

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

Roode vlekken op beschimmelde boter,

DOOR

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

(Ingezonden 24 April 1930).

De meest algemeene vorm waaronder het beschimmelen van boter optreedt is het ontstaan van zwart-groene plekjes, welke worden veroorzaakt door de schimmel *Cladosporium herbarum* ¹⁾. Soms ziet men echter daarnaast ook roode vlekken optreden, hetgeen, hoewel in veel mindere mate voorkomend, toch niet bepaald zeldzaam is te noemen.

Daar omtrent de oorzaak van dit laatste verschijnsel naar ons weten niets bekend is, werden verschillende monsters boter met roode vlekken, afkomstig uit de praktijk, aan een nader onderzoek onderworpen. Het resultaat hiervan was, dat het ons gelukte uit alle monsters een schimmel te isoleren, welke in staat is dit verschijnsel teweeg te brengen. Zooals gewoonlijk het geval is, zijn ook bij deze soort stammen te onderscheiden, welke dan verschillen in kleurvormend vermogen, aspect, enz.

Als voedingsbodems werden door ons gebruikt neutrale Löfflersche gelatine en weigelatine. ²⁾ De groei op deze beide voedingsbodems is niet dezelfde; de kolonies toch worden op de weigelatine belangrijk grooter dan op Löffler gelatine.

Zoo hebben deze na een 3-tal dagen op eerstgenoemden bodem een middellijn van 2 tot 3 c.M. en op de andere een van 1 tot 1½ c.M. Worden de cultures ouder, dan groeien de kolonies hoe langer hoe meer uit en

¹⁾ Zie Jaarverslag der Ver. tot Exploitatie eener Proefzuivelboerderij te Hoorn, 1918, bldz. 31.

Centralblatt für Bakteriologie, II Abt. Bd. 52, 1920, bldz. 39.

²⁾ De Löfflergelatine wordt door ons als volgt bereid:

Een pond rundvleesch, waarvan alle vet is verwijderd, wordt gemalen en gedurende 3 uur in een stoompot verhit met ½ Liter water en 5 Gr. NaCl. Vervolgens wordt gefiltreerd, 5 Gr. pepton Witte in het filtraat opgelost en 5 min. op de vrije vlam gekookt, dan geneutraliseerd op lakmoes, weer 5 min. gekookt, nogmaals gefiltreerd en 5 Gr. dextrose toegevoegd, waarna aangevuld wordt tot 1 Liter. In deze bouillon wordt 10 % gelatine opgelost, de vloeistof geneutraliseerd en verder op de gewone wijze behandeld.

Weigelatine wordt door ons bereid door in wei 10 % gelatine op te lossen en, na neutralisatie, gedurende ½ uur in den stoompot te verhitten. Vervolgens wordt het ontstane neerslag aefiltreerd.

2101036

bereiken op weigelatine na 13 dagen zelfs diameters van 6 tot 11 c.M. Voor de Löffler gelatine is dit niet het geval; in denzelfden tijd zijn daarop middellijnen van $3\frac{1}{2}$ tot $5\frac{1}{2}$ c.M. te constateeren.

