

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

BACTERIEELE PROCESSEN IN GECONSERVEERD GROENVOEDER
EN HUN INVLOED OP DE KAASBEREIDING.

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE.

(Ingezonden 25 September 1934.)

I. Algemeene beschouwingen.

In ons land bestaat groote belangstelling voor het conserveeren van gras en andere groene voederstoffen in vochtigen toestand. Deze belangstelling is nog zeer toegenomen door het bekend worden van een nieuwe methode, waarbij het voeder in houten of betonnen silo's geconserveerd wordt met behulp van sterke minerale zuren als zoutzuur en zwavelzuur. De toegevoegde zuren verhinderen het bederf der plantenmassa omdat zij een grooten invloed uitoefenen op het bacterieleven.

In op de gewone wijze, dus zonder zuren, ingekuuld groenvoeder zijn het n.l. de bacterien die verantwoordelijk gesteld moeten worden voor tal van ongewenschte processen. Er zijn dan ook verschillende manieren bedacht om de werking der bacterien bij ensilage of inkuiling te beïnvloeden en bepaalde nadeelige bacterieele processen te onderdrukken en andere, welke als voordelig beschouwd werden, te begunstigen. Algemeen wordt het b.v. nuttig geacht dat bij de conserveering een krachtige melkzuurgisting optreedt, welke het voeder een zekeren zuurgraad geeft, die, omdat het hier een organisch zuur betreft, niet schadelijk is voor het vee en die verhindert dat ongewenschte rottingsverschijnselen zich openbaren. De resultaten welke men krijgt indien de voedermassa door bacteriewerking geconserveerd wordt, zelfs al tracht men door bepaalde maatregelen de bacterieele processen in een gewenschte richting te beïnvloeden zijn evenwel dikwijls wisselend. Bij de verschillende inkuilings-systemen wordt nog te veel aan het toeval overgelaten.

Virtanen¹⁾ heeft de onzekerheden willen wegnemen door het voeder dadelijk, van het begin af, de juiste bederfwerende zuurgraad te geven op kunstmatige wijze. Hij doet dit door het in den silo gebrachte voeder laagsgewijze met verdund zuur te bespuiten. Volgens Virtanen bereikt men het best zijn doel

¹⁾ A. I. VIRTANEN. Die A. I. V.-Methode zur Konservierung von frischem Futter, *Schweiz. landw. Monatshefte* X (1932), 257. La méthode A. I. V. pour la conservation du fourrage vert, *Le lait* 13 (1933), 474. The A. I. V.-method of preserving fresh fodder, *The Empire Journ. of exp. Agr.* 1 (1933), 143.

door te bespuiten met zooveel van een verdunning van zwavelzuur en zoutzuur, dat de zuurgraad van het aldus bereide voeder aangegeven wordt door een pH van 3 tot 4. Maakt men het voeder zuurder (pH lager dan 3) dan zou het schadelijk zijn voor het vee, maakt men het minder zuur (pH boven 4) dan worden de bacterieele eiwitontledingsprocessen niet voldoende onderdrukt.

Beschouwen we deze nieuwe methode alleen uit het oogpunt van de bij conserveeringssystemen optredende verliezen van droge stof en voedende bestanddeelen, dan luidt het oordeel over de conserveering met anorganische zuren vrij gunstig, zooals blijkt uit de onderzoekingen der physiologische afdeling van het rijkslandbouwproefstation. ¹⁾

Voor de beoordeeling der bruikbaarheid van een silage of kuilvoeder is echter het verkregen rendement niet de eenige factor. Van zeer groot belang is b.v. ook of het vee het voeder graag eet en of het er eventueel schade van ondervindt.

Voor streken, waar kaas gemaakt wordt, moet bovendien gelet worden op den invloed die het gebruik van geconserveerd voeder op de kwaliteit van de kaas kan hebben. In deze voederstof zijn n.l. dikwijls boterzuurbacterien in groote hoeveelheden aanwezig, welke, hoofdzakelijk door besmetting van de melk met mest, in de kaas komen en hierin aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van de kaasgebreken „laat-los” en „knijper”.

Van op de Hollandsche manier ingekuuld voeder is reeds lang bekend dat het gevaarlijk voor de kaasbereiding kan zijn. In dit kuilvoeder heeft altijd een boterzuurgisting plaats en hoewel toch niet altijd van een nadeeligen invloed op de kaas blijkt is men van de werking van dit voeder op de kaas van te voren nooit zeker, zoodat voorzichtigheid altijd geboden is. In een later hoofdstuk komen wij op de vraag, waarom niet alle Hollandsche kuilen gevaarlijk voor de kaas zijn, terug; nu vermelden wij hierover slechts, dat er tusschen verschillende Hollandsche kuilhoopen groote verschillen bestaan in bacteriologisch opzicht. Dit wordt veroorzaakt doordat niet iedereen op dezelfde manier inkuult en bovendien doordat het verkregen resultaat afhankelijk is van een aantal omstandigheden, waarvan men den invloed moeilijk beheerschen kan.

Van den invloed, welke met minerale zuren geconserveerd voeder op de kwaliteit van kaas heeft, was, daar het hier een nieuwe methode betreft, niets bekend. Virtanen zelf acht dit voeder ongevaarlijk voor de kaasmakerij. In het seizoen 1932—1933 zijn door ons een aantal proeven hierover genomen,

¹⁾ E. BROUWER, DE RUYTER DE WILDT, HOLLEMAN en FRENS. Proefnemingen omtrent inkuiling met en zonder toevoeging van zoutzuur en suiker. Jaarverslag proefzuivelboerderij te Hoorn 1932. *Versl. v. landb. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 39, C (1933), 401.

welke reeds in deze verslagen beschreven werden. ¹⁾ Kaas, bereid uit melk van koeien, die gevoederd werden met geensileerd gras, geconserveerd met toevoeging van zoutzuur en suiker, zoodat de gemiddelde pH 3,7 à 3,8 was, bleek bij bewaren in sterke mate gasvorming te vertoonen, waarmede dus be-
wezen was, dat op deze wijze geensileerd voeder gevaarlijk voor kaas kan zijn.

Door deze proeven was evenwel het probleem van den invloed van met zuren geconserveerd voeder op de kaas nog niet geheel opgelost. Ten eerste kunnen wij ons afvragen of iedere mineraalzure silage gevaarlijk is. De door Virtanen opgegeven zuurgraad beslaat het pH-gebied van 3 tot 4 en mogelijk-
wijs zou een zuurder voeder dan het door ons bij onze proeven gebruikte betere resultaten kunnen geven. Bij het onderzoek van door de praktijk beschik-
baar gestelde monsters mineraalzuur voeder was n.l. reeds gebleken dat in zeer
zuur voeder (pH 2,4; 2,9; 3,14; 3,22) slechts weinig of geen boterzuurbacterien
voorkomen.

Verder kon uit onze onderzoekingen niet afgeleid worden of het gevaar
voor de kaasbereiding veroorzaakt werd door boterzuurbacterien, welke zich
in het geensileerde materiaal ontwikkeld hadden, d.w.z. daarin een meer of
minder sterke boterzuurgisting hadden teweeggebracht of door boterzuur-
bacteriensporen, welke bij het inbrengen van het gras in den silo op het opper-
vlak der halmen waren medegenomen en in het voeder in geconserveerden
toestand aanwezig bleven.

Virtanen zelf is van meening dat de boterzuurbacterien, welke men uit
het mineraalzure voeder kan kweken, afkomstig zijn van geconserveerde
sporen, die van het begin af op het gras aanwezig waren, doch dit kan de
gevaarlijkheid van dit voeder niet verklaren. In het algemeen toch komt
boterzuurgisting in de kaas des zomers, als de koeien gras eten, weinig voor,
hoewel dit gras minstens hetzelfde aantal boterzuurbacteriensporen bevat
als de silage. De gevallen van boterzuurgisting der kaas in den zomer moeten
toegeschreven worden aan besmetting door vuilhaarden in de voorwerpen
welke bij de verwerking der melk gebruikt worden.

De andere veronderstelling, n.l. het optreden van boterzuurgisting in den
silo, is echter à priori al even onwaarschijnlijk, daar het toch wel onmogelijk
lijkt dat bij een zoo hoogen zuurgraad nog boterzuurbacterien kunnen groeien.

Het gevaar voor kaas was echter duidelijk geconstateerd, zoodat er alle
reden voor was een nader onderzoek over het gedrag der boterzuurbacterien
in een mineraalzuren silo te verrichten ten einde een beter inzicht te verkrijgen
in de processen welke zich in zoo'n silo afspelen.

¹⁾ J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Bacteriologisch onderzoek van een aantal
in 1932 volgens de mineraalzuurmethode gemaakte kuilhoopen; Jaarverslag proefzuivel-
boerderij Hoorn 1932, 231; *Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 39, C
(1933), 545.

Het vraagstuk is op drie manieren aangevat, n.l.:

- 1°. Door laboratoriumproeven, waarbij gras geconserveerd werd in glazen potten;
- 2°. Door onderzoek van een groot aantal monsters silage uit de landbouwpraktijk en
- 3°. Door proeven met in proefsilos geensileerd gras.

II. Blijft de pH constant in een gras-zuur-mengsel ?

Bij de ensileering met minerale zuren wordt het versch gemaaid gras in levenden toestand bespoten met verdund zuur. Een chemisch evenwicht in dit mengsel wordt dus pas bereikt nadat het gras is afgestorven en een sapuittreding heeft plaats gehad. Door de gecompliceerde samenstelling van het mengsel kon het niet onmogelijk geacht worden dat het evenwicht zich langzaam instelt en juist dit zou misschien een verklaring kunnen geven van de bacteriewerkingen in zoo'n silo. Men zou zich n.l. kunnen voorstellen, dat door het langzaam inwerken van het zuur op de grasbestanddeelen het sap in den silo, hetwelk in het begin dus niets anders is dan het ingespoten

$\frac{2n}{1}$ zuur, steeds minder zuur werd, zóó zelfs, dat ten slotte een pH bereikt werd, welke gisting niet meer zou belemmeren. Op dit moment zou dus een boterzuurgisting kunnen beginnen doch daarnaast eveneens een melkzuurgisting. Door deze laatste zou dan langzamerhand de pH weer verlaagd worden, waardoor bij het rijp zijn van den silo de zuurgraad weer zou voldoen aan den eisch pH 3 à 4, terwijl toch boterzuurgisting is opgetreden. Hoewel deze veronderstelling niet waarschijnlijk is voor die gevallen, waarbij een lage eind-pH wordt bereikt, is zij niet dadelijk te verwerpen voor gevallen waar de eind-pH bij 4 ligt.

Bij het vullen van een silo ziet men de zuurgraad van het aflopende sap dan ook veranderen. Bij den houten silo, gemerkt P. Z. B. II, welke op 28 en 29 Sept. 1933 gevuld werd met 17 400 kg gras werd voor de pH van het aflopende sap gevonden:

Datum.	pH.
29 September	2,19
30 September	2,70
1 October	2,87
2 October	2,92

waaruit men ziet dat de stijging van de pH wel bestaat, doch niet groot is en zelfs neiging heeft om betrekkelijk spoedig tot stilstand te komen.

Nu is een dergelijke proef niet nauwkeurig genoeg om een antwoord op de gestelde vraag te geven. Bij een grooten silo is het nu eenmaal onmogelijk om overal op eenzelfde hoeveelheid gras dezelfde hoeveelheid zuur te brengen, waardoor plaatselijke verschillen in den zuurgraad optreden. Het onderzoek van een grooten silo, hetzij door analyse van het aflopende sap, hetzij door metingen in boormonsters, zou ons niet over het verloop van den zuurgraad kunnen inlichten.

Onze proeven hierover zijn daarom uitgevoerd in glazen potten, waarin 500 à 600 gram gras kon worden geconserveerd. De diameter van deze potten was 10 cm en de hoogte 17 cm. Het gebruikte gras werd in stukjes geknipt en daarna goed gemengd opdat bij een proefreeks in alle potten gras van dezelfde samenstelling aanwezig zou zijn. Na het mengen werd een afgewogen hoeveelheid in een groote schaal zorgvuldig gemengd met verdund zuur en daarna met de hand in de potten geperst. Boven op het gras werd een cylinder van paraffine geplaatst en deze bezwaard met een looden gewicht van 10 kg. Bij de potten was geen afvoer voor het sap aanwezig. Het ontstane sap bleef dus in de potten en dit was een voordeel daar dit de grootere, gewenschte homogeniteit van het mengsel beter garandeerde dan wanneer het sap kon afloopen. Met opzet hebben we zelfs het zuur met meer water verdund, waardoor het gras geheel ondergedompeld geraakte in het sap. Dit had tevens het voordeel dat wij voor de zuurgraadmetingen langen tijd de beschikking hadden over sap. Meestal was er na 24 uur reeds zooveel sap gevormd dat het gras onder het vloeistofniveau stond. Om ongewenschte werkingen van aerobe microorganismen te verhinderen werd steeds op het vloeistofoppervlak paraffineolie gegoten ter afsluiting van de lucht, terwijl door reguleering van den druk gezorgd werd dat het gras nooit boven het vloeistofoppervlak uitstak. Dit laatste is in een tijd van sterke temperatuurwisselingen moeilijk te verwezenlijken daar de zwelling van het gras afhankelijk van de temperatuur is en het bij lage temperatuur veel van het sap opzuigt.

Om het verloop van de pH te vervolgen moest bacteriewerking uitgesloten worden omdat de bacteriën invloed op den zuurgraad kunnen hebben. Sterilisatie bij 120° C. kwam hiervoor niet in aanmerking daar hierdoor de natuurlijke omstandigheden te sterk gewijzigd worden. We hebben daarom anti-septica gebruikt.

Sublimaat was in een concentratie van 1 ‰ onvoldoende. Bij 5 ‰ werd wel bacteriegroei belet, doch het gras veranderde sterk van uiterlijk. Toluol en chloroform verhinderden de melkzuurgisting niet; formaline voldeed goed

in een concentratie van 5‰ formaldehyde, berekend op de hoeveelheid gras.

In tabel 1 ziet men het verloop van den zuurgraad bij een reeks potten, gemaakt op 26 Juni 1933, waar per 500 gram gras werd toegevoegd 50 cc formaldehydeoplossing en 50 cc zoutzuuroplossing van verschillende concentratie. De zoutzuurconcentratie wordt in de tabel uitgedrukt door het aantal cm³ geconcentreerd zoutzuur op 500 gram gras.

TABEL 1.

Zoutzuur- concentratie.	pH op							pH in onderste laag op 20 Oct.
	27 Juni.	29 Juni.	3 Juli.	15 Juli.	25 Aug.	23 Sept.	20 Oct.	
0	—	5,41	—	5,41	5,37	5,39	5,24	5,36
2	4,43	4,48	4,50	4,51	4,50	4,44	4,43	4,39
4	3,33	3,50	3,51	3,53	3,58	3,49	—	3,47
6	2,26	2,65	2,69	2,81	2,96	2,77	2,76	2,75
8	1,59	1,90	—	2,00	2,14	2,08	2,11	2,11
10	1,26	1,26	—	1,39	1,57	1,62	1,59	1,67

Vloeistof en gras in de potten zijn gedurende heel den langen duur der proef steriel gebleven. De electrometrische pH-metingen werden steeds verricht in een monster van de bovenste laag van het sap, dat met een steriel pipetje uit de potten werd genomen. Op 20 Oct. 1933 werd bovendien nog de pH gemeten van sap, verkregen door uitpersing der onderste graslagen om vast te stellen of de voorafgaande metingen werkelijk geacht konden worden den toestand in den geheelen pot weer te geven.

De tabel 1 laat zien dat het evenwicht in het gras-zuurmengsel zich snel instelt en dan practisch constant blijft. Alleen bij de zeer hooge zuurgraden is een tendens tot langzame stijging van de pH merkbaar, vermoedelijk veroorzaakt door eenige hydrolyse van de graseiwitten.

In ieder geval kunnen we concluderen dat na het zuurmaken van het gras niet door chemische werking een belangrijke daling van den zuurgraad optreedt. Op grond van deze proef kunnen wij niet aannemen, dat in een mineraalzuuren silo, waarvan de pH aanvankelijk een boterzuurgisting onmogelijk maakt, de pH over een lang tijdsverloop stijgt tot een waarde, welke wel boterzuurgisting toelaat, en daarna weer daalt door de zurende werking der melkzuurbacteriën.

III. Invloed van den zuurgraad van het geënsileerde gras op de melkzuurbacterien.

Om over de mogelijkheid van een groei der melkzuurbacterien bij verschillende zuurgraden uitsluitel te krijgen was het wederom niet aangewezen dit onderzoek te verrichten met groote silo's. Ook nu weer was het gewenscht zoo homogeen mogelijke gras-zuur-mengsels te gebruiken, zoodat ook deze proeven hebben plaats gevonden in glazen potten op volkomen dezelfde wijze als hierboven in hoofdstuk II werd beschreven. Het antisepticum werd nu weggelaten om de bacterienflora in de potten haar normale ontwikkeling te gunnen. De potten werden bewaard bij 17° à 22° C.

De flora van het in de potten geënsileerde gras werd onderzocht door het afgepipeteerde sap, eventueel verdund met steriel water, of gesteriliseerd water waarin grassprietjes geschud werden, te enten op neutrale glucose-vleeschgelatine ¹⁾. Bovendien werd het verloop van den zuurgraad nagegaan.

Op 10 Juli 1933 werden 5 potten met elk 600 gram gras, gemengd met 100 cc zoutzuuroplossing, klaargemaakt, per pot respectievelijk 1, 2, 4, 6 en 8 cc sterk zoutzuur bevattend. Tabel 2 geeft een overzicht van het verloop van bacterienflora en pH.

TABEL 2.

Zout- zuur- concentratie.	Bepaling in het bovenstaande sap op					Bepaling op 6 November.			
	11 Juli pH.	21 Juli.		23 Augustus.		Sap pH.	Boven- laag pH.	Onderlaag.	
		pH.	Melkzuur- bacteriën.	pH.	Melkzuur- bacteriën.			pH.	Melkzuur- bacteriën.
1	5,27	3,96	massa	4,10		4,46	4,43	3,98	massa
2	4,50	3,82	massa	3,84	massa	3,84	3,84	3,86	massa
4	3,02	3,60	geen	3,73	massa	3,77	3,73	3,51	massa
6	2,40	2,71	geen	3,10	geen	2,99	2,98	2,98	geen
8	1,48	2,01	geen	2,21	geen	2,22	2,28	2,26	geen

Meerdere van dergelijke reeksen potten met gras en zoutzuur of met gras en A. I. V.-zuur werden op deze wijze onderzocht en steeds was het resultaat hetzelfde. De conclusies waartoe deze potproeven geleid hebben zijn de volgende:

1°. wordt het gras zóo zuur gemaakt, dat de aanvangs-pH ligt boven 3,5 à 3,6, dan treedt na langer of korter tijd een melkzuurgisting op. De aan-

¹⁾ Vleeschwater met ½ % NaCl, ½ % pepton Witte en ½ % glucose, gestold met 10 % gelatine, pH 6.

vankelijke heterogene bacterienflora wordt in dat geval spoedig vervangen door een melkzuurbacterienflora;

- 2°. door de moeilijk geheel uit te sluiten werking van gisten, schimmels en aerobe bacterien stijgt in de bovenlagen der potten de pH op den langen duur;
- 3°. in tegenstelling met de practijk worden bij de potten zelfs in de onderste graslagen gisten aangetroffen, waardoor ook in deze lagen de pH sterker verandert dan in de met formaline steriel gehouden potten en in groote practijksilo's. In practijksilo's worden gisten slechts zelden in groote aantallen aangetroffen;

Bij een pH beneden 3,5 is echter deze stijging van de pH niet van zooveel belang dat hierdoor een later optredende gisting verwacht kan worden;

- 4°. is er niet voldoende zuur om de pH tot beneden 3,5 te brengen, dan wordt de eindzuurgraad bepaald door de werkzaamheid der melkzuurbacterien, waardoor de pH van het sap in zoo'n silo toch niet gemakkelijk boven 4 komt.

De eerste en de vierde conclusie zijn voor ons de belangrijkste. Uit de vierde volgt dat een boterzuurgisting niet kan optreden tengevolge van een stijging van de pH van het sap in een silo omdat de melkzuurbacterien een stijging tot b.v. boven pH4 verhinderen.

Uit de eerste conclusie volgt dat het door Virtanen aangegeven zuurgraadsgebied van pH 3 tot 4 uiteenvalt in twee gebieden, n.l. een traject van pH 3 tot 3,5, waar geen melkzuurgisting mogelijk is en een traject van pH 3,5 tot 4, waarin wel melkzuurgisting kan optreden.

Treft men dus in de practijk een silo aan, waarvan de pH boven 3,5 ligt, dan zal hierin een melkzuurgisting in ieder geval zijn opgetreden en wel een sterker gisting naarmate de oorspronkelijke pH hooger was. Heeft de onderzochte practijksilo een pH beneden 3,5 dan is hierin, evenwel alleen als de silo met zorg gemaakt is en dus geen ongelijkmatigheden vertoont, geen melkzuurgisting geweest.

Nu heeft het al of niet aanwezig zijn van een melkzuurbacterienflora op zich zelf geen invloed op de kwaliteit van de kaas. We zullen echter later zien, dat het al of niet in melkzuurgisting geraken van een silo toch zulke consequenties meebrengt, dat we er nogmaals den nadruk op willen leggen, dat de methode Virtanen, al naar gelang de silage in het pH-gebied boven of beneden 3,5 ligt, twee verschillende producten levert; *in het gebied boven 3,5 met en in het gebied beneden 3,5 zonder melkzuurgisting.*

Dit maakt het wenschelijk, dat bij onderzoekingen over de resultaten, welke de mineraalzure ensilage geeft, ter betere beoordeeling steeds de pH opgegeven wordt. Mededeelingen, welke wij ontvingen over nog niet gepubliceerde onderzoekingen in het buitenland, vermelden tegenstrijdige resultaten, vooral uit een oogpunt van kaasbereiding. Het zal in latere hoofdstukken blijken dat dit veroorzaakt wordt doordat een mineraalzure silo uit het eene pH-gebied niet vergelijkbaar is met een silo uit het andere pH-gebied. De methode Virtanen levert dus niet een silage met bepaalde omschreven eigenschappen doch kan twee karakteristiek verschillende producten leveren.

IV. Invloed van den zuurgraad op de boterzuurbacteriën.

Evenals van andere bacterien is de ontwikkelingsmogelijkheid van boterzuurbacterien in hooge mate afhankelijk van den zuurgraad. Het is daarom mogelijk om door toevoeging van zuur iedere bacteriegroei onmogelijk te maken. Is een silage maar zuur genoeg, dan kunnen bacterien niet groeien en boterzuurbacterien dus ook niet. Het is echter de vraag hoe het met de ontwikkeling van boterzuurbacterien gesteld is in silages, welke een zuurgraad bezitten die voor het vee niet schadelijk is, dat is dus, althans volgens de opvatting van Virtanen, bij pH 3 tot 4.

Het leek ons niet waarschijnlijk dat boterzuurbacterien nog zouden kunnen groeien bij een pH beneden 4, doch de mogelijkheid was niet geheel uitgesloten. Daarom is van een groot aantal reïncultuurstammen van boterzuurbacterien, welke wij wegens een ander onderzoek bezaten, de zuurgevoeligheid bepaald. Daartoe werden zij geënt in Vleeschbouillon met 1 % glucose, welke met zoutzuur op verschillende pH gebracht was. De voedingsvloeistof bevond zich in cultuurbuizen, welke na de enting tot een capillair werden uitgetrokken, waarna zij luchtledig gepompt en dichtgesmolten werden. Voor deze proeven kan men geen oude cultuurbuizen gebruiken daar deze door het vele steriliseeren niet meer geschikt zijn om uitgetrokken te worden in den blaasvlam. Men moet dus nieuwe buizen nemen, doch deze hebben het nadeel dat het glas alkalien aan de vloeistof afgeeft, waardoor tijdens de proeven de zuurgraad der vloeistof niet constant blijft. Daarom hebben wij de buizen vóór het gebruik eerst uitgekookt in verdund zoutzuur en daarna goed schoongespoeld met water, terwijl de definitieve pH pas bepaald werd na het steriliseeren der buizen met den voedingsbodem.

