

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

Over een kaasschimmel

DOOR

F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM,

(Ingezonden 5 April 1923).

In het begin van December 1920 zond de bedrijfsadviseur der Friesche Coöperatieve Zuivel-Export Vereeniging een Goudsche kaas met donkerblauw gekleurde plekken in de korst, welk gebrek in een groote partij van een bepaalde fabriek voorkwam. Nader werd nog medegedeeld, dat bij de bereiding der kaas ijzerhoudend nortonwater was gebruikt geworden.

Het gelukte niet uit deze kaas een kleurstofvormende bacterie te isoleeren; echter werden uit de ingevreten plekken op de korst van een later toegezondene, nog in het beslag zittende dergelijke kaas, gisten en schimmels geïsoleerd, welke op voedingsbodems, waarin loodcarbonaat, bruin gekleurde koloniën te zien gaven en dus zwavelwaterstof of sulfiden vormden. Daar ook in deze tweede kaas met zwavelammonium en tannine ijzer aangetoond werd, en de asch veel ijzer bleek te bevatten, werd nagegaan of dit van invloed was voor het optreden der blauwe kleur. Daarom werd aan den voedingsbodem een ijzerzout toegevoegd.

Op weigelatine ¹⁾ met FeCl_3 deed een der schimmelsoorten een blauw violette kleur ontstaan, terwijl deze op gesteriliseerde kaas met ijzerchloride dezelfde kleur intensief te voorschijn riep, doch dit niet deed wanneer het ijzerzout ontbrak. De donkerblauw gekleurde plekken op de korst der onderzochte kazen waren dus veroorzaakt door de schimmel onder den invloed van het aanwezige ijzerzout. Het korstgebrek is dus te voorkomen door te verhinderen dat er ijzerzouten in den wrongel geraken. De eigenschappen en groeiwijze van de bedoelde schimmel werden nader onderzocht en kan daarover het volgende vermeld worden.

Een zeer goede voedingsbodem is neutrale of alcalische Löff-

¹⁾ Deze wordt door ons bereid door in wei 10 pct. gelatine op te lossen en, na neutralisatie tot amphoter, gedurende $\frac{1}{2}$ uur in de stoompot te verhitten op 100° C. Volgens wordt het ontstane neerslag afgefilterd.

2082400

lersche agar. Hierop vertoonen de verschillende overentingën constant een goeden groei in tegenstelling met vele andere schimmels, welke na betrekkelijk korten tijd daarop overgeënt te zijn geweest te gronde gaan. De kolonies zijn in den beginne wit, later worden ze onder sporenvorming donkerbruin. Het mycelium blijft ongekleurd, doch de kleur wordt te voorschijn geroepen door de sporen, welke donkerbruin zijn. Deze hebben een grootte van 5—9 μ ; zijn bolrond dikwijls met afgeplatte einden en ontstaan in lange onvertakte kettingen, voornamelijk aan zijtakken van het mycelium, doch ook de einddraden dragen dikwijls sporen. Van gedifferentieerde conidiëndragers kan hier niet gesproken worden, daar deze niet van het vegetatieve mycelium verschillen, hoogstens iets dikker zijn. De levensvatbaarheid der sporen is zeer groot. Een plaatcultuur op Löfflersche agar, welke één jaar oud was en ingedroogd, bleek bij overenting nog nieuwe cultures te kunnen leveren. Soms treden zonder bepaalde oorzaken mutanten op, welke lichter van kleur zijn tot wit toe. Microscopisch zijn in cultures der bruine schimmel verscheidene ongekleurde sporen op te merken. Door de mutatie kan het geschieden, dat na herhaalde overentingën de kleur steeds lichter wordt. Om het achteruitgaan der bruine kleur te vermijden is het wenschelijk steeds intensief bruine sporen over te enten. De plotselinge ontstane hel witte mutant is steeds zuiver gebleven. De reactie met FeCl_3 doet zich ook hierbij voor.

De doodingstemperatuur der sporen werd bepaald door verhitting in Löfflersche bouillon, waarvan de alkaliteit 21,0 c.c. norm. per Liter bedroeg.

