M. & P.C. Fitz-James, 1971. Sporulation of a cortexless mutant of a variant of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 105: 339-348.
- Perigo, J.A. et al., 1967. Observations on the inhibition of vegetative cells of *Clostridium sporogenes* by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of sub-lethally processed meats. *Journal of Food Technology* 2: 377-397.
- Perkin, A.G., H. Burton, H.M. Underwood & F.L. Davies, 1977. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. *Journal of Food Technology* 12: 131-148.
- Pette, J.W. & P. Sjollem, 1951. *Zuivelmicrobiologie en Melkhygiëne*. Misset N.V., Doetinchem, p. 228.
- Pflug, I.J. & R.G. Holcomb, 1977. Principles of thermal destruction of microorganisms. In: S.S. Block (Ed.). *Disinfection, sterilization and preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 933-994.
- Pflug, I.J. & C.F. Schmidt, 1968. Thermal destruction of microorganisms. In: C.A. Lawrence & S.S. Block (Eds). *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 63-105.
- Phillips, C.R., 1949. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. II. Sterilization of contaminated objects with ethylene oxide and related compounds: time, concentration and temperature relationships. *American Journal of Hygiene* 50: 280-288.
- Phillips, C.R., 1952. Relative resistance of bacterial spores and vegetative bacteria to disinfectants. *Bacteriological Reviews* 16: 135-138.
- Pien, J., 1972. Chemical and physico-chemical aspects, laboratory control. In: *International Dairy Federation (Ed.). IDF Monograph on UHT milk*. International Dairy Federation, Brussel, p. 35-53.
- Piggot, P.J. & J.G. Coote, 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological Reviews* 40: 908-962.
- Pitt, J.I., 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In: R.B. Duckworth (Ed.). *Water relations of foods*. 273-308. Academic Press, London, p. 273-308.
- Powell, J.F., 1953. Isolation of dipicolinic acid from spores of *B. megaterium*. *Biochemical Journal*: 54: 210-211.
- Powers, E.M. et al., 1975. Microbiology of processed spices. *Journal of Milk and Food Technology* 38: 683-687.
- Prescott, S.C. & C.G. Dunn, 1949. *Industrial microbiology*. McGraw-Hill Book Company.
- Prescott, S.C. & W.L. Underwood, 1897. Contributions to our knowledge of micro-organisms and sterilizing processes in the canning industries. II The souring of canned sweet corn. *Technology Quarterly and Proceedings of the Society of Arts* 10: 183-199.
- Preussmann, R., D. Schmähl, G. Eisenbrand & R. Port, 1977. Dose-response study with N-nitrosopyrrolidine and some comments on risk evaluation of environmental N-nitroso compounds. In: Tinbergen, B.J. & B. Krol (Eds). *Proceedings of the Second International Symposium on Nitrite in Meat Products*. Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, p. 261-268.
- Prevot, A.R. & E.R. Brygoo, 1953. Nouvelles recherches sur le botulisme et ses cinq types toxiques. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille* 85: 544-575.

- Pulay, G., 1974. Neues über einige die Lebenstätigkeit der Buttersäure-Bakterien beeinflussende Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der Haltbarkeit von Schmelzkäse. Deutsche Molkerei-Zeitung 95 I: 8-16.
- Put, H.M.C. & J. de Jong, 1980. The heat resistance of selected yeasts causing spoilage of canned soft drinks and fruit products. In: F.A. Skinner, R.R. Davenport & S.M. Passmore (Eds.). Yeasts. Academic Press London. In Press.
- Put, H.M.C., J. de Jong, F.E.M.J. Sand & A.M. van Grinsven, 1976. Heat resistance studies on yeast spp causing spoilage in soft drinks. Journal of Applied Bacteriology 40: 135-152.
- Put, H.M.C., J. de Jong & F.E.M.J. Sand, 1977. The heat resistance of ascospores of *Sacch. cerevisiae* strain 195 and *Sacch. chevalieri* strain 215, isolated from heat preserved fruit juice. In: A.N. Barker, G.W. Gould, J. Wolf & G.J. Dring (Eds). Spore research 1976. Academic Press, London, p. 545-563.
- Put, H.M.C. & J.Th. Kruiswijk, 1968. Altérations microbiologique des fraises au sirop pasteurisées, due a *Byssoschlamys*. Annales de l'Institut Pasteur de Lille 19: 171-190.
- Put, H.M.C. & S.J. Wybinga, 1961. Sulfito-réduction et sulfito-sensibilité des Clostridia. Considérations taxonomiques et pratiques. Annales de l'Institut Pasteur de Lille 12: 175-181.
- Radaeva, I.A., V.A. Efimova & A.A. Anatskaya, 1974, 1975. Use of nisin in the manufacture of evaporated milk. *Molochnaya promyshlennost*, 20-23. Gerefeerd in Dairy Science Abstracts 36(1974) 8, 37 (1975) 663.
- Ramadan, F.M., R.T. El-Zanfaly, F.A. El-Wakeil & A.M. Alian, 1972. On the antibacterial effects of some essential oils. I. Use of agar diffusion method. II. Studies of semi-solid agar phase. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 1: 51-55, 96-102.
- Read, R.B. & D.A. Kautter, 1974. The botulism hazard in canned mushrooms - U.S. experiences. IV International Congress of Food Science and Technological Work Documents, 4B, 1-2.
- Rice, S.L., L.R. Beuchat & R.E. Worthington, 1977. Patulin production by *Byssoschlamys* spp. in fruit Juices. *Applied Environmental Microbiology* 34: 791-796.
- Rice, A.C. & C.S. Pederson, 1954. Factors influencing growth of *Bacillus coagulans* in canned tomato juice. II. Acidic constituents of tomato juice and specific organic acids. *Food Research* 19: 115.
- Richmond, B. & M.L. Fields, 1966. Distribution of the thermophilic aerobic sporeforming bacteria in food ingredients. *Applied Microbiology* 14: 623-626.
- Ridgway, J.D., 1958. The incidence and thermal resistance of mesophilic spores found in milk and related environments. *Journal of Applied Bacteriology* 21: 118-127.
- Riemann, H., 1973. Botulinum Food Poisoning. *Journal de l'Institut Canadien de Science et Technologie alimentaire* 6: 111-125.
- Roberts, T.A., 1974. Inhibition of bacterial growth in model systems in relation to the stability and safety of cured meats. In: Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products, Zeist, 1973. Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, p. 91-101.
- Roberts, T.A. & A.O. Hitchins, 1969. Resistance of spores. In: G.W. Gould & A. Hurst (Eds). The bacterial spore. Academic Press, London, p. 611-670.
- Roberts, T.A. & M. Ingram, 1976. Nitrite and nitrate in the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. In: B.J. Tinbergen & B. Krol (Eds). Proceedings of the second International Symposium on Nitrite in Meat Products. Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, p. 29-38.