Van 214 reïncultures van boterzuurbacterien, geïsoleerd uit verschillende bronnen (kaas, melk, meel, grond, water, kuilvoeder en mineraalzure silage) hebben wij aldus de zuurgevoeligheid bepaald. De resultaten zijn samengevat in tabel 3.

TABEL 3.

Aantal onderzochte stammen.	Aantal gistende stammen bij verschillende pH.					
26	Reeks 1.					
	5,75	5,29	4,78	4,40	—	pH
	26	26	22	12	—	Aantal
38	Reeks 2.					
	5,65	5,10	—	4,42	—	pH
	38	37	—	24	—	Aantal
37	Reeks 3.					
	5,46	4,96	4,67	4,38	—	pH
	36	27	27	17	—	Aantal
47	Reeks 4.					
	5,23	4,91	4,70	4,39	—	pH
	46	41	35	19	—	Aantal
66	Reeks 5.					
	—	4,93	4,67	—	4,24	pH
	—	54	42	—	22	Aantal

We kunnen dus zeggen, dat bij een pH boven 5 alle boterzuurbacterien zeer goed groeien en gisten en dat bij pH beneden 5 de groeimogelijkheid sterker afneemt naarmate de vloeistof zuurder is. Bij pH 4,4 groeit 50 % der onderzochte stammen, bij pH 4,24 30 %. Nemen we nu verder in aanmerking, dat van de cultures die bij pH 4,4 groeiden 35 % pas na twee maanden bij 28° C. ging gisten en van de cultures welke bij pH 4,24 groeiden 75 % pas giste na een verblijf van bijna drie maanden in den thermostaat van 28° C., dan zien we hier zoo'n snelle vermindering van den groei in het pH-gebied beneden 4,4, dat wij gerechtigd zijn tot de conclusie dat boterzuurbacterien bij een pH beneden 4 practisch niet meer zullen groeien of gisten.

Wij willen evenwel niet verhehlen dat tegen de gebruikte methode ter bepaling van de zuurgevoeligheid bedenkingen kunnen worden aangevoerd. Boterzuurbacterien zijn dikwijls moeilijk tot ontwikkeling te brengen, zij „slaan moeilijk aan”, zelfs in vloeistoffen die toch overigens wel geschikt

zijn voor het kweken van deze bacterien. Dit bezwaar wordt sterker in vloeistoffen waarin bovendien nog hinderende factoren aanwezig zijn, zooals in dit geval het zuur.

Er is daarom ook nog onder meer practische omstandigheden, d.w.z. in proeven, welke nauwer aansluiten bij den toestand in een silo, onderzocht hoe de boterzuurbacterien door den zuurgraad beïnvloed worden.

V. Ontwikkeling van boterzuurbacterien in geënsileerd gras van verschillende pH.

De proeven hierover werden weer uitgevoerd door een mengsel van geknipt gras en zoutzuur of A. I. V.-zuur te ensileeren in glazen potten en ter verkrijging van een geheel gelijkmatig product werd het mengsel, evenals bij vorige potproeven, zoo vochtig gemaakt dat het gras altijd geheel onder de vloeistof gedompeld bleef. De potten werden bewaard bij tusschen 17° en 22° C. varierende temperaturen en na verschillende tijden werd de inhoud bacteriologisch en chemisch geanalyseerd.

A. Het aantoonen van boterzuurbacterien.

Wat dit betreft kunnen wij volstaan met te verwijzen naar ons reeds in hoofdstuk I aangehaald verslag van 1933. Ook nu hebben wij in de mineraalzuren silages boterzuurbacterien opgespoord door ophooping in glucosevleeschbouillon (1 % glucose, pH6). Slechts in die gevallen, waar de aanwezigheid van rottingsbacterien vermoed werd, is gebruik gemaakt van melk met 1 % glucose en $2,5 \text{ cc } \frac{n}{l}$ melkzuur per 100 cc. Andere voedingsbodems dan deze kunnen wij niet aanbevelen. Met name willen wij vooral ook het gebruik van de aardappelbrijmethode van Ruschmann ¹⁾ ontraden.

Het is ons n.l. bij een onderzoek ²⁾ naar de eigenschappen van uit diverse stoffen geïsoleerde boterzuurbacteriën gebleken dat er in de natuur drie groepen van deze bacteriën voorkomen, n.l.:

Gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën.

Niet-gelatine-vervloeiende, suikervergistende boterzuurbacteriën en

Niet-gelatine-vervloeiende, lactaatvergistende boterzuurbacteriën.

De eerste groep komt in geënsileerd gras soms wel voor doch nooit in betekenende aantallen; bacteriën uit de twee andere groepen daarentegen treft men altijd aan. Daar alleen de bacteriën uit de laatste groep, de lactaat-

¹⁾ RUSCHMANN en HARDER, Die Buttersäuregärung im Silofutter und der Nachweis ihrer Erreger; *Die Futterkonservierung* 3 (1931), 1.

²⁾ J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën; Jaarverslag proefzuivelboerderij te Hoorn 1933; *Versl. v. land.k. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*. 40, C (1934), 543.

vergisters, voor kaas gevaarlijk zijn, om welke reden wij deze dan ook „**Clostridium tyrobutyricum**” genoemd hebben, is het bij het bacteriologisch onderzoek van silages dus juist van buitengewoon belang de vertegenwoordigers van deze groep te kunnen aantoonen. *Cl. tyrobutyricum* nu groeit niet in voedingsbodems, waar slechts di- of polysacchariden als koolstofbron beschikbaar zijn. Dit wil zeggen dat deze soort niet aangetoond wordt als men melk, waarin slechts lactose als koolhydraat voorkomt, of aardappelbrij, waarin meestal alleen zetmeel aanwezig is, als ophoopingsvloei-stof gebruikt. Slechts bij gebruik van glucose als koolstofbron zijn wij er zeker van dat *Cl. tyrobutyricum* tot ontwikkeling komen kan; doch ook ***Cl. saccharobutyricum***, dat is de niet-lactaatvergistende boterzuurbacteriënsoort, hoopt zich in een glucosebodem op. Met glucose-vleeschbouillon worden dus beide soorten van boterzuurbacteriën opgespoord. Wij bezitten geen methode om *Cl. tyrobutyricum* alleen en rechtstreeks aan te toonen.

Bij zeer zure silages (pH lager dan 3,6) hebben wij het steriel genomen monster in vele gevallen in het mortier aangewreven met gesteriliseerde krijtsuspensie omdat anders de voedingsbodem door de enting met het zure materiaal te zuur zou worden om een gemakkelijke ontwikkeling van boterzuurbacteriën toe te laten.

Evenals bij het onderzoek van 1932—1933 werden van de silagemonsters ook dikwijls gelatinecultures aangelegd in Vleeschbouillongelatine met 1 % glucose (pH 6, neutraal ten opzichte van lakmoes). Deze cultures geven wel een globaal beeld van de flora van sporevormende bacteriën der silage, doch kunnen toch niet gebruikt worden voor de vaststelling van het aantal aanwezige boterzuurbacteriën, daar het aantal sporen, dat tot kolonien uitgroeit, slechts een gering en dan nog wisselend percentage van het totaal aantal aanwezige sporen uitmaakt.

Ten overvloede zij nog vermeld dat na enting en evacueering der cultuurbuizen 10 minuten op 80° C verhit werd om de niet-sporevormende bacteriën te doden.

B. *Het aantoonen van boterzuur.*

In de silagemonsters werd steeds bepaald of boterzuur gevormd was. Het boterzuur dient als indicatie voor een in de silage eventueel opgetreden boterzuurgisting. Indien n.l. de boterzuurbacteriën gelegenheid hebben gehad om zich te ontwikkelen moet er bij deze ontwikkeling boterzuur ontstaan zijn. In dat geval vindt men dus boterzuur en boterzuurbacteriën. Indien de boterzuurbacteriën niet hebben kunnen groeien zal men geen boterzuur vinden doch misschien wel boterzuurbacteriën, daar de sporen van deze bacteriën, die op het gebruikte gras aanwezig waren in leven gebleven kunnen zijn.

Het boterzuur in het geensileerde voeder werd bepaald volgens de gemodificeerde destillatiemethode. ¹⁾

100 gram silage werden in een kolf overgoten met gedestilleerd water en af en toe geschud. Na 24 uur staan werd gefiltreerd en 100 cc filtraat met $10 \text{ cc } \frac{n}{I}$ zwavelzuur gedestilleerd. Na afdestilleeren van telkens 30 cc werd in de destilleerkolf weer 30 cc water toegevoegd. De destillaten werden getitreerd met $\frac{n}{50}$ of $\frac{n}{10}$ loog, al naar gelang het boterzuurpercentage laag of hoog vermoed werd. Voor de berekening van het azijnzuur- en boterzuurpercentage uit de verkregen reeks van 4 destillaattiters moest soms het cijfer voor het eerste destillaat geelimineerd worden wegens de aanwezigheid van zeer vluchtige bestanddeelen die dit eerste destillaat te sterk verontreinigden. Dit was n.l. het geval bij monsters waarvan de pH zóó hoog was dat eenige rotting had plaats gehad. Dan was ook dikwijls een met waterdamp nog sterker vluchtig zuur dan boterzuur aanwezig.

Het is er ons bij deze bepalingen niet in de eerste plaats om te doen geweest nauwkeurig het percentage aan boterzuur te bepalen. Voor het onderzoek was het van meer belang te weten óf dan wel hoeveel boterzuur ontstaan was. Daarom hebben wij in vele gevallen, vooral wanneer wij slechts weinig of geen boterzuur verwachten, 100 gram silage geëxtraheerd met slechts 150 gram water. Men krijgt dan wel een onvolledige extractie doch een geconcentreerder extract. Bij schudden van 100 gram silage met 900 cc water is de extractie wel bijna volledig, doch wordt bij aanwezigheid van slechts weinig boterzuur de concentratie dikwijls te gering om een nauwkeurige bepaling mogelijk te maken.

De gehalten aan zuur (boterzuur, azijnzuur en melkzuur) werden berekend in procenten van de oorspronkelijke vochtige silage. Hiervoor was het ook nog noodig een droge-stof-bepaling uit te voeren.

C. *Bepaling van melkzuur.*

Voor de kwantitatieve bepaling van melkzuur in vloeistoffen, welke stikstofverbindingen bevatten, bestaat geen betrouwbare methode. Er zijn verscheidene melkzuurbepalingen bekend doch geen enkele voldoet in alle opzichten. Meestal vergenoegt men zich dan ook met een titratie van het aetherisch extract en brengt het gevonden zuur geheel als melkzuur in rekening, eventueel, als dit noodig is, na aftrek van aanwezige vluchtige zuren. Ook wij hebben ons om praktische redenen bepaald tot een titratie van het aetherisch extract. In den loop van het onderzoek is evenwel de techniek van deze extractie eenige keeren gewijzigd.

¹⁾ J. VAN BEYNUM, De bepaling van vluchtige vetzuren volgens de destillatiemethode; Jaarverslag proefzuivelboerderij te Hoorn 1932; *Versl. v. landb.k. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 39, C (1933), 57.

Een gedeelte der bepalingen is verricht door het te onderzoeken voeder te drogen na toevoeging van 10 of 20 cc $\frac{n}{1}$ zwavelzuur per 100 gram en het dan in een papierhuls in een Soxhlet-apparaat met droge aether uit te trekken. Bij andere bepalingen werd de restvloeistof der vluchtig-zuur-bepaling al of niet gedeeltelijk ingedampt en na met watervrij Natriumsulfaat te zijn gemengd in een papierhuls geextraheerd. Soms werd bij het indampen der destillatierest zwak alkalisch gemaakt om vervluchtiging van melkzuur en hydrolyse van eiwitachtige stoffen te vermijden. Enkele bepalingen werden ook uitgevoerd door extractie van de destillatierest der vluchtig-zuur-bepaling in een perforator.

Al deze methodes geven eenigszins verschillende uitkomsten. De in de tabellen opgegeven cijfers voor het melkzuurgehalte hebben eigenlijk slechts relatieve waarde. Men bedenke erbij dat zij slechts beteekenen: het gehalte aan riet-vluchtig zuur in het aetherextract, berekend als melkzuur.

D. *Resultaten der proeven in de glazen potten.*

In tabel 4 vindt men de gegevens van een reeks ensileeringen in glazen potten. De potten waren op 10 Juli 1933 gevuld met een mengsel van 600 gram nat gras en 100 cc zuuroplossing, bevattend respectievelijk 1, 2, 4, 6 en 8 cc geconcentreerd zoutzuur. Het is dezelfde proef als die van tabel 2. Na 122 dagen werden zij geopend en werd zowel van een gedeelte uit de bovenste laag als uit de onderste laag een analyse gemaakt.

TABEL 4.

Hoeveelheid zoutzuur per 600 gr gras.	Laag.	pH.	Boterzuurbacteriën.	% boterzuur.	% azijnzuur.	% melkzuur.	Melkzuurbacteriën.	Andere microben.
1 cc	Bovenlaag	4,43	tam. veel	0	0,74	—	massa	—
	Onderlaag	3,98	tam. veel	0	0,46	0,62	massa	—
2 cc	Bovenlaag	3,84	tam. veel	0	—	—	zeer veel	—
	Onderlaag	3,86	weinig	0	0,36	0,61	massa	—
4 cc	Bovenlaag	3,73	tam. veel	0	0,31	0,54	massa	—
	Onderlaag	3,51	tam. veel	0	—	—	massa	—
6 cc	Bovenlaag	2,98	geen	—	—	—	geen	enkele gist.
	Onderlaag	2,98	geen	—	—	—	geen	enkele gist.
8 cc	Bovenlaag	2,28	geen	0	0,06	0,10	geen	weinig gist.
	Onderlaag	2,26	geen	0	0,07	0,12	geen	z. v. gist.

Bij alle 5 potten was in het boven het gras staande sap een groot aantal gisten, o.a. kaamgisten, aanwezig. Deze zijn er voor verantwoordelijk dat in de meeste potten de zuurgraad van dit bovenstaande sap in het lange tijdsverloop van 122 dagen iets verminderd is. Bij de pot met 1 cc zoutzuur is daardoor zelfs iets rotting in de bovenlaag opgetreden, waardoor de pH nog meer opgelopen is.

In welke potten melkzuurgisting heeft plaats gehad blijkt behalve uit de aanwezigheid van melkzuurbacteriën ook uit de cijfers voor azijnzuur en melkzuur. Waar geen melkzuurbacteriën gevonden werden zijn deze cijfers uiterst laag.

Als de met zuren veroorzaakte kunstmatige zuurgraad geschikt is om nog groei van melkzuurbacteriën te veroorloven kunnen wij een sterkere melkzuurgisting verwachten naarmate de oorspronkelijke zuurgraad lager was. De proef van tabel 5 bewijst dit nader. Op 22 Augustus 1933 werden 6 potten gevuld met een mengsel van 550 gram tamelijk droog gras en 100 cc zuuroplossing, respectievelijk 1, 2, 3, 4, 5 en 6 cc sterk zoutzuur bevattend. Na 118 dagen werden uit deze potten monsters onderzocht. De analyses betreffen de alleronderste lagen.

TABEL 5.

Hoeveelheid zoutzuur per 550 gr gras.	pH.	Boterzuur- bacteriën.	% boter- zuur.	% azijn- zuur.	% melk- zuur.	Melk- zuur- bac- teriën.	Andere microben.
1	4,28	tamelijk veel	0	0,58	1,07	massa	—
2	3,90	tamelijk veel	0	0,40	1,06	massa	—
3	3,79	veel	0	0,39	0,92	massa	—
4	3,73	zeer veel	0	0,28	0,77	massa	—
5	3,64	tamelijk veel	0	0,19	0,61	massa	—
6	3,21	enkele	0	0,04	0,29	geen	tamelijk gist veel

We zien dat inderdaad de hoeveelheden melkzuur en azijnzuur, de producten der melkzuurgisting, afnemen naarmate meer mineraal zuur was toegevoegd, d.w.z. naarmate de oorspronkelijke pH lager was. Ook bij deze potten was in het bovenstaande sap een flinke gistontwikkeling (kaamgist) te constateeren. In de onderste lagen vinden we bij de potproeven alleen gist in die gevallen dat geen melkzuurgisting heeft plaats gehad en de suikers uit het gras voor de Saccharomyceten beschikbaar zijn gebleven.

Bezien wij nu de voor de boterzuurbacteriën verkregen gegevens dan is het opvallend, dat in alle potten boterzuurbacteriën gemakkelijk konden worden aangetoond. Het feit, dat echter niet het geringste spoortje boterzuur gevonden werd, bewijst ons dat in de potten dus geen boterzuurgisting heeft plaats gevonden. Dit wil zeggen dat de boterzuurbacteriën zich niet vermeerderd hebben en dat de aangetoonde boterzuurbacteriën dus de oorspronkelijk met het verse gras in de potten gebrachte sporen waren. Deze sporen blijven dus langen tijd in het voeder aanwezig en daar gras zelf niet als een gevaarlijk voeder kan worden beschouwd in verband met kaasgebreken mogen we ook aan deze in een silo gevonden boterzuurbacteriën wel iedere beteekenis voor de kaasbereiding ontzeggen.

Bij andere reeksen ensileeringen in glazen potten, waar het gras blijkbaar weinig of nagenoeg geen boterzuurbacteriënsporen bevatte zagen we precies hetzelfde resultaat als in tabel 5, doch vermeldde de derde kolom dan slechts „enkele” of „geen” boterzuurbacteriën. Om dit verband tusschen het boterzuurbacteriënaantal in het verse gras en in de ervan gemaakte silage te laten zien vermelden we in tabel 6 het onderzoek van een reeks potten, gemaakt op 25 October 1933, waarbij iedere pot gevuld werd met 600 gram geknipt gras en 100 cc zuuroplossing, bevattend 5 cc A. I. V.-zuur. De potten werden na verschillende tijden geopend om het verloop van den toestand met den tijd na te gaan. Van het verse gras werden eveneens cultures aangelegd ter bepaling van de aanwezigheid van boterzuurbacteriën.

TABEL 6.

	pH.	Boter- zuur- bacteriën.	% boter- zuur.	% azijn- zuur.
Het verse gras	—	enkele	—	—
Pot, geopend na 8 dagen	3,57	weinig	0	0,05
„ „ „ 20 „	3,22	weinig	0	0,06
„ „ „ 41 „	3,30	weinig	0	0,15
„ „ „ 75 „	3,40	enkele	0	0,17
„ „ „ 126 „	3,34	geen	0	0,15

De gegevens betreffen weer de onderste lagen der potten. Er blijkt dus een goede overeenstemming tusschen de beoordeling van het aantal boterzuurbacteriën in het verse gras en de ervan gemaakte silage, vooral als we bedenken, dat het gemakkelijker is boterzuurbacteriën in zuurgemaakt gras

aan te toonen dan in versch gras, dat nog vele andere bacteriën bevat, welke bij het bacteriologisch onderzoek hinderend zijn.

Hoewel we dus zien dat de op het voor de ensileering gebruikte gras aanwezige boterzuurbacteriënsporten in het zure voeder nog aangetoond kunnen worden is het toch ook te verwachten dat deze bij voldoende hoogen zuurgraad gedood worden. Hoe hoog deze voor de sporen doodelijke zuurgraad is leert ons reeds tabel 4, waar in de silages van een pH beneden 3 geen boterzuurbacteriën meer werden aangetroffen. Hoe het verloop van dit afsterven der sporen in het zure milieu geschiedt ziet men in tabel 7, waarin is samengevat het onderzoek van de onderste lagen van een aantal potten, gemaakt op 1 November 1933 met elk 600 gram gras en 100 cc zuuroplossing, bevattende 7½ cc A. I. V.-zuur.

TABEL 7.

	pH.	Boterzuur- bacteriën.	% boter- zuur.	% azijn- zuur.	% melk- zuur.	Melk- zuur- bac- teriën.	Andere microben.
Het verse gras	—	tamelijk veel	—	—	—	—	—
Pot, geopend na:							
20 dagen	2,16	weinig	0	0,03	—	geen	—
49 dagen	2,45	geen	0	0,05	0,23	geen	massa gist
79 „	2,60	geen	0	0,05	0,06	geen	zeer veel gist
127 „	2,66	geen	0	0,04	0,20	geen	enkele gist

Bij een pH beneden 3 zijn de boterzuurbacteriënsporten dus tamelijk snel gedood. Bij een pH boven 3,5 blijven zij goed geconserveerd en daartusschen is een gebied, waarbij het afsterven langzaam gaat. Zoo waren b.v. bij een reeks potten van denzelfden datum, doch van een pH 3,1 á 3,2 na 64 dagen nog boterzuurbacteriën aantoonbaar, na 92 dagen echter niet meer. Bij een andere reeks, gemaakt op 7 November 1933 met pH 3,3 á 3,4 werden na 86 dagen nog boterzuurbacteriën gevonden, na 122 dagen niet meer.

Ten aanzien van de boterzuurbacteriën komen we dus tot de volgende conclusies:

1. Omstreeks en beneden pH 4 heeft geen ontwikkeling van boterzuurbacteriën plaats in met zuren behandeld gras, zulks in overeenstemming met de boven beschreven proeven met reïncultures van boterzuurbacteriën in bouillon.

2. Bij een pH beneden 4 kunnen de sporen der boterzuurbacteriën in leven blijven.

3. Bij een pH beneden 3,5 zullen de sporen der boterzuurbacteriën afsterven en wel sneller naarmate het voeder zuurder is.

4. Bij pH beneden 3 sterven de sporen snel af.

5. Bij het aantoonen van boterzuurbacteriën in mineraalzure silo's zij men er op bedacht dat men zoowel in den silo ontwikkelde als de op het versche gras reeds aanwezige, geconserveerde boterzuurbacteriën aantoot. Dat wil dus zeggen, dat de aanwezigheid van boterzuurbacteriën niet behoeft te beteekenen, dat een boterzuurgisting in den silo heeft plaats gehad.

VI. De laagsgewijze bouw van een mineraalzure silo.

Uit het voorgaande zou moeten volgen dat mineraalzure silage, waarvan de pH beneden 4 ligt, in geen geval een boterzuurgisting kan doormaken. De praktijk leert evenwel anders. In het winterseizoen 1933—'34 hebben wij een groot aantal door de praktijk beschikbaar gestelde monsters mineraalzure silage onderzocht en op een zeldzame uitzondering na konden wij in alle monsters boterzuur vinden. De aanwezigheid van boterzuur is een onmiskenbaar teeken dat boterzuurgisting heeft plaats gehad en bewijst dus dat zich in de zure silo's boterzuurbacteriën **ontwikkeld** hebben.

Er zijn dus de volgende, elkaar tegensprekende feiten:

1. Boterzuurgisting kan niet geschieden bij pH beneden 4,2 à 4,0.
2. In mineraalzure silages van pH beneden 4 wordt practisch altijd meer of minder boterzuur aangetoond.

3. De uit mineraalzure silages geïsoleerde boterzuurbacteriën, welke daarin gisting veroorzaakt hebben zijn niet minder gevoelig voor zuur dan uit andere bronnen geïsoleerde boterzuurbacteriën. In deze silo's heeft dus niet een ontwikkeling van speciaal zuurresistente boterzuurbacteriën plaats.

