



De schimmelproef

<https://hdl.handle.net/1874/322577>

1936

De schimmelproef

W. A. Mol

qu.
2

A qu.

192

DE SCHIMMELPROEF

PROEFSTUK

DEEL I

DE SCHIMMELPROEF

DE SCHIMMELPROEF

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
DR. W. E. RINGER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG
7 DECEMBER 1936, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR

DOOR

WILHELMINA ADOLPHINE MOL

GEBOREN TE GOES



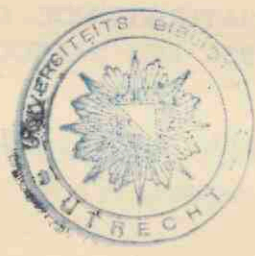
1936

Drukkerij Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

DE SCHIMMELPROEF

PROEFSCHEIDT

De proefschiedt van de schimmelproef is bedoeld om de aanwezigheid van schimmels in de voedingsstoffen te bevestigen. De proefschiedt is een belangrijke methode om de kwaliteit van de voedingsstoffen te controleren. De proefschiedt is een belangrijke methode om de kwaliteit van de voedingsstoffen te controleren. De proefschiedt is een belangrijke methode om de kwaliteit van de voedingsstoffen te controleren.



Aan mijn Ouders

Het beëindigen van mijn wetenschappelijke opleiding aan de Utrechtsche Universiteit biedt mij een welkome gelegenheid, U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren en Lectoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, mijn hartelijke dank te betuigen voor hetgeen Gij aan die opleiding hebt bijgedragen.

Hierbij geldt mijn dank wel in de eerste plaats U, Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor, voor alles, wat ik van U, gedurende de tijd, dat ik mijn proefschrift bij U bewerkte, mocht ondervinden. Uw raadgevingen en critische opmerkingen zijn van zeer veel waarde voor mij geweest; Uw hartelijke belangstelling zal mij steeds bijblijven.

Hooggeleerde KONINGSBERGER, de bereidwilligheid, waarmede Gij mij in staat stelt het schimmelpracticum in Uw laboratorium te volgen, stel ik op hooge prijs.

Verder dank ik mijn vrienden en collega's voor hun belangstelling en hulpvaardigheid, die zij mij gedurende mijn studietijd betoonden.

Het personeel van het Pharmaceutisch Laboratorium betuig ik mijn dank voor de verleende hulp.

INLEIDING

Het onderzoek over de deugdelijkheid van de toestand, waarin levens- en genotmiddelen verkeerden en waarbij zoowel de daarin aanwezige schimmel- als bacteriesoorten een rol spelen, althans kunnen spelen, heeft al sinds lange tijd de belangstelling van de voedingsmiddel-scheikundigen gehad. Zeer vele onderzoekers hebben zich met het vraagstuk, welke schimmels en bacteriën hierin voorkomen en welke, meestal schadelijke invloeden zij op de waar uitoefenen, beziggehouden.

In dit proefschrift zullen enkele levens- en genotmiddelen in het bijzonder behandeld worden, nl. cacao, meel en eenige specerijen. De redenen hiervoor zijn de moeilijkheden, verbonden aan het onderzoek hiervan, vooral wat betreft het schimmelgehalte.

De proef, die gewoonlijk voor het onderzoek daarvan, althans hier te lande, wordt gekozen, de zoogenaamde „Schimmelproef”¹⁾, levert in de praktijk bezwaren op, voornamelijk bij de interpretatie der resultaten. Het is daarom, dat wij aan dit deel van het onderzoek bijzondere aandacht hebben geschonken.

Na het mykologisch onderzoek werd tevens de bacteriologie dezer waren in beschouwing genomen.

Om een indruk te krijgen, aan welke infectiemogelijkheden de door ons in het onderzoek betrokken waren blootstaan en welke de, daarin te verwachten micro-organismen zijn of kunnen zijn, willen wij beginnen met een zeer korte uiteenzetting van de bewerkingen, die deze voedingsmiddelen ondergaan.

¹⁾ Zie hoofdstuk I.

Cacao.

