

FISIOLOGIE VAN SPOROLACTOBACILLUS

DEUR

STEPHANUS JOHANNES BOTHA
HONS B.Sc. (P.U. VIR C.H.O.)

VERHANDELING VOORGELÊ TER VERVULLING
VAN DIE VEREISTES VIR DIE GRAAD

M.Sc. IN MIKROBIOLOGIE

FAKULTEIT: NATUURWETENSAPPE

DEPARTEMENT: MIKROBIOLOGIE EN PLANTPATOLOGIE

UNIVERSITEIT VAN PRETORIA
PRETORIA

FEBRUARIE 1986

INHOUD

SAMEVATTING	i
ABSTRACT	iv
DANKBETUIGINGS	vii
HOOFSTUK 1 INLEIDING	1
HOOFSTUK 2 TAKSONOMIE EN FISILOGIE VAN <u>Sporolactobacillus</u>	3
2.1 Literatuuroorsig	3
2.1.1 Historiese oorsig	3
2.1.2 Taksonomie	4
2.1.3 Fisiologie	6
2.1.3.1 Morfologie	6
2.1.3.2 Spoorvorming	7
2.1.3.3 Belangrikste onderskeidende eienskappe	8
2.1.3.4 Ander onderskeidende eienskappe	9
2.2 Prosedures	10
2.2.1 Isolasië van <u>Sporolactobacillus</u>	10
2.2.2 Bepaling van die onderskeidende eienskappe van <u>Sporolactobacillus</u>	10
2.2.3 Bepaling van die minimum-, maksimum- en optimum pH-waardes vir groei van <u>Sporolactobacillus</u>	14
2.3 Resultate en Bespreking	14
2.3.1 Isolasië van <u>Sporolactobacillus</u>	14
2.3.2 Onderskeidende eienskappe van <u>Sporolactobacillus</u>	15
2.3.3 Bepaling van die minimum-, maksimum- en optimum pH-waardes vir groei van <u>Sporolactobacillus</u>	20
HOOFSTUK 3 GROEI EN OORLEWING ONDER BEPERKENDE TOESTANDE	23
3.1 Literatuuroorsig	23
3.1.1 Chemiese preserveermiddels	23
3.1.1.1 Natriumnitriet	23
3.1.1.1.1 Die antimikrobiële aktiwiteit van nitriet	25
3.1.1.2 Kalsiumsorbaat	27
3.1.1.2.1 Die antimikrobiële aktiwiteit van sorbaat	28
3.1.1.3 Nitriet en Sorbaat	30
3.1.2 Hitteweerstandbiedendheid	31
3.1.3 Wateraktiwiteit	33
3.1.4 Gamma-bestraling	35

3.2	Prosedures	38
3.2.1	Die invloed van natriumnitriet op spoorontkieming en groei	39
3.2.2	Die invloed van kaliumsorbaat op groei en spoorontkieming en groei	39
3.2.3	Groei van <u>Sporolactobacillus</u> by verlaagde a_w -waardes	40
3.2.	Bepaling van γ_{D10} -waardes	40
3.3	Resultate en Bespreking	41
3.3.1	Die invloed van natriumnitriet op spoorontkieming en groei	53
3.3.2	Die invloed van kaliumsorbaat op groei en spoorontkieming en groei	54
3.3.3	Groei van <u>Sporolactobacillus</u> by verlaagde a_w -waardes	55
3.3.3.1	NaCl as voghouer	55
3.3.3.2	Gliserol as voghouer	56
3.3.4	Bepaling van γ_{D10} -waardes	57
HOOFSTUK 4 RAKSTABIELE PRODUKTE EN ANTAGONISME		58
4.1	Inleiding	58
4.2	Prosedures	58
4.2.1	Bepaling van die moontlike antagonisme van <u>Sporolactobacillus</u> teen <u>Bacillus</u> -spesies	58
4.2.2	Reaksie van <u>Sporolactobacillus</u> in eksperimentele, rakstabiele produkte	59
4.3	Resultate en Bespreking	60
4.3.1	Antagonisme van <u>Sporolactobacillus</u> teen <u>Bacillus</u> -spesies	60
4.3.2	<u>Sporolactobacillus</u> in eksperimentele, rakstabiele produkte	60
HOOFSTUK 5 SAMEVATTING EN GEVOLGTREKKINGS		69
5.1	Samevatting van Resultate	69
5.2	Gevolgtrekkings	70
HOOFSTUK 6 BIBLIOGRAFIE		72
HOOFSTUK 7 BYLAE		81
Tabel 7.1.	Groei van <u>Sporolactobacillus</u> by verskillende pH-waardes, uitgedruk in terme van Absorbansie	81
Tabel 7.2	Persentasie spoorontkieming en groei van spoor suspensies van <u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 1553), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 tot L2412) by verskillende konsentrasies natriumnitriet, uitgedruk in terme van spoorontkieming en groei by $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ natriumnitriet (kontrole)	82

Tabel 7.3	<p>Persentasie groei van vegetatiewe selle van <u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u>-isolate (L2401 tot L2412) by verskillende konsentrasies kaliumsorbaat, uitgedruk in terme van groei by $0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kalium-sorbaat (kontrole)</p>	83
Tabel 7.4	<p>Persentasie spoorontkieming en groei van spoorsuspensies van <u>sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u>-isolate L2401 tot L2412) by verskillende konsentrasies kaliumsorbaat in terme van spoorontkieming en groei by $0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat (kontrole).</p>	84
Tabel 7.5	<p>Persentasie groei van vegetatiewe selle van <u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u>-isolate (L2401 tot L2412) by verlaagde wateraktiwiteit (ingestel met NaC), uitgedruk in terme van groei by daardie wateraktiwiteit waar geen NaCl by die medium gevoeg is nie ($a_w = 0,995$)</p>	85
Tabel 7.6	<p>Persentasie spoorontkieming en groei van spoorsuspensies van <u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u>-isolate (L2401 tot L2412) by verlaagde wateraktiwiteit (ingestel met NaCl), uitgedruk in terme van spoorontkieming en groei by daardie wateraktiwiteit waar geen NaCl by die medium gevoeg is nie ($a_w = 0,995$)</p>	86
Tabel 7.7	<p>Persentasie groei van vegetatiewe selle van <u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u>-isolate (L2401 tot L2412) by verlaagde wateraktiwiteit (ingestel met gliserol), uitgedruk in terme van groei by daardie wateraktiwiteit waar geen gliserol by die medium gevoeg is nie ($a_w = 0,985$)</p>	87
Tabel 7.8	<p>Persentasie spoorontkieming en groei van spoorsuspensies van <u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538), <u>Bacillus cereus</u> (DSM 626), <u>Clostridium sporogenes</u> en <u>Sporolactobacillus</u>-isolate (L2401 tot L2412) by verlaagde wateraktiwiteit (ingestel met gliserol), uitgedruk in terme van spoorontkieming en groei by daardie wateraktiwiteit waar geen gliserol by die medium gevoeg is nie ($a_w = 0,985$)</p>	88
Tabel 7.9	<p>Logs van die getal oorlewende organismes in vegetatiewe selsuspensies in GYP-sop by verskillende bestralingsdosisse (log van lewende seltelling. $\text{m} \cdot \text{l}^{-1}$)</p>	89
Tabel 7.10	<p>Logs van die getal oorlewende organismes in spoorsuspensies in GYP-sop by verskillende bestralingsdosisse (log van lewende seltelling. $\text{m} \cdot \text{l}^{-1}$)</p>	90

Tabel 7.11	Verandering in die mikrobepopulasie tydens opberging van eksperimentele rakstabiële Frankfurter-tipe wors wat met verskillende endospoorvormende bakterieë geïnokuleer is (log van lewende seltelling.g ⁻¹)	91
Tabel 7.12	Verandering in pH-en a _w -waardes van eksperimentele rakstabiële Frankfurter-tipe wors, wat met verskillende endospoorvormende bakterieë geïnokuleer is, tydens opberging	92
Figuur 7.1	Groei van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verskillende pH-waardes, uitgedruk in terme van absorptansie ($\lambda = 540 \text{ nm}$)	93
Figuur 7.2	Persentasie spoorontkieming en groei van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verskillende konsentrasies natriumnitriet i.t.v. spoorontkieming en groei by 0 mg.ℓ ⁻¹ natriumnitriet (kontrole)	94
Figuur 7.3	Persentasie groei van vegetatiewe selle van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verskillende konsentrasies kaliumsorbaat, uitgedruk i.t.v. groei by 0 mg.ℓ ⁻¹ kaliumsorbaat (kontrole)	95
Figuur 7.4	Persentasie spoorontkieming en groei van spoorsuspensies van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verskillende konsentrasies kaliumsorbaat i.t.v. spoorontkieming en groei by 0 mg.ℓ ⁻¹ kaliumsorbaat (kontrole)	96
Figuur 7.5	Persentasie groei van vegetatiewe selle van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verlaagde a _w (ingestel met NaCl) i.t.v. groei by a _w waar geen NaCl by die medium gevoeg is nie (a _w = 0,995)	97
Figuur 7.6	Persentasie spoorontkieming en groei van spoorsuspensies van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verlaagde a _w (ingestel met NaCl) i.t.v. spoorontkieming en groei by a _w = 0,995	98
Figuur 7.7	Persentasie groei van vegetatiewe selle van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verlaagde a _w (ingestel met gliserol), uitgedruk i.t.v. groei by a _w waar geen gliserol by die medium gevoeg is nie (a _w = 0,985)	99
Figuur 7.8	Persentasie spoorontkieming en groei van spoorsuspensies van <u>Sporolactobacillus</u> -isolate (L2401 - L2412) by verlaagde a _w (ingestel met gliserol) i.t.v. spoorontkieming en groei by a _w = 0,985 (kontrole)	100

SAMEVATTING

FISIOLOGIE VAN SPOROLACTOBACILLUS

DEUR

STEPHANUS JOHANNES BOTHA

STUDIELEIER: Prof W.H. Holzapfel

DEPARTEMENT: Mikrobiologie en Plantpatologie

GRAAD WAARVOOR VERHANDELINGE INGEDIEN IS: M.Sc. (Mikrobiologie)

Februarie 1986

SAMEVATTING

Sporolactobacillus-isolate is verkry vanaf die mis van verskillende herbivore diere, asook vanaf die rumen van 'n bees en die finale afvloeiwatervan 'n abattoir. Die isolate toon onderlinge verskille ten opsigte van hulle morfologiese en fisiologiese eienskappe. Een isolaat (L2404) het selfs verskil ten opsigte van die karakteristieke eienskap waarop die spesienaam van Sporolactobacillus inulinus berus, naamlik die vermoë om inulien te fermenteer.

Die gemiddelde minimum-, maksimum- en optimum pH-waardes vir groei van Sporolactobacillus was 3,5, 8,0 en 6,5-7,0 onderskeidelik.

Die weerstandbiedendheid van Sporolactobacillus teen chemiese preserveermiddels soos natriumnitriet en kaliumsorbaat was relatief hoog. Spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus het plaasgevind tot 'n konsentrasie van $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ natriumnitriet; geen minimum inhiberende konsentrasie waarby natriumnitriet spoorontkieming en groei volledig geïnhibeer het, kon in hierdie studie vir Sporolactobacillus aangedui word nie. Die minimum inhiberende konsentrasie kaliumsorbaat wat spoorontkieming en groei van spore sowel as vegetatiewe selle van Sporolactobacillus inulinus ATCC 15538 volledig onderdruk het, was $4000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat. Vir die isolate van Sporolactobacillus het die minimum inhiberende konsentrasies vir volledige inhibisie van spoorontkieming en groei ($5000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) verskil van dié vir vegetatiewe groei ($7000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

Spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus vind by relatief lae a_w -waardes plaas en die minimum a_w -waarde vir spoorontkieming en groei was ongeveer 0,88 as a_w met gliserol ingestel is. NaCl as voghouer het 'n toksiese effek (addisioneel tot die inhibisie deur a_w -verlaging) op spoorontkieming en groei gehad, terwyl volledige inhibisie by 'n a_w -waarde van 0,956 gevind is.

Die γD_{10} -waarde vir spore van Sporolactobacillus-isolate in GYP-sop was gemiddeld 2,5 kGy en vir vegetatiewe selle 0,35-0,525 kGy .

Die antagonisme van 'n Sporolactobacillus-isolaat, L2407, teen spesifieke Bacillus-spesies, kan moontlik aan die produksie van bakteriosien en/of 'n ander antagonistiese produk toegeskryf word.

Alhoewel laboratoriumondersoekes getoon het dat spore van Sporolactobacillus by lae a_w -waardes ($<0,94$) kan ontkiem en groei, kon geen aktiewe spoorontkieming en groei in eksperimentele rakstabiele produkte aangedui word nie. Die verskynsel kan waarskynlik toegeskryf word aan die interaksie van verskillende faktore wat in die produk teenwoordig is.

ABSTRACT

PHYSIOLOGY OF SPOROLACTOBACILLUS

BY

STEPHANUS JOHANNES BOTHA

PROMOTER: Prof W.H. Holzapfel

DEPARTMENT: Microbiology and Plant Pathology

DEGREE FOR WHICH THESIS IS SUBMITTED: M.Sc. (Microbiology)

February 1986

ABSTRACT

Positive isolation of Sporolactobacillus was made from the faeces of different herbivores, as well as from the rumen of cattle and the final waste water of an abattoir. The isolates showed differences concerning their morphological and physiological properties, and one isolate (L2404) differed by its inability to ferment inulin, which is an essential characteristic for allocation of an isolate to the species Sporolactobacillus inulinus.

The average minimum-, maximum- and optimum pH-values for growth of Sporolactobacillus were 3,5, 8,0 and 6,5-7,0 respectively.

Resistance of Sporolactobacillus to chemical preservatives was relatively high. Germination and outgrowth of spores of Sporolactobacillus takes place at sodium nitrite concentrations as high as $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. It was not possible in this study to determine a minimum inhibitory concentration for sodium nitrite, at which germination and growth of spores was completely inhibited. The minimum inhibitory concentration of potassium sorbate that completely inhibited germination and growth of spores as well as vegetative growth of Sporolactobacillus inulinus ATCC 15538 was $4000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. For the isolates of Sporolactobacillus the minimum inhibitory concentration for germination and growth of spores and for vegetative growth was $5000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ and $7000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ potassium sorbate respectively.

Germination and growth of spores of Sporolactobacillus take place at relatively low a_w -values. The minimum a_w -value where germination and growth of spores took place was approximately 0,88 when a_w -values were adjusted with glycerol. NaCl used as humectant for adjusting a_w -values appeared to have a toxic effect, in addition to inhibition by reduced a_w , on germination and growth of Sporolactobacillus spores. Complete inhibition was found at an a_w -value of 0,956.

D_{10} -values for γ -irradiation of spores of Sporolactobacillus strains in GYP-broth averaged 2,5 kGy as compared to values between 0,35 and 0,525 kGy for vegetative cells.

The antagonistic effect of a Sporolactobacillus isolate, L2407, on specific Bacillus species was probably caused by the production of a bacteriocin and/or another antagonistic substance.

Although laboratory experiments showed that the spores of Sporolactobacillus germinate and grow at low a_w -values ($<0,94$), no active germination or growth could be observed in experimental shelf-stable products. This may be attributed to the presence of additional inhibitory factors (or a combination thereof) present in the products.

DANKBETUIGING

Graag betuig ek hiermee my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone en instansies vir hulle aandeel in die totstandkoming van hierdie verhandeling.

Prof W.H. Holzapfel onder wie se leiding hierdie ondersoek uitgevoer is. Sy waardevolle leiding, hulpvaardigheid en belangstelling gedurende hierdie projek sal altyd waardeer word.

Die S.A.G.D., in besonder kol. S. de Jong vir die geleentheid om hierdie projek tydens my nasionale diensplig te kon uitvoer.

Die abattoir van Pretoria vir die verskaffing van monsters.

Die Department Stralingschemie, Atoom-Energie Korporasie, in besonder mnr F.R. McCoy vir γ -bestraling van monsters.

Die personeel van die Departement Mikrobiologie en Plantpatologie, Universiteit van Pretoria, asook my mede-kollegas tydens nasionale diensplig, vir hulle hulp, belangstelling en aanmoediging tydens hierdie projek.

Die personeel van die Vleiskundesentrum, NIVS, in besonder dr R.T. Naudé en mnr G.L. Nortjé vir die tyd wat tot my beskikking gestel is tydens die opskryf van hierdie verhandeling, asook vir hulle belangstelling en aanmoediging. Mnr P.H. Heinze en ander personeel vir die hulp met die opstelling van figure.

Mev G. Groenewald vir bevestigende toetse deur haar uitgevoer.

Mev E. Steyn vir die tik van die verhandeling.

My ouers en skoonouers vir belangstelling en aanmoediging tydens die studie.

My vrou, Francien vir haar onbaatsugtige hulp, aanmoediging en onderskraging tydens die uitvoering van eksperimente, insameling van data en opskryf van hierdie verhandeling. As blyk van waardering dra ek dan ook hierdie verhandeling aan haar op.

*"Uit Hom en deur Hom en tot Hom is alle dinge.
Aan Hom behoort die heerlijkheid tot in ewigheid!
Amen."*

Rom. 11.36

HOOFSTUK 1 INLEIDING

Mikroörganismes van die genera Bacillus, Clostridium en Desulfotomaculum vorm hitteweerstandbiedende spore en kan voedselbederf veroorsaak. Omdat Sporolactobacillus ook hitteweerstandbiedende spore kan produseer, is die moontlikheid dat die organisme ook voedselbederf (suurvorming) kan veroorsaak nie uitgesluit nie (Doores, 1983). In werklikheid bestaan daar n moontlikheid dat Gram-positiewe, spoorvormende bakterieë wat vanaf termies-geprosesseerde voedsel geïsoleer is, verkeerdelik geïdentifiseer is as Bacillus- of Clostridium-spesies (Doores & Westhoff, 1983).

Sporolactobacillus is meer suurtolerant en kan by laer pH-waardes as die meeste Bacillus- en Clostridium-spesies aktief groei. Produkte met lae pH-waardes asook dié met hoë koolhidraatkonsentrasies kan dus vatbaar wees vir bederf deur Sporolactobacillus. Die voorkoms van Sporolactobacillus in voedselindustrië is sover bekend nog nie aangedui nie (Doores, 1983).

In voedselpreservering word inhibering van mikrobiologiese aktiwiteite verkry deur verskillende faktore, waaronder hittebehandeling, chemiese preserveermiddels, verlaagde wateraktiwiteit (a_w) en bestraling. Die weerstandbiedendheid/sensitiwiteit van Bacillus- en Clostridium-spesies teen hierdie faktore is bekend. Dit is ook bekend dat die spore van Sporolactobacillus hitteweerstandbiedendheid besit en dat hulle morfologies ooreenstem met spore van Bacillus-spesies (Kitahara & Lai, 1967), maar die weerstandbiedendheid/sensitiwiteit van die spore van Sporolactobacillus teen chemiese preserveermiddels, verlaagde a_w en γ -bestraling is nog nie voldoende beskryf nie.

Die voorkoms van Sporolactobacillus in tipiese habitats is laag en die fisiologiese-, biochemiese- en ensiematiese eienskappe van Sporolactobacillus kan moontlik verskil, afhangende van die ekosisteem waaruit dit geïsoleer is en die land waar hierdie isolasie gedoen is (Doores & Westhoff, 1983).

Die fisiologiese-, biochemiese- en ensiematiese eienskappe van Sporolactobacillus stem ooreen met dié van Lactobacillus-spesies. Die voordele van Lactobacillus-spesies in die voedselbedryf is reeds bekend, dus kan Sporolactobacillus moontlik ook tot voordeel in

bepaalde situasies aangewend word. Die gebruik van laktobasille vir die aanvulling van ingewandsbakterieë is algemeen bekend, probleme word egter nog ondervind met die preservering van die laktobasille. Hierdie preserveringsprobleem kan met Sporolactobacillus uitgeskakel word, omdat die organisme spore vorm wat n hoër weerstandbiedendheid het (Kitahara & Suzuki, 1963). Die vermoë van Lactobacillus-spesies om bakteriosiene te produseer is reeds aangedui (Niemand & Holzapfel, 1984). Aangesien Lactobacillus-spesies antagonisties teen ander mikroörganismes kan optree, word vermoed dat hierdie moontlikheid ook by Sporolactobacillus bestaan.

In hierdie studie is die onderskeidende eienskappe van Sporolactobacillus ondersoek en organismes wat plaaslik geïsoleer is, is vergelyk met reeds beskryfde spesies. Die minimum-, maksimum- en optimum pH-waardes vir groei van Sporolactobacillus is bepaal en verder is die vermoë tot groei en oorlewing onder beperkende faktore soos wat by voedselpreservering gebruik word, ondersoek. Weerstandbiedendheid van Sporolactobacillus teen chemiese preserveermiddels, a_w en γ -bestraling is bepaal. Die reaksie van Sporolactobacillus wat in vakuumverpakte, lae wateraktiwiteitsprodukte geïnkuleer is tydens prosessering en wat terminaal met hitte behandel is, is ook ondersoek. Die moontlike antagonisme van Sporolactobacillus teen Bacillus-spesies wat normaalweg die probleemorganismes van hierdie tipe produkte is, is ook ondersoek.

HOOFSTUK 2 TAKSONOMIE EN FISILOGIE VAN Sporolactobacillus

2.1 LITERATUUROORSIG

2.1.1 HISTORIESE OORSIG

Kitahara en Suzuki het in 1963 uit hoenderkos 'n spoorvormende organisme geïsoleer wat hulle soos volg beskryf het: Staafvormig met geronde ente, beweeglik met 'n klein aantal peritriege flagella, spore is silindro-epilepties, word terminaal gedra en die sporangia is effens geswolle. Die organismes vorm klein grys kolonies op agar en los kalsiumkarbonaat in media op as gevolg van melksuurvorming. In sokkulture vorm 'n presipitaat en geen groei kom voor in media wat nie fermenteerbare koolhidrate bevat nie. Spoordraende selle word gewoonlik nie in normale groeimedia aangetref nie (Kitahara & Suzuki, 1963).

Nakayama en Yanoshi het later in 'n ekologiese ondersoek 'n aantal spoorvormende melksuurproduserende bakterieë geïsoleer vanaf die risosfeer van verskillende wilde plante. Die organismes was mesofiele, fakultatief-anaërobe, Gram-positiewe stawe met peritriege flagella en het ovaalvormige endospore geproduseer wat terminaal tot subterminaal geleë was (Nakayama & Yanoshi, 1967a; b).

Grond, en meer spesifiek die risosfeer van plante, voorsien 'n habitat wat voedingstowwe bevat wat noodsaaklik is vir die groei van melksuurbakterieë en dus moontlik ook vir die groei van spoorvormende melksuurbakterieë (Doores & Westhoff, 1983; Norris, 1981). Die voorkoms van Sporolactobacillus is laag en daarom is verryking noodsaaklik vir primêre isolasie. Omdat die aanvanklike isolasie van Sporolactobacillus in Japan plaasgevind het, is dit dus moontlik dat Sporolactobacillus nie so volop in ander habitatte voorkom nie, of dat die spesies wat in ander lande voorkom effens verskillende kultuureienskappe besit as die tipiese Sporolactobacillus-stamme wat in die literatuur beskryf is (Doores & Westhoff, 1983).

Omdat Sporolactobacillus se fenotipiese eienskappe ooreenstem met dié van Bacillus-spesies, maar die fisiologiese-, biochemiese- en ensiematiese eienskappe weer ooreenstem met dié van laktobasille, het navorsers lank geworstel met die presiese taksonomiese posisie van die organisme.

2.1.2 TAKSONOMIE

Die sogenaamde spoorvormende melksuurbakterieë wat beskryf was toe Kitahara en Suzuki in 1963 Sporolactobacillus vir die eerste keer geïsoleer het, was katalase-positief en het L(+)-melksuur geproduseer (Kitahara & Suzuki, 1963). Dié groep organismes het dus skynbaar eerder tot die genus Bacillus of 'n groep tussen Bacillus en Lactobacillus behoort. Die isolaat van Kitahara en Suzuki (1963) was egter katalase-negatief, het 'n ander suurstofvereiste as Bacillus-spesies gehad en het D(-)-melksuur geproduseer. Die ander bekende spoorvormende genus, naamlik Clostridium is ook katalase-negatief, maar groei slegs onder anaërobe toestande en produseer 'n groot aantal gasse, waaronder koolsuurgas en waterstof, asook vlugtige sure tydens die fermentasieproses. Die isolaat van Kitahara en Suzuki het van Lactobacillaceae slegs verskil ten opsigte van spoorvorming en beweeglikheid, terwyl die fisiologiese-, biochemiese- en ensiematiese eienskappe van die organisme weer heeltemal verskillend was van die twee bekende genera van die Bacillaceae, naamlik Bacillus en Clostridium. Kitahara en Suzuki het daarom voorgestel dat Sporolactobacillus in die genus Lactobacillus ingedeel word, waar dit gelyke taksonomiese status as die subgenera Betabacterium, Thermobacterium en Streptobacterium sou hê (Kitahara & Suzuki, 1963).

Suzuki en Kitahara het die mol % G + C in die DNA van Sporolactobacillus volgens Marmur se alkaliese hidrolise-metode op 39,3 % vasgestel (Suzuki & Kitahara, 1964). Miller en ander navorsers het egter met behulp van Marmur en Doty se metode 'n G + C-inhoud van 47,3 mol % gevind (Miller *et al.*, 1970). Dit wil voorkom asof die mol % G + C in die DNA van Sporolactobacillus inulinus eerder 47,3 % is as 39,3 % (Doores, 1979). Alhoewel daar 'n groot ooreenkoms in die mol % G + C van Bacillus coagulans, Sporolactobacillus inulinus en Lactobacillus plantarum bestaan, het DNA-hibridisasie getoon dat daar geen direkte filogenetiese verwantskap tussen die drie organismes bestaan nie (Uchida & Mogi, 1973).

'n Filogenetiese verwantskap kan egter ten opsigte van sellulêre vetsure tussen Sporolactobacillus- en Bacillus-spesies aangedui word. Sporolactobacillus besit skynbaar sonder uitsondering die sellulêre vetsuurspektra van Bacillus-spesies. Geen onversadigde vetsure of

siklopropaansuur word in Sporolactobacillus en Bacillus-spesies aangetref nie, terwyl iso- en anti-iso-vertakte vetsure tot 80 % van die totale vetsure by Sporolactobacillus kan uitmaak. Lactobacillus-spesies se vetsuurspektra bestaan hoofsaaklik uit onversadigde tipes vetsure (Uchida & Mogi, 1973).

Omdat die mol % G + C-waardes van die DNA van Bacillus-, Sporolactobacillus en Lactobacillus-spesies baie naby aan mekaar lê, is die mol % G + C-waardes dus nie 'n goeie maatstaf om hierdie groepe organismes taksonomies van mekaar te onderskei nie. Meer intensiewe studie is nodig alvorens besluit kan word of sellulêre vetsuurspektra as betroubare maatstaf vir taksonomiese onderskeiding van die drie groepe organismes kan dien (Uchida & Mogi, 1973).

Die voorkoms van di-amino-pimeliensuur ($m-A_2pm$) in die selwande van Sporolactobacillus dui op 'n ooreenkoms met Bacillus-spesies (Weiss et al., 1967). Die voorkoms van isoprenoïed-kinoon-verbindings by Sporolactobacillus- en Bacillus-spesies dui ook op ooreenkoms van die organismes (Collins & Jones, 1979).

Nakayama en Yanoshi het in 1967 'n aantal katalase-negatiewe, spoorvormende, melksuurproduserende bakterieë geïsoleer wat geïdentifiseer kon word as Sporolactobacillus. Sommige van hierdie isolate het verskil van die tipiese Sporolactobacillus inulinus ten opsigte van die tipe melksuur wat dit produseer, asook die vermoë om die pH van die medium te verlaag tot 3,8, terwyl Sporolactobacillus inulinus die pH van media slegs tot 4,4 kan verlaag. Twee verdere spesies van Sporolactobacillus is toe voorgestel, naamlik: Sporolactobacillus leavus (Produseer L(+)-melksuur) en Sporolactobacillus racemicus (Produseer D L-melksuur) (Nakayama & Yanoshi, 1967b; Norris, 1981).

"Bergey's Manual" (Buchanan & Gibbons, 1974) plaas Sporolactobacillus in Afdeling 15: Endosporvormende stawe en cocci, as 'n genus van die familie Bacillaceae. Sporolactobacillus word van Bacillus-spesies onderskei op grond van sy suurstofbehoefte en katalase-negatiewe reaksie. Sporolactobacillus inulinus is die enigste spesie van hierdie genus wat beskryf word in die betrokke agste uitgawe van "Bergey's Manual". Die spesie inulinus word afgelei van die organisme se vermoë om inulien sterk te fermenteer (Kitahara & Suzuki, 1963).

In "The Procaryotes" (Starr et al., 1981) word Sporolactobacillus ingedeel in Afdeling S: Endosporvormende Bakterieë, as n genus van dié afdeling. Sporolactobacillus leavus en Sporolactobacillus racemicus word ook genoem in "The Procaryotes", maar vollediger beskrywing is nodig vir erkenning op spesievlak. Die enigste spesie wat dus erken word, is Sporolactobacillus inulinus.

Uit die eienskappe van Sporolactobacillus wat in voorafgaande literatuur beskryf is, is dit duidelik dat die organisme wel n volwaardige taksonomiese posisie onder die endosporvormende organismes regverdig.

2.1.3 FISILOGIE

Sporolactobacillus word omskryf as n mikro-aërofiële, mesofiële, beweeglike, staafvormige bakterium wat homofermentatief is en hoofsaaklik D(-)-melksuur produseer (Kitahara & Suzuki, 1963).

"Bergey's Manual" (Buchanan & Gibbons, 1974) beskryf Sporolactobacillus as Gram-positiewe, reguit stawe wat enkel of in pare voorkom en selde in kort kettings. Die organisme produseer endospore, is chemo-organo-troof en beweeglik met n klein aantal lang, peritriege flagella. Metabolisme is fermentatief en heksose suikers word afgebreek deur n tipiese homofermentatiewe baan met produksie van uitsluitlik melksuur. Dit besit nie katalase of n sitochroomsisteem nie en ten opsigte van suurstofbehoefte is dit mikro-aërofiel. Geen groei vind plaas onder 10 °C of bo 45 °C nie en die optimum groeitemperatuur is 35 °C .

Die grondisolate verskil van hierdie tipiese beskrywing deurdat dié organismes fakultatief anaëroob is en DL- en L(+)-melksuur produseer deur n homofermentatiewe weg (Nakayama & Yanoshi, 1976b). Die optimum groeitemperatuur van grondspesies is 30 °C (Norris, 1981).

2.1.3.1 MORFOLOGIE

Afgesien van die normale staafvormige morfologie word sogenaamde paddavisagtige selle ("tad-pole like") ook dikwels by Sporolactobacillus aangetref (Kitahara & Toyota, 1972). Hierdie paddavisagtige selle is gedeeltelike sferoplaste wat gevorm word as gevolg van n wanbalans

tussen selverlenging en selwandvorming. Die proses staan bekend as outosferoplastvorming. In sporulasiemedia waar NH_4SO_4 en CaCO_3 afwesig is, kan tot 50 % paddavisagtige selle vorm en dié morfologiese vorm lyk soos n oorgangsfase vanaf n vegetatiewe sel na n sporangium. Die teenwoordigheid van NaCl in media, stimuleer ook die vorming van paddavisagtige selle (Kitahara & Lai, 1967).

2.1.3.2 SPOORVORMING

Spoordraende selle van Sporolactobacillus word nie normaalweg in of op groeimedia aangetref nie, omdat die organisme nie vryelik sporuleer nie. Die sporulasietempo van Sporolactobacillus is ongeveer 10^{-4} tot 10^{-6} in n populasie (Kitahara & Lai, 1967; Kitahara & Suzuki, 1963). Kitahara en Lai (1967) het n sogenaamde TM-medium vir spoorvorming van Sporolactobacillus saamgestel op grond van die volgende faktore wat spoorvorming stimuleer (Kitahara & Lai, 1967):

- i. CaCO_3 induseer die aksie van spoorvorming en dien ook as buffer vir melksuurfermentasie.
- ii. Mn^{2+} in n optimum konsentrasie van 10^{-4} M.
- iii. 1 % Ammoniumsulfaat.
- iv. Tamatieserum bevat Mn^{2+} en bevorder dus spoorvorming.
- v. Die optimum temperatuur vir sporulasie is 37 °C en die optimum pH 5,5.
- vi. Vleisekstrak word in plaas van peptoon gebruik, want n organiese stikstofbron bevorder spoorvorming.
- vii. α -Metielglukosied is die koolhidraat (C-bron) wat die hoogste spooropbrengs gee.

