

**DIE VOORKOMS EN BETEKENIS VAN
ACINETOBACTER IN ROUMELK**

Nellie Adéle Brand

B.Sc., Hons.B.Sc.

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike
nakoming van die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Mikrobiologie aan
die Potchefstroomse Universiteit vir
Christelike Hoër Onderwys.

Leier: Dr. J.F. Mostert

Hulpleier: Prof. dr. P.A.J. Brand

POTCHEFSTROOM

1993

" Begin met die werk, want Ek is met julle, sê die Here
die Almagtige."

Haggai 2:4b

INHOUDSOPGAWE

	Opsomming	iv
	Abstract	vii
	Bedankings	x
	Lys van afkortings	xi
1	Inleiding	1
1.1	Die suiwelbedryf in die RSA.....	1
1.2	Die kwaliteit van melk.....	1
1.3	Probleemstelling.....	3
2	Die isolering en identifisering van <u>Acinetobacter</u> uit roumelk	7
2.1	Nomenklatuur en klassifisering.....	7
2.2	Die totstandkoming van die genus.....	9
2.2.1	Isolate voor 1950.....	9
2.2.2	Isolate na 1950.....	13
2.3	Eienskappe van die genus <u>Acinetobacter</u>	14
2.4	Die voorkoms en ekologie van <u>Acinetobacter</u>	17
2.5	Isolering van <u>Acinetobacter</u>	19
2.6	Identifisering van <u>Acinetobacter</u>	20
2.6.1	Primêre fenotipiese toetse.....	21
2.6.2	Sekondêre fenotipiese toetse.....	23
2.7	Eksperimentele metodes.....	26
2.7.1	Melkmonsters.....	27
2.7.2	Inkubasietemperatuur.....	27
2.7.3	Instandhouding van suiwer kulture.....	27

2.7.4	Isolering van die organismes.....	27
2.7.5	Sifting vir <u>Acinetobacter</u>	28
2.7.6	TEM-ondersoeke.....	29
2.7.7	Fenotipiese toetse.....	30
2.7.7.1	Primêre fenotipiese toetse.....	30
2.7.7.2	Sekondêre fenotipiese toetse.....	33
2.8	Resultate en bespreking.....	35
2.8.1	Isolering van organismes.....	35
2.8.2	Siftingstoetse.....	39
2.8.3	Identifisering van isolate.....	41
3	Die vermoë van <u>Acinetobacter</u> om bederf in melk te veroorsaak	56
3.1	Inleiding.....	56
3.2	Ekstrasellulêre ensieme.....	59
3.2.1	Proteases.....	59
3.2.2	Lipases.....	60
3.3	Biogene amiene.....	61
3.4	Ekperimentele metodes.....	67
3.4.1	Groeivermoë by lae temperature.....	67
3.4.2	Bestandheid teen pasteurisasie.....	67
3.4.3	pH-veranderinge in melk.....	68
3.4.4	Proteolise.....	68
3.4.5	Lipolise.....	68
3.4.6	Groei in lakmoesmelk.....	69
3.4.7	Produksie van biogene amiene.....	69
3.5	Resultate en bespreking.....	70
3.5.1	Groeivermoë by lae temperature.....	70

3.5.2	Bestandheid teen pasteurisasie.....	72
3.5.3	pH-veranderinge in melk.....	80
3.5.4	Proteolise.....	82
3.5.5	Lipolise.....	83
3.5.6	Groei in lakmoesmelk.....	84
3.5.7	Produksie van biogene amiene.....	85
4	Die aanhegtingvermoë van <u>Acinetobacter</u>-kulture..	89
4.1	Inleiding.....	89
4.2	Biofilmvorming in die suiwelbedryf.....	91
4.3	Eksperimentele metodes.....	94
4.3.1	Produksie van ekstrasellulêre polisakkariede....	94
4.3.2	Aanhegtingondersoek.....	94
4.3.3	Vorbereiding van skyfies vir SEM-ondersoeke ...	96
4.4	Resultate en bespreking.....	98
4.4.1	Produksie van EPS.....	98
4.4.2	Aanhegtingondersoek.....	98
5	Algemene bespreking en gevolgtrekkings	109
5.1	Isolering van <u>Acinetobacter</u>	109
5.2	Identifisering	114
5.2.1	Primêre fenotipiese toetse	114
5.2.2	Sekondêre fenotipiese toetse	117
5.2.3	API 20 NE-sisteem	118
5.3	Die vermoë van <u>Acinetobacter</u> om melk te bederf.	119
5.4	Die aanhegtingvermoë van <u>Acinetobacter</u> -kulture.	124
	Literatuurlys.....	126

OPSOMMING

Die praktyk om roumelk voor prosessering in groot volumes vir relatief lang periodes koel op te berg, hou potensiële kwaliteitprobleme vir die suiwelbedryf in. Ernstige sintuiglike waarneembare gebreke en bederf van melk en melkprodukte word grotendeels toegeskryf aan die metaboliese aktiwiteit van verskeie psigrotrofe genera by lae koelopbergingsstemperature. Acinetobacter is 'n bekende kontaminant in melk en kan 'n dominante deel uitmaak van die Gram-negatiewe psigrotrofe populasie in roumelk. Die voorkoms en potensiële bederfvermoë van Acinetobacter in roumelk is ondersoek asook die vermoë om onder bepaalde toestande aan vlekvrystaalmelkkontakoppervlakke te heg.

In hierdie ondersoek is 5955 kolonies vanaf vyf isolasie-media uit twintig roumelkmonsters geïsoleer. Nadat primêre en sekondêre fenotipiese toetse op hierdie isolate uitgevoer is, het slegs agt-en-dertig isolate (0,6%) aan die eienskappe van Acinetobacter voldoen.

Ses-en-vyftig Acinetobacter-kulture (aght-en-dertig isolate en agtien verwysingskulture) se vermoë om melk te bederf is bepaal. Die groeivermoë van hierdie kulture is by lae temperature bepaal. Slegs tien isolate kon nie by 10°C groei nie, terwyl ses-en-dertig by 7°C en tien by 4°C gegroei het. Twee organismes is deur laboratoriumpasteurisasie ge-

dood, terwyl daar 'n betekenisvolle afname in die getalle van die oorblywende vier-en-vyftig Acinetobacter-kulture was. Uit hierdie resultate kan afgelei word dat hierdie organismes gereduseer word deur pasteurisasie, dog 'n sekere persentasie oorleef dit wel.

Die groei van Acinetobacter in melk het geen pH-veranderinge in die melk tot gevolg gehad nie. Alhoewel proteolise by enkele Acinetobacter-kulture aangetoon is, was die proteolitiese aktiwiteit deurgaans laag. By 30°C het slegs agt van die ses-en-vyftig kulture proteolise vertoon, drie by 10°C en een organisme kon kaseïen by 4°C en 7°C hidroliseer. Nie een van die kulture het defekte wat aan lipolise toegeskryf kan word, vertoon nie. Verskeie kulture het lakmoesmelk gereduseer, maar geen suur of alkali is gevorm nie. Laasgenoemde waarneming is 'n bevestiging dat die organismes verplig aëroob is, tot so 'n mate dat hulle neig om na relatief kort periodes in vloeistofmedium af te sterf.

Die teenwoordigheid van biogene amiene in verskeie voedselsoorte (waaronder suiwelprodukte) hou 'n gesondheidsrisiko vir die verbruiker in. In hierdie ondersoek het vyf-en-dertig van die agt-en-dertig Acinetobacter-kulture wat uit roumelk geïsoleer is tiramien geproduseer, terwyl negentien kulture by 30°C histamien geproduseer het. Acinetobacter kan 'n belangrike rol speel in die produksie van veral

tiramien, maar ook histamien. Die produksie van sekere amiene deur Acinetobacter mag ook 'n belangrike bydrae lewer ten opsigte van die sintuiglike defekte in melk.

Die produksie van ekstrasellulêre polimeriese stowwe (EPS) en aanhegtingvermoë van geselekteerde Acinetobacter-kulture aan vlekvrystaaloppervlakke is deur middel van skandeerelektronmikroskopie bepaal. Geen EPS-produksie is met Alcianblou-kleuring waargeneem nie. Nadat die vooraf gekondisioneerde vlekvrystaalskyfies in geïnkuleerde melk by 30°C en 7°C geïnkubeer is, is geen aanhegting waargeneem nie.

In hierdie ondersoek is gevind dat die Acinetobacter-kulture se metaboliese aktiwiteite wat die kwaliteit van melk beïnvloed, met die uitsondering van amienproduksie, gering is.

ABSTRACT

The practice of cold storage of large volumes of milk before processing for relatively long periods, poses potential quality problems for the dairy industry. Serious sensory defects and spoilage of milk and dairy products can mainly be related to the metabolic activity of different psychrotrophic genera at low storage temperatures. Acinetobacter is a common contaminant in milk and can represent a dominant part of the Gram-negative psychrotrophic population in raw milk. The incidence and the potential spoilage ability of Acinetobacter in raw milk were investigated as well as the ability to attach to stainless steel milk contact surfaces under specific conditions.

In this investigation 5955 colonies were isolated on five isolation media from twenty raw milk samples. After primary and secondary phenotypic tests had been performed only thirty-eight isolates (0,6%) conformed to the required characteristics of Acinetobacter.

The ability of fifty-six Acinetobacter cultures to spoil milk (thirty-eight isolates and eighteen reference cultures) was determined. The ability of these cultures to grow at low temperatures was determined.

Only ten isolates could not grow at 10°C, while thirty-six isolates grew at 7°C and ten at 4°C. Two organisms were killed by laboratory pasteurisation, while a significant decrease occurred in the numbers of the remaining fifty-four Acinetobacter cultures. From these results it can be concluded that these organisms are reduced by pasteurisation, but a certain percentage can survive it.

The growth of Acinetobacter in milk did not cause any change in the pH of the milk. Although proteolysis was observed in some Acinetobacter cultures the proteolytic activity was consistently low. At 30°C only eight of the fifty-six cultures showed proteolysis, three at 10°C and one organism could hydrolyse casein at 4°C and 7°C. None of the cultures showed any defect which could be ascribed to lypolysis. Several cultures reduced litmus milk, but no acid or alkaline was produced. The latter observation is an indication that the organisms are obligate aerobic to such an extent that they are inclined to die off after short periods in liquid media.

The presence of biogenic amines in various foods (dairy products included) poses a health risk to the consumer. In this investigation thirty-five of the thirty-eight Acinetobacter cultures isolated from raw milk produced tyramine,

while nineteen cultures could produce histamine at 30°C. Acinetobacter could play an important role especially in the production of tyramine but also of histamine. The production of certain amines by Acinetobacter could make an important contribution to the sensory defects in milk.

The production of extra-cellular polymeric substances and the ability of selected Acinetobacter cultures to attach to stainless steel surfaces were investigated, employing scanning electron microscopy. Alcianblue staining showed no production of extra-cellular polymeric substances. After the pre-conditioned stainless steel discs had been incubated in inoculated milk at 30°C and 7°C no attachment was observed.

Except for the production of amines, the metabolic activities of Acinetobacter cultures affecting the quality of raw milk were negligible in this investigation.

DANKBETUIGINGS

Graag betuig ek my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone sonder wie hierdie verhandeling nie moontlik sou gewees het nie:

- Die **Almagtige Drie-Enige God**, deur Wie alles moontlik is en aan Wie alle eer toekom
- *Dr. J.F. Mostert*, Irene Dierreproduksie-Instituut, as studieleier en sy opbouende kritiek met die skryf van hierdie verhandeling
- *Prof. P.A.J. Brand*, Departement Biochemie P.U. vir C.H.O., vir sy bekwame leiding in die uitvoering van hierdie navorsingsprojek
- *Die Bestuur*, IDPI, vir die gebruik van 'n amptelike projek vir studiedoeleindes
- *Dr. L.R. Tiedt*, Departement Elektronmikroskopie P.U. vir C.H.O., vir sy hulp met die elektronmikroskopiese ondersoeke
- *Jennifer McDonald* en *Retha van Dyk*, Suiwelbedryfsentrum IDPI, vir hulle uitstekende tegniese hulp in die bepaling van die betekenis van *Acinetobacter* in melk
- *My ouers* en *suster* vir gebede, inspirasie en ondersteuning.
- *Kurt Prinsloo*, vir hulp en ondersteuning
- *Vriende en familie*, vir aanmoediging en belangstelling
- *My kollegas*, vir hulp en belangstelling
- *Dr. P.J. Pretorius*, Departement Biochemie P.U. vir C.H.O., vir advies in verband met die manuskrip

LYS VAN AFKORTINGS

DN	:	denitrifisering
EPS	:	ekstrasellulêre polimeriese stowwe
F	:	flagellums
KV	:	kristalvioletagar
MMHN	:	gemodifiseerde medium van Holton
MMHNP	:	gemodifiseerde medium van Holton
MMP	:	gemodifiseerde MacConkey medium van Schutte
N-red:		nitraatreduksie
PTA	:	totale plaattellingsagar
RF	:	respirasie-fermentasie
SEM	:	skandeerelektronmikroskoop
TEM	:	transmissie-elektronmikroskoop
T80	:	Tween-80
VBBA	:	Victoriablou-bottervetagar

HOOFSTUK 1. INLEIDING

1.1 Die suiwelbedryf in die RSA

Altesaam 2 052 506 ton (2 052 506 000 kg) melk is gedurende 1990 deur ongeveer 9500 primêre produsente geproduseer (Hermann, 1991:17), terwyl daar gedurende 1992 in Suid-Afrika 1 804 362 ton melk verbruik is (Suiwelraad, 1993:3). Altesaam R25 872 miljoen word jaarliks aan suiwelprodukte bestee. Uiteraard is dit vir die suiwelbedryf om verskeie redes van die allergrootste belang om 'n voedsame, hoë kwaliteitprodukt met 'n aanvaarbare rakleef tydperk aan die verbruiker beskikbaar te stel. Hoewel geen syfers beskikbaar is nie, is dit bekend dat groot finansiële verliese jaarliks deur alle sektore van die suiwelbedryf gelyk word weens smaak- en kwaliteitprobleme wat direk toegeskryf kan word aan die metaboliese aktiwiteit van mikro-organismes in melk, voor sowel as na hittebehandeling.

1.2 Die kwaliteit van melk

Die doeltreffende verkoeling van melk direk na winning, gedurende vervoer en tydens opberging voor prosessering is die eerste skakels in die "koue-ketting" wat meehelp om 'n hoë kwaliteitprodukt aan die verbruiker beskikbaar te stel. Koelopberging van roumelk in groot volumes, selfs vir enkele

dae, word vandag algemeen toegepas. Dié praktyk is egter nie sonder probleme vir die suiwelbedryf nie omdat die kwaliteit van die melk deur die groei en metaboliese aktiwiteite van bepaalde mikro-organismes by lae temperature benadeel kan word. Lae temperature is selektief vir die groei van psigrotrofe bakterieë wat by uitstek melkproteïene en -vette metaboliseer. Die kwantitatiewe voorkoms en generiese samestelling van psigrotrofe organismes in roumelk is goed gedokumenteer (Hayes, 1985:106; Bramley & McKinnon, 1990:166).

Suiwelmikrobiologiese ondersoeke ten opsigte van die praktiese belang van psigrotrofe toon dat dié organismes direk, sowel as indirek, kwaliteitprobleme in roumelk en geprosesseerde suiwelprodukte kan veroorsaak. Nie-spoorvormende psigrotrofe bakterieë wat in roumelk groei, kan:

- (i) direk bederf veroorsaak indien groot getalle teenwoordig is, en
- (ii) hittebestande ekstrasellulêre ensieme vorm wat beide die prosesseringseienskappe van roumelk sowel as die kwaliteit van hittebehandelde melkprodukte nadelig beïnvloed (Senyk et al., 1982:513).

Aangesien melk nie gewoonlik onmiddellik geprosesseer word na ontvangs by die fabriek nie, kan dit tot vyf dae oud wees

voordat dit verwerk word (Cousin, 1982:172; Bester *et al.*, 1986:11). Alhoewel die suurwording van melk vertraag word deur verkoeling, verbeter dit nie noodwendig die kwaliteit van die sekondêre produk nie. Die groei van die melksuurbakterieë word wel geïnhibeer, maar die psigrotrofe populasie word bevoordeel (Bester *et al.*, 1986:11).

1.3 Probleemstelling

Navorsingsondersoeke ten opsigte van die samestelling van die psigrotrofe bakteriepopulasie in roumelk, wat oor dekades uitgevoer is, toon dat Acinetobacter spp., naas ander genera, bykans alomteenwoordig is (Baumann, 1968:39; Jay, 1978:152; Juni, 1984:304; Hayes, 1985:106). In vergelyking met ander belangrike psigrotrofe genera soos Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Aeromonas, Alcaligenes en Enterobacter (Mikolajcik, 1979:7, Cousin, 1982:176), is relatief min bekend ten opsigte van die ekobiologie asook die praktiese belang van metaboliese aktiewe Acinetobacter-rasse in melk. Gennari *et al.* (1992:70) beklemtoon dat Acinetobacter "draderigheid" in melk veroorsaak.

Oorsese en plaaslike ondersoeke het aan die lig gebring dat die samestelling van die psigrotrofe populasie, asook die voorkoms van Acinetobacter in roumelk afkomstig van verskil-

lende streke, merkbaar van mekaar verskil. Acinetobacter calcoaceticus het byvoorbeeld 1,1% van die psigrotrofe populasie in die Nancy-streek van Frankryk uitgemaak (Milliere & Veillet-Ponchet, 1979:366), terwyl daar in 'n Hongaarse ondersoek 17% as A. lwoffii geïdentifiseer is. 'n Duidelike seisoenale verspreiding van die organismes is ook waargeneem. Fischer et al. (1987:73) het waargeneem dat Pseudomonas gedurende die wintermaande en Acinetobacter gedurende die somermaande die oorheersende genera in die psigrotrofe populasie is. Swart (1988:70) kon geen Acinetobacter uit melkmonsters isoleer nie. Thomas & Thomas (1978:5) toon aan dat Acinetobacter nie vinnig in melk vermenigvuldig nie. Volgens Gennari et al. (1992:64) toon 'n ondersoek oor Acinetobacter en Moraxella-agtige organismes, dat Acinetobacter 95% van hierdie populasie in roumelk, 33% in gepasteuriseerde melk, 43% in kaas en 17% in botter uitmaak.

Volgens Henriksen (1973:522) is die taksonomie van Acinetobacter al vir dekades verwarrend. Die organismes besit nie unieke eienskappe waarvolgens hulle van ander organismes onderskei kan word nie. Die belangrikste fenotipiese eienskappe van die organisme kan soos volg saamgevat word: Acinetobacter is 'n Gram-negatiëwe, oksidase-negatiëwe, katalase-positiëwe, onbeweeglike, ongepigmenteerde, verplig aërobe kokkobasil. Hierdie organismes is uit grond, water, verskeie voedselsoorte en kliniese bronne geïsoleer.

Laasgenoemde isolate word geassosieer met patogeniteit. Daar is ook aangevoer dat hierdie organismes 'n rol speel in die fosfaatverwydering tydens die geaktiveerde slykproses (Warskow & Juni, 1972:1014).

Die teenwoordigheid van Acinetobacter in roumelk asook die verwarring in die taksonomiese klassifisering is problematies. Relatief min wetenskaplike kennis is beskikbaar oor die potensiele vermoë van Acinetobacter om melk te bederf. As gevolg van die verwarring wat in die literatuur oor die taksonomie van Acinetobacter bestaan, word die metaboliese aktiwiteite van hierdie genus soms saam met ander genera as 'n groep gerapporteer. So gee Muir et al. (1979:20,21) die proteolitiese en lipolitiese aktiwiteite van Acinetobacter, Moraxella en Brucella as 'n groep weer. Gevolglik is dit belangrik om die voorkoms en praktiese belang van Acinetobacter in roumelk te ondersoek.

Die doelstelling van hierdie studie is om die voorkoms en belangrikheid van Acinetobacter in roumelk te ondersoek. Om hierdie doelstelling te bereik is die volgende doelwitte gestel:

1. isolering van moontlike acinetobacters uit roumelkmonsters;
2. identifisering van die isolate met behulp van fenotipiese eienskappe;

3. bepaling van die potensiële vermoë van Acinetobacter om bederf in melk te veroorsaak en
4. die aanhegtingvermoë van Acinetobacter-kulture

Doelwitte 1 en 2 word in Hoofstuk 2 behandel, doelwit 3 in Hoofstuk 3 en doelwit 4 in Hoofstuk 4.

HOOFSTUK 2. DIE ISOLERING EN IDENTIFISERING VAN ACINETO- BACTER UIT ROUMELK

2.1 Nomenklatuur en klassifisering

Volgens Bergey's Manual bestaan die familie **Neisseriaceae** uit die volgende genera: **Neisseria**, **Kingella**, **Acinetobacter** en **Moraxella** (subgenera **Moraxella** en **Branhamella**) (Bøvre, 1984:289). Al hierdie organismes is nie-beweeglike, Gram-negatiewe bakterieë wat by uitstek onder aërobe toestande groei. In 1986 is 'n nuwe genus **Psychrobacter** geskep (Juni & Heym, 1986:388), terwyl **Mesophilobacter** in 1989 deur Nishimura et al. (1989:378) bygevoeg is. **Acinetobacter** word duidelik van die ander genera onderskei op grond van die organismes se negatiewe oksidase-reaksie. Die organisme word oor die algemeen as vrylewend (saproob) beskou (Bøvre & Hagen, 1981:1507,1511).

Die naam **Acinetobacter** is saamgestel uit die Griekse "akinetos" (onbeweeglik) en "bacter" (staafvormig), d.w.s. letterlik beteken dit "onbeweeglike basil" (Lautrop, 1974:436; Juni, 1984:303). Hierdie genus het tans net een spesie: **Acinetobacter calcoaceticus** (Beijerinck 1911) Baumann, Doudoroff & Stanier 1968, 1538 (Lautrop, 1974:437; Juni, 1984:304). Die genus was vroeër ook onder andere bekend as **Bacterium viscolactis**, **Micrococcus calco-aceticus** en **Micrococcus chinicus** (Lautrop, 1974:437; Juni, 1984:304,306). Skerman et al. (1980:241) het **A. calcoaceticus** sowel as **A.**

lwoffii in die "Approved Lists of Bacterial Names" opgeneem. Die spelling van "lwoffii" word deur Juni (1984:304) as "lwoffii" gegee, gevolglik spel Krieg & Holt (1984:304) "lwoffii" deurgaans op die manier.

Organismes wat aan die genus Acinetobacter behoort, is vroeër in twee groepe ingedeel op grond van hulle vermoë om suur vanaf suikers te vorm (Lautrop, 1974:437). Sinonieme vir organismes wat suur vorm, is: Herellea vaginicola De Bord 1942; Bacterium anitratum Schaub & Hauber 1948; Neisseria winogradskyi Lemoigne, Gerard & Jacobelli 1952; Achromobacter anitratum (Schaub & Hauber) Brisou 1953; Acinetobacter anitratum (Schaub & Hauber) Brisou & Prévot 1954; Moraxella glucolytica Piéchaud, Piéchaud & Second 1956; Micrococcus cerificans Finnerty, Hawtrey & Kallio 1962; Achromobacter conjunctivae Mannheim & Stenzel 1962; Achromobacter haemolyticus var. glucidolytica Mannheim & Stenzel 1962; Lingelsheimia anitrata (Schaub & Hauber) Seeliger, Schubert & Schlieber 1966 (Lautrop, 1974:437; Juni, 1984:304). Sinonieme vir dié groep organismes wat nie suur vorm nie is: Alcaligenes haemolysans Henriksen 1937; Moraxella lwoffii Audureau 1940; Mima polymorpha De Bord 1942; Acinetobacter lwoffii (Audureau) Brisou & Prévot 1954; Achromobacter citroalcaligenes Mannheim & Stenzel 1962; A. haemolyticus; B5W; Vibrio (Lautrop, 1974:437).

2.2 Die totstandkoming van die genus

Henriksen (1973:522) toon aan dat verwysings in die literatuur na Moraxella, Acinetobacter en die tribus Mimeae verwarrend is. Dieselfde organisme word dikwels verskillend benaam, terwyl aan verskillende organismes dieselfde generiese naam toegeken is. Organismes is dikwels ook onvolledig geïdentifiseer. Die nomenklatuur van Acinetobacter kan, soos reeds gemeld, tot groot verwarring lei.

2.2.1 Isolate voor 1950

In 1896 isoleer Morax 'n Gram-negatiewe diplobasil wat hierna ook deur Axenfeld beskryf is (Henriksen, 1973:522). Tussen 1899 en 1900 isoleer Petit 'n diplobasil ("diplobacille liquefiant") soortgelyk aan dié van Morax-Axenfeld. Hierdie organisme verskil van eersgenoemde deurdat dit in 'n medium sonder serum kan groei en gelatien vervloei. Sommige outeurs beskou hierdie organisme as 'n ras van die Morax-Axenfeld diplobasil, terwyl ander dit weer as 'n afsonderlike spesie beskryf (Henriksen, 1973:522).

In 1911 benaam Beijerinck 'n organisme uit grond, Micrococcus calco-aceticus, sonder om dit te beskryf. Die benaming "calco-aceticus" is afgelei van die organisme se vermoë om kalsiumasetaat as koolstofbron te gebruik. Hierdie is die eerste gepubliseerde naam vir dié takson. Later is daar na die herondersoek van een van sy isolate vasgestel dat die spesie dieselfde eienskappe besit as

Bacterium anitratum, Moraxella glucidolytica en Neisseria winogradskyi (Baumann et al., 1968:1534; Henriksen, 1973:531). Baumann et al. (1968:1534) toon aan dat die kultuur van Beijerinck ook herbenaam is as Pseudomonas calcoacetica en jare lank so bekend gestaan het in die Nederlandse kultuurversameling.

In 1916 beskryf Scarlett twee nuwe diplobasille. Een hiervan stem met dié van Morax en Petit ooreen, maar kan nie gelatien of serum vervloei nie. Op grond van hierdie eien-skap noem Scarlett die isolaat "bacillus duplex non liquefaciens". Die tweede een word as "diplobacillus Josefi" beskryf omdat dit uit 'n pasiënt met die naam Joseph geïsoleer is. Hierdie organisme was egter Gram-positief, maar is nooit weer geïsoleer nie en daar is geen verwysingskultuur nie (Henriksen, 1973:522-533).

Oliver en Wherry is die volgende outeurs wat in 1921 na die nie-vervloeiingsorganisme van Scarlett verwys. Hulle beskryf dit as Bacillus duplex-nonliquefaciens en vir drie dekades is daar geen verdere inligting oor hierdie spesie nie. In 1923 beskryf Jones en Little 'n diplobasil wat op gewone medium en gehemoliseerde bloedagar kan groei en gelatien sowel as serum kan vervloei (Henriksen, 1973:523).

In 1937 beskryf Henriksen 'n hemolitiese Gram-negatiewe organisme wat hy Alcaligenes haemolysans noem. Die beskry-

wing stem feitlik ooreen met die latere beskrywings van die hemolitiese variant van Acinetobacter calcoaceticus (A. lwoffii, Achromobacter haemolyticus subspesie alcaligenes). Die organismes het egter uit die oorspronklike kultuurversameling verlore geraak. Afgesien daarvan dat die naam A. haemolysans slegs in 'n paar publikasies gebruik is, is dit verder onbekend (Henriksen, 1973:523,531).

In 1939 publiseer De Bord 'n voorlopige verslag oor 'n groep Gram-negatiëwe, Neisseria-agtige bakterieë. Hy stel 'n nuwe genusnaam, Mima, voor omdat dit Neisseria mimeer. Die spesie Mima polymorpha was nie-sakkarolities. Hierdie isolaat is egter onvolledig beskryf (Henriksen, 1973: 523,531). In 1940 beskryf Audureau Moraxella lwoffii wat soortgelyk aan Mima polymorpha is. Dit is die eerste redelik volledige beskrywing van hierdie spesie (Henriksen, 1973:523-524).

In 1942 publiseer De Bord meer inligting oor die groep met sy genera en spesies, Mima polymorpha var. oxidans, Herellea vaginicola en Colloides anoxydana. Laasgenoemde spesie besit egter al die eienskappe van Citrobacter en die naam is dus ongeldig. Herellea vaginicola is verwar met Bacterium anitratum wat nou bekend staan as Acinetobacter calcoaceticus. Audureau het intussen haar beskrywing van Moraxella lwoffii gepubliseer (Henriksen, 1973:531).

Aangesien die derde spesie van **Mimeae** nl. Colloides anoxydana, klaarblyklik tot die **Enterobacteriaceae** behoort, het die tribus **Mimeae** verval en word daarom nie meer gebruik nie (Henriksen, 1973:531).

Na 'n versoek deur Henriksen word lwoffii in plaas van die spesienaam polymorpha aanvaar deur die Regskommissie van die Internasionale Komitee vir Sistematiese Bakteriologie (Henriksen, 1973:523-524). Daar is lank aanvaar dat De Bord se Herellea vaginicola dieselfde organisme as Bacterium anitratum is. Hierdie twee organismes verskil egter merkbaar van mekaar. Die naam H. vaginicola is in 1971 deur dieselfde komitee verwerp (Henriksen, 1973:531). Daar is geen bestaansreg vir die benaming wat deur De Bord beskryf is nie.

