

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

SUIKERVERGISTENDE EN LACTAATVERGISTENDE BOTERZUUR-  
BACTERIËN,

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE.

(Ingezonden 10 Augustus 1934.)

## I. Inleiding.

Boterzuurbacteriën komen, hoewel zij anaerob zijn, zeer verbreid in de natuur voor. Hiertoe zal wel bijdragen het feit, dat het sporevormende bacteriën zijn, waardoor zij bestand zijn tegen menigen ongunstigen invloed. De alomtegenwoordigheid van deze microörganismen is mede oorzaak, dat de boterzuurgistingen reeds van ouds bekend zijn. Sedert PASTEUR zijn eerste proeven deed is veel literatuur verschenen over deze bacteriën en heeft men er naar gestreefd ze in verschillende ondergroepen in te deelen, naar gelang van hun eigenschappen en gedrag.

De boterzuurbacteriën zijn van zeer groot belang voor het zuivelbedrijf. Men kent hier gunstige en ongunstige werkingen van deze bacteriëngroep. Zoo schijnt de typische rijping van Schabziegersoorten te danken te zijn aan een boterzuurgisting in de caseïne-massa, welke verkregen wordt door melk te precipiteeren bij hooge temperatuur met zure wei<sup>1)</sup>. Harde kaassoorten, zooals Emmentaler, Goudsche en Edammer, kunnen sterk benadeeld worden door boterzuurbacteriën wegens een gasontwikkeling, welke optreedt als de kaas reeds in haar definitieven vorm gebracht is, waardoor gasholten (laat-los) of scheuren (knijper) in het zuivel ontstaan.

In den laatsten tijd is de belangstelling voor de boterzuurbacteriën in het zuivelbedrijf weer toegenomen, zoowel voor consumptiemelk, in verband met eventueele schade voor jonge kinderen, als voor industriemelk, met het oog op de kaasbereiding.

De toenemende neiging om in het boerenbedrijf meer voeder te conserveeren door inkuiling of ensileering is mede niet vreemd aan deze groeiende belangstelling, daar in deze geconserveerde voeders dikwijls massa's boterzuurbacteriën worden aangetroffen, welke een infectie van de melk kunnen veroorzaken.

<sup>1)</sup> E. VON FREUDENREICH en ORLA JENSEN, Ueber die im Schabzieger stattfindende Buttersäuregärung. *Centralbl. f. Bakt.* II, 17 (1907), 225.

## II. De aard der boterzuurgisting.

De meest algemeen bekende boterzuurgisting is die, waarbij door de betreffende bacteriën suikers vergist worden. Deze suikers worden dan ontleed onder vorming van o.a. boterzuur, azijnzuur, koolzuur en waterstof. Hierop wijst ook de naam. Men kent deze bacterie onder de namen: *Bacterium*-, *Clostridium*-, *Granulobacter*- en *Amylobacter saccharobutyricum* en *Bacillus saccharobutyricus*, in welken naam tot uitdrukking gebracht wordt, dat suiker vergist wordt tot boterzuur,  $C_4H_8O_2$ .

Dan is ook de butylalkoholgisting bekend, waarbij suikers vergist worden tot o.a. butylalkohol,  $C_4H_{10}O$ , b.v. door *Clostridium butylicum*.

Ten slotte weet men ook, dat boterzuurbacteriën in staat schijnen te zijn melkzuur of melkzure zouten te vergisten, waarbij dus lactaat omgezet wordt tot boterzuur. Deze boterzuurgisting is zeer goed bekend aan de zuivelbacteriologen. Zij kennen twee lactaatvergistende processen in de kaas; het eene wordt nl. veroorzaakt door propionzuurbacteriën<sup>1)</sup> of boekelscheurbacteriën<sup>2)</sup> en het tweede door boterzuurbacteriën<sup>3)</sup>. Deze beide gistingen worden door de gasontwikkeling merkbaar op een tijdstip, dat in de kaasmassa geen suiker meer voorkomt. Bij een goed verloopend kaasbereidingsproces wordt binnen 24 uren na het brengen van de wrongel in den kaasvorm, door de melkzuurbacteriën alle aanwezige melksuiker omgezet in melkzuur en lactaat. Daar propionzuur- en boterzuurgisting eerst beginnen na 1 à 2 weken of nog later, afhankelijk van de temperatuur der bewaarplaats van de kaas, kan hier dus slechts sprake zijn van een ontleding van lactaat of eiwit door deze bacteriesoorten.

Voor de boekelscheur- of propionzuurbacteriën was het betrekkelijk eenvoudig aan te toonen dat hier lactaat vergist werd. Deze bacteriën zijn namelijk zeer gemakkelijk te kweken in een voedingsbodem, waarin Ca-lactaat als koolstofbron aanwezig is, nl. in water met: 1 % pepton Witte, 2 % Ca-lactaat, 0,1 %  $K_2HPO_4$ , 0,1 %  $MgSO_4$ , 0,5 %  $NaCl$ <sup>4)</sup>.

Voor de boterzuurgisting was het bewijs der lactaatvergistening moeilijker te leveren. In de genoemde pepton-Ca-lactaat-vloeistof is het nl. niet mogelijk boterzuurbacteriën tot ontwikkeling te brengen. Gisting wordt hierin dus niet

<sup>1)</sup> E. VON FREUDENREICH en ORLA JENSEN, Ueber die in Emmentalerkäse stattfindende Propionsäuregärung. *Centralbl. f. Bakt.* II, 17 (1907), 529.

<sup>2)</sup> BOEKHOUT en OTT DE VRIES, De normale gasvorming in kaas. *Jaarverslag van de Ver. tot exploitatie eener proefzuivelboerderij* 1915, 73; *Versl. v. landbk. onderz. d. Rijkslandbouwproefstations*, 21, (1917) 14.

<sup>3)</sup> BOEKHOUT en VAN BEYNUM, Over het „laat optredend los” bij Goudsche kaas. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij* 1928, 1. *Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 34 (1929), 25.

<sup>4)</sup> Zie ORLA JENSEN, *ibid.* BOEKHOUT en OTT DE VRIES, *ibid.*

verkregen. Het gelukte evenwel aan BOEKHOUT en VAN BEYNUM duidelijke gistingen te verkrijgen met calciumlactaat door in plaats van peptonwater vleeschbouillon te gebruiken<sup>1)</sup>. In vleeschbouillon met 1½ à 2 % Ca-lactaat hebben alle in den loop der jaren uit laat-los-kaas geïsoleerde boterzuurbacteriën duidelijken groei en duidelijke gisting vertoond, hoewel zij uit de kaas geïsoleerd waren door gebruik te maken van een bodem, welke als koolstofbron uitsluitend suiker bevatte, nl.:

Vleeschbouillon	}	pH 6.
0,5 % NaCl		
0,5 % pepton		
0,5 % glucose		
0,5 % galactose		

Ook konden zij de hierboven genoemde pepton-Ca-lactaat-vloeistof met deze boterzuurbacteriën tot gisting brengen. Dit gelukte nl. door gelijktijdige medeënting van colibacteriën. Pepton-Ca-lactaat-vloeistof, geënt met boterzuur- en colibacteriën, vertoont een langdurige duidelijke gisting.

Het bleek ons, dat behalve colibacteriën ook melkzuurbacteriën of andere anaerob groeiende willekeurige bacteriën de boterzuurgisting in dezen blijkbaar moeilijk aantastbaren bodem mogelijk konden maken. Hoewel in dezen bodem geen suiker aanwezig is en de proeven geheel anaerob genomen worden in buisjes, waaruit door uitkoken bij lage temperatuur (20° C.) aan de luchtpomp alle zuurstof verwijderd was, groeien de coli- en melkzuurbacteriën nog wel in voldoende mate om de boterzuurbacteriën aan den gang te helpen.

De oorzaak, dat de boterzuurgisting in deze vloeistof slechts optreedt bij aanwezigheid van andere, niet-lactaatvergistende bacteriesoorten, zal gezocht moeten worden in de oxydatie-reductiepotentiaal van het milieu. De streng anaerobe boterzuurbacteriën vereischen een bepaalden reductietoestand om in een vloeistof tot ontwikkeling te kunnen komen. Deze vinden zij in vloeistoffen met suiker, waar de suiker, bij afsluiting van de lucht, door een langzame ontleding de reductiepotentiaal verlaagt. Ook een gecompliceerde vloeistof als vleeschbouillon stelt zich bij luchtafsluiting op een lage potentiaal in. In een vloeistof met bestendige stoffen, als pepton en Ca-lactaat, blijft zij echter te hoog, zoodat een ontleding van de pepton door gemakkelijk groeiende bacteriën te hulp moet worden geroepen om een geschikten reductietoestand te veroorzaken.

Daarom kan men ook een boterzuurgisting in pepton-Ca-lactaat of in pepton-Na-lactaat verwekken door toepassing van reduceerende stoffen. Zoo konden wij in dit milieu boterzuurgisting krijgen door er ferrozouten (b.v.

<sup>1)</sup> Zie BOEKHOUT en VAN BEYNUM, *ibid.*

per 8 cc 3 druppels van een 5 %-oplossing van Mohr's zout) of cysteine (per 8 cc 3 druppels 5 %-zoutzure cysteine) aan toe te voegen.

De in een der genoemde lactaatbodems optredende boterzuurgisting is een lactaatvergisting, zooals blijkt uit de verandering van den zuurgraad. In voedingsvloeistoffen met suikers als koolstofbron wordt uit de neutrale suiker een zuur gevormd (boterzuur), waardoor tijdens de gisting de zuurgraad toeneemt. Bij de lactaatvergisting wordt uit het melkzuur boterzuur, koolzuur en waterstof gevormd, hetgeen met een zuurgraadvermindering gepaard moet gaan, daar hierbij uit een zuur met 3 koolstofatomen een zuur met 4 koolstofatomen ontstaat. Bij boterzuurgisting in een lactaatbodem stijgt daarin dus tijdens de gisting de pH. Bij kaas, welke een boterzuurgisting heeft door-gemaakt, vindt men wegens de verdeeling van het zout in de kaasmassa alleen gisting in het centrum. Blijkens titraties en pH-metingen is de zuurgraad in het gegiste inwendige altijd lager dan in den rand. Een dergelijke zuurgraads-verhouding in een kaas met gasholten is daarom reeds een duidelijke aanwijzing voor een plaats gehad hebbende boterzuurgisting.

Vatten we thans samen wat over lactaatvergisting door boterzuurbacteriën bekend is, dan hebben we hiervoor de volgende bewijzen:

1. Uit knijperkazen en laat-los-kazen kunnen boterzuurbacteriën geïsoleerd worden, welke in glucose-galactose-vleeschbouillon een duidelijke boterzuurgisting veroorzaken.
2. Enting van reïncultures van deze bacteriën in de kaasbakmelk geeft aanleiding tot het ontstaan van genoemde gebreken in de eruit gemaakte kaas.
3. De gisting treedt in de kaas pas op, wanneer alle suiker reeds door de melkzuurbacteriën is omgezet tot melkzuur.
4. Deze boterzuurbacteriën kunnen onder juist gekozen omstandigheden in kunstmatige voedingsbodems lactaten vergisten.
5. Bij deze gisting in lactaatbodems wordt zeer duidelijk de bij lactaatvergisting te verwachten zuurgraadsvermindering geconstateerd.

### III. Literatuur over boterzuurgisting.

De oudere literatuur geeft een zeer verward beeld van de boterzuurgistingen, ook reeds door de omstandigheid, dat niet altijd met reïncultures gewerkt werd of door het feit, dat de reïncultures niet betrouwbaar waren. We zullen hier enkele oudere onderzoekers aanhalen en daarbij alleen opmerkzaamheid schenken aan het vergistingsvermogen der beschreven boterzuurbacteriënsoorten ten opzichte van verschillende koolstofbronnen.

Na PASTEUR beschrijft A. PRAZMOWSKI in 1880 een *Clostridium butyricum*, welke vergist: zetmeel, dextrine, rietsuiker, melkzure kalk, glycerine, manniet.

M. GRUBER (1887) meende, dat PRAZMOWSKI's boterzuurbacterie uit 2 of 3 verschillende soorten bestond. N°. I en II zijn anaerob en vormen uit koolhydraten (o.a. saccharose) boterzuur en butylalkohol, N°. III zou facultatief anaerob zijn.

Bac. amylozyma van PERDRIX (1891) vergist glucose, saccharose, zetmeel.

BOTKIN's Bac. butyricus (1892), welke zeer verbreid zou voorkomen, vervloeit gelatine, coaguleert melk, vergist lactose en zetmeel, lactaat echter niet.

BEYERINCK (1893) onderscheidde Amylobacter saccharobutyricus, welke b.v. suiker en zetmeel vergist, Amylobacter butylicus, welke in hoofdzaak butylalkohol vormt en spreekt daarbij van een verkregen lactaatvergisting door Amylobacter lactobutyricus.

FLÜGGE (1894) beschreef een viertal boterzuurbacteriënsoorten zonder veel karakteristieke bijzonderheden aan te geven. II en IV vervloeien gelatine en coaguleeren melk, III is pathogeen, I is identiek met BOTKIN's bacterie.

GRIMBERT (1893) vond, dat zijn Bac. orthobutylicus glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose, zetmeel, manniet, arabinose, dextrine, inuline en glycerine vergistte, doch geen lactaat.

VON KLECKI (1896) ontdekte Bac. saccharobutyricus, welke identiek heet te zijn met de hierna te bespreken beweeglijke boterzuurbacterie van GRASSBERGER en SCHATTENFROH.

Door de onderzoekingen van laatstgenoemden <sup>1)</sup> is een duidelijker overzicht verkregen betreffende de groep der boterzuurbacteriën. In de eerste verhandeling worden 3 types beschreven, geïsoleerd uit melk, waarin boterzuurgisting was verkregen door pasteurisatie in waterdamp gedurende 5 min. tot een half uur in een gesloten flesch en daarna plaatsen bij 37° C. Alle 3 types vergisten lactose, zetmeel en glucose, echter geen lactaat. Melk wordt gecoaguleerd en twee der types zijn onbeweeglijk en vervloeien gelatine.