- Rodricks, J.V., 1976. Mycotoxins and other fungal related food problems. American Chemical Society, Washington, 409 p.
- Ross, E.W., 1977. Maximum-likelihood estimation of 12 D for inoculated packs. *Journal of Food Science* 42: 1264-1268.
- Roux, C. & J.-L. Bergère, 1977. Caractères taxonomiques de *Clostridium tyrobutyricum*. *Annales de Microbiologie, Institut Pasteur* 128A: 267-276.
- Rowley, D.B. et al., 1974. Status of radappertization of meats. *Journal of Milk and Food Technology* 37: 86-93.
- Rubbo, S.D., J.F. Gardner & R.L. Webb, 1967. Biocidal activities of glutaraldehyde and related compounds. *Journal of Applied Bacteriology* 30: 78-87.
- Rudat, K.D., 1969. Vergleichende Untersuchungen über die antibakterielle Wirksamkeit verschiedener Lauchgewächse und Kruziferenaten. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles* 18: 29-43.
- Russell, A.D., 1971. The destruction of bacterial spores. In: W.B. Hugo (Ed.), *Inhibition and destruction of the microbiological cell*. Academic Press, London, p. 451-613.
- Sadoff, H.L., 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews* 39: 516-539.
- Sand, F.E.M.J., 1973. Recent investigations on the microbiology of fruit juice concentrates. In: *International Federation of Fruit Juice Producers* (Ed.), *Technology of fruit juice concentrates, chemical composition of fruit juices*. International Federation of Fruit Juice Producers, Vienna, p. 185-216.
- Santha, I.M. & N.C. Ganguli, 1976. Myriad uses of hydrogen peroxide in dairy industry. *Journal of Food Science and Technology, Mysore* 13: 1-5.
- Schmit, J.C. & S. Brody, 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacterial Reviews* 40: 1-41.
- Schmidt, C.F. & W.K. Nank, 1957. Sterilization by means of spore deactivation. *Food Research* 22: 562-566.
- Schumann, U. & J. Werner, 1973. Thermoresistenz von *Byssoschlamys fulva* und *Byssoschlamys nivea*. *Flüssiges Obst* 40: 125-129.
- Scott, W.J., 1957. Water relations in food spoilage organisms. *Advances in Food Research* 7: 83-127.
- Settlow, P., 1977. Protein metabolism during germination of spores of *Bacillus* species. In: A.N. Barker, J. Wolf, D.J. Ellar, G.J. Dring & G.W. Gould (Eds), *Spore Research 1976*. Academic Press, London, p. 661-682.
- Shapton, D.A., D.W. Lovelock & R. Laurita-Longo, 1971. The evaluation of sterilization and pasteurization processes from temperature measurements in degrees Celcius (°C). *Journal of Applied Bacteriology* 34: 491-500.
- Shehata, T.E. & E.B. Collins, 1972. Sporulation and heat resistance of psychrophilic strains of *Bacillus*. *Journal of Dairy Science* 55: 1405-1409.
- Shehata, A.E., S.M. Khalafalla, M.N.I. Magdoub & A.A. Hofi, 1977. Use of nisin in the production of sterilized milk drinks. *Milchwissenschaft* 32: 412-416.
- Simonart, P. & G. Debeer, 1954. Het bacteriegehalte van melk tijdens het verloop van het centrifugeren. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 8: 163-171.
- Sinclair, N.A. & J.L. Stokes, 1964. Isolation of obligately anaerobic psychrophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* 87: 562-565.
- Singh, R.P., B. Settlow & P. Settlow, 1977. Levels of small molecules and enzymes in the mother cell compartment and the forespore of sporulating *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 130: 1130-1138.
- Slepecky, R.A., 1972. Ecology of bacterial sporeformers. In: H.O. Halvorson, R. Hanson, L.L. Campbell (Eds), *Spores V*. American Society for Microbiology, Ann Arbor, Michigan, p. 297-313.