Een van die organismes wat aanvanklik deur Beijerinck in 1911 as Micrococcus calco-aceticus benaam is, is weer in 1948 deur Schaub en Hauber ondersoek en hulle stel die naam Bacterium anitratum voor vir die organismes wat tans as "acinetobacters" bekend staan. Die term bacterium is in dié tyd gebruik vir bakterieë wat nie in bestaande genera geklassifiseer kon word nie, terwyl die spesienaam anitratum aantoon dat die organisme nie nitraat reduseer nie. Schaub en Hauber beskryf B. anitratum as 'n kok of kokkobasil, wat nie nitraat reduseer nie en sekere aldoses oksideer. Piéchaud, Piéchaud en Second beskryf hierdie organisme eers as Moraxella lwoffii var. glucidolytica en later as M.

glucidolytica. Hierdie organisme is dieselfde as B. anitratum. Lemoigne, Girard en Jacobelli verwys na hierdie organisme as Neisseria winogradskyi, maar volgens Henriksen (1973:524) is dit nie 'n Neisseria nie, maar 'n sinoniem.

2.2.2 Isolate na 1950

In 1952 bestudeer Henriksen sommige Moraxella-rasse, insluitend Audureau se M. lwoffii-ras. Hy verdeel hulle in twee groepe: oksidase-positief (M. lacunata en M. nonliquefaciens), asook oksidase-negatief waaronder M. lwoffii ressorteer (Henriksen, 1973:528-529).

Brisou stel in 1954 voor dat Bacterium anitratum in die genus Achromobacter geplaas moet word. Brisou en Prévot skep egter in 1957 die nuwe genus Acinetobacter vir die nie-beweeglike spesies van Achromobacter. Acinetobacter anitratus (calcoaceticus) word deur Brisou gekies as tipe-spesie van hierdie genus (Henriksen, 1973:531). Mannheim en Stenzel vind dat die organismes in verskillende groepe verdeel kan word op grond van variasie in hemolitiese en sekere ander fenotipiese eienskappe. In 1963 stel hulle voor dat die organismes in vyf spesies en twee subspesies ingedeel moet word, nl.: Achromobacter mucosus, A. conjunctivae, A. haemolyticus (subspesies haemolyticus en alcaligenes), A. metalcaligenes en A. citroalcaligenes (Henriksen, 1973:524).

Die onoordeelkundige gebruik en kombinering van bogenoemde generiese en spesiename het deur die jare groot verwarring veroorsaak. Benewens die verkeerde gebruik van hierdie name in verskillende lande het wetenskaplikes, selfs in dieselfde land, verskillende name aan dieselfde organisme toegeken (Henriksen, 1973:524). Daar word voortdurend nuwe voorstelle gemaak ten opsigte van die taksonomie van Acinetobacter. Bouvet & Grimont (1986:228,229) skep die volgende spesies, nl. A. baumannii, A. haemolyticus, A. junii en A. johnsonii. Rossau et al. (1991:310) stel 'n nuwe familie, Moraxellaceae met die genera Moraxella, Psychrobacter en Acinetobacter voor.

2.3 Eienskappe van die genus Acinetobacter

Acinetobacter besit nie unieke eienskappe wat dit van ander genera onderskei nie en daarom word hierdie organismes tans geïdentifiseer op grond van negatiewe eienskappe (Juni, 1984:305). Hulle is onbeweeglik, oksidase-negatief, nie-spoorvormend, nie-fermentatief, bevat nie intrasellulêre poli- β -hidroksibottersuur nie, produseer nie indool en H_2S nie en is Gram-negatief met selle wat soms moeilik ontkleur. Alhoewel die selle onbeweeglik is, mag draaibewegings as gevolg van polêre fimbrië voorkom (Lautrop, 1974:436; Juni, 1984:303-304). Bøvre (1984:288) toon aan dat die Neisseriaceae nie net onbeweeglik is nie, maar ook geen

flagellums besit nie, wat ook kenmerkend van Acinetobacter is.

Die kolonies van Acinetobacter is ongepigmenteerd, gewoonlik glad, soms uiters slymerig en heg aan die substraat. Wanneer die selle mukoïed is, kom kapsels voor (Lautrop, 1974:437; Juni, 1984:303). Acinetobacter is pleomorf (Juni, 1984:305) en aktief groeiende selle is gewoonlik dikkerige basille, terwyl selle in die stasionêre fase meer sferies is. Selle kom tipies in pare en kettings voor, terwyl groot, onreëlmatige selle, asook filamente, in kulture kan voorkom (Henriksen, 1973:527-529,542; Lautrop, 1974:436; Juni 1984:303).

Die samestelling van die selwand is soortgelyk aan dié van Gram-negatiewe bakterieë met peptidoglikaan wat muraamsuur, glukosamien, alanien, D-glutamiensuur en *m*-diaminopimeliensuur bevat (Juni, 1984:304). Die buitenste liposakkariedlae is tipies aan dié van Gram-negatiewe bakterieë.

Die genus Acinetobacter is chemoörganotroof met 'n respiratiewe metabolisme. Geen spesifieke groeifaktore word benodig nie en 'n wye verskeidenheid organiese verbindings kan as koolstof- en energiebron gebruik word (Lautrop, 1974:436). Die meeste Acinetobacter-rasse kan goed groei in 'n eenvoudige mineraalmedium met 'n enkele koolstof- en

energiebron soos etanol, asetaat, laktaat, piruvaat, malaat of α -ketoglutaraat. Relatief min rasse kan glukose as koolstofbron vir selgroei gebruik. Een so 'n stam kataboliseer dit via die Entner-Doudoroff-weg. Alhoewel Acinetobacter nie glukose kan verbruik nie, besit 'n aantal rasse 'n aldosedehidrogenase waardeur suur gevorm kan word in 'n glukose-medium asook media wat ander suikers soos D-xilose, L-arabinose, D-galaktose, D-mannose, L-ramnose, maltose en sellobiose bevat (Juni, 1984:304). Ammonium-, nitraat- en nitrietsoute kan as stikstofbron dien. Hierdie organismes besit 'n assimilatoriese nitraat-reduktase, dog hulle kan nie nitrate reduseer (denitrifiseer) of van nitraat-respirasie gebruik maak nie (Juni, 1984:304).

In teenstelling met die meeste Moraxella spesies is Acinetobacter weerstandbiedend teen penisillien. Geen Acinetobacter-isolate word deur 1 IE.ml^{-1} penisillien geïnhibeer nie en hulle is selfs weerstandbiedend teen 100 IE.ml^{-1} . Acinetobacter-kulture wat uit kliniese bronne in hospitale geïsoleer is, is sensitief vir kanamisien, tobramisien, karbenisillien, trimetoprim-sulfametoksool, minosiklien en doksisiklien (Juni, 1984:304).

Acinetobacter besit nie sitochroom c nie en is, soos reeds genoem, oksidase-negatief. Hulle besit wel sitochroom a en b. Verder besit hulle al die ensieme van die trikarboksiel-

suursiklus asook dié van die glioksalaatsiklus. Baie rasse produseer 'n ekstrasellulêre lipase wat aangetoon kan word deur die hidrolise van Tween-80 en ander lipiede. Stysel word nie vervloei nie, poli- β -hidroksibutiraat word nie gehidroliseer nie, terwyl gelatien deur enkele rasse gehidroliseer kan word. Sommige rasse produseer urease (Lautrop, 1974:436). Volgens Lautrop (1974:436) hemoliseer 10 tot 20% van die rasse bloed en Juni (1984:304) vind dat fosfolipases deur hierdie rasse geproduseer word.

Hierdie organisme is verplig aëroob met 'n streng respiratoriese metabolisme met suurstof as terminale elektronontvanger. Alle fakultatiewe anaërobe organismes word daarom by Acinetobacter uitgesluit. Al die fenotipiese variante van Acinetobacter groei tussen 20°C en 35°C met 'n optimum groeitemperatuur van tussen 33°C en 35°C (Juni, 1984:304). Alhoewel die genus mesofiel is, kan sommige groepe by 0°C groei (Henriksen, 1973:522). Die optimum pH is ongeveer 7,0 (Lautrop, 1974:437).

2.4 Die voorkoms en ekologie van Acinetobacter

Acinetobacter kom voor in water en grond. Baumann (1968:39) het bereken dat Acinetobacter ten minste 0,001% van die totale heterotrofe aërobe populasie in water en grond uitmaak. Alhoewel hierdie organismes gewoonlik nie-patogeen is, word hulle beskou as die oorsaak van baie hospitaal-infeksies. Infeksies wat veral geassosieer word met

Acinetobacter is onder andere: septisemie, breinvliesontsteking, endokarditis, breinabsesse, longabsesse en urienweginfeksies, asook ander kliniese verskynsels (Buxton *et al.*, 1978:507; French *et al.*, 1980:125.) Alhoewel daar geen bewyse is dat die organisme op hospitaalinstrumente koloniseer nie, blyk daar egter 'n noue assosiasie tussen hospitaalinstrumentasie en die infeksie te wees. Acinetobacter is van verskillende dele van die menslike liggaam geïsoleer, maar dit is nie duidelik of hulle kontaminante of kommensaliste is nie (Buxton *et al.*, 1978:507; Juni, 1984:304). Acinetobacter is ook uit geaktiveerde slyk geïsoleer (Warskow & Juni, 1972:1014).

Alhoewel Acinetobacter al uit kokosneute geïsoleer is, word bykans geen organismes daarin waargeneem wanneer die binneste gedeelte asepties verwyder word nie (Jay, 1978:96). Die organisme word gereeld geïsoleer uit vars vleis en is ook bekend om in verwerkte vleis voor te kom. Dit blyk dat Pseudomonas en die Acinetobacter-Moraxella-groep verantwoordelik is vir die grootste persentasie bederf van vleis (Jay, 1978:123-124,129,132,133; Hayes, 1985:90; Gennari *et al.*, 1992:61).

Volgens Hayes (1985:6) is hierdie organisme van belang in die bederf van veral witvleis (pluimvee) en skulpvis (Jay 1978:138-140). Acinetobacter kom in vars vis voor (Jay, 1978:138-140; Hayes, 1985:100). Hayes (1985:100) het waar-

geneem dat die ys waarin die vis aan boord van skepe vervoer word, veral met Pseudomonas en Acinetobacter gekontamineer is wat moontlik hoër bakterietellings tot gevolg kan hê.

Acinetobacter maak deel uit van die normale Gram-negatiewe bakteriepopulasie in melk (Cousin, 1982:176) en is herhaaldelik uit roumelk (Thomas & Thomas, 1978:5; Law & Mabbitt, 1983:135; Hayes, 1985:106; Fischer et al., 1987:73; Bramley & McKinnon, 1990:166,168,216) en suiwelprodukte geïsoleer (Jay, 1978:152; Law, 1979:578). Hoewel dié organisme nie vinnig in melk kan vermenigvuldig nie (Thomas & Thomas, 1978:5), het Fischer et al. (1987:76) daarop gewys dat Pseudomonas in die wintermaande en Acinetobacter in die somermaande die oorheersende genera van die psigrotrofe populasie in roumelk is. Swart (1988:70) kon egter geen Acinetobacter uit Pretoriase roumelk isoleer nie.

2.5 Isolering van Acinetobacter

Baumann (1968:39) maak met sukses gebruik gemaak van 'n minerale medium met 'n lae pH en goeie belugting om Acinetobacter vanuit water en grond te isoleer. Warskow & Juni (1972:1014) het waargeneem dat isolate vanuit water, grond en geaktiveerde slyk goed op 'n minerale medium met asetaat as koolstofbron groei. Ghren & Von Graevenitz

(1978:342) gebruik endo-agar, MacConkey-agar en deoksi-cholaat-agar vir die isolering van Acinetobacter. Hulle ondersoek ook 'n minerale medium, maar wys daarop dat daar nie 'n spesifieke selektiewe medium vir Acinetobacter bestaan nie. In 1983 stel Holton 'n selektiewe medium voor, wat 'n modifikasie van Mandel se medium is, vir die isolasie van hierdie organisme uit kliniese bronne. Isolate vanuit water is ook op triptoon-soja-agar gemaak (Pagel & Seyfried, 1976:221). Die afleiding kan gemaak word dat die mees suksesvolle isolasiemedium vir Acinetobacter 'n chemies gedefinieerde medium is.

2.6 Identifisering van Acinetobacter

Vir die identifisering van isolate tot op genusvlak word primêre sowel as sekondêre fenotipiese toetse aangewend. Die meeste van hierdie toetse stem ooreen met die minimum vereistes vir die identifisering van die genus Acinetobacter soos daargestel deur Bøvre & Henriksen (1976:92-96).

2.6.1 Primêre fenotipiese toetse

Die Gram-kleuringsreaksie verdeel bakterieë in twee hoofkategorieë, nl. Gram-positief en Gram-negatief. Hierdie is die eerste onderskeidingstoets. Die setel vir hierdie reaksie is in die selwand geleë. (Lamanna & Mallette, 1965:161-176; Salle, 1973a:61-65; Cruickshank et al., 1975:34).

Pigmentproduksie kan op verskeie media waargeneem word (Salle 1973b:78; Gerhardt et al., 1981:418). Aangesien Acinetobacter ongepigmenteerd is, is dit 'n belangrike toets.

Alle differensiële kleurings is drasties sodat die selvorm soms beïnvloed word en daarom is dit dikwels moeilik om tussen 'n Gram-negatiewe kok en 'n kokkobasil te onderskei. Waar daar getwyfel word aan die ware selvorm word negatiewe kleuring toegepas. Indiese ink of nigrosien word gebruik omdat dit nie met die sel reageer nie, maar slegs die agtergrond kleur (Harrigan & McCance, 1966:13; Cruickshank et al., 1975:33-34). Soos in die geval van alle ware Gram-negatiewe organismes is Acinetobacter nie 'n endosporovormer nie. Drie metodes kan gebruik word vir endosporokleuring, nl. dié van Dörner, Shaeffer & Fulton en Bartholomeus & Mittwer (Harrigan & McCance, 1966:13; Salle, 1973a:25,27; Cruickshank et al., 1975: 41-42; Gerhardt et al., 1981:23).

Om die familie **Neisseriaceae** korrek te identifiseer, is die bepaling van beweeglikheid en die teenwoordigheid van flagellums deurslaggewend. Standaardmetodes wat gebruik word, is die hangdruppelkultuur, beweeglikheidsagar en flagellumkleuring (Cruickshank et al., 1975:19-20,44-45, 112,172,187; Gerhardt et al., 1981:25-26,29-30,148-149,414-415,418-419). Acinetobacter besit nie flagellums nie. Met behulp van moderne tegnologie, soos die transmissie-

elektronmikroskoop (TEM), kan die teenwoordigheid van flagellums maklik waargeneem word nadat negatiewe kleuring toegepas is (Brand et al., 1987:2).

Die meeste bakterieë produseer waterstofperoksied wanneer hulle in die teenwoordigheid van vry suurstof groei. Aangesien dit toksies is vir lewende selle besit die meeste aërobe organismes die katalase-ensiem om dit te vernietig (Lamanna & Mallette, 1965:402; Harrigan & McCance, 1966:65; Kersters & DeLey, 1971:36; Salle, 1973a:402).

In die geval van Gram-negatiewe organismes word die oksidase-toets gebruik om die verplig aërobe bakterieë van die fakultatief anaërobe organismes te onderskei (Holding & Collee, 1971:24,25,35,36; Salle, 1973a:404-406; Cruickshank et al., 1975:180; Pelczar et al., 1986:178-179; Brock & Madigan, 1988:130-131). Die toets is van kardinale belang om Acinetobacter van die ander genera in die familie Neisseriaceae te onderskei (Bøvre, 1984:289).

Die respirasie-fermentasie-(RF-) toets wat gebruik word, word algemeen in die literatuur beskryf as die oksidasie-fermentasie-(OF-) toets (Hugh & Leifson, 1953:24). Hiermee word onderskei tussen die aërobe en anaërobe afbraak van 'n koolhidraat. Dit is een van die belangrikste toetse om fermenterende bakterieë soos Enterobacteriaceae, Aeromonas en Vibrio, van respirerende (verplig aërobe) bakterieë soos

Pseudomonas, Flavobacterium en lede van Neisseriaceae te onderskei (Hugh & Leifson, 1953:24; Holding & Collee, 1971:7; Cruickshank *et al.*, 1975:171). As alternatief kan die organismes wat nie in staat is om glukose te respireer of te fermenteer nie onder anaërobe toestande gekweek word, soos bv. in 'n anaërobe fles (Cruickshank *et al.*, 1975:157).

2.6.2 Sekondêre fenotipiese toetse

Die urease-toets is gebaseer op die vermoë van die organismes om ureum te hidroliseer (Harrigan & McCance, 1966:56; Holding & Collee, 1971:15-16; Cruickshank *et al.*, 1975:181).

Bakterieë wat stysel hidroliseer kan nie-diffundeerbare stysel omsit in diffundeerbare stowwe wat dan deur die sel opgeneem word vir verdere metabolisme (Cowan & Steel, 1965:163; Harrigan & McCance, 1966:58; Skerman, 1967:255; Holding & Collee, 1971:21; Salle, 1973a:390).

Proteolitiese organismes breek proteïene af. Sommiges is in staat om gelatinase te produseer (Holding & Collee, 1971:19-20; Salle, 1973a:464; Salle, 1973b:66-68). Kaseïen word deur verskillende organismes gehidroliseer (Harrigan & McCance, 1966:52,291; Salle, 1973b:68-69,169; Cruickshank *et al.*, 1975:178).

Sommige bakterieë kan lipiede hidroliseer en die ensieme hierby betrokke staan bekend as lipases. Sekere organismes hidroliseer eenvoudige gliseriede (Tween, tributirien), terwyl ander komplekse gliseriede (bottervet) hidroliseer. Indien 'n organisme eenvoudige gliseriede hidroliseer, is dit nie noodwendig in staat om ook komplekse gliseriede te hidroliseer nie. Die omgekeerde is ook waar. Hierdie reaksie word normaalweg aanvaar as die eerste stap in die ontwikkeling van galsterigheid. (Salle, 1973b:69).

Organismes kan sekere aminosure afbreek en benut as energiebron. In die geval van die indooltoets word die vermoë van bakterieë om triptofaan na indool af te breek, bepaal (Harrigan & McCance, 1966:53; Holding & Collee, 1971:14-15; Cruickshank *et al.*, 1975:179).

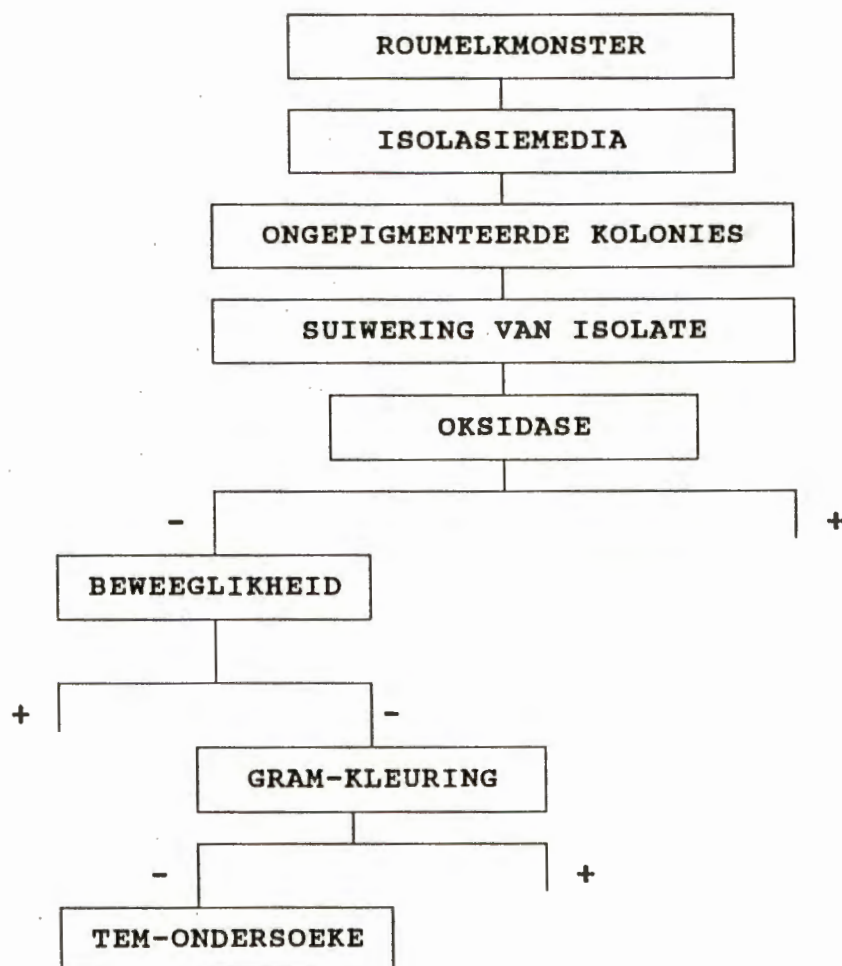
Sommige aërobe organismes kan nitraat as elektronontvanger gebruik wanneer hulle onder anaërobe toestande groei (nitraatrespirasie). Ander organismes weer gebruik nitraat as stikstofbron. Nitraat word in albei gevalle na nitriet gereduseer, wat weer verder gereduseer kan word (Harrigan & McCance, 1966:56; Salle, 1973a:428-430; Brock & Madigan, 1988:573-576).

Daar kan bepaal word of 'n bakterie eskulien na eskuletien en glukose kan hidroliseer (Harrigan & McCance, 1966:267; Holding & Collee, 1971:11).

Sommige organismes is in staat om sitraat as enigste koolstof- en energiebron te verbruik in 'n medium wat 'n ammoniumsout as enigste bron van stikstof bevat (Salle, 1973b:703; Cruickshank et al., 1975:176-177).

2.7 Eksperimentele metodes

'n Diagrammatiese voorstelling vir die aanvanklike isolering en selektering van organismes, word in Figuur 2.1 gegee.



Figuur 2.1 Diagram vir die isolering en selektering van organismes vir verdere ondersoek

2.7.1 Melkmonsters

Twintig roumelkmonsters vanaf 16 roetes uit die Vrystaat, PWV-gebied en Potchefstroom is by fabrieke asepties vanuit melktenkers in steriele monsterbottels geneem, onder verkoelde toestande (4°C) vervoer en binne 24 tot 30 uur ontleed.

2.7.2 Inkubasietemperatuur

Tensy anders vermeld, is al die inkubasies by 30°C gedoen.

2.7.3 Instandhouding van suiwer kulture

Suiwer isolate is op voedingsagarplate gekweek. Aktief groeiende selle is in 'n 10% afgeroomde melk : 70% laktose medium gesuspendeer. Die gesuspendeerde selle is volgens Joubert & Britz (1987:74) op steriele filtreerpapierskyfies gevriesdroog. Na vriesdroging is die kulture by -40°C bewaar.

2.7.4 Isolering van die organismes

Soos reeds genoem is geen selektiewe medium beskikbaar vir die isolering van Acinetobacter nie, maar 'n chemies gedefinieerde medium is wel geskik as isolasiemedium van Acinetobacter (2.5).

Die volgende isolasiemedia is gebruik:

- (i) Plaattellingsagar (Biolab).
- (ii) Kristalvioletagar (KV) met 'n finale konsentrasie van 0,001% (m/v) is gebruik as 'n selektiewe medium vir Gram-negatiewe organismes (Law et al., 1979:498).
- (iii) Holton se medium (MMHN) is gebruik as isolasiemedium vir die genus Acinetobacter (Holton, 1983:141). In hierdie ondersoek is die fruktose, sukrose en manose deur 5 g natriumasetaat per liter vervang terwyl die antibiotika weggelaat is.
- (iv) Aangepaste medium van Holton (MMHNP). 1 µg penisilien is by Holton se medium gevoeg om dit meer selektief vir Acinetobacter te maak (Lautrop, 1974:436).
- (v) Aangepaste MacConkey-agar (MMP). Die medium van Schutte (1986:25) is gebruik vir die isolering van Acinetobacter. In hierdie studie is laktose vervang met 5 g natriumasetaat per liter medium en 1 µg penisillien per ml medium is bygevoeg (Juni, 1984:304).

2.7.5 Sifting vir Acinetobacter

'n Tienvoudige verdunningsreeks is in fisiologiese soutoplossing vir elke melkmonster gemaak en deur middel van die spreiplaat-metode op die verskillende media gesprei. Al die spreiplate is twee dae by 30°C geïnkubeer, behalwe MMP wat 5-7

dae geïnkubeer is. Hierdie inkubasietydperke is deur 'n voorafgaande proeflopie bepaal.

Al die kolonies van telbare verdunnings op die isolasiemedia is afgetel en met behulp van die templaetmetode op voedingsagar uitgestreep om te bepaal of hulle gepigmenteerd is. Die volgende toetse is op al die ongepigmenteerde isolate uitgevoer:

- (i) oksidase (Salle, 1973a:404-406; Cruickshank et al., 1975:180,181),
- (ii) beweeglikheid deur middel van die hangdruppeltegniek (Bøvre & Henriksen, 1976:93),
- (iii) Gram-reaksie (Lamanna & Mallette, 1965:161-176; Salle, 1973a:61-65) en
- (iv) die voorkoms van flagellums met behulp van transmissie-elektronmikroskoop- (TEM-) ondersoeke van al die onbeweeglike isolate.

2.7.6 TEM-ondersoeke

'n Suspensie vanaf 'n oornagkultuur van elke bakterie is op 'n voorwerpglasie berei. Die roostertjies wat met Formvar bedek is, is met behulp van 'n krombektangetjie in die suspensie gedoop waarna dit dadelik op filtreerpapier gedroog is. Na kleuring met 1% (m/v) kaliumfosfowolframsuur is die roostertjies weer op filtreerpapier geklad om oorkleuring te voorkom. Na die TEM-ondersoeke is al die isolate wat nie flagellums besit nie op die oorspronklike isolasiemedia

gesuiwer. Die gesuiwerde isolate is fenotipies verder gekarakteriseer.

2.7.7 Fenotipiese toetse

'n Diagrammatiese voorstelling van die fenotipiese toetse wat gebruik is vir die identifisering van die isolate word in Figuur 2.2 gegee.

2.7.7.1 Primêre fenotipiese toetse

- (i) Die oksidase-toets is uitgevoer soos beskryf deur Holding & Collee (1971:241), Salle (1973a:404-406) en Cruickshank et al. (1975:180,181).
- (ii) Die katalase-toets is uitgevoer soos beskryf deur Harrigan & McCance (1966:65).
- (iii) Respirasie-fermentasie-toets (RF)
Die OF-toets van Hugh & Leifson (1953:24) is vervang met die enkelbuistegniek van Bruce et al. (1983:143). Die medium is verder gewysig deur die basaalmedium met dié van Hutner (Bøvre & Henriksen, 1976:93) te vervang. By hierdie medium is fenol-rooi tot 'n finale konsentrasie van 0,002% (m/v) as pH-indikator gevoeg. Ammoniumchloried is gebruik in plaas van ammoniumsulfaat en die finale pH van die medium is op 7,4 ingestel.

Vyf milliliter steriele medium is in 'n steriele proefbuis gepipetteer. Die proefbuis is afgekoel en na stolling van die medium is 2 ml steriele Vaspar op die gestolde agar geplaas. Nadat die Vaspar gestol het, is weer 5 ml van die medium bo-op gepipetteer. Die prosedure is asepties in 'n laminêre vloekabinet uitgevoer. Om Vaspar te berei, is gesmelte paraffienwas by gesmelte geel petroleumjellie in die verhouding 1:4 gevoeg (Bruce et al., 1983:143). Die resultate van fermentatiewe en respiratiewe reaksies is soos volg genoteer: suur (S/s); alkalies (A/a); gasproduksie (G/g) of negatief(-). Hierdie notering is gemaak op grond van die mate van suur-, alkali- en gasvorming in vergelyking met 'n negatiewe kontrole.

(iv) Anaërobe groei

Die isolate is in 'n anaërobe fles gekweek (Cruickshank et al., 1975:157). Die lug in die fles is deur 'n gasmengsel bestaande uit 10% CO₂, 18% H₂ en 72% N₂ verplaas. Saam met elke stel isolate is 'n fakultatief anaërobe organisme (Escherichia coli) as positiewe kontrole en 'n aërobe organisme (Pseudomonas aeruginosa) as negatiewe kontrole gekweek. Alle resultate is met dié van die RF-enkelbuistegniek gekontroleer.

(v) Negatiewe kleuring

Hierdie kleuring is van kardinale belang in hierdie ondersoek omdat Acinetobacter pleomorf is. Nigrosien is gebruik (Cowan & Steel, 1965:25; Cruickshank et al., 1975:33,34).

(vi) Endospoorkleuring

Schaeffer & Fulton se metode is gebruik waar malagietgroen in die endospoor ingekook word en die vegetatiewe sel daarna met safranien gekleur word (Harrigan & McCance, 1966:13).

(vii) Pigmentproduksie

Die toets is op voedingsagar met 'n finale glukosekonsentrasie van 0,5% (m/v) uitgevoer. Verder is alle vars en ou kulture op voedingsagar gekontroleer vir pigmentproduksie.

2.7.7.2 Sekondêre fenotipiese toetse

Die volgende sekondêre toetse is uitgevoer:

- (i) Urease-toets (Harrigan & McCance, 1966:56).
- (ii) Hidrolise van stysel (Harrigan & McCance, 1966:58).
- (iii) Hidrolise van gelatien (Salle, 1973a:464; Salle, 1973b:67,68,197).
- (iv) Hidrolise van Tween-80 (Harrigan & McCance, 1966:64,309).
- (v) Hidrolise van eskulien (Holding & Collee, 1971:11; Harrigan & McCance, 1966:276).