In de tweede verhandeling vindt men een onderzoek van boterzuurbacteriën gekweekt uit grond, kaas, water, faeces, meel, enz. door deze stoffen in gesteriliseerde melk 10 à 20 minuten in waterdamp te verhitten. Hier worden reeds de twee standaardtypes gegrondvest, nl.:

*de onbeweeglijke boterzuurbacterie*, Granulobacter saccharobutyricus immobilis liquefaciens, welke gelatine vervloeit en

*de beweeglijke boterzuurbacterie*, Granulobacter saccharobutyricus mobilis non liquefaciens, welke gelatine niet vervloeit en glucose, laevulose, galactose,

<sup>1)</sup> A. SCHATTENFROH en R. GRASSBERGER, Ueber neue Buttersäureerregger in der Marktmilch. *Centralb. f. Bakt.* II, 5 (1899) 209. Idem, Weitere Mitteilungen über Buttersäuregärung. *C. f. B.* II, 5 (1899) 697. Idem, Ueber Buttersäuregärung. *Arch. f. Hygiene*, 37 (1900), 54; 42 (1902), 219; 48 (1904), 1; 60 (1907), 40.

saccharose, maltose, lactose en zetmeel vergist, daarentegen manniet niet en glycerine weinig.

Deze laatste zou identiek zijn met:

- Boterzuurbacillus I van GRUBER,
- B. saccharobutyricus van BEYERINCK,
- B. saccharobutyricus van VON KLECKI,
- B. orthobutylicus van GRIMBERT,
- B. amylozyma van PERDRIX.

In de 3de verhandeling wordt op deze eenvoudige onderscheiding nog eens uitdrukkelijk de aandacht gevestigd en aangegeven, dat de onbeweeglijke glucose, laevulose, galactose, saccharose, maltose, lactose en zetmeel vergist en waarschijnlijk ook melibiose, raffinose en arabinose.

Het 4de artikel werkt de 2 types nader uit. Opgemerkt wordt, dat beide types geen eiwit aantasten, in tegenstelling met ook boterzuur produceerende rottingsbacteriën, dat ze moeilijk tot ontwikkeling zijn te brengen in een medium zonder organische stikstofverbindingen en dat cellulose niet vergist wordt. Een aantasting van manniet door de beweeglijke is onzeker.

In de artikelen van 1904 en 1907 wordt het verband behandeld met pathogene bacteriën (oedem, gashlegmonie, enz.) en vindt men een aantal min of meer speculatieve beschouwingen over denaturatie, overgang van de eene soort in de andere, suikerziekte der bacteriën, enz., welke voor ons hier niet van belang zijn.

In 1909 beschreef BREDEMANN een uitgebreid onderzoek<sup>1)</sup> naar het voorkomen en de eigenschappen van boterzuurbacteriën, verkregen volgens verschillende isolatiemethoden. Hij vond altijd maar één soort. Deze noemt hij *Bacillus amylobacter*. De eigenschappen komen overeen met die van de beweeglijke boterzuurbacteriën van SCHATTENFROH en GRASSBERGER. Van belang is, dat BREDEMANN op grond van zijn proeven tot de overtuiging kwam, dat zijn *Bac. amylobacter* niet alleen identiek was met *Granulobacter saccharobutyricum*, doch ook met *Granulobacter butylicum* (BEYERINCK), *Clostridium Pasteurianum* (WINOGRADSKY), *Clostr. americanum* (PRINGSHEIM), enz.

Door deze bacterie worden vergist: glucose, xylose, maltose, melitose, inuline, pectine en meestal laevulose, galactose, saccharose, lactose, zetmeel, manniet, dextrine, arabinose. Dulciet, cellulose, Ca-lactaat en Ca-tartraat worden niet vergist door de reïncultures.

<sup>1)</sup> G. BREDEMANN, *Bacillus amylobacter* A. M. et BREDEMANN in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. *Centralbl. für Bakteriologie* II, 23 (1909), 385.

De onderscheiding der niet-pathogene boterzuurbacteriën in twee groepen, zooals deze door GRASSBERGER en SCHATTENTROH gegeven werd (onbeweeglijk en beweeglijk type) heeft in de bacteriologie vasten voet gekregen en wordt nog algemeen erkend.

Zoo beschrijft WEIGMANN in het *Handbuch der Technischen Mykologie* van F. LAFAR (2. Band, blz. 114) onder den titel „Die neuen Buttersäurebakterien” deze twee types, welke beschrijving men ook kan vinden in zijn boek „Die Pilzkunde der Milch” van 1924, blz. 100. Evenzeer blijft door WEIGMANN deze onderscheiding gehandhaafd in het nieuwste zuivelwerk: „Lehrbuch der Milchwirtschaft” van FLEISCHMANN—WEIGMANN, 7e druk, Berlijn 1932.

In het boek van ORLA JENSEN: *Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft*, druk van 1913, vindt men op blz. 45 en 46 ook deze beschrijving der boterzuurbacteriën en kan men lezen, dat boterzuurbacteriën de meeste suikersoorten vergisten, manniët echter niet.

Ten slotte beschrijft het Amerikaansche werk *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (3de druk 1930) de boterzuurbacteriën onder den geslachtsnaam *Clostridium*. Ook hieruit kan men de verdeling van SCHATTENTROH en GRASSBERGER terugvinden met allerlei onderverdelingen, naar gelang de mogelijkheid van vergisting van enkele bijzondere koolhydraten.

Recente literatuur heeft zich beziggehouden met het metabolisme der boterzuurbacteriën. Zoo werd door DONKER<sup>1)</sup> en VAN DER LEK<sup>2)</sup> de ontleding van suikers beschreven, mede in verband met de systematiek dezer bacteriën.

Een andere reeks onderzoekers, werkzaam in de bacteriologische techniek, heeft zich beziggehouden met de problemen, welke zich voordeden bij het aantoonen van boterzuurbacteriën in diverse materialen. Van dezen noemen wij: BOEKHOUT en OTT DE VRIES, welken de bacteriën ophoopen in glucose-galactose-vleeschbouillon na pasteurisatie en isoleeren met glucose-galactose-vleeschgelatine<sup>3)</sup>, BURRI, die gebruik maakt van glucose-vleeschagar<sup>4)</sup>, RUSCHMANN, die aardappelbodem gebruikt<sup>5)</sup> en VAN BEYNUM en PETTE<sup>6)</sup>, die ook aangezuurde melk met glucose toepassen.

<sup>1)</sup> H. J. L. DONKER, Bijdrage tot de kennis der boterzuur-, butylalkohol- en aceton-gistingen. *Diss.* Delft, 1926.

<sup>2)</sup> J. B. VAN DER LEK, Onderzoekingen over de butylalkoholgisting. *Diss.* Delft 1930.

<sup>3)</sup> BOEKHOUT en OTT DE VRIES, Over het gebrek „Knijpers” in Edammerkaas. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij 1911*, 81. *Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 14 (1913), 9.

<sup>4)</sup> BURRI, STAUB en HOHL, Süssgrünfütter und Buttersäurebazillen, *Schweiz. Zentralbl. f. Milchwirtschaft*, 1919.

<sup>5)</sup> G. RUSCHMANN en L. HARDER, Die Buttersäuregärung im Silofütter und der Nachweis ihrer Erreger, *Die Futterkonservierung*, 3 (1931) 1.

<sup>6)</sup> J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Bacteriologisch onderzoek van een aantal in 1932 volgens de mineraalzuurmethode gemaakte kuilhoopen. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij 1932. Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 39 C (1933), 545.

#### IV. Lactaatvergisting in de literatuur.

De vergisting van melkzuur of lactaten door boterzuurbacteriën wordt in de literatuur slechts spaarzaam behandeld. In de verschillende artikelen wordt soms een losse opmerking erover gemaakt of een zin eraan gewijd; duidelijke uitspraken treft men evenwel niet aan. De oudste literatuur is nog het meest positief, misschien ook wel doordat toen nog dikwijls alleen met ruwcultures gewerkt werd. Naarmate het principe der reincultuur meer ingang vindt, verdwijnt de lactaatvergisting uit het gezichtsveld en wordt erover gesproken als een proces, dat wel heet te bestaan, doch waarmede men niet goed raad weet.

Bekend is de klassieke proef van PASTEUR, die duidelijke gistingen kreeg in een vloeistof met 2,25 % Ca-lactaat en anorganische voedingszouten <sup>1)</sup>. Dan herhalen wij hier de proeven van BEYERINCK, die uit calciumlactaatvergistingen zijn *Granulobacter lactobutyricus* isoleerde. BEYERINCK deelt slechts weinig mede over deze bacterie <sup>2)</sup> en is er later ook nooit meer op teruggekomen, terwijl zijn opgave, dat deze bacterie aan de lucht zijn eigenschappen veranderde en Subtiliskarakter verkreeg, het zeer onwaarschijnlijk maakt, dat hij een reincultuur van deze boterzuurbacterie in handen heeft gehad. Bovendien heeft de latere literatuur zich ook weinig of niets aan deze soort gelegen laten liggen.

Zoals wij boven zagen vergist de *Clostr. butyricum* van PRAZMOWSKI lactaat. Gelijk later bleek was deze echter een mengsel van verschillende boterzuurbacteriënsoorten.

In het begin van hun werkzaamheid over boterzuurbacteriën spreken SCHATTFROH en GRASSBERGER zich duidelijk uit over het bestaan der lactaatvergisting. In 1900 schrijven zij, dat de echte boterzuurgisting 2 groepen omvat, nl.:

- A. vergisting van melkzuur en melkzure zouten en
- B. vergisting van koolhydraten en enkele alcoholen.

Zij hebben eerst de groep B bestudeerd. Van een afzonderlijke behandeling van groep A is nooit iets gekomen. Wel maken zij er later enkele opmerkingen over. B.v. zeggen zij, dat nagistingen in een suikervergistende boterzuurgisting geweten moeten worden aan een vergisting van eerst uit de suiker ontstaan melkzuur. Later worden zij steeds onduidelijker over de lactaatvergisting, die volgens hen alleen kan optreden met sporenmateriaal als entstof, waarbij zij dus hun eerste vaststelling, dat de beweeglijke boterzuurbacterie lactaat niet vergist, min of meer terugnemen. Bij hun pogingen om lactaatvergistende

<sup>1)</sup> L. PASTEUR, *Etudes sur la bière*. Paris 1876.

<sup>2)</sup> BEYERINCK, *Sur la fermentation et le ferment butyliques*. *Arch. neerland.* 29 (1896), 1.



bacteriën te vinden, stuitten ze voortdurend op putrificusachtige bacteriën, dus rottingsbacteriën, waardoor het hun niet gelukte lactaatvergistende rein-cultures te krijgen.

BREDEMANN acht geen verschil aanwezig tusschen BEYERINCK's saccharo-butyricus en lactobutyricus. Hij merkt op, naar aanleiding van het feit, dat met glucosebodems altijd maar één soort gevonden wordt, dat deze wel in staat moet zijn lactaat te vergisten, daar grond geënt in lactaatvloei-stof altijd gisting gaf. Enkele van zijn stammen zouden zelfs in pepton-Ca-lactaat gegist hebben. Ten slotte meent hij dat de lactaatvergisting labiel is en pas door ge-wenning kan optreden.

Hoe groot de verwarring is, moge blijken uit WEIGMANN's werk „Pilzkunde der Milch" van 1924, waar de onbeweeglijke boterzuurbacterie, welke volgens GRASSBERGER en SCHATTFROH geen lactaat vergist, aangewezen wordt als veroorzaker van een gasvorming in kaas, welke na 14 dagen à 4 weken merkbaar wordt. Op blz. 350 wordt zijn opvatting nader gepreciseerd: „richtiger einer bestimmten Form des unbeweglichen Buttersäurebazillus" en „solche Buttersäurebakterien, welche milchsäuren Kalk zu zersetzen vermögen", waarin een tegenspraak ligt, daar wij weten, dat de boterzuurbacteriën uit kaas gelatine niet vervloeien.

Zoals boven reeds gezegd, is het geen toeval dat eigenlijk alleen de zuivel-bacteriologen aandacht aan de lactaatvergisting schenken. ORLA JENSEN noemt deze ook in zijn reeds aangehaald boek en deelt mede, dat de onbeweeglijke boterzuurbacterie van SCHATTFROH en GRASSBERGER melkzure kalk vergist en gasontwikkeling in kaas kan veroorzaken.

In Zwitserland <sup>1)</sup> en Nederland <sup>2)</sup> zijn er over de lactaatvergisting reeds duidelijker proeven gedaan, waarbij reeds kwam vast te staan, dat de boterzuurbacterie, welke lactaat vergist, in geen geval de onbeweeglijke van SCHATTFROH kan zijn, daar deze gelatine vervloeit en de uit knijpers of laat-los-kaas geïsoleerde bacteriën gelatine niet vervloeien.

Uit bovenstaand kort literatuuroverzicht blijkt genoegzaam, dat over de eigenschappen der klasse boterzuurbacteriën nog veel verwarring bestaat en dat in het bijzonder de lactaatvergisting niet opgehelderd is. De literatuur geeft geen opheldering, welke boterzuurbacterie lactaat vergist en hoe het gesteld is met de verhouding tusschen lactaat- en suikervergisting.

De bekendste boterzuurbacterie is *Clostridium saccharobutyricum*. De vraag of deze lactaat vergist is nooit scherp gesteld of opgelost.

<sup>1)</sup> Zie b.v. KÜRSTEINER, Die Emmentalerkäse-Qualitätsproduktion und das konservierte Grünfutter. *Schweiz. landw. Monatshefte*, 1926.

<sup>2)</sup> BOEKHOUT en VAN BEYNUM, *Ibid.*

### V. De proef van Weinzirl.

Het mag zeker van belang worden geacht, dat de kwestie of de lactaatvergisting veroorzaakt wordt door de gewone boterzuurbacterie of door een speciale soort worde opgelost. Dit probleem heeft juist voor de zuivel groote beteekenis, daar voor de kaasbereiding juist alleen de lactaatvergisting van belang is. Indien nl. bij de lactaatvergisting een speciale bacteriesoort betrokken is, mag het toch nuttig geacht worden bij de bacteriologische analyse van een bij de kaasbereiding gebruikte stof te onderzoeken of juist *deze* soort aanwezig is. De tot nu toe gebruikte onderzoeksmethodes schenken hieraan niet de minste aandacht, hetgeen zooals wij hierboven zagen, wel geweten moet worden aan de absolute onzekerheid, welke er ten aanzien van de lactaatvergisting bestaat.

Zoo gebruiken BOEKHOUT en OTT DE VRIES<sup>1)</sup> voor de isolatie glucose-galactose-bouillon, BURRI<sup>2)</sup> werkt met glucose-agar, RUSCHMANN<sup>3)</sup> aardappelbrij, VAN BEYNUM en PETTE<sup>4)</sup> glucose-galactose-bouillon, melk of melk met glucose. Bekend is ook de isolatie met behulp van melk (b.v. bij SCHATTENFROH en GRASSBERGER) en volgens de methode van BEYERINCK, waarbij het te onderzoeken materiaal gebracht wordt in een oplossing van suiker of zetmeel met anorganische voedingszouten. Bij al deze methodes wordt dus gekweekt in suikerhoudende bodems, waarbij zeer zeker boterzuurbacteriën tot ontwikkeling komen, doch de vraag naar lactaatvergisting niet aangeroerd wordt.