Reageerbuisen met deze bouillon werden na enting toegesmolten en in water van bepaalde temperatuur ondergedompeld en gedurende 10 minuten verhit. Daarna werden de buisjes geopend, een steriele wattenprop opgezet en vervolgens in een thermostaat bij 19° C. geplaatst. Na één maand trad voor drie verschillende stammen nog groei op in de buisjes verhit op 54° C., echter niet meer in die op 56° C., zoodat de doodingstemperatuur tusschen 54° en 56° C. is gelegen.

Wat de assimileerbaarheid van koolstof- en stikstofverbindingen betreft, is het volgende op te merken. In een oplossing van ½ pct. caseïnepepton in water met voedingszouten trad na 7 dagen matige groei op, welke echter intensiever werd en na 4 weken een goede ontwikkeling van de schimmel te zien gaf. Toevoeging van ½ pct. glucose of lactose veranderde het beeld weinig; zoo ook die van ½ pct. calciumlactaat. Een ½ pct. oplossing van asparagine vertoonde na 4 weken bijna geen groei; werd daaraan ½ pct. glucose of lactose toegevoegd, dan ontstond een vrij goede ontwikkeling, terwijl calciumlactaat de schimmel alleen op den bodem van het cultuurkolfje deed opkomen. Ammoniumsulfaat of kaliumnitraat in combinatie met bovengenoemde suikers of met ½ pct. calciumlactaat leverden weinig groei. Melk is geen gunstig voedingsmedium; wel ontstaat daarin mycelium, doch sporenvorming blijft

uit. Na een tweetal weken heeft bij 20° C. peptonisatie der caseïne plaats. De vloeistof heeft dan een geelbruine kleur en geeft een sterke biuretreactie en reageert amphoter. De schimmel scheidt dus een pepsineachtige ferment af; hetgeen ook te bemerken is door de lichte vervloeiing der gelatine culturen.

De invloed, welke melkzuur tot een concentratie van 5 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 30 c.c. cultuurvloeistof op den groei uitoefent, is verschillend voor de verschillende media, doch in het algemeen kan gezegd worden, dat het remmend werkt en wel te sterker naarmate de concentratie stijgt. De tijd van ontwikkeling wordt daardoor verlengd, doch na een tweetal maanden treedt nog een flinke groei op. Een scherpe grens schijnt dus niet te bestaan.

Het toegevoegde melkzuur wordt op den duur of vastgelegd aan alcalisch reagerende splitsingsproducten welke de schimmel vormt of door deze omgezet. Langzamerhand ontstaat toch na eenige weken een alcalisch reagerende vloeistof, behalve dan voor de hogere concentraties aan melkzuur. Toevoeging van glucose veroorzaakt, dat de melkzuurconcentratie, waarbij de vloeistof zuur blijft, lager ligt dan voor de andere suikers. Waarschijnlijk vormt de schimmel uit dit koolhydraat een zuur en blijft dus de zuur-titer der vloeistof hoog.

Tijdens den eersten groei in een eigenlijk te zuur milieu worden geen sporen gevormd, behalve in enkele gevallen tegen den wand van het glas boven het vloeistofniveau. Men vindt dan enkel wit mycelium en wel op den bodem van het kolfje. Vangt een snellere groei aan, dan vormen zich sporen en eerst daarna begint langzaam de bruine kleur van de schimmel op te komen. De sporen beginnen eerst dan op te treden, wanneer de cultuurvloeistof ongeveer het neutrale punt ten opzichte van lakmoes bereikt heeft.

Het weerstandsvermogen van de schimmel tegenover keukenzout is vrij sterk, doch is afhankelijk van de koolstofbron, waarover ze kan beschikken. In een oplossing van $\frac{1}{2}$ pct. caseïnepepton met voedingszouten alleen wordt nog een concentratie van 19 pct. NaCl verdragen; voegt men echter $\frac{1}{2}$ pct. glucose toe dan stijgt deze tot 24 pct. Lactose heeft een minder gunstigen invloed; hierbij ligt de grens bij 20 pct., hoewel na 3 maanden nog groei geconstateerd werd bij een concentratie van 23 pct. NaCl.

Toevoeging van $\frac{1}{2}$ pct. calciumlactaat aan de caseïnepeptonoplossing heeft weinig invloed en verschilt de zoutconcentratie, welke dan verdragen wordt, bijna niet van die van caseïnepepton alleen.