- (vi) Hidrolise van tributirien (Harrigan & McCance, 1966: 63,308).
- (vii) Indoolproduksie (Cowan & Steel, 1965:30; Cruickshank et al., 1975:179).
- (viii) Sitraatverbruik (Koser se sitraatmedium; Cruickshank et al., 1975:176).
- (ix) Denitrifisering en nitraatreduksie (Stanier et al., 1966:171)
- (x) Oksidasie van suikers
 'n Vloeistofmedium met 'n Durham-buisie en fenolrooi as pH-indikator is hiervoor gebruik (Cruickshank et al., 1975:172,173). Die volgende suikers is ingesluit: mannose, sukrose, mannitol, fruktose, galaktose, arabinose, ramnose, xilose, maltose, laktose en glukose.
- (xi) API 20 NE-sisteem
 Nadat die fenotipiese toetse uitgevoer is vir die klassieke (konvensionele) identifisering van die isolate, is geselekteerde kulture aan die API 20 NE-sisteem onderwerp.

2.8 Resultate en bespreking

In hierdie ondersoek is daar van 14 kulture uit die versameling van Prof. T.J. Britz (Departement Mikrobiologie en Biochemie, UOVS) en vier verwysingskulture uit die "National Collection of Industrial Bacteria" (NCIB) gebruik gemaak. Al hierdie kulture is aan dieselfde fenotipiese toetse en eksperimentele metodes onderwerp as die isolate vanuit roumelk. Die nommers van die UOVS- en verwysingskulture verskyn in Tabel 2.1.

TABEL 2.1: UOVS- en verwysingskulture

Kultuurnr.	Bron	Kultuurnr.	Bron
Ø5	UOVS	M27	UOVS
Ø5b	UOVS	M29	UOVS
R16	UOVS	P24*	UOVS
M3	UOVS	P25**	UOVS
M4	UOVS	P27***	UOVS
M9	UOVS	494****	NCIB 1954/8596
M18	UOVS	709****	NCIB 1955/8208
M21	UOVS	710a****	NCIB 1955/8209
M26	UOVS	792****	NCIB 1957/8552

- * P24 is verander na P(k)24
- ** P25 is verander na P(k)25
- *** P27 is verander na P(k)27
- **** Acinetobacter calcoaceticus

2.8.1 Isolering van organismes (2.7.4)

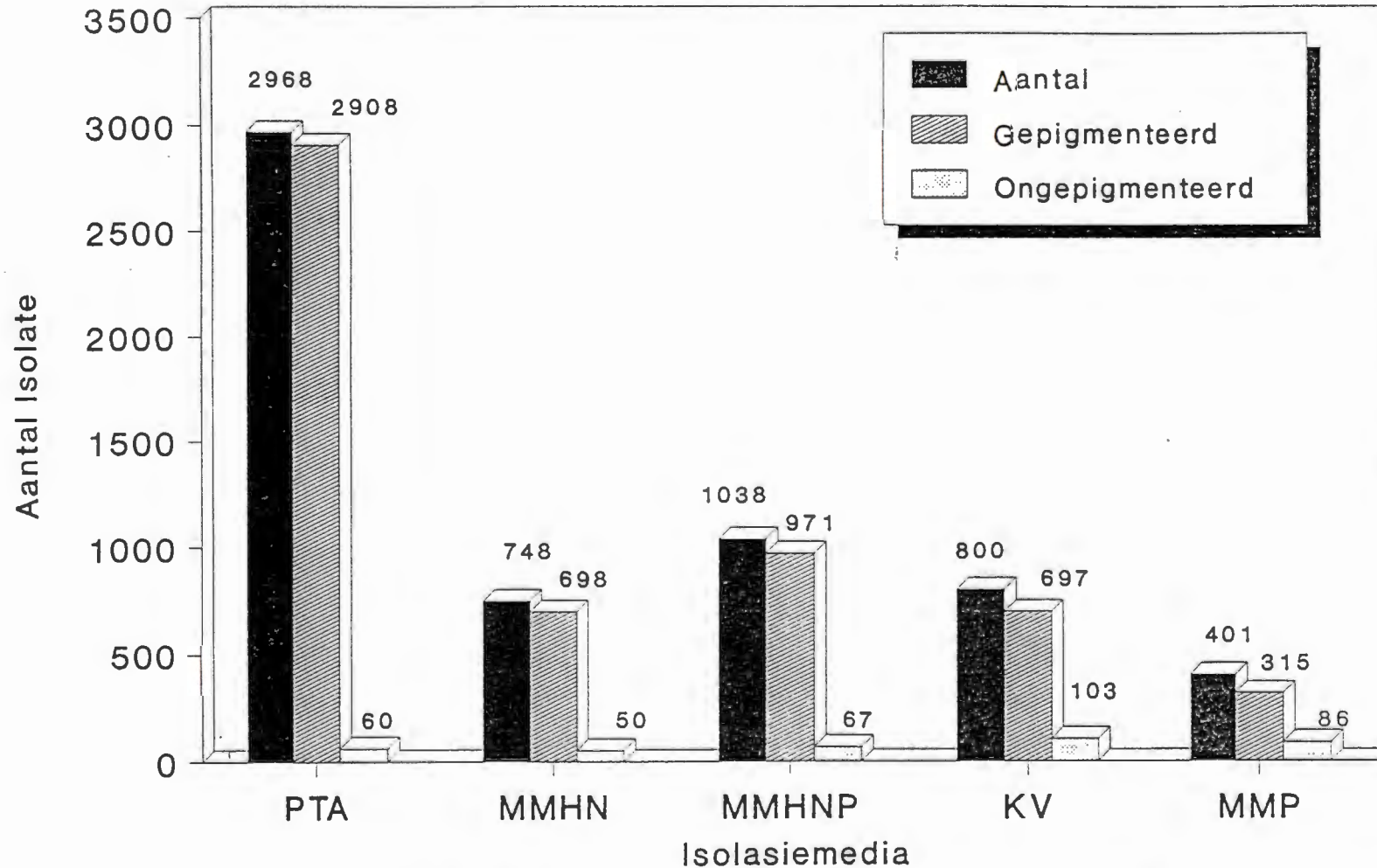
Twintig roumelkmonsters is ondersoek en altesaam 5955 kolonies is vanaf al die telbare verdunningsplate geïsoleer (Tabel 2.2). Hierdie kolonies verteenwoordig al die kolonies vanaf telbare spreiplate van die onderskeie isolasiemedie. Geen

statistiese metode is vir die aftel van die kolonies gebruik nie, aangesien die trefwaarskynlikheid daardeur verlaag word.

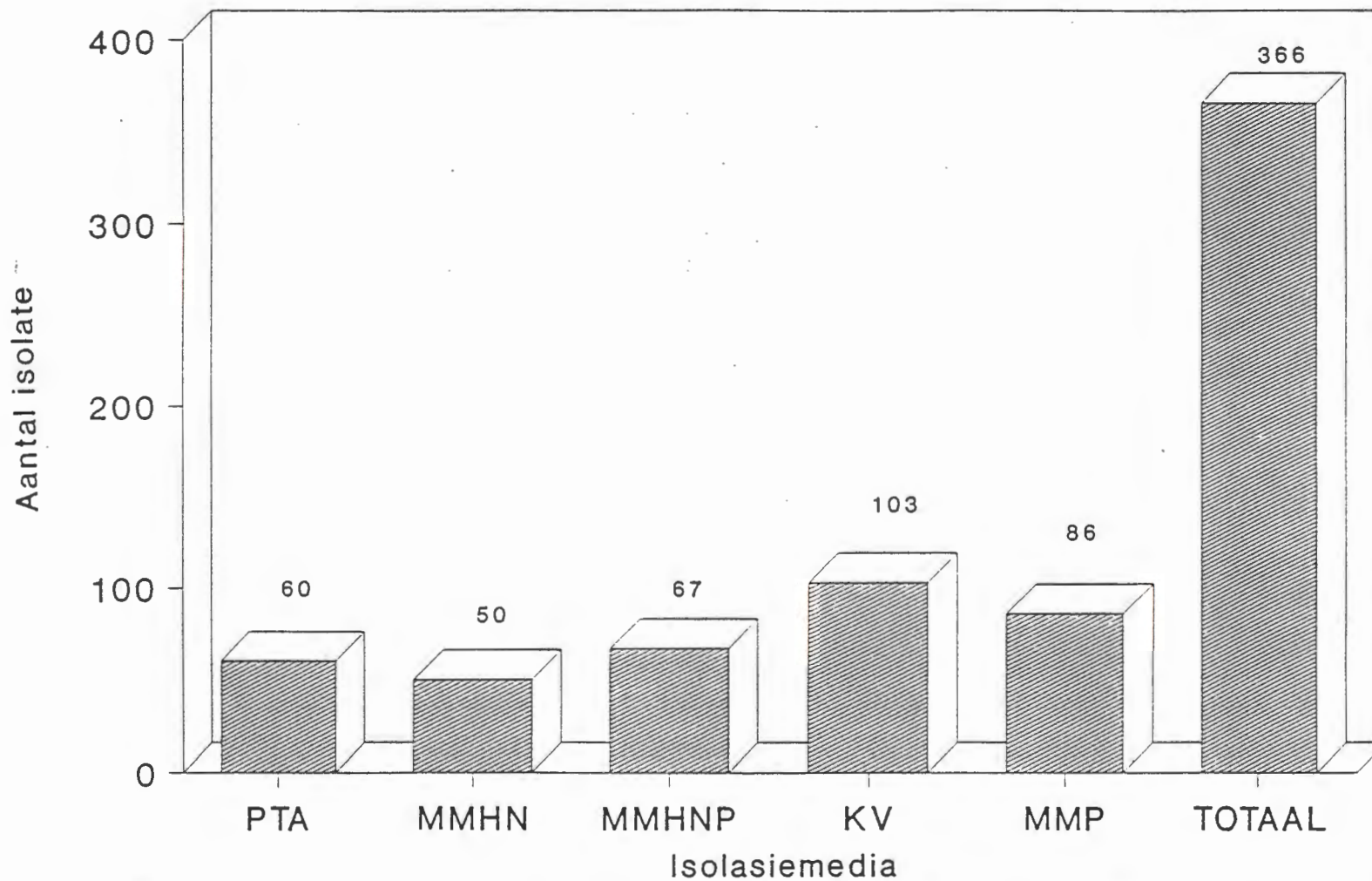
Lede van die genus Acinetobacter is ongepigmenteerd (2.3, 2.7.5, 2.7.7.1 (vii)). Die kolonies neem die kleur van die isolasiemedie aan; gevolglik moes pigmentproduksie eers bepaal word voor enige verdere ondersoek kon plaasvind. Die kolonies vanaf die onderskeie isolasiemedie is met behulp van die templaattmetode (Clowes & Hayes, 1968:21,229) na voedingsagar oorgedra om te bepaal of hulle ongepigmenteerd is. Slegs 6,2% (366 kolonies) van die oorspronklike isolate was ongepigmenteerd (Tabel 2.2). In Figuur 2.3 word 'n grafiese voorstelling gegee van die totale aantal kolonies, die gepigmenteerde kolonies en die ongepigmenteerde kolonies wat vanaf die onderskeie isolasiemedie afgetel is. Die grafiese voorstelling van die aantal ongepigmenteerde kolonies wat vanaf die onderskeie isolasiemedie geïsoleer is, word in Figuur 2.4 gegee.

TABEL 2.2: Totale aantal kolonies vanaf die onderskeie isolasiemedie

Isolasie-medium	Aantal kolonies	Ongepigmenteerde kolonies	
		Aantal	Persentasie
PTA	2 968	60	2,0
MMHN	748	50	6,7
MMHNP	1 038	67	6,5
KV	800	103	12,9
MMP	401	86	21,5
TOTAAL	5 955	366	6,2



FIGUUR 2.3 Aantal bakteriekolonies wat vanaf die onderskeie isolasiemedia geïsoleer is.



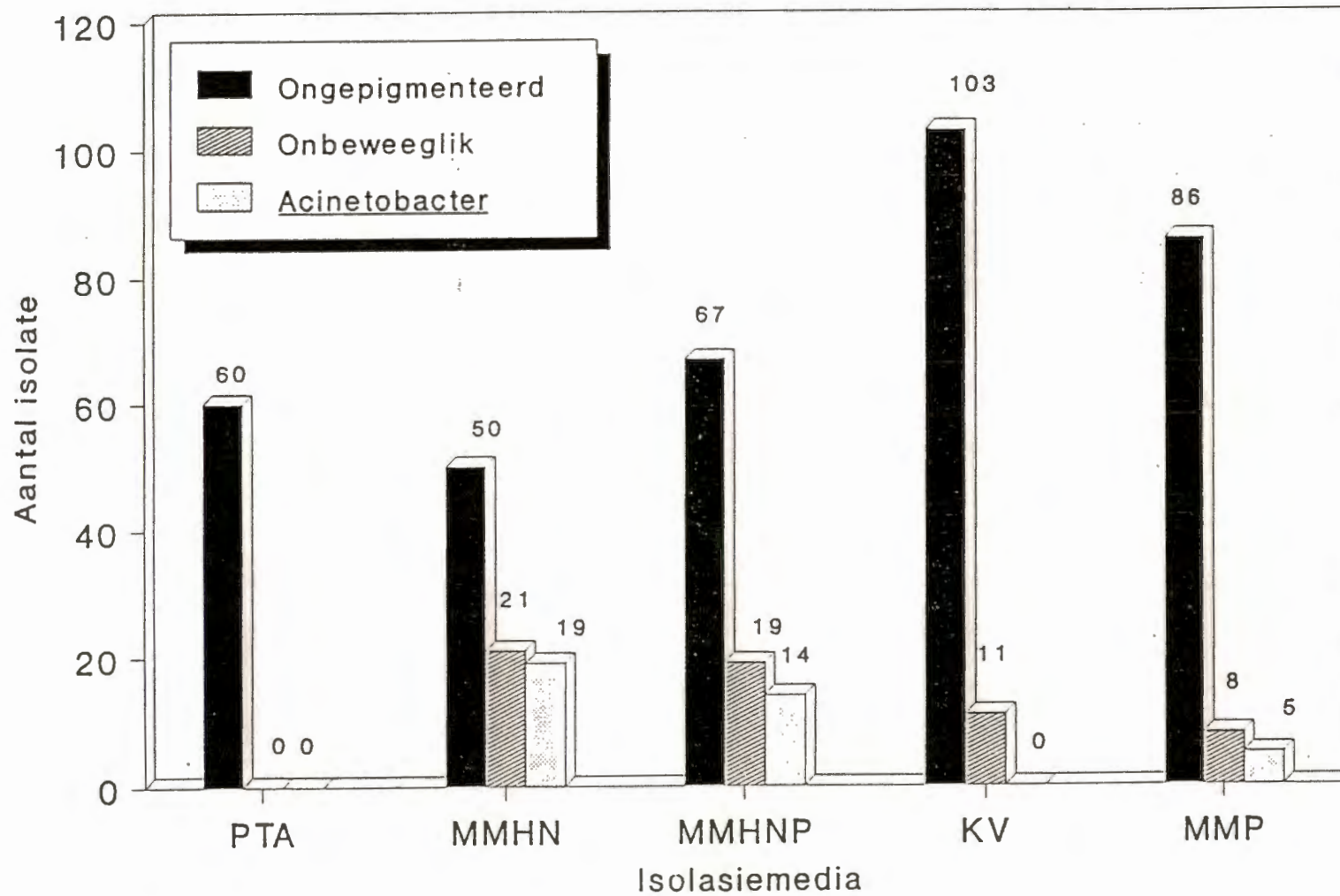
FIGUUR 2.4 Aantal ongepigmenteerde bakteriekolonies wat vanaf die onderskeie isolasiemedia geïsoleer is.

2.8.2 Siftingstoetse (2.7.5)

Altesaam 366 ongepigmenteerde kolonies (2.7.5, 2.7.7.1 (vii)) is vanaf die onderskeie isolasiemedia (2.7.4) gesuiwer. Die kolonies is hierna op voedingsagar oorgedra, waarna die oksidase-toets (2.7.5 (i), 2.7.7.1 (i)) met behulp van 1% (m/v) tetrametiel-*p*-fenileendiamien-dihidrochloried uitgevoer is. Al die oksidase-negatiewe isolate is hierna mikroskopies met behulp van die hangdruppelkultuur vir beweeglikheid ondersoek (2.6.1, 2.7.5(ii)). Die Gram-reaksies van al die onbeweeglike isolate is hierna bepaal (2.6.1, 2.7.5(iii)) en 148 Gram-negatiewe isolate is deur middel van die TEM ondersoek vir die teenwoordigheid van flagellums (2.7.5 (iv), 2.7.6). Slegs 59 isolate het geen flagellums besit nie (Tabel 2.3). Die grootste persentasie onbeweeglike isolate is vanaf MMHN en MMHNP geïsoleer, nl. 42% en 28,4% onderskeidelik. In Figuur 2.5 is 'n grafiese voorstelling van die totale aantal ongepigmenteerde isolate, die aantal ongepigmenteerde onbeweeglike isolate en die aantal Acinetobacter-isolate wat vanaf die onderskeie isolasiemedia geïsoleer is.

TABEL 2.3: Aantal onbeweeglike isolate

Isolasie-medium	Ongepigmenteerde kolonies	Onbeweeglike isolate	
		Aantal isolate	Persentasie
PTA	60	0	0,0
MMHN	50	21	42,0
MMHNP	67	19	28,4
KV	103	11	10,7
MMP	86	8	9,3
TOTAAL	366	59	16,1

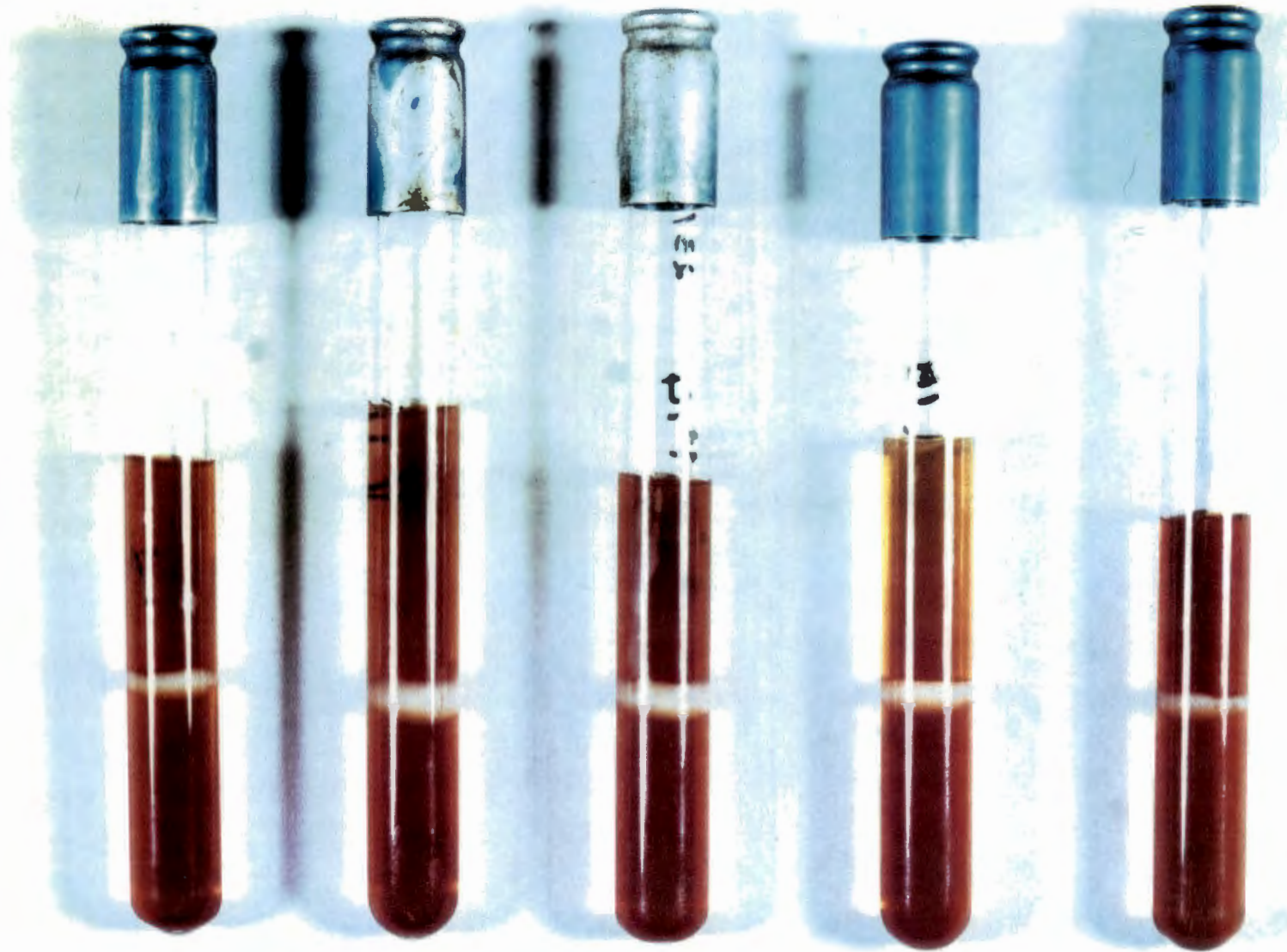


FIGUUR 2.5 Totale aantal ongepigmenteerde isolate, aantal ongepigmenteerde onbeweeglijke isolate en aantal Acinetobacter-isolate wat vanaf die onderskeie isolasiemedia geïsoleer is

2.8.3 Identifisering van isolate

'n Anaërobe fles is gebruik om die groeivermoë van organismes onder anaërobe toestande te bepaal (2.6.1, 2.7.7.1 (iv)). Somtyds het die verpligte aërobe kontrole-organisme, Pseudomonas aeruginosa, ook gegroei. Die resultate is met die RF-enkelbuistegniek geverifieer (2.6.1, 2.7.7.1 (iii)). Hierdie enkelbuistegniek word aanbeveel omdat die respiratiewe en fermentatiewe reaksie in een proefbuis waargeneem kan word. Dit is verder 'n uitstekende onderskeidingstoets vir groeivermoë onder anaërobe toestande. In Figure 2.6 en 2.7 word die resultate van die RF-enkelbuistegniek geïllustreer. Die proefbuis aan die linker- en regterkant is in beide gevalle twee kontrolebuis met die eksperimentele buis in die middel. In Figuur 2.6 word die negatiewe, alkaliese en respiratiewe reaksies onderskeidelik aangedui. Die respiratiewe reaksie toon swak suurproduksie en word soos volg genoteer: s-. Die fermentatiewe reaksies (Figuur 2.7) word soos volg van links na regs weergegee: ss; SS; SgS en SgSg.

Aangesien die oksidase-toets (2.6.1, 2.7.7.1 (i)) van kardinale belang is, word die gebruik van vier reagense aanbeveel, nl. N,N-dimetiel-1,4-fenileendiamien-dihidrochloried, N,N,N,N-tetrametiel-1,4-fenileendiamien, N,N,N,N-tetrametiel-1,4-fenileendiamien-dihidrochloried en para-amino-dimetielanaliënoksaalaat. 'n Organisme word slegs as oksidase-negatief beskou indien 'n negatiewe reaksie in die geval van al vier die reagense waargeneem word.



kontrolē

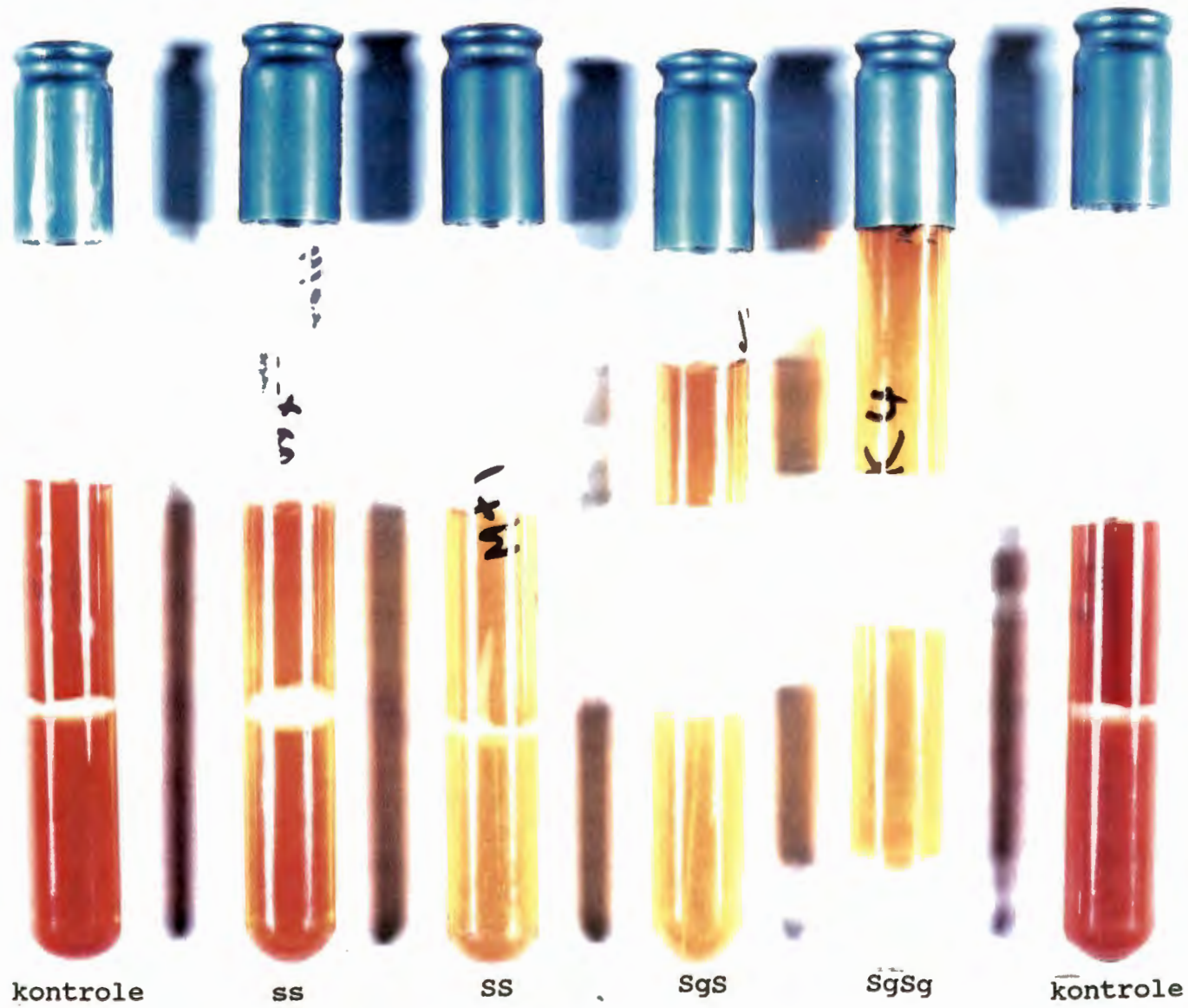
--

ā-

s-

kontrolē

FIGUUR 2.6 Die RF-enkelbuistegniek: respiratiewe en negatiewe reaksies.



FIGUUR 2.7 Die RF-enkelbuistegniek: fermentatiewe reaksies

Die primêre fenotipiese eienskappe (2.6.1, 2.7.7.1) van die 38 isolate uit roumelk, die UOVS-kulture en die verwysingskulture word in Tabel 2.4 saamgevat.

TABEL 2.4: Primêre fenotipiese eienskappe van die Acinetobacter-isolate vanuit roumelk asook die UOVS- en verwysingskulture

Kultuur	Gram-reaksie	RF	Anaërobe groei	F(TEM)	Oksidase	Katalase
M ⁺ 9	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 10	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 11	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 12	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 13	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 14	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 15	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 16	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 17	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 19	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 20	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 24	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 45	-	--	-	-	-	+
M ⁺ 47	-	--	-	-	-	+
N1	-	--	-	-	-	+
N2	-	--	-	-	-	+
N3	-	--	-	-	-	+
N11	-	--	-	-	-	+
N12	-	--	-	-	-	+
N13	-	--	-	-	-	+
N14	-	--	-	-	-	+
N15	-	--	-	-	-	+
N16	-	--	-	-	-	+
N17	-	--	-	-	-	+
N18	-	--	-	-	-	+
N19	-	--	-	-	-	+
N20	-	--	-	-	-	+
N21	-	--	-	-	-	+
N22	-	--	-	-	-	+
N23	-	--	-	-	-	+
N24	-	--	-	-	-	+
N27	-	S-	-	-	-	+
N28	-	--	-	-	-	+
P14	-	--	-	-	-	+
P36	-	--	-	-	-	+
P37	-	--	-	-	-	+
P44	-	--	-	-	-	+
P46	-	--	-	-	-	+

(F = flagellums; (+) = swak positiewe reaksie; + = positiewe reaksie; - = negatiewe reaksie; S = suurvorming; s = min suurvorming)

TABEL 2.4 (vervolg)

Kultuur	Gram-reaksie	RF	Anaërobe groei	F(TEM)	Oksidase	Katalase
Ø5	-	S-	-	-	-	+
Ø5b	-	--	-	-	-	(+)
R16	-	S-	-	-	-	+
M3	-	--	-	-	-	+
M4	-	S-	-	-	-	+
M9	-	--	-	-	-	+
M18	-	S-	-	-	-	+
M21	-	S-	-	-	-	+
M26	-	s-	-	-	-	+
M27	-	S-	-	-	-	+
M29	-	S-	-	-	-	+
P(k) 24	-	--	-	-	-	(+)
P(k) 25	-	--	-	-	-	(+)
P(k) 27	-	--	-	-	-	(+)
494	-	s-	-	-	-	+
709	-	s-	-	-	-	+
710a	-	s-	-	-	-	+
792	-	s-	-	-	-	+

(F = flagellums; (+) = swak positiewe reaksie; ; + = positiewe reaksie; - = negatiewe reaksie; S = suurvorming; s = min suurvorming)

Brzin (1963:188 & 1965:404-407) se waarnemings ten opsigte van die selvorme van die lede van Acinetobacter word deur hierdie ondersoek gestaaf. Verskeie suiwer kulture het groot, onreëlmatige selle asook die sogenaamde "spookselle" bevat (2.7.7.1 (v)). Hierdie selle en filamente is ook deur Henriksen (1973:527-529,542) en Juni (1984:304) beskryf. Sommige isolate het ook moeilik ontkleur tydens Gram-kleuring (2.7.5 (iii)), wat korreleer met die waarnemings van Lautrop (1974:436).