Met hierdie TM-medium is 1 % sporulasie verkry wat verhoog kan word na 10 % as die organisme in n CO_2 -atmosfeer geïnkubeer word.

Spore is ovaalvormig en word gewoonlik in n terminale posisie gedra (Buchanan & Gibbons, 1974), maar subterminale spore kom ook voor (Nakayama & Yanoshi, 1967b). Die spore besit n hoë hittedoleransie en elektronmikroskooondersoeke het aangetoon dat die spore morfologies ooreenstem met Bacillus-spesies se spore. Die spore besit ook ongeveer 5,16 % dipikoliensuur (DPA) (Kitahara & Lai, 1967).

2.1.3.3 BELANGRIKSTE ONDERSKEIDENDE EIENSKAPPE

TABEL 2.1 SLEUTELEIENSKAPPE OP GROND WAARVAN Sporolactobacillus VAN Bacillus EN Lactobacillus ONDERSKEI KAN WORD (Doores, 1979; Doores & Westhoff, 1983; Norris *et al.*, 1981)

Eienskap	Tipiese <u>Bacillus</u>	<u>Sporolactobacillus inulinus</u>	Tipiese <u>Lactobacillus</u>
Katalase-produksie	+	-	-
Bensidien-produksie	+	-	-
Nitraatreduksie	+	-	-
Gramreaksie	+	+	+
Produksie van spore	+	+	-
Beweeglikheid	+	+	-*
Melksuurfermentasie	-**	+	+
<u>m-A₂pm</u> in selwande	+	+	-*
Tipe vetsuurspektra	<u>Bacillus-tipe</u>	<u>Bacillus-tipe</u>	<u>Lactobacillus-tipe</u>

* Lactobacillus plantarum is beweeglik en bevat m-A₂pm in sy selwande.
(Weiss *et al.*, 1967)

** Bacillus racemilacticus, Bacillus leavolacticus, Bacillus coagulans en Bacillus stearothermophilus besit die vermoë om melksuur te produseer (Doores, 1979).

Sporolactobacillus groei goed in suikerkonsentrasies van 40 % (Maksimum = 70 %) en in die teenwoordigheid van voldoende CaCO₃ kan die suikers volledig gefermenteer word na D(-)-melksuur (Kitahara & Toyota, 1972). Hierdie organisme produseer dus baie effektief melksuur vanaf koolhidrate en DL- asook L(+)-melksuur word ook gevorm (Nakayama & Yanoshi, 1967b).

Lactobacillus-spesies produseer melksuur in enige van die drie vorme en in wisselende hoeveelhede.

Die bensidientoets is baie meer sensitief as die H₂O₂-katalasetoets en word gebruik om die teenwoordigheid van yster-porfirien-sisteme in bakterieë aan te toon (Doores & Westhoff, 1983).

2.1.3.4 ANDER ONDERSKEIDENDE EIENSKAPPE

Volgens "Bergey's Manual" (Buchanan & Gibbons, 1974) produseer Sporolactobacillus suur, maar geen gas, vanaf die volgende koolhidrate: fruktose, glukose, inulien, maltose, mannose, raffinose, sukrose, trehalose, mannitol, sorbitol en α -metielglukosied. Min of geen suur word gevorm vanaf arabinose, xilose, galaktose, laktose, melibiose, sellobiose, melisitose, dekstrien, stysel, gliserol, eritritol, adonitol en salisien.

Doores (1979) het die taksonomiese posisie van Sporolactobacillus aangedui met behulp van morfologiese- en fisiologiese eienskappe. Sy het die eienskappe van Bacillus- en Lactobacillus-spesies ingespan om die sleuteleienskappe van Sporolactobacillus aan te dui. Deur die resultate wat verkry is, word Sporolactobacillus van Lactobacillus plantarum onderskei op grond van spoorvorming en beweeglikheid, groei in 1 % taurocholaat (Sporolactobacillus groei nie in 1 % taurocholaat), groei in 10 % galsoute (Sporolactobacillus groei nie in 10 % galsoute) en produksie van suur vanaf sellobiose. Sporolactobacillus word onderskei van Bacillus-spesies op grond van suurproduksie vanaf mannose en fruktose, groei in 0,1 % kaliumsorbaat en die onvermoë van Sporolactobacillus om laktaat en sitraat as C-bron te benut.

Geen nuwe toetse is vir die onderskeiding van Sporolactobacillus van Bacillus- spesies gevind nie, behalwe die vermoë van Sporolactobacillus om in 0,1 % kaliumsorbaat te groei. Verder besit Bacillus-spesies ook nie die vermoë om die pH van media te verlaag soos wat vir Sporolactobacillus die geval is nie. As spoorvorming nie waargeneem word nie, kan Sporolactobacillus maklik as 'n Lactobacillus-spesie geïdentifiseer word. Similariteitswaardes wat met behulp van numeriese taksonomie verkry is, dui egter baie duidelik aan dat Sporolactobacillus 'n genus op sy eie is, alhoewel 'n groot similariteit bestaan tussen S. inulinus, B. racemilacticus en B. levolacticus (Doores, 1979).

2.2 PROSEDURES

2.2.1 ISOLASIE VAN Sporolactobacillus

n Totaal van sewe-en-twintig monsters is versamel vanaf die volgende habitatte:

- vyftien vanaf die mis van perde, beeste, skape, bokke en pluimvee
- nege vanaf die risosfeer van verskillende plante
- een vanaf die rumen van n bees
- een vanaf die finale afvloeiwater van n abattoir
- een vanaf rou rioolwater.

Gemodifiseerde Lactobacillus-MRS-sop (Doores & Westhoff, 1983) en Sporolactobacillus-sop (ATCC) waarby 0,0224 g/l broomkresolgroen en 0,1 % kaliumsorbaat gevoeg is, is vir verryking van Sporolactobacillus gebruik. By die bereiding van albei hierdie verrykingsmedia en van agarplate vir primêre uitstryking van verrykingsoppe, is grondekstrak (Pramer & Schmidt, 1965) in plaas van water gebruik. Vir primêre uitstryking vanaf die verrykingsoppe op agarplate is 20 g/l agar by dieselfde verrykingsoppe gevoeg en agarplate daarvan berei. Steriele verrykingsoppe is met 1 % (m/v) monster geïnkuleer en isolasie is verder uitgevoer volgens die metode van Doores en Westhoff (1983).

2.2.2 BEPALING VAN DIE ONDERSCHEIDENDE EIENSKAPPE VAN Sporolactobacillus

Kultuurnummers is aan tipiese organismes wat geïsoleer is, toegeken en daarna is hierdie kulture aan die volgende morfologiese-, fisiologiese-, biochemiese- en ensiematiese toetse onderwerp. Die outentieke stam van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) is by alle toetse as verwysingskultuur gebruik:

- i. Koloniemorfologie is beskryf volgens Kruger (1984).
- ii. Vir Gramkleuring is n bakteriese smeer berei soos beskryf deur Bartholomew (1962) en uitgevoer volgens die metode van Hucker (Bartholomew, 1962; Gerhardt et al., 1981).
- iii. Selmorfologie is beskryf volgens Pelczar et al. (1977).
- iv. Vir produksie van endospore is kulture anaëroob gekweek in n sogenaamde TM-medium (Kitahara & Lai, 1967) en spore is

waargeneem met behulp van 'n fasekontrasmikroskoop asook deur spoorkleuringpreparate wat volgens die metode van Schaeffer en Fulton (Gerhardt et al., 1981) berei is en onder 'n ligmikroskoop ondersoek is.

- v. Flagella is waargeneem deur enkelvoudige kleuring met behulp van 'n transmissie-elektronmikroskoop.
- vi. Groeitoetse is uitgevoer in glukose-gisekstrak-peptoon sop (GYP-sop) (Kitahara & Suzuki, 1963) en groei in teenwoordigheid van die volgende substrate is met GYP-sop as basale media getoets:
 - Verskillende konsentrasies NaCl (Wilkinson & Jones, 1977)
 - 0,02 % telluriet (Harrigan & McCance, 1970; Gerhardt et al., 1981)
 - 15 % etanol (Harrigan & McCance, 1970)
 - 0,04 % teepol (Harrigan & McCance, 1970)
 - 10 % en 40 % galsoute (Gerhardt et al., 1981)
 - 0,1 % kaliumsorbaat (Doores, 1979).
- vii. Anaërobe groei is in anaërobe flesse gedoen met Anaerocult A (Merck).
- viii. Beweeglikheid is waargeneem met behulp van die hangdruppel-tegniek (Harrigan & McCance, 1970; Wilkinson & Jones, 1977) en inokulasie in semi-soliede media (Gerhardt et al., 1981).
- ix. Katalase-produksie is met 3 % H₂O₂ getoets (Gerhardt et al., 1981).
- x. Die bensidientoets is uitgevoer volgens die gemodifiseerde metode soos beskryf deur Deibel en Evans (1960).
- xi. Vir indoolproduksie is organismes gekweek op 'n triptonmedium (Wilkinson & Jones, 1977) en die resultate is geneem volgens Cowan en Steel (1966).
- xii. Die Voges-Proskauer- en Metielrooi-toetse is albei op MRVP-medium uitgevoer (Cowan & Steel, 1966; Harrigan & McCance, 1970; Gerhard et al., 1981; Wilkinson & Jones, 1977).
- xiii. Styselhidrolise is op 'n agarmedium sonder glukose gedoen (Gerhardt et al., 1981; Wilkinson & Jones, 1977).

- xiv. Hippuraathidrolise is uitgevoer in GYP-SOP + 1 % (m/v) natriumhippuraat (Gerhardt et al., 1981; Wilkinson & Jones, 1977).
- xv. Kaseïenhidrolise is op α -metielglukosied-gisekstrak-peptoon agar (α -MYP-agar) + 1 % (m/v) afgeroomde melk gedoen (Gerhardt et al., 1981; Wilkinson & Jones, 1977).
- xvi. Gelatienhidrolise is op agarmedium en in semi-soliede medium bepaal (Gerhardt et al., 1981).
- xvii. Eskulienhidrolise is in ysterbevattende medium met 0,5 - 1 % (m/v) eskulien getoets (Cowan & Steel, 1966; Wilkinson & Jones, 1977).
- xviii. Lesitinase is getoets deur steriele lesitien tot 'n finale konsentrasie van 1 % (v/v) by steriele afgekoelde GYP-agar te voeg (Gerhardt et al., 1981; Wilkinson & Jones, 1977).
- xix. Tirosiendegradasie is op α -MYP-agar + 0,5 % (m/v) L-tirosien bepaal en die kolonies is ook ondersoek vir die produksie van 'n swart pigment op tirosienagar (Wilkinson & Jones, 1977).
- xx. H₂S-produksie is gedoen in GYP-agar wat met 0,025 % (m/v) ferri-ammoniumsitraat, 0,015 % (m/v) ystersulfaat en 0,03 % (m/v) natriumtiosulfaat gesupplementeer is (Gerhardt et al., 1981).
- xxi. Nitraatreduksie is gedoen in GYP-sop + 0,1 % (m/v) KNO₃ (Wilkinson & Jones, 1977) en die resultate is geneem volgens Wilson en Miles (1975).
- xxii. Vir arginiendeaminasie is organismes gekweek in Thornley se semi-soliede arginienmedium en resultate is gelees na toevoeging van Nessler se reagens (Gerhardt et al., 1981).
- xxiii. Die produksie van slym uit sukrose is in sukrose-gisekstrak-peptoon-sop gedoen (Cowan & Steel, 1966).
- xxiv. Die verbruik van sitraat, laktaat, malaat en propionaat as koolstofbron is bepaal deur groei in 'n basale medium (gisekstrak + peptoon) te vergelyk met groei in media waar die koolstofbron bygevoeg is (Wilkinson & Jones, 1977).

- xxv. Die reaksie van lakmoesmelk is bepaal volgens Wilkinson en Jones (1977).
- xxvi. Groei in dekstrose-asied is bepaal deur 0,4 % (m/v) natrium-asied by GYP te voeg (Doores, 1979).
- xxvii. Feniellalaniendeaminasie is op feniellalanienagar getoets deur groei met 10 % ferrichloried-oplossing te oorspoel (Gerhardt et al., 1981).
- xxviii. Koolhidraatfermentasie is bepaal deur byvoeging van 0,5 % tot 1 % koolhidraat by basale media (gisekstrak + pepton). 0,004 % chloorfenolrooi is as indikator gebruik.
- xxix. Die produksie van CO₂ uit glukose en glukonaat is met behulp van Durhambuisies in fermentasiemedie bepaal.
- xxx. Die eind-pH is na 5 dae inkubasie by optimum groeitemperatuur in GYP-sop gemeet met n TC 1004 pH-meter.
- xxxi. Bepaling van die teenwoordigheid van diaminopimeliensuur (m-A₂pm) in die selwande is met behulp van papierchromatografie gedoen volgens die metode van Harper en Davis (1979).
- xxxii. Melksuurisomere is bepaal volgens die metode van Bergmeyer soos beskryf deur Gerber (1984) met behulp van n Beckman-DU 8 spektrofotometer.
- xxxiii. Die bepaling van die mol % G + C in die DNA is gedoen deur selle te kweek in groot volumes GYP-sop (5 l). Die selle is geoes deur sentrifugering by 10 000 omwentelings per minuut vir 15 minute. n Selsuspensie in 1xSSC is met behulp van die "Aminco French Pressure cell" opgebreek na byvoeging van Proteïenase K (Boehringer-Mannheim). Breking van die selle is bevestig met n fasekontrasmikroskoop. Die selwande is verwyder deur sentrifugering by 18 000 omwentelings per minuut vir 20 minute en verdere isolasie en suiwing van DNA is gedoen volgens die metode van Marmur soos beskryf deur Holzapfel en Van Wyk (1982). Die konsentrasie van gesuiwerde DNA is by 260 nm met n Gilford 2600 spektrofotometer bepaal. Die smeltpunt (T_m-waarde) is in n Gilford 2600 spektrofotometer bepaal en die mol % G + C is bereken volgens die formule van Marmur en Doty (1962). DNA van Escherichia coli (Difco) is as verwysing gebruik.

2.2.3 BEPALING VAN DIE MINIMUM-, MAKSIMUM- EN OPTIMUM pH-WAARDES VIR GROEI VAN Sporolactobacillus

α -Metielglukosied-gisekstrak-peptoonsop se pH is by verskillende pH-waardes ingestel en in buise versprei. Na vogtige hittesterilisasie by 121 °C is die pH van 1 sop van elke reeks met behulp van n TC 1004 pH-meter bepaal en die buise is met 0,1 cm³ van aktiefgroeiende kulture van Sporolactobacillus-spesies geïnkuleer. Buise is vir 5 dae by 35 °C geïnkubeer en groei is na inkubasie in terme van troebelheid bepaal met n Gilford 2600 spektrofotometer by 540 nm (kyk Tabel 6.1). Die minimum-, maksimum- en optimum pH-waardes vir groei van Sporolactobacillus-spesies kan verkry word vanaf Fig. 2.1 en 6.1 nadat groei (gemeet in terme van absorpsie by 540 nm) as funksie van pH uitgedruk is.

2.3 RESULTATE EN BESPREKING

2.3.1 ISOLASIE VAN Sporolactobacillus

Vanuit die vier-en-vyftig verrykingsoppe vir Sporolactobacillus is twaalf positiewe isolate verkry wat die tipiese karakteristieke eienskappe van Sporolactobacillus besit. Kultuurnommers is aan die isolate toegeken en die habitatte waaruit hulle geïsoleer is, is die volgende:

- vier isolate uit droë- en nat perdemis (L2401 tot L2404)
- vier isolate uit droë- en nat beesmis (L2405, L2406, L2409 en L2410)
- twee isolate vanaf skaapmis (L2407 en L2408)
- een isolaat uit die finale afvloeiwatervan n abattoir (L2411)
- een isolaat uit die rumen van n bees (L2412).

Die resultate dui daarop dat die voorkoms van Sporolactobacillus in die betrokke habitats betreklik laag was. Isolate is slegs uit monsters met relatief hoë mikrobelaadings verkry. Alhoewel geen positiewe isolasie vanaf die risosfeer van plante verkry is nie, word hierdie organisme waarskynlik tog met plante as primêre habitat, geassosieer, aangesien isolate van die mis van herbivore diere, die

rumen van n bees en die finale afvloeiwater van n abattoir, verkry is.

Die voorkoms van Sporolactobacillus in die rumen van n bees dui daarop dat die organisme waarskynlik saam met voedsel (plante) deur die dier ingeneem word.

Die voorkoms van Sporolactobacillus in die finale afvloeiwater van n abattoir dui daarop dat die organisme wel in/op voedselprodukte, in hierdie geval vleis, kan voorkom. Onhigiëniese slagprosesse kan die verspreiding van Sporolactobacillus vanaf die mis bevorder.

Ten einde die voorkoms van Sporolactobacillus in voedselprodukte asook sy primêre habitat te bepaal, is n uitgebreide ekologiese ondersoek noodsaaklik.

2.3.2 ONDESKUIDENDE EIENSKAPPE VAN Sporolactobacillus

Tipiese Sporolactobacillus-isolate wat aan die karakteristieke eienskappe van Sporolactobacillus voldoen het (insluitende suurvorming in CaCO₃-bevattende media) se koloniemorfologie op Sporolactobacillus-agar word gegee in tabel 2.2 en die onderskeidende eienskappe in tabel 2.3.

TABEL 2.3 KOLONIEMORFOLOGIE VAN Sporolactobacillus-isolate

Eienskap	Isolate												
	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412
Kleur	Vuilwit	Vuilwit	Vuilwit	Vuilwit	Vuilwit	Wit	Wit	Wit	Roomwit	Vuilwit	Vuilwit	Roomwit	Roomwit
Profiel	Almal knopvormig												
Vorm	Almal rond												
Kolonierand	Getand	Getand	Getand	Getand	Getand	Getand	Getand	Glad	Getand	Getand	Getand	Glad	Getand
Oppervlak	Almal dof												
Samestelling	Almal bros												

TABEL 2.3 MORFOLOGIESE- EN FISIOLOGIESE EIENSKAPPE VAN
Sporolactobacillus-ISOLATE (Alle resultate wat hier gegee
word, berus op die gemiddeld van drie herhalings, behalwe
die bepaling van $m-A_2pm$ in selwande)

Alle stamme van Sporolactobacillus was positief vir die volgende toetse: Gramkleuring, endosporoproduksie, flagellaproduksie, aërobie-groei, anaërobiegroei, groei by 15, 20, 25, 37 en 40 °C, groei by pH 4,8, groei by 3 en 5 % NaCl, groei by 0,1 % kaliumsorbaat, beweeglikheid, VP-toets, MR-toets, produksie van dextran van sukrose, fermentasie van fruktose, glukose, mannose, α -metielglukosied en raffinose asook die teenwoordigheid van $m-A_2pm$ in selwande.

Alle stamme van Sporolactobacillus was negatief vir die volgende toetse: groei by 10, 45, 50, 55 en 65 °C, groei by pH 9,6, groei by 7 en 10 % NaCl, groei by 10 en 40 % galsoute, groei by 15 % etanol, 0,4 % teepol, 1 en 4 % taurocholaat en dekstrose-asied agar, katalaseproduksie, bensidienreaksie, indoolproduksie, styselhidrolise, hippuraathidrolise, kaseïenhidrolise, gelatienhidrolise, eskulienhidrolise, lesitinase, tirosiendegradasie, vorming van 'n swart pigment op tirosienagar, H₂S-produksie, nitraatreduksie, arginiendeaminasie, sitraat-, laktaat-, malaat- en propionaatverbruik, reaksie in lakmoesmelk, fenielalaniendeaminasie, fermentasie van amygdalien, arabinose, dekstrien, dulsitol, galaktose, gliserol, inositol, laktose, melisitose, melibiose, ramnose, ribose, salisien, sellobiose, stysel en xilose asook produksie van CO₂ uit glukose en glukonaat.

TABEL 2.3 (VERVOLG)

Eienskap	<u>Sporolactobacillus</u> -stamme													ATCC 15538*
	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	
Groei by 6,5 % NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Groei by 0,2 % telluriet	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Koolhidraatfermentasie														
Inulien	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Sukrose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Eind pH na fermentasie (5 dae) in glukose	3,99	3,99	4,18	4,08	3,99	4,03	4,05	3,99	4,02	4,09	4,17	4,19	4,25	
Tipe melksuur	D(-)	DL	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	DL	D(-)	D(-)
mol % G + C	47,1			44,88		47,08						47,36	47,12	47,3

Die selmorfologie van alle stamme was staafvormig, endospore was in alle gevalle groter as die sel en hoofsaaklik terminaal geleë, slegs L2411 en L2412 se endospore was terminaal tot subterminaal geleë.

* Resultate is verkry deur persoonlik kommunikasie met Dr. S. Doores. 1984. Department of Food Science, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, U.S.A.

Isolate (wat in hierdie studie verkry is) kon op grond van karakteristieke eienskappe as Sporolactobacillus-spesies geïdentifiseer word. Sommige van die organismes verskil egter wel van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) ten opsigte van spesifieke eienskappe, terwyl onderlinge verskille ook aangedui kon word.

Ten opsigte van koloniemorfologie is kleurverskille gevind, terwyl L2407 en L2411 ook van die ander isolate en ATCC 15538 verskil het ten opsigte van kolonierand (kyk Tabel 2.2).

Tabel 2.3 gee die morfologiese-, fisiologiese-, biochemiese- en ensiematiese eienskappe van Sporolactobacillus-isolate en tref ook 'n vergelyking met die eienskappe van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) soos in hierdie studie verkry en soos verkry deur Doores (persoonlike mededeling)*. Die endospore van L2411 en L2412 was subterminaal tot terminaal geleë; al die ander (insluitende ATCC 15538) was terminaal. Geen groei kon by pH 9,6 waargeneem word nie, terwyl Doores (persoonlike mededeling)* wel groei by pH 9,6 aandui (kyk Tabel 6.1 en Fig. 2.1 asook Fig. 6.1). Groei van L2401 tot L2412 vind nie plaas by 6,5 % NaCl nie, terwyl ATCC 15538 wel by hierdie konsentrasie NaCl groei. L2403, L2408 en L2412 het by 0,02 % telluriet gegroei, wat op bestandheid van hierdie organismes teen hierdie konsentrasie telluriet dui. Die koolhidraatfermentasiepatroon het ook onderlinge verskille getoon. Die belangrikste verskil was in die fermentasie van inulien deur L2404. Sporolactobacillus inulinus se spesienaam is afgelei van sy vermoë om inulien baie sterk te fermenteer (Kitahara & Suzuki, 1963), maar L2404 besit nie hierdie vermoë nie.

Ander verskille word aangetref by fermentasie van maltose, wat nie gefermenteer word deur L2404, L2407, L2409 en L2411 nie; mannitol, wat nie gefermenteer word deur L2404, L2405, L2407 en L2409 nie; sorbitol, wat nie gefermenteer word deur L2404, L2409 en L2411 nie; sukrose, wat nie gefermenteer word deur L2404 en L2405 nie en trehalose, wat nie gefermenteer word deur L2401 en L2411 nie.

Alhoewel die persoonlike kommunikasie met Doores (kyk Tabel 2.3) geen fermentasie van raffinose aandui nie, is in hierdie studie fermentasie

* Dr. S. Doores. 1984. Department of Food Science, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, U.S.A.

van raffinose deur ATCC 15538 en L2401 tot L2412 aangedui, in ooreenstemming met "Bergey's Manual" (Buchanan & Gibbons, 1974). Doores vermeld ook die produksie van CO₂ uit glukonaat (kyk Tabel 2.3), maar dit kon nie in hierdie studie bevestig word nie.

Die eind-pH na 5 dae inkubasie in GYP-sop was in die omgewing van 4. L2401 en L2411 produseer D L-melksuur, terwyl al die ander isolate en ATCC 15538 D(-)-melksuur produseer. Die mol % G + C in die DNA van ATCC 15538, L2405, L2411 en L2412 was binne die 1 % variasiegrens van 47,3 % soos aangedui vir Sporolactobacillus inulinus deur Doores (1979) en Miller *et al.* (1970). Die mol % G + C in die DNA van L2403 is na etlike herhalings bepaal as gemiddeld 44,8 % . Die mol % G + C van die ander isolate is nie bepaal nie.

Dit sal onrealisties wees om Sporolactobacillus op grond van die verskille wat in hierdie studie gevind is in verskillende spesies te probeer indeel, maar die moontlikheid dat daar verskillende biotipes van die organisme bestaan, word daardeur beklemtoon. Die moontlikheid dat L2404 n lid van die spesie Sporolactobacillus inulinus is, word sterk bevraagteken, maar om hierdie organisme van die ander te onderskei, sal dit beter bestudeer moet word. Ten opsigte van koolhidraatfermentasiepatroon toon L2401, L2405, L2407, L2409 en L2411 ook verskille, maar hierdie verskille is in werklikheid onbeduidend van aard en dui moontlik slegs op verskillende biotipes. Die mol % G + C wat gevind was vir L2403 is onverklaarbaar en korreleer nie met die ander eienskappe van die organisme as Sporolactobacillus-spesie nie.

2.3.3 BEPALING VAN DIE MINIMUM-, MAKSIMUM- EN OPTIMUM pH-WAARDES VIR GROEI VAN Sporolactobacillus

Fig. 2.1 gee die groei van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538), die gemiddelde waardes van die isolate (L-kulture), asook die afwykings daarvan by verskillende pH-waardes.

FIG. 2.1: GROEI VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15538), DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN L-ISOLATE (L-gem), L 2402 EN L 2411 BY VERSKILLENDEN pH-WAARDES IN TERME VAN ABSORBANSIE ($\lambda = 540$ nm).



Die optimum pH vir groei van Sporolactobacillus is geleë in die pH-gebied van 6,5 tot 7,0. Relatief goeie groei is waargeneem by laer pH-waardes tot by pH 4,0 (kyk Fig. 2.1), terwyl groeivermoë bokant pH 7 baie drasties afneem. Alhoewel groei waargeneem is by pH 2,5 en pH 8,5 (kyk Fig. 2.1) was hierdie groei so minimaal dat dit in werklikheid weglaatbaar klein is. Uit die resultate soos uiteengesit in Fig. 2.1 kan die minimum- en maksimum pH-waardes vir groei van Sporolactobacillus geneem word as 3,5 en 8,0 respektiewelik.

Die optimum pH-waarde van L2402 is nader aan 6,5 as 7,0, terwyl die organisme se maksimum pH-waarde eerder 7,0 is. L2411 groei by pH-waardes bokant pH 7,0 baie goed en die organisme se maksimum pH-waarde is ongeveer 8,5.

HOOFSTUK 3 GROEI EN OORLEWING ONDER BEPERKENDE TOESTANDE

3.1 LITERATUUROORSIG

3.1.1 CHEMIESE PRESERVEERMIDDELS

3.1.1.1 NATRIUMNITRIET

Die gebruik van nitraat en nitriet in die pekeling van vleis en vis dateer terug tot die jare 3000 V.C. in Mesopotamië. In die Romeinse tydperk is waargeneem dat rooi vlekke vorm op vleis wat met sout gepreserveer is. Die woestynsout wat vir hierdie preservering gebruik is, het skynbaar nitraat bevat en dit het die rooi kleur aan die vleis gegee. Met verloop van tyd het pekeltgnieke ontwikkel, die belangrikheid van nitriet bo nitraat is besef en die pekeling van vleisprodukte het ontwikkel tot n wetenskap (Sofos et al., 1979).

Die gebruik van nitriet in vleisprodukte bestaan dus al baie lank. Natriumnitriet het die volgende funksies tydens die produksie van gepekelde vleisprodukte (Lin & Sebranek, 1979; Sofos et al., 1979):

- i. Produksie van kleur
- ii. Ontwikkeling van geur
- iii. Tree op as anti-oksidadant
- iv. Verbeter tekstuur van die produk
- v. Besit anti-mikrobiiese aktiwiteit
- vi. Voorkom spoorontkieming en toksienproduksie deur Clostridium botulinum

Natriumnitraat (NaNO_3), natriumnitriet (NaNO_2) en die kaliumsoute van nitraat en nitriet word in gepekelde vleisprodukte gebruik. In suur-omgewing word nitrietione verander na salpetersuur (3HONO) wat dan weer verder afgebreek word na stikstofmonoksied (NO) wat skynbaar die belangrike komponent is wat die rooi kleur in die vorm van nitrosomioglobien aan vleis gee (Jay, 1970).

Toestemming vir die gebruik van nitriet in gepekelde en ander vleis-produkte is op 19 Januarie 1923 deur die "Bureau of Animal Industry" van die "United States Department of Agriculture" (USDA) gegee, nadat navorsers die volgende bevindings ten opsigte van die direkte

toevoeging van nitriet tot vleisprodukte gemaak het (Sofos et al., 1979).

- i. Natrium- of kaliumnitraat kan suksesvol deur natriumnitriet vervang word in die pekelingsproses van vleis.
- ii. n Hoeveelheid van $156-625 \mu\text{g.g}^{-1}$ natriumnitriet was voldoende vir kleurfiksering, afhangende van die kwaliteit van die vleis en die pekelingsproses wat gebruik word.
- iii. Die hoeveelheid natriumnitriet wat nodig was vir pekeling, was nie hoër as die hoeveelheid nitriet wat in die vleis voorgekom het na pekeling met nitraat nie en nitraatrete het nie voorgekom nie.
- iv. Die pekelingsperiode kon verkort word deur die direkte gebruik van nitriet.
- v. Die kwaliteit en voedingswaarde van vleis wat met nitriet gepekel is, was nie ondergeskik aan dié van vleis wat met nitraat gepekel is nie.

Na aanleiding van hierdie bevindings het die USDA toestemming gegee vir die gebruik van natriumnitriet by die pekeling van vleis, op voorwaarde dat produkte nie meer as $200 \mu\text{g}$ nitriet per g produk mag bevat nie (Sofos et al., 1979).

In die jare na 1950 het die grootskaalse gebruik van nitriet in vleisprodukte aanleiding gegee tot omvattende wetenskaplike ondersoeke waardeur die vorming van nitrosamiene en die karsinogeniese eienskappe daarvan onder meer aangetoon is (Sofos et al., 1979). n Gesondheidsrisiko word geskep deurdat nitriete met primêre-, sekondêre- of tersiêre amiene onder spesifieke suurtoestande kan reageer met die vorming van nitrosamiene (Gray & Randall, 1979; Simon et al., 1973). Afgesien van die byvoeging van nitriet by gepekelde vleisprodukte, kom nitrate en nitriete algemeen in die daaglikse dieet voor. Groente en vrugte is die hoofbronne van nitriet in die dieet, want nitrate is die primêre bron van gefikseerde stikstof vir groen plante en nitrate kan geredelik gereduseer word na nitriete (Gray & Randall, 1979). Effektief kan nitrosamiene dus in die suuromgewing van die

spysverteringskanaal gevorm word, want amiene is n natuurlike komponent van vleis.

Omdat die veiligheid van die gebruik van nitriet in gedrang was, is navorsing hierop toegespits en die volgende faktore bevestig die voordelige gebruik van nitriet in gepekelde vleisprodukte (Fiddler Piotrowski, 1972; Gray & Randall, 1979; Roberts, 1975; Sofos et al., 1979):

- i. Die gebruik van natriumnitriet binne vasgestelde perke verminder die gevaar van moontlike botulismetoksienvorming in produkte.
- ii. Nitrosamiene word gewoonlik as dele per miljard in produkte aangetref (die konsentrasie is dus weglaatbaar klein).
- iii. Die karsinogeniese eienskappe van nitrosamiene is nog nie by mense aangetoon nie, maar slegs by proefdiere onder eksperimentele toestande.
- iv. Nitriet wat binne bestaande perke by vleis gevoeg word, se konsentrasie is so laag dat dit nie gedurende n mens se normale lewensverwagting kanker kan veroorsaak nie.
- v. Nitrosamiene word ook in rookbesoedelde lug, olies, landboukundige chemikalieë en kosmetika aangetref.
- vi. Die voorkoms van voedselvergiftiging deur Clostridium botulinum is n werklikheid, kanker wat deur nitrosamiene veroorsaak word is slegs n teorie.