- Smelt, J.P.P.M., M.J. Santos da Silva & H. Haas, 1977. The combined influence of pH and water activity on the heat resistance of *Clostridium botulinum* types A and B. In: A.N. Barker, J. Wolf, D.J. Ellar, G.J. Dring & C.W. Gould (Eds). *Spore Research 1976*. Academic Press, London, p. 469-476.
- Smith, J.E. & D.R. Berry, 1974. An introduction to biochemistry of fungal development. Academic Press, London, 326 p.
- Smith, N.R., R.E. Gordon & F.E. Clark, 1952. Aerobic sporeforming bacteria. United States Department of Agriculture, Monograph No. 16, 148 p.
- Sonenshein, A.L. & K.M. Campbell, 1978. Control of gene expression during sporulation. In: G.H. Chambliss & J.C. Vary (Eds). *Spores VII*. American Society for Microbiology, Washington, p. 179-192.
- Speck, R.V., 1976a. Aciduric flat sour sporeformers. In: M.L. Speck (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington D.C., p. 248-253.
- Speck, R.V., 1976b. Sulfide spoilage sporeformers. In: M.L. Speck (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington D.C., p. 270-274.
- Spira, W.M. & J.M. Goepfert, 1975. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Canadian Journal of Microbiology* 21: 1236-1246.
- Spittstoesser, D.F. & C.M. Spittstoesser, 1977. Ascospores of *Byssoschlamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. *Journal of Food Science* 42: 685-689.
- Spuy, J.E. van der, F.N. Matthee & D.J.A. Crafford, 1975. The heat resistance of moulds *Penicillium vermiculatum* dangeard and *Penicillium brefeldianum* dodge in apple juice. *Phytophylactica* 7: 105-107.
- Stegeman, H., D.A.A. Mossel & W. Pilnik, 1977. Studies on the sensitizing mechanism of pre-irradiation to a subsequent heat treatment on bacterial spores. In: A.N. Barker, J. Wolf, D.J. Ellar, G.J. Dring & G.W. Gould (Eds). *Spore Research 1976*. Academic Press, London, p. 565-588.
- Steinbuch, E., 1968. Anwendung von Hitze zur Konservierung und Lagerung von Lebensmitteln. CICRA, Symposium, Berlin. Einfluss technologischer Massnahmen auf die Qualität der Lebensmittel, p. 63-76.
- Steinbuch, E., 1969. Roterende sterilisatie van asperges in blik. Sprenger Instituut, Wageningen, Bulletin nr. 91.
- Steinbuch, E., 1974a. Toepassing van hygiëne bij de winning, het transport en de opslag van voedingsmiddelen. Groenten en Fruit. Hoofdstuk 7.11.3. *Leergang Voedingsmiddelenhygiëne*. Voedingsmiddelentechnologie 7(9): 24-27.
- Steinbuch, E., 1974b. Food preservation by acid sensibilization of bacterial spores 1. Microbiological aspects. 2. Quality aspects. *Proceedings of the IV International Congress Food Science and Technology, Madrid 1974*. Vol. 4: 68-79, 80-90.
- Sterne, M. & I. Batty, 1975. *Pathogenic Clostridia*. Butterworth, London, p. 1-3.
- Stumbo, C.R., 1965. *Thermobacteriology in food processing*. Academic Press, New York/London.
- Sugiyama, H. & K.H. Yang, 1975. Growth potential of *Clostridium botulinum* in fresh mushrooms packaged in semipermeable plastic film. *Applied Microbiology* 30: 964-969.
- Sussman, A.S., 1969. The prevalence and role of dormancy. In: G.W. Gould & A. Hurst (Eds). *The Bacterial Spore*. Academic Press, London, p. 1-38.
- Sussman, A.S. & H.O. Halvorson, 1966. *Spores. Their dormancy and germination*. Harper & Row Publ., London, 354 p.
- Sutton, R.G.A., A.C. Ghosh & B.C. Hobbs, 1971. Isolation and enumeration of *Clostridium welchii* from food and faeces. In: D.A. Shapton & R.G. Board (Eds). *Isolation of Anaerobes*. American Press, London/New-York, p. 39-47.