Dertien van die organismes het suur vanaf glukose gevorm in die RF-toets (respirasie) (2.7.7.1 (iii)). Van hierdie organismes is slegs een (N27) uit roumelk geïsoleer. Indien die resultate van die oksidasie van glukose in ag geneem word

(2.7.7.2 (x)), is dit duidelik dat hierdie dertien organismes geen suur in vloeistofmedium vorm nie. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat Acinetobacter 'n verplig aërobe organisme is. Al die isolate was streng aëroob, in so 'n mate dat die organismes geneig was om na kort tydperke in vloeistofkulture af te sterf.

Die resultate van die sekondêre fenotipiese hidrolitiese reaksies (2.7.7.2) word in Tabel 2.5 gegee. Alle verdere sekondêre fenotipiese reaksies (2.7.7.2) word in Tabel 2.6 saamgevat.

Slegs twee organismes, M⁺24 en N1, besit die vermoë om gelatien te hidroliseer (2.7.7.2 (iii)). Volgens Gennari et al. (1992:67) is dit 'n kenmerk van A. alcaligenes. Dit is van belang om daarop te let dat met die API 20 NE-toetse (2.7.7.2 (xi)) geen gelatien-hidrolise by bogenoemde twee organismes waargeneem is nie. Nie een van die Acinetobacter-kulture was in staat om glukose, laktose, fruktose, sukrose, galaktose, arabinose, mannose, maltose, mannitol, ramnose of xilose in vloeistofmedium te oksideer nie (2.7.7.2 (x)). Geeneen van die organismes was in staat om tributirien, (2.7.7.2 (vi)) te hidroliseer nie.

TABEL 2.5: Sekondêre fenotipiese hidrolitiese reaksies

Kultuur	T80	Tributirien	Stysel	Gelatien	Eskulien
M ⁺ 9	+	-	-	-	-
M ⁺ 10	+	-	-	-	-
M ⁺ 11	+	-	-	-	-
M ⁺ 12	+	-	-	-	-
M ⁺ 13	+	-	-	-	-
M ⁺ 14	+	-	-	-	-
M ⁺ 15	+	-	-	-	-
M ⁺ 16	+	-	-	-	-
M ⁺ 17	+	-	-	-	-
M ⁺ 19	+	-	-	-	-
M ⁺ 20	+	-	-	-	-
M ⁺ 24	+	-	-	+	-
M ⁺ 45	+	-	-	-	-
M ⁺ 47	+	-	-	-	-
N1	+	-	-	+	-
N2	+	-	-	-	-
N3	+	-	-	-	-
N11	+	-	-	-	-
N12	+	-	-	-	-
N13	+	-	-	-	-
N14	+	-	-	-	-
N15	+	-	-	-	-
N16	+	-	-	-	-
N17	+	-	-	-	-
N18	+	-	-	-	-
N19	+	-	-	-	-
N20	+	-	-	-	-
N21	+	-	-	-	-
N22	+	-	-	-	-
N23	+	-	-	-	-
N24	+	-	-	-	-
N27	+	-	-	-	-
N28	+	-	-	-	-
P14	+	-	-	-	-
P36	+	-	-	-	-
P37	+	-	-	-	-
P44	+	-	-	-	-
P46	+	-	-	-	-
Ø5	+	-	-	-	-
Ø5b	+	-	-	-	-
R16	+	-	-	-	-
M3	+	-	-	-	-
M4	+	-	-	-	-
M9	+	-	-	-	-
M18	+	-	-	-	-
M21	+	-	-	-	-
M26	+	-	-	-	-
M27	+	-	-	-	-
M29	+	-	-	-	-

(T80 = Tween 80; + = positiewe reaksie; - = negatiewe reaksie)

TABEL 2.5 (vervolg)

Kultuur	T80	Tributirien	Stysel	Gelatien	Eskulien
P(k) 24	+	-	-	-	-
P(k) 25	+	-	-	-	-
P(k) 27	+	-	-	-	-
494	+	-	-	-	-
709	+	-	-	-	-
710a	+	-	-	-	-
792	+	-	-	-	-

(T80 = Tween 80; + = positiewe reaksie; - = negatiewe reaksie)

TABEL 2.6: Verdere sekondêre fenotipiese reaksies

Kultuur	Sitraat- verbruik	Produksie		DN	N-red
		Urease	Indool		
M ⁺ 9	-	-	-	-	-
M ⁺ 10	-	-	-	-	-
M ⁺ 11	-	-	-	-	-
M ⁺ 12	-	-	-	-	-
M ⁺ 13	-	-	-	-	-
M ⁺ 14	-	-	-	-	-
M ⁺ 15	-	-	-	-	-
M ⁺ 16	-	-	-	-	-
M ⁺ 17	-	-	-	-	-
M ⁺ 19	-	-	-	-	-
M ⁺ 20	-	-	-	-	-
M ⁺ 24	-	-	-	-	-
M ⁺ 45	-	-	-	-	-
M ⁺ 47	-	-	-	-	-
N1	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N11	-	-	-	-	-
N12	-	-	-	-	-
N13	-	-	-	-	-
N14	-	-	-	-	-
N15	-	-	-	-	-
N16	-	-	-	-	-
N17	-	-	-	-	-
N18	-	-	-	-	-
N19	-	-	-	-	-
N20	-	-	-	-	-
N21	-	-	-	-	-

(DN = denitrifikasie; N-red = nitraatreduksie;
- = negatiewe reaksie)

TABEL 2.6 (vervolg)

Kultuur	Sitraat- verbruik	Produksie		DN	N-red
		Urease	Indool		
N22	-	-	-	-	-
N23	-	-	-	-	-
N24	-	-	-	-	-
N27	-	-	-	-	-
N28	-	-	-	-	-
P14	-	-	-	-	-
P36	-	-	-	-	-
P37	-	-	-	-	-
P44	-	-	-	-	-
P46	-	-	-	-	-
Ø5	-	-	-	-	-
Ø5b	-	-	-	-	-
R16	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-
M18	-	-	-	-	-
M21	-	-	-	-	-
M26	-	-	-	-	-
M27	-	-	-	-	-
M29	-	-	-	-	-
M18	-	-	-	-	-
M21	-	-	-	-	-
M26	-	-	-	-	-
M27	-	-	-	-	-
M29	-	-	-	-	-
P(k) 24	-	-	-	-	-
P(k) 25	-	-	-	-	-
P(k) 27	-	-	-	-	-
494	-	-	-	-	-
709	-	-	-	-	-
710a	-	-	-	-	-
792	-	-	-	-	-

(DN = denitrifikasie; N-red = nitraatreduksie;
- = negatiewe reaksie)

Omdat hierdie genus onbeweeglik is en geen flagellums besit nie (2.3), is TEM-ondersoeke (2.7.6) belangrik in die identifisering van Acinetobacter. Met behulp van die TEM kan flagellums duidelik waargeneem word. Indien flagellums wel teenwoordig is, maar afgebreek het, sal dit steeds in die

mikroskoopveld sigbaar wees. Die morfologie van die selle is ook duidelik waarneembaar op TEM-foto's. Figuur 2.8 is 'n voorbeeld van 'n kokkobasil, terwyl 'n enkele laterale flagellum duidelik waarneembaar is in Figuur 2.9. In laasgenoemde geval is die kokkobasil nie Acinetobacter nie. Indien die twee figure met mekaar vergelyk word, is die waarde van transmissie-elektronmikroskopie in die bepaling van die teenwoordigheid van flagellums duidelik.

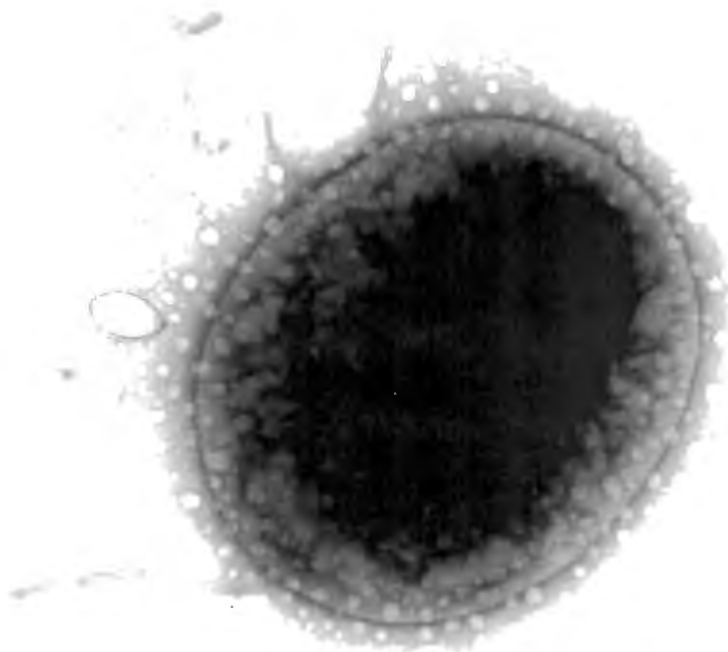
Fimbrië mag by Acinetobacter voorkom (2.3). Hierdie strukture is ook maklik waarneembaar met behulp van die TEM (Figure 2.10 en 2.11). Flagellums en fimbrië is duidelik onderskeibaar met behulp van elektronmikroskopie. Twee soorte fimbrië word in Acinetobacter aangetref nl. "dikker" en "dunner" fimbrië. Eersgenoemde word verbind met die draaibewegings van sommige organismes, terwyl aanhegting aan koolwaterstowwe aan die "dunner" fimbrië toegeskryf word (Rosenberg *et al.*, 1982:929,935). Fimbrië word verbind met 'n organisme se vermoë om op oppervlakke te koloniseer. Volgens Rosenberg *et al.* (1982:935) kan dit in gasheerselle lei tot die patogeniteit wat aan sommige organismes toegeskryf word. Figuur 2.10 is 'n TEM-foto van kultuur M18, wat 'n kliniese isolaat is waar fimbrië duidelik sigbaar is. In Figuur 2.11 word 'n kokkobasil aangetoon met 'n enkele polêre flagellum en fimbrië. Hierdie bakterie is nie Acinetobacter nie.



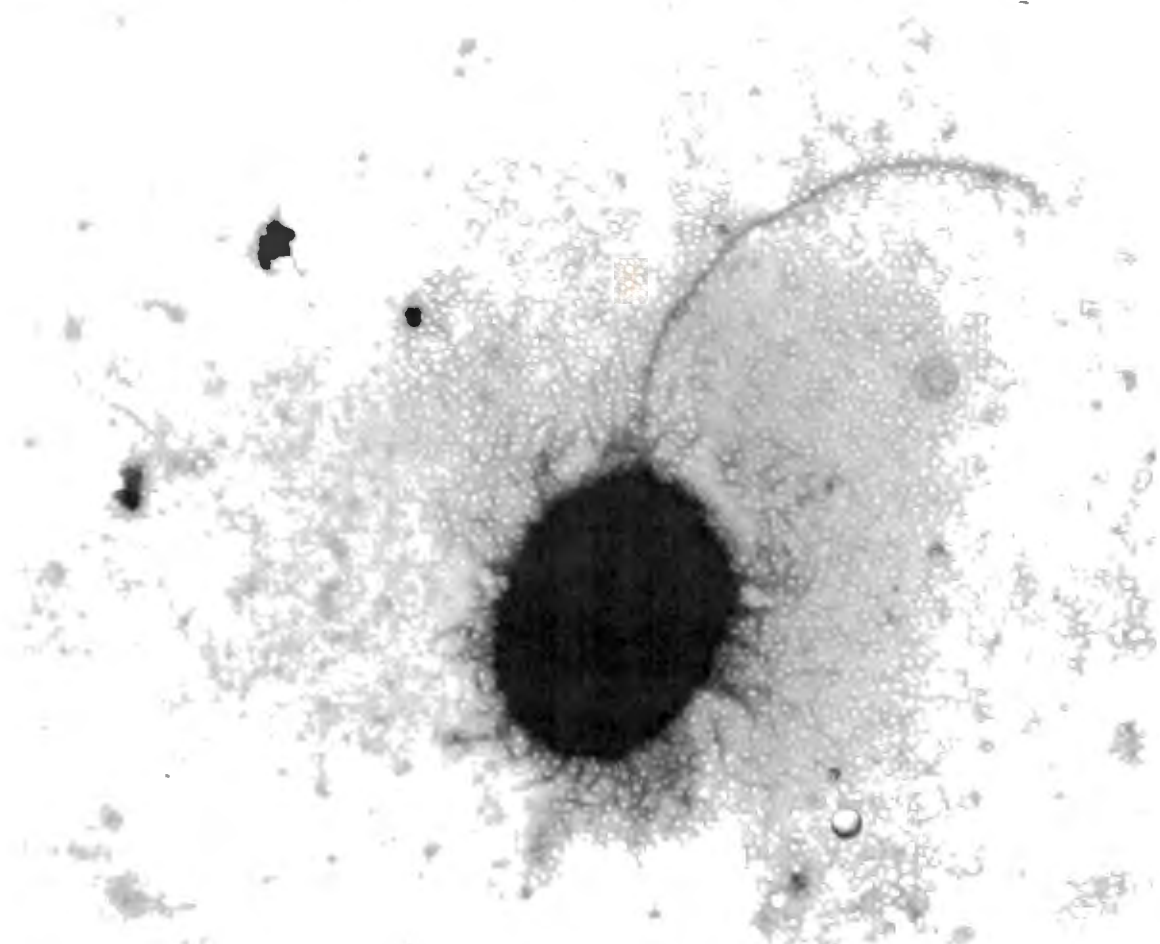
FIGUUR 2.8 'n Transmissie-elektronmikroskopiese foto van 'n kokkobasil (52 000 X)



FIGUUR 2.9 'n Transmissie-elektronmikroskopiese foto van 'n kokkobasil met 'n laterale flagellum (39 000 X)



FIGUUR 2.10 'n Transmissie-elektronmikroskopiese foto van 'n kokkobasil met fimbrieë (39 000 X)



FIGUUR 2.11 'n Transmissie-elektronmikroskopiese foto van 'n kokkobasil met 'n enkele polêre flagellum en fimbrieë (21 000 X)

Die aantal katalase-positiewe, oksidase-negatiewe, onbeweeglike, nie-spoorvormende, nie-geflagelleerde kokkobasille wat aan die eienskappe van Acinetobacter voldoen, word in Tabel 2.7 saamgevat. Volgens hierdie resultate voldoen slegs 0,6% van die totale aantal isolate in hierdie ondersoek aan die eienskappe van Acinetobacter. (Vergelyk ook Tabelle 2.2 en 2.3 en Figure 2.3-2.5.)

TABEL 2.7: Aantal isolate wat voldoen aan die eienskappe van Acinetobacter.

Medium	Aantal isolate
PTA	0
MMHN	19
MMHNP	14
KV	0
MMP	5
TOTAAL	38

Slegs die medium van Holton (MMHN) en die aangepaste medium van Holton (MMHNP) blyk uit Tabel 2.7 effens selektief te wees vir die isolering van Acinetobacter. Indien hierdie resultate egter met die totale aantal isolate vergelyk word, beslaan die Acinetobacter-kulture wat vanaf MMHN geïsoleer is slegs 0,32% van die 5955 isolate uit roumelk en die Acinetobacter-kulture vanaf MMHNP slegs 0,24%. (Vergelyk ook Tabelle 2.3 en 2.4 en Figure 2.3, 2.4 en 2.5.) Alhoewel MMHN en MMHNP chemies gedefinieerde media is, is dit as isolasiemedium nie selektief genoeg vir die isolasie van Acinetobacter uit 'n gemengde populasie nie. Die aangepaste medium van Schutte (MMP) word

nie aanbeveel nie, aangesien slegs 0,084% Acinetobacter-kulture uit 'n totaal van 5955 isolate uit roumelk vanaf hierdie medium geïsoleer is. Beide die kristalvioletagar (KV) en die totale plaattellingsagar (PTA) kan nie vir isolasiemedia aangewend word nie, omdat die media te algemeen is. Uit die resultate van hierdie ondersoek kan afgelei word dat daar nog nie 'n geskikte isolasiemedium vir Acinetobacter bestaan nie.

Die API 20 NE-sisteem is gebruik om die geïdentifiseerde isolate in subspecies te plaas. Dit is belangrik om daarop te let dat die API-identifikasiesisteem nié gebruik is vir die identifisering van die isolate tot op genusvlak nie, aangesien Acinetobacter geïdentifiseer word op grond van negatiewe eienskappe. Die gebruik van hierdie identifikasiesisteem vir lede van hierdie genus kan lei tot foutiewe identifikasie.

Veertig van die 56 kulture wat in hierdie ondersoek deur middel van konvensionele identifiseringsmetodes in die genus Acinetobacter ingedeel is, is aan die API 20 NE-sisteem onderwerp (Tabel 2.8). Nege-en-twintig organismes behoort aan die subspecies lwoffii en word geïdentifiseer as Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii. Die ander 11 kulture is Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus. Van die 25 Acinetobacter-kulture wat in hierdie ondersoek uit roumelk geïsoleer is, was slegs twee, M⁺47 en P44, uit die subspecies anitratus. Uit hierdie resultate kan afgelei word dat A. calcoaceticus var. lwoffii die grootste persentasie uitmaak van die Acinetobacter-kulture wat in hierdie ondersoek uit roumelk geïsoleer is.

TABEL 2.8: Indeling van geselekteerde, geïdentifiseerde Acinetobacter-kulture tot op subspesievlak deur middel van die API 20 NE-sistiem

Kultuur	Organisme
M ⁺ 9	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 10	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 11	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 12	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 13	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 14	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 15	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 17	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 19	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 20	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 24	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 45	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M ⁺ 47	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
N1	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
N2	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
N18	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
N19	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
N20	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
N23	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
N24	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
P14	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
P36	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
P37	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
P44	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
P46	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
Ø5	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
Ø5b	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
R16	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M4	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
M9	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
M18	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
M21	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
M27	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
M29	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
P(k) 24	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
P(k) 25	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>lwoffii</u>
494	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
709	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
710a	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>
792	<u>A. calcoaceticus</u> var. <u>anitratius</u>

HOOFSTUK 3. DIE VERMOË VAN ACINETOBACTER OM BEDERF IN MELK TE VEROORSAAK

3.1 Inleiding

In die moderne koeltegnologie is psigrotrofe bakterieë vir die suiwelbedryf van groot belang. Aangesien roumelk soms vir relatief lang periodes voor prosessering koelopgeberg word, is die bakteriologiese kwaliteit van die roumelk 'n bepalende faktor in die daarstelling van 'n hoë kwaliteit eindproduk. Verskeie kwaliteitprobleme in die suiwelbedryf word toegeskryf aan die metaboliese aktiwiteite van hierdie diverse groep organismes (Botha, 1985:143; Swart, 1988:1).

Die mikro-organismes wat in koelopgebergte melk kan groei, is in die tydperk 1901-1910 deur verskillende bakterioloë in Duitsland en die VSA ondersoek. In 1902 noem Schmidt-Nielson hierdie organismes psigrofiele. Hierdie term impliseer egter optimale groei by verkoelingstemperature, terwyl hulle optimum groeitemperatuur in werklikheid tussen 25°C en 35°C is. Eddy stel die term psigrotroof voor vir organismes wat by 5°C en laer kan vermenigvuldig. In 1968 is die volgende definisie deur die Internasionale Suiwelfederasie aanvaar: *In die suiwelbedryf is organismes wat by 7°C en laer kan vermenigvuldig psigrotroof, ongeag hulle optimum groeitemperatuur.* (Thomas & Thomas, 1978:5.)

Psigrotrofe bakterieë is gewoonlik Gram-negatiewe basille. Grond is die primêre bron, terwyl water, plante en voer ook as bron dien (Mikolajcik, 1979:8). Die organismes word ook in lug, fekale materiaal, gekontameneerde melkprodukte asook op melktoerusting aangetref (Cousin, 1982:178,179). Veral die hitte-labiele psigrotrofe is goed bestudeer. Die bekendste is die nie-spoorvormende, Gram-negatiewe staafvormige genera, nl. Pseudomonas, Alcaligenes, Achromobacter, Acinetobacter, Aeromonas en Flavobacterium, terwyl kolivormige organismes ook kan voorkom (Mikolajcik, 1979:7). Die genusnaam Achromobacter het verval en lede van hierdie genus is hergeklassifiseer in ander genera, hoofsaaklik Pseudomonas, Acinetobacter en Flavobacterium. Gram-positiewe organismes kom in baie kleiner getalle as die Gram-negatiewe organismes in melk voor en is gewoonlik spesies van Arthrobacter, Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus, Microbacterium, Clostridium, en Bacillus. Sommige lede van laasgenoemde genera is gewoonlik termodure psigrotrofe organismes. Potensiële patogene organismes wat in die suiwelbedryf aangetref word, is byvoorbeeld: Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, enteropatogene Escherichia coli, Staphylococcus aureus en Clostridium perfringens. Pseudomonas maak egter die grootste gedeelte van die psigrotrofe populasie in roumelk uit (Cousin, 1982:177-178).

Giste en skimmels wat 'n nadelige invloed op die kwaliteit van melk het, is: Candida, Saccharomyces, Rhodotorula,

Trichosporon, Aspergillus, Cladosporium, Alternaria, Mucor, Rhizopus, Geotrichum en Penicillium (Cousin, 1982:177-178).

Suiwelmikrobiologiese ondersoeke ten opsigte van die praktiese belang van psigrotrofe het aan die lig gebring dat dié organismes direk sowel as indirek kwaliteitprobleme in roumelk en geprosesseerde suiwelprodukte kan veroorsaak. Nie-spoorvormende psigrotrofe bakterieë wat in roumelk groei, kan:

- (i) direk bederf veroorsaak indien hulle in groot getalle teenwoordig is, en
- (ii) hittebestande ekstrasellulêre proteases en lipases vorm wat beide die prosesseringseienskappe van roumelk sowel as die kwaliteit van hittebehandelde melkprodukte nadelig beïnvloed (Mikolajcik, 1979:9; Senyk et al., 1982:513).

Psigrotrofe organismes is sterk lipolities of proteolities en meer as 60% besit beide eienskappe. Die afname in die kwaliteit van roumelk word toegeskryf aan hierdie ensimatiese aktiwiteite (Bester et al., 1986:11). Geur- en tekstuurdefekte in melk en melkprodukte word beskryf as bitter, vrugtig, onaangenaam, galsterig, suur, mouterig, vuil, gisterig, draderig, slymerig en soetkoagulerend. Sommige organismes produseer pigmente wat tot gevolg het dat die melkprodukte kan verkleur (Mikolajcik, 1979:8).

Indien die teenwoordigheid beperk en die groei van hierdie organismes doeltreffend beheer kan word, sal die bakteriologiese kwaliteit van die roumelk verbeter om sodoende by te dra tot die daarstelling van 'n veilige, voedsame en hoë kwaliteit eindproduk.

3.2 Ekstrasellulêre ensieme

Aktief groeiende psigrotrofe organismes in melk stel ekstrasellulêre ensieme vry wat die kwaliteit van suiwelprodukte wat van hierdie melk gemaak word, nadelig beïnvloed. Die Gram-negatiewe psigrotrofe organismes in roumelk word deur effektiewe pasteurisasietemperature gedood en is nie direk vir die bederf van hitte-behandelde melk en melkprodukte verantwoordelik nie. Die hitte-stabiele ensieme wat deur sekere spesies geproduseer word, is egter in staat om belangrike melkbestanddele af te breek (Law, 1979:573).

3.2.1 Proteases

Die hitte-stabiele proteases van veral Pseudomonas is goed bestudeer en bevindings dui daarop dat sommige proteases uiters hitte-stabiel is. Proteases wat byvoorbeeld by 4°C geproduseer word, is in staat om temperature tot so hoog soos 149°C vir 10 sekondes te weerstaan (Law, 1979:574).

Melkproteïene kan gehidroliseer word aangesien kaseïene ontvanklik is vir beide natuurlike proteases wat in melk teenwoordig is en mikrobiëse proteases (Cousin, 1989:206). Die aktiwiteit van hierdie ensieme kan veroorsaak dat die melk en melkprodukte bitter smaak.

Die proteolitiese vermoë van 'n organisme kan bepaal word op melkagarplate, op gelatienagarplate en in lakmoesmelk (Harrigan & McCance, 1976:66,67,71,72).

3.2.2 Lipases

Lipiede kan in drie groepe ingedeel word, nl.:

- (i) vette en olies,
- (ii) wasse en
- (iii) fosfolipiede.

Slegs vette en fosfolipiede is van belang in melk (Cousin, 1989:214).

Vette bestaan uit trigliserolesters van vetsure wat maklik na gliserol en vetsure gehidroliseer kan word. Fosfolipiede is komplekse verbindings wat gliserol en ander veresterde alkohole bevat. Die lipiede in melk bestaan uit 98% tri-asielgliserole of trigliseriede. Die buitenste gedeelte van die melkvetdeeltjie bevat proteïene, fosfolipiede, glikolipiede, sterole en gliseriede. Bykomend is di- en mono-asielgli-

seriede, cholesterol, vrye vetsure, glikolipiede en ander minder belangrike lipiede. Afbraak van lipiede gee aanleiding tot geur- en smaakdefekte, bv. galsterigheid wat in melk en melkprodukte kan voorkom. Daarom is dit van belang vir die suiwelbedryf om die lipolitiese aktiwiteit van psigrotrofe organismes te bestudeer (Cousin, 1989:215). Daar is bevind dat Pseudomonas een van die mees aktiewe psigrotrofe lipolitiese organismes is (Law, 1979:581).

Lipolise in roumelk is dikwels toe te skryf aan die natuurlike lipases wat in melk voorkom. Die aktiwiteit hiervan wissel as gevolg van belugting wat die melk tydens produksie en vervoer ondergaan. Verskeie outeurs wys egter op die toename in vrye vetsuurkonsentrasies in roumelk waarin psigrotrofe bakterieë vermenigvuldig het. Hitte-stabiele lipases veroorsaak byvoorbeeld galsterigheid in kaas (Law, 1979:581).

Die lipolitiese aktiwiteit van die psigrotrofe organismes kan bepaal word op Tween-80-, Victoriablou-bottervet- en tributirienagar (Harrigan & McCance, 1976:76,77).

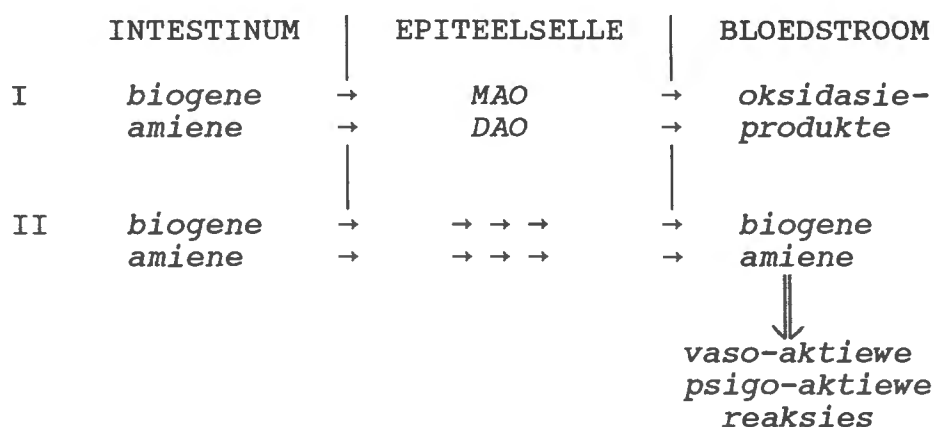
3.3 Biogene amiene

Amiene is organiese derivate van ammoniak waarin een of meer waterstofatome verplaas is deur 'n alkielradikaal. Nie-vlugtige amiene induseer belangrike fisiologiese reaksies in

mens en dier en staan bekend as biogene amiene (Edwards & Sandine, 1981:2431). Hierdie biologies aktiewe amiene word gedefinieer as alifatiese, aromatiese of heterosikliese organiese basisse met lae molekulêre massa wat ontstaan as gevolg van metaboliese prosesse in diere, plante en mikro-organismes (Rice et al., 1976:353; Ten Brink et al., 1990:73).

Biogene amiene wat in voedsel en drank voorkom, ontstaan gewoonlik as gevolg van die aktiwiteit van spesifieke aminosuurdekarboksilases. Onder toestande wat gunstig is vir die sintese van dekarboksilase en vir dekarboksilasie om plaas te vind, veroorsaak die groei van dekarboksilase-positiewe bakterieë die opeenhoping van amiene (Voigt & Eitenmiller, 1977:241; Ten Brink et al., 1990:74). Hierdie biologies aktiewe amiene kom normaalweg in baie voedselsoorte voor sonder om enige gesondheidsgevaar in te hou. Indien dit egter in groot hoeveelhede ingeneem word of as die meganisme van katabolisme vernietig of geïnhibeer word, kan dit nadelige fisiologiese veranderinge in die liggaam tot gevolg hê. Monoamien-oksidasies (MAO) en di-amien-oksidasies (DAO) detoksifiseer die amiene deur oksidasie en vervul sodoende 'n belangrike rol in die afbraak van die amiene. Sekere medikasie inhibeer egter die oksidatiewe afbraak van belangrike amiene (Figuur 3.1) (Ten Brink et al., 1990:74,75). Sekere amiene kan ook gedeeltelik deur die slymvliese in die mond geabsorbeer word met die gevolg dat die beskermende ensimatiese stelsels in die lewer en intestinum

nie bereik word nie (Veciana-Nogues et al., 1989:1653). Dit kan aanleiding gee tot hipertensie en migraine (Rice et al., 1976:353). Die amiene speel 'n rol in fisiologiese reaksies soos byvoorbeeld die regulering van liggaamstemperatuur, maagvolume en pH asook breinaktiwiteit (Ten Brink et al., 1990:74,75).



