Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Een systematisch onderzoek naar de waarde der kleine-plaatculturen volgens Frost voor de bepaling van het aantal levende bacteriën in melk

https://hdl.handle.net/1874/283033

1925

EEN SYSTEMATISCH ONDERZOEK NAAR DE WAARDE DER KLEINE-PLAATCULTUREN VOLGENS FROST VOOR DE BEPALING VAN HET AANTAL LEVENDE BACTERIËN IN MELK

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3627 5232

EEN SYSTEMATISCH ONDERZOEK NAAR DE WAARDE DER KLEINE-PLAATCULTUREN VOLGENS FROST VOOR DE BEPALING VAN HET AANTAL LEVENDE BACTERIËN IN MELK

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE AAN DE VEEARTSENIJKUNDIGE HOOGESCHOOL TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR J. H. HARTOG, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER VEEARTSENIJKUNDIGE HOOGESCHOOL, TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DEN SENAAT OP DONDERDAG 19 MAART 1925, DES NAMIDDAGS VIER UUR, DOOR **ADOLF CLARENBURG**, GEBOREN TE UTRECHT



BIBLIOTHEEK
DIERGENEESKUNDE
UTRECHT

DRUKKERIJ J. VAN BOEKHOVEN - UTRECHT, AMSTERDAM, DEN HAAG

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT
1467 3481

AAN MIJN OUDERS
AAN HETTY MEIJER

Bij de voltooiing van mijn proefschrift is het mij een aangename plicht, U, Hoogleeraren onzer Hoogeschool, hartelijk dank te zeggen voor het genoten onderwijs.

Inzonderheid U, Hooggeleerde VAN OYEN, *hooggeschatte Promotor, ben ik groote dankbaarheid verschuldigd, niet alleen voor Uw initiatief, het in dit proefschrift behandelde onderwerp ter hand te nemen, maar bovenal voor de welwillende wijze, waarop Gij mij bij mijn werk met raad en steun hebt bijgestaan.*

Gedurende de jaren, bij U als assistent doorgebracht, hebt Gij mij steeds tot het bestudeeren van wetenschappelijke vraagstukken opgewekt, waarbij mij Uw scherp en helder oordeel zoo zeer ten goede is gekomen.

Hooggeleerde SCHORNAGEL, *U ben ik in hooge mate dankbaar voor Uw aansporing tot wetenschappelijk onderzoek, gedurende den tijd, dat ik onder Uw leiding werkzaam was. Steeds hebt Gij mij met Uw groote ervaring welwillend ter zijde gestaan en het is dan ook voor een groot gedeelte, dat ik U mijn wetenschappelijke vorming verschuldigd ben.*

Waarde FRENKEL, *de tijd, welken ik te zamen met U heb doorgebracht, is voor mij een zeer aangename en tevens zeer leerrijke geweest. Weest er van verzekerd, dat deze mij steeds in dankbare herinnering zal blijven.*

Ten slotte dank ik U mijn zeer gewaardeerde collegae HOOGLAND *en* TEN THIJE *voor den aangenamen ambtelijken omgang, welken ik met U gehad heb en voor den steun, welken ik in zoo ruime mate van U mocht ontvangen.*

INHOUD

HOOFDSTUK I

Blz.

INLEIDING 1

HOOFDSTUK II

LITERATUUR 13

HOOFDSTUK III

ONDERZOEK NAAR EEN GOEDE CONTROLE-METHODE VOOR DE KLEINE-PLAATCULTUREN 34

HOOFDSTUK IV

BESCHRIJVING DER KLEINE-PLAATMETHODE, GETOETST AAN EIGEN ONDERZOEK 48

HOOFDSTUK V

RESULTATEN MET DE KLEINE-PLAATMETHODE, BIJ VERSCHILLENDE BROEDSTOOF-TEMPERATUREN VERKREGEN 66

HOOFDSTUK VI

NADERE BIJZONDERHEDEN OMTRENT DEN DUUR DER INCUBATIE BIJ 28° C. 100

HOOFDSTUK VII

ONDERZOEK VAN KIEMRIJKE MELK MET BEHULP VAN DE KLEINE-PLAATCULTUREN BIJ 28° C... 111

HOOFDSTUK VIII

EINDBESCHOUWING 129

LITERATUUR 135

VERKLARING DER PHOTO'S 138

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

De waarde van het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek is voor een groot deel gelegen in zijn *scherp controleerend vermogen op zindelijke winning en doelmatige behandeling der melk*. Vooral bij contrôle op een bedrijf, waar men zich toelegt op het winnen van melk, welke aan hooge eischen voldoet, blijkt, welk een uitstekend hulpmiddel dit onderzoek is voor het opsporen van binnengeslopen fouten. Zindelijk gewonnen en goed behandelde melk bevat een laag aantal bacteriën, dat niet meer dan enkele duizenden per c.M^3. behoeft te bedragen. Zoodra dan ook blijkt, dat dit aantal aanzienlijk overschreden is, mag men aannemen, dat er iets in het bedrijf niet in orde is, en een nader onderzoek kan dan uitmaken, waar de fout schuilt.

Het aantal kiemen, in de melk aanwezig, hangt samen met de volgende factoren :

1°. De oorspronkelijke infectie, d.w.z. de infectie, welke tijdens het melken optreedt. Slechte stalinrichting, onvoldoende reinheid der melkers, van de melkgevende dieren en van den stal zijn eenige der vele oorzaken, welke een hoog kiemgehalte der melk kunnen teweegbrengen. Maar bovenal is een slechte reiniging van het vaatwerk een groote bron voor infectie. Met nadruk dient er dan ook op te worden gewezen, dat hieraan de noodige aan-

dacht moet worden besteed en dat men er vooral zorg voor dient te dragen, dat, indien sterilisatie niet mogelijk is, de melkemmers, welke liefst ook een nauwe opening moeten bezitten, na grondige reiniging goed worden gedroogd, want juist de achtergebleven vloeistofresten vormen zoo'n uitstekenden voedingsbodem voor de microorganismen.

2°. De temperatuur, waarbij de melk wordt bewaard. Het is zonder meer duidelijk, dat een warme omgeving zeer bevorderlijk is voor een toename van het aantal bacteriën. Daarom moet de melk, zoo spoedig mogelijk na het winnen, koel worden bewaard en wel in een zindelijk, stofvrij lokaal.

3°. De ouderdom der melk, d. i. de tijd, welke is verloopen sinds de melk werd gewonnen. Het is vanzelf sprekend, dat, hoe ouder de melk is, hoe grooter ook de mogelijkheid zal zijn, dat de zich in de melk bevindende bacteriën tot vermeerdering zijn gekomen.

Zoodra een der hier genoemde factoren ongunstig inwerkt, komt dit tot uiting in een hoog kiemcijfer en bezit men dus in het quantitatief bacteriologisch onderzoek een uitstekend middel om zulks aan te toonen. Een nader onderzoek zal dan moeten uitmaken, waar de infectiebron schuilt.

Het aantal kiemen, in de melk aanwezig, is tevens een maatstaf voor de deugdelijkheid en de houdbaarheid der melk. Wanneer niet de noodige zindelijkheid bij de melkwinning betracht wordt, of wanneer de melk in een warme omgeving wordt bewaard en vervoerd, zal deze binnen

korten tijd een groot aantal bacteriën bevatten, welke daarin verschillende ongewenschte omzettingen kunnen teweegbrengen. Het product kan dan schadelijke eigenschappen verkrijgen, als gevolg waarvan digestiestoornissen bij zuigelingen en zwakke personen kunnen optreden. Deze kiemrijke melk zal ook zeer spoedig zuur worden en verschillende bewerkingen, welke in de zuivelindustrie noodig zijn, niet kunnen doorstaan. Terwijl over het algemeen kiemarme melk langen tijd goed blijft, zal deze melk snel bederven en zeer zeker het koken niet kunnen verdragen. Hoe grooter het kiemgehalte der melk is, des te kleiner is in den regel de houdbaarheid; het groote voordeel, aan een zindelijke winning en goede behandeling, dus aan een laag bacteriecijfer der melk verbonden, is dan ook de grootere houdbaarheid, welke dit voedingsmiddel daardoor verkrijgt. Van zeer groot belang is dit laatste voor de melkvoorziening der groote steden, aangezien de melk vaak van ver verwijderde boerderijen moet worden betrokken en er zoodoende dikwijls langen tijd verloopt, alvorens de melk den consument bereikt. Vooral gedurende het ondoelmatige transport hebben de micro-organismen goede gelegenheid zich te vermeerderen, ten gevolge waarvan groote hoeveelheden melk door bacterieele omzettingen voor de consumptie verloren gaan. Het is zonder meer duidelijk, dat een contrôle op den toestand dezer rauwe melk ten zeerste noodzakelijk is, en juist het quantitatief bacteriologisch onderzoek kan ons hierbij zoo goede diensten bewijzen. Ook wanneer men tot pasteurisatie wil overgaan, zal men dit onderzoek niet kunnen missen. In de eerste plaats

dient men hierbij immers steeds uit te gaan van deugdelijke melk, dus melk waarin, daargelaten andere eischen, welke men daaraan stelt, de bacteriën zich niet zoo rijkelijk hebben vermeerderd. In de tweede plaats moet ook de gepasteuriseerde melk voortdurend worden gecontroleerd, aangezien door pasteuriseeren geen steriel product verkregen wordt en dus bij ondoelmatige behandeling bederf kan optreden. Het is algemeen bekend, dat de sporen der rottingsbacteriën niet worden gedood, en juist doordat de melkzuurvormende micro-organismen wel vernietigd zijn, kunnen deze hun nadeelige werking ten volle ontplooien, waarbij vooral de eiwitten worden ontleed in stoffen, welke schadelijk voor de gezondheid kunnen zijn. Door het afgestorven zijn der melkzuurvormers stolt deze melk niet en wordt het euvel niet zoo gemakkelijk in den aanvang onderkend.

Op een groot belang van een laag kiemgehalte der melk wil ik nog wijzen. In den laatsten tijd worden vele pogingen in het werk gesteld melk te verkrijgen, welke zonder nadeel rauw kan worden gedronken. Dat hierbij naast een gering bacteriecijfer nog vele andere eischen moeten worden gesteld, waardoor geen *pathogene* kiemen in de melk kunnen geraken, spreekt vanzelf. Men komt dan op het terrein der hygiënische melkwinning, welke vooral niet met een zindelijke winning gelijkgesteld moet worden. Wanneer men de garantie voor een volkomen onschadelijkheid van rauwe melk wil geven, komt men voor groote moeilijkheden te staan. Ik noem hier slechts den eisch van het niet aanwezig mogen zijn van tuberkelbacillen. Dit is op zichzelf reeds een zeer moeilijk probleem, vooral

waar men behalve met de hygiënische, ook met de oeconomische zijde van dit vraagstuk heeft rekening te houden en geen maatregelen kan toepassen, welke de melk zóó duur maken, dat ze voor de breede lagen der bevolking niet te betalen is. Men zou daarom reeds een zeer groote schrede op den goeden weg zijn, indien melk kon worden verkregen met een gering aantal bacteriën, dus met groote houdbaarheid, welke korten tijd vóór het gebruik even zou kunnen worden gekookt. Vooral voor de kinderen zou men hierdoor een voedingsmiddel verkrijgen, dat vrij is van gevaarlijke ziektekiemen en waarin ook de vitaminen zeer weinig zouden hebben geleden.

In Amerika, waar de laatste jaren zeer veel over bacteriologisch melkonderzoek gewerkt is, heeft men de groote invloed, welke het aantal kiemen op de qualiteit der melk heeft, reeds lang ingezien. Men heeft daar de melk in verschillende soorten ingedeeld en voor elke soort o. m. het maximum toelaatbare aantal micro-organismen vastgesteld. Voor „Grade" A, „Certified milk" (d.i. rauwe melk), geldt de limiet 10.000 bacteriën per c.M³.; voor „Grade" A, gepasteuriseerde melk, vóór het pasteuriseeren 200.000 en daarna bij het bereiken van den consument 10.000; voor „Grade" B deze melk *moet* worden gepasteuriseerd) vóór het pasteuriseeren 1.000.000 en daarna 50.000; voor „Grade" C vóór het pasteuriseeren meer dan 1.000.000 en daarna hoogstens 50.000 kiemen per c.M³.[23])

Het ware te wenschen, dat men ook hier te lande tot een dergelijke officieele indeeling der qualiteiten kon komen. Hierdoor zou tevens mogelijk worden gemaakt, dat voor een betere qualiteit een ietwat hoogere prijs

zou kunnen worden bedongen, waardoor de meerdere zorg, door den veehouder aan de melkwinning besteed, ook beloond werd. Dit zou er zeer zeker krachtig toe bijdragen, dat vele wantoestanden werden opgeheven en de melkwinning en behandeling in betere banen werden geleid.

Hiermede is wel voldoende het groote belang van het onderzoek naar het aantal, in de melk aanwezige, micro-organismen aangetoond.

In de verschillende laboratoria worden zeer uiteenloopende methoden toegepast voor de bepaling van het aantal bacteriën in melk.

Als voornaamste en meest toegepaste methode mag ik wel noemen de KOCH'sche plaatmethode. Een bepaalde hoeveelheid melk wordt in verschillende verdunningen, met een hoeveelheid vloeibare agar — met of zonder toevoegsels — of gelatine vermengd, tot een plaat uitgegoten, welke bij een zekere temperatuur gedurende meerdere dagen wordt bebroed. Daarna wordt het aantal opgekomen koloniën geteld. Dit aantal, vermenigvuldigd met den verdunningsfactor, geeft dan het aantal kiemen, per c.M^3. in de melk aanwezig. Op deze methode kom ik in een ander hoofdstuk uitvoerig terug. Reeds vele publicaties zijn over deze z.g. plaatmethode verschenen, waarbij zeer uiteenloopende opgaven worden gedaan omtrent het voedingsmedium, de temperatuur en den duur der incubatie. Wat den voedingsbodem betreft, beveelt de één aan agar, een ander agar, waaraan een bepaald percentage melksuiker is toegevoegd, een derde

wei-agar. Dan zijn er enkele onderzoekers, die gelatine als het beste voedingsmedium prefereeren. Ook over de temperatuur, waarbij de platen moeten worden weggezet, leest men zeer verschillende opgaven, n.l. van temperaturen, die varieeren van kamer- tot lichaamstemperatuur. Ten slotte loopt de duur der incubatie, welke wordt aangegeven, uiteen van één dag tot 12 dagen.

Dit alles behoeft geen verwondering te wekken, aangezien er zoovele soorten micro-organismen, meestal saprophyten, in de melk kunnen voorkomen, waarvan de optimum groeivoorwaarden zoozeer verschillend zijn.

In Amerika wordt algemeen voor het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek de „Standard plate method" toegepast, waarbij als voedingsmedium bouillon- of vleesch-agar wordt gebruikt en de platen gedurende 48 uur bij 37° C. worden bebroed, waarna het aantal koloniën wordt afgelezen. Hier te lande wordt daarentegen de bouillon-gelatine-plaatmethode aanbevolen, waarbij gedurende 5 dagen bij 22° C. wordt bebroed. Deze voorbeelden illustreeren ten duidelijkste, hoe verschillend dit onderzoek wordt uitgevoerd. Het ware te wenschen, dat in alle landen een uniforme wijze van werken werd opgesteld, waardoor men in de gelegenheid zou zijn elkaars uitkomsten goed te interpreteeren.

De meest op den voorgrond tredende nadeelen, aan elke „groote-plaatmethode" verbonden, zijn:

1°. De lange tijdsduur, welke verloopt tusschen het instellen van de proef en het aflezen van het resultaat. Voor de praktijk der melkcontrôle is dit een zeer groot bezwaar, aangezien bij het aantreffen van een te hoog

kiemcijfer de melkleverancier moeilijk of niet kan nagaan, waar de bron der infectie schuilt en dus zoodoende weinig prophylactische waarde aan deze contrôle is toe te kennen.

2°. De groote hoeveelheden glaswerk en voedingsbodem, welke per onderzoek noodig zijn, alsmede de groote ruimte, welke per onderzoek in de broedstoof wordt ingenomen. Voor elk onderzoek, dat volgens de regels, door den Codex Alimentarius voor melk aangegeven, wordt uitgevoerd, zijn meerdere steriele pipetten en dito glasdoozen, benevens een evenredig aantal buizen steriele bouillon-gelatine noodig. Vooral wanneer het onderzoek over een groot aantal monsters wordt uitgebreid, eischt het schoonmaken en steriliseeren van het glaswerk, als ook het bereiden van den voedingsbodem veel werk en brengt evenredige kosten met zich.

3°. De onzekerheid, dat men, indien bouillon-gelatine als voedingsmedium wordt gebruikt, het resultaat na verloop van den vereischten tijd kan aflezen, aangezien dikwijls vervloeiing der gelatine optreedt, waardoor men het aantal koloniën niet kan bepalen.

De tweede methode, welke in Amerika veel wordt toegepast, is die van R. S. Breed [11 en 19]). Hierbij wordt 0,01 c.M³. melk door middel van een capillairpipet over 1 c.M². op een voorwerpglas uitgestreken. Na droging onder zachte verwarming wordt met behulp van xylol of een ander oplosmiddel het vet verwijderd en het preparaat opnieuw gedroogd. Daarna wordt dit ter fixeering enkele minuten in alcohol gelegd en weer gedroogd, waar-

na het gekleurd wordt met waterig methyleenblauw of een andere niet-alcalische kleurstof, welke ook niet de caseïne mag aantasten. Onder het microscoop, met gebruikmaking van een olie-immersie, worden dan de bacteriën geteld. Voor een nauwkeurige waarneming moet in honderd gezichtsvelden het aantal kiemen worden bepaald. Elke bacterie, waargenomen per gezichtsveld, komt dan overeen met ongeveer 500.000 micro-organismen per c.M³. melk. Ter vergemakkelijking van het onderzoek wordt hierbij een bepaald teloculair gebezigd.

De aan deze werkwijze verbonden voordeelen zijn:

1°. Alle bacteriën, ook die, welke tot groepjes zijn vereenigd, kunnen worden geteld.

2°. Het resultaat van het onderzoek kan zeer vlug worden afgelezen.

3°. Men krijgt een inzicht omtrent het karakter der bacterie-flora.

Als groote nadeelen staan hiertegenover:

1°. Wanneer het aantal kiemen minder dan 500.000 per c.M³. bedraagt, zijn de resultaten twijfelachtig. *Hierdoor is deze methode ongeschikt voor het onderzoek van melk met laag kiemgehalte, b.v. modelmelk.*

2°. Ook de doode micro-organismen worden meegeteld. Voor het onderzoek van gepasteuriseerde melk is ze daarom niet te gebruiken, terwijl ze ons voor de rauwe melk geen juiste aanwijzing geeft omtrent het aantal *levende* kiemen.

Een derde methode is die van Olav Skar [13 en 34]), welke veel overeenkomst met de voorgaande vertoont. Van een 2 % carbol-methyleenblauwoplossing wordt 0,2

c.M³. in een reageerbuis gegoten, en aangevuld tot 5 c.M³. met de te onderzoeken melk. Na flink schudden wordt dit mengsel in een waterbad gedurende 5 à 10 minuten op 70° C. verwarmd, waarna $^1/_{50}$ c.M³. der gekleurde vloeistof met behulp van een fijne platinanaald over een bepaald vierkant (24 × 20 m.M.), hetwelk zich op een voorwerpglas bevindt, wordt uitgestreken. Het preparaat wordt aan de lucht gedroogd en is nu voor het onderzoek gereed. Met behulp van een olie-immersie wordt het aantal bacteriën bepaald, waarbij van een oculairmicrometer gebruik wordt gemaakt.

Om het aantal kiemen per c.M³. te berekenen, moet het gemiddelde aantal, dat per gezichtsveld aanwezig is, met een zeer hoog cijfer worden vermenigvuldigd, varieerend van 500.000 tot 40.000.000 al naar de grootte van het gezichtsveld, dat wordt bekeken. De voor- en nadeelen van deze methode komen overeen met die, welke hierboven van de methode van Breed zijn opgegeven. *Ook deze methode is dus niet geschikt voor de contrôle van kiemarme melk.*

Een vierde methode, door verschillende onderzoekers toegepast, is de *reductaseproef*, welke berust op het vermogen der bacteriën bepaalde kleurstoffen te reduceeren en om te zetten in kleurlooze verbindingen. Dit ontkleuren zou des te sneller gaan, naarmate de melk meer bacteriën bevat, m. a. w. men zou uit den tijd, welke voor de reductie noodig is, tot den bacteriënrijkdom der melk kunnen besluiten. Methyleenblauw wordt algemeen als de beste, te bezigen, kleurstof aanbevolen. De proef wordt als volgt ingesteld. Bij een bepaald quantum melk voegt men een zekere hoeveelheid methyleenblauwoplossing,

waarna dit mengsel bij ± 38° C. wordt weggezet en de tijd bepaald, waarbinnen zich de melk ontkleurt.

Ducleaux is waarschijnlijk de eerste geweest, die op het verband van bacteriën met het reductievermogen der melk gewezen heeft. Verschillende onderzoekers hebben zich na hem met dit onderzoek beziggehouden en hoewel deze methode ook voorstanders telt, zijn toch de meesten van meening, dat ze voor de bepaling van het *aantal kiemen* in de melk ongeschikt is. Men is het er over het algemeen nog niet over eens, hoe de reactie eigenlijk verloopt, en of het alleen de bacteriën zijn, die de reductie bewerkstelligen. Ook betwijfelt men, of de duur der reductie parallel gaat met het bacteriegehalte. Barthel [12]) schrijft: „Diese Zahl, 10 Millionen, scheint folglich die Grenzziffer zu sein, die sich mit Hilfe der Reduktaseprobe sicher feststellen läszt. Bei einem Bakteriengehalt unterhalb dieser Zahl steht die Entfärbungszeit nicht in einem direkten Verhältnis zum Bakteriengehalt".

Op grond van 252 onderzoekingen zegt Stapenséa [14]): „Indien men het grenscijfer van het aantal bacteriën op 1 millioen stelt, gelijk de Codex Alimentarius doet, dan kan men geen gebruik van de M.-reductaseproef maken, daar een ontkleuringstijd van meer dan 6 uren zelfs geen waarborg geeft, dat het bacteriëncijfer beneden één millioen ligt".

Höyberg [16]) is van meening, dat de reductaseproef geen fijne reactie is voor de beoordeeling van den bacteriënrijkdom der melk, terwijl Dons [17]) aan het slot van zijn artikel concludeert: „Die Reduktaseprobe ist als Keimzählungsmethode sehr ungenau und aus diesem Grunde

nicht verwendbar für die amtliche Milchkontrolle".

Er zijn ook onderzoekers, die zich in meer optimistischen geest uitlaten. Een onderzoek op groote schaal zal moeten uitmaken, welke waarde de reductaseproef voor het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek heeft. M. i. staat het echter nu al wel vast, dat zij alleen beteekenis zal kunnen krijgen voor het onderzoek van zeer kiemrijke melk.

De methode, hier te lande toegepast, welke is aangegeven in den Codex Alimentarius [28]), kost veel materiaal en is zeer tijdroovend. Dat aan het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek een stiefmoederlijke rol is toebedeeld, vindt zijn oorzaak niet zoo zeer in de geringe waarde, welke men eraan toekent, dan wel in de moeilijkheid, welke het onderzoek van een groot aantal monsters meebrengt. Het is daarom de groote verdienste van Frost een methode te hebben uitgedacht, welke aan deze bezwaren te gemoet komt, omdat zij snelle uitkomsten geeft en naast de geringe ruimte, welke zij vereischt, goedkoop in haar uitvoering is.

Een aantal melkmonsters is aan een vergelijkend onderzoek onderworpen, ten einde na te gaan, of deze methode betrouwbare uitkomsten geeft en of zij bruikbaar is voor de praktijk, waarbij bijzondere aandacht is geschonken aan het onderzoek van z.g. modelmelk. Enkele onderdeelen zijn nader uitgewerkt, terwijl op grond van deze studie eenige veranderingen in de te volgen werkwijze zijn aangebracht.

HOOFDSTUK II.

LITERATUUR.

A. Overzicht.

In Augustus 1915 publiceerde W. D. Frost [1]), „Professor of Agricultural Bacteriology" aan de Universiteit te Wisconsin U. S. A., een voorloopige mededeeling over een methode, ter snelle bepaling van het aantal bacteriën in melk. Bij deze methode, welke een combinatie was van de directe telling en de cultureele methoden, werden culturen op voorwerpglazen aangelegd. Deze voorwerpglazen werden 3—6 uur in de broedstoof geplaatst, daarna gedroogd en gekleurd, waarna de koloniën met het microscoop werden bekeken.

In deze eerste mededeeling werden geen bijzonderheden vermeld; alleen werd in grove trekken aangegeven, hoe het onderzoek moest geschieden. De aangegeven werkwijze was als volgt. Een tiende c.M³. melk, vermengd met „Standard agar", werd over een bepaalde oppervlakte van een steriel voorwerpglas uitgestreken. Na stolling der agar werd het preparaat ongeveer 6 uur in de broedstoof geplaatst, onder zoodanige omstandigheden, dat uitdrogen voorkomen werd. Hierna werd het preparaat gedroogd en na een inleidende behandeling, waardoor kleurstofopname door de agar zooveel mogelijk verhinderd werd, gekleurd. Vervolgens werd het prepa-

raat iets ontkleurd, daarna afgespoeld en gedroogd. Deze gedroogde en gekleurde plaatcultuur werd met het microscoop bekeken. De kleine koloniën waren goed gekleurd en kwamen donker uit tegen de kleurlooze of lichtgekleurde omgeving. Met de zwakke vergrooting konden deze koloniën heel goed worden waargenomen. Soms waren ze, nadat de preparaten 4 uur in de broedstoof hadden gelegen, met het bloote oog duidelijk zichtbaar. Met behulp van een olie-immersie was het mogelijk de morphologie der verschillende, tot koloniën uitgegroeide bacteriën te bestudeeren.

De kiemcijfers, met deze door FROST uitgedachte methode verkregen, kwamen overeen met die der gewone plaatmethode. De verschillen waren weinig grooter dan die, welke optraden tusschen 2 platen van dezelfde verdunning of van verschillende verdunningen, bij toepassing van de „Standard method".

Bij onderzoek van gepasteuriseerde of zeer kiemarme melk moesten de kleine platen gedurende 8 uur in de broedstoof gehouden worden.

FROST eindigt deze voorloopige mededeeling met de conclusie, dat met zijn methode in $^1/_8$ tot $^1/_6$ van den tijd, voor het onderzoek volgens de standaardmethode noodig, een met deze laatste methode overeenstemmende aanwijzing van het aantal bacteriën in de melk wordt verkregen, en verder, dat, hoe hooger het bacteriegehalte is, hoe korter ook de tijd wordt, welke voor het onderzoek noodig is.

In een volgende publicatie [2]) gaf FROST een nauwkeurige beschrijving van zijn methode.

De kleine-plaatculturen werden aangelegd op gewone voorwerpglazen van 7,5 c.M. lengte en 2,5 c.M. breedte. Vooraf waren deze zorgvuldig schoongemaakt, waarna met een waspotlood langs een houten of kartonnen raam op het middengedeelte een vierkant was getrokken, van 2 bij 2 c.M. Het door de waslijnen ingesloten oppervlak bedroeg dus 400 m.M^2. De voorwerpglazen werden daarna met een gasvlam gesteriliseerd en op een warme doos geplaatst, welke voorzien was van een overhangend dak, waardoor ze tegen stof waren beschut.

In enkele buizen, welke 1 c.M^3. agar bevatten, werd deze voedingsbodem door verwarming gesmolten, waarna deze buizen ter afkoeling in een waterbad van 45° C. werden geplaatst. Tevens werd voor elk te onderzoeken melkmonster een steriele, door een wattenprop afgesloten buis in hetzelfde waterbad gebracht.

Na flink schudden werd 1 c.M^3. melk in een dezer steriele buizen gebracht en daarna dezelfde hoeveelheid van de gesmolten op 45° C. afgekoelde agar toegevoegd. Melk en agar werden goed gemengd, waarbij zorg werd gedragen, dat de agar niet tot onder 40° C. afkoelde. Te dien einde werd het mengsel af en toe in het waterbad van 45° C. gehouden. Met een steriele pipet werd $^1/_{10}$ c.M^3. van dit melk-agarmengsel op een warm voorwerpglas binnen het beschreven vierkant gebracht en met dezelfde pipet zoo vlug en gelijkmatig mogelijk over dit vierkant uitgestreken. Om de agar te doen stollen werd het preparaat enkele oogenblikken op een horizontale plaat onder een stolp geplaatst. Op deze wijze was een kleine plaat verkregen, welke $^1/_{20}$ c.M^3. melk bevatte. Indien ver-

wacht werd, dat de te onderzoeken melk meer dan 1.000.000 bacteriën per c.M^3. bevatte, werd deze vóór het mengen met de agar 1 : 2 of 1 : 10 met steriel water of steriele melk verdund, waardoor het preparaat ten slotte $^1/_{40}$ resp. $^1/_{200}$ c.M.^{3} melk bevatte.

De preparaten werden daarna in een speciaal daarvoor vervaardigd kastje gedurende 5—6 uur in een broedstoof bij 37° C. geplaatst. Op den bodem van dit kastje bevond zich een laagje water, ten einde een met waterdamp verzadigde atmosfeer te onderhouden. Wanneer slechts enkele preparaten waren vervaardigd, werd dit kastje door een PETRI-schaal vervangen.

Bij onderzoek van handelsmelk of melk, welke vóór het onderzoek eenigen tijd in een warme omgeving was geweest, was een broedtijd van 3—4 uur voldoende, terwijl voor kortelings gepasteuriseerde of zeer goede melk deze tijd waarschijnlijk tot 8 of misschien wel 12 uur moest worden verlengd.

Nadat de koloniën voldoende ontwikkeld waren, werden de preparaten gedurende 10 minuten onder zachte verwarming gedroogd. Dit drogen moest zorgvuldig geschieden, daar anders scheuren in de agar optraden.

De gedroogde plaatjes werden nu in de vlam gefixeerd, daarna gedurende 1 minuut in een 10 % oplossing van azijnzuur in 95 % alcohol gebracht en vervolgens 3 minuten gekleurd in een 1 : 4 verdunning van LOEFFLER's methyleenblauw. Hierna werden de preparaten enkele seconden ontkleurd in 95 % alcohol en verder zonder afspoelen gedroogd.

Indien de koloniën bij zwakke vergrooting werden be-

keken, kon dit geschieden, zonder van een dekglas gebruik te maken. Bij sterke vergrooting echter werd een dekglas op het preparaat gelegd, nadat de agaroppervlakte met cederolie of Canada-balsem bedekt was.

Was de melk in de juiste mate verdund, dan zag men bij zwakke vergrooting 3—50 koloniën in elk microscopisch gezichtsveld. Indien sterke vergrootingen werden gebruikt, was het bij sommige melkmonsters moeilijk koloniën van niet-gegroeide bacteriegroepen te onderkennen. In den regel werd bij deze sterke vergrootingen een hooger bacteriecijfer verkregen.

Het geheele preparaat werd bekeken, waarbij systematisch in minstens 20 velden het aantal koloniën werd geteld, n.l. langs elke diagonaal 10 velden. Van de koloniën, die op de grens van het gezichtsveld lagen, werd slechts het halve aantal meegeteld.