Als een verder bewijs voor de verwarring halen wij de bekende proef van WEINZIRL aan. Deze proef<sup>5)</sup> is oorspronkelijk bedoeld om faecale besmetting van melk aan te toonen. Dit wordt gedaan door een onderzoek naar de aanwezigheid van anaerobe sporevormende bacteriën, welke nl. na de besmetting der melk niet meer groeien (zooals coli doet) of afsterven (zooals vele andere niet-sporevormende bacteriën). Het oordeel, dat men met behulp van de anaerobe sporevormende bacteriën over de faecale besmetting der melk krijgt, is dus onafhankelijk van het tijdstip van het begin van het onderzoek, in tegenstelling met het bepalen dezer besmetting met coli, daar men hier wel degelijk bedacht moet zijn op een snelle toename der colibacteriën in de eerste uren na het melken. Met colionderzoek krijgt men dus geen juist beeld van de oorspronkelijk heerschende faecale besmetting. De waarde van de proef van WEINZIRL is wel aan eenige bedenking onderhevig; wij zullen dit echter on-

<sup>1)</sup> BOEKHOUT en OTT DE VRIES, *Ibid.*

<sup>2)</sup> BURRI, *Ibid.*

<sup>3)</sup> RUSCHMANN, *Ibid.*

<sup>4)</sup> VAN BEYNUM en PETTE, *Ibid.*

<sup>5)</sup> J. WEINZIRL, Detection of manurial pollution in milk by the anaerobic spore test. *The Am. Journal of Publ. Health*, 11 (1921), 149.

besproken laten en ons richten op het gebruik, dat op sommige plaatsen in Nederland van deze proef gemaakt wordt. De proef van WEINZIRL wordt uitgevoerd door porties van 5 cc melk te gieten in gesteriliseerde glazen buizen, waarin zich paraffine bevindt. Na pasteurisatie wordt afgekoeld en plaatst men de buizen bij 35° à 40° C. Door de pasteurisatie smelt de paraffine, stijgt op en stolt bij de afkoeling als een vaste prop, welke een anaerobe afsluiting bewerkstelligt. Een optredende gasontwikkeling, die de paraffineprop in meerdere of mindere mate omhoog drijft, toont de aanwezigheid van de anaerobe sporevormende bacteriën, dus de faecale besmetting, aan. In de meeste gevallen wordt de gisting teweeg gebracht door boterzuurbacteriën, hoewel bijna altijd daarnaast anaerobe rottingsbacteriën aanwezig zijn. Het in hoofdzaak aanwezig zijn van boterzuurbacteriën nu heeft aanleiding gegeven om deze proef te gebruiken voor het aantoonen van boterzuurbacteriën en het beoordeelen van de melk op geschiktheid voor de kaasbereiding. Hier geldt de proef dus als een indicatie op voor de kaasbereiding gevaarlijke boterzuurbacteriën, waarbij dus stilzwijgend wordt aangenomen, dat de in de Weinzirl-buizen zich ontwikkelende boterzuurbacteriën lactaatvergisters zijn. Daarbij wordt het begrip „boterzuurbacteriën” als een eenheidsbegrip beschouwd en iedere boterzuurbacterie gevaarlijk geacht.

## VI. Het gedrag van kaasboterzuurbacteriën in melk.

Wij vestigen er nogmaals de aandacht op, dat dus ook, indien men de proef van WEINZIRL gebruikt voor het aantoonen van boterzuurbacteriën, een opvoering van boterzuurbacteriën in een suikermilieu wordt toegepast. In 1931 zijn eenige proeven gedaan met de methode WEINZIRL met melk, afkomstig van de Proefzuivelboerderij.

Het bleek dat in vele gevallen de zich ontwikkelende flora bestond uit hoofdzakelijk rottingsbacteriën, waardoor het onmogelijk werd eventueel ook aanwezige boterzuurbacteriën te kweken. Ook bij verdere overentingen bleven dikwijls de rottingsbacteriën in de meerderheid. Om de proef beter geschikt te maken voor de beoordeeling van kaasmelk, dus om meer kans te hebben alleen boterzuurbacteriën aan te toonen, was het gewenscht de omstandigheden der Weinzirlproef zóó te wijzigen, dat de rottingsbacteriën uitgesloten werden. Dit kon verkregen worden door de proef niet uit te voeren met de melk als zoodanig, doch door de melk vóór de vulling in de buizen aan te zuren met melkzuur. Bij toevoeging van 2 à 3 cc n/1 melkzuur per 100 cc te onderzoeken melk wordt de ontwikkeling van boterzuurbacteriën weinig of niet beïnvloed. De rottingsbacteriën blijven niet geheel weg, zoodat bij overenting in onaangezuurde melk soms toch weer rotting gaat optreden, doch zij worden

toch in zóódanige mate onderdrukt, dat men in de gegiste Weinzirlbuizen slechts uiterst zelden rottingsgeuren constateert, zoodat de boterzuurgeur altijd zeer duidelijk is. Door deze aanzuring heeft men dus een uitstekend middel om van de meer algemeene proef van WEINZIRL een methode te maken, welke speciaal gericht is op het aantoonen van boterzuurbacteriën in melk. Het is dan ook hierom, dat door ons eveneens van aangezuurde melk gebruik gemaakt is bij het aantoonen van boterzuurbacteriën in ingekuuld groenvoeder<sup>1)</sup>, waarin het aantal boterzuurbacteriën ook dikwijls in een ongunstige verhouding staat tot het aantal rottingsbacteriën.

Bij de vele op deze en op de oorspronkelijke wijze uitgevoerde Weinzirlproeven viel het op, dat aan de gegiste melk in vele gevallen een typische geur te constateeren was; een geur, welke sterk herinnerde aan amyl- of butylalkohol. Nooit was deze geur waargenomen aan de vele honderden in den loop der jaren verkregen cultures van boterzuurbacteriën, geïsoleerd uit laat-lokazen of knijpers. Deze waren eveneens altijd gekweekt met behulp van een koolhydraatbodem (glucose-galactose-vleeschbouillon), doch nooit met melk. Het optreden van den kenmerkenden butylgeur in de vele der Weinzirlbuizen was dus aanleiding voor een onzer om te onderzoeken hoe de uit kaas geïsoleerde boterzuurbacteriën zich in melk gedroegen. Op 21 April 1931 werden daartoe de 12 toen aanwezige reïncultures van uit kaas afkomstige boterzuurbacteriën geënt in buisjes gesteriliseerde melk, welke na de enting luchtledig werden gepompt. Het resultaat van deze proef was niet twijfelachtig. Geen der reïncultuurstammen gaf na zelfs 1 maand eenigerlei gisting te zien, hoe zwaar de melk ook geënt werd.

Hierdoor was een aanwijzing verkregen, dat de kaasboterzuurbacteriën andere eigenschappen hebben dan de in de literatuur beschreven boterzuurbacteriën, daar deze laatste wel lactose heeten te vergisten. Dit was de aanleiding om een onderzoek te beginnen naar de eigenschappen van verschillende boterzuurbacteriën, geïsoleerd uit verschillende stoffen. De bedoeling hierbij was tevens te trachten duidelijker gegevens te verzamelen over de zoo geheimzinnige lactaatvergisting en tot een betere classificatie der boterzuurbacteriën te komen, opdat helderder inzicht zou worden verkregen betreffende het probleem der gevaarlijkheid van de aanwezigheid van boterzuurbacteriën voor de kaasbereiding.

## VII. Isolatie en reïnkweeking van boterzuurbacteriën.

Boterzuurbacteriën werden gekweekt uit: kaas, melk, grond, water (oppervlaktewater), meel, pulp, kuilvoeder, silovoeder.

<sup>1)</sup> VAN BEYNUM en PETTE, Ibid.

Meestal zijn deze stoffen in zulke mate verontreinigd met andere bacteriën, dat eerst een ophoopingmethode moet worden toegepast door kweken in een vloeibare voedingsvloeistof van zóódanige samenstelling en onder zóódanige omstandigheden, dat ten slotte een z.g. ruwcultuur wordt verkregen, welke practisch uitsluitend boterzuurbacteriën bevat. Deze ruwcultuur is dan het uitgangsmateriaal voor het aanleggen van koloniëncultures in vaste voedingsbodems.

Slechts in een enkel geval kan men direct van de te onderzoeken stof koloniëncultures aanleggen. Dit is b.v. het geval met silovoeder, dat bereid is met toevoeging van minerale zuren.

Er is bij de isolatie altijd aandacht besteed dat de lactaatvergistende boterzuurbacteriën niet onderdrukt werden. Uit dien hoofde is veel gebruik gemaakt van glucose-galactose-vleeschbouillon, waarin uit kaas afkomstige, dus lactaatvergistende, boterzuurbacteriën uitstekend groeien en gisten. Daarom werd ook na de ophooping in een andere voedingsbodem altijd eerst overgeënt in glucose-galactose-vleeschbouillon. Dit heeft tevens het voordeel dat hierin een gemakkelijk suspendeerbaar bacteriënneerslag ontstaat, hetgeen bij het maken van gelatinecultures van groot belang is. In andere bodems, als b.v. melk of meel, bevinden zich na de gisting te veel klompjes en kluitjes, die een gelijkmatige verdeeling in de gelatine onmogelijk maken.

Koloniëncultures zijn altijd gemaakt in glucose-galactose-vleeschgelatine (pH 6,0). Dit werd gedaan door van een uitgeste bezonken cultuur de heldere vloeistof af te gieten, het bacteriënneerslag in de overblijvende vloeistof te suspendeeren en verschillende verdunningen hiervan in steriel water in de gelatine te enten. Na 3 weken staan bij 21° C. werden uit de buis met het kleinste koloniënaantal eenige koloniën afgepikt in glucose-galactose-bouillon.

We laten thans eerst enkele algemeene opmerkingen volgen over de wijze van reincultiveering.

Alle cultures, zoowel vloeistof- als gelatinecultures, werden gemaakt in cultuurbuizen, welke na de enting in de blaasvlam boven het niveau van den voedingsbodem plaatselijk tot een capillair werden uitgetrokken. Aan de luchtpomp werd dan door uitkoken bij 20° C. de buis van lucht bevrijd en de capillair dichtgesmolten. Gelatinecultures werden uitgekookt bij 30° C. om in deze gelatinebuizen een goed evenwicht te krijgen tusschen de dampspanning der gestolde gelatine en de dampspanning van de zich daarboven bevindende luchtledige ruimte, welke ongeveer hetzelfde volume heeft als de hoeveelheid voedingsbodem (totaal inhoud der afgesmolten buis is ongeveer 16 cc, waarvan dus 8 cc voedingsbodem), werden de buizen recht-opstaand volledig ondergedompeld in een waterbad van 35° en hier een nacht aan zichzelf overgelaten, waarbij de temperatuur langzaam daalt en de gelatine

langzaam kan stollen. Doet men dit niet, dan is er geen dampspannings-evenwicht en gaat de gelatine later nakoken, waardoor in de gestolde massa scheuren ontstaan, welke niet van boterzuurgisting afkomstig zijn en zeer hinderlijk zijn bij de latere bewerking. Voor het afenten van koloniën breekt men eerst de uitgetrokken punt af en laat dan de buis stukspringen door een vijlstreek aan te brengen met een glasmes en daarop de gloeiend gemaakte punt van een dun glasstaafje te plaatsen. De koloniën werden uitgesneden of uitgewipt met een platinadraad, welke aan de punt was platgeslagen, waardoor hij den vorm van een schepje of mesje kreeg. In het begin van het onderzoek werden uit een vloeistofcultuur steeds 2 gelatinecultures gemaakt met verschillende enthoeveelheid. Kwamen in de zwakst geënte buis nog te veel koloniën voor om deze rein te kunnen uitsnijden, dan werd de gelatine voorzichtig gesmolten en uitgegoten in een steriele glazen schaal. De koloniën vloeien daarbij niet uiteen; hun onderlinge afstand wordt grooter, waardoor men goed kan afenten. Bij deze methode worden echter geen betrouwbare reïncultures verkregen. Dit wordt veroorzaakt door het scheuren van de gelatine tijdens de gisting, waarna de bacteriën over het oppervlak der scheuren groeien, waardoor de gesmolten en uitgegoten gelatine verontreinigd is door kleinere of grootere bacteriënvliesjes. Deze methode is daarom verlaten en later werden steeds uit een buis met bouillon 5 gelatinecultures aangelegd, geënt met verschillende verdunningen der suspensie en van deze 5 buizen die met het geringst aantal koloniën voor de afenting gebruikt.

De ervaring heeft ons geleerd, dat men niet te spoedig tevreden moet zijn. In de meeste gevallen werd 4 à 5 keer een passage door gelatine uitgevoerd en toch bleken toen zelfs enkele cultures nog niet geheel rein te zijn. Boterzuur bacteriën zijn toch reeds eenigszins moeilijk te kweken en het ging hier om een scheiding te bewerkstelligen tusschen zeer verwante soorten. Wij hebben opgemerkt, dat boterzuurbacteriën elkander beïnvloeden, d.w.z. dat als één gaat groeien, een andere hierdoor betere groei kans krijgt. En waar nu bij het suspenderen van het bacterieneerslag nooit zekerheid bestaat, dat de suspensie niet uit aan elkaar klevende bacteriën bestaat, ontstaan dikwijls mengkoloniën. Men behoeft bij dit verschijnsel niet aan iets als b.v. Gurwitschstralen, te denken. Het verlagen van de reductiepotentiaal door een voor deze potentiaal minder gevoelige bacterie kan de oorzaak zijn van den groei van andere meer gevoelige bacteriën.

Bij het overenten van de boterzuurbacteriënrw- of reïncultures moet men steeds veel bacteriën in den verschen bodem overbrengen. Wij doen dit door van de uitgegiste cultuur de heldere vloeistof af te gieten, het neerslag in de overblijvende vloeistof te suspenderen en hiervan een groot platinaoog (4 mg) over te brengen. Het is onze indruk, dat alleen de gevormde sporen in den

nieuwen bodem uitkiemen en sporen worden altijd slechts door een klein deel der bacteriën gevormd. We zien hierin ook duidelijk individueele verschillen. Zoo ziet men bij het aanleggen van gelatinecultures bij een even zware enting uit den eenen stam 2 koloniën opkomen en uit een andere 1000.

