

# BACTERIUM PITUITOSO-COERULEUM N. Sp.

DOOR

DR. N. GOSLINGS.

---

Bij gelegenheid van het onderzoek van verschillende soorten melk op hun microbengehalte, stuitte ik op een monster melk, dat geheel blauw geworden was, waarschijnlijk door infectie met lucht uit het laboratorium. Deze blauwkleuring der melk was des te merkwaardiger, omdat ik in mijn laboratorium nog nooit met een blauwe pigmentvormende microbe gewerkt had, en de aard der verkleuring, alsmede het gelijktijdig optreden van slijm, terstond deden vermoeden, dat ik met een andere microbensoort te doen had dan met de *Bacillus cyanogenes*, die gewoonlijk de oorzaak is van het spontane blauw worden der melk. In het algemeen is het blauw worden van een cultuurvloeistof onder invloed van microben iets bijzonders, omdat het getal soorten, dat een blauwe kleurstof vormt, klein is. Toch is het verschijnsel van het blauwworden der melk reeds lang bekend. Reeds in 1838 maakte Steinhoff gewag van dit feit, en drie jaar later, in 1841, Fuchs, die tevens aantoonde dat dit verschijnsel kon worden overgeplant op andere, normale, melk en dat het blauw-zijn der melk steeds gepaard gaat met het gelijktijdig optreden van de *Vibrio cyanogenes*, die door Ehrenberg beschreven werd. Later is de blauwe melk zoowel als de microbe, die deze verkleuring veroorzaakt, herhaalde malen beschreven geworden. Een van de beste beschrijvingen is wel die van Hueppe. <sup>1)</sup>

---

1) „Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Microorganismen“, Mitteilungen aus dem Kais. Gesundheitsamte, Bd 2 (1884) pg. 355.

Hueppe was ook de eerste, die bij zijn proeven met de *B. cyanogenes* met de absolute reïnculturen van dit organisme heeft gewerkt, een eisch voor elke nauwkeurige beschrijving van een microbensoort. Hij vond dan, dat de microbe zich gemakkelijk op de gebruikelijke voedingsbodems, zooals vleeschpeptongelatine, weigelatine e.a., kweken laat, aanvankelijk als zeer kleine koloniën, die aan den groei van melkzuurfermenten doet denken, bij overenting van vleeschgelatine op gelijken voedingsbodem worden echter geleidelijk grootere koloniën gevormd. Het organisme moet zich dus aanpassen aan den voor hem vreemden voedingsbodem. De microben, die zich door herhaald overenten hebben aangepast aan de alkalische vleeschgelatine, groeien daarop als niet vervloeiende kolonies, die ongeveer dubbel zoo groot worden als die der melkzuurfermenten. De omgeving der kolonies wordt groen tot geelgroen gekleurd, al naar de gelatinesoort, die gebruikt wordt; weigelatine wordt grauwbauw gekleurd. De microben zelf zijn sporenvormende beweeglijke staven, van een lengte van 2,3—3,5  $\mu$  en een breedte van 0,3—0,5  $\mu$ . Wanneer melk, gekookt of ongekookt, geënt wordt met een reïncultuur van de *Bac. cyanogenes*, dan wordt ze zonder uitzondering blauw. De aard van de verkleuring is echter afhankelijk van den kookduur. Melk, die maar even is opgekookt, wordt evenals ongekookte melk grauwbauw tot hemelsblauw. De kleur is aan de oppervlakte het sterkst en neemt naar beneden snel af. Steriele melk, die langer dan een half uur heeft gekookt, wordt nooit intensief blauw, maar wordt slechts zwak blauw gekleurd. Het mooist treedt de blauwkleuring op in gewone, onbehandelde melk, als gelijktijdig met de *Bac. cyanogenes* de melkzuurfermenten zich kunnen ontwikkelen. Een zwakzure reactie is bevorderlijk voor het ontstaan van de blauwe kleur, die het meest intensief is bij een zuurhalte van 0,2—0,3 %. Hoe langzamer echter de zuurvorming is, hoe intensiever de blauwe kleur. Steriele melk, die door den groei van de *Bac. cyanogenes* matblauw gekleurd is, wordt direct veel intensiever blauw na toevoëging van een geringe hoeveelheid zuur. Zoolang de melk intensief blauw is, is de zure reactie gering. Hueppe neemt aan, dat de *B. cyanogenes* de melksuiker intact

laat, aangezien het suikergehalte van ongeënte en met die bacterie geënte melk dezelfde is.

