

## EEN METHODE TER BEPALING VAN DE YOGHURTRETENTIE

A. GROENEVELD en J. M. FICK

### *Inleiding*

Een groot gedeelte van de onderzoeken naar de talrijke factoren, die de oorzaak van tandcariës kunnen zijn, houden zich bezig met de invloed van de voeding. Doordat men zich daarbij steeds baseert op de chemisch-parasitaire cariëstheorie van MILLER, wordt vooral aandacht geschonken aan voedingsstoffen met een hoog koolhydraatgehalte. Immers, deze koolhydraten kunnen door de mondbacteriën worden omgezet in melkzuur, wat glazuur zou kunnen aantasten als de pH beneden 5,5 komt.

Hoewel ook zure dranken op hun schadelijke werking (cariës en erosie) zijn onderzocht, is weinig of geen aandacht geschonken aan zure melkprodukten. Dit zijn produkten, die niet alleen een lage pH hebben (vaak  $< 5$ ) en bacteriën herbergen die sterke melkzuurvormers zijn, maar bovendien nog vergistbare suiker (nl. lactose) bevatten. Eén van deze produkten is yoghurt. Yoghurt wordt verkregen door aan gepasteuriseerde melk een mengcultuur van *Lactobacillus bulgaricus* en *Streptococcus thermophilus* toe te voegen, in een concentratie van 2,5% en te bebroeden in een waterbad bij 45°C. Na 2½ uur wordt de yoghurt scherp gekoeld en is gereed voor consumptie. De pH is dan  $\pm 4,4$ . Het eindprodukt bevat dan per ml.  $5 \times 10^8$  L. *bulgaricus* en ongeveer evenveel „ketens” *Str. thermophilus*.

Door de consumptie van yoghurt brengen wij behalve een zuur produkt (pH 4,4) en een groot aantal acidogene bacteriën, ook relatief veel vergistbare suiker in de mondholte. De vraag of yoghurt een belangrijke bijdrage kan leveren tot decalcificatie van glazuur, is zonder meer niet te beantwoorden. Een cariogeen effect kan het gevolg zijn van de hoge melkzuurconcentratie (lage pH), het koolhydraatgehalte (lactose en saccharose), of veroorzaakt worden door de acidogene bacteriën, die

tijdelijk, of in het ongunstigste geval voorgoed, deel gaan uitmaken van de vaste flora in de mondholte.

Het is dus van belang te weten *hoeveel* yoghurt in de mondholte achterblijft (retentie) en *hoelang* (retentietijd).

*L. bulgaricus* werd als gidsorganisme gebruikt, dat wil zeggen het aantal uit de mond gekweekte *L. bulgaricus* na het eten van yoghurt werd als maat voor de hoeveelheid achtergebleven yoghurt gebruikt. Door op verschillende tijden na yoghurtconsumptie uit de mond monsters te nemen, kan de retentietijd worden bepaald. Deze methode werd op haar bruikbaarheid onderzocht.

### *Materiaal en methode*

Voor het tellen van *L. bulgaricus* wordt een voedingsbodem, die selectief is voor lactobacillen (ROGOSA, 1951) anaeroob bebroed bij 45°C. *L. bulgaricus* heeft een optimale groeitemperatuur van 45°C. De mondholte daarentegen is arm aan lactobacillen die bij 45°C groeien (< 0,1 % van de totale flora). De lactobacillen die evenals de *L. bulgaricus* bij 45°C groeien vormen tezamen de thermoresistente basisflora en zal in het vervolg kortweg basisflora worden genoemd.

Nadat de proefpersoon gespoeld heeft met leidingwater, om de basisflora minder van het toeval afhankelijk te doen zijn, wordt het eerste monster verkregen door de proefpersoon te laten spoelen met 5 ml fysiologische zoutoplossing. Door het aantal thermoresistente lactobacillen in dit monster te bepalen krijgt men een maat voor de basisflora. De retentie wordt bepaald op vaste tijden na het eten van yoghurt, door te spoelen met 5 ml fysiologische zoutoplossing en in dit monster het aantal thermoresistente lactobacillen te bepalen. De retentie wordt na 1, 10 en 30 minuten afzonderlijk bepaald; voor elke bepaling wordt opnieuw yoghurt gegeten. Deze vier monsters worden na homogeniseren 1/100 verdund, waarna twee rolfljes (JULIUS, 1938) met 4 ml Rogosa medium elk met 1 druppel (= 1/30 ml) uit een gestandaardiseerde Pasteur pipet worden beënt (verdunning 1 : 3000).