- Suzuki, J. & K. Kitahara, 1964. Base composition of deoxyribonucleic acid in *Sporolactobacillus inulinus* and other lactic acid bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* 10: 305-311.
- Syuto, B. & S. Kubo, 1977. Isolation and Molecular Size of *Clostridium botulinum* type C toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 400-405.
- Swartling, P. & B. Lindgren, 1968. The sterilizing effect against *Bacillus subtilis* spores of hydrogen peroxide at different temperatures and concentrations. *Journal of Dairy Research* 35: 423-428.
- Szulmajster, J., 1973. Initiation of bacterial sporogenesis. In: J.M. Ashworth & J.E. Smith. (Eds). *Microbial differentiation*. University Press, Cambridge, p. 45-83.
- Tanimura, W., 1969. Micro-organism contamination in a food factory. IV. On the microflora in a cooked bean factory. *Journal of Food Science and Technology (Jap)* 16: 499-503.
- Tinbergen, B.J. & B. Krol (Eds), 1977. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Nitrite in Meat Products*. Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen.
- Todd, E., P.C. Chang, A. Manschild, A. Sharpe, C. Park & H. Pivnick, 1974. Botulism from marinated mushrooms. IV. *International Congress on Food Science and Technology, Work Documents, 4AC, 4-6*.
- Toledo, R.T., F.E. Escher & J.C. Ayres, 1973. Sporocidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage organisms. *Applied Microbiology* 26: 592-597.
- Townsend, C.T., 1938. Spore-forming anaerobes causing spoilage in canned acid foods. *Journal of Bacteriology* 36: 315-316 (Abstract).
- Townsend, C.T., L. Lee & W.A. Mercer, 1954. Inhibition of the growth of *Clostridium botulinum* by acidification. *Food Research* 19: 536-542.
- Trujillo, R. & T.J. David, 1972. Sporostatic and sporocidal properties of aqueous formaldehyde. *Applied Microbiology* 23: 618-622.
- Underwood, H.M., C.H. McKinnon, F.L. Davies & C.M. Cousins, 1974. Sources of *Bacillus* spores in raw milk. 19th International Dairy Congress, India. Vol. IE: 373-374.
- Unsworth, B.A., T. Cross, M.R.O. Seaward & R.E. Sims, 1977. The longevity of thermoactinomycetes endospores in natural substrates. *Journal of Applied Bacteriology* 42: 45-52.
- Vajdi, M. & R.R. Pereira, 1973. Comparative effects of ethylene oxide, gamma irradiation and micro-wave treatments on selected spices. *Journal of Food Science* 38: 893-895.
- Vaughn, R.H., I.H. Kreulevitch & W.A. Mercer, 1952. Spoilage of canned foods caused by the *Bacillus macerans-polymyxa* group of bacteria. *Food Research* 17: 560-570.
- Veldkamp, H., 1963. De microbiologische conservering van plantaardig materiaal. *Landbouwkundig Tijdschrift* 75: 649-665.
- Vries, T. de & J. Stadhouders, 1977. Boterzuurbacteriën in melk. *Zuivelzicht* 69: 196-199.
- Waart, J. de, 1971. The enumeration of *Clostridia* in food. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 22: 149-154.
- Waes, G., 1975. *Jaarverslag 1975*, Rijkszuivelstation Melle, België, p. 14.
- Wajid, H.R.A. & M.S. Kalra, 1976. Nisin as an aid for extending shelf life of sterilized milk. *Journal of Food Science and Technology, Mysore* 13: 6-8.
- Walker, H.W., 1975. Food borne illness from *Clostridium perfringens* C.R.C. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 7: 71-104.
- Warth, A.D., 1977. Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* 43: 215-230.

- Warth, A.D., 1978a. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 134: 699-705.
- Warth, A.D., 1978b. Molecular structure of the bacterial spore. *Advances in Microbial Physiology* 7: 1-45.
- Wasserfall, F., 1976. Kann auf Nitrat bei der Herstellung von Käse verzichtet werden? *Deutsche Molkerei-Zeitung* 23: 677-680.
- Weber, D.J. & W.M. Hess, 1975. Diverse spores of fungi. In: P. Gerhardt, R.N. Costilow & H. Sadoff (Eds). *Spores VI*. American Society for Microbiology, Washington, p. 97-111.
- Weber, D.J. & W.M. Hess (Eds), 1976. *The fungal spore: form and function*. John Wiley Interscience, New York, 895 p.
- White, D., 1975. Myxospores of *Myxococcus xanthus*. In: P. Gerhardt, R.N. Costilow & H. Sadoff (Eds). *Spores VI*. American Society for Microbiology, Washington, p. 44-51.
- White, D., M. Dworkin & D.J. Tipper, 1968. Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: Structure and relation to morphogenesis. *Journal of Bacteriology* 95: 2186-2197.
- Wilkinson, B.J., J.A. Deans & D.J. Ellar, 1975. Biochemical evidence for the reversed polarity of the outer membrane of the bacterial forespore. *Biochemical Journal* 152: 561-569.
- Williams, C.C., E.J. Cameron & O.B. Williams, 1941. A facultatively anaerobic mould of unusual heat resistance. *Food Research* 6: 69-73.
- Willis, A.T., 1969. Techniques for the study of anaerobic, sporeforming bacteria. In: J.R. Norris & D.W. Ribbons (Eds). *Methods in Microbiology*, Vol 3B. Academic Press, London/New-York, p. 79-115.
- Wilson, G.S. & A. Miles, 1975. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, 6th ed., Vol. 2. Edward Arnold, London, p. 2099-2108.
- Wolf, J., A.N. Barker, 1968. The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species. In: B.M. Gibbs & D.A. Shapten (Eds). *Identification methods for microbiologists*. Part B. Academic Press, London/New-York, p. 93-109.
- Wuchterpfennig, K. & I. Franke, 1968. Ergebnisse von Untersuchungen über die Hitzeresistenz eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* in Abhängigkeit von den Aciditätsverhältnissen. *Die Fruchtsaft Industrie* 13: 194-203.
- Xezones, H. & I.J. Hutchings, 1965. Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. *Food Technology* 19: 1003-1005.
- Xezones, H., J.L. Segmiller & I.J. Hutchings, 1965. Processing requirements for a heat-tolerant anaerobe. *Food Technology* 19: 111-112.
- Young, M., 1978. Bacterial endospore development; an ordered sequence of gene transcription. *Trends in Biochemical Sciences* 3: 55-59.
- Zijl, W.J. van & H.L. Wolff, 1968. *Bacillus cereus* als oorzaak van voedsel-vergiftiging in een bejaardencentrum. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 112: 1369-1371.

Glossarium

Activering Een behandeling die de ontkieming van sporen zelf niet inleidt, maar tot gevolg kan hebben dat een groter aantal sporen tot ontkieming overgaat en/of dat de ontkieming versneld wordt.