De cacaoboonen worden, nadat zij uit de vrucht gehaald zijn, ter verwijdering van de resten van het aanhangend vruchtvleesch ¹⁾ en ter verfijning van de smaak ²⁾, aan een fermentatie onderworpen. Deze fermentatie bestaat daarin, dat men de boonen in bakken stapelt en luchtig afgedekt laat gisten, tengevolge waarvan de temperatuur stijgt. Wij onderscheiden hier een uitwendige en een inwendige fermentatie, d.w.z. een fermentatie van het vruchtmoes en een fermentatie, die zich in het inwendige der boonen afspeelt. De processen, die bij de eerstgenoemde fermentatie tot stand komen, zijn vrijwel bekend, hoewel toch een algeheele opheldering nog ontbreekt; van de fermentatie *in* de boonen weten wij nog maar zeer weinig.

De fermentatie van het vruchtmoes begint bij het opstapelen en eindigt bij het drogen. Een nauwkeurig onderzoek hiernaar is in 1912 ingesteld door Bainbridge en Davies ³⁾. Eenige jaren geleden heeft Otto ⁴⁾ een uitvoerige samenvatting over de cacaofermentatie gegeven, welke in hoofdzaak met de eerstgenoemde onderzoekingen overeenstemt. Het verloop van deze fermentatie is in groote trekken het volgende: Zij wordt veroorzaakt door micro-organismen, die uit de lucht, van het gebruikte materiaal en, niet te vergeten, van de handen der arbeiders op de vruchten geraken. Het is gebleken, dat als micro-organismen vele gistsoorten, schimmels, bacteriën en actinomyceten voorkomen.

Door de opstapeling der boonen en de heerschende temperatuur beginnen de aanwezige micro-organismen zich snel te ontwikkelen, waardoor de temperatuur in de stapel in

¹⁾ O. Loew, C. f. Bakt. II Abt. 21, 533 (1908).

²⁾ Fickendey, „ II „ 25, 313 (1910).

³⁾ J. S. Bainbridge en S. H. Davies, J. Chem. Soc. 101, 2210 (1912).

⁴⁾ A. Otto, Off. int. d. Fabr. de Choc. et de Cacao II, 437 (1932).

2—3 dagen tot 45° — 48° C stijgt. Door de boonen dagelijks om te werken, wordt er voor zorg gedragen, dat zij niet hooger wordt dan 50° C.

Bij de fermentatie onderscheidt men meerdere fasen:

In het eerste stadium ontwikkelen zich voornamelijk gisten, zooals Mycoderma-, Saccharomyces- en verschillende Torula-soorten. Hierdoor worden de aanwezige suikers in alcohol omgezet. Na deze alcoholische gisting worden de gisten door bacteriën verdrongen en wel voornamelijk door azijnzuurbacteriën, die de alcohol tot azijnzuur oxydeeren. Daarnaast komen ook coli- en aerogenesbacteriën, melkzuurbacteriën en schimmels voor, die de suiker afbreken tot melkzuur en andere organische zuren. Zelfs kan bij een te lange voortzetting en bij te geringe zuurstoftoevoer een boterzure gisting ¹⁾ optreden, die zeer ongewenscht is. De door de azijnzure gisting veroorzaakte verzuring mag niet te sterk zijn, daar dan de fermentatie, die *in* de boonen plaats heeft, vertraagd of zelfs tot stilstand gebracht kan worden. Hiervoor wordt ook door het dagelijksch omwerken zorg gedragen. De sterke verzuring in het vruchtmoes heeft tengevolge, dat de bacteriën hun eigengevormd zuur niet meer kunnen verdragen en beginnen af te sterven. Dan begint de derde fase, waarin door verschillende schimmelsoorten, gisten en talrijke bacteriën, voornamelijk aërobe, sporenvormende bacteriën der subtilis-mesentericusgroep, de organische zuren worden ontleed. Hierdoor wordt de zuurgraad dus verlaagd. Dit proces mag niet te lang doorgaan en om rotting te voorkomen, beëindigt men na een dag of zes de fermentatie door de cacao, na gewasschen van de nog los aanhangende resten van het vruchtvleesch, te laten drogen, hetzij in de zon, of kunstmatig in drooghuisen. Deze drie fasen in het verloop der fermentatie

¹⁾ A. Schulte im Hofe, Die Kakaofermentation u.s.w., Berlin, 1908.
W. Roepke, Cacao, 1917.

zijn natuurlijk niet scherp begrensd; zij gaan langzaam in elkaar over.