De yoghurtproducten verschillen bacteriologisch alle van elkaar. Daarom moet van de gebruikte yoghurt telkens het aantal levende lactobacillen bepaald worden. Een standaarddruppel yoghurt (= 1/40 ml) wordt in 5 ml fysiologische zoutoplossing gedaan, gehomogeniseerd, 1/100 verdund en hiervan wordt één druppel op een rolflasje afgeënt. Het aantal lactobacillen per druppel yoghurtverdunding (1 : 3000) varieert van 300–500, d.w.z. 300–500 kolonies komen overeen met één druppel van de gebruikte yoghurt.

Na  $2 \times 24$  uur bebroeden, anaeroob bij  $45^{\circ}\text{C}$ , wordt het aantal kolonies in de rolfljes geteld. Indien het rolflje van de basisflora kolonies bevat, kan dit aantal afgetrokken worden van de aantallen in de andere fljes. Wat men overhoudt is het aantal *L. bulgaricus* afkomstig van achtergebleven yoghurt.

Een aantal proeven werd gedaan om een indruk te krijgen van:

- I strooiing van de basisflora;
- II efficiency van het spoelen;
- III reproduceerbaarheid.

#### I Strooiing in de basisflora

Het is van belang na te gaan of de basisflora zich gedurende de proef zó wijzigt, dat het van invloed is op de resultaten van de proef. Twee proefpersonen, één met een lage en één met een hoge basisflora, spoelden op tijden 0, 1, 10 en 40 minuten telkens met 5 ml fysiologische zoutoplossing. In elk van de zo verkregen monsters werd op de beschreven wijze een telling gedaan.

tijd in min.	persoon A	persoon B
0	26	1
1	12	1
10	20	0
40	41	0

Tabel I. Aantal thermoresistente lactobacillen per 1/3000 ml spoelvoestof. Twee personen (A en B).

De basisflora van proefpersoon B wijzigt zich eigenlijk niet, terwijl de basisflora van proefpersoon A wel fluctuaties te zien geeft (zie tabel I).

Het aantal gegevens is te klein om er een afsluitende conclusie aan te mogen verbinden. Wel is gebleken, dat door de grote verdunning die wordt toegepast (nl. 1 : 3000) het aantal thermoresistente lactobacillen altijd klein blijft en zo, dat zelfs een „hoge” basisflora de proefresultaten nauwelijks beïnvloedt.

#### II Efficiency van het spoelen

Nadat een proefpersoon yoghurt gegeten heeft, zal niet alle yoghurt, die in de mond achterblijft, er door éénmaal spoelen met 5 ml fysiologische

zoutoplossing uit verwijderd worden. Het is zelfs mogelijk, dat er een hoeveelheid yoghurt in de mond achterblijft, die er zelfs na zorgvuldig spoelen niet uit te verwijderen is.

Om dit na te gaan werd bij een proefpersoon 1 druppel yoghurt in de mond gebracht met de bedoeling deze goed door de mond te spoelen zonder te slikken. Na 1 minuut werd gespoeld met 5 ml fysiologische zoutoplossing. Zo werden ook monsters genomen nadat de proefpersoon respectievelijk 3, 10 of 30 druppels yoghurt door de mond had gespoeld. Na het spoelen met 10 druppels werd echter tweemaal achter elkaar met 5 ml fysiologische zoutoplossing gespoeld en na 30 druppels driemaal. Doordat de proefpersoon niet mag slikken, wordt er behalve de 5 ml fysiologische zoutoplossing ook een hoeveelheid speeksel extra opgevangen. Van de gebruikte yoghurt werd het aantal kolonies per druppel bepaald. Een bepaling van de basisflora van de proefpersoon compleeteerde de reeks. De monsters werden 1/100 verdund en afgèent in een rolflesje met één standaarddruppel (in duplo). Deze proef werd een drietal malen op verschillende dagen uitgevoerd bij dezelfde proefpersoon. (zie tabel II).