Ook wat de kleurvorming betreft is er verschil op te merken. Op weigelatine heeft deze practisch niet plaats. De kleur van het mycelium beweegt zich daar, al naar den stam en den ouderdom der cultuur, van af wit naar groenachtig bruin, soms met roode stippels erin. Op de Löffler gelatine daarentegen vormt zich in de kolonie al spoedig een rood centrum, dat hoe langer hoe meer toeneemt, tot de geheele kolonie gekleurd is. Van onderen bekeken vertoont deze dan een mooi rood, dat voor den eenen stam intensiever is dan voor den andere. Eén enkele van onze stammen maakte hierop een uitzondering en bleef zoo goed als ongekleurd. Hoewel de schimmel op genoemde gelatines flink groeit, vormt deze, in tegenstelling met de meeste andere soorten, daarop geen sporen. Dit geschiedt echter wel wanneer ze gebracht wordt op een bodem, bestaande uit gedestilleerd water, waaraan alleen $2\frac{1}{2}$ % agar is toegevoegd. De groei daarop is zeer gebrekkig en zonder kleurvorming, doch na 7 tot 14 dagen, waarbij het tijdstip wisselt met den stam, ziet men tusschen het mycelium kleine zwarte hoopjes opkomen, die onder het microscoop bij zwakke vergrooting zich oplossen tot een verzameling van zwarte sporen, samengevoegd tot een tros (zie fig. 1 en 2). Bezieet men ze echter bij sterkere vergrooting, dan gaat de zwarte kleur over in bruin-groen. Deze sporen worden dwars op het mycelium gevormd en zijn daaraan door zeer korte steeltjes bevestigd. Ze liggen dicht op elkaar, waardoor dan bij het verder uitgroeien de trosvormige opeenhoopingen ontstaan. De fig. 3 en 4 geven verschillende stadia daarvan weer. In het begin der ontwikkeling is er in de sporen zoo goed als geen teekening te ontdekken; later, wanneer ze grooter worden, ontstaan echter tusschenschotten en verschijnen op het sporenhuidje afzonderlijk liggende donker gekleurde, wratachtige verdikkingen, waardoor dit als het ware een schorsachtig uiterlijk verkrijgt (zie fig. 5).

Brengt men de sporen op de gebruikelijke voedingsbodems dan groeien ze uit op de wijze, als in het begin beschreven. Op water-agar ontkiemen ze eveneens doch vormen daar slechts een heel dun, doorzichtig mycelium, waaraan na 14 dagen weder sporenhoopjes worden opgemerkt. De overenting op water-agar, uitgaande van sporen, kan maanden achtereen herhaald worden zonder dat eenige verzwakking merkbaar wordt. Ook blijft hun kiemvermogen daarop geruimen tijd bestaan, in tegenstelling daarmee, dat de schimmel op de gewone voedingsbodems meerendeels reeds na één maand is afgestorven.

Eén stam van onze reïnculturen leverde, wat het vormen van sporen betrof, een uitzondering. Toen deze stam pas geïsoleerd was geworden was er geen verschil in dit opzicht met de andere te bemerken; later echter bleef de sporenvorming op de water-agar geheel en al uit en trad eerst weer op nadat de schimmel eenigen tijd op steriele boter had gegroeid. Na eenigen tijd verdween echter het vermogen tot sporenafscheiding weer maar kon dan door een passage over boter nogmaals te voorschijn worden geroepen.

Toen eenmaal gebleken was, dat het gebruik van den agarbodem voldoende was om tot een reïncultuur te komen, is getracht de isolatie der

schimmel te vereenvoudigen door de vóórcultuur op bovengenoemde gelatinebodems te omgaan. Daartoe werden de roode vlekken der beschimmelde boter gebracht in een physiologische keukenzoutoplossing, welke verwarmd was tot 30° C., en deze krachtig geschud. De resterende schimmelvliesjes werden vervolgens met een platinadraad uitgevischt en wederom alsvoren behandeld en dit nog eenmaal herhaald. Het aldus van boter gezuiverd vliesje werd vervolgens op de water-agar gebracht. In den aangegeven tijd verschenen de sporenhoopjes en kon de schimmel daarmee in reincultuur verkregen worden, zoodat op deze wijze de isolatie spoediger gelukte.

Behalve voor de isolatie der onderhavige is de water-agar ook voor die van andere schimmels een uitstekend hulpmiddel. Op dezen bodem toch wordt een dun, doorzichtig mycelium gevormd, waardoor de verschillende deelen bij zwakke vergrooting goed kunnen worden onderscheiden. Tevens liggen de sporendragers voldoende ver uiteen om, met behulp van een praepareermicroscop, uit een mengsel van schimmels door middel van een fijn platinadraadje van $\frac{1}{4}$ m.M. diameter één enkele sporendrager weg te kunnen nemen voor het overplanten.

