

TAKSONOMIE VAN MELKSUURBAKTERIEE GEASSOSIEER  
MET VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE

deur

ELIZABETH SUSANNA GERBER (neé VISSER)

LEIER : Prof. W.H. Holzapfel

DEPARTEMENT : Mikrobiologie en Plantpatologie

GRAAD WAARVOOR  
VERHANDELING

INGEDIEN IS : M.Sc. (Agric.) MIKROBIOLOGIE

JUNIE 1984

Ek verklaar dat die verhandeling wat hiermee vir die graad M.Sc. (Agric.) aan die Universiteit van Pretoria deur my ingedien word, nie eerder deur my vir 'n graad aan enige ander Universiteit ingedien is nie.



2.3	Melksuurbakterieë in assosiasie met vakuumverpakte vleisprodukte	22
2.4	Standaarde en riglyne vir mikrobiologiese kwaliteit van verwerkte vleis	27
2.4.1	Definisies	27
2.4.2	Bestaande riglyne	28
HOOFSTUK 3 : EKSPERIMENTELE PROSEDURES		31
3.1	Media	31
3.1.1	Asetaatagar met 0,5% Fruktose	31
3.1.2	MRS-agar met 0,04% Kaliumsorbaat sonder Natriumasetaat (MRS-KS-agar)	31
3.1.3	Bereiding van eieremulsie vir Baird-Parker Staphylococcus Base	31
3.1.4	Basale medium vir suikerfermentasie	33
3.2	Monsters	33
3.2.1	Monsters	33
3.2.2	Monsterneming	35
3.2.2.1	Eksudaat	35
3.2.2.2	Worse/Vleis	35
3.2.2.3	Verdunningsreekse	35
3.2.2.4	Uitplatings	35
3.3	Bepaling van fisiese eienskappe	35
3.3.1	pH	35
3.3.2	Melksuurisomeer	37
3.3.3	Telling van kolonies	37
3.3.3.1	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	37
3.3.3.2	Enterococci	37
3.3.3.3	Staphylococci	37
3.3.3.4	Giste en Swamme	38
3.3.3.5	Enterobakterieë	38
3.4	Isolasie van melksuurbakterieë	38
3.4.1	Isolasie	38
3.4.2	Bewaring van isclate	38
3.4.2.1	MRS-sopkultuur	38
3.4.2.2	Vriesdroging	39
3.5	Bepaling van algemene eienskappe van melksuurbakterieë	39
3.5.1	Groei by verskillende temperature, pH 3,9 10%NaCl	39

3.5.2	Gasvorming uit glukose, bepaling van finale pH	39
3.5.3	Arginienhidrolise	39
3.5.4	Katalase- en Pseudokatalase-aktiwiteit	40
3.5.5	Bepaling van die melksuurisomeer	40
3.5.6	Suikerfermentasiereeks	42
3.5.7	Slymvorming uit sukrose	44
3.5.8	Bepaling van die teenwoordigheid van meso-diaminopimeliensuur ( $\underline{m}$ - A <sub>2</sub> pm) in die selwande	44
3.5.9	Beweeglikheid, gelatinase, nitraatreduksie	45
3.5.10	Selwandontledings	46
3.5.11	Eienskappe van kolonies en enkelselle	47
	3.5.11.1 Koloniemorfologie	47
	3.5.11.2 Fasekontrasmikroskopie	47
	3.5.11.3 Skandeerelektronmikroskopie	47
3.5.12	Bepaling van mol % G+C in die DNA	48
	3.5.12.1 DNA-isolate	48
	3.5.12.1 Smeltpuntbepaling	49
3.5.13	Gramkleuring	49
HOOFSTUK 4 : RESULTATE EN BESPREKING		50
4.1	Algemene eienskappe van die monsters	50
	4.1.1 Voorkoms	50
	4.1.2 pH	51
	4.1.3 Melksuurkonfigurasie en -konsentrasie	53
4.2	Bakterietellings	60
	4.2.1 Totale plaattellings	60
	4.2.2 Melksuurbakterieë	64
	4.2.2.1 Resultate van tellings	64
	4.2.2.2 Resultate van ander wekers	70
	4.2.3 Tellings van <i>B. thermosphacta</i>	70
	4.2.3.1 Getalle in monsters	70
	4.2.3.2 Getalle van <i>B. thermosphacta</i> in vergelyking met melksuurbakterieë	74
	4.2.4 Enterobakterieë	79
	4.2.4.1 Resultate van tellings by produksie monsters en eksudaatmonsters	79
	4.2.4.2 Identifikasie van kolonies op DHL-agar van monster V32	79
	4.2.4.3 Riglyne vir Enterobakterieë in vleis	79

	<u>Bladsy</u>
4.2.5 Enterococci	82
4.2.5.1 Resultate van tellings van kolonies op CATC-agar	82
4.2.5.2 Riglyne t.o.v. getalle enterococci in vleis	82
4.2.5.3 Vergelyking met resultate van ander werkers	83
4.2.6 <i>Staphylococcus</i> - getalle	83
4.2.7 Giste en swamme	86
4.3 Karakterisering van isolate	87
4.3.1 Voorlopige ordening	87
4.3.2 Morfologiese karakterisering	87
4.3.2.1 Koloniemorfologie	87
4.3.2.2 Selmorfologie en -rangskikking	88
4.4 Identifikasie van isolate	94
4.4.1 Heterofermenterende melksuurbakterieë	94
4.4.1.1 D(-)-melksuuriolate	94
4.4.1.2 DL-melksuurisolate	102
4.4.2 Homofermenterende melksuurbakterieë	110
4.4.2.1 Isolate met $\underline{m}$ - A <sub>2</sub> pm in die selwand	110
4.4.2.2 L(+)-melksuurisolate	117
4.4.2.3 D(-)-melksuurisolate	123
4.4.2.4 DL-melksuurisolate	128
HOOFSTUK 5 : GEVOLGTREKKINGS	149
HOOFSTUK 6 : VERWYSINGS	151
BYLAAG	163

SAMEVATTING

TAKSONOMIE VAN MELKSUURBAKTERIEE GEASSOSIEER  
MET VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE

deur

ELIZABETH SUSANNA GERBER (neé VISSER)

LEIER : Prof. W.H. Holzapfel

DEPARTEMENT : Mikrobiologie en Plantpatologie

GRAAD WAARVOOR  
VERHANDELING

INGEDIEN IS : M.Sc. (Agric.) MIKROBIOLOGIE

JUNIE 1984

## SAMEVATTING

Verskeie werkers het reeds gewys op die sleutelrol wat die melksuurbakterieë by die bederf van vakuumverpakte vleisprodukte speel. Die sistematiek van die melksuurbakterieë is egter slegs sporadies en ongekoördineerd ondersoek, sodat daar tans nie 'n betroubare en bruikbare klassifikasiesistiem vir hierdie organismes bestaan nie. Die algemene voorkoms van onklassifiseerbare, "atipiese streptobakterieë" as die dominante groep in vakuumverpakte vleisprodukte, dui op die noodsaaklikheid van indringende taksonomiese ondersoek op hierdie melksuurbakterieë.

Altesaam 27 produkmonsters en 22 eksudaatmonsters (Weense worsies, Frankfurters, noenvleis, rookwors, "Russians" en "Country Sausage") is mikrobiologies ontleed.

Die totale getal mikroorganismes in elke monster is bepaal, asook die getalle van melksuurbakterieë, *Brochothrix thermosphacta*, enterobakterieë, enterococci, staphylococci, giste en swamme. Die melksuurbakterieë het die grootste groep uitgemaak (meer as 99%), terwyl die giste en swamme en *B. thermosphacta* onderskeidelik ca. 0,013 en 0,002% uitgemaak het. Enterobakterieë, enterococci en tipiese sowel as atipiese staphylococci is ook aangetoon, soms in getalle wat hoër was as die riglyne vir toelaatbare getalle van hierdie groepe.

Die 538 isolate wat vanaf *Lactobacillus*-selektiewe media verkry is, is aanvanklik verdeel op grond van die teenwoordigheid van katalase-aktiwiteit; 63 isolate was katalase-positief en is nie verder ondersoek nie.

Die taksonomie van die 475 katalase-negatiewe melksuurbakterieë is m.b.v. 'n groot aantal morfologiese en fisiologiese maatstawwe ondersoek, waarvan die melksuurisomeer en gas wat uit glukose gevorm word, asook die teenwoordigheid van meso-diaminopimeliensuur (m - A<sub>2</sub>pm) in die selwand, vir aanvanklike seleksie gebruik is. Die morfologie van elke isolaat



is m.b.v. fasekontrasmikroskopie beskryf, terwyl die morfologie van 'n verteenwoordiger van elke groep van die melksuurbakterieë met 'n skanderelektronmikroskoop ondersoek is. Die koloniemorfologie is ook beskryf.

Algemene fisiologiese toetse wat op elke isolaat uitgevoer is, sluit die volgende in: groei by 4<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> en 45<sup>o</sup>C, asook by pH 3,9 en 10% NaCl, die fermentasie van 26 verskillende suikers, slymvorming uit sukrose, beweeglikheid, arginienhidrolise en bepaling van die eind-pH-waarde.

Die mol % G+C-inhoud van die DNA en die aminosuursamestelling van die peptidoglikaan van L(+)-laktaatvormende isolate is ook as hulpmiddel by die klassifikasie gebruik.

Onder die 475 melksuurbakterie-isolate is die volgende groepe organismes gevind en m.b.v. die bogenoemde toetse geïdentifiseer:

1. D(-)-melksuurvormende heterofermenteerders (15 isolate)

*L. mesenteroides*/*L. dextranicum* (11 isolate)

*L. amelibiosum* (1 isolaat)

*L. lactophilum* (2 isolate)

*L. paramesenteroides* (1 isolaat)

2. DL-melksuurvormende heterofermenteerders (betabakterieë) (6 isolate):

*L. brevis* (4 isolate)

*L. cellobiosus* (1 isolaat)

*L. fermentum* (atipies) (1 isolaat)

3. DL-melksuurvormende streptobakterieë (homofermentatief, mesofiel) met  $\underline{m} - A_2pm$  in die selwand (18 isolate):

*L. plantarum*

4. L(+)-melksuurvormende streptobakterieë (29 isolate):

*L. bavaricus* (28 isolate)

*L. casei* ssp. *rhamnosus* (1 isolaat)

5. D(-)-melksuurvormende streptobakterieë (5 isolate):  
Geen definitiewe klassifikasie; *L. homohiochii*?
  
6. DL-melksuurvormende streptobakterieë (402 isolate):  
*L. curvatus* (80 isolate)  
*L. sake* (320 isolate)

Die DL-melksuurvormende streptobakterieë is die belangrikste groep melksuurbakterieë teenwoordig in vakuumverpakte vleisprodukte en die groot variasie in eienskappe wat binne hierdie groep gevind is, het die ontoereikendheid van die bestaande klassifikasiesisteen m.b.v. fenetiese eienskappe uitgewys. Daarby blyk veral verdere diepgaande ondersoeke noodsaaklik te wees om onduidelikhede omtrent die taksonomiese status van *L. sake* en *L. curvatus* op te klaar.

ABSTRACT

TAXONOMY OF LACTIC ACID BACTERIA ASSOCIATED  
WITH VACUUM-PACKED MEATPRODUCTS

by

ELIZABETH SUSANNA GERBER (née VISSER)

PROMOTOR : Prof. W.H. Holzapfel

DEPARTMENT : Microbiology and Plantpathology

DEGREE FOR WHICH

THESIS IS SUBMITTED : M.Sc. (Agric.) MICROBIOLOGY

JUNE 1984

## ABSTRACT

Several workers have indicated the importance of lactic acid bacteria in the spoilage of vacuum-packed meat products. Research on the systematics of these lactic acid bacteria in the past have been sporadic and uncoordinated, which resulted in an unreliable and arbitrary classification system for these organisms. The general occurrence of the unclassifiable "atypical streptobacteria" as the dominant group in vacuum-packaged meat products shows the necessity of thorough taxonomic investigation of these lactic acid bacteria.

Altogether 27 meat samples and 22 exudate samples (Vienna sausages, Frankfurters, cold meats, smoked and country sausages and Russians) were analysed microbiologically.

The total microorganism-count of each sample was determined as well as the numbers of lactic acid bacteria, *Brochothrix thermosphacta*, enterobacteria, enterococci, staphylococci, yeasts and fungi. The lactic acid bacteria were the largest group (more than 99%), with yeasts and fungi, and *B. thermosphacta* in percentages of ca. 0,013 and 0,002 respectively. Enterobacteria, enterococci and typical as well as atypical staphylococci were found, sometimes in larger numbers than permitted by regulations and directives.

The 538 isolates from *Lactobacillus*-selective media were divided by their catalase-reaction; 63 isolates were catalase-positive and not investigated further.

The other 475 isolates were investigated taxonomically using a number of morphological and physiological criteria, of which the lactic acid-isomer, gas formed from glucose and the presence of meso-diaminopimelic-acid (m - A<sub>2</sub>pm) in the cell-wall were used for dividing the isolates into main groups. The morphology of each isolate was investigated with a phase contrast microscope and a representative of each of the six main groups was investigated with a scanning electron microscope. The morphology of the colonies was also described.

The general physiological tests used to determine the properties of each isolate were: growth at 4°, 15° and 45°C, pH 3,9 and 10% NaCl, the fermentation of 26 different sugars, slime formation from sucrose, motility, hydrolysis of arginine and the determination of the final pH.

In the case of the L(+)-lactate-forming isolates, the mol % G+C-content of the DNA and the amino acid composition of the peptidoglycan were determined to aid in the classification.

Using these physiological properties, the 475 isolates were divided into six main groups and identified:

1. D(-)-lactate-forming heterofermentative lactic acid bacteria (15 isolates):

- L. mesenteroides/L. dextranicum* (11 isolates)
- L. amelibiosum* (1 isolate)
- L. lactophilum* (2 isolates)
- L. paramesenteroides* (1 isolate)

2. DL-lactate-forming betabacteria (6 isolates):

- L. brevis* (4 isolates)
- L. cellobiosus* (1 isolate)
- L. fermentum* (atypical) (1 isolate)

3. DL-lactate-forming streptobacteria with  $\underline{m}$  - A<sub>2</sub>pm in the cellwall (homofermentative, mesophilic) (18 isolates):

- L. plantarum*

4. L(+)-lactate-forming streptobacteria (29 isolates):

- L. bavaricus* (27 isolates)
- L. casei* ssp. *rhammosus* (1 isolate)

5. D(-)-lactate-forming streptobacteria (5 isolates):

- No conclusive identification; *L. homohiochii?*

6. DL-lactate-forming streptobacteria (402 isolates):

*L. curvatus* (80 isolates)

*L. sake* (320 isolates)

The DL-lactate-forming streptobacteria is the most important group of lactic acid bacteria in vacuum-packaged meatproducts, and the variation of the properties in this group showed the deficiency of the existing classification system using phenotypical properties. Especially as regards the taxonomic status of *L. sake* and *L. curvatus*, a further thorough investigation proves to be necessary.

## AFKORTINGS

Ala	alanien
Asp	aspartiensuur
ca.	ongeveer
°C	grade Celsius
DNA	deoksiribonukleïensuur
EDTA	etileendiaminotetra-asynsuur
<u>et al.</u>	en andere
Fig.	figuur
g	gram
GAA	galaktosamien
Gedist.	gedistilleerde
Gemid.	gemiddeld(e)
GLA	glukosamien
Glu	glutamiensuur
h	uur
l	liter
LDH	laktaat-dehidrogenase
log	logaritme
Lys	lisien
<u>m</u> - A <sub>2</sub> pm	<u>meso</u> -diaminopimeliensuur
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
mol % G+C	mol persentasie guanien plus sitosien
Mur	muramiensuur
NAD	nikotienamied-adenien-dinukleotied
nm	nanometer
No./nr.	nommer
pers.	persoonlike
spp.	spesies
µl	mikroliter
µm	mikrometer
V	dui eksudaatmonsters aan
v/v/v	volume per volume per volume

W	dui produkmonsters aan
w/v	gewig per volume
WNNR	Wetenskaplike en Nywerheidsnavorsingsraad
%	persentasie
>	meer as / groter as
<	minder as / kleiner as
+	positief
(+)	swak positief
-	negatief



## LYS VAN TABELLE

		<u>Bladsy</u>
TABEL 2.1	Voorbeelde van die emulsie-tipe vleisprodukte wat tradisioneel in sekere lande geproduseer word	5
TABEL 2.2	Opsomming van die riglyne t.o.v. vakuumverpakte vleisprodukte, asook nie-vakuumverpakte Brühwursttipe vleisprodukte in 'n aantal lande, volgens Leistner <u>et al.</u> (1981) en Debevere (persoonlike mededeling)	30
TABEL 3.1	Opsomming van die media wat gebruik is vir spesifieke mikrobegroepe en fisiologiese toetse, asook die pH, inkubasietyd en -temperatuur wat gebruik is. Verwysings na die literatuur word ook gegee	32
TABEL 3.2	Tabel van die tipe produkte waaruit die monsters bestaan het, asook die nommer wat aan 'n spesifieke monster en die eksudaat (indien teenwoordig) toegeken is	34
TABEL 3.3	Tabel van die verdunningsreeks wat uitgeplaas is, asook die spesifieke mikrobegroep en die medium wat gebruik is	36
TABEL 3.4	Lys van suikers wat gebruik is om die suikerfermentasiepatroon van die isolate te bepaal, asook die maatskappye vanwaar dit bestel is	43
TABEL 4.1	Besonderhede omtrent die pH-waardes van die produk- en eksudaatmonsters op die dag van monsterneming	52

		<u>Bladsy</u>
TABEL 4.2	Melksuurkonsentrasie en -konfigurasie van die eksudate in 19 produkmonsters op die dag van monsterneming en die ooreenstemmende pH by elk verkry	56
TABEL 4.3	Suurinhoud - as % melksuur - van 'n aantal voedselsoorte waarby melksuurbakterieë betrokke is en die hoofbestanddele wat gebruik word in die bereiding daarvan. Die land waar dit tradisioneel gebruik word, word ook aangedui	59
TABEL 4.4	Vergelyking van gemiddelde tellings van die totale aantal bakterieë op Std-I-agar met die gemiddelde tellings van die melksuurbakterieë op AA en MRS-KS-agar (monsters 29-35)	61
TABEL 4.5	Vergelyking van totale bakterietellings vanaf Std-I-agar van produk- en eksudaatmonsters met resultate van ander navorsers	65
TABEL 4.6	Vergelykings van die gemiddelde tellings van die melksuurbakterieë op AA, AA+Fr en MRS-KS van monsters 28 en 29. Die totale bakteriegetalle op Std-I-agar word ook gegee. Die inkubasieperiode was 72h by 30°C. Tellings word aangedui in log tellings per eenheid	68
TABEL 4.7	Resultate van tellings van melksuurbakterieë gevind in vakuumverpakte vleisprodukte deur ander werkers. Resultate van gemiddelde tellings in hierdie ondersoek gevind, word gegee, asook die tipe produkte en inkubasietoestande	72

TABEL 4.8	Resultate van gemiddelde <i>B. thermosphacta</i> -tellings op STAA-medium van produkmonsters (log tellings per g) en eksudaatmonsters (log tellings per ml)	73
TABEL 4.9	Vergelykings van gemiddelde van melksuurbakterieë en <i>B. thermosphacta</i> by produkmonsters (log tellings per g) en eksudaatmonsters (log tellings per ml)	76
TABEL 4.10	Vergelyking van getalle van <i>Brochothrix thermosphacta</i> en melksuurbakterieë in vakuumverpakte vleisprodukte gevind deur ander werkers. Die getalle van hierdie ondersoek word ook aangegee asook die produkte wat in die verskillende ondersoeke gebruik is	77
TABEL 4.11	Gemiddelde tellings vir produk- en eksudaatmonsters van enterobakterieë, enterococci, staphylococci en giste en swamme	80
TABEL 4.12	Identifikasie en beskrywing van kolonies van enterobakterieë geïsoleer uit monster V32 ( $10^{-2}$ verdunning) op DHL-agar ná 72h. Identifikasie is gedoen d.m.v. die API-20E-sisteen	81
TABEL 4.13	Vergelyking van resultate van tellings van enterococci by die produk- en eksudaatmonsters van hierdie ondersoek met die resultate van ander werkers. Die monsters was in alle gevalle vakuumverpakte, verwerkte vleis	84
TABEL 4.14	Besonderhede van die monsters waaruit <i>Leuconostoc</i> - spp. geïsoleer is en die minimum populasie (log tellings per eenheid) van die onderskeie isolate	99

		<u>Bladsy</u>
TABEL 4.15	Fisiologiese eienskappe van die heterofermenterende melksuurbakterieë wat D(-)-melksuur vorm ( <i>Leuconostoc</i> spp.)	100
TABEL 4.16	Besonderhede van die eksudaatmonsters waaruit die heterofermenterende lactobacilli wat DL-melksuur vorm, geïsoleer is en die minimumgetalle waarteen dit voorgekom het (in logs per ml). (Geen heterofermenterende lactobacilli is uit die produkmonsters self geïsoleer nie.)	103
TABEL 4.17	Molare verhoudings van die belangrikste aminosure wat in die selwande van die heterofermenterende <i>Lactobacillus</i> -stamme gevind is (met glutamiensuur geneem as 1,0)	105
TABEL 4.18	Fisiologiese eienskappe van die heterofermenterende lactobacilli (DL-melksuurvormende isolate)	106
TABEL 4.19	Uiteensetting van die tipes monsters waaruit die <i>L. plantarum</i> -stamme geïsoleer is. Die minimum getalle waarin dit voorgekom het, word gegee in logs per g of logs per ml	110
TABEL 4.20	Fisiologiese eienskappe van die <i>L. plantarum</i> -isolate	112
TABEL 4.21	Indeling van die <i>L. plantarum</i> -isolate op grond van die koloniemorfologie. Die eienskappe van die outentieke spesie soos in hierdie ondersoek getoets, word gegee, asook die eienskappe van die spesie soos uit die literatuur verkry (Buchanan en Gibbons, 1974)	114

		<u>Bladsy</u>
TABEL 4.22	Uiteensetting van die tipes monsters waaruit die homofermentatiewe melksuurbakterieë wat L(+)-melksuur vorm, geïsoleer is. Die medium en minimum getalle waarin dit voorgekom het, word ook gegee (log tellings per g of per ml)	118
TABEL 4.23	Resultate van fisiologiese toetse van homofermenterende L(+)-melksuurisolate. Die verdeling in subgroepe word getoon asook die eienskappe van die outentieke stamme	120
TABEL 4.24	Uiteensetting van die tipes monsters waaruit die homofermenterende melksuurbakterieë wat D(-)-melksuur vorm, geïsoleer is. Die minimum getalle waarin dit voorgekom het, word gegee as log tellings per g of per ml	124
TABEL 4.25	Fisiologiese eienskappe van die homofermentatiewe melksuurbakterieë wat D(-)-melksuur vorm	126
TABEL 4.26	Uiteensetting van die tipe monsters waaruit die DL-melksuurvormende streptobakterieë geïsoleer is. Die minimum getalle word in log tellings per g of per ml aangegee	132
TABEL 4.27	Voorgestelde sleutelmaatstawwe vir die onderskeiding van <i>L. curvatus</i> en <i>L. sake</i> (in ooreenstemming met Buchanan en Gibbons, 1974; Kagermeier, 1981)	137
TABEL 4.28	Eienskappe van <i>L. curvatus</i> en <i>L. sake</i> wat ooreenstem (fisiologiese eienskappe uitgesluit) (volgens Kagermeier, 1981)	138

		<u>Bladsy</u>
TABEL 4.29	Biogroepe van <i>L. curvatus</i> en <i>L. sake</i> soos bepaal deur die fermentasie van melibiose, maltose, sukrose, trehalose en arabinose. Die eienskappe van outentieke stamme word ook gegee	140
TABEL 4.30	Fisiologiese eienskappe van die DL-melksuurvormende streptobakterieë en die biogroepe wat by elke spesie onderskei word	141
TABEL 4.31	Klassifikasie van die DL-melksuurvormende streptobakterieë m.b.v. die vyf maatstawwe wat deur Shaw en Harding (1984) gebruik is	144
TABEL 1	Verspreiding van produk- en eksudaatmonsters oor 'n pH-reeks van 4 tot 6	163
TABEL 2	Resultate van tellings van totale aantal bakterieë op Std-I-agar van die produkmonsters (inkubasie: 72h by 30°C)	164
TABEL 3	Resultate van tellings van totale aantal bakterieë op Std-I-agar, van die eksudaatmonsters (inkubasie: 72h by 30°C)	165
TABEL 4	Verdeling van totale tellings vanaf Std-I-agar in groottegroepe by produk- en eksudaatmonsters, asook die frekwensie waarmee dit voorkom by die verskillende tipes monsters	166
TABEL 5	Resultate van die telling van melksuurbakterieë vanaf asetaatagar ná 72h by 30°C uit die produkmonsters	167
TABEL 5a	Resultate van tellings van melksuurbakterieë op AA+Fr en MRS-KS-agar ná 72h by 30°C, van die produkmonsters	168

TABEL 6	Resultate van die tellings van melksuurbakterieë in die eksudaatmonsters op asetaatagar ná 72h by 30°C	169
TABEL 6a	Resultate van tellings van melksuurbakterieë op AA+Fr en MRS-KS-agar ná 72h by 30°C, van die eksudaatmonsters	170
TABEL 7	Verdeling van gemiddelde tellings van melksuurbakterieë op asetaatagar (pH 5,5) in groottegroepe by die produk- en eksudaatmonsters, asook die frekwensie waarmee dit voorkom by die verskillende tipes monsters	171
TABEL 8	Verdeling van gemiddelde melksuurbakterietellings op MRS-KS-agar in groottegroepe by die produk- en eksudaatmonsters, asook die frekwensie waarmee dit by die verskillende tipes monsters voorgekom het	172
TABEL 9	Resultate van <i>B. thermosphacta</i> -tellings op STAA-medium van produk- en eksudaatmonsters (logs per g of logs per ml)	173
TABEL 10	Resultate van enterobakterietellings op DHL-agar ná 24h by 37°C en 48h by 20°C van die produk- en eksudaatmonsters. Ondervinding het getoon dat verdere inkubasie (na 24h) by kamertemperatuur die groei van pseudomonade bevorder	174
TABEL 11	Resultate van tellings van enterococci op CATC-agar in produk- en eksudaatmonsters (inkubasie: 48h by 37°C)	175
TABEL 12	Resultate van tellings op Baird-Parker-medium ná 72h by 37°C, by produk- en eksudaatmonsters. Die tellings van tipiese en atipiese kolonies word afsonderlik aangedui	176

TABEL 13	Resultate van tellings van giste en swamme vanaf ADA-medium n-a 72h by 25°C, van die produk- en eksudaatmonsters. Getalle van giste en swamme word gesamentlik aangedui	177
TABEL 14	Resultate van aminosuuranalise van die selwande van die ses heterofermenterende lactobacilli (konsentrasie in x nmol/mg selwand)	178
TABEL 15	Resultate van die fisiologiese toetse van die L(+)-melksuurvormende streptobakterieë ingedeel volgens die biogroepe wat onder elke spesie ingedeel is	179
TABEL 16	Resultate van die fisiologiese toetse van die DL-melksuurvormende streptobakterieë ingedeel volgens die biogroepe wat onder elke spesie ingedeel is	180



## LYS VAN FIGURE

		<u>Bladsy</u>
FIG. 4.1	Verspreiding van die % produk- en eksudaatmonsters oor 'n pH-reeks van 4,0 tot 6,0	54
FIG. 4.2	Vergelyking van melksuurbakteriegetalle (logs tellings per ml) op asetaataragar met die D(-)-melksuurkonsentrasie (1 mg laktaat per ml) van die eksudaatmonsters	57
FIG. 4.3	Vergelyking van gemiddelde tellings op Std-I-agar, AA en MRS-KS-agar vir die produk- en eksudaatmonsters	62
FIG. 4.4	Verdeling van die gemiddelde getalle van totale aantal bakterieë in die produk- en eksudaatmonsters in groottegroepe en die % monsters waarvan die getalle binne dié groottegroepe val	63
FIG. 4.5	Skematiese voorstelling van die gemiddelde melksuurbakterietellings op AA, AA+Fr en MRS-KS-agar na 72h by 30°C by 8 produk- en 7 eksudaatmonsters	69
FIG. 4.6	Die verspreiding van melksuurbakterieë in groottegroepe op AA en MRS-KS-agar by die produk- en eksudaatmonsters	71
FIG. 4.7	Vergelykings tussen die getalle <i>B. thermosphacta</i> en melksuurbakterieë getoon as % monsters in groottegroepe van 0,5 logs per ml of per g	75

FIG. 4.8	Tipiese kolonies van die melksuurbakterieë op MRS-agar (anaërobe inkubasie vir 48h by 25°C)	89
FIG. 4.9	Voorbeelde van die tipiese selmorfologie wat by die melksuurbakterieë gevind is	92
FIG. 4.10	Voorbeelde van onreëlmatige gedraaide en verlengde selle (MRS-sop, inkubasie vir 48h by 25°C)	95
FIG. 4.11	Transmissie-elektronmikroskoopfoto's om die flagella by beweeglike stamme te toon	96
FIG. 4.12	Tipiese selmorfologie van D(-)-laktaatvormende heterofermenteerders (leuconostocs) (uit MRS-sop, inkubasie vir 48h by 25°C)	98
FIG. 4.13	Tipiese selmorfologie van DL-laktaatvormende betabakterieë (uit MRS-sop, inkubasie vir 48h by 25°C)	104
FIG. 4.14	Tipiese selmorfologie van DL-laktaatvormende streptobakterieë met $\underline{m} - A_2pm$ in die selwand (uit MRS-sop, inkubasie vir 48h by 25°C)	111
FIG. 4.15	Tipiese selmorfologie van L(+)-laktaatvormende streptobakterieë (uit MRS-sop, inkubasie vir 48h by 25°C)	119
FIG. 4.16	Tipiese selmorfologie van D(-)-laktaatvormende streptobakterieë (uit MRS-sop, inkubasie vir 48h by 25°C)	125

- FIG. 4.17      Tipiese selmorfologie van die *L. curvatus*-      129  
                  groep van die DL-laktaatvormende strepto-  
                  bakterieë (uit MRS-sop, inkubasie vir  
                  48h by 25°C)
- FIG. 4.18      Tipiese selmorfologie van die *L. sake*-      130  
                  groep van die DL-laktaatvormende strep-  
                  tobakterieë (uit MRS-sop, inkubasie vir  
                  48h by 25°C)

## DANKBETUIGINGS

Graag wil ek hiermee dank teenoor die volgende persone en instansies wie se hulp en bydrae die verhandeling moontlik gemaak het, betuig.

Prof. W.H. Holzapfel vir leiding, waardevolle advies, aanmoediging en belangstelling.

John Putterill vir die groot werk met die elektronmikroskopie en die besondere moeite om die beste preparate te verkry.

Dr. Dijkstra van die WNNR vir die aminosuurontledings.

Mev. Amalie Joubert vir die tik van die verhandeling.

Kobus en my ouers vir die ondersteuning en voortdurende aanmoediging.

Vir almal by die werk, veral Erika, Malcolm en Amelita vir die bystand en aanmoediging.

SOLI DEO GLORIA

## HOOFSTUK 1 : INLEIDING

Die belang van melksuurbakterieë in vakuumverpakte vleisprodukte het duidelik geword kort nadat met dié tipe verpakking van voedselprodukte begin is. Die groep mikroörganismes het telkens die grootste deel van die mikrobepopulasie uitgemaak en tot die bederf van die produkte bygedra hoofsaaklik a.g.v. suurvorming.

Veral in die jongste verlede het die populariteit van selfbedieningsvoedsels by die verbruiker toegeneem en a.g.v. die moontlikheid wat vakuumverpakte produkte vir 'n langer goedhouvermoë en rakleef tyd inhou, word dit algemeen in die voedselbedryf aangewend. Die tipe vleisprodukte wat in hierdie studie ondersoek is, nl. vakuumverpakte emulsie-tipe vleisprodukte wat 'n hittebehandeling ondergaan het, is 'n uitstekende habitat vir melksuurbakterieë. Verder word die pH van die produk verlaag deur die melksuur wat gevorm word wat die vermeerdering van die melksuurbakterieë bevoordeel. Alhoewel die melksuurbakterieë aanvanklik in klein getalle in die produkte teenwoordig is, kan getalle van 7 tot 8 logs per g selfs onder verkoeling bereik word.

Hierdie groot getalle melksuurbakterieë speel dan ook 'n belangrike rol in die bederf van die produkte, soos blyk uit die groot verliese wat jaarliks deur die bedryf gely word a.g.v. mikrobiologiese bederf van die vleisprodukte. Mikroörganismes is vir ongeveer 2 tot 5% van die totale verliese verantwoordelik. Totale verliese van verwerkte vleisprodukte a.g.v. meganiese beskadiging, verkleuring en mikrobiologiese bederf het in 1976 R111 miljoen bedra en met prysstygings en verhoogde omset in ag genome, word bereken dat hierdie bedrag toegeneem het tot meer as R200 miljoen, waarvan produkte ter waarde van minstens R4 miljoen a.g.v. mikrobiologiese bederf vernietig is.

Die sistematiek van die melksuurbakterieë wat in vakuumverpakte vleisprodukte voorkom, het sedert die vroeë sestigerjare slegs sporadiese aandag geniet; weinig diepgaande

ondersoek is tot dusver in die opsig onderneem. Slegs 'n klein persentasie van die melksuurbakterieë (hoofsaaklik van die genera *Leuconostoc* en *Lactobacillus*), kon m.b.v. bestaande sisteme geklassifiseer word. Die klassifikasie van die grootste gedeelte van veral die lactobacilli het egter wesenlike probleme opgelewer. Verskeie pogings is reeds aangewend om die groep onklassifiseerbare melksuurbakterieë te sistematiseer.

'n Groep melksuurbakterieë wat nie gas uit glukose vorm nie, DL-melksuur vorm, glad nie by  $45^{\circ}\text{C}$  groei nie, maar wel by  $4^{\circ}$  tot  $8^{\circ}\text{C}$  en sonder meso-diaminopimeliensuur (m -  $\text{A}_2\text{pm}$ ) in die selwande, en wat telkens die grootste persentasie van die lactobacilli uitgemaak het, het mettertyd die benaming "atipiese" streptobakterieë (homofermentatiewe, mesofiele lactobacilli) gekry. Dit blyk of veral twee spesies kenmerkend vir hierdie groep is, nl. *Lactobacillus curvatus* en *Lactobacillus sake*, hoewel laasgenoemde spesie eers in 1980 as amptelike spesie erken is (Skerman, 1980).

Die algemene fisiologiese toetse wat in die identifikasie van melksuurbakterieë gebruik word, is m.b.t. isolate in hierdie studie uitgevoer, waarvan die belangrikste die volgende is: bepaling van die tipe melksuurisomeer, die suikerfermentasiereeks, verskeie groeitoetse, die teenwoordigheid van m -  $\text{A}_2\text{pm}$  in die selwand, gasvorming uit glukose, selwandsamestelling en mol % G+C-inhoud van die DNA.

Probleme verbonde aan hierdie identifikasie-sisteem het duidelik in die loop van hierdie studie na vore gekom. Die keuse van parameters in so 'n arbitrêre sisteem is van die grootste belang en dieselfde parameters is in die verlede nie deur verskillende werkers toegepas nie. "Konstante" eienskappe, soos die selwandsamestelling, mol % G+C-inhoud van die DNA en die elektroforetiese beweeglikheid van LDH-isieme, kan by sommige groepe van die melksuurbakterieë as deurslaggewende maatstawwe vir bevredigende identifikasie gebruik word. By die groep atipiese streptobakterieë bestaan daar egter vir elk van hierdie parameters weinig verskille.

Vir onderskeiding binne die groep (en dus tussen die betrokke twee spesies) het hierdie parameters dus nie veel waarde nie. In die ondersoek is dus hoofsaaklik van maatstawwe soos morfologie en suikerfermentasievermoëns gebruik gemaak; veral vyf suikers (melibiose, maltose, sukrose, trehalose en arabinose), is gebruik om die atipiese streptobakterieë te klassifiseer.

In hierdie studie is eerstens gepoog om die tipiese bederf-associasie van vakuumverpakte vleisprodukte te bepaal. 'n Poging is ook aangewend om die dominante melksuurbakterieë wat tipies met die betrokke vleisprodukte geassosieer word, m.b.v. konvensionele fenetiese klassifikasie-metodes sistematies te ondersoek.

## HOOFSTUK 2 : LITERATUUROORSIG

### 2.1 DEFINISIE

Die vleisprodukte wat in hierdie projek ondersoek is, behels produkte waarvan die vleisbestanddele saam met water en/of ys geëmulgiseer word. Hierby word ook nitrietpekelsout, speserye, geur- en preserveermiddels ingesluit. Sodanige produkte ondergaan 'n hittebehandeling, soos bak, "kook" (ca. 80°C) of braai, wat deur beroking voorafgegaan kan word. Tydens hierdie verhittingsproses koaguleer die proteïene in die vleis om 'n ferm en snybare produk te lewer. (Paradis en Stiles, 1978; Koch, 1978; Surkiewicz *et al.*, 1976). Na prosessering word die produkte óf as porsies óf as sodanig (die kleiner worsies) onder vakuüm verpak om die potensiële houvermoë daarvan te verbeter.

#### 2.1.1 Terminologie

'n Groot verskeidenheid verwerkte vleisprodukte is in die handel beskikbaar. Een produk kan in verskillende lande onder verskillende name bekend wees. Tradisionele produkte kom ook in verskeie lande voor, waarvan die belangrikste in Tabel 2.1 opgesom word.

#### 2.1.2 Samestelling

##### 2.1.2.1 Bestanddele (Koch, 1978)

###### Vleisbestanddele

Bees-, skaap-, lam- of varkvleis word gebruik, in kombinasie of afsonderlik, volgens die resep vir 'n betrokke produk. Vleis van jonger diere word by beesvleis vereis omdat dit 'n hoë proteïeninhoud het. Voorkeur word ook dikwels verleen aan vleis van die voorkwart van die dier bo vleis van die agterkwart. Vleis uit die nek- en skofgedeeltes wat baie senings en bindweefsel bevat, is 'n ideale keuse.



TABEL 2.1 VOORBEELDE VAN DIE EMULSIE-TIPE VLEISPRODUKTE  
WAT TRADISIONEEL IN SEKERE LANDE GEPRODUSEER  
WORD

	Algemene Term	Voorbeelde
Duitsland	Brühwurst	Mortadella, Lyoner Wurst, Frankfurter, Bierschinken, Jagdwurst, Wiener, Braunschweiger
VSA Kanada	Bologna-type sausage Luncheon Meats	Bologna, Vienna, Frankfurter, Pepper & Pimento Loaf, Braunschweiger, Liversausage
Nieu-Seeland Australië	Soos die VSA	
Suid-Afrika	Koue vleis Polonie	Polonie, Frankfurter, Russians, Country Sausage, Weense worsies, Koue vleis (Noenvleis)
Holland	Kookworst Rookworst	

Beesvleis met 'n helder rooi kleur word uitgesoek, in teenstelling met vleis vir bv. "Rohwurst"-produkte, waar donkerrooi vleis gebruik word.

Vet in die vorm van varkspek (sonder swoerd) word gewoonlik gebruik.

Ander vleissoorte wat ook in "Brühwurst"-resepte gebruik kan word, sluit in tong, varkvel, wangvleis en longe.

#### Speserye

'n Groot verskeidenheid kruie en speserye word aangewend volgens resep. Dit het, benewens die smaak en geur wat aan die produk verleen word, ook 'n bakteriostatiese effek. Die belangrikste speserye sluit in koljander, paprika, peper, foelie, naeltjies, tiemie, marjolein en neutmuskaat.

#### Ander byvoegings

Pistasieneute, piekels, kaas, olywe, spaghetti, eiers, rooiwyn, kleurstowwe (bv. saffraan), bloedplasma, ens. word volgens spesifieke resepte bygevoeg. Sommige van hierdie bestanddele mag 'n gesondheidsgevaar inhou, veral kleurstowwe en preserveermiddels, en word daarom streng deur regulasies beheer. Polifosfate (gewoonlik  $\text{Na}_3\text{HPO}_7$ ), kan as emulgeerhulpmiddels gebruik word.

#### Sout

Tans word meestal van nitrietpekelsout gebruik gemaak wat ongeveer 0,5%  $\text{NaNO}_2$  of  $\text{KNO}_2$  op 'n soutbasis bevat. 'n Konsentrasie van 18 - 20 g per kg is optimaal uit 'n organoleptiese oogpunt. Indien 'n laer konsentrasie gebruik sou word, sal die produk ook swakker koaguleer.

Baie aandag word geskenk aan die probleem van

dimetielnitrosamienvorming in vleisprodukte, veral by spek en ham. Hierdie moontlik karsinogeniese verbindings is nou ook al o.a. by frankfurters opgespoor (Fiddler et al., 1972). Dit word in water en voedsel as reaksieprodukte van amiene (primêr, sekondêr of tersiêr) en nitriet gevorm (Gray en Randall, 1979).

Worsprodukte bevat vrye amiene of voorlopers daarvan in die vorm van proteïne, aminosure of fosfolipiede wat met die nitriet kan reageer om nitrosamiene te vorm. Die gebruik van natriumnitriet as soutbyvoegsel kan gevaar inhou (Fiddler et al., 1972), en is al skerp veroordeel, veral n.a.v. bewyse van die karsinogeniese uitwerking van nitrosamiene op proefdiere (Simon et al., 1973).

Deur die gebruik van natriumnitriet kan die ontkieming van *Clostridium botulinum*-spore, asook die groei van ander bederforganismes in die produkte beheer word (Nielsen, 1983; Simon et al., 1973). Die nitrietsout dra ook by tot die ontwikkeling van tipiese geur en kleur van ham, spek, frankfurters, ens. (Simon et al., 1973).

Die reduseermiddel askorbiensuur wat algemeen in vleisprodukte gebruik word om kleurvorming te stabiliseer, inhibeer die vorming van dimetielnitrosamiene merkbaar (Fiddler et al., 1973).

A.g.v. die moontlike gesondheidsgevaar en die verbruikersweerstand teen nitrietbyvoeging, is metodes ondersoek om die bygevoegde nitriet te verminder.

Lin en Sebranek (1979) het gevind dat die nitrietvlak verlaag kan word indien hoë kwaliteit verpakkingsmateriaal gebruik kan word waarby alle suurstof (O<sub>2</sub>) tydens vakuumb vorming uitgesluit word,

en wat geen of min O<sub>2</sub>-permeasie toelaat.

Hierdie aspek van die tegnologie is nog nie voldoende ondersoek nie en sal verder aandag moet geniet. Veral die uitwerking van nitrietverlaging op die mikrobiologie van vleisprodukte sal opgeklar moet word, so bv. moet 'n veilige nitrietvlak vir die voorkoming van botulisme bepaal word.

Uit die voorafgaande is dit duidelik dat 'n besondere en unieke ekosisteem geskep word by vakuumverpakte vleisprodukte. Soos by enige ander ekosisteem kom hier ook mikroorganismes voor wat eie is aan die betrokke toestande en wat bevoordeel word deur die lae redokspotensiaal, lae O<sub>2</sub>-konsentrasie, die nitrietinhoud en relatief hoë soutinhoud. Lig, temperatuur, aanvanklike mikrobelaeding, prosesseringsmetodes, behandeling ná produksie, ens. speel ook 'n belangrike rol en sal meer volledig bespreek word.

### 2.1.3 Prosessering

#### 2.1.3.1 Vervaardigingsprosesse

Frankfurters is 'n bekende en tipiese vleisprodukt en die bereiding daarvan sluit die hoofstappe in wat by die produksie van al die ander Brühwurst-tipes wors of vleis gebruik word.