Hoewel deze fermentatie vrij nauwkeurig bestudeerd is, is zij nog steeds niet geheel verklaard. Een belangrijk gevolg van het proces is, dat het moes voor een groot deel wordt opgelost en uit de fermenteerbakken afvloeit. Daardoor komen de boonen vrij. Mogelijk is het hier, evenals bij de koffiementatie, een oplossen van de pectinestoffen door micro-organismen en enzymen in de cellen ¹⁾, maar het bewijs hiervoor ontbreekt alsnog.

Een bijzondere beteekenis heeft de fermentatie van het vruchtmoes door haar invloed op de fermentatie, die *in* de boonen plaats heeft; allereerst door de verhooging der temperatuur en misschien ook door de gevormde stoffen, die in de boonen kunnen diffundeeren.

De fermentatie *in* de boonen is het proces, waarop het bij de bewerking van de cacao speciaal aankomt. Van dit proces weten wij, zooals gezegd, nog zeer weinig. Wij zien alleen de uitwerking: het aroma wordt gevormd en de kleur verandert van violet in chocoladebruin, dit laatste waarschijnlijk door de splitsing van het glucoside „cacaonine”, door een in de boonen aanwezig enzym ²⁾, in cacaorood, suiker, coffeïne en theobromine. Men stelt zich voor, dat, door de verhoogde temperatuur en door het binnendringen van alcohol uit het moes, ten eerste de kiem en vervolgens het weefsel der beide cotylen wordt gedood, waardoor de processen, die wij tezamen fermentatie noemen, kunnen plaats hebben. Men neemt aan, dat deze processen onder invloed van enzymen uit de cel tot stand komen. Welke enzymen dit zijn, daaromtrent tasten wij nog vrijwel in het duister. Deze fermentatie is niet, zooals die van het vruchtmoes, bij het drogen afgelopen. Het ver-

¹⁾ A. Otto, Off. Int. d. Fabr. de Choc. et d. Cacao II, 437 (1932).

²⁾ W. Lazarus, Bot. Centralbl. 56, 296 (1893).
C. Schweitzer, Pharmaz. Zeitung 43, 389 (1898).

dient zelfs aanbeveling de boonen niet te snel te laten drogen, daar zij tijdens het drogen dikwijls nog meer aromatisch worden.

De cacao bevat dus na de fermentatie als micro-organismen reeds gisten, schimmels en talrijke bacteriën, vnl. aërobe sporendragers. Daarbij komt nog het feit, dat vele bewerkingen bij de cacao, o.a. het wasschen en het sorteeren, geheel met de hand geschieden, waarvan besmetting met talrijke bacteriën het gevolg is. Bij het bewaren van het verkregen product zal daarna nog infectie kunnen optreden met kiemen, die in de lucht aanwezig zijn, waaruit dus blijkt, dat in cacao een zeer groote verscheidenheid van micro-organismen kan worden aangetroffen.

Meel.

Dat micro-organismen in meel niet ontbreken, is bij de zoo ruimschoots bestaande gelegenheid tot infectie eigenlijk niet te verwonderen. Het aantal dezer kiemen kan dan ook dikwijls zeer groot zijn.

Er bestaan twee bronnen van infectie ¹⁾:

1. infectie van de buitenkant van de graankorrel, de „uitwendige infectie” en
2. de zoogenaamde „inwendige infectie”.

De eerste is quantitatief overheerschend en ook technisch meer van belang. Over de „inwendige infectie” hebben verschillende onderzoekingen plaats gehad: Na een eerste waarneming van Galippe ²⁾ heeft kort daarop Bernheim ³⁾ aangetoond, dat het inwendige van graankorrels niet steriel was, maar dat daarin coccen aanwezig waren. Echter be-

¹⁾ F. Lafar, Handb. d. techn. Mykologie II, 504 (1905—1908).

²⁾ M. Galippe, La semaine médicale 26, 267 (1887) ref. C. Bakt. 3, 108 (1888).

³⁾ H. Bernheim, Münchener Medizin. Wochenschrift, 35, 743 (1888).

wezen spoedig daarna Buchner ¹⁾, Fernbach ²⁾ en Lehmann ³⁾, dat de door Bernheim gebezigde methode voor het aantoonen van deze micro-organismen niet betrouwbaar was en onjuiste resultaten gaf. In 1902 is door Lindner en Chrzaszcz ⁴⁾ evenwel aangetoond, dat bij de gerst reeds in de bloeitijd verschillende soorten micro-organismen binnendringen, die dan in de rijpe korrel nog aanwezig en kiemkrachtig zijn.