De vloeistoffen, waarin de schimmel zich — zelfs maar weinig — ontwikkelde, werden bruin. De kleur der sporen vertoonde in enkele kolfjes afwijking; bij hooge zoutconcentratie werden namelijk de sporeneilanden bijna allen wit, terwijl in de kolfjes met glucose ze tevens cilindrisch waren opgerold. Daar hierbij het ontstaan van mutanten werd vermoed, werden cultures op Löffler agar aangelegd, welke echter weer bruin werden.

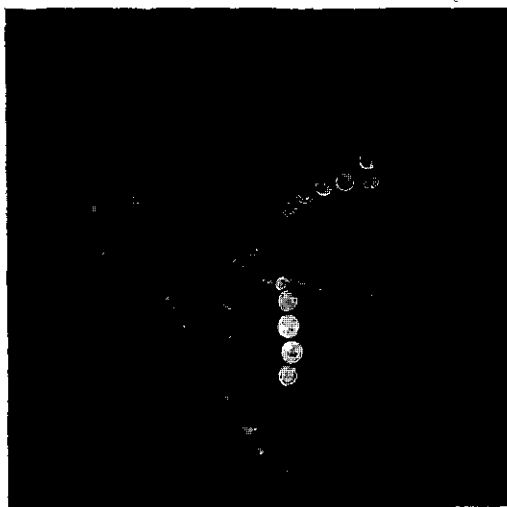
Zooals gezegd doet de schimmel bij aanwezigheid van ijzerzouten in de kaas een diep blauwe kleur ontstaan. In verband met deze reactie werd daarom het gedrag er van ten opzichte van ijzerzouten, meer speciaal ferrichloride, nader nagegaan.

In vloeistoffen en op voedingsbodems, die ten opzichte van de kaas arm aan eiwitten zijn, zooals vleeschgelatine, weigelatine, $\frac{1}{2}$ pct. caseïnepeptonoplossingen, enz. is bij aanwezigheid van ijzer van een blauwe kleur niets of bijna niets te bemerken, hoogstens is een lichtviolette verkleuring te zien. Daarom werd naar een betere voedingsbodem gezocht, waarop de blauwkleuring intensiever zou optreden en deze werd gevonden in wrongel, waaruit de melksuiker verwijderd was door uitwasschen met water.

Deze wrongel werd na vermenging met ferrichloride in cultuurschalen uitgespreid en vervolgens gesteriliseerd, waardoor een aaneensluitende massa ontstond. De schimmel bracht hierop de blauwe verkleuring te voorschijn en te sterker naarmate meer van het ijzerzout was toegevoegd. De blauw gekleurde verbinding bleek onoplosbaar te zijn in alcohol, aether, chloroform en aceton.

Ten einde na te gaan of de schimmel met behulp van ferriverbindingen de blauwe kleurstof maakt of een stof vormt, die met ijzer reageert, werd een streep cultuur op wrongel gepasteuriseerd om de schimmel te doden en vervolgens ferrichloride daarop gebracht. De kleurreactie trad ook daarbij op, zoodat het ijzer secundair werkt en niet direct ingeschoven wordt in het atomencomplex.

Daar met de wrongel goede resultaten waren verkregen, werd nagegaan of ook hoge concentraties van caseïnepepton bruikbaar waren voor het onderzoek. Een voedingsbodem bestaande uit agar met voedingszouten en 25 pct. caseïnepepton bleek eveneens voor het doel geschikt; men kan daarmee dezelfde verschijnselen te voorschijn roepen als met wrongel. Voor een onderzoek over de diffusie der kleurvormende stof is de caseïnepeptonbodem echter beter geschikt. Voegt men ferrichloride er aan toe, dan ontstaat de blauwe kleur in de naaste omgeving van het mycelium. Ook op den caseïnebodem zonder ijzer beperkt zich de reactie na uitgroeien der schimmel en bestippen met ijzerchloride tot de myceliumoppervlakte. Een diffusie van de kleurstofvormende stof heeft dus onder deze omstandigheden niet plaats. Dit neemt echter niet weg, dat op steriele kaas, waarin iets ferrichloride is, de blauwe verkleuring tot op een paar millimeter onder de oppervlakte gevolgd kan worden. Waar nu de schimmel een biologisch reactief bleek te zijn voor ijzer werd nagegaan welken graad van gevoeligheid het had ten opzichte van dit metaal. Als voedingsbodem werd gebruikt een oplossing van voedingszouten met caseïnepepton in verschillende concentratie en agar, waaraan dan ijzerchloride in diverse hoeveelheid werd toegevoegd. Het bleek, dat de scherpte der reactie afhankelijk is van de eiwitconcentratie. Met 10 pct. caseïnepepton trad bij 9.6 mgr. ferrichloride per 15 c.c. agar nog een violette kleur op, terwijl deze blauwer werd naarmate meer



