

# Melk en melkproducten. Aantonen van sporen van boterzuurbacteriën en bepaling van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën

Milk and milk products. Detection of spores of butyric acid bacteria and determination of the content of spores of butyric acid bacteria

1e druk, mei 1994  
UDC 637.14.055:579.672

## 1 Onderwerp en toepassingsgebied

Deze norm beschrijft een methode voor het aantonen van sporen van boterzuurbacteriën in melk. De methode kan worden gebruikt voor het uitvoeren van een grensreactie, hetgeen wil zeggen het aantonen van het wel of niet aanwezig zijn in een bepaalde hoeveelheid melk, en voor het vaststellen van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën via de bepaling van het meest waarschijnlijke aantal (MPN: most probable number).

De beschreven methode kan in beginsel ook worden toegepast voor het aantonen van sporen van boterzuurbacteriën en de bepaling van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën in melkproducten. Bijzondere voorzorgen kunnen daarbij noodzakelijk zijn.

### OPMERKINGEN

1. Voor algemene aanwijzingen voor microbiologisch onderzoek is een praktijkrichtlijn in voorbereiding.
3. De resultaten van deze methode geven een indicatie over het gehalte aan sporen van *Clostridium tyrobutyricum* die bij de bereiding van harde en halfharde kaassoorten ontstaan kunnen zijn van boterzuurgisting.
4. Bij de uitvoering van de methode kan worden gekozen tussen paraffine en water-agar als afdekingsmateriaal voor de inhoud van buizen. Met het oog op reinigbaarheid en hergebruik van de buizen na afloop van de bepaling, verdient toepassing van water-agar de voorkeur.

## 2 Termen en definities

**sporen van boterzuurbacteriën:** Micro-organismen die bij toepassing van de beschreven werkwijze gasvorming veroorzaken.

**gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën:** Het aantal kweekbare sporen van boterzuurbacteriën per volume melk.

### OPMERKING

Het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën wordt uitgedrukt in het aantal kweekbare sporen per ml.

## 3 Beginsel

Een of meer hoeveelheden analysemonster of verdunningen ervan worden na toevoeging van glucose, melkzuur en eventueel gesteriliseerde melk gepasteuriseerd. Daarna wordt nagegaan of bij bebroeding bij 37 °C zonder luchttoetreding gasvorming optreedt.

## 4 Voedingsmedia, verdunningsvloeistoffen en hulpstoffen

### 4.1 Algemeen

Gebruik materialen die voldoende zuiver zijn. Gebruik gedestilleerd of op andere wijze gedemineraliseerd water. Het water mag geen voor micro-organismen giftige bestanddelen bevatten. Gebruik voor de meting van de pH een pH-meter; referentietemperatuur 25 °C. Indien voedingsmedia en toevoegingen na sterilisatie niet direct worden gebruikt, moeten deze in het donker worden bewaard tussen 0 °C en 5 °C en onder omstandigheden waarbij geen veranderingen in de samenstelling optreden. Bewaar de voedingsmedia en toevoegingen niet langer dan een maand.

### 4.2 Gesteriliseerde magere melk

Gesteriliseerde magere melk die vrij is van bacteriegroei-remmende stoffen en die is gesteriliseerd volgens het UHT-procédé (UHT: ultra high temperature), wel of niet gevolgd door een milde nasterilisatie in de verpakking. Bewaar de gesteriliseerde magere melk niet langer dan 6 maanden of tot de uiterste verkoopdatum bij een temperatuur tussen 0 °C en 25 °C.

### OPMERKINGEN

1. Het gebruik van magere melk die mild is nagesteriliseerd kan bij toepassing van paraffine als afdekingsmateriaal de afleesbaarheid verbeteren.
2. Nøewel er nog weinig gegevens over afleesbaarheid zijn, ziet het er naar uit dat volle melk in plaats van magere melk kan worden toegepast.

### 4.3 Glucose-melkzuuroplossing

#### 4.3.1 Samenstelling

Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	5,0 g
L(+)-melkzuuroplossing, c(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ) = 1,0 mol/l	20 ml
Water	tot 100 ml

#### 4.3.2 Bereiding van de melkzuuroplossing, c(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) = 1,0 mol/l

Meng 20 volumedelen 50 % (m/m) L(+)-melkzuur met 90 volumedelen water. Controleer de sterkte van de bereide oplossing door middel van titratie. Corrigeer indien nodig door toevoeging van melkzuur of water.

#### 4.3.3 Bereiding van de glucose-melkzuuroplossing

Vul 5,0 g glucose en 20,0 ml melkzuuroplossing (4.3.2) in een maatkolf aan met water tot 100 ml. Steriliseer gedurende 15 min bij 121 °C ± 1 °C.