3.1.1.1 DIE ANTIMIKROBIESE AKTIWITEIT VAN NITRIET

Die antimikrobiese aktiwiteit van nitriet hou baie nou verband met pH, temperatuur, a_w en NaCl-konsentrasie. Inhibisie van mikroorganismes is sterker by lae pH-waardes, laer temperature en laer a_w -waardes. As nitriet saam met NaCl in vleisprodukte gebruik word, is die inheberingsvermoë ook baie sterker (Bell & De Lacey, 1984; Castellani & Nivan, 1955; Collins-Thompson & Rodriguez-Lopez, 1981; Hallerbach & Potter, 1981; Nielsen, 1983; Roberts, 1975).

Die inheberingsvermoë van nitriet is selektief van aard. Verskillende reaksies word by melksuurbakterieë verkry, sommige word geïnhibeer

sommige word gedeeltelik geïnhibeer en op ander het nitriet geen effek nie (Nielsen, 1983). Bacillus cereus word baie sterk geïnhibeer deur 200 dele nitriet per miljoen ($200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) (Nielsen & Zeuthen, 1984). Een van die belangrikste voordele van nitrietbyvoeging is die vermoë van nitriet om spoorontkieming van bederfbakterieë wat n hittedkok toegedien is, te inhibeer (Waldman et al., 1974).

Die presiese meganisme waarvolgens nitriet inhiberend op mikro-organismes inwerk, is nie bekend nie, maar die moontlike werking van nitriet kan soos volg gestel word (Lechowich et al., 1978):

- i. Verhoog die vernietiging van spore deur hitte.
- ii. Verhoog die tempo van spoorontkieming tydens prosessering en die ontkiemende spore word dan vernietig deur die daaropvolgende termiese proses.
- iii. Voorkom spoorontkieming.
- iv. Voorkom die uitgroei van ontkiemende spore.
- v. Reageer met ander verbindings tydens verhitting om sodoende meer inhiberende verbindings te vorm.

Bacillus-spore in media met 0,03 % ($300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) natriumnitriet het wel ontkiem, maar die verdere ontwikkeling (uitgroei) van vegetatiewe selle is geïnhibeer. Navorsing op Clostridium botulinum-spore het getoon dat spoorontkieming nie deur nitriet beïnvloed word nie en die inhiberende effek van nitriet is skynbaar op die uitgroei van hittebeskadigde spore (Sofos et al., 1979).

Die moontlike inhiberende effek van nitriet as gevolg van die vorming van meer inhiberende verbindings met komponente van die sisteem waarin dit gebruik word, is ook van waarde. Voldoende verhitting van nitriet in media gee aanleiding tot die vorming van n onbekende inhiberende bestanddeel wat van anorganiese nitriet verskil ten opsigte van die volgende (Perigo et al., 1967; Perigo & Roberts, 1968; Sofos et al., 1979):

- i. Die aktiwiteit van die verbinding is minder pH afhanklik as dié van anorganiese nitriet.
- ii. Resultate wat verkry is, was minder varieerbaar.

iii. n Uitermate sterk inhibeerder word gevorm deur byvoeging van relatief lae konsentrasies nitriet.

Die verbinding wat in media vorm na byvoeging van nitriet en outoklaving is deur Perigo et al. (1967) as n baie effektiewe inhibeerder van Bacillus-spesies beskryf. Hierdie verbinding is die Perigo-faktor genoem en daar is gevind dat dié faktor vorm as gisekstrak of triptoon saam met n reduserende middel soos sisteïen, natriumtioglikolaat of glukose en nitriet geoutoklaveer word. n Inhiberende bestanddeel word ook in vleis gevorm as nitriet daarby gevoeg en dit verhit word, maar hierdie bestanddeel is dialiseerbaar, terwyl die Perigo-faktor nie dialiseerbaar is nie. Dit is dus nog nie onteenseglik bewys dat die Perigo-faktor onder praktiese toestande in die kommersiële bedryf inhibisie veroorsaak nie (Sofos et al., 1979).

Geen enkele meganisme kan die inhiberingseffek van nitriet verklaar nie en eksperimentele resultate wat met nitriet verkry word, is ook nie altyd in die praktyk van toepassing nie. Die inhiberingsvermoë van nitriet is skynbaar die gevolg van meer as een meganisme wat op spesifieke produkte van toepassing is (Sofos et al., 1979).

3.1.1.2 KALIUMSORBAAT

Sorbiensuur is in 1859 deur die Duitse apteker A.W. Hoffmann, geïsoleer uit die vrugte van n Lysterbessieboom. Die antimikrobiese aktiwiteit van sorbaat is in die jare rondom 1940 aangetoon (Sofos & Busta, 1981; Sofos et al., 1979).

Sorbiensuur is n onversadigde-reguitketting α , β -trans-trans-2,4-diënoïese-monokarboksiel-alifatiese suur met die volgende struktuurformule:



Die karboksielgroep reageer maklik om soute en esters te vorm en hierdie soute is baie meer wateroplosbaar as sorbiensuur (Sofos & Busta, 1981; Sofos et al., 1979). Sorbiensuur word om hierdie rede as preserveermiddel gewoonlik aangewend as die kalium-, natrium- of kalsiumsout (Jay, 1970). Sorbaat is nie toksies nie en kan deur mens en dier op dieselfde wyse gemetaboliseer word as sommige natuurlike

vetsure. Die "World Health Organization" het, van alle voedsel-preserveermiddels, vir sorbaat die hoogste aanvaarbare daaglikse inname (ADI) naamlik $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ liggaamsmassa goedgekeur. Die "Food and Drug Administration" van die V.S.A. beveel sorbaat aan as 'n "GRAS"-bestanddeel ("Generally recognized as safe") (Sofos & Busta, 1981; Sofos et al., 1979).

Prakties word sorbaat aangewend in die preservering van menslike voedsel, dierevoedsel, farmaseutiese produkte, kosmetiese produkte en in verpakkingsmateriaal. Vir voedselpreservering word sorbaat aangewend by suiwelprodukte, bakkerijeprodukte, vrugte- en groente-produkte en ander voedselprodukte soos vleis, vis, margarien en slaaisouse. Sorbaat kan direk by die produk gevoeg word, die produk kan in 'n sorbaatoplossing gedompel word, daarmee bespuit of gepoeier word, of sorbaat kan by die verpakkingsmateriaal ingesluit word (Sofos & Busta, 1981).

3.1.1.2.1 DIE ANTIMIKROBIESE AKTIWITEIT VAN SORBAAT

Die effektiwiteit van sorbaat en die konsentrasie nodig om inhibisie van mikroörganismes te verkry, word beïnvloed deur die volgende faktore (Beuchat, 1981; Eklund, 1983; Hallerbach & Potter, 1981; Restaino et al., 1981; Sofos & Busta, 1981; Sofos et al., 1979):

- i. pH van die produk - Sorbaat se optimale aktiwiteit is by pH-waardes naby sy dissosiasiekonstante (pK_a), naamlik 4,75. Daarom is sorbaat meer effektief in lae pH-voedselsoorte.
- ii. Bestanddele van die produk - Spesifieke organiese sure soos melksuur en sitroensuur verhoog die effektiwiteit van sorbaat.
- iii. Voginhoud van die produk.
- iv. Produkkontaminasie.
- v. Vervaardigingsprosedure - Toediening van terminale hitte-behandeling verbeter die effektiwiteit van sorbaat.
- vi. Verpakking.
- vii. Opbergings temperatuur - Sorbaat is meer effektief by laer temperature.
- viii. Opbergings tyd.

Die antimikrobiese aktiwiteit van sorbaat is selektief van aard en melksuurproduserende spesies word glad nie deur lae konsentrasies sorbaat geïnhibeer nie. Die groeitempo van Lactobacillus plantarum word gereduseer by 0,2 % (2000 mg. ℓ^{-1}) kaliumsorbaat (pH 5,5) en by hoër konsentrasies sorbaat word groei van melksuurproduserende organismes volledig geïnhibeer (Restaino et al., 1981; Sofos et al., 1979). Sorbiensuur en kaliumsorbaat inhibeer groei van Bacillus cereus volledig by konsentrasies van 0,2 % (2000 mg. ℓ^{-1}) en 0,4 % (4000 mg. ℓ^{-1}) respektiewelik en die groei van B. subtilis word volledig geïnhibeer by 0,1 % (1000 mg. ℓ^{-1}) sorbiensuur en 0,26 % (2600 mg. ℓ^{-1}) kaliumsorbaat. By konsentrasies van 0,015 (150 mg. ℓ^{-1}) tot 0,05 % (500 mg. ℓ^{-1}) natriumsorbaat (pH 6,0) vind ontkieming van die spore van Bacillus-spesies plaas, vegetatiewe selle groei uit en verleng, maar kan nie vermeerder deur tweedeling nie. Die spoorontkiemingstempo van Bacillus-spesies word geïnhibeer deur natriumsorbaatkonsentrasies van 0,04 % (400 mg. ℓ^{-1}) (pH 6,0) en hoër (Sofos et al., 1979). Die groei en spoorontkieming van Clostridium botulinum en dus die produksie van botulinum-toksiene in vleisprodukte word geïnhibeer deur die byvoeging van 0,1 % (1000 mg. ℓ^{-1}) kaliumsorbaat (Tompkin et al., 1974).

Omdat die inhiberingsvermoë van sorbaat toeneem met verlaging in pH-waardes (en dus die hoeveelheid ongedissosieerde molekule) is aanvanklik bespiegel dat die inhiberingseffek moontlik direk in verband staan met die betrokke lae pH-waarde. Inhibisie van Clostridium botulinum word egter by pH 6,4 verkry en by hierdie relatief hoë pH-waarde moet die inhiberingsvermoë aan die effek van sorbaat toegeskryf word (Tompkin et al., 1974).

Die meganisme waarvolgens sorbaat inhiberend kan wees, is nie bekend nie, maar die volgende moontlikhede bestaan (Sofos & Busta, 1981):

- i. Inhibisie van verskillende ensiemsisteme
- ii. Inhibisie deur ontkoppeling van oksidatiewe fosforilasie
- iii. Inhibisie van die sulfhidrielsieme - fumarase, aspartase en suksiendehidrogenase
- iv. Inhibering van respirasie deur die kompetetiewe binding van sorbaat met asetaat op die setel van asetiël-koënsiem A vorming
- v. Verlaging van die endogene pH van die sel na opname.

3.1.1.3 NITRIET EN SORBAAT

As gevolg van die inhiberingsvermoë van sorbaat op groei en toksienproduksie van Clostridium botulinum het navorsers probeer aantoon dat hoë konsentrasies nitriet in gepekelde vleisprodukte effektief verlaag kan word deur die gebruik van sorbaat as preserveermiddel. Die "Food Safety and Quality Service" van die USDA het aanbeveel dat natriumnitriet in 'n konsentrasie van 40 d.p.m. ($40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) saam met 0,26 % ($2600 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) kaliumsorbaat gebruik word as anti-botulinum middel (Hallerbach & Potter, 1981).

Die verbeterde inhiberingsvermoë van nitriet en sorbaat wat in kombinasie gebruik word, is onder andere deur die volgende navorsers aangedui:

Hallerbach en Potter (1981)

Leistner et al. (1978)

Sebranek (1979)

Wagner et al. (1982)

Die meganisme waarvolgens sorbaat en nitriet in kombinasie met mekaar werk, vind moontlik plaas deurdat die twee verbindings met mekaar reageer om sterker inhibeermiddels te vorm (Sofos et al., 1979).

Die gebruik van nitriet-sorbaat mengsels as preserveermiddel hou die volgende voordele in (Sofos et al., 1979):

- i. Met laer nitrietvlakke kan die moontlikheid van nitrosamienproduksie verminder word.
- ii. Clostridium botulinum sal net so goed, indien nie beter, geïnhibeer word as wat met nitriet of sorbaat alleen verkry word.
- iii. Die lae nitrietvlakke wat gebruik word, sal nog steeds aan gepekelde vleisprodukte die kenmerkende kleur en geur gee.
- iv. Rakstabiliteit van die produkte sal verhoog.
- v. Sorbaat kan nie 'n gesondheidsrisiko veroorsaak nie, omdat dit 'n metaboliseerbare "GRAS"-bestanddeel is (kyk 3.1.1.2).
- vi. Die tipe prosessering van vleis hoef nie verander te word nie.

3.1.2 HITTEWEERSTANDBIEDENDHEID

Voedselpreservering deur middel van hitte kan in twee temperatuur-kategorieë geplaas word:

- Pasteurisasie behels die vernietiging van siekteveroor sakende organismes, of die vernietiging en vermindering van die aantal bederfor gismes wat in voedsel voorkom.
- Sterilisasie behels die vernietiging van alle lewensvatbare mikroörganismes wat waarneembaar kan wees deur standaard-tegnieke (Jay, 1970).

Die hitteweerstandbiedendheid van mikroörganismes word beïnvloed deur die volgende faktore (Jay, 1970; Kooiman & Jacobs, 1977):

- i. Verlaagde humiditeit verhoog hitteweerstandbiedendheid.
- ii. Teenwoordigheid van vet verhoog hitteweerstandbiedendheid (hou verband met verlaagde humiditeit).
- iii. Sommige soute het n beskermende effek teen hitteweerstandbiedendheid, terwyl ander soute mikroörganismes meer hitte-sensitief kan maak.
- iv. Koolhidrate verhoog hitteweerstandbiedendheid as gevolg van hulle effek op a_w .
- v. By die optimum pH vir groei is die hitteweerstandbiedendheid van n organisme die hoogste.
- vi. Die teenwoordigheid van proteïene en kolloïdale deeltjies in die substraat het n beskermende effek op mikroörganismes en verhoog dus hitteweerstandbiedendheid.
- vii. Hoe groter die lading mikroörganismes wat in die substraat teenwoordig is, hoe hoër is hitteweerstandbiedendheid.
- viii. Bakterieë is meer hitteweerstandbiedend in die stasionêre fase as in die logaritmiëse groeifase (ouer selle is meer hitte-weerstandbiedend).
- ix. Hitteweerstandbiedendheid verhoog as die inkubasiëtemperatuur van die organisme verhoog.
- x. Mikrobiëse inhibeermiddels verlaag hitteweerstandbiedendheid.

- xi. Inaktivering van bakterieë by 'n hoër temperatuur vir 'n korter tyd is meer effektief as by 'n laer temperatuur vir 'n langer tyd.
- xii. Die optimum groeitemperatuur van 'n organisme hou direk verband met hitteweerstandbiedendheid (termofiele organismes is meer hitteweerstandbiedend as mesofiele organismes).

Endospore van spoorvormende bakterieë is die hitteweerstandbiedendste vorm van lewe bekend. Die hitteweerstandbiedendheid van endospore word veroorsaak deur wisselwerking tussen Ca^{2+} , dipikoliensuur, muropeptiede en ander spoorbestanddele (Gould & Hurst, 1969). Hitteweerstandbiedendheid word gemeet in terme van desimale reduksietyd (D-waardes), waar hierdie D-waardes die tyd, in minute, gee wat nodig is om die getal mikroörganismes in 'n kultuur met 90 % (1 log) te verminder, by 'n spesifieke temperatuur. Z-waardes verteenwoordig die verandering in D-waardes met betrekking tot verandering in temperatuur en kan gedefinieer word as die °C nodig om die termiese dodingstyd met een logaritme te verminder (Doores, 1979; Doores & Westhoff, 1981).

Die D-waardes van Bacillus-spesies wissel van 4,4 tot 6,5 minute by 90 °C (Shehata & Collins, 1972). Laktobasille word binne 15 sekondes vernietig by 61,6 tot 73,8 °C (Sharpe & Mattick, 1960) en die D-waarde van Lactobacillus-spesies wissel van 0,4 tot 0,5 minute by 80 °C (Slatter & Holverson, 1947). Die Z-waardes van Lactobacillus-spesies wissel van 7,79 tot 19,83 °C en die van Bacillus coagulans is 9,1 °C (Mikolajick, 1970).

Die hitteweerstandbiedendheid van Sporolactobacillus is afhanklik van die groeitoestande van selle en word beïnvloed deur die tipe media, koolhidraatbron, persentasie koolhidraat in die substraat asook vaste- en vloeistofmedia (Doores, 1979) (kyk 2.1.3.2). By 85 °C is aanvanklik 'n D-waarde van 10 minute vir Sporolactobacillus gevind (Kitahara & Lai, 1976; Kitahara & Suzuki, 1963). Meer onlangse navorsing gee die volgende gemiddelde D-waardes vir hitteweerstandbiedendheid:

53,2 minute by 75 °C
19,5 minute by 80 °C
6,8 minute by 85 °C
5,1 minute by 90 °C

Die gemiddelde Z-waarde van Sporolactobacillus is 13,0 °C (Doores, 1979; Doores & Westhoff, 1981).

Sporolactobacillus is minder hitteweerstandbiedend as Bacillus-spesies as die D-waardes van die twee organismes vergelyk word. Die Z-waarde van Sporolactobacillus is egter heelwat groter as die van Bacillus-spesies maar hierdie waarde is in werklikheid nie beduidend as Sporolactobacillus met Bacillus-spesies vergelyk word nie, want bo 90 °C neem die hitteweerstandbiedendheid van Sporolactobacillus baie drasties af (Doores, 1979; Doores & Westhoff, 1981).

3.1.3 WATERAKTIWITEIT

Die wateraktiwiteit (a_w) van voedsel beïnvloed die vermeerdering en metaboliese aktiwiteite van mikroörganismes, asook hulle weerstandbiedendheid en oorlewingsvermoë. Mikrobiologiese bederf, voedselvergiftiging en fermentasie vind plaas as die a_w van 'n substraat gunstig is vir vermeerdering en metaboliese aktiwiteite van mikroörganismes. Die logaritmiese groeifase, stasionêre fase en dodingstempo van 'n mikrobiële kultuur word deur a_w beïnvloed. Die meeste organismes wat met voedsel geassosieer word, groei die beste by 'n relatief hoë a_w -waarde, terwyl slegs enkeles 'n lae a_w vereis vir optimale groei. Deur die a_w van voedsel te verlaag, word die groei van baie mikroörganismes wat in voedsel voorkom, geïnhibeer en sodoende word 'n preserveringseffek verkry (Leistner et al., 1981).

Die effektiwiteit van inhibering van mikroörganismes deur verlaagde a_w word beïnvloed deur die volgende faktore (Troller & Christian, 1978):

- i. As die inkubasietemperatuur van mikroöbe verlaag word, verhoog die minimum a_w waarby groei sal plaasvind.
- ii. Groei by 'n minimum a_w -waarde vind by 'n optimum pH-waarde plaas.

- iii. Die minimum a_w -waarde vir groei van fakultatief anaërobe organismes is hoër in anaërobe toestande as in aërobe toestande.
- iv. Sommige spesifieke voedingstowwe, byvoorbeeld die aminosuur prolien, stimuleer groei by laer a_w -waardes, maar ander voedingstowwe stimuleer groei slegs by relatief gunstige toestande, dit wil sê by optimale a_w -waardes.

Verlaging van die a_w van 'n substraat word gewoonlik verkry deur die byvoeging van NaCl, glukose, fruktose, gliserol of sorbitol. By enige spesifieke a_w kan definitiewe verskille waargeneem word ten opsigte van die effek van die a_w -verlagende middel op die ontkieming van spore en groei van vegetatiewe selle. Die sterkste inhiberingseffek van verlaagde a_w word waargeneem as ioniese middels soos NaCl gebruik word, terwyl die kleiner molekules soos gliserol 'n swakker inhiberingseffek het (Anagnostopoulus & Sidhu, 1981; Jakobsen & Murrell, 1977; Leistner *et al.*, 1981).

Staphylococcus aureus is een van die a_w -tolerantste bakterieë en groei word waargeneem by a_w -waardes so laag as 0,83 in gliserol-bevattende vleisprodukte (Troller & Christian, 1978). Gram-positiewe organismes is meer weerstandbiedend teen inaktivering deur verlaagde a_w as Gram-negatiewe organismes. Vir die vegetatiewe selle van Bacillus-spesies is die minimum a_w vir groei tussen 0,93 en 0,90; vegetatiewe selle van Clostridium-spesies se minimum a_w vir groei is tussen 0,95 en 0,94 en Lactobacillus-spesies se minimum a_w vir groei is tussen 0,94 en 0,90 (Leistner *et al.*, 1981; Niemand & Holzapfel, 1984).

Die ontkieming en uitgroei van spore van Bacillus- en Clostridium-spesies is baie intensief bestudeer. In die algemeen vind inisiasie van ontkieming by laer a_w -waardes plaas, terwyl die uitgroei van vegetatiewe selle uit die spoor 'n hoër a_w -waarde vereis (Troller & Christian, 1978). Spoorontkieming en groei van Bacillus- en Clostridium-spesies word algemeen geïnhibeer by a_w -waardes kleiner as 0,95 as die a_w met NaCl ingestel is. As a_w met gliserol ingestel is, word Bacillus- en Clostridium-spesies se spoorontkieming en groei geïnhibeer by a_w -waardes kleiner as 0,93 (Jakobsen & Murrell, 1977; Leistner *et al.*, 1981; Troller & Christian, 1978).

Die ontwikkeling van lae a_w ($<0,95$) rakstabile produkte wat 'n terminale hittebehandelingsproses ondergaan om vegetatiewe bakteriese selle te dood, hou al hoe meer belofte in. Verlaagde a_w werk saam met ander faktore om die produkte mikrobiologies en organolepties rakstabil te maak (Leistner *et al.*, 1981).

3.1.4 GAMMA-BESTRALING

Hittebehandeling is seker een van die oudste en mees gebruikte metodes vir fisiese sterilisasie en dekontaminasie van voedselprodukte. Hittebehandeling kan egter nie op vars vleis, vis, groente en vrugte en gedehidreerde kommoditeite soos speserye en meel toegepas word nie. Vernietiging of inaktivering van meeste mikrobies vind by betreklik lae dosisse van gamma(γ)-bestraling plaas (Holzapfel, 1985). Voedselgedraagde siektes soos salmonellose, staphylo-enterotoksikose, Clostridium perfringens enteritis en botulisme word 'n toenemende gesondheidsrisiko in die wêreld en die bestraling van voedsel kan dus 'n belangrike rol speel by programme van voedselpreservering (Kampelmacher, 1981).

Gamma-strale is elektromagnetiese strale met 'n uitsonderlik hoë penetrasievermoë en word uitgestraal deur die opgewekte kern van elemente soos ^{60}Co en ^{137}Ce (Jay, 1970). Die eenheid waarin stralingsenergie uitgedruk word, is die "gray" (Gy) en die desimale reduksiedosis (D_{10}) kan gedefinieer word as daardie dosis wat nodig is om die lewensvatbare getalle van 'n bakteriese kultuur met 90 % (1 log) te verminder (Niemand, 1978; Niemand, 1981).

Die effektiwiteit van bestraling as inhibeermiddel van mikro-organismes word bepaal deur die volgende faktore (Anellis *et al.*, 1977; Jay, 1970):

- i. Die aanvanklike kontaminasievlak van die substraat.
- ii. Die ouderdom en groeikondisies van spesifieke mikroörganismes.
- iii. Die teenwoordigheid van suurstof verlaag bestralingsweerstandbiedendheid.
- iv. Hoë vogtigheid verlaag stralingsweerstandbiedendheid.
- v. Lae pH-waardes verlaag stralingsweerstandbiedendheid.

- vi. Sommige komplekse substrate byvoorbeeld sulfidriëlverbindings, beskerm mikroörganismes teen die effek van straling.
- vii. Die stralingsweerstandbiedendheid van mikroörganismes verminder as ander faktore soos hittebehandeling, NaCl en melksuur in dieselfde sisteem teenwoordig is.

Die presiese dosis wat nodig is vir inaktivering deur bestraling berus op 'n "berekende" waarde as gevolg van die invloed van die verskillende faktore op die stralingsweerstandbiedendheid van mikroörganismes (Mossel & Stegeman, 1985). Aanduidings bestaan dat seldeursnee soms direk verband kan hou met stralingsweerstandbiedendheid (Niemand & Holzapfel, 1984).

Die aanwending van bestraling van voedselprodukte as preserveeringsmaatreël het die volgende voordele (Anellis et al., 1977; Holzapfel, 1985; Kampelmacher, 1981; Anon., 1985):

- i. Rakleef tyd van die produkte kan verleng word.
- ii. Die voorkoms van voedselgedraagde siektes kan verminder word.
- iii. Kruis- en herkontaminasie van voedselprodukte kan uitgeskakel word (bestraling is die terminale stap van prosesering).
- iv. Skep moontlikhede vir die ontwikkeling van nuwe rakstabiele produkte.
- v. Kan die reduksie en uitskakeling van chemiese preserveermiddels tot gevolg hê.
- vi. Bestraling het 'n minder skadelike invloed op kwaliteit en voedingswaarde van produkte as ander terminale prosesse soos byvoorbeeld hittebehandeling.
- vii. As 'n bestralingseenheid eers gebou is, is die koste om dit aan die gang te hou relatief laag.
- viii. Ekonomiese voordele as gevolg van reduksie van na-oes verliese, bevordering van internasionale handel en verbetering van volksgesondheid.

Gram-negatiewe bakterieë en meer spesifiek, ingewandspesies, is in die algemeen meer sensitief vir bestraling as Gram-positiewe bakterieë (Ingram & Farkas, 1977). Die D_{10} -waardes vir meeste

bakterieë is onder 0,8 kGy . Micrococcus radiodurans is besonder weerstandbiedend teen bestraling, met 'n D_{10} -waarde van 2,5 kGy (Jay, 1970). Die stralingsweerstandbiedendheid van die spore van Bacillus- en Clostridium-spesies is heelwat hoër as vir vegetatiewe selle. Die spore van Clostridium botulinum tipe A en sommige rasse van Clostridium perfringens is van die weerstandbiedendste bakteriese vorme teen bestraling (Ingram & Farkas, 1977).

TABEL 3.1 D_{10} -WAARDES VIR SOMMIGE SPOORVORMENDE ORGANISMES EN Lactobacillus-SPESIES (Holzapfel, 1985; Niemand & Holzapfel, 1984; Wallhäusser, 1978)

Organisme	D_{10} -waarde (kGy)	
	Vegetatiewe selle	Spore
<u>Lactobacillus</u> -spesies	0,28 - 0,88	
<u>Bacillus</u> -spesies	0,33 - 0,5	
<u>Bacillus cereus</u>		1,27
<u>Bacillus coagulans</u>		2,50
<u>Bacillus stearothermophilus</u>		1,7 - 3,3
<u>Clostridium botulinum</u> (A)		2,58
<u>Clostridium perfringens</u>		4,2
<u>Clostridium sporogenes</u>		1,6 - 2,2

Die mikrobiologiese kwaliteit van voedsel kan dus effektief verbeter word deur die aanwending van bestralingsdosisse van 4 tot 6 kGy, terwyl voedselbederf en die voorkoms van voedselgedraagde siektes drasties verlaag kan word (Holzapfel, 1985; Mossel & Stegeman, 1985).

Gedurende die Internasionale Simposium oor Voedselbestralingsprosesse wat gedurende Maart 1985 in Washington, D.C., gehou is, het 'n paneel van deskundiges van verskillende lande die volgende aanbevelings aan die hand gedoen betreffende die aanwending van voedselbestraling in ontwikkelende lande (Anon, 1985):

- i. Baie meer is bekend oor die veiligheid van voedselbestraling as 'n fisiese proses, as wat bekend is oor die meeste ander voedselpreserveringstegnieke. Regerings van die lande moet hierdie feit erken en alle moontlike stappe doen om hierdie tegnologie tot voordeel van die mensdom op kommersiële skaal

aan te wend.

- ii Programme wat bestraling gebruik om besmetting van opgebergde voedsel te voorkom, behoort geïmplementeer te word. Dit sal onmiddellike ekonomiese voordele inhou, asook verbeterde volksgesondheid, deurdat voedingstandaarde sal verhoog en chemiese preserveermiddels vervang sal word.
- iii. Programme wat bestraling gebruik as ontsmettingsmetode van vrugte, as metode van bevredigende kwarantynvereistes, moet geïmplementeer word. Ekonomiese voordele sal verkry word deur bevoordeling van internasionale handel, asook sekondêre voordele soos die reduksie van na-oes verliese en verbetering van volksgesondheid.
- iv. Bestraling behoort aangewend te word vir die reduksie van voedselgedraagde siektes wat ontstaan as gevolg van kontaminasie deur patogene mikroörganismes. Verbetering in volksgesondheid is hier 'n primêre voordeel, maar die internasionale handel sal ook daardeur bevoordeel word.
- v. Ontwikkeling van streekshulpprogramme deur internasionale- en nasionale organisasies moet ondersteun word, want sulke programme is 'n baie effektiewe metode om aanvaarbaarheidstudies uit te voer.
- vi. Moontlike ondersteuners van die voedselbestralingsproses moet aangemoedig word om die aandag van nasionale instellings te vestig op die sleutelrol wat wetgewing kan speel om die bestralingsproses volgens algemene standaarde te beheer.
- vii. Alle moontlike ondersteuning moet gegee word vir die produksie van opvoedkundige- en publisiteitsmateriaal deur nasionale- en internasionale instellings met die oog op die hoogste aanvaarbaarheid van die proses deur verbruikers.

3.2 PROSEDURES

By die uitvoering van alle eksperimente is die volgende organismes as verwysingskulture gebruik:

Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538)

Bacillus cereus (DSM 626)

Clostridium sporogenes (Kulmbach-kultuur)

Al die isolate wat in 2.3.1 verkry is, is by die uitvoering van eksperimente gebruik, tensy anders vermeld. Spoor-suspensies van al die organismes is berei volgens die metode soos beskryf deur Doores en Westhoff (1981). Clostridium sporogenes is deurgaans anaëroob geïnkubeer in anaërobe flesse met Anaerocult A (Merck).

3.2.1 DIE INVLOED VAN NATRIUMNITRIET OP SPOORONTKIEMING EN GROEI

GYP-sop met natriumnitrietkonsentrasies vanaf 100 d.p.m. ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) tot 2000 d.p.m. ($2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) en pH 6,0 is berei. Hierdie reekse GYP-sop + natriumnitriet is na vogtige hittesterilisasie by 121 °C met $0,1 \text{ cm}^3$ van die spoor-suspensies van die verskillende organismes en isolate geïnkuleer. n Hitteskok van 10 minute by 80 °C is aan die geïnkuleerde buise toegedien. Spoorontkieming en groei is na inkubasie by 35 °C vir 5 dae vir Sporolactobacillus en Clostridium en 2 dae vir Bacillus bepaal in terme van troebelheid, met n Gilford 2600 spektrofotometer. Die resultate wat verkry is, is persentasiegewys uitgedruk in terme van spoorontkieming en groei by 0 % natriumnitriet (Tabel 7.2). Die minimum inhiberende konsentrasie natriumnitriet vir organismes is afgelees vanaf Fig. 3.1 nadat % spoorontkieming en groei as funksie van natriumnitrietkonsentrasie uiteengesit is. Daar is op n inhibisiewaarde van 30 % groei in terme van die kontrole, as afsnypunt vir die minimum inhiberende konsentrasie, besluit.

3.2.2 DIE INVLOED VAN KALIUMSORBAAT OP GROEI EN SPOORONTKIEMING EN GROEI

GYP-sop met kaliumsorbaatkonsentrasies vanaf 0,1 % ($1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) tot 2 % ($20000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) en pH 6,0 is berei. Hierdie reekse GYP-sop + kaliumsorbaat is na vogtige hittesterilisasie by 121 °C met $0,1 \text{ cm}^3$ aktiefgroeiende vegetatiewe selle en $0,1 \text{ cm}^3$ spoor-suspensies van die verskillende organismes en isolate geïnkuleer. n Hitteskok van 10 minute by 80 °C is aan alle buise wat met spoor-suspensies geïnkuleer is, toegedien. Spoorontkieming en groei van spore en groei van vegetatiewe selle is na inkubasie by 35 °C vir 5 dae, vir Sporolactobacillus en Clostridium en 2 dae vir Bacillus bepaal in terme van troebelheid, met n Gilford 2600 spektrofotometer. Resultate wat verkry is, is persentasiegewys uitgedruk in terme van spoorontkieming en groei by 0 %

kaliumsorbaat (Tabel 7.3 en 7.4). Die minimum inhiberende konsentrasie kaliumsorbaat vir organismes is afgelees vanaf Fig. 3.2 en Fig. 3.3 nadat % groei en % spoorontkieming en groei as funksies van kaliumsorbaatkonsentrasie uiteengesit is.