De grootte van de „uitwendige infectie”, dus het aantal kiemen, dat op de buitenkant van de graankorrel aanwezig is, hangt geheel af van de mate van reinheid, waarmede de oogst en de daarop volgende bewerkingen plaats hebben. Dientengevolge loopt het kiemgetal van de graankorrels, die in de handel worden gebracht, zeer sterk uiteen, wat ook blijkt uit de quantitative gegevens van Hoffmann ⁵⁾ en van Becker ⁶⁾, waarvan de laatste per gram gerst 5000—12.000.000 kiemen telde.

Het kiemgehalte van meel zal des te lager zijn, naarmate de korrels zorgvuldiger van de zemelen zijn ontdaan. Uit dezelfde korrel bereid, zal dus een in technische zin fijner meel minder kiemen bevatten dan een grover, d.w.z. een meel, rijker aan zemelen. Waar om verschillende redenen uit tarwe een meel van hoogere fijnheid bereid wordt dan uit rogge ⁷⁾, zal in het algemeen roggemeel meer kiemen bevatten dan tarwemeel. Een volledige verwijdering van de vruchtwand en de zaadhuid en de zich daarop bevindende kiemen, is technisch

¹⁾ H. Buchner, Münchener Medizin. Wochenschrift, 35, 906 (1888).

²⁾ A. Fernbach, Ann. inst. Pasteur, 2, 567 (1888).

³⁾ K. B. Lehmann, Münchener Medizin. Wochenschrift, 7, (1889).

⁴⁾ P. Lindner, zie F. Lafar, Handb. d. techn. Mykologie V, 163 (1905—1914). T. Chrzaszcz, Wochenschrift f. Brauerei, 19, 590 (1902).

⁵⁾ Zie F. Lafar, Handb. d. techn. Mykologie V, 164, (1905-1914).

⁶⁾ H. Becker, Z. f. d. ges. Brauwesen 20, 437 (1897).

⁷⁾ Zie F. Lafar, Handb. d. techn. Mykologie II, 504 (1905-1908).

niet uit te voeren; de groeve nl., die in de lengterichting over de korrel verloopt, is door de vruchtwand en de zaadhuid bekleed, welke niet van de korrel loslaten. Een door Thomann¹⁾ onderzocht monster van roggemeel bevatte per gram ongeveer 28000 op bouillongelatine kweekbare kiemen, tarwe-meel ongeveer 20000 kiemen.

Luchtkiemen zal men dus in de eerste plaats in meel kunnen aantreffen, zoowel bacteriën als schimmelsporen, beide in groote getale. Wij willen hier nog niet nader ingaan op de soorten, die er in aan te treffen zijn. Het zullen voornamelijk sporendragers zijn en wel, zooals gebleken is, van de subtilis-mesentericusgroep, met alle onaangename gevolgen van dien (vgl. het draderig worden van brood, z.g.n. „leng” door *Bacillus mesentericus ruber*).

Schimmelsporen treft men er ook zeer vele op aan. Een nadere uiteenzetting hiervan willen wij eveneens tot het desbetreffende hoofdstuk²⁾ uitstellen.

Specerijen.

Zooals reeds in het handboek van Beythien³⁾ door Kossowicz⁴⁾ is opgemerkt, is het gehalte aan bacteriën en schimmels van specerijen vrij hoog. Zijn onderzoekingen gaan vnl. over de voor tafelmosterd benodigde grondstoffen. Daarbij bleek hem, dat dit geldt voor alle gedroogde vruchten en zaden, die als specerijen worden gebruikt, zooals mosterdzaad, anijs, venkel, kardamom, koriander, kummel, nootmus-

¹⁾ Thomann, C. f. Bakt. II Abt., 6, 740 (1900).

²⁾ Hoofdstuk V.

³⁾ A. Beythien, C. Hartwich en M. Klimmer, Handbuch der Nahrungsmitteluntersuchung, 1920, III. Teil, 503—504.

⁴⁾ A. Kossowicz, Z. f. d. landw. Vers. wesen in Österr. 8, 645, (1905).

” ” ” ” 9, 111, (1906).

” ” ” ” 12, 464, (1909).

” ” ” ” 13, 95, (1910).

” ” ” ” 15, Heft 7 (1912).

caat, Spaansche peper, witte en zwarte peper, piment, vanille en evenzeer voor de gedroogde bloemknoppen (kruidnagelen), stempels (saffraan), bloemen, bladeren en stengeldeelen (marjolein), bast (kaneel) en wortelstokken (gember).