Om het aantal bacteriën per c.M³. melk te berekenen, werd vooraf de oppervlakte van het gezichtsveld bij elke te gebruiken vergrooting bepaald, ten einde de z.g. microscopische factor, d.w.z. het aantal malen, dat het gezichtsveld-oppervlak in het totale cultuuroppervlak begrepen is, vast te stellen. Aangezien deze voor een bepaalde lenzencombinatie bij een zekere tubuslengte constant was, behoefde ze slechts eenmaal te worden bepaald. Met behulp van een object-micrometer werd de diameter van het gezichtsveld gemeten en de oppervlakte volgens de formule πR^2 berekend. Was b.v. het oppervlak van het microscopisch veld 2 m.M²., dan bedroeg de microscopische factor $\frac{400}{2} = 200$. Het aantal bac-

teriën per c.M³. melk werd verkregen door toepassing der formule $\frac{\text{aantal getelde koloniën}}{\text{aantal getelde velden}} \times$ verdunningsfactor der melk × microscopische factor = aantal bacteriën per c.M³. melk.

Daarna deelde FROST [3]) in 1916 de resultaten mede, welke hij gedurende het voorafgaande jaar met zijn methode verkregen had. Zeven en dertig monsters melk, varieerende in bacteriënrijkdom van 675—20.000.000, werden onderzocht, waarbij de „Standard plate method" als contrôle werd toegepast. Er werd een bevredigende overeenstemming tusschen beide methoden waargenomen.

Voor het aanleggen der kleine-plaatculturen werd 1 c.M³. der vooraf krachtig geschudde melk vermengd met een gelijke hoeveelheid agar. Kiemrijke monsters werden, alvorens deze bewerking te ondergaan, met steriel leidingwater 1 : 20 of 1 : 200 verdund, welke verdunningen zelfs voor de zeer kiemrijke monsters voldoende waren. Overigens geschiedde de vervaardiging der preparaten op dezelfde wijze, als in de vorige publicatie door FROST werd aangegeven, alleen met dit verschil, dat slechts 2 minuten gekleurd werd.

Van elk melkmonster werden meerdere kleine-plaatculturen aangelegd, terwijl de koloniën in elk preparaat werden geteld met behulp van 3 verschillende objectieven, welke respectievelijk vergrootingen gaven van 82, 200 en 840.

De „Standard plate method" werd op de gebruikelijke wijze uitgevoerd, waarbij de agarplaten gedurende 48 uur in een broedstoof van 37° C. werden geplaatst. De

koloniën werden met het bloote oog en tevens met 2 verschillende vergrootingen geteld. Verschillende verdunningen werden aangelegd en alle koloniën op de verschillende platen geteld, waarna uit het gemiddelde der gevonden getallen het kiemcijfer der onderzochte melk werd vastgesteld.

Naar het bacteriënaantal werden de onderzochte melkmonsters in 4 klassen verdeeld:

Klasse A (8 monsters) minder dan 10.000 bact. per c.M³.;

Klasse B (13 monsters) van 10.000 tot 100.000 bact. per c.M³.;

Klasse C (10 monsters) van 100.000 tot 1.000.000 bact. per c.M³.;

Klasse D (6 monsters) meer dan 1.000.000 bact. per c.M³.

De vergelijking der uitkomsten, met de twee beschreven methoden verkregen, geschiedde zooveel mogelijk door de telling van de kleine-plaatculturen met behulp van de zwakste vergrooting te verrichten, terwijl die van de „Standard method" met de sterkste vergrooting werd gedaan.

Resultaten klasse A. De tellingen volgens beide methoden kwamen goed overeen. Het bacterie-aantal per c.M³. melk, vastgesteld volgens de methode van FROST, was in alle gevallen grooter, gemiddeld 60 % hooger, dan volgens de standaard-methode, terwijl de verhouding varieerde van 1,10 : 1 tot 2,86 : 1. De verschillen tusschen de resultaten van de verschillende kleine-plaatculturen van hetzelfde melkmonster waren geringer, dan die van de standaard-platen.

Resultaten klasse B. Hierbij waren de fluctuaties

grooter. De verhouding der beide tellingen varieerde van 0,17 : 1 tot 3,12 : 1. Het aantal bacteriën, bepaald met de kleine-plaatculturen, bedroeg slechts weinig minder, dan met de standaard-platen, terwijl de variatie ten opzichte van het gemiddelde bij de laatste methode grooter was.

Resultaten klasse C. De resultaten kwamen goed overeen. De verhouding der tellingen volgens beide methoden wisselde van 0,25 : 1 tot 4,14 : 1, terwijl de kleine-plaatculturen over het algemeen hoogere uitkomsten gaven dan de standaard-platen. De variatie t. o. v. het gemiddelde was bij de standaard-methode ongeveer driemaal zoo groot als bij de methode van FROST.

Resultaten klasse D. Alle tellingen in deze klasse vielen bij de kleine-plaatculturen lager uit. De verhouding der beide tellingen schommelde van 0,20 : 1 tot 0,93 : 1. De afwijkingen t. o. v. het gemiddelde waren bij de standaard-platen gemiddeld 2-maal zoo groot als bij de kleine-plaatculturen.

Op grond van deze waarnemingen herhaalde FROST zijn reeds vroeger uitgesproken conclusie: „The results obtained indicate that the difference between the counts secured by the rapid method and the ordinary or standard method usually amounts to little more than the variation, which occurs between duplicate plates, or between different dilutions in the same analysis by the ordinary plate method."

Wanneer bij de aflezing der kleine-plaatculturen sterkere vergrootingen werden gebruikt vielen de tellingen in den regel hooger uit. De melkmonsters van klasse

B en C werden met verschillende vergrootingen onderzocht, welke respectievelijk 82, 200 en 840 bedroegen. De laatste vergrooting werd verkregen door gebruik te maken van een olie-immersie. De verhouding van de hierdoor verkregen resultaten was bij klasse B gemiddeld als 1 : 2,25 : 6,13 en bij klasse C als 1 : 1,93 : 3,21. Voor beide klassen te zamen bedroeg dus het verkregen kiemcijfer bij een vergrooting van 200-maal en 840-maal, respectievelijk ruim 2-maal en 4½-maal zooveel, dan wanneer een vergrooting van 82-maal werd toegepast. Twee redenen werden hiervoor opgegeven. In de eerste plaats konden zeer kleine koloniën met de zwakke vergrooting niet worden gezien, in de tweede plaats werden bij het gebruik maken der sterkere vergrootingen groepen van doode bacteriën meegeteld.

De resultaten, verkregen met de zwakke vergrooting, kwamen in het algemeen overeen met die van de standaard-platen. Door Frost werd een lenzencombinatie met een vergrooting van 200-maal als de beste aanbevolen.

Omtrent den tijdsduur der incubatie werd vastgesteld, dat, hoe langer deze genomen werd, hoe grooter ook de koloniën waren, waardoor minder verwarring met groepen doode bacteriën plaats vond. De voornaamste beteekenis, welke Frost aan zijn methode hechtte, was de korte incubatietijd. Terwijl deze voor de standaard-methode 48 uur bedroeg, kon bij de kleine-plaatculturen met 8—12 uur worden volstaan. In de meeste gevallen was slechts 6 uur noodig, terwijl bij sommige onderzoekingen 3 uur voldoende was. In het algemeen werd aangeraden de

preparaten niet korter dan 6 uur in de broedstoof te laten. Melk, versch van de koe of kort geleden gepasteuriseerd, bevatte weinig bacteriën, welke zich slechts langzaam tot zichtbare koloniën ontwikkelden. Voor deze melk werd een incubatietijd van 12 uur noodig geacht, terwijl in handelsmelk of andere melk met hoog kiemcijfer de bacteriën veel sneller koloniën vormden, zoodat na 3 uur het grootste gedeelte kon worden geteld. Zonder nadeel kon de incubatietijd 18 uur en langer worden genomen. Er vormden zich dan weleens „spreaders", d.w.z. koloniën, die, aan de oppervlakte komend, de agaroppervlakte overgroeiden; deze werkten echter niet storend op het gebruik der kleine-plaatculturen.

Een jaar later gaf Frost [5]) een uiteenzetting van de resultaten, welke hij met zijn methode in de praktijk verkregen had, waarbij zoowel rauwe als gepasteuriseerde melk, te zamen 111 monsters, aan een vergelijkend onderzoek werden onderworpen.

Ter controleering van de kleine-plaatculturen, welke op de reeds bekende wijze werden aangelegd, werd door een anderen onderzoeker van elk melkmonster van een verdunning 1 : 10.000 twee platen gegoten en deze gedurende 48 uur in een broedstoof bij 37,5° C. geplaatst. Voor beide methoden werd hetzelfde voedingsmedium gebruikt, hetwelk slechts 1 % agar bevatte, alhoewel volgens Frost een hoogere concentratie beter ware geweest.

Van ongeveer de helft der onderzochte monsters werden ook door Frost agarplaten aangelegd. In 16 gevallen kon het aantal koloniën op beide groote platen door het voor-

komen van „spreaders" niet worden geteld, terwijl in vele gevallen een dezer platen om deze reden niet kon worden afgelezen. Ook bij de kleine-plaatculturen kwamen „spreaders" voor, die echter, in tegenstelling met de standaard-methode geen beletsel vormden voor het bepalen van het aantal koloniën. Tevens viel op te merken, dat de groote platen, van hetzelfde melkmonster aangelegd, dikwijls aanzienlijke verschillen te zien gaven. In 10 gevallen bedroeg het verschil 50 %, terwijl bij 11 monsters dit meer dan 100 % bedroeg. Ook de kiemcijfers, door den anderen onderzoeker en FROST met de groote platen verkregen, liepen dikwijls sterk uiteen; de verhouding wisselde van 1 : 0,09 tot 1 : 8, terwijl de gemiddelde verhouding 1 : 1,42 was.

In alle kleine-plaatculturen kon de telling worden uitgevoerd, ofschoon bij enkele de koloniën dicht gezaaid waren en andere „spreaders" vertoonden.

De resultaten kwamen over het algemeen met die van de standaard-platen overeen. Wanneer 3 monsters, waarbij de kleine-plaatmethode aanzienlijk hoogere uitkomsten gaf, werden uitgeschakeld, varieerde de verhouding der verkregen bacteriecijfers van 1 : 0,05 tot 1 : 7,43, terwijl de gemiddelde verhouding 1 : 0,96 was. In 48 gevallen gaf de kleine-plaatcultuur een lagere, in 26 gevallen een hoogere uitkomst dan de „Standard plate method". Enkele monsters gaven in de kleine-plaatculturen aanzienlijk lagere cijfers. Men zocht de verklaring aanvankelijk in den korten incubatietijd; wanneer deze echter in sommige gevallen verlengd werd, verkreeg men weinig hoogere cijfers. Aannemelijker was de veronderstelling,

dat de groepjes bacteriën in onverdunde melk niet gemakkelijk werden uiteengeschud, terwijl dit wel het geval was, indien verdunningen werden aangelegd. Nu en dan gaven de kleine-plaatculturen veel hoogere cijfers dan de standaard-methode. FROST zocht de verklaring hiervoor in het feit, dat bij zijn methode door de vermenging van de agar met een relatief groote hoeveelheid melk een suikerrijk voedingsmedium werd gevormd, waarin de bacteriën zich beter ontwikkelden. Hij werd hierbij gesteund door de onderzoekingen van SHERMAN (1916, Journ. Bact., 1, 481—488), die in suikeragarplaten in den regel meer koloniën tot ontwikkeling zag komen dan in gewone agar. Tevens haalde FROST een publicatie aan van CONN (Public Health Reports, August 13, 1915), waarin de uitkomsten waren neergelegd, welke verschillende onderzoekers bij onderzoek van dezelfde melkmonsters volgens de standaard-methode hadden verkregen, om aan te toonen, dat de verschillen tusschen de kleine-plaatculturen en de standaard-methode overeenkwamen met die, welke twee of meer personen bij onderzoek van hetzelfde melkmonster volgens de laatstgenoemde methode verkregen.

Bij eenige ervaring met het aanleggen der kleine-plaatculturen waren de koloniën hierin gelijkmatig verdeeld. In een tabel werd van 10 preparaten het aantal koloniën, dat in 20 velden afzonderlijk werd waargenomen, weergegeven, om aan te toonen, dat deze cijfers niet ver uiteenliepen.

Bij onderzoek van een aantal melkmonsters in de praktijk, zou men, na eerst het preparaat vlug te zijn

doorgegaan, waarschijnlijk dan ook kunnen volstaan met in 4 à 5 velden de koloniën te tellen.

In een vorig artikel was meegedeeld, dat de resultaten bij sterkere vergrooting hooger uitvielen. Dit was het geval, wanneer de incubatie 4 à 5 uur duurde. Werd deze echter tot 7 à 8 uur verlengd, dan bleek er weinig verschil te zijn, en kon die vergrooting worden toegepast, waarbij de telling het gemakkelijkst kon geschieden.

Aan het einde van het artikel werden de volgende voordeelen der kleine-plaatculturen genoemd:

1°. De vlugheid; het resultaat kan na 7 à 8 uur worden afgelezen.

2°. Meer zekerheid.

3°. Grootere hoeveelheid melk onderzocht, meestal $^1/_{20}$ c.M³.

4°. Permanente houdbaarheid der preparaten.

5°. Zuinigheid.

6°. Tijdsbesparing.

SIMMONS [6]) onderzocht 136 melkmonsters met bacteriecijfers, varieerende van 50—160.000.000 per c.M³., volgens 5 verschillende methoden, n.l. de directe microscopische telling, de „Standard plate method", de lactose-agarplaatmethode, de kleine-plaatculturen van FROST en de reductaseproef. De uitkomsten werden vergeleken met die van de „Standard plate method", zooals deze door de „American Public Health Association" was voorgeschreven.

Voor de kleine-plaatculturen werd 1 c.M³. melk goed gemengd met 1 c.M³. agar, welke vooraf gesmolten en daarna tot 45° C. afgekoeld was. Melk met een hoog

bacteriegehalte werd vóór deze menging met steriel water 1 : 10 verdund. Daarna werd $^1/_{10}$ c.M^3. van het melk (resp. verdunde melk)-agarmengsel over een oppervlak van 4 c.M^2. op een, door flambeeren gesteriliseerd, voorwerpglas gelijkmatig verdeeld. Na stolling werden de preparaten gedurende 5 à 6 uur bij 37° C. geplaatst en bij ± 100° C. op een heete plaat gedroogd. De plaatjes werden 1 minuut in een 10 % oplossing van azijnzuur in 95 % alcohol gebracht, dan zonder spoelen gedurende 3—5 minuten in de kleurstof (1 deel LOEFFLER's methyleenblauw op 4 deelen gedestilleerd water), daarna goed gespoeld en weer op de heete plaat gedroogd. De preparaten werden met verschillende vergrootingen bekeken, waarvoor de microscopische factoren resp. 227, 4650 en 21.050 bedroegen. In de meeste gevallen werd van de zwakke vergrooting gebruik gemaakt. De uitkomsten kwamen goed met die van de standaard-platen overeen; gemiddeld wezen de kleine-plaatculturen 25 % meer bacteriën aan. SIMMONS zocht hiervoor de verklaring in den beteren voedingsbodem door de melktoevoeging. Melkmonsters met hoog kiemcijfer gaven daarentegen met de standaardmethode hoogere uitkomsten, waarschijnlijk door het uiteenvallen van de bacterieklompjes bij het aanleggen der verdunningen. De kleine-plaatculturen gaven betere overeenstemming met de lactose-agarplaten dan met de gewone agarplaten.

Indien de melk minder dan 1 millioen bacteriën bevatte, gaven alle methoden, met uitzondering van die van de directe microscopische telling, bevredigende resultaten.

Vergeleken met de overige cultureele methoden, kon

met de methode van FROST in $^1/_8$—$^1/_5$ van den tijd het aantal kiemen in melk worden bepaald, terwijl tevens een inzicht werd verkregen omtrent den aard der bacterieflora.

In 1921 publiceerde FROST [7]) de verbeterde techniek voor het aanleggen der kleine-plaatculturen. In den aanvang van dit artikel legde hij er nogmaals den nadruk op, dat het niet noodzakelijk was, de preparaten slechts enkele uren in de broedstoof te laten, waardoor men verplicht zou zijn op ongelegen tijden naar het laboratorium te gaan, ten einde de culturen eruit te nemen en te drogen. Men kon ze er evengoed 16, zelfs 24 uur in laten, zonder nadeel hiervan te ondervinden. Het was dus mogelijk den éénen dag de culturen aan te leggen en deze den volgenden dag verder te onderzoeken.

Alvorens tot het instellen der proef over te gaan, werden ter gelijkmatige verdeeling de melkmonsters minstens 25-maal om en om gedraaid. Ten einde schuimvorming, welke het nauwkeurig pipetteeren zou kunnen bemoeilijken, te voorkomen, moest deze beweging voorzichtig worden uitgevoerd.

De voornaamste verandering, welke werd aangebracht, was, dat $^1/_{20}$ c.M^3. melk direct op het voorwerpglas werd gebracht, waarna ongeveer een gelijke hoeveelheid gesmolten, afgekoelde agar werd toegevoegd. Dit laatste geschiedde met bepaalde pipetten, waarvan 1 of 2 druppels ongeveer met deze hoeveelheid overeenstemden. Ten einde de melk zoo nauwkeurig mogelijk af te meten, werden hiervoor speciaal geconstrueerde pipetten gebruikt met een nauw kanaal en een spits einde. Door middel van een uitgegloeide platina lis werden melk en

agar goed gemengd en over het bekende oppervlak van 4 c.M². uitgestreken. Deze bewerking geschiedde op de „warm table", d. i. een metalen doos, aan alle zijden, met uitzondering van den boven- en onderkant, met asbest bekleed, welke met water was gevuld en op ongeveer 45° C. werd verwarmd. In horizontale ligging liet men de agar stollen, waarna de preparaten in de „moist chamber cabinet" werden geplaatst, d. i. een koperen kastje, waarin zich een uitneembaar rek bevond, dat 48 voorwerpglazen kon bevatten. Op den bodem kon water worden gebracht, terwijl tusschen het kastje en het rek ruimte werd gelaten, ten einde den waterdamp te laten circuleeren. De „moist chamber cabinet", met de preparaten erin, werd in een broedstoof van 37,5° C. geplaatst. De duur der incubatie was zeer verschillend. Voor melkmonsters, waarin de bacteriën op het oogenblik van de bemonstering zich reeds vermeerderden, was 4 uur voldoende, terwijl, als de melk van een koelinrichting kwam, of indien ze gepasteuriseerd of versch was en weinig bacteriën bevatte, 7 of 8 uur noodzakelijk bleek. Bij niet spoedeischend onderzoek kon men de preparaten tot den volgenden dag in de broedstoof laten liggen.

De kleine-plaatculturen konden ook bij kamertemperatuur (20° C.) bebroed worden; echter moest de incubatietijd in dit geval op minstens 24 uur gesteld worden, terwijl dan nog de telling lager was dan bij 37° C. Dit was echter nog niet met zekerheid vastgesteld.

Nadat de preparaten uit den incubator waren genomen, werden deze op een heete plaat of in een electrischen oven gedurende ± 5 minuten bij een temperatuur, die

even onder 100° C. lag, gedroogd, daarna 1 minuut behandeld met een 10 % oplossing van ijsazijn in 95 % alcohol en vervolgens ongeveer 2 minuten gekleurd met methyleenblauw of carbolthionine. Werd aan deze kleurstof 5 % ijsazijn toegevoegd, dan kon de behandeling met den azijnzuren alcohol achterwege blijven. Zelfs was uit de laatste onderzoekingen gebleken, dat vooraf drogen niet noodzakelijk was. De azijnzure carbolthionine werd als de beste kleurstof aanbevolen, aangezien de ondergrond hierbij helderder was dan bij aanwending van methyleenblauw. Na het kleuren werden de preparaten bij een temperatuur van even onder 100° C. op een heete plaat gedroogd.

Indien de melk meer dan 1 millioen kiemen bevatte, werd 1 c.M³. hiervan met 9 c.M³. steriele melk verdund en na krachtig schudden van deze verdunning een kleineplaatcultuur aangelegd. Met opzet werd voor deze verdunning geen water gebruikt, zooals dit bij de KOCH'sche plaatmethode het geval was, aangezien de groeivoorwaarden dan geheel anders zouden zijn en niet te vergelijken met die voor de culturen, welke uit onverdunde melk waren aangelegd.

Wilde men het omslachtige werk, hetwelk dit verdunnen meebrengt, omzeilen, dan kon men in plaats van $^1/_{20}$ slechts $^1/_{100}$ of $^2/_{100}$ c.M³. melk op het voorwerpglas brengen en hierbij een druppel steriele melk en een druppel agar voegen, waarna het geheel werd uitgestreken.

Het tellen der koloniën en het berekenen van het aantal bacteriën per c.M³. melk geschiedde op de reeds vroeger beschreven wijze.

In het algemeen kon worden volstaan met het tellen

der koloniën in 5 daartoe geschikte velden, nadat vooraf een indruk was gekregen van de verspreiding der koloniën. Bij het gebruik der sterke vergrooting werden in preparaten, die 7 à 8 uur in de broedstoof waren geweest, de kleine bacteriegroepjes niet meegeteld, aangezien in dezen tijd de oorspronkelijk in de melk voorkomende levende bacteriën tot flinke koloniën waren uitgegroeid.

Voor het onderzoek te velde had Frost een bijzonder soort koffer vervaardigd, waarin al het materiaal, voor het onderzoek benoodigd, kon worden meegenomen, terwijl, door in de „warm table" water van ± 43° C. te brengen, het geheel als broedstoof dienst kon doen.

Hatfield en Park [9]) stelden een onderzoek in naar de waarde van de kleine-plaatculturen voor het bacteriologisch melkonderzoek, waarbij zij enkele veranderingen in de te volgen werkwijze aanbrachten. In plaats van, zooals Frost voorschreef, de melk vóór het onderzoek 25-maal voorzichtig te schudden, om schuimvorming tegen te gaan, werd door hen krachtig geschud en daarna de flesch schuin gehouden, om het gevormde schuim naar één kant te laten drijven, ten einde met de pipet melk zonder luchtbellen te kunnen opzuigen. Een tweede verandering bestond hierin, dat na het kleuren der preparaten deze enkele seconden in alcohol werden ontkleurd.

Een groot aantal melkmonsters werden onderzocht, waarbij als contrôle van de kleine-plaatculturen in alle gevallen de standaard-methode werd toegepast. De kleine-plaatculturen werden alle gedurende 15 à 16 uur in de broedstoof geplaatst. Van elk preparaat werden bij het begin van het onderzoek in 10 velden de koloniën geteld,

terwijl later door de grootere ervaring deze zoo gelijkmatig verdeeld lagen, dat met 2 à 3 velden kon worden volstaan. Als regel was de keuze van het te gebruiken objectief van weinig invloed op de telling. Het effect van een ongewone flora in de melk werd gedemonstreerd door het onderzoek van 39 monsters gepasteuriseerde melk, welke alle van één inrichting afkomstig waren. Terwijl de resultaten der standaard-methode varieerden van 62.000 tot 710.000 bacteriën per c.M³., gaven de kleine-plaatculturen bij kleine vergrooting tellingen, welke alle onder de 10.000 bleven. Bij gebruik van sterkere vergrootingen waren de uitkomsten hooger, terwijl met de olie-immersie massa's bacteriën werden gezien, welke niet tot duidelijke koloniën waren uitgegroeid. Opmerkelijk was, dat in de standaard-platen slechts zeer kleine koloniën ontwikkeld waren.

Na aanvankelijk voor de kiemrijke monsters verschillende verdunningen met steriele melk te hebben gemaakt, werden deze ter vereenvoudiging der methode ten slotte achterwege gelaten. Van deze monsters werd nu op de linkerzijde van het voorwerpglas 0,05 c.M³. en op de rechterzijde 0,01 c.M³. melk gebracht, waarna door toevoeging van 2 druppels agar 2 culturen op de gewone wijze werden aangelegd.

In afwijking van de voorschriften van Frost werd dus geen sterielemelk aan de afgemeten 0,01 c.M³. toegevoegd.

Te zamen werden 241 monsters melk onderzocht. De goede soorten melk gaven het geringste verschil met de standaard-platen te zien. De gepasteuriseerde en de te pasteuriseeren melk vertoonden grootere variaties.

De uitkomsten waren nu eens hooger, dan weer lager dan de standaard-methode. Indien de melk meer dan één millioen kiemen per c.M³. bevatte, was het verschil in den regel grooter. De schrijvers achtten een nadere studie van de verdunning der melk en het onderzoek van melk met ongewone bacteriesoorten noodzakelijk. Hun conclusie luidde : „Our present opinion is that both methods are to be depended upon and that, according to the local conditions, one or the other can be utilized".

Bovendien zijn nog twee artikelen over de kleine-plaatculturen verschenen, welke in Nederland echter niet te verkrijgen waren. In de literatuurlijst zijn deze publicaties onder Nos. 4 en 8 aangegeven.

B. Enkele opmerkingen naar aanleiding van de literatuur.

Het is opvallend, dat, waar de eerste mededeeling over de kleine-plaatculturen reeds in 1915 gedaan is, alleen van Amerikaansche zijde onderzoekingen hierover zijn verricht.

Een ernstig bezwaar tegen de onderzoekingen naar de betrouwbaarheid der nieuwe methode is, dat de contrôleplaten bij 37° C. werden bewaard. In zijn voorloopige mededeeling erkent Frost, dat bij 22° C. meer koloniën tot ontwikkeling komen. In Amerika heeft men echter de temperatuur van 37° C. gekozen, omdat hierbij het resultaat reeds na 2 dagen bekend zou zijn. Deze overweging moge misschien geldig zijn voor het onderzoek van melk in de praktijk, waar men bezwaarlijk 5 à 7 dagen op de uitkomst kan wachten, voor het controleeren van een nieuwe methode is ze principieel fou-

tief. Zoolang men bij het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek niet op een bepaalde bacteriesoort onderzoekt, waarvan de optimum groeitemperatuur bekend is, dient die methode te worden gevolgd, welke de hoogste resultaten geeft. De contrôle-methode, door de Amerikaansche onderzoekers toegepast, zou nog te verdedigen zijn, indien er een constante verhouding bestond tusschen de resultaten, welke de agarplaten bij 37° C. en 22° C. opleveren. Deze verhouding is echter zeer wisselend.

Een tweede bezwaar tegen bovengenoemde onderzoekingen is, dat, behoudens een onvolledig onderzoek van Frost over de resultaten bij kamertemperatuur (20° C.), alle experimenten met de kleine-plaatculturen bij ± 37° C. werden verricht. Ook hierbij is de temperatuur zeer willekeurig gekozen. In melk komen vele soorten micro-organismen met uiteenloopende optimum groeitemperaturen voor en het is de vraag, of bij 37° C. over het algemeen de beste groeivoorwaarden worden gegeven. De saprophyten zijn meestal numeriek sterk in de meerderheid en het is bekend, dat deze bij lagere temperaturen veel beter tot ontwikkeling komen. Om deze reden is het gewenscht na te gaan, bij welke temperatuur de beste resultaten met de kleine-plaatculturen worden verkregen.

HOOFDSTUK III

ONDERZOEK NAAR EEN GOEDE CONTROLE-METHODE VOOR DE KLEINE-PLAATCULTUREN.

De eerste vraag, welke zich bij het onderzoek naar de waarde van de methode der kleine-plaatculturen voordeed, was, welke contrôle-methode moest worden toegepast. Het lag voor de hand, om, waar het hier betrof de bepaling van het aantal levende micro-organismen in melkmonsters met uiteenloopend kiemgehalte, daarvoor te kiezen de KOCH'sche plaatmethode. Immers de methode volgens BREED, zoowel als die van SKAR, als de reductaseproef zijn voor de kiemarme monsters ongeschikt, afgezien nog van de andere bezwaren, waarop in de inleiding reeds gewezen is.

Na kennisneming van hetgeen in de literatuur over de KOCH'sche plaat-methode gepubliceerd was, waarbij viel op te merken, dat zeer uiteenloopende opgaven werden gedaan omtrent samenstelling van den voedingsbodem, duur en temperatuur der incubatie, werd aanvankelijk de methode aangewend, welke hier te lande algemeen gebruikelijk was en aangegeven stond in den Codex Alimentarius voor melk. Duidelijkheidshalve volgt hier in zijn geheel, hetgeen daaromtrent is vermeld.

„Melk, bestemd voor quantitatief bacteriologisch onderzoek, wordt na deskundige bemonstering zoo spoedig en

zoo koel mogelijk, bij voorkeur in ijs-verpakking, vervoerd naar het laboratorium, om daar zoo spoedig mogelijk onderzocht te worden.

Hier worden de volgende verdunningen gemaakt:

a. 1 c.M³. melk met 99 c.M³. steriele, physiologische keukenzoutoplossing (0,9 %); verdunningsfactor : 100;

b. Van *a* 1 c.M³. met 99 c.M³. steriele, physiologische keukenzoutoplossing (0,9 %); verdunningsfactor : 10.000.

Van elk dezer verdunningen wordt 0,5 c.M³. gelijkmatig verdeeld in bouillongelatine tot platen gegoten.

Na 5 dagen broeden bij 22° C. worden op de platen, waar dit mogelijk is, geteld:

het aantal koloniën en het aantal soorten van microorganismen.

Dit laatste onderzoek wordt ondersteund door microscopische waarneming en, zoo noodig, door het aanleggen van culturen in of op verschillende voedingsbodems.

Het aantal koloniën wordt opgegeven per c.M³. melk.

Wanneer in bijzondere gevallen de telling vroeger geschiedt, wordt hiervan, onder vermelding van de reden van afwijking, aanteekening gehouden bij de opgave van het aantal koloniën."

De bouillongelatine werd bereid volgens het recept, daarvoor in den Codex aangegeven.

Al heel spoedig bleek, hetgeen reeds bij vorige onderzoekingen was opgemerkt, dat in een groot aantal gevallen aan deze methode een groot bezwaar, n.l. het vervloeien der gelatine, verbonden was, waardoor het aantal koloniën niet of zeer onnauwkeurig kon worden bepaald.

Om deze reden werd nagegaan, of de gelatine door agar zou kunnen worden vervangen, ten einde meer zekerheid te hebben het eindresultaat van het contrôle-onderzoek te kunnen aflezen. Allereerst diende nu te worden nagegaan, of bij deze nieuwe methode, welke in het vervolg agarplaat- of agargietmethode zal worden genoemd, quantitatief even hooge uitkomsten werden verkregen. Te dien einde werden 100 melkmonsters aan een vergelijkend onderzoek onderworpen, waarbij zoowel de gelatine- als agarplaatmethode bij dezelfde melk werd toegepast. Van deze monsters waren 87 afkomstig van verschillende z.g. modelbedrijven, terwijl de overige 13 zonder bijzondere voorzorgsmaatregelen gewonnen waren. Met opzet werd voor het overgrootste gedeelte melk genomen, waarvan verwacht mocht worden, dat ze niet al te veel bacteriën zou bevatten, ten einde onnauwkeurigheden, welke sterke verdunningen veroorzaken, zoo gering mogelijk te doen zijn.

Techniek der gelatine-plaatmethode.