Die volgende stappe word agtereenvolgens in die proses gebruik (Surkiewicz et al., 1976):

Verkoelde of bevrore vleis word deur 'n meule gestuur en daarna in 'n baksnyer (Eng.: "bowl cutter", Duits: "Kutter") fyner gemaal saam met water en ys, speserye, geurmiddels, preserveermiddels en soms melkvaste stowwe of sojaproteïen. Hieruit ontstaan mettertyd 'n emulsie wat vervolgens ook deur 'n emulsiemeule gestuur kan word. Die finale temperatuur van die emulsie moet ca. 14°C bedra met die

oog op optimale binding.

Die stop van natuurlike of kunsmatige derms vind nou plaas. Dit is 'n stap wat meestal meganies gedoen word, asook die daaropvolgende verdeling van die wors in kleiner porsies van geskikte lengte deur 'n draaiproses. Die worsies word dan aan stokke gehang en in 'n rookkamer by 66 - 82°C behandel (gewoonlik 69 - 71°C). Berokingstyd wissel van produk tot produk en kan tot 8 uur lank duur.

Ander hittebehandelings as beroking word hierna aangewend (Koch, 1978), bv. kook, braai en bak volgens die spesifieke tipe produk en die verlangde smaak, geur en tekstuur daarvan.

Afkoeling vind hierna plaas d.m.v. steriele koue water, tot ongeveer 4°C. Wienerworsies word nou afgeskil (meganies) en verpak (meganies of per hand).

Nadat verpakking afgehandel is, word die afsonderlike pakkies aan vakuum onderwerp en verseël. Verkoeling en koue opberging (0 - 5°C) is essensieel.

## Algemeen

### Minimum vleisbestanddele

Afgesien van produkte waar uitsluitlik van beesvleis gebruik gemaak word, moet die beesvleisinhoud ten minste 40% wees. (Fruin et al., 1978). Die res van die vleis word deur ander vleissoorte opgemaak.

Ander bestanddele wat veral by die Bologna-tipes koue vleis gevoeg kan word, is o.m. piekels, wonderpeper, kaas, olywe, spaghetti, eiers, ens.

### 2.1.3.2 Beroking

By die prosessering van die meeste Brühwurstprodukte wat berook word, word van hitte gebruik gemaak (Koch, 1978), alhoewel koue beroking ook soms gebruik word. Die temperatuur wat aangewend word binne die rookkamer, wissel van 60 - 80°C, met 'n lugvogtigheid van 70 - 75%.

Die doel met die beroking is om die produk 'n tipiese reuk, smaak, kleur en houbaarheid te gee. A.g.v. die hittebehandeling word byna al die vegetatiewe mikro-organismes vernietig, en galsterigheid en verkleuring (Sink en Hsu, 1977) voorkom.

Asyn- en mieresuur, formaldehyd, asetalddehyd, asetoon, fenole, ens., is van die groot aantal verbindings wat tydens die rookproses die gewenste veranderinge teweeg bring. Die hele proses, veral die temperatuur en lugtoevoer, moet egter noukeurig beheer word aangesien sekere ongewenste smake en geure kan ontstaan, of die kwaliteit van die produk kan verswak weens uitdroging.

In Duitsland, waar hierdie tipe vleisproduk reeds baie jare op 'n gevestigde tradisionele manier geproduseer word, word dikwels van spesifieke houtsoorte gebruik gemaak om 'n spesifieke en tipiese geur en smaak teweeg te bring (Koch, 1978).

Met die ontwikkeling van nuwe tegnologie, word tans ook van ander rookbronne gebruik gemaak, o.m. rookekstrakte.

## 2.2 BEDERF VAN VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE

Vakuumverpakking word vanaf 1958 algemeen gebruik om die rakleef tyd van vars vleis en vleisprodukte te verleng.

Die eerste omvattende ondersoek na die bederf van vakuumpverpakte vleisprodukte is deur Allen en Foster (1960) gedoen. Sedertdien is 'n groot gedeelte van die navorsing gewy aan die daarstelling van mikrobiologiese en gesondheidsriglyne vir hierdie tipe produkte. Aandag is o.m. gegee aan die algemene mikrobiologie, die spesifieke organismes teenwoordig en hul opeenvolging tydens opberging, die invloed van verskeie interne en eksterne faktore op die mikrobiologie en die beperking van kontaminasie en voedselgedroogde patogene. Relatief min werk is nog gedoen spesifiek met die oog op die klassifikasie, en veral die sistematiese ondersoek van melksuurbakterieë wat as dominante groep organismes hierby betrokke is.

#### 2.2.1 Algemeen

Volgens Allen en Foster (1960) het die mikrobepopulasie wat aanvanklik in die vleisprodukte teenwoordig was, bestaan uit aërobe, katalase-positiewe cocci, met 'n klein aantal stawe en giste. Namate die opbergtyd toegeneem het (ná 10 - 20 dae afhangend van die temperatuur), het die katalase-negatiewe organismes egter begin oorheers, wat hoofsaaklik uit Gram-positiewe nie-spoorvormende stawe (99%) bestaan het. Hetero- en homofermenteerders is geïsoleer en verder in groepe verdeel n.a.v. verdere toetse, maar die groepe, veral die homofermenterende melksuurbakterieë kon nie by bestaande spesies ingepas word nie.

Hierdie organismes kon relatief hoë soutkonsentrasies (ten minste 6,5%) verdra. 'n Belangrike afleiding is gemaak wat vandag nog van toepassing is, nl. dat die kontaminasie van die produk beperk moet word deur fabrieksanitasie, want die hoë soutkonsentrasie en lae opbergingstemperatuur kan die groei van die bederfororganismes net tot op 'n sekere punt onder beheer hou.

Hierna is die goedhou vermoë van die vakuumverpakte vleisprodukte deur 'n groot aantal werkers ondersoek, waaronder Alm et al. (1961), Miller (1961), Kempton en Bobier (1970), Mol et al. (1971), Hill et al. (1976), Surkiewicz et al. (1976), Duitschaever (1977), Paradis en Stiles (1978), Fruin et al. (1978), Duitschaever (1978), Shay et al. (1978), Oblinger en Kennedy (1980). Opbergings- en rakleefstudies is deur die meeste gedoen, en m.b.v. selektiewe media is vasgestel of die volgende organismes of groepe organismes teenwoordig is:

Totale aantal bakterieë, micrococci, staphylococci, Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, lactobacilli, fekale streptococci, salmonellae, *Clostridium perfringens* en giste en swamme.

#### 2.2.2 Bederf deur Melksuurbakterieë

Niven en sy medewerkers het by nie-vakuumverpakte wors- en vleisprodukte o.m. 'n groen verkleuring op die oppervlak van die produkte ondersoek. (Niven, 1948; Niven et al., 1948; Niven et al., 1949). Heterofermenterende lactobacilli en leuconostocs was vir hierdie bederf verantwoordelik. Steinke en Foster (1951) het hierdie tipe bederf ook aan die groot getalle melksuurbakterieë toegeskryf.

By vakuumverpakte vleisprodukte word bederf egter op 'n ander wyse waargeneem. Opbergingsstudies is onderneem deur o.a. Miller (1961), Kempton en Bobier (1970), Hill et al. (1976), Mol et al. (1971), Egan et al. (1980). Die tipe bederf wat algemeen aangetref is met hierdie studies, is "af"-smake en -geure, slymvorming, kleurverandering, melkerige eksudaat en suur reuk.



Die bogenoemde werkers het ooreenstemmende resultate verkry, nl. dat bederf gewoonlik sigbaar word wanneer die mikrobe-getalle, soos weerspieël deur aërobe plaattellings, 8 log tellings per g bereik. Kempton en Bobier (1970) het egter geen verband gevind tussen bakteriegroei en waarneembare bederf nie. Volgens hulle is die tempo van groei dieselfde by alle produkte, maar bederf word op verskillende tye sigbaar. "Pickle & Pimento Loaf" was slymerig na 5 weke, 'n melkerige eksudaat het na 3 weke by die Weense worsies ontstaan, maar die Bologna het 'n aanvaarbare smaak en geur bly behou tot aan die einde van die 15-week-opbergingsperiode. In aansluiting hiermee, het Hill et al. (1976) 'n direkte verwantskap gevind tussen totale tellings en sensoriese eienskappe aan die een kant, en opbergings tyd aan die ander kant, maar nie tussen totale tellings en "af"-geurontwikkeling nie. Met 'n opgeleide proepaneel was die betrokke produkte (Bologna en gekruide "Luncheon Meat") ná 3 weke minder aanvaarbaar met tellings van 4 tot 5 log tellings per g as monsters met 6 - 8 log tellings per g. Waar die totale tellings hoër as 8 log tellings per g was, was die produkte in elk geval onaanvaarbaar.

Hierdie "verbruikersaanvaarding" word aan die teenwoordigheid van melksuur (gevorm deur melksuurbakterieë in die produk), toegeskryf. Die moontlikheid word gestel dat melksuur as byvoegsel gebruik kan word om spesiale produkte te vervaardig in die suiwel- en droëworsbedryf, en om die sensoriese raklewe van rou gemaalde vleis te verbeter. Produkte kan egter dan onnodig vroeg van die rak verwyder word terwyl dit nog vir die verbruiker aanvaarbaar sou wees.

Uit die voorheengenoemde opbergingsstudies (Miller, 1961; Kempton en Bobier, 1970 ens.) het ook die volgende aan die lig gekom:

1. Organismes (veral melksuurbakterieë) wat by 'n lae pH en O<sub>2</sub>-spanning, en hoë soutkonsentrasie (3 - 6,5%) kan groei, oorheers na verloop van 'n sekere opbergings tyd. Hierdie was 'n algemene bevinding deur verskillende werkers, behalwe deur Duitschaever (1977). Hierdie aspek word later bespreek.
2. Die melksuurbakterieë is aanvanklik in baie klein getalle teenwoordig en word moeilik in die vars verpakte produk opgespoor.
3. Die ergste besmetting met melksuurbakterieë vind plaas tydens op sny en verpakking (Mol et al., 1971).
4. Volgens Paradis en Stiles (1978) is die lae pH wat karakteristiek is aan hierdie produkte 'n belangrike beskermingsfaktor teen die vermeerdering van patogene bakterieë. 'n Lae pH ontstaan egter nie noodwendig nie en daar kan dus nie op 'n lae pH staatgemaak word om patogene te beheer nie.
5. Duitschaever (1978) berig dat die opbergings temperatuur in die verkoops punt 'n groot rol kan speel by die bederf en aantal mikroorganismes wat ontwikkel. Dit is dus noodsaaklik dat die temperatuur so konstant moontlik gehou word.
6. Fruin et al. (1978) het produkte van verskillende vervaardigers ondersoek en gevind dat hoër aërobe mikrobetellings gereeld by sekere vervaardigers voorkom.
7. A.g.v. die spesifieke prosesseringsmetode waardeur die produkte 'n hittebehandeling of beroking ondergaan, is die produkte effektief gepasteuriseer na afloop daarvan. Kontaminasie vind

egter hierna plaas tydens hantering, opсны in kleiner stukke of skywe, of verpakking (vanaf verpakkingsmateriaal, masjienerie, personeel, ens.) (Mol et al., 1971). Hierdie faktore speel dus 'n groot rol in die ontwikkeling van die bakterieë uiteindelik teenwoordig. Die opbergingsstemperatuur in die groot- en kleinhandel is dus die belangrikste faktor in die goedhouvermoë en tempo van bederf.

Streng maatreëls en kontrole is noodsaaklik om die kontaminante-lading te beperk en ontwikkelingstoestande so ongunstig moontlik te maak.

### 2.2.3 D(-)-melksuur as kriterium van bederf

Volgens Schneider et al. (1983), is die D(-)-melksuurkonsentrasie in vleismonsters 'n aanduiding van die varsheid of ouderdom van die produk. Die D(-)-melksuurkonstrasie word as aanduiding gebruik eerder as die totale bakterietelling aangesien hierdie telling 'n plato bereik ná ca. 8 dae met 8,0 log tellings per g by 7°C, en ná 25 dae by 2°C. Die sensoriese analise van die monsters het ook in 'n groter mate met die D(-)-melksuurkonsentrasie gekorreleer as met indikatororganismes, bv. *B. thermosphacta*, Enterobacteriaceae, koliforme, ens. Die D(-)-melksuur was afkomstig van die melksuurbakterieë self as metaboliese eindproduk, terwyl L(+)-melksuur ook deur glikolise in die produk gevorm kan word deur spierensieme.

Die bepaling van bakteriegetalle is egter altyd noodsaaklik aangesien die sensoriese beoordeling nie 'n aanduiding kan gee van die periode wat die produk nog op die rak gehou kan word nie. Dit gee ook die higiëniese toestand van die produk weer, asook moontlike gesondheidsgevaare.

Die outeurs het gevind dat die L(+)-melksuurkonsentrasie in hul produkte ("Kochschinken", "Kassler", Mortadella en "Corned Beef") 3,21 tot 7,21 mg laktaat/ml was. Die aanvanklike D(-)-melksuurkonsentrasie was ca. 0,10 mg/g, maar neem tot aan die einde van die opbergingsperiode (25 dae) toe tot 4,72 en 5,75 mg/g by "Kochschinken" en "Kassler", en onderskeidelik 4,22 en 1,14 mg/g by Mortadella en "Corned Beef". Hierdie syfers oortref meestal dié van die L(+)-laktaatkonsentrasie.

#### 2.2.4 Lactobacilli en *Brochothrix thermosphacta*

Ten spyte van die feit dat *B. thermosphacta* 'n algemene kontaminant en bederfororganisme van vars vleis en - produkte is, speel hierdie organisme by vakuumverpakte vleisprodukte (soos hier gedefinieer), byna geen rol nie.

Paradis en Stiles (1978) het gevind dat *B. thermosphacta* nie geassosieer is met die groei van bakterieë in vakuumverpakte vleisprodukte nie. Dit is selfs in 'n groot aantal van die monsters (71) deur hulle ondersoek, nie gevind nie. Ook Mol et al. (1971) het 'n lae voorkoms van hierdie organisme gevind. Shay et al. (1978) het egter 'n hoër voorkoms tydens rakleefstudies gevind (33% van die isolate). Hierdie verskynsel was onverklaarbaar.

Latere studies deur dieselfde groep (Egan et al., 1980) het aangetoon dat *B. thermosphacta* en lactobacilli die vleisprodukte op verskillende maniere laat bederf:

*B. thermosphacta* bring bederf gouer te weeg en veroorsaak 'n "af"-aroma (geur) wanneer die populasie getalle van 8 log tellings per g bereik. Hierdie "af"-reuk word nie deur lactobacilli veroorsaak nie, maar wel 'n "af"-geur ("flavor"), ná 21 dae met 'n populasie van 8 log tellings per g.

Volgens Nielsen (1983a) het die suurstofdeurlaatbaarheid van die verpakkingsmateriaal 'n invloed op die ontwikkeling van *B. thermosphacta*.

Collins-Thompson en Lopez (1981) het hierdie organisme se voorkoms in vakuumverpakte vleisprodukte (Bologna), bestudeer in verwantskap met nitriet en melksuurbakterieë. Hulle bevindings stem ooreen met dié van Paradis en Stiles (1978) en Mol et al. (1971) nl. dat *B. thermosphacta* se getalle begin afneem wanneer die melksuurbakterieë 6 log tellings per g bereik.

In afwesigheid van nitriet het *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus viridescens* en *Lactobacillus buchneri* geen merkbare invloed op *B. thermosphacta* gehad nie. *Lactobacillus plantarum* en *Lactobacillus brevis* het *B. thermosphacta* merkbaar geïnhibeer. Nitriet het 'n kleiner uitwerking op die groei van *B. thermosphacta* gehad as wat deur Brownlie (1966) berig is, maar in teenwoordigheid van nitriet en die bogenoemde melksuurbakterieë was die inhiberende effek duidelik waarneembaar.

## 2.2.5 Ander faktore wat 'n rol mag speel by rakleef tyd

### 2.2.5.1 Rou bestanddele

Die aanvanklike graad van kontaminasie van die rou bestanddele het geen invloed op die bederf van die produkte nie aangesien dit 'n hittebehandeling of berokingsproses ondergaan, en dus effektief gepasteuriseer word. Hoë getalle in die bestanddele mag egter wel die tekstuur, geur en kwaliteit van die eindproduk beïnvloed (Warnecke et al., 1966).

### 2.2.5.2 Byvoeging van Natriumnitriet

Die byvoeging van nitriet en sorbaat in die vorm van natriumnitriet, natrium-isoaskorbaat en kaliumsorbaat het geen merkbare uitwerking gehad

op die oorlewing van bygevoegde patogene of die "natuurlike" mikrobese noemenswaardig verander nie (Hallerbach en Potter, 1981).

Nielsen (1983a) en Collins-Thompson en Lopez (1981) het getoon dat nitriet melksuurbakterieë verskillend beïnvloed: óf volledige inhibisie, óf gedeeltelike inhibisie, óf geen inhibisie, soos veral die geval met die sg. "atipiese" streptobakterieë.

#### 2.2.5.3 Temperatuur, Lig, Opbergings tyd

Blootstelling aan lig (soos in uitstalkabinette) het geen merkbare invloed gehad op die mikrobese in frankfurters nie. Temperatuur is egter 'n belangrike parameter in die goedhou vermoë van produkte. By temperature van  $-4^{\circ}\text{C}$  tot  $0^{\circ}\text{C}$  het die bakteriegetalle konstant gebly tot op 49 dae van opberging. Alm et al. (1961) en Allen en Foster (1960) was ook eens oor hierdie aspek. Lae temperatuur is baie belangrik om bederf te vertraag en opbergings tyd te verleng (Simard et al., 1983).

#### 2.2.5.4 Deurlaatbaarheid van verpakkingsmateriaal

Vier verskillende verpakkingsfilms is deur Nielsen (1983b) getoets vir gasdeurlaatbaarheid en die invloed daarvan op die mikrobepopulasie. Groot verskille is gevind in die deurlaatbaarheid van die vier materiale, maar slegs klein verskille in die aërobe plaattellings. Die maksimum getalle was egter hoër by dié met die grootste deurlaatbaarheid. By hierdie materiale was die tellings van *B. thermosphacta* baie hoog, terwyl dié van melksuurbakterieë hoër was by dié met lae gasdeurlaatbaarheid.

#### 2.2.5.5 Effek van beroking

Tydens die berokingsproses word die produk verhit tot dit 'n interne temperatuur van  $60^{\circ}\text{C}$  tot  $80^{\circ}\text{C}$

bereik. Heiszler et al. (1972) het die effek van die tyd en temperatuur van beroking op die mikroorganismes op frankfurters ondersoek en het gevind dat 'n omgekeerde verwantskap tussen tyd en interne temperatuur van beroking, en bakterietoename tydens opberging bestaan. Verhoging van die interne temperatuur was egter meer inhiberend as verlenging van die tydsduur van beroking. D.m.v. die berokingsproses kan die voorkoms van koagulase-positiewe staphylococci beheer word. Die opberging van die produkte by 'n lae temperatuur is noodsaaklik om die bakteriostatiese effek van die berokingsproses te versterk.

#### 2.2.5.6 Gasatmosfeerverpakking

A.g.v. sekere probleme wat met vakuumverpakking ondervind word ná produksie, bv. verlies aan vakuumvervorming, verswakking van geur en kleur, eksudasie, ens. is gemodifiseerde gasatmosfeerverpakking voorgestel as alternatief om mikrobiële bederf, kleurverandering en inkrimping te bekamp. Die meeste van hierdie studies is gedoen met vars vleis, maar Simard et al. (1983) het die invloed daarvan op vleisprodukte ondersoek. By psigrotrofe bakterieë, anaërobe bakterieë, koliforme en lactobacilli is geen statisties betekenisvolle verskille gevind tussen vakuum- en N<sub>2</sub>-verpakkings nie. Giste en swamme het konstant gebly met vakuumverpakking, maar het betekenisvol toegeneem met N<sub>2</sub>-verpakking ná 7 dae opberging (by 3°C en 7°C).

#### 2.2.5.7 Rakleef tyd van verwerkte vleis

Groot verskille in die aanvaarbare rakleef tyd en goedhou vermoë van verskillende produkte is gevind. Eenvormige regulasies bestaan ook nie waardeur produkte ná afloop van 'n sekere aantal dae van die rakke verwyder moet word nie. Opbergingstemperatuur en kontaminasielading by verpakking is die

belangrikste faktore wat die rakleef tyd van 'n produk bepaal.

Allen en Foster (1960) het gevind dat die produkte aanvaarbaar bly tot 40 dae by  $7,2^{\circ}\text{C}$  met 'n aërobe plaattelling van 8 log telling per g. Slymvorming het dan voorgekom. Hierdie getal organismes word egter eers ná 70 tot 80 dae bereik by  $1,1^{\circ}\text{C}$ . Kempton en Bobier (1970) het die rakleef tyd op 35 dae gestel waarna slymvorming die produk bederf. 'n Eksudaat is egter al ná 21 dae opgemerk by "Pickle & Pimento Loaf". By Bologna is egter 'n verbetering in smaak waargeneem (a.g.v. die melksuur) en is die rakleef tyd na 105 dae verleng by  $5^{\circ}\text{C}$ .

Ooreenstemmende resultate is deur Hill et al. (1976) gevind.

In Arizona (VSA) moet produkte van die rak verwyder word wanneer getalle van 8 log tellings per g bereik word. Volgens 'n proepaneel was produkte (Bologna en "Luncheon Meat") met 'n bakterietelling van onderskeidelik 4 tot 5 en 8 tot 9 log tellings per g, opgeberg by 3 tot  $7^{\circ}\text{C}$ , minder aanvaarbaar (d.i. 'n rakleef tyd van 24 tot 28 dae ná verstryking van die datum op monsters), as produkte met mikrobetellings van 5 tot 8 log tellings per g. Dit impliseer dat die rakleef tyd verleng kon word na 40 tot 60 dae ná die amptelike verstrykdatum. Die aanvaarbaarheid van hierdie produkte met die hoë bakterietellings word toegeskryf aan die gevormde melksuur wat 'n pikante smaak aan die produk gee.

'n Rakleef tyd van 30 tot 35 dae by  $4^{\circ}\text{C}$  word deur Paradis en Stiles (1978) in vooruitsig gestel, terwyl Oblinger en Kennedy (1980) ook die beëindiging van die rakleef tyd voorstel wanneer die aantal



organismes 8 log tellings per g bereik.

## 2.2.6 Moontlike bronne van besmetting tydens prosessering

### 2.2.6.1 Voor hittebehandeling

Groot hoeveelhede bakterieë kan as kontaminasie verkry word vanaf die slagproses, opсны en rypmaking van die vleis (Kempton en Bobier, 1970; Kitchell en Shaw, 1975). Slegs 10% van hierdie organismes is deur eersgenoemde outeurs vanaf *Lactobacillus*-selektiewe medium verkry.

### 2.2.6.2 Effek van hittebehandeling

Die klein getal organismes wat hierdie proses oorleef, is hoofsaaklik spore en weerstandbiedende vegetatiewe selle. Die lactobacilli kon nie direk ná hierdie proses aangetoon word nie.

### 2.2.6.3 Verpakking

Tot met verpakking neem die getal bakterieë vinnig toe, afhangende van die mate van meganisasie van die verpakkingsproses. By die produksie van Weense worsies kom 'n groot mate van meganisasie voor en word die kontaminasie daardeur beperk. Melksuurbakterieë kan nou weer in groot getalle aangetoon word.

By opсны en verpakking is sanitasie van die grootste belang en sekere probleemareas in die proses kan aangetoon word. Die bronne van kontaminasie kan personeel, lug, apparaat en toestande van verpakking wees. Meer gereelde sanitasie en skoonmaak is 'n wyse waarop kontaminasie beperk kan word. Geister en Maack (1967) het aanbeveel dat sanitasie elke 2 uur gebruik moet word om 'n rakleef tyd van 30 dae te verseker. Hierdie sienswyse word ook deur Cavett (1963) en Ingram (1962) gehuldig.

Pivnick en Bird (1965) het gevind dat die patogeen *Clostridium botulinum* toksiese getalle bereik in vakuumverpakte vleisprodukte voordat die produk sigbaar bederf by 30°C.

Die hoogste standarde van sanitasie is dus noodsaaklik vir die beperking van kontaminasie en verlenging van rakleef tyd. Eenvormige standarde en regulasies bestaan egter nie om hierdie belangrike saak te beheer nie.

### 2.3 MELKSUURBAKTERIEË IN ASSOSIASIE MET VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE

Sedert daar rondom 1958 begin is met mikrobiologiese navorsing i.v.m. vakuumverpakte vleisprodukte deur Allen en Foster (1960), het die oorheersende getuieis daarop gedui dat bederf by hierdie tipe produkte hoofsaaklik deur die melksuurbakterieë veroorsaak word. Hierdie groep organismes is aanvanklik in klein getalle teenwoordig, maar vermeerder vinnig om die dominante groep in die populasie te word.

Slegs Duitschaeffer (1977) het berig dat geen aanduiding van die teenwoordigheid van melksuurbakterieë in die produkte (vakuumverpakte "Luncheon Meats", Bologna, ens.) gevind is nie, en daarom is geen poging aangewend om dit te isoleer nie. 80% van die kolonies geïsoleer, was katalase-positief. Die produkte was nie ouer as vyf dae ná die verstrykingsdatum nie, en hy voorsien die moontlikheid dat die katalase-negatiewe organismes ná hierdie tydperk kon ontwikkel.

Ten spyte van hierdie eenstemmigheid? het baie min publikasies verskyn waarin gepoog is om die melksuurbakterieë te sistematiseer. Aangesien 'n nuwe tipe ekosistiem ontstaan het met die vakuumverpakking van voedselprodukte, kan verwag word dat seleksie onder die

mikroorganismes sal plaasvind en dat nuwe biotipes kan ontwikkel.

Allen en Foster (1960) het weereens die voortou geneem met 'n klassifikasiepoging en het basiese mikrobiologiese, biochemiese en fisiologiese toetse uitgevoer met hul isolate. Drie duidelik afgebakende groepe is geïdentifiseer (Allen en Foster, 1960):

1. Heterofermenterende melksuurbakterieë
2. Homofermenterende melksuurbakterieë wat suur vorm vanaf laktose
3. Homofermentatiewe melksuurbakterieë wat geen laktose fermenteer nie.

Cavett (1963) het 'n skema voorgestel waarvolgens melksuurbakterieë in vakuumverpakte spek geïdentifiseer kon word. Die organismes teenwoordig kon in genera verdeel word deur 'n diagnostiese sleutel wat uit 'n klein aantal toetse bestaan. Selfs organismes wat in baie klein getalle voorkom, kon opgespoor word. Alhoewel hierdie sleutel van toepassing is op 'n rou vleisprodukt, verwys Reuter (1970b) hierna as 'n bruikbare uitgangspunt vir die identifikasie van melksuurbakterieë in ander vleisprodukte.

Hierna het Mol et al. (1970), Reuter (1970a), Reuter (1970b), Kitchell en Shaw (1975), Reuter (1975) e.a. die probleem aangepak.

Afgesien van ander mikroorganismes wat in klein hoeveelhede op die produkte gevind is (bv. *Aerococcus* ssp. Micrococci, halofiele, Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, giste en swamme), is die volgende 3 groepe deur al die bg. werkers onderskei:

1. Ongeklassifiseerde Streptobakterieë

Volgens Mol et al. (1971) maak hierdie groep die

grootste deel van die melksuurisolate uit, nl. sowat 87%. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus farciminis* en *Lactobacillus casei* is gevind, maar ook isolate wat nie by die bogenoemde spesies groepeer kon word nie. Reuter (1970a) het bevind dat hierdie groep verskil van *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis* en ssp. *torquens*.

## 2. Atipiese streptobakterieë

Mol et al. (1971) het hul eie resultate vergelyk met atipiese streptobakterieë van Deibel en Niven (1958), Thornley en Sharpe (1959) uit hoendervleis, Keddie (1959) uit kuilyoer, Cavett (1963) uit spek en dié van Abo-Elnaga en Kandler (1965). Wesenlike verskille met hierdie isolate kon aangetoon word.

'n Redelike groot mate van ooreenkoms is gevind met die atipiese streptobakterieë van Reuter (1967) uit droë wors en dié van Allen en Foster (1960).

Volgens Reuter (1970a) het hierdie groep 'n swakker fermentasiepatroon as die tipiese streptobakterieë. Vergelyking met isolate van ander werkers is egter feitlik onmoontlik a.g.v. onvoldoende inligting en verskillende benaderings.

Reuter (1975) het die eienskappe van atipiese streptobakterieë soos volg uiteengesit:

- i. 'n Sterk neiging tot kokkoïede selvorme op soliede media met 'n lae koolhidraatinhoud. Op lactobacillusmedium word die tipiese staafvorme aangetref.
- ii. 'n Laer suurtoleransie kom voor. Die onderskeiding met tipiese streptobakterieë kan dus reeds m.b.v. eindpH-bepaling gedoen word.
- iii. Die minimum en maksimumgroeitemperature verskil.

Reuter (1975) berig ook dat met die beskrywing van nuwe spesies gewag is aangesien selwandontledings, DNA-homologiestudies en bepaling van die mol% G + C nodig sal wees vir identifikasie.

### 3. Heterofermenterende melksuurbakterieë

Slegs drie *Lactobacillus viridescens* spesies is deur Mol et al. (1971) geïsoleer. Ook Allen en Foster (1960) en Reuter (1970a) het van hierdie groep gevind. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridescens* en *Lactobacillus halotolerans* kom algemeen in vleis voor (Reuter, 1970a). Die heterofermenterende lactobacilli word van die leuconostocs onderskei op grond van selmorfologie, melksuurkonfigurasie, slymvorming uit sukrose en die teenwoordigheid van arginiendihidrolase.

Kagermeier (1981) het 'n omvattende ondersoek gedoen na homofermenterende melksuurbakterieë geïsoleer uit 'n verskeidenheid vleisprodukte: "Rohwurst", maalvleis, "Kochwurst", ens.

Die grootste groep isolate is aanvanklik in twee groepe verdeel op grond van die teenwoordigheid van meso-diaminopimeliensuur ( $\underline{m} - A_2\text{pm}$ ) in die selwande. Daarna is die groep waarby  $\underline{m} - A_2\text{pm}$  afwesig was, verder onderverdeel volgens konfigurasie van die gevormde melksuur. In geheel is vier duidelike groepe onderskei:

1. met  $\underline{m} - A_2\text{pm}$
2. sonder  $\underline{m} - A_2\text{pm}$ , vorm DL-melksuur
3. sonder  $\underline{m} - A_2\text{pm}$ , geen rasemase,  $\geq 85\%$  L(+)-melksuur
4. sonder  $\underline{m} - A_2\text{pm}$ , L(+)-melksuur.

Binne elke groep is verdere verdelings en klassifikasie gedoen m.b.v. DNA-homologiestudies, suikerfermentasiepatrone, en mol % G + C in die DNA.

Die meeste isolate het binne die tweede groep geval en volgens Kagermeier sou hierdie groep hoofsaaklik uit *Lactobacillus sake* en *Lactobacillus curvatus* bestaan.

Die kenmerke van die grootste aantal isolate het ooreengestem met die "tipiese" en "atipiese" streptobakterieë van Reuter (1967, 1970a), terwyl pediococci, leuconostocs, heterofermenterende melksuurbakterieë en streptococci in 'n kleiner mate teenwoordig was.

Die "tipiese" streptobakterieë kon geïdentifiseer word as *L. plantarum*, *L. casei*, *Lactobacillus alimentarius* en *L. farciminis*. Ander organismes kon nie by hierdie spesies ingedeel word nie aangesien daar saam met die groot mate van ooreenkoms ook wesenlike verskille bestaan, bv. in elektroforetiese beweeglikheid van laktaat dehidrogenase (LDH), of suikerfermentasiepatroon.

Die "atipiese" streptobakterieë het aan die 3 eienskappe soos deur Reuter (1975) gestel, voldoen. M.b.v. DNA-DNA homologiestudies is die groep as *L. sake* of *L. curvatus* geklassifiseer. Dié 2 spesies is baie na verwant (50% DNA-DNA homologie), en verdere skeiding is hoofsaaklik gedoen op grond van suikerfermentasies. 'n Bevredigende onderskeid kan egter nie in alle gevalle getref word nie, en sekere isolate kon aan enige van die bogenoemde twee spesies toegeken word.

Met die afhandeling van studie het die werk van Shaw en Harding (1984) m.b.t. die atipiese streptobakterieë bekend geword. Die isolate wat hulle verkry het van vakuumpverpakte, rou vleis is m.b.v. numeriese taksonomie geklassifiseer.

Twee duidelik afgebakende groepe wat nie by die bekende melksuurbakterieë tuisgehoort het nie, en wat albei uit streptobakterieë bestaan het, is gevind. Hierdie isolate het 90% van die totale isolate uitgemaak, en die twee groepe word op grond van hul suurtoleransie van mekaar onderskei. Hulle stel voor dat die DL-melksuurvormende isolate in hul groep II, wat suurverdraend is, as *L. sake* geklassifiseer word, en die wat L(+)-melksuur vorm, as *Lactobacillus bavaricus*. Die isolate in hul groep I verteenwoordig volgens die outeurs 'n nuwe spesie wat gliserol fermenteer, ammoniak uit arginien vorm, pirovaat as energiebron kan gebruik en 'n uitsonderlik lae mol % G+C besit.

Met hierdie benadering van numeriese taksonomie is dit nou volgens die outeurs moontlik om die melksuurbakterieë op vakuumverpakte vleis te klassifiseer en kan die term "atipiese" streptobakterieë verval. Die probleem van verskillende parameters wat deur verskillende werkers gebruik is, behoort ook volgens hulle deur hierdie metode van klassifikasie oorbrug te word.

## 2.4 STANDAARDE EN RIGLYNE VIR MIKROBIOLOGIESE KWALITEIT VAN VERWERKTE VLEIS

### 2.4.1 Definisies

Standaard behels regtelike norme neergelê vir die soort en aantal mikroörganismes in 'n lewensmiddel,

en metodes om dit te bepaal. So 'n standaard word na 'n grondige ondersoek t.o.v. gewenstheid, kontroleerbaarheid en uitvoerbaarheid, ingestel, en die praktyk bewys dan of sodanige standaard sinvol en realisties is. 'n Standaard kan slegs deur verandering van wette gewysig word wat 'n lang en uitgerekte proses is (Leistner et al., 1981).

Riglyne het geen afdwingbare geregtelike mag nie en dien slegs as aanbeveling. Mikrobiologiese riglyne behels die aanbevole aantal of tipe mikroorganismes of afwesigheid daarvan in 'n sekere tipe produk. Metodes en monsterneming moet ook hierby ingesluit wees (Leistner et al., 1981).

Standaarde is dus regulatories en afdwingbaar van aard, en behels optrede van instansies buite die voedselbedryf wat die toepassing van hierdie standarde moet kontroleer. Riglyne is makliker om toe te pas aangesien dit interne kontrole behels. Riglyne kan ook redelik maklik verander word sonder 'n lang wetlike proses om by die snel ontwikkelende vleis- en vleisverwerkingsindustrie aan te pas.

#### 2.4.2 Bestaande riglyne

Geen omvattende mikrobiologiese standarde vir vleis en vleisprodukte bestaan internasionaal nie, maar wel 'n aantal riglyne (Debevere, pers. mededeling). Veral vir rou en verwerkte vleis bestaan die riglyne al redelik lank, maar vir vakuumverpakte vleis en vleisprodukte moet dienlike riglyne oor die algemeen nog saamgestel word.

In hul publikasie verwys Leistner et al. (1981) net een keer na vakuumverpakte vleisprodukte soos hier gedefinieer (Brühwursttipe). (Enkele male word ook na dié tipe produkte wat nie vakuumverpak is nie, verwys.) Volgens die outeurs bou 'n buitengewoon



hoë bakterielading dikwels in hierdie vakuumverpakte produkte op, maar dit bestaan "gelukkig meestal uit melksuurbakterieë wat geen gesondheidsgevaar daarstel nie"(!) Bederf a.g.v. suurvorming kom egter voor. Dit is volgens hierdie outeurs dus nie noodsaaklik om mikrobiologiese riglyne vir "voorverpakte" vleisprodukte op te stel nie, maar riglyne sou nuttig wees om die varsheid en houbaarheid van hierdie produkte te verseker.

In Tabel 2.2 word die riglyne wat volgens Leistner et al. (1981) t.o.v. vakuumverpakte vleisprodukte bestaan, saamgevat.

Uit Tabel 2.2 blyk dit dat die bestaande riglyne t.o.v. vakuumverpakte vleisprodukte tot die totale bakterietelling beperk is. Selfs by die vleisprodukte wat nie onder vakuum verpak word nie, is die riglyne onvolledig, veral t.o.v. sekere patogene.

TABEL 2.2 OPSOMMING VAN DIE RIGLYNE T.O.V. VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE, ASOOK NIE-VAKUUMVERPAKTE BRÜHWURSTTIPE VLEISPRODUKTE IN 'N AANTAL LANDE, VOLGENS LEISTNER ET AL. (1981) EN DEBEVERE (PERSOONLIKE MEDEDELING)

Land	Tipe Verpakking	Groep mikroorganismes (aantal)										
		Totale telling (per g)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Koli-forme	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -reduserende clostridia	Fekale Streptococci	Enterobakterieë	<i>Proteus</i> ssp	Giste en Swamme
Joego-Slawië	Nie-vakuum		geen	geen/25g		geen/0,01g		geen/0,01g			geen	
Denemarke	Bevrore	10 <sup>4</sup>				100/g		100/g	100/g			
Frankryk	Nie-vakuum	5 · 10 <sup>5</sup>		geen		10 <sup>2</sup> /g	10 <sup>3</sup> /g	30/g				
	Vakuum	3x10 <sup>5</sup>										
VSA (alle state)	Nie-vakuum	1x10 <sup>6</sup>	0-50	geen	geen	geen	geen					0- 10 <sup>6</sup>
Wes-Duitsland	Nie-vakuum	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>										
	Vakuum	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>										
België	Nie-vakuum	10 <sup>5</sup>	geen/g	geen/25g	10 <sup>2</sup> /g	10 <sup>2</sup> /g		10 <sup>3</sup> /g	10/g			

## HOOFSTUK 3 : EKSPERIMENTELE PROSEDURES

### 3.1 MEDIA

Die media wat gebruik is vir isolasie van spesifieke mikrobe, fisiologiese toetse en reagense wat by hierdie toetse gebruik is, word in Tabel 3.1 opgesom. Die spesifieke mikrobegroep, medium, pH, inkubasietyd en -temperatuur, asook die verwysing in die literatuur word gegee. Enkele opmerkings i.v.m. dié media word hieronder gemaak.

#### 3.1.1 Asetaatagar met 0,5% Fruktose

As 'n poging om die groei van melksuurbakterieë op asetaatagar te verbeter, is 0,5% Fruktose by die medium gevoeg. Dit is d.m.v. 'n filter gesteriliseer en bygevoeg aangesien asetaatagar nie geoutoklaveer word nie.

#### 3.1.2 MRS-agar met 0,04% Kaliumsorbaat sonder Natriumasetaat (MRS-KS-agar)

0,04% Kaliumsorbaat is by die geoutoklaveerde MRS-agar (ca. 50°C) gevoeg nadat dit steriel gefiltreer is. Natriumasetaat is weggelaat aangesien dit soms die groei van melksuurbakterieë inhibeer. (Sien ook hoofstuk 3 punt 4.2.2.1.)

#### 3.1.3 Bereiding van eieremulsie vir Baird-Parker Staphylococcus Base

Die bereiding van die eieremulsie is gedoen volgens Handbook: Culture Media, Merck, 1982.

Vars hoendereiers is gewas en vir 'n paar uur in 70% etanol geplaas. Die wit en geel van die eier is asepties geskei en 50 ml van die eiergeel by 50 ml steriele fisiologiese soutoplossing (0,85% w/v) gevoeg en gehomogeniseer. (Die geel van 1 groot hoendereier is ca. 20-25 ml.)

TABEL 3.1 OPSOMMING VAN DIE MEDIA WAT GEBRUIK IS VIR SPESIFIEKE MIKROBEGROEPE EN FISILOGIESE TOETSE, ASOOK DIE pH, INKUBASIETYD EN -TEMPERATUUR WAT GEBRUIK IS. VERWYSINGS NA DIE LITERATUUR WORD OOK GEGEE

Mikroegroep of Fisiologiese Toets	Medium	Afkorting	pH	Inkubasie		Atmosfeer	Verwysing
	Medium			Tyd	Temp.		
Totale mikrobepopulasie	Standard I agar (Merck)	Std-I	7,5	72h	30°C	aëroob	
Melksuurbakterieë	Asetaatar (Merck)	AA	5,5	72h	30°C	aëroob	Rogosa <u>et al.</u> (1951)
	Asetaatar met 0,5% Fruktose	AA+Fr	5,5	72h	30°C	aëroob	Sien 3.1.1
	MRS-agar met 0,04% Kaliumsorbataat (Merck) sonder Na-asetaat	MRS-KS	6,8	72h	30°C	aëroob	Reuter (1970a). Natriumasetaat is weggelaat. Sien 3.1.2
<i>B. thermosphacta</i>	STAA-medium	STAA		96h	25°C	aëroob	Gardner (1966)
Enterococci	Citrate Azide Tween Carbonate Agar Base (Merck)	CATC	7,0	48h	37°C	aëroob	
Staphylococci	Baird-Parker Staphylococcus Base (Merck)	B-P	6,8	96h	37°C	aëroob	Sien 3.1.3 vir bereiding van eier-emulsie
Enterobakterieë	DHL-agar (Merck) volgens Sakazaki	DHL	7,2	24h 48h	37°C 25°C	aëroob	
Giste en swamme	Aartappeldekstrose agar (Biolab)	ADA		96h	25°C	aëroob	
Arginienhidrolise				48h	25°C		Niven <u>et al.</u> (1942)
Suikerfermentasie	Basale MRS-medium	B-MRS	6,5	48h	25°C		Sharpe en Fryer (1965), De Man <u>et al.</u> (1960). Sien 3.1.4
Malaatfermentasie			5,4	48h	25°C		Mitsuoka (1969)
Bepaling van beweeglikheid, gelatinase, nitraatreduksie			7,3	48h	25°C		Reuter (1970a) Natriumasetaat is weggelaat.
Basiese groeimedium	MRS-sop (Merck)	MRS	6,5	48h	25°C		De Man <u>et al.</u> (1960)
	MRS-sop sonder Natriumasetaat	MRS-Ac					Natriumasetaat is weggelaat

#### 3.1.4 Basale medium vir suikerfermentasie

Die basale medium is ook sonder natriumasetaat gebruik vir die isolate van monsters W28 - 35 en V28 - 32, V34 en V35. Hierdie medium is MRS-medium (De Man et al., 1960) sonder glukose en vleisekstrak.

### 3.2 MONSTERS

#### 3.2.1 Monsters

27 verskillende vleisproduk-monsters is ondersoek vir die teenwoordigheid van veral melksuurbakterieë, maar ook ander mikroörganismes wat teenwoordig mag wees.

8 van hierdie monsters is in die kleinhandel aangekoop met 'n melkerige eksudaat in die pakkie. Die oorblywende 19 monsters is deur die produsent voorsien. Dit was produkte wat deur die kleinhandel teruggestuur is na die produsent a.g.v. sigbare tekens van bederf, nl. 'n melkerige eksudaat, verlies aan vakuum, verkleuring, ens. (Geen rakleef-tydvervaldatum was op die pakkies aangedui nie.)

Die eksudaat wat by 22 van hierdie monsters aanwesig was, is ook gebruik, en 49 monsters is dus in totaal ondersoek.

Die produkte waaruit die monsters bestaan het, word in Tabel 3.2 gegee, asook die nommers wat aan die monsters toegeken is en aan die eksudaat indien dit aanwesig was. Al die monsters is deur Enterprise geproduseer behalwe W1 en W2 wat van Renown afkomstig was. Monsters W1 tot W4, W30 en W33 tot W35 is self aangekoop terwyl die res deur die produsent voorsien is.