Zooals medegedeeld, treedt de roode kleur zeer intensief op bij de Löffler gelatine. De oorzaak hiervan kan liggen in de samenstelling van dezen voedingsbodem. In tegenstelling met de weigelatine bevindt zich in de Löffler gelatine o.a. pepton en dextrose, zoodat het niet ongegrond was te vermoeden, dat deze beide stoffen van grooten invloed zijn bij de kleurvorming.

Ten einde te onderzoeken in hoeverre er verband bestaat tusschen deze en de voedingsstoffen zijn proeven opgezet, waarbij òf alleen suikers werden gebruikt òf deze samen met pepton Witte of caseïnepepton. Als suikers werden genomen melksuiker, dextrose en galactose en wel omdat alleen deze in boter kunnen voorkomen. Uit den aard der zaak is de melksuiker daarin aanwezig als melkbestanddeel en hangt de hoeveelheid ervan af van de mate van uitwassen. Zoo vonden wij in 3 monsters boter uit de praktijk, op vocht omgerekend: 1.3, 1.5 en 0.8 %; cijfers dus, welke vooral wat het laatste betreft nogal uiteenliepen. De dextrose en galactose daarentegen komen niet als zoodanig in melk voor doch kunnen door inversie uit de melksuiker ontstaan.

De meeste boter toch wordt bij de bereiding besmet met gisten, welke in de fabrieken in de lucht aanwezig zijn of zich bevinden in de weinig toegankelijke naden der verschillende werktuigen, plaatsen dus, waar de reiniging niet anders dan minder effectief kan zijn.

Deze gisten vermeerderen zich in de boter en kunnen, voor zoover het lactosegisten zijn, de melksuiker inverteeren door haar enzyme de lactase waardoor dan galactose en dextrose kunnen optreden.

Het gebruik van pepton Witte of caseïne-pepton bij bovengenoemde proeven kan op het eerste gezicht eenigszins afwijkend lijken omdat in boter vrijwel alleen kaasstof als stikstofbron aanwezig is, doch dient in het oog te worden gehouden, dat gisten en schimmels in staat zijn door middel van proteolytische enzymen deze eiwitstof in een oplosbare vorm te brengen.

Om nu de kleurvorming bij de verschillende combinaties na te gaan is water-agar gebruikt waaraan werd toegevoegd $\frac{1}{2}$ % Lactose, Dextrose of Galactose of ook een mengsel van beide laatste en wel van ieder dan $\frac{1}{4}$ %. Dit betreft de proeven met suikers alleen; bij een andere reeks bevatte de water-agar naast deze ook nog $\frac{1}{2}$ % Pepton Witte of Caseïne-pepton. ¹⁾

De kleurvorming nu op deze verschillende voedingsbodems, wanneer ze werden geënt met schimmelsporen, was als volgt. Bij weglaten van pepton gaf slechts één der 4 gebruikte stammen een roodbruine kleur met alle suikers. Bij de drie overige waren van één de kolonies altijd geel, van een tweede groen met licht rozen rand, terwijl bij de derde deze geel waren indien melksuiker voorlag en bruin voor dextrose en galactose. De grootte der kolonies bedroeg op deze voedingsbodems ongeveer 5 c.M.

Bij aanwezigheid van Pepton Witte gedroegen zich de stammen anders. Ze werden op één na alle rood, behalve wanneer alléén pepton Witte aanwezig was en vooral werd met dextrose en galactose een intensieve kleur verkregen. De eene stam welke een uitzondering maakte gaf echter met de verschillende suikers een bruine verkleuring te zien.

Op deze serie voedingsbodems groeiden de kolonies sterk uit, zoodat ze de cultuurplaat van 10 c.M. geheel bedekten. De caseïne-pepton bleek minder geschikt om een intensief roode kleur in het leven te roepen. Twee der stammen leverden hiermee slechts bruin, een derde bruin tot geelbruin, terwijl de vierde bruinrood werd en alleen met galactose donker rood. Bij deze laatste waren de kolonies \pm 6 c.M. in middellijn.