Dit alles maakt het onderzoek langdurig en tijdroovend, doch wij herhalen nogmaals, dat men niet te spoedig overtuigd mag zijn van de betrouwbaarheid der verkregen reincultures.

Gelatinecultures werden verwerkt na 3 weken bij 21° C. gestaan te hebben, vloeistofcultures werden altijd een maand bij 28° C. bebroed. Destamreincultures werden steeds aangehouden in glucose-galactose-vleeschbouillon of in vleeschwater met ½ % keukenzout, ½ % pepton Witte en 1 % glucose. Na de enting werden zij bij 28° C. geplaatst tot één week na dat de laatste buis was gaan gisten. Dan werden zij bij kamertemperatuur gezet tot de volgende overenting. Daarbij is het noodig éénmaal per maand over te enten, niet méér en niet minder, anders verliest men zijn cultures. Dit verlies van cultures (door niet meer aanslaan bij overenten) is onvermijdelijk, doch is het minst bij de beschreven manier van overenten.

Thans volgt de beschrijving van de isolatie van boterzuurbacteriën uit verschillende stoffen.

#### A. *Isolatie uit melk.*

Op 1 April 1931 werden porties van met 2 of 3 cc n/l gesteriliseerd melkzuur aangezuurde rauwe melk gebracht in buizen, deze luchtledig gepompt, toegesmolten en 10 min. op 80° C. verhit. Dit pasteuriseeren om niet-sporevormende bacteriën te vernietigen werd uitgevoerd door onderdompeling in een waterbad van die temperatuur. Na het pasteuriseeren werd direct afgekoeld in koud water. Pasteuriseeren geschiedde alleen bij de buis, welke geënt werd met het te onderzoeken materiaal; bij alle latere overentingen werd niet meer gepasteuriseerd.

Een gedeelte werd na 1 week overgeënt in aangezuurde gesteriliseerde melk, niet-aangezuurde melk en bouillon<sup>1)</sup>. Met een ander gedeelte werd dit na 14 dagen gedaan. Uit deze cultures werd na 1 week of 2 weken overgeënt in bouillon.

Ten slotte waren aanwezig 44 ruwcultures met de volgende geschiedenis:

#### Behandeling.

1 week in zure melk, 1 week in zure melk, daarna in bouillon.

1 „ „ „ „ „ 1 „ „ melk, „ „ „

1 „ „ „ „ „ 1 „ „ bouillon, „ „ „

<sup>1)</sup> Onder „bouillon” verstaan wij voortaan glucose-galactose-vleeschbouillon of glucose-vleeschbouillon.

1 week	in zure melk,	2 weken	in zure melk,	daarna	in bouillon.
1	„ „ „ „	2	„ „	melk,	„ „ „
1	„ „ „ „	2	„ „	bouillon,	„ „ „
2 weken	„ „ „	1 week	in zure melk,	„ „ „	„
2	„ „ „ „	1	„ „	melk,	„ „ „
2	„ „ „ „	1	„ „	bouillon,	„ „ „
2	„ „ „ „	2 weken	„ zure melk,	„ „ „	„
2	„ „ „ „	2	„ „	melk,	„ „ „
2	„ „ „ „	2	„ „	bouillon,	„ „ „

In geen enkele der buizen is ooit rottingsgeur geconstateerd, waaruit wel blijkt, hoe gunstig de toevoeging van melkzuur op de onderdrukking der rottingsbacteriën gewerkt heeft. De overentingen werden volgens bovenstaand ingewikkeld schema verricht, omdat een voorloopige proef geleerd had, dat in de ruwcultures veel vervloeiende bacteriën (niet rottingsbacteriën) aanwezig waren en het met het oog op het maken van gelatinecultures noodig was deze zooveel mogelijk te onderdrukken, waarvoor in aanmerking kwamen: langer wachten met overenten, of kweeken in zuur milieu. Hoewel het niet bekend was of de hier aanwezige vervloeiende bacteriën zich ook zoo gedroegen, zijn deze manieren van onderdrukking van vervloeiende bacteriën gevolgd, daar in het algemeen gelatine-vervloeiende bacteriën gevoelig zijn voor zuur. Bij langer wachten met overenten zijn zij dus langer onderworpen aan de schadelijke werking van de door boterzuurbacteriën geproduceerde zuren.

Inderdaad zijn vele der uit bovengenoemde ruwcultures aangelegde gelatinecultures vervloeid, zoodat een aantal buizen moest worden weggeworpen of een klein, nog niet vervloeid gedeelte der gelatine moest worden gebruikt voor de afenting. In het algemeen kan men gelatinecultures niet afenten vóór zij 14 dagen oud zijn, omdat eerst sporen moeten zijn gevormd, zoodat men dikwijls een buis met mooie koloniën moet wegwerpen door de werkzaamheid van één vervloeiende kolonie, welke langzamerhand alle gelatine vervloeit.

De meeste vervloeiende bacteriën waren aanwezig in die ruwcultures, welke verkregen waren door snel opeenvolgende overentingen en de minste in die, welke verkregen waren door lang kweeken in zure vloeistoffen, hetgeen dus in overeenstemming is met bovengenoemde veronderstelling.

Na 4 keer maken van koloniëncultures in gelatine hadden wij de beschikking over 70 reincultures van stammen van boterzuurbacteriën, afkomstig uit de melkmonsters. Deze zijn gemerkt van 1—40 en van 120—149. Al deze vervloieden de gelatine niet.



### B. *Isolatie uit meelsoorten.*

Een boterzuurgisting in maïsmeel werd teweeggebracht door een maïsmeel-water-mengsel in een luchtledig toegesmolten buisje 10 min. op 80° C. te verhitten en te kweken bij 28° C. Na de gisting werd enkele keeren overgeënt in bouillon en daarna werden op de gewone wijze in gelatine door koloniëncultuur, wederom eenige keeren herhaald, reïncultures gemaakt.

Evenzoo werd gehandeld met gedroogde pulp.

Van lijnmeel werd een boterzuurgisting verkregen door lijnmeel te overgieten met kokend water. Na de gisting werd op de gewone wijze verder bewerkt ter reïncultiveering.

Uit meelsoorten kregen wij de reïncultures, genummerd van 101—111, uit de pulp de nummers 112 en 113.

### C. *Isolatie uit grond.*

Uit grond werden op een aantal verschillende wijzen boterzuurbacteriën geïsoleerd.

#### 1°. Volgens het recept van BEYERINCK.

De grond werd gepasteuriseerd in een buisje met water, voedingszouten, krijt en 1 % glucose, of met water, voedingszouten, krijt en 1 % zetmeel.

Meestal gelukt het wel om in deze bodems met veel grond een gisting te veroorzaken. Overentingen van deze gistingen in hetzelfde milieu weigeren evenwel in bijna alle gevallen. Daarom werd uit de gegiste, met grond geënte, buizen dadelijk overgeënt in bouillon en weer als boven verder bewerkt.

Uit deze wijze van isolatie stammen de reïncultures 150 tot 154.

#### 2°. Met melk.

Indien men grond ent in gesteriliseerde melk en kweekt in luchtledige buisjes bij 28° C., wordt meestal een rottingsgisting verkregen. Als boterzuurgisting optreedt is de cultuur echter in zoo hevige mate met rottingsbacteriën besmet, dat verdere verwerking met kans op succes vrijwel uitgesloten is. Daarom is ook bij deze wijze van isoleeren melk gebruikt met toevoeging van 2 à 3 cc n/l melkzuur per 100 cc. Om bovendien eventueele lactaatvergisters een betere kans te geven (wij weten immers uit hoofdstuk VI, dat deze niet in melk gisten) is bovendien aan deze melk nog 1 % glucose toegevoegd. Bij enting met grond krijgt men nu betere boterzuurgistingen. De reïncultures werden weer gemaakt via bouillon en gelatine. Deze methode leverde de reïncultures, gemerkt 65—75.

Door enting van grond in melk met 1 % glucose, dus zonder zuur, ontstonden boterzuurgistingen, waaruit de nummers 76, 77 en 78 afkomstig zijn.

### 3°. Ophooping in lactaatbodems.

Het lijkt logisch, dat men voor het winnen van speciaal lactaatvergistende boterzuurbacteriën ophooping en tracht uit te voeren in bodems, waarin alleen lactaat als koolstofbron voorkomt. In de praktijk gelukt dit evenwel niet zoo gemakkelijk. -Men kan b.v. grond enten en pasteuriseeren in vleeschbouillon met 2 % Ca-lactaat, waarvan we weten dat lactaatvergisters er goed in groeien. De rottingsbacteriën vinden hierin evenwel nog een beteren voedingsbodem dan de boterzuurbacteriën, zoodat deze proef evenzoo verloopt alsof geen lactaat aanwezig was, d.w.z. de zich ontwikkelende flora bevat bijna uitsluitend rottingsbacteriën. Ook als men dezen bodem zuurder maakt, b.v. op pH 5,1 brengt, is het succes nihil. Boterzuurbacteriën groeien nu eenmaal toch reeds moeilijk in dezen bodem, dus maakt zuur deze nog minder geschikt. Gebruiken we een anorganischen lactaatbodem volgens het voorschrift van PASTEUR, dus water, voedingszouten en 2 % Ca-lactaat, dan krijgt men bij enting met weinig grond geen gisting of een zwavelwaterstofvorming en bij enting met veel grond toch nog zooveel rottingsbacteriën door de aantasting van de organische stof van den ingebrachten grond, dat men van boterzuurgisting niets bemerkt. Bij juiste keuze van de hoeveelheid te enten grond wil het soms wel gelukken een boterzuurgisting te krijgen en het is uit enkele van deze toevallig gelukte proeven dat wij boterzuurbacteriëncultures hebben weten te verkrijgen.

Door grond te enten en te pasteuriseeren in Ca-lactaat met voedingszouten, over te enten in vleeschbouillon met Ca-lactaat van pH 5,2 en hierna overenten in bouillon werden verkregen de reïncultures 56—64. Door direct uit de anorganische lactaatvloei-stof in bouillon te enten ontstonden ruwcultures, die ten slotte de reïncultures 50—55 opleverden, als altijd na herhaalde passages door gelatine.

Al deze reïncultures waren echte boterzuurbacteriën, blijkens de uitnemende boterzuurgisting in glucose-bouillon. Aeroben groei vertoonden ze niet (vgl. BEYERINCK, *ibid.*).

#### D. *Isolatie uit water.*

Hiervoor werd slotwater gebracht en gepasteuriseerd in glucose-zouten-oplossing met krijt. In vele gevallen ging de vloeistof niet in gisting. Ontstond er wel gisting, dan werd overgeënt in bouillon en verder de gewone weg gevolgd. Dit gaf ons de reïncultures 155 en 156.

#### E. *Isolatie uit kaas.*

Een laat-los kaas of een knijper wordt steriel aangeboord, het boorsel met steriel water met een sterielen stamper in een steriel mortier tot een

papje gewreven en zwaar geënt in bouillon. De buisjes worden als gewoonlijk luchtledig gepompt, dichtgesmolten, 10 min. op 80° C. verhit en geplaatst bij 21° C. of 28° C. Er zijn hier minder passages door gelatine noodig om tot een reïncultuur te komen, omdat, zooals boven reeds werd opgemerkt, kaas reeds een selectieve bodem is voor lactaatvergisters. Verontreiniging met andere boterzuurbacteriënsoorten komt dus niet voor.

Uit verschillende kazen zijn afkomstig de reïncultures K 1—K 9 en K 13—K 32.

Bij de gasvorming in kaas is het mogelijk dat hierbij boekelscheurbacteriën of boterzuurbacteriën betrokken zijn. Het onderzoek van kaas met gasontwikkeling moet dus op beide soorten gericht zijn. Voor het onderzoek op boekelscheurbacteriën wordt de kaas geënt in pepton-Ca-lactaat-oplossing, niet gepasteuriseerd en ook gekweekt in luchtledig gepompte buisjes. In de kaas aanwezige boekelscheurbacteriën brengen de vloeistof dan tot gisting. Deze wijze van aantoonen van boekelscheurbacteriën is niet betrouwbaar als de kaas boterzuurbacteriën bevat. Deze gisten nl. ook in de pepton-Ca-lactaat-oplossing, omdat wegens het niet pasteuriseeren voldoende andere bacteriën aanwezig zijn om de reductiepotentiaal van den voedingsbodem voor de boterzuurbacteriënontwikkeling voldoende te verlagen. Bij overenting in bouillon en pasteurisatie van een dergelijke cultuur krijgt men dus een boterzuurbacteriënrucultuur.

Op deze wijze ontstonden de reïncultures K 10, K 11, K 12.

#### F. *Isolatie uit kuilgras.*

Het is bijna onmogelijk om uit kuilgras, bereid volgens de in Nederland gebruikelijke methode, boterzuurbacteriën te isoleeren, al komen zij er meestal in groote aantallen in voor. In het Hollandsche kuilgras zijn nl. zoo geweldige hoeveelheden rottingsbacteriën aanwezig, dat iedere methode ter verkrijging van een boterzuurgisting hierop vastloopt. Zelfs enten in aangezuurde melk helpt niet. Wel merkt men in de melkcultuur niets of slechts weinig van rotting; zoodra men overent in bouillon krijgen de rottingsbacteriën de overhand. Vleeschbouillon-Ca-lactaat komt heelemaal niet in aanmerking. Hierin krijgt men rotting of heelemaal geen gisting. Men is dus eigenlijk afhankelijk van het toeval bij de isolatie. Een voorafgaande droging van het kuilgras schijnt de boterzuurbacteriën in een voordeliger positie te brengen, zoodat uit gedroogd kuilgras met meer succes boterzuurbacteriën gekweekt kunnen worden.

Door ophooping in bouillon werden verkregen de reïncultures 44, 45, door ophooping in met melkzuur aangezuurde bouillon 43, uit koloniën, ontstaan door enting van een aftreksel van gedroogd kuilgras in glucose-vleeschagar

41, 42, 92, door ophooping in melk-glucose 46, 47, 48, door ophooping in melk-glucose-melkzuur 49, 90, 91.

Verder zijn nog volgens deze methodes uit kuilgras geïsoleerd de nummers S 28, S 29, S 30, S 31, S 32, S 39, S 40, S 41, S 44, S 49, S 50, S 51, S 52, S 53.