TABEL 3.2 TABEL VAN DIE TIPE PRODUKTE WAARUIT DIE MONSTERS BESTAAN HET, ASOOK DIE NOMMER WAT AAN 'N SPESIFIEKE MONSTER EN DIE EKSUDAAT (INDIEN TEENWOORDIG) TOEGEKEN IS

Produk	Aantal	No	Eksudaat teenwoordig (No)
Weense worsies	6	W10 W17 W18 W19 W27 W28	V10 V17 V18 V19 V27 V28
Gerookte Weense Worsies	4	W5 W6 W13 W29	V5 V6 V13 V29
Noenvleis (Luncheon Meat)	6	W1 W2 W11 W15 W16 W34	V11 V15 V16 V34
Frankfurters	2	W7 W31	V31
"Russians"	4	W3 W9 W32 W35	V3 V9 V32 V35
Rookwors	3	W4 W30 W33	V4 V30
"Country Sausage"	2	W8 W14	V8
Totaal		27	22

### 3.2.2 Monsterneming

#### 3.2.2.1 Eksudaat

1 ml van die eksudaat in die monster is met 'n steriele pipet oorgeplaas in 'n steriele 9 ml kwartsterkte Ringer's Buffer blanko (Merck) ( $10^{-1}$  verdunning).

#### 3.2.2.2 Wors/Vleis

20g van 'n wors- of vleismonster is asepties verwyder uit die middel en teen die kante om 'n verteenwoordigende gedeelte van die monster te verkry. Dit is saam met 180 ml steriele kwartsterkte Ringer's Buffer vir 2 min in 'n Stomacher fynge- maak ( $10^{-1}$  verdunning). (Steriele plastieksakkies is hiervoor gebruik )

#### 3.2.2.3 Verdunningsreekse

Hierna is toepaslike verdunningsreekse gemaak met steriele 9 ml kwartsterkte Ringer's Buffer (Merck).

#### 3.2.2.4 Uitplatings

Alle uitplatings is in duplikaat gedoen.

M.b.v. die spreiplaattegniek is 0,1 ml van 'n toepaslike verdunning uitgeplaat (d.i. 'n verdere  $10^{-1}$  verdunning) op selektiewe media en geïnkubeer by die optimum temperatuur vir elke groep organismes. Die verdunnings wat uitgeplaat is, die selektiewe medium en mikrobegroep word in Tabel 3.3 aangedui.

### 3.3 BEPALING VAN FISIESE EIENSKAPPE

#### 3.3.1 pH

Op die dag van monsterneming is die pH van die wors of vleis, en van die eksudaat bepaal d.m.v. 'n Zeiss Optical Instr. (Pty) Ltd. Model 300 pH-meter, of 'n Taeuber & Corssen Model 1001 pH-meter.

TABEL 3.3 TABEL VAN DIE VERDUNNINGSREEKSE WAT UITGEPLAAT IS, ASOOK DIE SPESIFIEKE MIKROBEGROEP EN DIE MEDIUM WAT GEBRUIK IS

Mikroegroep	Medium	Verdunning
Totale mikrobetelling	Std-I-agar	$10^{-4}$ - $10^{-7}$ ( $10^{-8}$ )
Melksuurbakterieë	AA	$10^{-4}$ - $10^{-7}$ ( $10^{-8}$ )
	AA+Fr	$10^{-4}$ - $10^{-7}$
	MRS-KS	$10^{-4}$ - $10^{-8}$
<i>B. thermosphacta</i>	STAA	$10^{-2}$ - $10^{-4}$
Enterococci	CATC	$10^{-2}$ - $10^{-4}$
Staphylococci	B-P	$10^{-2}$ - $10^{-4}$
Giste en swamme	ADA	$10^{-2}$ - $10^{-4}$
Enterobakterieë	DHL	$10^{-1}$ , $10^{-2}$



### 3.3.2 Melksuurisomeer

Die melksuurisomeer en -konsentrasie van die eksudate is ook bepaal volgens die metode beskryf onder punt 3.5.5.

### 3.3.3 Telling van kolonies

Kolonies op die plate met die hoogste verdunning, asook alle ander telbare plate, is getel.

Die volgende metodes van evaluering is ook aangewend:

#### 3.3.3.1 *Brochothrix thermosphacta*

Telbare plate op STAA-agar is behandel met 2 ml oksidasereagens: (Merck) t.w. 1% N,N,N',N'-tetrametiel-1,4-fenileendiammoniumchloried in 'n 0,1% waterige askorbiensuuroplossing (Merck), wat telkens vars opgemaak is. Dit is vir 10 min op die plate gelaat, en daarna is slegs kolonies wat nie bloupers verkleur het nie (d.w.s. oksidase-negatiewe kolonies), getel.

#### 3.3.3.2 Enterococci

Slegs donkerrooi kolonies met 'n deursnee van meer as 1 mm is in aanmerking geneem (Handbook: Culture Media, Merck, 1982).

#### 3.3.3.3 Staphylococci

Slegs swart, skyfvormige kolonies is getel en verdeel in 2 groepe:

- tipiese kolonies: blink, glad, met 'n helder sone rondom kolonies, met of sonder 'n presipitaat;
- atipiese kolonies: blink, glad, sonder helder sone.

(Handbook: Culture Media, Merck, 1982).

#### 3.3.3.4 Giste en Swamme

'n Oplossing van 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is gebruik om te verseker dat slegs giste (katalase-positief) getel word.

#### 3.3.3.5 Enterobakterieë

Alle kolonies is getel.

By monster V32 is die kolonies m.b.v. die API 20E-sisteen (Ayerst Laboratories) geïdentifiseer.

### 3.4 ISOLASIE VAN MELKSUURBAKTERIEË

#### 3.4.1 Isolasie

Kolonies wat verteenwoordigend was van die verskillende tipes morfologie op AA, AA+Fr, Std I- en MRS-KS-agar, is uitgestreep op MRS-agar (Merck). Dié kolonies is gekies vanaf die plate met die hoogste verdunning, en by die laaste 3 eksperimentele isolasies (15 monsters) is die kolonies soos volg gekies:

Medium	Aantal kolonies per monster
AA	8
MRS-KS	10
Std-I	5

M.b.v. die Gaspak - (BBL) of Anaerocult-sisteme (Merck), is hierdie MRS-agarplate anaëroob geïnkubeer vir 48h by 25°C.

#### 3.4.2 Bewaring van isolate

##### 3.4.2.1 MRS-sopkultuur

Indien 'n reinkultuur op die plaat verkry is, is 'n kolonie daarvan oorgedra na MRS-sop en weereens by 25°C vir 48h geïnkubeer. Hierdie sopkulture is in die koelkas bewaar en drieweekliks op vars sop oorgeënt.

#### 3.4.2.2 Vriesdroging

Alle isolate is so gou moontlik gevriesdroog met 'n Edwards Model B5A-vriesdroër. Steriele afge-roomde melk (Difco) wat 10% laktose (Merck) bevat (geoutoklaveer by 115°C vir 5 min), is gebruik om die kulture van 48h-oue MRS-agarskuinstes af te was.

### 3.5 BEPALING VAN ALGEMENE EIENSKAPPE VAN MELKSUURBAKTERIEË

#### 3.5.1 Groei by verskillende temperature, pH 3,9, 10% NaCl (Sharpe en Fryer, 1965)

Die groei van die isolate by 4°C, 15°C en 45°C in MRS-sop is getoets na 8, 5 en 4 dae onderskeidelik.

Groei in MRS-sop by pH 3,9, asook in MRS-sop waarby 10% NaCl gevoeg is, is na 4 dae inkubasie by 25°C bepaal.

#### 3.5.2 Gasvorming uit glukose, bepaling van finale pH

MRS-sop sonder di-ammoniumwaterstofsitraat is gebruik om gasvorming deur die isolate vanaf glukose m.b.v. 'n Durhambuisie te bepaal, ná inkubasie van 48h by 25°C. Na afloop van 'n verdere inkubasieperiode van 48h, is die finale pH van die medium met 'n Zeiss Optical Instr. 300-pH meter bepaal.

#### 3.5.3 Arginienhidrolise

(Niven et al., 1942)

Die isolate is in die betrokke medium (sien Tabel 3.1) ingeënt en by 25°C geïnkubeer vir 72h. Die teenwoordigheid van ammoniak in hierdie kulture is m.b.v. Nessler se reagens (Harrigan en McCance, 1976) uitgewys. 'n Gelyke aantal druppels van die kultuur en reagens is gemeng en die kleurreaksie waargeneem. 'n Donker oranje tot rooibruinverkleuring dui op arginienhidrolise en die vorming van ammoniak.

### 3.5.4 Katalase- en Pseudokatalase-aktiwiteit

#### 3.5.4.1 Katalase

'n Oplossing van 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is gebruik om die katalase-aktiwiteit van elke isolaat te bepaal. Die kolonies is vanaf 48h-oue kulture op MRS-agar oorgedra na 'n druppel 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) op 'n voorwerpglasie met 'n inokulasienaald wat nie van platinum vervaardig is nie. Katalase-aktiwiteit is as gasborrels waargeneem (Whittenbury, 1964).

#### 3.5.4.2 Pseudokatalase

Dieselfde prosedure is gevolg as by die katalase-toets, maar die isolate is op bloedagarplate gekweek. Lise van die bloedselle rondom die kultuurgroei is terselfdertyd ondersoek (Whittenbury, 1964).

### 3.5.5 Bepaling van die melksuurisomeer

(Hohorst, 1970; Bergmeyer, 1965)

#### a. Kultuur

Die isolate is in MRS-sop sonder vleisekstrak of natriumasetaat gekweek vir 48h by 25°C.

#### b. Reagense

##### i. Glisienhidrasienbuffer

Glisien	22,8 g
Hidrasienhidraat (25%)	50 ml
Gedist. H <sub>2</sub> O	550 ml
pH	9,0

Die buffer kan ses maande lank in die koelkas bewaar word.

##### ii. NAD<sup>+</sup>-oplossing

NAD <sup>+</sup> (Boehringer-Mannheim)	300 mg
Gedist. H <sub>2</sub> O	10 ml

Kan 4 weke in koelkas bewaar word.

iii. Laktaatdehidrogenase (LDH)

L- en D-LDH (Boehringer-Mannheim)

c. Eksperiment

Per kuvet: (duplikaat vir elke monster)

3,0 ml Glisien-hidrasienbuffer

0,2 ml NAD<sup>+</sup>-oplossing

0,02 ml monster, direk uit groeimedium

(Vir die nulwaarde is 0,02 ml gedistilleerde H<sub>2</sub>O i.p.v. die monster gebruik.)

Die blankowaarde is afgelees by 366 nm met 'n Gilford 250 Spektrofotometer.

0,02 ml D- en L-LDH is by duplikaat kuvette gevoeg.

Absorbansie is na 1h by 37°C gelees.

Die waarde is teen lug afgelees en die verskil ( $\Delta E$ ) in afwyking van die nulkuvet is van die monster se lesing afgetrek ( $E_{kor}$ ).

Bg. toets is ook uitgevoer met 0,02 ml van die groeimedium wat nie geïnkuleer is nie, en die lesings is met hierdie waarde gekorrigeer.

Die konsentrasie van elke laktaatisomeer is soos volg bereken (Stetter, 1973):

Laktaatisomeer

$$(\text{mg/ml monster}) = \frac{\Delta E_{kor} \times V_{kuv} \times \text{verduunning} \times 90}{\epsilon \times d \times V_{monster} \times 1000}$$

$\Delta E_{kor}$  = verskil tussen absorbansielesing van monster en blanko na 1h

$V_{kuv}$  = totale volume in kuvet (3,22 ml)

Verduunning = verdunningsfaktor (1)

90 = molekulêre massa van laktaat

$\epsilon$  = molare absorbansie koëffisiënt van gereduseerde NAD, afhanklik van die golflengte:  $\epsilon_{366} = 3,30 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ .

$d$  = deursnee van die kuvet (1 cm)

$V_{\text{monster}}$  = volume van die monster (0,02 ml)

### 3.5.6 Bepaling van die suikerfermentasiepatroon

(Sharpe en Fryer, 1965)

#### a. Voorbereiding van groeimedia

Die suikers wat gebruik is, word in Tabel 3.4 gelys.

D(-)-arabinose, D(+)-maltose, D(-)-ribose en D(+)-xilose is vooraf as 5% oplossings steriel gefiltreer met Millex-GS wegdoenbare filters (Millipore) (0,22  $\mu\text{m}$ ). Daarna is 1 ml van die suiker by 9 ml steriele B-MRS met indikator gevoeg om 'n finale konsentrasie van 0,5% te gee.

Die ander suikers is in 0,5% ( $\text{W}/\text{V}$ ) konsentrasie by die B-MRS (sien Tabel 3.1) gevoeg, vir 5 min by 115°C geoutoklaveer en daarna vinnig afgekoel; 0,004% ( $\text{W}/\text{V}$ ) chloorfenolrooi is as indikator gebruik.

Eskuliensplitsing is bepaal in B-MRS met 0,5% ( $\text{W}/\text{V}$ ) eskulien (Merck) en 0,05% ( $\text{W}/\text{V}$ )  $\text{FeCl}_3$  as indikator.

Die medium vir malaatfermentasie word in Tabel 3.1 beskryf.

#### b. Inokulasie

'n Inokulum van 1 tot 2 druppels van 'n vars MRS-sopkultuur is by elke buis gevoeg en vir 48h by 25°C geïnkubeer. Die resultate is geneoteer en weer ná afloop van 'n verdere inkubasieperiode van 48h geëvalueer.

TABEL 3.4 LYS VAN SUIKERS WAT GEBRUIK IS OM DIE SUIKERFERMENTASIEPATROON VAN DIE ISOLATE TE BEPAAL, ASOOK DIE MAATSKAPPYE VANWAAR DIT BESTEL IS

Tipe verbinding (Reuter, 1970a)	Suiker	Maatskappy
Pentoses	D(-)-Arabinose L(+)-Rannose D(-)-Ribose D(+)-Xilose	BDH Merck Saarchem Merck
Monosakkariede	D(-)-Fruktose D(+)-Galaktose Kalium-D-Glukonaat D(+)-Mannose	Hopkins & Williams Ltd. Riedel-de Haën Merck Protea Holdings Ltd.
Disakkariede	Laktose D(+)-Maltose $\alpha$ -D-Melibiose Sellobiose Sukrose Trehalose	Merck Merck Koch-Light Laboratories Ltd. Merck Saarchem Merck
Trisakkariede	$\alpha$ -D-Melezitose D-Raffinose	Serva Koch-Light Laboratories Ltd.
Polisakkariede	Inulien Stysel	Difco Riedel-de Haën
Suikeralkohole	m-Inositol $\bar{D}$ (-)-Mannitol D(-)-Sorbitol	BDH Riedel-de Haën Merck
Glikosiede	Amigdalien Eskulien $\alpha$ -Metielglikosied Salisien	Merck Merck Sigma Difco

Kleurverandering van rooi na geel dui op suurvorming, terwyl gasvorming in die Durhambuisies waargeneem is. Indien eskuliensplitsing plaasgevind het, word die medium swart en ondeursigtig, soms met die vorming van 'n presipitaat.

### 3.5.7 Slymvorming uit Sukrose

(Sharpe, 1962)

Die isolate is uitgestreep op MRS-agar wat 10% sukrose bevat en nã anaërobe inkubasie van 48h by 25°C vir slymvorming ondersoek.

### 3.5.8 Bepaling van die teenwoordigheid van mesodiaminopimeliensuur ( $\underline{m} - A_2^{pm}$ ) in die selwande

(Harper en Davis, 1979)

Nadat 'n digte kultuur na 48h verkry is, in ongeveer 7 ml MRS-sop by 25°C, is dit gesentrifugeer.

Die sediment is opgelos in 1 ml 6 N HCl, oorgedra na 'n skroefdekselproefbuis en oornag by 100°C gehidroliseer.

Die suur is m.b.v. stikstof in 'n kokende waterbad afgedamp. Sodra dit droog was, is dit met 1 ml gedistilleerde water gewas, weer afgedamp tot droog en die presipitaat in 0,1 ml gedistilleerde H<sub>2</sub>O opgelos.

S+S 2043 Chromatografiepapier is voorberei en 2 tot 3  $\mu$ l van die monster daarop oorgedra met 'n mikropipet (Alltech), en met 'n droër drooggeblaas.

$\underline{m} - A_2^{pm}$  (Serva) in gedistilleerde H<sub>2</sub>O is as verwysing gebruik.

Afwaartse chromatografie in Rhuland se loopvloeistof (Rhuland et al., 1955) is in 'n versadigde atmosfeer uitgevoer.



Na 3 tot 4h is die papier gedroog, met ninhidrien (Holzapfel, 1969) ontwikkel en weer gedroog. Kleurontwikkeling is in 'n oond by 100°C vir 5 min uitgevoer.

Die  $m - A_2pm$ -kolle vertoon donker olyfgroen en verkleur na geel binne 24h.

### 3.5.9 Toets vir beweeglikheid, gelatinase en nitraatreduksie

Die semisoliede medium van Reuter (1970a) is met 'n vars kultuur geïnkuleer d.m.v. 'n reguit inokulasie-naald.

#### 3.5.9.1 Beweeglikheid

Na inkubasie van 48h by 25°C, is die beweeglikheid van die isolate in die semisoliede medium geëvalueer. Troebelheid regdeur die medium is geneem as aanduiding van beweeglikheid.

Transmissie-elektronmikroskopie is gebruik om beweeglike kulture morfologies te ondersoek.

'n Negatiewe kleuring is gemaak van die isolate vanaf 'n 48h-oue kultuur op MRS-agar. 'n Aantal selle is in 'n druppel steriele, gefiltreerde H<sub>2</sub>O gesuspendeer. Hierdie druppel is bo-op die roostertjie, bedek met Formvar (Merck), geplaas en vir 'n paar minute laat staan. Die kleurstof (1,5% fosfowolframsuur, Merck) by pH 6,8, is met 'n gelyke volume steriele H<sub>2</sub>O verdun en 'n druppel hiervan bo-op die roostertjie geplaas. Ná presies 2,5 min is die roostertjie verwyder en op filtreerpapier gedroog. Die bakterieë is m.b.v. 'n Hitachi H-600 Transmissie-elektronmikroskoop ondersoek vir die teenwoordigheid van flagella.

### 3.5.9.2 Gelatinase

Ná evaluasie van beweeglikheid in die semisoliede medium is die proefbuis enkele ure in die koelkas geplaas en daarna omgekeer om te toets vir die vervloeiing van die medium a.g.v. die teenwoordigheid van die gelatinase-ensiem.

### 3.5.9.3 Nitraatreduksie

Na uitvoering van die gelatinase-toets is 2 tot 3 druppels van die Griess-Ilosvayreagens (Harrigan en McCance, 1976) bo-op die semisoliede medium gevoeg en ná 10 minute ondersoek vir 'n kleurverandering. Indien geen kersierooiverkleuring voorgekom het nie (nitratareduksie-negatief), is 'n bietjie sinkpoeier by elke buis gevoeg en die negatiewe reaksie deur 'n rooi verkleuring bevestig. Enige  $N_2$  wat gevorm het, is waargeneem as lugblasies in die medium.

### 3.5.10 Selwandontledings

Kulture van die heterofermenterende lactobacilli is gekweek in 5 l MRS-sop en daarna deur sentrifugering geoes. Nadat die selle ingevries is, is die metode van Schleifer en Kandler (1967, 1972) gebruik om die selle op te breek en die selwande te herwin. Die selwande is ná vriesdroging bewaar.

#### i. Parsiële hidrolisasie

Parsiële hidrolisasie van die selwande is voorberei (4 N HCl vir 30 min by  $45^{\circ}\text{C}$ ), en m.b.v. tweedimensionele papierchromatografie ontleed. Twee loopvloeiistofstelsels is gebruik:

Sisteen I : (16h)

Isopropanol	:	Ysasynsuur	:	$\text{H}_2\text{O}$
75	:	10	:	15 (v/v/v)

Sistees II ; (10-12h)

2-Metielpiridien	:	water	:	NH <sub>4</sub> OH
70	:	28	:	2 (v/v/v)

Kleurontwikkeling is m.b.v. ninhidrienontwikkelingsvloeistof (Holzapfel, 1969) by 100°C gedoen.

ii. Totale hidrolisasie

Kwantitatiewe aminosuurontledings van die totale hidrolisate (4N HCl by 100°C vir 16h) is d.m.v. 'n Waters HPLC-chromatograaf uitgevoer deur die Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium (NCNL) van die WNNR, volgens die metode van Lee en Drescher (1978).

3.5.11 Eienskappe van kolonies en enkelselle

3.5.11.1 Koloniemorfologie

Beskrywing van enkelkolonies van reinkulture op MRS-agar is gedoen t.o.v. deursnit, kleur, profiel, vorm en oppervlak.

3.5.11.2 Fasekontrasmikroskopie

Die morfologie van enkelselle van die isolate is ondersoek d.m.v. fasekontrasmikroskopie. Die isolate is verkry vanaf enkelkolonies van 48h-oue reinkulture op MRS-agar.

3.5.11.3 Skandeerelektronmikroskopie

48h-oue kulture in MRS-sop of MRS-agar is voorberei vir waarneming met 'n skandeerelektronmikroskoop (Hitachi model S-450). 'n Suspensie van die kultuur is m.b.v. 'n spuit en membraanfilter (Nucleopore) op 'n polikarbonaatmembraan (Nucleopore) (0,4 μm, deursnee 25 mm) oorgedra en met die volgende reagentie behandel:

Reagens	Tydsduur
1. 2% Glutaaraldehyd (Merck) in 0,2 M Natriumkako-dilaatbuffer (Polaron)	30 min
2. 0,2 M Na-kako-dilaatbuffer	15 min
3. 2% O <sub>S</sub> O <sub>4</sub> in 0,1 M Na-kako-dilaat- buffer	30 min
4. 0,2 M Na-kako-dilaatbuffer	15 min
5. Dehidrasie : 50, 70, 80, 90% etanol	10 min elk
6. 100% etanol	10 min x 2

Sorg is gedra dat die filters nie uitdroog tussen behandelings nie.

Drogings het geskied m.b.v. 'n kritiese-punt-droër (Hitachi HCP-2), en daarna is die membrane gemon-teer, met goud oorgeblaas en besigtig.

### 3.5.12 Bepaling van mol% G+C in die DNA

#### 3.5.12.1 DNA-isolasie

Opkweek en oes van selle

M.b.v. 'n inokulum in 100 ml MRS-sop, is kulture van die isolate in 4 l MRS-sop by 30°C vir 18h gekweek. Nadat die selle deur sentrifugering geoes is (7 000 o.p.m. vir 20 min), is dit gewas in fosfaatbuffer met 'n pH van 7,0, en daarna weer afgeswaai.

Opbreking van selle

Breking van die selle het plaasgevind m.b.v. glas-krale met 'n deursnit van 0,1 tot 0,11 mm (B. Braun Melsungen) in 'n selmeule (Edmund Bühler, Tübingen, model V12). Die selsuspensie het 'n derde van die

buis van die selmeule gevul en die glaskrale die oorblywende twee-derdes. 'n Spatelpunt Proteïenase K (Boehringer-Mannheim) is bygevoeg. Die selmeule is met etanol verkoel en die mate van breking is ná 20 min met 'n fasekontrasmikroskoop bepaal.

#### DNA-isolasie

Die selwande en -inhoud is uit die selkrale met sout-EDTA-buffer (pH 8,0) gewas, en die selwande is hieruit verwyder deur die suspensie af te swaai teen 15 000 o.p.m. vir 20 min.

Verdere isolasie en suiwing van die DNA is gebaseer op die metodes van Marmur (1961) en Garvie et al. (1974), en is beskryf deur Holzapfel en Van Wyk (1982).

Die konsentrasie van die gesuiwerde DNA is by 260 nm m.b.v. 'n Beckman DU-8 spektrofotometer bepaal.

Die gesuiwerde DNA is in 2 ml 1 x SSC opgeneem en ingevries.

#### 3.5.12.2 Smeltpuntbepaling

'n Geskikte verdunning van die gesuiwerde DNA is in 1 x SSC gemaak om 20 g DNA /ml te verkry. Die smeltpunt ( $T_m$ -waarde) is bepaal volgens die metode van Mandel en Marmur (1968) in 'n Beckman DU-8 Spektrofotometer. Die mol% G+C is bereken volgens die formule van De Ley (1970). Die gemiddelde  $T_m$ -waarde van ten minste 4 bepalinge is gebruik. Gesuiwerde DNA van *L. minor* (DSM 20014) en *L. cremoris* (DSM 20200) is as verwysings gebruik.

#### 3.15.13 Gramkleuring

Die metode wat deur Salle (1971) beskryf is, is gevolg met 48h-oue kulture in MRS-sop.

## HOOFSTUK 4 : RESULTATE EN BESPREKING

### 4.1 ALGEMENE EIENSKAPPE VAN DIE MONSTERS

#### 4.1.1 Voorkoms

Die voorkoms van die monsters is by ontvangs geëvalueer t.o.v. die volgende eienskappe:

i. Swamgroei

Geen swambesmetting (duidelike kolonies) is waargeneem nie.

ii. Bakteriekolonies

Geen onderskeibare oppervlaktekolonie is aangetref nie.

iii. Eksudaat

By 22 van die 27 monsters was 'n melkerige eksudaat teenwoordig van ten minste 1 ml in volume. Die eksudaat van monsters W28 en W29 was taai en slymerig.

iv. Breking van vakuum

Die vakuum van die verpakings van monsters W28 en W29 was gebreek. By monsterneming is 'n onwelriekende geur by hierdie twee monsters waargeneem.

v. Verkleuring

Geen groen verkleuring is by die monsters waargeneem nie. Allen en Foster (1960) verwys na die werk van Niven en sy medewerkers in 1948 tot 1957, waar 'n groen verkleuring en slymvorming by vleismonsters wat nie vakuumverpak is nie, gevind is. Dit is deur heterofermenterende lactobacilli en *Leuconostoc*-spesies veroorsaak, wat die grootste persentasie van die

mikroorganismes op die monsters uitgemaak het.

Met die instelling van vakuumverpakking van verwerkte vleis, het hierdie probleem verdwyn, soos deur Allen en Foster (1960) aangedui is. 'n Bruin verkleuring is egter soms waargeneem waar die dele van die monsters, veral die wors-tipes, wat aan die lig blootgestel is, effens donkerder verkleur het as dele waar die wors dig teenmekaar verpak was.

#### 4.1.2 pH

Die pH van elke wors- of vleismonster (hierna verwys as produkmonsters), asook van die eksudaat in die pakkies, is op die dag van monsterneming bepaal. By die produkmonsters is die elektrode van die pH-meter in die middel van die gedeelte van die monsters geplaas wat nie stukkend gesny is tydens bemonstering nie.

Die pH-waardes van die produkmonsters en eksudate word in Tabel 4.1 aangedui.

By die produkmonsters het die pH gewissel van 4,74 tot 5,89, en by die eksudaatmonsters van 4,11 tot 5,54. By vergelyking is 'n pH-reeks van 5,0 tot 6,7 deur Steinke en Foster (1951), Kempton en Bobier (1970) en Paradis en Stiles (1978) gevind. (Dit is hoër as by die betrokke produk- en eksudaatmonsters.) Riemann et al. (1972) en Collins-Thompson en Lopez (1981) het gevind dat die pH van hul produkte (Bologna) van 'n aanvanklike 6,5 - 6,6 gedaal het tot 5,3 - 5,5. Die outeurs het meestal rakleefstudies gedoen waarin vars monsters vir 'n spesifieke tyd opgeberg is. Die produkmonsters in hierdie studie het almal die aanvaarbare rakleef tyd oorskry en soms is sigbare bederf al waargeneem. Die hoeveelheid eksudaat wat in hierdie monsters gevind is (soms tot ca. 10 tot 15 ml), dui ook op die ouderdom van die monsters.

TABEL 4.1 BESONDERHEDE OMTRENT DIE pH-WAARDES VAN DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS OP DIE DAG VAN MONSTERNEMING

Produkmonsters		Eksudaatmonsters	
No.	pH	No.	pH
W5	4,74	V5	4,63
W6	5,15	V6	4,11
W7	5,32		
W8	5,89	V8	5,54
W9	5,65	V9	5,14
W10	5,20	V10	4,80
W11	5,21	V11	4,92
W13	5,21	V13	4,91
W14	5,68		
W15	5,35	V15	5,20
W16	5,61	V16	4,74
W17	5,01	V17	4,88
W18	4,96	V18	4,95
W19	4,95	V19	5,05
W27	5,17	V27	5,07
W28	4,75	V28	4,52
W29	5,42	V29	5,52
W30	5,09	V30	4,65
W31	5,05	V31	5,01
W32	5,38	V32	5,51
W33	5,18		
W34	5,22	V34	4,76
W35	5,30	V35	5,33
Gemid.	5,24	Gemid.	4,96



Die laer pH kan dus by hierdie monsters verwag word aangesien die melksuurbakterieë wat verantwoordelik is vir die suurvorming en gepaardgaande pH-daling, vryelik kon vermeerder tot maksimumgetalle.

In Tabel 1 van die Bylae word die monsters in 'n pH-reeks ingedeel om die verspreiding van die monsters aan te toon, en in Fig. 4.1 word die frekwensies grafies voorgestel.

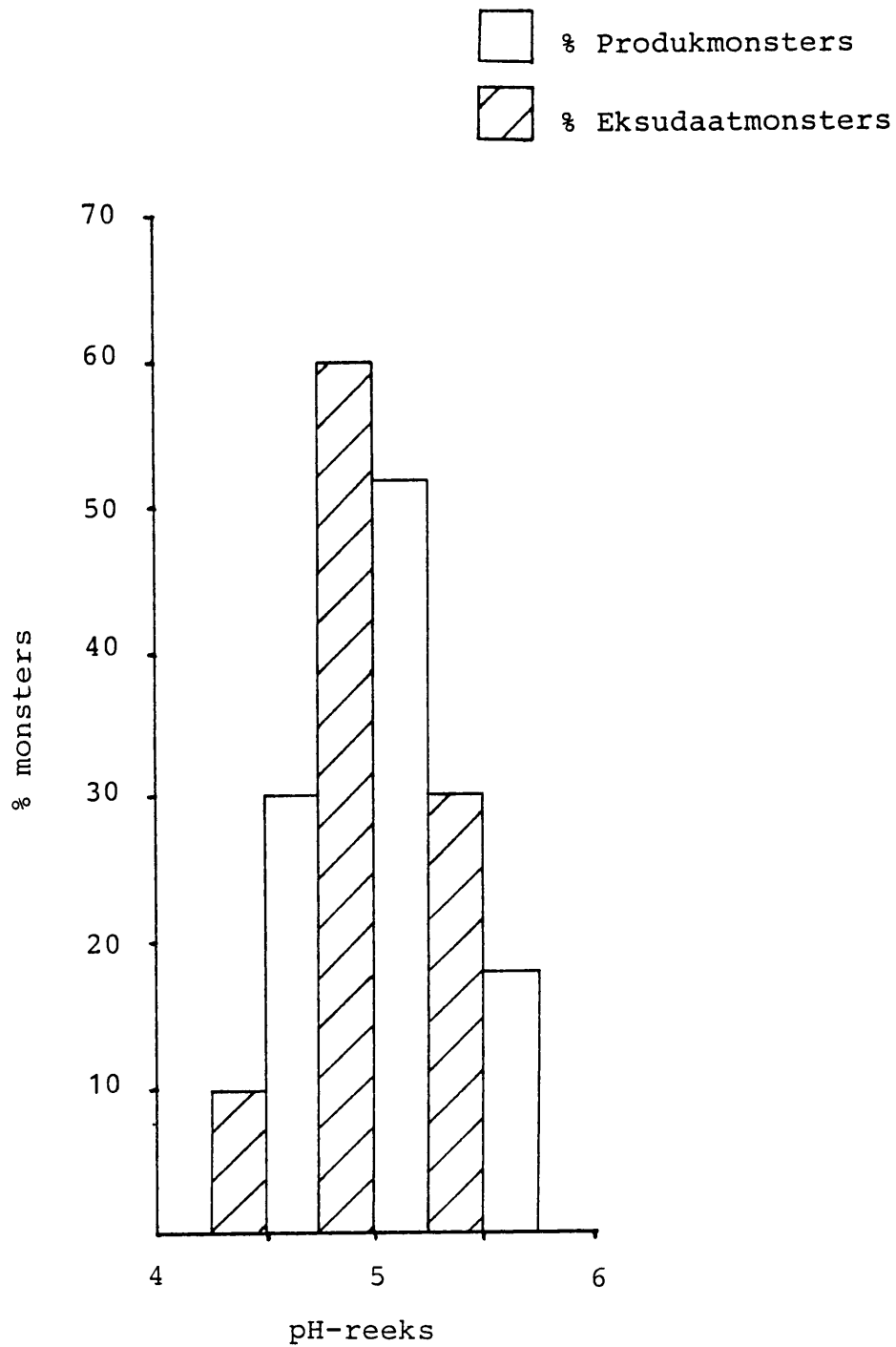
Uit Tabel 4.1 blyk dit dat die eksudaatmonsters se gemiddelde pH laer was as die gemiddelde pH van die produkmonsters. Dit kan waarskynlik toegeskryf word aan die hoër getalle melksuurbakterieë wat in die eksudate voorkom, soos blyk uit die gemiddelde tellings op Std-I-agar, asetaatar en MRS-KS-agar. (Tabel 4.4.) Alhoewel 'n lae pH in die monsters die groei van sekere organismes, in besonder organismes wat 'n moontlike gesondheidsgevaar kan inhou, inhibeer maar gunstige groeitoestande skep vir melksuurbakterieë, kan daar nie op hierdie bakteriostatiese effek van lae pH staatgemaak word om die tipe produkte te beveilig nie. Die resultate wat in Tabel 4.11 gegee word, toon dat ongewenste organismes wel kan vermeerder tot onaanvaarbare getalle onder hierdie omstandighede (Herkontaminasie ná hittebehandelingsproses moet beperk word en die regte opbergingstoestande geskep word ).

#### 4.1.3 Melksuurkonfigurasie en -konsentrasie

'n Monster van die eksudaat in 19 van die produkte is op die dag van monsterneming onttrek en die melksuurisomeer en -konsentrasie daarvan bepaal.

Die verhouding tussen D(-)-melksuur en L(+)-melksuur het vir 17 van die monsters tussen 35% en 65% gewissel. By die ander twee monsters (V16 en V29) het die L(+)-isomeer, meer as 65% uitgemaak.

FIG. 4.1 VERSPREIDING VAN DIE % PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS OOR 'N pH-REEKS VAN 4,0 TOT 6,0



Die % D(-) en L(+)-melksuur asook die totale melksuurkonsentrasie van hierdie eksudaatmonsters word in Tabel 4.2 gegee.

Uit Tabel 4.2 blyk dit dat die L(+)-melksuurkonsentrasie van hierdie eksudaatmonsters gewissel het van 5,31 tot 10,11 mg melksuur/ml. Die % L(+)-melksuur was in die meeste gevalle hoër as die % D(-)-melksuur. Die D(-)-melksuurkonsentrasie het gewissel van 4,42 tot 6,60 mg melksuur/ml, met 5,07 mg/ml as gemiddeld.

Hierdie waardes vergelyk goed met die gemiddelde waardes vir D(-)-melksuur wat Schneider et al. (1983) (soos uiteengesit onder 2.2.3), in vleisprodukte na lang opbergingstye gevind het. Tog blyk daar geen duidelike verband tussen D(-)-melksuurkonsentrasie en die getal melksuurbakterieë te wees nie (Fig. 4.2).

Die gemiddelde totale melksuurkonsentrasie van die produkeksudate was 12,32 mg/ml. Dit kom ooreen met die konsentrasiereeks van baie tipiese, gefermenteerde voedselsoorte in Tabel 4.3. Die totale melksuurkonsentrasie wat in hierdie voedselsoorte verkry word, wissel van 4,0 tot 28 mg melksuur/ml.

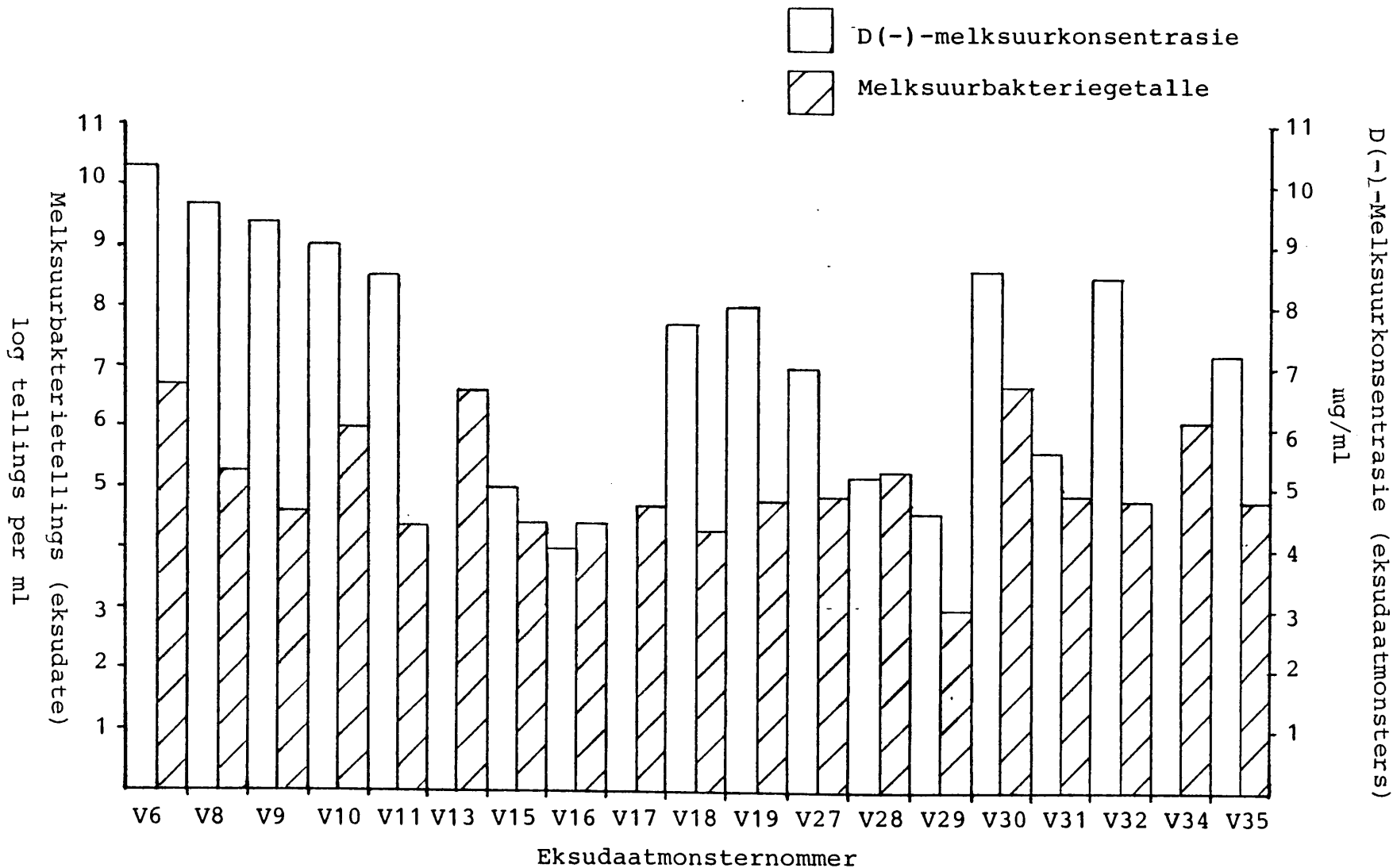
Melksuurbakterieë word wêreldwyd in die fermentasie en preservering van verskeie voedsels gebruik waar dit ook 'n belangrike rol in die beveiliging en voedsaamheid daarvan speel. Volgens Steinkraus (1983a) word hierdie organismes by die produksie van voedsels soos o.a. groente, brood-tipe produkte, melkprodukte, vis- en seekosprodukte aangewend en dien ook as plaasvervanger van vleisproteïen deur die verryking van groenteproteïene.

Die pH van die voedselsoorte word vinnig verlaag en sodoende word kompeterende organismes uitgeskakel. Deur die melksuurfermentasie word 'n tipiese smaak

TABEL 4.2 MELKSUURKONSENTRASIE EN -KONFIGURASIE VAN DIE EKSUDATE IN 19 PRODUKMONSTERS OP DIE DAG VAN MONSTERNEMING EN DIE OOREENSTEMMENDE pH BY ELK VERKRY

Monster	Isomeer	pH	L(+)-melksuur		D(-)-melksuur		Totale Melksuur	
			mg/ml	% van die totaal	mg/ml	% van die totaal	mg/ml	%
V6	DL	4,11	7,51	53	6,67	47	14,18	1,418
V8	DL	5,54	8,30	61	5,26	39	13,56	1,356
V9	DL	5,14	6,79	60	4,61	40	11,40	1,140
V10	DL	4,80	7,93	57	5,95	43	13,88	1,388
V11	DL	4,92	6,35	59	4,42	41	10,77	1,077
V13	DL	4,91	6,02	48	6,59	52	12,60	1,260
V15	DL	5,20	6,19	59	4,35	41	10,55	1,055
V16	DL	4,74	8,39	66	4,29	34	12,69	1,269
V17	DL	4,88	6,84	59	4,67	41	11,51	1,151
V18	DL	4,95	6,00	58	4,27	42	10,27	1,027
V19	DL	5,05	6,81	59	4,75	41	11,56	1,156
V27	DL	5,07	5,31	54	4,89	46	9,90	0,990
V28	DL	4,52	8,53	62	5,30	38	13,83	1,383
V29	DL	5,52	5,95	66	3,05	34	9,00	0,900
V30	DL	4,65	10,10	60	6,68	40	16,77	1,677
V31	DL	5,01	7,01	59	4,85	41	11,86	1,186
V32	DL	5,51	6,71	58	4,81	42	11,52	1,152
V34	DL	4,76	10,11	62	6,12	38	16,23	1,623
V35	DL	5,33	6,95	59	4,79	41	11,74	1,174

FIG. 4.2 VERGELYKING VAN MELKSUURBAKTERIEGETALLE (LOG TELLINGS PER ML) OP ASETAATAGAR MET DIE D(-)-MELKSUURKONSENTRASIE (mg LAKTAAT PER ml) VAN DIE EKSUDAATMONSTERS



aan die voedselprodukte verleen. Melksuurbakterieë speel ook 'n rol in die preserving van voedsel a.g.v. hul vermoë om by 'n lae pH te groei en hul relatiewe bestandheid teen waterstofperoksied en produksie van CO<sub>2</sub> deur heterofermenteerders.

In Tabel 4.3 word die melksuurkonsentrasie van 'n verskeidenheid voedselsoorte waarby melksuurbakterieë betrokke is, aangedui.

In teenstelling met die voedselsoorte wat in die tabel genoem is, is die melksuur wat in die betrokke vleisprodukte gevorm is ongewens, en dus verantwoordelik vir bederf. Die mate van melksuurfermentasie wat in hierdie monsters plaasgevind het, het egter die groei van meer algemene voedselbederfororganismes soos *Pseudomonas* spp. geïnhibeer en daarom terselfdertyd die produkte "gepreserveer". Die monsters het dus nie tekens van proteolise getoon nie.

Suurvorming deur melksuurbakterieë kan dus as die tipiese vorm van bederf van vakuumverpakte vleisprodukte beskou word.