Als samenvattend overzicht van deze proeven mag gezegd worden, dat het mooiste rood werd verkregen wanneer naast pepton Witte galactose en dextrose samen werd toegevoegd, waarop dan volgde dextrose en vervolgens galactose ieder voor zich. Melksuiker kwam bij deze suikers altijd achteraan zoowel wat kleur als grootte der kolonies betrof.

Wat de sporenvorming op de genoemde voedingsbodems aangaat, gedroegen de stammen zich zeer verschillend. Bij twee ervan bleef deze achterwege, terwijl van de beide overige na 14 dagen één het deed op alle bodems, uitgezonderd bij pepton Witte met dextrose en galactose, en de andere alleen bij pepton Witte met of zonder melksuiker en caseïne-pepton met galactose al of niet met dextrose samen. Ook gaf deze stam nog sporenvorming te zien op water-agar met galactose plus dextrose.

¹⁾ Deze Caseïnepepton werd door ons aldus gemaakt.

Caseïne, welke volgens HAMMERSTEN uit centrifugemelk is bereid, wordt in nog vochtigen toestand met gedestilleerd water aangewreven tot een dunne suspensie. Hieraan voegt men toe 0,3 % oxaalzuur en 0,2 % pepsine Langebeck; ieder voor zich eerst opgelost in een zeker volume water met welk volume eveneens dient rekening te worden gehouden. De flesch met de aldus voorbereide suspensie wordt gedurende ruim een week in een waterbad van 37—38° C. verwarmd en gedurende dien tijd veel geschud. Na afloop van dit tijdsverloop wordt het filtraat in een porceleinen schaal opgekookt onder toevoeging van koolzure kalk in overmaat. Er wordt nogmaals gefiltreerd, het filtraat in vacuo droog gedampt en het verdampingsresidu tot een fijn poeder verwerkt. Op deze wijze verkregen wij uit 15 L. centrifugemelk 170 Gr. droge caseïnepepton met 13,3 % stikstof en 3,34 % asch, waarvan 1,5 % CaO.

Voor pepton Witte bedragen deze cijfers respectievelijk 14,1 %, 1,8 % en 0,83 %.

Daar dus gebleken was, dat pepton Witte een zeer gunstigen invloed had op de kleurvorming en deze stof aminoverbindingen bevat, is nagegaan of er daaronder voorkwamen, welke in staat waren voor zich een kleur te voorschijn te roepen.

Evenals bij de vorige proeven werd ook hierbij gebruik gemaakt van water-agar.

Daaraan werd toegevoegd $\frac{1}{2}$ % van de volgende aminoverbindingen, namelijk Asparagine, Asparaginezuur, Asparaginezuur natrium, Glycocol, Leucine, Tyrosine en Glutaminezuur. ¹⁾ Op de aldus bereide agar werden eveneens sporen gebracht van een viertal stammen. Deze groeiden op alle platen tot een flinke kolonie uit, zoodat er in dit opzicht geen sterk sprekend verschil was op te merken. Nochtans bestond er wel een onderscheid wat de snelheid der ontwikkeling betrof. De eene stof toch leverde in denzelfden tijd kolonies van grooter diameter dan de andere en dit kon zelfs belangrijk uiteen loopen. In dit opzicht muntten bijv. uit Asparaginezuur, Leucine en Tyrosine met kolonies van 6, 7 en 8 c.M. middellijn.

Van een invloed der genoemde aminoverbindingen op de kleurvorming was bij het meerendeel niet veel te bemerken en voor zoover daarvan nog sprake kon zijn, beperkte deze zich tot een rose tot roodachtige verkleuring in het midden der kolonie. Echter verhielden de stammen zich in dit opzicht verschillend; bij de een was voor een stof de verkleuring te bemerken, bij den andere niet. Zoo leverde het Asparaginezuur met twee stammen een roode tot rose verkleuring, terwijl het Leucine met één stam hetzelfde deed, en met een andere een gele verkleuring ontstond. Een uitzondering maakte het Glutaminezuur, dat bij alle vier stammen een roode tot rose verkleuring te voorschijn riep.