#### 4.4 Melk-glucose-melkzuuroplossing

Samenstelling	
Glucose-melkzuuroplossing (4.3.3)	100 ml
Gesteriliseerde magere melk (4.2)	900 ml

##### Bereiding

Breng op aseptische wijze in een steriele kolf 900 ml gesteriliseerde magere melk (4.2) en voeg daaraan onder voortdurend mengen 100 ml glucose-melkzuuroplossing (4.3.3) toe. Laat de kolf met inhoud staan bij een temperatuur van 20 °C tot 25 °C.

Controleer na 60 min ± 5 min de pH in een aseptisch genomen monster. Deze moet 5,45 ± 0,03 zijn. Corrigeer de pH indien nodig met behulp van natriumhydroxide-oplossing  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ , of met zoutzuur  $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ . Gebruik de verkregen melk-glucose-melkzuuroplossing binnen 24 h.

#### 4.5 Paraffine

Paraffine, pastilles of staafjes, smelttraject 54 °C tot 60 °C.

#### 4.6 Water-agar

##### Samenstelling

Agar, afhankelijk van de geleereigenschappen  
Water

15 g tot 20 g  
1000 ml

##### Bereiding

Los de agar onder verwarming op in het water. Steriliseer gedurende 15 min bij 121 °C ± 1 °C.

#### 5 Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

Gebruikelijke toestellen en steriel glaswerk voor een microbiologisch laboratorium en in het bijzonder de onderstaande.

**5.1** Pipetten van 1 ml en 10 ml, met een schakelverdeling in 0,1 ml.

**5.2** Glazen cultuurbuizen met inwendige afmetingen van ca. 16 mm × 150 mm en rekjes voor de buizen.

**5.3** Buizen met paraffine.

Indien paraffine als afdekkingsmateriaal wordt gebruikt, breng dan in buizen (5.2) zoveel paraffine (4.5) dat na smelten een prop van 2,5 cm tot 3 cm hoogte zal ontstaan. Sluit de buizen af en steriliseer 15 min bij 121 °C ± 1 °C.

**5.4** Waterbaden, waarvan een ingesteld op een temperatuur van 80 °C ± 1 °C en een op een temperatuur van 45 °C ± 1 °C.

Indien agar als afdekkingsmateriaal wordt gebruikt, bovendien een bad waardoor stromend leidingwater (10 °C tot 20 °C) kan worden geleid.

**5.5** Broedstoof voor bebroeding bij 37 °C ± 1 °C.

#### 6 Voorbehandeling van het monster

##### OPMERKING

Zie voor de monsterneming NEN 3748.

Behandel het monster voor volgens NEN 6872. Gebruik echter gesteriliseerde magere melk (4.2) voor het maken van verdunningen van het monster.

#### 7 Werkwijze

##### 7.1 Bereiding van verdunningen

Bereid zo nodig verdunningen volgens NEN 6872. Gebruik echter gesteriliseerde magere melk (4.2) als verdunningsvloeistof.

##### 7.2 Enting, pasteurisatie en koeling bij gebruik van paraffine als afdekkingsmateriaal

###### 7.2.1 Enting

###### Niet verdunde melk

Breng in buizen met paraffine (5.3) achtereenvolgens 0,1 ml glucose-melkzuuroplossing (4.3.3), 10 ml melk-glucose-melkzuuroplossing (4.4) en 1 ml van het te onderzoeken monster melk. Meng.

###### Verdunningen

Breng in buizen met paraffine (5.3) achtereenvolgens 0,1 ml glucose-melkzuuroplossing (4.3.3), 10 ml melk-glucose-melkzuuroplossing (4.4) en 1 ml van de gewenste decimale verdunning (7.1). Meng.

##### OPMERKING

Indien hoeveelheden van 10 ml van een monster worden onderzocht, kan vooraf een grote hoeveelheid monster worden gemengd met glucose-melkzuuroplossing (4.3.3) in de verhouding 10 op 1,1. Na 60 min ± 5 min moet dan de pH op 5,45 ± 0,03 worden ingesteld (zie 4.4). Vervolgens moeten hoeveelheden van 11 ml in de buizen met paraffine worden overgebracht.

###### 7.2.2 Pasteurisatie

Plaats de rekjes met buizen in het waterbad van 80 °C. Zorg ervoor dat het vloeistofniveau in de buizen ten minste 1,5 cm onder het waterniveau staat.