In Fig. 4.2 word die D(-)-melksuurkonsentrasie en die aantal melksuurbakterieë wat in 'n betrokke monster voorgekom het, grafies voorgestel. Geen duidelike verband tussen die twee parameters kon aangetoon word nie. Dit moet ingedagte gehou word dat MRS-KS-agar 'n beter isolasiemedium vir melksuurbakterieë blyk te wees en dat alle melksuurbakterieë nie met die asetaatar en gerber is nie. Soos aangetoon deur Holzapfel en Gerber (1983) en Shaw en Harding (1984) het asetaat vermoedelik 'n inhiberende invloed op sekere lactobacilli; asetaatar en selfs MRS-agar is gevolglik nie geskikte media vir alle lactobacilli wat in vleis en vleisprodukte voorkom nie. Indien die log melksuurbakterietellings per ml van monsters V28 tot V35 (op MRS-KS-agar) beskou word,

TABEL 4.3 SUURINHOUD - AS % MELKSUUR - VAN 'N AANTAL  
VOEDSELSTOORTE WAARBY MELKSUURBAKTERIEË BETROKKE  
IS EN DIE HOOFBESTANDELE WAT GEBRUIK WORD IN  
DIE BEREIDING DAARVAN. DIE LAND WAAR DIT  
TRADISIONEEL GEBRUIK WORD, WORD OOK AANGEDUI

Voedselsoort	Wêrelddeel	Suurinhoud as % Melksuur	Hoofbestanddeel van voedselsoort
Sauerkraut	Duitsland	1,7 - 2,3 (a)	Kool
	VSA	0,68 - 0,4 (b)	
		1,5 (d)	
Piekels	Algemeen	0,6 - 1,0 (a,b)	Komkommers, uie, blomkool, ens.
Suurpap	RSA	0,4 - 0,5 (a)	Mieliemeel
Jogurt	Algemeen	1,7 (c)	Melk
Kimchi	Korea	0,4 - 0,8 (b)	Sjinese kool, radyse en ander groente
Idli/Dosa	Indië	2,8 (b)	'n Deeg van rys en dhal
Ogi	Nigerië	0,65 (b)	Suurpap van koring, sorghum
Gari	Nigerië	0,85 (b)	Kasawortel
Balao balao	Fillipyne	1,32 (b)	Rys en garnale
Kishk	Midde-Ooste	1,3 - 1,8 (b)	Skaapmelkjogurt en koring
Trahanas	Griekeland	do	do
Trahanas	Turkye	do	do

- a - Steinkraus (1983a)
- b - Steinkraus (1983b)
- c - Davis (1975)
- d - Stamer (1975)

blyk daar geen verband te wees met die melksuurkon-  
sentrasie nie.

Dit kom voor of die melksuurbakterieë in monsters  
V13, V17 en V34 in besonder deur asetaat onderdruk  
is en daarom nie deur Rogosa-agar aangetoon kon word  
nie.

## 4.2 BAKTERIETELLINGS

### 4.2.1 Totale plaattellings

Die totale aantal kolonies op telbare Std-I-agarplate  
is bepaal as aanduiding van die getal lewenskragtige  
organismes in 'n monster. Die gemiddelde tellings  
wat verkry is by die produk- en eksudaatmonsters word  
in Tabel 4.4 aangedui. Die volledige resultate van  
die tellings word in Tabele 2 en 3 in die Bylae uit-  
eengesit (Kyk ook Fig. 4.3 ).

Die laagste telling van die produkmonsters is by  
monster W4 aangeteken, nl. 6,55 logs per g en die  
hoogste by W13 met 8,71 logs per g (Tabel 4.4).

By die eksudaatmonsters het die log tellings gewissel  
van 8,2 by V4 tot 10,54 by V35, en meer as 10,7 log  
tellings per ml by V6 (Tabel 4.4).

Oor die algemeen was die tellings by die eksudaat-  
monsters 1 tot 2 logs hoër as dié vanaf die ooreen-  
stemmende produkmonsters.

Die totale tellings van die produk- en eksudaatmon-  
sters word in Tabel 4 in die Bylae in grootterækse  
ingedeel om die verspreiding van die tellings onder  
die monsters aan te dui. In Fig. 4.4 word hierdie  
frekwensie grafies voorgestel.

Altesaam 56% van die produkmonsters het tellings van  
tussen 7,5 en 8 logs per g gehad, terwyl 82,6% van



TABEL 4.4 VERGELYKING VAN GEMIDDELDE TELLINGS VAN DIE TOTALE AANTAL BAKTERIEË OP STD-I-AGAR MET DIE GEMIDDELDE TELLINGS VAN DIE MELKSUURBAKTERIEË OP AA EN MRS-KS-AGAR (MONSTERS 29-35). DIE TELLINGS VAN DIE PRODUKMONSTERS WORD AANGEDUI IN LOG TELLINGS PER g EN DIÉ VAN DIE EKSUDAATMONSTERS IN LOG TELLINGS PER ml. DIE INKUBASIEPERIODE WAS 72h BY 30°C

Produksmonsters				Eksudaatmonsters			
Monster	Medium			Monster	Medium		
	Std-I	MRS-KS	AA		Std-I	MRS-KS	AA
W1	7,72		8,08				
W2	7,04		6,5				
W3	7,75		7,7	V3	9,6		9,4
W4	6,56		6,3	V4	8,2		8,5
W5	7,63		7,4	V5	9,04		8,9
W6	8,36		8,7	V6	>10,7		10,3
W7	7,90		7,7		1		
W8	8,0		7,9	V8	10		9,7
W9	7,75		7,6	V9	9,8		9,4
W10	7,45		7,5	V10	9,8		8,99
W11	7,76		7,6	V11	8,6		8,5
W13	8,72		6,5	V13	10,26		-
W14	7,60		-				
W15	8,4		-	V15	9,43		4,95
W16	8,18		6,6	V16	9,4		4,0
W17	8,26		6,97	V17	9,9		-
W18	7,91		4,7	V18	9,6		7,7
W19	7,65		6,1	V19	9,7		8,04
W27	7,84		7,1	V27	9,2		7,1
W28	7,86	7,9	5,5	V28	9,3	9,4	5,2
W29	8,48	9,1	4,2	V29	9,0	9,6	4,6
W30	7,75	7,6	6,4	V30	9,8	9,7	8,6
W31	7,62	6,8	6,8	V31	9,5	9,1	5,6
W32	7,52	6,9	6,04	V32	9,98	9,4	8,5
W33	7,5	8,2	-				
W34	8,66	8,7	-	V34	10,1	10,3	-
W35	8,08	8,3	-	V35	10,3	10,6	7,2

FIG. 4.3 VERGELYKING VAN GEMIDDELDE TELLINGS OP STD-I-AGAR, AA EN MRS-KS-AGAR VIR DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS

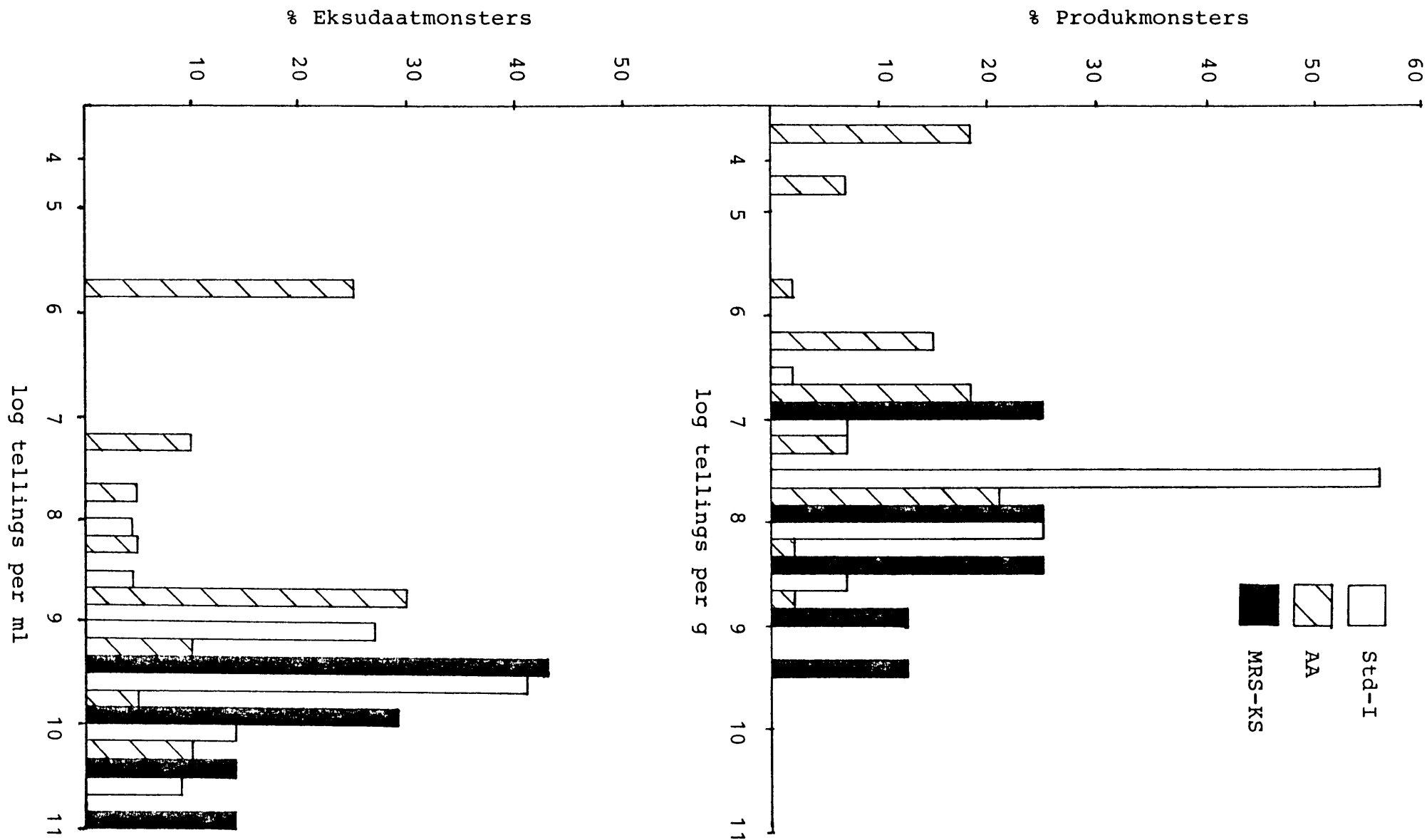
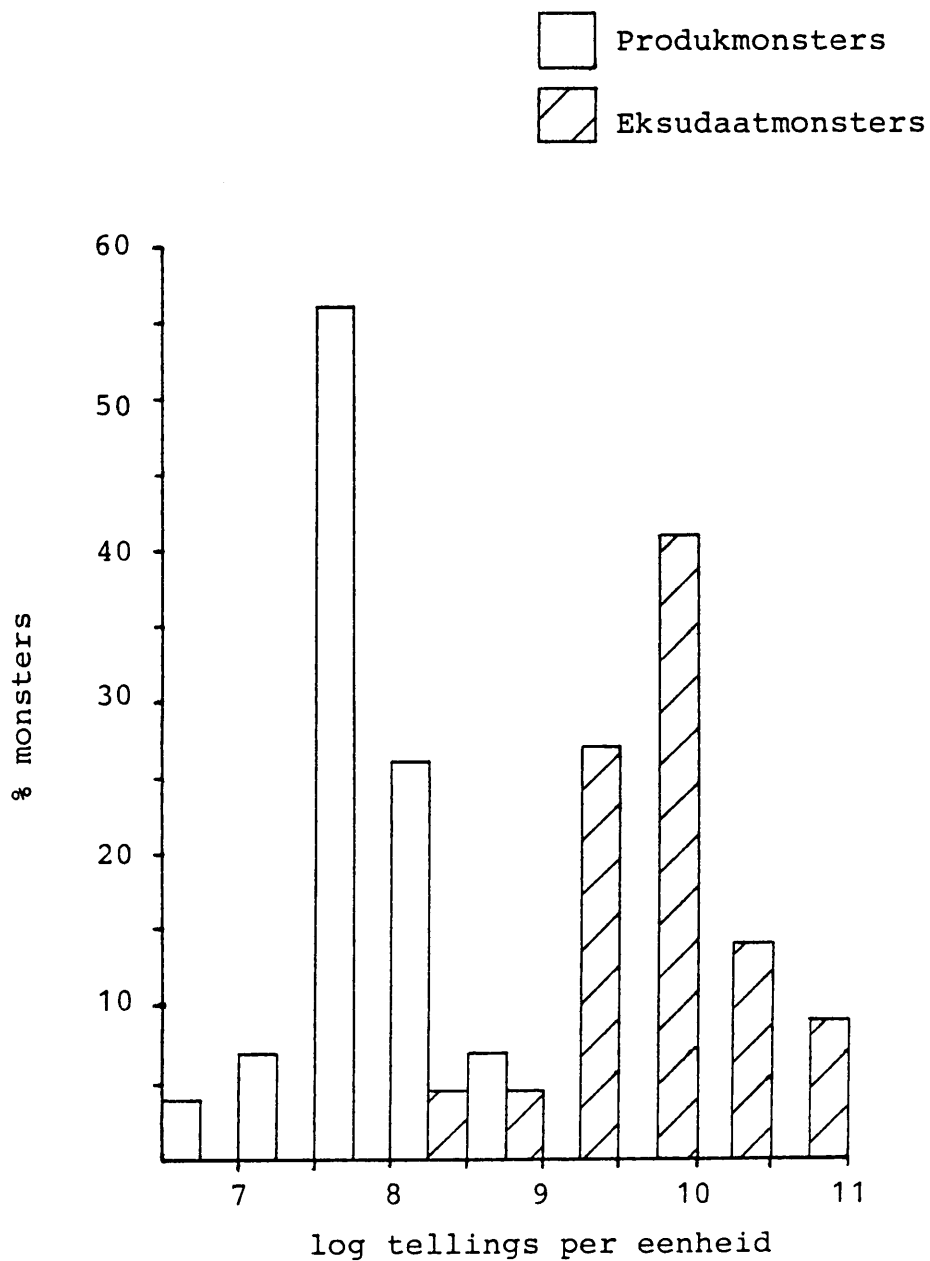


FIG. 4.4 VERDELING VAN DIE GEMIDDELDE GETALLE VAN TOTALE AANTAL BAKTERIEË IN DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS IN GROOTTEGROEPE EN DIE % MONSTERS WAARVAN DIE GETALLE BINNE DIÉ GROOTTEGROEPE VAL



die monsters binne die reeks 7 tot 8,5 geval het. Soos verwag kan word, het hierdie reeks na 9 tot 10,5 logs per ml vir 85% van die eksudaatmonsters verskuif. Die grootste groep, nl. 40%, het tellings van 9,5 tot 10 logs per ml bevat.

Opbergingsstudies is deur verskeie ander werkers onderneem om die soort en getalle mikroorganismes in vaakuumverpakte vleisprodukte vas te stel. Resultate van die getalle totale mikroorganismes wat in hierdie studies verkry is, word in Tabel 4.5 gegee.

Uiteenlopende tipe eksperimente is gebruik om hierdie resultate te verkry. Allen en Foster (1960), Kempton en Bobier (1970) en Mol et al. (1971) het opbergingsstudies met vars geproduseerde monsters gedoen wat tot 16 weke lank geduur het. Ander navorsers het hulle monsters vanaf kleinhandelaars verkry en daarna opgeberg en bemonster (Duitschaeffer, 1977; Paradis en Stiles, 1978 en Fruin et al. 1978). Opbergings-temperatuur het van 0 tot 21<sup>o</sup>C gewissel.

Dit is dus moeilik om 'n vergelyking te tref met die monsters in hierdie studie. Die tellings vanaf die produkmonsters was egter vergelykbaar, nl. 6 tot 8 logs per g, alhoewel laer tellings ook verkry is. Slegs by eksperimente deur Shay et al. (1978) is hoër tellings gevind, nl. tot 9,4 logs per g.

Geeneen van hierdie navorsers het 'n eksudaat as sodanig bemonster nie. Die gemiddelde tellings van die totale aantal bakterieë in die eksudaatmonsters in hierdie studie, was hoër as by die vleismonsters van die bogenoemde outeurs.

#### 4.2.2 Melksuurbakterieë

##### 4.2.2.1 Resultate van tellings

Asetaatagar (Rogosa et al., 1951) by pH 5,5 is gebruik om die aantal melksuurbakterieë in die 27

TABEL 4.5 VERGELYKING VAN TOTALE BAKTERIETELLINGS VANAF STD-I-AGAR VAN PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS MET RESULTATE VAN ANDER NAVORSERS

Produk	Totale tellings log tellings/g	Opbergingstyd	Opbergings- temperatuur	Navorsers
Produkmonsters Eksudate	6-8,7 8-10,7			Hierdie ondersoek
Bologna "P & P Loaf"	7 7,50	60 dae 60 dae	34 <sup>o</sup> F 34 <sup>o</sup> F	Allen en Foster (1960)
Weense worsies, Bologna-tipe wors	7,50	21 dae	3 <sup>o</sup> C	Alm <u>et al.</u> (1961)
Bologna "Pickle Loaf"	4,92 5,76	7 dae 7 dae	3-4 <sup>o</sup> C 3-4 <sup>o</sup> C	Miller (1961)
Bologna, Weense worsies, "P & P Loaf"	8	4-16 weke	5 <sup>o</sup> C	Kempton en Bobier (1970)
Noenvleis, Berliner wors	6,3-8,4	7 dae	8 <sup>o</sup> C	Mol <u>et al.</u> (1971) Monsters vanaf kleinhandel
Bologna, Gekruide noenvleis	10 <sup>6</sup>	3 weke	4-7 <sup>o</sup> C	Hill <u>et al.</u> (1976)
Bologna; Hoender, en Macaroni en Kaas-tipe noenvleis	7-8,7	By aankoop bemonster	-	Duitschaever (1977) Monsters het toegelate rakleef tyd met nie meer as 5 dae oorskry nie
Bologna	6-8	By aankoop bemonster, of opgeberg tot by ver- stryking van rakleef- tyd	21 <sup>o</sup> C - -	Paradis en Stiles (1978)
Noenvleis	4,9-9,4 4,5-8,8	0-21 dae	20 <sup>o</sup> C 0 <sup>o</sup> C	Shay <u>et al.</u> (1978)
"P & P Loaf"	5,4-8,3 4,6-7,7	5 dae 5 dae	20 <sup>o</sup> C 35 <sup>o</sup> C	Oblinger en Kennedy (1980)

produkmonsters en 22 eksudate te bepaal. Die gemiddelde tellings wat op hierdie wyse verkry is, word in Tabel 4.4 aangedui.

By die produkmonsters het die tellings van 4,18 tot 8,08 logs per g gewissel en by die eksudaatmonsters van 4,0 tot 10,3 logs per ml (kyk Tabelle 5 en 6 in die Bylae). Die gemiddelde tellings vir die produk- en eksudaatmonsters was 7,55 en 9,2 logs per eenheid onderskeidelik.

Melksuurbakterieë kon by vyf van die 27 produkmonsters en een van die 22 eksudaatmonsters met asetaatagar (pH 5,5) nie opgespoor word nie.

Dit is gevind dat die natriumasetaat in die groei-medium die groei van melksuurbakterieë kan inhibeer (Holzapfel en Gerber, 1983; Shaw en Harding, 1984). Asetaatagar (Merck) bevat 15g natriumasetaat per l en daarom is by monsters 28 tot 35 ook van ander isolasiemedia gebruik gemaak. Asetaatagar waarby 0,5% fruktose gevoeg is en MRS-agar met 0,04% kaliumsorbaat sonder natriumasetaat (MRS-KS-agar) is addisioneel tot die asetaatagar gebruik. Die fruktose is bygevoeg ná waarneming van verbeterde groei van *Lactobacillus divergens* in 'n groei-medium waarby fruktose of sukrose gevoeg is. Volgens Stamer en Stoyla (1967) word die glukose in die groei-medium tydens outoklavering afgebreek na ander produkte, waarskynlik fruktose. Hulle het swak groei by *L. brevis* gevind op media waar die glukose met filters gesteriliseer is, maar indien dié media geoutoklaveer is, het die organismes goed gegroei. Aangesien AA nie geoutoklaveer word nie, is die fruktose bygevoeg om die groei van die melksuurbakterieë te stimuleer.

Die MRS-KS-agar is 'n groei-medium wat deur Reuter (1970a) gebruik is, maar in die gewysigde medium is natriumasetaat weggelaat (dit word wel geoutoklaveer).

Resultate van gemiddelde tellings wat op hierdie media verkry is word in Tabela 4.4 en 4.6 gegee. Die melksuurbakterie-getalle vanaf afsonderlike verdunnings word in Tabela 5 en 6 in die Bylae gegee.

Die gemiddelde tellings van die melksuurbakterieë op AA+Fr (Tabel 4.6) het geen merkbare toename in getalle by die produkmonsters getoon nie, maar wel by die eksudaatmonsters. Dié toename in melksuurbakteriegetalle is egter laag in vergelyking met die toename verkry op MRS-KS-agar. Volgens Tabela 5 en 6 het die getalle melksuurbakterieë van 4,0 tot 7,07 logs per g by die produkmonsters en tussen 4,5 en 8,1 logs per ml by die eksudaatmonsters op AA+Fr gewissel. Dié isolasiemedium is daarom slegs by een isolasie-eksperiment gebruik vir monsters 28 en 29.

MRS-KS-medium blyk 'n goeie groeimedium vir melksuurbakterieë te wees. Dit is duidelik as die hoër gemiddelde tellings van melksuurbakterieë by die produk- sowel as die eksudaatmonsters in Tabel 4.4 beskou word. Melksuurbakterieë is vanaf hierdie medium geïsoleer uit monsters W33, W34, W35 en V34 nadat geen kolonies van hierdie monsters op asetaat-agar verkry is nie. Slegs by monsters 31 en 32 is dieselfde aantal kolonies op die onderskeie media gevind.

MRS-KS-agar is egter nie so selektief t.o.v. katalase-positiewe organismes as die asetaatagar nie. Ongeveer 50% van die katalase-positiewe organismes wat vanaf monsters W28 tot W35 gekry is, was van hierdie medium afkomstig.

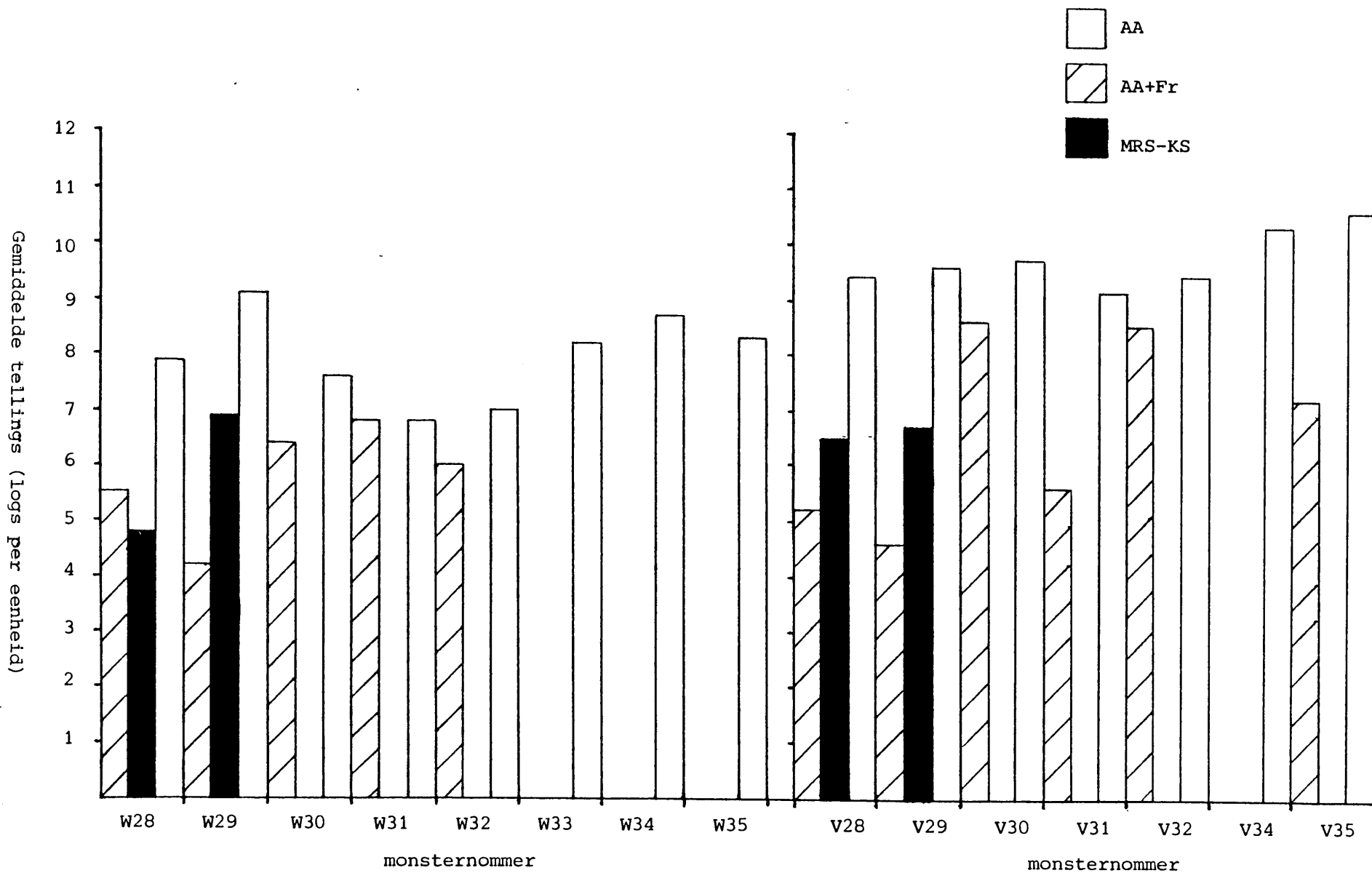
In Fig. 4.5 word die gemiddelde tellings van melksuurbakterieë vanaf al drie media wat gebruik is in die isolasie van hierdie groep organismes, vergelyk. Hoër tellings is in alle gevalle met

TABEL 4.6 VERGELYKING VAN DIE GEMIDDELDE TELLINGS VAN DIE MELKSUURBAKTERIEË OP AA, AA+Fr EN MRS-KS VAN MONSTERS 28 EN 29. DIE TOTALE BAKTERIEGETALLE OP STD-I-AGAR WORD OOK GEGEE. DIE INKUBASIEPERIODE WAS 72h BY 30°C. TELLINGS WORD AANGEDUI IN LOG TELLINGS PER EENHEID

Produkmonsters					Eksudaatmonsters				
Mon-ster	Medium				Mon-ster	Medium			
	Std-I	AA	AA+Fr	MRS-KS		Std-I	AA	AA+Fr	MRS-KS
W28	7,86	5,5	4,8	7,9	W28	9,3	5,2	6,5	9,4
W29	8,48	4,2	6,9	9,1	W29	9,0	4,6	6,7	9,6



FIG. 4.5 SKEM/TIESE VOORSTELLING VAN DIE GEMIDDELDE MELKSUURBAKTERIETELLINGS OP AA, AA+Fr EN MRS-KS-AGAR NA 72H BY 30°C BY 8 PRODUK- EN 7 EKSUDAATMONSTERS



MRS-KS-agar verkry, behalwe by monsters W31 en W32. Die toename in getalle is veral opmerklik by die eksudaatmonsters.

Die verdeling van die gemiddelde tellings van die melksuurbakterieë in groottegroepe word in Tabel 7 in die Bylae getoon soos dit vanaf asetaatagar verkry is, en in Tabel 8 t.o.v. MRS-KS-agar. In Fig. 4.6 word hierdie resultate grafies voorgestel.

#### 4.2.2.2 Resultate van ander werkers

Resultate van ander werkers m.b.t. melksuurbakterieë wat voorkom in vakuumverpakte vleisprodukte, word in Tabel 4.7 opgesom.

In die gevalle waar opbergingsstudies gedoen is, was die melksuurbakteriegetalle die laagste, soos by Mol et al. (1971), Kempton en Bobier (1979) en Egan et al. (1980) aangesien die opbergings tyd korter was as die rakleef tyd wat gewoonlik aanbeveel word.

Die resultate van hierdie werkers stem ooreen met dié van die produkmonsters, maar die getalle melksuurbakterieë in die eksudaatmonsters van hierdie studie is veel hoër.

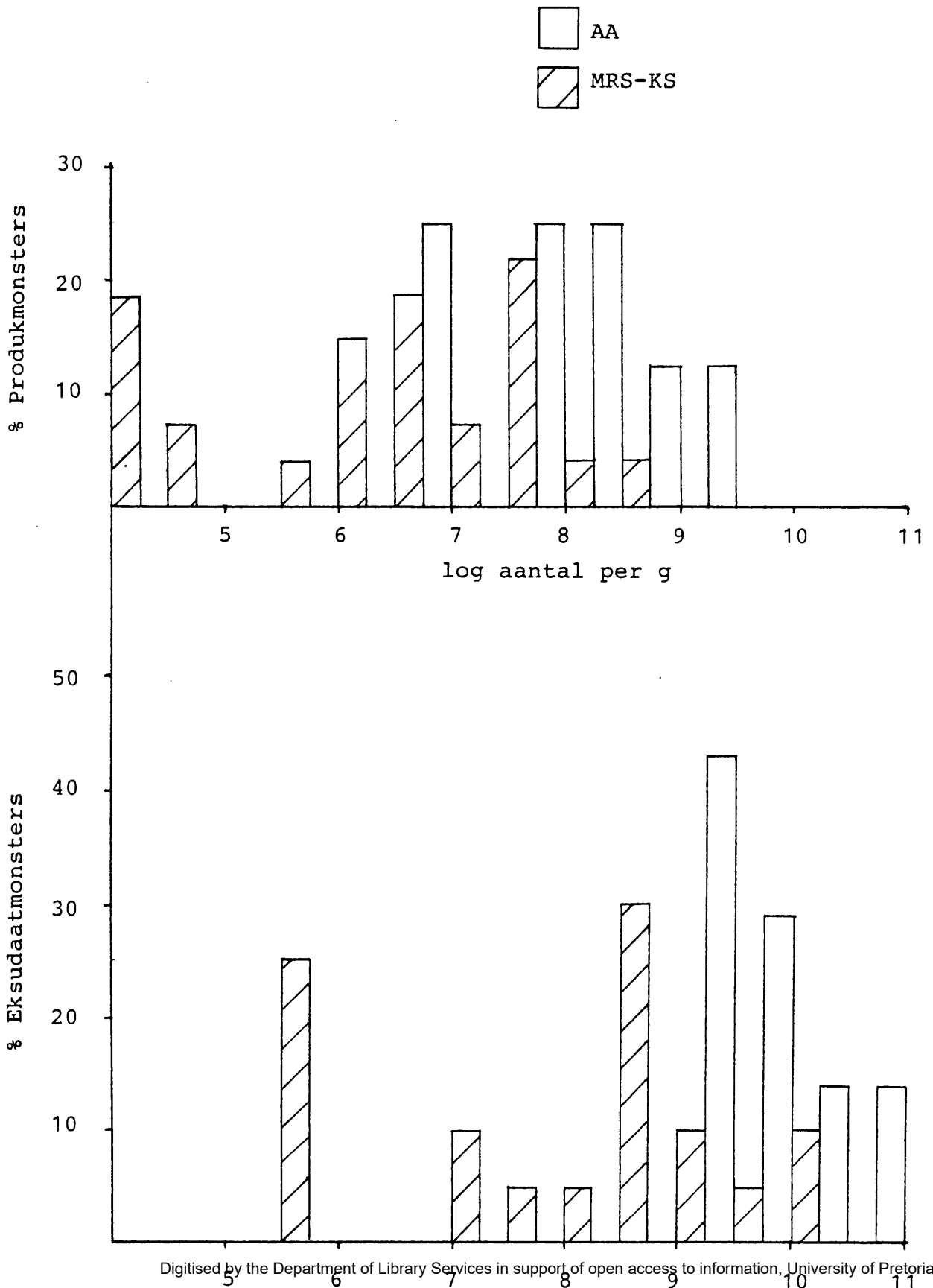
#### 4.2.3 Tellings van *B. thermosphacta*

##### 4.2.3.1 Getalle in monsters

*B. thermosphacta* is as oksidase-negatiewe kolonies op STAA-agar by slegs 10 van die 27 produkmonsters en by 11 van die 22 eksudaatmonsters gevind. Die resultate van die gemiddelde tellings word in Tabel 4.8 en Tabel 9 in die Bylae gegee.

Tellings wat wissel van 2,0 tot 5,7, met 'n gemiddeld van 3,35 logs per g, is vir die produkmonsters gevind. Die gemiddelde telling van die eksudaatmonsters was hoër, nl. 4,72 logs per ml. Dié getalle

FIG. 4.6 DIE VERSPREIDING VAN MELKSUURBAKTERIEË IN GROOTTEGROEPE OP AA EN MRS-KS-AGAR BY DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS



TABEL 4.7 RESULTATE VAN TELLINGS VAN MELKSUURBAKTERIEË GEVIND IN VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE DEUR ANDER WERKERS. RESULTATE VAN GEMIDDELDE TELLINGS IN HIERDIE ONDERSOEK GEVIND, WORD GEGEE, ASOOK DIE TIPE PRODUKTE EN INKUBASIE TOESTANDE

Werkers	Monsters				Tellings	
	Tipe Produk	Opmerkings	Inkubasie		Medium	log tellings per g
			Tyd	Temp.		
Hierdie ondersoek	Produkmonsters				AA	7,6 (4,2-8,7)
	Eksudaatmonsters				AA	9,2 (4,0-10,3)
Mol <u>et al.</u> (1971)	Noenvleis	Opbergingsstudies	7 dae	8°C	MRST-agar	4,3
		Aangekoop			AA	2,8
Paradis en Stiles (1978)	Bologna	Aangekoop	<15 dae rak- lewe oorskry	5°C	LBS	6-8 : 31%
			<15 dae rak- lewe oorskry			2 : 41%
						6-8 : 27%
Shay <u>et al.</u> (1978)	Noenvleis	Aangekoop en dadelik bemonster			AA	Homofermenteerders : 40% Heterofermenteerders : 42%
Kempton en Bobier (1979)	Bologna "P & P Loaf" Weense worsies	Opberginstudies met vars monsters	14 dae	5°C	APT	ca. 6,0
			16 dae	5°C		ca. 7,0
			16 dae	5°C		ca. 8,0
Egan <u>et al.</u> (1980)	Noenvleis	Opbergingsstudies	12 dae	5°C	MRS	8,0

TABEL 4.8 RESULTATE VAN GEMIDDELDE *B. THERMOSPACTA* -TELLINGS OP STAA-MEDIUM VAN PRODUKMONSTERS (LOG TELLINGS PER g) EN EKSUDAATMONSTERS (LOG TELLINGS PER ml)

Produkmonsters		Eksudaatmonsters	
Monster	Gemid.	Monster	Gemid.
W3	3,8	V3	5,3
W4	4,6	V4	6,5
W5	2,0	V5	3,8
		V6	3,0
		V8	2,0
W9	3,1	V9	4,8
W10	2,0		
W11	3,7	V11	5,2
W14	2,4		
W15	5,7	V15	6,6
W16	4,2	V16	5,2
W17	2,0	V17	6,4
		V29	3,1

het van 2,0 tot 6,6 logs per ml gewissel (Tabel 4.8).

By monster 10 kon *B. thermosphacta* nie in die eksudaat gevind word nie, terwyl dit by monsters 6, 8 en 29 slegs in die eksudaat aangetoon kon word.

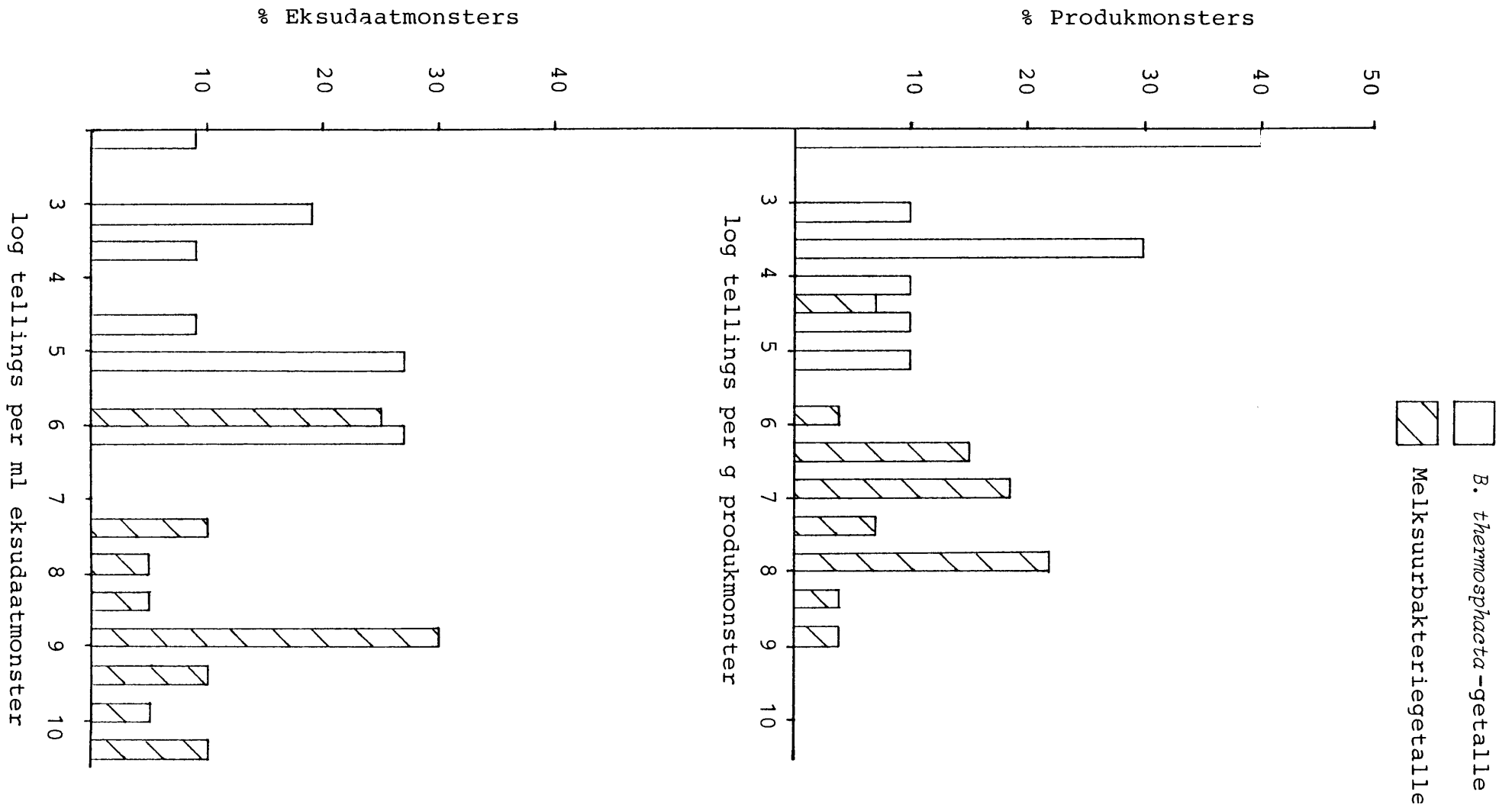
#### 4.2.3.2 Getalle van *B. thermosphacta* in vergelyking met melksuurbakterieë

In Fig. 4.7 word die getalle van *B. thermosphacta* diagrammaties met dié van die melksuurbakterieë vergelyk. Soos verwag kan word, was die getalle *B. thermosphacta* baie laer as dié van die melksuurbakterieë. Alhoewel *B. thermosphacta* 'n belangrike rol speel in die bederf van rou vleis (McLean en Sulzbacher, 1953; Roth en Clark, 1972) is dit nie 'n belangrike bederfororganisme by vakuumpverpakte vleisprodukte nie (Egan et al., 1980; Collins-Thompson en Lopez, 1980 en Grau, 1980). In Tabel 4.9 word die gemiddelde getalle van melksuurbakterieë en *B. thermosphacta* vergelyk.

Uit hierdie tabel blyk dit duidelik dat die getalle van *B. thermosphacta* veel laer was as die melksuurbakterieë. Persentasiegewys maak *B. thermosphacta*-getalle 0,003% uit van die totale tellings (op Std-I-agar) by die produkmonsters en 0,0014% by die eksudaatmonsters. Daarteenoor beslaan die melksuurbakterieë vanaf AA 8,89% en vanaf MRS-KS-agar 99% van die totale tellings by die produkmonsters. By die eksudaatmonsters is die persentasies 1,04 en > 99 respektiewelik.

In Tabel 4.10 word die resultate van ander werkers t.o.v. *B. thermosphacta*-getalle opgesom. Dit word ook met die gemiddelde tellings van *B. thermosphacta*-kolonies van hierdie studie vergelyk.

FIG. 4.7 VERGELYKING TUSSEN DIE GETALLE *B. THERMOSPACTA* EN MELKSUURBAKTERIEË GETOON AS % MONSTERS IN GROOTTEGROEPE VAN 0,5 LOGS PER ml OF PER g



TABEL 4.9 VERGELYKING VAN GEMIDDELDE TELLINGS VAN  
MELKSUURBAKTERIEË EN *B. THERMOSPACTA*  
BY PRODUKMONSTERS (LOG TELLINGS PER g)  
EN EKSUDAATMONSTERS (LOG TELLINGS PER ml)

Monsters	Melksuurbakterieë	<i>B. thermosphacta</i>
Produkmonsters	6,8	3,35
Eksudaatmonsters	9,6	4,72



TABEL 4.10 VERGELYKING VAN GETALLE VAN *BROCHOTHRIX THERMOSPACTA* EN MELKSUURBAKTERIEË IN VAKUUMVERPAKTE VLEISPRODUKTE GEVIND DEUR ANDER WERKERS. DIE GETALLE VAN HIERDIE ONDERSOEK WORD OOK AANGEGEE ASOOK DIE PRODUKTE WAT IN DIE VERSKILLENDE ONDERSOEKE GEBRUIK IS

Werkers	Tipe produk	Tellings (log per g of ml)	
		Melksuurbakterieë	<i>B. thermosphacta</i>
Hierdie ondersoek	Produkmonsters	7,6	4,73
	Eksudaatmonsters	9,2	5,97
Mol <u>et al.</u> (1971)	Noenvleis	7,6	5,2
Paradis en Stiles (1978)	Bologna	2 *22,7%	2,0 *62,8%
		2-4 13,6%	2-4 16,8%
		4-6 13,6%	4-6 13,3%
		6-8 31%	
		8 18,2%	
Shay <u>et al.</u> (1978)	Noenvleis	50% van totale populasie	50% van totale populasie

\*Persentasie van totale aantal monsters.

Die resultate, soos in Tabel 4.10 weergegee, is in ooreenstemming met bevindings van hierdie ondersoek. Die getalle van die melksuurbakterieë het dié van *B. thermosphacta* in alle gevalle oorskry. *B. thermosphacta* kan dus nie as 'n belangrike bederforganisme by hierdie tipe vakuumverpakte vleisprodukte beskou word nie.

Egan et al. (1980) beweer egter dat bederf by produkte nie noodwendig deur die organismes wat in die grootste getalle voorkom, veroorsaak word nie. In hul eksperiment is die noenvleis met *B. thermosphacta* sowel as homo- en heterofermentatiewe melksuurbakterieë geïnkuleer. *B. thermosphacta*-getalle was 8,0 log tellings per g ná 9 dae by 5°C, terwyl die melksuurbakterieë 'n langer sloerfase gehad het en dié getalle eers na 12-21 dae bereik het. Bederf van produkte deur *B. thermosphacta* word waargeneem as 'n "af"-aroma veroorsaak deur die hoofeindproduk asetoïen. By melksuurbakterieë word bederf hoofsaaklik deur suurvorming veroorsaak, wat nie noodwendig beteken dat dit van die rak verwyder moet word nie. Die melksuur gee 'n pikante smaak aan die produk, wat deur sommige verbruikers verkies word. Die suurvorming gaan egter gepaard met 'n "af"-geur ("flavor") by die vleisprodukte wat dit onaanvaarbaar maak.

Hierdie bevindings stem in 'n groot mate ooreen met dié van Mol et al. (1971), nl. dat bederf van hierdie tipe produkte plaasvind wanneer bakteriegetalle 8,0 log tellings per ml of g bereik. Hulle berig ook dat die pikante smaak wat veroorsaak word deur die melksuur, die rakleef tyd van die produkte kan verleng. Dieselfde gevolgtrekking word ook gemaak deur Surkiewicz et al. (1976) t.o.v. ingemaakte ham.