I : normale omstandighede

II: in die teenwoordigheid van MAO/DAO-inhibeerders

FIGUUR 3.1 Skematiese voorstelling van die oksidatiewe amienstelsel in die teenwoordigheid en afwesigheid van middels wat hulle werking beïnvloed (Ten Brink et al., 1990:75.)

Biogene amiene kan teenwoordig wees in suiwelprodukte, veral in gefermenteerde voedsel, insluitend kaas (Joosten & Northolt, 1987:260). Volgens Chander et al. (1989:940) en Tham (1988:103) word verskeie gevalle van amientoksifisering toegeskryf aan kaasverbruik. Verskeie gevalle van migraine-aanvalle en hoofpyn ná die inname van sekere suiwelprodukte is aangemeld.

Amiene veroorsaak ook tipiese geurdefekte in suiwelprodukte. Die mikrobiologiese kwaliteit van roumelk het 'n direkte invloed op die vorming van biogene amiene in kaas (Joosten & Northolt, 1987:264) en ander suiwelprodukte.

Min is bekend ten opsigte van die toksiese vlakke van amiene, maar dit word aanvaar dat histamienvlakke bokant 500-1000 mg/kg voedsel gesondheidsgevaar vir die verbruiker inhou. Daar is voorgestel dat die toelaatbare grens vir histamienvlakke in voedsel 100 mg histamien per kg voedsel en 2 mg per liter alkoholiese drank behoort te wees. Groter onduidelikheid heers oor die dosisgrootte vir ander amiene. Drumpelwaardes van 100-800 mg per kg voedsel is vir tiramien voorgestel (Ten Brink et al., 1990:76).

Edwards & Sandine (1981:2432) toon aan dat die inname van 10-80 mg tiramien vasoaktief is en aanleiding kan gee tot hipertensie, hoofpyn, koors, verhoogde bloeddruk, soms vomering en perspirasie. Hierteenoor is histamien (700-1000 mg) 'n verslapper van kapillêre bloedvate wat hipotensie, naarheid, vomering, maagpyn, hoofpyn, 'n brandende keel, dors, opswelling van die lippe en 'n uitslag tot gevolg kan hê.

Alhoewel aminosuurdekarboksilases nie algemeen by bakterieë voorkom nie, kan spesies van onder andere die volgende genera (waarvan die meeste psigrotroof is) wel een of twee aminosure dekarboksileer: Bacillus, Citrobacter, Clostridium,

Escherichia, Klebsiella, Alcaligenes, Micrococcus,
Leuconostoc, Lactobacillus, Pediococcus, Photobacterium,
Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella en Streptococcus
 (Edwards & Sandine, 1981:2432; Ten Brink et al., 1990:77).
 Edwards & Sandine (1981:2432) meld dat Achromobacter betrokke
 was by histamienvergiftiging na die inname van vis. Hierdie
 genus het verval en is in, onder andere, die genus
Acinetobacter ingedeel. Law et al. (1979:507) het waargeneem
 dat proteolitiese aktiwiteit in kaas gepaard gaan met die
 teenwoordigheid van Acinetobacter.

Voorvereistes vir die vorming van aansienlike hoeveelhede bio-
 gene amiene is:

- (i) die beskikbaarheid van vrye aminosure;
- (ii) die teenwoordigheid van dekarboksilase-positiewe mikro-organismes en
- (iii) gunstige toestande vir bakteriegroei, dekarboksilasesintese en dekarboksilasie.

Die meeste amiene is hitte-stabiel, sodat sekere dekarboksilases na pasteurisasie steeds aktief is. Die implikasie hiervan is dat die hoeveelheid amiene wat gevorm word nie gedurende prosessering sal verminder nie, maar tydens opberging wel kan vermeerder (Ten Brink et al., 1990:77).

Uit die voorafgaande literatuuroorsig is dit duidelik dat psigrotrofe bakterieë die kwaliteit van melk en melkprodukte kan benadeel. Enkele aspekte van die vermoë van die Acinetobacter-isolate om melk te bederf, is daarom ondersoek.

3.4 Eksperimentele metodes

3.4.1 Groeivermoë by lae temperature

Aangesien melk voor en na prosessering koelopgeberg word, is die groeivermoë van die Acinetobacter-kulture by lae temperature bepaal. Die organismes is deur middel van die templaatsmetode in triplikaat op voedingsagar uitgestryk en 14 dae by 4°C, 7°C en 10°C geïnkubeer. Die resultate is daagliks genoteer.

3.4.2 Bestandheid teen pasteurisasie

11% (m/v) hersaamgestelde afgeroomde melk is met antibiotikavrye afgeroomde melkpoeier berei en in 5 ml hoeveelhede in proefbuis versprei. Die buise is 10 minute by 121°C (100 kPa) gesteriliseer, afgekoel en met 0,1 ml oornagkultuur geïnkuleer. Spreiplaat van die kulture is op voedingsagar berei om die aantal organismes wat geïnkuleer is te bepaal. Hierdie plaat is 24 uur by 30°C geïnkubeer. Die buise is 30 minute saam met 'n ongeïnkuleerde buis (kontrole) in 'n waterbad by 63°C gepasteuriseer (Harrigan & McCance, 1976:176). Spreiplaat is in duplikaat berei en 24 uur by 30°C en 5-7 dae by 4°C, 7°C en 10°C geïnkubeer.

3.4.3 pH-veranderinge in melk

50 ml 11% (m/v) hersaamgestelde, antibiotikavrye afgeroomde melk is 10 minute by 121°C gesteriliseer en met 5 ml van die oornagkultuur geïnkuleer. Die proefkulture is saam met ongeïnkuleerde kontroles by 4°C, 7°C, 10°C en 30°C 9 dae geïnkubeer. pH-bepalings is daaglik uitgevoer.

3.4.4 Proteolise

Die hidrolise van kaseïen is op melkagar (Harrigan & McCance, 1976:67,351-352) bepaal. Die templaetmetode is gebruik en die plate is in triplikaat 14 dae by 4°C, 7°C, 10°C en 30°C geïnkubeer. 'n Helder sone om die groei is as positiewe resultaat geneem. Resultate is daaglik genoteer.

3.4.5 Lipolise

Die hidrolise van bottervet is op Victoriablou-bottervet-agar bepaal (VBBA). Die templaetmetode is gebruik om die organismes in triplikaat uit te stryk. Inkubering is 14 dae by 4°C, 7°C, 10°C en 30°C gedoen. Lipolitiese organismes vorm 'n diepblou sout in die teenwoordigheid van vrye vetsure, terwyl die agar ligroos tot ligpers vertoon (Harrigan & McCance, 1976:77,373-374). Resultate is daaglik genoteer.

3.4.6 Groei in lakmoesmelk

11% (m/v) hersaamgestelde afgeroomde melk is gebruik. Dit is berei met antibiotikavrye afgeroomde melkpoeier waarby 4% lakmoes as indikator gevoeg is (\pm 10 ml/liter). Die medium is geïnkuleer uit 'n oornagkultuur en 14 dae by 30°C en 7°C geïnkubeer. Die resultate is daagliks genoteer, nl.: suurproduksie, suurstolling (-klonting), reduksie, gasproduksie, soetstolling (-klonting) en alkali-produksie (Harrigan & McCance, 1976:53-54,346). 'n Ongeïnkuleerde buis lakmoesmelk is saam met die geïnkuleerde media by die verskillende temperature geïnkubeer om die kultuur daarmee te kan vergelyk.

3.4.7 Produksie van biogene amsiene

Die medium van Niven et al. (1981:321) is gebruik om te bepaal of die Acinetobacter-kulture histidien- en tirosiendekarboksilases produseer. Die toetse wat op agarplate sowel as in vloeistofmedium uitgevoer is, is 14 dae by 30°C en 7°C geïnkubeer. Indien die organisme die spesifieke dekarboksilase produseer, vorm 'n bloupers sone om die groei op die agarplaat terwyl die vloeistofmedium bloupers kleur. Ongeïnkuleerde buise met vloeistofmedium is by die verskillende temperature saam met die geïnkuleerde buise as kontroles geïnkubeer.

3.5 Resultate en bespreking

3.5.1 Groeivermoë by lae temperature (3.4.1)

Volgens Tabel 3.1 was 46 van die 56 organismes wat getoets is in staat om binne 14 dae by 10°C te groei. Slegs 10 het by 4°C gegroei en 36 van die 56 Acinetobacter-isolate vertoon psigrotrofe groei by 7°C. Van hierdie 36 psigrotrofe is 35 tydens hierdie ondersoek uit roumelk geïsoleer. Psigrotrofe groei is vanaf 5 dae waargeneem, behalwe in die geval van M⁺12 en N28 waar groei na 3 dae begin het. Net 10 organismes het by al drie temperature gegroei. Hierdie organismes is almal uit roumelk geïsoleer. Organismes wat in staat is om by lae temperature te groei is van belang in die suiwelbedryf aangesien melk en suiwelprodukte by lae temperature opgeberg word.

TABEL 3.1: Groeivermoë van Acinetobacter-kulture by 10°C, 7°C en 4°C na 14 dae inkubasie

Kultuurnr.	Groeivermoë by		
	10°C	7°C	4°C
M ⁺ 9	++	++	+
M ⁺ 10	++	++	0
M ⁺ 11	+++	+++	0
M ⁺ 12	+++	++	0
M ⁺ 13	+++	+	0
M ⁺ 14	+++	+++	0

(geen groei = 0; swak groei = +
matige groei = ++; goeie groei = +++)

TABEL 3.1 (vervolg)

Kultuurnr.	Groeivermoë by		
	10°C	7°C	4°C
M ⁺ 15	+++	+++	0
M ⁺ 16	+++	+++	0
M ⁺ 17	+++	+++	+
M ⁺ 19	+++	+++	0
M ⁺ 20	+++	+++	0
M ⁺ 24	+++	+++	0
M ⁺ 45	+++	+++	0
M ⁺ 47	+++	+++	+
N1	+++	+++	0
N2	+++	+++	0
N3	+++	0	0
N11	+++	+++	0
N12	+++	+++	0
N13	+++	+++	0
N14	+++	+	0
N15	+++	+	+
N16	++	++	0
N17	++	+++	0
N18	++	+	0
N19	++	+	0
N20	+	+	+
N21	+++	++	+
N22	+	0	0
N23	+++	+++	0
N24	+	++	0
N27	+++	+++	+++
N28	+++	+++	+++
P14	+++	++	+
P36	+++	++	+
P37	+++	++	0
P44	+++	0	0
P46	+++	++	0
Ø5	0	0	0
Ø5b	++	0	0
R16	+++	0	0
M3	+	0	0
M4	0	0	0
M9	0	0	0
M18	0	0	0
M21	0	0	0
M26	0	0	0

(geen groei = 0; swak groei = +
matige groei = ++; goeie groei = +++)

TABEL 3.1 (vervolg)

Kultuurnr.	Groeivermoë by		
	10°C	7°C	4°C
M27	+++	0	0
M29	0	0	0
P(k) 24	+++	0	0
P(k) 25	+++	0	0
P(k) 27	+++	+++	0
494	0	0	0
709	+	0	0
710a	0	0	0
792	0	0	0

(geen groei = 0; swak groei = +
matige groei = ++; goeie groei = +++)

3.5.2 Bestandheid teen pasteurisasie (3.4.2)

In Tabel 3.2 word die bakterietellings voor en na pasteurisasie asook die persentasie oorlewing ná inkubasie by 30°C gegee. N27 en N28 word gedood tydens die pasteurisasieproses en 'n aansienlike afname in die getalle van die ander 54 kulture is waargeneem.

Om die kulture se groeivermoë na pasteurisasie by 'n lae koelopbergings temperatuur te bepaal, is dit na behandeling by 10°C geïnkubeer. Van die 46 kulture wat in staat was om by 10°C te groei (Tabel 3.1), kon slegs 27 na pasteurisasie by 10°C groei (Tabel 3.3) alhoewel almal na pasteurisasie by 30°C gegroei het (Tabel 3.2).

TABEL 3.2: Bakterietellings van Acinetobacter-kulture voor en na pasteurisasie asook die persentasie oorlewing na 24 uur inkubasie by 30°C

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
M ⁺ 9	2050,0	0,500	0,024
M ⁺ 10	850,0	1,855	0,218
M ⁺ 11	1300,0	1,770	0,136
M ⁺ 12	3050,0	0,270	0,009
M ⁺ 13	2400,0	0,375	0,002
M ⁺ 14	1750,0	0,580	0,033
M ⁺ 15	750,0	0,135	0,018
M ⁺ 16	2050,0	1,100	0,054
M ⁺ 17	4400,0	0,035	0,008
M ⁺ 19	1850,0	0,150	0,008
M ⁺ 20	600,0	0,030	0,005
M ⁺ 24	3900,0	22,250	0,571
M ⁺ 45	3800,0	1,600	0,042
M ⁺ 47	2400,0	0,320	0,013
N1	2950,0	0,450	0,015
N2	4400,0	0,335	0,008
N3	5000,0	0,295	0,006
N11	1850,0	0,075	0,004
N12	1700,0	1,420	0,084
N13	220,0	1,770	0,805
N14	3850,0	2,530	0,066
N15	11,0	0,055	0,500
N16	3100,0	1,400	0,045
N17	15,0	0,045	0,300
N18	2,1	0,010	0,476
N19	65,0	0,020	0,031
N20	40,0	0,030	0,075
N21	38,5	0,025	0,065
N22	500,0	0,310	0,062
N23	28,0	0,020	0,071
N24	45,0	0,035	0,078
N27	3450,0	0,000	0,000
N28	1450,0	0,000	0,000
P14	4300,0	0,115	0,003
P36	2950,0	0,100	0,003
P37	1350,0	0,190	0,014
P44	11950,0	1,810	0,015
P46	3250,0	0,300	0,009
ø5	900,0	1,950	0,217
ø5b	1010,0	0,030	0,003

TABEL 3.2 (vervolg)

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
R16	2700,0	0,320	0,012
M3	3100,0	2,895	0,093
M4	6000,0	0,465	0,008
M9	8850,0	16,150	0,183
M18	300,0	0,020	0,007
M21	7100,0	0,805	0,011
M26	9750,0	0,275	0,003
M27	1000,0	0,830	0,083
M29	1500,0	2,000	0,133
P(k) 24	2300,0	0,280	0,012
P(k) 25	2550,0	0,045	0,002
P(k) 27	4400,0	0,350	0,008
494	6350,0	12,700	0,200
709	1400,0	0,800	0,057
710a	2700,0	0,300	0,011
792	1450,0	1,450	0,100

TABEL 3.3: Bakterietellings van Acinetobacter-kulture voor en na pasteurisasie asook die persentasie oorlewing na 7 dae inkubasie by 10°C

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
M ⁺ 9	2050,0	0,090	0,004
M ⁺ 10	850,0	1,145	0,135
M ⁺ 11	1300,0	1,600	0,123
M ⁺ 12	3050,0	0,030	0,001
M ⁺ 13	2400,0	0,135	0,006
M ⁺ 14	1750,0	0,220	0,013
M ⁺ 15	750,0	0,035	0,005
M ⁺ 16	2050,0	1,160	0,057
M ⁺ 17	4400,0	0,030	0,001
M ⁺ 19	1850,0	0,105	0,006
M ⁺ 20	600,0	0,020	0,003
M ⁺ 24	3900,0	21,350	0,547
M ⁺ 45	3800,0	2,460	0,065

TABEL 3.3 (vervolg)

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisatie
	Voor	Na	
M ⁺ 47	2400,0	1,850	0,077
N1	2950,0	0,175	0,006
N2	4400,0	0,320	0,007
N3	5000,0	0,190	0,004
N11	1850,0	0,075	0,004
N12	1700,0	1,505	0,089
N13	220,0	1,570	0,714
N14	3850,0	1,690	0,044
N15	11,0	0,050	0,456
N16	3100,0	0,000	0,000
N17	15,0	0,015	0,100
N18	2,1	0,000	0,000
N19	65,0	0,000	0,000
N20	40,0	0,000	0,000
N21	38,5	0,000	0,000
N22	500,0	0,000	0,000
N23	28,0	0,000	0,000
N24	45,0	0,000	0,000
N27	3450,0	0,000	0,000
N28	1450,0	0,000	0,000
P14	4300,0	0,850	0,020
P36	2950,0	0,100	0,003
P37	1350,0	0,100	0,007
P44	11950,0	0,000	0,000
P46	3250,0	0,130	0,004
ø5	900,0	0,000	0,000
ø5b	1010,0	0,000	0,000
R16	2700,0	0,000	0,000
M3	3100,0	0,000	0,000
M4	6000,0	0,000	0,000
M9	8850,0	0,000	0,000
M18	300,0	0,000	0,000
M21	7100,0	0,000	0,000
M26	9750,0	0,000	0,000
M27	1000,0	0,000	0,000
M29	1500,0	0,000	0,000
P(k) 24	2300,0	0,000	0,000
P(k) 25	2550,0	0,000	0,000
P(k) 27	4400,0	0,000	0,000
494	6350,0	0,000	0,000
709	1400,0	0,000	0,000
710a	2700,0	0,000	0,000
792	1450,0	0,000	0,000

Die invloed van laboratoriumpasteurisasie op die psigrotrofe groeivermoë van die Acinetobacter-kulture by verskillende inkubasietemperatuur is ook bepaal. Twee-en-twintig van die 36 kulture wat in staat was om by 7°C te groei (Tabel 3.1), het na pasteurisasie by 7°C gegroei (Tabel 3.4). Slegs M⁺17, M⁺47 en P36 (Tabel 3.5) groei na pasteurisasie by 4°C, terwyl 10 organismes in staat was om by 4°C te groei (Tabel 3.1). Geeneen van die UOVS- of verwysingskulture het na pasteurisasie by 10°C, 7°C of 4°C gegroei nie.

Aangesien sommige Acinetobacter-kulture wel bestand is teen laboratoriumpasteurisasie, kan hulle metaboliese aktiwiteite 'n invloed hê op die kwaliteit van suiwelprodukte vanweë hulle vermoë om by lae temperature te groei. Al is daar slegs 'n klein persentasie Acinetobacter-kulture tydens hierdie ondersoek uit roumelk geïsoleer, kan die invloed van die metaboliese aktiwiteite van Acinetobacter as kommensalis nie uitgesluit word nie. Watter invloed dit wel op die melk mag uitoefen is moeilik om aan te toon aangesien hulle nie oor die nodige ensieme beskik om melk te bederf nie (vergeelyk 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5 en 3.4.6). Die enigste nadeel wat dit vir die verbruiker mag inhou, is die vorming van biogene aminer in suiwelprodukte (kyk 3.4.7). Hulle teenwoordigheid in gepasteuriseerde melk en suiwelprodukte kan moontlik nie alleen toegeskryf word aan herkontaminasie na pasteurisasie nie.

TABEL 3.4: Bakterietellings van Acinetobacter-kulture voor en na pasteurisasie asook die persentasie oorlewing na 7 dae inkubasie by 7°C

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
M ⁺ 9	2050,0	0,085	0,004
M ⁺ 10	850,0	0,930	0,109
M ⁺ 11	1300,0	1,055	0,081
M ⁺ 12	3050,0	0,010	0,0003
M ⁺ 13	2400,0	0,080	0,003
M ⁺ 14	1750,0	0,110	0,006
M ⁺ 15	750,0	0,040	0,005
M ⁺ 16	2050,0	1,320	0,064
M ⁺ 17	4400,0	0,040	0,001
M ⁺ 19	185,00	0,030	0,002
M ⁺ 20	600,0	0,000	0,000
M ⁺ 24	3900,0	7,800	0,200
M ⁺ 45	3800,0	2,855	0,075
M ⁺ 47	2400,0	0,735	0,031
N1	2950,0	0,200	0,007
N2	4400,0	0,080	0,002
N3	5000,0	0,000	0,000
N11	1850,0	0,055	0,003
N12	1700,0	1,260	0,074
N13	220,0	1,300	0,591
N14	3850,0	0,010	0,0003
N15	11,0	0,000	0,000
N16	3100,0	0,000	0,000
N17	15,0	0,000	0,000
N18	2,1	0,000	0,000
N19	65,0	0,000	0,000
N20	40,0	0,000	0,000
N21	38,5	0,000	0,000
N22	500,0	0,000	0,000
N23	28,0	0,000	0,000
N24	45,0	0,000	0,000
N27	3450,0	0,000	0,000
N28	1450,0	0,000	0,000
P14	4300,0	0,182	0,004
P36	2950,0	0,020	0,001
P37	1350,0	0,000	0,000
P44	11950,0	0,000	0,000
P46	3250,0	0,070	0,002
Ø5	900,0	0,000	0,000
Ø5b	1010,0	0,000	0,000

TABEL 3.4 (vervolg)

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
R16	2700,0	0,000	0,000
M3	3100,0	0,000	0,000
M4	6000,0	0,000	0,000
M9	8850,0	0,000	0,000
M18	300,0	0,000	0,000
M21	7100,0	0,000	0,000
M26	9750,0	0,000	0,000
M27	1000,0	0,000	0,000
M29	1500,0	0,000	0,000
P(k)24	2300,0	0,000	0,000
P(k)25	2550,0	0,000	0,000
P(k)27	4400,0	0,000	0,000
494	6350,0	0,000	0,000
709	1400,0	0,000	0,000
710a	2700,0	0,000	0,000
792	1450,0	0,000	0,000

TABEL 3.5: Bakterietellings van Acinetobacter-kulture voor en na pasteurisasie asook die persentasie oorlewing na 7 dae inkubasie by 4°C

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
M ⁺ 9	2050,0	0,00	0,000
M ⁺ 10	850,0	0,00	0,000
M ⁺ 11	1300,0	0,00	0,000
M ⁺ 12	3050,0	0,00	0,000
M ⁺ 13	2400,0	0,00	0,000
M ⁺ 14	1750,0	0,00	0,000
M ⁺ 15	750,0	0,00	0,000
M ⁺ 16	2050,0	0,00	0,000
M ⁺ 17	4400,0	0,01	0,0002
M ⁺ 19	1850,0	0,00	0,000
M ⁺ 20	600,0	0,00	0,000
M ⁺ 24	3900,0	0,00	0,000
M ⁺ 45	3800,0	0,00	0,000

TABEL 3.5 (vervolg)

Kultuurnr.	Getal bakterieë (X 10 ³)		% oorlewing na pasteurisasie
	Voor	Na	
M ⁺ 47	2400,0	0,210	0,009
N1	2950,0	0,000	0,000
N2	4400,0	0,000	0,000
N3	5000,0	0,000	0,000
N11	1850,0	0,000	0,000
N12	1700,0	0,000	0,000
N13	220,0	0,000	0,000
N14	3850,0	0,000	0,000
N15	11,0	0,000	0,000
N16	3100,0	0,000	0,000
N17	15,0	0,000	0,000
N18	2,1	0,000	0,000
N19	65,0	0,000	0,000
N20	40,0	0,000	0,000
N21	38,5	0,000	0,000
N22	500,0	0,000	0,000
N23	28,0	0,000	0,000
N24	45,0	0,000	0,000
N27	3450,0	0,000	0,000
N28	1450,0	0,000	0,000
P14	4300,0	0,000	0,000
P36	2950,0	0,025	0,001
P37	1350,0	0,000	0,000
P44	11950,0	0,000	0,000
P46	3250,0	0,000	0,000
Ø5	900,0	0,000	0,000
Ø5b	1010,0	0,000	0,000
R16	2700,0	0,000	0,000
M3	3100,0	0,000	0,000
M4	6000,0	0,000	0,000
M9	8850,0	0,000	0,000
M18	300,0	0,000	0,000
M21	7100,0	0,000	0,000
M26	9750,0	0,000	0,000
M27	1000,0	0,000	0,000
M29	1500,0	0,000	0,000
P(k) 24	2300,0	0,000	0,000
P(k) 25	2550,0	0,000	0,000
P(k) 27	4400,0	0,000	0,000
494	6350,0	0,000	0,000
709	1400,0	0,000	0,000
710a	2700,0	0,000	0,000
792	1450,0	0,000	0,000

3.5.3 pH-veranderinge in melk (3.4.3)

Die lesings is daagliks vir net 3 dae by 30°C geneem. Om koelopberging te simuleer, is die resultate daagliks by 10°C, 7°C en 4°C vir 9 dae genoteer.

In Tabel 3.6 word die pH-veranderinge van die melk gegee. Hierdie pH-veranderinge is die verskil tussen die aanvangs-pH-lesing en die pH-lesing geneem op die laaste dag van inkubasie. Die presisie van 'n pH-meter (apparaat) kan wissel met ongeveer 0,02 pH-eenhede, terwyl die akkuraatheid (meting) met ongeveer 0,05 eenhede kan varieer. Daar kan 'n daaglikse speling van ongeveer 0,1 pH-eenheid wees wat die aanvaarde akkuraatheid verteenwoordig. Taras et al. (1971:279) beveel aan dat pH-lesings na die naaste 0,1 pH-eenheid afgerond moet word. Dit is dan ook in hierdie ondersoek gedoen.

Die pH-veranderinge wat in hierdie ondersoek waargeneem is, korreleer met dié verandering van die kontrole, dit wil sê, as die pH van die kontrole daal, daal die pH van die geïnkuleerde proef ook. Die omgekeerde is ook waargeneem. By geeneen van die vier temperature waarby die Acinetobacter-kulture geïnkubeer is, is noemenswaardige veranderinge in die pH van die melk waargeneem nie. Hierdie waarnemings is gemaak in die geval van beide groot (454×10^5 ; 709) en klein ($1,6 \times 10^5$; N19) inokulums.

TABEL 3.6: pH-veranderinge by 30°C, 10°C, 7°C en 4°C*
daagliks vir 3 dae bepaal

Kultuurnr	30°C	10°C	7°C	4°C	Inokulum (X 10 ⁵)
M ⁺ 9	0,0	0,1	0,0	0,1	60,00
M ⁺ 10	0,0	+0,1	0,0	0,0	46,50
M ⁺ 11	0,1	+0,1	0,0	0,0	49,50
M ⁺ 12	0,0	0,1	0,0	0,0	19,30
M ⁺ 13	0,1	0,1	0,0	0,0	22,50
M ⁺ 14	+0,1	+0,1	+0,2	+0,2	71,50
M ⁺ 15	0,0	+0,1	+0,1	0,0	8,00
M ⁺ 16	0,3	0,0	0,0	0,1	33,00
M ⁺ 17	0,0	0,0	0,0	0,0	21,50
M ⁺ 19	0,0	+0,1	0,0	+0,1	7,15
M ⁺ 20	+0,1	0,0	+0,1	+0,0	15,00
M ⁺ 24	+0,2	+0,1	0,1	0,1	129,00
M ⁺ 45	0,2	0,1	0,1	0,1	47,50
M ⁺ 47	0,1	0,0	0,0	+0,1	27,50
N1	0,0	0,0	0,1	0,1	215,00
N2	0,2	0,1	0,0	0,0	33,50
N3	0,0	0,0	+0,1	0,0	52,00
N11	0,2	0,1	0,0	0,0	51,50
N12	0,2	0,1	0,0	0,0	27,10
N13	0,0	+0,1	+0,2	+0,2	28,50
N14	0,2	0,1	0,0	+0,1	78,00
N15	0,1	0,1	0,1	0,1	7,30
N16	0,3	+0,1	0,1	0,1	325,00
N17	0,1	+0,2	+0,2	+0,1	10,50
N18	0,2	+0,1	+0,1	0,0	10,50
N19	0,1	+0,1	+0,1	+0,2	1,60
N20	0,1	+0,1	+0,1	+0,1	4,00
N21	0,2	0,1	0,0	0,1	176,00
N22	0,1	+0,1	+0,1	+0,2	4,00
N23	0,1	+0,2	+0,1	+0,1	19,00
N24	0,0	0,0	0,0	0,0	27,00
N27	0,2	0,0	0,0	0,0	144,00
N28	0,1	+0,1	+0,1	+0,1	149,00
P14	0,1	0,1	0,1	0,1	40,20
P36	+0,1	0,0	0,0	0,0	59,50
P37	0,1	0,1	0,0	+0,1	125,00
P44	0,1	0,1	+0,1	+0,1	155,00
P46	0,3	+0,1	0,0	0,0	135,00
Ø5	0,3	0,0	0,2	0,2	29,00
Ø5b	0,1	0,1	0,0	0,0	152,00
R16	0,2	0,0	+0,1	+0,2	19,30

(* Styging in pH word met 'n + aangedui, ander waardes is 'n daling in pH)

TABEL 3.6 (vervolg)

Kultuurnr	30°C	10°C	7°C	4°C	Inokulum (X10 ⁵)
M3	0,3	0,3	0,2	0,3	34,0
M4	+0,1	0,1	0,1	0,0	89,5
M9	0,2	0,3	0,2	0,3	64,5
M18	0,1	0,0	0,0	0,0	149,5
M21	0,2	0,0	0,1	0,0	40,0
M26	+0,1	0,2	0,0	0,1	195,0
M27	0,2	0,2	0,1	0,2	64,5
M29	0,3	0,1	0,0	0,0	120,0
P(k)24	0,2	0,0	0,1	0,0	53,5
P(k)25	0,2	0,3	0,1	0,1	86,0
P(k)27	0,0	0,1	0,1	0,1	80,0
494	0,2	0,3	0,3	0,3	225,0
709	0,1	0,7	0,2	0,2	454,0
710a	0,1	0,3	0,2	0,2	244,0
792	0,1	0,7	0,3	0,6	34,5

(* Styging in pH word met 'n + aangedui, ander waardes is 'n daling in pH)

Daarom kan die gevolgtrekking gemaak word dat die invloed van hierdie Acinetobacter-isolate op die pH van melk weglaatbaar klein is.