Steriele melk gedraagt zich ten opzichte van het zuur worden ook anders dan rauwe melk; ze wordt in het geheel niet zuur, maar zwak alcalisch en coaguleert niet. Het geheele verschijnsel van het blauw worden treedt het duidelijkst op in afgeroomde melk, aangezien de room nooit zoo intensief blauw wordt als ondermelk. Volgens Hueppe is de blauwe kleur gebonden aan het caseine-molecuul.

Ook in een kunstmatigen voedingsbodem van de volgende samenstelling:

Wijnsteenzure ammoniak	0.5—1	%
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2—0.5	„
$\text{Mg SO}_4$	0.05—0.25	„
$\text{Ca Cl}_2$	0.01—0.025	„

evenals in de Cohn'sche oplossing wordt door den groei van de *B. cyanogenes* een kleurverandering te voorschijn geroepen, die meest tusschen groenachtigblauw en groenachtiggeel varieert, terwijl de zure reactie overgaat in een alcalische. Deze groenachtige kleur laat zich door oxydatie-middelen omzetten in blauw. Ook in oplossingen van ureum (0.5—1 %), asparagine (0.5—1 %), leucine (0.5—1 %) wordt een groene kleurstof gevormd, die in blauw kan worden omgezet. In oplossingen van pepton trad geen verkleuring op, ook niet in die van glucose en gewone suiker, die pepton als stikstofbron hadden, wel als wijnsteenzure ammoniak als stikstofbron genomen was.

De beste voedingsbodem ter verkrijging van de blauwe kleur is volgens Hueppe een oplossing van:

neutrale melkzure ammoniak	0.5—1	%
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2—0.5	„
$\text{Mg SO}_4$	0.05—0.25	„
$\text{Ca Cl}_2$	0.01—0.025	„

De optimum-temperatuur is gelegen tusschen 15—18° C., begint echter reeds bij 10—12°, en vindt boven 37° niet meer plaats.

Schadelijk voor de gezondheid schijnt de blauwe melk niet te zijn, zooals voedingsproeven en subcutane injecties op jonge dieren hebben aangetoond. Kleine kinderen schijnen bij het gebruik soms diarrhee te krijgen, ofschoon

't mij onwaarschijnlijk toelijkt, dat er moeders geweest zullen zijn, die hunne zuigelingen met dergelijke blauwe melk gevoed hebben.

Ludwig Heim, die het organisme van de blauwe melk ook aan een nauwkeurig onderzoek heeft onderworpen, vond, in afwijking met Hueppe, dat de *B. cyanogenes* geen sporen vormt.

Behalve van de *B. cyanogenes* vinden we in de literatuur in korte mededeelingen nog gewag gemaakt van een paar andere blauwe kleurstofvormende microben, die bij gelegenheid uit water geïsoleerd zijn. Bij nader onderzoek bleek, dat deze soorten alle op vleeschgelatine groeien als kleine blauwe kolonies. Voorts geeft Zangemeister nog een korte beschrijving van een eveneens de melk blauwkleurende microbensoort, die hij in spontaan blauw geworden melk had gevonden. Ook deze microbe bleek bij nader onderzoek niet identisch te zijn met de *B. cyanogenes*, maar daarmee te verschillen o.a. wat haar verhouding betreft tegenover gesteriliseerde melk, die niet blauw wordt.

Wat het slijmvormend vermogen betreft, dit is een eigenschap van de microben, die meer algemeen verbreid is dan het vormen van een blauw pigment. De slijmvormende microben komen vrij algemeen in suikerhoudende sappen voor, en de industriën, die zulke sappen verwerken, ondervinden er dikwijls het nadeel van. Vooral in de melk komen er verscheidene slijmvormende soorten voor, die goed zijn beschreven en waarvan vooral de *Streptococcus hollandicus*, de microbe der lange wei, voor ons van belang is. Maar ook in de suikersappen van biet en riet treden slijmgistingen op, die veroorzaakt worden door de *Leuconostoc mesenterioïdes* en *Bacterium pediculatum*.