Voor het grootste deel is dit aanzienlijk kiemgehalte te wijten aan de ondergane bewerkingen: het verzamelen, drogen en verpakken en dit gehalte wordt bij gemalen specerijen nog hooger. Ook hier gaat het hoofdzakelijk om de in de lucht voorkomende, sporenvormende bacteriën en schimmelsporen.

Nu worden vele specerijen bovendien nog aan bepaalde behandelingen onderworpen, zooals fermentatie, behandeling met sterke azijn e.a., waardoor een vermindering van het kiemgehalte plaats heeft. Daarnaast oefent ook de aetherische olie, die zich in de verschillende specerijen bevindt, een bactericide werking uit, die trouwens voor vele niet al te hoog aangeslagen mag worden (zie Hoofdstuk III). Na de ondergane behandeling is er weder ruimschoots gelegenheid tot infectie, zoodat de specerijen uit de handel een vrij aanzienlijk gehalte aan bacteriën en schimmelsporen bevatten.

Wij zullen ons in dit proefschrift beperken tot die waren, die ter onderzoek van het schimmelgehalte in de regel aan de schimmelproef¹⁾ worden onderworpen. Dit zijn cacao, meel, nootmuscaat en peper.

Als wij beproven hebben, welke bezwaren hieraan verbonden zijn en op welke wijze deze zijn te ondervangen, zullen de laatste hoofdstukken aan de bacteriologie van deze waren worden gewijd.

¹⁾ Zie Hoofdstuk I.

HOOFDSTUK I

DE SCHIMMELPROEF

In de „Vereenbarungen zur Untersuchung von Nahrungs- und Genuszmitteln für das Deutsche Reich“¹⁾ beschrijft Emmerling reeds in 1897 een methode om voedingsmiddelen op de aanwezigheid van schimmel te onderzoeken. Hij geeft daar het volgende voorschrift: In ein Erlenmeijer-Kölbchen von etwa 200—300 cm³ Inhalt giebt man ca. 100 cm³ Wasser, verschlieszt dasselbe mit sterilisirter Watte, kocht das Wasser auf etwa 25—30 cm³ ein und lässt, nachdem man über den Baumwollepfropfen eine Papierhülse gestülpt hat, erkälten. Nach Entfernung des Baumwollepfropfens füllt man thunlichst schnell in das schräg gehaltene Kölbchen — um das Hineinfallen von Luftstaub zu verhindern — mittels eines sterilisirten Löffels aus der Mitte des Gegenstandes so viel von letzterem ins Kölbchen, dasz die Masse gut durchfeuchtet ist. Darauf verschlieszt man das Kölbchen wieder schnell mit dem Baumwollepfropfen und Papier und stellt es in einem Raum von Bruttemperatur (30°—40° C) auf.

Bei stark verschimmelten Gegenständen zeigt sich schon innerhalb 24 Stunden ein weisser Ueberzug auf der breiigen Masse, bei mäsizig verschimmelten Gegenständen tritt dieser erst nach 3—4 Tagen hervor, durchweg um so später, je weniger Schimmelsporen und Bakterien vorhanden sind.

De voorschriften, welke door de Codex Alimentarius zijn

¹⁾ Vereenbarungen zur einheitlichen Untersuchung und Beurtheilung von Nahrungs- und Genuszmitteln, sowie Gebrauchsgegenständen für das Deutsche Reich. Heft I, 20 (1897).

aangegeven en in de Koninklijke Besluiten ¹⁾ op grond van de Warenwet zijn beschreven, verschillen in principe niet met dit van Emmerling. Zij luiden als volgt:

Meel- en Cacaobesluit:

1.5 à 2 g van de te onderzoeken waar worden in een goed sluitende gesteriliseerde cultuurschaal van ± 10 cm diameter met ongeveer 3 cm^3 steriel water tot een papje geroerd en gelijkmatig over den bodem der schaal verdeeld. De schaal wordt daarna omgekeerd in een broedstoof van $35^\circ - 37^\circ \text{ C}$ geplaatst. Na 24 uur wordt de schimmelgroei beoordeeld.

Specerijenbesluit:

In een steriel Erlenmeijer kolfje van ongeveer 200 cm^3 inhoud worden 10 cm^3 steriel water gemengd met ongeveer 5 g tot poeder gebrachte specerij, of zooveel meer, totdat al het water is opgenomen. De kolf wordt, met steriele wattenprop gesloten, gedurende 3×24 uur bij 35° C geplaatst, waarna het resultaat wordt beoordeeld.