#### 4.2.4 Enterobakterieë

##### 4.2.4.1 Resultate van tellings by produk- en eksudaatmonsters

Die resultate wat verkry is d.m.v. tellings van enterobakterie-kolonies op DHL-agar, word in Tabel 4.11 en Tabel 10 in die Bylae gegee.

By die produkmonsters was die gemiddelde telling 2,25 logs per g indien die kolonies wat oor die hele plaat gesprei het - moontlik *Proteus*-spp. - buite rekening gelaat word. Die getalle het van 1,0 tot 4,2 logs per g gewissel.

Die gemiddelde log tellings per ml vanaf die eksudaatmonsters was 2,49 met getalle wat van 1,0 tot 4,5 logs per ml gewissel het. Spreiende kolonies wat moontlik *Proteus*-spp. was, is by vier monsters gekry. Hierdie kolonies is nie in berekening gebring vir bepaling van die gemiddeldes nie.

##### 4.2.4.2 Identifikasie van kolonies op DHL-agar van monster V32

Tipiese kolonies is op DHL-agarplate gekies en enkelkolonies van elk op afsonderlike DHL-agarplate verkry ná inkubasie by 37°C vir 24h en by 25°C vir 48h. Identifikasie van dié enterobakterieë is gedoen m.b.v. die API-20E-sisteem. In Tabel 4.12 word hierdie kolonies beskryf en die moontlike identifikasie n.a.v. die API-20E-sisteem gelys.

##### 4.2.4.3 Riglyne vir Enterobakterieë in vleis

Uit Tabel 2.2 blyk dit dat die riglyn vir enterobakterieë vir vleis in Denemarke minder as 100 organismes per g is, en 10 per g in België (Leistner et al., 1981). Van die 21 produk- en eksudaatmonsters was die getal enterobakterieë by 15 daarvan hoër as dié aanbevole riglyn.

TABEL 4.11 GEMIDDELDE TELLINGS VIR PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS

- VAN
- Enterobakterieë (op DHL-agar, 96h by 37<sup>o</sup> en 25<sup>o</sup>C)
  - Enterococci (op CATC-agar, 48h by 37<sup>o</sup>C)
  - Staphylococci (op B-P-agar, 72h by 37<sup>o</sup>C)
  - Giste en swamme (op ADA-medium, 72h by 25<sup>o</sup>C)

Produkmonsters (log tellings per g)						Eksudaatmonsters (log tellings per ml)					
Monsters	Groep organismes					Monsters	Groep organismes				
	Enterobakterieë	Enterococci	Staphylococci		Giste en swamme		Enterobakterieë	Enterococci	Staphylococci		Giste en swamme
			Tipies	Atipies					Tipies	Atipies	
W1						V3					
W2	2,98	2,7				V4					
W3						V5	2,5				
W4						V6		2,3	2,5	2,0	
W5	1,0					V7				3,4	
W6						V8			2,6	3,8	
W7						V9		2,7	2,8	2,3	
W8		2,3				V10				2,0	
W9			3,7	2,3	2,5	V11	2,3	3,0	3,3		
W10						V13	1,0				
W11	1,0		3,0		6,9	V15	3,2	4,6	4,5		
W13					3,5	V16	4,5	5,1	3,5	3,9	
W14		3,0				V17					
W15	2,4	3,99	2,4		7,2	V18	1,0			4,4	
W16	4,2	4,9	2,6		2,7	V19	2,0			4,0	
W17						V27					
W18						V28					
W19						V29	3,0		3,3	3,7	
W27	3,4	4,9	3,7	4,5	4,0	V30				6,1	
W28					4,9	V31				5,0	
W29	1,75		2,5			V32	2,95	2,7	4,3	4,5	
W30					2,2	V34	spreiers	2,6		6,3	
W31					2,4	V35	spreiers	2,7		4,6	
W32	1,3								4,6	5,1	
W33					4,2						
W34	spreiers			2,0	4,0						
W35	spreiers		2,0	2,0	3,4						

TABEL 4.12 IDENTIFIKASIE EN BESKRYWING VAN KOLONIES VAN ENTEROBAKTERIEË GEÏSOLEER UIT MONSTER V32 ( $10^{-2}$  verdunning) OP DHL-AGAR NÁ 72h. IDENTIFIKASIE IS GEDOEN D.M.V. DIE API-20E-SISTEEM

Nr.	Genus en spesie	Koloniebeskrywing (op DHL-agar ná 72h)			
		Deursnit (mm)	Vorm	Elevasie	Kleur
1	<i>Citrobacter freundii</i>	4	Rond	Opgehewe	Ligpienk, swart in die middel
2	<i>Enterobacter agglomerans</i>	4	Rond	Opgehewe met holte in die middel	Pienk
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	Rond	Opgehewe	Ligpienk, donkerpienk in middel
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	Rond	Opgehewe	Ligpienk
5	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	Rond	Opgehewe	Donkerpienk
6	<i>Proteus</i>	3	Rond	Plat	Swart
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	4	Rond	Plat	Pienk, bruin in die middel, geriffeld
8	<i>Citrobacter freundii</i>	2	Rond	Plat	Pienk, swart in die middel
9	<i>Citrobacter freundii</i>	4	Rond	Plat	Konsentriese ringe van pienk, wit, bruingeel
10	<i>Citrobacter freundii(?)</i>	3	Rond	Opgehewe met holte in die middel	Donkerpienk
11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	Rond	Opgehewe	Ligpienk
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	4	Rond	Opgehewe	Pienk, bruin in die middel
13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	Rond	Opgehewe	Pienk, bruin in die middel
14	<i>Escherichia coli</i>	2-3	Rond	Konveks	Donkerpienk

*Escherichia coli*, wat volgens riglyne afwesig moet wees in l.g monster, is opgespoor by monster V32 in getalle van 3,2 log tellings per ml.

Hoë getalle ongewenste enterobakterieë in die monsters dui op moontlike swak higiëne en sanitasie in die fabriek ná die hittebehandelingsproses wat hierdie tipe produkte ondergaan het. Herbesmetting van die produkte vind gewoonlik plaas tydens die opсны van die produkte en by verpakking (Mol *et al.*, 1971). Moontlike swak opbergingsstoestande by 'n te hoë temperatuur kan tot die vermeerdering van die organismes bydra. Die teenwoordigheid van hierdie groep organismes is ook uit 'n gesondheids-oogpunt ongewens.

#### 4.2.5 Enterococci

##### 4.2.5.1 Resultate van tellings van kolonies op CATC-agar

Slegs donkerrooi kolonies - 'n donkerrooi pigment a.g.v. die reduksie van 2,3,5-trifenieltetrazolium-chloried om rooi formazan te vorm - met 'n deursnit van meer as 1 mm is getel, en ter bevestiging ook mikroskopies ondersoek. Die resultate van die gemiddelde tellings word in Tabel 4.11 aangedui.

Tellings wat wissel van 2,3 tot 5,1 logs per eenheid is gevind, met 'n gemiddelde telling van 3,63 logs per g by die produkmonsters en 3,2 logs per ml by die eksudaatmonsters, soos blyk uit Tabel 11 in die Bylae.

##### 4.2.5.2 Riglyne t.o.v. getalle enterococci in vleis

Riglyne vir die teenwoordigheid van enterococci in vakuümverpakte, verwerkte vleis is slegs deur Dene-marke en België voorgestel (Leistner *et al.*, 1981; Debevere, persoonlike mededeling), nl. minder as 100 per g en 1 000 per g onderskeidelik. By vyf van die 14 monsters (d.i. 36%) is hoër tellings as hierdie riglyne verkry.

#### 4.2.5.3 Vergelyking met resultate van ander werkers

In Tabel 4.13 word die resultate van vier ander outeurs se werk opgesom.

Volgens Paradis en Stiles (1978) en Duitschaeffer (1977) is die getalle enterococci positief gekorreleer met die totale plaattellings. Die hoë getalle enterococci en totale tellings dui dus op ongewenste hoë opbergings-temperatuur ná verpakking waartydens dié organismes vrylik kon vermeerder. Die belangrikheid van 'n lae temperatuur (0 - 4°C) tydens hantering, vervoer, opberging en uitstal in die winkel blyk uit hierdie resultate.

#### 4.2.6 Staphylococcus-getalle

Die kolonies wat op Baird-Parker-medium gevind is, kan in twee groepe verdeel word:

- i. Tipiese kolonies: swart skyfvormige kolonies met 'n helder sone rondom wat op die teenwoordigheid van lesitinase dui. Soms is 'n wit, korrelrige neerslag as konsentriese sirkel binne dié helder sone rondom die kolonie waargeneem.
- ii. Atipiese kolonies: swart, skyfvormige kolonies, maar geen lesitinase-sone of wit neerslag is hier aanwesig nie.

Tipiese kolonies is by agt vleis- en agt eksudaatmonsters gevind, terwyl atipiese kolonies by vier vleis- en ses eksudaatmonsters gevind is.

Verdere identifikasie van tipiese *Staphylococcus*-kolonies is nie gedoen nie. Dié identifikasie behels verryking in brein-hartinfusiesop en koagulasetoetse met koagulaseplasma.

Getalle wat gevind is by hierdie monsters, word in Tabel 4.11 opgesom.

TABEL 4.13 VERGELYKING VAN RESULTATE VAN TELLINGS VAN ENTEROCOCCI BY DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS VAN HIERDIE ONDERSOEK MET DIE RESULTATE VAN ANDER WERKERS. DIE MONSTERS WAS IN ALLE GEVALLE VAKUUMVERPAKTE, VERWERKTE VLEIS

Werkers	% van monsters waar gevind	Tellings		Opmerkings
		%	Getalle (log tellings/g)	
Hierdie ondersoek:				
Produkmonsters	22		4,5	
Eksudaatmonsters	40		4,3	
Duitschaever (1977)	100	45	>3,0 3,0- 6,7	Monsters het vervaldatum met nie meer as 5 dae oorskry
Duitschaever (1978)	26,7	100	< 3,0	Monsters is aangekoop voor vervaldatum
Paradis en Stiles (1978)	78	60	>2,0 1,0-8,3	
Oblinger en Kennedy (1980)	100	64	3,0 4,9-6,4	



Soos uit Tabel 4.11 en Tabel 12 van die Bylae blyk, het die tellings van tipiese kolonies by die produksmonsters van 2,0 tot 3,7, en atipiese kolonies van 2,0 tot 4,5 logs per g gewissel. (Gemiddeld: 2,8 by tipiese kolonies en 2,7 logs per g by atipiese kolonies.)

Tipiese kolonies by eksudaatmonsters het gewissel van 2,5 tot 4,3, met 'n gemiddeld van 3,35 log tellings per ml. Die getal atipiese kolonies was gemiddeld 3,48 log tellings per ml en het van 2,0 tot 4,6 log tellings per ml gewissel.

Mol et al. (1971), Surkiewicz et al. (1976), Duitschae-ver (1977), Paradis en Stiles (1978), Fruin et al. (1978), Duitschaever (1978) en Oblinger en Kennedy (1980) het almal bevind dat *Staphylococcus aureus* nie in sorgwekkende getalle in die monsters wat hulle ondersoek het, voorkom nie. In alle gevalle was die getalle minder as 1 000 per g. Ter vergelyking wissel die riglyne in Denemarke, Frankryk, die VSA en België volgens Leistner et al. (1981) tussen nul en minder as 100 *S. aureus*-organismes per g (Tabel 2.2).

Shay et al. (1978) het koagulase-positiewe *S. aureus* by 50% van hul monsters gevind waarvan een 'n telling van 4,7 logs per g gehad het. Hulle het gevind dat die monsters geen lewensvatbare *S. aureus*-organismes bevat het ná die kookproses nie, maar dat kontaminasie plaasvind deur kontak met die werkoppervlaktes, apparaat en personeel tydens opsny en verpakking van die produkte. Die voorgestelde riglyn van 100 organismes per g soos deur Hobbs (1967) voorgestel, is in hierdie geval van toepassing.

Oblinger en Kennedy (1980) het ook klem gelê op higiëne ná die kookproses om kontaminasie met organismes wat 'n gesondheidsgevaar inhou, te beperk.

Die gemiddelde aantal tipiese kolonies by die eksudaatmonsters van hierdie ondersoek was effens hoër as by die produkmonsters. Hierdie hoër getalle kan op 'n herbesmetting ná die kookproses dui, op swak sanitasie tydens produksie en ontoereikende opbergingstoestande.

#### 4.2.7 Giste en swamme

Resultate van tellings van gis- en swamkolonies vanaf ADA-medium word in Tabel 4.11 en Tabel 13 in die Bylae aangedui.

By die produkmonsters het die tellings gewissel van 2,0 tot 7,2 logs per g by 15 monsters (55,5%) met 'n gemiddelde telling van 3,95 logs per g. 16 Eksudaatmonsters (72,7%) het tellings opgelewer wat van 2,0 tot 6,3 logs per ml gewissel het met 'n gemiddeld van 4,42 logs per ml. (Die getalle by monster V11 het egter 7,5 logs oorskry.)

Miller (1961) het giste by aangekoopte monsters gevind en Shay et al. (1978) het giste en swamme by 7% aangekoopte monsters gevind, maar bevind dat die tellings wissel van produsent tot produsent. Die tellings wat deur Oblinger en Kennedy (1980) gerapporteer word, wissel van 2,5 tot 5,9, met 'n gemiddeld van 4,5 logs per g. Hierdie tellings was volgens hulle positief gekorreleer met die totale aërobe plaattellings van die monsters.

Hoër getalle van giste en swamme is in hierdie ondersoek gevind as deur die bogenoemde werkers.

Hierdie groep organismes vorm die tweede grootste groep van die totale mikrobepopulasie by hierdie monsters. Dit is dus naas die melksuurbakterieë ook betrokke by die bederf van die produkte.

### 4.3 KARAKTERISERING VAN ISOLATE

#### 4.3.1 Voorlopige ordening

Altesaam 537 isolate is vanaf asetaatagar, asetaatagar met 0,5% fruktose, Std-I-agar en MRS-KS-agar geïsoleer. Hierdie isolate is t.o.v. hul Gramreaksie, die teenwoordigheid van katalase en pseudokatalase en moontlike hemolitiese eienskappe ondersoek.

Gramreaksie: Al die isolate wat katalase-negatief was, het 'n positiewe Gramreaksie getoon.

Katalasereaksie: Van die 537 isolate, was 475 katalase-negatief, en is as waarskynlike melksuurbakterieë aan verdere ondersoeke onderwerp.

Pseudokatalase en hemolise: Bloedagarplate is gebruik om die vorming van pseudokatalase sowel as die moontlike hemolitiese eienskappe van die 475 isolate aan te toon. Al die isolate was positief t.o.v. die teenwoordigheid van pseudokatalase, maar geeneen het die bloedselle in die omgewing van die koloniegroei gelyseer nie.

#### 4.3.2 Morfologiese karakterisering

##### 4.3.2.1 Koloniemorfologie

Die morfologie van enkelkolonies van elke isolaat op MRS-agar is ná 48h by 25°C (anaëroob) ondersoek. Die vorm, kolonierand, elevasie, oppervlak en kleur van 'n enkelkolonie is in ag geneem.

Die kolonies het die volgende algemene eienskappe gehad:

Vorm: Al die kolonies was rond.

Deursnit: Speldpункolonies is gevind, maar die meeste kolonies se deursnit het van 0,5 tot 2 mm gewissel.

Kleur: Die meeste kolonies was gryswit tot lig roomkleur. 'n Aantal geelbruin kolonies is ook gevind, asook kolonies wat deurskynend was - veral die speldpuntgrootte kolonies -, of kolonies met 'n wit kern en deurskynende rand.

Elevasie: Die meeste kolonies was effens konveks tot konveks, soms met 'n effense induiking in die middel. 'n Aantal plat kolonies is ook gevind.

Oppervlak: Al die kolonies was glad en blink.

Van die algemeenste kolonietipes word in Fig. 4.8 getoon.

#### 4.3.2.2 Selmorfologie en -rangskikking

Katalase-positiewe isolate:

M.b.v. fasekontrasmikroskopie van sommige van hierdie isolate, kon die volgende morfologiese groepe onderskei word:

- Cocci wat enkeld, in pare en klompe voorkom.
- Kort dik stafies met opvallende knakdeling; kettings is ook hier waargeneem.
- Kort stafies, baie onreëlmatig en pleomorfe.

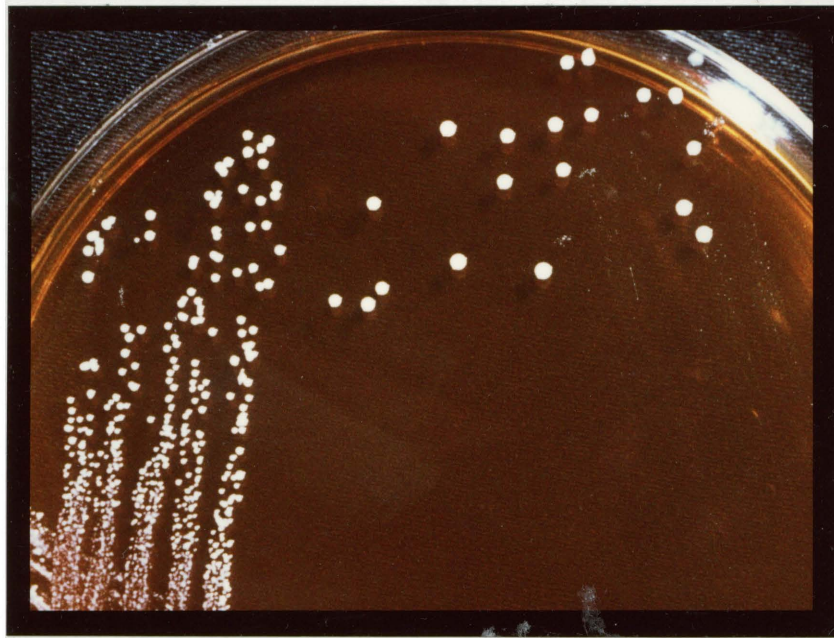
Katalase-negatiewe isolate:

Die tipiese morfologie van die enkelselle asook hul rangskikking tot mekaar, is m.b.v. fasekontrasmikroskopie en aftaselektronmikroskopie in 48h-oue kulture bestudeer.

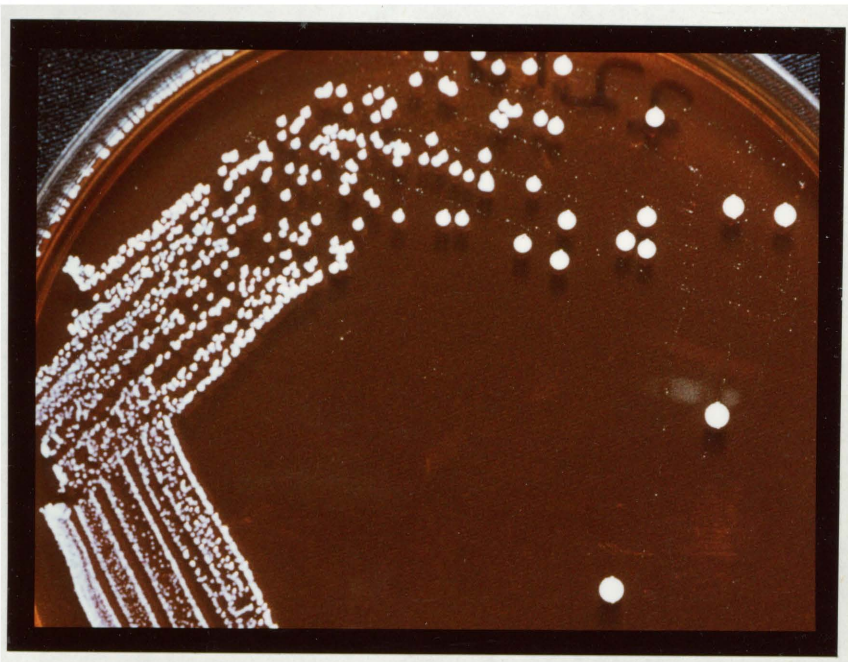
Tipiese kort tot medium lang staafvormige selle is meestal waargeneem wat enkeld, in pare of kort kettings (ca. vier tot agt selle) voorkom (Fig. 4.9).

By 'n groot aantal isolate (ca. 50%) het benewens

FIG. 4.8 a, b TIPIESE KOLONIES VAN DIE MELKSUURBAKTERIEË  
OP MRS-AGAR (ANAËROBE INKUBASIE VIR 48h BY  
25°C)

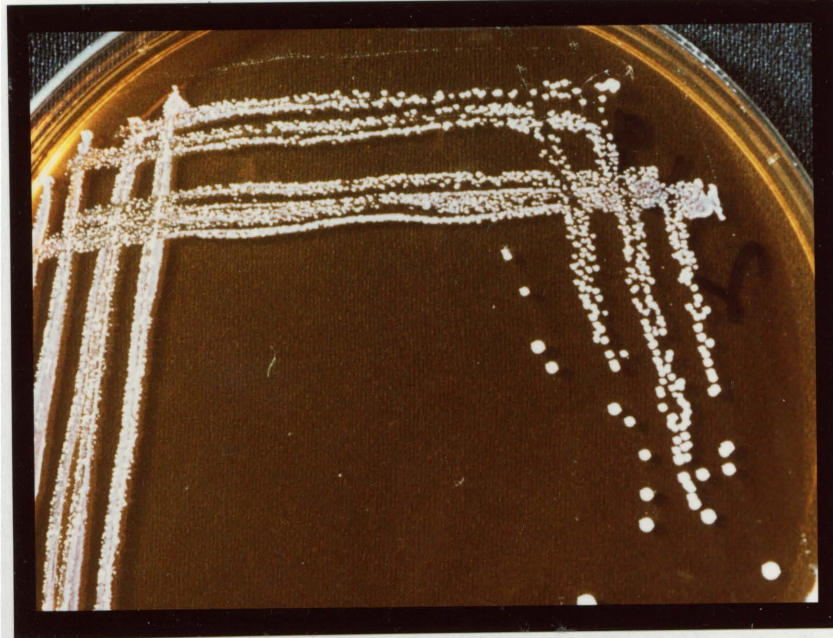


a : L1797

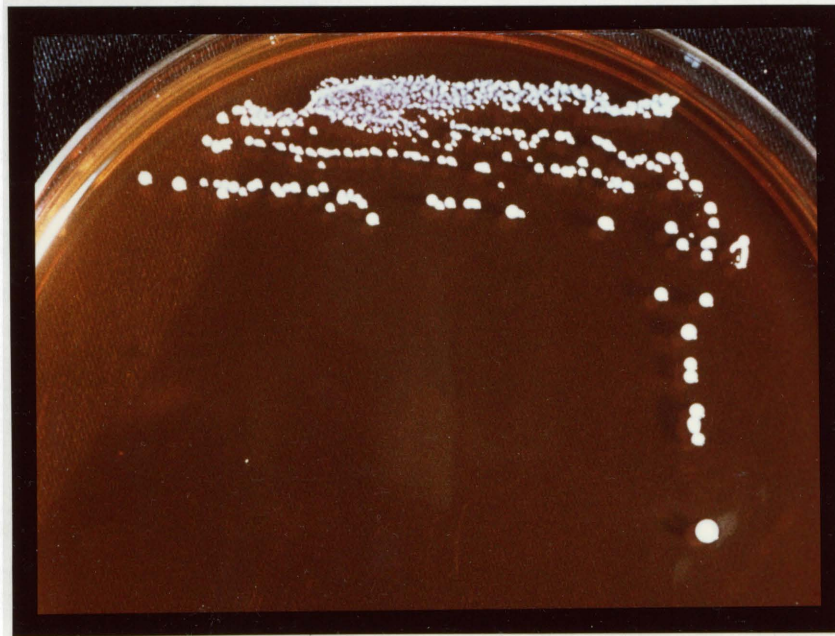


b : L2215

FIG. 4.8 c, d TIPIESE KOLONIES VAN DIE MELKSUURBAKTERIEË  
OP MRS-AGAR (ANAËROBE INKUBASIE VIR 48h BY  
25°C)

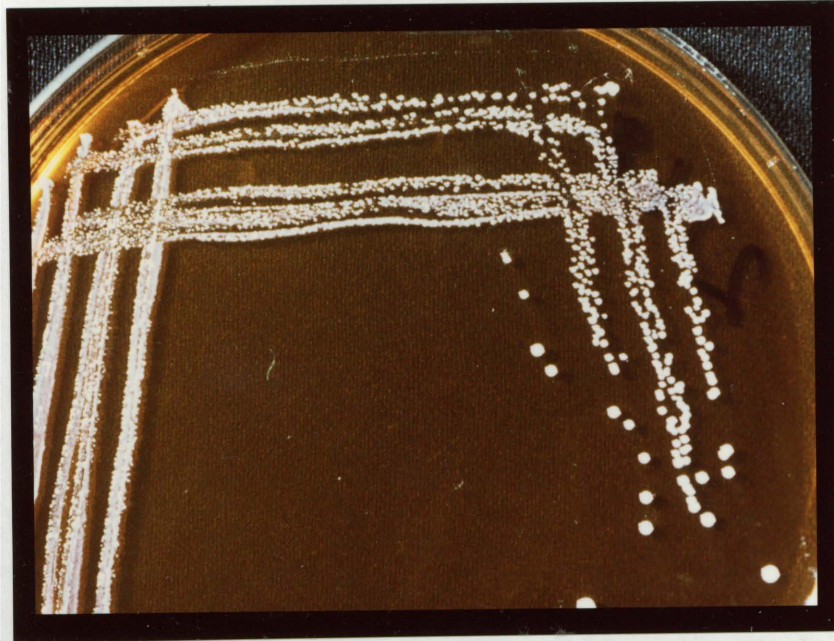


c : L2168

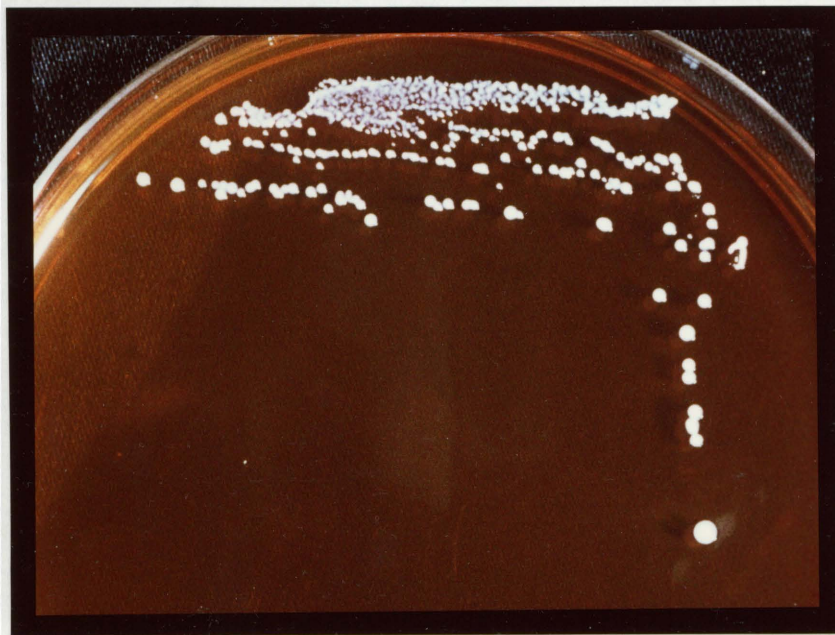


d : L2173

FIG. 4.8 e, f TIPIESE KOLONIES VAN DIE MELKSUURBAKTERIËË  
OP MRS-AGAR (ANAËROBE INKUBASIE VIR 48h BY  
25°C)

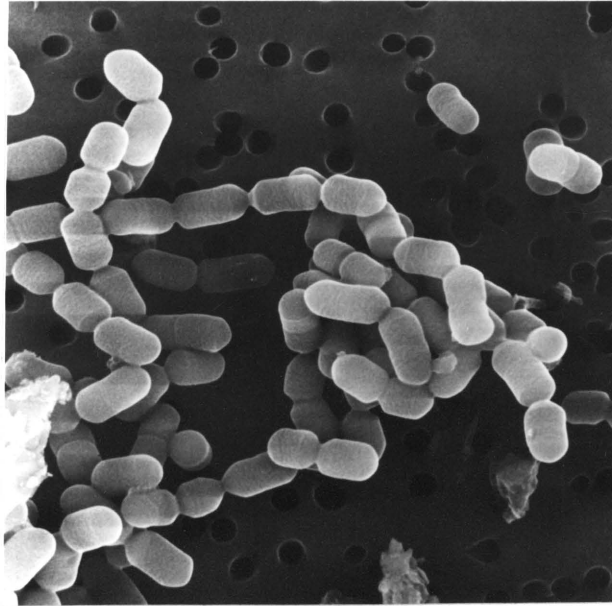


e : L2180

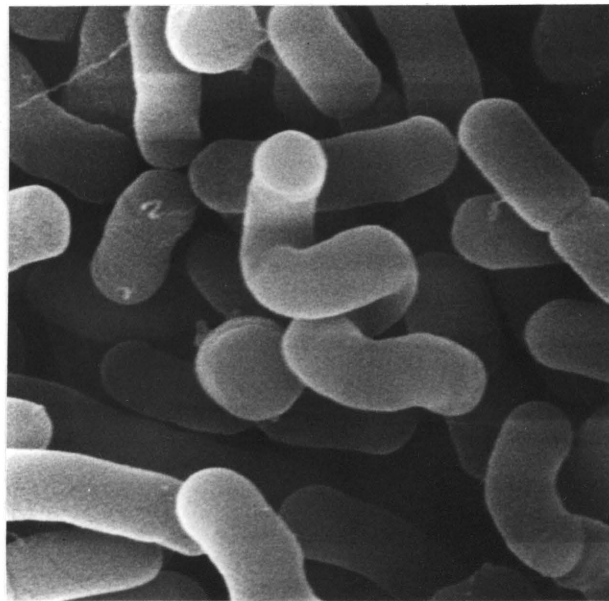


f : L2211

FIG. 4.9 a, b, c VOORBEELDE VAN DIE TIPIESE SELMORFOLOGIE  
WAT BY DIE MELKSUURBAKTERIEË GEVIND IS

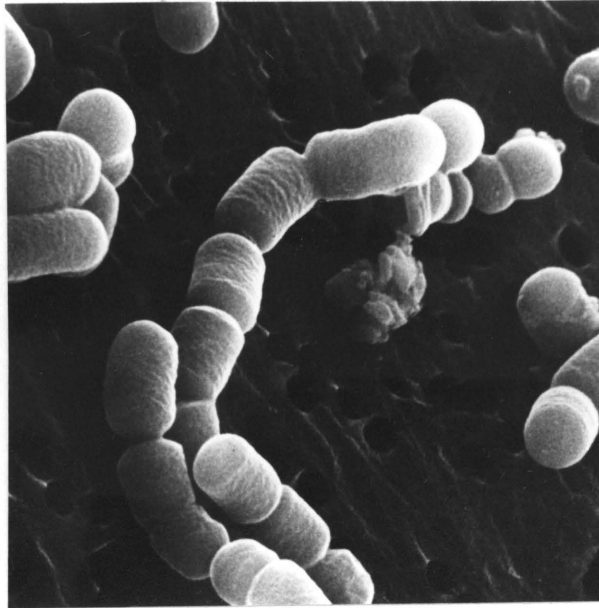


a : Isolaat L2293  
Vergroting : 14 000 X



b : Isolaat L2085  
Vergroting : 15 000 X





c : Isolaat L1699  
Vergroting : 10 000 X

die enkelselle, ook gedraaide kort kettings in aggregate voorgekom. 'n Byna algemene verskynsel was lang filamentagtige selle wat tesame met die meer tipiese selle voorgekom het. Hierdie verlengde selle was enkelselle of kettings wat meestal reguit was, maar soms 'n gedraaide tot selfs spiraalagtige voorkoms gehad het (Fig. 4.10).

Die "gedraaide" filamente is 'n ongewone verskynsel by melksuurbakterieë. Aangesien dit algemeen voorgekom het, kan dié morfologie moontlik in verband gebring word met die spesifieke habitat of isolasie-metodes. 'n Ondersoek van die peptidoglikaansamestelling van hierdie selle se selwande kan moontlik 'n verklaring bied vir dié ongewone morfologie.

Flagella is by 17 isolate gevind. Dit is m.b.v. die transmissie-elektronmikroskoop waargeneem en word in Fig. 4.11 getoon. Beweeglikheid is ook bevestig deur die troebelheid wat na 48h inkubasie in die semi-soliede medium van Reuter (1970a) ontstaan het.

#### 4.4 IDENTIFIKASIE VAN ISOLATE

##### 4.4.1 Heterofermenterende melksuurbakterieë

Slegs 21 van die 475 katalase-negatiewe isolate (d.i. 4,4%) het in MRS-sop sonder di-ammoniumwaterstofsitraat gas uit glukose gevorm. Hierdie bestanddeel van MRS-medium is weggelaat om die moontlikheid van dekarboksilasie van sitraat uit te skakel. In 'n verdere verdeling van die groep heterofermenterende melksuurbakterieë is 15 isolate gevind wat D(-)-melksuur en 6 wat DL-melksuur gevorm het.

##### 4.4.1.1 D(-)-melksuurisolate

Hierdie 15 isolate het as medium-groot, ovale cocci tot kokkoïde stafies wat soms onreëlmatig was,

FIG. 4.10 VOORBEELDE VAN ONREËLMATIG GEDRAAIDE EN  
VERLENGDE SELLE (MRS-SOP, INKUBASIE VIR  
48h BY 25°C)  
Isolaat L2085, vergroting : 15 000 X

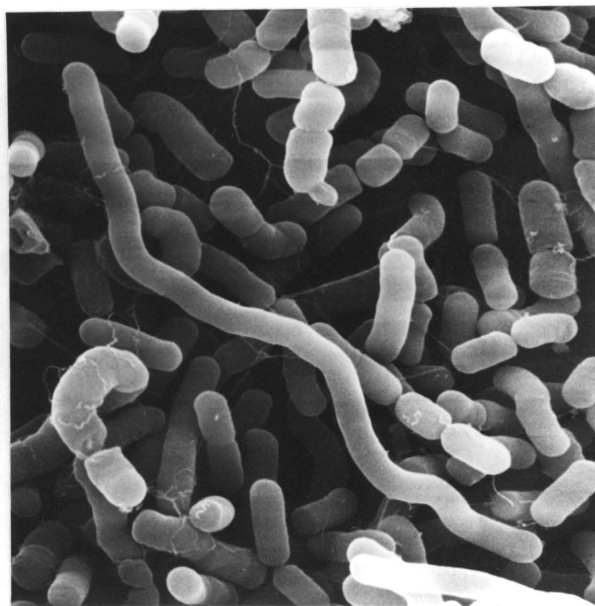
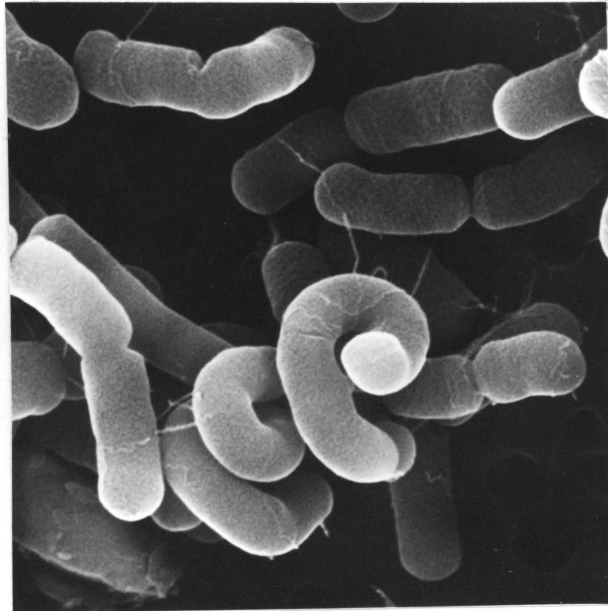
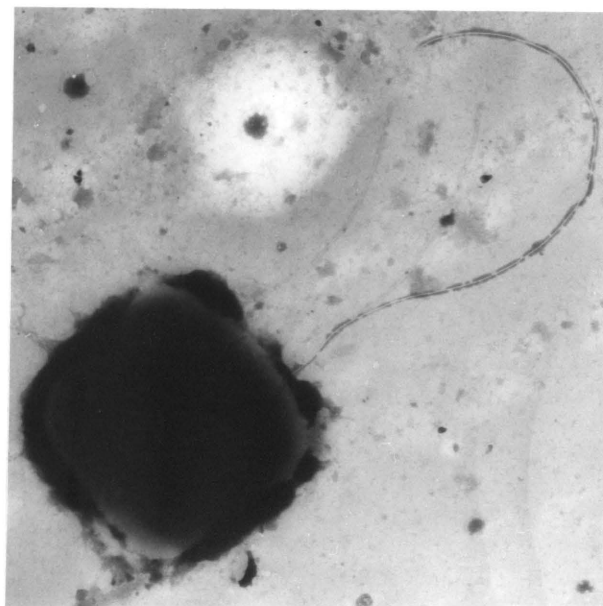
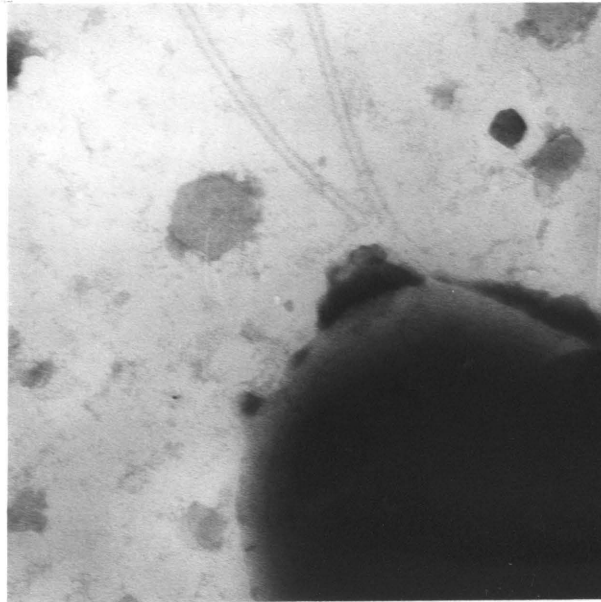


FIG. 4.11

TRANSMISSE-ELEKTRONMIKROSKOOPFOTO'S OM DIE  
FLAGELLA BY BEWEEGLIKE STAMME TE TOON.

Isolaat L1787, vergroting : 80 000 X, 20 000 X  
(Vanaf MRS-plate, anaërobe inkubasie  
vir 48h by 25°C)



onder die fasekontrasmikroskoop vertoon. Kettings het algemeen voorgekom, en by isolate L1642, L2113 en L2231 was dit gedraai en onreëlmatig. Enkelselle is by ses isolate opgemerk terwyl knakdeling by iso-laar L1642 gevind is. Tipiese morfologie vir hierdie groep word in Fig. 4.12 getoon soos met die skandeerelektronmikroskoop waargeneem.

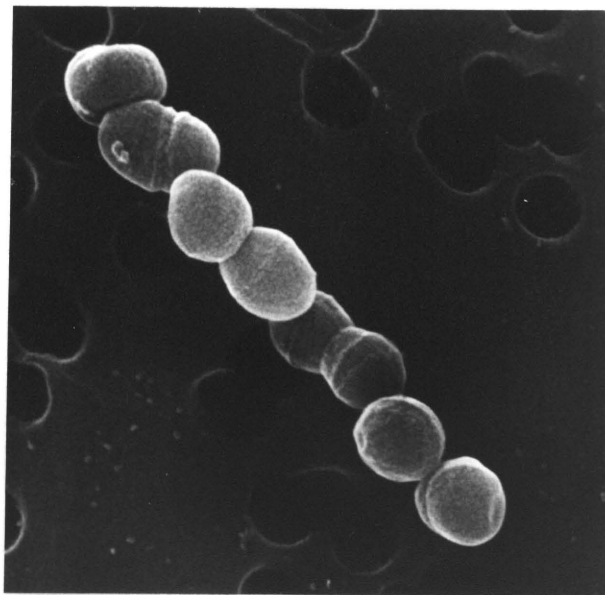
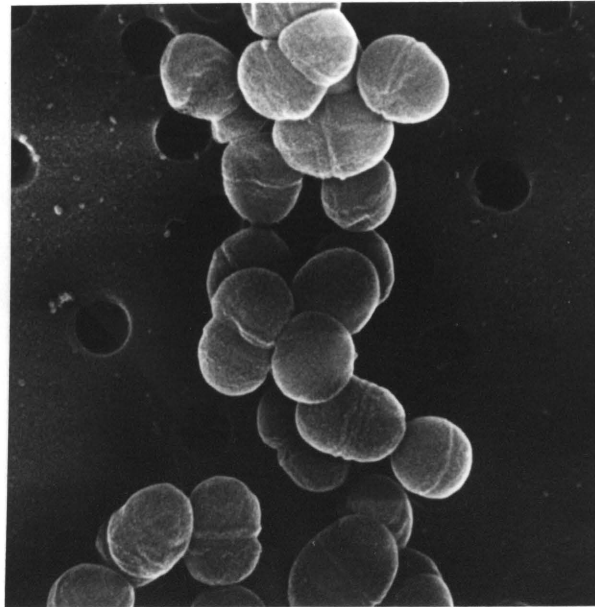
Die monsters waaruit die 15 isolate afkomstig was, word in Tabel 4.14 aangedui.

In die 1974-uitgawe van Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan en Gibbons, 1974) word die eienskappe van *Leuconostoc*-spesies beskryf. Dié groep het sferiese tot effens verlengde kokkoïde selle in pare en kettings, is Gram-positief en vorm D(-)-melksuur uit glukose. Ammoniak word nie uit arginien gevorm nie en slymvorming uit sukrose word soms aangetref. Volgens Teuber en Geis (1981) bevat die selwande van hierdie groep geen  $m - A_2pm$  nie en wissel die finale pH van *Leuconostoc*-kulture na 72h van 3,8 tot 4,6. Hierdie eienskappe is gebruik om dié groep isolate as *Leuconostoc* - spesies te klassifiseer, tesame met 'n reeks suikerfermentasietoetse en ander groeitoetse.

In Tabel 4.15 word die belangrikste eienskappe van hierdie groep heterofermenterende melksuurbakterieë wat D(-)-melksuur vorm, aangetoon.

Slegs drie isolate uit hierdie groep het geen slym uit sukrose geproduseer nie, en twee hiervan kon in ooreenstemming met Holzapfel (1969) moontlik as *Leuconostoc lactophilum* geklassifiseer word. Fermentasie van laktose en die onvermoë om malaat te gebruik, is kenmerkend van hierdie spesie. Die ander isolaar is waarskynlik *Leuconostoc paramesenteroides* aangesien laktose nie gefermenteer word nie.

FIG. 4.12 TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN D(-)-LAKTAATVORMENDE  
HETEROFERMENTEERDERS (LEUCONOSTOCS)  
(UIT MRS-SOP, INKUBASIE VIR 48h BY 25°C)  
Isolaat L2102, vergroting : 20 000 X en  
25 000 X



TABEL 4.14 BESONDERHEDE VAN DIE MONSTERS WAARUIT *LEUCONOSTOC* -SPP. GEÏSOLEER IS EN DIE MINIMUM POPULASIE (LOG TELLINGS PER EENHEID) VAN DIE ONDERSKEIE ISOLATE

Tipe Monster	Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
	No	Medium	Aantal isolate	Log getal in monster	No	Medium	Aantal isolate	Log getal in monster
Weense worsies	W5	AA	1	6,0	V10	AA	1	7,0
					V11	AA	1	7,0
Frankfurters	W29	MRS-KS	2	7,0	V17	Std-I	1	7,0
					V18	AA	1	5,0
					V28	MRS-KS	2	7,0
					V29	MRS-KS	2	7,0
					V31	Std-I	1	7,0
Noenvleis	W2	AA	2	5,0	-	-	-	-
					W34	MRS-KS	1	8,0

TABEL 4.15 FISILOGIESE EIENSKAPPE VAN DIE HETEROFERMENTERENDE MELKSUURBAKTERIEË WAT D(-)-MELKSUUR VORM (*LEUCONOSTOC* SPP.)