Bij het Tyrosine daarentegen deed zich een ander verschijnsel voor. Deze stof leverde wel met alle vier stammen een verkleuring doch was deze niet rood tot rose maar blauw violet. Daar eenzelfde kleur ook ontstaat bij inwerking van de tyrosinase op tyrosine zoo is het vermoeden niet ongegrond, dat de schimmel dit enzym zal bevatten.

Van de aminoverbindingen valt behalve ten opzichte van de kleurvorming ook nog iets op te merken in verband met de sporenvorming. Het eigenaardige feit deed zich ook hierbij voor, dat de vier verschillende stammen zich afzonderlijk gedroegen. Twee ervan vormden namelijk op geen der agarplaten sporen, de beide andere daarentegen op alle, behalve dat bij één van deze sporenvorming uitbleef op de asparagineplaat. De sporenhoopjes verschenen in al de gevallen binnen een normalen tijd, d.w.z. na 10 dagen. De sporenvormende stammen waren in dit geval dezelfde als die, welke bij de proeven met pepton en suikers het verschijnsel vertoonden, zoodat vermoed mag worden, dat ze een sterker sporige vermogen hebben dan de beide andere, of dat ze aan hunne voeding hoogere eischen stellen en dus spoediger tot sporenvorming overgaan.

¹⁾ Daar asparaginezuur en glutaminezuur de agar bij het steriliseeren op 120° C. versuikeren en daardoor geen stolling bij afkoeling meer plaats grijpt, werden deze twee stoffen afzonderlijk gesteriliseerd in een kolfje en daarin de steriele, gesmolten agar gegoten.

Was bij vorenstaande proeven het doel meer gericht op de kleurvorming, de volgende dienden om na te gaan welke de gunstigste voedingsstoffen waren.

Als stikstofbron is daarbij gebruikt Pepton, Ammoniumsulfaat en Asparagine, terwijl als koolstofbron werd genomen Saccharose, Lactose, Maltose, Dextrose, Laevulose en Galactose. Deze verschillende stoffen werden in hoeveelheden van $\frac{1}{2}$ % opgelost in gedestilleerd water, waarin zich tevens voedingszouten bevonden. ¹⁾ Deze oplossing werd in buisjes getapt en geënt met sporen van drie verschillende stammen afkomstig. Na één week was de groei overal nog zwak en eerst na 18 dagen was daarin een duidelijk onderscheid op te merken voor de verschillende voedingsmedia en de verschillende stammen. Het bleek toen, dat voor 2 stammen asparagine en ammoniumsulfaat gelijkwaardig zijn, doch dat één de voorkeur geeft aan asparagine. Pepton echter wordt door alle drie stammen verkozen boven asparagine en ammoniumsulfaat, echter is voor één stam de groei daarin intensiever dan voor de beide andere. Dit is dezelfde stam, welke asparagine beter assimileert dan ammoniumsulfaat.

Wat de invloed der suikers betreft, is onderling weinig of geen verschil te merken. Alleen komt voor één stam de lactose in de combinaties met pepton en asparagine wat achter bij de andere suikers, terwijl voor een anderen stam laevulose in de reeks met asparagine wat meer voorop staat. Neemt men echter niet alleen den groei maar ook de kleurvorming in aanmerking, dan zou aan laevulose de voorkeur dienen te worden gegeven. Deze riep in combinatie met pepton van alle suikers het best een roode kleur in de vloeistof te voorschijn bij de verschillende stammen. Met het oog hierop is dan ook bij de proeven omtrent de resistentie der schimmel ten opzichte van keukenzout en melkzuur dit medium gebruikt.

Om den invloed van keukenzout na te gaan, werd dit in verschillende gewichtsprocenten aan de vloeistof toegevoegd, deze in buisjes afgetapt en daarna geënt met de sporen van 3 verschillende stammen. Van elk percentage werden telkens drie buisjes aangezet en deze gedurende 21 dagen bij 21° C. bebroed. Onderstaand tabelletje geeft het verloop van deze proef weer. Het aantal kruisjes duidt daarbij de mate van groei aan, terwijl het —teeken aangeeft, dat deze niet is opgetreden.