Eveneens zijn slijmige omzettingen van wijn en bier bekend, die voor die producten zeer nadeelig zijn en bepaald als ziekten worden aangemerkt en die ook door bacteriën worden veroorzaakt, evenals het lang worden van het brood.

Bij deze slijmige omzettingen, die bij voorkeur in oplossingen van suikers optreden, maar die toch ook kunnen voorkomen in vloeistoffen waarin geen suikers aanwezig zijn, kan de oorzaak van de slijmigheid verschillend zijn. Zoo is bij de *Leuconostoc mesenterioïdes*, de oorzaak van

het slijmig worden van de vloeistoffen toe te schrijven aan het slijmhulsel, dat om die microkok voorkomt. Vooral bij dit organisme kan dit slijmhulsel zóó groot zijn, dat het vele malen grooter is dan de microbe zelf. Bij andere microben, zooals bij de *Bacillus lactis viscosus* Adametz e. a., is het slijmhulsel lang zoo sterk niet ontwikkeld en bij nog andere, en wel het meerendeel der slijmvormende microben, ontbreekt zoo'n omhulsel of kapsel geheel of wordt althans de aanwezigheid sterk in twijfel getrokken, omdat een kapsel niet altijd gemakkelijk is aan te toonen. Dit is b.v. het geval bij de lange weibacillen. In het laatste geval hebben we een directe omzetting van suiker in slijm aan te nemen. Omtrent de chemische samenstelling van dit slijm loopen de meeningen nog uiteen. Dit vindt zijn oorzaak in de groote moeilijkheid, voldoende hoeveelheid slijm voor de analyse in absoluut zuiveren toestand te verkrijgen. Ofschoon men den indruk krijgt, dat in sterk slijmige vloeistoffen de hoeveelheid slijmstof nog al groot is, valt die, wanneer ze afgescheiden is, niet mee. Zoo heeft Goethart het slijm afgescheiden uit 12 liter lange wei, en na reiniging en droging het gewicht er van bepaald, dat 3.33 gram bedroeg. De resultaten van de chemische analyse van het afgescheiden slijm zijn altijd eenigszins onbetrouwbaar door de groote hoeveelheid microben, die met het slijm wordt neergeslagen. Men mag echter aannemen, dat de verschillende microbensoorten niet alle de zelfde slijmstoffen produceeren. Zoo wordt b.v. door de reeds genoemde *Leuconostoc mesenterioïdes* dextran gevormd, terwijl het slijm van de *Streptococcus hollandicus* een mucine-achtig lichaam moet zijn.

Een zeer belangrijke eigenschap van de slijmvormende microben is, dat ze door voortgezette cultuur in kunstmatige voedingsbodems, gemakkelijk hun vermogen om slijm te vormen verliezen. De samenstelling van den voedingsbodem, de temperatuur waarbij en de zuurstofspanning waaronder de microben worden voortgekweekt, zijn alle factoren, die van belang zijn voor de vorming van het slijm. In dit opzicht is de voor ons zoo belangrijke lange weibacterie uitvoerig onderzocht. Van de stikstofverbindingen zijn de eiwitstoffen van de melk en pepton alleen geschikt voor de vorming van het slijm, niet echter andere stikstofver-

bindingen als kippeneiwit, ammoniakverbindingen of nitraten. Suikers zijn evenzeer noodig, maar ook al weer niet alle. Het cultiveeren bij temperaturen boven  $20^{\circ}$ , alsook het kweeken bij eenen zuurstofdruk, die te ver boven of beneden den optimumdruk ligt, voert na een paar overentingen reeds tot een erfelijk standvastigen variant, die geen slijm meer vormt. Ook van de *Leuconostoc* laat zich de niet slijmige variant verkrijgen, door op aardappelen, suikervrije gelatine of melkgelatine te kweeken. De omstandigheden, waaronder die veranderingen optreden, zijn nog lang niet alle bekend. Wat echter van deze groote groep van microben bekend is, stempelt hen tot een der belangrijkste groepen der microbiologie.