Bij deze en de hiernavolgende methoden werd gebruik gemaakt van steriel glaswerk.

Nadat het melkmonster goed geschud was ter gelijkmatige verdeeling van de verschillende bestanddeelen, werd met een pipet 10 c.M³. der te onderzoeken vloeistof in een buis gebracht, welke met een kurk was afgesloten. Eenige minuten achtereen werd nu flink geschud, waarna 1 c.M³. gebracht werd in een kolfje met 49 c.M³. steriele, physiologische keukenzoutoplossing. Op den bo-

dem van het kolfje bevonden zich glaskogeltjes, om de vermenging te vergemakkelijken. Na schudden werden van deze verdunning 2 Petri-schalen bedeeld, ieder met 0,5 c.M³., terwijl tevens 1 c.M³. werd gebracht in een met een kurk afgesloten buis, waarin 9 c.M³. steriele, physiologische keukenzoutoplossing. Weer werd enkele minuten krachtig geschud en met behulp van een andere pipet van deze tweede verdunning 0,5 c.M³. in 2 Petri-schalen gevoegd. Bovendien werd 1 c.M³. in een tweede buis met 9 c.M³. physiologische keukenzoutoplossing gebracht, weer flink geschud en van deze derde verdunning 2 Petri-schalen met 0,5 c.M³. bedeeld.

In elk der 6 genoemde Petri-schalen werd een buis met 15 c.M³. vloeibare gelatine leeggegoten. De gelatine was van te voren in een waterbad bij 45° C. opgesmolten en daarna tot 25° C. afgekoeld. Het uitgieten geschiedde op een koude, horizontaal gestelde glasplaat. Na stolling der gelatine werden de glasdoozen in een broedstoof bij 22° C. geplaatst.

Techniek der agarplaatmethode.

Deze kwam geheel overeen met de hierboven beschrevene, met dit verschil, dat de bouillongelatine vervangen werd door bouillonagar, welke bij 100° C. was opgesmolten en daarna tot 45° C. afgekoeld. De agarplaten werden eveneens bij 22° C. weggezet.

De bouillonagar werd als volgt bereid: 1 K.G. vetvrij rundvleesch, in kleine stukjes gesneden, werd overgoten met 2 L. water en daarna langzaam aan den kook ge-

bracht. Na 2 uur koken werd de bouillon afgegoten, het vleesch hierin uitgeperst en tot 2 Liter met leidingwater bijgevuld. Daarna werd tot 1 % pepton „WITTE" en ½ % keukenzout toegevoegd. De vloeistof werd met 10 % carbonas natricus-oplossing tot zwak alkalisch tegenover vochtig lakmoespapier geneutraliseerd, waarna 40 gram fijn geknipte agar-agar werd toegevoegd. Dit mengsel werd 2 uur in den KOCH'schen stoomer bij 100° C. geplaatst om de agar-agar te smelten. Daarna werd de reactie weer nagegaan, welke soms iets zuur was geworden, waarna een geringe hoeveelheid alcali werd toegevoegd, totdat de oorspronkelijke alkalische reactie was hersteld. De agarmassa werd nu tot 50° C. afgekoeld, waarbij troebelingen ontstonden en zich tevens een neerslag vormde, en daarna direct weer 1—1½ uur in het KOCH'sche toestel geplaatst. Deze laatste bewerking werd ter betere klaring van den voedingsbodem in den regel nog eens herhaald. Na filtreeren door een dubbele laag watten werd 15 c.M³. in steriele cultuurbuizen afgemeten. Deze werden door middel van een wattenprop afgesloten en gedurende ½ uur in het KOCH'sche apparaat gesteriliseerd. Na afkoeling en stolling werden deze gevulde buizen 2 dagen bij 37° C. bewaard, ter onderzoek op steriliteit.

Het aflezen der platen.

Elken dag werden de platen nagezien, waarbij al spoedig bleek, dat, alvorens het maximum aantal koloniën zichtbaar was, het broeden, zoowel voor de agar-

als gelatineplaten, gedurende minstens 5 dagen moest worden voortgezet, en dan nog konden vele koloniën slechts met een loupe worden geteld. Ook als langer, ja zelfs 10 dagen werd gewacht, kon het vergrootglas niet worden gemist. De oorzaak hiervan was waarschijnlijk wel hierin te zoeken, dat voor verschillende bacteriën de ontwikkelingsvoorwaarden onvoldoende waren. De samenstelling van het voedingsmedium en de broedtemperatuur zoodanig te kiezen, dat alle bacteriën, welke in melk kunnen voorkomen, tot flinke koloniën uitgroeien, zal echter vermoedelijk wel tot de onmogelijkheden behooren. Tevens viel op te merken, dat, wanneer vele koloniën zich op één plaat ontwikkelden, deze kleiner van afmetingen bleven, dan wanneer dit aantal gering was.

Ter vermijding van vergissingen werden de getelde koloniën met een stip O.I. inkt aangegeven. Het aflezen der agarplaten leverde weinig moeilijkheden op, behoudens enkele gevallen, waarbij overgroeiing was opgetreden, zoodat de agaroppervlakte geheel of gedeeltelijk met een bacteriënlaag overtrokken was of waarbij weelderige schimmelgroei was ontstaan. Van de gelatineplaten echter waren reeds na enkele dagen vele min of meer vervloeid, hetwelk na langeren incubatietijd toenam. Van de 100 ingestelde onderzoekingen, waarbij het resultaat der agarplaten kon worden afgelezen, moesten 30 wegens gedeeltelijke of algeheele vervloeiing der gelatineplaten buiten beschouwing blijven. Het bepalen van het aantal koloniën geschiedde volgens de regels, welke in het rapport van de „Laboratory Section of the American Public Health Associa-

tion", Oct. 24, 1916, waren vastgesteld Zooveel mogelijk werden die platen afgelezen, welke 30—300 koloniën bevatten, terwijl van de voor telling in aanmerking komende platen steeds het gemiddelde werd genomen. Platen met minder dan 30 koloniën werden, indien mogelijk, buiten beschouwing gelaten. Elke kolonie, welke in de met verschillende verdunning bedeelde glasdoozen gegroeid was, kwam overeen met respectievelijk 100, 1000 en 10.000 bacteriën per c.M³. melk. De uitkomsten der platen, die van dezelfde verdunning in den overeenkomstigen voedingsbodem waren aangelegd, liepen dikwijls sterk uiteen en verschillen van 50 en meer procent konden geen zeldzaamheid genoemd worden. De sterkste verdunningen gaven over het algemeen het hoogste eindresultaat, waarschijnlijk door het niet gelijkmatig vermengen en door het meerdere schudden, waardoor bacteriëngroepjes betere gelegenheid kregen uiteen te vallen en tot meerdere koloniën uit te groeien.

Een overzicht der 70 onderzoekingen, waarbij zoowel de gelatine- als agarplaten konden worden afgelezen, werd in tabel 1 (zie blz. 44—46) weergegeven. De eerste kolom vermeldt de nummers der gevallen, welke gerangschikt werden volgens het opklimmend aantal der op de gelatineplaten ontwikkelde koloniën. De tweede en derde kolom vermelden het bacteriënaantal per c.M³. melk, dat respectievelijk volgens de gelatine- en agarplaatmethode bij 22° C. verkregen werd. In de laatste kolom werd de verhouding dezer beide tellingen berekend. Frappant was, dat slechts in drie gevallen, t.w. nos. 20, 23 en 39, de gelatineplaten hoogere uitkomsten gaven, waarvan de ge-

vallen 23 en 39 eigenlijk uitvielen, aangezien hierbij de verschillen zoo gering waren, dat zij binnen de waarnemingsfouten bleven. De verhoudingen der beide tellingen varieerden van 1 : 0,30 tot 1 : 31,67, terwijl het gemiddelde aantal bacteriën, verkregen volgens de agarplaatmethode 2,25-maal zoo groot bleek als dat, met de gelatineplaten verkregen. De nos. 5, 8, 45, 54, 58 en 59 gaven zeer groote verschillen in het voordeel van de agar te zien, voor welk verschijnsel geen verklaring gevonden werd. Wanneer deze waarnemingen buiten beschouwing werden gelaten, bleek de verhouding 1 : 1,64 te worden, zoodat dan nog op de agar ruim 1½-maal zooveel koloniën waren gegroeid als op de gelatine.

Op grond van dit experiment mag worden geconcludeerd, dat bij het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek, ingesteld volgens de bepalingen van den Codex Alimentarius, de bouillongelatine door bouillonagar mag worden vervangen.

Aangezien de koloniën in de agarplaten bij 22° C. pas na 5 dagen konden worden geteld, terwijl dan nog in vele gevallen deze zeer klein, ja nauwelijks zichtbaar waren, werd nu nagegaan, of 1°. door toepassing van een hoogere broedtemperatuur, 2°. door de verdunde melk over een gereed zijnde agarplaat uit te strijken, de vermeerdering der bacteriën kon worden bespoedigd.

Te dien einde werden 17 melkmonsters van diverse herkomst en waarvan verwacht mocht worden, dat ze een laag kiemcijfer zouden bezitten, elk volgens drie methoden onderzocht:

1°. Volgens de agarplaatmethode bij 22° C.

2°. Volgens dezelfde methode, waarbij echter de platen bij 37° C. werden weggezet.

3°. Volgens de „agarstrijkmethode" bij 37° C.

Bij de 2 eerste methoden werden dezelfde verdunningen, als bij het vorige experiment beschreven, gebruikt, terwijl weer elke verdunning in duplo werd onderzocht. Voor de derde methode werden verdunningen van 1 : 10, 1 : 100 en 1 : 1000 gemaakt, terwijl van elke verdunning 2 agarplaten met 0,1 c.M³. werden bedeeld, waarna deze vloeistof met een rechthoekig omgebogen platina-naald of met een glasspatel volgens DRIGALSKI zooveel mogelijk over de agaroppervlakte verdeeld werd.

Iederen dag werden alle glasdoozen gecontroleerd, waarbij bleek, dat bij de agarplaatmethode van 37° C. de koloniën na 3 dagen konden worden geteld, dat dan echter ook nog vele koloniën zeer klein waren gebleven.

Ook na veel langer, zelfs 10 dagen, broeden, was dit nog het geval. Bij de agarstrijkmethode waren de koloniën doorgaans veel grooter, terwijl reeds na 2 dagen het aantal kon worden bepaald. Tevens werd een grootere variatie in het kolonietype waargenomen, waardoor, dit zij terloops opgemerkt, een beter inzicht in den aard der bacterieflora werd verkregen. Daartegenover stond, dat in vele gevallen de koloniën geconflueerd waren, waardoor het aantal moeilijk kon worden opgegeven.

De bepaling van het aantal kiemen geschiedde volgens de bij de vorige proef beschreven regels. De uitkomsten werden weergegeven in tabel 2 (zie blz. 47).

De eerste kolom gaf de nummers weer der onderzoekingen, die gerangschikt werden volgens het opklim-

mend aantal bacteriën, verkregen volgens de agarplaatmethode bij 22° C., welke in tegenstelling met de strijkmethode, agargietmethode werd genoemd. De drie daarop volgende kolommen vermeldden het aantal kiemen per c.M³. melk, respectievelijk bepaald met de daarboven vermelde werkwijze. In de laatste kolom werden de verhoudingen der tellingen volgens de drie methoden weergegeven. Slechts bij nummer 1 gaf de agarplaatmethode bij 37° C. de hoogste uitkomsten, terwijl in alle andere gevallen de agargietmethode bij 22° C. de hoogste cijfers te zien gaf. De verhouding der bacteriecijfers volgens beide eerste methoden varieerde van 1 : 0,25 tot 1 : 1,08, terwijl gemiddeld de agarplaten bij 22° C. bijna tweemaal zoo hooge uitkomsten gaven als die bij 37° C. De verhouding der kiem-aantallen, volgens de eerste en derde methode, varieerde van 1 : 0,1 tot 0,71, terwijl gemiddeld het bacteriecijfer bij de gietmethode bij 22° C. driemaal zoo hoog was, als de strijkmethode bij 37° C. daarvoor aangaf.

De betere groeivoorwaarden voor de in de melk voorkomende bacteriën bij lagere temperaturen gaf een verklaring voor het hoogere kiemcijfer bij 22° C., terwijl het nog geringere aantal bij de „strijkmethode" op grond van confluentie moest worden verklaard.

Op grond van deze proefnemingen mag wel worden geconcludeerd, dat van de onderzochte werkwijzen de agarplaatmethode bij 22° C. verreweg de beste is. Daarom werd besloten, als contrôle voor de kleine plaatculturen, deze methode toe te passen.

TABEL 1.

Aantal bacteriën per c.M³. melk volgens gelatine- en agarplaatmethode bij 22° C.

Nos.	Gelatineplaat-methode 22°C.	Agarplaat-methode 22°C.	Verhouding der tellingen
1.	1.500	5.900	1 : 3.93
2.	2.000	4.500	1 : 2.25
3.	2.300	3.400	1 : 1.48
4.	2.400	5.700	1 : 2.38
5.	2.400	29.100	1 : 12.13
6.	2.500	2.900	1 : 1.16
7.	2.800	11.500	1 : 4.11
8.	2.800	39.500	1 : 14.11
9.	2.800	7.200	1 : 2.57
10.	2.800	8.800	1 : 3.14
11.	3.200	10.500	1 : 3.28
12.	3.300	4.800	1 : 1.45
13.	3.300	10.300	1 : 3.12
14.	3.400	4.100	1 : 1.21
15.	3.400	5.500	1 : 1.62
16.	3.400	4.500	1 : 1.32
17.	3.700	24.500	1 : 6.62
18.	3.900	5.400	1 : 1.38
19.	3.900	5.200	1 : 1.33
20.	4.000	1.200	1 : 0.30
21.	4.000	4.900	1 : 1.23
22.	4.300	4.500	1 : 1.05
23.	4.400	4.300	1 : 0.98
24.	4.600	7.000	1 : 1.52
25.	5.000	20.000	1 : 4.00

TABEL 1 (*Vervolg*).

Nos.	Gelatineplaat-methode 22°C.	Agarplaat-methode 22°C.	Verhouding der tellingen
26.	5.100	8.700	1 : 1.71
27.	5.200	12.300	1 : 2.37
28.	5.500	7.200	1 : 1.31
29.	5.600	6.700	1 : 1.20
30.	5.900	7.000	1 : 1.19
31.	6.100	10.400	1 : 1.70
32.	6.300	18.200	1 : 2.89
33.	6.400	12.700	1 : 1.98
34.	6.600	7.600	1 : 1.15
35.	7.100	8.100	1 : 1.14
36.	7.400	15.900	1 : 2.15
37.	7.600	22.000	1 : 2.89
38.	8.400	12.000	1 : 1.43
39.	8.700	8.600	1 : 0.99
40.	9.100	30.600	1 : 3.36
41.	9.500	15.400	1 : 1.62
42.	11.000	16.200	1 : 1.47
43.	11.700	50.800	1 : 4.34
44.	11.800	18.500	1 : 1.57
45.	12.000	103.000	1 : 8.58
46.	12.000	12.400	1 : 1.03
47.	14.500	19.000	1 : 1.31
48.	14.500	17.500	1 : 1.21
49.	15.000	28.300	1 : 1.89
50.	15.300	20.700	1 : 1.35
51.	16.600	16.700	1 : 1.01
52.	17.200	12.000	1 : 0.70
53.	18.600	32.400	1 : 1.74

TABEL 1 (*Vervolg*).

Nos.	Gelatineplaat-methode 22°C.	Agarplaat-methode 22°C.	Verhouding der tellingen
54.	21.000	665.000	1 : 31.67
55.	22.000	78.500	1 : 3.57
56.	23.000	28.000	1 : 1.22
57.	23.600	25.100	1 : 1.06
58.	23.800	590.000	1 : 24.79
59.	26.000	450.000	1 : 17.31
60.	30.800	44.200	1 : 1.44
61.	30.900	34.500	1 : 1.12
62.	40.000	80.000	1 : 2.00
63.	40.900	45.900	1 : 1.12
64.	56.000	64.000	1 : 1.14
65.	102.000	272.000	1 : 2.67
66.	200.000	390.000	1 : 1.95
67.	350.000	415.000	1 : 1.19
68.	385.000	1.160.000	1 : 3.01
69.	395.000	525.000	1 : 1.33
70.	700.000	725.000	1 : 1.04
gemidd.	40.469	91.119	1 : 2.25

TABEL 2.

Aantal bacteriën per c.M³. melk volgens agargietmethode 22° C. agargietmethode 37° C. en agarstrijkmethode 37° C.

Nos.	Agargietmethode 22° C.	Agargietmethode 37° C.	Agarstrijkmethode 37° C.	Verhouding der tellingen
1.	5.900	6.400	3.100	1 : 1.08 : 0.53
2.	8.000	7.000	5.700	1 : 0.88 : 0.71
3.	11.500	7.300	7.400	1 : 0.63 : 0.64
4.	13.200	6.800	6.400	1 : 0.52 : 0.48
5.	16.900	6.500	5.900	1 : 0.38 : 0.35
6.	17.400	9.800	7.300	1 : 0.56 : 0.42
7.	17.500	9.300	8.600	1 : 0.53 : 0.49
8.	17.600	10.600	4.900	1 : 0.60 : 0.28
9.	21.000	12.300	9.500	1 : 0.59 : 0.45
10.	22.500	16.900	11.900	1 : 0.75 : 0.53
11.	25.100	11.000	8.600	1 : 0.44 : 0.34
12.	25.400	12.500	11.800	1 : 0.49 : 0.46
13.	33.000	8.200	7.300	1 : 0.25 : 0.22
14.	37.000	36.000	19.600	1 : 0.97 : 0.53
15.	45.000	32.200	15.000	1 : 0.72 : 0.33
16.	51.000	38.000	5.100	1 : 0.75 : 0.10
17.	53.500	13.500	11.200	1 : 0.25 : 0.21
18.	78.000	29.000	14.200	1 : 0.37 : 0.18
gemidd.	27.750	15.183	9.083	1 : 0.55 : 0.33

HOOFDSTUK IV.

BESCHRIJVING DER KLEINE-PLAATMETHODE GETOETST AAN EIGEN ONDERZOEK.

Alvorens een bespreking te houden over de resultaten, verkregen met de „little plate method" volgens FROST — voortaan *kleine-plaatmethode* genoemd — volgt hier eerst een overzicht van de benoodigde apparatuur en het materiaal, benevens van de techniek, welke voor deze bacterietelling werd toegepast.

A. Benoodigde apparaten.

Voorwerpglazen. Hiervoor worden de gewoonlijk gebruikte modellen genomen, welke 76 m.M. lang en 26 m.M. breed waren.

„*Marking Guide*". Dit is een apparaat om gemakkelijk en nauwkeurig vierkanten van 4 c.M². oppervlak op de voorwerpglazen te teekenen langs 2 metalen modellen. Op elk glas worden twee vierkanten aangebracht, aangezien elk onderzoek in duplo geschiedde. Zie photo 1.

Waspotlooden. Hiermede werden bovengenoemde vierkanten geteekend. Het groote voordeel boven andere glaspotlooden was, dat ze zeer gemakkelijk op glas hun kleurstof afgaven, terwijl bij de volgende bewerkingen deze zeer moeilijk losliet.

Pincet van bijzondere constructie n.l. met een lang, recht en een iets korter omgebogen been. Het lange been

was voorzien van een verbreeding met een opstaanden rand, waartegen het voorwerpglas onbeweeglijk in het pincet gefixeerd kon worden. Zie photo 1. Met dit pincet konden de verschillende manipulaties zeer gemakkelijk uitgevoerd worden.

„*Warm Table*". Zie photo 2. Dit toestel dient om de voorwerpglazen, welke erop gelegd worden, op een bepaalde temperatuur te houden, n.l. bij het aanleggen der kleine-plaatculturen op ± 45° C. en bij het drogen der preparaten op 80° à 90° C. Het bestaat uit een rechthoekige, metalen doos, aan alle zijden, behalve aan boven en onderzijde, door asbest omgeven. Deze doos rust op 3 metalen pooten, welke losgeschroefd kunnen worden, waardoor de bovenzijde altijd in horizontalen stand kan worden gebracht. Aan de rechterzijde van het bovenvlak bevinden zich 2 schuin geplaatste buizen, welke in het lumen van de metalen doos uitmonden en waarin bij het instellen der proef buizen met gesmolten agar worden gebracht. Aan de linkerzijde is een opening aangebracht, waardoor men water in de doos kan laten vloeien en waarin tevens door middel van een doorboorde kurk een thermometer bevestigd wordt, ten einde de temperatuur van het waterbad te kunnen aflezen. De verwarming vindt plaats door een brander, welke met klemmetjes aan de metalen pooten is bevestigd en door middel van een gummislang met de gasleiding verbonden is.

Steriele pipetten van 10, 1 en 0,1 c.M³. De pipetten van 10 c.M³. dienen om van het oorspronkelijke melkmonster een gedeelte in een steriele buis over te brengen, die van 1 c.M³. om druppels agar van de vereischte grootte te

laten uitvloeien en die van 0,1 c.M³. om zoo nauwkeurig mogelijk $^1/_{20}$ c.M³. melk te kunnen afmeten. Deze laatste pipetten zijn in 10 gelijke deelen verdeeld en bezitten een puntig eind, terwijl de deelstrepen op voldoenden afstand van elkaar liggen.

Glazen plaat, met *verstelbaren drievoet*, *waterpasje* en *glazen stolp*. Door middel van het waterpasje wordt nagegaan, of de glazen plaat horizontaal ligt. Deze glazen plaat dient om de aangelegde kleine-plaatculturen op te leggen, ten einde de agar te laten stollen, terwijl de glazen stolp over de preparaten heen wordt geplaatst, om verontreiniging uit de lucht te voorkomen.

Incubator met preparatenrek. Zie photo 3. Deze incubator bestaat uit een metalen kastje, waarin een uitneembaar rek, dat 48 voorwerpglazen kan bevatten, geplaatst is. Op den bodem is ruimte gelaten, om water in te brengen, ten einde een vochtige atmosfeer in den incubator te onderhouden, terwijl voor goede circulatie van den waterdamp ruimte tusschen de wanden van het kastje en het preparatenrek wordt gelaten. Hierdoor wordt het uitdrogen der preparaten voorkomen.

Broedstoof om den incubator in te plaatsen.

Kleurbakjes, ten einde meerdere preparaten gelijktijdig te kunnen kleuren.

B. Benoodigd materiaal.

Voedingsbodem. Hiervoor werd in den aanvang 2 % bouillonagar gebruikt, terwijl later de 1½ % concentratie genomen werd, aangezien hiermede door het minder vlug stollen op het warmwaterbad bij het vermengen met de

melk mooiere preparaten werden verkregen. Overigens geschiedde de bereiding op de wijze, zooals in het vorige hoofdstuk is aangegeven.

10 % *Oplossing van ijsazijn in* 95 % *alcohol.* Met deze vloeistof werden de preparaten na het broeden behandeld, ten einde de agar minder geschikt te maken voor het opnemen van kleurstof. Bij nader onderzoek bleek echter, dat deze voorbehandeling gemist kon worden, indien ijsazijn bij de kleurstof werd gevoegd.

Kleurstof. Door FROST werden 2 kleurstoffen aanbevolen, welke beide goede resultaten gaven: 1°. Een oplossing van 1 deel LOEFFLER's methyleenblauw in 3 deelen gedestilleerd water of 1 deel verzadigde, alcoholische methyleenblauwoplossing in 40 deelen gedestilleerd water. 2°. Carbolthionine met ijsazijn. Deze kleurstof werd volgens onderstaand recept bereid: 1 gram thionineblauw en 2,5 gram carbolzuur werden gevoegd bij 400 c.M³. gedestilleerd water. Dit mengsel liet ik gedurende een nacht bij kamertemperatuur staan, daarna werd het gefiltreerd en bij het filtraat 20 gram ijsazijn gevoegd.

C. Techniek van de kleine-plaatmethode.

Het te onderzoeken monster werd ongeveer 20-maal het onderst boven gedraaid ter gelijkmatige verdeeling der verschillende bestanddeelen. De melk bevond zich in den regel in afgesloten flesschen en vertoonde bij aankomst op het laboratorium dikwijls een min of meer dikke roomlaag, welke door schudden zoo gelijkmatig mogelijk werd verdeeld. Nadat de flesch voorzichtig geopend was, waarbij zorg werd gedragen den inhoud niet te ver-

ontreinigen, werd met een steriele pipet 10 c.M³. in een steriele reageerbuis, voorzien van een steriele gummistop, overgebracht. Deze buis werd eenige minuten geschud, om zooveel mogelijk uiteenvallen van bacterieklompjes, welke zich altijd in melk bevinden, te bewerkstelligen. Volgens de onderzoekingen van WALTER MEIER dient men de waarde van dit schudden niet te onderschatten. Hij zegt n.l.: „Versuche hinsichtlich des Einfluszes kräftigen Schüttelns auf die mittels Gelatine- und Agarplatten feststellbare Keimzahl in frischer Kuhmilch haben ergeben, dasz 5 Minuten langes, kräftiges Schütteln der Milch 9—137,7 Proz. mehr Keime in der Milch mittels Plattenaussaat nachweisen liesz, als wenn die betreffende Probe nur gut durchmischt wurde". Een bezwaar, dat bij het schudden van deze onverdunde melk werd ondervonden, was, dat er boterbolletjes en schuim gevormd werden. Daarom werd niet al te heftig geschud en de buis in verticalen stand een oogenblik weggezet om de luchtbelletjes zooveel mogelijk te laten ontsnappen. Daarna werd met een steriele pipet van 0,1 c.M³., welker inhoud in 10 gelijke deelen was verdeeld, tot aan de bovenste deelstreep melk uit de buis opgezogen. De buis werd hierbij schuin gehouden, om gemakkelijker schuimopname te verhinderen. Het is gewenscht de pipet hierbij niet verder in de melk te dompelen, dan noodig is om luchtopzuiging te voorkomen, daar bij diep onderdompelen veel melk aan den buitenkant blijft kleven, welke daarna naar beneden vloeit en de afmeting onnauwkeurig maakt. In elk geval werd na vulling de punt van de pipet in aanraking gebracht met den binnenkant van de steriele buis

om de aanklevende vloeistof te verwijderen. Men kan ook met steriel filtreerpapier of een steriel doekje den buitenkant afvegen, dit is echter niet zoo eenvoudig en geeft bovendien kans op verontreiniging. Van te voren waren op een schoon voorwerpglas met het beschreven toestelletje 2 vierkanten van 4 c.M^2. oppervlak met waspotlood aangebracht. Met het bekende pincet werd dit voorwerpglas daarna opgenomen en gesteriliseerd door het driemaal door de vlam van een BUNSEN'schen brander te halen met den gemerkten kant naar beneden en éénmaal met denzelfden kant naar boven gekeerd. De ervaring moet de snelheid van het door de vlam halen aangeven, aangezien bij een te langzaam tempo de was smelt en zich over de vierkanten verdeelt, terwijl, wanneer dit te vlug geschiedt, onvoldoende sterilisatie verkregen wordt. In dit verband dient er reeds op te worden gewezen, dat voorwerpglazen, waarop de omtrekken der vierkanten zijn ingekrast, groote voordeelen bieden, in de eerste plaats door de besparing van den tijd, welke voor het aanbrengen der vierkanten noodig is, in de tweede plaats doordat het bezwaar van het smelten der was bij het steriliseeren geheel vervalt. Bovendien heeft men bij de behandeling in de verschillende vloeistoffen geen last van het loslaten der gekleurde wasdeeltjes, die zich dan later weer op de preparaten kunnen afzetten en het aflezen bemoeilijken. Direct na het steriliseeren werd het voorwerpglas met de teekening naar boven op de „warme tafel" gelegd. Deze was van te voren met water gevuld en op 45° C. verwarmd. Indien tijdens de bewerking de temperatuur onder 40° C. daalde, werd de gaskraan

wijder opengezet, terwijl men bij stijging boven 45° C. minder gas liet toestroomen. Een paar agarbuizen waren in een waterbad bij 100° C. geplaatst ter smelting van den voedingsbodem en daarna ter afkoeling op 45° C. in een waterbad van die temperatuur gebracht. In een der schuin geplaatste openingen van de „warm table" werd een buis met gesmolten en tot 45° C. afgekoelde agar geplaatst, nadat de wattenprop was afgenomen en de monding was geflambeerd. Nu werd een lange, steriele pipet van 1 c.M³. na zachte verwarming in deze buis met agar gebracht. De bedoeling van deze zachte verwarming was om te voorkomen, dat de agar rondom de pipet zou stollen. Al deze bewerkingen waren reeds geschied, als de melk in de pipet van 0,1 c.M³. werd opgezogen. Nu werd op elk der vierkanten van het voorwerpglas 0,05 c.M³. melk gebracht, waarbij moest worden zorg gedragen, dat dit voldoende was afgekoeld, daar anders verschillende kiemen zouden worden gedood. Van elk melkmonster werd dus 0,1 c.M³., verdeeld over 2 preparaten, onderzocht. Daarna werd zoo spoedig mogelijk uit de in de „warm table" geplaatste agarbuis door middel van de erin geplaatste pipet ongeveer een gelijke hoeveelheid gesmolten agar op elk vierkantje gebracht en de pipet in de agarbuis gezet, om eventueel voor het maken van andere preparaten weer dienst te dunnen doen. In den regel was één druppel agar voldoende, terwijl anders 2 druppels werden toegevoegd. Het maakte zeer weinig verschil uit, of de agardruppel naast of op den melkdruppel werd gebracht, alleen bij koude melkmonsters verdiende het de voorkeur de druppels naast elkaar te plaatsen om

te verhinderen, dat door toevoeging van den kouden druppel de agar zou stollen. Met een uitgegloeid en daarna behoorlijk afgekoeld platina-oogje werden nu beide druppels innig gemengd, zoodat een homogene massa ontstond, welke tijdens het mengen zoodanig werd uitgespreid, dat het geheele vierkant gelijkmatig werd bedekt. Zonder vooraf uit te gloeien werd met dezelfde naald op het andere vierkant dezelfde bewerking herhaald. Door de aanwezigheid der waslijnen werd dit uitspreiden vergemakkelijkt daar deze de agar-melkmassa deden terugvloeien, zoodat tijdens de bewerking het vierkant niet overschreden werd. In dit opzicht staan de voorwerpglazen, waarbij de vierkanten zijn ingekrast, in het nadeel, echter ondervindt men hiervan bij eenige ervaring zeer weinig stoornis. In het begin traden door gedeeltelijke stolling der agar dikwijls korrels in het preparaat op. Nadat meerdere handigheid was verkregen en bovendien 1½% agar in plaats van 2% aan den voedingsbodem was toegevoegd, werd hiervan, behoudens bij sterk afgekoelde monsters, geen nadeel meer ondervonden. Deze laatste monsters dient men dan ook vooraf even in een waterbad van 45° C. eenige minuten te verwarmen. Zoo spoedig mogelijk werd na het uitspreiden der melk-agarmassa het preparaat op een koude, horizontaal gestelde glasplaat onder een stolp gebracht ten einde het mengsel te laten stollen. Men kan de preparaten ook direct in het rek van den incubator plaatsen, waarbij zich echter het bezwaar kan voordoen, dat door een niet horizontalen stand van dit rek de massa vóór het stollen naar één kant loopt, zoodat minder mooie resultaten worden verkregen.