3.2.3 GROEI VAN Sporolactobacillus BY VERLAAGDE a_w -WAARDES

Die a_w van GYP-sop is by verskillende a_w -waardes ingestel deur die toevoeging van verskillende konsentrasies NaCl en gliserol (Winer, 1984). Die a_w -waardes van die verskillende reekse is na vogtige hittesterilisasie by 121 °C met behulp van 'n Novasina-instrument wat vooraf met 9,52 % NaCl en 26 % gliserol gekalibreer is, bepaal. Die verskillende reekse is met 0,1 cm³ aktiefgroeiende vegetatiewe selle en 0,1 cm³ spoor suspensies van die verskillende organismes en isolate geïnokuleer. 'n Hitteskok van 10 minute by 80 °C is aan alle buise wat met spoor suspensies geïnokuleer is, toegedien. Spoorontkieming en groei van spore en groei van vegetatiewe selle is na inkubasie by 35 °C vir 5 dae vir Sporolactobacillus en Clostridium, en 2 dae vir Bacillus, bepaal, in terme van troebelheid, met 'n Gilford 2600 spektrofotometer. Resultate wat verkry is, is persentasiegewys uitgedruk in terme van spoorontkieming en groei in GYP-sop sonder enige NaCl of gliserol byvoegings ($a_w = 0,985$) (Tabel 7,5; 7.6; 7.7; 7,8). Die minimum a_w waarby spoorontkieming en groei plaasvind, is afgelees vanaf Fig. 3.5; 3,6; 3,7 en 3,8 nadat % spoorontkieming en groei as funksie van a_w uiteengesit is.

3.2.4 BEPALING VAN YD_{10} -WAARDES

Vegetatiewe selsuspensies en spoor suspensies van die verwysingskulture en verteenwoordigende isolate is in hierdie ondersoek gebruik. Vegetatiewe selsuspensies en spoor suspensies van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538), Bacillus cereus (DSM 626), L2403, L2405, L2411 en L2412 is in 2 cm³ volumes GYP-sop versprei. Vegetatiewe selsuspensies en spoor suspensies van Clostridium sporogenes is in 2 cm³ volumes in RCM-sop (Reinforced Clostridial Media: Biolab.) versprei. Die suspensies is voortdurend op ys gehou om spoorontkieming en groei van die organismes te voorkom. Bestraling is by die bestralingsseenheid van die departement Stralingschemie, Atoom-energie-korporasie (AEK), Pelindaba, gedoen. Die bestralings-

eenheid is n Gammabeam 650 (Kanada) met n ^{60}Co -bron. Vegetatiewe selsuspensies is met bestralingsdosisse vanaf 0,5 kGy tot 4 kGy, met inkremente van 0,5 kGy, aan ioniserende strale onderwerp en spoorsuspensies met bestralingsdosisse vanaf 1 kGy tot 8 kGy, met inkremente van 1 kGy. Na bestraling is verdunningsreekse in kwartsterkte Ringer-oplossing berei en op ooreenstemmende agarmedia uitgeplaat volgens die standaard metode met behulp van glasspreiers (Gerhardt et al., 1981). Agarplate vir Sporolactobacillus is by 35 °C vir 5 dae geïnkubeer, agarplate vir Bacillus cereus by 37 °C vir 2 dae en agarplate vir Clostridium sporogenes by 37 °C vir 5 dae. Na inkubasie is die aantal kolonies op die plate getel en die aantal oorlewende organismes by elke bestralingsdosis in terme van logs is bereken (Tabel 7.9 en 7.10). Die D_{10} -waardes vir γ -bestraling is verkry vanaf die helling van die grafiek waar logs van die aantal oorlewende organismes as funksie van bestralingsdosis uiteengesit is (Fig. 3.10 en 3.11).

3.3 RESULTATE EN BESPREKING

Alle resultate wat gegee word, berus op die gemiddelde waardes van ten minste twee herhalings.

FIG.3.1: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626), L 2407 EN DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN DIE L-ISOLATE (L-gem) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES Na-NITRIET i.t.v. 0mg/l.

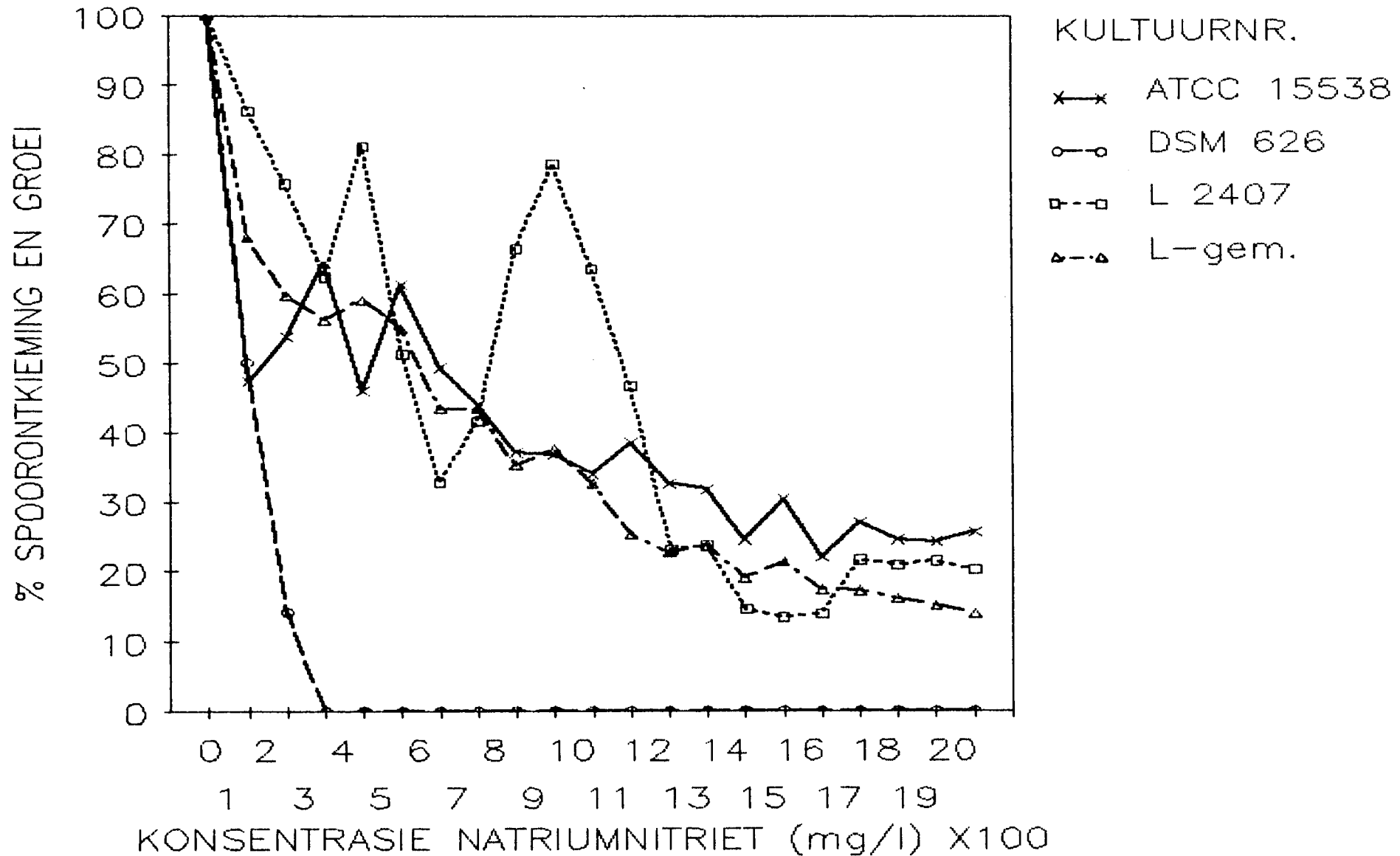


FIG.3.2: PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626) EN DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN DIE L-ISOLATE (L-gem) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES K-SORBAAT i.t.v. 0mg/l K-SORBAAT.

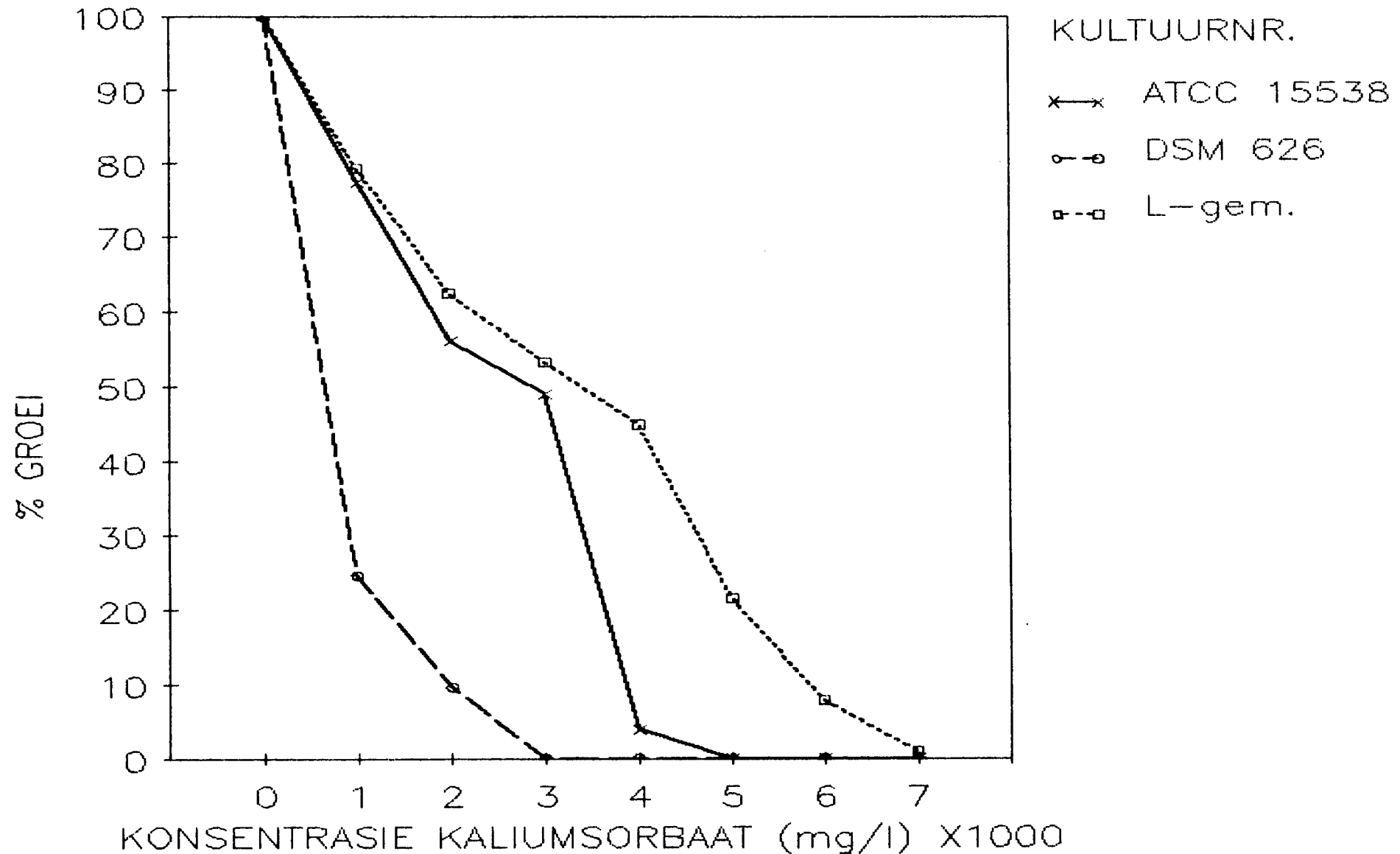


FIG 3.3: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOOR-SUSPENSIES VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15538), *Bacillus cereus* (DSM626) EN GEMIDDELD VAN L-ISOLATE(L-gem) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES K-SORBAAT i.t.v. 0 mg/l.

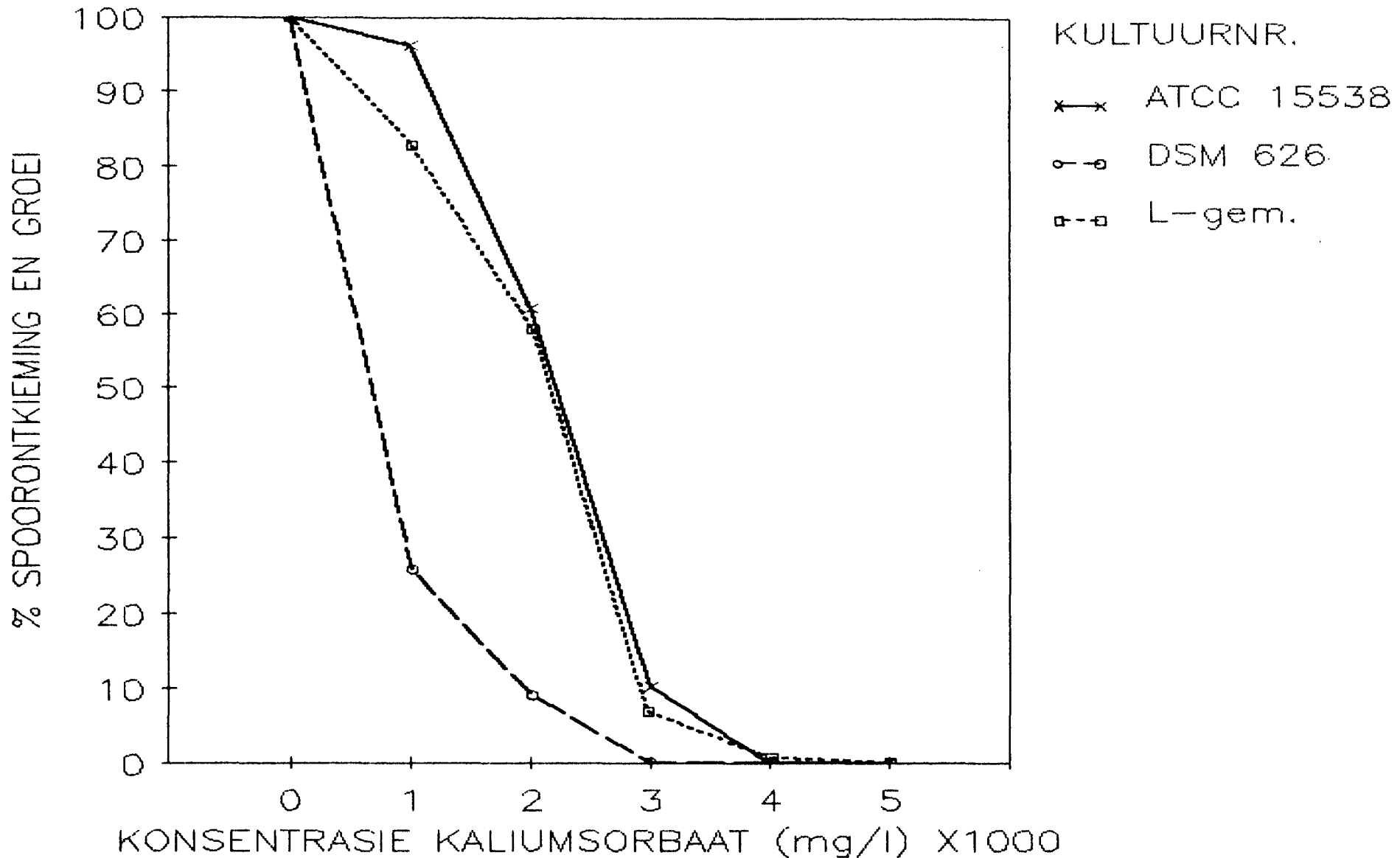


FIG 3.4: PERSENTASIE GROEI EN PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626) EN DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN L-ISOLATE(L-gem) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES K-SORBAAT i.t.v. 0 mg/l K-SORBAAT.

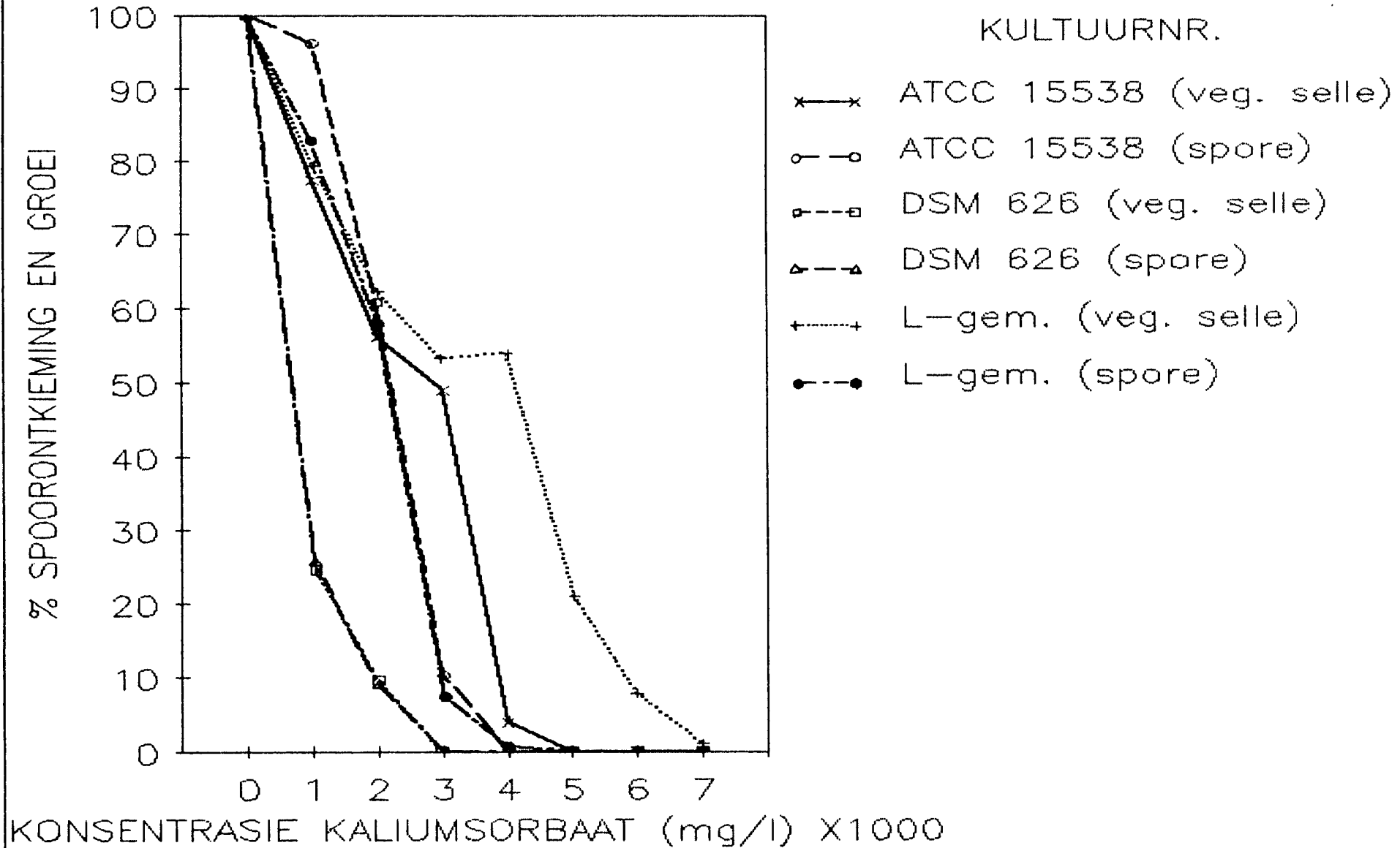


FIG.3.5: PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626), *C sporogenes* EN DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN L-ISOLATE (L-gem) BY VERLAAGDE aw (ingestel met NaCl) i.t.v. aw = 0.995 (kontrole).

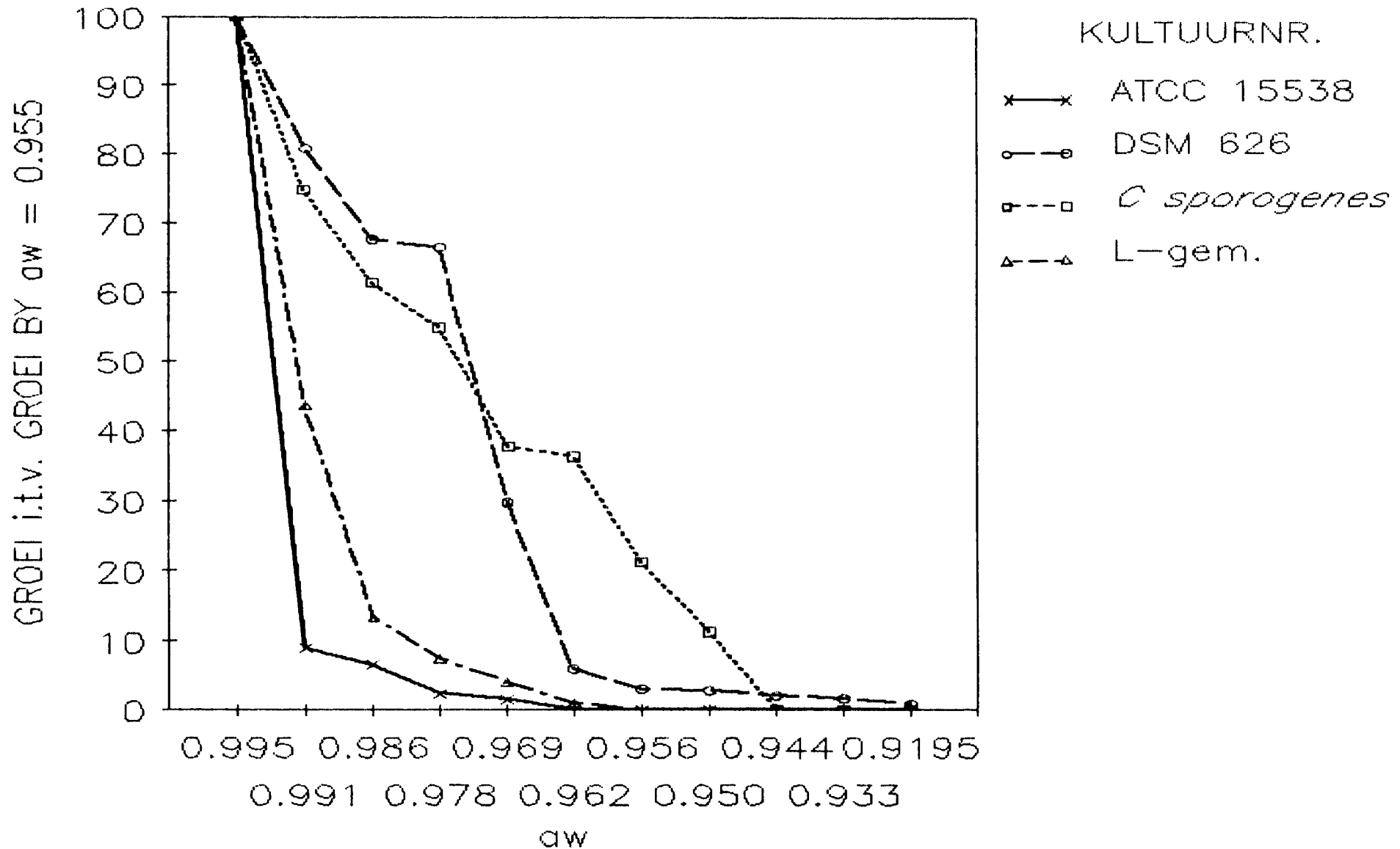


FIG.3.6: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOOR-SUSPENSIES VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626), *C sporogenes* EN DIE GEM. WAARDES VAN DIE L-ISOLATE (L-gem) BY VERLAAGDE aw (ingestel met NaCl) i.t.v. aw =0,995 (kontrolle).

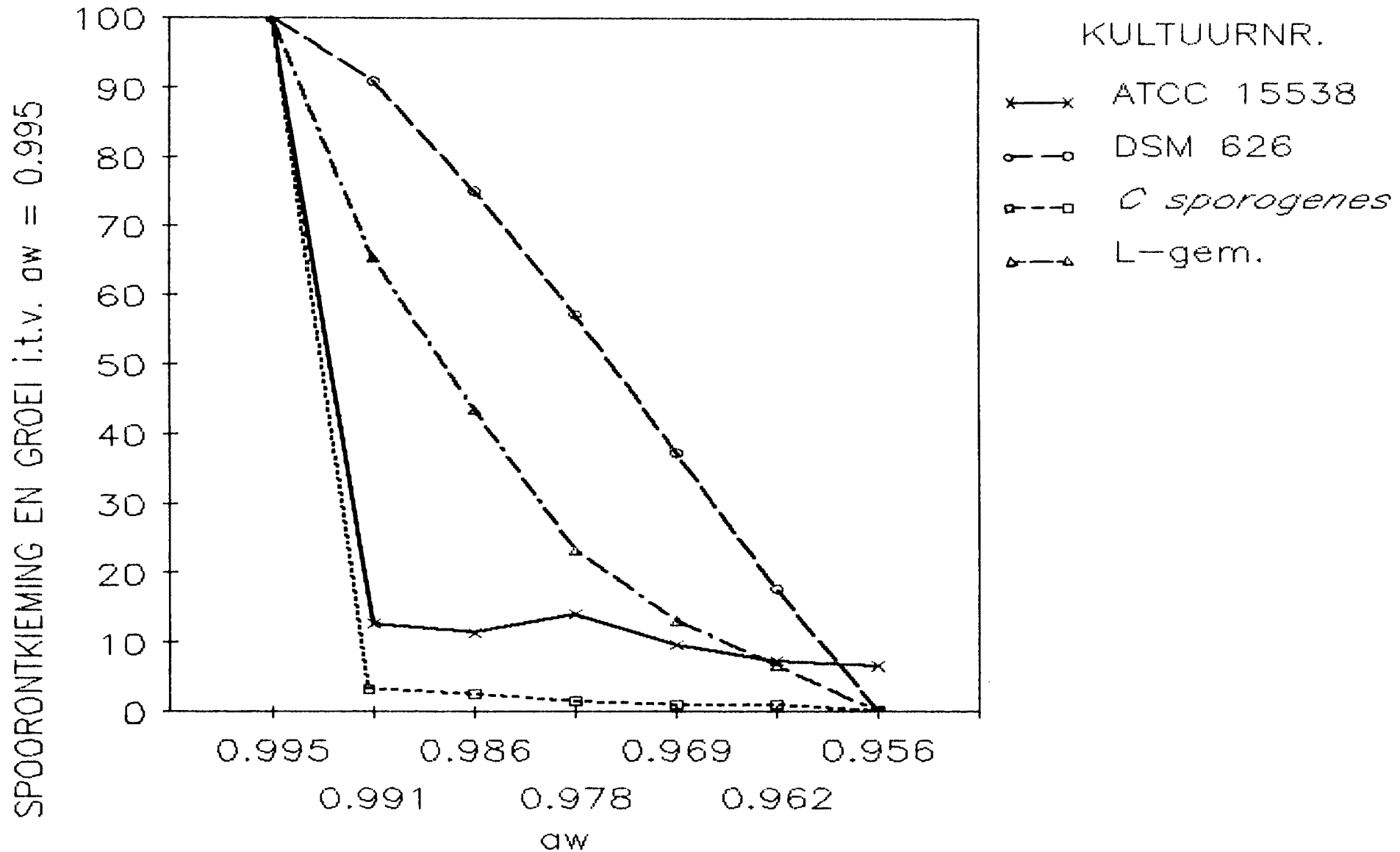


FIG.3.7: PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626), *C sporogenes* EN DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN L-ISOLATE (L-gem.) BY VERLAAGDE aw i.t.v. aw = 0.985 (kontrole).

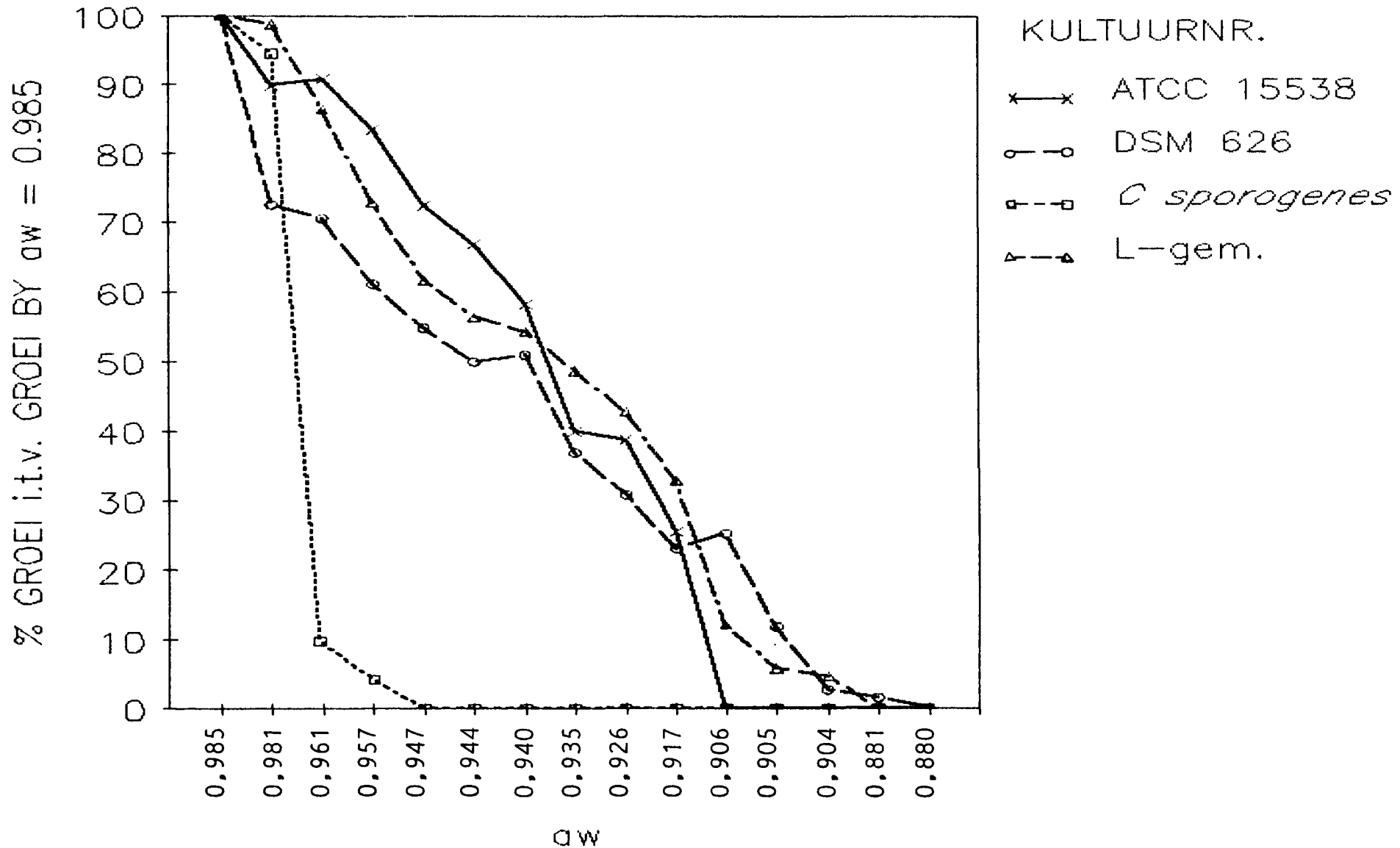


FIG.3.8: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOOR-SUSPENSIES VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626), *C sporogenes* EN DIE GEMIDDELDE WAARDES VAN L-ISOLATE (L-gem) BY VERLAAGDE aw i.t.v. aw = 0.985 (kontrole).