Gebruik voor het vaststellen van de pasteurisatie-intensiteit een controlebuis. Bepaal het tijdstip waarop de inhoud van de buis een temperatuur van 79 °C heeft bereikt en pasteuriseer daarna 5 min. De tijd van opwarmen mag ten hoogste 5 min bedragen. Plaats onmiddellijk na de pasteurisatie de rekjes met buizen in het waterbad van 45 °C.

Ga verder volgens 7.4.

##### 7.3 Enting, pasteurisatie en koeling bij gebruik van agar als afdekkingsmateriaal

###### 7.3.1 Enting

###### Niet verdunde melk

Breng in steriele buizen (5.2) achtereenvolgens 0,1 ml glucose-melkzuuroplossing (4.3.3), 10 ml melk-glucose-melkzuuroplossing (4.4) en 1 ml van het te onderzoeken monster melk. Meng.

###### Verdunningen

Breng in steriele buizen (5.2) achtereenvolgens 0,1 ml glucose-melkzuuroplossing (4.3.3), 10 ml melk-glucose-melkzuuroplossing (4.4) en 1 ml van de gewenste decimale verdunning (7.1). Meng.

##### OPMERKING

Indien hoeveelheden van 10 ml van een monster worden onderzocht, kan vooraf een grote hoeveelheid monster worden gemengd met glucose-melkzuuroplossing (4.3.3) in de verhouding 10 op 1,1. Na 60 min ± 5 min moet dan de pH op 5,45 ± 0,03 worden ingesteld (zie 4.4). Vervolgens moeten hoeveelheden van 11 ml in de buizen worden overgebracht.

###### 7.3.2 Pasteurisatie

Ga te werk volgens 7.2.2. Plaats echter onmiddellijk na de pasteurisatie de rekjes met buizen in het bad met stromend leidingwater (5.4).

# Bestelformulier

## Stuur naar:

NEN Standards Products & Services  
t.a.v. afdeling Klantenservice  
Antwoordnummer 10214  
2600 WB Delft



**NEN** Standards Products & Services

Postbus 5059  
2600 GB Delft

Vlinderweg 6  
2623 AX Delft

T (015) 2 690 390  
F (015) 2 690 271

[www.nen.nl/normshop](http://www.nen.nl/normshop)

## Ja, ik bestel

\_\_ ex. NEN 6877:1994 nl Melk en melkproducten - Aantonen van sporen van boterzuurbacteriën en bepaling van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën € 16.34

**Wilt u deze norm in PDF-formaat? Deze bestelt u eenvoudig via [www.nen.nl/normshop](http://www.nen.nl/normshop)**

### Gratis e-mailnieuwsbrieven

Wilt u op de hoogte blijven van de laatste ontwikkelingen op het gebied van normen, normalisatie en regelgeving? Neem dan een gratis abonnement op een van onze e-mailnieuwsbrieven. [www.nen.nl/nieuwsbrieven](http://www.nen.nl/nieuwsbrieven)

## Gegevens

Bedrijf / Instelling \_\_\_\_\_

T.a.v. \_\_\_\_\_ O M O V

E-mail \_\_\_\_\_

Klantnummer NEN \_\_\_\_\_

Uw ordernummer \_\_\_\_\_ BTW nummer \_\_\_\_\_

Postbus / Adres \_\_\_\_\_

Postcode \_\_\_\_\_ Plaats \_\_\_\_\_

Telefoon \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_

**Factuuradres** (indien dit afwijkt van bovenstaand adres)

Postbus / Adres \_\_\_\_\_

Postcode \_\_\_\_\_ Plaats \_\_\_\_\_

Datum \_\_\_\_\_ Handtekening \_\_\_\_\_

### Retourneren

Fax: 015 2 690 271

E-mail: [klantenservice@nen.nl](mailto:klantenservice@nen.nl)

Post: NEN Standards Products & Services,

t.a.v. afdeling Klantenservice  
Antwoordnummer 10214,  
2600 WB Delft

(geen postzegel nodig).

### Voorwaarden

- De prijzen zijn geldig tot 31 december 2018, tenzij anders aangegeven.
- Alle prijzen zijn excl. btw, verzend- en handelingskosten en onder voorbehoud bij o.m. ISO- en IEC-normen.
- Bestelt u via de normshop een pdf, dan betaalt u geen handeling en verzendkosten.
- Meer informatie: telefoon 015 2 690 391, dagelijks van 8.30 tot 17.00 uur.
- Wijzigingen en typfouten in teksten en prijsinformatie voorbehouden.
- U kunt onze algemene voorwaarden terugvinden op: [www.nen.nl/leveringsvoorwaarden](http://www.nen.nl/leveringsvoorwaarden).