Gewichtsprocenten NaCl.

Stam.	5 %.			6 %.			7 %.		
1	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++

¹⁾ Te weten 1/10 % K₂HPO₄; 1/20 % MgSO₄ en enkele druppels van een 33 % CaCl₂ oplossing.

Gewichtsprocenten NaCl (vervolg).

Stam.	8 %.			9 %.			10 %.			11 %.		
1	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
3	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Hieruit is te zien dat bij stam 1 reeds een invloed is op te merken bij 6 %, voor de andere bij 7 1/2 %, terwijl deze invloed zich hoe langer hoe meer accentueert tot dat bij 9 % in één der drie buisjes van stam 1 geen groei meer optreedt. Bij 10 % staken stam 1 en 3 geheel en levert stam 2 nog slechts groei in 2 buisjes; bij 11 % is ook deze uitgeschakeld, zoodat dit gewichtsprocent aan keukenzout de concentratie is waarbij groei uitgesloten is. De schimmel blijkt dus gevoeliger voor keukenzout te zijn dan *Cladosporium herbarum*. In overeenstemming met deze gevoeligheid is het dan ook, dat evenmin als laatstgenoemde ook deze schimmel niet in gezouten boter tot ontwikkeling kan komen.

De invloed van melkzuur op den groei is op overeenkomstige wijze nagegaan; alleen is daarbij het gehalte uitgedrukt in volumeprocenten.

Hoewel men ook bij deze proef soms onderling een verschil tusschen de drie buisjes ziet optreden, zoo daalt toch de intensiteit van den groei naarmate het percentage aan melkzuur stijgt en heeft in 21 dagen bij stam 1 en 3 geen groei meer plaats in een concentratie van 1 1/2 % melkzuur en stopt stam 2, indien 1 3/4 % wordt toegevoegd.

In tegenstelling met wat we voor het zout hebben gevonden is het weerstandsvermogen tegen melkzuur dus grooter dan bij *Cladosporium herbarum*.

Tegen hogere warmtegraden zijn de sporen niet zeer bestand, zoodat haar doodings temperatuur betrekkelijk laag ligt. Deze is bepaald door reageerbuisen met \pm 10 c.c. melk te enten met sporen van drie stammen afzonderlijk en daarna toe te smelten, waarna ze gedurende 10 min. in water van verschillende temperatuur werden ondergedompeld. Vervolgens werden de buisjes voorzichtig geopend, van een steriele watteprop voorzien en bij 21° C. geplaatst. Daar schimmels streng aerob zijn werd op deze wijze een goede luchttoevoer verkregen.

Bij deze proef bleek, dat het weerstandsvermogen der sporen tegen hogere temperaturen o.a. verband houdt met den ouderdom der sporen. Bedroeg deze laatste bijv. \pm 14 dagen, dan ontstond geen groei meer bij een verhitting op 46° C., terwijl dit nog wel gebeurde wanneer de sporen \pm 3 weken oud waren. Echter kan gezegd worden, dat voor sporen, welke 10 à 15 dagen oud zijn, de doodings temperatuur in melk 48° C. bedraagt daar dan na 24 dagen geen groei meer was te constateeren bij de drie verschillende stammen.

De omzettingen, welke de schimmel in melk te weeg brengt, zijn van vrij ingrijpenden aard. Na ongeveer 3 weken treedt bij 21° C. een stremming op, gevolgd of begeleid door een peptonisatie. Deze geschiedt echter vrij langzaam; zoo was bijv. in één-Liter-kolven met 750 c.c. melk na \pm 3 weken nog weinig van de gestremde koek opgelost. Na 2 maanden was deze voor de helft verdwenen, terwijl een maand later hij grootendeels in oplossing was gegaan. Dat er echter veel tijd mede gemoeid gaat voor en aler de peptonisatie volledig is moge wel hieruit blijken, dat in Erlenmeyerkolven van 500 c.c., waarin 250 c.c. melk was gegoten, waardoor de vloeistof-opervlakte ten opzichte der dieptelaag vrij groot was en dus verhoudingsgewijs een groote hoeveelheid schimmelmassa voorkwam ten opzichte der hoeveelheid om te zetten melk, nog na \pm 3 maanden de oplossing van den caseïnekoek evenmin volledig was.