De ervaring moest hierbij den juisten tijd aangeven, waarbinnen het melk-agarmengsel voldoende hard was geworden. Deze tijd was ten zeerste afhankelijk van de omgevende kamertemperatuur. 's Winters kon met 10 minuten worden volstaan, terwijl 's zomers 15 à 20 minuten hiervoor noodig waren. Indien onvoldoende stolling was verkregen, groeiden de bacteriën niet tot mooie, scherp omschreven koloniën uit, doch trad dikwijls infiltratieve groei op, terwijl bij te lang laten liggen, uitdroging der preparaten werd waargenomen.

Nadat voldoende stolling was opgetreden, werd het voorwerpglas in den incubator in de broedstoof geplaatst. De broedstooftemperatuur bleek van grooten invloed te zijn op het aantal zich ontwikkelende koloniën. Volgens de laatste publicatie van Frost moest deze 37,5° C. zijn, terwijl geen voldoende experimenten waren genomen om uit te maken, of ook bij 20° C. dezelfde resultaten werden verkregen. Wel moest bij deze lage temperatuur de incubatie minstens 24 uur worden voortgezet. Overigens werden in de literatuur geen proeven vermeld, waarbij een andere temperatuur dan 37° C. of 37,5° C. was toegepast. Op grond van verschillende onderzoekingen bij diverse temperaturen, welke nader zullen worden vermeld, werd nu vastgesteld, dat de beste broedtemperatuur ongeveer bij 28° C. lag. De duur der incubatie liep volgens Frost uiteen van 4 tot 8 uur, terwijl deze zonder bezwaar tot 24 uur kon worden verlengd. Ook hierover heb ik nader te beschrijven proeven genomen, waarvan nu reeds wordt meegedeeld, dat bij een broedstooftemperatuur van 28° C. 15 uur voldoende is om

betrouwbare resultaten te verkrijgen, terwijl door een langeren incubatieduur geen nadeel wordt ondervonden.

Het voorwerpglas, met de 2 gestolde agarplaatjes, werd in den loop van den dag in de broedstoof bij 28° C. geplaatst en daarna den volgenden dag verder behandeld. Over den incubator dient nog het een en ander te worden medegedeeld. Bijna voortdurend werden van één melkmonster meerdere preparaten gemaakt, welke bij verschillende temperaturen werden gebroed. Aangezien bij den aanvang van het onderzoek slechts een en later twee incubatoren van het beschreven model aanwezig waren, werd hiervoor met hetzelfde resultaat van een geïmproviseerd apparaat gebruik gemaakt. Dit bestond uit een glasdoos, op den bodem waarvan een PETRI-schaal werd geplaatst. Op deze schaal werd het voorwerpglas gelegd, terwijl op den bodem der glasdoos een laagje water werd gebracht om een vochtige atmosfeer rondom de kleine platen te onderhouden. Om dezelfde reden werd het deksel der glasdoos na het inbrengen der preparaten met een laagje vaseline vast aangesloten. Ook werd met veel succes gebruik gemaakt van een glasdoos, waarin op halverhoogte in horizontale ligging een geperforeerde, geglazuurd steenen plaat rustte, waarop de kleine-plaatculturen werden gelegd. Op den bodem der doos bevond zich een laagje water, terwijl, door den rand van het deksel in te vetten, het geheel goed werd afgesloten. Heel goed voldeed ook een glazen doos, waarin zich een voor meerdere preparaten gebouwd rekje bevond. Ook hier was, om uitdrogen der preparaten te voorkomen, water op den bodem gebracht en het deksel der doos met vaseline ingesmeerd

ter betere afsluiting. Om het vallen van waterdruppels door de condensatie van den waterdamp van den binnenkant van het deksel op de agarplaatjes te voorkomen, werd boven in het rekje een gewoon voorwerpglas gebracht om deze druppels op te vangen.

Van tijd tot tijd werden de incubatoren in stoom gesteriliseerd of met kokend water omgespoeld. Ook werd wel ter steriliseering in den incubator volgens FROST water aan de kook gebracht en op deze wijze dit toestel eenigen tijd doorgestoomd.

Nadat het preparaat voldoende lang in de broedstoof was geweest, werd het uit den incubator genomen. Met het bloote oog waren dan meestal reeds vele koloniën zichtbaar, die door hun witte kleur tegen de meer grijze agar afstaken. Werd dit preparaat onder het microscoop bij getemperd licht bekeken, dan konden alle koloniën duidelijk worden waargenomen en de telling kwam geheel overeen met die van de gekleurde kleine-plaatcultuur. Aangezien deze preparaten niet houdbaar zijn, terwijl bovendien door kleuring de koloniën veel duidelijker voor den dag treden, is de verdere behandeling alleszins aan te bevelen.

Het preparaat werd vóór de kleuring eerst gedroogd bij een temperatuur van ± 90° C., gedurende 2 à 3 minuten, waarbij de vochtige glans verloren ging en het preparaat dof werd. Dit drogen geschiedde door het voorwerpglas op de „warm table" te leggen, waarvan de temperatuur door verwarming van het water tot 90° C. was opgevoerd. Volgens de aanwijzing van FROST moest dit drogen even onder het kookpunt van water plaats vinden.

Hierbij ontstonden echter dikwijls scheuren in de agarplaatjes, welke bij lagere temperaturen lang niet zoo gemakkelijk optraden. Bij ongeveer 90° C. droogden de preparaten vlug, terwijl scheuren weinig voorkwamen.

Na het drogen werd het preparaat gedurende 2 minuten gekleurd in de ijsazijnhoudende carbolthionine en vervolgens in water afgespoeld, om de overtollige kleurstof te verwijderen. Daarna werd het definitief gedroogd, door met een doekje den onderkant en de randen af te vegen en het daarna gedurende 1 minuut bij 90° C. op de „warme tafel" te leggen.

De agar was nu heel zwak of niet gekleurd, terwijl de koloniën een mooie, donkerblauwe kleur vertoonden en scherp afstaken tegen den lichten ondergrond.

Het drogen en kleuren der preparaten vond op de beschreven wijze plaats, nadat verschillende andere methoden op hun bruikbaarheid waren nagegaan. Indien de preparaten, nadat ze uit de broedstoof waren genomen, zonder voorafgaande droging, direct in de kleurstof werden gebracht, bleek de ondergrond tamelijk sterk meegekleurd te worden, waardoor het tellen der koloniën bemoeilijkt werd. Met methyleenblauw werden, evenals met carbolthionine, goede resultaten verkregen; de koloniën namen hierbij over het algemeen een zeer donkere kleur aan, terwijl de ondergrond niet zoo mooi ontkleurd werd, als bij het gebruik van carbolthionine. De behandeling der preparaten vóór het kleuren met een 10 % oplossing van ijsazijn in 95 % alcohol bleek overbodig, aangezien zonder deze voorbehandeling even mooie preparaten werden verkregen,

mits aan de kleurstof 5 % ijsazijn werd toegevoegd.

Het tellen*) der koloniën geschiedde met behulp van een microscoop van ZEISS, waarbij steeds het compensatie-oculair 4 en de objectieven A en D werden gebruikt, terwijl bij het bestudeeren der bacterievormen de olie-immersie $^1/_{12}$'' goede diensten bewees.

Hierbij behoefde het preparaat niet met een dekglas te worden afgesloten; de druppel cederolie werd direct op de kleine plaat gebracht. In den regel kon met de zwakke vergrooting worden volstaan, aangezien na 15 uur de meeste bacteriën tot flinke koloniën waren uitgegroeid. Alleen wanneer bij deze vergrooting het aantal koloniën per gezichtsveld meer dan 30 à 40 bedroeg, werd het objectief D genomen, aangezien met objectief A dan niet nauwkeurig kon worden geteld. Indien door het groote aantal koloniën ook deze vergrooting onvoldoende was, kon de opgave van het aantal slechts bij grove benadering geschieden. In deze gevallen kon ook de olie-immersie geen dienst doen, daar hierbij altijd in meerdere of mindere mate confluentie der koloniën was waar te nemen.

Indien verwacht werd, dat de melk een zoo groot aantal kiemen bevatte, werd deze vóór het aanleggen der kleine-plaatculturen verdund. Op deze kwestie van verdunning kom ik in het hoofdstuk over het onderzoek van kiemrijke melk terug. Het is zeer moeilijk vaste kiemcijfers aan te geven voor melk, waarbij objectief A, en die, waarbij objectief D gebruikt moet worden, aangezien de grootte

*) Gemakshalve maakte ik bij het tellen der koloniën gebruik van een automatisch telapparaat.

der koloniën van zoovele factoren afhankelijk is. Ook het aangeven van een bepaald kiemcijfer, waarbij de melk moet worden verdund, is zeer lastig. De ervaring, maar bovenal de experimenten moeten hierbij den weg aanwijzen. In de literatuur wordt hierover zeer weinig gesproken. Alleen wordt aangegeven, dat bij het aanwezig zijn van meer dan één millioen kiemen de melk moet worden verdund. Mijn ervaring is, dat over het algemeen tot een kiemcijfer van 100.000 met objectief A kan worden volstaan, terwijl daarboven objectief D moet worden gebruikt. Hiermede kan men tot 200.000 het aantal vrij nauwkeurig opgeven, terwijl daarboven de melk vóór het aanleggen der kleine-plaatculturen moet worden verdund.

Ook de vraag, in hoeveel velden de koloniën moeten worden geteld om het aantal bacteriën in de melk te bepalen, moet door de ervaring worden beantwoord. Indien slechts weinig koloniën per gezichtsveld voorkomen, moeten meer velden worden nagekeken, dan wanneer dit aantal grooter is. Ook de kwestie van het gelijkmatig verdeeld zijn der koloniën is in dit opzicht van groot belang. Daarom moet eerst worden nagegaan, hoe het met deze verdeeling gesteld is, terwijl daarna bij monsters, waarbij het aantal bacteriën niet hooger is dan 50.000 per c.M^3., in 5 à 10 velden het aantal koloniën moet worden geteld. Is daarentegen het aantal hooger, dan kan met het tellen van 2 à 5 velden worden volstaan.

De randzones der preparaten moeten niet worden meegeteld, aangezien hierin relatief weinig koloniën voorkomen, en wel in de eerste plaats, omdat de agarlaag hier het dunst is, en in de tweede plaats, omdat deze gedeel-

ten het meest aan uitdroging zijn blootgesteld. Ook moeten van de koloniën, die op den rand van het microscopisch gezichtsveld liggen, slechts het halve aantal in de telling worden opgenomen. De conclusies over het aantal te onderzoeken velden werden verkregen, door meerdere tellingen van een verschillend aantal velden te verrichten.

Indien het gemiddeld aantal koloniën per gezichtsveld bepaald was, kon heel gemakkelijk het aantal bacteriën per c.M³. melk worden berekend. Hierbij werd uitgegaan van de veronderstelling, dat elke kolonie afkomstig was van één micro-organisme. Men moet zich er hierbij wel van bewust zijn, dat heel dikwijls een kolonie uit meer dan één bacterie gevormd werd. Dit bezwaar kleeft echter aan elke cultiveeringsmethode en kan door schudden van het monster tot een minimum beperkt worden, ofschoon het, ook door zeer krachtig schudden, niet gelukken zal, alle bacteriegroepjes in hun afzonderlijke exemplaren te doen uiteenvallen. Hiervan kon ik mij herhaaldelijk door het maken van een uitstrijkpreparaat of een kleine-plaatcultuur, waarbij deze zonder voorafgaand bebroeden direct gekleurd werd, overtuigen. Bijna altijd waren in deze preparaten groepjes van 2 of meer bacteriën waar te nemen. Bij de kiemarme melkmonsters had het schudden in dit opzicht veel minder effect dan bij de kiemrijke, waarbij de melk voor het aanleggen der culturen werd verdund en waarbij zonder bezwaar krachtiger kon worden geschud.

De volgende formule werd voor de berekening van het aantal bacteriën per c.M³. melk gebruikt.

$$\text{Aantal bacteriën per c.M}^3\text{. melk} = \frac{\text{aantal getelde koloniën}}{\text{aantal getelde velden}} \times \frac{\text{oppervlakte kleine plaat}}{\text{oppervlakte microsc. veld}} \times 20.$$

De eerste factor van dit product stelt het gemiddeld aantal koloniën per microscopisch gezichtsveld voor en wordt op de bovenbeschreven manier bepaald. Van den tweeden factor is het oppervlak van de kleine plaat bekend, namelijk 400 m.M^2., terwijl het oppervlak van het microscopisch gezichtsveld voor elke te gebruiken lenzencombinatie moet worden bepaald. Hiervoor wordt met behulp van een object-micrometer de diameter van het bedoelde veld gemeten en de formule π R^2 toegepast. Indien men er voor zorgt de tubuslengte constant te houden, behoeft men voor elke lenzencombinatie dezen diameter slechts éénmaal te bepalen. Bij een tubuslengte van 155 m.M. is de diameter van het microscopisch gezichtsveld bij compensatie-oculair 4 en objectief A 1,92 m.M., bij hetzelfde oculair en objectief D 0,45 m.M. Het oppervlak van het microscopisch gezichtsveld bedraagt nu respectievelijk 2,9 m.M^2. en 0,16 m.M^2. De tweede factor, welke de microscopische factor genoemd wordt, bedraagt dus voor de eerste lenzencombinatie $\frac{400}{2,9} = \pm 138$ en voor de tweede $\frac{400}{0,16} = 2500$.

De derde factor bedraagt 20, aangezien $^1/_{20}$ c.M^3. melk onderzocht werd. Indien de melk vóór het aanleggen der kleine-plaatculturen, b.v. 1 : 10, was verdund, moest voor dezen factor dan ook 200 worden genomen, aangezien dan slechts $^1/_{200}$ c.M^3. in de kleine plaat verwerkt was.

Werden, om eens een voorbeeld te noemen, van een melkmonster, dat zonder voorafgaande verdunning werd onderzocht, in 10 microscopische gezichtsvelden van de lenzencombinatie compensatie-oculair 4 en objectief A 54 koloniën geteld, dan bedroeg het aantal bacteriën per c.M³.

melk $\frac{54}{10} \times 138 \times 20 = 14904$.

Het zal nu duidelijk zijn, dat elke kolonie, per microscopisch gezichtsveld waargenomen, overeenkomt met 20 maal de microscopische factor, vooropgesteld, dat de melk vóór het onderzoek niet verdund is.

Om het aantal bacteriën per c.M³. melk te bepalen, werd, indien met zwakke vergrooting werd gekeken, d. i. de vergrooting, verkregen met compensatie-oculair 4 en objectief A, het gemiddeld aantal koloniën per microscopisch gezichtsveld vermenigvuldigd met $20 \times 138 = 2760$, afgerond 2800, en bij gebruik maken van de sterke vergrooting, d. i. de vergrooting, verkregen met compensatie-oculair 4 en objectief D met $20 \times 2500 = 50.000$.

Het tellen der koloniën en het berekenen van het bacterie-aantal kan ook geschieden met behulp van een telrooster, d. i. een dekglas, dat door fijne lijnen in vierkantjes van 1 m.M². is verdeeld. Dit dekglas wordt dan met de verdeeling naar onderen droog op het preparaat gelegd en de preparaten met de reeds beschreven lenzencombinaties bekeken. Het zal zonder meer duidelijk zijn, dat het gemiddeld aantal koloniën per ruitje, dus per m.M²., overeenkomt met het aantal kiemen per $\frac{1}{400} \times \frac{1}{20} = \frac{1}{8000}$ c.M³. melk. Wanneer dus dit aantal met 8000

vermenigvuldigd wordt, is het aantal bacteriën, dat per c.M³. melk aanwezig is, bekend.

Met behulp van dit dekglas werden in meerdere preparaten alle koloniën geteld, om te kunnen nagaan, hoeveel velden moesten worden nagezien, indien van dit telrooster geen gebruik werd gemaakt.

Door een inleidend onderzoek was nagegaan, of de resultaten van de verschillende kleine-plaatculturen, welke van één melkmonster waren aangelegd, sterk uiteenliepen, ten einde vast te stellen, hoe groot dit aantal voor een nauwkeurige bepaling van het kiemcijfer der melk moest zijn. Van een aantal melkmonsters waren meerdere kleine-plaatculturen op verschillende voorwerpglazen aangelegd. Dit experiment, waarvan de resultaten met die van Frost [3]) overeenstemden, leidde tot de conclusie, dat door het onderzoek in duplo, waarvoor dus slechts één voorwerpglas noodig was, betrouwbare cijfers werden verkregen.

HOOFDSTUK V.

RESULTATEN MET DE KLEINE-PLAATMETHODE BIJ VERSCHILLENDE BROEDSTOOF-TEMPERATUREN VERKREGEN.

A. Broedstooftemperatuur 37° *C.*

Nadat was nagegaan, welke contrôle-methode voor de beoordeeling van de uitkomsten der kleine-plaatculturen moest worden toegepast, werd een aantal melkmonsters vergelijkend onderzocht. De kleine-plaatmethode werd hierbij uitgevoerd op de wijze, als in het vorige hoofdstuk is uiteengezet, waarbij echter de aangelegde plaatjes in een broedstoof van 37° C. werden geplaatst, terwijl ter contrôle tegelijkertijd van 3 verdunningen van dezelfde melk, t.w. 1 : 100, 1 : 1000 en 1 : 10.000, twee agarplaten werden gegoten, welke gedurende minstens 5 dagen bij 22° C. werden bewaard. Het instellen dezer contrôle-proef geschiedde volgens de beschrijving, in hoofdstuk III aangegeven.

Aard en herkomst der onderzochte melk.

Aangezien mij ter beoordeeling der methode het onderzoek van kiemarme monsters het meest gewenscht voorkwam, werd de te onderzoeken melk betrokken van inrichtingen, waar meerdere zorg aan de winning en behandeling werd besteed. Tevens bracht mij het groote

belang, dat het quantitatief bacteriologisch onderzoek van deze soort melk heeft, en omdat daarvoor door den Codex Alimentarius een maximum toelaatbaar aantal kiemen van 50.000 per c.M³. is opgegeven, op deze keuze. Het bleek reeds spoedig bij onderzoek van gewone handelsmelk, dat hierbij de bacteriënrijkdom in den regel zóó groot was, dat, alvorens de kleine-plaatculturen aan te leggen, verdunningen moesten worden gemaakt. Aan het onderzoek van deze kiemrijke melk is een apart hoofdstuk gewijd.

Ten einde melk van verschillende herkomst te verkrijgen, werd deze van vier verschilllende plaatsen genomen, waarvan drie buiten Utrecht gelegen waren. Zooveel mogelijk werd de melk direct na aankomst op het laboratorium onderzocht, waarbij dient te worden opgemerkt, dat deze een zeer verschillenden ouderdom bezat, varieerende van enkele tot 36 uren. De monsters werden genomen van November 1923 tot November 1924, waardoor ook de temperatuur dezer melk wisselend was. Meerdere malen werden eigenhandig genomen melkmonsters en tevens gesteriliseerde melk onderzocht.

Van elk melkmonster werden 4 kleine-plaatculturen op 2 voorwerpglazen aangelegd, waarvan het eene gedurende 15 en het andere 24 uur in de broedstoof werd geplaatst. Werd een kortere incubatietijd genomen, b.v. 8 à 10 uur, dan waren in vele gevallen de koloniën zeer onvoldoende ontwikkeld, terwijl na 24 uur dikwijls overgroeiing van een der preparaten werd waargenomen.

Van elke kleine-plaatcultuur werden in 15 microscopische gezichtsvelden de koloniën geteld, en zoodoende

het kiemcijfer bepaald, terwijl van de 2 preparaten op één voorwerpglas het gemiddelde werd genomen. Op deze wijze werden van elk melkmonster 2 gemiddelde kiemcijfers verkregen, waarvan het hoogste in de hieronder te vermelden tabellen werd verwerkt.

Van den aanvang af heb ik mij op het standpunt gesteld, dat voor de practijk van het melkonderzoek de preparaten duidelijk en gemakkelijk afleesbaar moesten zijn. Daarom werden de resultaten zooveel mogelijk bij zwakke vergrooting afgelezen, terwijl alleen de duidelijk zichtbare, dus flink ontwikkelde koloniën werden geteld. In vele preparaten waren, zelfs nadat ze 24 uur en langer in de broedstoof waren geweest, meerdere zeer kleine koloniën zichtbaar, welke alleen bij sterke vergrooting of met een olie-immersie als zoodanig te onderkennen waren en slechts uit enkele tientallen bacteriën gevormd werden. Dergelijke koloniën werden om genoemde reden niet in de telling opgenomen.

De gemiddelde kiemcijfers werden onder 10.000 in 100-tallen, daarboven tot 100.000 in 1000-tallen en boven 100.000 in 10.000-tallen afgerond, waarbij resp. 50, 500 en 5000 of meer voor 100, 1000 en 10.000 werden in rekening gebracht, terwijl daar beneden deze cijfers werden verwaarloosd.

In het geheel werden 189 monsters onderzocht. In tabel 3*a* (zie blz. 80—82) zijn de gevallen verzameld, waarbij het met behulp van de kleine-plaatmethode bepaalde kiemcijfer minstens 75 % bedroeg van het met de contrôlemethode gevonden cijfer. Dit zijn dus de melkmonsters, waarbij de uitkomsten betrouwbaar kunnen worden ge-

acht. Als laagste limiet werd 75 % gekozen en niet 100 %, aangezien bij elke cultureele methode van quantitatief bacteriologisch melkonderzoek, wanneer dit in duplo geschiedt, verschillen tusschen de diverse uitkomsten waar te nemen zijn. Bij de agarplaatmethode komen dikwijls zeer groote variaties tusschen de resultaten der verschillende verdunningen voor, echter loopen de uitkomsten van 2 platen, welke van dezelfde verdunning zijn aangelegd, in den regel niet zoover uiteen en blijft het verschil meestal beneden 25 %.

Van de 189 onderzochte melkmonsters bevatten er 12 volgens de contrôle-methode meer dan een millioen bacteriën per c.M³. Hiervan kon in de kleine-plaatculturen het kiemcijfer niet worden bepaald ten gevolge van de sterke confluentie der koloniën. Bovendien was van 6 monsters niet dan bij zeer grove benadering het bacterie-aantal te bepalen, eensdeels door de sterke overgroeiing met bacteriën, anderdeels door het optreden van infiltratieven groei, waardoor geen duidelijke koloniën waren ontstaan. Van meerdere voorwerpglazen was een der kleine-plaatculturen door overgroeiing moeilijk of niet af te lezen. In deze gevallen werd alleen het resultaat der niet overgroeide cultuur opgenomen. De oorzaak van het overgroeien met bacteriën was enkele malen gelegen in het niet tijdig steriliseeren van den incubator, hetwelk om de 5 à 7 dagen dient te geschieden.

De resultaten van het onderzoek der resteerende 171 monsters zijn in tabel 3*a* en 3*b* opgeteekend. Hiervan vielen 67 onder tabel 3*a*, terwijl de overige 104 monsters onder tabel 3*b* (zie blz. 83—86) moesten worden gerang-

schikt, waarin die melkmonsters zijn opgenomen, waarvan het kiemcijfer, verkregen met de kleine-plaatmethode, minder bedroeg dan 75 % van dat, verkregen met de contrôle-methode.

Van de in tabel 3*a* gerangschikte melkmonsters varieert de verhouding van de verkregen kiemcijfers volgens contrôle- en kleine-plaatmethode van 1 : 6 tot 1 : 0,75, terwijl de gemiddelde verhouding 1 : 1,17 is. Worden de nummers 4 en 63 buiten beschouwing gelaten, dan zijn deze verhoudingen respectievelijk 1 : 1,93, 1 : 0,75 en 1 : 1,04.

Van de 67 monsters geven 31 hoogere en 32 lagere uitkomsten dan de contrôle-methode, terwijl van 4 de resultaten gelijk zijn. De nummers 1 en 2 zijn gesteriliseerde melkmonsters. (Het steriel blijven der kleine-plaatculturen is wel een bewijs, dat, indien vlug gewerkt wordt, infectie tijdens het vervaardigen en broeden niet behoeft op te treden).

In tabel 3*b* zijn de volgens beide methoden bepaalde kiemcijfers veel meer uiteenloopend. We zien hier, dat de verhoudingen varieeren van 1 : 0,63 tot 1 : 0,03, terwijl de gemiddelde verhouding 1 : 0,26 is. Opvallend is, dat 81 monsters, dus bijna 4/5 van het aantal in deze tabel gerangschikte melkmonsters, overeenkomende met 47 % van het totaal getabelleerde aantal, volgens de kleine-plaatmethode onderzocht, minder dan de helft van het kiemcijfer geven, dat bij de contrôle wordt gevonden. De oorzaak van dit verschijnsel is te vinden in de temperatuur van 37° C., welke voor verschillende bacterie-soorten ongunstig genoemd moet worden. De bacteriën, welke hun optimum groeivoorwaarden bij deze

temperatuur hebben, groeien tot zeer groote koloniën uit, terwijl de overige zich niet of onvoldoende ontwikkelen. Bovendien worden door de snel groeiende bacteriën de andere in hun ontwikkeling tegengehouden. In vele preparaten bevinden zich naast meerdere groote koloniën talrijke, die, met de olie-immersie bezien, slechts uit enkele tientallen bacteriën bestaan. In andere preparaten, waarin deze groote koloniën niet voorkomen, zijn alle koloniën zeer slecht ontwikkeld. Ook een langer verblijf in de broedstoof verandert hier weinig of niet aan de grootte. Zonder twijfel speelt de hooge temperatuur een ongunstige rol, vooral als men bedenkt, dat in objectglasculturen, welke van hetzelfde melkmonster zijn aangelegd, doch bij lagere temperatuur worden geplaatst, de bacteriën zich tot flinke koloniën ontwikkelen.

De broedstooftemperatuur van 37° C. veroorzaakt nog een ander nadeel. Door de snelle vorming van meerdere groote koloniën ziet men veel z.g. „spreaders" optreden. Nu maken enkele „spreaders" het aflezen niet onmogelijk; wanneer er echter vele gevormd zijn, wordt het tellen der koloniën ten zeerste bemoeilijkt en moet met een benadering van het aantal worden volstaan. Dit bezwaar wordt geheel of gedeeltelijk ondervangen, indien een kortere incubatieduur, b.v. 8 à 10 uur, wordt genomen, doch dan is in vele gevallen het aantal goed ontwikkelde koloniën veel kleiner dan na ± 20 uur, terwijl meermalen de koloniën dan zóó klein zijn, dat bij zwakke vergrooting niet kan worden geteld en bij sterke vergrooting de aflezing zeer moeilijk, zoo niet onmogelijk is. Niettemin was in vele gevallen het resultaat reeds na

10 à 12 uur af te lezen, hetwelk dus een voordeel van de gebruikte temperatuur genoemd mag worden.

De resultaten, bij 37° C. bereikt, zijn dus onbevredigend, omdat bij een groot aantal gevallen minder dan 75 % van het aantal koloniën, dat bij de contrôle-methode optreedt, wordt waargenomen.

B. Broedstooftemperatuur 22° C.

Van 195 melkmonsters werden 4 kleine-plaatculturen aangelegd, waarvan 2 gedurende 15 uur en de overige 2 gedurende 24 uur in een broedstoof bij 22 °C. werden gezet, terwijl het kiemcijfer werd bepaald op de onder A aangegeven wijze.

Meestal werden dezelfde melkmonsters gebruikt, als voor het onderzoek onder A aangegeven, waarbij van hetzelfde melkmonster meerdere kleine-plaatculturen werden aangelegd, welke dan in diverse broedstoven met verschillende temperaturen werden gebracht.

Van de 195 monsters bevatten 16 volgens de contrôle-methode meer dan één millioen bacteriën per c.M³., terwijl de betreffende kleine-plaatculturen zeer vele, over het algemeen, kleine koloniën vertoonden. Bovendien was er sterke confluentie opgetreden, zoodat het kiemcijfer slechts bij grove benadering kon worden vastgesteld, reden waarom deze monsters niet in de tabellen werden opgenomen. In de kleine-plaatculturen, welke van dezelfde melk werden aangelegd, echter bij 37° C. in de broedstoof werden geplaatst, waren in meerdere gevallen slechts enkele koloniën gevormd, terwijl het overgroote deel der bacteriën niet tot koloniën was uit-

gegroeid. *Dit verschijnsel werd bij* 22° *C. niet waargenomen; in alle gevallen was een ontelbaar aantal koloniën gevormd.*

Slechts van één melkmonster kon wegens sterke overgroeiing en uitgebreiden infiltratieven groei der kleine-plaatculturen het bacteriecijfer niet worden opgegeven, ofschoon dit volgens de contrôle-methode slechts 23.000 bedroeg.

De resultaten der overige 178 monsters zijn in de tabellen 4*a* en 4*b* weergegeven. In tabel 4*a* (zie blz. 87—90) zijn de melkmonsters verzameld, welke volgens de kleine-plaatmethode een kiemcijfer aanwezen, dat minstens 75 % bedroeg van het volgens de contrôle-methode aangegeven getal. Zooals men ziet, vallen hieronder 99 monsters, dus 56 % van het totaal getabelleerde aantal. In de laatste kolom dezer tabel zijn de verhoudingen aangegeven tusschen het bacterie-aantal van dezelfde melk, volgens de contrôle- en kleine-plaatmethode verkregen. Deze verhoudingen varieeren van 1 : 5,50 tot 1 : 0,75 en de gemiddelde verhouding is 1 : 1,21. Indien de nummers 4,83 en 85, waarbij de kleine-plaatmethode een overwegend grooter getal aanwijst dan de contrôle-methode, buiten beschouwing blijven, dan worden deze verhoudingen resp. 1 : 2,54, 1 : 0,75 en 1 : 1,08.

In tabel 4*b* (zie blz. 91—93) zijn de monsters ondergebracht, waarbij het aantal bacteriën, verkregen met de kleine-plaatmethode, minder dan 75 % van dat der contrôle-methode bedroeg. Hieronder vallen 79 monsters, dus 44 % van het totale aantal. De verhoudingen der volgens beide genoemde methoden verkregen kiemcijfers varieeren hier van 1 : 0,74 tot 1 : 0,09, terwijl de gemiddelde verhouding is 1 : 0,51.

Van 32 der onder de tabellen 4*a* en 4*b* vallende monsters is het bacterie-aantal, met de kleine-plaat vastgesteld, minder dan de helft van het resultaat der contrôle-methode. Dit komt overeen met 18 % van het totale aantal. De uitkomsten, bij 22° C. met de objectglas-culturen verkregen, komen dus meer met die der contrôle-methode overeen, dan het geval is bij 37° C.

Over het algemeen waren de preparaten mooier dan bij 37° C., aangezien minder overgroeiing en ook minder infiltratieve groei werd waargenomen. De koloniën waren nu eens grooter, dan weer kleiner dan die, verkregen bij een temperatuur van 37° C.

Een groot bezwaar, aan de temperatuur van 22° C. verbonden, was, dat na 15 uur in vele gevallen de koloniën nog zeer gering ontwikkeld waren, meerdere malen zelfs nog na 24 uur. Hieruit moest het lage bacteriecijfer in deze gevallen verklaard worden, aangezien, zooals reeds werd meegedeeld, alleen goed uitgegroeide koloniën werden geteld.