Isolate	Fisiologiese toetse																				Identifikasie				
	Groei by 4°C	Amigdalien	Sellobiose	Eskulien-hidrolise	Galaktose	Gas uit Glukonaat	Suur uit Glukonaat	Laktose	Gas uit Malaat	Mannose	Melibiose	α-Metkel-glikosied	Raffinose	Salisien	Ramnose	Arabinose	Maltose	Ribose	Xilose	10% NaCl		pH 3,9	Eind pH	Slymvorming	
L616	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,6	+	<i>L. mesenteroides/dextranicum</i>	
L620	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,4	+		
L1562	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,66	+		
L1619	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,55	+		
L1642	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,5	+		
L1767	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,32	+		
L1790	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4,17	-		<i>L. paramesenteroides</i>
L2102	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	3,95	+		<i>L. mesenteroides/dextranicum</i>
L2111	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	3,86	+		<i>do</i>
L2113	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	3,87	+		<i>do</i>
L2118	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	3,96	-		<i>L. lactophilum</i>
L2128	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	3,88	+		<i>L. mesenteroides/dextranicum</i>
L2130	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	4,41	-		<i>L. lactophilum</i>
L2231	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	3,86	+		<i>L. mesenteroides/dextranicum</i>
L2278	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4,03	+		<i>L. amelibiosum</i>
*	66,7	6,7	33,3	73,3	93,3	13,3	93,3	73,3	13,3	86,7	93,3	86,7	80	13,3	6,7	86,7	93,3	80	86,7	20	33,3	4,2	60		
**	63,6	9	27,3	72,7	100	9	100	81,8	18,8	81,8	100	91	81,8	18,8	9	91	100	81,8	100	9	36,4	4,2			

\* Verwys na % van die isolate wat positiewe reaksies toon en die gemiddelde eind pH-waarde.

\*\* Verwys na % van die *L. mesenteroides/L. dextranicum*-isolate wat positiewe reaksies toon.

100% positiewe reaksies: D(-)-melksuur, gas uit glukose, groei by 15°C, fermentasie van fruktose, sukrose, trehalose.

0% positiewe reaksie: Katalase, groei by 45°C, gas uit sellobiose, fermentasie van inositol, inulien, mannitol, mannose, melezitose, sorbitol, stysel,  $\underline{m}$  - A<sub>2</sub>pm, NH<sub>3</sub> uit arginien, beweeglikheid, nitraatreduksie, gelatinase.



Die ander 12 isolate het almal slym uit sukrose gevorm en is as lede van die *Leuconostoc mesenteroides*-groep geklassifiseer. Hierdie groep bestaan uit *L. mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* en *Leuconostoc amelibiosum*. *L. amelibiosum* word van die ander twee spesies onderskei op grond van sy Lys-(Ala)<sub>2</sub>-tipe selwandpeptidoglikaan en die onvermoë om melibiose te benut. Isolaat L2278 kan moontlik tot hierdie spesie gereken word.

Die oorblywende 11 isolate is dus waarskynlik *L. mesenteroides* of *L. dextranicum*. *L. dextranicum* het 'n kleiner suikerfermentasiespektrum wat hierdie spesie onderskei van *L. mesenteroides*. Volgens hibridisasiestudies is hierdie twee spesies homolog en kan waarskynlik in die toekoms as een spesie gereken word (Holzapfel en Kandler, ongepubliseerde resultate).

#### Opsommende beskrywing van die heterofermenterende D(-)-melksuurisolate

Morfologie (48h by 25°C op MRS-agar; anaërobe inkubasie):

**Kolonies:** 0,5 tot 2 mm in deursnit, rond met gladde, blink oppervlakte. Plat (drie isolate) en konvekse elevasie (twaalf isolate); roomwit tot gryswit (tien isolate) en deurskynend met roomwit kern (vyf isolate).

**Mikroskopies:** Effens verlengde of ovale cocci, meestal in kettings en pare; soms is enkelselle waargeneem. Die kettings was soms onreëlmatig gedraai (Fig. 4.12).

Fisiologies: Al 15 isolate het gas uit glukose en D(-)-melksuur gevorm, by 15°C gegroei en was katalase-negatief. Arginienhidrolise, beweeglikheid, nitraatreduksie en groei by 45°C is nie aangetoon nie.

Groei by 4°C is by tien isolate waargeneem terwyl die gemiddelde eind-pH 4,2 was.

Slymvorming uit sukrose is by 12 isolate gevind waarvan een isolaat (L2278) nie melibiose kon fermenteer nie (*L. amelibiosum*). Die ander 11 isolate is as *L. mesenteroides*/*L. dextranicum* geïdentifiseer. By drie isolate kon slymproduksie vanaf sukrose nie aangetoon word nie waarvan twee isolate (L2110 en L2130) laktose kon fermenteer (*L. lactophilum*), en een isolaat (L1790) laktose nie benut het nie (*L. paramesenteroides*) (Tabel 4.15).

#### 4.4.1.2 DL-melksuurisolate

Hierdie heterofermenterende, katalase-negatiewe groep van ses isolate kan morfologies onder die genus *Lactobacillus* geklassifiseer word terwyl hul ook tipies DL-melksuur uit glukose gevorm het, maar geen slym uit sukrose nie. Die suikerfermentasiespektrum het ook van dié van die *Leuconostoc*-spesies verskil. Hierdie isolate is gevolglik as heterofermenterende lactobacilli ("subgenus" *Betabacterium*) geklassifiseer.

In Tabel 4.16 word die monsters waaruit die isolate afkomstig is, aangetoon.

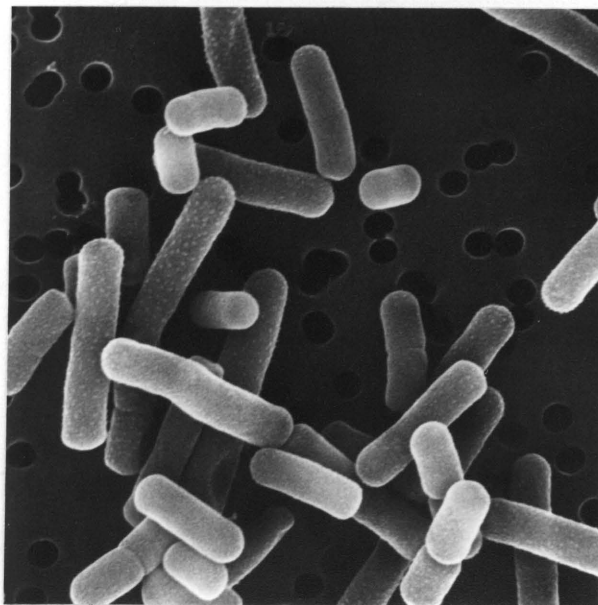
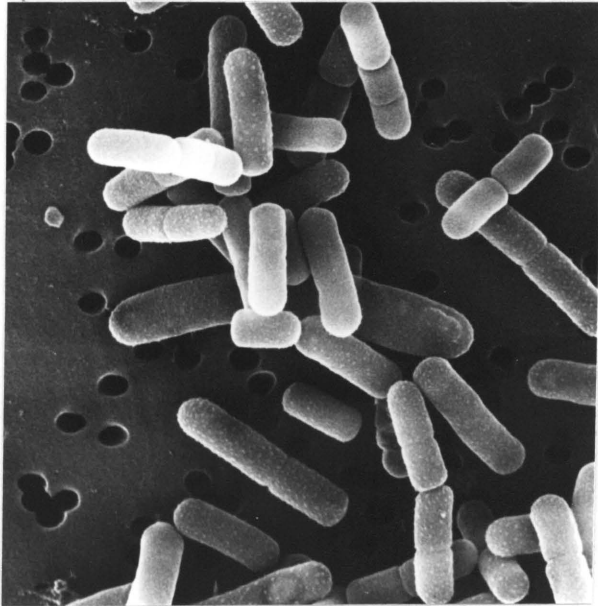
Fig. 4.13 toon die morfologie van een van die isolate van hierdie groep soos onder die skandeerelektronmikroskoop waargeneem. Die kolonies van hierdie isolate was rond, 1 tot 2 mm in deursnit, roomwit met 'n gladde, blink oppervlak; twee isolate se elevasie was plat en die ander konveks. Die selle (soos met die fasekontrasmikroskoop waargeneem) was kort, dik, reguit stafies wat enkeld of in pare voorgekom het, behalwe by isolaat L2173 waar die selle lank, verdik en krom was en met baie lang filamente. Die selle van isolaat L2174 het meestal in kettings voorgekom.

TABEL 4.16    BESONDERHEDE VAN DIE EKSUDAATMONSTERS WAARUIT DIE HETEROFERMENTERENDE LACTOBACILLI WAT DL-MELKSUUR VORM, GEÏSOLEER IS EN DIE MINIMUM-GETALLE WAARTEEN DIT VOORGEKOM HET (IN LOGS PER ml). (GEEN HETEROFERMENTERENDE LACTOBACILLI IS UIT DIE PRODUKMONSTERS SELF GEÏSOLEER NIE )

Tipe Monster	Eksudaatmonsters			
	No	Medium	Aantal isolate	Log getal in monster
Weense worsies	V28	AA+Fr	1	4,0
	V29	AA+Fr	3	5,0
"Russians"	V32	MRS-KS	2	7,0

FIG. 4.13 TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN DL-LAKTAATVORMENDE  
BETABAKTERIEË (UIT MRS-SOP, INKUBASIE VIR 48h  
BY 25°C)

Isolaat L2060, vergroting : 10 000 X



Volgens Schleifer en Kandler (1972) bestaan daar groot variasie in die interpeptiedbrug van die peptidoglikaan van die heterofermenterende lactobacilli en dit kan dus as 'n belangrike taksonomiese maatstaf beskou word.

Analise van die aminosuursamestelling van die peptidoglikaan van hierdie isolate is as verdere hulpmiddel vir klassifikasie gebruik. Die resultate van hierdie analise word in Tabel 14 van die Bylae gegee.

Die teenwoordigheid van aminosure wat gewoonlik nie in die selwande van die lactobacilli voorkom nie, bv. valien, isoleusien en leusien, dui op die onsuiwerheid van die selwand. Isolaat L2060 bevat 'n taamlik hoë konsentrasie van sommige van die "nie-selwand-aminosure" en die hoeveelheid glutamiensuur is ook laag in vergelyking met die ander vyf isolate. 'n Verhouding van 1 glutamiensuur : 2 alanien, wat gewoonlik in die selwande van die Lys-Asp-tipes voorkom (Schleifer en Kandler, 1972), word nie by hierdie isolaat gevind nie, maar wel 'n 1:4 verhouding.

In Tabel 4.17 word die belangrikste selwand-aminosure en -suikers, nl. alanien, lisien,  $m - A_2pm$ , aspartiensuur, glukosamien, galaktosamien en muraamiensuur relatief tot glutamiensuur gegee.

Die belangrikste fisiologiese eienskappe van hierdie groep word in Tabel 4.18 uiteengesit.

Volgens die resultate weergegee in Tabelle 4.17 en 4.18 kon isolate L2060, L2061, L2062 en L2082 as *L. brevis* geïdentifiseer word. Dié organisme bevat 'n Lys-Asp-tipe peptidoglikaan en groei by 15°C. Die suikerfermentasiepatroon van isolate L2173 en L2174 verskil aanmerklik van die ander vier isolate. Arabinose en xilose word nie benut nie, terwyl mannose,

TABEL 4.17 MOLARE VERHOUDINGS VAN DIE BELANGRIKSTE AMINOSURE WAT IN DIE SELWANDE VAN DIE HETEROFERMENTERENDE *LACTOBACILLUS* -STAMME GEVIND IS (MET GLUTAMIENSUUR GENEEM AS 1,0)

Isolaat nr.	Aminosuur/Aminosuiker							
	Glu	Ala	Lys	m- <sub>2</sub> pm	Asp	GLA	GAA	Mur
L2060	1	4,17	1,58	-	0,93	-	5,8*	0,1
L2061	1	2,1	-	0,16	0,64	1,01	0,78	0,61
L2062	1	1,9	0,79	0,1	0,81	0,70	0,98	0,49
L2082	1	2,36	0,82	0,15	0,76	0,77	0,91	0,62
L2173	1	2,32	0,84	0,34	0,65	0,73	4,1*	0,32
L2174	1	2,07	0,78	0,18	0,69	1,64	3,2*	0,51

\*Die hoë konsentrasie galaktosamien kan toegeskryf word aan die moontlike teenwoordigheid daarvan in die selwand-poli-sakkariedkompleks.

TABEL 4.18 FISILOGIESE EIENSKAPPE VAN DIE HETEROFERMENTERENDE LACTOBACILLI  
(DL-MELKSUUR-VORMENDE ISOLATE)

Isolate	Fisiologiese toets															Identifikasie	
	Suur uit sellobiose	Eskulien-hidrolise	Galaktose	Gas uit Glukonaat	Laktose	Malaat	Mannose	Melibiose	Salisien	Sukrose	Trehalose	Arabinose	Xilose	NH <sub>3</sub> uit Arginien	Groei by 10% NaCl		Eind pH
L2060	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3,91	<i>L. brevis</i>
L2061	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3,97	<i>L. brevis</i>
L2062	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3,92	<i>L. brevis</i>
L2082	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3,94	<i>L. brevis</i>
L2173	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	3,92	<i>L. cellobiosus</i>
L2174	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	3,97	<i>L. fermentum</i>
% *	16,7	33,3	33,3	16,7	33,3	66,7	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	66,7	66,7	66,7	33,3	3,94	

\*Verwys na % van isolate wat positiewe reaksies toon, en die gemiddelde finale pH-waarde.

100% positiewe reaksies: DL-melksuur, gas uit glukose, groei by 4<sup>o</sup> en 15<sup>o</sup>C, fermentasie van fruktose, glukonaat, maltose en ribose; groei by pH3,9.

0% positiewe reaksie: Katalase, groei by 45<sup>o</sup>C, fermentasie van amigdaliën, inositol, inulien, mannitol, melezitose, α-metielglukosied, raffinose, sorbitol, stysel en ramnose, gas uit sellobiose, m - A<sub>2</sub>pm, slymvorming, beweeglikheid, gelatinase en nitraatreduksie.

melibiöse, salisien, sukrose en trehalose wel gefermenteer word. Die onvermoë van hierdie twee isolate om ammoniak vanaf arginien te vorm, is 'n atipiese eienskap vir die "subgenus" *Betabacterium*. Isolaat L2173 is as *Lactobacillus fermentum* wat nie by 45°C groei nie, geïdentifiseer.

Geen L(+)-melksuurvormende heterofermenterende lactobacilli is onder hierdie groep gevind nie, in teenstelling met bevindings van Hitchener et al. (1982) wat 115 isolate met hierdie eienskappe gevind het op vakuümverpakte rou vleis. 'n Nuwespesie nl. *L. divergens* wat onder die subgenus *Betabacterium* tuishoort en wat L(+)-melksuur uit glukose vorm, is deur Holzapfel en Gerber (1983) beskryf. Dit is ook opvallend dat geen tipiese DL-heterofermenterende lactobacilli, waarvan *L. viridescens* die tradisionele vleisorganisme is (Niven en Evans, 1957), onder die isolate uitgewys kon word nie. Mol et al. (1971) en Reuter (1975) onder andere maak ook melding van die voorkoms van *L. viridescens* onder hul isolate.



Opsommende beskrywing van die heterofermenterende lactobacilli

Morfologie (48h by 25°C op MRS-agar; anaërobe inkubasie):

Kolonie: Ronde, roomwit kolonies met 'n deursnit van 1 tot 2 mm, roomwitkleur en gladde, blink oppervlak. Die kolonies van L2173 en L2174 was plat, terwyl die ander isolate 'n konvekse elevasie getoon het.

Mikroskopies: Kort, dik, reguit stafies, enkeld of in pare met lang, reguit filamente. Die selle van L2173 was lank, gekrom en verdik met opvallende lang gekromde filamente. Kettings het meestal by L2174 voorgekom.

Fisiologies: Die vyf isolate het almal gas uit glukose en DL-melksuur gevorm, by 4°C en 15°C gegroei en was katalase-negatief.  $m - A_2pm$ , beweeglikheid, slymvorming, nitraatreduksie en groei by 45°C kon nie aangetoon word nie. Die tipiese suikerfermentasiereeks van *L. brevis* is by vier isolate (L2060, L2061, L2062 en L2082) gevind, terwyl die ander twee isolate 'n wyer reeks gefermenteer het en nie ammoniak uit arginien gevorm het nie, wat atipies vir die "subgenus" *Betabacterium* is. Hiervan is L2173 as *L. cellobiosus* geïdentifiseer en L2174 as 'n atipiese *L. fermentum* wat nie by 45°C groei nie (Tabel 4.18).

#### 4.4.2 Homofermenterende melksuurbakterieë

Die oorblywende 454 isolate is almal as homofermenterende lactobacilli geklassifiseer aangesien meer as 85% melksuur vanaf glukose gevorm is (Sharpe, 1981), met geen noemenswaardige gasvorming uit glukose nie.

Verdere onderverdeling van hierdie groep het plaasgevind op grond van die teenwoordigheid van  $\underline{m} - A_2pm$  in die selwand en die melksuurisomeer wat gevorm word. Slegs 18 isolate het  $\underline{m} - A_2pm$  in die selwand gehad en die ander 436 isolate kon in drie groepe opgedeel word volgens die gevormde melksuurisomeer:

- 1) DL-melksuur: 402 isolate
- 2) L(+)-melksuur: 29 isolate
- 3) D(-)-melksuur: 5 isolate

##### 4.4.2.1 Isolate met $\underline{m} - A_2pm$ in die selwand

Die 18 isolate met  $\underline{m} - A_2pm$  in die selwand is almal as *Lactobacillus plantarum* geklassifiseer. Hul suikerfermentasiespektrum sowel as gevormde melksuurisomeer (DL-laktaat) dui daarop dat hulle nie aan een van die ander  $\underline{m} - A_2pm$ -bevattende spesies behoort nie (*Lactobacillus yamanashiensis*, *Lactobacillus sharpeae*, ens.)

In Tabel 4.19 word die tipe monsters waaruit die isolate afkomstig is, aangedui, en Fig. 4.14 toon die tipiese selmorfologie van hierdie groep isolate.

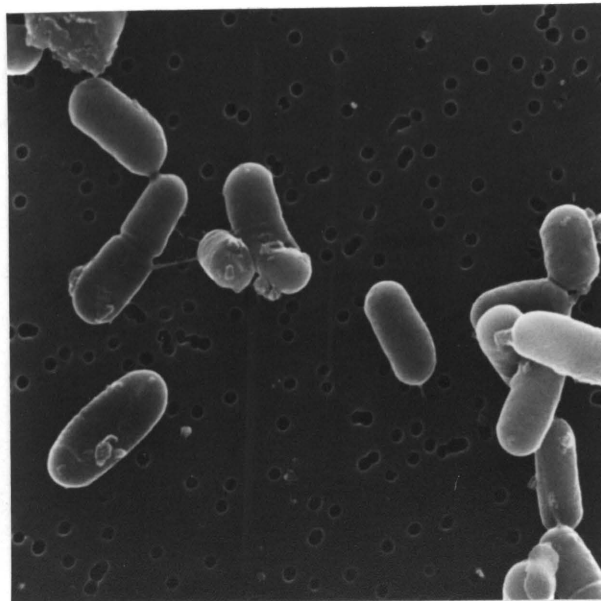
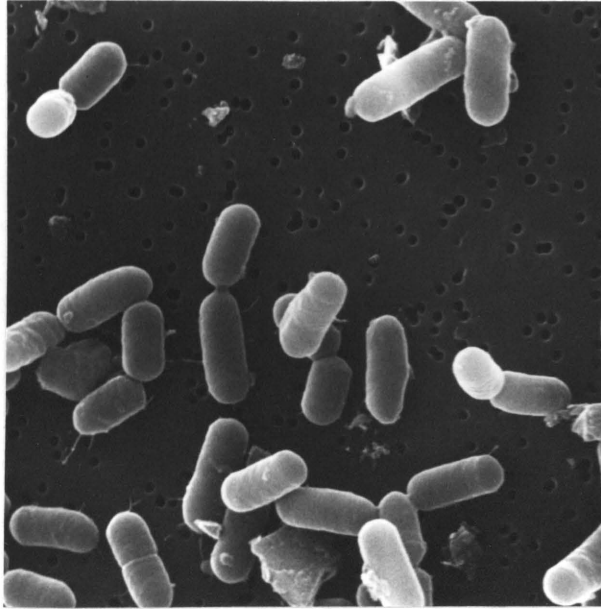
Van hierdie 18 isolate kon 14 nitraat na nitriet reduseer en het twee slym uit sukrose gevorm. Geen beweglike vorme is gevind nie. Met die uitsondering van twee isolate was die finale pH van die kulture na vier dae laer as 4,0, met 'n gemiddelde pH van 3,79. Geeneen van die groep isolate het arginien gehidroliseer nie.

Die belangrikste fisiologiese eienskappe van die 18 isolate word in Tabel 4.20 getoon. Eienskappe van 'n

TABEL 4.19 UITEENSETTING VAN DIE TIPES MONSTERS WAARUIT DIE *L. PLANTARUM*- STAMME GEÏSOLEER IS. DIE MINIMUM GETALLE WAARIN DIT VOORGEKOM HET, WORD GEGEE IN LOGS PER g OF LOGS PER ml

Tipe monster	Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters
Weense worsies					V17	AA	3	4,0
					V19	AA	1	4,0
					V27	AA	1	4,0
					V29	AA+Fr	1	4,0
					V16	AA	1	4,0
Noenvleis Frankfurters				V31	MRS-KS	2	7,0	
"Russians"	W3	AA	3	6,0	V3	AA	2	
	W32	MRS-KS	1	6,0	V32	AA	3	6,0

FIG. 4.14 TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN DL-LAKTAATVORMENDE STREPTOBAKTERIEË MET  $\underline{m} - A_2pm$  IN DIE SELWAND (UIT MRS-SOP, INKUBASIE VIR 48h BY 25°C) Isolaat L2161, vergroting : 10 000 X



TABEL 4.20 FISILOGIESE EIENSKAPPE VAN DIE *L. PLANTARUM*- ISOLATE

Isolaat	Fisiologiese toetse																							
	Groei by 4°C		Amigdaliën	Sellobiose	Eskulien	Fruktose	Gas uit glukonaat	Inositol	Inulien	Laktose	Mannitol	Melezitose	DL-melietielglukosied	Raffinose	Sorbitol	Stysel	Ramnose	Arabinose	Maltose	Xilose	Groei by 10% NaCl	Eind-pH	Slymvorming	NO <sub>3</sub> -reduksie
L569	-		+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3,8	-	+
L575	-		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,9	-	+
L589	-		+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,9	-	+
L591	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,8	+	+
L596	-		+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,9	-	+
L1766	-		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,82	-	+
L1779	-		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,81	-	+
L1780	-		+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,8	-	+
L1781	-		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,8	-	+
L1789	-		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,67	-	+
L1889	-		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,62	-	+
L2064	+		+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,46	-	-
L2161	+		-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,57	-	-
L2164	+		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,6	+	+
L2167	+		+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	3,57	-	+
L2184	+		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	4,26	-	+
L2188	+		+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3,91	-	+
L2191	+		-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	4,32	-	+
* DSM20174	3,89 +		83,3 +	88,9 -	66,7 -	88,9 +	11,1 -	11,1 -	16,7 -	94,4 +	77,8 +	77,8 +	50 +	83,3 +	77,8 +	27,8 -	33,3 -	72,2 +	88,9 +	55,6 +	61,1 -	3,8 3,82	11,1 -	77,8 -

\* Dui die persentasie van isolate aan wat 'n positiewe reaksie getoon het.

\* 100%: Groei by 4°C, DL-melksuur, groei by pH 3,9,  $\underline{m}$  - A<sub>2</sub>pm in die selwand, fermentasie van galaktose, glukonaat, malaat, mannose, melibiose, salisien, sukrose, trehalose, ribose.

\* 0%: Katalase, gasvorming uit glukose, groei by 45°C, gasvorming uit sellobiose, arginienhidrolise, beweeglikheid, gelatienase, hemolise.

outentieke stam, nl. *Lactobacillus plantarum* ssp. *pseudoplantarum* (DSM20174) is vir vergelykingsdoeleindes bepaal en word ook in Tabel 4.20 aangegee.

Slegs twee duidelike groepe kon op grond van hierdie eienskappe onderskei word, nl. 'n groep wat die meeste van die suikers kon fermenteer en 'n kleiner groep wat uit isolate L2161, L2184, L2188 en L2191 bestaan met 'n baie nou suikerfermentasiespektrum. Hierdie laaste groep verskil ook t.o.v. die eienskappe van die outentieke stam wat getoets is. Kleiner verskille in dié twee groepe kom egter voor.

Twee tipes kolonies is onder die *L. plantarum*-isolate aangetref:

- Altesaam 11 stamme het roomwit kolonies met 'n deursnit van meer as 1 mm gehad. Die kolonies was rond met 'n konvekse elevasie en gladde blink oppervlak.
- Kleiner ronde kolonies met 'n deursnit van minder as 1,5 mm en wat 'n geelbruin pigment vorm, kom in hierdie subgroep voor. Die oppervlakte was almal glad en blink en die elevasie konveks. Dié kolonietipe is by sewe isolate aangetref. Geen ander groep isolate van die lactobacilli het soortgelyke geelbruin kolonies gevorm nie. Donkergeel kolonies is ook by hierdie spesie beskryf deur Buchanan en Gibbons (1974).

Indien die kolonie-eienskappe gebruik sou word om die geïsoleerde *L. plantarum*-stamme in twee groepe te verdeel, sal die subgroep met die roomwit kolonies in twee subgroepe verdeel kon word met die vier genoemde isolate wat min suikers bevat, in een van hierdie subgroepe. Hierdie indelings word in Tabel 4.21 getoon.

Die twee subgroepe met sewe isolate elk verskil nie

TABEL 4.21 INDELING VAN DIE *L. PLANTARUM*-ISOLATE OP GROND VAN DIE KOLONIEMORFOLOGIE. DIE EIENSKAPPE VAN DIE OUTENTIEKE SPESIE SOOS IN HIERDIE ONDERSOEK GETOETS, WORD GEGEE ASOOK DIE EIENSKAPPE VAN DIE SPESIE SOOS UIT DIE LITERATUUR VERKRY (BUCHANAN EN GIBBONS, 1974)

Kolonie tipe en outentieke stamme	Groeieienskappe															Isolate		
	Groei by 4°C	Sellobiose	Fruktose	Mannitol	Melezitose	α-metielglukosied	Raffinose	Sorbitol	Stysel	Ramnose	Arabinose	Maltose	Xilose	Groei by 10% NaCl	Eind-pH		NO <sub>3</sub> -reduksie	Aantal isolate
Geelbruin kolonies	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,82	+	7	L569, L575, L589, L597, L596, L1766, L1889
Roomwit kolonies (1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,66	+	7	L1779, L1780, L1781, L1789, L2064, L2164, L2167
Roomwit kolonies (2)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	4,16	+	4	L2161, L2184, L2188, L2191
<i>L. plantarum</i> spp. <i>pseudopantarum</i> (DSM20174)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	3,82	-		
<i>L. plantarum</i> (volgens Buchanan en Gibbons, 1974)			+	+	+		+	+	-	-	d	+	+	+				

+ : positiewe reaksie by 100% isolate

- : negatiewe reaksie by 100% isolate

± : positiewe reaksie by 50% isolate

‡ : positiewe reaksie by ca. 75% isolate

⋈ : negatiewe reaksie by ca. 75% isolate

d : resultate varieër

Positiewe reaksie by 100% isolate: DL-melksuur, groei by 15°C en pH 3,9, m - A<sub>2</sub>pm in selwand, fermentasie van amigdaliën, eskulien, galaktose, laktose, glukonaat, malaat, mannose, melibiose, salisien, sukrose, trehalose, ribose.

Negatiewe reaksie by 100% isolate: katalase-aktiwiteit, gasvorming uit glukose, groei by 45°C, gasvorming uit sellobiose en glukonaat, fermentasie van inositol en inulien, slymvorming uit sukrose, beweeglikheid, arginiensplitsing, gelatinase-aktiwiteit.

in 'n groot mate in hul suikerbenutting nie, behalwe in die fermentasie van  $\alpha$ -metielglikosied. Die patroon van die outentieke stam kom ook hiermee ooreen.

Die subgroep met vier isolate se gemiddelde eind-pH was hoër as dié van die ander twee groepe, nl. 4,16 teenoor onderskeidelik 3,66 en 3,82, en ook hoër as dié van die outentieke stam wat 3,82 was.

### Opsommende beskrywing van die *L. plantarum*-isolate

Morfologie (48h by 25°C op MRS-agar; anaëroob geïnkubeer):

- Kolonies: 1) Ronde roomwit kolonies met deursnit van meer as 1 mm en gladde blink oppervlak. Die elevasie was konveks (11 isolate).
- 2) Ronde geelbruin kolonies met 'n deursnit van minder as 1,5 mm, konvekse elevasie en gladde blink oppervlak (7 isolate).

Morfologie: Kort tot baie kort stafies wat in pare en kort kettings voorkom. Onreëlmatige aggregate en verlengde selle is ook aangetref.

Fisiologie: Al die isolate het DL-melksuur gevorm, bevat  $m - A_2pm$  in die selwand, groei by 15°C maar nie by 45°C nie en is katalase-negatief. Gasvorming uit glukose, arginienhidrolise, beweeglikheid en gelatinase is nie aangetoon nie. Nitraatreduksie is by 14 isolate aangetoon en slymvorming uit sukrose by slegs twee isolate. Groei by 4°C is by 7 isolate getoon en groei in teenwoordigheid van 10% NaCl by 11 isolate.



#### 4.4.2.2 L(+)-melksuurisolate

Slegs 29 isolate het L(+)-melksuur in MRS-sop sonder natriumasetaat en vleisekstrak gevorm; meer as 90% van die totale melksuurkonsentrasie was in die vorm van die L(+)-isomeer.

In hierdie groep is geen beweeglike stamme gevind nie. Die kolonie- en selmorfologie was tipies van die melksuurbakterieë soos beskryf onder punt 4.3.2. Geen geelbruin kolonies is gevind nie. Die enkelselle was oor die algemeen kort, dik stafies met 'n algemene neiging tot verlengde selle, en soms onreëlmatige selvorms. Benewens enkelselle het pare en kort kettings ook algemeen voorgekom.

In Tabel 4.22 word die monsters waaruit die isolate afkomstig is, gelys, asook die minimum getalle waarin dit aangetref is.

Fig. 4.15 toon die selmorfologie van een van die isolate van hierdie groep.

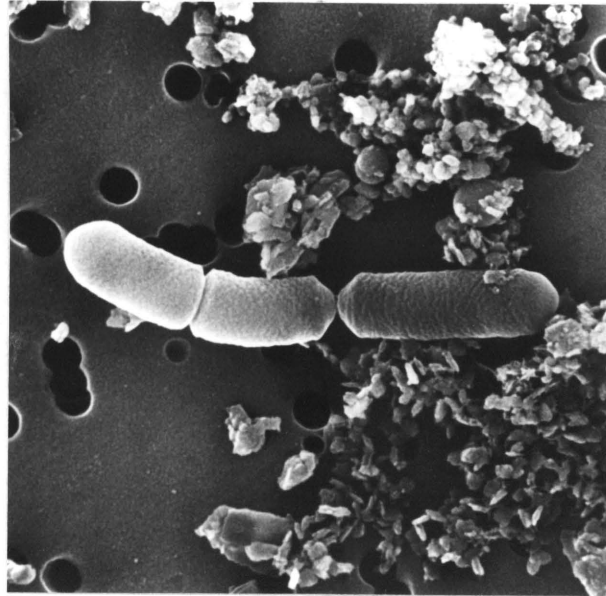
Die belangrikste fisiologiese eienskappe van hierdie groep word in Tabel 4.23 uiteengesit. Die eienskappe van outentieke *Lactobacillus alimentarius* (DSM20249) soos in hierdie ondersoek bepaal, en eienskappe van *Lactobacillus bavaricus* soos uit die literatuur verkry (Stetter en Stetter, 1980) word ook bygevoeg. In Tabel 4.23 word die 29 isolate ook in ses biogroepe verdeel op grond van die fermentasie van melibiose, maltose, sukrose en trehalose. (Volledige resultate van die fisiologiese eienskappe van hierdie groep word in Tabel 15 in die Bylae gegee.)

Die sewe isolate in biogroep II het volgens hul suikerfermentasiereeks in 'n groot mate ooreengestem met die eienskappe van *L. bavaricus* soos dit uit die literatuur verkry is. Die belangrikste eienskappe wat hier in ag geneem is, is die fermentasie van melibiose en onvermoë

TABEL 4.22 UITEENSETTING VAN DIE TIPES MONSTERS WAARUIT DIE HOMO FERMENTATIEWE MELKSUURBAKTERIEË WAT L(+)-MELKSUUR VORM, GEÏSOLEER IS. DIE MEDIUM EN MINIMUM GETALLE WAARIN DIT VOORGEKOM HET, WORD OOK GEGEE (LOG TELLINGS PER g OF PER ml)

	Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters
Weense worsies	W5	AA	2	6,5	V5	AA	2	7,0
	W6	AA	1	7,0	V10	AA	2	7,0
	W28	AA+Fr	1	4,0	V28	AA	2	4,0
Noenvleis Frankfurters						AA+Fr	1	4,0
						Std-I	3	7,0
					V11	AA	3	7,0
"Russians"	W7	AA	1	7,0	V31	MRS-KS	4	6,0
	W31	MRS-KS	2	5,5	V3	AA	1	7,0
Rookwors	W3	AA	1	7,0	V35	MRS-KS	2	8,0
	W30	MRS-KS	1	7,0				

FIG. 4.15 TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN L(+)-LAKTAATVORMENDE  
STREPTOBAKTERIEË (UIT MRS-SOP, INKUBASIE VIR  
48h BY 25°C)  
Isolaat L2100, vergroting : 15 000 X



TABEL 4.23 RESULTATE VAN FISILOGIESE TOETSE VAN HOMOFERMENTERENDE L(+)-MELKSUURISOLATE. DIE VERDELING IN SUBGROEPE WORD GETOON ASOOK DIE EIENSKAPPE VAN OUTENTIEKE STAMME

Groep	Aantal isolate	Melibiose	Maltose	Sukrose	Trehalose	Groei by 4°C	Amigdalien	Sellobiose	Eskuliensplitsing	Gas uit glukonaat	Suur uit glukonaat	Inositol	Inulien	Laktose	Malaat	Mannitol	Mannose	Melezitose	α-Metielglikosied	Raffinose	Salisien	Sorbitol	Stysel	Ramnose	Arabinose	Xilose	Groei by 10% NaCl	Groei by pH 3,9	Slymvorming	Eind-pH	mol % G+C	Identifikasie	
I	4	+	+	+	+	75	25	0	50	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	25	75	0	0	25	75	75	0	50	0	4	42,29	<i>L. bavaricus</i>	
II	7	+	-	+	-	86	71	71	71	0	100	0	0	14	71	0	71	0	0	0	86	0	0	0	57	0	43	29	43	4,3	41,93	<i>L. bavaricus</i>	
III	11	+	+	+	+	100	36	55	73	46	100	0	0	55	100	0	91	0	46	0	100	0	0	9	27	9	36	64	0	4		<i>L. bavaricus</i>	
IV	1	+	+	+	+	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	3,32		<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamosus</i>	
V	4	+	-	+	+	100	0	25	25	25	75	0	0	0	100	0	100	0	0	0	25	0	0	25	0	0	75	50	0	4,2		<i>L. bavaricus</i>	
VI	2	-	-	+	+	0	50	50	0	0	0	0	0	50	100	0	100	0	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0	0	4,3		<i>L. bavaricus</i>	
<i>L. alimentarius</i>		-	+	+	+	100	100	100	100			0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	100	100	0	3,9	35,79		
<i>L. bavaricus</i> (Stetter en Stetter, 1980)		+	-	-	-			100						100		0				0			0	0	0						42		
<i>L. casei</i>						100	100	100	100					100		100		100		100			0	100	0	0							

\* + : 100% positiewe reaksies  
- : 100% negatiewe reaksies

\*\* Verwys na % van die isolate wat positiewe reaksies toon, en die gemiddelde eind-pH-waarde en mol % G+C.

\* 100% : L(+)-melksuur, groei by 15°C, fermentasie van fruktose, galaktose, sukrose, ribose en pseudo-katalase-aktiwiteit.

\* 0% : Katalase-aktiwiteit, gasvorming uit glukose en sellobiose, groei by 45°C,  $m - A_2pm$  in selwande, arginienhidrolise, beweeglikheid, nitraatreduksie en gelatinase-aktiwiteit.

om maltose te fermenteer. Afwykings in die suikerfermentasiëpatroon het voorgekom t.o.v. arabinose, trehalose, laktose en sellobiose.

Vier isolate het met die eienskappe van *L. alimentarius* ooreengestem, en vorm biogroep I. Maltose is wel gefermenteer, maar melibiose nie. 'n *L. alimentarius*-stam vanaf die Duitse Kultuurversameling (DSM), nl. DSM2049, is ook ondersoek. Die outentieke stam se fermentasiëreeks is in 'n groot mate ooreenstemmend met die isolate in biogroep I.

Aangesien die mol % G+C in die DNA van *L. alimentarius* en *L. bavaricus* duidelik verskil (35,9 - 37,3 teenoor 42 mol %), is die DNA van vier isolate uit biogroep II, twee isolate uit biogroep I en die outentieke stam van *L. alimentarius* gesuiwer en die mol-% G+C-inhoud d.m.v. smeltpuntbepaling vasgestel. 'n Outentieke stam van *L. bavaricus* was nie verkrygbaar nie. Die resultate van hierdie eksperiment word ook in Tabel 4.23 aangedui.

Hieruit blyk dit dat die gemiddelde mol % G+C van hierdie ses isolate ooreenstem met dié van *L. bavaricus* soos dit in die literatuur gestel word.

Volgens die suikerfermentasiëpatroon van hierdie twee organismes kan twee biogroepe egter duidelik gesien word.

Die suikerfermentasiëpatroon van isolaat L2243 het baie van die ander 28 isolate verskil deurdat 'n baie wyer spektrum suikers gefermenteer word, bv. inositol, inulien, mannitol, melezitose, sorbitol en stysel wat deur nie een ander isolaat fermenteer word nie. Stysel word baie sterk verbruik. Hierdie eienskappe van die isolaat stem baie ooreen met die van *L. casei*, en moontlik die subspesies *rhamnosus* weens die swak fermentasie van ramnose. Stysel word egter nie deur *L. casei* verbruik nie.

Die oorblywende 17 isolate is in drie biogroepe verdeel op grond van hul fermentasie van melibiose, maltose, sukrose en trehalose; die identifikasie van hierdie isolate as moontlik *L. bavariicus* word in Tabel 4.23 aangedui.

Opsommende beskrywing van die homofermentatiewe L(+)-melksuurisolate

Morfologie (48h by 25°C op MRS-agar; anaërobe inkubasie):

Kolonies: Ronde roomwit kolonies met 'n deursnit van 2 mm en minder met 'n plat tot konvekse elevasie en gladde, blink oppervlak.

Morfologie: Kort tot medium lang dik stafies wat meestal in pare of kettings voorgekom het en dikwels onreëlmatig gekrom was. Verlengde selle, wat ook onreëlmatig vertoon het, het by 'n aantal isolate voorgekom.

Fisiologies: Al die isolate het L(+)-melksuur gevorm, maar geen gas uit glukose nie en het ook nie  $m - A_{2pm}$  in die selwande bevat nie. Groei by 15°C is by die 29 isolate aangetoon, maar nie groei by 45°C, arginien-splitsing, beweeglikheid of katalase-aktiwiteit nie. Slymvorming uit sukrose is by vier isolate aangetoon terwyl 22 by 4°C kon groei. Die mol % G+C van die DNA van ses isolate is bepaal en dit is tesame met die suikerspektrum gebruik om 28 van die isolate as *L. bavariicus* te identifiseer terwyl een isolaat, nl. L2243 as *L. casei* ssp. *rhamnosus* geïdentifiseer is.

(Kyk Tabel 15 van die Bylae.)

#### 4.4.2.3 D(-)-melksuurisolate

Vyf isolate is geïsoleer wat D(-)-melksuur vorm. Die monsters waaruit dit geïsoleer is en die getalle waarin dit voorgekom het, word in Tabel 4.24 uiteengesit. Die selmorfologie van een van die isolate word in Fig. 4.16 aangedui soos dit onder die skanderelektronmikroskoop waargeneem is.

Die fisiologiese eienskappe van hierdie groep word in Tabel 4.25 gegee.

Twee groepe word duidelik onderskei, soos uit Tabel 4.25 blyk. Die eerste groep, wat bestaan uit isolate L1570 en L1803, het 'n wyer suikerfermentasiespektrum as die tweede groep, nl. L2115, L2124 en L2131.

Die enigste twee homofermentatiewe *Lactobacillus*-spesies wat D(-)-melksuur vorm is *Lactobacillus coryniformis*, wat ook DL-melksuur kan vorm, en *Lactobacillus homohiochii*, wat uitsluitlik D(-)-melksuur vorm. 'n Outentieke stam van *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis* (DSM20001) se suikerfermentasiereeks is ook in hierdie ondersoek bepaal en is by Tabel 4.25 gevoeg. Dit verskil egter met die D(-)-melksuurisolate deurdat mannitol, sorbitol en ramnose wel gefermenteer word, en nitraat na nitriet gereduseer word. Die mol % G+C-inhoud van *L. coryniformis* en *L. homohiochii* verskil baie min, nl. 45,4 en 46 respektiewelik (Buchanan en Gibbons, 1974). Identifikasie van hierdie groep organismes kan dus nie met sekerheid gedoen word nie. Isolate L2115, L2124 en L2131 het egter 'n baie nou fermentasiespektrum wat kenmerkend is van *L. homohiochii*.

Die kolonie-morfologie van hierdie groep het ooreengestem, nl. kolonies met 1,5 tot 2 mm deursnee, rond, roomwit, plat tot effens konveks met 'n gladde, blink

TABEL 4.24 UITEENSETTING VAN DIE Tipes Monsters Waaruit die Homofermenterende Melksuurbakterieë wat D(-)-Melksuur vorm, Geïsoleer is. Die Minimum Getalle waarin dit Voorgekom het, word Gegee as Log Tellings per g of per ml

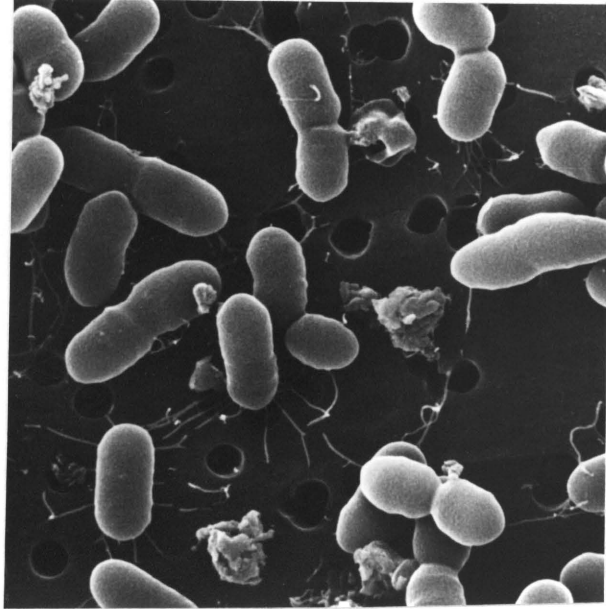
Tipe Produk	Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters
Weense worsies					V5	AA	1	7,0
					V19	AA	1	7,0
	W29	MRS-KS	1	7,0	V29	MRS-KS	2	7,0



FIG. 4.16

TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN D(-)-LAKTAAT-  
VORMENDE STREPTOBAKTERIEË (UIT MRS-SOP,  
INKUBASIE VIR 48h BY 25°C)

Isolaat L2124, vergroting : 10 000 X



TABEL 4.25 FISILOGIESE EIENSKAPPE VAN DIE HOMO FERMENTATIEWE MELKSUURBAKTERIEË WAT D(-)-MELKSUUR VORM

Isolaatnommer	Groei by 4°C	Fermentasie																	Groei by 10% NaCl	Eind-pH	Slymvorming	Beweeglikheid	Nitraatreduksie
		Amigdalien	Sellobiose	Eskulien	Fruktose	Galaktose	Glukonaat	Laktose	Malaat	Mannose	Melibiose	α-Metielglukosied	Raffinose	Salisien	Trehalose	Arabinose	Ribose	Xilose					
L1570	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	4,69	+	-	-
L1803	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	4,04	-	+	-
L2115	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4,47	-	-	-
L2124	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4,52	-	-	-
L2131	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	4,41	-	-	-
*%	80	20	40	60	80	60	80	40	20	40	20	40	20	20	20	20	60	20	80	4,43	20	20	0
<i>L. coryniformis</i>	+	-	-	+	+	+		-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3,82	-	-	+
<i>L. homohiochi</i>		-	-			-		-			-		-	+		-	-						

\* 100%: D(-)-melksuur, groei by 15°C, teenwoordigheid van pseudokatalase, fermentasie van sukrose en maltose.