hoeveelheid ingebrachte yoghurt	Experiment I		Experiment II		Experiment III	
	teruggevangen hoeveelheid vloeistof/ml.	aantal gevonden kolonies	teruggevangen hoeveelheid vloeistof/ml.	aantal gevonden kolonies	teruggevangen hoeveelheid vloeistof/ml.	aantal gevonden kolonies
1 druppel	7.4	116	7.0	105	7.9	118
3 druppels	7.2	505	6.6	490	7.9	189
10 drp. 1e maal spoelen	7.1	1180	6.6	1340	8.2	700
2e maal spoelen	5.4	125	5.1	103	6.2	76
30 drp. 1e maal spoelen	8.1	2970	8.8	2600	9.5	1983
2e maal spoelen	5.4	297	5.2	208	6.2	238
3e maal spoelen	5.4	41	5.2	39	6.0	0
blanco yoghurt 1/3000 ml.	—	250	—	167	—	131
basisflora	5.4	1	5.2	0	5.7	1

Tabel II. Efficiency van het spoelen. Drie experimenten. Hoeveelheid teruggevangen yoghurt plus speeksel, na inbrengen van een bepaalde hoeveelheid yoghurt en de aantallen kolonies in de rolflesjes (gemiddelde van een bepaling in duplo).

Past men op tabel II de volgende formule toe:

$$\frac{\text{teruggevangen hoeveelheid spoelvloeistof in ml}}{5} \times \frac{\text{aantal gevonden kolonies}}{\text{aantal gevonden kolonies in blanco yoghurt}}$$

dan krijgt men de uitgespoelde hoeveelheid yoghurt uitgedrukt in aantal druppels yoghurt (zie tabel III).

	uitgespoelde yoghurt		
	Experiment I	Experiment II	Experiment III
1 druppel	0.7	0.9	1.4
3 drp.	2.9	3.8	2.3
10 drp. 1e maal	6.7	10.6	8.8
2e maal	0.5	0.6	0.7
totaal	7.2	11.2	9.5
30 drp. 1e maal	19.2	27.0	28.7
2e maal	1.2	1.3	2.3
3e maal	0.2	0.2	0.0
totaal	20.6	28.5	31.0

Tabel III. Efficiency van het spoelen. De getallen van tabel II omgerekend in druppels teruggevangen yoghurt.

In figuur 1 is het resultaat grafisch afgebeeld.

Uit het verloop van de curves II en III mag men concluderen, dat de hoeveelheid ingebrachte yoghurt geheel uitgespoeld wordt. Er zijn kleine afwijkingen, die evenwel binnen de proeffout van de methode lijken te liggen. Ook curve I toont dit resultaat, behalve na het inbrengen van 30 druppels. De hoeveelheid uitgespoelde druppels is in dit laatste geval aanzienlijk te laag. Men kan nauwelijks aannemen dat dit alleen de toevallige fout van de methode is. Ook is het onwaarschijnlijk dat  $\pm 10$  druppels yoghurt na  $3 \times$  spoelen zouden kunnen achterblijven. Het meest waarschijnlijk is, dat de proefpersoon in dit geval toch geslikt heeft, zodat er yoghurt verdwenen is.