#### G. *Isolatie uit mineraalzure silages.*

In het algemeen bieden de mineraalzure silages, gemaakt volgens de Oost-Pruisische methode of volgens VIRTANEN, geen enkele moeilijkheid bij de isolatie van boterzuurbacteriën. Pas bij silages, waarvan de pH beneden 3 ligt, vindt men meestal geen boterzuurbacteriën, omdat zij in zóó zuur materiaal niet voorkomen. Ligt de pH boven 4, dan begint men weer moeilijkheden te krijgen met rottingsbacteriën, maar bij silages met pH tusschen 3 en 4 krijgt men door enting en pasteurisatie in bouillon of melk met 1 % glucose dadelijk een zuivere boterzuurgisting. Deze silages zijn daarom het prachtigste materiaal om boterzuurbacteriën uit te kweken. Men krijgt dan den indruk, dat de flora van sporevormende bacteriën in dit materiaal uitsluitend gevormd wordt door de boterzuurbacteriën. Daarom kan men uit volgens dit procédé geconserveerd groenvoeder ook wel rechtstreeks gelatinecultures aanleggen, waarbij men meestal alleen koloniën van boterzuurbacteriën krijgt, doch soms ook wel koloniën van gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën.

Uit dergelijke silages zijn in onze boterzuurbacteriëncollectie aanwezig de reincultures S 1—S 27, S 33—S 38, S 42, S 43, S 45—S 48.

#### H. *Isolatie uit diversen.*

In hooi komen practisch geen boterzuurbacteriën voor. Soms lukt het echter een boterzuurgisting te veroorzaken met hooi uit de onderste lagen van een hooiberg, waar zich de zwaardere, bij het optassen medegenomen gronddeeltjes verzameld hebben. Uit een zoodanige hooiboterzuurgisting is n°. 159 afkomstig.

Bij de bereiding van aardappelpulp maakt deze stof in gistingsputten een boterzuurgisting door. Ook deze stof leent zich zeer moeilijk voor het kweken van boterzuurbacteriën, ook al te wijten aan de aanwezigheid van rottingsbacteriën. Uit deze stof zijn de nummers 157 en 158 afkomstig.

Uit ingekuilde bostel werden ten slotte nog de reincultures S 54—S 58 gewonnen.

### VIII. *Gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën.*

De in hoofdstuk VII beschreven isolaties betreffen alle boterzuurbacteriën, welke niet in staat zijn gelatine te vervloeien. Bij de bespreking van boterzuurgistingen uit melk en silage is reeds gewezen op het voorkomen van gelatine-

vervloeiende bacteriën. Vooral in melk kan men deze gemakkelijk verkrijgen door met korte intervallen in niet-zuurgemaakte media over te enten. Men krijgt dan ruwcultures, waarvan het hoofddeel der flora uit deze vervloeiende bacteriën bestaat. Het zijn eveneens boterzuurbacteriën, getuige duidelijke gisting, boterzuurgeur en iedere afwezigheid van rotgeur.

Er zijn verschillende pogingen aangewend om deze bacteriën in reïncultuur te krijgen. In buizen met gelatine gelukt dit niet, daar zoolang de koloniën nog afzonderlijk liggen en dus de bolvormige vervloeiingszônes elkander nog niet raken, de cultures nog te jong zijn en geen sporen gevormd hebben, waardoor zij dus bij overenting te gronde gaan. Later is evenwel alle gelatine vervloeid.

Met buisjes agar hadden wij evenmin succes, daar de vervloeiende bacteriën den agar geheel doorgroeiden en het niet tot kolonievorming kwam. Waren wel koloniën zichtbaar, dan waren deze door het doorgroeingsverschijnsel van andere nooit rein. Toevoeging van 1 à 4 % gelatine aan den agar gaf ook geen resultaat.

Toen is plaatcultuur geprobeerd op gedroogde agaroppervlakken in een luchtledig gepompte exsiccator met pyrogallol of in de apparatuur volgens BOTKIN of SCHATTENFROH. Hierbij werden zeer mooie koloniëncultures verkregen, doch de koloniën waren nooit rein. Altijd werden in de koloniën kleine koloniën van de niet-vervloeiende boterzuurbacteriën gevonden. Men moet nl. ook weer zeer zwaar enten om enkele koloniën te krijgen. De geheele entstreep bevat dus massa's boterzuurbacteriën, waarvan slechts enkele tot kolonievorming komen. Dan echter wordt in het terrein van deze groeiende koloniën de reductietoestand ook geschikt voor de anders niet voor ontwikkeling vatbare bacteriën, waardoor onder de groote kolonie vele kleinere ontstaan.

Kweken in gelatine zonder suiker sloot ook de niet-vervloeiende soorten niet uit; vermoedelijk wegens aanwezigheid van vergistbare stof in den vleeschbouillon.

Na enkele pogingen is het isoleeren van deze soort opgegeven, voornamelijk daarom, wijl deze bacteriën toch geen lactaatvergistend vermogen bezitten. Men treft ze nooit in harde kaassoorten aan. Het zijn echte suikervergisters en wij mogen ze rekenen tot de groep der onbeweeglijke boterzuurbacteriën of tot het type *Clostridium Welchii*.

Hoewel ze voor consumptiemelk van belang zijn, behoeft de zuivelindustrie, voor wat betreft de kaasbereiding, zich over deze bacteriën niet bezorgd te maken.

De naam *Clostr. saccharobutyricum liquefaciens* is daarom goed in overeenstemming met de eigenschappen dezer bacteriesoort.

### IX. Niet-gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën.

In alle onderzochte stoffen zijn niet-vervloeiende boterzuurbacteriën aangetroffen. In totaal zijn méér dan de in hoofdstuk VII opgesomde 224 reïncultures gemaakt. Men heeft echter steeds eenig verlies bij het overenten, doordat de bacteriën zelfs in den zoo bij uitstek gunstigen glucosebouillon niet altijd aanslaan. Zoo waren b.v. van de oorspronkelijk uit melk geïsoleerde 87 stammen na 1½ jaar in cultuur houden 17 verloren geraakt en thans zijn er van de 224 stammen nog ettelijke verdwenen.

Op het uiterlijk beoordeeld, hebben de geïsoleerde stammen verschillende eigenschappen.

Er zijn er, welke na de gisting snel in de cultuurvloeistof bezinken, andere bezinken langzaam.

Het in de vloeistof bezonken bacterieneerslag is bij den eenen stam compact en aan den glaswand klevend, bij den andere los, wolkig en niet aan den wand klevend, het is wit of meer of minder geel.

In gelatine maken sommige stammen groote koloniën, andere slechts kleine koloniën.

De kleur der gelatinekoloniën is wit of geelachtig, soms zijn de koloniën violet. In het laatste geval is niet de geheele kolonie violet doch slechts een bolschil aan het oppervlak.

Er is verschil te constateeren in hoeveelheid geproduceerd gas tusschen de verschillende stammen.

Het ontstane gistingsgas is niet voor alle stammen brandbaar. D.w.z. dat er verschillen bestaan in de verhouding van de gevormde gassen koolzuur en waterstof.

Sommige bacteriën zijn slijmig, een enkele keer werd zelfs een bacterie gevonden, welke den bouillon geheel tot slijm maakte.

Verder zij nog medegedeeld, dat geen enkele van alle reïncultures aerob groeide.

De reïncultures zijn nu onderzocht op gistingseigenschappen. Het doel van ons onderzoek was immers te bepalen of de lactaatvergisting een specifiek verschijnsel van een speciale bacteriesoort is of dat er onder de gewone boterzuurbacteriën (*Clostr. saccharobutyricum*) enkele met lactaatvergistend vermogen voorkomen. Ook was het niet onmogelijk, dat de lactaatvergisting sterk afhankelijk is van de omstandigheden (b.v. reductiepotentiaal) en dat de eene stam gemakkelijker in staat zou zijn lactaat te vergisten dan de andere, hetgeen eveneens de tegenstrijdige literatuuropgaven zou kunnen verklaren.

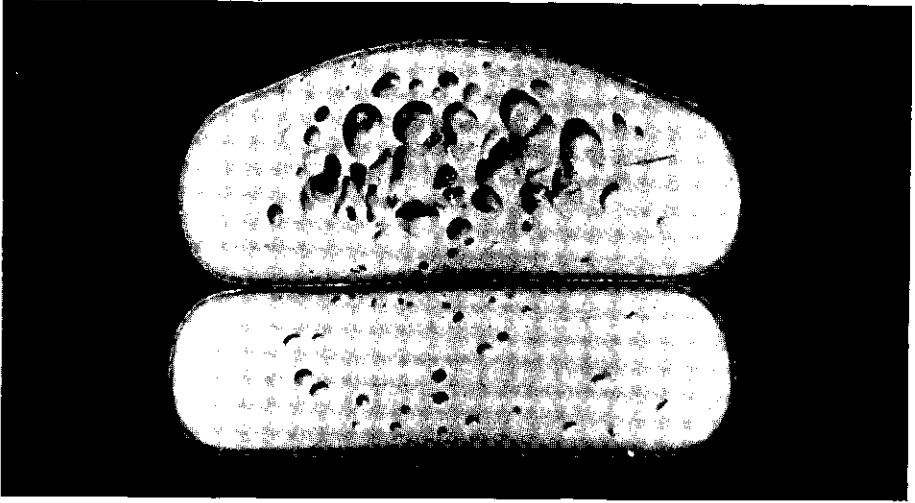


Fig. 1. Kaas bereid op 18 Mei 1934.

*Bovenste:* melk geënt met *Clostridium tyrobutyricum*, stam n°. 42.

*Onderste:* contrôlekaas, niet geënt met boterzuurbacteriën.

Geplaatst bij 18° C. op 2 Juni.

Opengesneden 15 Juni.

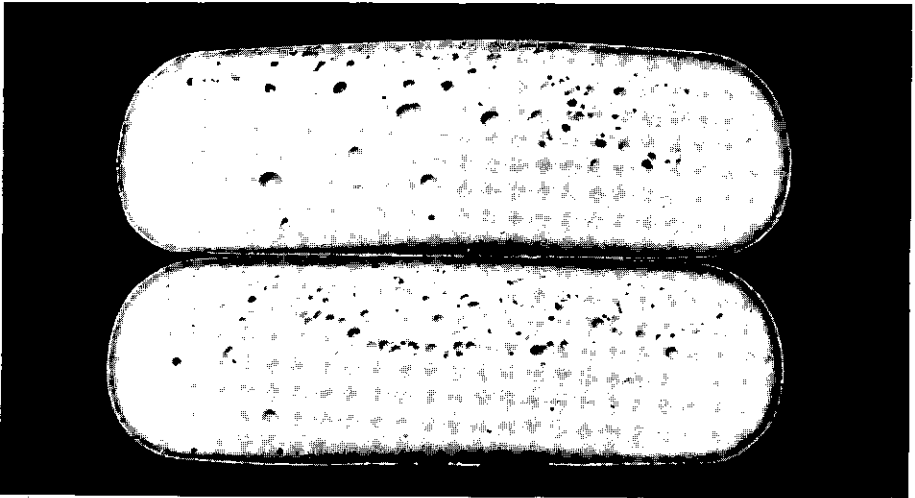


Fig. 2. Kaas bereid op 17 Mei 1934.

*Bovenste:* melk geënt met *Clostridium saccharobutyricum*, stam n°. 1.

*Onderste:* contrôlekaas, niet geënt met boterzuurbacteriën.

Geplaatst bij 18° C. op 2 Juni.

Opengesneden 15 Juni.



Fig. 3. Kaas bereid op 25 Mei 1934.

*Bovenste:* melk geënt met *Clostridium tyrobutyricum*, stam n°. 7.

*Onderste:* contrôlekaas, niet geënt met boterzuurbacteriën.

Geplaatst bij 18° C. op 8 Juni.

Opengesneden 6 Juli.

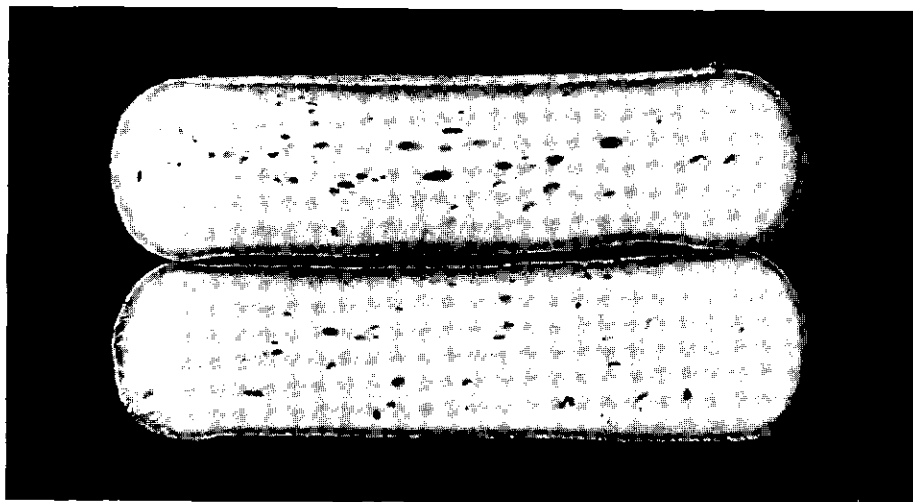


Fig. 4. Kaas bereid op 23 Mei 1934.

*Bovenste:* melk geënt met *Clostridium saccharobutyricum*, stam n°. S 28.

*Onderste:* contrôlekaas, niet geënt met boterzuurbacteriën.

Geplaatst bij 18° C. op 8 Juni.

Opengesneden 6 Juli.



### X. Onderzoek op lactaatvergistend vermogen.

We hebben reeds besproken, dat het verkrijgen van een lactaatvergisting zeer moeilijk is. In pepton-Ca-lactaat-voedingszouten-water gelukt de gisting slechts uiterst zelden, ook als men het Ca-lactaat vervangt door Na-lactaat. Door dit milieu reduceerend te maken met cysteine, ferrozouten of met behulp van reduceerende, niet-lactaat-vergistende bacteriën, wordt het resultaat beter, doch nog niet altijd slaan de bacteriën erin aan. Vervanging van pepton Witte in dezen bodem door pepton Poulenc bleek geen verbetering te geven.

Meestal verloopt de gisting goed in vleeschbouillon met  $\frac{1}{2}$  % pepton en  $1\frac{1}{2}$  à 2 % Ca-lactaat. Toch is deze bodem ons niet altijd goed bevallen. Vleeschbouillon is nog al wisselend van samenstelling, hij bevat altijd een weinig vergistbare stof, de eene keer meer, de andere keer minder. Men komt daardoor dikwijls tot verkeerde conclusies, zoodat het beter is ook dezen bodem niet te gebruiken. Er is nog getracht door kweeking van coli, gedurende 24 uren, deze voedingsbodem suikervrij te maken, maar ook nu nog was het al of niet verkrijgen van gisting niet betrouwbaar of reproduceerbaar.