3.5.4 Proteolise (3.4.4)

Die proteolitiese vermoë van die Acinetobacter-kulture is daaglik genoteer (Tabel 3.7; kyk 3.4.4). In die geval van N16, N17, P(k)24 en P(k)25 is op die 6de dag, en in die geval van P(k)27 en M27, op die 7de dag proteolise by 30°C waargeneem. Op die 8ste dag is proteolise by twee verwysingskulture, 494 en 710a waargeneem. By 10°C is proteolise by N27, N28 en P14 na 6 dae waargeneem. Slegs by N21 is proteolise onder psigrotrofe omstandighede na 6 dae waargeneem.

TABEL 3.7: Dae waarop Acinetobacter-kulture proteolise vertoon na inkubasie by 30°C, 10°C, 7°C en 4°C

Kultuurnr.	Dae			
	30°C	10°C	7°C	4°C
N16	6			
N17	6			
N21			6	6
N27		6		
N28		6		
P14		6		
P(k)24	6			
P(k)25	6			
P(k)27	7			
M27	7			
494	8			
710a	8			

Die proteolitiese aktiwiteit van die Acinetobacter-isolate is baie laag (12 uit 56 isolate). Dit word gestaaf deur die lae voorkoms van proteolise by 30°C en die bykans afwesigheid daarvan by ander temperature. Die proteolitiese aktiwiteit van hierdie Acinetobacter-isolate is gering en hulle invloed op die kwaliteit van melk weglaatbaar klein. (Vergelyk ook 3.5.6.)

3.5.5 Lipolise (3.4.5)

Geen lipolitiese aktiwiteit is by 30°C, 10°C, 7°C of 4°C waargeneem nie, daarom sal hierdie Acinetobacter-isolate nie die kwaliteit van melk deur lipolitiese aktiwiteit beïnvloed nie.

3.5.6 Groei in lakmoesmelk (3.4.6)

Geen suurproduksie het in lakmoesmelk by 30°C en 7°C plaasgevind nie. Suur word vanaf laktose in melk gevorm. Acinetobacter kan egter nie laktose oksideer nie (2.8.3).

Geen alkali is by 30°C en 7°C geproduseer nie. Indien in ag geneem word dat alkali-produksie eers waargeneem word nadat die pH tot 8,3 styg, korreleer hierdie resultate met die bevindings van die pH-ondersoeke (Tabel 3.6).

Reduksie van lakmoesmelk deur verskillende kulture is by 30°C waargeneem (Tabel 3.8), maar geen reduksie is by 7°C waargeneem nie. Die reduksie is 'n bevestiging dat Acinetobacter streng aëroob is. Reduksie van die redoksindikator (lakmoes) vind plaas indien aërobe bakterieë die suurstof gebruik wat lei tot die ontstaan van anaërobe toestande. Indien die kulture geskud word of vir 'n langer tydperk geïnkubeer word, kan suurstof weer in die medium in diffundeer, om sodoende die redoks-indikator van wit na leiklipblou te verander.

Bakterieë wat 'n ekstrasellulêre protease produseer, vorm 'n soetklont in lakmoesmelk. Taaiwording van die lakmoesmelk is deur N14, N16 en 05 gevorm. Hierdie reaksie is slegs by 30°C waargeneem. N14 en 05 is egter proteolities negatief (Tabel 3.7). Hierdie taaiwording moet eerder as draderigheid beskou word as soetklonting (Gennari et al., 1992:70).

TABEL 3.8: Dae waarop reduksie van lakmoesmelk deur Acinetobacter-kulture by 30°C verkry is

Kultuurnr.	Dae
M3	4
M4	4
M9	4
M18	9
M21	4
M26	4
M27	4
M29	7
Ø5	4
P(24)	4
P(25)	4
P(27)	4
494	7

Alhoewel sommige Acinetobacter veranderinge in lakmoesmelk by 30°C teweegbring, vind geen reaksies onder psigrotrofe toestande plaas nie.

3.5.7 Produksie van biogene amiene (3.4.7)

In hierdie ondersoek is die vloeistofmedium met die agarplaat vergelyk. Aangesien beter kleurontwikkeling in die vloeistofmedium verkry is, is al 56 Acinetobacter-kulture hierin geïnkuleer. Hierdie resultate stem ooreen met die bevinding van Joosten & Northolt (1987:262).

Al die organismes het tiramien na 48 uur by 30°C geproduseer (Tabel 3.9). Altesaam 35 organismes was na 14 dae tiramienpositief by 7°C. Dié 35 organismes is uit roumelk geïsoleer. Slegs 3 organismes wat in hierdie ondersoek uit roumelk ge-

ïsoleer is, was nie in staat om tiramien onder psigrotrofe toestande te produseer nie.

Die volgende organismes was na 14 dae histamien-positief by 30°C: M⁺9, M⁺10 M⁺45, M⁺47, N14, P14, 05, M3, M4, M9, M18, M21, M27, M29, 709, 710a en 792. M26 en 494 het swak positiewe reaksies vertoon. Geen organisme het histamien onder psigrotrofe toestande gevorm nie.

Acinetobacter besit beide histidien- en tirosiendekarboksilase. In teenstelling met tiramien is histamien nie onder psigrotrofe toestande gevorm nie. Indien die korrelasie met proteolise in ag geneem word, moet aangeneem word dat **Acinetobacter** nie voldoende aminosuurvoorgangers daar kan stel nie. In gefermenteerde produkte kan die aminosuurvoorgangers egter beskikbaar gestel word deur die proteolitiese vermoë van ander psigrotrofe organismes, waarna **Acinetobacter** dekarboksilasie kan veroorsaak.

TABEL 3.9: Dekarboksilering van tirosien en histidien in vloeistofmedium deur Acinetobacter by 30°C en 7°C

Kultuurnr.	30°C		7°C	
	Tirosien (48 uur)	Histidien (14 dae)	Tirosien (14 dae)	Histidien (14 dae)
M ⁺ 9	+	+	-	-
M ⁺ 10	+	+	+	-
M ⁺ 11	+	-	-	-
M ⁺ 12	+	-	+	-
M ⁺ 13	+	-	+	-
M ⁺ 14	+	-	+	-
M ⁺ 15	+	-	+	-
M ⁺ 16	+	-	+	-
M ⁺ 17	+	-	+	-
M ⁺ 19	+	-	-	-
M ⁺ 20	+	-	+	-
M ⁺ 24	+	-	+	-
M ⁺ 45	+	+	+	-
M ⁺ 47	+	+	+	-
N1	+	-	+	-
N2	+	-	+	-
N3	+	-	+	-
N11	+	-	+	-
N12	+	-	+	-
N13	+	-	+	-
N14	+	+	+	-
N15	+	-	+	-
N16	+	-	+	-
N17	+	-	+	-
N18	+	-	+	-
N19	+	-	+	-
N20	+	-	+	-
N21	+	-	+	-
N22	+	-	+	-
N23	+	-	+	-
N24	+	-	+	-
N27	+	-	+	-
N28	+	-	+	-

(+ = positiewe dekarboksilering;
 (+) = swak dekarboksilering;
 - = geen dekarboksilering)

TABEL 3.9 (vervolg)

Kultuurnr.	30°C		7°C	
	Tirosien (48 uur)	Histidien (14 dae)	Tirosien (14 dae)	Histidien (14 dae)
P14	+	+	+	-
P36	+	-	+	-
P37	+	-	+	-
P44	+	-	+	-
P46	+	-	+	-
Ø5	+	+	-	-
Ø5b	+	-	-	-
R16	+	-	-	-
M3	+	+	-	-
M4	+	+	-	-
M9	+	+	-	-
M18	+	+	-	-
M21	+	+	-	-
M26	+	(+)	-	-
M27	+	+	-	-
M29	+	+	-	-
P(k) 24	+	-	-	-
P(k) 25	+	-	-	-
P(k) 27	+	-	-	-
494	+	(+)	-	-
709	+	+	-	-
710a	+	+	-	-
792	+	+	-	-

(+ = positiewe dekarboksilering;
 (+) = swak dekarboksilering;
 - = geen dekarboksilering)

HOOFSTUK 4. DIE AANHEGTINGVERMOË VAN ACINETOBACTER-KULTURE

4.1 Inleiding

Bakterieë is in staat om stewig te heg aan 'n verskeidenheid oppervlakke in die natuur. Hierdie oppervlakke kan wissel van 'n mens se tand of long, die dunderm van 'n bees, die rumen van 'n herkouer, mediese biomateriale of 'n klip in 'n waterstroom. Somtyds is hulle baie spesifiek ten opsigte van die oppervlak waaraan hulle heg (Costerton et al., 1978:86; Costerton et al., 1981:308; Costerton et al., 1987:441,443,447-452). Aanhegting vind plaas deur middel van ekstrasellulêre polimeriese stowwe (EPS).

Aanhegting vind gewoonlik nie plaas in omgewings wat ryk of baie arm (oligotroof) is aan voedingstowwe (media) nie (Costerton et al., 1987:436,441). Voordat kolonisering kan plaasvind, moet organiese materiaal eers aan die oppervlak heg om 'n kondisioneringsfilm te vorm waaraan die mikrobies dan heg (Duddridge & Pritchard, 1983:28; Hamilton, 1985:210; Costerton et al., 1987:437). Aanvanklik vind die aanhegting van selle lukraak en omkeerbaar vanuit 'n planktoniese populasie plaas. As gevolg van ladingsverskille tussen die oppervlak en die organisme vind elektrostatische binding plaas wat deur pH-veranderinge beïnvloed word. Aanhegting met behulp van vashegtingsorganelle soos pilusse, fimbrië, stele en prostekte kan ook plaasvind (Duddridge & Pritchard,

1983:28,30). Enige verdere kolonisering en vermeerdering van die biomassa is afhanklik van die groei van die selle wat eerste aangeheg het. Hierna vind die produksie van EPS in groot hoeveelhede plaas (Hamilton, 1985:210-211; Costerton *et al.*, 1987:437).

'n Bakteriese sel bind onomkeerbaar aan 'n oppervlak deur middel van EPS. EPS word aan die buitekant van die omringende membraan van Gram-negatiewe selwande, asook aan die buitekant van die peptidoglikaan van Gram-positiewe selwande, neergelê. Gram-negatiewe bakterieë speel 'n belangrike rol by aanhegting aangesien hulle by uitstek EPS sintetiseer. Anorganiese ione, Ca^{2+} en Mg^{2+} , asook ongelyke oppervlakke bevorder onomkeerbare aanhegting. Nadat 'n sel onomkeerbaar aangeheg het, vind tweedeling plaas en die dogterselle word deur die EPS omsluit en aan die oppervlak geheg. Deur herhaaldelike tweedeling ontstaan 'n mikrokolonie wat mettertyd feitlik die hele oppervlak koloniseer. Planktoniese bakterieë en ander mikro-organismes kan ook by hierdie anioniese matriks van die biofilm aansluit. So ontstaan 'n biofilm wat saamgestel is uit talle mikro-organismes asook makromolekule wat deur die organismes self gesintetiseer word of van buite af vasgevang word (Costerton *et al.*, 1981:299; Duddridge & Pritchard, 1983:30,31; Costerton *et al.*, 1987:349). In 'n biofilm is die konsortiums van mikrobies direk van mekaar afhanklik.

Probleme wat kan ontstaan, is 'n tekort aan suurstof asook die oneweredige diffusie van voedingstowwe deur die biofilm (Duddridge & Pritchard, 1983:28; Hamilton, 1985:198,199, 205,209; Costerton et al., 1987:458).

4.2 Biofilmvorming in die suiwelbedryf

Ten spyte van moderne fabriekstegnologie soos pasteurisasie, was- en reinigingsprogramme, higiëniese maatreëls en ander fisiese en chemiese beheermaatreëls, vind bakteriese herkontaminasie van melk en suiwelprodukte steeds plaas. Melkkontakoppervlakke is 'n kardinale bron van bakteriese herkontaminasie (Thomas et al., 1966:29; Cousin, 1982:179).

Volgens Koutzayiotis (1990:6,10) impliseer die waarnemings dat dieselfde organismes voor en na pasteurisasie in melk aangetref word, dat dié bakterieë suksesvolle kompeteerdere moet wees en ook fisiologies aanpasbaar moet wees om in 'n ongunstige omgewing te oorleef. Bakterieë kan in die teenwoordigheid van melkreste op swak gereinigde melkerytoerusting voorkom (Thomas & Thomas, 1978:7). Die melkreste kan die organismes beskerm teen antimikrobiese wasmiddels (International Dairy Federation, 1979:7). Met wisselende omgewingstemperature laer as 20°C kan die organismes vermeerder en 'n belangrike bron van psigrotrofe kontaminante in roumelk wees. Hoë vlakke van mikrobiese groei moet op

melkerytoerusting voorkom om melk wat daarvoor vloei te kontamineer (Cousins & Bramley, 1981:144).

Volgens Cousins & Bramley (1981:151) stem die generiese samestelling van die organismes op melkkontakoppervlakke ooreen met die genera wat algemeen in roumelk voorkom. Die hoë getalle waarin Gram-negatiewe basille op swak gereinigde melkkontakoppervlakke voorkom, is betekenisvol omdat hierdie organismes verantwoordelik is vir defekte in gepasteuriseerde melk by lae temperature. Tellings van ongeveer $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ Gram-negatiewe basille kan organoleptiese defekte in melk veroorsaak (International Dairy Federation, 1986:15). Volgens Mostert & Jordaan (1992:ongepubliseerde data) is die verwagte houvermoë van kommersieel gepasteuriseerde melk in Suid-Afrika slegs ongeveer 9 dae by 7°C. Enige toename in psigrotrofe getalle in die gepasteuriseerde melk deur herkontaminasie sal die houvermoë nadelig beïnvloed (International Dairy Federation, 1979:7).

Maxcy (1971:569-573) toon aan dat in die melk-ekosisteem 'n aantal komplekse faktore die voorkoms van mikro-organismes kan beïnvloed, naamlik kontaminasie van buite, wasmiddels, beskikbare vog, temperatuur, inkubasietydperk en die populasiedigtheid van die mikro-organismes. Bogenoemde outeur het vlekvrystaalvierkantjies gekondisioneer en aan roumelk blootgestel waarna die bakterieë wat op die vlekvrystaaloppervlakke versamel het, gegroepeer is volgens Gram-reaksies.

Alhoewel die Gram-negatiewe bakterieë ongelukkig nie verder geïdentifiseer is nie, is dit uit hierdie resultate duidelik dat bakterieë in roumelk in staat is om aan vlekvrystaaloppervlakke te heg. Speers *et al.* (1984:547,553-555) het bo alle twyfel aangetoon dat glas-, rubber- en vlekvrystaaloppervlakke deur mesofiele en psigrotrofe bakterieë gekontameneer word.

Volgens Gilmour (1989:30) is Acinetobacter 'n EPS-produseerder. Hy het aangetoon dat EPS-produksie nie deur die inkubasietemperatuur beïnvloed word nie en dat EPS-produksie deur Acinetobacter na 9 uur inkubasie by 7°C waarneembaar is.

Die vermoë van geselekteerde Acinetobacter-kulture om onder verskillende omstandighede EPS te produseer en aan vlekvrystaaloppervlakke te heg, is ondersoek en word in hierdie hoofstuk beskryf.

4.3 Eksperimentele metodes

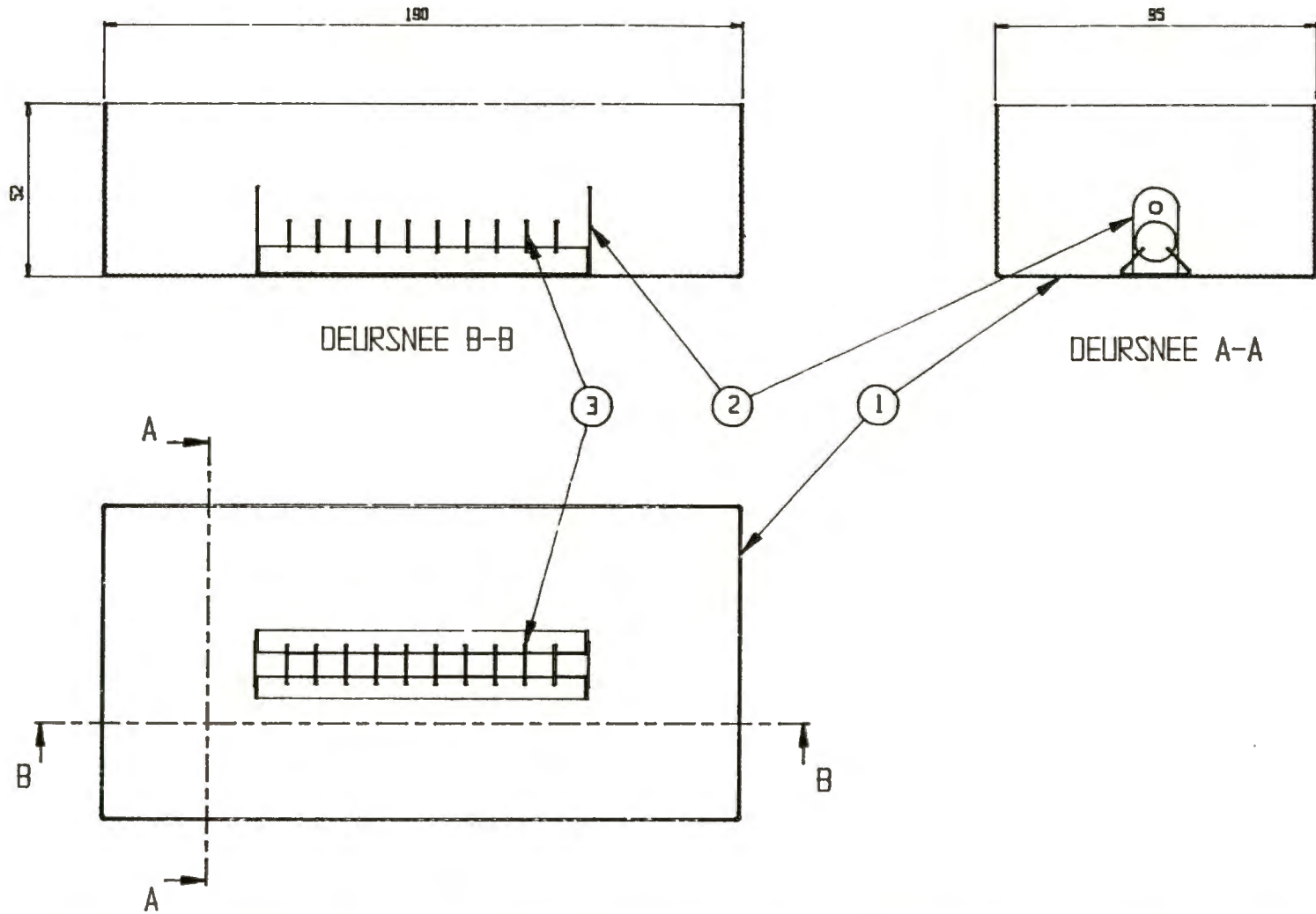
4.3.1 Produksie van ekstraselulêre polisakkariede (EPS)

Al 56 Acinetobacter-isolate se vermoë om EPS te produseer is bepaal. Voorwerpglasies is in 80 ml 11% (m/v) her-saamgestelde, antibiotikavrye afgeroomde melk geplaas en 10 minute by 115°C geoutoklaveer. Agt milliliter oornagkultuur is as inokulum gebruik, waarna die melk 48 uur by 30°C geïnkubeer is. Ligmikroskopiese ondersoeke vir EPS-produksie is na kleuring met 1% (m/v) Alcianblou in 95% (v/v) etanol gedoen (Gurr, 1960:20-21; Gerhardt et al., 1981:31).

4.3.2 Aanhegtingondersoek

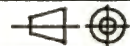
500 ml rou volroommelk is 10 minute by 115°C geoutoklaveer om mikro-organismes te dood. Staalbakkies, met vlekvrystaalskyfies (7 mm in deursnee) in vlekvrystaalkies, is 30 minute by 121°C gesteriliseer.

Die geoutoklaveerde melk is in die aanhegtingtoestel (Figuur 4.1) gegiet. Hierna is die aanhegtingtoestel oornag by die verlangde temperatuur geïnkubeer om sodoende kondisionering van die vlekvrystaalskyfies (Maxcy, 1971:569-673) te bewerkstellig.



FIGUUR 4.1 'n Skematiese voorstelling van die vlekvrystaaltoestel waarmee die aanhegtingonderzoek uitgevoer is

MATERIAAL : VLEKVRYSTAAL
 SKAAL : 1:2



3	STAALSKYF	I	N/A
2	STAALRAK	I	N/A
1	STAALBAK	I	N/A
ITEM	BESKRYWING	HDEV	TEKENING/ MATERIAAL No.
TITEL :		TEKENING No. :	
AANHEGTINGTOESTEL		N/A	

Aktief groeiende selle is met behulp van 'n fisiologiese soutoplossing vanaf twee voedingsagarplate geoes. Die melk in die aanhegtingtoestel is geïnkuleer en totale plaat-tellings is gedoen. Hierna is die aanhegtingtoestel by 20°C en 7°C geïnkubeer. Die vlekvrystaalskyfies is met 'n steriele tangetjie na 24, 48 en 72 uur (20°C), asook na 1, 3 en 6 dae (7°C) verwyder en vir skandeer-elektronmikroskopie (SEM) voorberei. Die prosedure is ook in 'n 1% (v/v) melk-suspensie in water by 7°C uitgevoer. 'n Aanhegtingtoestel met ongeïnkuleerde melk (die kontrole) is by elke ondersoek gebruik.

Om die toestande in melkerytoerusting na reiniging te simuleer, is 'n aanhegtingtoestel waarvan die rakkie met vlekvrystaalskyfies 12 uur in melk en 12 uur buite melk by 20°C geïnkubeer is, gebruik. Hierdie prosedure is drie dae lank herhaal. Die vlekvrystaalskyfies is na 24, 48 en 72 uur verwyder en vir SEM-ondersoeke voorberei.

4.3.3 Voorbereiding van skyfies vir SEM-ondersoeke

Die skyfies is ten minste 24 uur in gemodifiseerde Karnovski-buffer gefikseer (Brand et al., 1987:2). Dit is hierna drie maal met gedistilleerde water gewas en 60 minute in 2% osmiumtetraoksied gefikseer. Nadat dit drie maal met gedistilleerde water gewas is, is dit 30 minute in uranielasetaat geplaas, waarna dit weer drie maal met gedis-

tilleerde water gewas is. Alkoholdehidrering vanaf 60% (v/v) tot 100% (v/v) met tienvoudige toenames in etanolkonsentrasie is minstens vyf uur op die skyfies uitgevoer. Hierna is die skyfies 60 minute in 'n 100% freon:100% etanol (1:1)-mengsel geplaas. Die skyfies is in 100% freon gehou tot en met die SEM-ondersoeke.

Geen kritiese droging is gedoen nie en na die 100% freonbehandeling is die toetsskyfies deur middel van 'n Emscope Temcarb 500-apparaat met koolstof (3-5 nm) en goudpalladium (60:40, 3-5 nm) opgedamp.

4.4 Resultate en bespreking

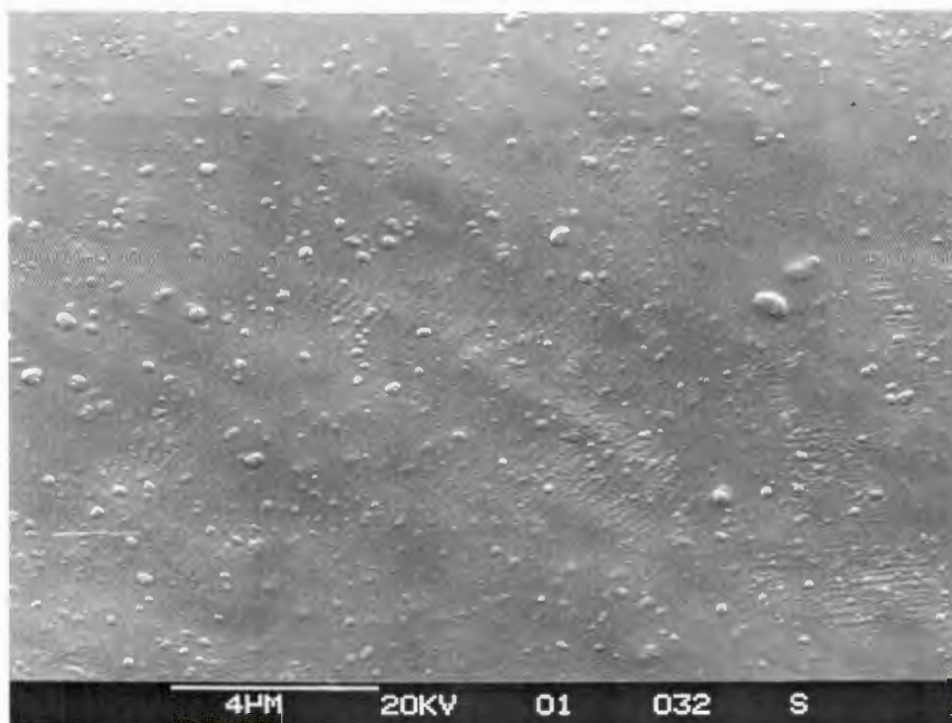
4.4.1 Produksie van EPS (4.3.1)

Aangesien EPS moeilik waarneembaar is met behulp van ligmikroskopie, is Alcianbloukleuring gebruik om die vorming van EPS aan te dui. Al 56 Acinetobacter-kulture van hierdie ondersoek is aan Alcianbloukleuring onderwerp en nie een van hulle het positief gekleur vir die produksie van EPS nie. Die moontlikheid dat Acinetobacter wel onder ander toestande en in ander omgewings in staat kan wees om EPS te vorm, kan nie uitgesluit word nie (vergelyk Gilmour, 1989:30). Indien EPS nie geproduseer word nie kan bakterieë nie onomkeerbaar aanheg nie.

Die selle het slegs op die voorwerpglasie net onder die meniskus van die melk gegroei. Dit is weereens 'n bevestiging dat Acinetobacter 'n verplig aërobe organisme is.

4.4.2 Aanhegtingondersoek (4.3.2 en 4.3.3)

'n SEM-ondersoek van die oppervlakke van skoon vlekvrystaalskyfies het getoon dat hulle oppervlakke ongelik is (Figuur 4.2). Dit is duidelik dat die oppervlak van die skyfies merkbaar varieer. Sommige gedeeltes het 'n gladde voorkoms terwyl op ander gedeeltes groewe en riffels voorkom.



FIGUUR 4.2 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n skoon, ongekondisioneerde vlekvrystaalskyfie (6 000 X)



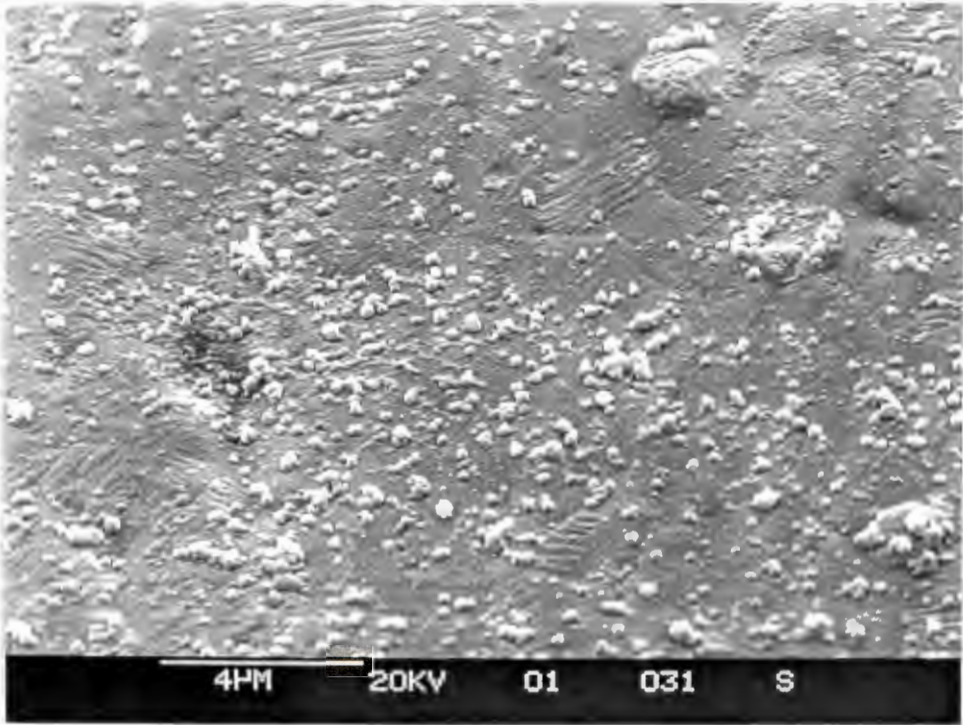
FIGUUR 4.3 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van 'n gekondisioneerde vlekvrystaalskyfie in 'n 1% melksuspensie wat by 7°C geïnkubeer is.