Aëroob Een aëroob micro-organisme heeft voor zijn metabolisme zuurstof nodig.

Anaëroob Een anaëroob micro-organisme kan zich óf uitsluitend in afwezigheid van zuurstof ontwikkelen (obligaat anaëroob) óf heeft voor zijn ontwikkeling geen zuurstof nodig, maar kan zich wel bij aanwezigheid van zuurstof ontwikkelen (facultatief anaëroob).

Appertiseren Het geven van een dusdanige warmtebehandeling aan een product dat bij de gebruikelijke bewaaromstandigheden van het geappertiseerde product geen groei van micro-organismen meer plaatsvindt.

Ascospore Een geslachtelijke spore van een gist of schimmel, gevormd in een zakachtige structuur, de zogenaamde ascus.

Aseptisch Besmettingen met micro-organismen geheel uitsluitend.

Autoclaf Een ketel, tank of ander vat waarin men verpakte produkten ladingsgewijs met behulp van stoom of heet water onder verhoogde druk kan steriliseren.

Bacteriespore Meestal wordt hieronder verstaan de spore gevormd door een endosporevormende bacterie die behoort tot de familie van de Bacillaceae. Deze spore wordt gekenmerkt door een grote resistentie tegen onder andere hitte. Bacteriën behorend tot de orde van de Myxobacterales kunnen myxosporen vormen en bacteriën behorend tot de orde van de Actinomycetales kunnen onder andere conidio- en sporangiosporen vormen.

Blancheren Het toepassen van een warmtebehandeling die onder andere ten doel heeft enzymen te inactiveren om daardoor ongewenste biochemische omzettingen te voorkomen.

Blancheur Apparaat voor het blancheren van groenten.

Cell De kleinste organisatie-eenheid van enig levend organisme die, mits in een geschikte omgeving, in staat is tot een onafhankelijk bestaan van enige duur en in staat is zijn eigen substantia te vervangen.

Commitment Het moment binnen de sporulering, waarbij de prespore na overbrenging in een vers medium niet langer kan terugkeren tot een vegetatieve cel.

Core, of sporeprotoplast Het binnenste gedeelte van een spore dat door het plasmamembraan omgeven is.

Cortex Het deel van de spore gelegen tussen core en coat dat voornamelijk is samengesteld uit een polymeernetwerk van peptidoglycan.

Cultuur Een kweek van cellen in een medium. Bestaat een cultuur uit cellen

voortgekomen uit één cel, dan spreekt men van een zuivere of reincultuur.

Cyste Een rustende of dormante cel, die veelal door de vorming van een dikke celwand of extra bescherm laag beter bestand is tegen ongunstige uitwendige omstandigheden. Bij Myxomycetes en Myxobacterales het slijmig vruchtlichaam waarin zich de myxosporen bevinden.

Dormancy Een rustperiode of -stadium van een cel gekenmerkt door een minimale stofwisseling en het ontbreken van ontwikkelingsprocessen. Bij bacteriesporen het handhaven van een toestand van inertie tegen ogenschijnlijk gunstige ontkiemingsomstandigheden. Sporen kunnen in dormancy verschillen.

D-waarde De decimale reductiewaarde. De tijd (gewoonlijk uitgedrukt in minuten) die nodig is om bij een gegeven temperatuur en onder overigens gestandaardiseerde omstandigheden het aantal levende organismen terug te brengen op 1/10 van het oorspronkelijke aantal. De D-waarde is een goede maatstaf voor de thermoresistentie van een organisme.

Endogeen Van binnen uit gevormd.

Endospore Een spore die gevormd is binnenin de bacteriecel. Zie bacteriespore.

Endotrofe sporulering De vorming van een spore zonder dat de vegetatieve moedercel voedingsstoffen uit het medium opneemt.

Flat sour Een type van microbieel bederf van conserven, waarbij verzuring optreedt, maar geen gasvorming.

F₀-waarde Een procesbeschrijvende waarde, weergevende het aantal minuten bij 121,1 °C die, uitgaande van een Z-waarde van 10 °C, equivalent zijn met de door het produkt ondergane hittebehandeling.

Fungus Gist of schimmel.

Generatietijd De tijd welke verloopt tussen twee delingen van een micro-organisme; dit is als regel ook de tijd welke nodig is voor een verdubbeling van de concentratie van micro-organismen in een produkt.

Homogeniseren Het verkleinen van deeltjes in een vloeibare massa.

Kiemgetal Het totale aantal kweekbare (levende) micro-organismen dat per gram of ml produkt aanwezig is.

Kolonie Een macroscopisch zichtbaar hoopje cellen op of in een vaste voedingsbodem.

Lag-fase De periode die verloopt voordat de vermeerdering van de cellen begint.

Mesofiel Onder mesofiele micro-organismen kunnen worden verstaan micro-organismen die een optimum groeitemperatuur hebben in het gebied van 25 tot 50 °C. Meestal groeien zij niet beneden 10 °C.

Microbiocide In staat micro-organismen te doden.

Microcyclische sporulering. Hersporulering direct na ontkieming en uitgroei zonder dat er eerst een celdeling plaatsvindt.

Most Probable Number MPN of meest waarschijnlijk aantal is de concentratie aan micro-organismen in een produkt welke men met behulp van statistische tabellen heeft afgeleid uit het al of niet aanwezig zijn van deze micro-organismen in meervoudige opeenvolgende decimale verdunningen van het produkt.