Na vele vergeefsche en langdurige proeven werd ten slotte in gistautolysaat de beste bodem voor deze proeven gevonden. Lactaatvergistende boterzuurbacteriën gisten in gistautolysaat-lactaat uitstekend; niet-lactaatvergistende stammen maken geen gas, zoodat met dezen bodem scherp gedifferentieerd kan worden.

Wij bereiden deze cultuurvloeistof als volgt:

1 kg persgist wordt met 1 l leidingwater tot een pap gewreven. Deze pap wordt gedurende 7 uren onder af en toe roeren verwarmd op 37° C. in een waterbad. Dan wordt de temperatuur van het waterbad opgevoerd tot 50° à 51° C. en deze gedurende 24 uren constant gehouden (af en toe wordt omgeroerd). Indien het geringste spoor van rottingsgeur bemerkt wordt, moet men dit autolyseproces direct beëindigen, al is minder dan 24 uren op 50° C. verhit. Door zelfgisting en melkzuurgisting is nu de vloeistof van vergistbare suikerachtige stof bevrijd. Na het einde der autolyse wordt de massa gedurende 10 minuten gekookt, waarbij men vooral voorzichtig moet verhitten, omdat bij het begin van het koken de vloeistof sterk schuimt. Het tijdens de bewerking verdampde water wordt weer aangevuld door toevoeging van gedistilleerd water en dan wordt gefiltreerd door papierfilter (n°. 597. van SCHLEICHER en SCHÜLL). De geheele massa filtreert in één nacht door als men er 3 of 4 trechters met filters van 27 cm diameter naast elkaar voor gebruikt (vouwfilters). Als de bereiding goed gelukt is, is de pH van het verkregen filtraat ongeveer 5,4. Er wordt nu  $1\frac{1}{2}$  % Na-lactaat toegevoegd (de Na-lactaatpraeparaten in den handel zijn stroopen, welke 60 à 70 % Na-lactaat bevatten)

en de pH ingesteld op 5,8 à 6,0. We hebben aldus een zeer geconcentreerden voedingsbodem verkregen, welke afgetapt wordt in hoeveelheden van 8 cc in cultuurbuizen en gesteriliseerd bij 120° C. De reductietoestand in deze vloeistof is zeer goed, gaat echter bij bewaren achteruit; er ontstaat dan een zwart neerslag in de buizen. Men moet deze cultuurvloeistof dus versch gebruiken. Dit is natuurlijk niet altijd mogelijk en dan verdient het aanbeveling den voorraad te bewaren in een waterstofatmosfeer.

Na de enting met boterzuurbacteriën worden de buisjes luchtledig gepompt, dichtgesmolten en geplaatst bij 28° C. Lactaatvergistende boterzuurbacteriën vormen bij de gisting zooveel gas, dat in de buisjes een druk van 2 à 2½ atmosfeer ontstaat.

Hoewel de gistaautolysaat-lactaat-vloeistof de beste bodem is, komt het nog wel voor, dat de boterzuurbacteriën er niet in tot ontwikkeling komen, vooral reïncultures. Bij het onderzoek van reïncultures moet men dus niet te gauw een negatief gistingresultaat vertrouwen, doch de proef herhalen. Lukte het na drie keer nog niet om gisting in lactaat te verkrijgen, dan werd nog een keer geënt in gistaautolysaat-Na-lactaat, maar nu tezamen met een stam van *Bact. coli*. Indien de betreffende boterzuurbacteriënstam lactaat vergisten kan, krijgt men met *coli* samengeënt zeer zeker gisting. Men moet er echter op letten, dat in het geval van lactaatvergisting zeer zeker de 2 à 2½ atmosfeer druk aanwezig is, daar *coli* alleen in den bodem nog iets gas maakt.

Vindt men zelfs nu nog geen gistingsgas in de buizen, dan kan men er zeker van zijn, dat de betreffende stam niet in staat is lactaat te vergisten.

215 reïncultures werden door ons op deze wijze onderzocht: 104 gisten er bij de eerste enting, 35 bij de tweede en nog 4 bij de derde enting. De 72, welke toen nog niet in lactaat gegist hadden, werden met *coli* samengeënt in de lactaatvloeistof. Hiervan giste er nog slechts één, zoodat van de 215 reïncultures er 144 in staat waren lactaat te vergisten en 71 niet.

Het resultaat was als volgt:

TABEL I.

Geïsoleerd uit:	Opgehoopt in:	Lactaat vergist door:	Lactaat niet vergist door:
melk . . . . .	melk met melkzuur . .	3, 6—16, 19, 20, 22, 23, 26, 28— 30, 32—40, 121, 122, 124—126, 128, 129, 134, 135, 138, 141, 143—149	1, 2, 4, 5, 17, 18, 21, 24, 25, 27, 31, 120, 123, 127, 130, 131, 132, 133, 136, 137, 139, 140, 142.

Geïsoleerd uit:	Opgehoopt in:	Lactaat vergist door:	Lactaat niet vergist door:
meelsoorten . . .	het meel zelf . . . . .		101—111
gedroogde pulp .	de pulp zelf . . . . .		112, 113
grond . . . . .	glucose, zouten, krijt, water melk met melkzuur . . . . .	150—154 65—67, 69, 70, 74, 75	68, 71
	melk . . . . .	76, 77, 78	
	lactaat, daarna in vleesch- bouillon-lactaat . . . . .	58—64	56, 57
	lactaat, daarna in glucose- bouillon . . . . .	51	50
water . . . . .	glucose, zouten, krijt, water		155, 156
kaas . . . . .	glucose-galactose-bouillon ongepasteuriseerde pepton- Ca-lactaat . . . . .	K 1—K 9, K 13— K 32 K 10—K 12	
Kuilgras . . . . .	. . . . .	41—44, 46—49, 90—92, S 40, S 41, S 44	45, S 28—S 32, S 39, S 49—S 53
Mineraalzure si- lage . . . . .	. . . . .	S 1—S 4, S 7, S 8, S 10, S 11, S 14— S 16, S 18—S 21, S 23, S 24, S 34— S 38, S 42, S 43, S 46—S 48	S 5, S 6, S 9, S 12 S 13, S 22, S 25— S 27, S 33, S 45
hooi . . . . .	glucose-bouillon . . . . .	159	
Aardappelpulp .	. . . . .		157, 158
ingekulde bostel	. . . . .		S 54—S 56

### XI. Vergisting van lactose.

Deze was voor ons van bijzonder belang, juist met het oog op de waarde van de in hoofdstuk V besproken proef van WEINZIRL. Van onze kaasboter-

zuurbacteriën is reeds in hoofdstuk VI medegedeeld, dat zij in melk niet gisten. Dit kon beteekenen, dat zij het vermogen missen om lactose te vergisten of dat melk geen goede voedingsbodem voor deze bacteriën is. De lactosevergisting is daarom voor alle geïsoleerde boterzuurbacteriëncultures nader bestudeerd, vooral om na te gaan of het niet-gisten in melk een algemeene eigenschap van lactaatvergistende boterzuurbacteriën is.

Voor de lactosevergisting werden als voedingsvloeistoffen gebruikt gemengde volle melk en lactosepepton (water met voedingszouten, 1 % pepton Witte en 1 % lactose). Deze laatste bodem werd gekozen nadat eerst vele proefnemingen waren verricht met vleeschbouillon-lactose. Om dezelfde reden als bij de bespreking van den voedingsbodem voor lactaatvergisting werd uiteengezet, voldeed deze vloeistof niet. Wel is er verschil tusschen de hoeveelheid gistingsgas bij niet-lactosevergistende en wel-lactosevergistende stammen, doch dit verschil is slechts kwantitatief, zoodat het maken van een seherp onderscheid met behulp van een vleeschbouillonmedium niet betrouwbaar is. Ook door gebruik te maken van door coli vergisten vleeschbouillon werd de beoordeeling niet gemakkelijker. Ook is nog getracht gistautolysaat voor dit doel te gebruiken, doch ook dit is ongunstig. Blijkbaar bevat het zooveel melkzuur, dat er eenige lactaatvergisting in optreedt, welke de uitkomsten onzeker maakt.

Peptonoplossing is daarom voor dit doel beter, daar pepton Witte geen vergistbare koolstofbronnen bevat. Daar een peptonoplossing evenwel niet zoo'n gunstigen reductietoestand heeft als vleeschbouillon, waardoor de mogelijkheid bestond, dat gevoelige bacteriën zouden weigeren in deze vloeistof te groeien, hebben wij eerst bewezen, dat in pepton-koolhydraat-oplossing al onze boterzuurbacteriën tot ontwikkeling konden komen. Dit werd gedaan in pepton-glucose, waarin alle boterzuurbacteriënstammen flink gisten. Men dient er alleen voor te zorgen, dat de vloeistof een juisten zuurgraad bezit. De gunstigste pH voor boterzuurbacteriëngisting is 6; boven 7 groeien de meeste niet.

Bij deze proef is tevens bewezen, dat alle boterzuurbacteriën glucose vergisten.

Het onderzoek werd zóó uitgevoerd, dat de bacteriën eerst onderzocht werden in pepton-lactose-bodem. De niet-gistende werden daarna onderzocht met melk en diegene, welke ook dan nog niet gegist hadden, werden nogmaals geënt in pepton-lactose-oplossing. Ten overvloede herinneren wij er nogmaals aan, dat het aanbeveling verdient versche vloeistoffen te gebruiken of de cultuurvloeistoffen in een waterstofatmosfeer te bewaren.

In tabel II is het resultaat van de lactosevergisting door onze reïncultures vermeld.

TABEL II.

Geïsoleerd uit:	Lactose vergist door:	Lactose niet vergist door:
melk . . . . .	1, 2, 4, 5, 17, 18, 21, 24, 25, 27, 31, 120, 123, 127, 130, 132, 133, 136, 137, 139, 140, 142	3, 6—16, 19, 20, 22, 23, 26, 28—30, 32—40, 121, 122, 124—126, 128, 129, 134, 135, 138, 141, 143—149
meelsoorten . . . . .	101—111	
gedroogde pulp . . . . .	112, 113	
grond . . . . .	68, 71 56, 57 50	150—154 65—67, 69, 70, 74, 75 76—78 58—64 51
water . . . . .	155, 156	
kaas . . . . .		K 1—K 32
kuilgras . . . . .	45, S 28—S 32, S 39, S 41, S 49—S 53	41—44, 46—49, 90—92, S 40, S 44
mineraalzure silage . . . . .	S 5, S 7, S 9, S 11, S 12, S 14— S 16, S 22, S 25—S 27, S 33, S 45, S 46	S 1—S 4, S 6, S 8, S 10, S 13, S 17—S 21, S 23, S 24, S 34— S 38, S 42, S 43, S 47, S 48
hooi . . . . .		159
aardappelpulp . . . . .	157	158
ingekuilde bostel . . . . .	S 54—S 58	

Er is dus evenals bij de lactaatvergisting een scherp onderscheid tusschen niet- en wèl-lactosevergistende boterzuurbacteriën. Het meest opvallende is nu, dat bij vergelijking van tabel I met tabel II blijkt, dat *een lactaatvergistende bacterie geen lactose vergist en een lactosevergistende bacterie geen lactaat*.

In de tabellen zal men slechts enkele uitzonderingen op dezen regel vinden. Deze betreffen de bacteriën: 131, 158, S 6, S 7, S 11, S 13—S 17, S 41, S 46, S 57 en S 58.

De bacteriën 158, S 6 en S 13 hebben niet gegist in beide bodems, de nummers S 17, S 57 en S 58 waren inmiddels te gronde gegaan, zoodat de lactaatvergisting niet onderzocht kon worden,

reincultuur 131 is door toevallige omstandigheden niet in lactose onderzocht,

de nummers S 7, S 11, S 14—S 16, S 41 en S 46 hebben zoowel in lactaat als in lactose gegist.

Het is dus slechts een zeer klein percentage, dat zich buiten den algemeenen regel gedragen heeft en we behoeven er niet aan te twijfelen, dat deze uitzonderingen veroorzaakt worden doordat deze bacteriën onrein waren. Hiervoor spreekt dat zij alle afkomstig waren uit silages, waarvan in hoofdstuk VII reeds medegedeeld is, dat hierbij minder zorg aan de reincultiveering werd besteed, omdat de cultures zoo spoedig rein leken te zijn. Overigens is nog getracht om bij enkele van deze uitzonderingen door nog verdere gelatinecultuur een scheiding te bewerkstelligen. Inderdaad werden uit enkele van deze nog bacteriën gekweekt, welke lactose wél en lactaat niet vergistten, zoodat het buiten twijfel is, dat de niet-ervloeiende boterzuurbacteriën gesplitst kunnen worden in twee scherp onderscheiden groepen, n.l. lactaatvergistende en lactosevergistende.

## **XII. Vergisting van andere koolhydraten en koolhydraatachtige stoffen.**

Behalve de lactosevergisting is ook met alle stammen onderzocht of zij in staat waren saccharose, zetmeel, maltose, galactose, laevulose en manniet te vergisten.

Dit wordt weer het beste gedaan in een pepton-voedingszouten-oplossing, zooals bij de lactosevergisting beschreven werd. Gekweekt werd als gewoonlijk in luchtledig gepompte, dichtgesmolten buisjes. Alle cultures, ook die in lactaat en lactose, werden dagelijks gecontroleerd om te zien of gisting zichtbaar was en ten overvloede werden de buisjes, na 1 maand bij 28° gestaan te hebben, onder water opengemaakt om de aan- of afwezigheid van gistinggas aan te toonen.

Indien een negatief resultaat werd verkregen, werd de proef nog eens herhaald. We kregen nu het volgende resultaat. Saccharose, zetmeel, maltose en manniet werden alleen vergist door die boterzuurbacteriën, welke lactose vergisten. De lactaatvergistende boterzuurbacteriën tasten deze stoffen dus niet aan.

Glucose werd, zooals reeds eerder opgemerkt is, door alle reincultures vergist.

Laevulose werd vergist door bijna alle stammen, behalve 9, 11, 29, 36,

38, 39, 40, 41, 44, 77, 92, 122, 125, 132, 145, 147, 149, 152, 154, S 1, S 9, S 13, S 21, S 24, S 35, S 40, S 42, S 43, S 44, S 45, S 48, K 23, K 29; dit zijn alle lactaatvergisters, behalve 132, S 9, S 13 en S 45.