#### BESCHRIJVING VAN DE BACTERIE.

Zooals ik reeds in den aanvang schreef, kreeg ik de microben voor de eerste maal als verontreiniging in melk, waaruit ik ze isoleerde op melkagarplaten. Ze groeien hierop als groote, vochtigglanzende kolonies, die, voordat ze hun kleurstof vormen, veel gelijken op melkdruppels. De kolonies worden bij  $22^{\circ}$  zoo groot, dat ze na een paar dagen de geheele plaat bedekken als een blauw, slijmig, eenige millimeters dik belegsel. Niet zoo zeer de kolonies zelf dan wel het omgevende substraat wordt blauw tot blauw-violet gekleurd. Na eenigen tijd, afhankelijk van de temperatuur waarbij men kweekt, gaat de blauwe kleur over in een gele, terwijl de caseïne in oplossing gaat, waardoor de plaat doorzichtig wordt. Ent men van dit geel belegsel een weinig over in steriele melk, dan wordt die na een paar dagen blauw en slijmig. Aanvankelijk meende ik met twee verschillende microbensoorten te doen te hebben, eene de melk blauw kleurende, en eene slijmvormende; en ik trachtte door culturen op vleeschgelatine een scheiding van die twee vermeende soorten te bewerkstelligen. Om hiertoe te geraken heb ik een beetje van de slijmige blauwe melk verdund met steriel water, en door schudden en zwenken die melk gelijkmatig door het water verdeeld. Daarna heb ik op eenige vooraf gegoten vleeschgelatineplaten culturen aangelegd door uitzaaien van geringe hoeveelheden van dat water. Tot mijn verwondering bleef

groeï geheel achterwege; op geen der platen trad ook maar een spoor van groeï op. Dat dit merkwaardig verschijnsel niet daaraan kan liggen, dat vleeschgelatine geen goede voedingsbron is, bewees wel het feit, dat eene gelijktijdige uitzaaiïng van die waterige emulsie in vleeschagar aanleiding gaf tot een zeer intensieven groeï. Ook op vleeschgelatine gelukte het mij ten slotte groeï te krijgen, toen ik voor de enting van de onverdunde melk zelf uitging. Men krijgt dan echter geen ontwikkeling van goed geïsoleerde kolonies, maar van de plaatsen waar zeer veel bacteriën materiaal is achtergebleven, zooveel dat het met het bloote oog goed te zien is, ontwikkelt zich een slijmige, taaie, bruinachtige bacteriën massa, die een groot gedeelte van de plaat bedekt. Op weigelatine gedraagt de microbe zich juist evenzoo; ook daarop blijft groeï achterwege. Iets beter wordt de groeï op vleeschgelatine, waaraan 10 % ondermelk is toegevoegd, ofschoon de groeï in vergelijking met dien van andere microben toch nog zeer spaarzaam is. Op dezen voedingsbodem ontwikkelt de microbe zich tot kleine, bruinblauwe, vochtig glanzende, ronde kolonies, die een zwakke fluorescentie vertoonen en de gelatine langzaam tot vervloeiïng brengen.

Daar op vleeschagar in korten tijd normale kolonies tot ontwikkeling kwamen, zoo kon het zich niet ontwikkelen op gelatineplaten alleen op physische eigenschappen van de gelatine berusten.

Burri en Stutzer, die een soortgelijk gedrag ten opzichte van gelatine bij een door hen bestudeerde nitraatreducerende microbe vonden, zochten dit verschijnsel daardoor te verklaren, dat de bovenste gelatinelaag een taaie, glad huidje vormt, dat aan de weinige daarop gebrachte microben geen aangrijpingspunten biedt, waarschijnlijk door het ontbreken van de noodige enzymen, zoodat de microben daarop te gronde gaan.