Het kan dus niet anders of er moeten in de mineraalzure silo's ongelijkmatigheden voorkomen, welke den groei van boterzuurbacteriën plaatselijk toelaten. Op deze plaatsen moet de zuurgraad lager zijn dan de gemiddelde zuurgraad. Ongelijkmatigheden treft men in een silo welhaast altijd aan omdat de geringste slordigheid bij het maken zich openbaart door een afwijkende pH. Het is echter niet deze „toevallige” ongelijkmatigheid, die wij hier bedoelen, doch een ongelijkmatigheid welke aan het procédé inhaerent is.

Bij het maken van een silo wordt het voeder *laagsgewijze* ingebracht en bespoten. Van iedere laag komt dus alleer de bovenkant met het opgespoten zuur in aanraking. Het materiaal onder deze oppervlaktelaag wordt pas met zuur gedrenkt nadat de geheele laag totaal is platgedrukt en het zuur er door diffusie in de uitgetreden vloeistof in doorgedrongen is. Hiermede is tijd gemoeid. Het indringen van het zuur kan pas onbelemmerd geschieden als het

ontstane sap de grassprietten volledig drenkt en dan nog gaat het langzaam daar vloeistofstromingen, welke een snelle en goede menging bevorderen, in een massa met een dergelijk dicht geraamte van stengels niet kunnen optreden. Het homogeen worden kan dus alleen door zuivere diffusie geschieden en dit is een langzaam proces. Als illustratie hoe langzaam de diffusie verloopt halen we een voorbeeld aan uit de tabel der practijkmonsters (tabel 17), n.l. het monster n°. 14, waar bij een ouderdom van den silo van enkele maanden over een traject van slechts 7 cm pH-waarden van 3,07 en 3,93 gevonden werden. Dit is een gevolg van groote ongelijkmatigheid bij het bespuiten. Doch er volgt uit, dat ook het binnendringen van het zuur in de ingebrachte graslagen bij een zelfs zorgvuldig gemaakte silo slechts langzaam zal plaats vinden. Ten slotte is dus ook het vullen van een silo in lagen een bewuste ongelijkmatigheid, zij het dan over kleinere afstanden. Men behoort eigenlijk het gras zorgvuldig met het zuur te mengen om een homogeen betrouwbaar product te krijgen. De gemiddelde pH, zelfs gemeten in een betrekkelijk klein volume silage, is dus een waarde welke slechts beperkte betekenis heeft, daar de pH, vooral in het begin, van plaats tot plaats verschillend is. Bij zeer ongelijkmatig gemaakte silo's hebben we hetzelfde doch in veel sterkere mate. Hier heeft de gemiddelde pH eigenlijk heelemaal geen betekenis om er een oordeel op te vestigen over het al of niet mogelijk zijn van gistingen.

Iedere silo bestaat dus na de vulling uit afwisselend zeer zure en niet zure laagjes. De bespoten zure laagjes zullen geen bacterieontwikkeling vertoonen daar deze te zuur zijn, omdat hier al het zuur, bestemd voor de geheele ingebrachte graslaag, terecht gekomen is. In de tussehangende lagen, welke niet met het opgespoten zuur in aanraking kwamen zal dus bacterieontwikkeling kunnen plaats hebben, d.w.z. er zal in deze lagen gisting optreden, net zoolang tot door het langzame diffundeeren van het zuur uit de bespoten lagen de zuurgraad zoo hoog gestegen is dat verdere bacteriegroei er door belet wordt.

Afhankelijk van omstandigheden, welke nog besproken zullen worden, is er dus in ieder laagje gedurende langer of korter tijd bacterieontwikkeling mogelijk, waardoor in de zure silo's, waarvan de pH beneden 4 ligt, toch nog boterzuurgisting geconstateerd kan worden en in silo's, waarvan de pH beneden 3,5 ligt, melkzuurgisting.

Het bestaan van deze lagenstructuur in een silo is door het onderzoek bevestigd kunnen worden. Wij brengen hiervoor de volgende bewijzen bij:

1°. Op 11 October 1933 werd in een betonnen kuip 3420 kg gras geensileerd door porties van 30 kg uit te spreiden (oppervlak 3,13 m²) en te bespuiten met 2 liter verdund A. I. V.-zuur. 's Middags te 12 uur werd de vulling onderbroken tot 13½ uur. Toen (om 13½ uur) werd bij het insteken van de hand

geconstateerd dat zich in verticale richting lagen afwisselden, welke zich door de temperatuur onderscheidden. Tusschen twee koude lagen bevond zich steeds een warmere laag. Behalve in temperatuur verschilden de lagen ook in kleur. De koude lagen welke bestonden uit het met zuur bespoten gras waren door de inwerking van het zuur bruin van kleur, de warme lagen waren normaal groen. Temperatuur en kleur verrieden dus dat in de laatste het zuur nog niet was doorgedrongen;

2°. als men een silo opent en men spit met een scherp geslepen schop een blok uit de voedermassa dan ziet men dikwijls op het verticale snijvlak de lagenstructuur zeer duidelijk afgeteekend door de kleur. Hoe jonger de silo is des te duidelijker ziet men de afwisseling tusschen lagen welke bruin van kleur zijn en lagen welke nog meer of minder groen zijn. Bij oudere silo's kan men de gelaagde structuur nog slechts dicht bij het oppervlak en vooral aan den zijkant zien;

3°. enkele microbiologische analyses gaven een duidelijk beeld van de laagsgewijze bouw.

Uit den onder 1° genoemden betonsilo werd op 9 November 1933 een boormonster gestoken, waarbij een rol silage werd verkregen waaruit enkele uiterst dunne schijfjes werden genomen voor het onderzoek op boterzuurbacteriën.

TABEL 8.

Schijfje genomen uit een laag van:	Gemiddelde pH der 25 cm dikke laag.	Boterzuurbacteriën in het onderzochte schijfje.
5— 25 cm diepte	2,71	veel
25— 50 „ „	2,61	„
50— 75 „ „	2,74	geen
75—100 „ „	3,13	zeer veel

In een der schijfjes (welke slechts één grashalm dik waren) werden dus geen boterzuurbacteriën gevonden, in een ander schijfje daarentegen zeer veel.

Van denzelfden silo werd op 13 December 1933 wederom op dezelfde wijze een boormonster onderzocht. De schijfjes werden geheel willekeurig genomen.

TABEL 9.

Schijfje N°.	pH in de laag, waaruit het schijfje afkomstig is.	Melkzuurbacteriën.	Boterzuurbacteriën.
1	3,11	—	tamelijk veel
2		enkele	" "
3		—	geen
4		tamelijk veel	tamelijk veel
5		—	veel
6		—	tamelijk veel
7		geen	veel
8	2,79	—	"
9		veel	"
10		—	tamelijk veel
11	2,56	—	veel
12		—	geen
13		—	"
14		geen	veel
15		"	tamelijk veel

Ook hier zien we duidelijke verschillen in de bacteriënaantallen van plaats tot plaats.

Omdat de gevolgen van het opbouwen van een silo in lagen zoo uiterst belangrijk zijn vermelden we in de tabellen 10 en 11 nog de analyses van schijfjes genomen uit een betonnen silo, gevuld op 17 Oct. 1933 met 3600 kg gras en A. I. V.-zuur. Tabel 10 betreft een boormonster, genomen op 16 Nov. '33, tabel 12 een monster, genomen op 10 Januari, toen deze silage dus reeds 3 maanden oud was.

TABEL 10.

Schijfje N°.	Boterzuurbacteriën.
1	geen
2	"
3	veel
4	"

Gemiddelde pH 3,34.

TABEL 11.

Schijfje N°.	Diepte.	Gemiddelde pH aldaar.	Melkzuurbacteriën.
4	13 cm	3,20	geen
6	24 "	3,00	zeer veel
8	32 "	3,08	weinig
11	53 "	2,99	geen
14	67 "	3,05	"
15	76 "	3,18	zeer veel
17	91 "	3,24	weinig

In de tabellen 8, 9, 10 en 11 ziet men dus de gevolgen welke de laagstructuur heeft op de bacterienflora en dat er dus laagjes zijn met flinke bacterie-ontwikkeling naast laagjes zonder bacterien.

VII. Factoren, welke de gisting in een mineraalzure silo bepalen.

Zoo wij zagen is dus dank zij de laagjes-structuur van een zuren silo bacteriegroei toch mogelijk al zou de gemiddelde pH van den inhoud doen besluiten tot de onmogelijkheid daarvan. Deze bacteriegroei is beperkt tot de tusschenlagen van het voeder, welke niet direct met het zuur bespoten werden. De in deze laagjes optredende gistingen zullen intensiever zijn naarmate het zuur later of langzamer hierin doordringt. De boterzuurgisting in zoo'n laagje eindigt zoodra het diffundeerende zuur de pH tot beneden 4,2 à 4,0 gebracht heeft, de melkzuurgisting eindigt pas als de pH-waarde er beneden 3,5 gedaald is.

De tijdsduur van de mogelijkheid van bacterie-ontwikkeling wordt nu bepaald door de volgende omstandigheden:

1°. *De dikte der ingebrachte lagen.*

Hoe dikker de graslagen, die men bespuit, zijn, des te langer duurt het eer het zuur tot het midden der lagen doorgedrongen is.

2°. *Het vochtgehalte van het ingebrachte voeder.*

Hoe droger het te ensileeren materiaal is, des te meer zuigen de buitenzijden der ingebrachte lagen het zuur op en des te langzamer dringt het in de lagen naar binnen. Bovendien is bij droog voeder het totaal vochtgehalte in den silo laag, hetgeen de diffusie eveneens tegengaat. Niet alleen het watergehalte van de plantencellen is hierbij van belang doch evenzeer het water, dat zich op de plantendeelen bevindt, afkomstig van regen of dauw.

3°. *De aard van het ingebrachte materiaal.*

Hoe jonger het te ensileeren voeder is des te soepeler en des te beter wordt het tijdens de vulling van den silo samengeperst. Oud materiaal verzet zich meer tegen samenpersing, waardoor de zuurdiffusie verlangzaamd wordt.

4°. *De persing tijdens het vullen van den silo.*

Hoe sterker men door aantrappen bij het vullen van den silo het voeder in elkaar perst des te beter aanraking der halmen wordt verkregen en des te sneller zal het opgespoten zuur in de laagjes diffundeeren.

5°. *De plaats der laagjes in den silo.*

De laagjes boven in den silo worden niet zoo snel en zoo krachtig in elkander geperst als de laagjes onder in den silo. In de bovenlagen blijven gistingen

dus langer mogelijk dan in de onderlagen. Ook langs de wanden van den silo blijft wegens de wrijving, welke het voeder bij het inzakken ondervindt, de laagstructuur langer behouden, waardoor dus in randmonsters over het algemeen beter bacterie-ontwikkeling geconstateerd wordt dan in monsters, genomen uit het centrum van een silo. De wrijving welke het materiaal tegen de zijwanden van den silo ondervindt is ook oorzaak van het hol liggen der lagen. Bij het ledigen van een silo, waar men laag voor laag weghaalt, kan men bij bijna alle silo's, en vooral bij de kleinere, dit hol liggen waarnemen.

6°. *De gemiddelde zuurgraad van het geensileerde materiaal.*

Het zuur heeft grooten invloed op het in elkaar zakken van het voeder. Hoe zuurder men het gras maakt des te eerder verliest het zijn spanning en des te sneller zakt het ineen, waardoor dus spoediger sap ontstaat, hetgeen de diffusie naar nog niet zure lagen bevordert. Bij onze proeven in glazen potten bleek deze invloed van den zuurgraad zeer duidelijk. In het onderzochte pH-gebied was er groot verschil in de snelheid waarmede het gras bij constanten druk in elkaar zakte.

Bij een reeks potten, gevuld met dezelfde hoeveelheid gras en dezelfde hoeveelheid verdund zuur van verschillende zuurconcentratie, was b.v. het sapniveau boven het gras uitgekomen na 45 uur bij een eind-pH van 4,03 en na 4 uur bij een eind-pH van 3,26. Bij een andere reeks was het gras in de potten geheel in het ontstane sap verdronken na 21 uur bij een eind-pH van 4,04 en na 10 uur bij een eind-pH van 3,82.

De invloed welke de concentratie van het zuur op het langer of korter bestaan van de niet-zure laagjes heeft blijkt ook uit den invloed van de gemiddelde pH in een silo op de hoeveelheid der gistingsproducten. In het reeds hierboven beschreven boormonster uit een beton-silo werden vier lagen van 25 cm dikte geanalyseerd. Deze beton-silo was zorgvuldig in laagjes van 30 kg gras opgebouwd, zoodat slechts ten gevolge van de iets ongelijke dosering van het zuur kleine pH-verschillen in deze lagen voorkwamen.

Tabel 12 geeft de analyseuitkomsten.

TABEL 12.

Laag N ^o .	Gemiddelde pH.	% melkzuur.	% boterzuur.	% azijnzuur.
1	3,11	0,22	0,015	0,12
2	2,79	—	0,012	0,09
3	2,56	—	spoortje	0,09
4	3,13	0,38	0,022	0,12

De hoeveelheid der gistingenproducten is hier dus duidelijk een functie van de pH. Dit geeft den indruk dat zelfs bij deze hooge zuurgraden nog gisting mogelijk is. Men zou zelfs uit deze tabel de conclusie kunnen trekken dat boterzuurgisting nog mogelijk is bij pH beneden 3 en dat de intensiteit der gisting door de pH bepaald wordt. Uit het voorgaande weten wij echter dat bij deze zuurgraden gisting absoluut is uitgesloten en dat de gistingen alleen verklaard mogen worden door het bestaan van niet-zure laagjes in den silo. Hoe zuurder een silo is des te korter blijven de niet-zure laagjes bestaan en des te minder gistingenproducten vindt men. Men moet dus bedenken dat het verband tusschen de hoeveelheid boterzuur en de pH niet veroorzaakt wordt door den invloed van de pH op de gisting, doch door den invloed van de pH op den tijdsduur dat de niet-zure laagjes kunnen blijven bestaan.

De bovengenoemde 6 factoren bepalen of er meer of minder bacteriegroei in een silo zal zijn. Zij gelden voor met zorg gevulde silo's, waarbij men zelfs zoo gelijkmatig mogelijk heeft gewerkt. Daarnaast is nog te noemen de bevordering van bacteriegroei wegens ongelijkmatigheden in een silo als gevolg van mindere zorgvuldigheid bij het vullen. Door deze grove ongelijkmatigheid vindt men in sommige silo's plekken met sterke boterzuurgeur of zelfs rottingsgeur.

VIII. Gevaarlijkheid van een silage voor de kaasbereiding.

We moeten dus uit het voorgaande concludeeren dat ten gevolge van de lagenstructuur van een mineraalzuur silo gistingen mogelijk zijn bij gemiddelde pH-waarden welke zouden doen besluiten tot de onmogelijkheid van deze gistingen. Daarom vindt men in silo's van een pH beneden 4 praktisch altijd boterzuurbacterien en boterzuur. De mate der boterzuurgisting is grootendeels afhankelijk van de gemiddelde pH, zoodat in het algemeen zeer zure silo's weinig en minder zure silo's veel boterzuur bevatten. Dit werd bevestigd door het onderzoek der practijksilo's (tabel 17). Er zijn slechts enkele uitzonderingen, doch deze uitzonderingen vinden hun ongedwongen verklaring met behulp van de in hoofdstuk VII opgesomde factoren; dit zijn de 5 andere omstandigheden, welke behalve de gemiddelde zuurgraad bepalen hoe lang de niet-zure laagjes blijven bestaan. Het spreekt vanzelf dat een silo gemaakt met zooveel zuur, dat de eind-pH omstreeks 3,8 is, doch opgebouwd uit uiterst dunne lagen en goed geperst, minder boterzuur zal bevatten dan een silo van hetzelfde gras met veel zuur, zoodat de gemiddelde eind-pH b.v. 3,3 is, doch slordig opgebouwd uit dikke lagen en weinig geperst bij de vulling. Deze practijkvoorbeelden vinden nog bespreking in een later hoofdstuk.

Hoewel dus bijna altijd boterzuurbacterien gevonden worden en ook dikwijls boterzuur in kleinere of grootere hoeveelheden aangetoond kan worden

was daarmee nog geen ervaring opgedaan over de mate van gevaarlijkheid van een silage voor de kaasbereiding. We hebben daarom met silages uit enkele ter onzer beschikking staande mineraalzuren silo's koeien gevoederd en van de verkregen melk kaas gemaakt en deze vergeleken met kaas, gemaakt van melk, geleverd door met hooi gevoederde koeien.

Deze silo's waren:

Silo P. Z. B. I, gemaakt door de physiologische afdeling op 22 September 1933 in een silo van houten ringen en gevuld met 13 800 kg gras, bespoten met 5,9 l verdund A. I. V.-zuur per 100 kg.

Silo P. Z. B. II, als voren en gevuld met 17 380 kg gras, bespoten met per 100 kg 6,1 l verdund A. I. V.-zuur op 28 en 29 September 1933.

Silo P. Z. B. IV, als voren en gevuld met 34 000 kg gras, behandeld met per 100 kg 6 l verdund zoutzuur en 0,3 kg suiker op 22 en 23 Mei 1933.

Betonsilo I, gemaakt door ons op 11 October 1933 in een betonkuip en gevuld met 3420 kg droog gras, bespoten met in totaal 235 l verdund A. I. V.-zuur.

Betonsilo II, gemaakt door ons op 17 October 1933, gevuld met 3600 kg gras, bespoten met in totaal 109 l verdund A. I. V.-zuur.

Al deze silo's waren zuurder dan de silo, waarmee wij in het seizoen 1932—'33 kaasproeven hadden gedaan.

In tabel 13 vindt men het resultaat der kaasproeven.

TABEL 13.

Silo, genaamd:	Bereid met:	Materiaal.	Gemiddelde pH tijdens voeding.	Kwaliteit der kaas.
P. Z. B. I	A. I. V.-zuur	gras	3,3	goed
" II	"	"	3,2	"
" IV	zoutzuur en suiker	"	3,5	iets laat los
Betonsilo I	A. I. V.-zuur	"	3,4	goed
" II	"	"	3,3	"
Silo 1932—1933	zoutzuur en suiker	"	3,7	sterk laat-los

Hieruit kunnen wij dus de praktische conclusie trekken, dat in het algemeen silo's met een pH beneden 3,5 onschadelijk zijn voor de kaasmakerij en dat silo's met een pH boven 3,5 als gevaarlijk of minstens „verdacht” kunnen worden beschouwd.

Wij kunnen ons nu afvragen hoe deze praktische conclusie (waarop, zooals wij later zullen zien, uitzonderingen mogelijk zijn) overeenkomt met de bac-

teriologische gesteldheid van de silo's. De zuurgraadgrens pH3,5 volgt toch niet logisch uit de hierboven gegeven theoretische beschouwingen. Wel weten wij dat het gevaar van boterzuurgisting in de niet-zure laagjes van een silo afneemt naarmate de silo zuurder is, doch waar de zuurgraadgrens voor den groei van boterzuurbacterien bij of boven pH 4 ligt is niet aan te nemen dat het gevaar toevalligerwijze bij pH 3,5 zoodanig is afgenomen dat het praktisch te verwaarloozen zou zijn.

Eerst hebben wij gemeend dat het aantal boterzuurbacterien bepalend voor het gevaar zou zijn. Zooals reeds meermalen uiteengezet bestaat er geen betrouwbare methode om het aantal boterzuurbacterien te bepalen. Men krijgt bij het bacteriologisch onderzoek hoogstens een indruk over de hoeveelheid aanwezige boterzuurbacterien. Het bleek ons nu, dat er geen verband bestond tusschen de waardeering van het aantal boterzuurbacterien in de silage en de gevaarlijkheid voor kaas. Het duidelijkst ontbrak dit verband bij den silo, onderzocht in het seizoen 1932—'33 en den in tabel 13 bedoelden betonsilo I. In den eerstgenoemden silo werd slechts een betrekkelijk gering aantal boterzuurbacterien gevonden en in betonsilo I was een buitengewoon groot aantal boterzuurbacterien aanwezig, terwijl de eerste zeer slechte kaas opleverde en de laatstgenoemde goede kaas.

Het aantal boterzuurbacteriën is dus geen maatstaf voor de gevaarlijkheid van een silo voor de kaasbereiding.

Een nader onderzoek der in silo's aanwezige boterzuurbacteriën heeft ons de verklaring van deze eigenaardigheid gegeven.

In hoofdstuk V, onder A, hebben wij reeds de aandacht gevestigd op het bestaan van twee groepen niet-gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën, n.l. lactaatvergistende en suikervergistende, respectievelijk door ons genoemd *Clostridium tyrobutyricum* en *Clostridium saccharobutyricum* ¹⁾. Daar in de bij de bacteriologische analyse gebruikte voedingsbodems beide soorten van boterzuurbacteriën tot ontwikkeling komen, doch slechts één der soorten, n.l. de lactaatvergister, in staat is het gebrek „laat-los" of „knijper" in kaas te veroorzaken is het dus niet geoorloofd om tot de gevaarlijkheid van een silo voor de kaasbereiding te besluiten indien men veel boterzuurbacteriën vindt. **Een silo is alleen dan gevaarlijk als de in den silo zich ontwikkeld hebbende boterzuurbacteriën lactaatvergisters zijn.** Op theoretische gronden kan nu aangegeven worden onder welke omstandigheden de gevaarlijke lactaatvergistende boterzuurbacteriën zich in een silo kunnen vermeerderen.

¹⁾ J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën; Jaarverslag Proefzuivelboerderij te Hoorn 1933; *Verl. v. landb.k. onderz. der Rijkslandbouwproefstations* 40 C. (1934) 543.

Wij zagen dat zich in de niet-zure laagjes van een silo aanvankelijk bacterieele processen kunnen afspelen, net zoo lang tot het diffundeerende opgespoten zuur den zuurgraad hiervoor te hoog maakt. Melkzuurgisting kan dus in zoo'n laagje optreden totdat de pH er gedaald is tot 3,5. In ieder geval zal er een zelfs tamelijk volledige melkzuurgisting plaats hebben indien de gemiddelde pH van een silo boven 3,5 ligt. Hoe sneller en hoe vollediger de melkzuurgisting kan zijn des te minder kans hebben de suikervergistende boterzuurbacteriën om zich flink te ontwikkelen en des te meer kans hebben de lactaatvergisters om zich te vermeerderen. Het is dus de aanwezigheid van melkzuur welke het gevaar voor de kaas doet ontstaan, daar dit melkzuur de gevaarlijke *Cl. tyrobutyricum* in staat stelt zich in een silo te vermeerderen. Hierdoor is tevens duidelijk waarom de gevaarsgrens bij normaal gemaakte silo's bij pH 3,5 gevonden werd. Dit is immers de grens welke bepaalt of al of niet melkzuur gevormd wordt. Bij een pH beneden 3,5 is dank zij het bestaan der niet-zure laagjes nog wel eenige melkzuurgisting mogelijk, doch deze is slechts zeer beperkt daar de bestaansduur dezer laagjes steeds korter wordt naarmate de zuurgraad hooger is. Daarom kan men ook eerder een boterzuurgisting verwachten bij een pH beneden 4 dan een melkzuurgisting bij een pH beneden 3,5.

Als tweede factor, welke de gevaarsgrens der pH in een silo bepaalt, zij het afsterven der boterzuurbacteriën genoemd. Bij de proeven, beschreven in hoofdstuk V, werd gevonden dat bij pH boven 3,5 de sporen dezer bacteriën in leven bleven en dat bij pH beneden 3,5 een afsterving geconstateerd kon worden. Ook hier verschijnt dus pH 3,5 als grenswaarde.

De suikervergistende boterzuurbacteriën kunnen zich alleen ontwikkelen als er koolhydraten ter hunner beschikking zijn. De ontwikkeling van deze soort kan in een mineraalzuren silo nooit een hoogen vlucht nemen daar zij óf geremd wordt door het verdwijnen van de koolhydraten door de melkzuurgisting óf door de diffusie van het opgespoten zuur.