Uit de cijfers is nog het volgende af te leiden. Brengt men 10 of meer

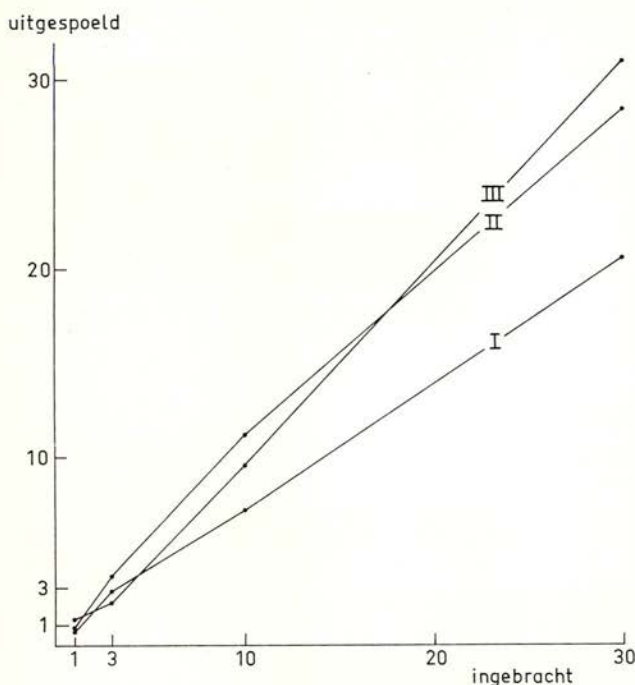


Fig. 1. Efficiency van het spoelen. Drie experimenten. Aantal ingebrachte en uitgespoelde druppels yoghurt.

druppels in de mond, dan moet men twee- of driemaal spoelen om de totale hoeveelheid yoghurt uit te spoelen. Spoelt men een aantal malen na elkaar, dan neemt bij iedere keer spoelen de hoeveelheid yoghurt met ongeveer een factor 10 af. Dat betekent, dat men door éénmaal spoelen  $\pm 90\%$  van de gereteneerde yoghurt weer uitspoelt!

### III De reproduceerbaarheid van de retentiebepaling

Door een drietal proefpersonen werd na monsternamen van de basisflora yoghurt gegeten. Na 10 minuten werd weer gespoeld met 5 ml fysiologische zoutoplossing en volgens de tevoren beschreven methode behandeld (experiment I). Na een uur werd opnieuw yoghurt gegeten en de procedure herhaald (experiment II). Na twee uur tenslotte werd het experiment nogmaals herhaald (experiment III).

Voor elke telling werden drie rolfljes afgeënt (zie tabel IV). Uit deze telling in triplo kan de proeffout van de bepaling worden berekend. Het blijkt dat de standaardafwijking voor elke afzonderlijke afenting en tel-

proefpersonen	Experiment I			Experiment II			Experiment III		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
aantal kolonies	149	267	205	230	252	350	133	182	203
in triplo	194	334	278	249	301	294	154	175	196
bepaald	165	358	318	247	315	329	168	189	210
gemiddeld	169	319	267	242	290	324	152	182	203

Tabel IV. Reproduceerbaarheid van de retentiebepaling. Drie proefpersonen A, B en C.

ling ongeveer 10 % van het gemiddelde is. Indien, zoals in dit onderzoek het plan is, elke enting en telling in duplo wordt gedaan, wordt de standaardafwijking van de telling ongeveer 8 %. Dit laatste getal is zeker aanvaardbaar.

Bij elk van de drie personen is de retentieproef driemaal herhaald (experiment I, II en III). De uitkomsten vertonen onderling vrij grote afwijkingen. Zo werden voor persoon A in de drie experimenten gemiddeld resp. 169, 242 en 152 kolonies geteld (zie onderste regel van tabel IV). In deze uitkomsten is de fout van de bepaling zelf gering, doordat de getallen telkens van de telling in triplo afkomstig zijn. Gezien de efficiency van het spoelen (zie onder III) moeten dit ware verschillen zijn. Blijkbaar kan de grootte van de retentie onder schijnbaar dezelfde condities vrij sterk afwijken. De standaardafwijking van de hoeveelheid yoghurt die bij eenzelfde persoon na het eten van yoghurt achterblijft blijkt ongeveer 25 % te zijn van de gemiddeld achtergebleven hoeveelheid. Dit betekent dat er 95 % kans is dat de waarde welke men bij een persoon voor de yoghurtretentie vindt in één afzonderlijke bepaling niet meer dan 50 % van de gemiddelde retentie bij deze zelfde persoon zal afwijken. Deze afwijking wordt bepaald door oncontroleerbare factoren als bv. toevallige tongbewegingen, waardoor meer of minder van de yoghurt verwijderd wordt.