Op grond van de vrij goede resultaten, bij 22° C. bereikt, werd in verband met den tragen groei, welke hierbij dikwijls optrad, nagegaan, of door het gebruik maken van een hoogere temperatuur dit bezwaar kon worden opgeheven, terwijl de genoemde voordeelen bleven bestaan. Te dien einde werden van een aantal van dezelfde monsters, als voor de beide vorige experimenten gebruikt, kleine-plaatculturen aangelegd, welke bij 26° C. en 30° C. werden gezet. De resultaten, bij deze temperaturen verkregen, worden onder C en D besproken.

Alvorens hiertoe over te gaan, wil ik nog een experiment

vermelden, waarbij werd nagegaan, of bij een temperatuur van 22° C. de kleine-plaatjes in plaats van met bouillon-agar, met bouillon-gelatine konden worden gemaakt. De reden, waarom dit werd onderzocht, was, dat gelatine gemakkelijker en bij lagere temperatuur smelt, waardoor de preparaten bij 20° à 25° C. zouden zijn te vervaardigen, terwijl bovendien tijdens de menging met de melk op de „warme tafel" geen last van stolling werd ondervonden. Aan den anderen kant duurde het echter zeer lang, vóór het melkgelatine-mengsel goed gestold was. Het grootste bezwaar echter, waardoor de gelatine practisch voor dit doel onbruikbaar werd, was, dat zeer sterke infiltratieve groei optrad en geen duidelijke kolonievorming. Van de 20 onderzochte melkmonsters werden slechts in 8 gevallen goede preparaten verkregen, waarvan het kolonie-aantal overeenkwam met dat van de kleine-plaatculturen, welke met agar waren gemaakt, echter was in de overige 12 gevallen het resultaat onmogelijk af te lezen. Om deze reden werd van verdere proefnemingen met gelatine afgezien.

C. Broedstooftemperatuur 26° *C.*

Bij deze temperatuur werden 115 onderzoekingen verricht, waarbij dezelfde melkmonsters werden gebruikt, als onder A en B aangegeven. Van 12 dezer was het kiemcijfer, blijkens de contrôle-methode, hooger dan een millioen, zoodat om de reden, onder B genoemd, de resultaten niet in de desbetreffende tabellen werden ondergebracht. Met nadruk dient er op te worden gewezen, dat in tegenstelling met de preparaten, welke bij 37° C.

werden geplaatst, in al deze gevallen overvloedige kolonievorming was opgetreden. Voor de practijk van de melkkeuring is deze quaestie van groot belang, aangezien met één blik in het microscoop kon worden vastgesteld, dat het kiemcijfer zeer hoog was. Wanneer het betreffende monster z.g. modelmelk was, zou het niet aan de hiervoor gestelde eischen voldoen.

In één monster, waarbij de contrôle-platen een bacterie-aantal van 25.000 aanwezen, waren in de kleine-plaatculturen slechts enkele koloniën waarneembaar. Deze slechte uitkomst werd veroorzaakt door het ontbreken van water in den incubator, waardoor een onvoldoende vochtigheidsgraad was ontstaan en de kleine plaatjes waren uitgedroogd.

De resultaten der overige 102 melkmonsters zijn weer in de bekende twee groepen verdeeld en in de tabellen 5*a* (zie blz. 94—96) en 5*b* (zie blz. 97) vereenigd. Zooals men hieruit kan aflezen, gaven 77 monsters, dus 75 % van het totale aantal, zeer goede uitkomsten. De verhoudingen van de kiemcijfers, welke van dezelfde monsters, respectievelijk door middel van de contrôle- en kleine-plaatmethode, werden verkregen, varieerden van 1 : 14,17 tot 1 : 0,75, terwijl gemiddeld de verhouding 1 : 1,16 was. Indien de nummers 3 en 68, waarbij de kleine-plaatmethode zeer hooge uitkomsten gaf, buiten beschouwing werden gelaten, waren deze verhoudingen resp. 1 : 3,21, 1 : 0,75 en 1 : 1,02.

In tabel 5*b* moesten 25 gevallen, overeenkomende met 25 % van het totaal getabelleerde aantal, worden ondergebracht. De bovengenoemde verhoudingen varieerden van 1 : 0,70 tot 1 : 0,10 en de gemiddelde verhouding

was 1 : 0,51. Slechts in 9 gevallen, dus 9 % van het gezamenlijke aantal, waren de bacteriecijfers, met de kleineplaatmethode verkregen, minder dan de helft van die, welke met de contrôle-platen werden bereikt. De oorzaak hiervan was zeer moeilijk, zoo niet onmogelijk, met zekerheid op te geven. Mogelijk was, dat in enkele gevallen de voorwerpglazen na het steriliseeren onvoldoende waren afgekoeld, ofschoon hieraan voortdurend de noodige aandacht was geschonken. Het leek me echter zeer waarschijnlijk, dat met de agarplaten, bij de contrôlemethode gebruikt, hoogere uitkomsten werden verkregen, doordat bij het aanleggen der verdunningen de melk krachtig kon worden geschud, waardoor aan de samengeklonterde bacteriën betere gelegenheid werd gegeven uiteen te vallen, dan dit bij het aanleggen der kleineplaatjes uit de onverdunde melk het geval kon zijn. Dit nadeel werd vooral bij het onderzoek van „modelmelk" waargenomen.

Over het algemeen werden mooie preparaten verkregen, waarbij zeer weinig overgroeiing en „spreaders" werden waargenomen. De koloniën waren in den regel grooter dan in de preparaten, welke bij 22° C. waren bewaard, ofschoon in enkele gevallen juist het tegenovergestelde werd waargenomen. Toch waren in meerdere preparaten, echter minder dan bij 22° C., nog vele koloniën na 15 uur onvoldoende ontwikkeld.

D. Broedstooftemperatuur 30° C.

Ofschoon bij 26° C. goede resultaten waren verkregen, werd nagegaan, of door het opvoeren der temperatuur

tot 30° C. het bezwaar van de geringe ontwikkeling der koloniën in enkele gevallen kon worden ondervangen. Te dien einde werden van 28 melkmonsters kleineplaatculturen aangelegd, welke bij 30° C. in de broedstoof werden geplaatst. Gelijktijdig werden van dezelfde monsters preparaten bij een of meer der reeds genoemde temperaturen bewaard. Enkele monsters bezaten blijkens de contrôle-methode meer dan een millioen bacteriën en werden om reeds bekende redenen buiten beschouwing gelaten. Van de overige 24 werden de resultaten op de bekende manier in tabelvorm gebracht, waarbij bleek, dat 19 monsters (tabel 6*a*, zie blz. 98), dus 79 % van het totale aantal, volgens de kleine-plaatmethode, een kiemcijfer hadden, hetwelk minstens 75 % bedroeg van het door de contrôle-methode aangewezen getal. De verhoudingen varieerden hier van 1 : 1,71 tot 1 : 0,75, terwijl de gemiddelde verhouding 1 : 1,07 was. Van 5 monsters (tabel 6*b*, zie blz. 99) was het kiemcijfer minder dan 75 % van hetgeen door de contrôle-methode werd aangegeven, terwijl dit in geen enkel geval onder 50 % bedroeg.

We zien hieruit, dat, evenals bij 22° C., een goede overeenstemming met de contrôle-platen bestond.

Er werden mooie preparaten verkregen, waarin de koloniën over het algemeen flink ontwikkeld waren, ofschoon in enkele, naast groote, ook zeer kleine koloniën voorkwamen. Hoewel in veel geringere mate, trad dus hetzelfde nadeel op, als bij 37° C. Ook werd, sterker dan dit bij 26° C. het geval was, vorming van „spreaders" waargenomen. Daartegenover stond, dat de koloniën over het algemeen zich bij 30° C. beter ontwikkelden, zoodat in

alle gevallen na 15 uur het resultaat kon worden afgelezen.

Het blijkt dus, dat, voor het verkrijgen van een zoo groot mogelijk aantal koloniën, dat bovendien duidelijk afleesbaar is, een temperatuur wenschelijk is, gelegen tusschen 26° *en* 30° *C.*

De verdere onderzoekingen zijn dan ook steeds bij 28° C. verricht. De resultaten, hierbij verkregen, kwamen met die der beide vorige onderzoekingsreeksen overeen.

Zooals reeds in hoofdstuk IV werd meegedeeld, werden door het onderzoek in duplo betrouwbare kiemcijfers verkregen. De uitkomsten van kleine-plaatculturen, welke van dezelfde melk waren aangelegd, liepen nogal eens uiteen. De oorzaak hiervan was, dat niet steeds op elk vierkant precies een even groot quantum melk gebracht werd, terwijl bovendien de bacteriën niet altijd gelijkmatig in de melk verdeeld waren. De gemiddelde bacteriecijfers, van meerdere onderzoekingen in duplo verkregen, liepen in den regel niet ver uiteen. De onderlinge variaties waren geringer dan die, welke tusschen verschillende contrôle-platen optraden. Zelden was het verschil tusschen bovengenoemde gemiddelden grooter dan 25 %.

Van elk melkmonster werd dus 0,1 c.M³. in de kleine-plaatjes verwerkt, terwijl bij de contrôle-methode deze hoeveelheid veel geringer was. Dit moet een groot voordeel van de kleine-plaatmethode genoemd worden, aangezien hierdoor de kans, dat het gevonden kiemcijfer overeenkomt met het werkelijke aantal bacteriën in de melk, veel grooter is, dan bij de agarplaatmethode. Men moet hierbij echter wel rekening houden met het feit, dat elke cultureele bepaling van den bacteriënrijkdom der melk een approximatieve is.

TABEL 3*a*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 37° C. *minstens* 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-methode verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
1.	0	0	1 : 1.00
2.	0	0	1 : 1.00
3.	1.100	1.000	1 : 0.91
4.	1.200	7.200	1 : 6.00
5.	1.300	2.300	1 : 1.77
6.	2.700	2.300	1 : 0.85
7.	2.800	3.900	1 : 1.39
8.	2.900	5.600	1 : 1.93
9.	2.900	5.500	1 : 1.90
10.	3.100	3.500	1 : 1.13
11.	3.100	3.400	1 : 1.10
12.	3.900	3.100	1 : 0.79
13.	4.100	4.200	1 : 1.02
14.	4.100	6.600	1 : 1.61
15.	4.300	3.500	1 : 0.81
16.	4.500	7.100	1 : 1.58
17.	4.500	5.100	1 : 1.13
18.	4.500	3.400	1 : 0.76
19.	4.800	4.900	1 : 1.02
20.	4.800	5.800	1 : 1.21
21.	4.900	6.200	1 : 1.27
22.	5.000	6.300	1 : 1.26
23.	5.400	4.100	1 : 0.76
24.	5.500	5.500	1 : 1.00

TABEL 3*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
25.	5.900	11.000	1 : 1.86
26.	5.900	7.000	1 : 1.20
27.	6.300	4.800	1 : 0.76
28.	66.00	9.800	1 : 1.48
29.	6.600	5.100	1 : 0.77
30.	6.700	5.200	1 : 0.78
31.	7.000	8.000	1 : 1.14
32.	7.200	6.100	1 : 0.85
33.	7.200	8.600	1 : 1.19
34.	7.800	7.800	1 : 1.00
35.	8.000	6.500	1 : 0.81
36.	8.100	7.300	1 : 0.90
37.	8.300	12.000	1 : 1.45
38.	8.400	8.700	1 : 1.04
39.	8.600	10.500	1 : 1.22
40.	8.800	6.600	1 : 0.75
41.	10.000	8.800	1 : 0.88
42.	10.000	7.700	1 : 0.77
43.	10.000	9.100	1 : 0.91
44.	10.000	8.000	1 : 0.80
45.	10.000	9.500	1 : 0.95
46.	10.000	7.700	1 : 0.77
47.	11.000	9.500	1 : 0.86
48.	11.000	8.100	1 : 0.74
49.	12.000	13.000	1 : 1.08
50.	12.000	23.000	1 : 1.92
51.	13.000	10.000	1 : 0.77
52.	14.000	18.000	1 : 1.29

TABEL 3*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
53.	15.000	14.000	1 : 0.93
54.	15.000	16.000	1 : 1.07
55.	17.000	13.000	1 : 0.76
56.	17.000	16.000	1 : 0.94
57.	18.000	20.000	1 : 1.11
58.	19.000	17.000	1 : 0.89
59.	20.000	15.000	1 : 0.75
60.	21.000	19.000	1 : 0.90
61.	22.000	19.000	1 : 0.86
62.	29.000	26.000	1 : 0.89
63.	75.000	320.000	1 : 4.27
64.	100.000	87.000	1 : 0.87
65.	170.000	230.000	1 : 1.35
66.	270.000	240.000	1 : 0.89
67.	730.000	780.000	1 : 1.07
Gemidd.	27.907	32.685	1 : 1.17

TABEL 3*b*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 37° C. *minder* dan 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-methode verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
68.	2.300	1.500	1 : 0.65
69.	3.400	2.300	1 : 0.68
70.	4.800	3.300	1 : 0.69
71.	5.300	500	1 : 0.09
72.	5.400	3.100	1 : 0.57
73.	5.500	3.500	1 : 0.64
74.	5.600	3.800	1 : 0.68
75.	5.700	1.900	1 : 0.33
76.	5.700	3.700	1 : 0.65
77.	6.300	4.100	1 : 0.65
78.	7.000	1.400	1 : 0.20
79.	7.000	3.700	1 : 0.53
80.	7.600	4.500	1 : 0.59
81.	7.600	2.400	1 : 0.32
82.	7.900	4.900	1 : 0.62
83.	7.900	3.400	1 : 0.43
84.	8.700	4.300	1 : 0.49
85.	9.200	5.400	1 : 0.59
86.	9.900	6.700	1 : 0.68
87.	10.000	6.000	1 : 0.60
88.	10.000	4.500	1 : 0.45
89.	10.000	4.600	1 : 0.46
90.	11.000	5.400	1 : 0.49
91.	11.000	3.900	1 : 0.35

TABEL 3*b* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
92.	11.000	5.300	1 : 0.48
93.	11.000	3.800	1 : 0.35
94.	11.000	5.400	1 : 0.49
95.	12.000	1.900	1 : 0.16
96.	12.000	300	1 : 0.03
97.	12.000	4.700	1 : 0.39
98.	12.000	2.300	1 : 0.19
99.	12.000	7.100	1 : 0.59
100.	12.000	5.400	1 : 0.45
101.	12.000	6.900	1 : 0.58
102.	12.000	2.900	1 : 0.24
103.	13.000	3.600	1 : 0.28
104.	15.000	6.200	1 : 0.41
105.	16.000	7.400	1 : 0.46
106.	16.000	9.800	1 : 0.61
107.	17.000	6.000	1 : 0.35
108.	17.000	9.000	1 : 0.53
109.	17.000	4.200	1 : 0.25
110.	18.000	6.400	1 : 0.36
111.	18.000	9.500	1 : 0.53
112.	18.000	7.000	1 : 0.39
113.	18.000	2.600	1 : 0.14
114.	18.000	7.000	1 : 0.39
115.	19.000	4.900	1 : 0.26
116.	19.000	11.000	1 : 0.58
117.	20.000	9.200	1 : 0.46
118.	20.000	13.000	1 : 0.65
119.	21.000	6.600	1 : 0.31

TABEL 3*b* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
120.	22.000	9.700	1 : 0.44
121.	22.000	6.300	1 : 0.29
122.	22.000	5.400	1 : 0.25
123.	23.000	8.000	1 : 0.35
124.	24.000	4.400	1 : 0.18
125.	25.000	3.300	1 : 0.13
126.	25.000	6.200	1 : 0.25
127.	25.000	2.500	1 : 0.10
128.	25.000	3.000	1 : 0.12
129.	25.000	6.700	1 : 0.27
130.	26.000	8.000	1 : 0.31
131.	28.000	1.800	1 : 0.06
132.	28.000	4.800	1 : 0.17
133.	29.000	2.300	1 : 0.08
134.	30.000	8.100	1 : 0.27
135.	31.000	3.900	1 : 0.13
136.	32.000	5.400	1 : 0.17
137.	32.000	7.200	1 : 0.23
138.	35.000	10.000	1 : 0.29
139.	35.000	6.400	1 : 0.18
140.	37.000	8.000	1 : 0.22
141.	37.000	3.400	1 : 0.09
142.	38.000	8.700	1 : 0.23
143.	38.000	8.800	1 : 0.23
144.	39.000	13.000	1 : 0.33
145.	40.000	11.000	1 : 0.28
146.	44.000	3.200	1 : 0.07
147.	45.000	10.000	1 : 0.22

TABEL 3*b* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 37°C.	Verhouding
148.	48.000	6.200	1 : 0.13
149.	51.000	3.900	1 : 0.08
150.	51.000	14.000	1 : 0.28
151.	53.000	4.300	1 : 0.08
152.	56.000	5.000	1 : 0.09
153.	58.000	6.100	1 : 0.11
154.	59.000	4.900	1 : 0.08
155.	67.000	30.000	1 : 0.45
156.	78.000	20.000	1 : 0.26
157.	80.000	5.300	1 : 0.07
158.	80.000	4.900	1 : 0.06
159.	110.000	6.600	1 : 0.06
160.	150.000	16.000	1 : 0.11
161.	160.000	77.000	1 : 0.48
162.	170.000	9.700	1 : 0.06
163.	200.000	14.000	1 : 0.07
164.	240.000	130.000	1 : 0.54
165.	350.000	79.000	1 : 0.22
166.	380.000	48.000	1 : 0.13
167.	390.000	190.000	1 : 0.49
168.	420.000	250.000	1 : 0.60
169.	450.000	72.000	1 : 0.16
170.	530.000	230.000	1 : 0.43
171.	670.000	17.000	1 : 0.03
Gemidd.	61.219	16.169	1 : 0.26

TABEL 4*a*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 22° C. *minstens* 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-methode verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
1.	0	0	1 : 1.00
2.	0	0	1 : 1.00
3.	1.050	1.100	1 : 1.05
4.	1.200	4.500	1 : 3.75
5.	1.300	2.200	1 : 1.69
6.	2.300	2.300	1 : 1.00
7.	2.800	3.100	1 : 1.11
8.	2.900	5.700	1 : 1.97
9.	2.900	4.000	1 : 1.38
10.	3.100	4.400	1 : 1.42
11.	3.900	3.200	1 : 0.82
12.	4.500	4.400	1 : 0.98
13.	4.800	6.200	1 : 1.29
14.	4.900	7.000	1 : 1.43
15.	5.200	7.700	1 : 1.48
16.	5.400	4.300	1 : 0.79
17.	5.500	6.300	1 : 1.15
18.	5.500	6.500	1 : 1.18
19.	5.600	4.300	1 : 0.77
20.	5.900	15.000	1 : 2.54
21.	6.300	8.600	1 : 1.37
22.	6.500	6.500	1 : 1.00
23.	6.600	9.900	1 : 1.50
24.	7.000	6.700	1 : 0.96

TABEL 4*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
25.	7.000	8.200	1 : 1.17
26.	7.000	5.900	1 : 0.84
27.	7.200	6.100	1 : 0.85
28.	7.500	7.000	1 : 0.93
29.	7.600	5.900	1 : 0.76
30.	7.900	7.300	1 : 0.92
31.	7.900	7.800	1 : 0.99
32.	8.000	6.900	1 : 0.86
33.	8.100	7.600	1 : 0.94
34.	8.300	17.000	1 : 2.05
35.	8.400	7.500	1 : 0.89
36.	8.600	7.300	1 : 0.85
37.	8.700	7.800	1 : 0.90
38.	9.200	9.600	1 : 1.04
39.	10.000	8.400	1 : 0.84
40.	10.000	14.000	1 : 1.40
41.	10.000	11.000	1 : 1.10
42.	10.000	8.700	1 : 0.87
43.	10.000	12.000	1 : 1.20
44.	10.000	10.000	1 : 1.00
45.	10.000	8.100	1 : 0.81
46.	11.000	9.800	1 : 0.89
47.	11.000	11.000	1 : 1.00
48.	12.000	16.000	1 : 1.33
49.	12.000	11.000	1 : 0.92
50.	12.000	13.000	1 : 1.08
51.	14.000	23.000	1 : 1.64
52.	15.000	31.000	1 : 2.07

TABEL 4*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
53.	15.000	12.000	1 : 0.80
54.	15.000	14.000	1 : 0.93
55.	17.000	16.000	1 : 0.94
56.	17.000	15.000	1 : 0.88
57.	18.000	16.000	1 : 0.89
58.	19.000	18.000	1 : 0.95
59.	20.000	16.000	1 : 0.80
60.	20.000	15.000	1 : 0.75
61.	20.000	23.000	1 : 1.15
62.	21.000	20.000	1 : 0.95
63.	22.000	20.000	1 : 0.91
64.	22.000	20.000	1 : 0.91
65.	24.000	34.000	1 : 1.42
66.	25.000	25.000	1 : 1.00
67.	26.000	33.000	1 : 1.27
68.	27.000	27.000	1 : 1.00
69.	30.000	29.000	1 : 0.97
70.	31.000	25.000	1 : 0.81
71.	32.000	29.000	1 : 0.91
72.	35.000	37.000	1 : 1.06
73.	37.000	31.000	1 : 0.84
74.	38.000	34.000	1 : 0.89
75.	40.000	51.000	1 : 1.28
76.	44.000	34.000	1 : 0.77
77.	53.000	43.000	1 : 0.81
78.	54.000	67.000	1 : 1.24
79.	56.000	50.000	1 : 0.89
80.	58.000	63.000	1 : 1.09

TABEL 4*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
81.	59.000	55.000	1 : 0.93
82.	67.000	65.000	1 : 0.97
83.	75.000	400.000	1 : 5.33
84.	78.000	71.000	1 : 0.91
85.	80.000	440.000	1 : 5.50
86.	100.000	100.000	1 : 1.00
87.	100.000	120.000	1 : 1.20
88.	110.000	110.000	1 : 1.00
89.	150.000	170.000	1 : 1.13
90.	160.000	180.000	1 : 1.13
91.	170.000	360.000	1 : 2.12
92.	180.000	160.000	1 : 0.89
93.	190.000	190.000	1 : 1.00
94.	200.000	260.000	1 : 1.30
95.	240.000	240.000	1 : 1.00
96.	270.000	380.000	1 : 1.41
97.	400.000	360.000	1 : 0.90
98.	420.000	320.000	1 : 0.76
99.	730.000	810.000	1 : 1.11
Gemidd.	50.288	60.917	1 : 1.21

TABEL 4*b*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 22° C. *minder* dan 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-methode verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
100.	2.700	1.100	1 : 0.41
101.	3.100	2.000	1 : 0.65
102.	3.400	700	1 : 0.21
103.	4.100	900	1 : 0.22
104.	4.100	1.900	1 : 0.46
105.	4.300	3.200	1 : 0.74
106.	4.500	2.900	1 : 0.64
107.	4.500	3.200	1 : 0.71
108.	4.800	1.800	1 : 0.38
109.	4.800	2.000	1 : 0.42
110.	5.000	3.600	1 : 0.72
111.	5.300	2.000	1 : 0.38
112.	5.400	2.300	1 : 0.43
113.	5.700	3.000	1 : 0.53
114.	5.700	1.900	1 : 0.33
115.	5.900	1.100	1 : 0.19
116.	6.300	3.700	1 : 0.59
117.	6.600	4.000	1 : 0.61
118.	6.700	4.800	1 : 0.72
119.	7.200	2.800	1 : 0.39
120.	7.600	5.400	1 : 0.71
121.	7.800	5.400	1 : 0.69
122.	8.800	2.700	1 : 0.31
123.	9.900	5.200	1 : 0.53
124.	10.000	5.900	1 : 0.59

TABEL 4*b* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
125.	10.000	6.100	1 : 0.61
126.	11.000	2.200	1 : 0.20
127.	11.000	4.900	1 : 0.45
128.	11.000	5.400	1 : 0.49
129.	11.000	6.500	1 : 0.59
130.	11.000	2.200	1 : 0.20
131.	12.000	3.200	1 : 0.27
132.	12.000	7.100	1 : 0.59
133.	12.000	3.300	1 : 0.28
134.	12.000	7.600	1 : 0.63
135.	12.000	6.000	1 : 0.50
136.	12.000	5.800	1 : 0.48
137.	13.000	4.800	1 : 0.37
138.	13.000	8.300	1 : 0.64
139.	15.000	9.100	1 : 0.61
140.	16.000	11.000	1 : 0.69
141.	16.000	9.100	1 : 0.57
142.	16.000	11.000	1 : 0.69
143.	17.000	9.000	1 : 0.53
144.	17.000	11.000	1 : 0.65
145.	18.000	12.000	1 : 0.67
146.	18.000	5.900	1 : 0.33
147.	18.000	13.000	1 : 0.72
148.	18.000	9.400	1 : 0.52
149.	19.000	9.000	1 : 0.47
150.	19.000	12.000	1 : 0.63
151.	21.000	15.000	1 : 0.71
152.	22.000	1.900	1 : 0.09
153.	22.000	14.000	1 : 0.64

TABEL 4*b* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 22°C.	Verhouding
154.	24.000	13.000	1 : 0.54
155.	25.000	16.000	1 : 0.64
156.	25.000	7.000	1 : 0.28
157.	25.000	15.000	1 : 0.60
158.	28.000	11.000	1 : 0.39
159.	28.000	9.800	1 : 0.35
160.	29.000	21.000	1 : 0.72
161.	29.000	5.800	1 : 0.20
162.	32.000	19.000	1 : 0.59
163.	33.000	23.000	1 : 0.70
164.	35.000	23.000	1 : 0.66
165.	38.000	20.000	1 : 0.53
166.	39.000	25.000	1 : 0.64
167.	46.000	27.000	1 : 0.59
168.	48.000	29.000	1 : 0.60
169.	51.000	11.000	1 : 0.22
170.	64.000	30.000	1 : 0.47
171.	80.000	51.000	1 : 0.64
172.	170.000	50.000	1 : 0.29
173.	350.000	190.000	1 : 0.54
174.	380.000	110.000	1 : 0.29
175.	390.000	210.000	1 : 0.54
176.	450.000	320.000	1 : 0.71
177.	530.000	330.000	1 : 0.64
178.	670.000	260.000	1 : 0.39
Gemidd.	53.142	26.899	1 : 0.51

TABEL 5*a*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 26° C. *minstens* 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-methode verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 26°C.	Verhouding
1.	0	0	1 : 1.00
2.	0	0	1 : 1.00
3.	1.200	17.000	1 : 14.17
4.	2.300	3.600	1 : 1.57
5.	2.700	3.100	1 : 1.15
6.	2.800	6.100	1 : 2.18
7.	2.900	9.300	1 : 3.21
8.	2.900	8.500	1 : 2.93
9.	3.100	4.300	1 : 1.39
10.	3.400	4.500	1 : 1.32
11.	4.100	6.100	1 : 1.49
12.	4.500	8.100	1 : 1.80
13.	4.500	5.700	1 : 1.27
14.	4.500	5.300	1 : 1.18
15.	4.800	4.500	1 : 0.94
16.	4.800	5.200	1 : 1.08
17.	5.000	5.600	1 : 1.12
18.	5.400	5.900	1 : 1.09
19.	5.500	6.300	1 : 1.15
20.	5.500	9.600	1 : 1.75
21.	5.700	7.500	1 : 1.32
22.	5.700	5.600	1 : 0.98
23.	5.900	5.700	1 : 0.97
24.	6.300	10.000	1 : 1.59

TABEL 5*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 26°C.	Verhouding
25.	6.500	6.200	1 : 0.95
26.	7.600	7.500	1 : 0.99
27.	7.600	6.300	1 : 0.83
28.	7.900	9.800	1 : 1.24
29.	8.600	9.000	1 : 1.05
30.	8.700	12.000	1 : 1.38
31.	10.000	17.000	1 : 1.70
32.	10.000	13.000	1 : 1.30
33.	10.000	8.700	1 : 0.87
34.	11.000	9.300	1 : 0.85
35.	11.000	11.000	1 : 1.00
36.	12.000	20.000	1 : 1.67
37.	12.000	15.000	1 : 1.25
38.	13.000	13.000	1 : 1.00
39.	14.000	15.000	1 : 1.07
40.	15.000	12.000	1 : 0.80
41.	16.000	12.000	1 : 0.75
42.	17.000	15.000	1 : 0.88
43.	17.000	19.000	1 : 1.12
44.	18.000	20.000	1 : 1.11
45.	18.000	17.000	1 : 0.94
46.	19.000	21.000	1 : 1.11
47.	19.000	17.000	1 : 0.89
48.	20.000	26.000	1 : 1.30
49.	20.000	15.000	1 : 0.75
50.	21.000	29.000	1 : 1.38
51.	21.000	16.000	1 : 0.76
52.	24.000	34.000	1 : 1.42

TABEL 5*a* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 26°C.	Verhouding
53.	25.000	27.000	1 : 1.08
54.	25.000	19.000	1 : 0.76
55.	27.000	26.000	1 : 0.96
56.	29.000	36.000	1 : 1.24
57.	30.000	30.000	1 : 1.00
58.	31.000	32.000	1 : 1.03
59.	32.000	25.000	1 : 0.78
60.	32.000	27.000	1 : 0.84
61.	37.000	35.000	1 : 0.95
62.	38.000	32.000	1 : 0.84
63.	38.000	32.000	1 : 0.84
64.	39.000	30.000	1 : 0.77
65.	40.000	49.000	1 : 1.20
66.	53.000	40.000	1 : 0.75
67.	56.000	51.000	1 : 0.91
68.	80.000	450.000	1 : 5.63
69.	80.000	62.000	1 : 0.78
70.	100.000	110.000	1 : 1.10
71.	100.000	99.000	1 : 0.99
72.	150.000	170.000	1 : 1.12
73.	160.000	200.000	1 : 1.25
74.	180.000	150.000	1 : 0.83
75.	190.000	180.000	1 : 0.95
76.	200.000	260.000	1 : 1.30
77.	400.000	350.000	1 : 0.88
Gemidd.	34.551	40.199	1 : 1.16

TABEL 5*b*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 26° C. *minder* dan 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-methode verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat methode 26°C.	Verhouding
78.	4.100	1.900	1 : 0.46
79.	5.300	2.700	1 : 0.51
80.	5.400	3.700	1 : 0.69
81.	6.600	4.600	1 : 0.70
82.	7.200	2.900	1 : 0.40
83.	7.900	5.000	1 : 0.63
84.	8.800	4.300	1 : 0.49
85.	11.000	5.600	1 : 0.51
86.	11.000	5.200	1 : 0.47
87.	12.000	6.000	1 : 0.50
88.	12.000	7.900	1 : 0.66
89.	13.000	5.300	1 : 0.41
90.	16.000	9.100	1 : 0.57
91.	18.000	12.000	1 : 0.67
92.	19.000	9.500	1 : 0.50
93.	22.000	2.300	1 : 0.10
94.	26.000	17.000	1 : 0.65
95.	28.000	11.000	1 : 0.39
96.	29.000	6.400	1 : 0.22
97.	44.000	28.000	1 : 0.64
98.	46.000	27.000	1 : 0.59
99.	48.000	28.000	1 : 0.59
100.	51.000	11.000	1 : 0.22
101.	64.000	33.000	1 : 0.52
102.	670.000	360.000	1 : 0.54
Gemidd.	47.412	24.376	1 : 0.51

TABEL 6*a*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 30° C. *minstens* 75 % bedroeg van dat, met de contrôle-proef verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 30°C.	Verhouding
1.	3.100	4.100	1 : 1.32
2.	5.500	9.400	1 : 1.71
3.	5.700	5.900	1 : 1.04
4.	63.00	10.000	1 : 1.59
5.	6.500	6.800	1 : 1.05
6.	7.600	6.700	1 : 0.88
7.	7.900	7.700	1 : 0.97
8.	10.000	8.600	1 : 0.86
9.	16.000	13.000	1 : 0.81
10.	20.000	15.000	1 : 0.75
11.	24.000	35.000	1 : 1.46
12.	32.000	24.000	1 : 0.75
13.	53.000	40.000	1 : 0.75
14.	100.000	95.000	1 : 0.95
15.	150.000	170.000	1 : 1.13
16.	160.000	220.000	1 : 1.38
17.	180.000	140.000	1 : 0.76
18.	190.000	190.000	1 : 1.00
19.	200.000	260.000	1 : 1.30
Gemidd.	61.979	66.379	1 : 1.07

TABEL 6*b*.

Gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode bij 30° C. *minder* dan 75 % bedroeg van dat met de contrôle-proef verkregen.

Nos.	Contrôle-methode	Kleine-plaat-methode 30°C.	Verhouding
20.	15.000	11.000	1 : 0.73
21.	18.000	12.000	1 : 0.67
22.	38.000	26.000	1 : 0.68
23.	46.000	29.000	1 : 0.63
24.	64.000	33.000	1 : 0.52
Gemidd.	36.200	22.200	1 : 0.61

HOOFDSTUK VI.

NADERE BIJZONDERHEDEN OMTRENT DEN DUUR DER INCUBATIE BIJ 28° C.

Nadat was nagegaan, bij welke broedstooftemperatuur met de kleine-plaatmethode de beste resultaten werden bereikt, was het van groot belang vast te stellen, gedurende welken tijd de kleine-plaatjes in de broedstoof moesten blijven, ten einde het maximum aantal bacteriën tot koloniën te doen uitgroeien, die met de zwakke vergrooting van het microscoop zichtbaar waren.

Ten einde een indruk te verkrijgen omtrent den tijd, waarbinnen de bacteriën in de kleine-plaatculturen zich tot koloniën ontwikkelden, werden van verschillende melkmonsters meerdere preparaten vervaardigd, welke gelijktijdig in een broedstoof bij 28° C. werden geplaatst. Tot een incubatieduur van 24 uur werd om de 2 uur één voorwerpglas, waarop dus 2 kleine-plaatculturen aanwezig waren, uit de broedstoof genomen en werden vervolgens deze preparaten gedroogd en gekleurd. Van elk op deze wijze behandeld melkmonster bleven daarna nog 2 kleine-plaatculturen in duplo over, welke respectievelijk 30 en 48 uur bij 28° C. werden gelaten.*)

De volgende soorten melk werden op deze manier onderzocht:

*) Collega W. Treffers was zoo vriendelijk gedurende den nacht om de twee uur een voorwerpglas uit den incubator te nemen en daarna te drogen.

A. Melk, welke in een steriele glaskolf werd gewonnen;
B. „Modelmelk";
C. Melk, welke in niet-steriel vaatwerk gewonnen werd.

Van elk dezer soorten werden eenige monsters op de hierboven beschreven wijze onderzocht. De ouderdom van de onder A en C genoemde melk was bekend en varieerde bij den aanvang van het onderzoek van ½ tot 3 uur, gedurende welken tijd de monsters bij ± 15° C. werden bewaard. Van de „modelmelk", waaronder dient te worden verstaan melk, welke in gesloten flesschen van z.g. modelinrichtingen werd verkregen, was de ouderdom niet bekend, maar bedroeg tijdens het onderzoek naar schatting minstens 16 uur. Bovendien was niet bekend, of deze melk in steriel vaatwerk gewonnen was.

De resultaten, welke met de onder A genoemde melk monsters werden bereikt, kwamen, wat de ontwikkelingssnelheid der bacteriën betrof, met elkaar overeen. De bacteriënrijkdom varieerde, volgens de contrôle-methode, van 1000 tot 8000 per c.M³. In de eerste 3 preparaten, welke dus resp. 2, 4 en 6 uren in de broedstoof waren geweest, was geen spoor van kolonie-ontwikkeling waar te nemen. Na 8 en 10 uur waren enkele koloniën, bestaande uit meerdere 10- tot 100-tallen bacteriën, gevormd. Na 12 en 14 uur waren meerdere kleine en groote koloniën zichtbaar, terwijl de tijd, waarna de preparaten met de kleine vergrooting konden worden afgelezen, varieerde van 16 tot 20 uur. De bacteriecijfers, welke na deze incubatietijden werden verkregen, kwamen overeen met die, welke na langeren broedtijd werden bepaald, en met die, welke door de contrôle-platen werden aan-

gegeven. De grootte der koloniën nam echter na langere broedtijden geregeld toe.

In de kleine-plaatjes, welke van de „modelmelk" waren aangelegd, hadden zich na een verblijf van 2 uur in de broedstoof geen koloniën gevormd. Na 4 uur waren slechts enkele koloniën zichtbaar, welke uit enkele 10- tot 100-tallen bacteriën bestonden. Na 6 en 8 uur hadden zich meerdere, iets grootere koloniën ontwikkeld, terwijl na langeren incubatietijd het aantal, met de kleine vergrooting waarneembare, koloniën allengs toenam. Na 14 à 16 uur was geen vermeerdering van dit aantal meer waar te nemen. Wel nam de grootte der koloniën tot een broedtijd van 24 à 30 uur geregeld toe. Nog zij opgemerkt, dat de bacteriënrijkdom van deze monsters „modelmelk" varieerde van 15.000 tot 70.000 en dat de ontwikkelingssnelheid grooter was, naarmate zich meer bacteriën in de melk bevonden.

De melkmonsters, onder C genoemd, kwamen, wat de winning betrof, het meest met de gewone handelsmelk overeen en bezaten een bacteriënrijkdom, varieerende van 90.000—200.000 per c.M³. De bereikte resultaten weken sterk af van die, welke met de onder A en B aangegeven soorten werden verkregen. Reeds nadat de preparaten 2 uur in de broedstoof waren geweest, hadden zich meerdere kleine koloniën gevormd, welke uit meerdere 10- tot 100-tallen bacteriën bestonden. Na een broedtijd van 4 uur was het aantal — alsmede de grootte — der gevormde koloniën aanzienlijk toegenomen, terwijl na 6 à 8 uur reeds een indruk van den bacteriënrijkdom der melk kon worden verkregen, ofschoon de meeste koloniën nog zeer

klein waren. De omvang der koloniën werd na langeren broedtijd grooter, zoodat na ± 12 uur de telling gemakkelijk kon geschieden. In de preparaten, welke langer dan 12 uur in de broedstoof gehouden werden, nam de grootte der koloniën slechts weinig toe, terwijl geen vermeerdering van het aantal werd waargenomen.

Zooals reeds medegedeeld, werd deze proef genomen, ten einde een idee te verkrijgen omtrent de snelheid, waarmede de bacteriën tot koloniën uitgroeiden. Ik ben er mij ten volle van bewust, dat op grond van dit experiment geen conclusies te trekken zijn voor den minumum incubatietijd van de verschillende melkmonsters, aangezien meerdere factoren hierop van invloed zijn. Ter beantwoording van de vele vragen, welke in verband met de ontwikkeling van bacteriën in melk kunnen worden gesteld, zal een uitgebreid onderzoek noodzakelijk zijn.

Voor de practijk van het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek was het echter van zeer groote beteekenis na te gaan, of binnen 24 uur na het onderzoek alle bacteriën zich tot, met de kleine vergrooting van het microscoop waarneembare, koloniën hadden ontwikkeld, m.a.w. of na een langeren incubatietijd een hooger bacteriecijfer werd verkregen.

Te dien einde werden van 56 melkmonsters 3 preparaten in duplo vervaardigd, welke respectievelijk gedurende 15, 20 à 24 en 45 à 48 uur in een broedstoof bij 28° C. werden gehouden. De melkmonsters waren van zeer verschillende herkomst. Een gedeelte van deze monsters was in een steriele glaskolf gewonnen, terwijl een ander ge-

deelte in niet-steriel vaatwerk was opgevangen. Ook werden verschillende monsters „modelmelk" voor dit onderzoek gebruikt. In 45 der onderzochte gevallen werden contrôleplaten gegoten. De resultaten van dit onderzoek zijn in tabel 7*a* (zie blz. 108—109) weergegeven. Zooals men hierop ziet, kwamen de bacteriecijfers, welke na de verschillende incubatietijden werden verkregen, met elkaar overeen, terwijl een bevredigende overeenstemming met de uitkomsten der contrôleplaten werd waargenomen. De verschillen tusschen de resultaten na de diverse broedtijden bleven binnen de grenzen der nauwkeurigheid van de methode. De omvang der koloniën nam bij toepassing van een langeren incubatietijd dan 15 uur aanzienlijk toe. In mindere mate was dit het geval bij de preparaten, welke van de op niet-steriele wijze gewonnen melk waren aangelegd. Over het algemeen vond bij een langeren incubatietijd dan 24 uur de toename in grootte der koloniën langzamer plaats. De lagere uitkomsten in de gevallen 14, 20, 24 en 29, na een broedtijd van 15 uur verkregen, moeten waarschijnlijk hierdoor verklaard worden, dat verschillende koloniën nog zóó klein waren, dat ze met de zwakke vergrooting van het microscoop niet werden opgemerkt.

Behalve bovengenoemde melkmonsters werden nog 29 monsters handelsmelk van diverse herkomst met hetzelfde doel onderzocht. In hoofdstuk VII wordt omtrent het onderzoek van deze melk uitvoerig mededeeling gedaan. Alvorens de kleine-plaatculturen aan te leggen, moesten verdunningen van de melk worden aangelegd. Van elk melkmonster werden 2 preparaten in duplo ver-

vaardigd, welke respectievelijk gedurende 15 en 45 uur in een broedstoof bij 28° C. werden geplaatst. De incubatietijd van 20—24 uur werd achterwege gelaten, aangezien door verschillende onderzoekingen was gebleken, dat de op deze wijze verkregen bacteriecijfers overeenstemden met die, welke na een broedtijd van 15 uur werden verkregen. Voor de verdunning der melk werden zoowel ontroomde melk als pepton-keukenzoutoplossing gebruikt. De resultaten, welke met deze verdunningsvloeistoffen werden verkregen, stemden goed met elkaar overeen.

In tabel 7*b* (zie blz. 110) zijn de uitkomsten ondergebracht, welke na de verschillende incubatietijden werden afgelezen. De cijfers zijn overgenomen uit tabel 8*c* (zie blz. 126), waarbij dient te worden opgemerkt, dat van de monsters, welke in tabel 7*b* met de nos. 1 t/m 16 zijn aangegeven, de resultaten der 1 op 10 verdunningen en van de overige, die der 1 op 100 verdunningen, werden overgenomen. Uit tabel 7*b* blijkt duidelijk, dat er een goede overeenstemming bestond tusschen de bacteriecijfers, welke na een broedtijd van 15 en 45 uur werden verkregen. Opvallend was, dat na 15 uur in alle gevallen de koloniën flink ontwikkeld waren, terwijl na een incubatietijd van 45 uur een geringe toename in grootte viel waar te nemen.

Na een broedtijd van 45—48 uur waren de preparaten over het algemeen minder gemakkelijk afleesbaar, dan wanneer een broedtijd van 15, resp. 20—24 uur werd toegepast. Dit gold zoowel voor de melkmonsters in tabel 7*a* als voor die in tabel 8*b*. Na een verblijf der kleine-plaatjes van 45—48 uur in de broedstoof, waren vele koloniën

geconflueerd, terwijl meerdere malen overgroeiing met bacteriën werd waargenomen. Om deze redenen konden de koloniën in vele gevallen niet nauwkeurig worden geteld en moest met een benadering van het bacteriecijfer worden volstaan, terwijl in enkele gevallen de preparaten onbruikbaar waren (tabel 7*a* nos. 48, 51 en 56).

Opvallend was, dat in meerdere kleine-plaatculturen, ook na een incubatietijd van 45—48 uur, kleine koloniën werden waargenomen. Ter verklaring van dit verschijnsel kwamen m. i. 3 mogelijkheden in aanmerking. 1°. De broedstooftemperatuur van 28° C. was voor de bacteriën, waaruit deze koloniën gevormd werden, niet gunstig. 2°. De samenstelling van het voedingsmedium was voor deze bacteriën niet de gewenschte. 3°. Het aantal koloniën in één kleine plaat was zeer groot, zoodat een geringe afstand tusschen de koloniën onderling bestond. Deze laatste mogelijkheid geldt natuurlijk alleen voor de kiemrijke monsters. Ook bij de KOCH'sche plaatmethode is bij het voorkomen van een groot aantal koloniën op één plaat de omvang der koloniën kleiner, dan wanneer een klein aantal zich hierop ontwikkelt.

Een merkwaardig verschijnsel, dat vooral na langere broedtijden werd waargenomen, was, dat zich aan de peripherie van enkele koloniën een krans van kleine koloniën ontwikkeld had.

Deze proefnemingen, zoowel als die, in de hoofdstukken V *en* VII *vermeld, leeren, dat over het algemeen na een incubatietijd van* 15 *uur betrouwbare resultaten worden verkregen, terwijl na* 20—24 *uur in alle gevallen de pre-*

paraten gemakkelijk kunnen worden afgelezen. Voor het onderzoek van kiemrijke, in niet-steriel vaatwerk gewonnen melk kan misschien met een broedtijd van 10 *à* 12 *uur worden volstaan.*

In de practijk zal dus één dag na inlevering van de melkmonsters het kiemgetal bekend zijn, terwijl bij de methode, welke in den Codex Alimentarius voor het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek is opgegeven, hiervoor 5 *dagen noodig zijn.*

De oorspronkelijke opgave van Frost, *waarbij* 8 *uur broeden bij* 37° C. *voldoende wordt geacht, zal voor practische toepassing in de hand van laboranten tot miswijzingen leiden.*

TABEL 7*a*.

BACTERIECIJFERS NA VERSCHILLENDE INCUBATIETIJDEN VERKREGEN.

Nos.	Contrôle-methode	15 uur	20—24 uur	45—48 uur
1.		3.800	4.000	4.100
2.		4.100	4.300	4.700
3.		4.500	3.500	3.700
4.		5.000	6.000	6.800
5.		14.000	16.000	16.000
6.		15.000	15.000	17.000
7.		36.000	33.000	32.000
8.		42.000	43.000	49.000
9.		63.000	79.000	75.000
10.		73.000	79.000	84.000
11.		250.000	260.000	230.000
12.	1.000	1.000	700	800
13.	3.000	2.200	2.500	2.800
14.	5.000	2.600	3.600	3.700
15.	5.400	5.000	6.300	7.500
16.	6.000	3.400	4.100	3.800
17.	6.000	4.200	3.500	3.700
18.	6.400	5.600	6.000	6.900
19.	7.200	5.900	5.700	5.300
20.	7.200	7.500	12.000	12.000
21.	10.000	6.400	6.200	7.300
22.	10.000	8.000	8.700	8.200
23.	11.000	14.000	15.000	12.000
24.	11.000	4.100	5.700	5.100
25.	11.000	13.000	11.000	10.000
26.	11.000	10.000	11.000	10.000
27.	12.000	14.000	15.000	18.000

TABEL 7*a* (Vervolg).

Nos.	Contrôle-methode	15 uur	20—24 uur	45—48 uur
28.	12.000	10.000	12.000	8.700
29.	13.000	7.800	11.000	14.000
30.	15.000	13.000	12.000	12.000
31.	15.000	18.000	21.000	16.000
32.	16.000	14.000	14.000	14.000
33.	17.000	11.000	15.000	18.000
34.	18.000	12.000	11.000	14.000
35.	21.000	17.000	17.000	15.000
36.	26.000	16.000	16.000	18.000
37.	26.000	27.000	29.000	28.000
38.	33.000	35.000	34.000	30.000
39.	38.000	28.000	33.000	30.000
40.	40.000	32.000	30.000	32.000
41.	40.000	32.000	33.000	32.000
42.	46.000	28.000	30.000	33.000
43.	53.000	40.000	44.000	46.000
44.	56.000	41.000	43.000	45.000
45.	56.000	31.000	33.000	34.000
46.	64.000	61.000	66.000	60.000
47.	71.000	65.000	79.000	84.000
48.	75.000	66.000	79.000	onbruikbaar
49.	92.000	96.000	90.000	80.000
50.	100.000	76.000	70.000	60.000
51.	100.000	86.000	90.000	onbruikbaar
52.	120.000	160.000	140.000	100.000
53.	130.000	110.000	100.000	100.000
54.	160.000	210.000	180.000	170.000
55.	190.000	150.000	150.000	150.000
56.	550.000	230.000	240.000	onbruikbaar

TABEL 7*b*.
BACTERIECIJFERS NA VERSCHILLENDE INCUBATIETIJDEN VERKREGEN.

Handelsmelk.

Nos.	Contrôle-methode	15 uur	45 uur
1.	46.000	74.000	70.000
2.	120.000	130.000	150.000
3.	130.000	170.000	170.000
4.	200.000	260.000	280.000
5.	250.000	320.000	320.000
6.	290.000	330.000	310.000
7.	650.000	450.000	400.000
8.	890.000	630.000	550.000
9.	950.000	450.000	460.000
10.	1.140.000	1.040.000	1.010.000
11.	1.160.000	520.000	510.000
12.	1.170.000	1.350.000	1.250.000
13.	1.310.000	1.100.000	1.300.000
14.	1.390.000	930.000	870.000
15.	1.450.000	1.780.000	1.470.000
16.	2.100.000	2.970.000	2.170.000
17.	2.130.000	1.340.000	1.420.000
18.	2.320.000	3.030.000	2.620.000
19.	2.630.000	3.590.000	3.780.000
20.	2.700.000	4.860.000	4.350.000
21.	3.230.000	3.050.000	2.480.000
22.	4.300.000	1.710.000	1.820.000
23.	5.900.000	7.670.000	7.640.000
24.	5.900.000	1.330.000	1.530.000
25.	8.200.000	5.230.000	4.840.000
26.	10.300.000	11.400.000	10.000.000
27.	13.500.000	22.630.000	22.400.000
28.	27.400.000	36.500.000	32.500.000
29.	27.500.000	32.500.000	29.830.000

HOOFDSTUK VII.

ONDERZOEK VAN KIEMRIJKE MELK MET BEHULP VAN DE KLEINE-PLAATCULTUREN BIJ 28° C.

Bij onderzoek van kiemrijke melk is het noodig deze te verdunnen, alvorens de kleine-plaatculturen aan te leggen. In preparaten, van deze melk in onverdunden toestand vervaardigd, wordt een ontelbaar aantal meestal zeer kleine koloniën gevormd, welke bovendien meer of minder sterk conflueeren. Om deze redenen is het aantal koloniën in deze culturen niet nauwkeurig te bepalen.

Een aantal kiemrijke melkmonsters werd onderzocht, bij welk onderzoek verdunningen met verschillende vloeistoffen werden aangelegd. Ten einde voor dit onderzoek melk van zeer uiteenloopende herkomst te verkrijgen, werden deze bij verschillende melkverkoopers aan huis gehaald, terwijl tevens van meerdere slijters op straat melk gekocht werd. Steeds werd er voor gezorgd, dat het vaatwerk, waarin de melk werd ontvangen, van te voren uitgekookt was.

Deze melk werd goed dooreengemengd, waarna 1 c.M³. hiervan gebracht werd in een met een steriele kurk afgesloten, steriele buis, waarin zich 9 c.M³. steriele verdunningsvloeistof bevond. Na krachtig schudden werden van deze verdunning op de gebruikelijke manier kleine-plaatculturen aangelegd. Van de meeste onderzochte melk-

monsters werden tevens verdunningen 1 : 100 gemaakt, door 1 c.M³. van de 1 : 10 verdunde melk in een nieuwe hoeveelheid van 9 c.M³. steriele verdunningsvloeistof te brengen.

Verschillende vloeistoffen werden op hun bruikbaarheid voor het verdunnen van melk onderzocht, t. w. melk, bouillon, 1 % druivensuikerbouillon, 1 % melksuikerbouillon, pepton-keukenzoutoplossing en physiologische keukenzoutoplossing. Het bleek bij onderzoek van een 4-tal melkmonsters, waarbij verdunningen met al deze vloeistoffen werden gemaakt, dat in alle gevallen goede ontwikkeling der koloniën in de kleine-plaatculturen was waar te nemen. Physiologische keukenzoutoplossing voldeed niet zoo goed als pepton-keukenzoutoplossing, aangezien de koloniën in de onderzochte gevallen niet zoo groot waren, als wanneer laatstgenoemde vloeistof werd gebruikt.

Aangezien van de hierboven aangegeven vloeistoffen de pepton-keukenzoutoplossing het gemakkelijkst te bereiden en bovendien het goedkoopst was, werd bij de volgende onderzoekingen in alle gevallen naast steriele melk ook deze vloeistof voor het aanleggen der verdunningen gebruikt, ten einde na te gaan, of overeenstemmende resultaten werden bereikt en dus de melk als verdunningsvloeistof door pepton-keukenzoutoplossing kon worden vervangen. De reden, waarom dit werd onderzocht, was, dat verschillende bezwaren aan het gebruik van melk voor dit doel verbonden zijn. 1°. Ter verkrijging van een steriele vloeistof moet de melk 3 achtereenvolgende dagen gedurende een kwartier op 100° C. worden

verhit. 2°. Bij het schudden, na het vermengen van de te onderzoeken melk met de gesteriliseerde melk, worden schuim en boterbolletjes gevormd. 3°. Bij het bewaren van de gesteriliseerde melk vormt zich aan de oppervlakte een roomlaag. Dit laatste bezwaar werd grootendeels ondervangen door ontroomde melk te gebruiken. De pepton-keukenzoutoplossing, welke 1 % pepton (*Witte*) en 1 % keukenzout bevatte, werd door eenmalige verwarming gedurende een half uur op 100° C. gesteriliseerd. Na vermenging met melk kon zonder bezwaar krachtig worden geschud, terwijl de oplossing zeer lang kon worden bewaard, zonder veranderingen te vertoonen. Bovendien was deze vloeistof goedkooper te verkrijgen dan melk.

Van elk melkmonster werden dus verdunningen van 1 op 10, en meestal ook van 1 op 100, in steriele ontroomde melk en in steriele pepton-keukenzoutoplossing gemaakt. Van elke verdunning werden 2 kleine-plaatculturen in duplo aangelegd, waarvan de eene gedurende 15 uur en de andere 45 uur in een broedstoof van 28° C. werd geplaatst. Om het aantal bacteriën per c.M³. melk te bepalen moest, indien het preparaat met de zwakke vergrooting werd bezien (d.i. de vergrooting, verkregen met comp. oc. 4 en obj. A), het gemiddeld aantal koloniën per microscopisch gezichtsveld vermenigvuldigd worden met $10 \times 2800 = 28.000$ of $100 \times 2800 = 280.000$, al naar het preparaat vervaardigd was van een verdunning 1 op 10 of 1 op 100. Bij gebruik der sterke vergrooting (d.i. de vergrooting, verkregen met comp. oc. 4 en obj. D) moest dit worden vermenigvuldigd met respectievelijk $10 \times 50.000 = 500.000$ en $100 \times 50.000 = 5.000.000$.

Zooveel mogelijk werden de koloniën met behulp van de zwakke vergrooting geteld.

Bovendien werden van de *onverdunde melk* 2 kleine-plaatculturen in duplo aangelegd. Een hiervan werd zonder verblijf in de broedstoof, na stolling van het melk-agarmengsel, direct gedroogd en gekleurd, ten einde een denkbeeld te krijgen omtrent de groepjesvorming der bacteriën in de melk. De andere werd gedurende 15 uur bij 28° weggezet.

Van elk melkmonster werden, ter contrôle van de uitkomsten der kleine-plaatculturen, agarplaten in duplo gegoten van verschillende verdunningen, t.w. 1 : 1000, 1 : 10.000 en 1 : 100.000.

De resultaten van het onderzoek der kiemrijke melkmonsters werden voor een duidelijk overzicht in verschillende tabellen weergegeven.

In tabel 8*a* (zie blz. 124) zijn de resultaten neergelegd van het onderzoek naar de groepjesvorming der bacteriën in de melk, benevens van de uitkomsten der kleine-plaatculturen, welke van deze melk in onverdunden toestand waren aangelegd.

Groepjesvorming der bacteriën in de melk.

Met behulp van een olie-immersie $^1/_{12}$" werd van 34 preparaten in duplo de verspreiding der bacteriën nagegaan. Onder een bacterie-groepje werd een opeenhooping van meerdere tientallen of meer bacteriën verstaan. Samenvoegingen van enkele bacteriën werden niet in de tabel opgenomen. Deze kwamen in nagenoeg alle melk-

monsters voor, hoewel bij nos. 1 en 2 slechts zeer weinige. Werden in een kleine-plaat slechts enkele groepjes waargenomen, dan werd van *weinig* bacterie-groepjes gesproken. Indien om de 2 à 3 microscopische gezichtsvelden een groepje werd gezien, dan werd dit in de tabel met *meerdere* groepjes aangegeven, terwijl bij het voorkomen van deze groepjes in bijna elk gezichtsveld van *vele* groepjes gesproken werd. Het aantal micro-organismen, waaruit deze groepjes waren samengesteld, liep zeer uiteen en varieerde van enkele 10- tot meerdere 100-tallen, terwijl geen verband viel op te merken tusschen dit aantal en de bacteriënrijkdom der melk. Bedroeg het aantal bacteriën per c.M³. melk minder dan 300.000, dan werden geen of weinig groepjes waargenomen, terwijl bij een kiemcijfer van 2.700.000 en hooger altijd vele werden gezien. Bij melkmonsters met een kiemaantal, varieerende van 650.000 tot 2.700.000, was de groepjesvorming der bacteriën zeer verschillend. Terwijl bij nos. 9 en 11 met een bacterie-aantal van resp. 890.000 en 1.140.000 geen groepjes werden gezien, waren er bij nos. 8 en 10, waarbij dit aantal resp. 880.000 en 950.000 bedroeg, vele waargenomen. Terloops zij nog opgemerkt, dat in de preparaten van nos. 34 zeer vele lange, losliggende streptococcen aanwezig waren.

Resultaten der kleine-plaatculturen van de onverdunde melk.

Over het algemeen was in de preparaten, welke van de onverdunde melk waren vervaardigd, meer of minder

sterke confluentie der koloniën opgetreden, waardoor het bacteriegehalte slechts bij grove benadering was aan te geven.

De melkmonsters, in tabel 8*a* onder nos. 1, 2 en 3 aangegeven, waarbij het kiemcijfer volgens de contrôle-methode resp. 46.000, 120.000 en 130.000 bedroeg, vertoonden geen confluentie der koloniën in de kleine-plaatculturen, terwijl de resultaten der kleine-plaatmethode overeenstemden met die der contrôle-methode. In 6 gevallen was het aantal koloniën in de kleine-plaatjes wegens de uitgebreide confluentie niet te schatten.

Opmerkelijk was het varieerende aspect der koloniën in de verschillende preparaten. In de meeste gevallen waren deze zeer gering ontwikkeld en was hierdoor, alsmede door de confluentie, het aantal niet nauwkeurig te bepalen. Daartegenover stond, dat in meerdere kleine-plaatjes de koloniën zich flink ontwikkeld hadden. Dat hierbij het bacteriecijfer niet nauwkeurig was op te geven, werd òf veroorzaakt door de confluentie alleen, òf doordat bovendien naast de groote koloniën zich vele zeer kleine gevormd hadden.

Uit de tabel ziet men, dat in de gevallen, waarbij het aantal bacteriën volgens de contrôle-methode 200.000 of meer bedroeg, door de kleine-plaatculturen der onverdunde melk geen betrouwbare resultaten werden verkregen.

Het is zeer moeilijk een minimum bacteriegehalte aan te geven, waarbij in *alle gevallen* de melk moet worden verdund. Volgens Frost dient dit minimum op 1.000.000 te worden gesteld. Het hierboven vermeld onderzoek

leert echter, dat het gewenscht is reeds bij een bacteriecijfer van 200.000 verdunningen aan te leggen, hoewel moet worden toegegeven, dat in verschillende gevallen, waarbij het kiemcijfer hooger is dan 200.000, door middel van de kleine-plaatculturen en met de contrôlemethode overeenstemmende cijfers worden verkregen.

Resultaten der kleine-plaatculturen van de verdunningen met ontroomde melk.

In tabel 8*b* (zie blz. 125) zijn de resultaten weergegeven, welke met de kleine-plaatculturen van de met *ontroomde melk* verdunde melkmonsters werden bereikt. Zooals men ziet, werden zoowel verdunningen van 1 : 10 als van 1 : 100 aangelegd. Ten einde na te gaan, of na een verblijf der preparaten van 15 uur in de broedstoof het maximum aantal koloniën tot ontwikkeling was gekomen, werden van de meeste melkmonsters kleine-plaatculturen aangelegd, welke 15 en 45 uur in de broedstoof werden geplaatst.

Wanneer men tabel 8*b* aandachtig beschouwt, dan is het opvallend, dat in de preparaten, welke van de sterkste verdunning (1 : 100) zijn aangelegd, de hoogste bacteriecijfers worden afgelezen. Voor de melkmonsters, waarvan in de kleine-plaatculturen van de verdunning 1 : 10 een zeer groot aantal, deels geconflueerde koloniën ontwikkeld waren, was dit begrijpelijk, aangezien voor een nauwkeurige waarneming sterkere verdunningen behoorden te worden gebruikt. Voor de melkmonsters echter, waarbij een relatief laag kiemcijfer werd waargenomen,

moest de oorzaak worden gezocht in de verdunning. Hetzelfde verschijnsel werd waargenomen bij de contrôle-platen, welke van verschillende verdunningen waren aangelegd. Ook hierbij gaven de sterkste verdunningen over het algemeen de hoogste uitkomsten. Deze omstandigheid mag bij het vergelijken van kleine- en groote-plaatmethode dus niet ten nadeele van de eerste in de schaal worden geworpen.

De resultaten der kleine-plaatjes, welke 45 uur in de broedstoof waren geweest, stemden overeen met die, welke na een incubatietijd van 15 uur werden verkregen. In deze laatste preparaten waren de koloniën goed ontwikkeld en hoewel na een broedtijd van 45 uur over het algemeen de grootte weinig was toegenomen, kon toch in vele gevallen worden waargenomen, dat enkele koloniën aanzienlijk grooter waren geworden, waardoor confluentie was opgetreden en het aantal niet nauwkeurig kon worden bepaald. Tevens werd opgemerkt, dat in enkele preparaten ook na 45 uur kleine koloniën voorkwamen. In enkele gevallen waren de kleine-plaatjes na 45 uur met bacteriën overgroeid, waardoor de aflezing bemoeilijkt werd.

Van de 34 onderzochte melkmonsters werden in alle gevallen verdunningen 1 : 10 aangelegd. In de eerste 21 gevallen, waarbij het bacteriecijfer volgens de contrôle-methode minder dan 2.900.000 bedroeg, werden door de kleine-plaatculturen vrij wel hiermede overeenstemmende getallen aangegeven, alleen de nos. 12 en 15 gaven nogal belangrijke verschillen te zien. De oorzaak van de hoogere uitkomsten in de contrôle-platen is m. i. gelegen in de

sterke verdunningen (1 : 10.000), welke moesten worden gebruikt.