Galactose werd vergist door bijna alle lactosevergisters en een aantal lactaatvergisters. Van de lactaatvergisters gisten in galactose n.l. alleen: 3, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 26, 33, 121, 124, 134, 143 en 145.

Van de lactosevergisters werd galactose niet vergist door: S 9, al moet hierbij gezegd worden, dat een negatief gistingresultaat niet dezelfde bewijskracht heeft als een positief resultaat bij deze bacteriën, welke dikwijls zoo moeilijk tot groei zijn te brengen.

Arabinose werd door de lactosevergisters vergist. Van de lactaatvergisters vergistten van de onderzochte stammen er 90 niet en 44 wel arabinose.

TABEL III.

Gisting in arabinose door de lactaatvergisters:	Geen gisting in arabinose door de lactaatvergisters:
3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 26, 33, 36, 38, 41, 42, 59, 62, 63, 64, 74, 75, 76, 77, 92, 121, 124, 126, 134, 138, 143, 145, 147, 148, 151, 153, S 3, S 4, S 10, S 34, S 40, S 44	19, 20, 28, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 40, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 51, 58, 60, 61, 65, 66, 67, 69, 70, 78, 90, 91, 122, 125, 128, 129, 135, 141, 144, 146, 149, 150, 152, 154, 159, S 1, S 2, S 8, S 18, S 19, S 20, S 21, S 23, S 24, S 35, S 36, S 37, S 38, S 42, S 43, S 47, S 48; alle gemerkt K.

We zien hier in zooverre verband met de galactosevergisting, dat de lactaatvergisters, welke in galactose gisten, eveneens in arabinose gisten. In hoeverre hierop een nadere onderverdeling gebaseerd kan worden is niet verder onderzocht. Het is trouwens ook de vraag of deze eenig practisch nut zou hebben.

Niet alle, doch een groot aantal der reïncultures werd nog onderzocht op het vermogen tot vergisting van Mannose, Xylose, Dulciet, Sorbiet, Raffinose, Rhamnose, Dextrine, Inuline, Glycerine, waarbij bleek, dat rhamnose en glycerine door geen enkelen stam werden vergist en dat de andere genoemde stoffen alleen werden vergist door lactosevergisters en niet door lactaatvergisters.

Aan het einde van dit hoofdstuk vermelden wij in tabel IV als demonstratie hoe scherp het onderscheid tusschen lactaat- en lactosevergisters is een extract uit de verrichte gistingproeven.

TABEL IV.

Rein- cultuur N <sup>o</sup> .	Gisting in										
	glu- cose.	lac- taat.	lac- tose.	saccha- rose.	mal- tose.	zet- meel.	man- niet.	xylose.	sor- biet.	raffi- nose.	man- nose.
1	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
49	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
61	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
71	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
122	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
150	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S 28	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S 33	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+
S 35	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S 43	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S 53	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+
K 1	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K 17	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K 30	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

We hebben hier bovendien met een constante eigenschap te doen. Van een groot aantal der geïsoleerde bacteriën zijn de bovenbeschreven gistingproeven n.l. gedaan in 1932 en in 1934. Het gedrag van beide soorten ten opzichte van de ter vergisting geboden koolstofverbindingen was evenwel niet veranderd. De suikervergisters bleven weigeren lactaat te vergisten, de lactaatvergisters tastten ook na 2 jaar nog geen disacchariden aan.

### XIII. *Clostridium tyrobutyricum*.

Uit de hoofdstukken X, XI en XII kunnen we concludeeren, dat de groep der niet vervloeiende boterzuurbacteriën uit twee wel onderscheiden soorten



bestaat. De eene soort is een typische suikervergister, de andere een typische lactaatvergister.

Voor de eene soort is het logisch om den naam *Clostridium saccharobutyricum* te behouden, daar deze naam de hoofdeigenschap der suikervergisting duidelijk aangeeft.

*Clostridium saccharobutyricum* vergist dus: glucose, laevulose, galactose, mannose, saccharose, lactose, maltose, zetmeel, raffinose, arabinose, xylose, dextrine, dulciet, sorbiet, manniet en inuline en vergist niet: lactaat, glycerine en rhamnose.

(De in hoofdstuk IX genoemde bacteriën, welke in gelatine koloniën vormen met violette bolschil, behooren altijd tot deze groep).

In deze groep behoort ook *Clostr. butylicum*. De uit meel geïsoleerde stammen geurden b.v. zeer sterk naar butylalkohol; aan andere daarentegen konden wij geen butylalkoholgeur constateeren, terwijl de meeste eenigermate dezen geur vertoonden.

Voor de groep der lactaatvergistende boterzuurbacteriën meenen wij den naam *Clostridium tyrobutyricum* te moeten kiezen. Deze naam geeft duidelijk aan, dat het bij deze bacteriënsoort gaat om boterzuurbacteriën, welke voor kaas belangrijk zijn (*τυρος* = kaas). Wij konden er ook BEYERINCK's naam „lactobutyricum” voor kiezen. Wij hebben evenwel gemeend, dit niet te moeten doen, daar het niet zeker is, dat BEYERINCK een reïncultuur van lactaatvergistende boterzuurbacteriën in handen heeft gehad (vgl. den door BEYERINCK beschreven overgang in *subtilis*) en bovendien omdat de naam *lactobutyricum* verwarring kan stichten, daar deze naam verwantschap vertoont met het woord „lactose” en dus misverstaan kan worden. De lactaatvergister vergist immers geen lactose.

*Clostridium tyrobutyricum* vergist glucose en lactaat. De meeste stammen vergisten ook laevulose en sommige galactose en arabinose. Daarentegen wordt door geen der stammen vergist: mannose, saccharose, lactose, maltose, zetmeel, raffinose, xylose, dextrine, dulciet, sorbiet, manniet, glycerine, rhamnose en inuline.

Dat de door ons gekozen naam reden heeft en dat de onderscheiding der twee groepen boterzuurbacteriën van groot belang is voor de kaasbereiding is nader aangetoond met kaasproeven, waarbij de kaasbakmelk geënt werd met reïncultures uit onze collectie. Er werd in twee bakken gekaasd; in den eenen bak werd melk verkaasd zonder toevoeging van een boterzuurbacteriëncultuur, in den anderen met toevoeging van een één maand oude bouillon-cultuur van een boterzuurbacterie, hetzij een lactaatvergister, hetzij een suikervergister.

De suikervergisters hebben nooit gasontwikkeling in de kaas teweeggebracht,

de lactaatvergisters daarentegen hebben in de kaas, wanneer deze bij 18° C bewaard werd, altijd het gebrek laat-los of knijper veroorzaakt, zij het, dat niet alle lactaatvergistende stammen even fel in hun werking waren. Eenige hierachter afgedrukte fotografieën demonstreeren duidelijk de gevaarlijkheid van *Cl. tyrobutyricum* en de onschadelijkheid van *Cl. saccharobutyricum* voor de kaasbereiding.

Beide soorten, zoowel *saccharobutyricum* als *tyrobutyricum*, vormen uit glucose boterzuur, *tyrobutyricum* gewoonlijk meer dan *saccharobutyricum*. Bij *saccharobutyricum* wordt méér boterzuur gevormd, naarmate de cultuur minder naar butylalkohol geurt.

Hieronder volgen nog enkele analyses van het gehalte aan boterzuur in een uitgegiste cultuur, bepaald volgens de destillatiemethode<sup>1)</sup>: door 50 cc met 40 cc water en 20 cc n/l zwavelzuur te destilleeren en na iedere portie van 30 cc het oorspronkelijk volume in de destillatiekolf te herstellen met warm water.

TABEL V.

Gekweekt in:	Rein- cultuur N°.	Bacteriesoort.	% boterzuur.	% azijnzuur.	pH van de cultuur.
Glucosebouillon <sup>2)</sup>	3	<i>tyrobutyricum</i>	0,57	0,11	4,59
"	S 19	"	0,40	0,05	4,94
"	6	"	0,55	0,025	4,66
"	90	"	0,42	0,04	4,91
"	30	"	0,48	0,02	4,83
"	K 1	"	0,30	0,10	4,82
"	K 27	"	0,52	0,03	4,78
"	K 21	"	0,45	0,07	4,82
"	1	<i>saccharobutyricum</i>	0,04	0,06	5,39
"	4	"	0,34	0,04	5,11
"	17	"	0,19	0,11	5,22
"	71	"	0,12	0,09	4,69
"	101	"	0,10	0,17	5,26
"	130	"	0,46	0,03	5,05
"	S 22	"	0,17	0,08	4,58

<sup>1)</sup> Zie VAN BEYNUM, De bepaling van vluchtige vetzuren volgens de destillatiemethode. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij 1932. Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 39 C (1933), 57.

<sup>2)</sup> PH van den ongeenten bouillon 6,0.

#### XIV. Het gebruik van de proef van Weinzirl.

Het bovenstaande onderzoek naar de eigenschappen van de in de natuur voorkomende boterzuurbacteriën maakt het duidelijk, dat men de reeds in hoofdstuk V beschreven proef van WEINZIRL niet mag gebruiken voor de contrôle van melk op bruikbaarheid voor de kaasbereiding. Theoretisch is een dergelijk gebruik van deze proef geheel ontoelaatbaar. Bij de oorspronkelijke uitvoering van deze proef toch hoopen zich in de te onderzoeken melk de volgende bacteriën op:

1. Rottingsbacteriën.
2. Vervloeiende boterzuurbacteriën.
3. Suikervergistende niet-vervloeiende boterzuurbacteriën (*Clostr. saccharobutyricum*).

Deze bacteriën kunnen nl. uitstekend groeien van de in de melk hun geboden koolstof- en stikstofbronnen. *Clostr. tyrobutyricum* daarentegen kan niet in melk groeien, tenzij andere bacteriën door hydrolyse van de melk-suiker glucose doen ontstaan. Blijkbaar is dit eenigermate het geval, daar men uit boterzuurgistingen in melk ook lactaatvergistende boterzuurbacteriën kan isoleren.

Bij het onderzoek toont men op deze wijze dus juist de niet voor kaas gevaarlijke boterzuurbacteriën aan. In de gistingen komt eventueel *tyrobutyricum* slechts dank zij toevallige omstandigheden voor. Is de melk zwaar besmet met alleen *tyrobutyricum*, dan toont men zelfs geen boterzuurbacteriën aan, terwijl zulke melk juist uiterst gevaarlijk voor de kaasmakerij is. Dit extreme geval is practisch zeer goed mogelijk en vermindert ook de waarde van WEINZIRL's proef, als men deze wenscht te gebruiken in zijn eigenlijke beteekenis (het aantoonen van faecale besmetting).

Men kan de proef verbeteren door aan de melk glucose toe te voegen om ook de ontwikkeling van *tyrobutyricum* mogelijk te maken. Wil men alleen naar boterzuurbacteriën zoeken, dan voege men bovendien melkzuur toe in de reeds in hoofdstuk V genoemde concentratie, daar hierdoor de ontwikkeling van rottingsbacteriën geremd wordt.

#### XV. Het voorkomen en het aantoonen van de twee types niet-vervloeiende boterzuurbacteriën.

Het onderzoek heeft tegelijkertijd aangetoond, dat *Cl. saccharobutyricum* en *Cl. tyrobutyricum* beide zeer verspreid in de natuur voorkomen. Vergelijken we het aantal geïsoleerde stammen lactaatvergisteters met het aantal verkregen

stammen suikervergisters, dan zou men geneigd zijn te denken, dat de lactaatvergisters zelfs in de meerderheid zijn. Deze conclusie wenschen wij echter niet te trekken, daar bij de ophoeringsproeven dikwijls speciaal naar lactaatvergisters is gezocht. Bovendien is het gebleken, dat *Cl. saccharobutyricum* veel gevoeliger is dan *Cl. tyrobutyricum*, zoodat wij in onze verzameling reïncultures van beide soorten de *saccharobutyricum* stammen sneller verliezen dan de *tyrobutyricum* stammen. Dit geschiedt ook in de ruwcultures, zoodat men uit menige gemengde cultuur, tengevolge van den langen duur van de reïncultiveering, ten slotte alleen maar de *tyrobutyricum* isoleert.

*Cl. tyrobutyricum* is eigenlijk altijd gevonden, behalve in typisch suiker- of zetmeelachtige stoffen. Meel en gedroogde pulp hebben daarom alleen stammen van *Cl. saccharobutyricum* gegeven.

Het is van groot belang voor de zuivelindustrie te weten of een stof lactaatvergistende boterzuurbacteriën bevat. De suikervergistende boterzuurbacteriën zijn immers voor de kaasmakerij van geen belang. Welke methodes staan ons nu ter beschikking om de gevaarlijke *Cl. tyrobutyricum* aan te toonen? Een rechtstreeksch aantoonen is helaas niet mogelijk. Door de aanwezigheid van rottingsbacteriën zijn we altijd genoodzaakt een suikermilieu voor de ophooping te bezigen en hierin ontwikkelt zich ook de ongevaarlijke *saccharobutyricum*. We moeten hiervoor evenwel altijd een glucosebodem nemen, daar deze de *tyrobutyricum* ook ophooft. In verband hiermede wijzen wij op de methode RUSCHMANN<sup>1)</sup>, waarbij aardappelpap wordt aanbevolen voor het aantoonen van boterzuurbacteriën. Het is wel duidelijk, dat het niet juist is om deze te gebruiken, daar aardappelpap een zetmeelbodem is, welke wel *Cl. saccharobutyricum* tot ontwikkeling laat komen, doch niet *Cl. tyrobutyricum*, tenzij toevallig, door een bacterieele hydrolyse van het zetmeel tot glucose. Leest men het betreffende artikel van RUSCHMANN en HARDER na, dan kan men uit het verloop der door hen genomen proeven dikwijls besluiten of de onderzochte stof *Cl. tyrobutyricum* of *saccharobutyricum* bevatte. In hun tabel 5 op blz. 18 zien we b.v. in proef 1 geen gisting in aardappelpap en in aardappelpap met saccharose, wel daarentegen met glucose. Hier heeft de te onderzoeken stof (silovoeder) dus lactaatvergisters bevat. Bij proef 2 blijft het resultaat onbeïnvloed door glucosetoevoeging, waaruit we concludeeren, dat de hoofdflora uit suikervergistende boterzuurbacteriën moet hebben bestaan. Uit tabel 6 kunnen we besluiten, dat in het „Rieselfeldergras mit Melasse” een mengsel van suiker- en lactaatvergisters aanwezig was en in het „Rieselfeldergras ohne Melasse” in hoofdzaak suikervergisters aanwezig waren.