Als eisch is gesteld, dat na de schimmelproef de waar noch beschimmeld, noch op andere wijze duidelijk bedorven of ontleed mag zijn.

Bij deze proef worden de waren dus onder verhoogde vochtigheidsgraad en bij verhoogde temperatuur gehouden, dus onder omstandigheden, gunstiger voor de schimmelgroei, hoewel zal blijken, dat beide factoren niet zoo gunstig mogelijk zijn gekozen.

Men heeft eerst de proef ook bij meel en cacao voorgeschreven op dezelfde manier als bij specerijen, nl. in een Erlenmeijer kolf, omdat het in de praktijk eenvoudiger was, hierin 100 cm^3 water in te dampen tot 10 cm^3 , waardoor steriliteit werd verkregen, dan steeds steriel water in voorraad te

¹⁾ In het vervolg aan te duiden als K.B.

moeten hebben. Later zag men in, dat de proef beter in een Petri-schaal uitgevoerd kon worden, omdat daar meer aërobe omstandigheden heerschen dan in een Erlenmeijer kolf, daar in een Petri-schaal een, zij het ook geringe, luchtcirculatie plaats heeft en schimmels sterk aëroob zijn. De proef bleek in een Petri-schaal inderdaad iets sneller en iets sterker positief uit te vallen. Waarom men wel voor meel en cacao, maar niet voor specerijen, de bepaling heeft veranderd, is ons niet bekend. Aan de Keuringsdienst in Utrecht wordt steeds, ook voor specerijen, de proef in een Petri-schaal uitgevoerd.

Als bezwaren tegen deze proef zijn de volgende te noemen:

1. Het resultaat van de proef is sterk afhankelijk van de wijze van uitvoering. Vooral de vochtigheid is van groote invloed en moet dan ook nauwkeurig aangegeven worden. De hoeveelheid water, die men toe moet voegen, is in sommige gevallen zoodanig, dat de massa nog zeer visceus is; in andere gevallen is de inhoud van de schaal zoo dun-vloeibaar, dat deze niet om te keeren is. Natuurlijk heeft dit invloed op de schimmelgroei, wat blijkt uit de volgende waarnemingen, waarbij enkele monsters meel, cacao, peper en nootmuscaat 3 dagen bij 37° C zijn bewaard met resp. 2, 3 en 4 cm³ water per 1.5 gram der waar.

TABEL I

Monster	a	b	c	
	1.5 g + 2 cm ³ water	1.5 g + 3 cm ³ water	1.5 g + 4 cm ³ water	
meel	22 kolonies	17 kolonies	—	a > b > c
nootmuscaat	+	+	+	a > b = c
nootmuscaat	+	+	—	a > b > c
nootmuscaat	+	—	—	a > b = c
nootmuscaat	++	++	++	a = b = c
witte peper	+	+	zwak +	a > b > c
cacao	+	5 kol.	+	a = b = c
cacao	+	4 kol.	2 kol.	a > b > c
cacao	++	++	++	a = b = c

Hierin beteekent +, dat de plaat voor een deel met een schimmellaag was begroeid, ++, dat de geheele plaat met een dikke laag schimmel was bedekt.

Het voorschrift geeft aan: 1.5 g + 3 cm³ water. Men ziet, dat bij verschillende monsters de schimmelproef bij een toevoeging van 2 cm³ water sterker positief uitvalt. Bij 4 cm³ water is de groei in vele gevallen minder sterk dan bij de voorgeschreven hoeveelheid.

2. De *temperatuur* van 37° C, die het K.B. voorschrijft voor de proef, is volgens ons niet de meest aanbevelenswaardige. Zooals wij later uitvoeriger zullen laten zien, is deze te hoog. De meeste schimmels hebben een vrij wat lagere optimum-temperatuur. Het komt meermalen voor, dat monsters een negatieve schimmelproef bij 37° C geven, daarentegen bij 22° C de uitslag van de proef positief is. Dit is afhankelijk van de soorten schimmels, die in de waar aanwezig zijn en bij 37° C niet, bij 22° C wel groeien. Als de temperatuur, waar de meeste schimmelsporen gelegenheid tot uitgroeien verkrijgen, zouden wij 25° C willen noemen.