Het feit nu, dat uit de strooculturen van de slijmigblauwe melk zich telkens één enkele soort kolonies ontwikkelde, wees met zeer groote waarschijnlijkheid op de aanwezigheid van slechts één microbensoort in deze abnormale melk. Gedachtig echter aan het in de bacteriologie dikwijls voorkomende verschijnsel dat twee microbensoorten zeer nauw met elkander verbonden zijn en daardoor moeilijk

te scheiden, heb ik mij met deze boven beschreven manier van het in reïncultuur brengen van microben niet tevreden gesteld. Temeer scheen mij deze manier van isoleering onvoldoende, daar het uitgangsmateriaal een slijmige massa is, juist geschikt om zelfs na verdeeling in steriel water meerdere microben bij elkaar te doen blijven. Microscopische preparaten van dergelijke verdunningen in water gemaakt, vertoonden werkelijk naast de goed geïsoleerde microben vele kleinere en grootere microbengroepen. De absoluut zekere methode om uit mijn slijmig materiaal tot een reïncultuur te geraken, scheen mij de verdunningsmethode. Ik heb deze methode toegepast volgens het „Tuscheverfahren” van Burri. Speciaal voor dat doel in den handel gebrachte inkt werd met eene 6—10 voudige hoeveelheid water verdund, in reageerbuisjes gesteriliseerd en een paar weken aan zich zelf overgelaten, om eventueel aanwezige vaste zwevende bestanddeelen te doen afzetten. Met een groot platina-oogje werden nu 8—10 druppels van dit mengsel inkt en water op een steriel objectdrager gebracht, daarna met een klein oogje waterige bacteriënsuspensie met het eerste inktdruppeltje vermengd. De verdere verdunningen in de andere inktdruppeltjes verrichtte ik met het kleine platina-oogje, na dit vooraf in water te hebben afgespoeld en uitgedroogd. Uit druppel I werd een klein weinig in druppel II overgedragen, hieruit weer iets in druppel III enz., tot bij druppel 8 à 10 een groote verdunning van microben was bereikt. Met een voorzichtig uitgedroogde schrijfspen werden nu uit den laatsten druppel fijne stippen gemaakt op een steriele gelatineplaat, en elke stip na ongeveer  $\frac{1}{2}$ —1 minuut bedekt met een steriel objectglaasje. Daarna werden met eene sterke vergrooing achtereenvolgens alle stippen onderzocht. Is de inkt van goede samenstelling en de gelatine niet te week, dan vertoonen zich de inktstipjes onder het microscoop als homogeen grauwe schijfjes, waarin de microben zich voordoen als schitterend verlichte staafjes en bolletjes. Bij genoegzaam groote verdunning vindt men nu naast inktstipjes, die weinig microben of microbengroepen bevatten, ook schijfjes die een enkele microbe bevatten, en enkele die steriel gebleven zijn. Zoo'n schijfje met één enkele microbe vormt dan het punt



van uitgang voor de reincultuur. Met een steriele pincet werd het dekglasje met het daaraan gehechte inkschijfje op een steriele melkagarplaat overgebracht, en in eene stoof bij 22° geplaatst. Na korten tijd ontwikkelde zich uit de enkele kiem eene kolonie, waarna het dekglasje van de kolonie werd afgenomen. Het gelukte mij op deze manier, na eenige oefening, kolonies te krijgen, die zich ontwikkeld hadden uit een enkele kiem. Daar deze kolonies nu èn de blauwe kleur èn de slijmvorming vertoonden, was hiermee dus bewezen, dat deze dubbele functie aan een enkele microbensoort toekomt.

De micoben zijn op microkokken gelijkende onbeweeglijke kortstaafjes, van 0,6—1  $\mu$  lang en ongeveer 0,4—0,5  $\mu$  breed. Sporen werden niet waargenomen.