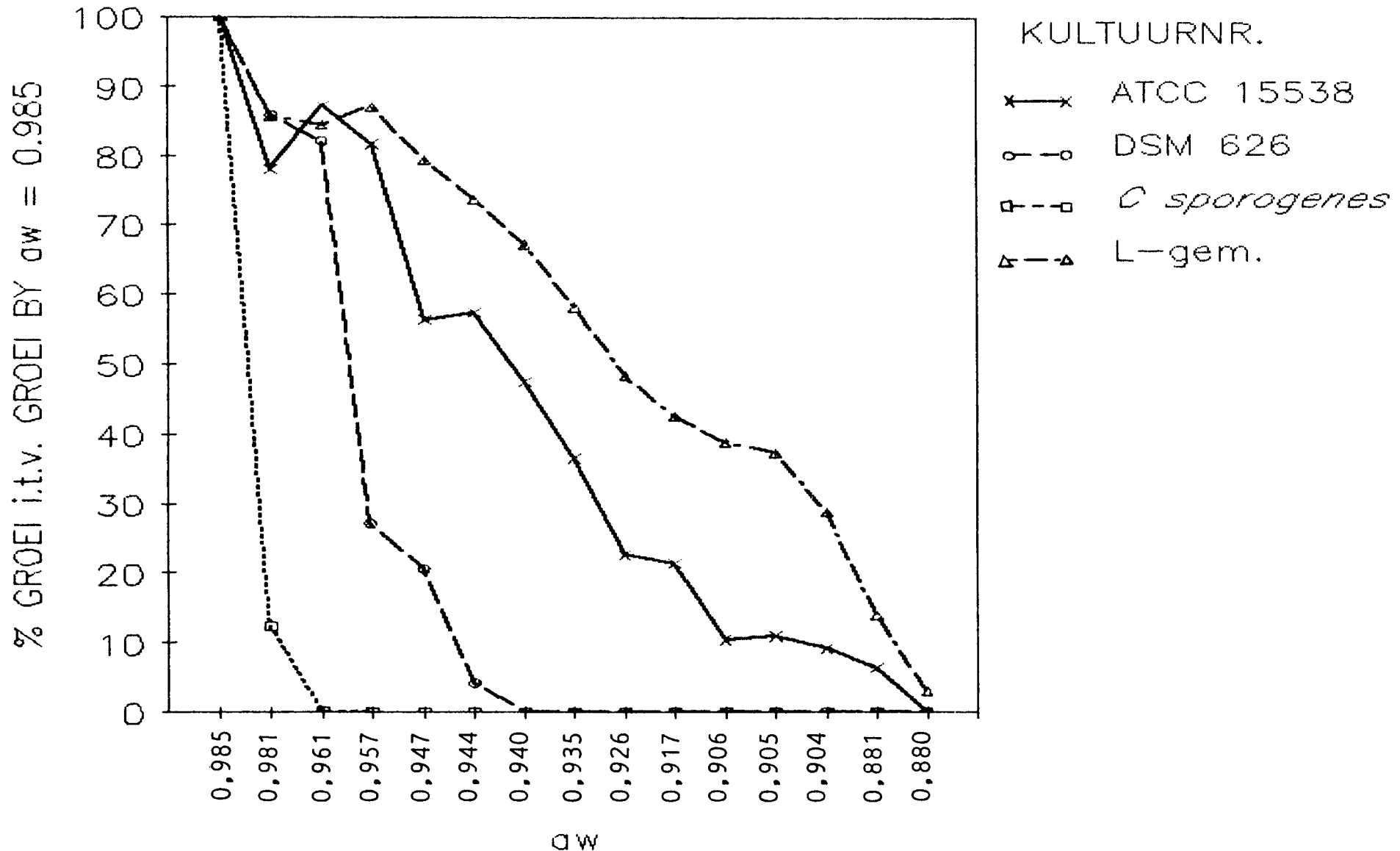


FIG.3.9 PERSENTASIE GROEI EN PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN *S inulinus* (ATCC 15538), *B cereus* (DSM 626), *C sporogenes* EN DIE GEMIDDELTE WAARDES VAN DIE L-ISOLATE (L-gem) BY VERLAAGDE aw i.t.v. aw = 0,985 (kontrole).

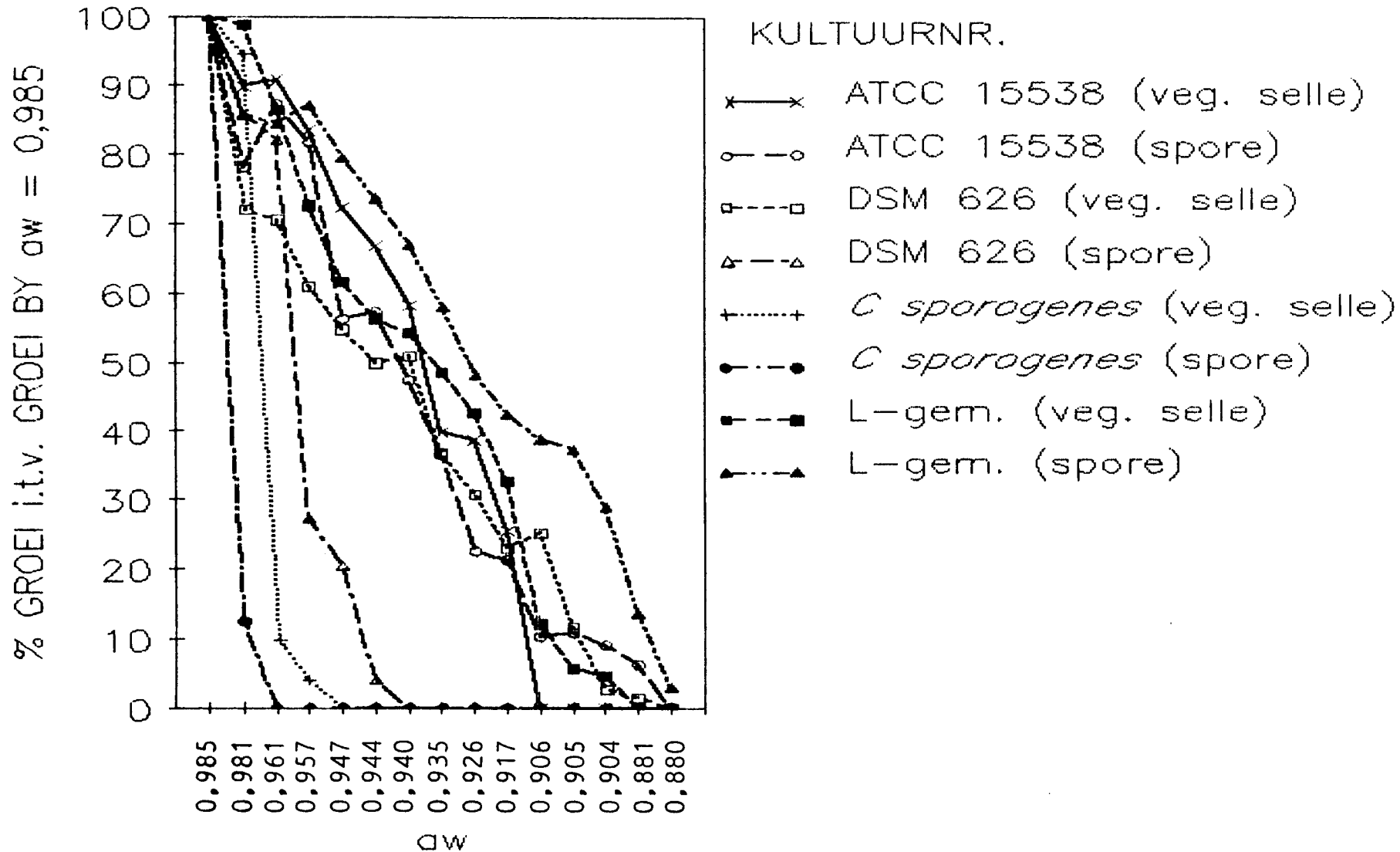


FIG.3.10: LOGS VAN DIE GETAL OORLEWENSE ORGANISMES VAN VEGETATIEWE SELSUSPENSIES IN GYP-SOP AS FUNKSIE VAN BESTRALINGSDOSIS (lewende seltelling /ml).

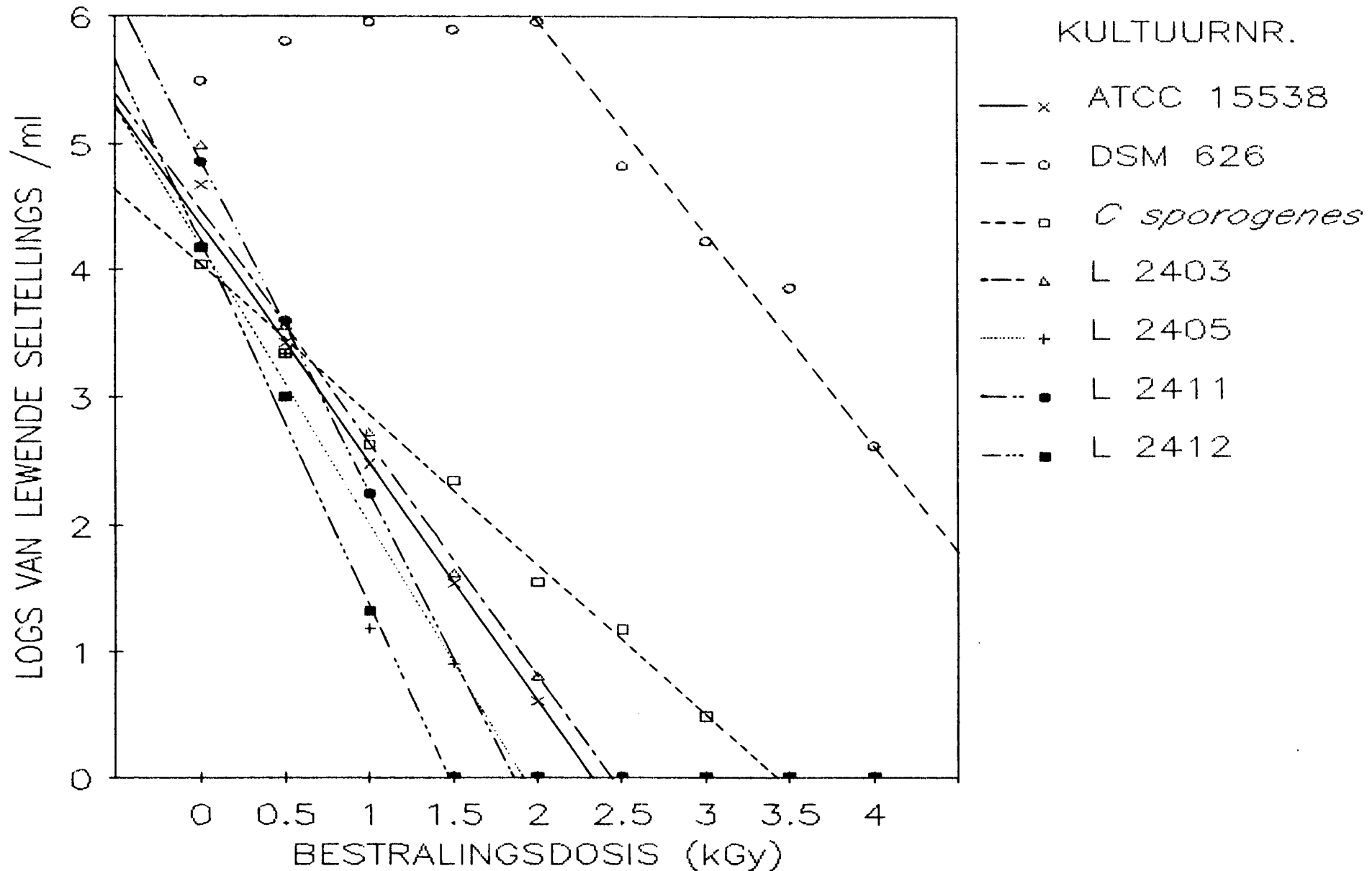
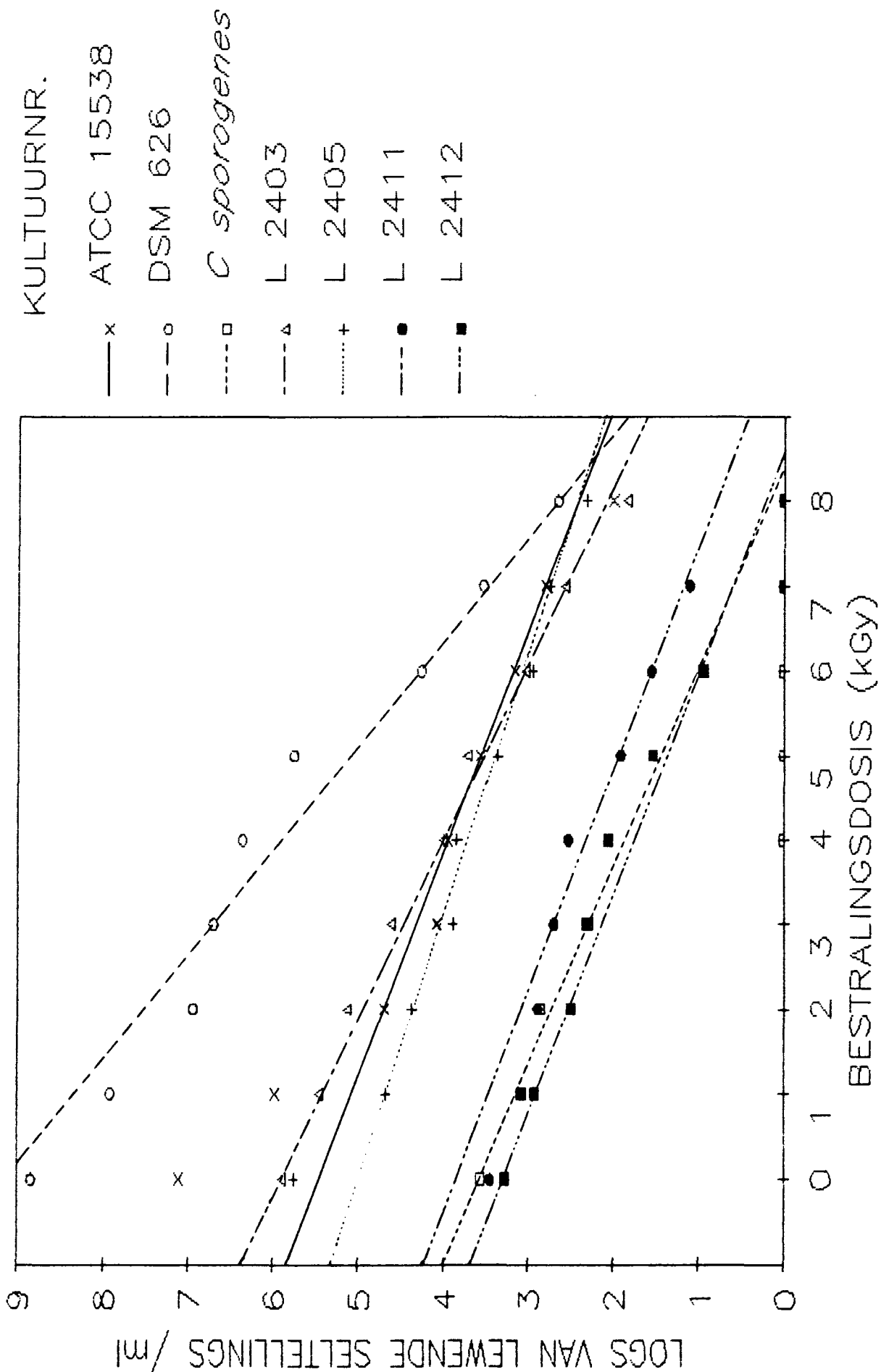


FIG.3.11: LOGS VAN DIE GETAL OORLEWENDE ORGANISMES VAN SPOORSUSPENSIES IN GYP-SOP AS FUNKSIE VAN BESTRALINGS-DOSIS (lewende seltelling /ml).



3.3.1 DIE INVLOED VAN NATRIUMNITRIET OP SPOORONTKIEMING EN GROEI

Spoorontkieming en groei van Bacillus cereus (DSM 626) word sterk geïnhibeer deur relatief lae konsentrasies natriumnitriet, in vergelyking met spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) (kyk Fig. 3.1). Die weerstand van die Sporolactobacillus-isolate (L-gem.) is effens laer as die van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) maar baie hoër as die van Bacillus cereus (DSM 626) en vergelyk in werklikheid goed met die weerstand van die outentieke stam van Sporolactobacillus (ATCC 15538).

Bacillus cereus (DSM 626) se spoorontkieming en groei word volledig geïnhibeer by $300 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ natriumnitriet. By $200 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ is inhibisie van Bacillus cereus (DSM 626) alreeds sterk (14,12 % spoorontkieming en groei). Hierdie inhiberende konsentrasie vergelyk goed met resultate soos verkry deur Nielsen en Zeuthen (1984) ($200 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$) en Sofos *et al.* (1979) ($300 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$).

Clostridium sporogenes groei glad nie in teenwoordigheid van natriumnitriet nie.

By Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en Sporolactobacillus-isolate (L2401 tot L2412) kan groei nog waargeneem word tot 'n konsentrasie van $2000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ natriumnitriet. Sporolactobacillus besit dus net soos sommige Lactobacillus-spesies 'n relatief hoë weerstand teen natriumnitriet as chemiese preserveermiddel (Nielsen, 1983). Dit sou wenslik wees om die inhiberingseffek van natriumnitriet op Sporolactobacillus te definieer in terme van 'n minimum inhiberende konsentrasie (m.i.k.), waar die m.i.k. daardie konsentrasie is waarby spoorontkieming en groei onder 'n sekere persentasie sal wees. By 30 % spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus is die m.i.k. ongeveer $1300 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, dit is egter moeilik om 'n absolute m.i.k. vir spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus daar te stel, want by $2000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ natriumnitriet wissel die persentasie spoorontkieming en groei tussen 3,57 % (L2410) en 25,63 % (ATCC 15538) (kyk Tabel 7.2).

Spoorontkieming en groei van L2407 word skynbaar gestimuleer by natriumnitriekonsentrasies van 800 tot $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ (kyk Fig. 3.1),

maar by natriumnitrietkonsentrasies bo $1200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ word L2407 op dieselfde wyse geïnhibeer as ander Sporolactobacillus-isolate.

3.3.2 DIE INVLOED VAN KALIUMSORBAAT OP GROEI EN SPOORONTKIEMING EN GROEI

Die groei van vegetatiewe selle van Bacillus cereus (DSM 626) word baie sterker deur kaliumsorbaat geïnhibeer as die groei van vegetatiewe selle van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538). Die Sporolactobacillus-isolate (L-gem.) word min of meer op dieselfde wyse deur kaliumsorbaat geïnhibeer as Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538), maar die konsentrasie kaliumsorbaat waarby volledige inhibisie plaasvind, is hoër vir die isolate (L-gem.) as vir Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) (kyk Fig. 3.2).

Spoorontkieming en groei van Bacillus cereus (DSM 626) word ook baie sterker geïnhibeer as dié van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en Sporolactobacillus-isolate (L2401 tot L2412).

Daar bestaan geen verskil tussen die inhibisie van vegetatiewe groei en inhibisie van spoorontkieming en groei van Bacillus cereus (DSM 626) nie. Spoorontkieming gevolg deur groei asook groei van vegetatiewe selle word volledig geïnhibeer by $3000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat (kyk Fig. 3.4). Volgens Sofos *et al.* (1979) word groei van Bacillus cereus volledig geïnhibeer by 'n kaliumsorbaatkonsentrasie van $4000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Volledige inhibisie van vegetatiewe groei van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) vind by 'n kaliumsorbaatkonsentrasie van $5000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ plaas en volledige inhibisie van spoorontkieming en groei by $4000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Vegetatiewe groei by $4000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat is egter baie laag (3,87 %) en dit lyk dus asof volledige inhibisie van spoorontkieming en groei en vegetatiewe groei by ongeveer dieselfde konsentrasie kaliumsorbaat plaasvind.

Vegetatiewe groei van die Sporolactobacillus-isolate (L-gem.) word volledig geïnhibeer by $7000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat en spoorontkieming en groei by $5000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Die vegetatiewe selle van Sporolactobacillus isolate is dus meer weerstandbiedend teen inhibisie deur kaliumsorbaat as die spoorvorm.

By $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat is Bacillus cereus (DSM 626) sterk geïnhibeer, in teenstelling met Sporolactobacillus (waar die effek minimaal was).

Clostridium sporogenes het geen groei getoon as kaliumsorbaat by die medium gevoeg is nie en word dus volledig geïnhibeer by $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat. Tompkin et al. (1974) het die inhibisie van Clostridium botulinum gevind by $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kaliumsorbaat.

3.3.3 GROEI VAN Sporolactobacillus BY VERLAAGDE a_w -WAARDES

3.3.3.1 NaCl AS VOGHOUER

Spoorontkieming en groei van vegetatiewe selle van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en die Sporolactobacillus-isolate (L-gem.) word baie sterk geïnhibeer deur verlaagde a_w , as NaCl as a_w verlagende middel gebruik word. Vegetatiewe selle is reeds by $a_w = 0,986$ baie sterk geïnhibeer (13,39 % groei) en by $a_w = 0,956$ is volledige inhibisie gevind (kyk Fig. 3.5). Spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) is sterk geïnhibeer by $a_w = 0,991$ (12,69 % groei), maar volledige inhibisie vind eers by $a_w = 0,956$ plaas. Spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus-isolate (L2401 tot L2412) is relatief gesproke minder beïnvloed deur verlaagde a_w as Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538), aangesien spoorontkieming en groei nie so sterk by die hoër a_w -waardes geïnhibeer is nie. Volledige inhibisie vind by $a_w = 0,956$ plaas (kyk Fig. 3.6).

Groei van die vegetatiewe selle van Bacillus cereus (DSM 626) en Clostridium sporogenes vind by relatief lae a_w -waardes plaas en die minimum a_w vir groei was 0,919 en 0,944 onderskeidelik (kyk Fig. 3.5). Spoorontkieming en groei van Bacillus cereus (DSM 626) is volledig geïnhibeer by $a_w = 0,956$ terwyl spoorontkieming en groei van Clostridium sporogenes by $a_w = 0,991$ baie sterk geïnhibeer is (3,31 % groei), maar volledige inhibisie vind ook eers by $a_w = 0,956$ plaas (kyk Fig. 3.6).

Omdat daar geen verskil was tussen die minimum a_w waarby groei van vegetatiewe selle en spoorontkieming en groei van spore van

Sporolactobacillus geïnhibeer word nie, en omdat hierdie inhibisie by 'n relatief hoë a_w -waarde plaasvind, lyk dit asof die toksiese effek van NaCl eerder hierdie inhibisie veroorsaak as wat dit toegeskryf kan word aan verlaagde a_w .

3.3.3.2 GLISEROL AS VOGHOUER

As gliserol as a_w -verlagende middel gebruik word, bestaan daar feitlik geen verskil tussen die groei van vegetatiewe selle en die spoorontkieming en groei van spore van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en Sporolactobacillus-isolate (L2401 - L2412) nie (kyk Fig. 3.9). Spoorontkieming gevolg deur groei vind by al die Sporolactobacillus-isolate by laer a_w -waardes plaas as direkte vegetatiewe groei. Hierdie verskynsel is onverklaarbaar en in stryd met bestaande kennis oor die effek van a_w op vegetatiewe groei en spoorontkieming en sal dus beter bestudeer moet word.

Die hoogste inhiberende a_w vir vegetatiewe selle van Sporolactobacillus was ongeveer 0,905 en die hoogste inhiberende a_w vir spoorontkieming en groei 0,880. Met gliserol as voghouer is die groei van vegetatiewe selle van Bacillus cereus (DSM 626) geïnhibeer by $a_w = 0,880$ en spoorontkieming en groei by $a_w = 0,940$.

Clostridium sporogenes is baie sensitief vir verlaagde a_w ; groei van vegetatiewe selle is geïnhibeer by $a_w = 0,947$ en spoorontkieming en groei van spore by $a_w = 0,961$.

Die minimum a_w -waarde waarby spoorontkieming en groei van Bacillus cereus (DSM 626) en Clostridium sporogenes gevind is, vergelyk goed met die inhiberende $a_w < 0,93$ (met gliserol as voghouer) soos gevind deur Jakobsen en Murrell (1977), Leistner *et al.* (1981) en Troller en Christian (1978). Soos reeds aangedui deur Anagnostopoulos en Sidhu (1981), Jakobsen en Murrell (1977) en Leistner *et al.* (1981) bestaan daar 'n verskil in die inhiberingseffek van verskillende a_w verlagende middels (NaCl is meer effektief as gliserol weens die hoër toksisiteit van eersgenoemde).

As die resultate wat verkry is met gliserol as voghouer vergelyk word, is dit duidelik dat Sporolactobacillus-spore anders as Bacillus- en Clostridium-spore, by 'n relatief lae a_w kan ontkiem en groei.

3.3.4 BEPALING VAN γ D₁₀-WAARDES

Die D₁₀-waardes vir γ -bestraling bereken vanaf die hellings van grafieke (met die logs van die getal oorlewende organismes as funksie van bestralingsdosis, Fig. 3.10 en 3.11) word in Tabel 3.2 saamgevat.

TABEL 3.2 γ D₁₀-WAARDES VIR VEGETATIEWE- EN SPOORVORM VAN KULTURE EN ISOLATE SOOS IN HIERDIE STUDIE GEVIND

Organisme (Kultuur nr.)	D ₁₀ vegetatiewe selle (kGy)	D ₁₀ spore (kGy)
<u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC 15538)	0,525	2,55
<u>Bacillus cereus</u> (DSM 626)	0,575	1,25
<u>Clostridium sporogenes</u>	0,85	2,30
L2403	0,525	2,10
L2405	0,45	2,85
L2411	0,375	2,50
L2412	0,350	2,55

Die D₁₀-waardes vir spore van Bacillus cereus en Clostridium sporogenes stem ooreen met dié in die literatuur (Wallhäusser, 1978). Die D₁₀-waardes vir vegetatiewe selle van Clostridium sporogenes is relatief hoog, hoewel die resultate toon dat dit nie met die moontlike teenwoordigheid van endospore verband hou nie (kyk Fig. 3.10).

Die D₁₀-waardes vir vegetatiewe selle van Sporolactobacillus is laer as vir B. cereus en C. sporogenes soos in hierdie studie gevind, maar is binne die grense wat aangedui word vir Bacillus-spesies (Holzapfel, 1985). Die D₁₀-waardes vir spore van Sporolactobacillus is relatief hoog in vergelyking met Bacillus-spesies en toon ooreenkoms met sommige Clostridium-spesies (Wallhäusser, 1978).

In geheel gesien, is Sporolactobacillus-spore hoogs weerstandbiedend teen γ -bestraling met gemiddelde D₁₀-waardes rondom 2,5 kGy . Daarteenoor toon die vegetatiewe selle na verhouding n betreklik gemiddelde bestandheid vir bakterieë met D₁₀-waardes van 0,525 en laer.

HOOFSTUK 4 RAKSTABIELE PRODUKTE EN ANTAGONISME

4.1 INLEIDING

Soos reeds in Hoofstuk 3 beskryf, het verskillende faktore n invloed op die daarstelling van rakstabiele produkte. Die konsep van rakstabiele produkte berus op hitte-inaktivering van vegetatiewe organismes in geseëlde/vakuumverpakte produkte en inhibisie van spoorontkieming in die produkte deur verlaagde a_w in samewerking met ander faktore soos pH, redokspotensiaal en ander produkbestanddele. Geen preserveermiddels is normaalweg nodig om mikrobiëse groei in hierdie produkte te inhibeer nie (Leistner et al., 1981).

Huidige navorsing op verskeie terreine is gerig op Bioteegnologie en die moontlike biologiese beheer van siektes, plaë en bederf van produkte. Die produksie van bakteriosiene deur Lactobacillus spp. is aangedui (Niemand & Holzapfel, 1984) en as n organisme dus verkry kan word wat antagonisties op bederfbakterieë inwerk terwyl dit geen noemenswaardige effekte op die kwaliteit van voedselprodukte het nie, sal voedselpreservering n nuwe era betree.

4.2 PROSEDURES

4.2.1 BEPALING VAN DIE MOONTLIKE ANTAGONISME VAN Sporolactobacillus TEEN Bacillus-SPESIES

Bacillus spp. wat vir hierdie ondersoek gebruik is, is geïsoleer uit vakuumverpakte, rakstabiele produkte met $a_w < 0,95$ en wat terminaal met hitte behandel is. Die isolate is soos volg geïdentifiseer (Isolaatnommers word in hakies aangedui):

Bacillus cereus (20)

Bacillus cereus var. mycoides (26)

Bacillus subtilis (10)

Bacillus megaterium (22)

Bacillus stearothermophilus (7)

Bacillus sphaericus (35)

Bacillus firmus (3)

Bacillus licheniformes (40)

Antagonisme is getoets met behulp van die oppervlak-diffusiemetode soos beskryf deur Spooner en Sykes (1972) en produksie van bakteriosiene of ander antagonistiese middels is bevestig deur die metode van Mulvany (1970) en die metode van Mayr-Harting et al. (1972).

4.2.2 REAKSIE VAN Sporolactobacillus IN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE PRODUKTE

Frankfurter-tipe emulsie is voor die stopproses met Sporolactobacillus en Sporolactobacillus-plus Bacillus-spoorsuspensies geïnkuleer, sodat n spoorlading van ongeveer $10^6 \cdot g^{-1}$ verkry is. Die spoor-suspensie is in die baksnyer goed met die emulsie gemeng en daarna is die produkte gestop, berook, vakuumverpak en met hitte behandel (gekook) by 78 °C vir 1 uur. As kontrole is Frankfurter-tipe emulsie sonder enige bakteriese inokulum ook berei en net soos die ander behandel. Van elkeen van die drie groepe is monsters by 4 °C, 25 °C en 37 °C geïnkubeer. Periodieke mikrobiologiese analise van die produkte is gedoen deur 10 g monster in 90 cm³ steriele kwartsterkte Ringer-oplossing in n Stomacher Lab-Blender 400 te homogeniseer.

n Reeks verdunnings is uit hierdie 10^{-1} -verdunning berei in steriele kwartsterkte Ringer-oplossing en die verdunningsreekse is volgens die standaardmetode met behulp van glasspreiers (Gerhardt et al., 1981) op ooreenstemmende media vir die organismes uitgeplaat. Dieselfde verdunningsreekse is n hitteskok van 10 minute by 80 °C toegedien en op dieselfde wyse op ooreenstemmende media uitgeplaat, om die aantal spore te bereken. Na inkubasie by 35 °C vir 5 dae vir Sporolactobacillus en 2 dae vir Bacillus is die aantal kolonies op die plate getel en die kontaminasievlakke van die produkte is bereken (Tabel 7.11). Parallel met die mikrobiologiese ondersoeke is die pH- en a_w -waardes van die produkte bepaal met behulp van n TC 1001 pH-meter met n skerppunt glaselektrode en n Novasina a_w -meter onderskeidelik (Tabel 7.12).

4.3 RESULTATE EN BESPREKING

4.3.1 ANTAGONISME VAN Sporolactobacillus TEEN Bacillus-SPESIES

Al die Sporolactobacillus-isolate asook Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) is getoets vir moontlike antagonisme teen Bacillus-spesies.

Slegs L2407 het antagonisme getoon teen:

Bacillus cereus (20)

Bacillus cereus var. mycoides (26)

Bacillus megaterium (22)

Bacillus subtilus (10)

Antagonisme is bevestig deur die metode van Mulvany (1970) en kan dus toegeskryf word aan die produksie van bakteriosien of ander antagonistiese middels.

Geen antagonisme kon aangedui word by die ander organismes nie.

Antagonisme van Sporolactobacillus teen Bacillus-spesies is nog nie voorheen ondersoek nie. Die resultate toon dat een Sporolactobacillus stam (L2407) wel 'n inhiberende effek teen die betrokke Bacillus-stamme gehad het. Hierdie antagonisme kan uitsluitlik toegeskryf word aan die produksie van 'n antagonistiese produk wat moontlik bakteriosien kan wees. Om die aard van die verbinding wat antagonisme teen Bacillus-spesies veroorsaak vas te stel, moet die effek daarvan eers beter bestudeer word.