In de melkmonsters, onder nos. 22 tot en met 34 aangegeven, varieerde het kiemcijfer volgens de contrôlemethode van 2.900.000 tot ± 140.000.000. In deze 13 gevallen werden met de kleine-plaatculturen van de 1 op 10 verdunde melk aanzienlijk lagere uitkomsten verkregen om dezelfde redenen, als dit bij de preparaten der onverdunde melk het geval was. Een uitzondering werd door no. 23 gevormd, waarbij de resultaten overeenstemden met die van de contrôle-platen. De kleine-plaatculturen, van de verdunning, 1 : 100 aangelegd, waren veel beter afleesbaar, terwijl de hiermede verkregen kiemcijfers overeenstemden met die, welke door de contrôlemethode werden opgeleverd. Alleen in de gevallen, onder nos. 24, 26 en 27 vermeld, waren de uitkomsten aanzienlijk lager, hetgeen geen verwondering behoeft te wekken, als men nagaat, dat de contrôle-platen van een verdunning 1 : 100.000 waren aangelegd.

Resultaten der kleine-plaatculturen van de verdunningen met pepton-keukenzoutoplossing.

De tabel 8c (zie blz. 126), waarin bovengenoemde resultaten zijn verzameld, is op dezelfde wijze opgesteld als de voorgaande tabel. Men ziet, dat de uitkomsten na een incubatieduur van 15 uur overeenstemmen met die, welke na een broedtijd van 45 uur werden verkregen, terwijl na 15 uur de koloniën voldoende ontwikkeld waren. Ook hier werd na 45 uur meerdere malen confluentie der koloniën

waargenomen, waardoor een lager kiemcijfer dan na 15 uur werd bereikt, terwijl in sommige gevallen slechts een benaderende opgave kon worden gedaan.

Tevens valt weer op te merken, dat over het algemeen door de sterkere verdunningen hoogere resultaten worden verkregen.

De bacteriecijfers, welke van de 34 onderzochte monsters in een verdunning 1 : 10 werden verkregen, kwamen in de gevallen, waarbij het bacterie-aantal volgens de contrôle-methode minder dan 2.130.000 bedroeg, over het algemeen overeen met die, welke met de laatstgenoemde methode waren bepaald. De gevallen, waarbij de contrôle-platen belangrijk hoogere uitkomsten gaven, moesten weer uit de sterke verdunning (1 : 10.000) worden verklaard.

Van 17 melkmonsters was het bacteriecijfer volgens de contrôle-methode meer dan 2.100.000. De kleine-plaatculturen van de verdunningen 1 : 10 gaven in deze gevallen over het algemeen onduidelijke beelden, terwijl een te laag kiemgehalte werd aangewezen. Ook hier waren de resultaten van de verdunningen 1 : 100 belangrijk beter en de verkregen kiemcijfers in overeenstemming met die der contrôle-platen. De belangrijk hoogere uitkomsten van deze platen in de gevallen, onder nos. 24, 26 en 27 aangegeven, vonden waarschijnlijk weer hun oorzaak in de sterke verdunning (1 : 100.000).

Ten einde een overzicht te geven van de resultaten, met de beide verdunningsvloeistoffen bereikt, werd tabel 8*d* (zie blz. 127—128) opgesteld, waarin van elk melk-

monster de bacteriecijfers werden opgenomen, welke met de contrôle-methode en de twee verdunningsvloeistoffen werden verkregen.

Van 17 melkmonsters, welke volgens de contrôle-methode een bacteriecijfer van minder dan 2.130.000 bezaten, werden in de betreffende kolommen de resultaten opgeteekend, welke met de 1 op 10 verdunningen waren bereikt, terwijl van de overige 16 monsters de uitkomsten der 1 op 100 verdunningen werden ingevuld. Van deze laatste monsters varieerde het aantal bacteriën per c.M³. volgens de contrôle-platen van 2.130.000 tot 35.600.000. No. 34 der vorige tabellen werd in tabel 8*d* niet opgenomen, aangezien hierbij het bacterie-aantal slechts bij grove benadering kon worden bepaald. In de laatste kolom zijn de verhoudingen van de verkregen kiemcijfers, t. o. v. het resultaat der contrôle-methode, vermeld.

Indien No. 26 buiten beschouwing werd gelaten, varieerden de verhoudingen van de bacteriecijfers, welke met de contrôle-platen en de kleine-plaatculturen van de met ontroomde melk verdunde melkmonsters werden verkregen, van 1 : 1,96 tot 1 : 0,40. Slechts in 4 gevallen overeenkomende met 12 % van het totaal getabelleerde aantal, bedroeg het bacterie-aantal volgens de kleine-plaatmethode minder dan de helft van hetgeen door de contrôle-platen werd verkregen, waarbij dient te worden opgemerkt, dat in de gevallen 10 en 12 de uitkomsten zeer weinig onder 50 % lagen. Gemiddeld was de verhouding 1 : 1,02, zoodat over het algemeen de resultaten zeer goed overeenstemden.

Wat over de uitkomsten der kleine-plaatculturen van de met ontroomde melk verdunde monsters gezegd is, geldt ook voor de verdunningen met pepton-keukenzoutoplossing. Bij uitschakeling van No. 26 varieerden de bovengenoemde verhoudingen van 1 : 1,80 tot 1 : 0,40, terwijl gemiddeld de verhouding 1 : 1,05 was. Ook hier bedroeg in dezelfde 4 gevallen het bacterie-aantal volgens de kleine-plaatmethode minder dan de helft van dat der contrôle-methode, terwijl bij de nos. 10 en 12 het verschil met deze helft weer zeer gering was.

Bij vergelijking der tabellen 8*a* en 8*d* ziet men, dat in de gevallen, waarbij met de kleine-plaatculturen uit de onverdunde melk onvoldoende resultaten werden bereikt, zeer goede uitkomsten werden verkregen, nadat verdunningen waren aangelegd.

Reeds vroeger werd meegedeeld, dat melkmonsters met een hooger kiemcijfer dan 200.000 moesten worden verdund. Op grond van de hierboven besproken experimenten kunnen over den graad der verdunningen, alsmede over den aard der verdunningsvloeistof nadere aanwijzingen worden gegeven. *Voor melkmonsters met een bacteriecijfer, varieerende van* ± 200.000 *tot* ± 2.000.000, *kan met een verdunning* 1 *op* 10 *worden volstaan, terwijl daarboven sterkere verdunningen moeten worden gebruikt.* Voorop dient te worden gesteld, dat men zich niet behoeft te binden aan de door mij gebezigde verdunningen. De graad der verdunningen zal moeten afhangen van het maximum aantal bacteriën, hetwelk men in bepaalde melksoorten toelaatbaar acht.

De resultaten, welke met ontroomde melk en pepton-

keukenzoutoplossing als verdunningsvloeistoffen werden bereikt, kwamen zeer goed overeen. Op grond van de reeds besproken voordeelen der pepton-keukenzoutoplossing boven ontroomde melk moet dus eerstgenoemde vloeistof voor de verdunningen der melkmonsters worden aanbevolen.

TABEL 8*a*.

Nos.	Groepjesvorming der bacteriën	Contrôle-methode	Kleine-plaatculturen bij 28° C. van de onverdunde melk
1.	Geen groepjes bacteriën	46.000	39.000
2.	,, ,, ,,	120.000	140.000
3.	Weinig ,, ,,	130.000	115.000
4.	,, ,, ,,	200.000	± 90.000
5.	,, ,, ,,	250.000	± 150.000
6.	,, ,, ,,	290.000	± 240.000
7.	Meerdere ,, ,,	650.000	± 280.000
8.	Veel ,, ,,	880.000	± 500.000
9.	Geen ,, ,,	890.000	± 360.000
10.	Veel ,, ,,	950.000	± 340.000
11.	Geen ,, ,,	1.140.000	± 500.000
12.	Weinig ,, ,,	1.160.000	± 230.000
13.	Meerdere ,, ,,	1.170.000	niet telbaar
14.	Weinig ,, ,,	1.310.000	± 210.000
15.	,, ,, ,,	1.390.000	± 750.000
16.	Meerdere ,, ,,	1.450.000	± 770.000
17.	Veel ,, ,,	2.100.000	± 1.500.000
18.	Meerdere ,, ,,	2.130.000	± 510.000
19.	Veel ,, ,,	2.320.000	± 1.560.000
20.	Meerdere ,, ,,	2.630.000	± 1.250.000
21.	Veel ,, ,,	2.700.000	± 1.500.000
22.	,, ,, ,,	2.900.000	± 610.000
23.	,, ,, ,,	3.230.000	± 1.250.000
24.	,, ,, ,,	4.300.000	± 685.000
25.	,, ,, ,,	5.900.000	± 1.250.000
26.	,, ,, ,,	5.900.000	± 1.100.000
27.	,, ,, ,,	8.200.000	± 1.880.000
28.	,, ,, ,,	10.300.000	niet telbaar
29.	,, ,, ,,	13.500.000	± 2.500.000
30.	,, ,, ,,	27.400.000	niet telbaar
31.	,, ,, ,,	27.500.000	± 2.500.000
32.	,, ,, ,,	27.900.000	niet telbaar
33.	,, ,, ,,	35.600.000	niet telbaar
34.	,, ,, ,,	± 140.000.000	niet telbaar

TABEL 8*b*.

KLEINE-PLAATCULTUREN VAN VERDUNNINGEN MET ONTROOMDE MELK.

Nos.	Contrôle-methode	1 : 10 15 uur 28° C.	1 : 10 45 uur 28° C.	1 : 100 15 uur 28° C.	1 : 100 45 uur 28° C.
1.	46.000	56.000	58.000	63.000	58.000
2.	120.000	130.000	130.000		
3.	130.000	150.000	160.000		
4.	200.000	200.000	190.000	430.000	400.000
5.	250.000	330.000	310.000		
6.	290.000	310.000	290.000		
7.	650.000	430.000	380.000	610.000	580.000
8.	880.000	810.000		1600.000	
9.	890.000	610.000	640.000	930.000	930.000
10.	950.000	470.000	510.000	680.000	670.000
11.	1.140.000	1.050.000	1.040.000	1.300.000	±1.300.000
12.	1.160.000	520.000	520.000	900.000	890.000
13.	1.170.000	1.360.000	±1.250.000		
14.	1.310.000	1.640.000	1.680.000	2.430.000	2.470.000
15.	1.390.000	860.000	930.000	870.000	760.000
16.	1.450.000	1.170.000	1.080.000		
17.	2.100.000	1.970.000	2.170.000		
18.	2.130.000	1.900.000	2.130.000	3.180.000	2.860.000
19.	2.320.000	1.930.000	1.850.000	3.420.000	3.420.000
20.	2.630.000	3.400.000	3.000.000	5.160.000	4.430.000
21.	2.700.000	2.530.000	1.980.000	3.780.000	3.290.000
22.	2.900.000	1.880.000		4.650.000	
23.	3.230.000	3.250.000	±2.480.000		
24.	4.300.000	1.250.000	±1.000.000	1.700.000	1.630.000
25.	5.900.000	4.000.000	±4.000.000	7.630.000	7.830.000
26.	5.900.000	1.250.000	±1.000.000	1.350.000	1.550.000
27.	8.200.000	2.470.000	2.350.000	4.980.000	4.450.000
28.	10.300.000	±7.000.000	±6.000.000	12.100.000	±10.000.000
29.	13.500.000	±9.550.000	±7.500.000	14.110.000	±14.000.000
30.	27.400.000	±1.500.000	±1.500.000	31.500.000	30.000.000
31.	27.500.000	±15.000.000	±15.000.000	32.830.000	30.330.000
32.	27.900.000	±12.500.000		20.500.000	
33.	35.600.000	±20.000.000		38.330.000	
34.	±140.000.000	niet telbaar	niet telbaar	±200.000.000	±200.000.000

TABEL 8c.

KLEINE-PLAATCULTUREN VAN VERDUNNINGEN MET PEPTON-KEUKENZOUTOPLOSSING.

Nos.	Contrôle-methode	1 : 10 15 uur 28° C.	1 : 10 45 uur 28° C.	1 : 100 15 uur 28° C.	1 : 100 45 uur 28° C.
1.	46.000	74.000	70.000	71.000	79.000
2.	120.000	130.000	150.000		
3.	130.000	170.000	170.000		
4.	200.000	260.000	280.000	480.000	410.000
5.	250.000	320.000	320.000		
6.	290.000	330.000	310.000		
7.	650.000	450.000	400.000	580.000	590.000
8.	880.000	800.000		1.550.000	
9.	890.000	630.000	550.000	940.000	880.000
10.	950.000	450.000	460.000	1.310.000	950.000
11.	1.140.000	1.040.000	1.010.000	1.240.000	±1.200.000
12.	1.160.000	520.000	510.000	990.000	990.000
13.	1.170.000	1.350.000	±1.250.000		
14.	1.310.000	1.100.000	1.300.000	3.360.000	2.660.000
15.	1.390.000	930.000	870.000	670.000	770.000
16.	1.450.000	1.780.000	1.470.000		
17.	2.100.000	2.970.000	2.170.000		
18.	2.130.000	1.380.000	1.620.000	1.340.000	1.420.000
19.	2.320.000	1.780.000	1.750.000	3.030.000	2.620.000
20.	2.630.000	3.500.000	2.920.000	3.590.000	3.780.000
21.	2.700.000	3.180.000	2.630.000	4.860.000	4.350.000
22.	2.900.000	3.180.000		4.600.000	
23.	3.230.000	3.050.000	±2.480.000		
24.	4.300.000	1.230.000	±1.000.000	1.710.000	1.820.000
25.	5.900.000	4.530.000	±4.000.000	7.670.000	7.640.000
26.	5.900.000	1.330.000	±1.000.000	1.330.000	1.530.000
27.	8.200.000	2.680.000	2.480.000	5.230.000	4.840.000
28.	10.300.000	±8.000.000	±6.000.000	11.400.000	±10.000.000
29.	13.500.000	±11.250.000	±7.500.000	22.630.000	±22.400.000
30.	27.400.000	±1.500.000	±1.500.000	36.500.000	32.500.000
31.	27.500.000	18.330.000	±20.000.000	32.500.000	29.830.000
32.	27.900.000	±12.500.000		22.400.000	
33.	35.600.000	±20.000.000		31.170.000	
34.	±140.000.000	niet telbaar	niet telbaar	±200.000.000	±200.000.000

TABEL 8*d*.

VERGELIJKING DER RESULTATEN, MET ONTROOMDE MELK EN PEPTON-KEUKENZOUTOPLOSSING ALS VERDUNNINGSVLOEISTOF VERKREGEN.

Nos.	Contrôle-methode	Ontroomde melk	Pepton-keukenzout oplossing	Verhoudingen
1.	46.000	56.000	74.000	1 : 1.22 : 1.61
2.	120.000	130.000	130.000	1 : 1.08 : 1.08
3.	130.000	150.000	170.000	1 : 1.15 : 1.31
4.	200.000	200.000	260.000	1 : 1.00 : 1.30
5.	250.000	330.000	320.000	1 : 1.32 : 1.28
6.	290.000	310.000	330.000	1 : 1.07 : 1.14
7.	650.000	430.000	450.000	1 : 0.66 : 0.69
8.	880.000	810.000	800.000	1 : 0.92 : 0.91
9.	890.000	610.000	630.000	1 : 0.69 : 0.71
10.	950.000	470.000	450.000	1 : 0.49 : 0.47
11.	1.140.000	1.050.000	1.040.000	1 : 0.92 : 0.91
12.	1.160.000	520.000	520.000	1 : 0.45 : 0.45
13.	1.170.000	1.360.000	1.350.000	1 : 1.16 : 1.15
14.	1.310.000	1.640.000	1.100.000	1 : 1.25 : 0.84
15.	1.390.000	860.000	930.000	1 : 0.62 : 0.67
16.	1.450.000	1.170.000	1.780.000	1 : 0.81 : 1.23
17.	2.100.000	1.970.000	2.970.000	1 : 0.94 : 1.41
18.	2.130.000	3.180.000	1.340.000	1 : 1.49 : 0.63
19.	2.320.000	3.420.000	3.030.000	1 : 1.47 : 1.31
20.	2.630.000	5.160.000	3.590.000	1 : 1.96 : 1.37
21.	2.700.000	3.780.000	4.860.000	1 : 1.40 : 1.80
22.	2.900.000	4.650.000	4.600.000	1 : 1.60 : 1.59

TABEL 8*d* (Vervolg.)

Nos.	Contrôle-methode	Ontroomde melk	Pepton-keukenzout oplossing	Verhoudingen
23.	3.230.000	3.250.000	3.050.000	1 : 1.01 : 0.94
24.	4.300.000	1.700.000	1.710.000	1 : 0.40 : 0.40
25.	5.900.000	7.630.000	7.670.000	1 : 1.29 : 1.30
26.	5.900.000	1.350.000	1.330.000	1 : 0.23 : 0.23
27.	8.200.000	4.980.000	5.230.000	1 : 0.61 : 0.64
28.	10.300.000	12.100.000	11.400.000	1 : 1.17 : 1.11
29.	13.500.000	14.110.000	22.630.000	1 : 1.05 : 1.68
30.	27.400.000	31.500.000	36.500.000	1 : 1.15 : 1.33
31.	27.500.000	32.830.000	32.500.000	1 : 1.19 : 1.18
32.	27.900.000	20.500.000	22.400.000	1 : 0.73 : 0.80
33.	35.600.000	38.330.000	31.170.000	1 : 1.08 : 0.88
Gemidd.	5.955.636	6.076.848	6.251.939	1 : 1.02 : 1.05

HOOFDSTUK VIII.

EINDBESCHOUWING.

a. Samenvatting van eigen onderzoek.

Allereerst werd nagegaan, welke contrôle-methode voor de beoordeeling der resultaten van de kleine-plaatculturen moest worden toegepast. Aangezien de methode, welke in den Codex Alimentarius voor het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek is aangegeven, v.n. door de vervloeiing der bouillongelatine, geen bevredigende uitkomsten gaf, werd door een vergelijkend onderzoek van 100 melkmonsters, waarbij naast genoemde methode, ook de „agarplaatmethode" werd gebruikt, nagegaan, of de bouillongelatine door bouillonagar mocht worden vervangen. Het bleek, dat op de agarplaten gemiddeld 1½-maal zooveel koloniën tot ontwikkeling kwamen als op de gelatineplaten, terwijl bovendien een grootere zekerheid bestond, dat de resultaten konden worden afgelezen. In 36 % der gevallen, waarbij zoowel volgens de gelatineplaat- als volgens de agarplaatmethode het bacteriecijfer kon worden bepaald, waren op de gelatineplaten minder dan 50 % der koloniën ontwikkeld als op de agarplaten. In de agarplaten bij 22° C. konden de koloniën pas na 5 dagen worden geteld, terwijl deze in vele gevallen dan nog zeer klein waren. Daarom werd onderzocht, of 1°. door een hoogere broedtemperatuur,

2°. door de verdunde melk over een agarplaat uit te strijken de vermeerdering der bacteriën kon worden bespoedigd. Te dien einde werden 17 melkmonsters volgens onderstaande 3 methoden onderzocht: 1°. de agarplaatmethode bij 22° C.; 2°. de agarplaatmethode bij 37° C.; 3°. de „agarstrijkmethode" bij 37° C. Het aantal koloniën kon met de beide laatste methoden sneller worden bepaald, echter was het verkregen kiemcijfer volgens de eerste methode gemiddeld bijna 2-maal zoo groot als dat volgens de tweede, en 3-maal zoo hoog als dat volgens de derde methode. Op grond van deze proefnemingen werd de agarplaatmethode bij 22° C. als de contrôle-methode voor de kleine-plaatculturen bij de verdere experimenten gebruikt.

Door het onderzoek van een aantal melkmonsters, zoowel volgens de kleine-plaat-, als volgens de contrôlemethode, werd nagegaan, bij welke broedstooftemperatuur de beste resultaten werden verkregen. De kleineplaatculturen werden resp. bij 37°, 22°, 26° en 30° C. geplaatst, terwijl van elk melkmonster het resultaat na een incubatietijd van 15 en 24 uur werd bepaald. Voor elken incubatietijd werd het onderzoek in duplo verricht. De resultaten bij 37° C. waren niet bevredigend. Van de 171 melkmonsters, waarbij het aantal koloniën in de kleineplaatjes kon worden vastgesteld, was in 104 gevallen het verkregen kiemcijfer minder dan 75 % van dat, hetwelk door de contrôle-platen werd aangegeven, terwijl in 47 % der gevallen de uitkomsten minder dan 50 % bedroegen. In vele gevallen was het zelfs minder dan 20 %. Bovendien waren in vele preparaten naast zeer groote-, talrijke

zeer kleine-koloniën aanwezig, terwijl veel last van overgroeiing en vorming van „spreaders" werd ondervonden. Daarbij kwam, dat in meerdere gevallen, waarbij in de melk meer dan 1.000.000 kiemen aanwezig waren, in de kleine-plaatculturen slechts enkele koloniën gevormd waren en het overgroote deel der bacteriën niet tot koloniën was uitgegroeid. Bij een broedstooftemperatuur van 22° C. werden veel betere resultaten bereikt. Van 178 melkmonsters bedroeg in 79 gevallen het aantal bacteriën volgens de kleine-plaatmethode minder dan 75 % van dat der contrôle-platen, en slechts in 18 % der onderzochte gevallen minder dan 50 %. In alle gevallen, waarbij volgens de contrôle-platen zich meer dan 1.000.000 kiemen per c.M³. in de melk bevonden, was een ontelbaar aantal kleine koloniën gevormd. Door deze omstandigheid, hetwelk men ook bij de temperaturen van 26° C. en 30° C. kon waarnemen, werden in de practijk van het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek miswijzingen voorkomen. Een groot bezwaar voor de kleine-plaatmethode aan de temperatuur van 22° C. verbonden, was, dat na 15 uur in vele gevallen de koloniën nog zeer gering ontwikkeld waren, meerdere malen zelfs nog na 24 uur. De kleine-plaatculturen, welke in een broedstoof bij 26° C. werden geplaatst, vertoonden dit euvel in veel mindere mate, hoewel in meerdere preparaten nog vele koloniën na 15 uur onvoldoende ontwikkeld waren. Van 102 melkmonsters, welke bij deze temperatuur werden onderzocht, was het verkregen bacteriecijfer volgens de kleine-plaatmethode in 25 gevallen minder dan 75 % van dat der contrôle-methode en slechts in 9 % der gevallen

minder dan 50 %. Van 24 melkmonsters, waarbij de kleine-plaatjes bij 30° C. werden bewaard, kon in alle gevallen het resultaat na 15 uur worden afgelezen. In 5 gevallen was het kiemcijfer minder dan 75 % van hetgeen door de contrôle-platen werd aangegeven, terwijl dit in geen enkel geval minder dan 50 % bedroeg. Hoewel bij 30° C. de koloniën zich over het algemeen flink ontwikkelden, kwamen toch naast de groote koloniën vele zeer kleine voor, terwijl ook meer last van de vorming van „spreaders" werd ondervonden. De nadeelen, aan de temperatuur van 37° C. verbonden, kwamen, ofschoon in veel geringere mate, weer te voorschijn, zoodat geen proeven bij temperaturen tusschen 30 en 37° C. werden genomen.

Het blijkt dus, dat voor het verkrijgen van een zoo groot mogelijk aantal koloniën, dat bovendien duidelijk afleesbaar is, een temperatuur wenschelijk is, gelegen tuschen 26° en 30° C.

Kleine-plaatjes, welke met bouillongelatine in plaats van met bouillonagar werden vervaardigd en waarbij een broedstooftemperatuur van 22° C. gebruikt werd, leverden, over het geheel genomen, geen gunstige resultaten op.

De verdere proefnemingen met de kleine-plaatculturen werden alle bij 28° C. genomen. Omtrent den minimum incubatietijd kon door een inleidend onderzoek worden vastgesteld, dat deze voor melkmonsters van verschillende herkomst zeer uiteenloopend is. Bij kiemrijke, in niet steriel vaatwerk gewonnen melk werd een snellere vermeerdering der bacteriën waargenomen, dan wanneer deze in een steriele glaskolf was opgevangen. In elk geval werden na een incubatietijd van 8—10 uur geen, voor de

practijk betrouwbare, resultaten verkregen, zoodat op den dag van inlevering der melkmonsters geen uitspraak omtrent het kiemcijfer kon worden gedaan. Ten einde na te gaan, of zulks één dag na de inlevering kon geschieden, werden van 85 melkmonsters van zeer verschillende herkomst meerdere preparaten vervaardigd, welke gedurende verschillende tijden in de broedstoof werden gehouden. Het bleek, dat over het algemeen na 15 uur betrouwbare resultaten werden verkregen, hoewel in verschillende gevallen de koloniën nog niet flink ontwikkeld waren. Na 20—24 uur was in alle gevallen in de kleine-plaatculturen het aantal koloniën gemakkelijk te bepalen, terwijl na een broedtijd van 45—48 uur geen vermeerdering van dit aantal viel waar te nemen.

Ingeval de te onderzoeken melk meer dan 200.000 bacteriën per c.M³. bevatte, bleek het noodig, alvorens de kleine-plaatculturen aan te leggen, verdunningen van deze melk te maken. Door het onderzoek van 34 monsters handelsmelk, waarbij preparaten van de onverdunde melk werden vervaardigd, bleek, dat hiermede geen betrouwbare indruk van het aantal bacteriën werd verkregen. Dit was wel het geval, indien de kleine-plaatculturen werden aangelegd van de 1 op 10 of 1 op 100 verdunde melk. In alle gevallen kwamen de bacteriecijfers, welke na een incubatietijd van 15 uur en 45 uur werden verkregen, met elkaar overeen. Voor melkmonsters, waarvan het bacteriecijfer varieerde van ± 200.000 tot ± 2.000.000, kon met een verdunning van 1 op 10 worden volstaan, terwijl daarboven een sterkere verdunning moest worden gebruikt.

Verschillende verdunningsvloeistoffen werden op hun bruikbaarheid onderzocht, waarbij werd opgemerkt, dat met pepton-keukenzoutoplossing even goede resultaten werden bereikt als met ontroomde melk.

b. Conclusies.

De kleine-plaatmethode volgens W. D. Frost is een uitstekende, betrouwbare en snel tot het doel voerende methode voor het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek.

Ter verkrijging van de meest betrouwbare resultaten dient de incubatietemperatuur op ± 28° C. gesteld te worden, waarbij in alle gevallen 20—24 uur na de inlevering der melkmonsters het kiemcijfer kan worden afgelezen.

Indien verwacht kan worden, dat de melk meer dan 200.000 bacteriën per c.M³. bevat, dient men, alvorens tot het vervaardigen der kleine-plaatjes over te gaan, verdunningen aan te leggen.

Voor het aanleggen der genoemde verdunningen is pepton-keukenzoutoplossing boven ontroomde melk aan te bevelen.

De kleine-plaatmethode voldoet beter aan de eischen, die de practijk aan het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek stelt, dan de tot heden gebruikelijke methode der gelatine-plaatculturen.

LITERATUUR.

A. Kleine-plaatculturen.

1. 1915. Frost, W. D., Rapid method of counting bacteria in milk. Science. N. S. Vol. XLII, pp. 255—256.
2. 1916. Frost, W. D., A rapid method of counting living bacteria in milk and other richly seeded materials. Journ. Am. Med. Assoc. Vol. LXVI, Nr. 12, pp. 889—890.
3. 1916. Frost, W. D., Comparison of a rapid method of counting bacteria in milk with the standard plate method. Journ. Inf. Dis. Vol. 19, pp. 273—287.
4. 1916. Frost, W. D., Counting bacteria in milk in less than eight hours. Report International Milk Dealers Association, Springfield, Mass. Meeting, pp. 63—78.
5. 1917. Frost, W. D., Counting the living bacteria in milk, a practical test. Journ. Bacteriol. Vol. II pp. 567—583.
6. 1919. Simmons, J. E., A comparison, with the standard plate method of some rapid methods for bacteriologic analysis of milk. Journ. Inf. Dis., Vol. 24, No. 4, pp. 322—336.
7. 1921. Frost, W. D., Improved technic for the micro or little plate method of counting bacteria in milk. Journ. Inf. Diss., Vol. 28, No. 2, pp. 176—184.
8. 1922. Hatfield, Hazel, M. and Park, Wm. H., A critical study of the value of Frost's little plate method for determining the colony counts of milks. Proceedings of the Am. Assoc. Med. Milk Commissions, Vol. 14.
9. 1922. Hatfield, Hazel M., and Park, Wm.H., A study of the practical value of the Frost's little plate method in the routine colony count of milk samples. Am. Journ. Publ. Health, Vol. XII, No. 6.

B. Overige, geraadpleegde literatuur.

10. 1909. Sommerfeld, Paul, Handbuch der Milchkunde.
11. 1911. Breed, Robert S., The determination of the number of bacteria in milk bij direct microscopical examination. Centralbl. f. Bakt. II, Bd. 30, p. 337.

12. 1911. Barthel, Chr., Die Reduktaseprobe, verglichen mit anderen milchhygienischen Untersuchungsmethoden. Ztschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genuszmittel. Bd. 21, Heft 9, S. 513—534.

13. 1912. Bahr, L., Eine schnelle und genaue Methode zum direkten Zählen von Bakterien von O. Skar. Zeitschr. f. Fleisch u. Milchhygiene. Jg. XXIII, Heft 13. (Origineel in „Skand. Veter. Tidsskr." Aarg. II, 1912, Heft 8).

14. 1912. Stapensea, J. Welke der meest gebruikelijke proeven verdienen bij het onderzoek naar de qualiteit der melk de voorkeur. Tijdschrift voor Veeartsenijkunde, Deel 39, blz. 231—260.

15. 1912. Sommerfeldt, S., Beitrag zur Bestimmung des Keimgehaltes in der Milch. Inaugural-Dissertation. Leipzig.

16. 1913. Höijberg, H. M., Ist die Reduktaseprobe eine wertvolle Probe im Dienste der Milchkontrolle? Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene. Jg. XXIV, S. 107.

17. 1914. Dons, R., Zur Beurteilung der Reduktase- (Gärreduktase-)Probe. Zentralbl. f. Bakt. II, Bd. 40, S. 132.

18. 1914. Löhnis, F., Untersuchungen über den Keimgehalt der in Leipzig im Handel befindlichen Milchsorten. Milchwirtschaftl. Centralbl, Jg. 43, 1914, S. 9.

19. 1916. Breed, R. W. and Brew, J. D., Counting bacteria bij means of the microscope. New York. Agricult. Exper. Stat., Technic. Bull. 49.

20. 1916. Standard methods of counting bacteria. From the report of the Laboratory Section of the Amer. Public. Health Assoc., Oct. 24, pp. 260-272.

21. 1916. Düggeli, M., Untersuchungen über die Mikroflora von Handelsmilch verschiedener Herkunft in der Stadt Zürich nach Zahl und Art der darin vorkommenden Spaltpilze. Zentralbl. f. Bakt. II, Bd. 45, S. 433.