Zoolang de peptonisatie nog niet geëindigd is reageert de vloeistof ten opzichte van lakmoes zwak zuur en heeft een aan vruchten herinnerenden geur. Op den langen duur echter gaat de reactie in een alkalische over en ontstaat ammoniak.

Ten einde na te gaan, welke vluchtige zuren de schimmel in melk vormt, zijn culturen in melk, nadat het schimmelvlies zooveel mogelijk verwijderd was, met eenige Grammen wijnsteen zuur in vacuo drooggedampt, het destillaat geneutraliseerd, wederom drooggedampt en het residu opgenomen in 110 c.c. water, waarna deze oplossing werd onderzocht volgens de gewijzigde methode DUCLAUX.¹⁾

De totale hoeveelheid zuur, welke in de culturen gevormd werd, bleek verschillend te zijn al naar den schimmelstam en den ouderdom der culturen. Zoo leverde stam 1 uit 1500 c.c. melk na 20 dagen 50 c.c. 1/10 norm. zuur, stam 2 na 64 dagen 193 c.c. 1/10 norm. zuur en stam 3 na 91 dagen 136 c.c. 1/10 norm. zuur. Echter is ook de wijze, waarop gekweekt wordt van grooten invloed. De cultures in Erlenmeyers, waarvan hierboven sprake is, gaven bijv. per 2500 c.c. melk, geënt met stam 2, na 81 dagen 520 c.c. 1/10 norm. zuur. Reduceert men dit getal op 1500 c.c. melk en 64 dagen, daarbij aannemende, dat er een regelmatigen tijdwerking plaats heeft, dan verkrijgt men 246 c.c. 1/10 norm. of 1.28 maal de hoeveelheid, welke ontstaat bij het kweeken van stam 2 in kolven van 1 Liter gevuld met 750 c.c. melk.

Wat nu de samenstelling van het vluchtige zuur betreft kan het volgende opgemerkt worden. Bij het onderzoek volgens de gewijzigde methode DUCLAUX werd een destillatiegetal verkregen, dat lag tusschen dat van azijnzuur en propionzuur, terwijl het destillaat naar azijnzuur riekte. Hieruit kon afgeleid worden, dat azijnzuur en propionzuur aanwezig waren. De verhouding, waarin deze zuren voorkwamen, wisselde eveneens met den stam en ouderdom der culturen. Zoo vonden we bij stam 1 na 20 dagen een verhouding van propionzuur tot azijnzuur als 1 tot 3, bij stam 2 na 64 dagen als 1 tot 7 en bij stam 3 na 91 dagen als 1 tot 7, terwijl bij stam 2 in de culturen in Erlenmeyerkolven de verhouding 1 tot 7.75 was.

¹⁾ Zie o.a. Verslag over het jaar 1915 der Ver. tot Exploitatie eener Proefzuivelboerderij te Hoorn, bldz. 86.

Hebben we in het bovenstaande enkele biologische eigenschappen van de schimmel behandeld, welke voor de boterbereiding van belang kunnen worden geacht, zoo rest nog aan te geven tot welke soort deze behoort. Daartoe wendden we ons destijds tot JOHA. WESTERDIJK, welke zoo welwillend was de schimmel te determineeren en ze rangschikte onder het geslacht *Epicoccum* Link, waarschijnlijk identiek zijnde met *Epicoccum heterochroum*, een soort welke pas was gevonden door WOLLENWEBER, die ze isoleerde van aardappel. In dit laatste kan wellicht voor fabrieken, welke last hebben van roode vlekken op hun boter, een vingerwijzing gelegen zijn.

Plaatverklaring.