#### *Tijd van afenten*

Het lag in de bedoeling de methode toe te passen bij een onderzoek buiten het laboratorium. Dat hield in, dat de monsters pas na verloop van tijd beënt en bebroed konden worden. Uit een experiment bleek, dat het bewaren van de monsters zelfs gedurende 1 ½ uur geen systematische verschillen opleverde (zie tabel V).

	a	b
blanco yoghurt	238	180
basisflora	15	17
1'	1056	1144
10'	167	132
30'	73	57

Tabel V. Tijd van afenten.

a. monsters direct afgeënt b. monsters na 1½ uur afgeënt.

*Resultaten en discussie*

Tabel VI bevat de resultaten verkregen uit een groter onderzoek van een vijftal geselecteerde proefpersonen, die onderling sterk verschillen. Proefpersoon I heeft een hoge basisflora, terwijl de anderen geen thermoresistente lactobacillen in de basisflora hebben. Proefpersoon II heeft nog een hoge retentie na 10 min. en na 30 min., proefpersoon III een hoge retentie na 10 min., maar een lage na 30 min. De proefpersonen IV en V hebben lage waarden na 10 min. en 30 min.

proef- soon	basisflora		1 min.			10 min.			30 min.		
	duplobep.	gem.	duplobep.	gem.	duplobep.	gem.	duplobep.	gem.	duplobep.	gem.	
31	34	32	1232	1078	1155	124	118	121	49	54	52
0	0	0	476	406	441	251	250	250	87	53	52
0	0	0	262	269	266	124	138	131	1	4	3
0	0	0	462	553	507	27	32	30	0	0	0
0	0	0	236	269	252	1	3	2	0	0	0

Tabel VI. Resultaten verkregen uit een vijftal geselecteerde proefpersonen uit een groter onderzoek (gemiddeld aantal lactobacillen per druppel yoghurt is 409).

Figuur 2 geeft dit grafisch weer. Langs de x-as is de retentietijd uitgezet. Langs de y-as de logaritmen van het gemiddeld aantal gevonden kolonies. De logaritme van het aantal wordt gegeven omdat bij dit soort proeven (vergelijk: II Efficiency van het spoelen) de hoeveelheid logaritmisch afneemt. Ook wanneer rekening gehouden wordt met de standaardafwijking van de bepaling is de retentie na 1 minuut maximaal niet groter dan 4 à 5 druppels yoghurt. Na 10 minuten is de retentiebepaling bij slechts één proefpersoon zo klein, dat de gevonden waarde zeer dicht in de buurt van de basisflora komt. Eén proefpersoon (II) houdt ook na



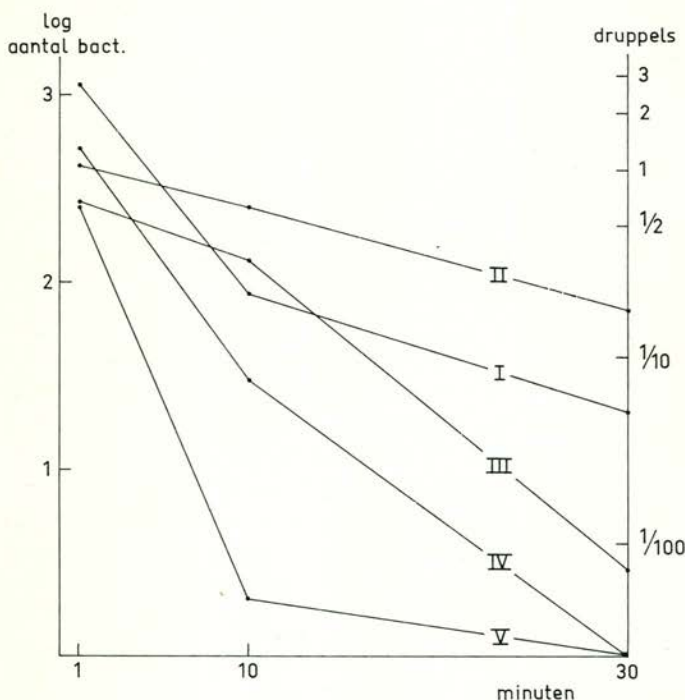


Fig. 2. Een vijftal geselecteerde proefpersonen. Horizontaal zijn uitgezet de tijden waarop de monsters genomen werden. Verticaal: links de logarithme van het aantal gevonden kolonies (na aftrek van de basisflora); rechts geeft het aantal kolonies uitgedrukt in druppels van de gebruikte yoghurt.