Er is misschien nóg een tweede reden waarom bij het langer bestaan der niet-zure laagjes hoofdzakelijk lactaatvergistende boterzuurgisting optreedt. Bij het vullen van een silo blijft in de ingebrachte voederlagen ook lucht aanwezig. De melkzuurgisting is onafhankelijk van het al of niet aanwezig zijn van lucht, de boterzuurgisting kan pas beginnen als de zuurstof verdwenen is, hetzij door ademhaling van het plantenmateriaal, hetzij door bacteriewerking. Daardoor zal dus daar, waar door mindere persing langer lucht in het voeder gebleven is, dat is dus v.n.l. boven in den silo en aan de zijanten, de boterzuurgisting in de laagjes pas kunnen beginnen na de melkzuurgisting of als de melkzuurgisting reeds ver gevorderd is. Deze boterzuurgisting zal dus in hoofdzaak een lactaatvergisting zijn. In de diepere lagen en meer in het cen-

trum, waar door betere persing de zuurstof eerder verdreven is, zal de boterzuurgisting ook eerder een aanvang kunnen nemen en dus voor een belangrijk deel, zoo zelfs niet geheel, een suikervergisting zijn. Op de plaatsen waar de persing het geringste effect heeft, dus boven aan den zijkant, blijft zeer lang lucht aanwezig, waardoor hier zelfs bij hooge pH geen boterzuurgisting kan optreden, zooals wij bij een onzer betonsilo's duidelijk konden vaststellen, waar in een laag met pH 5,05 zelfs geen boterzuurbacteriën aangetoond konden worden.

De in dit hoofdstuk ontwikkelde beschouwingen over den aard van de in een silo voorkomende boterzuurbacteriën zijn ten volle bevestigd door het onderzoek der practijkmonsters. In hoofdstuk XI vindt dit nadere bespreking.

IX. De boterzuurbacteriën in een Hollandschen kuilhoop.

Het betere inzicht, dat wij verkregen hebben over de groep der boterzuurbacteriën kunnen wij ook dienstbaar maken aan de processen welke zich in een Hollandschen kuil afspelen. We weten dat practisch alle Hollandsche kuilen een boterzuurgisting doormaken. Toch blijkt niet iedere Hollandsche kuil gevaren voor de kaasbereiding mede te brengen, hetgeen in de practijk wel bekend is en waarvan wij in ons verslag over de proeven van het seizoen 1932—1933 ook een voorbeeld gegeven hebben. Tot nu toe kon van dit verschillend gedrag van Hollandsche kuilen op de kwaliteit van de kaas geen verklaring gegeven worden, daar zoowel in voor kaas gevaarlijke als in voor kaas ongevaarlijke kuilen boterzuurgistingen zijn opgetreden. De onderscheiding der boterzuurbacteriën in een groep lactaatvergistende en een groep suikervergistende geeft ook hier de oplossing aan de hand.

Zooals reeds meer door ons opgemerkt is worden er geen twee Hollandsche kuilen gelijk gemaakt. In groote trekken is de bereidingswijze als volgt: gedeeltelijk verwelkt gras wordt in een langzaam tempo op een hoop gereden. Meestal duurt het dan ook enkele dagen voor de kuilhoop geheel klaar is en door het opbrengen van grond van de buitenlucht wordt afgesloten. De bedoeling van de gedeeltelijke verwelking en de langzame optassing is een flinke temperatuurverhoging te krijgen. Dikwijls worden temperaturen van 60° à 70° C. bereikt. Evenwel gelukt het niet altijd het proces zóó te leiden als men wel zou wenschen. Is b.v. het gras natter of wordt in snel tempo aan den kuil gebouwd dan kunnen geen hooge temperaturen ontstaan en hiervan is het gevolg dat men in groote trekken twee types bij den Hollandschen kuil kan onderscheiden, welke essentieel verschillend zijn. Ontstaat n.l. in den kuilhoop een hooge temperatuur van 60° C. of hooger dan worden hierdoor de niet-sporevormende bacteriën gedood, vooral ook omdat de hooge temperatuur lang kan blijven bestaan. De melkzuurbacteriën sterven dus ook af en zoo'n

warme kuilhoop of althans dat gedeelte van den kuil hetwelk zoo warm geweest is, kan dus geen melkzuurgisting doormaken. De boterzuurgisting zal dus een suikervergisting zijn en de zich daarbij ontwikkelende boterzuurbacteriën zijn v.n.l. die van het type *Cl. saccharobutyricum*, welk type voor kaas ongevaarlijk is.

Wordt evenwel de temperatuur niet hoog dan kan wel een melkzuurgisting plaats hebben en zal de daarop volgende boterzuurgisting een lactaatvergisting zijn, waarbij zich bacteriën van het voor kaas zoo gevaarlijke type *Cl. tyrobutyricum* in groote hoeveelheden ontwikkelen.

Vindt men nu werkelijk deze twee kuiltypes in de practijk?

De verschillen in het gistingstype van Hollandsche kuilen kunnen b.v. blijken uit de analyse der aanwezige zuren. Tabel 14 geeft een overzicht van analyses, verricht door BROUWER en ontnomen aan de jaarverslagen der proefzuivelboerderij te Hoorn over de jaren 1926, 1927 en 1932¹⁾.

TABEL 14.

Uit jaarverslag	Hollandsche kuil	Laag N°.	% droge stof.	% vluchtig zuur.	% melkzuur.
1926	V I	—	44,33	0,67	0,87
	V II	—	31,87	0,77	0,85
	V III	—	39,55	0,33	0,37
1927	V III	a	22,65	0,57	1,36
	V III	b	24,20	0,61	1,61
	V I	a	20,82	1,28	0,59
	V I	b	25,09	0,91	1,94
1932	—	—	22,5	1,38—2,82	0,1—0,25

Opvallend is het verschil tusschen eenerzijds de kuilen 1932, V Ia. van 1927 en V III van 1926 en anderzijds de kuilen V IIIa, V IIIb. en V Ib. van 1927. De laatste hebben duidelijk een melkzuurgisting doorgemaakt, de eerste, naar het schijnt, niet. De overige monsters laten waarden zien, welke er tusschen in liggen. Dit kan komen doordat de analyses betrekking hebben op monsters, samengesteld uit kleinere monstertjes, afkomstig van verschillende plekken en dus den gemiddelden toestand weergeven van een groot gedeelte van den kuil, waarin plekken van beide types kunnen voorkomen, al naar gelang de temperatuur op verschillende plaatsen meer of minder hoog gestegen is.

¹⁾ Zie ook: E. BROUWER, *Versl. v. landb.k. onderz. der Rijkslandbouwproefstations* 32 (1927), 69; *idem* 33 (1928), 10. BROUWER, DE RUYTER DE WILDT, HOLLEMAN en FRENS *idem*, 39, C (1933), 401.

Er is echter nog een omstandigheid welke oorzaak is dat uit de chemische analyse niet direct afgelezen kan worden of een Hollandsche kuilhoop wel of niet een melkzuurgisting heeft ondergaan. Bij het proces der lactaatvergisting wordt door de boterzuurbacteriën n.l. melkzuur in boterzuur omgezet. Volgt dus op de melkzuurgisting een boterzuurgisting dan verdwijnt daardoor meer of minder van het oorspronkelijk gevormde melkzuur en neemt het gehalte aan vluchtig zuur toe, waardoor het typische verschil in de analysecijfers der twee kuiltypes verdoezeld wordt.

Wij hebben enkele Hollandsche kuilen onderzocht en bacteriologische en chemische analyses gemaakt van een klein blok, uit den kuilhoop gestoken. Hierbij hebben we dus meer kans dat in het monster eenzelfde toestand heerscht en dat de analyse niet gedeelten betreft die wel en tegelijkertijd gedeelten die niet in melkzuurgisting gegaan zijn.

TABEL 15.

	% melk- zuur.	% azijn- zuur.	% boter- zuur.	Melkzuur- bacteriën.	pH.
Jonge Hollandsche kuil 4	0,41	0,19	0,22	geen	4,73
Voorjaarskuil P. Z. B.	0,76	0,13	1,06	„	5,03
Idem, diepere laag	2,30	0,39	0,82	tamelijk veel	4,53
Duivenboonen-mais-kuil	0,54	0,75	0,67	massa	4,3
Graskuil in Drente 15	0,14	0,34	1,10	„	5,72

Uit de chemische analyse van tabel 15 kan men wel duidelijk zien dat de derde een echte „melkzuurkuil” is, voor de andere is de beoordeeling echter moeilijker. De graskuil in Drente b.v. zou men willen indeelen bij die groep van kuilen welke niet in melkzuurgisting gegaan zijn. Er is toch slechts 0,14 % melkzuur gevonden, d. i. practisch niets. In de tabel is ook opgenomen het resultaat van het onderzoek naar de aanwezigheid van melkzuurbacteriën en daaruit blijkt dat in dezen Drentschen kuil massa's melkzuurbacteriën werden gevonden, zoodat deze kuil wel een melkzuurkuil was, echter een melkzuurkuil, waaruit het melkzuur door boterzuurgisting weer verdwenen was.

De bacteriologische analyse kan in dit opzicht betrouwbaarder uitkomsten geven. Zonder moeite worden hierdoor de bovenste twee monsters uit tabel 15 verwezen tot het type „kuilhoop zonder melkzuurgisting” en de onderste drie tot het type „kuilhoop met melkzuurgisting”.

Ook uit oudere gegevens, die wij bezaten blijkt dat men er rekening mede moet houden dat er Hollandsche kuilen met en zonder melkzuurgisting zijn.

Bacteriologische analyses uit het seizoen 1932—1933 gaven n.l. het volgende:

TABEL 16.

Hollandsche kuil.	Onderzoekt:	pH.	Melkzuurbacteriën.
Graskuil van Mei 1932	December 1932	5,5	massa
„ „ 1932	Januari 1933	4,96	geen
„ „ September 1932 . . .	17 Januari 1933	5,02	massa
„ „ „ 1932 . . .	31 „ 1933	5,32	„

De laatste twee monsters van tabel 16 betreffen denzelfden kuilhoop als de laatste van tabel 14 (1932). In dezen kuil was geen melkzuur aanwezig, zoodat het den schijn had alsof er geen melkzuurgisting had plaats gevonden. Ook bij dit voorbeeld blijkt duidelijk hoe bedriegelijk de chemische analyse kan zijn. Het bacteriologisch onderzoek bewijst dat in dezen kuil wel degelijk melkzuurgisting moet zijn geweest.

De tabellen in dit hoofdstuk bewijzen dus duidelijk het bestaan der twee genoemde types van Hollandsche kuilen. Er blijkt echter ook uit dat pas het bacteriologisch onderzoek betrouwbaar kan uitmaken tot welk type de kuil of een gedeelte van den kuil behoort.

X. Hoe kan men aantoonen of een kuilhoop of een mineraalzure silage gevaarlijk is voor de kaasbereiding.

Uit het voorgaande volgt dat een kuilhoop of een mineraalzure silo gevaren voor de kaasbereiding zal opleveren indien in het geconserveerde voeder een lactaatvergiftiging door boterzuurbacteriën heeft plaats gehad, omdat zich dan in het voeder *Cl. tyrobutyricum* heeft ontwikkeld, welke bacteriesoort ook in kaas door lactaatvergiftiging gistingsgassen vormt. Zoodra de koolhydraten uit het groene materiaal door melkzuurbacteriën omgezet zijn is de lactaatvergiftiging nog slechts de eenig mogelijke boterzuurgisting.

De logische conclusie hiervan is dus, dat **de gevaarlijkheid van een geconserveerd voeder onverbrekkelijk verbonden is aan de melkzuurgisting.**

De literatuur over het conserveren van voeder door inkuiling (zonder gebruik te maken van anorganische zuren) beschouwt de melkzuurgisting als een essentieele noodzakelijkheid voor het goed gelukken der conserveering. Door de melkzuurgisting toch wordt de zuurgraad sterk verhoogd en het zuur

heeft grooten invloed op de conserveering daar de rotting er door beperkt wordt. Daarom wordt bij andere inkuilingsmethodes dan de Hollandsche (b.v. de methode Völtz) doelbewust aangestuurd op een flinke melkzuurgisting. Men beschouwt dan echter het conserveeringsprobleem uitsluitend uit een oogpunt van de verliezen in voederwaarde. Indien men echter het oog richt op de beïnvloeding van de kwaliteit van kaas, moet bij de tot nu toe gevolgde methodes van inkuilen de melkzuurgisting uit den boeze worden geacht omdat deze gisting de grondstof levert, welke de ontwikkeling van de gevaarlijke *Cl. tyrobutyricum* mogelijk maakt.

Bij een Hollandschen kuil wordt de melkzuurgisting bevorderd door:

1°. alle factoren, welke verhinderen dat een hooge temperatuur ontstaat, dat zijn b.v.:

a. Het optassen van gras met hoog vochtgehalte.

Hoe minder droge stof een kuil heeft, des te grooter warmtecapaciteit heeft de massa en des te minder lucht zal zij bevatten. De laatste omstandigheid beperkt de hoeveelheid ontwikkelde warmte en de eerste verhindert een groote temperatuurstijging. Tabel 14 en onze ervaring bevestigen deze zienswijze.

b. Het snel opbouwen van den kuilhoop.

Hierdoor wordt de inwerking der luchtzuurstof verminderd en dus de oxydatie welke oorzaak is van de warmteproductie.

2°. alle factoren welke een hoog lactaatgehalte veroorzaken.

Toevoeging van suiker bij de inkuiling kan dus nadeelig zijn. Niet omdat de suiker zelf de boterzuurgisting bevordert, want de boterzuurbacteriën welke rietsuiker kunnen vergisten zijn ongevaarlijk voor kaas (*Cl. saccharobutyricum*). De rietsuiker bevordert echter de melkzuurgisting en daardoor indirect de lactaatvergisting door *Cl. tyrobutyricum*.

Het is ons dan ook gebleken dat alle door ons onderzochte kuilmonsters, afkomstig uit z.g. Völtzkuilen (waaronder men dan kuilen verstaat die snel opgebouwd zijn van niet-verwelkt gras met toevoeging van suiker), als gevaarlijk voor de kaasmakerij moesten worden beschouwd.

Bij een mineraalzuur silo moeten ook alle omstandigheden, welke de melkzuurgisting bevorderen, worden geacht het gevaar voor de kaasmakerij te doen toenemen. Het gebruik van suiker is b.v. ook een dier omstandigheden. Men moge ook verder bedenken dat bij een mineraalzuuren silo geen hooge temperaturen ontstaan, waardoor er altijd een melkzuurgisting zal plaats hebben als de zuurgraad dit toelaat.

Voor de beoordeeling van een geconserveerd voeder uit een oogpunt van kaasbereiding is dus niet zoozeer van belang de aanwezigheid in grooter of

kleiner aantal van boterzuurbacteriën, doch komt het er op aan aan te toonen of er al of niet lactaatvergisting heeft plaats gevonden.

A. *Bacteriologische methode.*

De methodiek om te onderzoeken of in een stof lactaat- of suikervergistende boterzuurbacteriën aanwezig zijn is door ons reeds beschreven in het artikel „Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën.” Men ent dus de door enting van geconserveerd voeder in glucosevleeschbouillon verkregen ruw-cultuur van boterzuurbacteriën (welke na de enting met het voeder gepasteuriseerd was om de niet-sporevormende bacteriën te dooden) in eenerzijds *Manniet-peptonwater* en anderzijds in *Natriumlactaat-gistaautolysaat*. Krijgt men nu gisting in mannietpepton en niet in lactaat-autolysaat dan heeft men te maken met de voor kaas ongevaarlijke Cl. *Saccharobutyricum*; krijgt men daarentegen gisting in lactaatautolysaat en niet in mannietpepton, dan was in het voeder de gevaarlijke Cl. *tyrobutyricum* aanwezig. Constaceert men in beide vloeistoffen gisting dan waren beide soorten tegenwoordig.

Het is noodig om in het te onderzoeken voeder de aanwezigheid van boterzuur te bepalen om zeker te zijn dat de gevonden boterzuurbacteriën zich in het voeder vermeerderd hebben en niet de met het gras ingebrachte geconserveerde sporen zijn.

De beschreven methode heeft het nadeel dat zij als alle bacteriologische methodes langdurig is. Wij hebben nog getracht of het mogelijk was sneller tot het doel te geraken door het geconserveerde voeder direct in mannietpepton en in lactaat-gistaautolysaat te enten en te pasteuriseeren doch hiervan zijn de resultaten onbetrouwbaar, daar vooral in lactaat-autolysaat de boterzuurbacteriën moeilijk aanslaan of door een zelfs gering aantal rottingsbacteriën overvleugeld worden. Ook is nog geprobeerd of het niet-pasteuriseeren van de geënte lactaatautolysaatbuizen den boterzuurbacteriën betere kansen gaf doch ook dit gaf geen betrouwbaarder uitkomsten. Wijziging van de concentratieverhouding van koolstof- en stikstofbron door verdund gistaautolysaat (1 op 5 of 1 op 10) met 1½ % Na-lactaat te gebruiken om aldus beter de rottingsbacteriën te kunnen onderdrukken bleef eveneens zonder succes in een groot aantal gevallen.

Een tweede bacteriologische methode bestaat in het aantoonen van melkzuurbacteriën. Dit is wel een snelle doch slechts een indirecte methode. Men toont er alleen mee aan dat er melkzuurgisting heeft plaats gehad en dat er daarom in het voeder de mogelijkheid van lactaatvergistende boterzuurgisting bestaan heeft. In ieder geval maakt de gelijktijdige aanwezigheid van veel melkzuurbacteriën en boterzuur een silage wel verdacht.

B. *Chemische methode.*

Wij hebben er reeds op gewezen dat de chemische analyse tot verkeerde conclusies kan leiden daar de lactaatvergisting het ontstane melkzuur kan vergisten, waardoor de chemische samenstelling van een dergelijk voeder, dat juist zeer gevaarlijk voor kaas is, gaat lijken op die van voeder hetwelk geen melkzuurgisting doch alleen een suikervergistende boterzuurgisting heeft doorgemaakt, ongevaarlijk voor kaas. Dit bezwaar geldt in hoofdzaak de Hollandsche kuilhoopen. Bij de mineraalzuren silages waar de gistingen en vooral de boterzuurgisting door den invloed van den zuurgraad niet zoo volledig verlopen, kan de chemische analyse der voorkomende zuren dikwijls wel een waardevolle aanwijzing geven.

De aanwezigheid van boterzuur (zelfs in sporen) bewijst een plaats gehad hebbende boterzuurgisting. Het melkzuurgehalte kan nader uitwijzen of dit boterzuur van een lactaat- of van een suikervergisting afkomstig is. Vindt men in een mineraalzuur silo n.l. slechts sporen melkzuur dan heeft geen melkzuurgisting plaats gehad en is het boterzuur ongevaarlijk. In ieder geval zou een silo als gevaarlijk beoordeeld moeten worden waar bij een hoog gehalte aan gevormde zuren (vluchtig zuur + melkzuur) de hoeveelheden melkzuur en boterzuur van dezelfde orde van grootte zijn. Uit de ontwikkelde theorie is het verder duidelijk dat een hoog boterzuurgehalte op zich zelf reeds verdacht is. De suikervergisting door boterzuurbacteriën kan immers in een silo slechts van korten duur zijn, daar zij spoedig tot stilstand gebracht wordt, hetzij door het in de niet-zure laagjes diffundeerende anorganische zuur, hetzij door een melkzuurgisting welke de koolhydraten verbruikt.

XI. De ensileeringen in de praktijk.

In het stalvoederingsseizoen 1933—'34 is een groot aantal silages, afkomstig uit de praktijk, onderzocht. De monsters werden ons door de betreffende veehouders ter beschikking gesteld, dikwijls door bemiddeling en met medewerking van rijkslandbouw- of veeteeltconsulenten, waarvoor wij op deze plaats onzen dank betuigen. Het waren uit den silo gestoken blokmonsters van 2 tot 4 kg gewicht, verzonden in biscuittrommels, zoodat uit het inwendige bacteriologisch betrouwbare monsters geknipt konden worden met behulp van gesteriliseerde pincetten en scharen.

In de blokmonsters werden de volgende bepalingen gedaan:

1°. Geur. Speciaal werd gelet op de aanwezigheid van boterzuur- en azijnzuurgeur. Een azijnzuurgeur kan als teeken van een plaats gehad hebbende melkzuurgisting beschouwd worden.

2°. pH. Deze werd bepaald van verschillende lagen in het blok om een inzicht te krijgen in de gelijkmatigheid. Hoe sterker de pH-waarden op deze kleine afstanden uiteenloopen met des te minder zorg is de silo gemaakt. Ook is de gemiddelde pH van het geheele blok bepaald door het uit elkander te plukken, te mengen en van een gemiddeld monster sap te persen voor de meting,

3°. Melkzuur, boterzuur en azijnzuur volgens de in hoofdstuk V besproken methodes. Meestal werden de concentraties dezer zuren bepaald in een gemiddeld monster van het blok; een enkele keer, b.v. bij klaarblijkelijk groote ongelijkmatigheden, werden verschillende gedeelten uit het blok apart geanalyseerd.

4°. Boterzuurbacteriën. Voor de uitvoering hiervan zij verwezen naar hoofdstuk V en hoofdstuk X.

5°. Melkzuurbacteriën. Hiertoe werden plaatcultures aangelegd op glucosevleeschbouillon-gelatine.

6°. Andere micro-organismen.

Al deze onderzoeken werden niet in alle monsters verricht. De onderzoekstechniek heeft zich in den loop van het onderzoek ontwikkeld in verband met het ontstaan van de in vorige hoofdstukken besproken theorie over de boterzuurgistingen in een silo. Bij de vroegst ingekomen monsters vindt men b.v. daarom geen gegevens betreffende den aard der aangetroffen boterzuurbacteriën.

Men mag het bij een blokmonster gevonden resultaat niet zonder meer overdragen op den geheelen silo. Het blokmonster geeft ons slechts de gegevens uit het midden van een silo, daar wij bij voorkeur monsters hebben willen onderzoeken welke den toestand het gunstigst weergaven. Onze bedoeling was n.l. niet om na te gaan wat met de mineraalzuurmethode in de practijk bereikt is, doch wat er in de practijk mee bereikt kan worden. Meestal is b.v. het randgedeelte van een silo van slechter kwaliteit wat de aanwezigheid van boterzuurbacteriën betreft. Ook is het randgedeelte vaak minder zuur en uit dien hoofde reeds gevaarlijker. Om echter een idee te geven van de gemiddelde kwaliteit van de onderzochte silo's zijn in de tabel ook opgegeven pH en boterzuur-gehalte zooals deze aan het rijkslandbouwproefstation te Wageningen werden gevonden in een gemiddeld monster van de geheele horizontale laag van den silo waaruit ook het blok voor het bacteriologisch onderzoek was gestoken.

De monsters zijn slechts aangegeven door een nummer en de provincie van herkomst; namen van inzenders zijn niet vermeld. In tabel 17 zijn de resultaten van het onderzoek der door de practijk ingezonden monsters samengesteld. Tabel 18 betreft de gegevens, verkregen bij silo's, gemaakt op de proefzuivelboerderij ten behoeve van de physiologische afdeeling van het proefstation;

in tabel 19 vindt men de cijfers over de ensileering in kleine bontonsilo's van ongeveer 5 m³ inhoud.

Wij bespreken thans eerst tabel 17.

Een 14-tal silo's heeft niet voldaan aan den eisch dat de gemiddelde pH beneden 4 moet zijn. Het zijn de nummers:

1, 2, 5, 6, 12, 18, 25, 33, 38, 43, 49, 59, 88 en 90.