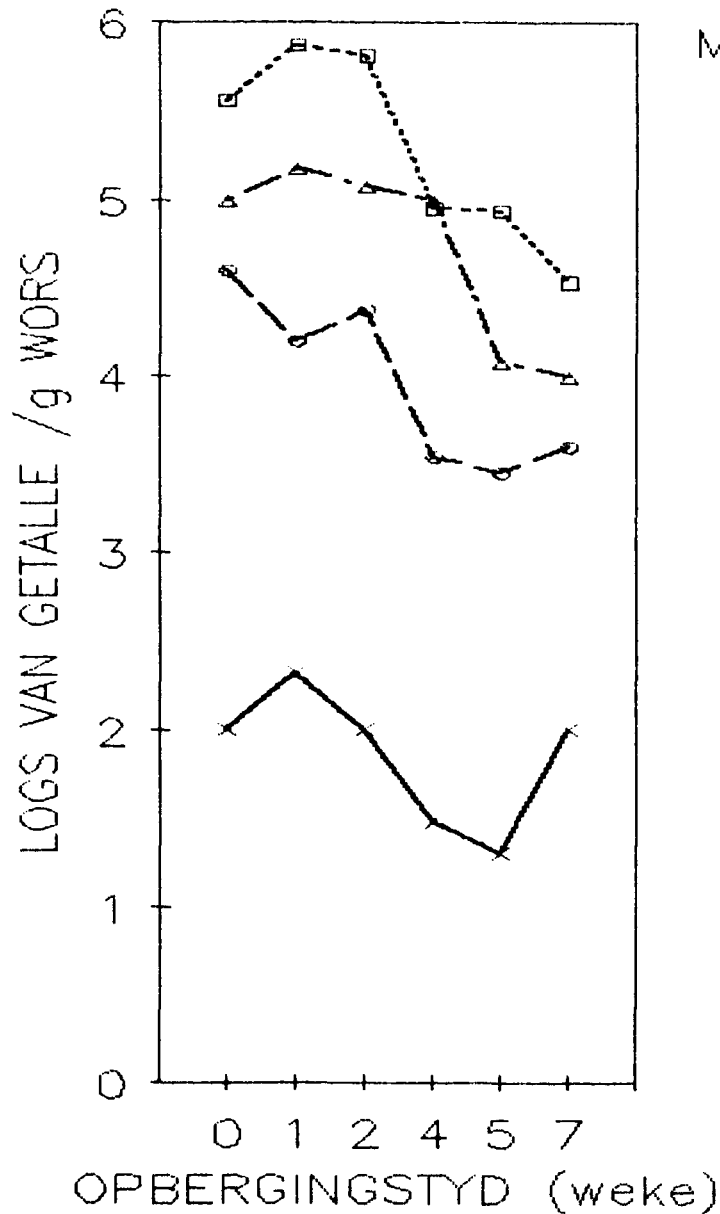
4.3.2 Sporolactobacillus IN EKSPERIMENTELE, RAKSTABIELE PRODUKTE

Kontrole = Frankfurter-tipe wors.

F + S = Frankfurter-tipe wors wat met 'n spoorsuspensie van Sporolactobacillus ingeënt is

F + S + B = Frankfurter-tipe wors wat met spoorsuspensies van Sporolactobacillus en Bacillus-spesies ingeënt is.

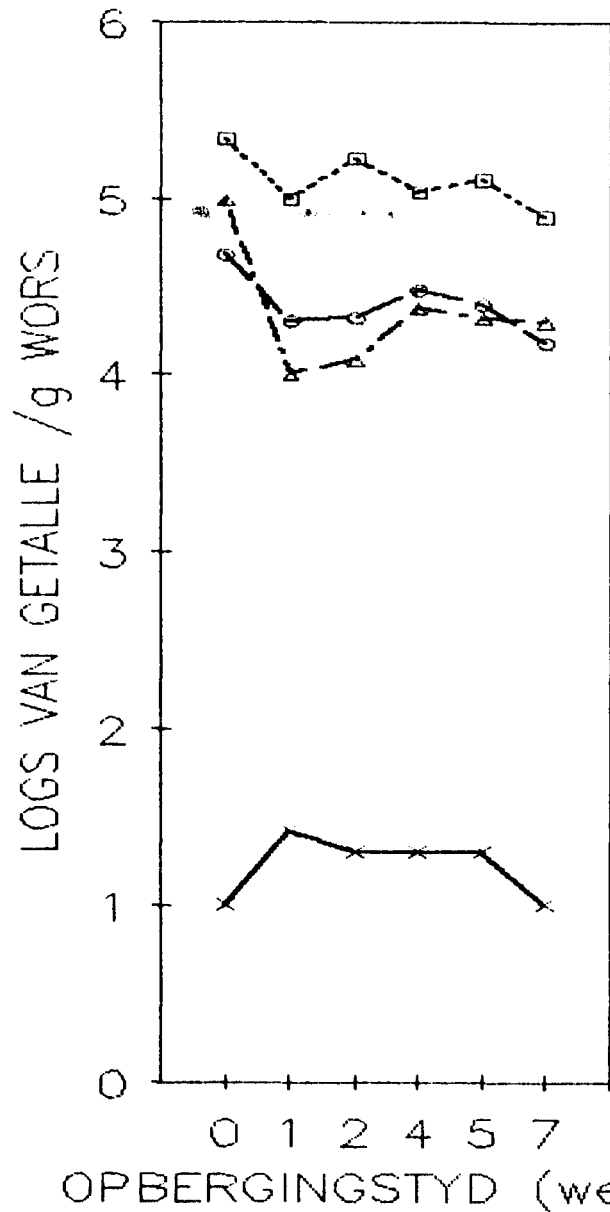
FIG.4.1: VERANDERINGE IN DIE VEGETATIEWE MIKROBEBEPOPULASIE VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 4 C (lewende seltelling/g).



MONSTER.

- x KONTROLE (totale telling)
- o F + S (totale *Sporolactobacillus*)
- F + S + B (totale telling)
- △ F + S + B (totale *Sporolactobacillus*)

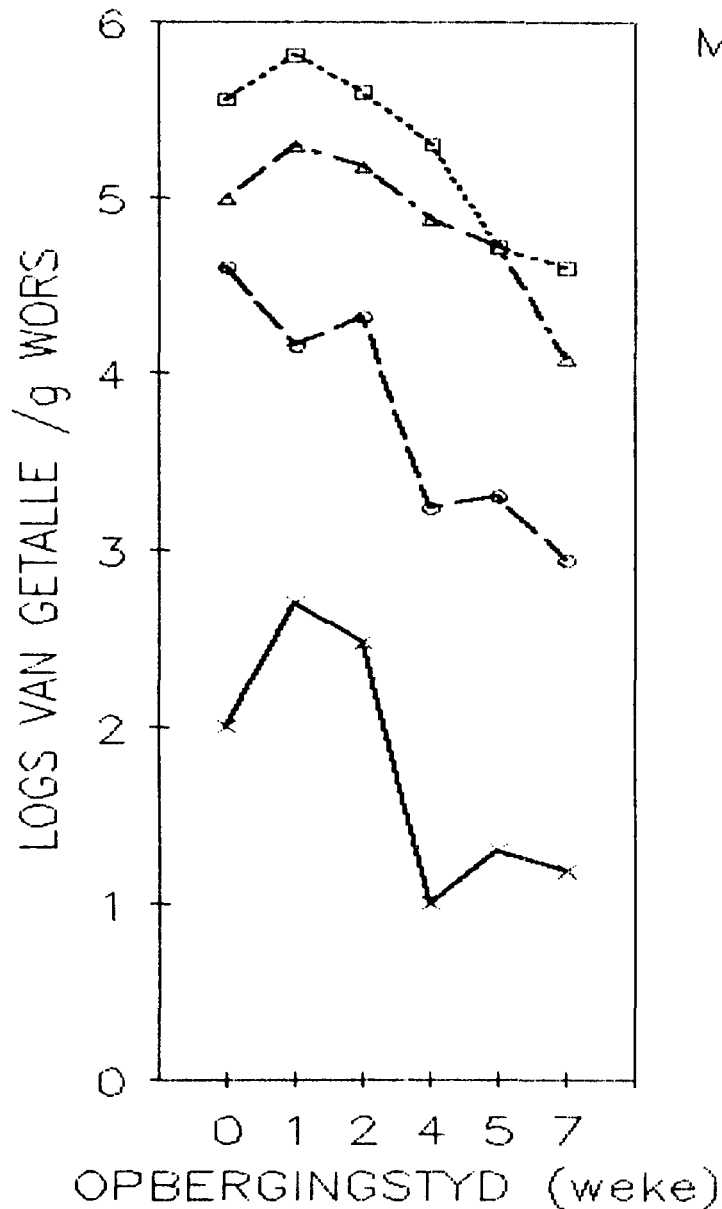
FIG.4.2: VERANDERINGE IN DIE SPOORVORM MIKROBEBEPOPULASIE VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 4 C (lewende seltelling/g).



MONSTER.

- x KONTROLE (totale spore)
- o F + S (*Sporolactobacillus* spore)
- F + S + B (*Bacillus* spore)
- △ F + S + B (*Sporolactobacillus* spore)

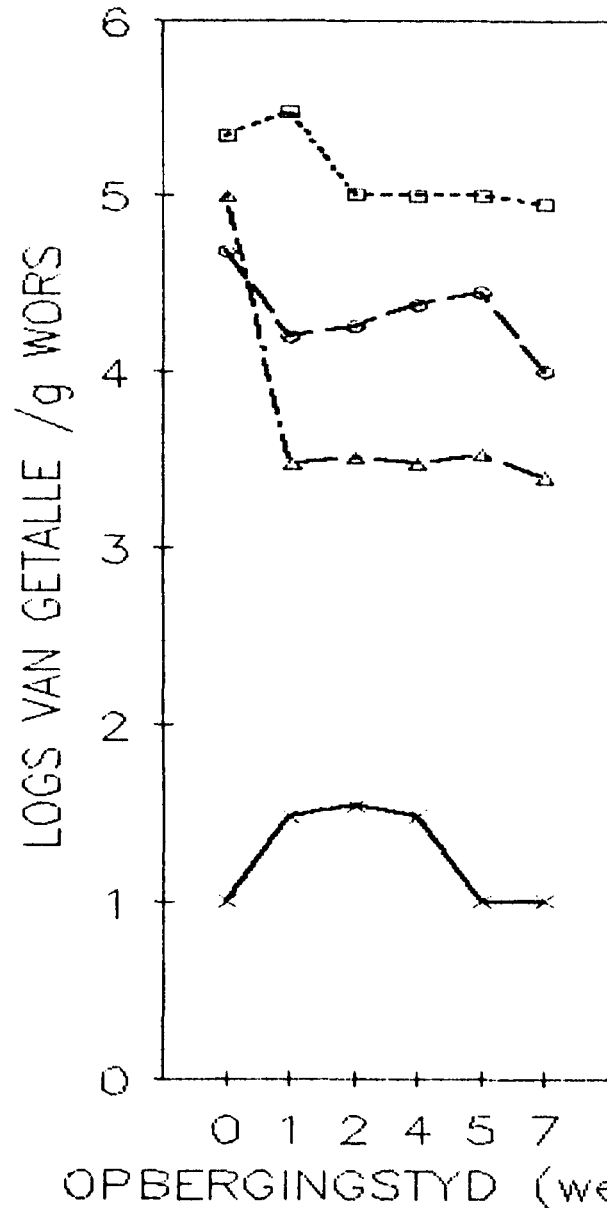
FIG.4.3: VERANDERINGE IN DIE VEGETATIEWE MIKROBEBEPOPULASIE VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 25 C (lewende seltelling /g).



MONSTER.

- x KONTROLE (totale telling)
- o F + S (totale *Sporolactobacillus*)
- F + S + B (totale telling)
- △ F + S + B (totale *Sporolactobacillus*)

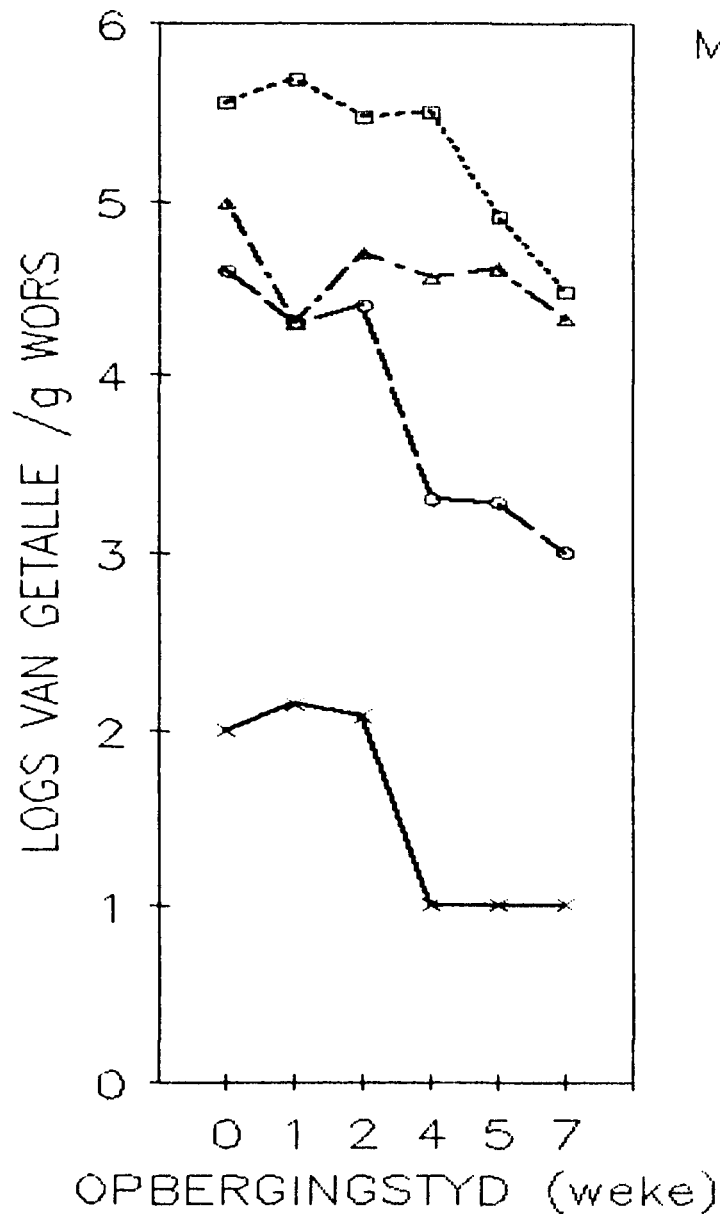
FIG.4.4: VERANDERINGE IN DIE SPOORVORM MIKROBEBEPOPULASIE VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 25 C (lewende seltelling/g).



MONSTER.

- x KONTROLE (totale spore)
- o F + S (*Sporolactobacillus* spore)
- F + S + B (*Bacillus* spore)
- △ F + S + B (*Sporolactobacillus* spore)

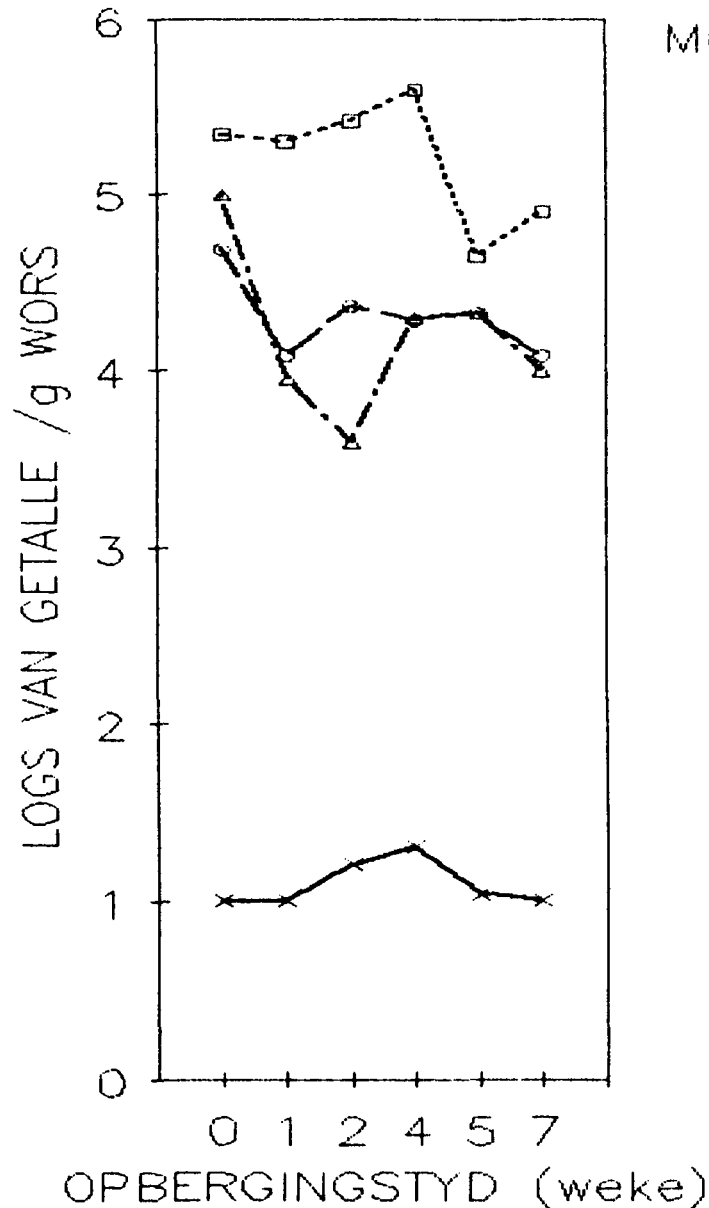
FIG.4.5: VERANDERINGE IN DIE VEGETATIEWE MIKROBEBEPOPULASIE VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 37 C (lewende seltelling/g).



MONSTER.

- x KONTROLE (totale telling)
- o F + S (totale *Sporolactobacillus*)
- F + S + B (totale telling)
- △ F + S + B (totale *Sporolactobacillus*)

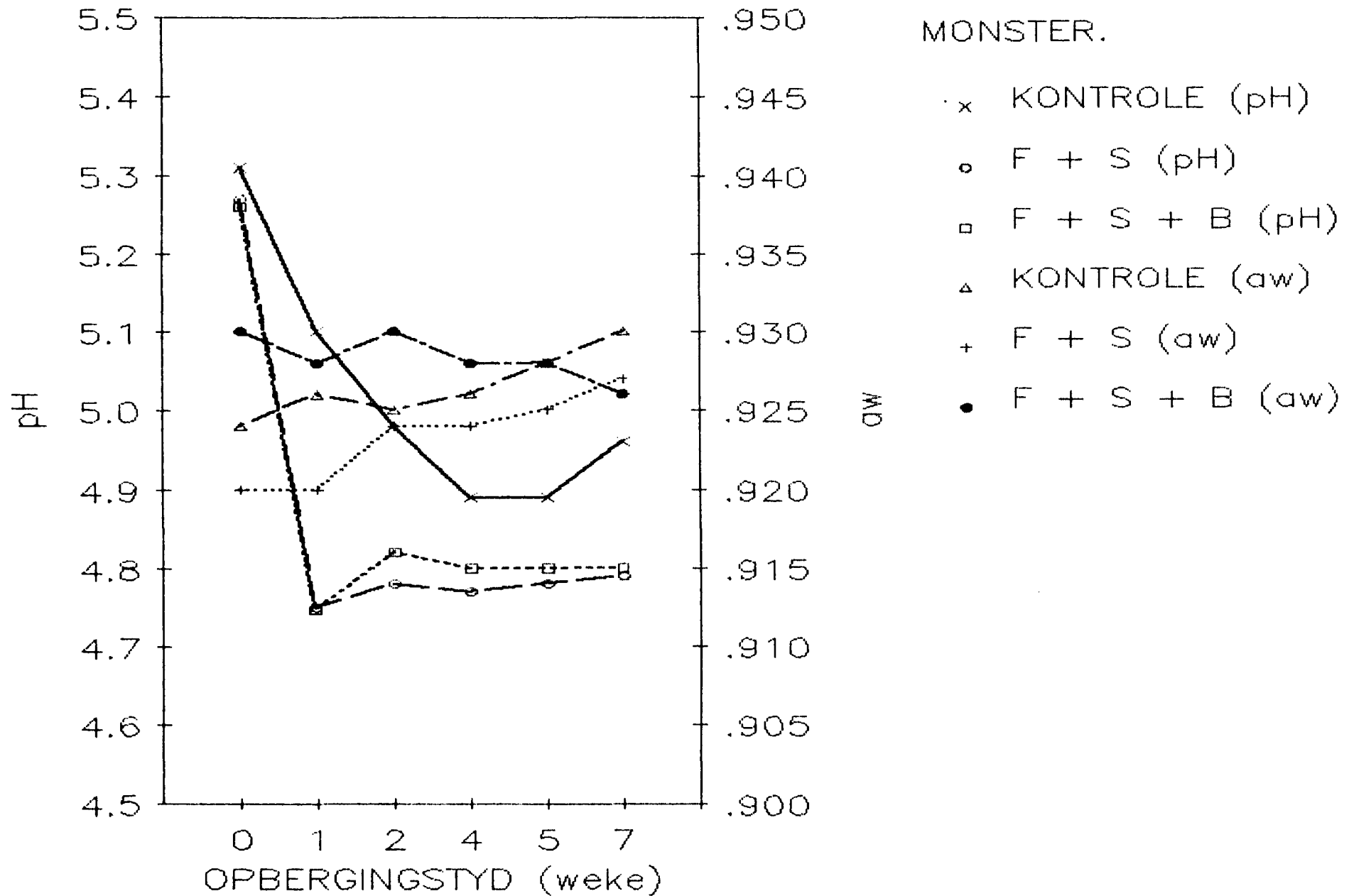
FIG.4.6: VERANDERINGE IN DIE SPOORVORM MIKROBEBEPOPULASIE VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 37 C (lewende seltelling/g).



MONSTER.

- x KONTROLE (totale spore)
- o F + S (*Sporolactobacillus* spore)
- F + S + B (*Bacillus* spore)
- △ F + S + B (*Sporolactobacillus* spore)

FIG.4.7: VERANDERING IN pH— EN aw—WAARDES VAN EKSPERIMENTELE FRANKFURTER—TIPE WORS TYDENS OPBERGING BY 37 C.



Vegetatiewe seltellings en spoortellings toon by al die opbergings-temperature n algemene afname.

Die a_w van die produkte bly konstant oor die opbergingsperiode. Die a_w van die produkte was laer as die beoogde a_w vir hierdie produkte.

Die pH van die produkte wat met Sporolactobacillus-spore ingeënt is en by 25 °C en 37 °C opgeberg is, toon n vinnige aanvanklike daling in vergelyking met produkte wat by 4 °C opgeberg is en kontrole-produkte. Na hierdie aanvanklike vinnige daling in pH, bly die pH min of meer konstant.

Alhoewel geen aktiewe groei en spoorontkieming van Sporolactobacillus waargeneem kon word nie, kan die vinnige aanvanklike pH-daling in die produkte wat met Sporolactobacillus ingeënt is, moontlik dui op metaboliese aktiwiteite van die organisme. Dit is moontlik dat daar by n spesifieke pH en a_w sodanige toestande geskep word wat die metaboliese aktiwiteite van die organismes volledig inhibeer.

Alhoewel verwag kan word dat spore van Sporolactobacillus by die a_w -waarde van hierdie produkte sal ontkiem en groei, kan n hele aantal faktore soos verpakking, pH en samestelling van die produk meewerk om ongunstige toestande vir spoorontkieming en groei te skep. In hierdie produkte kon geen spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus waargeneem word nie.

HOOFSTUK 5 SAMEVATTING EN GEVOLGTREKKINGS

5.1 SAMEVATTING VAN RESULTATE

- i. Uit n totaal van vier-en-vyftig verrykings van monsters vanaf sewe-en-twintig bronne is twaalf isolate van Sporolactobacillus verkry.
- ii. Die twaalf isolate, met kultuurnommers L2401 tot L2412, het ten opsigte van hulle morfologiese- en fisiologiese eienskappe onderling verskil. Hierdie verskille dui moontlik op die bestaan van verskillende biotipes van Sporolactobacillus en moontlik selfs op die bestaan van verskillende spesies van Sporolactobacillus.
- iii. Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en die isolate van Sporolactobacillus (L2401-L2412) het goed by laer pH-waardes (tot 4,0) gegroei en die optimum pH-waarde vir groei was in die pH-gebied van 6,5 tot 7,0.
- iv. Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en die isolate van Sporolactobacillus (L2401 - L2412) besit n relatief hoë weerstand teen inhibering van spoorontkieming en groei deur nitriet ($m.i.k. = 1300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ as 30 % spoorontkieming en groei as afsnypunt geneem word).
- v. Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en die Sporolactobacillus-isolate (L2401 - L2412) besit n hoër weerstand teen inhibering van spoorontkieming en groei van spore en vegetatiewe groei deur kaliumsorbataat as wat bekend is vir ander spoorvormende organismes.
- vi. Ontkieming en groei van die spore van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en Sporolactobacillus-isolate (L2401 - L2412) vind by laer a_w -waardes plaas as wat tot dusver bekend was vir ander spoorvormende organismes. Dit is n verskynsel wat verdere ondersoek verdien.
- vii. Die spore van Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538) en isolate L2403, L2405, L2411 en L2412 is hoogs weerstand-

biedend teen γ -bestraling met 'n gemiddelde D_{10} -waarde van 2,5 kGy .

- viii. Die Sporolactobacillus- isolaat, L2407, was antagonisties teen spesifieke Bacillus-spesies.
- ix. In eksperimentele rakstabiele produkte kon geen aktiewe spoorontkieming en groei van Sporolactobacillus aangedui word nie. Alhoewel spore van die organisme die vermoë besit om by lae a_w -waardes te ontkiem en te groei, is daar waarskynlik 'n interaksie van verskillende faktore in die produk, wat die rakstabiliteit van die produk verseker.

5.2 GEVOLGTREKKINGS

- i. Dit skyn of Sporolactobacillus teen 'n betreklik lae frekwensie in die habitats wat ondersoek is (mis van verskillende herbivore diere, die rumen van 'n bees, die finale afvloeiwatervan 'n abattoir en die risosfeer van plante) voorkom. Nogtans mag die moontlike voorkoms van die organisme in voedsel en veral vleis nie deur voedselprosesseerders uit die oog verloor word nie. Die beperkte inligting wat tans oor hierdie onderwerp beskikbaar is, dui inderdaad op die noodsaaklikheid van verdere navorsing in hierdie rigting.
- ii. Die hoër weerstandbiedendheid van Sporolactobacillus teen chemiese preserveermiddels soos nitriet en sorbaat, die vermoë van die spore van die organisme om by laer a_w -waardes te ontkiem en die hoër weerstandbiedendheid van endospore van die organisme teen γ -bestraling kan veral moontlik aanleiding gee tot probleme in die voedselindustrie. Omdat Sporolactobacillus by relatief lae pH-waardes (pH 4,0) aktief kan groei, moet daar veral gewaak word teen die voorkoms van die organisme in lae pH-produkte.
- iii. Die ontkieming van Sporolactobacillus-endospore by a_w -waardes $<0,94$ is 'n unieke verskynsel en is nog nie tevore vir ander endosporvormers vermeld nie.

- iv. n Intensiewe ekologiese ondersoek kan moontlik aanleiding gee tot die bevestiging van die bestaan van verskillende spesies van Sporolactobacillus en kan ook die spesifieke primêre habitat van die organisme aandui.
- v. Die taksonomiese status van moontlike spesies of biogroepe onder hierdie genus verdien verdere aandag omdat eenvormigheid ten opsigte van die mol % G + C in die DNA nie vir alle isolate gevind is nie.
- vi. Biologiese preservering van voedselprodukte deur Sporolactobacillus kan moontlike potensiaal inhou. Uitsluitel daaroor sal eers verkry word nadat antagonisme van Sporolactobacillus teen ander bederfveroorsoekende organismes beter bestudeer is.
- vii. Rakstabiele produkte besit gewoonlik n hele aantal faktore wat bydra tot die stabiliteit van die produk. Daarom stem eksperimentele resultate wat verkry word ten opsigte van sensitiwiteit of weerstandbiedendheid van mikroörganismes teen inhiberingsfaktore nie altyd ooreen met praktiese resultate nie.

HOOFSTUK 6 BIBLIOGRAFIE

- ANON., 1985. Implementation of the food irradiation process. Report of an expert panel. (In: Food irradiation processing. pp.521-526. Proceedings of a IAEA and FAO Symposium, Washington D.C. 4-8 March 1985. IAEA, Vienna, 1985.)
- ANAGNOSTOPOULOS, G.D. & SIDHU, H.S., 1981. The effect of water activity and a_w controlling solute on spore germination of Bacillus stearothermophilus. J. appl. Bact. 50, 335-349.
- ANELLIS, Abe, SHATTUCK, E., LATT, T., SONGPASERTCHAL, S., ROWLEY, D.B. & ROSS, E.W.Jr., 1977. Gamma irradiation at $-30 \pm 10^{\circ}$ of low level nitrite/nitrate ham. (In: BARKER, A.N., WOLF, J., ELLAR, D.J., DRING, G.J. and GOULD, G.W. (eds.), 1977. Spore research 1976. Vol. II. pp. 631-647 London, Academic Press.)
- BARTHOLOMEW, James W., 1962. Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the result obtained. Stain Technol. 37(3): 139-154.
- BELL, R.G. & DE LACY, Karen M., 1984. Influence of NaCl, NaNO₂ and oxygen on the germination and growth of Bacillus licheniformis, a spoilage organism of chub-packed luncheon meats. J. appl. Bact. 57: 523-530.
- BEUCHAT, L.R., 1981. Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts. J. Fd. Sci. 46: 771-777.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (eds.), 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore. The Williams & Wilkens Company. 1246 pp.
- CASTELLANI, A.G. & NIVEN, C.F., 1955. Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. J. Bact. 7: 283-300.
- CHIRIFE, J., FONTAN, C.F. & SCORZA, O.C., 1981. The intracellular water activity of bacteria in relation to the water activity of the growth medium. J. appl. Bact. 50: 475-479.

- COLLINS, M.D. & JONES, D., 1979. Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of Sporolactobacillus and possible related bacteria. J. appl. Bact. 47: 293-297.
- COLLINS-THOMPSON, D.L. & 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. & LOPEZ, G.R., 1981. Depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed bologna. J. Fd. Prot. 44(8): 593-595.
- COWAN, S.T. & STEEL, K.J., 1966. Manual for the identification of medical bacteria. London. Cambridge University Press, pp. 217.
- DEIBEL, R.H. & EVANS, J.B., 1960. Modified benzidine test for the detection of cytochrome-containing respiratory systems in microorganisms. J. Bact. 79: 356-360.
- DOORES, S., 1979. Isolation, Identification and Heat Resistance of Sporolactobacillus inulinus. 134 pp. Ph.D.-Thesis - University of Maryland.
- DOORES, S., 1983. Bacterial spore resistance-species of emerging importance. Fd. Technol. Nov. 1983: 127-134.
- DOORES, S. & WESTHOFF, D.C., 1983. Selective method for the isolation of Sporolactobacillus from food and environmental sources. J. appl. Bact. 54: 273-280.
- DOORES, S. & WESTHOFF, D.C., 1981. Heat resistance of Sporolactobacillus inulinus. J. Fd. Sci. 46: 810-812.
- EKLUND, T., 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. J. appl. Bact. 54: 383-389.
- FIDDLER, W., PIOTROWSKI, E.G., PENSABENE, J.W., DOERR, R.C. & WASSERMAN, A.E., 1972. Effect of sodium nitrite concentration on N-nitrosodimethylamine formation in frankfurters. J. Fd. Sci. 37: 668-670.

- GERBER, E.S., 1984. Taksonomie van melksuurbakterieë geassosieer met vakuüm-verpakte vleisprodukte. Pretoria. 192 pp. M.Sc. agric-(Mikrobiol.)-verhandeling - Universiteit van Pretoria.
- GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILOW, R.N., NESTER, E.W., WOOD, W.A., KRIEG, R.N. & PHILLIPS, G.B., 1981. Manual of methods for general bacteriology. Washington: American Society for Microbiology. 524 pp.
- GOULD, G.W. & HURST, A., 1969. The bacterial spore. London: Academic Press, 724 pp.
- GRAY, J.I. & RANDALL, C.J., 1979. The nitrite/N-nitrosamine problem in meats: an update. J. Fd. Prot. 42(2): 168-179.
- GRECZ, N., BRUSZER, G. & AMIN, I., 1981. Effect of radiation and heat on bacterial spore DNA. IAEA-SM 250/22: 3-19 (In: Combination processes in Food irradiation. Proceedings of a Symposium, Columbo. 24-28 November 1980. IAEA, Vienna, 1981.)
- GRECZ, N., LO, H., KANG, T.W. & FARKAS, J., 1977. Characteristics of radiation survivalcurves of spores of Clostridium botulinum strains. (In: BARKER, A.N., WOLF, J., ELLAR, D.J., DRING, G.J. & GOULD, G.W. (eds.), 1977. Spore research 1976, Vol. II pp 603-630. London: Academic Press.)
- HALLERBACH, C.M. & POTTER, N.N., 1981. Effects of nitrite and sorbate on bacterial populations in frankfurters and Thüringer Cervelat. J. Fd. Prot. 44(5): 341-346.
- HARPER, J.J. & DAVIES, G.H.G., 1979. Two-dimensional thin-layer chromatography for amino-acid analysis of bacterial cell walls. Int. J. Syst. Bact. 29(1): 56-58.
- HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M.E., 1970. Laboratory methods in microbiology. London: Academic Press. 362 pp.
- HOLZAPFEL, W.H., 1985. Radiation microbiology relevant to the food industry. (In: SAVVOT'85: WNNR-Konferensiesentrum Pretoria, Vol 2, 359-369.)
- HOLZAPFEL, W.H. & 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. C3, 495-502.