30 min. nog een relatief hoog aantal lactobacillen,  $\sim 1/5$  druppel yoghurt.

Het aantal gegevens is nog te gering om een uitspraak te kunnen doen omtrent de gemiddelde retentie van yoghurt. Bovendien moet bedacht worden dat ten aanzien van een invloed van de yoghurt op het ontstaan van cariës nog vele andere factoren een rol zullen spelen. Verder onderzoek hieromtrent is gaande.

*Samenvatting: Een methode ter bepaling van de yoghurtretentie.*

Een methode werd beschreven om de retentie van yoghurt te bepalen. Na yoghurtconsumptie werd de in yoghurt voorkomende *Lactobacillus bulgaricus* uit de mondholte met behulp van 5 ml fysiologische zoutoplossing teruggevangen en op een selectief medium bij 45° C gekweekt. Ook van de gebruikte yoghurt werd het aantal *L. bulgaricus* per druppel bepaald. Het aantal teruggevangen bacteriën kan nu worden omgerekend in druppels yoghurt.

De invloed van de thermoresistente basisflora is door het relatief kleine aantal thermoresistente bacteriën in de mondholte en door de toegepaste verdunning zeer klein. Door éénmaal met 5 ml fysiologische zoutoplossing te spoelen werd ongeveer 90 % van de geretineerde yoghurt teruggevangen.

De standaardafwijking van de methode zelf blijkt klein te zijn, namelijk voor de afzonderlijke waarneming 10 % van het gemiddelde. De hoeveelheid achtergebleven yoghurt is ook voor eenzelfde persoon verre van constant en blijkt een standaardafwijking te hebben van ongeveer 25 % van het gemiddelde.

Aan de hand van een vijftal geselecteerde proefpersonen uit een groter onderzoek werd de toepasbaarheid van de methode gedemonstreerd.

De auteurs willen van deze gelegenheid gebruik maken Prof. O. BACKER DIRKS en Prof. Dr. K. C. WINKLER te danken voor de zeer waardevolle adviezen, gedurende de ontwikkeling van deze methode gegeven.

*Summary: A method to determine yogurt retention.*

A method of determining yogurt retention is described. After yogurt consumption, the *Lactobacillus bulgaricus* contained in yogurt was recovered from the oral cavity by rinsing with 5 ml. physiological saline, and cultured on a selective medium at 45° C. In the sample of yogurt used, the number of *L. bulgaricus* per drop was counted. The number of bacilli recovered could then be converted into drops of yogurt.

The influence of the thermo-resistant basic flora is very small because of the relatively small number of thermo-resistant bacilli in the oral cavity and the dilution used. By a single washing with 5 ml. physiological saline, about 90 % of the retained yogurt was recovered.

The standard deviation of the method as such proves to be small (10% of the mean for the individual observation). The quantity of yogurt retained shows considerable intraindividual variation and proves to have a standard deviation of about 25 % of the mean.

The validity of the method was demonstrated in five selected test subjects from a more extensive material.

The authors wish to thank Prof. O. BACKER DIRKS and Prof. Dr. K. C. WINKLER for valuable advice received while they were developing this method.

*Literatuur:*

- JULIUS, H. W., 1938. Een methode voor het tellen van levende bacteriën, vervanging voor de plaatmethode. *Antonie van Leeuwenhoek*, 5, 28-34.
- ROGOSA, M., MITCHELL, J. A. and WISEMAN, R. F., 1951a. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Bact.* 62, 132.
- ROGOSA, M., MITCHELL, J. A. and WISEMAN, R. F., 1951b. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Dent. Res.* 30, 682.

Dorpsstraat 27, Doorn.  
Moolengraafaan 3, Vught.