Moedercel Dat deel van de vegetatieve cel waarin de spore(n) is gevormd.

Ontkieming Een proces dat leidt tot het eerste irreversibele stadium dat herkenbaar anders is dan het sporestadium. Ontkieming is een afbraakproces en gaat gepaard met verlies van dormancy en resistentie. Na ontkieming volgt het stadium van uitgroei.

Osmose Diffusie van water door een membraan van een gebied van een lage naar een hoge concentratie van opgeloste stoffen.

Pasteuriseren Het geven van een warmtebehandeling veelal beneden 100 °C aan een produkt met het doel het produkt in microbiologisch opzicht voldoende veilig te maken voor menselijke consumptie; een bijkomend doel is het uitstellen van microbiologisch bederf door alle relatief weinig thermoresistente micro-organismen te doden.

Pathogeen Ziekteverwekkend; hetzij door activiteit welke het micro-organisme in een lichaam ontwikkelt, hetzij als gevolg van een stof (toxine) welke het micro-organisme in een voedingsmiddel kan maken.

Prespore Het cytoplasmagedeelte van een vegetatieve cel dat zich aan het differentiëren is tot een sporecel.

Psychrofiel Onder psychrofiële micro-organismen kunnen worden verstaan micro-organismen welke goed kunnen groeien bij 0 °C. De optimale groeitemperatuur zal lager zijn dan 25 °C.

Psychrotroof Onder psychrotrofe micro-organismen kunnen worden verstaan micro-organismen die goed kunnen groeien bij 5 à 7 °C. De optimale groeitemperatuur zal bij ongeveer 30 °C liggen.

Recovery Het in cultuur brengen van cellen.

Resuscitatie Door het scheppen van gunstige omstandigheden het delingsvermogen herstellen van sublethaal beschadigde cellen van micro-organismen.

Sporangium Bij Bacillaceae de gehele cel waarin de enkelvoudige endospore wordt gevormd. Bij schimmels de zakachtige structuur waarin ongeslachtelijke sporen worden gevormd.

Spore Een resistente structuur gevormd door een cel.

Sporicide Sporedodend.

Sporostatisch De ontkieming en/of de uitgroei van sporen remmend.

Sporogeen Het vermogen bezitten tot sporevorming.

Steriliseren Het geven van een dusdanige kiemdodende behandeling aan een produkt dat alle micro-organismen, waaronder sporen van bacteriën, worden gedood.

Thermofiel Onder thermofiele micro-organismen kunnen worden verstaan micro-organismen die een optimale groeitemperatuur hebben hoger dan 50 °C.

Thermotolerant Onder thermotolerante micro-organismen kunnen worden verstaan micro-organismen die goed kunnen groeien bij 55 °C en 37 °C.

Uitgroei Na ontkieming volgt uitgroei. Tijdens dit stadium ontwikkelt de gekiemde spore zich tot een normale vegetatieve cel.

Voorspore Een volledig door de moedercel ingesloten prespore.

Wateractiviteit a_w of relatieve waterdampdruk is de verhouding van de waterdampdruk in een voedingsmiddel tot de waterdampdruk van zuiver water bij dezelfde temperatuur.

z-waarde De temperatuurstijging of -daling (uitgedrukt in °C of °F) die nodig is om de D-waarde 10 maal zo klein, respectievelijk 10 maal zo groot te maken.

Register

acidiofiel 67, 68, 200
 Actinomycetales 40
 Actinomycetes 47, 59
 activering 16, 33-35, 153
 de- 166
 hitte- 116 e.v., 153
 activeringsenergie 93
 adaptatie 68
 alkalische fosfatase 152, 155-157
 anaërobe potten 130
 anisotroop 24, 28
 antibioticum 25, 26, 47, 81, 112
 antiserum 81
 appertisatie 136, 145, 198
 Arrhenius-vergelijking 93
 ascosporen 48 e.v.
 ascus 55
 aseptisch 155, 159, 163
 a_w 2, 65, 66, 101, 141, 202

Bacillaceae 40

Bacillus 113
 - *anthracis* 75
 - *brevis* 149
 - *cereus* 8 e.v., 86 e.v., 124 e.v., 184 e.v.
 - *circulans* 113, 143, 153 e.v., 193
 - *coagulans* 8 e.v., 113 e.v., 143, 161, 193 e.v.
 - *globigii* 110, 111
 - *licheniformis* 20, 113, 143, 149 e.v., 190, 193
 - *macerans* 3, 184, 199, 203
 - *macquariensis* 100
 - *megaterium* 113, 117, 184
 - *mycoides* 3
 - *pantothenicus* 115
 - *pasteurii* 115
 - *polymyxa* 19, 199, 203, 207
 - *pumilis* 113
 - *stearothermophilus* 3 e.v., 113 e.v., 164 e.v., 198 e.v.
 - *subtilis* 6 e.v., 113 e.v., 149 e.v., 184 e.v.

bacteriofagen 78, 174

bactofuge 151, 157

bepalen van:

Bacillus cereus 124
Clostridium botulinum 133
Clostridium perfringens 132
Desulfotomaculum nigrificans 133
 mesofiele *Bacillus* 122
 mesofiele *Clostridium* 127
 psychrofiele *Bacillus* 121
 psychrofiele *Clostridium* 127
Sporolactobacillus inulinus 125
Sporolactobacillus ureae 134
 thermofiele *Bacillus* 123
 thermofiele *Clostridium* 131

besmetting van:

- blancheur 188
 - fruit 184
 - gereedschap 181, 149
 - groente 184
 - grond 134, 148, 186
 - hulpstoffen 139
 - ingrediënten 150
 - kruiden 140, 193
 - meel 139
 - melk 148
 - mest 148
 - specerijen 139, 193
 - uier 148
 - verwerking 140
 - vleesgrondstoffen 138
 - waswater 186-188

bestraling 31, 101, 102, 147

bewaren koud 154

bewaartemperatuur 173

bioassay 80

bitty cream 158

black disease 75

blancheren 63, 188, 189

blancheur 188, 189

bombage 133, 189

boterzuurgisting 151, 168-175

botulismus 75-83

- bij dieren 82

- bij mens 75

-diagnostiek 80

-ethiologie 76

-preventie 81

- therapeutische maatregelen tegen - 81
 voorkomen van - 79
 -ziekte 75
 houtvuur 74
 para- 74
- calcium 11, 18, 22, 35, 206
 carbolmaak 159, 163
 carboxylgroepen 23, 29, 30, 35
 chromosoom 12, 13, 15
 cleaning in place (CIP) 155
 cleistothecium 56, 64
Clostridium 114
 - *bifermentans* 132
 - *botulinum* 3 e.v., 73 e.v.
 - *butyricum* 114, 170, 199, 202
 - *chauvoei* 74
 - *histolyticum* 74
 - *nauseum* 128
 - *nigrificans*, zie *Desulfotomaculum nigrificans*
 - *novyi* 74, 75
 - *pasteurianum* 187, 191, 199, 202
 - *pectinovorum* 127
 - *perfringens* 6 e.v., 84, 86, 100, 114
 - *septicum* 74
 - *sordellii* 74
 - *sporogenes* 3 e.v.
 - *tetani* 6, 73, 74
 - *tetanomorphum* 128, 175, 177
 - *thermosaccharolyticum* 3, 114, 131-133, 194, 199
 - *tyrobutyricum* 149 e.v.
 coat 8-10, 13, 21, 29
 commitment 14, 51
 conidia 41
 conserven 65, 79
 groente- 197, 190
 half- 175, 181
 tropen- 116, 195, 198
 vruchten- 201-203
 core, zie protoplast
 cortex 10, 13, 21 e.v., 28 e.v., 59, 60
 cultuur
 rein- 120, 174
 cyste 19, 33, 36, 37, 44, 48
 cytoplasma 11, 28, 32
- de-activering 166
Desulfotomaculum nigrificans 3, 114, 115, 133, 134, 194, 199
 diaminopimelinezuur 30
 dipicolinezuur (DPA) 11 e.v., 34
- DNA 7 e.v., 27, 102, 110, 114
 dormancy 16, 26 e.v., 57, 176
 dormant 16, 33, 37, 58, 117, 118
 drogen 191
 druk
 hydrostatische - 26, 36, 38
 mechanische - 23
 osmotische - 19, 23, 27 e.v.
D-waarde 61, 66, 89 e.v.
*D*₁₀-waarde 102-104
- eiwitten 11, 20
 enteritis
 necrotiserende - 73
 enterotoxemie 73
 enzymen
 spore- 7, 20, 21, 33
 etherische oliën 203
 ethyleenoxide 109, 111, 140
 exosporium 7
 exotoxinen 73
- fasecontrastmicroscop 6, 17, 49, 58, 135
 filtratietechniek 106
 flat sour 123, 186 e.v.
 formaldehyde 108, 109
 fotoreactivering 105
*F*₀-waarde 60, 95 e.v., 137, 154 e.v., 193 e.v.
 fruit 184-207
- gasgangreen 74
 gasvorming in kaas 169 e.v.
 genen 14, 47
 genoom 11, 13, 46
 generatietijd 156
 gevaarschatting 2
 gietplaat 128, 129
 gisten 3, 4, 33, 39 e.v.
 glutaaraldehyde 108, 109
 glycerol 31, 32
 Good Manufacture Practices (GMP) 1, 71
 gramnegatief 2, 114, 156
 grampositief 114
 gray 102
 groente 184-207
 grondstoffen 186
- hard swell 199
 hemoglobininurie 75
 bitterresistentie 3, 61-65, 100-102
 hittegevoelig 22, 29, 30, 67
 homogeniseren 119, 155

houdbaarheid van:

- smeltkaas 175 e.v.
- melk 152, 157

HTST 155

hulpstoffen 139-141

hydratatie 29, 31

de- 31, 32

re- 30

hyfe 40, 53

hygiëne 64, 86, 140, 174

hygiënische maatregelen 190-192

inactivering 88-112

chemische - 105

inactivering door middel van:

- ethyleenoxyde 109
- formaldehyde 108
- glutaaraldehyde 108
- hitte 88, 193-204
- H_2O_2 106
- ioniserende straling 102
- propyleenoxyde 111
- ultraviolette straling 103
- zuur 205

ingrediënten 116, 132, 150, 192, 193

initiële besmetting 144, 145, 187, 191, 192

ionen 35

kat- 28, 29, 35, 38

tegen- 28, 30, 35, 37

I.S.O. 119, 122, 129

kaas 149, 151, 168-175

katalase 151, 171

kiemcelwand 7, 12, 13, 21

kieming, zie ontkieming

kippe-eiwit 173

kleuring

alcian-blue- 29, 37

malachietgroen- 6

methyleenblauw- 163

nigrosine- 120

knockmethode 200

koffiemelk 164

kruiden 109, 139, 140, 193

kuilvoer 174

laat-los 168

lag-fase 106, 228

lecithinase 124, 125, 157

letaliteitsfactor 96-99

levenscyclus van:

- *Byssochlamys* 45

- *Mucor* 44

- *Saccharomyces* 45

lichtbreking 6, 16, 27, 105

lysis 13

lysozym 21, 25, 49, 130, 173

mangaan 14, 21, 126

maturatiestadium 13, 16

medium, zie voedingsbodem

melk

geëvaporeerde - 164

gepasteuriseerde - 155

gesteriliseerde - 159

rauwe - 148

melklipase 155

melkpoeder 149, 166, 167

melkprodukten

gepasteuriseerde - 158

gesteriliseerde - 159

membraan 31, 35

binnenste - 13, 28

buitenste - 13, 28

cytoplasma- 12, 13

moedercel- 27

plasma- 12, 21, 31

voorspore- 27

spore- 35

mesomen 7, 12, 13

metalen 11

methemoglobinemie 190

Miller-Prickett-buizen 128, 129, 180

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) 105

morfologie 12, 13, 43-46

Most Probable Number (MPN) 128, 131

mycelium 40

pseudo- 40

mycotoxinen 41, 58, 63, 70

Myxobacterales 40

Myxococcus 59

Myxomycetes 41

NCA 139, 187, 193

neurotrope intoxicaties 73

nisine 26, 112, 161, 173-177

nitraat 142, 151, 170-173, 189

nitriet 4, 101, 127, 139, 142-146, 173, 189, 190

nucleïnezuur 11, 21

nutriënten 14, 15, 18, 25

octanol 21

ondersterilisatie 165, 197

ontkieming van:

- Actinomycetes 59

- Bacillaceae 16-18, 35

- fungi 60

- Myxococcus 59

operon 14

opslag 147, 165, 198-200, 205

opwarmtijd 120

osmotische druk 19, 23, 27 e.v.

overlevingscurve 31, 88, 102, 103,

106

- pasteurisatie
 - van fruit 200
 - van groente 200
 - HTST- 155
 - laag- 151
 - van vlees 136
- pekelzouten 26
- peptidoglycan 10, 11
- perigo-factor 142
- perithecium 56
- permeabiliteit 12, 29
- pH 67, 101, 143 e.v., 171, 202, 205
- plasmamembraan 12, 21, 31
- polyfosfaat 141, 175, 177, 179
- prespore 13, 14, 15
- procesberekening met behulp van:
 - additiemethode 97, 98
 - grafische methode 99, 100
- proceskeuze 193-196
- procesomstandigheden 196, 197
- product
 - aangezuurd - 200-203
 - vers - 184
 - zuur - 116, 200-203
- propyleenoxyde 111
- protoplast 11, 12
- putrid swell 199

- Q₁₀ 92 e.v., 160

- rad 102
- radappertisatie 147
- recovery-condities 101
- redoxpotentiaal 61, 63, 81, 152, 168
- reincultuur 120, 174
- reinigen 154, 161, 181, 186, 191
- remmende factoren 144, 152, 154
- resistentie 21-33, 26-37
 - hitte- 3, 61-65, 100-102
 - osmotische beheersing van de - 28-32
 - stralings- 103
- resuscitatie 25
- ribosomen 7, 20 e.v.
- RNA 7, 20, 21
- roeryoghurt 167, 168
- roken 137
- roomlaag 157
- rotatie 196

- schimmels 3, 4, 33, 39 e.v.
- silage 170, 171, 206
- slachten 138
- slagroom 159
- smeltkaas 149, 175-180
- smeltzouten 175
- snijworst 144

- specerijen 102, 109, 139, 193
- spenen 148
- spinazie 187, 189
- sporangium 49, 54
- sporen
 - asco- 48 e.v.
 - bacterie- 6-25, 39, 47
 - centrale - 6
 - chlamydo- 41
 - endogene - 57
 - exogene - 57
 - geslachtelijke - 41, 55
 - gist- 43
 - menno- 57
 - myxo- 43, 46, 59
 - ongeslachtelijke - 41, 55
 - pre- 13-15
 - schimmel- 43
 - subterminale - 6
 - terminale - 6
 - voor- 13, 15, 27, 28, 37
 - xeno- 57
- sporestructuur 7-11
- sporevorming
 - bij Actinomycetes 47
 - bij Bacillaceae 12-15, 120, 180
 - commitment 14, 51
 - endogene- 54, 55
 - endotrofe - 15
 - exogene - 53, 56
 - geslachtelijke - 46, 54, 56
 - bij gisten 48
 - inductie van de - 14, 15
 - microcyclische - 15, 19
 - ongeslachtelijke - 46, 53, 54
 - bij schimmels 52
- sporewand, zie coat
- sporicide 105, 203, 206
- Sporolactobacillus* 113, 134
 - *inulinus* 114, 125, 126, 134, 135
- Sporosarcina* 113, 114
 - ureae 113
- sporostatisch 105
- sporulering, zie sporevorming
- sterilisatie
 - controle 182-183
 - van groente en fruit 193
 - kort-hoog- 159-163
 - lang-laag- 159-163
 - van melk 159
 - van smeltkaas 175-180
 - in twee stappen 160-163
 - UHT- 93, 151, 159, 164, 182
- sterilisatiesmaak 160
- steriliserend effect 95, 159, 160