- INGRAM, M. & FARKAS, J., 1977. Microbiology of foods pasteurised by ionising radiation. Acta Alimentaria 6(2): 123-185.
- JAKOBSEN, M. & MURRELL, W.G., 1977. The effect of water activity and the a_w -controlling solute on germination of bacterial spores. (In: BARKER, A.N., WOLF, J., ELLAR, D.J., DRING, G.J. & GOULD, G.W. (eds.), 1977. Spore research 1976 Vol II, pp. 819-834. London: Academic Press.)
- JAY, J.M., 1970. Modern food microbiology. New York: Van Nostrand Reinhold Company. 328 pp.
- KAMPELMACHER, E.H., 1981. Prospects of eliminating pathogens by the process of food irradiation. 1981. pp. 265-288. (In: Combination processes in food irradiation. Proceedings of a Symposium, Columbo, 14-28 November 1980. IAEA, Vienna, 1981.)
- KITAHARA, K. & LAI, C-L., 1967. On the spore formation of Sporolactobacillus inulinus. J. gen. appl. Microbiol. 13: 197-203.
- KITAHARA, K. & SUZUKI, J., 1963. Sporolactobacillus nov. subgen. J. gen. appl. Microbiol. 9(1): 59-71.
- KITAHARA, K. & TOYOTA, T., 1972. Autospheroplastization and cell-permeation in Sporolactobacillus inulinus. J. gen. appl. Microbiol. 18: 99-107.
- KOOIMAN, W.J. & JACOBS, R.P.W.M., 1977. The heat resistance of Bacillus subtilis 1-12 in relation to the water activity during pre-equilibration and during exposure to heat. (In: BARKER, A.N., WOLF, J., ELLAR, D.J., DRING, G.J. & GOULD, G.W., 1977. pp.477-485. Spore Research 1976 Vol. II. London: Academic Press.)
- KRUGER, M., 1984. Inleiding tot praktiese bakteriologie; 22/84. Potchefstroom: Departement Sentrale Publikasies. P.U. vir C.H.O., 171 pp.
- LECHOWICH, R.V., BROWN, W.L., DEIBEL, R.H. & SOMERS, I.I., 1978. The role of nitrite in the production of canned cured meat products. Fd. Technol. May 1978: 48-58.
- LEISTNER, L., BEM, Z. & HECHELMANN, H., 1978. Potassium sorbate - an alternative to nitrite in meat products. Presented on September 5, 1978, at the 24th European Meeting of Meat

Research workers, held in Kulmbach, Federal Republic of Germany.

- LEISTNER, L., RÜDEL, W. & KRISPIN, K., 1981. Microbiology of meat and meat products in high- and intermediate-moisture ranges. pp. 855-916. (In: ROCKLAND, L.B. & STEWART, G.F. (ed.), 1981. Water activity: influences on food quality. New York: Academic Press.)
- LIN, H-S. & SEBRANEK, J.G., 1979. Effect of sodium nitrite concentration and packaging conditions on color stability and rancidity development in sliced bologna. J. Fd. Sci. 44: 1451-1454.
- LUSHER, P., DENVER, S.P. & HUGO, W.B., 1984. A note on the effect of dilution and temperature on the bactericidal activity of potassium sorbate. J. appl. Bact. 57: 179-181.
- MARMUR, J. & DOTY, P., 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5: 109-118.
- MAYR-HARTING, A., HEDGES, A.J. & BERKELEY, R.C.W., 1972. Methods for studying bacteriocins. pp. 315-422. (In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., 1972: Methods in Microbiology. Volume 7A. London: Academic Press. 497 pp.)
- MIKOŁOJCZAK, E.M., 1970. Thermodestruction of Bacillus spores in milk. J. Milk Fd. Technol. 33: 61-63.
- MILLER, A., SANDINE, W.E. & ELUKER, P.R., 1970. Deoxyribonucleic acid base composition of Lactobacilli determined by thermal denaturation. J. Bact. 102(1): 278-280.
- MOSEL, D.A.A. & STEGEMAN, H., 1985. Irradiation: an effective mode of processing food for safety. (In: Extended synopses. IAEA-SM-271/80, Washington D.C. 4-8 March 1985. International Symposium on food irradiation processing. IAEA, Vienna, 1985.)
- MULVANY, J.G., 1970. Membrane filter techniques in microbiology. pp. 205-253. (In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., 1970. Methods in microbiology, Volume I. London: Academic Press. 712 pp.)

- NAKAYAMA, O. & YANOSHI, M., 1967a. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from Rhizosphere. I. Taxonomic studies on Bacillus laevolacticus nov. sp. and Bacillus racemilacticus nov. sp. J. gen. appl. Microbiol. 13: 139-153.
- NAKAYAMA, O. & YANOSHI, M., 1967b. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from Rhizosphere. II. Taxonomic studies on the catalase-negative strains. J. gen. appl. Microbiol. 13: 155-165.
- NIELSEN, H.-J.S., 1983. Composition of bacterial flora in sliced vacuum packed bologna-type sausage as influenced by nitrite. J. Fd. Technol. 18: 371-385.
- NIELSEN, H.-J.S. & ZEUTHEN, P., 1984. Growth of pathogenic bacteria in sliced vacuum-packed bologna-type sausage as influenced by nitrite. J. Fd. Technol. 19: 683-394.
- NIEMAND, J.G., 1978. Verlenging van rakleef tyd van voedsel deur ioniserende straling met spesiale verwysing na vleis. Chemie afdeling, Raad op Atoomkrag, Pelindaba.
- NIEMAND, J.G., 1981. Verlenging van die rakleef tyd van vleis deur ioniserende straling. Pretoria. 191 pp. D.Sc.-verhandeling - Universiteit van Pretoria.
- NIEMAND, J.G. & HOLZAPFEL, W.H., 1984. Characteristics of lacto-bacilli isolated from radurised meat. Int. J. Fd. Microbiol. 1: 99-110.
- NORRIS, J.R., 1981. Sporosarcina and Sporolactobacillus. pp. 337-357. (In: BERKELEY, R.C.W. & GOODFELLOW, M. (ed.), 1981. The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification. London: Academic Press.)
- NORRIS, J.R., BERKELEY, R.C.W., LOGAN, N.A. & O'DONNELL, A.G., 1981. The genera Bacillus and Sporolactobacillus. (In: STARR, M.P., STOLP, H., TRÜPER, H.G., BALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G. (ed.), 1981. The Prokaryotes, Volume II. Berlin: Springer-Verlag. 2284 pp.)
- PELCZAR, M.J., REID, R.D. & CHAN, E.C.S., 1977. Microbiology. 4th ed. New York: McGraw-Hill Book Company. 952 pp.

- PERIGO, J.A. & ROBERTS, T.A., 1968. Inhibition of clostridia by nitrite. J. Fd. Technol. 3: 91-94.
- PERIGO, J.A., WHITING, E. & BASHFORD, T.E., 1967. Observations on the inhibition of vegetative cells of Clostridium sporogenes by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of sub-lethally processed cured meats. J. Fd. Technol. 2: 377-397.
- PRAMER, D. & SCHMIDT, E.L., 1965. Experimental Soil Microbiology. Minnesota: Burgess Publishing Company. 107 pp.
- RAJAN, K.S. & GRECZ, N., 1977. Chelation characteristics of calcium in relation to waterbinding and heat resistance of bacterial endospores. (In: BARKER, A.N., WOLF, J., ELLAR, D.J., DRING, G.J. & GOULD, G.W. (ed.), 1977. Spore Research 1976 Vol II. pp. 527-543. London: Academic Press.)
- RESTAINO, L., KOMATSU, K.K. & SYRACUSE, M.J., 1981. Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food-related microorganisms in culture media. J. Fd. Sci. 47: 134-138.
- ROBERTS, T.A., 1975. The microbiological role of nitrite and nitrate. J. Sci. Fd. Agric. 26: 1755-1760.
- ROGOSA, M., 1961. Experimental conditions for nitrite reduction by certain strains of the Genus Lactobacillus. J. gen. Microbiol. 24: 401:408.
- SEBRANEK, J.G., 1979. Advances in the technology of nitrite use and consideration of alternatives. Fd. Technol. July 1979: 58-62 & 93.
- SHARPE, M.E. & MATTICK, A.T.R., 1960. Lactobacilli in milk used for commercial cheese making. J. Dairy Res. 27: 277.
- SHEHATA, T.E. & COLLINS, E.B., 1972. Sporulation and heat resistance of psychrophilic strains of Bacillus. J. Dairy Sci. 55: 1405-1409.
- SIMON, S., ELLIS, D.E., MacDONALD, D.G., MILLER, D.G., WALDMAN, R.C. & WESTERBERG, D.O., 1973. Influence of nitrite and nitrate curing ingredients on quality of packaged frankfurters. J. Fd. Sci. 38: 919-923.

- SLATTER, W.L. & HALVORSON, H.O., 1947. The heat resistance of lactobacilli found in American cheddar cheese. J. Dairy Sci. 30: 231-243.
- SPOONER, D.F. & SYKES, G., 1972. Laboratory assessment of antibacterial activity. pp. 212-276. (In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., 1972. Methods in Microbiology. London: Academic Press. 388 pp.)
- SOFOS, J.N. & BUSTA, F.F., 1981. Antimicrobial activity of Sorbate. J. Fd. Prot. 44(8): 614-622.
- SOFOS, J.N., BUSTA, E.F. & ALLEN, C.E., 1979. Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: A Review. J. Fd. Prot. 42(9): 739-770.
- SUZUKI, J. & KITAHARA, K., 1964. Base compositions of desoxyribonucleic acid in Sporolactobacillus inulinus and other lactic acid bacteria. J. gen. appl. Microbiol. 10(4): 305-311.
- STARR, M.P., STOLP, H., TRÜPER, H.G., BALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G. (ed.), 1981. The Prokaryotes, Vol II, Berlin: Springer-Verlag. 2284 pp.
- TOMPKIN, R.B., CHRISTIANSEN, L.N., SHAPARIS, A.B. & BOLIN, H., 1974. Effect of potassium sorbate on Salmonellae, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Clostridium botulinum in cooked, uncured sausage. Appl. Microbiol. Aug 1974: 262-264.
- TROLLER, J.A. & CHRISTIAAN, J.H.B., 1978. Wateractivity and Food, New York: Academic Press. 235 pp.
- UCHIDA, K. & MOGI, K., 1973. Cellular fatty acid spectra of Sporolactobacillus and some other Bacillus-Lactobacillus intermediates as a guide to their taxonomy. J. gen. appl. Microbiol. 19: 129-140.
- WAGNER, M.K., KRAFT, A.A., SEBRANEK, J.G., RUST, R.E. & AMUNDSON, C.M., 1982. Effect of different packaging films and vacuum on the microbiology of bacon cured with or without potassium sorbate. J. Fd. Prot. 45(9): 854-858.
- WALDMAN, R.C., WESTERBERG, D.O. & SIMON, S., 1974. Influence of curing ingredients and storage time on the quality of pre-

- blended sausage meats and frankfurters. J. Fd. Sci. 39: 718-722.
- WALLHÄUSSER, von Karl Heinz, 1978. Sterilisation-Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung-Betriebshygiene. 2., neubearbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme. 484 pp.
- WEISS, N., PLAPP, R. & KANDLER, O., 1967. Die Aminosäuresequenz des DAP-haltigen Mureïns von Lactobacillus plantarum und Lactobacillus inulinus. Arch. f. Mikrobiol. 58: 313-323.
- WIEBE, H.H., KIDAMBI, R.N., RICHARDSON, G.H. & ERNSTROM, C.A., 1981. A rapid psychrometric procedure for water activity measurement of foods in the intermediate moisture range. J. Fd. Prot. 44(12): 892-895.
- WILKINSON, B. & JONES, D., 1977. A numerical taxonomic survey of Listeria and related bacteria. J. gen. Microbiol. 98: 399-421.
- WILSON, G.S. & MILES, A.A., 1975. Topley and Wilson's principles of bacteriology: Virology and immunity; Vol I, 6th edition. London: Edward Arnold. 1303 pp.
- WINER, B.A., 1984. Growth of Staphylococcus aureus under stress conditions. Pretoria. 113 p. M.Sc.-Thesis - University of Pretoria.
- YORK, G.K. & VAUGHN, R.H., 1964. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. J. Bact. 88(2): 411-417.

TABEL 7.1 GROEI VAN Sporolactobacillus BY VERSKILLENDSE pH-WAARDES UITGEDRUK IN TERME VAN ABSORBANSIE

pH ingestel	pH gemeet	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	Gemiddeld van <u>L.</u> -isolate
2,5	2,52	0,007	0,005	-	0,006	0,008	-	-	0,013	0,007	0,007	0,003	0,016	0,007	0,006
3,0	2,97	0,009	0,011	0,033	0,008	0,011	0,007	0,004	0,018	0,013	0,009	0,011	0,021	0,021	0,014
3,5	3,48	0,015	0,029	0,031	0,013	0,01	0,024	0,006	0,030	0,039	0,016	0,030	0,034	0,029	0,024
4,0	4,05	0,062	0,031	0,076	0,027	0,045	0,038	0,050	0,042	0,057	0,040	0,037	0,038	0,026	0,044
4,5	4,46	0,071	0,077	0,075	0,057	0,060	0,060	0,067	0,097	0,064	0,061	0,094	0,086	0,070	0,072
5,0	5,00	0,162	0,236	0,080	0,244	0,166	0,150	0,172	0,162	0,162	0,157	0,128	0,251	0,269	0,180
5,5	5,67	0,257	0,280	0,251	0,238	0,243	0,252	0,255	0,262	0,243	0,237	0,230	0,339	0,368	0,266
6,0	6,12	0,276	0,261	0,281	0,330	0,270	0,298	0,367	0,291	0,263	0,261	0,264	0,374	0,380	0,301
6,5	6,55	0,398	0,349	0,409	0,333	0,332	0,431	0,423	0,404	0,435	0,334	0,320	0,474	0,390	0,387
7,0	7,07	0,435	0,353	0,012	0,377	0,285	0,523	0,385	0,490	0,488	0,301	0,410	0,417	0,396	0,375
7,5	7,50	0,038	0,076	0,009	0,023	0,031	0,020	0,017	0,037	0,030	0,028	0,034	0,398	0,301	0,080
8,0	7,83	0,014	0,010	0,006	0,015	0,018	0,005	0,014	0,027	0,023	0,015	0,009	0,406	0,028	0,044
8,5	8,20	0,004	0	0	0,012	0,008	0	0	0,017	0,015	0,005	0,004	0,265	0,016	0,027
9,0	8,62	0	-	-	0	0	-	-	0,017	0	0	0	0	0,015	0,003
9,5	8,89	-	-	-	-	-	-	-	0,010	-	-	-	-	0	0
10,0	9,03	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-

TABEL 7.2 PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOORSUSPENSIE VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15338), *Bacillus cereus* (DSM 626), *Clostridium sporogenes* EN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L2401 TOT L2412) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES NATRIUMNITRIET, UITGEDRUK IN TERME VAN SPOORONTKIEMING EN GROEI BY 0 mg.ℓ⁻¹ NATRIUMNITRIET (KONTROLE)

Konsentrasie natriumnitriet (mg.ℓ ⁻¹)	ATCC 15338	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gem. van L-kulture
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
100	47,35	95,51	75,91	45,06	56,42	89,63	82,96	86,36	62,40	58,85	53,56	61,78	47,87	0	50,05	68,03
200	53,76	73,65	70,32	52,16	81,84	72,70	62,57	75,76	42,32	38,83	54,76	42,44	49,53		14,12	59,73
300	64,35	67,07	53,28	60,19	74,33	48,92	53,43	62,48	63,58	39,56	51,19	48,67	52,13		0	56,24
400	45,96	60,78	67,64	54,63	50,61	49,12	64,18	81,21	66,14	61,43	63,10	48,22	42,42			59,12
500	61,28	56,29	47,20	51,85	58,84	35,62	45,97	51,21	83,07	57,86	75,00	50,44	46,68			55,00
600	49,30	39,82	35,77	44,14	46,00	21,14	25,37	32,73	80,71	40,79	70,24	42,44	38,86			43,17
700	44,01	44,31	33,09	41,05	46,00	17,42	16,72	41,52	75,40	36,12	65,24	53,11	39,10			43,41
800	37,05	30,54	32,36	35,49	43,58	16,24	21,19	66,36	35,04	23,83	32,14	38,44	47,38			35,22
900	36,77	36,53	35,52	35,33	39,23	19,57	22,09	78,58	43,70	18,92	21,43	44,22	38,86			37,58
1 000	33,98	41,32	34,31	37,35	42,86	12,52	26,57	63,64	36,22	11,06	18,57	33,56	32,46			32,54
1 100	38,44	38,02	27,74	32,72	28,10	6,65	13,73	46,67	18,24	13,02	15,24	30,67	32,46			25,27
1 200	32,59	29,04	28,71	33,95	30,75	7,24	5,97	23,03	25,20	17,20	8,10	33,11	29,86			22,66
1 300	31,76	27,84	22,63	32,10	46,97	10,18	5,07	23,64	32,28	14,99	6,67	3,89	26,78			23,67
1 400	24,51	27,55	26,03	20,99	31,96	8,41	7,76	14,55	24,80	11,3	6,90	23,33	24,41			19,01
1 500	30,36	26,05	27,98	31,17	29,54	12,13	8,82	13,33	34,45	18,30	5,24	24,22	24,85			21,34
1 600	22,01	23,35	24,14	21,60	22,28	14,87	5,07	13,94	23,23	15,72	4,76	22,22	17,30			17,37
1 700	27,02	28,14	22,87	23,46	13,56	10,76	9,55	21,52	26,97	13,38	5,95	16,44	13,74			17,20
1 800	24,51	26,80	21,30	23,46	11,98	9,20	9,85	20,86	25,35	9,58	4,29	18,67	11,48			16,07
1 900	24,23	26,65	18,98	23,15	9,93	7,05	11,34	21,42	24,85	9,22	3,57	15,48	9,88			15,13
2 000	25,63	24,30	20,50	20,30	9,50	7,46	6,80	20,10	22,21	9,06	3,57	14,15	9,20			13,93

* *Clostridium sporogenes*

TABEL 7.3 PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15538), *Bacillus cereus* (DSM 626), *Clostridium sporogenes* EN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L2401 TOT L2412) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES KALIUMSORBAAT, UITGEDRUK IN TERME VAN GROEI BY $0 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ KALIUMSORBAAT (KONTROLE)

Konsentrasie kaliumsorbaat ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$)	ATCC 15338	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gen. van L-kulture
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1 000	77,42	76,61	88,04	71,48	92,12	88,40	71,12	82,26	82,56	67,57	76,01	76,67	80,21	-	24,47	79,42
2 000	56,13	49,83	82,21	69,92	56,25	57,46	66,46	54,45	68,85	55,74	59,54	60,00	64,17	-	9,54	62,24
3 000	49,03	42,71	52,53	64,84	55,71	51,93	81,68	47,85	52,34	48,99	56,65	41,28	44,12	-	-	53,30
4 000	3,87	45,76	41,41	53,52	47,01	46,13	47,83	38,98	42,37	43,24	45,95	48,46	39,57	-	-	45,02
5 000	-	4,41	9,51	37,11	20,3	18,51	0,90	22,58	22,12	16,89	43,93	44,36	14,97	-	-	21,31
6 000	-	-	3,68	3,13	3,80	4,42	-	19,89	21,18	0,34	27,6	6,67	2,94	-	-	7,79
7 000	-	-	-	-	-	-	-	2,42	0,94	-	8,09	-	0	-	-	0,95
8 000	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	-	-	0

* *Clostridium sporogenes*

TABEL 7.4 PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOORSUSPENSIES VAN Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538), Bacillus cereus (DSM 626), Clostridium sporogenes EN Sporolactobacillus-ISOLATE (L2401 TOT L2412) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES KALSIUMSORBAAT IN TERME VAN SPOOR-ONTKIEMING EN GROEI BY 0 mg.ℓ⁻¹ KALIUMSORBAAT (KONTROLE)

Konsentrasie kaliumsorbaat (mg.ℓ ⁻¹)	ATCC 15338	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gem. van L-kulture
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1 000	96,19	78,77	82,80	82,20	94,77	83,35	93,79	91,22	70,39	94,89	74,37	63,00	75,14	0	25,78	82,89
2 000	60,91	36,13	47,00	56,04	66,74	65,27	68,08	58,78	64,50	70,22	55,89	46,15	59,78	-	8,99	57,98
3 000	10,15	8,39	5,60	6,81	11,30	7,14	5,65	7,81	8,52	15,56	11,55	0	0	-	0	7,6
4 000	0	0	0	0	4,81	0	0	0	3,25	0	0	-	-	-	-	0,67
5 000	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0

* Clostridium sporogenes

TABEL 7.5 PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15538), *Bacillus cereus* (DSM 626), *Clostridium sporogenes* EN *Sporolactobacillus*-ISOLATE(L2401 TOT L2412) BY VERLAAGDE WATERAKTIWITEIT (INGESTEL MET NaCl), UITGEDRUK IN TERME VAN GROEI BY DAARDIE WATERAKTIWITEIT WAAR GEEN NaCl BY DIE MEDIUM GEVOEG IS NIE ($a_w = 0,995$)

Molaliteit	NaCl (%)	a_w -gemeet	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gem. van L-kulture
0	0	0,995	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,2	1,15	0,991	8,93	24,69	25,53	13,97	41,49	19,53	60,74	14,48	69,05	72,38	16,85	92,21	73,75	75,00	80,80	43,73
0,4	2,28	0,986	6,55	14,94	23,05	7,72	7,76	14,48	12,96	6,06	33,33	11,11	16,85	5,19	7,25	61,25	67,64	13,39
0,6	3,39	0,978	2,38	10,06	4,96	5,51	7,46	10,77	5,93	4,04	15,48	7,94	10,75	3,38	3,50	55,00	66,55	7,48
0,8	4,47	0,969	1,49	8,77	4,26	2,21	2,39	3,70	4,44	2,69	11,90	2,54	7,53	3,12	2,5	37,50	29,82	4,68
1,0	5,52	0,962	0	5,19	0	0	0,60	0,67	0	2,69	0	0	2,15	0	0	36,25	5,89	0,94
1,2	6,55	0,956		3,25			0	0		0			0			21,25	2,98	
1,4	7,56	0,950		0												11,25	12,76	
1,6	8,55	0,944														0	2,04	
1,8	9,52	0,933															1,60	
2,0	10,46	0,919															0,87	
2,2	11,39	0,915															0	

* *Clostridium sporogenes*

TABEL 7.6 PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOORSUSPENSIES VAN Sporolactobacillus inulinus (ATCC 15538), Bacillus cereus (DSM 626), Clostridium sporogenes EN Sporolactobacillus-ISOLATE (L2401 TOT L2412) BY VERLAAGDE WATERAKTIWITEIT (INGESTEL MET NaCl), UITGEDRUK IN TERME VAN SPOORONTKIEMING EN GROEI BY DAARDIE WATERAKTIWITEIT WAAR GEEN NaCl BY DIE MEDIUM GEVOEG IS NIE ($a_w = 0,995$)

Molaliteit	NaCl (%)	a_w -gemeet	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gem. van L-kulture
0	0	0,995	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,2	1,15	0,991	12,69	70,66	30,56	11,06	55,05	92,86	47,18	66,75	86,07	72,33	90,73	84,18	78,59	3,31	90,97	65,50
0,4	2,28	0,986	11,40	12,44	15,96	10,59	29,13	87,91	32,23	24,94	59,96	45,30	70,64	10,56	43,93	2,3	75,15	43,42
0,6	3,39	0,978	13,99	7,98	11,46	8,00	17,20	34,80	22,92	19,56	36,94	27,03	67,33	8,27	17,66	1,45	57,08	23,26
0,8	4,47	0,969	9,59	4,93	11,46	5,88	11,01	13,55	15,28	9,29	16,25	14,16	42,3	8,03	4,42	0,93	37,27	13,09
1,0	5,52	0,962	7,25	4,69	9,44	3,29	0	3,85	9,30	5,13	8,70	10,04	19,21	6,57	0	0,93	17,66	6,635
1,2	6,55	0,956	6,48	0	0	0	0	0	0	0	3,48	3,60	7,06	0	0	0	0	0
1,4	7,56	0,950	0															

* Clostridium sporogenes

TABEL 7.7 PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15538), *Bacillus cereus* (DSM 626), *Clostridium sporogenes* EN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L2401 TOT L2412) BY VERLAAGDE WATERAKTIWITEIT (INGESTEL MET GLISEROL), UITGEDRUK IN TERME VAN GROEI BY DAARDIE WATERAKTIWITEIT WAAR GEEN GLISEROL BY DIE MEDIUM GEVOEG IS NIE ($a_w = 0,985$)

Molaliteit	Gliserol (%)	a_w -gemeet	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gem. van L-kulture
0	0	0,985	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,5	4,605	0,981	89,88	110,74	93,50	94,02	98,92	96,51	90,16	01,62	96,05	98,12	85,53	104,17	115,47	94,48	72,62	98,73
1,0	9,210	0,961	90,80	104,91	94,18	85,75	85,14	85,56	90,93	84,59	81,05	72,31	65,99	81,48	114,36	9,85	70,54	86,44
1,5	13,815	0,957	83,4	79,45	56,78	66,98	78,92	75,81	60,88	81,62	70,79	65,05	59,64	83,10	93,92	4,18	61,0	72,74
1,8	16,578	0,947	72,39	69,94	50,28	65,52	59,03	69,89	51,81	77,57	59,74	45,24	50,76	65,97	73,20		54,76	61,66
2,0	18,420	0,944	66,87	57,06	47,74	56,41	65,14	62,10	57,51	62,16	57,89	43,01	37,06	58,33	72,10		49,94	56,38
2,2	20,262	0,940	58,28	54,60	43,22	66,95	60,00	65,86	41,97	60,54	49,21	42,74	36,04	61,81	6,78		50,98	54,31
2,4	22,104	0,935	39,88	60,43	42,09	58,69	52,97	51,88	26,17	55,14	54,47	34,95	30,46	53,01	62,98		36,77	48,60
2,6	23,946	0,926	38,65	59,20	32,49	54,42	34,05	43,01	18,91	47,47	45,00	33,33	26,65	51,39	66,85		30,70	42,74
2,8	25,788	0,917	25,46	55,21	28,81	44,44	27,30	12,90	5,96	44,32	14,21	27,96	18,78	54,17	58,01		23,01	32,67
3,0	27,630	0,906	-	17,18	-	16,24	4,86	1,08	3,89	6,76	10,00	-	-	40,05	45,30		25,26	12,11
3,2	29,472	0,905	-	4,60	-	3,98	5,95	-	-	-	4,74	-	-	26,85	43,09		11,86	5,83
3,4	31,314	0,904	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,15	35,15		2,74	4,69
3,6	33,156	0,881	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,63		1,57	-
3,8	34,998	0,880	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-

* *Clostridium sporogenes*

TABEL 7.8 PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOORSUSPENSIES VAN *Sporolactobacillus inulinus* (ATCC 15538), *Bacillus cereus* (DSM 626), *Clostridium sporogenes* EN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L2401 TOT L2412) BY VERLAAGDE WATERAKTIWITEIT (INGESTEL MET GLISEROL), UITGEDRUK IN TERME VAN SPOORONTKIEMING EN GROEI BY DAARDIE WATERAKTIWITEIT WAAR GEEN GLISEROL BY DIE MEDIUM GEVOEG IS NIE ($a_w = 0,985$)

Molaliteit	Gliserol (%)	a_w -gemeet	ATCC 15538	L2401	L2402	L2403	L2404	L2405	L2406	L2407	L2408	L2409	L2410	L2411	L2412	C*	DSM 626	Gem. van L-kulture
0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,5	4,605	0,981	78,17	89,13	91,24	61,98	82,56	89,41	92,11	85,4	59,63	105,56	97,22	81,68	91,77	12,41	85,89	85,68
1,0	9,21	0,961	87,31	75,65	92,01	58,46	80,35	83,99	92,9	112,37	87,02	87,02	74,44	89,39	73,03		82,20	84,50
1,5	13,815	0,957	81,76	79,20	89,15	70,55	77,48	74,14	99,09	117,35	56,80	81,33	82,82	89,06	107,99		27,15	87,16
1,8	16,578	0,947	56,35	69,27	87,63	69,01	63,80	53,94	93,27	112,47	49,90	70,67	79,80	83,21	91,77		20,51	79,55
2,0	18,420	0,881	57,36	63,12	87,89	68,35	65,34	53,94	93,27	110,09	35,50	59,11	82,07	72,52	80,39			73,72
2,2	20,262	0,940	47,46	67,85	76,55	64,40	62,25	48,03	92,11	97,72	32,86	51,78	67,68	63,61	80,87			67,14
2,4	22,104	0,935	36,55	54,37	70,01	52,53	46,58	47,78	81,87	89,95	19,27	54,67	67,17	51,40	61,74			58,11
2,6	23,946	0,926	22,59	35,46	48,97	44,18	34,88	38,18	69,59	79,91	19,07	45,11	50,00	53,18	62,26			48,32
2,8	25,788	0,917	21,32	4,350	41,49	33,63	32,89	41,87	59,06	57,08	10,55	39,11	47,72	53,94	49,88			42,56
3,0	27,630	0,906	10,41	34,75	42,01	36,04	29,80	43,60	52,3	64,84	4,87	37,78	23,48	45,04	51,57			38,84
3,2	29,472	0,905	10,91	36,41	41,49	39,12	36,20	37,93	53,51	47,03	1,22	34,67	22,98	45,55	52,06			37,35
3,4	31,314	0,904	9,14	39,24	36,60	20,66	19,87	23,65	38,89	39,82		32,44	20,20	38,93	36,32			28,85
3,6	33,156	0,881	6,35	23,88		9,89	2,87	14,29	16,08	29,22		6,22	5,66	29,01	28,33			13,79
3,8	34,998	0,880		4,02		4,84	2,87	3,20	12,28	1,83		1,11	1,26	2,04	2,66			3,00
4,0	36,840	0,868				7,23	-	-	7,89	-		-		-				

* *Clostridium sporogenes*

TABEL 7.9 LOGS VAN DIE GETAL OORLEWENDE ORGANISMES IN VEGETATIEWE SELSUSPENSIES IN GYP-SOP BY VERSKILLENDE BESTRALINGSDOSISSE (LOG VAN LEWENDE SELTELLING.m⁻¹)

Dosis (kGy)	<u>Sporolactobacillus inulinus</u> (ATCC15538)	L2403	L2405	L2411	L2412	<u>Bacillus cereus</u> (DSM 626)	<u>Clostridium sporogenes</u>
0	4,68	5,00	4,20	4,6	4,18	5,50	4,04
0,5	3,42	3,56	3,34	3,60	3,00	5,81	3,34
1,0	2,48	2,73	1,18	2,25	2,31	5,96	2,63
1,5	1,54	1,62	0,90			5,90	2,35
2,0	0,60	0,80				5,96	1,55
2,5						4,83	1,17
3,0						4,23	0,48
3,5						3,86	
4,0						2,62	

TABEL 7.10 LOGS VAN DIE GETAL OORLEWENDE ORGANISMES IN SPOORSUSPENSIES IN GYP-SOP BY
 VERSKILLENDE BESTRALINGSDOSISSE (LOG VAN LEWENDE SELTELLING.m⁻²)

Dosis (kGy)	<u>Sporolactobacillus</u> <u>inulinus(ATCC15538)</u>	L2403	L2405	L2411	L2412	<u>Bacillus cereus</u> (DSM 626)	<u>Clostridium</u> <u>sporogenes</u>
0	7,11	5,90	5,76	3,45	3,28	8,84	3,56
1,0	5,98	5,46	4,68	3,09	2,92	7,92	3,08
2,0	4,70	5,13	4,37	2,89	2,50	6,95	2,85
3,0	,08	4,61	3,89	2,70	2,32	6,71	2,30
4,0	3,95	4,00	3,85	2,53	2,06	6,36	
5,0	3,57	3,72	3,36	1,92	1,54	5,76	
6,0	3,15	3,04	2,95	1,56	0,95	4,26	
7,0	2,78	2,57	2,74	1,11		3,53	
8,0	2,00	1,85	2,32			2,65	

TABEL 7.11 VERANDERING IN DIE MIKROBEPOPLASIE TYDENS OPBERGING VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS WAT MET VERSKILLENDE ENDOSPOORVORMENDE BAKTERIEË GEÏNOKULEER IS (LOG VAN LEWENDE SELTELLING.g⁻¹)

Inkubasie Tyd	Inkubasie Temperatuur	Kontrole		Frankfurter + <u>Sporolactobacillus</u>				Frankfurter + <u>Sporolactobacillus</u> + <u>Bacillus</u>			
		Totale telling	Totale spore	Totale telling	Totale <u>Bacillus</u> -spore	Totale <u>Sporolacto.</u>	<u>Sporolacto.</u> spore	Totale telling	Totale <u>Bacillus</u> -spore	Totale <u>Sporolacto.</u>	<u>Sporolacto.</u> Spore
0	0	2	1	2,70	2,85	4,60	4,68	5,56	5,34	5	5
1 week	4°C	2,32	1,42	2,85	2,18	4,30	5,87	5	5,18	4	
	25°C	2,70	1,48	1,90	2,60	4,15	4,20	5,81	5,48	5,30	3,48
	37°C	2,15	1,0	1,60	2,48	4,30	4,08	5,69	5,30	4,30	3,95
2 weke	4°C	2,42	1,30	2,70	2,15	4,38	4,32	5,81	5,23	5,08	4,08
	25°C	2,48	1,54	2	1,95	4,32	4,26	5,60	5	5,18	3,51
	37°C	2,08	1,20	2,70	2,40	4,40	4,36	5,48	5,42	4,70	3,60
4 weke	4°C	1,48	1,30	1,95	2,08	3,54	4,48	4,95	5,04	5	4,38
	25°C	1	1,48	2,60	1,4	3,23	4,38	5,30	5	4,88	3,48
	37°C	1	1,30	1,48	2	3,30	4,28	5,51	5,60	4,56	4,30
5 weke	4°C	1,30	1,30	2	2,15	3,45	4,40	4,94	5,11	4,08	4,32
	25°C	1,30	1	1,90	1,70	3,30	4,45	4,72	5	4,72	3,53
	37°C	1	1,04	1,30	2,04	3,28	4,32	4,92	4,65	4,61	4,32
7 weke	4°C	2	1	1,60	1	3,60	4,18	4,54	4,90	4,0	4,30
	25°C	1,18	1	1,15	1	2,94	4,0	4,60	4,95	4,08	3,40
	37°C	1	1	1	1	3,0	4,08	4,48	4,90	4,32	4,0

TABEL 7.12 VERANDERING IN pH- EN a_w -WAARDES VAN EKSPERIMENTELE RAKSTABIELE FRANKFURTER-TIPE WORS, WAT MET VERSKILLENDE ENDOSPOORVORMENDE BAKTERIEË GEÏNOKULEER IS, TYDENS OPBERGING

Inkubasie tyd	Inkubasie Temperatuur	Kontrole		Frankfurter + <u>Sporolactobacillus</u>		Frankfurter + <u>Bacillus</u> + <u>Sporolactobacillus</u>	
		pH	a_w	pH	a_w	pH	a_w
0	0	5,31	0,924	5,27	0,920	5,26	0,930
1 week	4°C	5,14		5,15		5,25	
	25°C	5,19		4,90		5,02	
	37°C	5,10	0,926	4,75	0,920	4,75	0,928
2 weke	°C	5,13		5,15		5,18	
	25°C	5,05		4,89		4,98	
	37°C	4,98	0,925	4,78	0,924	4,82	0,930
4 weke	4°C	5,12		5,17		5,15	
	25°C	4,87		4,79		4,70	
	37°C	4,89	0,926	4,77	0,924	4,80	0,928
5 weke	4°C	5,19		5,19		5,19	
	25°C	4,92		4,81		4,81	
	37°C	4,89	0,928	4,78	0,925	4,80	0,928
7 weke	4°C	5,24		5,13		5,12	
	25°C	4,99		4,77		4,72	
	37°C	4,96	0,930	4,79	0,927	4,80	0,926

FIG.7.1: GROEI VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERSKILLENE pH-WAARDES UITGEDRUK i.t.v. ABSORBANSIE.