ijzer was toegevoegd. Bij lagere peptonconcentratie werd de minimumreactie verschoven naar een hooger punt, zoodat deze bij 5 pct. caseïnepepton teruggebracht werd tot 19 mgr. ijzer per 15 c.c. agar.

Hoewel de schimmel dus op geringe hoeveelheden ijzer reageert, staat de gevoeligheid der reactie ten achter bij de bekende chemische reacties.

Gedetermineerd volgens Rabenhorst's Kryptogamen Flora behoort de schimmel tot het geslacht *Oospora* (Wallr.) en komt het meest overeen met *Oospora otophila* (Harz). Of ze er mede identisch is, konden we niet nagaan, daar we deze ons niet konden verschaffen.

Photo.

Sporenvorming der schimmel in een vochtige kamer in neutrale Löfflersche bouillon, daarna het dekglas gebracht in tusche. Vergrouting 480 maal.

Ueber einen Käsepilz.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen.)

Von der Kruste eines Goudakäses mit blau gefärbten Stellen wurde ein Pilz isoliert, welcher bei Gegenwart von Eisensalzen in Kasein einen blauen Ton hervorrief. Auch der Goudakäse enthielt Eisen weil bei der Bereitung viel eisenhaltiges Quellwasser gebraucht worden war. Der Pilz wächst ganz gut auf Löffleragar. Die Farbe der Kolonien ist im Anfang weisz, wird aber während der Sporenbildung dunkelbraun. Mikroskopisch ist das Mycel farblos und sind die Sporen braun. Bisweilen entstehen plötzlich Mutante mit weiszer Sporenfarbe, die auch die blaue Reaktion mit Eisensalzen geben.

Die Sporen sind kuglig, oft mit abgestutzten Enden, und entstehen in unverästelte Ketten. Die Konidienträger sind Endäste oder meistens Seitenäste des Mycels.

Die Sporen werden getötet durch Erhitzung auf einer Temperatur zwischen 54°—56° C. während 10 Minuten. Ihr Resistenz gegen Austrocknung ist sehr grosz; nach einem Jahre sind sie noch lebensfähig.

Der Pilz kann Zucker oder andere Kohlenstoffquellen entbehren, braucht aber für ihre Entwicklung Eiweiskörper oder Pepton. Milch wird aufgeholt durch Peptonisierung des Kaseins innerhalb zwei Wochen bei 20°. Sporen werden hierin fast nicht gebildet und die Reaktion bleibt amphoter.

Der Pilz entwickelt sich noch in Nährflüssigkeiten mit ungefähr 20 pct. Kochsz. Die Wachstumsgrenze mit Säure kann schwierig bestimmt werden weil die Säure durch bald entstehendes Mycel allmählig neutralisiert wird, was sehr lange dauert.

Sporen entstehen, wenn die Flüssigkeit ungefähr neutral geworden ist.

Der blaue Farbstoff wird gebildet weil das Ferriion reagiert mit einem Stoffwechselprodukt des Pilzes. Ohne Eisen werden die Nährböden dunkelrotbraun. Die Intensität der blauen bzw. der rotbraunen Farbe steigert sich mit der Peptonkonzentration und der Eisenmenge.

Die Bestimmung nach Rabenhorst's Kryptogamenflora ergab die Gattung „Oospora“. Am meisten gleicht der Pilz Oospora Otophila.

Photo.

Sporenbildung im feuchten Kammer; weiter Tuschepräparat.
Vergrößerung 480 ×