De groei op vleeschagar is weinig karakteristiek. Zij doet zich voor als witte, ronde, vochtig glanzende, van 4—5 m.M. groote kolonies met gekartelden rand. Slijmig zijn de kolonies op dezen voedingsbodem gewoonlijk niet, ofschoon tusschen de vele exemplaren, die op een plaat voorkomen er altijd een paar zijn, die slijm gevormd hebben. Legt men van deze slijmige varianten opnieuw een agarplaat aan, dan treedt hetzelfde verschijnsel op, n.l. dat verreweg het grootste gedeelte van de koloniën geen slijm vormt. Wanneer men van deze beide varianten entingen maakt in steriele ondermelk en die bij 23° plaatst, wordt de melk zonder uitzondering blauw en slijmig. Ten opzichte van de slijmvorming in melk gedraagt de microbe zich anders dan de *Streptococcus hollandicus*, het organisme van de lange wei. Gaat bij dit organisme het vermogen om melk slijmig te maken in overentingen spoedig verloren, wanneer men kweekt bij zijn optimumtemperatuur, of wanneer men het entingsmateriaal ontleemt aan plaatsen, waar niet de optimale zuurstofspanning is gelegen, *deze* blauwe slijmvormende microbre gedraagt zich in dit opzicht lang zoo gevoelig niet. Onverschillig of men de overentingen plaatst bij lage temperatuur (23°), dan wel bij de optimale temperatuur van de slijmvorming (28—30°), ze worden na korteren of langeren tijd steeds slijmig. Overentingen, bij 37° geplaatst, worden echter niet altijd meer slijmig. Wanneer men in gesloten flesschen kweekt, in plaats van in kolfjes, dus bij afwezigheid van zuurstof,

vindt geen slijmvorming meer plaats, zoodat dus het slijm gevormd wordt onder invloed van de zuurstof.

Nog in een ander opzicht verschilt mijne bacterie van de bacterie van de lange wei, n.l. in het vermogen om een kapsel te vormen, wat als verslijmingsproduct van den celwand is te beschouwen. Het aantoonen van kapsels is niet altijd gemakkelijk, maar gelukt het best bij jonge culturen, wanneer geen water gebruikt wordt bij 't maken van het preparaat. Een droppeltje slijmige melk werd tusschen twee objectdragers zeer fijn verdeeld, gedroogd, gefixeerd en daarna volgens Johne gekleurd (kleuring met 2 % waterige gentianavioletooplossing, daarna gedeeltelijke ontkleuring in 1—2 % azijnzuur), waarna de kapsels als een zwak violet omhulsel zichtbaar worden.

Niet in elk voedingsmedium treedt slijmvorming even sterk op. Van alle voedingsstoffen vond ik daartoe melk het meest geschikt; toevoeging van bepaalde koolhydraten bevordert het optreden van slijm, ofschoon gewoon vleeschwater, zelfs zonder toevoeging van pepton, door krachtige slijmvormers ook slijmig wordt. Zoo vond ik toevoeging van amyllum, lactose, raffinose en maltose bevorderlijk voor de slijmvorming, terwijl laevulose, glucose, arabinose en rietsuiker de slijmvorming tegengaan.

In vleeschwater is de groei karakteristiek, wanneer men slechts zorg draagt, dat het kolfje, waarin de enting plaats vindt, niet geschud wordt. De groei vangt dan aan met eene zwakke, nauw merkbare troebeling van de bouillon, en een gering grondbezinksel. Aan de oppervlakte is de groei het sterkst en komt het daar tot de ontwikkeling van een drijvende kolonie, die van den glaswand schijnt uit te gaan. Deze kolonie breidt zich snel uit en bedekt spoedig als een dun, samenhangend, slijmig geheel de geheele oppervlakte, daarbij veel gelijkend op een dun laagje room, soms met een lichte nuance in 't blauw. De onderstaande vloeistof is maar weinig slijmig.

Steriele melk wordt bij 23° na enting in 2 à 3 dagen blauw. Soms gaat aan deze blauwkleuring het slijmig worden der melk vooraf, soms treedt die eerst na de blauwkleuring op. Tijdens deze veranderingen der melk blijft de reactie amphoteer of wordt zwak alcalisch. Pogingen, om ongekookte melk blauw te laten worden, mislukten steeds,

aangezien de ontwikkeling van de melkzuurfermenten den groei en de vorming der blauwe kleurstof van deze microbe tegengaat. We hebben hier dus wat de blauwkleuring betreft iets geheel anders als bij de *B. cyanogenes*, waar de vorming van de blauwe kleur juist door een zwakke zuurvorming ondersteund wordt. De blauwe kleur treedt alleen op aan de oppervlakte, zoover de lucht in kan dringen; de onderste lagen der melk blijven kleurloos.