22. 1917. The New York Milk Committee. Public Health Reports, Vol. 32, No. 7. Feb. 16.

23. 1917. Klein, Louis A., Principles and practice of Milkhygiene.

24. 1917. Brew, J. D., and Dotterer, W. D., The number of bacteria in milk. New York Agricult. Exper. Stat. Bull. 439.

25. 1918. Meier, Walter, Untersuchungen über zweckmäszige Kultivierungsmethoden für die Bakterien der frischermolkenen Kuhmilch. Centralbl. f. Bakt. II, Bd. 48, S. 433.

26. 1919. Kufferath, H., Le contrôle bactériologique et hygiénique des laits. Annales de l'Institut Pasteur. T. 33, p. 462.

27. 1920. Breed, R. S. and Stocking, W. A., The accuracy of bacterial count from milk samples. New York (Geneva) Agricult. Exper. Stat., Tech. Bull. 75, pp. 1—97.

28. 1920. Codex Alimentarius. No. 1. Melk.

29. 1920. Ostertag, R. v., Die polizeiliche Kontrolle des Milchverkehrs im Interesse der menschlichen Gesundheit. Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhygiene. Bd. 30, H. 1.

30. 1921. Violle, Les microbes et le lait. Le Lait. T. 1, p. 113.

31. 1921. Huynen, M. E., Le problème du lait. Annales de méd. vét., Nov.

32. 1921. Harding, H. A., Prucha, M. J., Kohman, E. F., Weeter, H. M., and Chambers, W. H., In how far is the bacterial count of milk influenced bij the dirt content? Jour. Dairy Science Vol. 4, pp. 430—447.

33. 1921. Robertson, A. H., The relations between bacterial count from milk as obtained bij microscopic and plate methods. New York State. Agricult. Exper. Stat. Geneva, Tech. Bull. 86.

34. 1922. Skar, Olav, Mikroskopische Zählung und Bestimmung des Gesamtkubikinhaltes der Mikroorganismen in festen und flüssigen Substanzen. Centrabl. f. Bakt. II, Bd. 57, S. 327.

35. 1922. Huynen, E., Au sujet de l'inspection du lait. Annales de méd. vét., Mai.

36. 1922. Wilson, G. S., The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. Jour. of bacteriology. Vol. VII.

37. 1923. Gózony, Ludwig, und Kramár, Eugen, Reduktionsversuche mit Bakterien. Centralbl. f. Bakt. O. Bd. LXXXIX, S. 193.

38. 1923. Rapport van de commissie van onderzoek in zake het instellen van een gemeentelijk melkbedrijf te Amsterdam.

VERKLARING DER PHOTO'S.*)

Photo No. 1. „Marking guide" en pincet volgens W. D. Frost. Ongeveer $^1/_3$ der ware grootte.

Photo No. 2. „Warm table" volgens W. D. Frost. Ongeveer $^1/_8$ der ware grootte.

Photo No. 3. „Moist chamber cabinet" volgens W. D. Frost. Ongeveer $^1/_4$ der ware grootte.

Photo No. 4. Twee objectglazen met kleine-plaatculturen van hetzelfde melkmonster:
a. 15 uur bij 28° C. Ware grootte.
b. 28 uur bij 28° C. Vorming van „spreaders". Ware grootte.

Photo No. 5. Kleine-plaatcultuur van melk met 11.000 bacteriën per c.M³. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 6. Kleine-plaatcultuur van melk met 92.000 bacteriën per c.M³. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 7. Kleine-plaatcultuur van melk met 190.000 bacteriën per c.M³. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 8. Kleine-plaatcultuur van melk met 450.000 bacteriën per c.M³. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 9. Kleine-plaatcultuur van melk met ± 3.000.000 bacteriën per c.M³. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 10. Kleine-plaatcultuur na een incubatietijd van 45 uur bij 28° C. Aan de peripherie van enkele groote koloniën een krans van kleine koloniën gevormd. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 11. Kleine-plaatcultuur van melk met 20.000 kiemen per c.M³., na een incubatietijd van 15 uur bij 28° C.

Photo No. 12. Kleine-plaatcultuur van dezelfde melk na een incubatietijd van 24 uur bij 28° C. Vergrooting 40 maal.

Photo No. 13. Rand van een kolonie van staafjesvormige micro-organismen in een kleine-plaatcultuur. Vergrooting 600 maal.

Photo No. 14. Rand van een kolonie van coccen in een kleine-plaatcultuur. Vergrooting 600 maal.

---

*) De photo's werden vervaardigd in het Instituut van Prof. Dr. H. Schornagel met medewerking van den heer C. J. Witmans.

a 0637

PHOTO'S

PHOTO 1

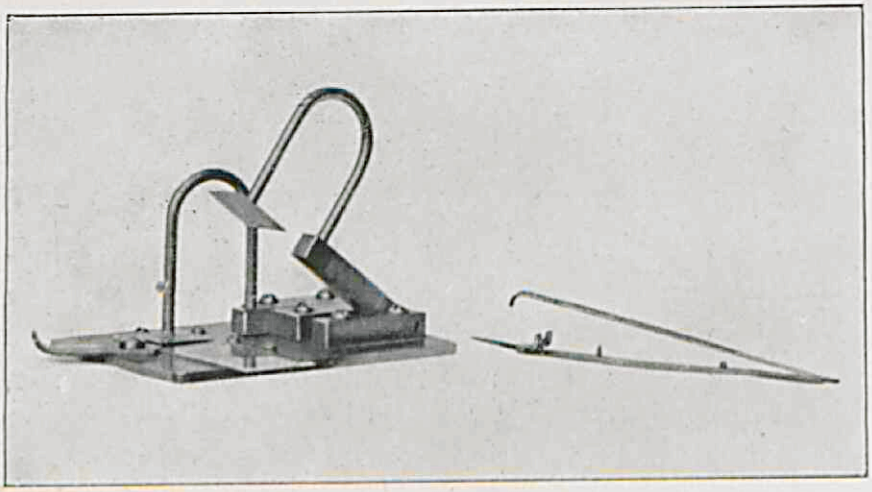


PHOTO 2

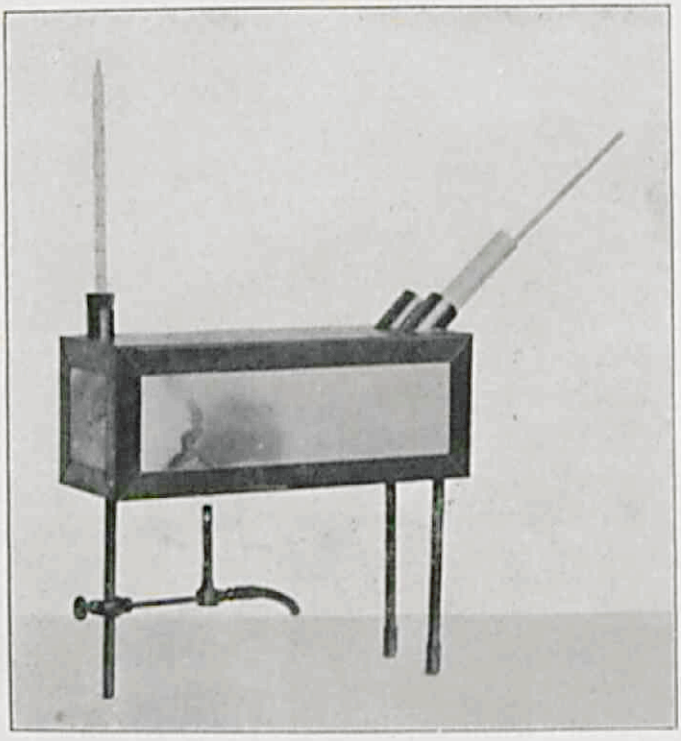


PHOTO 3

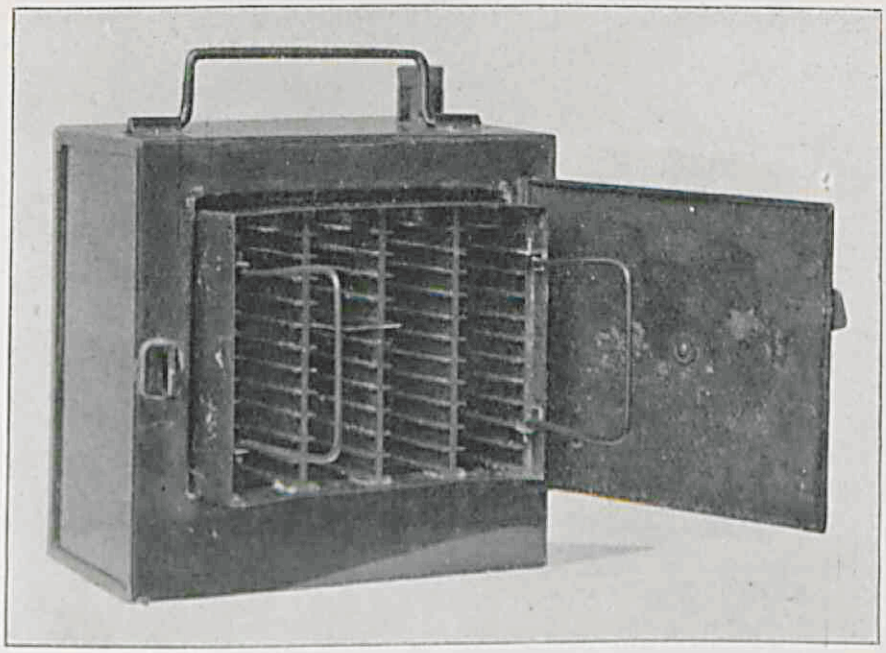


PHOTO 4

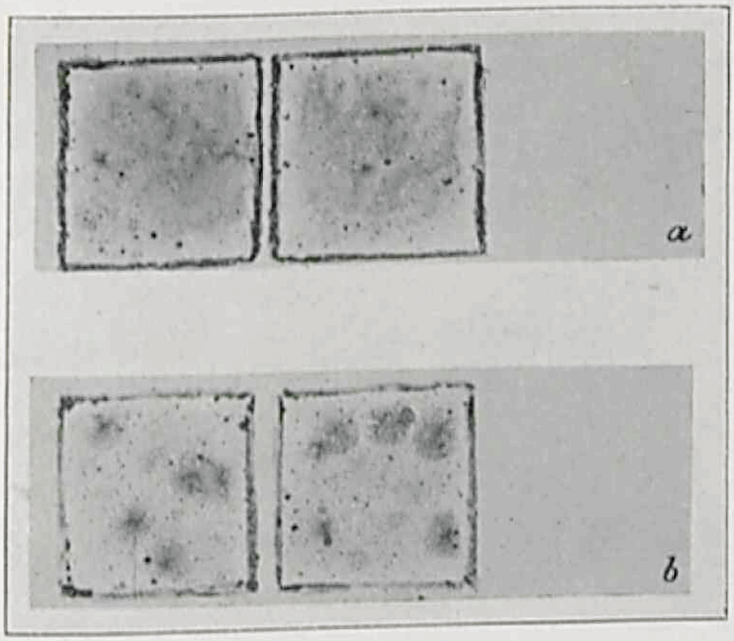


PHOTO 5

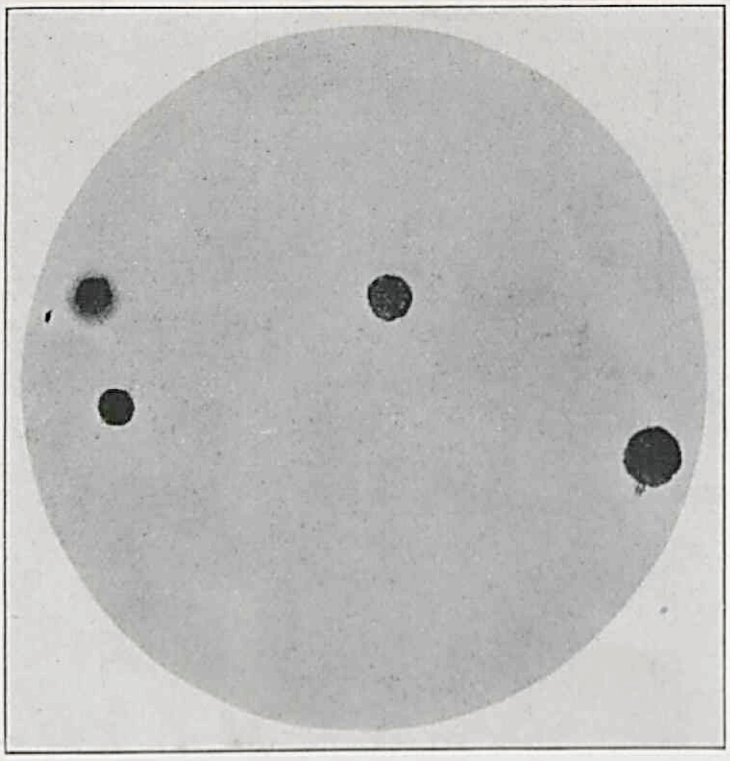


PHOTO 6

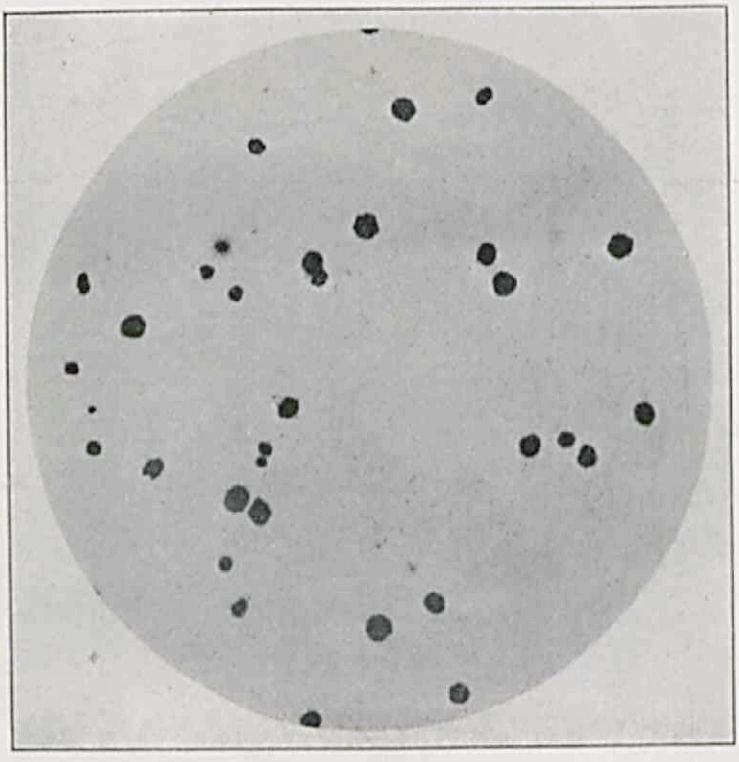


PHOTO 7

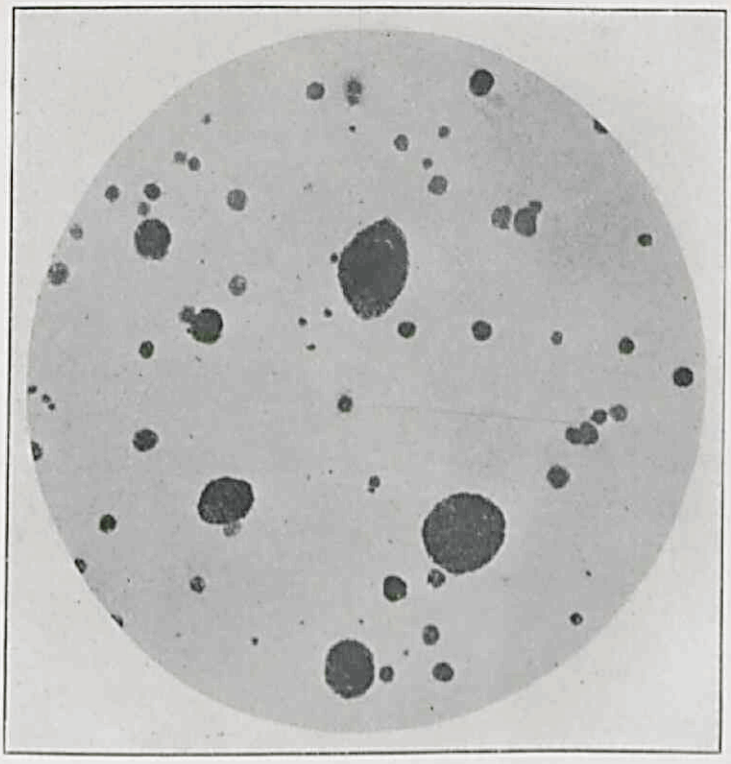


PHOTO 8

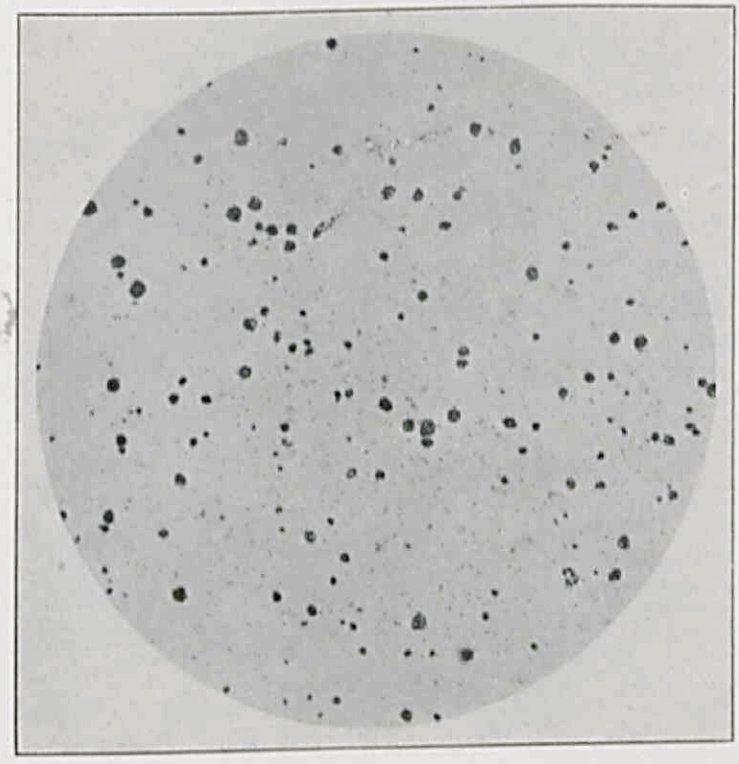


PHOTO 9

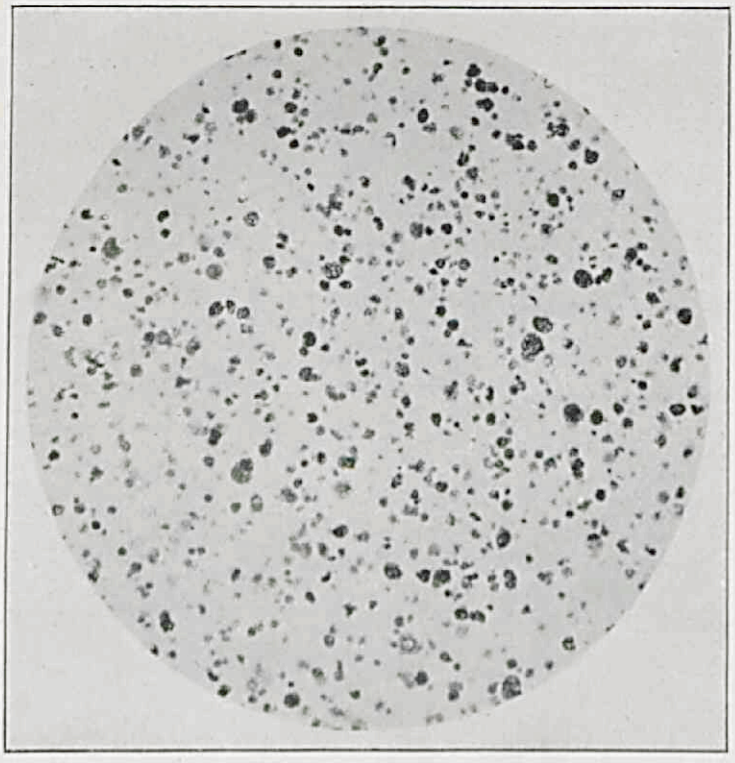


PHOTO 10

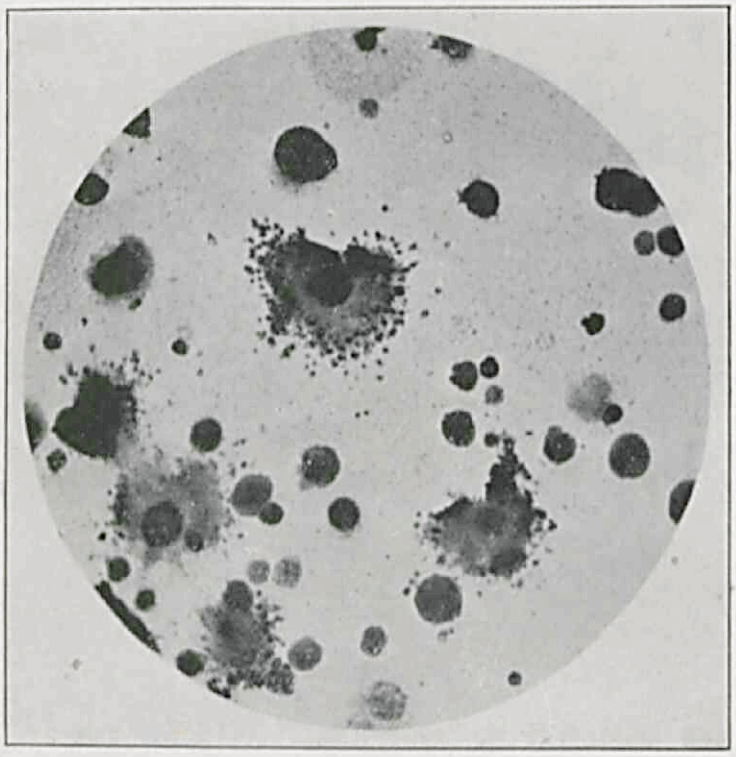


PHOTO 11

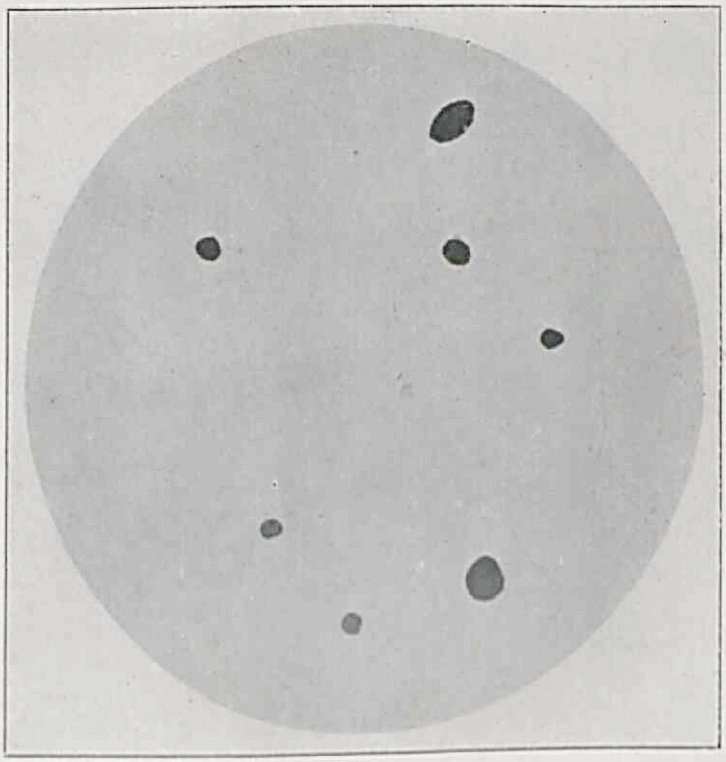


PHOTO 12

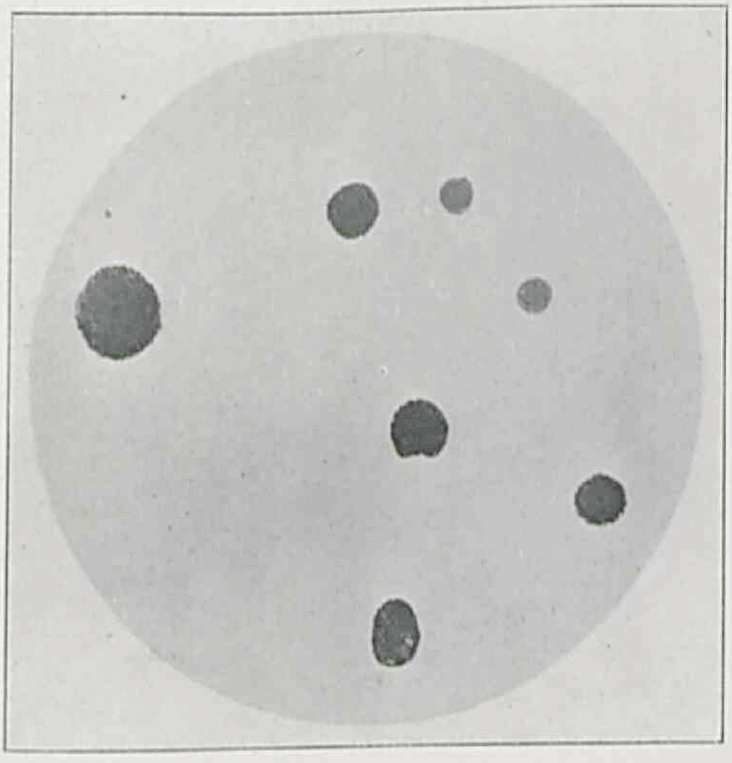


PHOTO 13

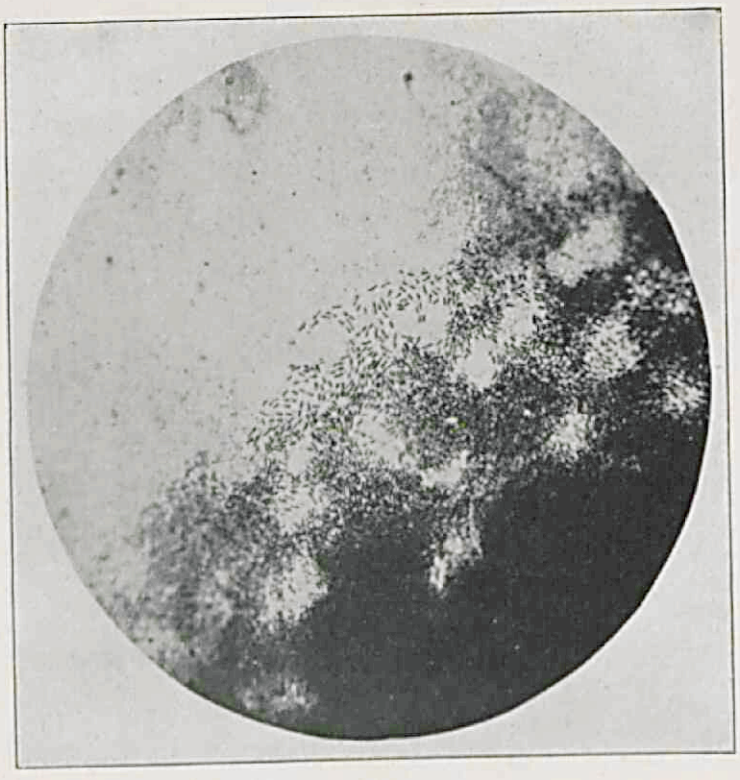
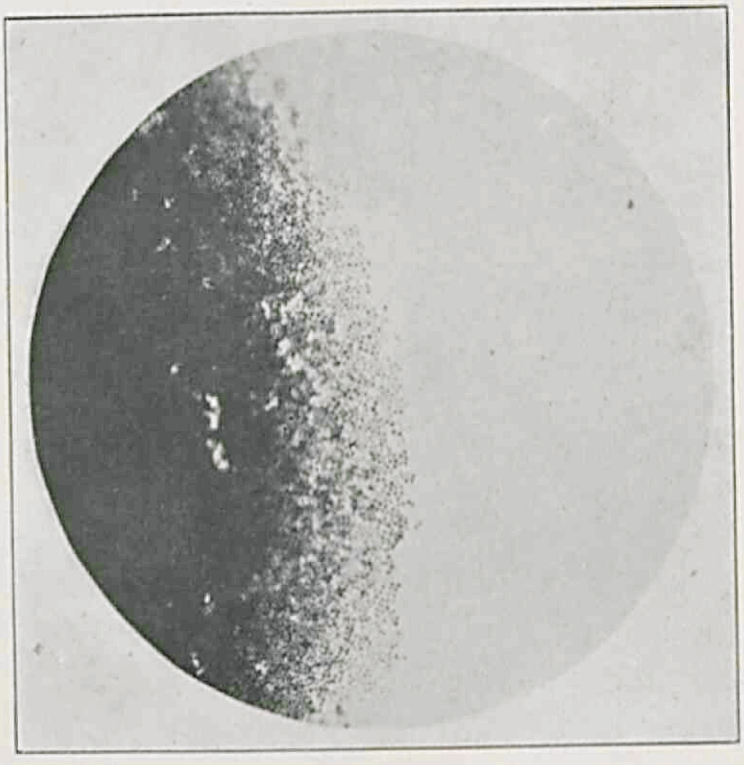


PHOTO 14



STELLINGEN

I

De methode, welke in den Codex Alimentarius (No. 1. Melk. 1920) voor het quantitatief bacteriologisch melkonderzoek is aangegeven, dient door de kleine-plaatmethode volgens W. D. Frost te worden vervangen.

II

De diagnose „Carcinosarcoom" door Joest en Biedermann gesteld bij twee gevallen van vulva carcinoom bij het rund (Zeitschrift für Krebsforschung 1921, Band 18, blz. 51) is onjuist.

III

Het verdient geen aanbeveling op onze lichtere gronden, zooals het noordelijk gedeelte van Limburg, de fokkerij van het zware trekpaard aan te moedigen.

IV

Het afwezig zijn van streptococcen in uitstrijkpreparaten van het melksediment bij koeien, die aan een streptococcen mastitis lijdende waren, is geen bewijs, dat de aandoening genezen is.

V

Het voorschrift, vervat in art. 30, sub f, 2e alinea van het Koninklijk Besluit van 5 Juni 1920 S. 285, waarbij de z.g. vleeschlymphklieren steeds moeten worden onderzocht bij die vormen van tuberculose, waarin de ziekte niet tot één orgaan en de daarbij behoorende lymphklieren beperkt is, moet in een aantal gevallen te streng worden geacht.

VI

Bij de winning van ziektekiemvrije melk moet met de tuberculose der kleine huisdieren rekening worden gehouden.

VII

Waar in het z.g. Keuringsregulatief van bacteriologisch onderzoek van vleesch sprake is en hiermede klaarblijkelijk uitsluitend musculatuur bedoeld wordt, moet men ter voorkoming van misvattingen dit nader aangeven.

VIII

Er bestaan geen voldoende redenen, om in alle gevallen van gegeneraliseerde straalschimmelziekte tot afkeuring van het geslachte dier over te gaan.

BIBLIOTHEEK
DIERGENEESKUNDE
UTRECHT