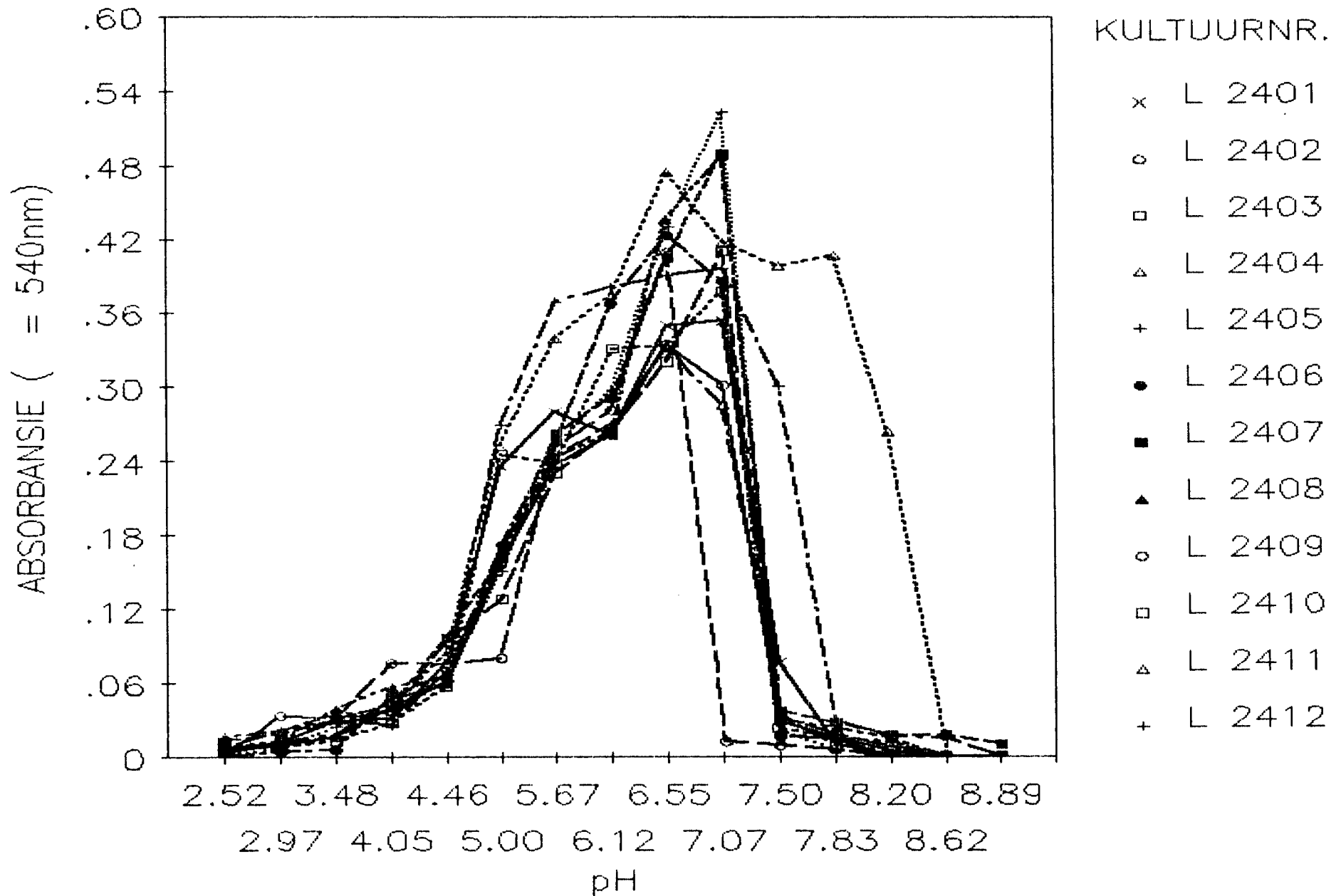


FIG.7.2: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES NATRIUMNITRIET i.t.v. SPOORONTKIEMING EN GROEI BY 0 mg/l NATRIUMNITRIET.

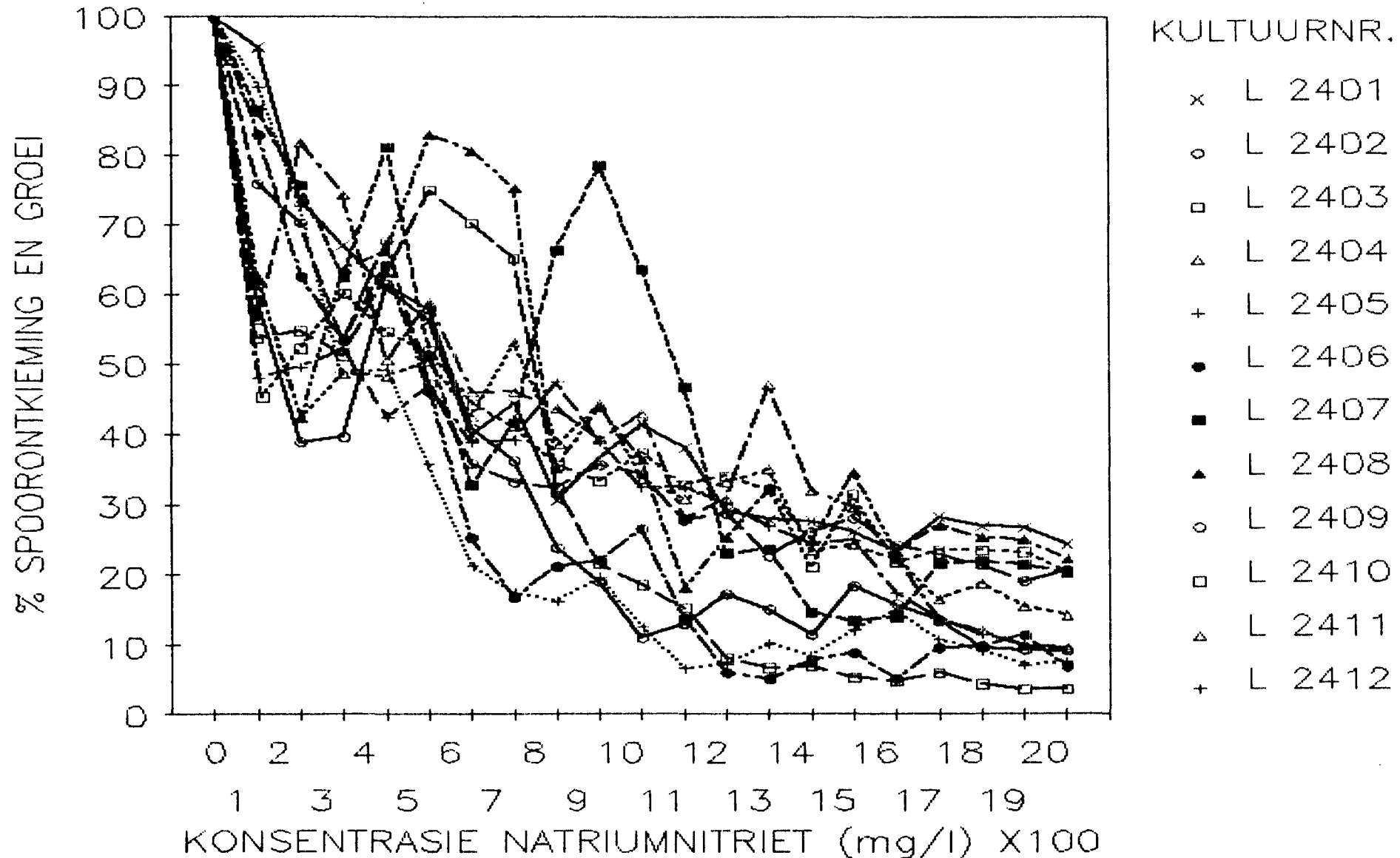


FIG.7.3: PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES KALIUMSORBAAT UITGEDRUK i.t.v. GROEI BY 0 mg/l KALIUMSORBAAT (kontrole).

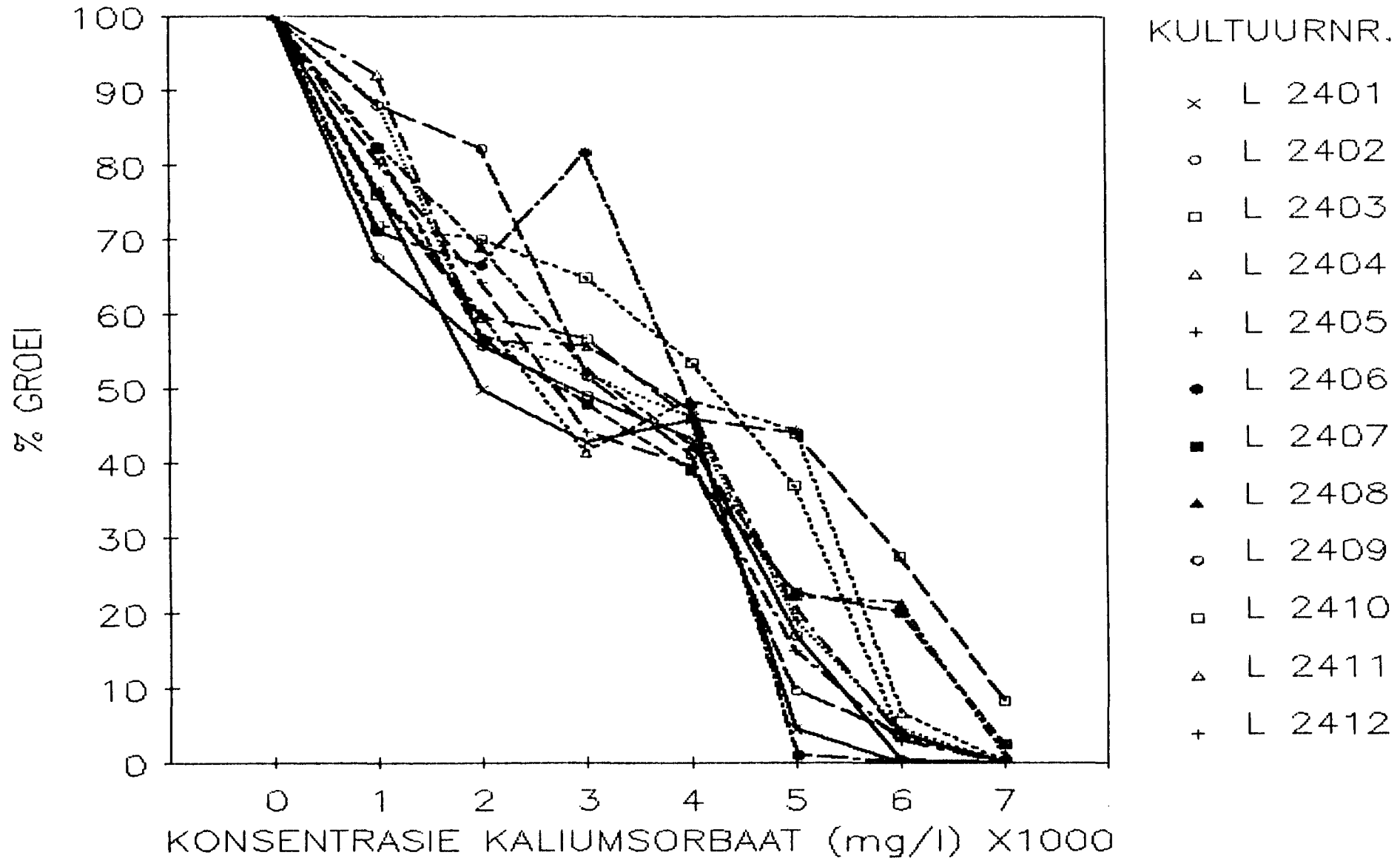


FIG.7.4: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOOR-SUSPENSIES VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERSKILLENDE KONSENTRASIES KALIUMSORBAAT i.t.v. SPOOR-ONTKIEMING EN GROEI BY 0 mg/l KALIUMSORBAAT (kontrole).

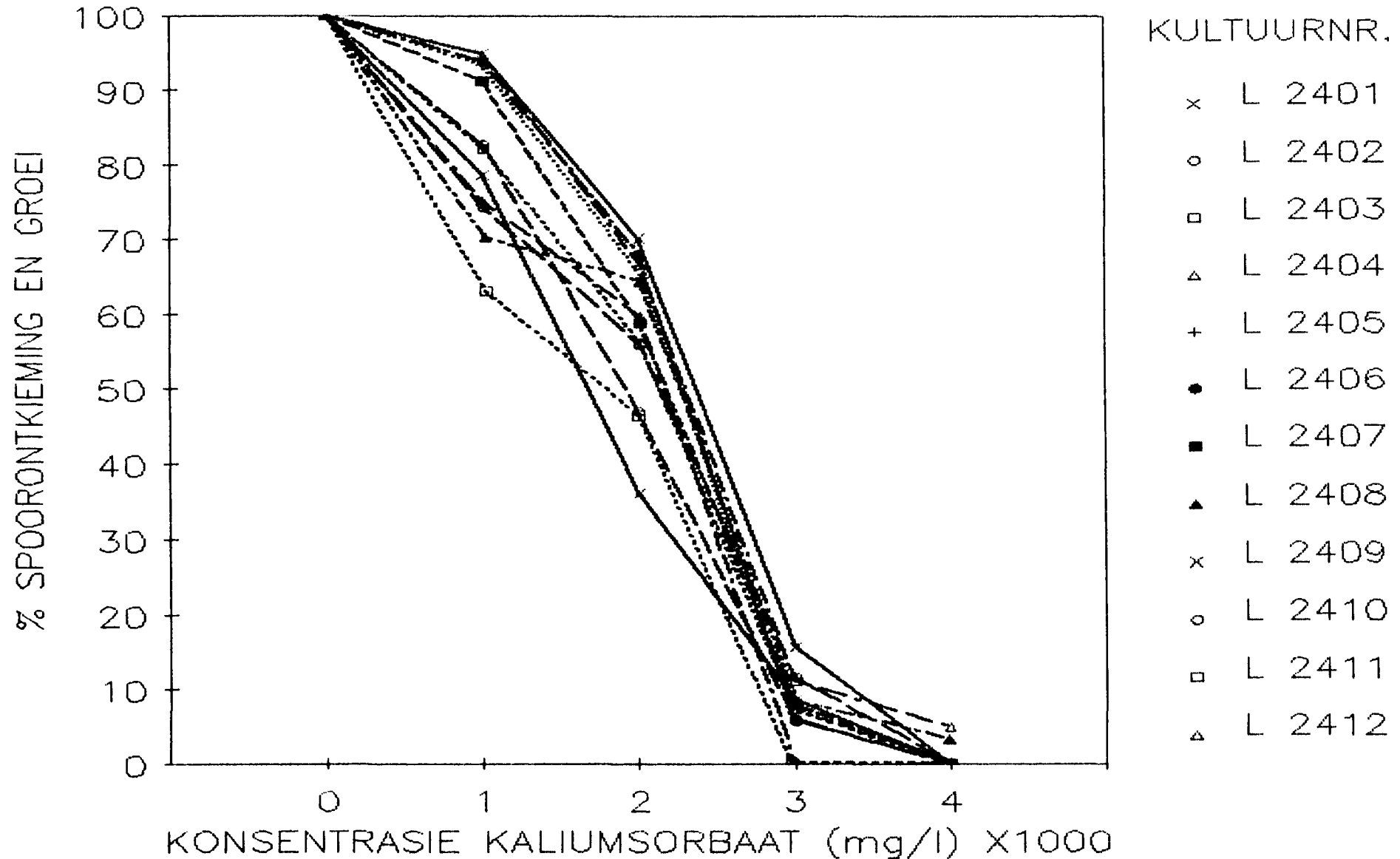


FIG.7.5: PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERLAAGDE aw (ingestel met NaCl) i.t.v. GROEI BY aw WAAR GEEN NaCl BY DIE MEDIUM GEVOEG IS NIE (aw = 0,995).

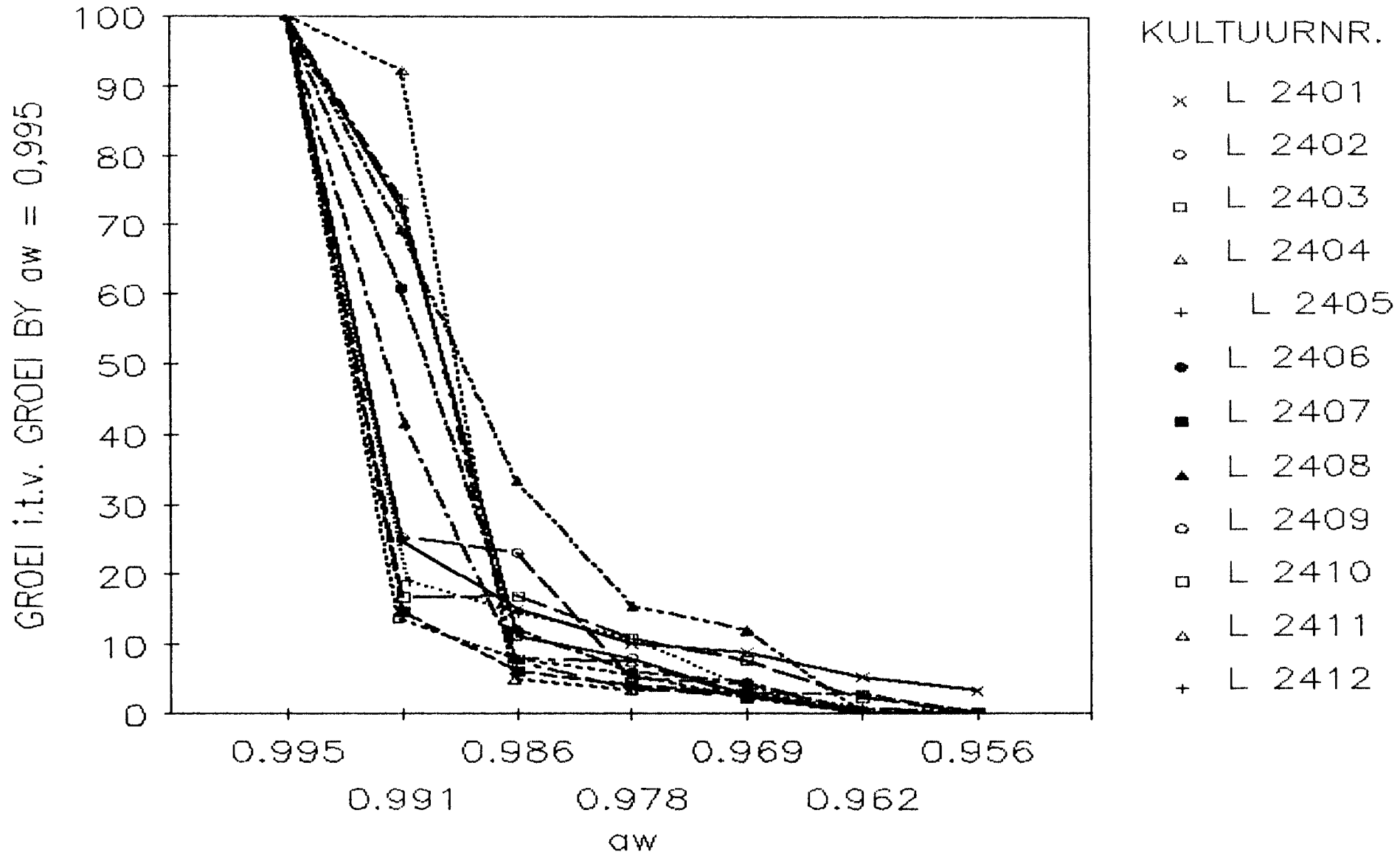


FIG.7.6: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOOR-SUSPENSIES VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERLAAGDE aw (ingestel met NaCl) i.t.v. SPOORONTKIEMING EN GROEI BY aw = 0.995 (kontrole).

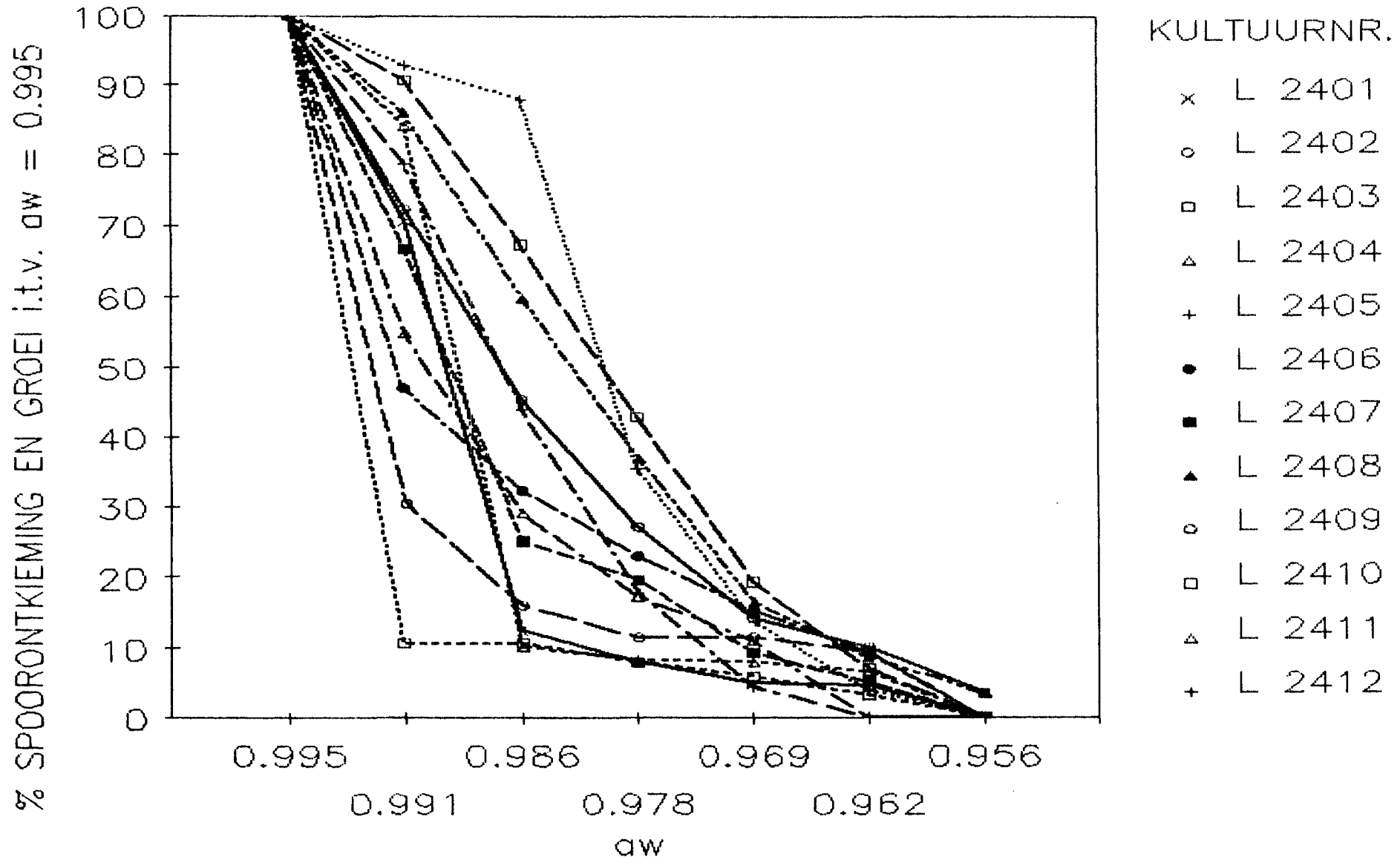


FIG.7.7: PERSENTASIE GROEI VAN VEGETATIEWE SELLE VAN *Sporolactobacillus*-ISOLATE (L 2401-L 2412) BY VERLAAGDE a_w (ingestel met gliserol) UITGEDRUK i.t.v. GROEI BY a_w WAAR GEEN GLISEROL BY DIE MEDIUM GEVOEG IS NIE ($a_w = 0,985$).

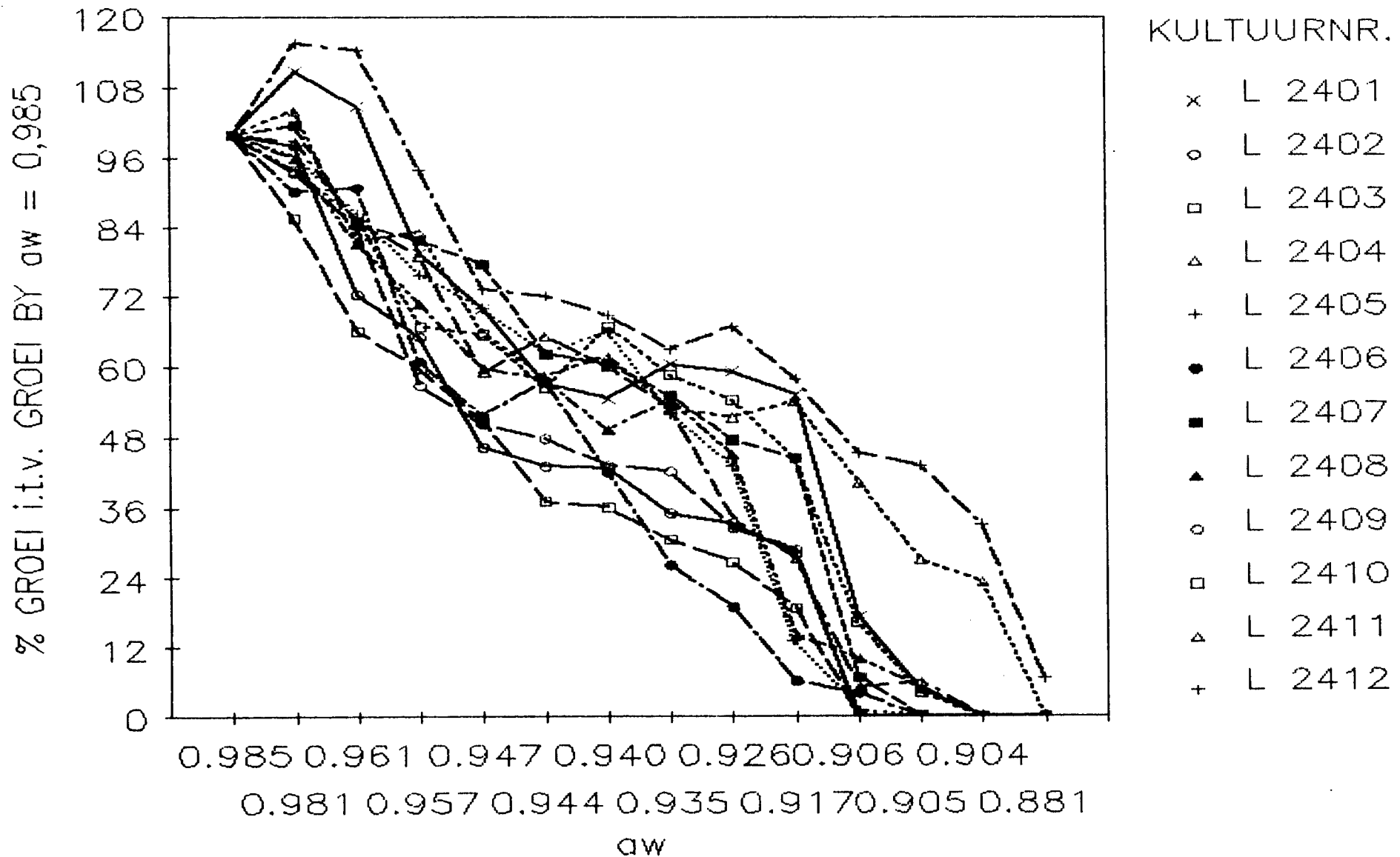


FIG.7.8: PERSENTASIE SPOORONTKIEMING EN GROEI VAN SPOOR-SUSPENSIES VAN *Sporolactobacillus*-isolate (L 2401-L 2412) BY VERLAAGDE a_w (ingestel met gliserol) i.t.v. SPOORONTKIEMING EN GROEI BY $a_w = 0,985$ (kontrole).