<sup>1)</sup> G. RUSCHMANN und L. HARDER, Die Buttersäuregärung im Silofutter und der Nachweis ihrer Erreger. *Die Futterkonservierung*, 3 (1931), 1.

Weldra hopen wij in een artikel, speciaal gewijd aan ensileeringsvraagstukken, te beschrijven hoe juist bij de groenvoederconserveering de nu verkregen kennis over boterzuurbacteriën van belang is en verhelderend werkt bij de studie der ensileeringsproblemen.

Keeren we thans terug tot de bespreking der techniek van het onderzoek op boterzuurbacteriën.

Het beste is dus de te onderzoeken stof te enten in een glucosebodem en wel glucose-vleeschbouillon, welke bodem sterk electief is voor boterzuurbacteriën, hierna luchtledig te pompen, dicht te smelten en te pasteuriseeren. Dikwijls mislukt de ophooping der boterzuurbacteriën ten gevolge van de ontwikkeling van rottingsbacteriën, doch in de meeste gevallen slaagt zij. De aldus verkregen ruwcultuur kan nu (indien zij vrij is van rottingsbacteriën) onderzocht worden door over te enten in twee cultuurvloeistoffen, waarvan de eene alleen ontwikkeling van tyrobutyricum en de andere alleen van saccharobutyricum toelaat.

Voor den eenen bodem gebruike men gistautolysaat-Na-lactaat, waarvan de bereiding in hoofdstuk X is medegedeeld. Hiermede spoort men de lactaatvergisters op; *Cl. saccharobutyricum* ontwikkelt zich hierin niet.

Voor den anderen bodem zou lactose-pepton gebruikt kunnen worden, doch is hierin gevaar gelegen wegens de mogelijkheid van suikerhydrolyse. We moeten dus een koolstofbron kiezen, welke niet vatbaar is voor hydrolyse en waarin *Cl. tyrobutyricum* niet groeit en niet gist. Wij gebruiken hiervoor mannietpepton (water, voedingszouten, 1 % pepton Witte, 1 % manniet), hetgeen ons zeer goed voldaan heeft. Het resultaat van de enting der eerst-verkregen ruwcultuur in deze beide bodems wordt als volgt geïnterpreteerd:

Gistingresultaat in		In de onderzochte stof is aanwezig:
Mannietpepton.	Gistautolysaat-Na-Lactaat.	
+	—	<i>Cl. saccharobutyricum</i>
—	+	<i>Cl. tyrobutyricum</i>
+	+	<i>Cl. tyrobut.</i> en <i>Cl. saccharobut.</i> beide

Men moet hierbij bedacht zijn op de vervloeiende boterzuurbacterie, daar deze misschien ook manniet vergisten kan. Het is echter niet aan te bevelen een gelatinecultuur te maken en hiervan enkele koloniën te onderzoeken op gisting in manniet en lactaat, daar men bij het afenten van koloniën te veel van het toeval afhankelijk is.

Het verdient aanbeveling te beoordeelen of gisting is opgetreden door opening der buizen onder water, om aldus al of geen gasdruk aan te toonen. Dit is beter dan het constateeren van gistingsgasbelletjes, daar vooral in maniet de gisting soms zóó langzaam verloopt, dat geen gasbelletjes worden waargenomen. Ook controleere men den geur der cultures, daar de aanwezigheid van rottingsgeuren het onderzoek waardeloos maakt, daar rottingsbacteriën ook gas maken uit eiwitachtige stoffen.

## KORTE SAMENVATTING.

Boterzuurbacteriën zijn voor het zuivelbedrijf zeer belangrijk, daar zij gevaarlijke kaasgebreken kunnen veroorzaken (laat-los en knijper). De boterzuurgisting in kaas is een vergisting van lactaat. In de algemeene bacteriologische literatuur vindt men slechts een verwarrend beeld over de gistingseigenschappen der in de natuur voorkomende boterzuurbacteriën.

De lactaatvergisting is wel bekend, doch is nooit voorwerp geweest van doelbewust onderzoek, hetgeen ongetwijfeld te wijten is aan het moeilijk verkrijgen van een lactaatvergisting. Daarom is de suikervergistende boterzuurgisting meer bekend. De op dit gebied heerschende onzekerheid is voor ons aanleiding geweest de in de natuur voorkomende boterzuurbacteriën nader te bestudeeren.

Uit verschillende stoffen werden boterzuurbacteriën geïsoleerd en deze zijn met veel moeite en ten koste van veel tijd in reïncultuur gebracht. Wij verkregen 215 reïncultures, welke op gistingseigenschappen zijn onderzocht. De lactaatvergisting werd onderzocht met gistaautolysaat-Na-lactaat, de vergisting van verschillende suikers in pepton-suiker-oplossing.

Er bleken nu 2 types van niet-gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën te zijn, nl.:

1°. Lactaatvergistende, waarvan alle stammen glucose en lactaat, de meeste laevulose en sommige galactose en arabinose vergisten. Mannose, saccharose, lactose, maltose, zetmeel, raffinose, xylose, dulciet, sorbiet, manniet, dextrine, glycerine, rhamnose en inuline worden niet vergist.

2°. Suikervergistende, waarvan alle stammen glucose, laevulose, galactose, mannose, saccharose, lactose, zetmeel, maltose, raffinose, xylose, arabinose, dulciet, sorbiet, manniet, dextrine en inuline vergisten. Lactaat wordt door deze niet vergist, evenmin als glycerine en rhamnose.

Het zijn de bacteriën der eerstgenoemde soort, die wegens het vermogen tot lactaatvergisting de gebreken „laat-los” en „knijper” in kaas veroorzaken. Deze soort hebben we daarom *Clostridium tyrobutyricum* genoemd.

De bacteriën, behoorende tot de tweede soort zijn ongevaarlijk voor kaas en omdat deze overeenkomen met de in de literatuur beschreven boterzuurbacteriën hebben we hiervoor den naam *Clostridium saccharobutyricum* behouden.

De boterzuurbacteriën zijn dus als volgt scherp te verdeelen:

## Boterzuurbacteriën

Gelatine-vervloeiende	Gelatine niet-vervloeiende	
type <i>Cl. Welchii</i> of <i>Cl. saccharobutyricum liquefaciens</i> .	Lactaatvergisten- de <i>Cl. tyrobuty- ricum</i> .	Suikervergistende <i>Cl. saccharobuty- ricum</i> .

Er werd op gewezen, dat het met het oog op de kaasmakerij van belang is, bij het onderzoek naar de aanwezigheid van boterzuurbacteriën, juist speciaal op het voorkomen van lactaatvergistende bacteriën te letten. Bij de gewoonlijk gebruikte onderzoekingsmethododes worden meestal beide groepen aangetoond en bij sommige methododes zelfs in hoofdzaak alleen de suikervergistende.

Daarom onderzoekte men de stof met een glucosebevattenden voedingsbodem en ente de verkregen ruwcultuur in mannietpepton en in gistaulysaat-Na-lactaat. In den eerstgenoemden bodem kunnen nl. alleen suikervergistende boterzuurbacteriën gisten, in den laatstgenoemde alleen lactaatvergistende.

Over de proef van WEINZIRL werden enkele opmerkingen gemaakt. Deze proef mag niet gebruikt worden om hiermede de voor kaas gevaarlijke *Cl. tyrobutyricum* aan te toonen, daar deze, omdat hij lactose niet vergist, in melk slechts door toevallige omstandigheden kan groeien. Bij de proef van WEINZIRL worden aangetoond: rottingsbacteriën, gelatine-vervloeiende boterzuurbacteriën en niet-vervloeiende boterzuurbacteriën. Wil men de proef gebruiken voor het aantoonen van boterzuurbacteriën alleen dan verdient het aanbeveling 2 à 3 cc n/1 melkzuur per 100 cc toe te voegen en tevens 1 % glucose om den groei van *Cl. tyrobutyricum* mogelijk te maken. Treedt er nu gisting op dan is het nog niet zeker dat de betreffende melk ondeugdelijk voor de kaasbereiding is daar zelfs de aldus gemodificeerde methode ook de onschadelijke *Cl. saccharobutyricum* tot ontwikkeling doet komen.

Gebruikt men de proef van WEINZIRL voor het aantoonen van faecale besmetting, dan is het nuttig om glucose toe te voegen opdat ook *Cl. tyrobutyricum* kan groeien.



## SUMMARY.

**Sugar-fermenting and lactate-fermenting butyric acid bacteria.**

Butyric acid bacteria ferment carbohydrates and produce butyric acid, as indicates the name *Clostridium saccharobutyricum*. There are strains which form butanol from carbohydrates (*Cl. butylicum*).

In general bacteriology very little is known about the fermentation of lactates or lactic acid by butyric acid bacteria. Dairy bacteriologists however are acquainted with this process. The subsequent blowing of cheeses of Emmental, Gouda or Edam type is caused by butyric acid bacteria. When this unwelcome fermentation in cheese takes place all sugar has already been changed into lactic acid by the action of lactic acid bacteria, the only carbon source for the butyric acid fermentation thus being calciumlactate.

A lactate-fermentation is not easily accomplished, but BOEKHOUT and VAN BEYNUM have been able to obtain such a fermentation in a lactate-beef-broth. In a solution of peptone-Ca-lactate no fermentation takes place, unless a reducing substance (ferric salts, cystein, indifferent bacteria, e.g. coli or lactic acid bacteria) be added.

A review of literature about butyric acid bacteria shows, that there is no distinct differentiation in this group of bacteria. The systems of various authors do not agree and especially a better knowledge of the bacteria fermenting lactate is wanting. The best system is still that of GRASSBERGER and SCHATTENFROH. These authors distinguish two groups:

A. gelatin-liquefying, sugar-fermenting bacteria, non motile, called *Granulobacillus saccharobutyricus immobilis liquefaciens*.

B. Gelatin not liquefying, sugar-fermenting bacteria, motile, called *Granulobacillus saccharobutyricus mobilis non liquefaciens*.

It is unknown whether the bacteria of the non-liquefying group do ferment lactates and nothing is known about the relation between lactate- and sugar-fermentation.

We have isolated about 200 strains of butyric acid bacteria from various origins (milk, flour, soil, ensiled grass, cheese, water). For the isolation a butyric acid fermentation was started by inoculation of these materials in an elective medium, such as dextrose-beef-broth, milk, acidified milk (acidified to check the growth of putrefactive bacteria) and acidified milk with dextrose.

All experiments were made in glass tubes. After the inoculation a part of the tube was drawn to a capillar and the tube was evacuated with the aid of a vacuum-oil-pump. A pasteurisation only took place after the inoculation of the raw materials to kill the non spore-forming organisms.

After the fermentation was finished the culture was inoculated into dextrose-beef-broth and from this gelatin-cultures were made. A culture was only regarded as pure after 4 or 5 times cultivating in gelatin. One must have much patience in making pure cultures of butyric acid bacteria. The colonies in gelatin are often impure.

In milk were found a great number of gelatin-liquefying butyric acid bacteria. These are not studied, because they have no importance for the cheese-maker. We have never been able to detect a liquefying butyric acid bacterium in Edam- or Gouda cheese.

The non-liquefying bacteria have been studied with regard to their fermentation-properties.

The fermentation of carbohydrates and allied substances was determined with a solution of 1 % peptone-Witte and nutrient salts, the fermentation of lactates with yeast-autolysate (concentrated) and 1½ % Na-lactate.

We could distinguish two typical groups:

1. One group of bacteria fermented: dextrose, fructose, galactose, mannose, saccharose, lactose, maltose, starch, xylose, arabinose, raffinose, dulcitol, sorbitol, mannitol, dextrin, inulin.

These bacteria did not ferment lactates, glycerol and rhamnose.

2. The other group fermented: dextrose and lactates.

Most of the strains of this group fermented fructose and some of them galactose and arabinose.

Mannose, saccharose, lactose, maltose, starch, xylose, raffinose, dulcitol, sorbitol, mannitol, dextrin, glycerol, rhamnose and inulin were not attacked.

The first group consists of the bacteria, called *Clostridium saccharobutyricum* (sugar fermenting butyric acid bacteria).

For the second group (lactate fermenting butyric acid bacteria) we have chosen the name *Clostridium tyrobutyricum* (τυροσ = cheese), because it is this species, which causes subsequent development of gas in cheese.

*Cl. saccharobutyricum* is not dangerous in cheesemaking.

This was proved by making cheeses with the addition of cultures of *Cl. saccharobutyricum* and *Cl. tyrobutyricum* respectively. In all cases the results were very striking, *Cl. tyrobutyricum* causing subsequent blowing and *Cl. saccharobutyricum* not.

*Cl. tyrobutyricum* does not thrive in milk, because it does not ferment lactose; development in milk is only possible when other kinds of bacteria are present, which produce dextrose by hydrolysis of the lactose.

Especially for cheesemaking it is of very great importance to know whether the butyric acid bacteria in milk or other substances connected with dairy industry (e.g. ensiled fodder) belong to the group of *Cl. tyrobutyricum* or not.

Butyric acid bacteria can only be detected by inoculating the substance to be examined into a carbohydrate medium. The following media may be used:

Dextrose-beef-broth in which both types of butyric acid bacteria grow well, or

Milk to which has been added 1 % dextrose to enable the growth of *Cl. tyrobutyricum* and 2—3 cc of n/1 lactic acid per 100 cc to check the growth of putrefactive bacteria.

It is not possible to make use of a lactate medium, because this is more elective for putrefactive bacteria.

The raw-culture thus obtained may contain sugar-fermenting or lactate fermenting butyric acid bacteria or both. To determine which species is present it is inoculated into mannitol-peptone and into yeast-autolysate-sodium-lactate (pH 6).

When a putrefactive odour is absent the result of this fermentation experiment may be interpreted as follows:

Fermentation in		Species present.
Peptone-mannitol.	Lactate medium.	
+	—	<i>Cl. saccharobutyricum</i>
—	+	<i>Cl. tyrobutyricum</i>
+	+	Both

It is not allowed to use a disaccharide for the differentiation of the butyric acid bacteria because of possible hydrolysis. Thus mannitol has been chosen. In mannitol-medium however the fermentation is not always visible. Therefore it is advisable to open the fermentation tubes under water to detect the presence or absence of gas.

With the WEINZEL test are detected: putrefactive bacteria, non liquefying and liquefying butyric acid bacteria. When acidified milk is used only butyric acid bacteria develop; addition of dextrose is necessary to make this medium apt for *Cl. tyrobutyricum*. However it is not allowed to use this test for determining whether the milk is dangerous for cheesemaking as *Cl. saccharobutyricum* may be the only butyric acid bacterium present.