- Fig. 1. Sporenhoopjes op water-agar, vergrooting 60 × .
 „ 2. Dezelfde, vergrooting 350 × .
 „ 3. Beginnende sporenvorming, vergrooting 670 × .
 „ 4. Sporen in verschillende stadia van ontwikkeling, vergrooting 670 × .
 „ 5. Sporen met tusschenwanden, vergrooting 700 × .
 „ 6. Schimmelkolonie van stam 2 op water-agar met $\frac{1}{2}$ % Pepton Witte, waaraan toegevoegd is $\frac{1}{4}$ % galactose en $\frac{1}{4}$ % dextrose. Cultuur 6 dagen oud.
-

Red spotted moulded butter.

Moulded butter generally has black-green coloured spots which are caused by the mould *Cladosporium herbarum*. Besides these spots there sometimes appear red-coloured ones which are also to be ascribed to a mould. We succeeded in isolating it on the usual media. Unlike most moulds this species does not form spores on the said media. It does however do so when put on a medium composed of distilled water to which $2\frac{1}{2}$ % of agar-agar has been added. The growth on it is very poor but after seven to fourteen days black coloured little heaps are seen in the mycelium which at a higher magnification turn out to be conglomerates of blackish spores made up into bunches. By inoculating these spores on the usual media a pure culture of the mould can at once be obtained, a thing that is otherwise practically impossible. We have ascertained what are the best foodstuffs for this species. Of the different nitrogenous compounds and carbohydrates this microorganism prefers peptone Witte and laevulose. This is not only apparent from the growth but also from the colouring. However other saccharids are welcome too, a very good growth and colouring being for instance obtained with dextrose and galactose. As these two last saccharids are formed by inversion out of lactose they are more important factors in the growth of the mould than laevulose. Lactose too is useful as a source of carbon but does not give such an intensive red colouring as dextrose and galactose. The thermal death point of the spores was determined by immersing into hot water of different temperatures little fused test tubes which were filled with milk inoculated with spores. In this condition a heating at 48° C. for 10 minutes was sufficient to kill them. Like *Cladosporium herbarum* this mould is sensitive to salt, but its sensibility is greater; while the former requires 16 % of salt to inhibit the growth, already 11 % was sufficient for the present mould. In relation to the lactic acid the opposite is the case; the sensibility to it of *Cladosporium herbarum* is greater. To check the growth of *Cladosporium herbarum* 1 % of this acid is sufficient, while for the present species this percentage comes to $1\frac{3}{4}$ %. In milk the mould causes a rather considerable peptonisation and in older cultures ammonia is formed at last. For the rest the volatile acids acetic acid and propionic acid were formed in a ratio of 7 tot 1 in the case of the strain we examined.

JOH. WESTERDIJK who kindly identified the mould at our request found it to belong to the genus *Epicoccum* Link, the species being probably *Epicoccum heterochroum*.

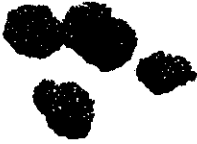


fig. 1.



fig. 2.



fig. 3.



fig. 4.



fig. 5.

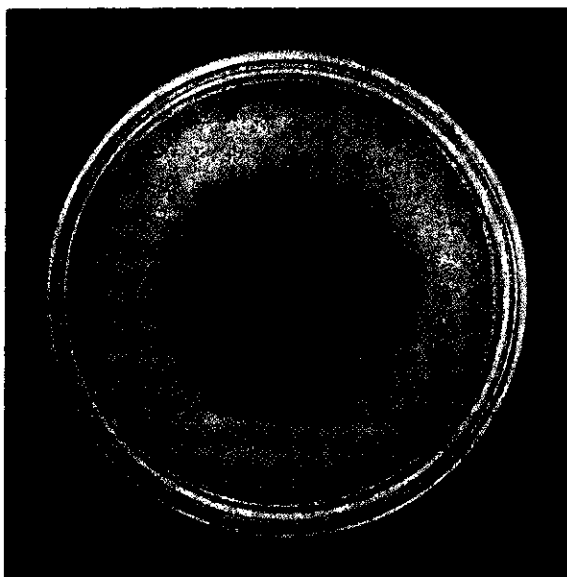


fig. 6.