Het boterzuurgehalte loopt voor deze monsters uiteen van 0,13 tot 1,48 % doch voor de meeste tusschen 0,4 en 0,9 %. Men kan in deze groep de hoogste boterzuurconcentraties verwachten doch men bedenke ook dat, zoo boterzuur ontstaan kan, er ook koolhydraat moet zijn dat door de boterzuurgisting, hetzij direct, hetzij via melkzuur wordt omgezet en het koolhydraatgehalte is niet voor alle plantenmateriaal hetzelfde. Zoo heeft b.v. monster 6 bij pH 4,32 slechts 0,13 % boterzuur. Het betreft hier dan ook koolhydraatarme lucerne. Een monster uit denzelfden silo, afkomstig uit een dieper gelegen laag (monster 49) bevatte 1,48 % boterzuur doch daar te dezer plaatse de pH 5,2 was, moet een groot gedeelte van dit boterzuur vermoedelijk aan rotting worden toegeschreven.

22 monsters hadden een pH tusschen 3,5 en 4,0; het zijn de nummers: 13, 22, 26, 44, 47, 50, 53, 55, 58, 63, 64, 67, 70, 80, 84, 89, 93, 94, 95, 99, 102 en 107.

Het boterzuurgehalte liep hier uiteen van 0 tot 0,51 %, de meeste hadden een boterzuurconcentratie tusschen 0,1 en 0,4 %. Er waren 4 monsters zonder boterzuur, twee ervan betroffen stoppelknollen. Bij de monsters uit dit pH-gebied demonstreert zich reeds de invloed van het met meer of minder zorg maken van de silage. Bij n°. 63 (0 % boterzuur) is tijdens de vulling door een groot aantal arbeiders getrapt, waardoor de niet-zure laagjes slechts zeer korten tijd konden blijven bestaan, bij de nummers 50 (0,03 % boterzuur), 84 (0,06 % boterzuur) en 107 (0 % boterzuur) is tijdens de vulling der silo's constant gesproeid, zoodat hier voor de vorming van niet-zure laagjes weinig gelegenheid was.

Bij 21 monsters lag de pH tusschen 3,0 en 3,5. Het zijn de nummers: 3, 11, 14, 32, 34, 35, 37, 45, 46, 56, 61, 69, 76, 77, 78, 79, 81, 83, 92, 97, 98.

Het gehalte aan boterzuur varieerde van 0 tot 0,40 %, doch lag voor de meeste tusschen 0,04 en 0,22 %. Het hooge boterzuurgehalte van n°. 14 (0,13 % bij een pH van 3,08) wordt verklaard door de ongelijkmatigheid van dezen silo. De pH in dit kleine blok varieerde van 2,72 tot 3,93. Er zijn in deze groep meer monsters met een relatief hoog boterzuurgehalte (nummers 32, 83, 98). Er moeten dus bij deze silo's dikke lagen gras bespoten zijn.

10 monsters hadden een pH beneden 3,0. Het waren de nummers 7a, 16, 27, 60, 62, 71, 72, 73, 87 en 91. Het boterzuurgehalte liep uiteen van

0 tot 0,1 %, doch was bij de meeste 0,01 à 0,05 %. Merkwaardig is het, dat de silo met het hoogste bedrag aan boterzuur (n°. 91 met 0,1 %) gemaakt is door een veehouder, waarvan ook de monsters uit andere silo's een in verband met de pH hooge boterzuurconcentratie vertoonden. Dit zijn n.l. de monsters 32 met 0,32 % boterzuur bij pH 3,30 en 61 met 0,11 % boterzuur bij pH 3,14. De monsters 3, 35, 78, 98 zijn eveneens afkomstig van verschillende silo's uit één bedrijf. Met uitzondering van het zuurste monster (n°. 3 met pH 3,00) hebben al deze monsters een in verband met hun zuurgraad hoog boterzuurpercentage. Daarentegen zijn de monsters van het bedrijf, dat de nummers 50, 67, 84 en 107 inzonderd, gekenmerkt door een bijzonder laag boterzuurpercentage. We zien hier dus duidelijk den invloed van de wijze van ensileren. Het kan niet anders of op beide eerstgenoemde bedrijven zijn dikkere lagen bespoten dan op het andere.

De cijfers voor het gehalte aan melkzuur geven niet zoo'n duidelijk beeld over den toestand der silo's als de boterzuurgetallen. Dit komt ten eerste door de betrekkelijke waarde die de melkzuurcijfers hebben als gevolg van onzekerheden in de bepaling van het melkzuur, doch ten tweede ook door de lactaatvergisting. Zelfs indien er een absoluut betrouwbare methode was voor de bepaling van het melkzuur zou toch het melkzuurpercentage niet een juist inzicht geven over de hoeveelheid melkzuur welke in een silo ontstaan was. Het melkzuurpercentage kan slechts aangeven hoeveel melkzuur op het moment van monsterneming in den silo aanwezig is, zegt evenwel niets over het kwantitatieve verloop der melkzuurgisting daar in vele gevallen en juist in die gevallen, waarin een krachtige melkzuurgisting heeft plaats gehad, een kleiner of grooter gedeelte van het melkzuur omgezet kan zijn tot boterzuur. Dit blijkt ook duidelijk uit onze cijfers. De hoogste melkzuurconcentraties zou men verwachten in de silo's met hooge pH, waar de melkzuurbacteriën in hun werking niet door den zuurgraad belemmerd zijn. In werkelijkheid treffen we juist in de silo's van een pH boven 4 geen hooge melkzuurconcentraties aan. Ook in het pH-gebied van 3,5 tot 4 zijn wegens de genoemde reden de melkzuurpercentages niet hoog. Daarentegen zijn ze in het pH-gebied 3 tot 3,5 weer hooger dan men verwachten zou; doch hier ontbreekt dan ook de lactaatvergisting.

De beschouwing van de verschillen der pH-waarden in een blok geeft een oordeel over grove ongelijkmatigheden bij de bereiding. Zeer opvallend zijn in dit opzicht de monsters 7 en 14. Bij n°. 7 konden wij zelfs plekken met verschillende geur apart onderzoeken. Bij n°. 14 is gesproeid met gieters in plaats van met een spuit. De silo 46 van hetzelfde bedrijf is door het sproeien met een spuit veel gelijkmatiger. In het algemeen zijn bij de ongelijkmatig gesproeide silo's volgens de verwachting de concentraties der gistingproducten hooger dan bij gelijkmatige silo's van dezelfde gemiddelde pH.

De vergelijking der pH-waarden van de blokmonsters met de aan het rijkslandbouwproefstation te Wageningen bepaalde pH-cijfers leert dat bij 37 silo's de gemiddelde pH der heele horizontale laag hooger was dan de pH van het blokmonster, genomen uit het centrum. Dit beteekent dat van deze silo's het randgedeelte minder zuur was dan het centrum. Bij 10 silo's was het randgedeelte zuurder dan het centrum blijkens de hoogere pH-cijfers voor het blokmonster en bij 18 silo's waren de getallen practisch gelijk. Het veel voorkomende verschil tusschen rand en centrum is wel afhankelijk van de grootte van den silo. Bij een kleinen silo heeft de persoon die spuit neiging om in het midden te blijven staan, waardoor hier minder zuur komt. Bij een grooten silo loopt de spuiters meestal in een cirkel en wordt daardoor het midden dikwijls overdadig bespoten.

Ook ziet men dat op enkele uitzonderingen na het boterzuurgehalte van het Wageningsche monster hooger is dan het onze als ook de in Wageningen bepaalde pH hooger is en lager als de pH lager is. De bereidingswijze van de verschillende practijksilo's is zóó verschillend geweest dat van een verband tusschen pH en boterzuurgehalte weinig blijkt. Bij vergelijking van de in Wageningen bepaalde gegevens met de onze heeft men echter twee analyses van eenzelfde silo, waardoor het verband pH-boterzuur wel duidelijk naar voren komt.

Wij mogen volgens de ontwikkelde theorie nu speciaal die silages als gevaarlijk voor de kaasbereiding beschouwen welke een hoog boterzuurgehalte bezitten, verder die silo's welke naast veel of tamelijk veel melkzuur tamelijk veel boterzuur bevatten. Ongevaarlijk zijn de silo's welke zoowel weinig melkzuur als weinig boterzuur bevatten en die waarin geen boterzuur kan worden aangetoond.

In tabel 20 is deze verdeeling, louter berustend op de waardeering volgens de chemische analyse, weergegeven.

In deze tabel zijn ook de pH-cijfers der silomonsters opgenomen. Men ziet hieruit dat op enkele uitzonderingen na de ongevaarlijke silo's een pH beneden 3,5 bezitten. De hoogere pH-waarden vindt men in de groep der gevaarlijke silo's. De meeste Defu-silages treft men ook in deze groep aan, waartoe vooral de hooge pH doch waarschijnlijk ook de toegevoegde suiker bijgedragen zal hebben.

We zullen thans nagaan tot welke conclusies het bacteriologisch onderzoek geleid heeft.

Bij dit bacteriologisch onderzoek kan men waarde hechten aan de aanwezigheid van melkzuurbacteriën. Indien we geen melkzuurbacteriën vinden beteekent dit dat de silage ongevaarlijk voor de kaasbereiding is, hoewel we er bij zeer zure silo's toch altijd nog rekening mee moeten houden dat in

TABEL 20.

Verdeeling der practijksilo's, uitsluitend op grond van de chemische analyse. ¹⁾

N ^o .	Voor kaas gevaarlijke silo's.						Voor kaas ongevaarlijke silo's.						Moeilijk te classificeren.						
	MZ.	BZ.	pH.	N ^o .	MZ.	BZ.	pH.	N ^o .	MZ.	BZ.	pH.	N ^o .	MZ.	BZ.	pH.				
1	0,97	0,47	4,12	44	1,58	0,12	3,57	3	0,06	0,05	3,00	62	0,40	0,01	2,75	6	0,24	0,13	4,32
2	0,55	0,83	4,18	47	0,63	0,20	3,86	7a	0,47	0,04	2,68	63	1,29	0	3,58	14	0,44	0,13	3,08
5	0,13	0,86	4,62	55	0,42	0,39	3,97	11	0,83	0,02	3,40	69	1,28	0	3,26	45	1,01	0,10	3,33
49	0,12	1,48	5,20	59	0,72	0,54	4,26	16	0,12	0,05	2,89	71	0,63	0,01	2,71	61	0,56	0,11	3,14
7b	0,55	0,22	3,26	64	0,64	0,40	3,80	22	0,51	0	3,60	72	0,62	0,06	2,81	81	0,73	0,16	3,32
7c	—	0,40	4,04	67	1,07	0,25	3,64	27	0,23	0	2,15	73	0,84	0,005	2,94	91	0,46	0,10	2,89
12	0,70	0,58	4,07	70	1,84	0,13	3,76	34	1,36	0	3,49	76	1,12	0,06	3,37	93	1,43	0,09	3,61
13	0,60	0,26	3,75	78	1,56	0,22	3,22	37	0,70	0,03	3,10	77	0,83	0,04	3,06	97	0,72	0,13	3,46
18	0,08	0,78	4,86	80	0,25	0,29	3,81	46	1,38	0,04	3,37	79	0,92	spoor	3,38	99	1,10	0,08	3,62
25	0,63	0,61	4,11	83	1,35	0,40	3,27	50	1,51	0,03	3,7	84	2,01	0,06	3,74	102	1,26	0,15	3,96
26	0,62	0,18	3,82	88	0,77	0,71	4,05	53	0,34	0	3,75	87	1,19	0,02	1,67				
32	0,65	0,32	3,30	89	0,81	0,51	3,63	56	0,92	0,04	3,26	92	0,64	0,04	3,02				
33	0,41	0,46	4,50	90	1,11	0,34	4,08	58	0,55	0,02	3,88	107	2,17	0	3,7				
35	1,07	0,13	3,45	94	1,25	0,32	3,78	60	0,33	0,01	2,86								
38	0,46	0,96	4,01	95	0,76	0,20	3,72												
43	0,46	0,17	4,43	98	0,52	0,30	3,45												

¹⁾ Voor een definitieve verdeling der silages moeten ook de bacteriologische onderzoeken in aanmerking genomen worden. Men raadplege hiervoor den tekst.

In deze tabel beteekent MZ % melkzuur en BZ % boterzuur.

de niet-zure laagjes in het begin nog een flinke ontwikkeling van melkzuurbacteriën kan hebben plaatsgevonden, doch de bacteriën later door het difundeerende zuur kunnen zijn gedood. Omgekeerd mag ook niet altijd de aanwezigheid van melkzuurbacteriën gevaarlijk geacht worden. Een geringe ontwikkeling van melkzuurbacteriën zal n.l. in de niet-zure laagjes haast altijd wel optreden.

Op grond van het ontbreken van melkzuurbacteriën zouden we dus de silomonsters 3, 7a, 7b, 11, 16, 27, 61, 62, 71, 72, 73, 77, 83, 87, 89, 91 en 92 in de ongevaarlijke groep kunnen onderbrengen. De nummers 83 en 89 zijn echter in ieder geval gevaarlijk, hetgeen duidelijk uit de chemische analyse volgt en wat hieronder nog nader aangetoond zal worden. Men ziet dus dat de beoordeeling niet mag geschieden met behulp van één kenmerk. Men dient daarvoor de combinatie van gegevens te beschouwen.

Overigens is er een goede overeenstemming tusschen het ontbreken van melkzuurbacteriën en de classificatie volgens tabel 20.

Belangrijker is het onderzoek naar de hoeveelheid boterzuurbacteriën en naar de eigenschappen der aanwezige boterzuurbacteriën. Vooral dit laatste, n.l. het onderzoek of de boterzuurbacteriën tot het lactaatvergistende of het suikervergistende type behooren, is van belang, daar hiermede de gevaarsfactor zelf bestudeerd wordt. Er doen zich bij dit onderzoek dikwijls groote cultiveeringsmoeilijkheden voor, zoodat het niet altijd tot het doel voert.

De silo's 35, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 55, 58, 59, 64, 67, 80, 81, 83, 88, 89, 90, 94, 98, 102 en 107 bleken lactaatvergistende boterzuurbacteriën te bevatten de silo's 34, 35, 47, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 64, 67, 71, 76, 77, 80, 81, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 97, 98, 102 en 107 suikervergistende.

In de silomonsters 35, 47, 55, 58, 59, 64, 67, 80, 81, 88, 89, 90, 94, 98, 102 en 107 werden dus beide soorten aangetroffen, doch in de silo's 35, 43, 49, 55, 83, 88, 89, 94 en 107 waren de lactaatvergisters verre in de meerderheid en in de silo's 34, 56, 60, 71, 76, 81 en 97 bestond de meerderheid der boterzuurbacteriën uit suikervergisters.

Uit de groep silo's, waarin *Cl. tyrobutyricum* gevonden werd, zullen 46 en 58 echter als ongevaarlijk beschouwd moeten worden, daar uit het onderzoek dezer monsters gebleken is, dat er geen boterzuurgisting is opgetreden.

Dat zelfs nu nog een kleine onzekerheid in de beoordeeling blijft, ziet men bij het silomonster n°. 107. In dit monster werden veel boterzuurbacteriën aangetroffen, bijna alle lactaatvergistend. Toch is in dit monster geen boterzuurgisting geweest, getuige de afwezigheid van boterzuur. Hier hebben we dus een duidelijk geval van conserveering der op het gras bij het oogsten aanwezige boterzuurbacteriënsporen en dit is toevallig een zeer groot aantal en alle van de soort *Cl. tyrobutyricum*. Men zou zich kunnen voorstellen

dat de bemesting van het grasland op deze infectie van het gras invloed heeft. Indien men n.l. bemest met mest van koeien, welke veel kuilvoeder met lactaat-vergistende boterzuurbacteriën nuttigden, wordt deze infectie van het gras steeds erger en het is niet onmogelijk dat reeds een zeer heftige infectie zonder gisting alleen voldoende zou zijn om een silo onbetrouwbaar te achten.

Een paar zeer illustratieve voorbeelden uit tabel 17 volgen hier nog:

Het silomonster 55 is een typisch voorbeeld van een voor kaas gevaarlijken silo. pH is 3,90 à 4,07, de verhouding melkzuur: boterzuur is 1 en het boterzuurgehalte is hoog (0,39 %). Er werden veel boterzuurbacteriën gevonden, die bijna alle lactaat konden vergisten.

Het monster 56 is typisch ongevaarlijk. pH is 2,66 à 3,41. Er was weinig boterzuur en de vele aanwezige boterzuurbacteriën vergistten geen lactaat.

Even typisch zijn n°. 60 met lage pH en alleen suikervergistende boterzuurbacteriën en n°. 64 met hoge pH en bijna alleen lactaatvergisters.

Zeer merkwaardig is het monster 83. Dit is een duidelijk voorbeeld hoe zelfs een zeer zure silo nog gevaarlijk kan zijn en hoe men door een minder zorgzame bereiding toch nog beneden de vroeger genoemde pH-grens van 3,5 kaasgevaarlijke silo's kan krijgen. Er waren bij pH 3,1 à 3,27 tamelijk veel boterzuurbacteriën en alle waren lactaatvergistend. De cijfers voor melkzuur en boterzuur bewijzen dat gistingen in deze silo hebben plaats gehad.

Dat men daarentegen bij hogere pH dan 3,5 door uiterste zorgvuldigheid ook betrouwbare silo's kan maken bewijzen b.v. de monsters 34, 50, 63 en 84. N°. 50 en n°. 84 zijn afkomstig van het bedrijf waar door ononderbroken spuiten tijdens de vulling de laagjesvorming vermeden is en boterzuurgisting dus onmogelijk werd. Bij n°. 34 is door het ontbreken van drainage een hoog vochtgehalte behouden en dus een betere zuurdiffusie verkregen en bij n°. 63 is de voedermassa goed in elkaar geperst tijdens de vulling.

Van één der practijksilo's is zoowel een rand- als een middenmonster geanalyseerd. Men vindt deze beide onder de nummers 93 en 94. Men ziet uit de gegevens hoe hier in dezelfde horizontale silolaag verschillen aanwezig waren. De rand van den silo bevatte bijna uitsluitend lactaatvergistende boterzuurbacteriën; de boterzuurbacteriën uit het centrum (93) waren moeilijk kweekbaar, zoodat niet bepaald kon worden tot welk type zij behoorden. Het centrummonster is in tabel 20 gerangschikt in de groep der moeilijk te beoordeelen silo's. Het randgedeelte is in ieder geval gevaarlijk voor kaas. Door den veehouder, die de monsters 93 en 94 leverde, is kaas gemaakt in den tijd dat zijn koeien met deze silage gevoederd werden. Twee dezer kazen, de eene bereid op 21 Maart 1934, de andere op 25 Maart 1934 werden door ons bij 18° C. bewaard en zijn laat-los geworden, echter pas langzamerhand. Bij het bacteriologisch onderzoek der gerezen kaas bleken de boterzuurbacteriënhaarden

slechts plaatselijk in de kaasmassa aanwezig te zijn. Deze kaasproef verliep dus wel in overeenstemming met het resultaat van het silo-onderzoek, waarbij het midden van den silo zich deed kennen als een grens-geval. Van de onderzochte kaas is aan het einde van dit verslag een foto bijgevoegd.

Bezien wij thans tabel 18, dat zijn de gegevens over eenige silo's op het terrein der proefzuivelboerderij. Bij deze silo's waren wij in staat meer monsters te onderzoeken, zoodat hier een beeld verkregen werd over eenige silo's in hun geheel. Deze silo's zijn zeer zorgvuldig gemaakt, doch men ziet duidelijk hoe moeilijk het is een gelijkmatig product te maken. Uit de cijfers van de silo's P.Z.B. I en P.Z.B. II volgt dat de allerbovenste laag in slechten toestand verkeerde. Bij silo P.Z.B. III is de rand onbetrouwbaar en hoewel er b.v. bij de analyse van 20 Januari 1934 in het boterzuurgehalte van rand en midden practisch geen verschil was en trouwens de verhouding melkzuur: boterzuur ook niet verschillend was, gaf de bacteriologische analyse scherp het verschil tusschen deze beide deelen weer. Uit den rand werden n.l. bijna uitsluitend lactaatvergistende boterzuurbacteriën geïsoleerd, uit het midden suikervergistende.

Silo P.Z.B. IV is gemaakt met toevoeging van suiker. Dit heeft een hoog melkzuurgehalte veroorzaakt, zelfs op die plaatsen, waar de gemiddelde pH beneden 3,5 was. Suiker bevordert dus in de niet-zure laagjes de melkzuurgisting. De aanwezigheid van boterzuur naast dit vele melkzuur doet dezen silo wel verdacht zijn. Inderdaad konden wij met dezen silo geen goede kaas maken. De boterzuurbacteriënanalyse heeft ons hier echter geen verklaring van gegeven omdat het niet gelukte uit de diepere lagen van dezen silo kweekbare boterzuurbacteriën te isoleeren.

Uit de cijfers van tabel 18 volgt verder nog dat de zuurgraad in een mineraal-zuren silo van boven naar beneden in vele gevallen toeneemt.

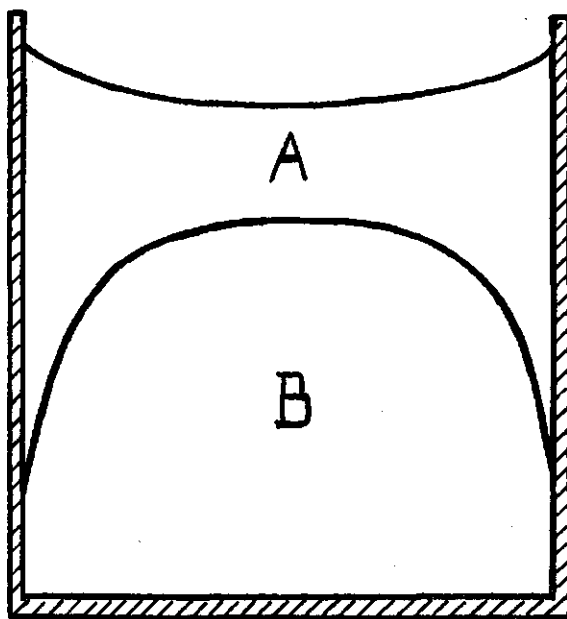
Tabel 19 vermeldt de analyses van de twee kleine betonsilo's. Betonsilo I werd op 11 October 1933 gevuld met 3400 kg zeer droog gras en bespoten met in totaal 235 liter verdund A.I.V.-zuur. Hoewel het ontstane sap uit dezen silo niet kon afvloeien mogen we dezen silo toch als een normalen A.I.V.-silo beschouwen daar door de droogte van het gras slechts zeer weinig sap gevormd werd, zoodat alleen de alleronderste laag in het sap stond.

Betonsilo II was op 17 October 1933 gemaakt van 3600 kg zeer nat gras, tijdens heftige regens van het land gehaald en bespoten met in totaal 110 liter verdund A.I.V.-zuur. Ook uit dezen silo is het sap niet afgelopen en daar hier zeer veel sap ontstond mag deze silo niet als een typischen A.I.V.-silo beschouwd worden.

Het is vooral betonsilo I geweest welke een zeer fraaie bevestiging gegeven heeft van onze boterzuurbacteriëentheorie. De geheele silo (behalve de aller-

onderste, in het sap verdronken laag) bevatte zeer veel boterzuurbacteriën, ook in het centrum, waar toch de pH bij 3,5 lag en het boterzuurgehalte laag was. Uit tabel 13 zien we dat deze silo, niettegenstaande het grootte aantal boterzuurbacteriën toch goede kaas heeft opgeleverd. Het onderzoek naar het type der boterzuurbacteriën heeft dit volkomen verklaard. Uit het monster van 6 April 1934 werden bijna uitsluitend lactaatvergistende soorten geïsoleerd, zowel uit het centrum als uit den rand, doch in de diepere lagen was de toestand geheel veranderd. In het centrummonster van 13 April 1934 waren alleen suikervergistende boterzuurbacteriën aanwezig, in den rand werden nog lactaatvergisters gevonden naast veel suikervergisters. Bij het monster van 20 April werden ook in den rand practisch alleen maar suikervergistende boterzuurbacteriën aangetroffen. Dit verklaart dus volkomen hoe met dezen silo toch goede kaas gemaakt werd. De kazen werden n.l. gemaakt op 11 tot 18 April.