Wanneer men echter schudt, zoodat ook de diepere lagen met de lucht in aanraking komen, is de geheele inhoud zeer spoedig gelijkmatig blauw, welke blauwe kleur behalve aan de oppervlakte weer spoedig verdwijnt. Ook de slijmvorming geschiedt, zooals ik reeds mededeelde, onder invloed van de lucht. Men kan dit overtuigend aantonen door de bacterie in een reageerbuisje geheel gevuld met melk te kweken. Wanneer blauwkleuring en slijmvorming zijn opgetreden, wordt met een capillair iets aan het onderste gedeelte van het buisje ontnomen, wat dan blijkt blauw noch slijmig te zijn. Toch heeft de microbe zich ook in de diepere lagen ontwikkeld, zooals een microscopisch preparaat aantoonde.

De slijmvorming heet aanvankelijk een coaguleeren van de caseïne ten gevolge, die niet vlokkig neerslaat, maar als een slijmige witte massa zich op den bodem van de kolf afzet. De slijmigheid kan zoo sterk worden, dat aan voorwerpen, die men in zulke melk dompelt, draden van een meter en langer blijven hangen. Langzamerhand wordt door het proteolytisch enzym de caseïne opgelost en gaat de melk over in een meer of minder helder gele tot bruine vloeistof.

Niet in alle kolonies is de vorming van het blauwe pigment even sterk, zoodat men op een melkagarplaat kolonies aantreft van donkerblauw tot nagenoeg kleurloos. De blauwe kleurstof diffundeert uit de microbe in de agar, zoodat elke kolonie omgeven is door een breed, blauw diffusieveld. Alleen in jonge culturen is de kleur zuiver blauw, in oude culturen verloopt de kleur door violet en geel naar bruin. Hoe lager de temperatuur is waarbij men kweekt, des te langer bewaart een cultuur haar blauwe kleur, zoodat, wanneer men bij 10—12° kweekt, de culturen

ongeveer 3 weken blauw blijven. Bij 30° daarentegen gaat de blauwe kleur na 2 dagen reeds over in geel. De blauwe kleur is in geen der oplosmiddelen, die ik aanwendde — alcohol, aether, benzine, chloroform, 1 % formalin, verdunde alkaliën — oplosbaar. Wanneer men van de bovenvermelde kleurlooze of weinig gekleurde kolonies opnieuw streepculturen maakt op melkagar, dan vertoonen die dikwijls in sterke mate het vermogen, kleurstof te vormen, terwijl de intensief blauwe kolonies af en toe minder sterk gekleurde dochterkolonies geven. Deze blauwkleuring schijnt in de eerste plaats door het caseinemolecuul veroorzaakt te worden, getuige de prachtig blauwe verkleuring van melk en van eenen voedingsbodem van de volgende samenstelling:

water	100
nutrose	4
K <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05,

ofschoon ook in oplossingen van andere eiwitten blauwkleuring kan optreden. In den nutrose-voedingsbodem hadden sterke groei en vorming van blauwe kleurstof plaats, nooit echter slijmvorming. Voegde men aan dezen voedingsbodem sporen maltose of lactose toe, dan werden de culturen in korten tijd slijmig.

De blauwkleuring treedt in afgeroomde melk intensiever op en duurt langer dan in volle melk. Toch neemt ook daarin de roomlaag de blauwe kleur aan. Een merkwaardig verschijnsel ontdekt men nog, wanneer men een eenigszins oude cultuur van volle blauwe melk onderzoekt. Men vindt daarin het aantal vetbolletjes sterk verminderd. Dit verdwijnen van de vetbolletjes kan niet worden toegeschreven aan ontleding van het vet, aangezien de microbe geen lipase afscheidt.

Op aardappelschijven is de groei eveneens eigenaardig. Ze vormt daarop een prachtig blauw belegsel, welke blauwe kleur op den aardappel overgaat. Na een week is dit belegsel roomkleurig, terwijl de aardappel nog zwak matblauw is.

Behalve een proteolytisch enzym bezit de microbe nog diastase en katalase. Door het voorkomen van dit laatste

enzym, evenals door het gemis aan vorming van melkzuur, behoort deze slijmvormer dus niet tot de melkzuurfermenten.

Nitraten worden niet ontleed onder vorming van gasvormige bestanddeelen.

---