Hierdie groewe en riffels in en op die vlekvrystaalskyfie kan as ideale aanhegtingpunt dien vir organismes aangesien melkreste hierin neergelê word (Figuur 4.3).

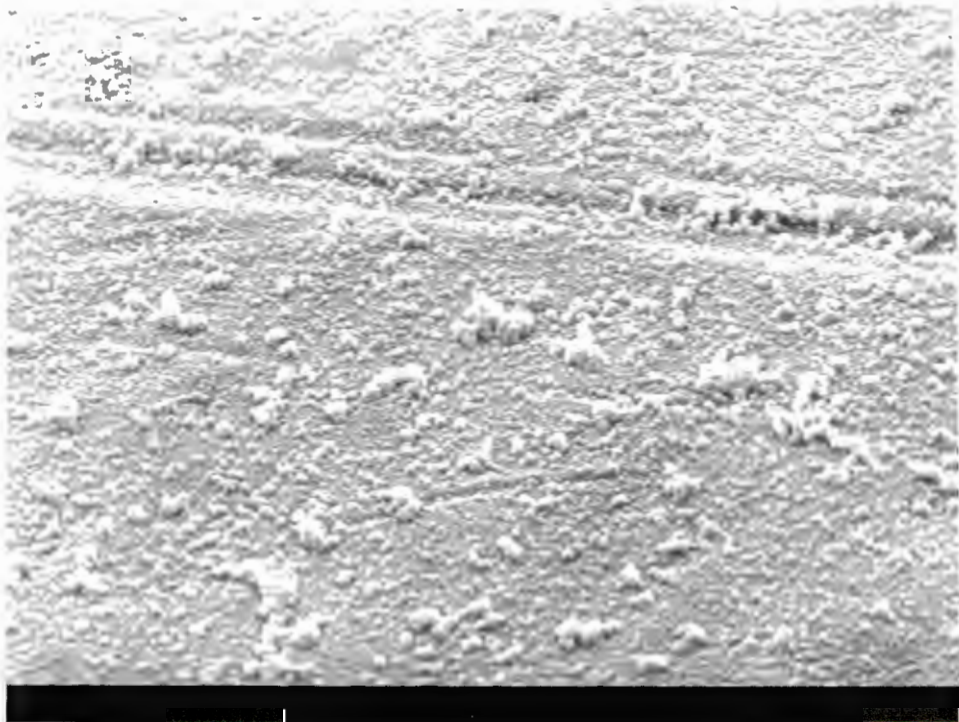
In hierdie ondersoek is volroommelk gebruik asook 'n 1% melksuspensie, omdat klein volumes melk na reiniging in melkerytoerusting aangetref word. Indien hierdie reiniging nie doeltreffend is nie kan aanhegting van organismes plaasvind. Enige biofilm wat so vorm, bind onomkeerbaar aan die oppervlak en kan die kwaliteit van die roumelk asook suiwelprodukte beïnvloed. Die vier verwysingskulture (494, 709, 710a en 792) sowel as M⁺9, M⁺12, M⁺24 en M9 is gebruik.

Tydens die kondisionering van die vlekvrystaalskyfies word melkfilm in verskillende vorme op die skyfies neergelê. Hierdie melkfilm kan as aanhegtingpunt vir organismes dien en voorsien ook in die organismes se voedingsbehoefte. In die SEM-foto's van die kontrole vlekvrystaalskyfies (Figure 4.4 tot 4.9) wat in die verskillende ondersoeke gebruik is, kan die neerlegging van melkfilm op die vlekvrystaalskyfies duidelik waargeneem word (kondisionering).

In Figure 4.4., 4.5 en 4.6 word die oppervlakke van vlekvrystaalskyfies wat vir verskillende tye by 7°C in volroommelk gekondisioneer is, aangetoon. Na 96 uur inkubasie (Figuur 4.5) is daar 'n duidelike toename in die hoeveelheid melkfilm wat op die oppervlak van die skyfie

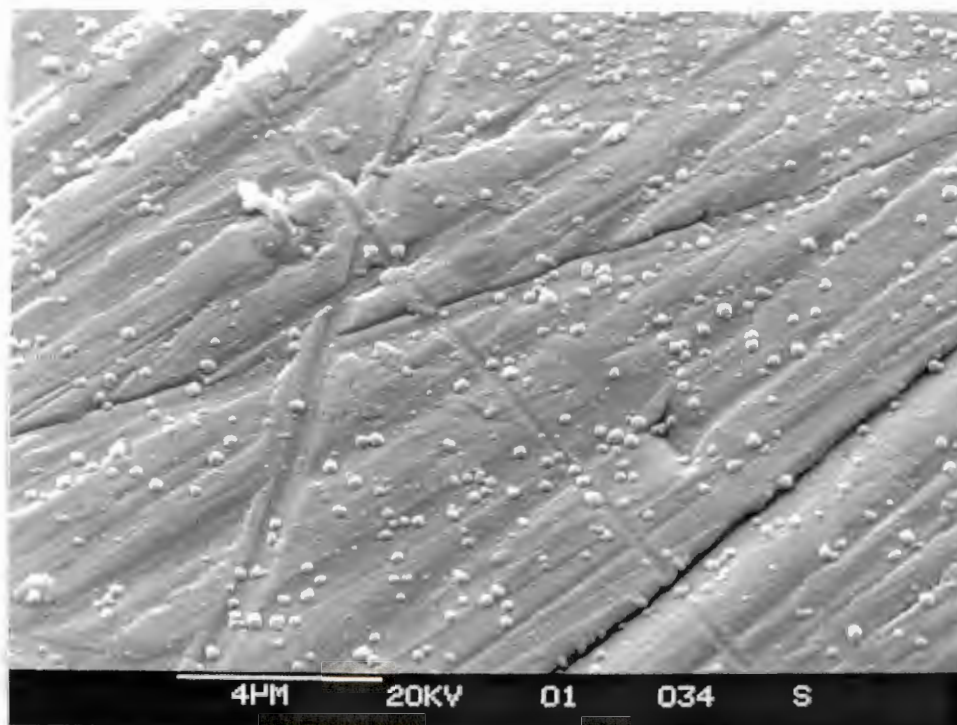


FIGUUR 4.4 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n kontrole-vlekvryestaalskyfie in volroommelk na inkubasie van 24 uur by 7°C (6 000 X)

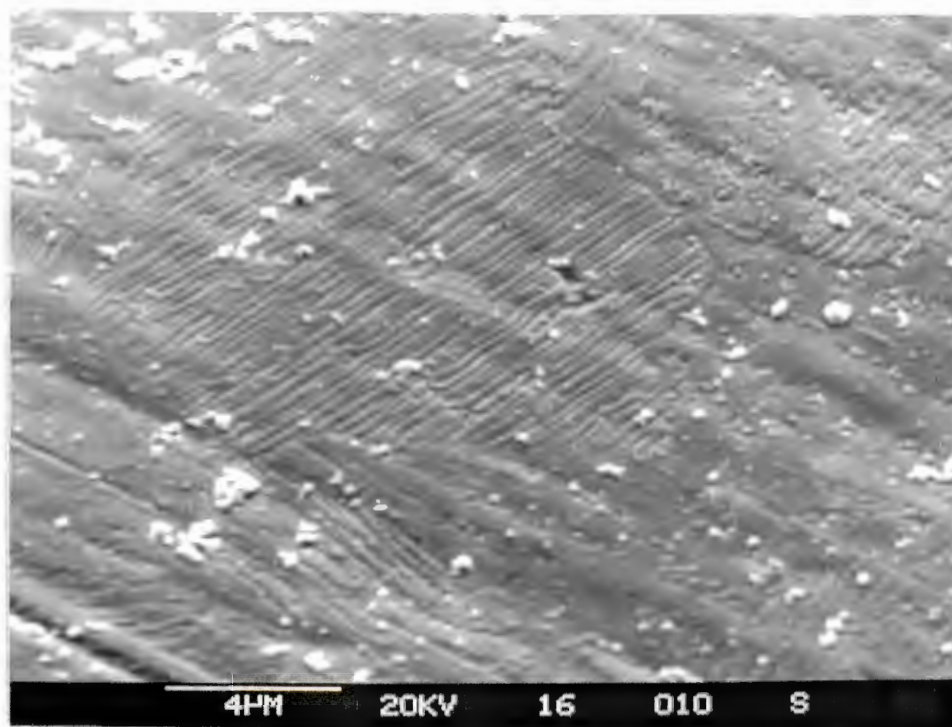


FIGUUR 4.5 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n kontrole-vlekvryestaalskyfie in volroommelk na inkubasie van 96 uur by 7°C (6 000 X)

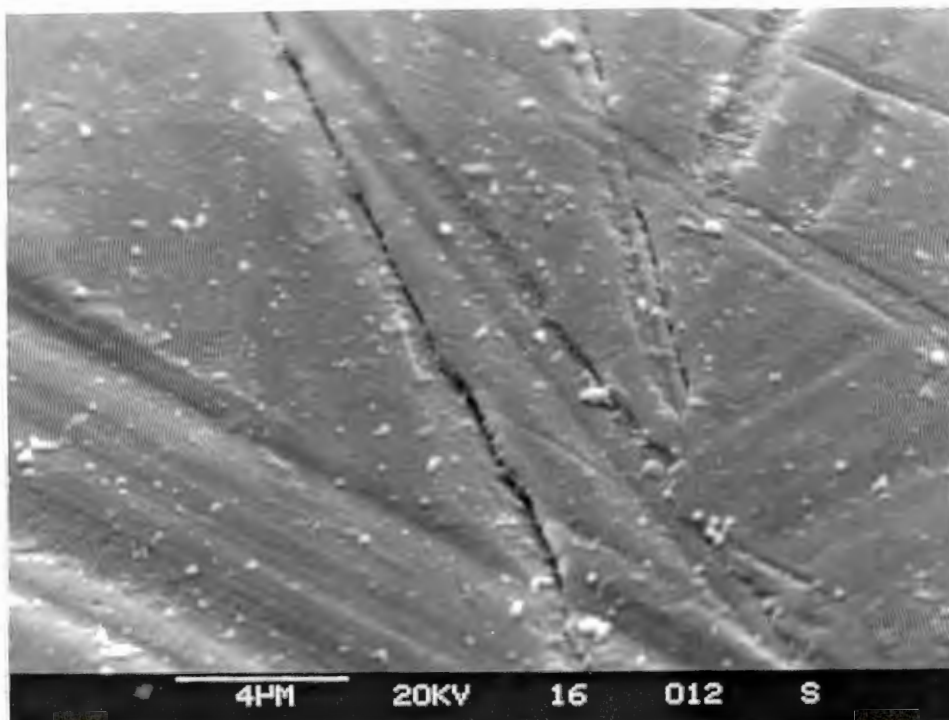
neergelê word in vergelyking met die SEM-foto wat na 24 uur inkubasie geneem is (Figuur 4.4). 'n Duidelike neerlegging van melkvastestowwe bo-oor die aanvanklik neergelegde melkfilm kan na 144 uur op die SEM-foto gesien word (Figuur 4.6). Daar kan aangeneem word dat daar op die oppervlakke van die skyfies wat in volroommelk gekondisioneer is groot hoeveelhede neergelegde voedingstowwe voorkom. Die oppervlakke van die vlekvrystaalskyfies wat in 'n 1% melksuspensie by 7°C gekondisioneer is, word gegee in Figure 4.7, 4.8 en 4.9. Dieselfde tendens as dié in die volroommelk is hier waargeneem. Die hoeveelheid melkvastestowwe wat neergelê word, is egter aansienlik minder as in eersgenoemde geval. Baie minder voedingstowwe word in die geval van die 1% melksuspensie op die vlekvrystaalskyfies neergelê. Alhoewel aanhegtingtoestelle met geïnkuleerde volroommelk by 20°C en 7°C geïnkubeer is, is geen bakterieselle met behulp van SEM-ondersoeke op die oppervlakke van die vlekvrystaalskyfies waargeneem nie. Geeneen van die geselekteerde Acinetobacter-kulture het in volroommelk by 20°C of 7°C aangeheg nie. Die teenwoordigheid van voldoende voedingstowwe kan onder andere as verklaring dien waarom geen aanhegting plaasgevind het nie, want volgens Costerton et al. (1987:436), vind geen aanhegting plaas in omgewings wat ryk is aan voedingstowwe nie. Indien biofilmvorming plaasvind, sal dit waarskynlik in 'n voedingstofarme omgewing soos die 1% melksuspensie geskied.



FIGUUR 4.6 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n kontrole-vlekvryestaalskyfie in volroommelk na inkubasie van 144 uur by 7°C (6 000 X)



FIGUUR 4.7 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n kontrole-vlekvryestaalskyfie in 1% melksuspensie na inkubasie van 24 uur by 7°C (5 000 X)



FIGUUR 4.8 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n kontrole-vlekvryestaalskyfie in 1% melksuspensie na inkubasie van 96 uur by 7°C (5 000 X)



FIGUUR 4.9 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n kontrole-vlekvryestaalskyfie in 1% melksuspensie na inkubasie van 144 uur by 7°C (5 000 X)

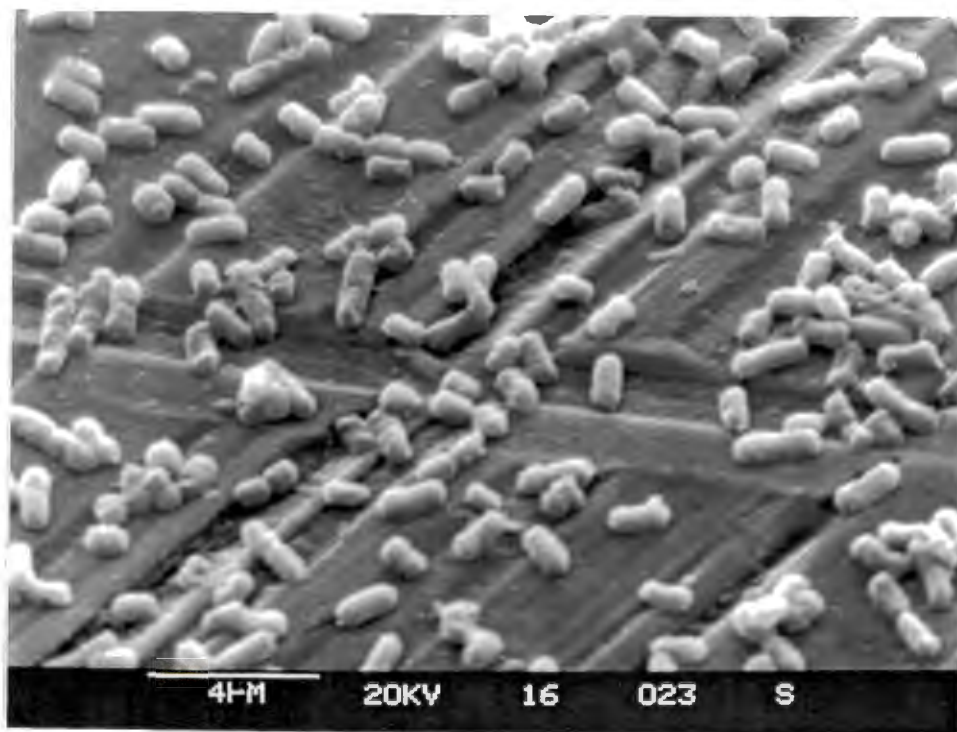
In die 1% melksuspensie het die mate van aanhegting gewissel soos duidelik geïllustreer word deur die resultate wat met die Acinetobacter-kultuur, M⁺9, verkry is. Na 24 uur het daar selle op die oppervlak van die skyfie voorgekom (Figuur 4.10), terwyl daar in Figuur 4.11 'n duidelike vermindering is in die aantal selle wat op die oppervlak voorkom. Na 144 uur is daar meer selle op die oppervlak van die vlekvrystaalskyfie teenwoordig (Figuur 4.12). Dit is belangrik om daarop te let dat die selle in hierdie SEM-foto's die enigste op die oppervlak van die vlekvrystaalskyfies was. As in ag geneem word dat geen aanhegtingstrukture waargeneem kan word nie, moet daar aanvaar word dat Acinetobacter nie in staat is om onder bogenoemde toestande biofilm te vorm nie. Hierdie resultate korreleer met die resultate wat in hierdie ondersoek verkry is dat die Acinetobacter-kulture nie EPS vorm nie (kyk 4.4.1). Sonder EPS-produksie is aanhegting aan oppervlakke met die daaropvolgende vorming van 'n biofilm nie moontlik nie. Die selle wat wel op die oppervlak voorkom heg waarskynlik deur middel van elektrostatische kragte.



FIGUUR 4.10 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n vlekvrystaalskyfie in 'n 1% melksuspensie, wat geïnkuleer is met die Acinetobacter-kultuur M⁺9, na inkubasie van 24 uur by 7°C (5 000 X)



FIGUUR 4.11 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n vlekvrystaalskyfie in 'n 1% melksuspensie, wat geïnkuleer is met die Acinetobacter-kultuur M⁺9, na inkubasie van 96 uur by 7°C (5 000 X)



FIGUUR 4.12 'n Skandeerelektronmikroskopiese foto van die oppervlak van 'n vlekvrystaalskyfie in 'n 1% melksuspensie, wat geïnkuleer is met die Acinetobacter-kultuur M⁹, na inkubasie van 144 uur by 7°C (5 000 X)

'n Aanhegtingtoestel waarvan die vlekvrystaalskyfies 12 uur in melk en 12 uur buite melk by 20°C geïnkubeer is, is gebruik om die toestande in melkerytoerusting na reiniging te simuleer. Geen Acinetobacter-selle is egter op die oppervlakke van die vlekvrystaalskyfies waargeneem nie, terwyl die melkvastestowwe, wat tydens kondisionering op die oppervlak van die vlekvrystaalskyfies neergelê is, droog geword het en soms afgeskilfer het. Hierdie resultate is 'n bevestiging dat organismes voldoende vog nodig het vir biofilmvorming (Maxcy, 1971:569-573).

Die resultate wat in hierdie ondersoek verkry is, verskil van dié van Lewis et al. (1987:282) waar Acinetobacter na 9 uur EPS geproduseer het. Lewis et al. (1987:279-283) het aanhegting van Pseudomonas, Acinetobacter en Micrococcus by 7°C en 30°C op vlekvrystaalvierkantjies wat in melk gekondisioneer ("soiled") is, waargeneem. Die skyfies is met die bogenoemde organismes geïnkuleer, waarna EPS sowel as ander aanhegtingstrukture gevorm is. Die skyfies is in 'n vogtige omgewing, onder aërobe toestande, geïnkubeer. Die residuele melkvastestowwe het voldoende voedingstowwe aan die verplig aërobe organismes verskaf om te koloniseer. Die skyfies is egter nie weer in melk geïnkubeer nie. In teenstelling hiermee het Koutzayiotis (1990:139) ook net enkele Acinetobacter-selle sonder sigbare EPS-produksie waargeneem. Laasgenoemde bevindings korreleer met die resultate wat in hierdie ondersoek verkry is.

HOOFSTUK 5. ALGEMENE BESPREKING EN GEVOLGTREKKING

5.1 Isolering van Acinetobacter

Twee benaderings kan gevolg word om 'n genus of verwante genera te isoleer, naamlik die gebruik van 'n:

- (i) selektiewe medium waarop die groei van 'n spesifieke groep organismes bevorder en ongewenste organismes se groei geïnhibeer sal word of
- (ii) algemene groei-onderhoudende medium waarop die grootste moontlike verskeidenheid bakterieë sal groei.

In laasgenoemde geval kan daar van statistiese seleksie gebruik gemaak word om 'n verteenwoordigende aantal bakterieë van die totale populasie te bestudeer of al die kolonies kan geïdentifiseer word (Harrigan & McCance, 1976:47-49).

Alhoewel 'n selektiewe, chemies gedefinieerde medium die ideaal is om Acinetobacter uit roumelk te isoleer, is daar nog geen sodanige medium beskikbaar nie. Verskeie isolasie-media is in die ondersoek gebruik en daar is gepoog om die mate van selektiwiteit ten opsigte van Acinetobacter te bepaal. Daar bestaan steeds 'n behoefte aan 'n eenvoudige selektiewe medium en 'n vinnige metode om Acinetobacter uit roumelk te isoleer. Spreiplate van melkmonsters is op verskillende media (2.7.4) berei en al die kolonies vanaf

plate met tussen 30 en 300 kolonies is afgetel (Harrigan & McCance, 1976:27). S6 is 'n totaal van 5955 kolonies vanaf die onderskeie isolasiemedia afgetel vir verdere identifisering. Hierdie werkswyse is gevolg omdat die klem in hierdie ondersoek op die isolering van moontlike acinetobacters was en nie op totale tellings nie.

Vanaf die twee chemies gedefinieerde media (MMHN en MMHNP), is onderskeidelik 19 en 14 acinetobacters geïsoleer (Tabel 2.7). Wanneer die totale aantal isolate (5955) in berekening gebring word, is dit duidelik dat die Acinetobacter-isolate vanaf MMHN slegs 0,32% van die totaal uitmaak en dié vanaf MMHNP slegs 0,24%. Beide MMHN en MMHNP is daarom nie geskikte selektiewe isolasiemedia vir Acinetobacter nie. (Kyk 2.8.1 en 2.8.2.)

Gennari et al. (1992:63) het waargeneem dat voedingsagar nie geskik is as isolasiemedium vir Acinetobacter nie. Hulle het beter resultate gekry deur voedingsagar met galsoute en kristalviolet te supplementeer en deur galsoute, kristalviolet en natriumbutiraat by 'n basale mineraalmedium te voeg. Al die pers kolonies wat hulle waargeneem het, is as Acinetobacter en Moraxella beskou en verder ondersoek. In die huidige ondersoek is egter geen acinetobacters vanaf media wat kristalviolet bevat, geïsoleer nie (Tabel 2.7).

Alhoewel Vanderzant et al. (1987:485) goeie resultate verkry het met 'n ryk voedingsagar (triptoon-soja-agar), is in hierdie ondersoek geen acinetobacters vanaf plaat-tellingsagar (PTA) verkry nie (Tabel 2.7). Beide Gennari et al. (1992:63) en Vanderzant et al. (1987:485) se waarnemings sowel as die resultate van hierdie ondersoek, bevestig weereens dat daar tans geen selektiewe isolasiemedium vir Acinetobacter bestaan nie, gevolglik is 'n omvangryke en arbeidsintensiewe ondersoek steeds noodsaaklik om die teenwoordigheid van Acinetobacter in roumelkmonsters te bepaal.

Lede van die genus Acinetobacter is so streng aëroob dat hulle na kort tydperke in 'n vloeistofmedium afsterf. As gevolg van hierdie eienskap van Acinetobacter, is die spreiplaatmetode gebruik om maksimale voorsiening van suurstof gedurende inkubasie te verseker. Gennari et al. (1992:63) en Vanderzant et al. (1987:485) het dieselfde tegniek gebruik.

Geen statistiese seleksie is vir die isolering gebruik nie aangesien die trefwaarskynlikheid daardeur verlaag sou word. Al die kolonies wat vanaf die onderskeie isolasiemedia verkry is, is gesif vir moontlike acinetobacters. 'n Primêre eienskap van Acinetobacter is dat die kolonies ongepigmenteerd is. Hierdie kenmerk is daarom as eerste stap in die siftingproses gebruik. Aangesien die meeste

isolasiemedia wat gebruik is 'n kleurstof bevat, het die kolonies die kleur van die medium aangeneem. Die 5955 kolonies is daarom eers op voedingsagar uitgestreep om pigmentproduksie te bepaal. Gedurende hierdie eerste siftingstap is 5589 gepigmenteerde kolonies uitgeskakel (Tabelle 2.2 en 2.3 asook Figure 2.4 en 2.5). In die literatuur is daar nie genoegsame beklemtoning van die groot aantal gepigmenteerde bakterieë wat in roumelk voorkom nie.

Omdat Acinetobacter oksidase-negatief is, is die 366 ongepigmenteerde kolonies vervolgens met tetrametiel-p-fenileen-diamien-dihidrochloried vir die teenwoordigheid van oksidase getoets. Beweglikheid in die geval van die oksidase-negatiewe kulture is met behulp van die hangdruppelkultuurmetode onder die fasekontrasmikroskoop ondersoek. 'n Verdere 218 kulture is op grond van hulle beweeglikheid uitgeskakel (kyk 2.8.2). Gedurende waarnemings met die fasekontrasmikroskoop is voorlopige afleidings oor die selvorm ook gemaak. Die 148 ongepigmenteerde, oksidase-negatiewe, onbeweeglike isolate is aan verdere primêre fenotipiese toetse onderwerp.

Gennari *et al.* (1992:66) het slegs die plate met die hoogste aantal enkel kolonies ondersoek: sifting van meer as 6000 kolonies is uitgevoer deur óf al die kolonies vanaf een plaat óf 'n verteenwoordigende aantal vanaf 'n plaat onder die fasekontrasmikroskoop vir beweeglikheid en tipiese

selvorm (kort basille) te ondersoek. Na suiwering op voedingsagar is die isolate verder geïdentifiseer. Uit hierdie publikasie is dit nie duidelik hoeveel isolate verder ondersoek is nie.

Griffiths & Phillips (1982:343) het kolonies vanuit roumelk op melkagar gesuiwer. Gram-kleuring en die oksidase-toets is op die suiwer kolonies uitgevoer. Vyftig kulture is aan identifikasie vir **Enterobacteriaceae**, **Acinetobacter** en **Chromobacterium** onderwerp (Griffiths & Phillips, 1982:346,349).

Tydens nie een van die laasgenoemde twee ondersoeke is 'n bevestigende toets vir pigmentproduksie uitgevoer nie, terwyl daar in die huidige ondersoek groot waarde geheg aan is aan dié kenmerk om acinetobacters te isoleer.

5.2 Identifisering

5.2.1 Primêre fenotipiese toetse

Alhoewel die nie-fermenterende Gram-negatiewe bakterieë met gemak in 'n roetine-laboratorium geïdentifiseer kan word met die konvensionele metodes, bly dit tydrowend (vergelyk Gilardi, 1972:65). Die kenmerke van Acinetobacter is duidelik in 2.1, 2.2, 2.3 en 2.6 uiteengesit en die gebruik van die onderskeidende primêre fenotipiese eienskappe om 'n isolaat in die regte genus te plaas, is belangrik. Indien hier gefouteer word, word bakterieë verkeerd geïdentifiseer. 'n Belangrike bydrae van hierdie ondersoek is dat Acinetobacter met so min as agt konvensionele fenotipiese toetse tot op genusvlak geïdentifiseer kon word.

In 5.1 is reeds aangetoon dat moontlike acinetobacters verkry is op grond van die afwesigheid van pigment en oksidase, hulle onbeweeglikheid en selvorm. (Vergelyk ook Gennari et al., 1992:63.) Hierna is die isolate op die oorspronklike isolasiemedie gesuiwer en enkelkolonies is op voedingsagarskuinstes afgetel. Hierdie kulture is weer gekontroleer vir pigmentproduksie waarna Gram-, endospoor- en negatiewe kleuring uitgevoer is. Alle Gram-negatiewe, nie-spoorvormende basille, diplobasille of kokkobasille is aan verdere fenotipiese toetse onderwerp (vergelyk 2.6.1, 2.7.5, 2.7.6, 2.7.7.1 en 2.8).

Kulture wat voldoen het aan die kenmerke van Acinetobacter is weer vir die teenwoordigheid van oksidase getoets, dié keer met vier reagense (kyk 2.7.7.1). Ongepubliseerde data oor die afgelope dekade (Departement Biochemie, PU vir CHO, Potchefstroom) het aangetoon dat isolate verskil in reaksie ten opsigte van die reagens wat gebruik word vir die oksidase-toets. Volgens die literatuur het die navorsers wat isolate as acinetobacters geïdentifiseer het, slegs een reagens gebruik. Dit kon aanleiding gegee het tot moontlike foutiewe identifisering van sommige isolate.

Al die oksidase-negatiewe isolate is vervolgens aan die katalase-toets onderwerp (kyk 2.7.7.1). Katalase-produseerders is hierna elkeen in 'n RF-enkelbuis geïnkuleer en ook getoets vir die vermoë om anaëroob te groei. Die RF-toets is meer sensitief as die OF-toets van Hugh & Leifson (1953:24) aangesien eersgenoemde toets suurproduksie aantoon nadat die pH ongeveer 'n halwe eenheid gedaal het, terwyl laasgenoemde eers suur aantoon nadat die pH ongeveer een eenheid gedaal het. Die meeste navorsers gebruik Hugh & Leifson (1953:24) se metode wat kan bydra tot foutiewe identifisering van isolate. Acinetobacter fermenteer nie glukose nie, gevolglik word baie min of geen suur gedurende respirasie gevorm nie. Die vermoë van Acinetobacter om suur van glukose te vorm, word as kriterium aangewend tydens die klassifikasieproses om tussen A. calcoaceticus en A. lwoffii te onderskei aangesien laasgenoemde suur vanaf glukose vorm.

Acinetobacter is onbeweeglik en besit geen flagellums nie. Alhoewel die hangdruppelkultuurmetode 'n goeie tegniek is vir die bepaling van beweeglikheid by isolate, moet dit op vars, jong kulture uitgevoer word aangesien kulture na 'n tydperk hulle vermoë tot beweeglikheid op vaste media verloor. TEM-ondersoeke is uiters geskik vir die bepaling van die teenwoordigheid van flagellums, want met behulp van die TEM word flagellums duidelik waargeneem en selfs afgebreekte flagellums is sigbaar in die mikroskoopveld. Eubakterieë besit slegs die vermoë van ware beweeglikheid indien dit geflagelleerd is. In die literatuur word in die meeste gevalle nie aangedui of van TEM-ondersoeke gebruik gemaak is nie, gevolglik kan isolate verkeerd geïdentifiseer word. Fimbrieë, wat as moontlike aanhegtingstrukture kan dien, is ook duidelik waarneembaar met laasgenoemde tegniek. Van die 366 ongepigmenteerde isolate was slegs 59 onbeweeglik en ongeflagelleerd. Uit hierdie resultate blyk dit dat die aanvanklike isolate uit die roumelkmonsters oorheersend beweeglik en gepigmenteerd is en dus nie Acinetobacter is nie.