We kunnen den toestand in dezen betonsilo dus weergeven door de volgende schematische teekening.



Eenzelfde toestand werd ook gevonden in silo P.Z.B. III.

Het silogedeelte A bevat de lactaatvergistende en het gedeelte B de suikervergistende boterzuurbacteriën. Dit is volkomen in overeenstemming met de door ons ontwikkelde opvatting. We hebben immers betoogd dat door de laags-

gewijze bouw van een mineraalzure silo gistingen mogelijk zijn zoolang het zuur nog niet volledig in de laagjes gedrongen is. De langstdurende gisting vindt men daar, waar de niet-zure laagjes het langst blijven bestaan, dit is boven in den silo en aan de zijanten omdat hier de massa niet zoo snel in elkaar geperst wordt. Daar is dus de lactaatvergisting ook mogelijk. De plaats en de vorm der tusschen de gebieden A en B liggende scheidingslijn wordt bepaald door de grootte van den silo en de factoren genoemd in hoofdstuk VII. Op de grens tusschen beide gebieden zal men beide types boterzuurbacteriën vinden.

Het is dus mogelijk dat men uit één silo goede en slechte kaas maakt, al naar gelang men voedert uit het gebied A of het gebied B.

Aan het slot van dit hoofdstuk willen wij nog eenige Hollandsche kuilhoopen beschouwen in het licht der boterzuurbacteriëtheorie.

TABEL 21.

Kuilhoop gemerkt	pH.	% melkzuur.	% azijnzuur.	% boterzuur.	Boterzuurbacteriën.	Lactaatvergisters.	Suikervergisters.	Melkzuurbacteriën.	Andere microorganismen.
Graskuil in Drenthe 15 .	5,72	0,14	0,34	1,10	zeer veel			massa	rottingsbacteriën
Stoppelknollen, voederbieten	4,46	0,46	0,17	0,47	zeer veel	++	++	massa	—
Duivenboonen, mais . . .	4,3	0,54	0,75	0,67	zeer veel	+++	—	massa	rottingsbacteriën
Jonge Holl. kuil 4 . . .	4,73	0,41	0,19	0,22	—			geen	—
Voorjaarskuil P.Z.B. 82 .	4,53	2,30	0,39	0,82	zeer veel	+++	+	veel	—
Graskuil van Mei 1932 .	5,5	—	—	—	tam. veel			massa	—
Graskuil van 1932 . . .	4,96	—	—	—	veel	—	+++	geen	rottingsbacteriën
Graskuil van Sept. '32 .	5,2	—	—	—	veel	+++	+	massa	rottingsbacteriën
Graskuil in Friesland . .	—	—	—	—	veel	+++	—		—

In de tabel 21 komt weer duidelijk het typische onderscheid der twee soorten Hollandsche kuilen naar voren, bij een aantal nu tevens bevestigd door het determineren van de soort der aanwezige boterzuurbacteriën. Men lette vooral op de verschillen tusschen het derde en het zeven monster uit deze tabel, waar volgens verwachting naast melkzuurbacteriën lactaatvergisterende boterzuurbacteriën gevonden werden en bij afwezigheid van melkzuurbacteriën suikervergisterende boterzuurbacteriën. Het 1e, 2e, 3e, 5e, 6e, 8e en 9e monster moeten als gevaarlijk voor de kaasbereiding beschouwd worden, het 4e en 7e niet.

TABEL 17 (Vervolg).

Num- mer van het mon- ster.	Provincie van herkomst.	Geënsileerd materiaal.	Gebruikt zuur.	Kg suiker per 100 kg voeder.	Datum van ensileering.	Datum van onderzoek.	Geur van het monste
67	Groningen	gras	A. I. V.	—	7-6-'33	14- 2-'34	iets boterzuur, aceta- mide
69	Overijssel	gras, stoppel- klaver	A. I. V.	—	9-'33	17- 2-'34	goed
70	Drente	gras	Defu	0,2	25, 26-7-'33	19- 2-'34	ester, iets boterzuur
71	Overijssel	roode klaver	A. I. V.	—	25, 26-7-'33	20- 2-'34	goed
72	Limburg	haver, wikken	A. I. V.	—	22-6-'33	21- 2-'34	goed
73	Groningen	gras	A. I. V.	—	16-5-'33	21- 2-'34	goed
76	Utrecht	gras	A. I. V.	—	22, 23-5-'33	27- 2-'34	goed
77	Utrecht	gras	A. I. V.	—	9, 10-6-'33	27- 2-'34	goed, iets azijn
78	N.-Holland	gras	A. I. V.	—	31-5-'33	27- 2-'34	boterzuur, azijnzuur
79	N.-Holland	gras	Defu + A.I.V.	—	6, 7-9-'33	2- 3-'34	goed
80	Gelderland	haver	A. I. V.	—	22, 23, 24-6-'33	2- 3-'34	boterzuur, azijnzuur
81	Drente	gras	Defu	0,3	24, 25-7-'33	3- 3-'34	zoet, plaatselijk azijn
83	N.-Holland	gras	A. I. V.	—	15-6-'33	7- 3-'34	boterzuur
84	Groningen	gras	Defu	0,16	2-6-'33	7- 3-'34	zoet, plaatselijk azijn
87	Drente	roode klaver, gras	A. I. V.	—	6-9-'33	13- 3-'34	esterachtig, broeigeur
88	Groningen	kanarie, klaver	A. I. V.	—	23-6-'33	15- 3-'34	boterzuur
89	Friesland	gras	A. I. V.	—	13-6-'33	15- 3-'34	boterzuur, azijnzuur, ester
90	Groningen	roode klaver	Defu	0,2	28, 29-6-'33	19- 3-'34	—
91	Z.-Holland	gras	Defu	0,2	26, 27-5-'33	22- 3-'34	appel, iets boterzuur
92	Groningen	gras	A. I. V.	—	3, 4-8-'33	23- 3-'34	scherp, ester, iets boter- zuur
93	Utrecht	gras	A. I. V.	—	29, 30-5-'33	23- 3-'34	scherp, ester, iets boter- zuur
94	Utrecht	gras	A. I. V.	—	29, 30-5-'33	23- 3-'34	scherp, ester, iets boter- zuur
95	Z.-Holland	gras	Defu	0,2	7, 8-6-'33	26- 3-'34	zoet, ester, iets boter- zuur
97	Overijssel	roode klaver	Defu	0,2	12, 13-6-'33	29- 3-'34	goed, iets azijn
98	N.-Holland	gras	A. I. V.	—	26, 27-5-'33	29- 3-'34	boterzuur
99	Utrecht	gras	A. I. V.	—	31-5-'33	4- 4-'34	scherp, ester
102	Groningen	gras, klaver	Defu	0,2	23, 24-5-'33	9- 4-'34	iets ester, iets boterzuur
107	Groningen	gras	Defu	0,2	30-5-'33	20- 4-'34	zoet

Oor- deel- n. l.	pH.		Blokmonster.				Melkzuur- bacteriën.	Boter- zuur- bacteriën.	Clostr. tyro- buty- ricum.	Clostr. sac- charo- buty- ricum.	Andere micro-organismen.	
	Blokmonster.	Uiteen- lopend van:	Bepaald in Wageningen.	% melkzuur.	% azijnzuur.	% boterzuur.						% boterzuur bepaald in Wageningen.
22	—	—	4,11	0,97	0,14	0,47	0,58	zeer veel	zeer veel			
218	—	—	3,70	0,55	0,23	0,83	0,40	afwezig	zeer veel			rottingsbacteriën
200	—	—	3,52	0,06	0,09	0,05	0,13	afwezig	zeer veel			veel gist
202	—	—	4,95	0,13	0,55	0,86	1,02	afwezig	zeer veel			rottingsbacteriën
232	3,84-4,97	—	4,75	0,24	0,21	0,13	0,12	afwezig	geen			
200	5,11-5,31	—	5,0	0,12	0,58	1,48	1,35	zeer veel	zeer veel	++	—	rottingsbacteriën
203	—	—	—	0,47	0,06	0,04	—	afwezig	weinig			
222	—	—	3,0	0,55	0,12	0,22	0,08	afwezig	weinig			veel gist
220	—	—	—	—	0,08	0,40	—	weinig	zeer veel			
200	3,37-3,43	—	3,45	0,83	0,15	0,02	0,01	afwezig	weinig			massa gist
207	3,82-4,63	—	4,05	0,70	0,18	0,58	0,45	massa	veel			
205	3,61-3,90	—	3,93	0,60	0,45	0,26	0,31	massa	weinig			
202	2,72-3,93	—	3,54	0,44	0,13	0,13	0,28	enkele	zeer veel			
200	2,89-3,41	—	3,4	0,13	0,13	0,05	0,13	afwezig	veel			weinig gist
205	4,82-4,89	—	4,09	0,08	0,69	0,78	0,29	massa	zeer veel			rottingsbacteriën
200	2,08-2,18	—	3,3	0,23	0,15	0	0,01	afwezig	geen			
200	3,58-3,65	—	3,7	0,51	0,15	0	0,01	massa	enkele			rottingsbacteriën
200	3,88-4,13	—	4,6	0,63	0,07	0,61	1,14	veel	veel			zeer veel rottingsbacteriën
200	3,66-4,10	—	4,6	0,62	0,61	0,18	0,09	zeer veel	weinig			rottingsbacteriën
200	3,24-3,32	—	3,8	0,65	0,52	0,32	0,55	massa	veel			rottingsbacteriën
200	4,42-4,54	—	4,4	0,41	0,17	0,46	0,49	zeer veel	zeer veel			enkele vervloeiende bacteriën
200	3,41-3,49	—	3,5	1,36	0,27	0	0	massa	tam. veel	—	++	enkele vervl., B. mycoides
200	3,26-3,66	—	3,4	1,07	0,36	0,13	0,17	massa	zeer veel	+++	+	enkele vervl., B. mycoides
200	3,10-3,18	—	3,5	0,70	0,29	0,03	0,26	massa	veel			
200	3,63-4,14	—	4,0	0,46	0,18	0,96	0,81	veel	zeer veel			
200	4,23-4,73	—	4,1	0,46	0,41	0,17	0,06	massa	veel	+++	—	rottingsbacteriën
200	3,55-3,67	—	3,50	1,58	0,36	0,12	0,23	zeer veel	zeer veel	+	—	enkele schimmels
200	3,26-3,44	—	3,4	1,01	0,18	0,10	0,24	veel	weinig	+	—	
200	3,34-3,39	—	3,5	1,38	0,28	0,04	0	veel	weinig	+	—	massa schimmels
200	3,85-3,86	—	3,9	0,63	0,63	0,20	0,18	massa	veel	+	+	
200	3,64-3,73	—	3,6	1,51	0,40	0,03	0,03	massa	enkele			
200	3,72-3,81	—	3,7	0,34	0,15	0	0	massa	weinig			rottingsbacteriën
200	3,90-4,07	—	3,7	0,42	0,35	0,39	0,16	massa	veel	+++	+	
200	2,66-3,41	—	3,2	0,92	0,21	0,04	0,05	veel	tam. veel	—	+++	veel rottingsbacteriën
200	3,57-4,05	—	3,6	0,55	0,24	0,02	0	massa	veel	+	++	zeer veel moireebacteriën
200	3,82-4,30	—	3,9	0,72	0,22	0,54	0,34	veel	zeer veel	++	++	zeer veel moireebacteriën
200	2,76-3,38	—	3,8	0,33	0,14	0,01	0,03	massa	veel	—	+++	enkele rottingsbacteriën
200	3,09-3,20	—	3,8	0,56	0,43	0,11	0,37	afwezig	veel	—	+	enkele vervloeiende
200	2,58-3,06	—	3,1	0,40	0,07	0,01	0	afwezig	enkele			tamelijk veel moireebacteriën
200	3,53-3,62	—	—	1,29	0,25	0	—	veel	geen			veel moireebacteriën
200	3,77-3,80	—	4,1	0,64	0,15	0,40	0,69	veel	zeer veel	+++	++	

pH.		Blokmonster.			Blokmonster.		Melkzuur- bacteriën.	Boter- zuur- bacteriën.	Clostr. tyro- buty- ricum.	Clostr. sac- charo- buty- ricum.	Andere micro-organismen.
Ge- mid- deld.	Uiteen- lopend van:	Bepaald in Wageningen.	% melkzuur.	% azijnzuur.	% boterzuur.	% boterzuur bepaald in Wageningen.					
3,64	3,58-3,70	3,7	1,07	0,48	0,25	0,32	massa	zeer veel			
3,26	3,02-3,59	3,4	1,28	0,33	0	0	zeer veel	geen	++	-	rottingsbacteriën
3,78	3,72-3,81	4,3	1,84	0,53	0,13	0,26	massa	geen			enkele vervl., B. mycoïdes
2,71	2,71-2,97	—	0,63	0,15	0,01	—	afwezig	weinig			
2,81	2,77-2,91	3,2	0,62	0,06	0,06	0,01	afwezig	geen			rottingsbacteriën
2,94	2,78-3,06	—	0,84	0,10	0,005	—	afwezig	geen		+	enkele moiree, enkele vervl.
3,37	3,32-3,38	3,5	1,12	0,38	0,06	0,06	veel	tam. veel			
3,06	2,92-3,23	3,5	0,83	0,16	0,04	0,12	afwezig	enkele			
3,22	3,10-3,22	3,6	1,56	0,15	0,22	0,44	zeer veel	tam. veel		+	enkele moireebacteriën
3,38	3,21-3,39	3,5	0,92	0,24	spoor	0,05	zeer veel	weinig		+	
3,81	3,81-3,81	4,1	0,25	0,39	0,29	0,58	massa	zeer veel			enkele vervloeiende
3,32	3,28-3,41	3,8	0,73	0,25	0,16	0,27	zeer veel	veel		+	rottingsbacteriën
3,27	3,10-3,27	3,6	1,35	0,21	0,40	0,48	afwezig	veel		+	rottingsbacteriën
3,74	3,55-3,84	3,7	2,01	0,76	0,06	0,16	massa	weinig		++	rottingsbacteriën
1,67	1,67-1,70	3,0	1,19	0,25	0,02	0,07	afwezig	geen		++	rottingsbacteriën
4,05	3,91-4,19	4,1	0,77	0,19	0,71	0,84	veel	zeer veel		++	
3,63	3,35-3,76	4,1	0,81	0,39	0,51	0,64	afwezig	zeer veel		++	
4,08	4,04-4,19	4,5	1,11	0,63	0,34	0,81	zeer veel	tam. veel		++	rottingsbacteriën
2,89	2,89-2,95	3,5	0,46	0,25	0,10	0,14	afwezig	enkele		++	
3,02	3,01-3,09	—	0,64	0,18	0,04	—	afwezig	weinig		+	rottingsbacteriën
3,61	3,61-3,72	—	1,43	0,37	0,09	—	veel	veel			
3,78	3,76-4,03	—	1,25	0,16	0,32	—	zeer veel	zeer veel		+	zeer veel gist
3,72	3,57-3,82	3,8	0,76	0,57	0,20	0,32	massa	zeer veel		+	enkele moireebacteriën
3,46	3,45-3,53	—	0,72	0,26	0,13	—	tam. veel	veel			veel rottingsbacteriën
3,45	3,44-3,48	3,4	0,52	0,30	0,30	0,38	veel	veel			
3,62	3,52-3,73	3,6	1,10	0,27	0,08	0,07	zeer veel	geen		+++	moireebacteriën, enkele vervl.
3,96	3,88-4,01	3,9	1,26	0,45	0,15	0,29	veel	tam. veel		++	
3,7	—	3,8	2,17	0,35	0	0	veel	veel		+	veel moireebacteriën
										+++	veel kaamgist

LABEL 17.

Num- mer van het mon- ster.	Provincie van herkomst.	Geënsileerd materiaal.	Gebruikt zuur.	Kg suiker per 100 kg voeder.	Datum van ensileering.	Datum van onderzoek.	Geur van het monste- r.
1	Drente	gras	zoutzuur	—	29/30-8-'33	9-11-'33	boterzuur
2	N.-Holland	gras	Defu	0,2	29/30-5-'33	14-11-'33	boterzuur, iets rot, ester
3	N.-Holland	gras	Defu	—	8, 9, 10-6-'33	15-11-'33	vruchten
5	Z.-Holland	gerst	A. I. V.	—	25-9-'33	20-11-'33	boterzuur, iets rot
6	Zeeland	lucerne	A. I. V.	—	31-8-'33	23-11-'33	boterzuur, zoet
49	Zeeland	lucerne	A. I. V.	—	31-8-'33	18-1-'34	rot, boterzuur
7a	Z.-Holland	gras	A. I. V.	—	16-8-'33	23-11-'33	zoet, esterachtig
7b	Z.-Holland	gras	Defu	0,2	1, 2-6-'33	2-12-'33	azijnzuur
7c	Z.-Holland	gras	Defu	0,25	6, 7-6-'33	2-12-'33	boterzuur
11	N.-Holland	gras	Defu	0,2	28/31-8-'33	4-12-'33	zoet, boterzuur
12	N.-Holland	gras	Defu	0,2	?	4-12-'33	zoet, azijnzuur
13	Groningen	gras	A. I. V.	—	24, 25, 26-8-'33	7-12-'33	zoet, azijn, aceta-
14	Groningen	gras en riet	A. I. V.	—	12, 13, 14-6-'33	9-12-'33	boterzuur
16	Overijssel	haver en wikklen	A. I. V.	—	12, 13, 14-6-'33	27-12-'33	frisch
18	Gelderland	duivenboonen	A. I. V.	—	19, 20, 21-10-'33	20-12-'33	knollen
22	Gelderland	stoppelknollen	Defu	0,2	19-9-'33	22-12-'33	boterzuur
25	Z.-Holland	gerst	Defu	0,2	7, 8-6-'33	22-12-'33	ester, scherp
26	Z.-Holland	lucerne, klaver,	Defu	—	27, 28-8-'33	29-12-'33	iets boterzuur
32	Z.-Holland	gras	Defu	0,2	27, 28-6-'33	29-12-'33	boterzuur en e
33	Overijssel	haver	A. I. V.	—	19-7-'33	3-1-'34	zoet, iets ester
34	N.-Brabant	roode klaver	Defu	—	14/17-6-'33	3-1-'34	iets boterzuur, e
35	N.-Holland	gras	Defu	0,2	27, 28-7-'33	4-1-'34	acetamide
37	Utrecht	gras	A. I. V.	—	8-6-'33	6-1-'34	zoet, iets azijn
38	Drente	klaver, gras	A. I. V.	—	16, 17-10-'33	11-1-'34	boterzuur
43	Drente	klaver, wikklen, enz.	Defu	0,2	6, 7-6-'33	12-1-'34	iets boterzuur
44	Drente	gras	A. I. V.	—	7, 8-6-'33	15-1-'34	zoet
45	Gelderland	gras, klaver	Defu	0,2	26, 27-5-'33	16-1-'34	zoet
46	Groningen	gras	Defu	—	21-6-'33	16-1-'34	frisch, iets azijn
47	Z.-Holland	haver	zoutzuur	0,2	9-6-'33	18-1-'34	zoet, iets azijn
50	Groningen	gras	Defu	—	15-11-'33	22-1-'34	knollen
53	Drente	stoppelknollen	Defu	0,2	16, 17-6-'33	26-1-'34	boterzuur, azijnzuur
55	Z.-Holland	gras	zoutzuur	—	28-8-'33	27-1-'34	zoet
56	Drente	gras	A. I. V.	0,25	11-10-'33	5-2-'34	goed, iets azijn
58	Z.-Holland	stoppelgewas	Defu	—	1, 2-9-'33	7-2-'34	boterzuur, azijnzuur,
59	Overijssel	gras	Defu	—	30-6-'33	8-2-'34	ester
60	Groningen	gras	A. I. V.	—	2, 3-6-'33	8-2-'34	goed
61	Gelderland	haver	Defu	—	9-10-'33	9-2-'34	goed
62	Z.-Holland	wikklen	A. I. V.	0,2	13, 14-9-'33	9-2-'34	zoet
63	Drente	stoppelklaver,	Defu	—	25-8-'33	9-2-'34	boterzuur, azijnzuur
64	N.-Brabant	gras	A. I. V.	—			

TABEL 18.

Silo.	Diepte van het monster.	Datum van onderzoek.	Plaats van het monster.	Gour.	pH.	
					Gemiddeld.	Uiteenloopen van.
P. Z. B. I. Van 22-9-'33 met gras en A. I. V.-zuur.	10 cm	29-11-'33	centrum	iets rot, azijn	—	4,66-7
	83 cm	7-12-'33	centrum	scherp	3,50	3,49-3
	130 cm	12-12-'33	centrum	scherp	3,30	3,29-3
P. Z. B. II. Van 28, 29-9-'33 met gras en A. I. V.-zuur.	10 cm	24-11-'33	centrum	iets rot, boterzuur	3,98	3,91-5.
	20-40 cm	1-12-'33	centrum	zoete laag	3,46	—
				azijnachtige laag	3,77	—
	55-75 cm	12-12-'33	centrum	zoet	3,00	2,92-3.
	70-85 cm	21-12-'33	centrum	zoet, iets azijn en boterzuur	3,05	2,98-3.
	90-130 cm	28-12-'33	centrum	goed	3,43	—
	90-130 cm	28-12-'33	rand	goed	3,36	—
	105-115 cm	3-1-'34	centrum	goed, acetamide	3,33	3,29-3.
122-130 cm	10-1-'34	centrum	appel, acetamide	3,10	3,07-3.	
122-134 cm	10-1-'34	rand	appel, azijn, acetamide	3,25	3,14-3.	
P. Z. B. III. Van 5, 6-10-'33 met gras en A.I.V.-zuur.	20-34 cm	22-12-'33	centrum	appel	3,10	3,01-3.
	40-52 cm	28-12-'33	centrum	goed, iets azijn	3,55	3,47-3.
	40-52 cm	28-12-'33	rand	boterzuur, azijnzuur, rot	3,57	2,65-4.
	80-88 cm	8-1-'34	centrum	appel, azijn	3,20	3,20-3.
	80-89 cm	8-1-'34	rand	boterzuur, azijnzuur	4,51	3,84-5.
	117-129 cm	20-1-'34	centrum	goed, acetamide	3,20	3,11-3.
	117-128 cm	20-1-'34	rand	iets azijn- en boterzuur	3,76	3,57-3.
135-150 cm	29-1-'34	centrum	appel, acetamide	2,84	2,70-3.	
P.Z.B. IV. Van 22, 23-5-'33 met gras, suiker en zoutzuur	37-50 cm	13-2-'34	centrum	azijnzuur, boterzuur	4,00	3,87-4.
	37-49 cm	13-2-'34	rand	azijn	3,70	3,61-3.
	67-79 cm	22-2-'34	centrum	azijn	3,61	3,54-3.
	67-81 cm	22-2-'34	rand	azijn	3,47	3,40-3.
	110-130 cm	13-3-'34	centrum	azijn	3,45	3,30-3.
	110-130 cm	13-3-'34	rand	azijn	3,35	3,29-3.