\* 0%: Katalase-aktiwiteit, gasvorming uit glukose, sellobiose en glukonaat, groei by 45°C, en pH 3,9, fermentasie van inositol, inulien, mannitol, melezitose, sorbitol, stysel, ramnose,  $\underline{m}$  - A<sub>2</sub>pm in die selwand, arginiensplitsing, nitraatreduksie, gelatinase-aktiwiteit.

\* Dui die persentasie van isolate aan wat 'n positiewe reaksie getoon het.

oppervlakte. Die selle het onder die fasekontras-mikroskoop as kort, dun stafies vertoon. Dit het as enkelselle, pare of kort kettings voorgekom, met onreëlmatige selle, asook verlengde selle wat 'n onreëlmatige morfologie gehad het. By isolaat L1803 was die onreëlmatige morfologie veral opmerklik, en by isolate L2124 en L2131 het die selle meestal enkeld en soms kokkoïd voorgekom.

Homofermentatiewe isolate wat D(-)-melksuur vorm, is ook deur Reuter (1975) in rou vleis gevind. Hy het dit beskryf as 'n korynevormige groep wat dus nie homogeen is nie, en kon nie hierdie isolate identifiseer nie. Shaw en Harding (1984) het egter geen D(-)-melksuurvormende streptobakterieë gevind nie.

#### Opsommende beskrywing van homofermentatiewe D(-)-melksuurisolate

Morfologie (48h by 25°C op MRS-agar; anaërobe inkubasie):

**Kolonies:** Ronde plat tot konvekse kolonies met deursnit van 1 tot 2 mm, roomkleur met deurskynende rand en gladde, blink oppervlakte.

**Morfologie:** Klein kort stafies wat meestal enkeld of in pare voorkom en baie onreëlmatig vertoon het (verdik, gekrom). Verlengde selle wat ook onreëlmatig voorgekom het, is opgemerk (Fig. 4.15).

**Fisiologie:** D(-)-melksuur en groei by 15°C is by al die isolate getoon maar geen gasvorming uit glukose en glukonaat, groei by 45°C en pH 3,9,  $\underline{m}$  - A<sub>2</sub>pm in die selwande, arginiensplitsing, nitraatreduksie, katalase- of gelatinase-aktiwiteit nie. Slymvorming uit sukrose by L1570 en beweeglikheid by L1803 is gevind, maar slegs L1803 het nie by 4°C gegroei nie. Die gemiddelde eind-pH was 4,43.

Geen definitiewe identifikasie van hierdie vyf isolate kon gedoen word nie.

#### 4.4.2.4 DL-melksuurisolate

Die grootste persentasie, nl. 88%, van die homofermenterende melksuurbakterieë (streptobakterieë) het DL-melksuur gevorm. Hierdie groep van 402 isolate kan dus as die belangrikste melksuurbakterieë in vakuumverpakte vleisprodukte beskou word.

Die tipiese kolonie- en selmorfologie van die melksuurbakterieë, soos beskryf onder punt 4.3.2.1, is ook in hierdie groep aangetref. Die kolonies was rond, met 'n plat tot konvekse elevasie, roomwit van kleur met 'n gladde, blink oppervlak. Die selle was baie kort tot medium lang stafies wat enkeld, in pare of in kort kettings voorgekom het. Verlengde selle, wat as enkelselle of in kort kettings waargeneem is, is dikwels opgemerk. Hierdie verlengde selle was in baie gevalle onreëlmatig, gekrom, gebuig en gedraai. Soms was dit ook in aggregate opgedraai. Kokkoïde selle is soms waargeneem, asook kort, gebuigde selle wat in aggregate saamgepak het (Fig. 4.17 en Fig 4.18).

Slymvorming is by 25 isolate, d.i. 6,2%, aangetref. In vergelyking hiermee het Hitchener et al. (1982) by ca. 50% van hulle DL-vormende streptobakterieë slymvorming uit sukrose gevind, en Shaw en Harding (1984) by 46% van hul groep II wat as *L. sake* geïdentifiseer is. Altesaam 16 beweeglike isolate (3,9%) is gevind waarvan die meeste (15 isolate) as *L. curvatus* geklassifiseer is (sien later). Mol et al. (1971) het een beweeglike stam onder hul 59 atipiese streptobakterieë gevind, maar dié isolaat het nie van die ander isolate verskil nie. Reuter (1970a) het twee beweeglike stamme gevind wat in sy subgroep A tuisgehoort het. Kagermeier (1981) het hierdie subgroep, asook subgroep A<sup>1</sup>, tentatief as *L. sake* geïdentifiseer. Geen beweeglike stamme is onder Kagermeier (1981) se eie isolate gevind nie.

FIG. 4.17

TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN DIE *L. CURVATUS*-  
GROEP VAN DIE DL-LAKTAATVORMENDE STREPTO-  
BAKTERIEË (UIT MRS-SOP, INKUBASIE VIR  
48h BY 25°C)

Isolaat L2085, vergroting : 15 000 X

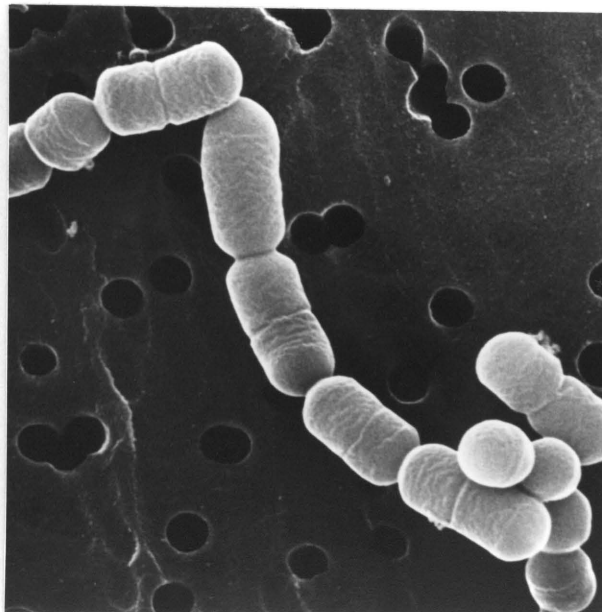
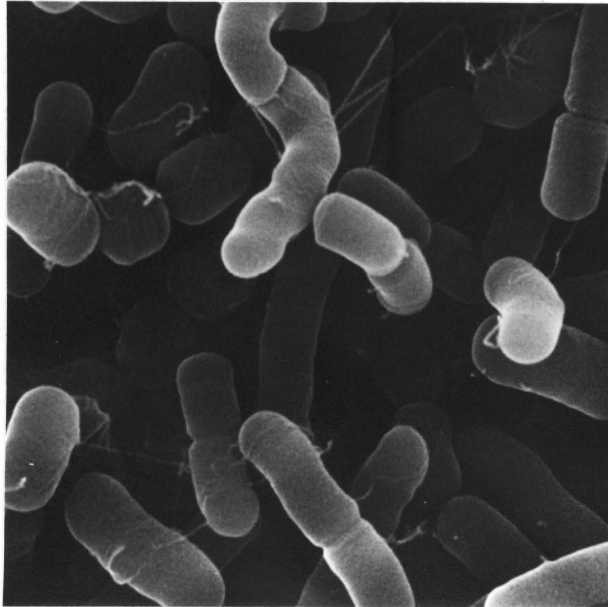
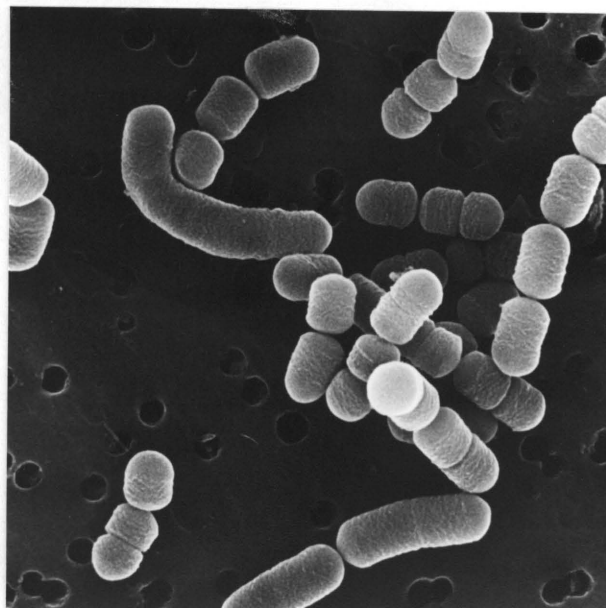
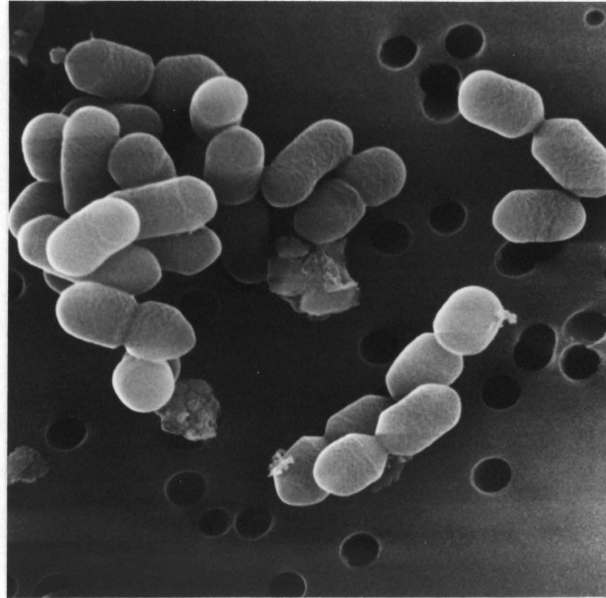


FIG. 4.18

TIPIESE SELMORFOLOGIE VAN DIE *L. SAKE-*  
GROEP VAN DIE DL-LAKTAATVORMENDE  
STREPTOBAKTERIEË (UIT MRS-SOP, INKUBASIE  
VIR 48h BY 25°C)

Isolaat L2120, vergroting : 10 000 X



Die tipe produkte waaruit hierdie groep isolate geïsoleer is en die minimum getalle waarin dit voorgekom het, word in Tabel 4.26 aangegee.

Homofermenterende, mesofiele lactobacilli wat DL-melksuur vorm maar geen  $\underline{m}$  - A<sub>2</sub>pm in die selwande besit nie, sluit tans slegs vier erkende spesies in, nl. *L. curvatus*, *L. coryniformis*, *L. farciminis* en *L. sake*. *L. farciminis* en *L. coryniformis* kan onder bepaalde omstandighede ook 'n "oormaat" aan L(+)- en D(-)-melksuur vorm.

*L. farciminis* fermenteer geen pentose-suikers nie, soos ook in hierdie ondersoek m.b.t. die outentieke stam DSM20184 aangedui is. Ook *L. coryniformis* is nie in staat om ribose te fermenteer nie. Aangesien al 402 isolate positiewe ribose-fermentasie getoon het, kan aanvaar word dat die genoemde twee spesies nie hier verteenwoordig was nie. Daarbenewens het *L. coryniformis* 'n baie nou suikerfermentasiespektrum, weereens in teenstelling met die 402 isolate wat almal 'n wyer suikerfermentasiereeks getoon het.

Uit hierdie feite blyk dit dus dat *L. curvatus* en *L. sake* vermoedelik die enigste erkende spesies is wat moontlik in hierdie groep verteenwoordig kon wees.

Die belangrikste groep lactobacilli wat deur ander werkers uit vleisprodukte geïsoleer is, is weens gebrek aan taksonomiese inligting as "atipiese" streptobakterieë beskryf. Sulke organismes is tipies uit vakuumverpakte vleisprodukte sowel as ander vleisprodukte, soos ham (Cavett, 1963; Kitchell en Shaw, 1975), salami (Reuter, 1967), hoendervleis (Thornley en Sharpe, 1959), rou vleis (Reuter, 1975), gepekelde vleisprodukte (Deibel en Niven, 1958) en vakuumverpakte rou vleis (Hitchener et al., 1982) geïsoleer. Hierdie organismes is ook op kuilvoer en gras gevind (Keddie, 1959) waarheen hul oorsprong moontlik terug te voer is.

TABEL 4.26 UITEENSETTING VAN DIE TIPE MONSTERS WAARUIT DIE DL-MELKSUURVORMENDE STREPTOBAKTERIEË GEÏSOLEER IS. DIE MINIMUM GETALLE WORD IN LOG TELLINGS PER g OF PER ml AANGEDEE

Tipe Produk	Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters
Weense worsies	W5	AA	10	6	V5	AA	11	7
	W6	AA	9	7				
	W10	AA	4	7	V10	AA	9	7
	W17	AA	11	5	V17	Std-I	4	7
	W18	AA	2	4	V18	AA	2	5
					V19	AA	14	6
	W27	AA	15	5,5	V27	AA	5	7
	W28	AA	5	4	V28	AA	1	4
		AA+Fr	6	5		AA+Fr	4	6
		Std-I	3	7		Std-I	1	7
		MRS-KS	8	6		MRS-KS	6	7
	W29	AA	1	4	V29	AA	1	4
		AA+Fr	1	5		AA+Fr	4	5
		Std-I	2	7		Std-I	3	7
		MRS-KS	4	7		MRS-KS	4	7
	Noenvleis	W11	AA	7	7	V11	AA	11
W15		AA	7	4	V15	AA	10	4
W16		AA	7	4				
W34		MRS-KS	13	8	V34	MRS-KS	6	8
	Std-I	4	8		Std-I	3	8	
Frankfurters	W7	AA	4	7				
	W31	AA	5	6	V31	AA	2	5
		MRS-KS	6	6		MRS-KS	1	7
	Std-I	5	6		Std-I	4	7	
"Russians"	W3	AA	2	6	V3	AA	3	7
	W9	AA	3	7	V9	AA	13	7
					V32	AA	9	7
	W32	MRS-KS	8	6		MRS-KS	8	7
		Std-I	4	7		Std-I	4	7
	W35	MRS-KS	8	7	V35	AA	9	6
	Std-I	4	8		MRS-KS	5	8	
					Std-I	6	8	



TABEL 4.26 (vervolg)

Tipe Produk	Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters	No.	Medium	Aantal isolate	Minimum getal in monsters
Rookwors	W4	AA	2	5	V4	AA	1	7
	W30	AA	8	5,5	V30	AA	7	7
		MRS-KS	6	6		MRS-KS	9	7
		Std-I	3	7		Std-I	5	7
	W33	MRS-KS	12	7				
		Std-I	2	7				
"Country Sausage"	W8	AA	6	7	V8	AA	9	7

Volgens Reuter (1971) is vleisprodukte 'n ideale habitat vir atipiese streptobakterieë, waarvan een subgroep (C) deur hom as *L. curvatus* geklassifiseer is (Reuter, 1970a). Dit kom egter voor of *L. sake* moontlik die belangrikste "atipiese" *Streptobacterium*-spesie in vleisprodukte mag wees (Kagermeier, 1981; Shaw en Harding, 1984).

Die "atipiese" streptobakterieë in die tipe vakuumverpakte vleisprodukte wat in hierdie studie ondersoek is, is die eerste keer deur Allen en Foster (1960) opgemerk. Dit het dus reeds met die aanvang van die vakuumverpakkingstechnologie op die toneel verskyn. Hierdie groep lactobacilli kon nie met die bestaande identifikasiesisteme geklassifiseer word nie. Daarna het Mol et al. (1971) gevind dat die atipiese streptobakterieë 38,6% van die isolate uitgemaak het, terwyl slegs vier identifiseerbare, tipiese lactobacilli (d.i. 2,6%) gevind is. Dié atipiese streptobakterieë was stawe, wat dikwels gebuig was, en in kettings van 4 tot 12 selle voorgekom het.

Reuter (1967, 1970a, 1970b, 1971, 1975) het hierdie groep grondig ondersoek. Volgens Reuter (1975) was daar drie belangrike verskille met tipiese streptobakterieë:

- i) atipiese streptobakterieë vorm kort, kokkoïde selle veral op media met 'n lae koolhidraatinhoud;
- ii) die groeitemperatuur van hierdie organismes verskil met dié van die tipiese groep, veral die minimum groeitemperatuur wat 4°C of laer is in vergelyking met 8°C van tipiese streptobakterieë;
- iii) 'n laer suurtoleransie is kenmerkend en daarmee word ook 'n laer melksuurproduksie en dus 'n hoër eind-pH (3,95 teenoor 3,6) gevind (Reuter, 1970b).

Die atipiese groep word ook onderskei deur 'n ander suikerfermentasiepatroon as die tipiese streptobakterieë (Reuter, 1967). Die getalle waarin dié atipiese streptobakterieë in vleisprodukte voorgekom het, was hoër, soms 2 tot 3 log-eenhede, as die tipiese groep (Reuter, 1967; Kagermeier, 1981). In vakuumverpakte produkte wat hy ondersoek het, berig Reuter (1975) dat die getalle by die atipiese groep 8,2 was teenoor 6,6 logs per g by die tipiese streptobakterieë.

Reuter (1967, 1970a) het die atipiese groep in biogroepe verdeel, op grond van 'n groot aantal fisiologiese eienskappe. Volgens hom is die fermentasie van pentoses van groot belang en kan dit (veral arabinose) as onderskeidende kenmerk gebruik word. Hy het een van sy biogroepe (C) onder die spesie *L. curvatus* ingedeel. Vir die klassifikasie van hierdie belangrike, maar onklassifiseerbare groep as geheel, is egter na geen nuwe of bestaande spesies verwys nie, veral omdat genotipiese informasie nie beskikbaar was nie.

Die atipiese streptobakterieë word steeds as die dominante groep onder die lactobacilli in vakuumverpakte en ander vleisprodukte gevind (Shaw en Harding, 1984). Ongelukkig is telkens van verskillende identifikasietoetse en -sisteme gebruik gemaak, asook 'n onvoldoende aantal toetse deur sommige werkers, sodat die atipiese streptobakterieë van verskillende werkers nie vergelykbaar is nie. Algemene eienskappe van hierdie groep is deur Reuter (1975) beskryf. Slegs *L. curvatus* is as erkende spesie onder die groep gevind (Reuter, 1970a). Hierdie spesie is oorspronklik deur Abo-Elnaga en Kandler (1965) beskryf en is geïsoleer uit habitats soos die lug in stalle en uit mis.

*L. sake* is oorspronklik deur Katagiri et al. (1934) beskryf en hoort waarskynlik ook tuis onder die atipiese streptobakterieë. Dit is by sake-bereiding geïsoleer. Baie min eienskappe van hierdie organisme is egter deur die outeurs beskryf, en die spesie is nie erken in die agtste uitgawe van Bergey's Manual of Determinative Bacteriology nie (Buchanan en Gibbons, 1974). Spesiestatus is eers in 1980 aan hierdie organisme toegeken in die "Approved List of Bacterial Names" (Skerman et al., 1980).

Die onderskeiding tussen *L. curvatus* en *L. sake* word getref op grond van die selmorfologie en suikerfermentasie. By *L. curvatus* word sterk gekromde en soms kokkoïde, effens onreëlmatige stafies aangetref wat in gedraaide, gekromde kettings kan voorkom. Sulke gedraaide kettings word ook by *L. sake* aangetref, hoewel die sterk neiging tot kromming nie by hierdie spesie aanwesig is nie. Die fermentasie van melibiose, maltose, sukrose, trehalose en arabinose dien hoofsaaklik as maatstaf van onderskeiding tussen hierdie twee spesies (Kagermeier, 1981). Die "tipiese" fermentasiepatroon van hierdie twee spesies word t.o.v. hierdie suikers in Tabel 4.27 uiteengesit.

Die werk van Kagermeier (1981) dui daarop dat die elektroforetiese eienskappe van die LDH-isoëieme nie as betroubare maatstaf gebruik kan word om *L. sake* van *L. curvatus* te onderskei nie. Dieselfde ooreenstemming word gevind t.o.v. die mol % G+C-inhoud in die DNA van die twee spesies. Die ooreenstemmende eienskappe by *L. curvatus* en *L. sake* t.o.v. die elektroforetiese beweeglikheid en mol % G+C-inhoud word in Tabel 4.28 gegee.

Hibridisasie-ondersoeke kan wel van waarde wees by die onderskeiding tussen hierdie twee spesies, maar die hoeveelheid werk en spesifieke probleme hieraan verbonde, maak dit onprakties vir roetine-ondersoeke.

TABEL 4.27 VOORGESTELDE SLEUTELMAATSTAWWE VIR DIE  
ONDESKIEDING VAN *L. CURVATUS* EN *L. SAKE*  
(IN OOREENSTEMMING MET BUCHANAN EN  
GIBBONS, 1974; KAGERMEIER, 1981)

Fermentasie van	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sake</i>
Melibiose	-	+
Maltose	+	-
Sukrose	-	+
Trehalose	-	+
Arabinose	-	+

TABEL 4.28 EIENSKAPPE VAN *L. CURVATUS* EN *L. SAKE* WAT OOREENSTEM (FISIOLOGIESE EIENSKAPPE UITGESLUIT) (VOLGENS KAGERMEIER, 1981)

Eienskap	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sake</i>
mol % G+C	43,9	42,2
melksuurkonfigurasië	DL-	DL-
Relatiewe elektroforetiese beweeglikheid: L - LDH	1,60 - 1,64	1,60
D - LDH	1,20	1,20

Voorts dui die relatief hoë persentasie DNA-homologie (40-50%) op 'n moontlike verwantskap tussen hierdie spesies.

Kagermeier (1981) het ook gevind dat die atipiese streptobakterieë hoofsaaklik uit die twee genoemde spesies bestaan, maar dat 'n groot aantal verskille ook binne elke spesie voorkom. Sy het die eienskappe wat in Tabel 4.27 genoem is, vir onderskeiding gebruik, maar ook beweer dat 'n absolute afbakening van spesies m.b.v. dié eienskappe nie moontlik is nie. Die moontlikheid van oorvleuelende "*sake/curvatus*"-groepe word genoem. Elk van hierdie spesies blyk dus op sigself heterogeen te wees. So kan bv. maltose-fermentasie soms wel by *L. sake* aangetref word, soos gesien kan word volgens die indeling in Tabel 4.29.

Met verwysing na die oorspronklike beskrywing van *L. curvatus* (Abo-Elnaga en Kandler, 1965) kan die morfologie egter as 'n waardevolle, bykomende maatstaf vir die onderskeiding van die twee spesies gebruik word. Op grond van sy kenmerkende gekromde voorkoms kan *L. curvatus* (kyk Fig. 4.17) met redelike sekerheid van *L. sake* onderskei word (kyk Fig. 4.18). Twyfel omtrent klassifikasie op grond van "atipiese" suikerfermentasiepatrone kan dus vir dié spesies met behulp van hul morfologiese eienskappe uit die weg geruim word.

Die 402 isolate wat ondersoek is, is m.b.v. die eienskappe in Tabel 4.30 in twee "spesiegroepe" verdeel. *L. sake* maak die grootste groep, nl. 322 isolate (80%) uit met 80 isolate (20%) as die *L. curvatus*-groep.

Dit is egter gevind dat daar variasie binne elke spesie bestaan t.o.v. die fermentasie van die vyf suikers wat in Tabel 4.27 genoem word, asook die

TABEL 4.29 BIOGROEPE VAN *L. CURVATUS* EN *L. SAKE* SOOS BEPAAL DEUR DIE FERMENTASIE VAN MELIBIOSE, MALTOSE, SUKROSE, TREHALOSE EN ARABINOSE. DIE EIENSKAPPE VAN OUTENTIEKE STAMME WORD OOK GEGEE

Spesie	Biogroep	Aantal isolate	Suikerfermentasie				
			Melibiose	Maltose	Sukrose	Trehalose	Arabinose
<i>L. curvatus</i>	I	17	-	+	-	-	-
	II	30	-	+	+	+	-
	III	2	-	+	-	+	-
	IV	15	-	+	+	-	-
	V	12	-	+	+	+	+
	VI	3	-	-	+	-	-
	VII	1	-	-	-	-	-
	Outentieke spesie			-	+	-	-*
<i>L. sake</i>	I	114	+	-	+	+	
	II	136	+	+	+	+	
	III	37	+	-	+	-	
	IV	2	+	+	+	-	
	V	13	-	-	+	+	
	Outentieke spesie			+	-	+	+

\* Negatiewe reaksie by ca. 75% isolate



TABEL 4.30 FISILOGIESE EIENSAPPE VAN DIE DL-MELKSURVORMENDE STREPTOBACTERIEË EN DIE BIOGROEPE WAT BY ELKE SPESIE ONDERSKEI WORD

Identifikasie en Biogroepe	Aantal isolate	Fisiologiese Toetse																																		
		Melibiose	Maltose	Sukrose	Trehalose	Arabinose	Groei by 4°C	Amigdalien	Gas uit sellobiose	Suur uit sellobiose	Eskulien	Fruktose	Galaktose	Gas uit glukonaat	Suur uit glukonaat	Inositol	Inullien	Laktose	Malaat	Mannitol	Mannose	Melezitose	$\alpha$ -Mettielglikosied	Raffinose	Salsien	Sorbitol	Stysel	Ramnose	Xilose	NH <sub>3</sub> uit arginien	Groei by 10% NaCl	Groei by pH 3,9	Slymvorming	Beweeglikheid	Finale pH	
<i>L. curvatus</i>																																				
I	17	-*	+	-	-	-	50	41,2	0	82,4	76,5	100	94	0	11,8	0	0	17,6	88,2	0	100	0	5,9	0	64,7	5,9	5,9	0	23,5	5,9	29,4	5,9	0	35,3	4,18	
II	30	-	+	+	+	-	65,5	16,7	0	40	80	100	100	6,7	26,7	0	10	26,7	93,3	0	96,7	0	46,7	0	90	0	3,3	3,3	10	0	30	23,3	3,3	17,9	4,13	
III	2	-	+	-	+	-	0	50	0	50	100	100	100	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	50	0	0	0	50	0	0	0	4,34	
IV	15	-	+	+	-	-	46,7	80	0	93,3	86,7	100	100	0	0	0	6,7	53,3	100	0	100	0	40	6,7	80	0	6,7	6,7	6,7	0	13,3	13,3	20	20	4,11	
V	12	-	+	+	+	+	83,3	83,3	0	91,7	41,7	100	100	16,7	66,7	0	8,3	58,3	100	0	100	0	8,3	0	100	0	0	8,3	0	16,7	25	66,7	0	0	4,09	
VI	3	-	-	+	-	+	100	100	0	66,7	33,3	100	100	0	66,7	0	0	0	100	0	100	0	33,3	0	66,7	0	0	0	33,3	0	0	0	0	0	4,24	
VII	1	-	-	-	-	-	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	3,92
<i>L. sake</i>																																				
I	125	+	-	+	+	9,6	64,9	4,0	0	31,6	27	100	100	20	90,4	0,88	0	20,8	89,6	0,88	80	0,88	5,6	6,1	60,8	0	0,88	4,4	2,4	0,88	30,4	42,4	10,4	0	4,09	
II	145	+	+	+	+	49	67,6	14,5	1,4	53,1	71,7	93,4	98,5	26,9	96,6	1,5	17,2	49	95,9	1,5	96,6	1,5	29,7	16,6	90,3	1,4	1,5	2,2	4,8	0	46,2	63,4	2,1	0,69	3,93	
III	37	+	-	+	-	43,2	46	81,1	0	33	70,2	100	100	18,9	89,2	0	0	13,5	83,8	0	78,4	0	5,4	2,7	94,6	2,7	0	2,7	2,7	10,8	29,7	21,6	13,5	0	4,18	
IV	2	+	+	+	-	50	50	100	0	100	50	100	100	0	50	50	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	50	0	0	0	4,16	
V	13	-	-	+	+	2,1	76,9	15,4	0	15,4	38,5	100	100	23,1	100	0	0	15,4	100	0	100	0	23,1	0	38,5	0	0	0	0	7,7	53,9	30,8	0	0	4,31	

\* + : 100% positiewe reaksies

\*\* - : 100% negatiewe reaksies

\*\* Verwys na % van die isolate wat positiewe reaksies toon, en die gemiddelde eind-pH-waarde.

100% positiewe reaksies: Fermentasie van ribose, DL-melksuur, groei by 15°C.

0% positiewe reaksies: Katalase-aktiwiteit, gasvorming uit glukose, groei by 45°C,  $\bar{m} - A_2pm$  in die selwand, nitraatreduksie, gelatinase-aktiwiteit.

meeste ander eienskappe en die seleksie wat uit dié eienskappe gemaak word om as klassifikasiemaatstawwe te dien, maak die bestaande sisteem dus arbitrêr.

In Tabel 4.29 word *L. sake* en *L. curvatus* onderskeidelik in vyf en sewe biogroepe verdeel. Die eienskappe van die outentieke spesies soos uit die literatuur verkry, word ook bygevoeg. Al die ander fisiologiese eienskappe wat vir hierdie twee spesies bepaal is, word gegee as die persentasie van isolate wat positief was t.o.v. 'n spesifieke eienskap.

Die twee spesies verskil dus hoofsaaklik in die fermentasie van melibiose, maltose, sukrose en trehalose, terwyl daar vir die ander suikers 'n wye spektrum van moontlikhede bestaan. Groot verskille in eskulien-splitsing, groei by pH 3,9, gasvorming uit glukonaat, en fermentasie van glukonaat, raffinose, xilose en arabinose het voorgekom. Slymvorming is by 26% van die *L. sake*-isolate gevind (vergeleke met 46% van die isolate van Shaw en Harding, 1984). Terwyl 18% van die stamme by die *L. curvatus*-groepe beweeglik was, het beweeglikheid prakties nie by *L. sake*-groepe of enige ander isolate (L(+)-laktaatvormers, ens.) voorgekom nie.

In ooreenstemming met die beskrywing van Reuter (1975) vir die "atipiese" streptobakterieë toon die grootste persentasie van die *L. sake/L. curvatus*-isolate in hierdie ondersoek 'n psigrotrofe aard deur hul groeivermoë by 4°C. Reuter (1975) het ook die atipiese groep as minder suurbestand beskryf op grond van hul onvermoë om by pH 3,9 te groei. Ongeveer 63% van die *L. sake/L. curvatus*-isolate in hierdie ondersoek het nie by pH 3,9 gegroei nie. Dit bly egter 'n wesentlike probleem om die biogroepe A, B en C van Reuter (1975) met erkende DL-melksuurvormende spesies soos *L. curvatus* en *L. sake* in verband te bring.

Indien slegs die fermentasie van melibiose en maltose beskou word, is dit moeilik om te bepaal watter biogroepe van die twee spesies in Tabel 4.29 as "*sake/curvatus*"-oorgangsgroepe beskou kan word, en veral hier sal die morfologiese eienskappe as belangrike maatstaf geld.

Shaw en Harding (1984) het numeriese taksonomie gebruik om *Streptobacterium*-isolate vir vleismonsters in twee groot groepe te verdeel. Ter klassifikasie is voorgestel dat dit onderskeidelik onder *L. sake* en 'n nuwe spesie van die atipiese streptobakterieë tuis hoort. *L. curvatus* word egter nie deur hulle as 'n atipiese streptobacterium beskou nie. Die fermentasie van veral mannitol, sorbitol, raffinose, ribose en sukrose (maar nie maltose of melibiose nie) is as maatstawwe gebruik.

Indien hierdie vyf suikers as maatstaf gebruik sou word om die 402 DL-melksuurvormende isolate van hierdie ondersoek te sistematiseer, kom tien van die biogroepe in Tabel 4.29 ooreen met *L. sake* of die groep I van Shaw en Harding (1984), en twee biogroepe met *L. curvatus* (kyk Tabel 4.31). *L. curvatus* verskil volgens Shaw en Harding (1984) van *L. sake* slegs in die fermentasie van sukrose, en die onderskeid tussen die twee spesies word dus baie moeilik. Isolate wat met *L. sake* en die "nuwe" spesie ooreenkom, sal op grond van hul mol % G+C-inhoud in die DNA onderskei moet word.

In hul publikasie maak Shaw en Harding (1984) ook melding van die groot mate van ooreenkoms wat bestaan tussen *L. sake* en *L. bavariensis* t.o.v. morfologie, suikerfermentasiepatroon en mol % G+C-inhoud. *L. bavariensis* vorm egter L(+)-melksuur in teenstelling met die DL-melksuur by *L. sake*. L(+)-melksuurvormende isolate (<10%), is ook in hul groep II gevind en kom ooreen met die eienskappe van *L. bavariensis* soos beskryf deur

TABEL 4.31 KLASSIFIKASIE VAN DIE DL-MELKSUURVORMENDE STREPTOBAKTERIEË M.B.V. DIE VYF MAATSTAWWE WAT DEUR SHAW EN HARDING (1984) GEBRUIK IS

	Fermentasie					Finale pH < 4,15	mol % G+C
	Mannitol	Sorbitol	Raffinose	Ribose	Sukrose		
<i>L. sake</i> *	-	-	-	+	+		42
<i>L. curvatus</i> *	-	-	-	+	-		43,9
Nuwe spesies van Groep I*	+	-	-	+	+	-	33,2 - 36,9
<i>L. sake</i> -tipe spesies van Groep II*	-	-	-	+	+	+	40,7 - 43,7
Isolate van hierdie ondersoek							
<i>L. curvatus</i> -tipe isolate:							
Groep I	-	-	-	+	-	-	
II	-	-	-	+	+	+	
III	-	-	-	+	+	-	
IV	-	-	-	+	+	+	
V	-	-	-	+	+	+	
VI	-	-	-	+	+	-	
VII	-	-	-	+	-	+	
<i>L. sake</i> -tipe isolate:							
Groep I	-	-	-	+	+	+	
II	-	-	-	+	+	+	
III	-	-	-	+	+	-	
IV	-	-	-	+	+	-	
V	-	-	-	+	+	-	

\*Shaw en Harding (1984).

Stetter en Stetter (1980), asook met die betrokke L(+)-laktaatvormende isolate in hierdie ondersoek (kyk 4.4.2.2).

Dieselfde arbitrêre sisteem van klassifikasie wat die absolute onderskeiding tussen *L. sake* en *L. curvatus* bemoeilik, word ook t.o.v. ander *Lactobacillus*-spesies gebruik. DNA-basissamestelling en selwand-aminosuursamestellings kan by sommige van hierdie groepe as bevestigende maatstaf dien en geld in sommige gevalle as die deurslaggewende onderskeidingskenmerke. Die suikerfermentasiereeks word egter nog in die meeste gevalle aangewend vir algemene onderskeiding tussen spesies.

'n Verdere probleem wat nog opgeklaar moet word, is die teenwoordigheid van plasmiede in die lactobacilli en die eienskappe wat hierop gedra word. So is in die verlede al vasgestel dat die eienskap van laktosefermentasie by melksuurstreptococci op 'n plasmied geleë is (Kempler en McKay, 1979). Indien kennis beskikbaar is omtrent ander eienskappe waarvoor op die plasmiede gekodeer word, kan eienskappe uitgekies word waarvoor in die chromosoom self gekodeer is. Sodoende sal maatstawwe soos suikerfermentasiepatrone met 'n groter mate van betroubaarheid vir die onderskeiding van afsonderlike taksons gebruik kan word.

Ander identifisiemetodes wat moontlik aangewend kan word om 'n verantwoordbare fenetiese klassifikasiesisteem vir *L. sake* en *L. curvatus*, en moontlik ook vir ander *Lactobacillus*-groepe, daar te stel, is oorweeg.

Poli-akrielamiedgelelektroforese van die proteïene in die sel en/of selwand is al aangewend in die identifikasie van verskeie organismes of groepe organismes. Die beginsel van hierdie tegniek, asook die aanwending van numeriese taksonomie in hierdie verband,

word deur Kersters en De Ley (1974) uiteengesit. Dit is 'n sisteem wat vir die onderskeiding van spesies binne talle bakteriegroepe van groot waarde behoort te wees. Ander navorsers het reeds hierdie klassifikasie metode gebruik in die sistematisering van die volgende organismes:

*Campylobacter* (Morris en Park, 1973; Hanna et al., 1983), *Mycoplasma* (Razin en Rottem, 1967), *Brucella* (Morris, 1973), *Mycobacterium* (Haas et al., 1972), *Corynebacterium* (Larsen et al., 1971) en die groep D Streptococci (Lund, 1965), asook by die algemene identifikasie van bakterieë vanaf tandvleis deur Moore et al. (1980).

Voorlopige werk is reeds m.b.v. die metode in hierdie ondersoek gedoen as 'n poging tot die onderskeiding tussen *L. curvatus* en *L. sake*. Aangesien 'n outentieke *L. sake*-stam nie beskikbaar was nie, kon geen definitiewe resultate m.b.t. hierdie twee organismes verkry word nie. Dit kom egter voor of die metode wel goeie moontlikhede inhou as hulpmiddel vir die klassifikasie en onderskeiding van die twee spesies.

Shaw en Harding (1984) het numeriese taksonomie gebruik in die identifikasie van melksuurbakterieë uit vakuumverpakte rou vleis. Die meeste algemene fisiologiese eienskappe van hul isolate is vir taksonomiese doeleindes m.b.v. die API 50-sisteem (vir identifikasie van *Lactobacillus*-spesies) bepaal.

'n Nuwe tegniek wat ontwikkel is, behels elektroforese van DNA-fraksies wat met restriksie-ensieme verkry is. Die ooreenstemming van basispare in verskillende organismes se genome word hierdeur bepaal.

*Lactobacillus helveticus* en *Lactobacillus jugurti* is reeds m.b.v. hierdie tegniek getoets (Manachini en Parini, 1983), en dit hou waarskynlik ook moontlikhede in vir onderskeiding van *L. sake* en *L. curvatus*.

Faagtipering, asook DNA : DNA-hibridasietegnieke is verdere spesifieke tegnieke wat aangewend kan word vir identifikasie- en klassifikasie doeleindes; veral die laasgenoemde tegniek lewer egter praktiese probleme indien dit op roetinebasis uitgevoer moet word.

Opsommende beskrywing van die DL-melksuurvormende streptobakterieë wat nie  $m - A_2pm$  in die selwande het nie

Morfologie (48h by 25°C op MRS-plate; anaërobe inkubasie):

Kolonies: Ronde, plat tot effens konvekse kolonies wat roomwit en soms deurskynend was. Die deursnit wissel van speldpuntgrootte tot ca. 2 mm en die oppervlak was glad en blink.

- Morfologie: 1) Kort stafies wat enkeld, in pare of kort kettings voorgekom het, asook in aggregate (vermoedelik *L. sake*).
- 2) Kort, gekromde stafies wat meestal in pare en gedraaide, onreëlmatige kettings voorgekom het en soms aggregate gevorm het (vermoedelik *L. curvatus*).
- 3) Verlengde selle wat dikwels onreëlmstig gebuig en gekrom was, is by die meeste isolate aangetref.

Fisiologie: Die 402 isolate is almal katalase-negatief, Grampositief, vorm DL-melksuur uit glukose maar geen gas nie, besit geen  $m - A_2pm$  in die selwand nie en groei nie by 45°C nie. Ammoniak is deur 'n klein aantal isolate uit arginien gevorm (9 isolate) terwyl 25 isolate slym uit sukrose gevorm het en 16 isolate beweeglikheid getoon het. Vyftien van hierdie isolate is as *L. curvatus* geklassifiseer. Die eind-pH van 63% (256)

van die kulture ná 4 dae was nog steeds >4,0, terwyl 215 isolate (ca. 53%) by 4°C gegroei het. M.b.v. hul morfologie en ander fisiologiese toetse, veral die fermentasie van melibiose, maltose, sukrose, trehalose en arabinose, kon 80 isolate as *L. curvatus* en 322 isolate as *L. sake* geïdentifiseer word. By die *L. curvatus*-groep word sewe biogroepe onderskei op grond van hul reaksie t.o.v. die vyf suikers, en by die *L. sake*-groep vyf biogroepe. Groot variasie van eienskappe binne die spesies en selfs binne elke biogroep is opvallend.

(Kyk Tabel 16 van die Bylae.)



## HOOFSTUK 5 : GEVOLGTREKKINGS

1. Uit 'n totaal van 538 verteenwoordigende bakterie-isolate uit vakuümverpakte vleisprodukte sowel as eksudaat, was 63 stamme katalase-positief. Hierdie "minder belangrike" groep katalase-positiewe organismes is hoofsaaklik deur coryneforme tipes verteenwoordig.
2. Alle katalase-negatiewe isolate kon as melksuurbakterieë geïdentifiseer word. Slegs 21 (4,42%) stamme van die melksuurbakterieë was heterofermentierend. Daarvan is 15 as leuconostocs (hoofsaaklik *L. mesenteroides*) en 4 as heterofermentatiewe (betabakterieë) geïdentifiseer.
3. Teen die verwagting in, kom dit voor of heterofermentatiewe melksuurbakterieë slegs 'n geringe rol in die bederfpatroon van die betrokke produkte speel. Voorts is ook geen voorbeelde van L(+)-laktaatvormende betabakterieë of selfs *L. viridescens* gevind nie.
4. Onder die 29 stamme van L(+)-laktaatvormende homofermentatiewe lactobacilli kon 28 as *L. bavaricus* geïdentifiseer word. Die assosiasie van hierdie spesie met vleisprodukte is nog nie voorheen aangetoon nie.
5. Ook *L. plantarum* skyn 'n mindere rol in die bederfpatroon van die betrokke produkte te speel en slegs 18 stamme van hierdie spesie (3,8% van die melksuurbakterieë) is geïsoleer; 14 van hierdie stamme kon nitraat reduseer.
6. Probleme is ondervind met die klassifikasie van die D(-)-laktaatvormende streptobakterieë. Hierdie klein groep van slegs vyf stamme behoort waarskynlik tot die spesie *L. homohiochii*.
7. Die grootste persentasie van die homofermentatiewe melksuurbakterieë, het DL-melksuur gevorm. Uit die literatuur blyk dit dat die grootste groep melksuurbakterieë

wat uit vakuumverpakte vleisprodukte geïsoleer word, uit lede van die groep atipiese streptobakterieë bestaan, en wel *L. curvatus*, *L. sake* en ook moontlike nuwe spesies.

Op grond van die morfologie van die isolate en hul fisiologiese eienskappe wat in hierdie ondersoek bepaal is, en meer spesifiek die fermentasie van melibiose, maltose, sukrose, trehalose en arabinose, blyk dit dat die groep waarskynlik saamgestel is uit *L. sake* (80%) en *L. curvatus* (20%). Die isolate wat met *L. sake* ooreenstem, kon in vyf biogroepe onderverdeel word, en die *L. curvatus*-isolate in sewe biogroepe. Van die *L. curvatus*-isolate was 15 beweeglik wat 'n uitsonderlike eienskap onder die lactobacilli is.

Op grond van tekortkomings in die bestaande fenetiese klassifikasiesisteen, moet tans nog aanvaar word dat daar moontlike "*sake/curvatus*-oorgangsgroepe" bestaan.