In hierdie ondersoek is waargeneem dat die selle van Acinetobacter soms moeilik ontkleur tydens Gram-kleuring. Hierdie eienskap, asook die pleomorfisme van hierdie organismes, bemoeilik die bepaling van die Gram-reaksie en selvorm van isolate. Laasgenoemde kan egter meer betroubaar met negatiewe kleuring bepaal word.

Uit Tabel 2.7 en Figuur 2.5. is dit duidelik dat slegs 38 isolate wat in hierdie ondersoek uit roumelk geïsoleer is, voldoen het aan die eienskappe van die genus Acinetobacter. Aangesien hierdie isolate aan uiters streng kriteria onderwerp is, kan die afleiding gemaak word dat slegs 0,6% van die totale aantal isolate werklik Acinetobacter was. Wanneer die bevindings van ander outeurs krities beskou word, kan die afleiding gemaak word dat daar moontlik foute tydens identifisering voorgekom het. As voorbeeld hiervan kan die teenwoordigheid van flagellums genoem word, omdat in die meeste ondersoeke nie van die TEM gebruik gemaak is nie. Die benadering wat in hierdie ondersoek gevolg is, is betroubaar in die identifisering van Acinetobacter.

5.2.2 Sekondêre fenotipiese toetse (2.7.7.2)

Sekondêre fenotipiese toetse word uitgevoer om tussen die verskillende variante te onderskei (vergelyk 2.8.3, Tabelle 2.5 en 2.6).

Enkele kulture nl. M⁺24 en N1, het proteolise vertoon deur gelatien te vervloei. Feitlik geen veranderinge is in lakmoesmelk waargeneem nie. Die vermoë om Tween-80 ('n eenvoudige lipied) te hidroliseer het geen ooreenstemmende korrelasie met die hidrolise van komplekse lipiede (VBBA) getoon nie. Laktose en glukose is nie geoksideer nie, al-

hoewel enkele isolate wel glukose in die RF-toets onder aërobe toestande kon respireer (Tabel 2.4).

Uit hierdie resultate is dit duidelik dat Acinetobacter hoofsaaklik geïdentifiseer word op negatiewe eienskappe.

5.2.3. API 20 NE-sisteem

Verskeie mini-toetstoestelle, waaronder API, is kommersieel beskikbaar om Gram-negatiewe basille te identifiseer. Die toetse is veral vir kliniese diagnose uitgewerk (Griffiths & Phillips, 1982:343). In 'n vergelyking van verskeie mini-toetstoestelle met konvensionele identifiseringsmetodes, het die API-sisteem die swakste resultate getoon (Griffiths & Phillips, 1982:343,349). Die toestelle is ook redelik duur in die RSA.

In die huidige ondersoek is reeds geïdentifiseerde kulture geselekteer en aan die API-sisteem onderwerp om die isolate in die subspecies van Acinetobacter calcoaceticus in te deel (kyk Tabel 2.8). Die meerderheid isolate is hiervolgens onder A. calcoaceticus var. lwoffii ingedeel en die oorblywende isolate is as A. calcoaceticus var. anitratum geïdentifiseer.

Wanneer die 20 toetse van die API 20 NE-sisteem van nader beskou word, kan die enkele oksidase-toets as primêre

fenotipiese toets beskryf word, terwyl die ander toetse sekondêre fenotipiese toetse is. Indien in ag geneem word dat Acinetobacter geïdentifiseer word op grond van negatiewe eienskappe, is die API-sisteen nie voldoende vir die identifisering van hierdie genus nie. Al die primêre fenotipiese toetse moet nog op die konvensionele wyse uitgevoer word. Hierdie aanbeveling geld veral vir die oksidase-toets omdat 'n organisme slegs as oksidase-negatief beskou kan word indien 'n negatiewe reaksie met al vier die reagense verkry word (2.8.3).

Tydens die gebruik van die API 20 NE-sisteen om Acinetobacter-kulture in subspesies te verdeel, is geen gelatienhidrolise by die twee organismes M⁺24 en N1, wat wel gelatien met die konvensionele metode gehidroliseer het, waargeneem nie. Nie een van die 56 organismes was in staat om sitraat te verbruik nie, terwyl verskeie sitraat-positiewe reaksies tydens die API-toetse waargeneem is. Aangesien Acinetobacter op grond van negatiewe eienskappe geïdentifiseer word, is die API-sisteme nie geskik vir die vinnige identifikasie van organismes in hierdie genus nie.

5.3 Die vermoë van Acinetobacter om melk te bederf

Die resultate is in 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3., 3.5.4, 3.5.5, 3.5.6 en 3.5.7 bespreek.

Omdat roumelk soms vir relatief lang periodes voor pro-sessering koelopgeberg word, is die bakteriologiese kwaliteit van die roumelk 'n bepalende faktor in die daarstelling van 'n hoë kwaliteit eindproduk. Psigrotrofe bakterieë is as gevolg van die moderne koeltegnologie vir die suiwelbedryf van groot belang.

In hierdie ondersoek was 46 van 56 organismes wat as Acinetobacter geïdentifiseer is in staat om by 10°C te groei, by 36 is psigrotrofe groei by 7°C waargeneem en slegs 10 van die 56 organismes kon by 4°C groei. Net drie isolate wat uit roumelk geïsoleer is, kon nie by 7°C groei nie. Die meerderheid Acinetobacter-kulture wat uit roumelk geïsoleer is, was in staat om psigrotroof te groei. (Kyk 3.5.1.)

Indien 'n organisme wat suiwelprodukte kan bederf, bestand is teen pasteurisasietemperature kan dit die kwaliteit van suiwelprodukte beïnvloed. Slegs twee organismes, N27 en N28, is deur laboratoriumpasteurisasie gedood (Tabel 3.2). Alhoewel die doding van die oorblywende kulture gevarieer het tussen 99,195 en 99,998%, toon die bevindings dat 54 Acinetobacter-kulture wel pasteurisasie oorleef het. (Kyk 3.5.2.)

Daar ontstaan 'n vraag oor die spesifieke meganisme wat sommige van hierdie Acinetobacter-kulture in staat stel om laboratoriumpasteurisasie te oorleef. Aangesien hulle nie

endospore produseer nie moet daar 'n ander meganisme bestaan wat hulle termoduries maak. Watson (1990:183) het aangetoon dat bakterieë stresproteïene produseer as reaksie op ongunstige omgewingsfaktore. Alhoewel hierdie verskynsel nog nie goed verstaan word nie, is dit 'n manier waarop bakterieselle teen stres wat dodelik is, beskerm word. 'n Aantal stresproteïene word gevorm uit reaksie teen 'n hittedok (Watson, 1990:184-186). Hierdie stresproteïene word nie slegs teen hitte gevorm nie, maar ook teen ander ongunstige omgewingsfaktore. Prokariote besit een geen wat kodeer vir een stresproteïen as reaksie op hittedokke (Watson, 1990:194-195).

Die proteïen moet egter 'n belangrike rol speel in die oorlewing van termodure bakterieë gedurende pasteurisasie. Hierdie verskynsel word ook as verworwe termotoleransie beskryf (Watson, 1990:203). Watson (1990:216) voer aan dat navorsing wat op Escherichia coli en Saccharomyces cerevisiae gedoen is, daarop dui dat stresproteïene eerder die selle help herstel van hittedokskade as om hulle teen hitte te beskerm. Alhoewel geen navorsing in die huidige ondersoek gedoen is ten opsigte van voorkoms van stresproteïene in die geval van Acinetobacter nie, kan wel aangevoer word dat die selle wat pasteurisasie oorleef het, moontlik stresproteïene gevorm het.

Die groei van Acinetobacter in melk het nie 'n noemenswaardige invloed op die pH van melk nie. As psigrotrofe organisme is die invloed van hierdie genus op die verandering in pH van die melk weglaatbaar klein (kyk 3.5.3). Geen suur is by die optimum groeitemperatuur van hierdie organisme (30°C) in lakmoesmelk geproduseer nie (kyk 3.5.6). Laktose word nie deur die Acinetobacter-kulture wat in hierdie ondersoek gebruik is, geoksideer nie. Die reduksie van lakmoesmelk by 30°C is 'n bevestiging dat Acinetobacter verplig aëroob is. Isolate N14, N16 en 05 produseer ekstrasellulêre ensieme wat verantwoordelik mag wees vir die vorming van draderigheid in die lakmoesmelk, eerder as proteolise (Gennari et al., 1992:70), aangesien die drie organismes geen proteolise op die melkagarplate getoon het nie (kyk 3.5.4). Slegs N21 is by 7°C proteolities. Onder die laboratoriumtoestande van hierdie ondersoek, veroorsaak nie een van die psigrotrofe Acinetobacter-isolate defekte in melk wat aan lipolise toegeskryf kan word nie (kyk 3.5.5).

Die teenwoordigheid van biogene amiene in verskeie voedselsoorte (waaronder kaas) kan lei tot 'n gesondheidsrisiko vir die verbruiker. Volgens Law (1979:581) kan Acinetobacter proteolise in kaas bewerkstellig. In hierdie ondersoek is waargeneem dat sommige Acinetobacter-kulture wel tirosien- en histidiendekarboksilase besit. As psigrotrofe organismes het 35 van die 38 Acinetobacter-isolate uit roumelk tiramien

geproduseer. Alhoewel 19 Acinetobacter-kulture in staat was om histamien by 30°C te vorm, is geen histamien by 7°C gevorm nie. Acinetobacter kan 'n belangrike rol speel in die produksie van veral tiramien, maar ook van histamien (kyk 3.5.7). Die afleiding kan gemaak word dat die produksie van sekere amiene deur Acinetobacter een van die belangrikste bydraes in die bederf van melkprodukte kan wees. Alhoewel Acinetobacter nie die pH van melk verlaag nie, kan ander bakterieë die pH van melk of 'n produk soos kaas, laat daal sodat dekarboksilering geïnduseer word. In hierdie geval kan Acinetobacter dan 'n belangrike bydrae tot die produksie van amiene lewer. Die kwantitatiewe bepaling van die produksie van amiene en die belangrikheid van amiene is deur verskeie outeurs beklemtoon, soos Voigt et al. (1974:377-381), Taylor et al. (1979:274-278), Niven et al. (1981:321-322), Taylor & Woychik (1982:747-751) en Chen et al. (1989:808-813). (Vergelyk ook 3.3 en 3.4.7.)

Die ondersoek wat uitgevoer is, het getoon dat die potensiële vermoë van Acinetobacter om melk te bederf, gering is. As deel van die normale mikrobiese populasie in melk en melkprodukte kan dit moontlik in konsortium met ander bakterieë 'n meer betekenisvolle bydrae tot bederf lewer.

5.4 Die aanhegtingvermoë van Acinetobacter-kulture

In 4.1 is aangetoon dat mikrobiëse aanhegting nie voorkom in 'n omgewing ryk aan voedingstowwe nie. Melk is 'n omgewing ryk aan voedingstowwe.

Die melk in die aanhegtingtoestel is geïnkuleer met Acinetobacter-selle wat gewissel het van 181×10^6 tot 243×10^6 per ml. Geen EPS-produksie (4.4.1) en aanhegting van Acinetobacter aan vlekvrystaalskyfies is in hierdie ondersoek waargeneem nie (4.4.2 en 4.4.3), alhoewel beperkte elektrostatiese aanhegting voorgekom het. Dit is vanselfsprekend dat indien EPS nie geproduseer word nie, onomkeerbare aanhegting onmoontlik is. Koutzayiotis (1990:115,116) het min EPS-produksie deur Acinetobacter waargeneem, terwyl aanhegting nie voorgekom het nie.

Die resultate in hierdie ondersoek verskil van Lewis et al. (1987:279-384) en Gilmour (1989:30) wat wel aanhegting waargeneem het. Hierdie outeurs het die metaalvierkantjies in melk gekondisioneer ("soiled") en dit dan met enkelselle van Acinetobacter-kulture geïnkuleer. Inkubasie het op klam filtreerpapier onder aërobe toestande plaasgevind en nie in melk nie. Die kulture kon selfs onder psigrotrofe toestande op die melkgekondisioneerde skyfies groei. Lewis et al. (1987:281, Figuur 1(f)) kon aanhegting en produksie van EPS onder hierdie toestande aantoon.

In hierdie ondersoek is gevind dat die Acinetobacter-kulture se metaboliese aktiwiteite wat die kwaliteit van melk beïnvloed, met die uitsondering van amienproduksie, gering is.

LITERATUURLYS

- BAUMANN, P. 1968. Isolation of Acinetobacter from soil and water. *Journal of bacteriology*, 96(1):39-42. ✓
- BAUMANN, P., DOUDOROFF, M. & STANIER, R.Y. 1968. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative Species (Genus Acinetobacter). *Journal of bacteriology*, 95:1520-1541. ✓
- BESTER, B.H., GROENEVELD, H.T. & LOMBARD, S.H. 1986. Prediction of the keeping quality of refrigerated raw milk. *South African journal of dairy science*, 18(1):11-17. ✓
- BIOLAB. 1990. Culture media catalogue. Merck : Midrand. ✓
- BOTHA, W.C. 1985. Verwantskappe tussen die bakteriologiese gehalte van roumelk en die finale suiwelprodukt. ✓
South African journal of dairy technology, 17(4):143-152.
- BOUVET, P.J.M. & GRIMONT, P.A.D. 1986. Taxonomy of the genus Acinetobacter with the recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and emended descriptions of Acinetobacter cal- ✓

coaceticus and Acinetobacter lwoffii. *International journal of systematic bacteriology*, 36(2):228-240.

BØVRE, K. 1984. Family VIII. **Neisseriaceae** Prévot 1933, 119 AL. In : Krieg, N.R. & Holt, J.G., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 288-290.

BØVRE, K. & HAGEN, N. 1981. The family **Neisseriaceae**: rod-shaped species of the genera Moraxella, Acinetobacter, Kingella, and Neisseria, and the Branhamella group of cocci. In : Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G., eds. *The Procaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*, vol 2. New York : Springer-verlag. p. 1507-1529.

BØVRE, K. & HENDRIKSEN, S.D. 1976. Minimal standards for description of new taxa within the genera Moraxella and Acinetobacter: proposal by the subcommittee on Moraxella and allied bacteria. *International journal of systematic bacteriology*, 26:92-96.

BRAMLEY, A.J. & MCKINNON, C.H. 1990. The microbiology of raw milk. In : Robinson, R.K. *Dairy microbiology*, vol. 1. The microbiology of milk. 2nd ed. London : Elsevier Applied Science Publications. 301p.

BRAND, P.A.J., TIEDT, L.R., & HAMILTON-ATTWELL, V.L. 1987. Some observations on the morphology and anatomy of filament type 0041. *Water SA*, 13(1):1-6. ✓

BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. 1988. *Biology of microorganisms*. 5th ed. London : Prentice-Hall International. 835p. ✓

BRUCE, J., DAVEY, G.M. & DRYSDALE, E.M. 1983. A note on a single tube technique for the Hugh and Leifson's oxidation-fermentation test. *Journal of applied microbiology*, 54:143-144.

BRZIN, B. 1963. The influence of temperature on the size and shape of Bacterium anitratum. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, 57:188-198. ✓

BRZIN, B. 1965. Spheroplastic effect of the temperature of incubation on the cells of Bacterium anitratum. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, 63:404-414. ✓

BUXTON, A.E., ANDERSON, R.L., WERDEGAR, D. & ATLAS, E. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with Acinetobacter calcoaceticus. Epidemiologic characteristics. *The American journal of medicine*, 65:507-513.

CHANDER, H., BATISH, V.K, BABU, S. & SINGH, R.S. 1989. Factors affecting amine production by a selected strain of Lactobacillus bulgaricus. *Journal of food science*, 54(4): 940-942. ✓

CHEN, C.M., WEI, C.I., KOBURGER, J.A. & MARSHALL, M.R. 1989. Comparison of four agar media for the detection of histamine-producing bacteria in tuna. *Journal of protection*, 52(11):808-813. ✓

CLOWES, R.C. & HAYES, W., eds. 1968. Experiments in microbial genetics. Oxford : Blackwell Scientific Publ. 244p. ✓

COSTERTON, J.W., CHENG, K.-J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M. & MARRIE, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology*, 41:435-464. ✓

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. & CHENG, K.-J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238:86-95.

COSTERTON, J.W., IRVIN, R.T. & CHENG, K.-J. 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual review of bacteriology*, 35:299-324. ✓

COUSIN, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products : a review. *Journal of food protection*, 74(2):172-207. ✓

COUSIN, M.A. 1989. Physical and biochemical effects on milk components. In : McKellar, R.C., ed. *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Florida : CRC Press Inc. p.205-225. ✓

COUSINS, C.M. & BRAMLEY, A.J. 1981. The microbiology of raw milk. In : Robinson, R.K., ed. *Dairy Microbiology*, vol. 1. London : Applied Science Publishers. p. 119-164. ✓

COWAN, S.T & STEEL, R.J. 1965. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge : University Press. 217p. ✓

CRUICKSHANK, R., DUGUID, J.P., MARMION, B.P. & SWAIN, R.H.A. 1975. *Medical microbiology*, vol 2. The practice of medical microbiology. 12th ed. Edinburgh : Churchill Livingstone. 587p. ✓

DUDDRIDGE, J.E. & PRITCHARD, A.M. 1983. Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. *Proceedings of the conference on microbial corrosion* (Teddington):28-35. ✓

EDWARDS, S.T. & SANDINE, W.E. 1981. Public health significance of amines in cheese. *Journal of dairy science*, 64:2431-2438. ✓

FISCHER, P.L., JOOSTE, P.J. & NOVELLO, J.C. 1987. The seasonal distribution of psychrotrophic bacteria in Bloemfontein raw milk supplies. *South African journal of dairy science*, 19(3):73-76. ✓

FRENCH, G.L., CASEWELL, M.W., RONCORONI, A.J., KNIGHT, S. & PHILLIPS, I. 1980. Hospital outbreak of antibiotic-resistant Acinetobacter anitratus: epidemiology, and control. *Journal of hospital infection*, 1:125-131. ✓

GENNARI, M., PARINI, M., VOLPON, D. & SERIO, M. 1992. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of Psychrobacter and Acinetobacter from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *International journal of food microbiology*, 15:61-75. ✓

GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILOW, R.N., NESTER, E.W., WOOD, W.A., KRIEG, N.R. & PHILLIPS, G.B., eds. 1981. Manual of methods for general microbiology. Washington : American Society for Bacteriology. 524p. ✓

GHREN, M. & VON GRAEVENITZ, A. 1978. Search for Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus: enrichment of fecal samples. *Journal of clinical microbiology*, 8(3):342-343. ✓

GILARDI, G.L., 1972. Practical schema for the identification of nonfermentative Gram negative bacteria encountered in medical bacteriology. *American journal of medical technology*, 38(3):65-72. ✓

GILMOUR, A. 1989. Adherence of bacteria to dairy equipment surfaces. *Milk industries*, 91(12):29-30.

GRIFFITHS, M.W. & PHILLIPS, J.D. 1982. Identification of bacteria of dairy origin using miniaturized test-systems. *Journal of applied bacteriology*, 53:343-350. ✓

GURR, E. 1960. *Encyclopaedia of microscopic stains*. London : Leonard Hill. 498p. ✓

HAMILTON, W.A. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annual review of bacteriology*, 39: 195-217.

HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M.E. 1966. *Laboratory methods in microbiology*. London : Academic Press. 382p. ✓

HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M.E. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. London : Academic Press. 452p. ✓

HAYES, P.R. 1985. Food microbiology and hygiene. London : Elsevier. 403p. ✓

HENRIKSEN, S.D. 1973. Moraxella, Acinetobacter and the Mimeae. *Bacteriological reviews*, 37(4):522-561.

HERMANN, M.N. 1991. Die bedryf se siening van die wetenskaplike navorsing en opleiding van die gegradueerde suiwelkundiges in Suid-Afrika. *Suid-Afrikaanse tydskrif vir suiwelkunde*, 23(1):17-18.

HOLDING, A.J. & COLLEE, J.G. 1971. Routine biochemical tests. In : Norris, J.R. & Ribbons, D.W., eds. *Methods in microbiology*, vol 6A. London : Academic Press. 539p. ✓

HOLTON, J. 1983. A note on the preparation and use of a selective medium for the isolation of Acinetobacter spp. from clinical sources. *Journal of applied bacteriology*, 54:141-142. ✓

HUGH, R. & LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 66:24-26. ✓

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1979. Design and use of CIP systems in the dairy industry. (IDF Document 117: 1979) Brussels : International Dairy Federation. 76p. ✓

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1986. Monograph on pasteurized milk. (IDF Document 200: 1986) Brussels : International Dairy Federation. 98p. ✓

JAY, J.M. 1978. Modern food microbiology. 2nd ed. New York : Van Nostrand. 479p. ✓

JOOSTEN, H.M.L.J. & NORTHOLT, M.D. 1987. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Netherlands milk dairy journal*, 41:259-280.

JOUBERT, W.A. & BRITZ, T.J. 1987. A simple and inexpensive method for the longterm preservation of microbial cultures. *Journal of microbiological methods*, 7:73-76. ✓

JUNI, E. 1984. Genus Acinetobacter. In : Krieg, N.R. & Holt, J.G., eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1. Baltimore : Williams & Wilkins. p. 303-307. ✓

JUNI, E. & HEYM, G.A. 1986. Psychrobacter immobilis gen. nov., sp. nov.: Genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *International journal of systematic bacteriology*, 36(3):388-391. ✓

KERSTERS, K. & DELEY, J. 1971. Enzymatic tests with resting cells and cell-free extracts. In : Norris, J.R. & Ribbons, D.W., eds. *Methods in microbiology*, vol. 6A. London : Academic Press. 539p. ✓

KOUTZAYIOTIS, C. 1990. Die voorkoms en belangrikheid van biofilms in melkpypleidings in die suiwelbedryf. 175p. (Verhandeling (M.Sc.) - P.U. vir C.H.O.) ✓

KRIEG, N.R. & HOLT, B.G., eds. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1. Baltimore : Williams & Wilkins. 964p. ✓

LAMANNA, C. & MALLETTE, M.F. 1965. *Basic bacteriology. Its biological and chemical background.* 3rd ed. Baltimore : Williams & Wilkins. 964p. ✓

LAUTROP, H. 1974. Genus IV. Acinetobacter Brisou and Prévot 1954, 727. In : Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore : Williams & Wilkins. 436-438p. ✓

LAW, B.A. 1979. Review of the progress of dairy science: enzymes and their effects on milk and milk products. *Journal of dairy research*, 46:573-588. ✓

LAW, B.A., ANDREWS, A.T, CLIFFE, A.J, SHARPE, M.E & CHAPMAN, H.R. 1979. Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on Cheddar cheese-making with stored milk. *Journal of dairy research*, 46:497-509. ✓

LAW, B.A. & MABBITT, L.A. 1983. New methods for controlling the spoilage of milk and milk products. In : Roberts, T.A. & Skinner, F.A., eds. Food Microbiology. Advances and prospects. London: Academic Press p.132-150. ✓

LEWIS, S.J., GILMOUR, A., FRASER, T.W. & McCALL, R.D. 1987. Scanning electron microscopy of soiled stainless steel inoculated with single bacterial cells. *International journal of food microbiology*, 4:279-284. ✓

MAXCY, R.B. 1971. Factors in the ecosystem of food processing equipment contributing to outgrowth of microorganisms on stainless steel surfaces. *Journal of milk and food technology*, 34(12):569-573. ✓

MIKOLAJCIK, E.M. 1979. Psychrotrophic bacteria and dairy product quality. 1. Major organisms involved and defects produced. *Cultured dairy products journal*, 14(4):6-10.

MILLIERE, J.B. & VEILLET-PONCHET, L. 1979. Determination of caseolytic psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Dairy science abstracts*, 41(6):366.

MUIR, D.D., PHILLIPS, J.D. & DALGLEISH, D.G. 1979. The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *Journal of the society of dairy technology*, 32(1):19-23. ✓✓

NISHIMURA, Y., KINPARA, M. & IIZUKA, H. 1989. Mesophilobacter marinus gen. nov., sp. nov. : an Anaerobic coccobacillus isolated from seawater. *International journal of systematic bacteriology*, 39(4):378-381. ✓

NIVEN, C.F., JEFFREY, M.B. & CORLETT, D.A. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 41(1):321-322. ✓

PAGEL, J.E. & SEYFRIED, P.L. 1976. Numerical taxonomy of aquatic Acinetobacter isolates. *Journal of general microbiology*, 95:220-232. ✓

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. 1986. Microbiology. 5th ed. New York : McGraw-Hill. 918p. ✓

RICE, S.L., EITENMILLER, R.R. & KOEHLER, P.E. 1976. Biologically active amines in food: a review. *Journal of milk and food technology*, 39(5):353-358. ✓

ROSENBERG, M., BAYER, E.A., DELAREA, J & ROSENBERG, E. 1982. Role of thin fimbria in adherence and growth of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 on hexadecane. *Applied and environmental microbiology*, 44(4):929-937. ✓

ROSSAU, R., VAN LANDSCHOOT, A., GILLIS, M. & DE LEY, J. 1991. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera Moraxella, Acinetobacter and Psychrobacter and related organisms. *International journal of systematic bacteriology*, 41:310-319. ✓

SALLE, A.J. 1973a. Fundamental principles of bacteriology. 7th ed. New York : McGraw-Hill. 1094p. ✓

SALLE, A.J. 1973b. Laboratory manual on fundamental principles of bacteriology. 7th ed. New York : McGraw-Hill. 201p. ✓

SCHUTTE, C.E. 1986. The distribution and metabolic activity of Acinetobacter strains present in an anaerobic digester while treating a petrochemical effluent. 93p. (Verhandeling (M.Sc.) - UOVS). ✓

SENYK, G.F., ZALL, R.R. & SHIPE, W.F. 1982. Subpasteurization of heat treatment to inactivate lipase and control bacterial growth in raw milk. *Journal of food protection*, 45(7):513-515,518. ✓

SKERMAN, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria with methods and digests of generic characteristics. 2nd ed. Baltimore : Williams & Wilkins. 303p. ✓

SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V. & SNEATH, P.H.A, eds. 1980. Approved lists of bacterial names. *International journal of systematic bacteriology*, 30:225-420. ✓

SPEERS, J.G.S., LEWIS, S.J. & GILMOUR, A. 1984. Bacteriological sampling of glass, rubber and stainless steel pipe sections. *Journal of dairy research*, 51:547-555. ✓

STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. & DOUDOROFF, M. 1966. The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *Journal of general microbiology*, 43:159-271. ✓

SUIWELRAAD. 1993. Suiwelsyfers. Statistiese nuusberig van die Suiwelraad. Pretoria : Suiwelraad. ✓

SWART, G.J. 1988. Die voorkoms en beheer van psigrotrofe bakterieë in rou silomelk. 140p. (Verhandeling (M.Sc.Agric) - UOVS). ✓

TARAS, M.J., GREENBERG, A.E., HOAK, R.D. & RAND, M.C., eds. 1971. Standard methods for the examination of water and wastewater. 13th ed. Washington : American Public Health Association. 874p. ✓

TAYLOR, S.L., GUTHERTZ, L.S. & LIEBER, E.R. 1979. Histamine production by Klebsiella pneumoniae and an incident of scombroid fish poisoning. *Applied and environmental microbiology*, 37:274-278. ✓

TAYLOR, S.L. & WOYCHIK, N.A. 1982. Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae. *Journal of food protection*, 45(8):747-751. ✓

TEN BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H.M.L.J. & HUIS IN'T VELD, J.H.J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International journal of food microbiology*, 11:73-84. ✓

THAM, W. 1988. Histamine formation by enterococci isolated from home-made goat cheeses. *International journal of food microbiology*, 7:103-108. ✓

THOMAS, S.B., DRUCE, R.G. & DAVIES, A. 1966. The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk. *Dairy industries*, 31(1):27-31. ✓

THOMAS, S.B. & THOMAS, B.F. 1978. The bacterial content of milking machines and pipeline milking plants. *Dairy industries international*, 43(10):5-10. ✓

VANDERZANT, C., SAVELL, J.W., HAMEY, P.L., ACUFF, G.R., COX, N.A. & BAILEY, J.S. 1987. Indole-induced green to brown-black pigment formation by an Acinetobacter strain from beef. *Journal of food protection*, 50(6):485-486. ✓

VECIANA-NOGUES, M.T., VIDAL-CAROU, M.C. & MARINE-FONT, A. 1989. Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products. *Journal of food science*, 54(6):1653-1655. ✓

VOIGT, M.N., EITENMILLER, R.R., KOEHLER, P.E. & HAMDY, M.K.
1974. Tyramine, histamine, and tryptamine content of
cheese. *Journal of milk and food technology*, 37(7):377-
381. ✓

VOIGT, M.N. & EITENMILLER, R.R. 1977. Production of
tyrosine and histidine decarboxilase by dairy-related bacte-
ria. *Journal of food protection*, 40(4):241-245. ✓

WARSKOW, A.L. & JUNI, E. 1972. Nutritional requirements
of Acinetobacter strains isolated from soil, water and
sewage. *Journal of bacteriology*, 112(2):1014-1016. ✓

WATSON, K. 1990. Microbial stress proteins. *Advances
in applied physiology*, 31:183-273. ✓