— een- pend an:	% melk- zuur.	% azijn- zuur.	% boter- zuur.	Melkzuur- bacteriën.	Boterzuur- bacteriën.	Clostr. tyro- buty- ricum.	Clostr. saccharo- buty- ricum.	Andere micro-organismen.
—4,00	0,38	0,21	0,14	zeer veel	zeer veel	++	++	enkele B. mycoides
—3,50	0,61	0,21	0,04	massa	massa	+++	+	massa moireebacteriën
—4,70	0,69	0,41	0,36	massa	zeer veel	++	++	enkele vervloeiende
—3,50	0,63	0,16	spoor	zeer veel	zeer veel	—	+++	veel moireebact., veel gist
—4,07	1,05	0,35	0,04	massa	veel	+	+++	enkele B. mycoides
—	0,98	0,26	spoor	zeer veel	veel	—	+++	enkele moireebacteriën
—	1,17	0,34	0,05	massa	tamelijk veel	(+)	+++	
—	1,13	0,35	0,06	massa	geen			
—	0,47	0,11	0	massa	weinig	+	+	enkele vervloeiende, enkele gist
—	0,35	0,35	0,21	massa	weinig	+	—	
—3,45	0,59	0,11	0	zeer veel	geen			zeer veel gist, enkele vervl.
—3,62	0,69	0,18	0	massa	weinig			enkele gist, enkele vervloeiende
—3,68	0,46	0,09	0,05	zeer veel	enkele			massa gist

TABEL

	% melk- zuur.	% azijn- zuur.	% boter- zuur.	Melkzuur- bacteriën.	Boterzuur- bacteriën.	Clostr. tyro- buty- ricum.	Clostr. saccharo- buty- ricum.	Ano	Be
33	—	0,28	0,33	massa	zeer veel			bact.	Van 11, 1 gras en
32	0,86	0,17	0	weinig	veel			enke	
34	0,82	0,17	0	afwezig	veel			enke	
35	0,71	0,26	0,09	zeer veel	tamelijk veel			bact.	
36	0,62	0,16	0,11	veel	geen				Van 17-18 en A. I
37	0,48	0,11	0,31	zeer veel	geen			wein	
38	0,47	0,08	0,01	afwezig	tamelijk veel				
39	0,40	0,08	0,04	massa	zeer veel				
40	0,68	0,14	0	veel	weinig	—	+		
41	0,68	0,17	0	zeer veel	geen		+		
42	0,94	0,16	0,02	massa	geen				
43	0,21	0,06	0,01	tamelijk veel	geen			tame	
44	0,53	0,12	0	massa	enkele			enke	
45	0,15	0,08	0,02	weinig	tamelijk veel			veel	
46	0,22	0,14	0,03	massa	zeer veel			enke	
47	—	0,15	0,27	massa	zeer veel				
48	0,54	0,13	0,04	zeer veel	veel	—	+++		
49	0,53	0,26	0,49	massa	zeer veel	+++	+		
50	0,57	0,13	0,01	tamelijk veel	tamelijk veel	—	+	tame	
51	0,82	0,24	0,05	massa	weinig	+	—		
52	0,42	0,05	0,02	veel	weinig			wein	
53	1,18	0,16	0,49	zeer veel	zeer veel	++	+++		
54	0,93	0,09	0,20	massa	veel	++	+	enke	
55	2,25	0,40	0,11	weinig	tamelijk veel				
56	2,02	0,23	0,09	tamelijk veel	veel				
57	2,00	0,30	0,02	tamelijk veel	geen				
58	2,10	0,26	0,02	tamelijk veel	geen			B. n	

3.

onsilo.	Diepte van het monster.	Datum van onderzoek.	Plaats van het monster.	Geur.	pH.	
					Gemiddeld.	Uitloop v
I.	50 cm	26-3-'34	centrum	appel, rot, boterzuur	3,48	3,0
-10-'33 met A.I.V.-zuur.	96 cm	6-4-'34	centrum	iets azijn	3,43	3,4
	96 cm	6-4-'34	rand	boterzuur	4,48	3,8
	125 cm	13-4-'34	centrum	appel	3,44	3,3
	125 cm	13-4-'34	rand	boterzuur, azijnzuur	4,02	3,9
	140 cm	20-4-'34	centrum	appel	3,6	
	140 cm	20-4-'34	rand	goed	3,9	
	bodem	27-4-'34	centrum	goed	3,65	
II.	60 cm	27-4-'34	centrum	goed	3,3	
-33 met gras V.-zuur.	60 cm	27-4-'34	rand	boterzuur en azijnzuur	4,5	
	130 cm	8-5-'34	centrum	appel	3,33	3,3
	130 cm	8-5-'34	rand	goed	3,54	3,5
	bodem	12-5-'34	—	goed	3,43	3,3

Bij de bacteriologische analyse van mineraalzure silages zijn wij herhaaldelijk gestuit op een gistende bacterie, welke dikwijls in groote aantallen in deze silages voorkomt. Het is een gelatine-vervloeiende bacterie die aerob op gelatine zeer karakteristieke koloniën vormt van moiree-structuur en anaerob in suikerhoudende voedingsvloeistoffen gisting veroorzaakt. Bij het determineeren van deze moiree-bacterie volgens BERGEY'S MANUEL vonden wij veel overeenkomst met *Bacillus pabuli*, welke door SCHIEBLICH veel in geconserveerd voeder werd aangetroffen. Door de moireestructuur der koloniën lijkt de bacterie ook veel op de door DEN DOOREN DE JONG beschreven ¹⁾ *Bac. undulatus*, doch deze soort is obligaat aerob. Bovendien vervloeit *B. undulatus* gelatine zeer snel, terwijl onze moiree-bacterie slechts zeer langzaam vervloeit.

Er werd geen enkele aanwijzing gevonden dat deze bacterie eenigen invloed op het ensileringsproces zou hebben. Echter kan de gisting welke deze bacterie in glucosevleeschbouillon geeft aanleiding geven tot de veronderstelling dat men met boterzuurbacteriën te doen heeft. Door van de gegiste buizen een cultuur aan te leggen op glucosevleeschgelatine kan verwarring voorkomen worden.

XII. Ensilerering zonder gevaar voor de kaas.

De conclusie waartoe het onderzoek geleid heeft luidt dus dat slechts dan een silo gevaarlijk is voor de kaasbereiding als er een lactaatvergistende boterzuurgisting in heeft plaats gehad. Daar de lactaatvergistende boterzuurbacterie de eenige boterzuurbacterie is, welke groeit in een milieu, waar lactaat de eenige koolstofvoeding is, hebben wij dus in de melkzuurgisting een bron van gevaar te zien bij de tegenwoordige systemen van conserveering omdat deze het lactaat levert dat voor de ontwikkeling der lactaatvergisters noodig is.

Op grond hiervan lijkt het dus gewenscht dat de melkzuurgisting verhinderd wordt. Men kan dit bereiken door:

- 1°. bij de bereiding de silage zoo heet te laten worden dat de melkzuurbacteriën gedood worden (vgl. Hollandsche kuil en electroënsilage);
- 2°. bij de bereiding andere zuren dan melkzuur te gebruiken.

De eerste methode heeft het voordeel dat men een voeder krijgt dat door het vee over het algemeen zeer graag gegeten wordt. Een nadeel is echter bij de Hollandsche wijze van inkuiling het groote verlies aan voedende bestanddeelen, want de warmte welke voor het bereiken van de hooge temperatuur noodig is wordt geleverd door een verbranding van organische stof. Ook heeft

¹⁾ *Zentralbl. f. Bakt.* I, Orig., 122 (1931), 277.

de hooge temperatuur een nadeeligen invloed op de verteerbaarheid der eiwitten, gelijk dit ook bekend is bij het broeien van hooi, waar bij 70° C. wel een teruggang van 60 % van het verteerbaar eiwit is geconstateerd. ¹⁾ Verder is het niet altijd zeker dat deze bereiding gelukt en men overal in het geconserveerde voeder de melkzuurbacteriën doodt. Bijna altijd zal voeder, volgens deze methode bereid, gedeeltelijk in rotting verkeeren en daardoor een onaangename geur vertoonen.

De tweede methode is de mineraalzuurmethode. Oorspronkelijk bedoeld om door middel van een hoogen zuurgraad de verliezen aan organische stof te verhinderen en vooral het eiwit in het voeder op betere wijze te conserveren, blijkt uit ons onderzoek nu ook dat de conserveering door andere zuren dan door in het voeder zelf ontstaan melkzuur het gevaar van de ontwikkeling van lactaatvergiftende boterzuurbacteriën bedwingt.

Evenwel heeft ons onderzoek ook geleerd dat hiervoor **de methode, zooals deze door Virtanen aanbevolen wordt, niet betrouwbaar is.** In de eerste plaats wordt voor pH-waarden van 3,5 tot 4,0 de melkzuurgisting niet onderdrukt en ten tweede is door de wijze van bespuiting met zuur op lagen ingebracht voeder in het binnenste der lagen gisting mogelijk. Het gevolg is, dat men er **bij normaal gemaakte mineraalzuren silages rekening mede moet houden, dat silages van een pH boven 3,5 voor de kaasbereiding gevaarlijk kunnen zijn.** Bij niet al te slordig gemaakte silages van een pH beneden 3,5 is geen gevaar voor de kaas te duchten doch stuit men op een ander bezwaar. Bij onze kaasproeven is het vee, dat hiervoor de melk leverde, langen tijd gevoederd met mineraalzuren silage van een pH beneden 3,5 en bleek alras dat de koeien het niet met smaak aten, zoodat over het algemeen slechts kleine hoeveelheden gevoederd konden worden. Bovendien scheen het voeder een ongunstigen invloed uit te oefenen op den gezondheidstoestand van het vee. Hierover zijn door de physiologische afdeling van het proefstation nadere onderzoekingen gedaan, welke ook in deze verslagen gepubliceerd worden. Men kan door toevoeging van basische stoffen (b.v. krijt) bij de voeding de physiologische zuurwerking wel verminderen, doch de eetlust wordt er niet mede verbeterd.

Het ziet er dus thans naar uit of bij de mineraalzuren ensileering bij een pH boven 3,5 gevaar voor de kaas is te verwachten en bij een pH beneden 3,5 gevaar voor het vee.

De oorzaak van het gevaar voor kaas vonden wij in de gelaagde structuur van den silo. Als wij deze zouden kunnen vermijden zou de betrouwbaarheid toenemen. Dit konden wij aantoonen met de proefensileeringen in glazen

¹⁾ E. TRUNINGER, Zur Frage der Selbsterhitzung und Selbstentzündung des Dürrfutters; *Landw. Jahrb. d. Schweiz* 43 (1929), 278.

potten, beschreven in hoofdstuk V, waar in voedermassa's, welke homogeen in zuurgraad waren, geen boterzuurgisting optrad. Bij de practijksilo's van tabel 17 vinden we hiervan ook enkele voorbeelden. Een dezer is het monster N°. 34. Dit had een pH van 3,5, zoodat er in dezen silo nog boterzuurgisting verwacht kon worden. Toch werd geen boterzuur aangetoond. De bij het monster verstrekte opgave vermeldde nu dat deze silo wegens den hoogen grondwaterstand niet gedraineerd was, zoodat alle vocht behouden bleef en spoediger een homogene zuurgraad kon ontstaan dan in een gedraineerden silo. Een tweede voorbeeld is het monster N°. 63, waarin bij een pH van 3,58 ook geen boterzuur werd gevonden. Bij de bereiding van dezen silo is door een groot aantal personen het voeder in elkaar getrapt, ook al een der omstandigheden welke de vorming van niet-zure laagjes en dus de gisting verhinderen. Van hetzelfde bedrijf is het monster 43 afkomstig. Dit bevat wel boterzuur doch we mogen wel vaststellen dat ook in dezen silo het boterzuurgehalte (0,17 %) voor een dergelijk hooge pH (4,46) wel zeer laag is.

Ook hebben we reeds de aandacht gevestigd op de monsters 50, 84 en 107 van 3 silo's uit hetzelfde bedrijf, waar tijdens de vulling ononderbroken gesproeid is.

Zowel uit de laboratoriumproeven als uit het onderzoek der practijk-monsters is dus komen vast te staan dat een silo betrouwbaarder is naarmate hij van den aanvang af meer homogeen was. Men kan deze homogeniteit bereiken door zoo nat mogelijk te ensileeren en de massa zoo intensief als maar mogelijk is in elkaar te persen. Daarom zal ook een onderbreking van de vulling nadeelig zijn omdat hierdoor gedurende langeren tijd de persing niet uitgeoefend wordt. Een ideale ensileering zou men eigenlijk verkrijgen door zoo veel water bij de vulling te gebruiken dat al het voeder in vloeistof ondergedompeld is, waarbij men dus ook een silo zonder drainage moet gebruiken.

Het is misschien zelfs niet onmogelijk dat bij ensileeren met veel water de toevoeging van minerale zuren achterwege kan blijven. Bezien wij daartoe thans de kansen, welke een dergelijk systeem van ensileering zou hebben in verband met de eischen die men aan een absoluut volwaardige ensileeringsmethode moet stellen. Deze eischen zijn:

- 1°. *Er mag slechts weinig verlies aan droge-stof-bestanddeelen zijn.*
- 2°. *Het voedsel moet in goed verteerbaren vorm blijven.*
- 3°. *Het vee moet het geconserveerde voeder graag eten.*
- 4°. *De kaasbereiding mag er geen nadeel van ondervinden.*
- 5°. *De methode moet in de practijk gemakkelijk uitvoerbaar zijn.*

Ad 1°. De verliezen aan droge-stof-bestanddeelen bij een Hollandschen kuil worden veroorzaakt door oxydaties als de kuil pas gemaakt is en er nog

lucht tusschen de plantendeelen aanwezig is, benevens door kantverliezen als gevolg van minder goede afsluiting van de lucht. Ensileeren we nu in een gesloten silo met veel water, dan zullen er geen kantverliezen optreden omdat de voedermassa ook aan de kanten goed afgesloten is en ook weinig oxydatieverliezen omdat de lucht door het water uit de plantenmassa verdreven wordt. Doordat een op deze wijze gemaakte silage geen verwarming ondergaat zal er een melkzuurgisting in plaats hebben. Indien we er nu in slagen, desnoods met behulp van een suikertoevoeging, in een dergelijken silo zooveel zuur te doen ontstaan dat de pH beneden 4 komt, wordt ook de aantasting der eiwitten door rottingsbacteriën beperkt.

Ad 2°. Bij ensileering met watertoevoeging stijgt de temperatuur niet, waardoor de verteerbaarheid der eiwitstoffen niet verandert.

Ad 3°. Daar bij een dergelijke ensileering slechts organisch zuur ontstaat, hetgeen verteerbaar is, zal een schadelijke werking van het zuur op den gezondheidstoestand uitblijven. Een bezwaar is misschien het vele sap. Dit bevat een hoog gehalte aan voedzame bestanddeelen en zou dus niet weggegoorpen mogen worden doch apart op eenige wijze aan het vee verstrekt moeten worden.

Ad 4°. Uit de potproeven, beschreven in hoofdstuk V is reeds gebleken dat men in geheel ondergedompeld gras bij een pH beneden 4, ja zelfs nog iets boven 4, geen boterzuurgisting behoeft te verwachten. Indien dus de melkzuurbacteriën in een dergelijke silage in staat zijn de pH snel tot ongeveer 4 te brengen behoeven we geen boterzuurgistingen te vreezen en is dus een silage verkregen met de natuurlijke, voor het vee niet schadelijke melkzuurgisting, waarbij de gevreesde lactaatvergisting is vermeden. Doordat het zuur niet van buiten af ingebracht wordt maar in de massa zelf ontstaat zullen ongelijkmatigheden in den zuurgraad niet verwacht kunnen worden.

Uit vorige proeven is reeds duidelijk geworden dat melkzuurbacteriën nog in staat zijn te groeien bij pH waarden beneden 4. Het is theoretisch dus mogelijk dat door deze bacteriën de pH in een suikerhoudenden voedingsbodem tot beneden 4 verlaagd wordt. Wij hebben verschillende stammen van melkzuurbacteriën uit silages in reïncultuur gebracht en gekweekt in graswater (1 kg gras en 1 liter water in een stoempot gedurende een uur verhit en daarna gefiltreerd). Hierbij traden groote verschillen in zuurvormend vermogen aan den dag. Bezien uit het oogpunt van zuurvorming vonden wij twee groepen van melkzuurbacteriën. Bacteriën uit de eene groep verzuurden het gebruikte graswater tot een pH van 3,4 à 3,6, de bacteriën uit de andere groep brachten het graswater (dat zelf een pH van 5,6 à 5,7 had) slechts op een pH van 4,5 à 5,0.

Er zijn ook een aantal proeven genomen waarbij gras in glazen potten geënsileerd werd met toevoeging van alleen water. Deze proeven zijn onder ongunstige omstandigheden gedaan, d.w.z. het resultaat werd aan het toeval overgelaten omdat er geen maatregelen werden genomen (b.v. enting met krachtig zurende melkzuurbacteriën of toevoeging van suiker) om een extra hoog zuurgraad te bereiken. Men krijgt dan in het begin ontwikkeling van allerlei andere bacteriën (o.a. coli), waardoor koolhydraat onttrokken wordt aan de vergisting tot melkzuur door de melkzuurbacteriën. Toch is bij deze proeven een flinke hoge zuurgraad ontstaan.

Op 14 November 1933 werden de potten gevuld met geknipt gras en water en geplaatst bij 10°, 20° en 28° C. Per 600 gram gras werd 150 gram water gebruikt. In tabel 22 vindt men de analyses van enkele dezer proefensileeringen.

TABEL 22.

Glazen pot, gemaakt:	Bewaard bij:	Onderzocht na:	Bovenlaag.				Onderlaag.			
			pH.	Melk- zuur.	Azijn- zuur.	Boter- zuur.	pH.	Melk- zuur.	Azijn- zuur.	Boter- zuur.
B	10° C	106 dagen	4,00	1,65	0,29	0	3,95	1,37	0,24	0
N	20° C	76 „	4,66	1,04	0,67	0,05	4,15	1,51	0,42	0
L	20° C	115 „	4,33	1,20	0,77	0	4,12	1,47	0,58	0
K	28° C	15 „	4,78	0,94	0,29	0,20	4,07	1,07	0,22	0

Beschouwt men alleen de onderlaag dan blijkt dus bij alle temperaturen een flinke zuurgraad ontstaan te zijn, veroorzaakt door het bij de melkzuurgisting gevormde melkzuur. Boterzuur is in de onderlagen der potten van tabel 22 niet ontstaan, zooals ook vroeger werd waargenomen in potten, waarin het gras met behulp van anorganisch zuur op een pH 4 of zelfs iets daarboven gebracht werd.

De bovenlagen dezer potten geven een minder gunstig resultaat te zien. De afsluiting van den inhoud der potten met behulp van paraffineolie is niet volledig zoodat tot de bovenlaag lucht kan toetreden. Deze maakt groei van aerobe micro-organismen mogelijk en wel v.n.l. van kaamgisten. Deze veroorzaken een verbranding of een neutralisatie van het melkzuur, dus een neutralisatie, welke door diffusie langzaam in de bovenlaag van het gras voortschrijdt. Hiervan maken rottingsbacteriën en boterzuurbacteriën gebruik om te groeien. De hierbij optredende ammoniakvorming bevordert het proces nog sterker. Hoe hooger de temperatuur is des te sneller zal het bederf zich vol-

trekken. Bij 28° C. vonden wij reeds na 51 dagen den geheelen inhoud in rotting (zie tabel 23).

TABEL 23.

Glazen pot, gemerkt:	Bewaard bij:	Onderzocht na:	pH van het sap. ¹⁾	Bovenlaag.			Onderlaag.		
				pH.	% melk- zuur.	% boter- zuur.	pH.	% melk- zuur.	% boter- zuur.
F	28°	7 dagen	6,19	4,34	1,18	sporen	4,03	1,35	0
K	28°	15 „	5,40	4,78	0,94	0,20	4,07	1,07	0
H	28°	51 „	5,49	5,68	0,09	1,66	5,87	0,12	1,62
E	28°	79 „	5,54	5,65	—	—	5,93	—	—

Men ziet dus duidelijk het indringen der neutralisatie van boven af en de gevolgen daarvan. Als men tabel 23 leest, dan verwondert men zich niet meer over de slechte kwaliteit van kuilgras, bereid volgens de Hollandsche methode en bewaard in niet zorgvuldig van de lucht afgesloten hoopen. De warmte welke in het begin in zoo'n hoop ontstaat blijft er lang in bewaard zoodat soms na 5 maanden de temperatuur nog boven 25° C. kan zijn, hetgeen de rotting sterk bevordert.

Zelfs al bereikt de zuurgraad in den aanvang een hooge waarde dan zal toch op den duur daar, waar een langzame toetreding van lucht kan plaats hebben, de pH stijgen en zullen zich rottingsverschijnselen openbaren benevens een lactaatvergisting door boterzuurbacteriën. Deze lactaatvergisting komt zeer duidelijk tot uiting in tabel 23, waar men ziet dat in verloop van tijd het melkzuur door boterzuur wordt vervangen. In overeenstemming hiermede waren de uit pot H geïsoleerde boterzuurbacteriën dan ook alle lactaatvergisters.

Hoe lager de temperatuur is des te langzamer verloopt de neutralisatie en des te minder zal men van rotting en boterzuurgisting merken, doch in praktische omstandigheden zal bij ensileering zonder mineraalzuur altijd wel een gedeelte van de silage aan rotting onderhevig zijn. Toch is dit niet een nadeel dat speciaal eigen is aan de thans besproken methode van ensileering. Ook bij de mineraalzuurmethode is de bovenlaag nooit betrouwbaar, zelfs al wordt bij het vullen van een silo de bovenste laag met meer zuur bespoten, zooals men in de praktijk gewoonlijk doet. Bij onze potproeven hebben wij tenminste in de bovenlagen der potten, gevuld met gras en mineraalzuur, ook altijd eenige rotting waargenomen en bij groote silo's bleek bij het openen de pH van de bovenste laag meestal zeer ongunstig te zijn. Zoo werd b.v. in de allerbovenste lagen gevonden bij de reeds eerder besproken mineraalzure silo's:

¹⁾ Bedoeld is het boven het gras staande sap.

TABEL 24.

Silo.	pH.
P. Z. B. I	4,66—7,85
P. Z. B. II	3,91—5,40
Betonsilo II	4,41—5,14

Bij ensileeren met mincrale zuren in gegraven kuilen zal men dit verschijnsel niet alleen aan het bovenoppervlak doch ook aan de zijanten waarnemen, waar door opzuigen of uitloogen zuur uit het voedermateriaal in den grond verdwijnt en de randzuurgraad dus minder wordt. Dit kon bij enkele praktijkgevallen ook geconstateerd worden.

Bij de ensileering met alleen water zal de rotting van de bovenlaag beter vermeden kunnen worden naarmate de afsluiting van de lucht beter is en ook naarmate het voeder sneller geheel onder het vloeistofniveau komt. Zoolang n.l. het gras nog niet in de vloeistof „verdronken” is treden er oxydaties op, welke oorzaak zijn dat de door de melkzuurbacteriën bereikte eindzuurgraad niet zoo hoog is als bij snelle verdrinking.

Zooals boven reeds opgemerkt werd zal bij lage temperatuur het resultaat van deze ensileeringsmethode beter zijn. Dan verloopt de melkzuurgisting wel langzamer doch rotting en boterzuurgisting treden dan zelfs niet in de bovenste lagen op, gelijk tabel 25 nader bevestigt.

TABEL 25.

Glazen pot gemerkt:	Bewaard bij	Onderzocht na	Monster genomen van	pH.	% melkzuur.	% azijnzuur.	% boterzuur.
C	10° C	21 dagen	bovenstaand sap	4,17	—	—	—
			bovenlaag	4,30	0,48	0,12	0
			onderlaag	4,26	0,28	0,12	0
D	10° C	56 dagen	bovenstaand sap	3,99	—	—	—
			bovenlaag	3,96	1,13	0,19	0
			onderlaag	4,06	1,06	0,18	0
B	10° C	106 dagen	bovenstaand sap	4,35	—	—	—
			bovenlaag	4,00	1,65	0,29	0
			onderlaag	3,95	1,37	0,24	0

Uit theoretische overwegingen en onze laboratoriumproeven schijnt dus wel te volgen dat ook bij behoud van de melkzuurgisting het boterzuurbacteriëngevaar kan worden uitgeschakeld. De overwegingen, welke hiertoe leiden, waren:

1. door een flinke melkzuurgisting is het mogelijk om in voederstoffen snel een pH van 4 of lager te bereiken, bij welke pH geen boterzuurgistingen kunnen optreden;
2. door toepassing van veel water bij het vullen van den silo wordt in de voedermassa de vereischte homogeniteit verkregen zonder welke de boterzuurgisting niet uitblijft.