8. Moontlike tegnieke wat aangewend kan word om 'n meer verantwoordbare klassifikasiesisteen vir die melksuurbakterieë (en veral vir die "atipiese streptobakterieë") daar te stel, word genoem. Hierdie tegnieke behels numeriese taksonomie n.a.v. poli-akrielamiedgelelektroforese van die selproteïene, numeriese taksonomie van fisiologiese eienskappe, elektroforese van DNA-fraksies om die opeenvolging van basispare van verskillende organismes se genome te vergelyk, faagtipering en DNA:DNA-hibridisasie.

## HOOFSTUK 6 : VERWYSINGS

ABO-ELNAGA, I.G. en KANDLER, O., 1965. Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. I. Das Subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. Zbl. Bakt. Hyg., II. 119, 1-36.

ALLEN, J.R. en FOSTER, E.M., 1960. Spoilage of vacuum-packed sliced processed meats during refrigerated storage. Food Res. 25, 19-25.

ALM, F., ERICHSEN, I. en MOLIN, N., 1961. The effect of vacuum packaging on some sliced processed meat products as judged by organoleptic and bacteriologic analysis. Food Technol. 15, 199-203.

BERGMEYER, H.U., 1965. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York and London.

BROWNLIE, L.E., 1969. Effect of some environmental factors on the growth of *Microbacterium thermosphactum*. M.Sc.-verhandeling, Sydney Universiteit, Australië.

BUCHANAN, R.E. en GIBBONS, N.E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. Baltimore : The Williams and Wilkens Co.

CAVETT, J.J., 1963. A diagnostic key for identifying the lactic acid bacteria of vacuum packed bacon. J. appl. Bact. 26, 453-470.

COLLINS-THOMPSON, D.L. en LOPEZ, G.R., 1980. Influence of sodium nitrite, temperature and lactic acid bacteria on the growth of *Brochothrix thermosphacta* under anaerobic conditions. Can. J. Microbiol. 26, 1416-1421.

- COLLINS-THOMPSON, D.L. en RODRIGUEZ-LOPEZ, G., 1981. Depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed Bologna. *J. Food Prot.* 44, 593-595.
- DAVIS, J.G., 1975. IV.2 The microbiology of yoghurt. In: Lactic acid bacteria in beverages and food. (Eds.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting.) Academic Press, London.
- DEIBEL, R.H. en NIVEN, C.F., 1958. Microbiology of meat curing. The occurrence and significance of a motile micro-organism of the genus *Lactobacillus* in ham curing brines. *Appl. Microbiol.* 6, 323-327.
- DE LEY, J., 1970. Re-examination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bact.* 101, 738-754.
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M. en SHARPE, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.* 23, 130-135.
- DUIJSCHAEVER, C.L., 1977. Bacteriological evaluation of luncheon meats in the Canadian retail market. *J. Food Prot.* 40, 382-384.
- DUIJSCHAEVER, C.L., 1978. Bacteriological evaluation of frankfurters in the Canadian retail market. *J. Food Prot.* 41, 770-774.
- EGAN, A.F., FORD, A.L. en SHAY, B.J., 1980. A comparison of *Microbacterium thermosphactum* and lactobacilli as spoilage organisms of vacuum-packaged sliced luncheon meats. *J. Food Sci.* 45, 1745-1748.
- FIDDLER, W., PIOTROWSKI, E.G., PENSABENE, J.W., DOERR, R.C. en WASSERMAN, A.E., 1972. Effect of sodium nitrite concentration on N-dinitrosodimethylamine formation in frankfurters. *J. Food Sci.* 37, 668-670.

FIDDLER, W., PENSABENE, J.W., KUSHNIR, I. en PIOTROWSKI, E.G., 1973. Research Note. Effect of frankfurter cure ingredients on n-nitrosodimethylamine formation in a model system. J. Food Sci. 38, 714-715.

FRUIN, J.T., FOSTER, J.F. en FOWLER, J.L., 1978. Survey of bacteriological populations of bologna products. J. Food Prot. 41, 692-695.

GARDNER, G.A., 1966. A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. J. appl. Bact. 29, 455-460.

GARVIE, E.I., ZEZALA, V. en HILL, V., 1974. Guanine plus cytosine content of the deoxyribonucleic acid of the leuconostocs and some heterofermentative lactobacilli. Int. J. system. Bact. 24, 248-251.

GEISTER, R.S. en MAACK, A.C., 1967. Sanitation in meat and poultry processing plants. J. Milk Food Technol. 30, 67-70.

GRAU, F.H., 1980. Inhibition of the anaerobic growth of *Brochothrix thermosphacta* by lactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 40, 433-436.

GRAY, J.I. en RANDALL, C.J., 1979. The nitrite/n-nitrosamine problem in meats: an update. J. Food Prot. 42, 168-179.

HAAS, H., DAVIDSON. Y. en SACKS, T., 1972. Taxonomy of Mycobacteria studies by polyacrylamide-gel eletrophoresis of cell proteins. J. med. Microbiol. 5, 31-37.

HALLERBACH, C.M. en POTTER, N.N., 1981. Effects of nitrite and sorbate on bacterial populations in frankfurters and Thuringer cervelat. J. Food Prot. 44, 341-346.

HANDBOOK : CULTURE MEDIA (Merck)., 1982.

HANNA, J., NEILL, S.D., O'BRIEN, J.J. en ELLIS, W.A., 1983. Comparison of aerotolerant and reference strains of *Campylobacter* species by polyacrymide gel electrophoresis. *Int. J. syst. Bact.* 33, 143-146.

HARPER, J.J. en DAVIS, G.H.G., 1979. Two-dimensional thin-layer chromatography for amino-acid analysis of bacterial cell walls. *Int. J. syst. Bact.* 29, 56-58.

HARRIGAN, W.F. en McCANCE, M.E., 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. London, New York, San Francisco : Academic Press.

HEISZLER, M.G., KRAFT, A.A., REY, C.R. en RUST, R.E., 1972. Effect of time and temperature of smoking on microorganisms on frankfurters. *J. Food Sci.* 37, 845-849.

HILL, W.M., REAUME, J. en WILCOX, J.C., 1976. Total plate count and sensory evaluation as measures of luncheon meat shelf life. *J. Milk Food Technol.* 39, 759-762.

HITCHENER, B.J., EGAN, A.F. en ROGERS, P.J., 1982. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *J. appl. Bact.* 52, 31-37.

HOBBS, B., 1967. In: 'Quality Control in the Food Industry', vol. I. (Ed.: S.M. Herschdoerper.) Academic Press, London.

HOHORST, H.J., 1970. L(+)-Lactat: Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Ed.: H.U. Bergmeyer). 2nd Ed. Verlag Chemie, Weinheim.

HOLZAPFEL, W.H., 1969. Aminosäuresequenz des Mureins und Taxonomie der Gattung *Leuconostoc*. Proefskrif. Technischen Hochschule, München.

HOLZAPFEL, W.H. en GERBER, E.S., 1983. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+)-lactate. *System. Appl. Microbiol.* 4, 522-534.

HOLZAPFEL, W.H. en VAN WYK, E.P., 1982. *Lactobacillus kandleri* sp. nov., a new species of the subgenus *Betabacterium*, with glycine in the peptidoglycan. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3, 495-502.

INGRAM, M., 1962. Microbiological principles in prepacking meats. J. appl. Bact. 25, 259-281.

KAGERMEIER, A., 1981. Taxonomic und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten. Proefskrif, Ludwig-Maximilians-Universiteit, München.

KATAGIRI, H., KITAHARA, K. en FUKAMI, K., 1934. The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mashes for sake manufacture. Bull. agric. Chem. Soc. Japan 10, 156-157.

KEDDIE, R.M., 1959. The properties and classification of lactobacilli isolated from grass and silage. J. appl. Bact. 22, 403-416.

KEMPLER, G.M. en MCKAY, L.L., 1979. Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* : Evidence for plasmid-linked citrate utilization. Appl. Environ. Microbiol. 37, 316-323.

KEMPTON, A.G. en BOBIER, S.R., 1970. Bacterial growth in refrigerated, vacuum-packed luncheon meats. Can. J. Microbiol. 16, 287-297.

KERSTERS, K. en DE LEY, J., 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. J. gen. Microbiol. 87, 333-342.

KITCHELL, A.G. en SHAW, B.G., 1975. Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. In: Lactic acid bacteria in beverages and food. (Eds.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting) Academic Press, London.

KOCH, H., 1978. Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren. Verlagshaus Sponholz, Frankfurt am Main 16. Auflage.

LARSEN, S.A., BICKHAM, S.T., BUCHANAN, T., en JONES, W.L., 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Corynebacterium diphtheriae* : a possible epidemiological aid. Appl. Microbiol. 22, 885-890.

LEE, K.S. en DRESCHER, D.G., 1978. Fluorometric amino acid analysis with o-phthaldialdehyde (OPA). Int. J. Biochem. 9, 457-467.

LEISTNER, L., BEM Z., DRESEL, J. en PROMEUSCHEL, S., 1981. Mikrobiologische Standards für Fleisch. Aus dem Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach.

LIN, H-S. en SEBRANEK, J.G., 1979. Effect of sodium nitrate concentrations and packaging conditions on color stability and rancidity development in sliced bologna. J. Food Sci. 44, 1451-1454.

LUND, B., 1965. A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci. J. gen. Microbiol. 40, 413-419.

MANACHINI, P.L. en PARINI, C., 1983. DNA restriction endonuclease cleavage patterns, DNA-sequence similarity and phenotypical characteristics in some strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus jugurti*. Antonie van Leeuwenhoek 49, 143-152.

MANDEL, J. en MARMUR, J., 1968. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the Guanine plus Cytosine content of DNA. In: Methods in Enzymology 12 (B), 195-198 (Eds.: L. Grossman en K. Moldare). Academic Press Inc., New York.



MARMUR, J., 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. molec. Biol.* 3, 208-218.

McLEAN, R.A. en SULZBACHER, W.L., 1953. *Microbacterium thermosphactum*, spec. nov., a non-heat resistant bacterium from fresh pork sausage. *J. Bact.* 65, 428-433.

MILLER, W.A., 1961. The microbiology of some selfservice packaged luncheon meats. *J. Milk Food Technol.* 24, 374-377.

MITSOUKA, T., 1969. Vergleichende Untersuchungen über die Laktobazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern. *Zbl. Bakt. I. Org.* 210, 32-51.

MOL, J.H.H., HIETBRINK, J.E.A., MOLLEN, H.W.M. en VAN TINTEREN, J., 1971. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. *J. appl. Bact.* 34, 377-397.

MOORE, W.E.C., HASH, D.E., HOLDEMAN, L.V. en CATO, E.P., 1980. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 900-907.

MORRIS, J.A., 1973. The use of polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of *Bruceella*. *J. gen. Microbiol.* 76, 231-237.

MORRIS, J.A. en PARK, R.W.A., 1973. A comparison using gel electrophoresis of cell proteins of Campylobacters (Vibrios) associated with infertility, abortion and swine dysentery. *J. gen. Microbiol.* 78, 165-178.

NIELSEN, H.-J.S., 1983a. Composition of bacterial flora in sliced vacuumpacked Bologna-type sausage as influenced by nitrite. *J. Food Technol.* 18, 371-385.

NIELSEN, H.-J.S., 1983b. Influence of temperature and gas permeability of packaging film on development and composition of microbial flora in vacuum-packed Bologna-type sausage. *J. Food Prot.* 46, 693-698.

NIVEN, C.F., 1948. Causes of green ring spoilage in sausage products and how to avoid such trouble. *Natl. Provisioner* 119, 112.

NIVEN, C.F. en EVANS, J.B., 1957. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produce a green discoloration of cured meat pigments. *J. Bact.* 73, 758-759.

NIVEN, C.F., CASTELLANI, A.G. en ALLANSON, V., 1948. Association of lactic acid bacteria with sausage discolorations. *Soc. Am. Bacteriologists, Proc.*, p. 50.

NIVEN, C.F., CASTELLANI, A.G. en ALLANSON, V., 1949. A study of the lactic acid bacteria that cause surface discolorations of sausages. *J. Bact.* 58, 633-641.

NIVEN, C.F., SMILEY, K.L. en SKERMAN, J.M., 1942. The hydrolysis of arginine by Streptococci. *J. Bact.* 43, 651-660.

OBLINGER, J.L. en KENNEDY, J.E., 1980. Microbiological evaluation of selected delicatessen meats from retail supermarkets. *J. Food Prot.* 43, 530-533.

PARADIS, D.C. en STILES, M.E., 1978. A study of microbiological quality of vacuum packaged sliced Bologna. *J. Food Prot.* 41, 811-815.

PIVNICK, H. en BIRD, H., 1965. Toxinogenesis by *Clostridium botulinum* Types A and B in perishable cooked meats vacuum-packed in plastic pouches. *Food Technol.* 19, 132-140.

RAZIN, S. en ROTTEM, S., 1967. Identification of *Mycoplasma* and other microorganisms by polyacrylamide-gel electrophoresis of cell proteins. J. Bact. 94, 1807-1810.

REUTER, G., 1967. Atypische Streptobakterien als dominierende Flora in reifender und gelagerter Rohwurst. Die Fleischwirtschaft 4, 397-402.

REUTER, G., 1970a. Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillenstämme. Die Fleischwirtschaft 50, 954-962.

REUTER, G., 1970b. Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 3. Mitteilung: Abgrenzung der einzelnen Keimgruppen. Die Fleischwirtschaft 8, 1081-1084.

REUTER, G., 1971. Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 7. Mitteilung: Kohlenhydratstoffwechselprodukte und antagonistische Aktivitäten gegenüber saprophytären und enterotoxischen Mikroorganismen. Die Fleischwirtschaft 51, 1237-1242, 1245.

REUTER, G., 1975. III.3 Classification problems, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products. In: Lactic acid bacteria in beverages and food. (Eds.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.C. Whiting). Academic Press, London.

RHULAND, L.E., WORK, E., DENMAN, R.F. en HOARE, D.S., 1955. The behaviours of the isomers of  $\alpha \epsilon$ -diaminopimelic acid on paper chromatograms. J. Am. Chem. Soc. 77, 4844-4846.

RIEMANN, H., LEE, W.H. en GENIGEORGIS, C., 1972. Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-processed meat products. J. Milk Food Technol. 35, 514-523.

ROGOSA, M., MITCHELL, J.A. en WISEMAN, R.F., 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bact.* 62, 132.

ROTH, L.A. en CLARK, D.S., 1972. Studies on the bacterial flora of vacuum-packaged fresh beef. *Can. J. Microbiol.* 18, 1761-1766.

SHAW, B.G. en HARDING, C.D., 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuumpacked beef, pork, lamb and bacon. *J. appl. Bact.* 56, 25-40.

SCHLEIFER, K.H. en KANDLER, O., 1967. Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Streptococcus thermophilus* und *Streptococcus faecalis*. *Arch. Mikrobiol.* 57, 335-364.

SCHLEIFER, K.H. en KANDLER, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bact. Rev.* 36, 407-477.

SCHNEIDER, W., HILDEBRANDT, G. en SINELL, H.-J., 1983. D(-)-Lactat-Konzentration als Parameter für die Bewertung des Frischezustandes vorverpackter, hitzebehandelter Fleischerzeugnisse. *Fleischwirtschaft* 63, 1198-1205.

SHARPE, M.E., 1962. Lactobacilli in meat products. *Food Manuf.* 37, 582-584.

SHARPE, M.E., 1981. Section R. 131: The Genus *Lactobacillus*. In: *The Prokaryotes Vol. II.* (Eds: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel) Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.

SHARPE, M.E. en FRYER, T.F., 1965. Media for lactic acid bacteria. *Lab. Prac.* 14, 697-701.

- SHAY, B.J., GRAU, F.H., FORD, A.L., EGAN, A.F. en RATCLIFF, D., 1978. Microbiological quality and storage life of sliced vacuum-packed smallgoods. *Food Technol. in Australia* 30, 48-54.
- SIMARD, R.E., Lee, B.H., LALEYE, C.L. en HOLLEY, R. A., 1983. Effect of temperature, light and storage time on the microflora of vacuum- or nitrogen-packed frankfurters. *J. Food Prot.* 46, 199-205.
- SIMON, S., ELLIS, D.E., MacDONALD, B.B., MILLER, D.G., WALDMAN, R.C. en WESTERBERG, D.O., 1973. Influence of nitrite and nitrate curing ingredients on quality of packaged frankfurters. *J. Food Sci.* 38, 919-923.
- SINK, J.D. en Hsu, L.A., 1977. Chemical effects of smoke-processing on frankfurter manufacture and storage characteristics. *J. Food Sci.* 42, 1489-1491.
- SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V. en SNEATH, P.H.A., 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. syst. Bact.* 30, 225-420.
- STAMER, J.R., 1975. Recent developments in the fermentation of sauerkraut. In: *Lactic acid bacteria in beverages and foods.* (Eds.: J.G. Carr, C.V. Cutting, G.S. Whiting). Academic Press, London.
- STAMER, J.R. en STOYLA, B.O., 1967. Growth response of *Lactobacillus brevis* to aeration and organic catalysts. *Appl. Microbiol.* 15, 1025-1030.
- STEINKE, P.K.W. en FOSTER, E.M., 1951. Microbial changes in refrigerated liver sausage. *Food Res.* 16, 245-251.
- STEINKRAUS, K.H., 1983a. Progress in preservation of Food through fermentation. *Chemistry and World Supplies: The New Frontiers CHEMRAWN II.* (Ed.: L.W. Shemilt.) Pergamon Press.

STEINKRAUS, K.H., 1983b. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 337-348.

STETTER, K.O., 1973. Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäure-isomerenmischen bei Lactobacillen. Doktorale Verhandlung, Technische Universität, München.

STETTER, H. en STETTER, K.O., 1980. *Lactobacillus bavaricus* sp. nov., a new species of the subgenus *Streptobacterium*. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. C1*, 70-74.

SURKIEWICZ, B.F., JOHNSTON, R.W. en CAROSELLA, J.M., 1976. Bacteriological survey of frankfurters produced at establishments under Federal inspection. *J. Milk Food Technol.* 39, 7-9.

TEUBER, M. en GEIS, A., 1981. Section Q 129. The family Streptococcaceae (Nonmedical aspects) In: *The Prokaryotes Vol. II* (Eds: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel.) Springer-Verlag : Berlin, Heidelberg, New York.

THORNLEY, M.J. en SHARPE, M.E., 1959. Micro-organisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic sporeformers. *J. appl. Bact.* 22, 368-376.

WARNECKE, M.O., OCKERMAN, H.W., WEISER, H.H. en CAHILL, V.R., 1966. Quality of processed comminuted meat as affected by microbial flora of the raw constituents. *Food Technol.* 20, 686-688.

WHITTENBURY, R., 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. gen. Microbiol.* 35, 13-26.

## BYLAAG

TABEL 1      VERSPREIDING VAN PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS  
 OOR 'N pH-REEKS VAN 4 TOT 6

Monster		pH (aantal monsters)			
		4,1-4,5	4,6-5,0	5,1-5,5	5,6-6,0
Worse- en vleis	Weense worsies		5	5	
	Koue vleis			3	1
	Frankfurters		1	1	
	Russians			2	1
	Rookwors		1	1	
	"Country Sausage"				2
	Totaal		7	12	4
%		30	52	18	
Eksudaat	Weense worsies	2	7	1	
	Koue vleis		3	1	
	Frankfurters		1		
	Russians			3	
	Rookwors		1		
	"Country Sausage"			1	
	Totaal	2	12	6	
%	10	60	30		



TABEL 2 RESULTATE VAN TELLINGS VAN TOTALE AANTAL BAKTERIEË  
 OP STD-I-AGAR VAN DIE PRODUKMONSTERS  
 (INKUBASIE: 72h BY 30°C)

Produksmonsters (log tellings per g)							
Monster	Tellings in duplikaat			Monster	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
W1	8,04	7,71	7,72	W16	8,11	8,08	8,18
	7,65	6,7			8,29	8,29	
W2	6,7	6,7	7,04	W17	8,34	8,0	8,26
	7,25	7,19			8,35	8,27	
W3	6,3	7,75	7,75	W18	7,7	8,08	7,91
	7,94	7,6			7,97	7,76	
W4	6,26	6,62	6,56	W19	7,7	8,2	7,65
	6,75	6,4			7,7	7,57	
W5	6,9	7,52	7,63	W27	7,78	7,88	7,84
	7,48	7,14			7,9	7,85	
W6	8,56	8,63	8,36	W28	7,67	7,76	7,86
	8,68	8,69			7,96	7,88	
W7	7,95	8,0	7,90	W29	7,85	7,85	8,48
	7,96	7,85			7,79	7,96	
W8	7,89	7,64	8,0	W30	8,61	8,57	7,75
	8,08	8,3			8,56	8,63	
W9	7,85	7,99	7,75	W31	7,48	7,9	7,62
	7,71	7,78			7,7	7,76	
W10	7,9	7,85	7,45	W32	7,89	7,64	7,52
	7,59	7,61			7,0	7,7	
W11	7,61	7,8	7,76	W33	7,66	7,75	8,66
	7,78	7,7			7,69	7,6	
W13	6,3	6,85	8,72	W34	7,3	7,48	7,5
	7,38	7,38			7,53	7,57	
W14	7,78	7,38	7,60	W35	7,63	7,57	8,08
	7,86	7,9			8,0	8,0	
W15	7,7	7,73	8,4	W35	8,04	7,48	8,08
	8,86	8,40			8,7	8,9	
W15	7,6	7,48	7,60	W35	8,41	8,8	8,08
	7,78				8,51	8,63	
W15	8,58	8,2	8,4	W35	8,40	8,0	8,08
	8,05	8,54			8,0	8,0	
					8,02	8,05	
					7,83	8,28	

TABEL 3 RESULTATE VAN TELLINGS VAN TOTALE AANTAL BAKTERIEË OP STD-I-AGAR, VAN DIE EKSUDAAT-MONSTERS (INKUBASIE: 72h BY 30°C)

Eksudaatmonsters (log tellings per ml)							
Monster	Tellings in duplikaat			Monster	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
V3	9,56	9,7	9,6	V18	9,6	9,6	9,6
V4	8,6	8,0	8,2	V19	9,7	9,7	9,7
	7,9	7,9		V27	9,1	9,2	9,15
V5	9,1	9,1	9,04		9,1	9,2	
	8,8	9,1		V28	9,3	9,2	9,28
V6	>10,7	>10,7	>10,7	V29	9,1	9,1	9,0
V8	10,0	10,0	10,0		9,0	8,9	
V9	9,6	9,6	9,6	V30	9,8	9,9	9,8
V10	9,6	9,7	9,7	V31	9,6	9,4	9,5
V11	8,7	8,3	8,6	V32	9,9	10,0	9,98
	8,7	8,6		V34	10,2	10,2	10,1
V13	10,2	10,3	10,26		9,9	10,0	
V15	9,4	9,4	9,4	V35	10,4	10,4	10,3
V16	9,3	9,4	9,3		10,1	10,0	
V17	9,9	-	9,9				

TABEL 4 VERDELING VAN TOTALE TELLINGS VANAF STD-I-AGAR IN GROOTTEGROEPE BY PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS, ASOOK DIE FREKWENSIE WAARMEE DIT VOORKOM BY DIE VERSKILLENDE TIPES MONSTERS

Tipe Produk	Produkmonsters (log tellings/g)					Eksudaatmonsters (log telling/ml)					
	6,5-7	7-7,5	7,5-8	8-8,5	8,5-9	8-8,5	8,5-9	9-9,5	9,5-10	10-10,5	10,5-11
Weense worsies		1	5	3	1			4	4	1	1
Noenvleis		1	2	2	1		1	2		1	
Frankfurters			2						1		
"Russians"			3	1					3	1	
Rookwors	1		2			1			1		
"Country Sausage"			1	1						1	
Totaal	1	2	15	7	2	1	1	6	9	4	1
%	4	7	56	26	7	5	5	27	40	18	5

TABEL 5 RESULTATE VAN DIE TELLING VAN MELKSUURBAKTERIEË VANAF ASETAATAGAR NÁ 72h BY 30°C UIT DIE PRODUKMONSTERS

Produkmonsters (log tellings per g)									
Mon-ster	Tellings in duplikaat			Mon-ster	Tellings in duplikaat				
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.		
W1	8,4	8,1	8,08	W14	-	-	-		
	7,99	7,3			-	-			
W2	6,1	6,9	6,5	W16	6,5	-	6,6		
	6,4	6,3			6,6	-			
W3	7,8	8,0	7,7	W17	7,2	6,8	6,97		
	7,4	7,4			7,0	-			
W4	6,1	6,2	6,3	W18	4,7	-	4,7		
	6,2	6,4			6,1	-			
W5	7	7,5	7,4	W19	6,1	-	6,1		
	7,5	7,4			W27	7,3		7,0	7,1
	7,4	7,4				7,0		7,04	
W6	7,4	8,7	8,7	W28	7,1	7,04	5,5		
	8,7	8,7			5,2	5,6			
W7	7,95	7,7	7,7	W29	4,3	4,0	4,2		
	7,5	7,8			W30	7,0		6,3	6,4
	7,3	7,3				5,9		5,9	
W8	8,0	7,9	7,9	W31	6,1	-	6,8		
	7,9	7,7			W32	6,8		6,7	6,04
	7,8	7,4				6,3		6,1	
W9	7,95	7,0	7,6	W33	5,8	5,7	-		
	7,6	7,7			W34	-		-	-
	7,5	7,4				7,3		-	
W10	7,7	7,5	7,5	W35	-	-	-		
	7,4	7,7			W11	8,0		7,9	7,6
	7,3	7,2				7,5		7,4	
W11	8,0	7,9	7,6	W13	7,3	7,3	6,5		
	7,5	7,4			6,3	-			
	7,3	7,3			6,7	-			

TABEL 5a RESULTATE VAN TELLINGS VAN MELKSUURBAKTERIEË OP AA+Fr EN MRS-KS-AGAR NÁ 72h BY 30°C, VAN DIE PRODUKMONSTERS

AA+Fr				MRS-KS-agar			
Mon-ster	Tellings (logs per g)			Mon-ster	Tellings (logs per g)		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
W28	4,48	4,95	4,8	W28	7,95 7,9	7,8	7,9
W29	6,9 4,0	7,07	6,9	W29	9,3	8,9	9,1
				W30	7,3 7,6 7,4	8,0 7,7 7,3	7,6
				W31	7,3 6,7 6,9	6,9 6,7 6,1	6,8
				W32	7,2 6,8	7,0 6,7 8,0	6,99
				W33	8,5 8,1 7,9	8,0 8,4 8,04	8,2
				W34	8,7 8,7 8,6	8,6 8,6 8,6	8,7
				W35	8,5 8,3 8,2	8,5 8,3 8,3	8,3

TABEL 6      RESULTATE VAN DIE TELLINGS VAN MELKSUURBAKTERIEË  
 IN DIE EKSUDAATMONSTERS OP ASETAAT-AGAR NÁ 72h  
 BY 30°C

Eksudaatmonsters (log tellings per ml)							
Mon-ster	Tellings in duplikaat			Mon-ster	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
V3	9,4	9,5	9,4	V19	8,0	8,1	8,04
V4	8,5	8,6	8,5		7,7		
	8,4	8,4		V27	7,3	7,0	7,1
V5	8,8	9,0	8,9		7,04	7,04	
	8,7	8,9			7,1	7,04	
V6	10,4	10,2	10,3	V28	4,7	5,3	5,2
V8	9,8	9,5	9,7	V29	4,6	-	4,6
V9	9,5	9,5	9,4	V30	8,7	8,6	8,6
	9,1	9,1			8,6	8,6	
V10	9,1	9,3	8,99	V31	6,0	5,5	5,6
	8,6	8,5			5,3	5,5	
V11	8,6	8,6	8,5		5,2		
	8,3	8,3		V32	8,5	8,5	8,5
V13	-	-	-		8,6	8,5	
V15	5,1	4,7	4,95	V34	-	-	-
V16	4,0	-	4,0	V35	7,3	7,3	7,2
V17	-	-	-		7,1	6,7	
V18	8,5	5,98	7,7			7,1	
	6,3						
	6,1						

TABEL 6a RESULTATE VAN TELLINGS VAN MELKSURBAKTERIEË OP AA+Fr EN MRS-KS-AGAR NÁ 72h BY 30°C, VAN DIE EKSUDAATMONSTERS

AA+Fr				MRS-KS-agar			
Mon-ster	Tellings (logs per ml)			Mon-ster	Tellings (logs per ml)		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
V28	5,5 5,4	8,1 5,4	6,5	V28	9,5	9,4	9,4
V29	7,2 5,0 4,5	6,0 5,3 6,97	6,7	V29	9,5	9,7	9,6
				V30	9,8	9,7	9,7
				V31	9,2 8,8	9,4 8,7	9,1
				V32	9,5 9,0	9,6 9,1	9,4
				V34	10,4	10,3	10,3
				V35	10,6	10,5	10,6

TABEL 7 VERDELING VAN GEMIDDELDE TELLINGS VAN MELKSUURBAKTERIEË OP ASETAATAGAR (pH 5,5) IN GROOTTEGROEPE BY DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS, ASOOK DIE FREKWENSIE WAARMEE DIT VOORKOM BY DIE VERSKILLENDEN TYPES MONSTERS

Produkmonsters										
Tipe Monster	(log tellings per g)									
	0-4	4-5	5-5,5	5,5-6	6-6,5	6,5-7	7-7,5	7,5-8	8-8,5	8,5-9
Weense worsies		2		1	1	2	2	1		1
Noenvleis	2					2		1	1	
Frankfurters						1		1		
"Russians"	1				1			2		
Rookwors	1				2					
"Country Sausage"	1									
Totaal	5	2	0	1	4	5	2	6	1	1
%	18,5	7	0	4	5	18,5	7	22	4	4

Eksudaatmonsters										
Tipe Monster	(log tellings per ml)									
	5,5-6	6-6,5	6,5-7	7-7,5	7,5-8	8-8,5	8,5-9	9-9,5	9,5-10	10-10,5
Weense worsies	3			1	1	1	2			2
Noenvleis	1						1			
Frankfurters	1									
"Russians"				1			1	2		
Rookwors							2			
"Country Sausage"									1	
Totaal	5	0	0	2	1	1	6	2	1	2
%	25	0	0	10	5	5	30	10	5	10



TABEL 8 VERDELING VAN GEMIDDELDE MELKSUURBATERIETELLINGS OP MRS-KS-AGAR IN GROOTTEGROEPE BY DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS, ASOOK DIE FREKWENSIE WAARMEE DIT BY DIE VERSKILLENDE Tipes MONSTERS VOORGEKOM HET

Produkmonsters						
Tipe Monster	log tellings per g					
	6,5-7	7-7,5	7,5-8	8-8,5	8,5-9	9-9,5
Weense worsies			1			1
Noenvleis					1	
Frankfurters	1					
"Russians"	1			1		
Rookwors			1	1		
"Country Sausage"						
Totaal	2	0	2	2	1	1
%	25	0	25	25	12,5	12,5

Eksudaatmonsters				
Tipe Monster	log tellings per ml			
	9-9,5	9,5-10	10-10,5	10,5-11
Weense worsies	1	1		
Noenvleis			1	
Frankfurters	1			
"Russians"	1			1
Rookwors		1		
"Country Sausage"				
Totaal	3	2	1	1
%	43	29	14	14

TABEL 9 RESULTATE VAN *B. THERMOSPACTA*-TELLINGS OP STAA-MEDIUM VAN PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS (LOGS PER g OF LOGS PER ml)

Produkmonsters				Eksudaatmonsters			
Monster	Tellings in duplikaat		Gemid.	Monster	Tellings in duplikaat		Gemid.
	1	2			1	2	
W3	3,95	3,5	3,8	V3	5,4	5,2	5,3
W4	4,6	4,6	4,6	V4	6,5	6,6	6,5
W5	2,0	2,0	2,0	V5	3,8	3,8	3,8
				V6	3,0	3,0	3,0
W9	3,1	3,2	3,1	V8	2,0	-	2,0
W10	2,0	-	2,0	V9	2,6	5,1	4,8
W11	3,8	3,7	3,7	V11	5,2	5,1	5,2
W14	2,5	2,3	2,4				
W15	5,7	5,7	5,7	V15	6,6	-	6,6
W16	4,3	4,0	4,2	V16	4,5	5,2	5,2
	4,4	4,3			5,3	5,3	
W17	2,0	-	2,0	V17	6,4	-	6,4
				V29	3,0	2,0	3,1
					2,0		

TABEL 10 RESULTATE VAN ENTEROBAKTERIETELLINGS OP DHL-AGAR NÁ 24h BY 37°C EN 48h BY 20°C VAN DIE PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS. ONDERVINDING HET GETOON DAT VERDERE INKUBASIE (NA 24h) BY KAMERTEMPERATUUR DIE GROEI VAN PSEUDOMONADE BEVORDER

Produkmonsters (log tellings per g)						Eksudaatmonsters (log tellings per ml)					
Mon-ster	Tellings in duplikaat					Mon-ster	Tellings in duplikaat				
	1		2		Gemid.		1		2		Gemid.
	24h	72h	24h	72h			24h	72h	24h	72h	
W2	2,0	2,6*	2,7	2,95	2,98	V5	2,4	-	2,5	-	2,5
W5	-	-	1,0	-	1,0	V11	2,3	spreiende kolonies	-	-	2,3
W11	-	-	1,0	-	1,0	V13	1,0	-	-	-	1,0
W15	2,04	2,7	-	-	2,4	V15	spreiende kolonies	2,6	2,8	3,3	3,2
W16	2,11	2,7	4,2	3,2	4,2	V16	4,6	-	4,5	2,9	4,5
W27	-	3,5	-	3,2	3,4	V18	1,0	-	-	-	1,0
W29	1,5	2,0	-	-	1,75	V19	1,0	1,3	1,0	2,2	2,0
W32	1,0	-	1,5	-	1,3	V29	2,8	2,0	2,8	2,8	3,0
W34							-	-	3,3	-	
W35	spreiers		spreiers			V32	3,3	2,6			2,95
	spreiers					V34	-	-	-	-	
						V35	spreiers		spreiers		
							spreiers		spreiers		

\*Die verskil in tellings na 24h en 72h dui die aantal moontlike pseudomonade aan.

TABEL 11 RESULTATE VAN TELLINGS VAN ENTEROCOCCI OP  
 CATC-AGAR IN PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS  
 (INKUBASIE: 48h BY 37°C)

Produkmonsters (log tellings per g)				Eksudaatmonsters (log tellings per ml)			
Mon-ster	Tellings in duplikaat			Mon-ster	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
W2	2,6	2,7	2,7	V6	2,3	-	2,3
W8	2,3	-	2,3	V9	2,0	3,0	2,7
W14	3,0	-	3,0	V11	3,0	-	3,0
W15	4,3 3,6	4,1 3,6	3,99	V15	4,7 4,3	- 4,7	4,6
W16	4,5 5,0	5,0 5,0	4,9	V16	4,3 5,3	4,9 5,3	5,1
W27	4,9 4,9	4,95 4,7	4,9	V32	2,8	2,5	2,7
				V34	-	2,6	2,6
				V35	3,0 2,0	- 2,6	2,7

TABEL 12 RESULTATE VAN TELLINGS OP BAIRD-PARKER-MEDIUM NÁ 72h BY 37°C, BY PRODUK- EN EKSUDAATMONSTERS. DIE TELLINGS VAN TIPIESE EN ATIPIESE KOLONIES WORD AFSONDERLIK AANGEDUI

Tipiese Kolonies							
Produkmonsters (log tellings per g)				Eksudaatmonsters (log tellings per ml)			
Monsters	Tellings in duplikaat			Monsters	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
W9	4,0	2,6	3,7	V6	2,5	-	2,5
	2,0			V8	2,6	-	2,6
W11	-	3,0	3,0	V9	2,8	-	2,8
W15	2,3	2,5	2,4	V11	3,3	-	3,3
W16	2,6	-	2,6	V15	4,5	4,1	4,5
				V16	4,0	3,0	3,5
W27	3,3	3,8	3,7		3,8	-	
					2,9	-	
W29	2,5	-	2,5	V29	3,5	3,0	3,3
W35	2,0	-	2,0	V32	4,0	4,0	4,3
					3,3	4,1	
					3,0	-	

Atipiese Kolonies							
Produkmonsters (log tellings per g)				Eksudaatmonsters (log tellings per ml)			
Monsters	Tellings in duplikaat			Monsters	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
W9	-	2,3	2,3	V8	3,8	-	3,8
				V9	2,3	-	2,3
W27	4,5	-	4,5	V10	-	2,0	2,0
				V29	3,8	3,7	3,7
W34	2,0	-	2,0	V32	4,7	4,5	4,5
					2,7	2,8	
					-	4,5	
W35	-	2,0	2,0	V35	3,8	4,3	4,6
					3,3	3,95	
						3,6	

TABEL 13    RESULTATE VAN TELLINGS VAN GISTE EN SWAMME VANAF  
 ADA-MEDIUM NÁ 72 BY 25°C, VAN DIE PRODUK- EN  
 EKSUDAATMONSTERS.    GETALLE VAN GISTE EN SWAMME  
 WORD GESAMENTLIK AANGEDUI

Produkmonsters (log tellings per g)				Eksudaatmonsters (log tellings per ml)			
Mon-ster	Tellings in duplikaat			Mon-ster	Tellings in duplikaat		
	1	2	Gemid.		1	2	Gemid.
				V6	2,0	-	2,0
W7	3,3 3,3	3,5 3,4	3,4				
W8	3,3 3,3	3,0 3,1	3,2	V8	4,5 5,1	5,5 5,4	5,4
W9	-	2,5	2,5	V9	4,1 3,0	3,9 -	3,9
				V10	2,5	-	2,5
W11	6,9	6,8	6,9	V11	ontel- baar	ontel- baar	
W13	2,0 -	2,95 4,0	3,5				
W15	7,3	7,2	7,2				
W16	3,0 2,9	- 2,0	2,7	V16	- 3,5	4,3 3,8	3,9
W17	4,6	6,1	4,8	V17	3,0 2,5	- 2,6	2,8
				V18	4,6	4,0	4,4
				V19	4,0	-	4,0
W27	-	4,0	4,0	V27	5,1 4,97	4,95 4,8	4,95
W28	4,3 5,1	4,9 5,0	4,9				
				V29	4,6 2,3	4,6 2,3	
W30	2,0	2,3	2,2	V30	6,1	6,1	6,1
W31	2,3	2,5	2,4	V31	4,9	5,1	5,0
				V32	- 3,5	3,7 3,1	
W33	4,3 4,2	4,2 4,0	4,2				
W34	4,0 4,2 3,96	4,0 4,0 3,9	4,0	V34	6,3	6,3	6,3
W35	3,7 3,2	3,0 3,2	3,4	V35	- - 4,4	5,6 4,5 3,8	5,1

TABEL 14 RESULTATE VAN AMINOSUURANALISE VAN DIE SELWANDE  
 VAN DIE SES HETEROFERMENTERENDE LACTOBACILLI  
 (KONSENTRASIE IN x nmol/mg SELWAND)

Aminosure, aminosuikers, ens.	Isolate					
	L2060	L2061	L2062	L2082	L2173	L2174
SO <sub>3</sub>	34,9	19,2	19,6	19,2	5,7	6,5
Aspartiensuur (Asp)	21,9	77,2	92,9	74,4	48,1	78,4
Treonien (Thr)	14,5	10,2	32,2	23,0	-	1,3
Serien (Ser)	9,0	24,7	9,5	16,0	-	1,7
Muramiensuur (Mur)	2,3	72,8	56,4	60,0	23,4	58,1
Glutamiensuur (Glu)	23,6	120,4	114,7	97,6	74,0	114,1
Prolien (Pro)	-	-	-	-	-	-
Glisien (Gly)	13,6	9,8	27,2	14,8	1,7	2,8
Alanien (Ala)	98,4	252,8	218,2	230,8	171,6	236,5
Sisteien (Cys)	-	-	-	-	-	-
Valien (Val)	14,6	5,7	18,5	10,0	-	-
Methionien (Met)	3,7	-	5,1	-	-	-
Diaminopimeliensuur ( <u>m</u> - A <sub>2</sub> pm)	-	19,2	11,7	15,1	25,5	20,7
Isolensien (Ile)	10,9	2,6	8,6	2,4	-	1,6
Leusien (Leu)	18,8	6,5	20,7	8,2	-	2,6
Tirosien (Tyr)	6,3	3,6	14,0	8,5	-	-
Fenielalanien (Phe)	6,4	1,4	14,0	4,4	-	18,3
Glukosamien (GLA)	-	121,9	80,4	75,1	53,7	187,5
Galaktosamien (GAA)	136,9	94,3	112,6	88,9	301,1	369,9
Triptofaan (Trp)	4,6	85,4	4,1	4,0	4,5	4,0
Lisien (Lys)	37,3	-	90,5	80,3	61,8	89,4
Arginien (Arg)	8,6	-	-	-	-	-

TABEL 15 RESULTATE VAN DIE FISILOGIESE TOETSE VAN DIE L(+)-MELKSUURVORMENDE STREPTOBAKTERIEË GERANGSKIK VOLCENS DIE BIOGROEPE WAARONDER ELKE SPESIE INGEDEEL IS

Spesie	Biogroep	Isolaatnommer	Fisiologiese Toets																																																
			Groei by 4°C	Groei by 15°C	Groei by 45°C	Amigdalien	Gas uit sellobiose	Suur uit sellobiose	Eskulien	Fruktose	Galaktose	Gas uit glukonaat	Suur uit glukonaat	Inositol	Inulien	Laktose	Malaat	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melebiose	α-Metielglikosied	Raffinose	Salisien	Sorbitol	Stysel	Sukrose	Trehalose	Ramnose	Arabinose	Maltose	Ribose	Xilose	m - A <sub>2</sub> pm	NH <sub>3</sub> uit arginien	Groei by 10% NaCl	Groei by pH 3,9	Slymvorming	Bewesglikheid	NO <sub>3</sub> -reduksie	Eind-pH										
<i>L. bavaricus</i>	I	L594	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2					
		L2070, L2071	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9			
		L2083	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9			
<i>L. bavaricus</i>	II	L1569	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7			
		L1614, L1615	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3		
		L2100	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1		
		L1633	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6		
		L2197	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1		
		L2254	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0		
<i>L. bavaricus</i>	III	L1580	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3		
		L2056	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	
		L2099	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	
		L2101	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	
		L2207	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	
		L1622	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	
		L1685		+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	
		L1694		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	
		L2187	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	
		L2190	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	
		L2189	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	
<i>L. casei</i>	IV	L2243	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3		
<i>L. bavaricus</i>	V	L1558	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	
		L1564	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5
		L2193	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	
		L2255	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9
<i>L. bavaricus</i>		L574	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2	
		L1640	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	















TABEL 16 (vervolg)

Spesie	Biogroep	Isolate	Fisiologiese Toets																																									
			Groei by 4°C	Groei by 15°C	Groei by 45°C	Amigdalien	Gas uit sellobiose	Suur uit sellobiose	Eskulien	Fruktose	Galaktose	Gas uit glukonaat	Suur uit glukonaat	Inositol	Inulien	Laktose	Malaat	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	α-Metielglukosied	Raffinose	Salisien	Sorbitol	Stysel	Sukrose	Trehalose	Ramnose	Arabinose	Maltose	Ribose	Xilose	m - A <sub>2</sub> Pm	NH <sub>3</sub> uit arginien	Groei by 10% NaCl	Groei by pH 3,9	Slymvorming	Beweeglikheid	NO <sub>3</sub> -reduksie	Eind-pH			
<i>(L. sake)</i>	(II)	L1750, L1774, L1778	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4			
		L1792	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3		
		L1753	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3		
		L1754	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2		
		L1756	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3		
		L1757	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1		
		L1763, L1786	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2		
		L1772	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1		
		L1776	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0		
		L1791, L1871, L1877	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	
		L1793	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2	
		L1732	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	
		L1746, L1758, L1769,	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,4
		L176	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3
		L1751	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1
		L1762	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0
		L1764	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1
		L1765	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1
		L1777	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1
		L1788	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9
		L1804	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9
		L2137	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
		L2143	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
		L1800	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9
		L1869	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0
		L1884	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9