Ad 5°. Voor wat de uitvoerbaarheid der verschillende conserveeringsmethodes betreft mogen wij niet verhehlen dat de mineraalzuurmethode verschillende onaangenaamheden heeft. Het werken met sterke anorganische zuren door leeken bergt gevaren in zich. Zou het ook uit practisch oogpunt mogelijk blijken met alleen toevoeging van water en eventueel suiker te ensileeren dan zou dit ongetwijfeld van voordeel zijn.

Wij stellen ons voor over dit principe van conserveering nog verdere proeven te doen, doch hebben gemeend reeds thans dit principe te moeten bespreken daar het zich logisch ontwikkeld heeft uit onze onderzoekingen en proeven over de thans bekend zijnde conserveeringsmethodes.

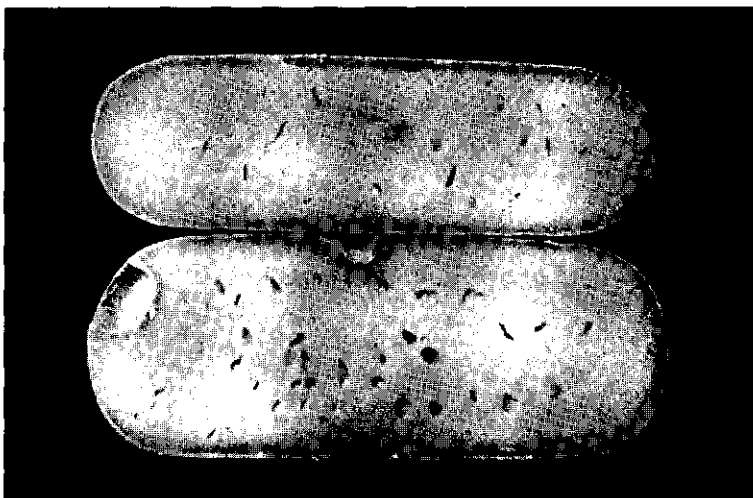


Fig. 1. Kazen, gemaakt op 14 December 1933.

Bovenste : Silomelkkaas. Silo P. Z. B. 1.

Onderste : Hooimelkkaas.

Geplaatst bij 18° C. op 30 December 1933.

Opengesneden op 30 Januari 1934.

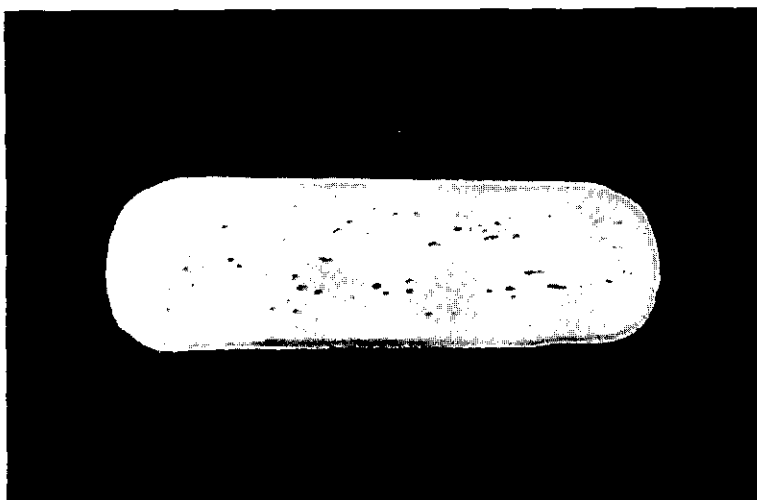


Fig. 2. Kaas, gemaakt op 16 Mei 1934.

Silomelkkaas. Betonsilo II.

Geplaatst bij 18° C. op 29 Mei 1934.

Opengesneden 6 Juli 1934.

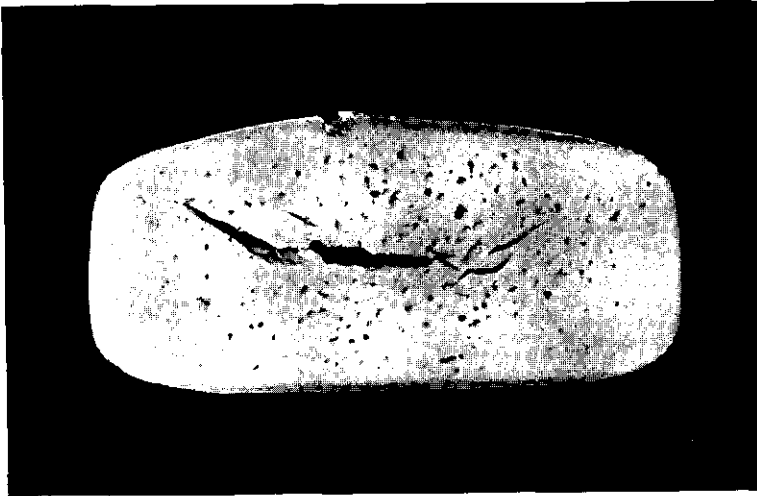


Fig. 3. Practijkaas, gemaakt op 21 Maart 1934.

Silomelkkaas. Zie tabel 17, nos. 93 en 94.

Geplaatst bij 18° C. op 6 April 1934.

Opengesneden 26 April 1934.

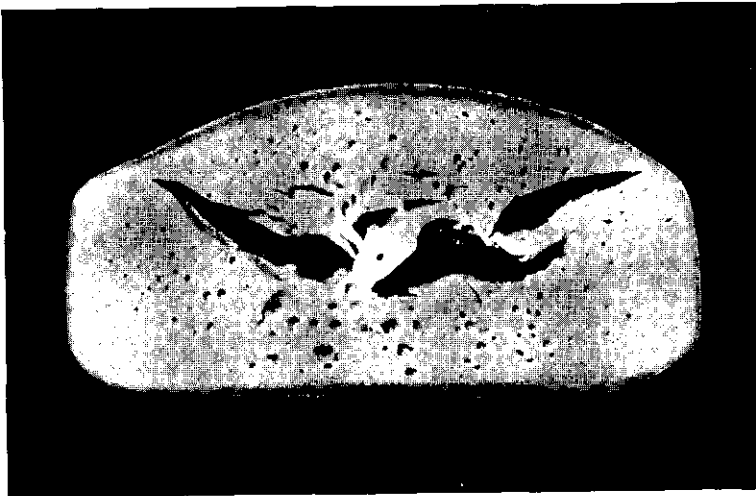


Fig. 4. Practijkaas, gemaakt op 25 Maart 1934.

Silomelkkaas. Zie tabel 17, nos. 93 en 94.

Geplaatst bij 18° C. op 6 April 1934.

Opengesneden 15 Mei 1934.

KORT OVERZICHT.

1. In een vorige verhandeling is verslag gegeven van het bacteriologisch onderzoek van een aantal ensileeringen van groenvoeder met de mineraalzuur-methode. In de meeste van deze silages werden toen boterzuurbacteriën aangetroffen. Bij een kaasproef met melk van vee dat gevoederd werd met door zoutzuur- en suikertoevoeging geconserveerd gras van een gemiddelde pH van 3,7 vertoonden de bereide kazen het gebrek „laat-los” of „knijper”, hoewel in deze silage slechts betrekkelijk weinig boterzuurbacteriën aangetroffen werden.

In de stalperiode 1933—1934 werd kaas gemaakt terwijl aan de koeien grassilages van een pH beneden 3,5 gevoederd werden. Deze kaas bleef van goede kwaliteit, hoewel bij sommige van deze silages het aantal boterzuurbacteriën veel grooter was dan in het eerste geval.

Er werd een groot aantal silagemonsters uit de practijk onderzocht (tabel 17). Bijna alle bevatten meer of minder boterzuur, zelfs die met een pH beneden 3,5. In bijna alle silo's was dus boterzuurgisting opgetreden.

De volgende vragen deden zich nu voor:

1°. Hoe is het te verklaren dat zich gevallen voordoen van laat-los-gebrek in de kaas bij voeding van silage met betrekkelijk weinig boterzuurbacteriën, terwijl in andere gevallen bij aanwezigheid van veel boterzuurbacteriën in de silage de kaas geen gebrek vertoont?

2°. Op welke wijze is te verklaren dat een pH van 3,5 als grens verschijnt voor het al of niet gevaarlijk zijn van een silage voor de kaasbereiding?

3°. Hoe is het mogelijk dat in een dergelijk zure stof als mineraalzure silage boterzuurgistingen kunnen plaats hebben?

2. Boterzuurbacteriënsporen, welke met het versche voeder in den silo gebracht worden, kunnen levenskrachtig in de zure massa blijven doch deze sporen kunnen moeilijk verantwoordelijk gesteld worden voor een dergelijke infectie van de kaasmelk dat deze aanleiding zou geven tot het kaasgebrek „laat-los”. Er is blijkens de aanwezigheid van boterzuur inderdaad boterzuurgisting en dus vermeerdering van boterzuurbacteriën in een mineraalzure silo. Het leek mogelijk dat het pH-evenwicht in een silo zich langzaam zou instellen, waardoor de vloeistof in den silo langzamerhand minder zuur zou worden, zoodat zoowel boterzuur- als melkzuurgisting na verloop van tijd zouden kunnen beginnen. De optredende melkzuurgisting zou door de vorming van melkzuur de pH dan weer tot op zijn definitieve waarde kunnen verlagen. Evenwel bleek bij onze proeven dat het evenwicht tusschen gras en zuur zich snel instelt, zoodat na enkele dagen de pH zijn definitieve waarde bereikt.

3. Boterzuurbacteriën zijn gevoeliger voor zuur dan melkzuurbacteriën. Bij pH 4,2 groeide in glucosevleeschbouillon nog slechts een gering percentage van de onderzochte reïncultuurstammen. Bij proeven met ensileering van gras in glazen potten werd bij pH-waarden beneden 4,2 geen boterzuurgisting waargenomen. Wel blijven bij een pH boven 3,5 eenmaal aanwezige boterzuurbacteriënsporten in leven. Deze sterven pas af bij pH beneden 3,5 en wel langzamer naarmate de pH dichter bij 3,5 ligt.

De melkzuurbacteriën groeien in geënsileerd gras nog zeer goed bij pH boven 3,5. Bij een pH lager dan 3,5 kunnen zij zich niet ontwikkelen. Daaruit volgt dus dat een mineraalzure silo in ieder geval een melkzuurgisting doormaakt als de pH boven 3,5 ligt. Is de pH lager dan 3,5 dan zou theoretisch geen melkzuurgisting optreden. De methode VIRTANEN kan dus twee verschillende soorten silages opleveren.

4. De verklaring dat toch boterzuurgisting optreedt in een silo met pH beneden 4 en melkzuurgisting bij pH beneden 3,5 moet gezocht worden in de gelaagde structuur van een mineraalzure silo. Van de in den silo gebrachte voederlagen wordt alleen het oppervlak met zuur bespoten, zoodat in het inwendige dezer lagen langer of korter tijd bacterie-werkingen mogelijk zijn al naar gelang de lagen dikker of dunner zijn, het voeder droger of natter is, de persing kleiner of grooter is en minder of meer zuur gebruikt werd.

5. Vorige onderzoekingen, door ons uitgevoerd, hebben geleerd, dat er twee soorten van gelatine-niet-ervloeiende boterzuurbacteriën zijn. De eene soort, *Clostridium tyrobutyricum*, vergist lactaten, de andere soort, *Clostridium saccharobutyricum*, vergist lactaten niet, doch wel diverse koolhydraten. Daarom zal in een silo, waarin een flinke melkzuurgisting opgetreden is en een groot deel der koolhydraten omgezet is in melkzuur, zich v.n.l. *Cl. tyrobutyricum* ontwikkelen en in een silo, waarin slechts onbetekenende melkzuurgisting was, *Cl. saccharobutyricum*.

Door de eigenschap der lactaatvergisting is van de genoemde twee boterzuurbacteriënsoorten alleen *Cl. tyrobutyricum* gevaarlijk voor de kaasbereiding, zoodat alleen silages waarin zich deze soort ontwikkeld heeft voor de kaasmakerij verdacht zijn. Het aantal in een silage gevonden boterzuurbacteriën is dus eigenlijk van geen belang. Een gering aantal boterzuurbacteriën van het type *Cl. tyrobutyricum* is veel gevaarlijker dan een groot aantal bacteriën van het type *Cl. saccharobutyricum*. Bovendien wordt hierdoor begrijpelijk gemaakt dat mineraalzure silages van een pH boven 3,5 in het algemeen gevaarlijk zijn voor de kaas en die met pH beneden 3,5 niet. In de laatste ontbreekt n.l. de flinke en snelle melkzuurvorming welke voor de ontwikkeling van *Cl. tyrobutyricum* noodig is.

Evenwel, als een silo met weinig zorg gemaakt is (dikke lagen b.v.) kan toch lactaatvergisting in een silo van pH beneden 3,5 hebben plaats gehad en zal zoo'n silo dus toch gevaarlijk voor de kaas zijn (zie b.v. n°. 83 van tabel 17).

Bij het onderzoek der practijksilo's werden in het algemeen lactaatvergistende boterzuurbacteriën gevonden in silo's van pH boven 3,5 en suikervergistende in silo's van pH beneden 3,5. In enkele silagemonsters werd geen boterzuur aangetroffen. Deze zijn dus blijkbaar met groote zorg gemaakt.

6. Bij den Hollandschen kuilhoop onderscheiden wij twee verschillende types. Het eene type is de kuilhoop zonder melkzuurgisting, waarin n.l. de melkzuurbacteriën door de hooge temperatuur, welke in den hoop ontstaan is, gedood zijn en het andere type is de kuilhoop, waarin wel een melkzuurgisting heeft plaats gehad. Het eerste type moet ongevaarlijk voor de kaasbereiding geacht worden omdat de zich daarin ontwikkeld hebbende boterzuurbacteriën tot de soort *Cl. saccharobutyricum* behooren; het tweede type is gevaarlijk voor kaas omdat hierin de lactaatvergistende boterzuurbacterie door de aanwezigheid van melkzuur gelegenheid heeft gehad zich te ontwikkelen.

De melkzuurgisting is dus in een kuilhoop het gevaarbringende element.

7. Bij het onderzoek van silages bepale men: melkzuur, boterzuur, pH, melkzuurbacteriën, boterzuurbacteriën en vooral of *Cl. tyrobutyricum* aanwezig is. De gelijktijdige aanwezigheid van boterzuur en *Cl. tyrobutyricum* maakt een silage verdacht.

De melkzuurbepaling is eigenlijk van weinig belang daar het melkzuur-gehalte geen uitsluitsel geeft over het verloop der melkzuurgisting. Eenmaal ontstaan melkzuur kan n.l. door de werkzaamheid van *Cl. tyrobutyricum* omgezet zijn tot boterzuur.

8. Onze onderzoekingen geven aanleiding om te veronderstellen dat in een silage de boterzuurgisting met meer succes onderdrukt kan worden naarmate de silage van den aanvang af meer homogeen is. De gelaagde structuur van een mineraalzure silo moet dus vermeden worden en men kan dit bereiken door een hooger vochtgehalte.

Door bij de ensileering een overmaat water te gebruiken en het voeder te ensileeren in goed gesloten, niet-gedraineerde silo's zal het misschien zelfs mogelijk zijn een betrouwbare silage te bereiden zonder van minerale zuren gebruik te hoeven maken.

SUMMARY.

Fermentations in ensiled fodder with regard to cheese-making.

In a previous paper about this subject ¹⁾ we have described the bacteriological examination of a number of silages made with the addition of inorganic acids. In most of the samples butyric-acid-bacteria, which are regarded as dangerous to cheese-making, could be found and cheese made from milk of cows fed on such a silage of a pH of 3,7 appeared to show heavy subsequent blowing.

The results of this year's work proved silages of a pH below 3,5 to be harmless to cheese.

During the winter-season 1933—1934 66 silages have been examined and nearly all of them contained more or less butyric-acid and butyric-acid-bacteria, even the silages of a pH below 3,5 (table 17).

It was therefore necessary to explain how fermentations can take place in such materials of high acidity (pH below 4) and why subsequent blowing of the cheese in some cases was observed with silages containing only comparatively few butyric-acid-bacteria and was not observed in other cases where a large number of these bacteria was present in the consumed fodder.

The spores of butyric-acid-bacteria, present on the fresh grass, may remain alive in acid silages but these spores cannot be expected to be dangerous to cheese-making as the original grass which contains at least the same number of these spores cannot be regarded dangerous to cheese. The cases of subsequent blowing in summer, when the cows are fed on fresh grass, are not due to the butyric-acid-bacteria on the fresh grass but to insufficient cleaning of transporting-cans, pipe-lines, a.s.o.

As said above a butyric-acid-fermentation takes place in nearly all silages made with inorganic acids. It seemed possible that in a mixture of grass and inorganic acid the chemical equilibrium was reached after a long time. Then the acidity could perhaps decrease to a value at which the fermentations of lactic-acid-bacteria and butyric-acid-bacteria could begin. In the course of these acid-producing fermentations a pH below 4 could be reached again. This assumption however proved to be false as was shown in experiments in which grass was ensiled with hydrochloric acid and formaldehyde to prevent any bacterial action. In these experiments the pH-equilibrium was soon reached and the pH remained constant over a long time (table 1).

Though it seemed improbable that a butyric-acid-fermentation could

¹⁾ *These reports*, 39, C (1933), 564; *Annual report of the experimental dairy farm Hoorn*, 1932, 231.

take place at a pH below 4 we thought it necessary to study the effect of the acidity of the medium on this fermentation. Of a great number of butyric-acid-bacteria only a small percentage developed in dextrose-beef-broth of a pH of 4,2 (table 3). Other experiments were carried out with glass vessels in which grass was ensiled with hydrochloric acid or with a mixture of hydrochloric and sulphuric acid (A. I. V. acid). A large amount of water was added too to be sure that the pH was the same in the whole mass of grass. The grass was thoroughly mixed with the acid solution (e.g. 600 grams of grass and 100 cc of acid solution). In these silages the butyric-acid-bacteria, normally present on the grass, remained alive when the pH was above 3,5 and they died sooner or later when the pH was more or less below 3,5. Whether a butyric-acid-fermentation had taken place was examined chemically as it is impossible to estimate the number of butyric-acid-bacteria. It is therefore very difficult to determine whether an increase of the number of these bacteria has taken place. The presence of butyric acid however is a distinct indication of fermentation and bacterial multiplication. In the bottom layers of the grass ensiled in glass vessels and kept at room temperature butyric acid never has been produced when the pH was below 4,2. So it is impossible that a butyric-acid-fermentation can take place in a silo of a pH below 4, when really all parts of the silo have the same acidity.

As to the lactic-acid-fermentation we could show that lactic-acid-bacteria could develop at acidities of pH above 3,5. In a silo of a final pH above 3,5 a lactic-acid-fermentation always takes place, in a silo of pH below 3,5 such a fermentation is impossible when all parts of the silo have the same pH.

So we can make two different kinds of silages with Virtanen's method. Silo's of a pH above 3,5 have undergone a lactic-acid-fermentation, silo's of a pH below 3,5 possibly have not.

A silo made with inorganic acids is built in layers of fodder and only the surface of each layer is wetted with the acid. So in the beginning the interior of each layer is not acid enough to prevent bacterial activity. The bacterial action in the inner of these layers is checked when the acid has penetrated into it by diffusion. This diffusion is more effective when the layers are thin, the fodder is wet, the pressure more intense and more acid is used. Fermentations are therefore more complete in silo's made with dry grass, in thick layers, less acid and especially in the upper layers or near the walls, where the pressure is low. **It is on account of the existence of these layers that a butyric-acid-fermentation can take place in silos of an average pH below 4.**

An investigation in the group of butyric-acid-bacteria has shown that there are two types, one of which ferments sugars and no lactates; the other type

ferments lactates and no complex sugars ¹). As the subsequent blowing of cheese is a lactate fermentation only the latter causes this cheese-defect. A silage, containing a large number of sugar-fermenting butyric-acid-bacteria (*Clostr. saccharobutyricum*) therefore will not cause subsequent blowing of cheese; a silo with lactate-fermenting butyric-acid-bacteria (*Clostr. tyrobutyricum*) however is dangerous to cheese-making. *Cl. tyrobutyricum* is the only species of the group of butyric-acid-bacteria, which can develop when the sugar of the medium has been transformed into lactic acid. For this reason a silo in which a lactic-acid-fermentation has taken place as well as a butyric-acid-fermentation is likely to cause subsequent blowing of cheese.

In a Virtanen silo a lactic-acid-fermentation always takes place when the pH is above 3,5. Our practical conclusion that cheese does not show blowing when silages of a pH below 3,5 are fed is now easily understood. The absence of a sufficient lactic-acid-production at an average pH below about 3,5 prevents the development of *Cl. tyrobutyricum*.

Indeed we found in silo's of a pH below 3,5 in most cases only sugar-fermenting butyric-acid-bacteria and in most of the silo's of pH above 3,5 lactate-fermenting bacteria. Of course it is possible that a silo of a pH below 3,5 contains lactate-fermenting butyric-acid-bacteria, e.g. when it is made of thick layers of fresh fodder (n°. 83 of table 17) or that a silo of a pH above 3,5 does not show any butyric-acid-fermentation, e.g. when it is made with great accuracy and the whole mass of fodder is soaked with the acid within a short time (thin layers).

A silage prepared according to the Dutch method must be regarded as dangerous to cheese-making when a lactic-acid-fermentation has taken place in it. In the majority of cases the acidity is not high enough to prevent a butyric acid-fermentation, because of the oxydation of carbohydrates by the oxygen of the air during the first period after the grass has been put on a pile. When this oxydation is very intense, the temperature may rise to 70° C. and the lactic-acid-bacteria are killed. Then lactic acid cannot be formed and the butyric-acid-fermentation is a sugar-fermentation caused by *Cl. saccharobutyricum*. Such a silage will not cause blowing of cheese. When the lactic-acid-bacteria are not killed (in a Dutch silage in which the temperature did not rise to such a degree) a lactate-fermentation can occur.

The absence of lactic acid is not a reliable indication that a lactic-acid-fermentation did not take place as all lactate may have been transformed into butyric acid by the action of *Cl. tyrobutyricum*.

If a silage should be examined whether it is likely to cause subsequent blowing of cheese it is not sufficient to determine the presence of more or less

¹) *These reports* 40 C (1934) 543; *Annual report of the experimental dairy farm, Hoorn, 1933.*

butyric-acid-bacteria, but it is necessary to prove that a lactate-fermentation has taken place. This is likely to have happened when butyric acid is present and lactic-acid-bacteria are found in large amounts. In a complete analysis should be estimated: lactic-acid, butyric acid, pH, lactic-acid-bacteria, butyric-acid-bacteria and especially one ought to examine whether the butyric-acid-bacteria belong to the genus *Clostr. tyrobutyricum* or *Clostr. saccharobutyricum*.

Some suggestions were made for a new method of ensiling green forage. Our investigations have shown that a butyric-acid-fermentation cannot take place when in all parts of the silo the pH is the same and below 4. Lactic-acid-bacteria can acidify the grass as far as a pH below 4 and as the lactic acid develops in the fodder a better distribution of the acid is obtained than with artificial addition of inorganic acids. Oxydations in the fresh fodder (respiration and activity of aerobic bacteria) should be prevented as they attack carbohydrates and produce alkaline substances. For this reason water must be added to remove the oxygen. Such a silage is expected not to be dangerous to cheese-making and is not injurious to cows as Virtanen's silage often seems to be.