3. Het grootste bezwaar van de schimmelproef is wel de *beoordeeling*. Oorspronkelijk was het bij Emmerling alleen een kwalitatieve proef; men heeft haar later door een in-deeling in sterk positief, positief, zwak positief en zeer zwak positief, semi-quantitatief gemaakt. Het is nu echter de moeilijkheid, dat deze qualificatie sterk afhankelijk is van de persoon, die de uitslag beoordeelt. Positief noemt de één het, als de schaal voor een derde gedeelte met schimmel is bedekt; een ander noemt de uitslag eerst positief, als de geheele plaat met schimmel is begroeid. Dit is nog niet zoo erg, tenslotte mag ieder zijn qualificatie voor zich weten, als het punt, waarop de waar afgekeurd wordt, maar bij de verschillende onderzoekers hetzelfde is en dat is nu zeker niet altijd het geval. De één is in zijn beoordeeling veel scherper dan de ander en daarom wordt behoefte gevoeld aan een scherp

omschreven maat voor de beoordeeling van dit onderzoek. Om deze reden zijn wij gaan zoeken naar een meer quantitative en minder subjectieve methode.

Ook is het gewenscht bij de beoordeeling rekening te houden met de herkomst van het product. De Koninklijke Besluiten doen voorkomen, alsof de waarde van de schimmelproef voor alle waren dezelfde is. Zij stellen immers, zoowel in het Meel- en Cacao-, als in het Specerijenbesluit, de eisch, dat na de schimmelproef de waar noch schimmelig, noch op andere wijze duidelijk bedorven of ontleed mag zijn. Deze eisch is voor waren als peper e.d., die verkregen zijn, enkel door het vermalen van het ruwe product, veel scherper dan voor waren als cacao e.d., die een zekere zuivering, i.c. een roostproces, hebben ondergaan en dientengevolge minder schimmelsporen zullen bevatten dan de eerstgenoemde.

Als men de proef volgens het K.B. uitvoert, zal de gedachte opkomen, of dit nu wel de meest geschikte wijze is, om door schimmel sterk verontreinigde waar te herkennen; bovendien, om de daarin aanwezige schimmelsporen te doen groeien, n.l. door het aanmengen met water en het dan één dag of langer bij verhoogde temperatuur te laten staan. De meest geschikte methode om de schimmelsporen te laten ontkiemen is het zeker niet, daarvoor zijn wel betere voedingsbodems te vinden, dan een cacao-, meel- of peperpapje, maar dat is de bedoeling ook niet. Juist, als op deze wijze, enkel door het bevochtigen en op iets hogere temperatuur bewaren, beschimmelen optreedt, is er zeer veel kans, dat de waar, ook zonder zoo sterke bevochtiging, reeds bij een iets verhoogde temperatuur gaat beschimmelen en bederven en dus niet voor het gebruik geschikt mag worden geacht.

Wij keuren de methode van het K.B. dan ook niet in zijn geheel af, omdat wij het principe ten volle aanvaarden, n.l. het uit de handel weren van waren, die in ondeugdelijke toestand verkeerren, of zoo aanstonds zullen verkeerren, maar

wij willen trachten haar te verbeteren en aan te vullen door een wijze van uitvoeren, welke minder persoonlijke factoren, subjectieve gevoelens en inzichten bij de beoordeeling doen spreken.

Literatuur.

In de literatuur wordt de proef zeer zelden genoemd. Emmerling beschrijft haar het eerst in de „Vereinbarungen zur Untersuchung von Nahrungs- und Genussmitteln für das Deutsche Reich“¹⁾. König zegt in zijn handboek bij de bepaling van het kiemgehalte van meel²⁾, dat de door Emmerling beschreven bepaling „kein einwandfreies Bild“ geeft.

De proef is opgenomen in de Codex Alimentarius en staat, als gevolg daarvan, beschreven in de Koninklijke Besluiten tot toepassing van de artikelen 14 en 15 der Warenwet (Staatsblad 1919, no. 581).

In de buitenlandsche literatuur wordt er niet over gerept en het schijnt, dat de proef alleen in ons land geregeld wordt toegepast.

In 1926 heeft Imhoff³⁾ reeds zijn bezwaren tegen de schimmelproef uitgesproken op de conferentie voor voedingsmiddelscheikunde. Daarna zijn nog eenige artikelen van Van Raalte⁴⁾ verschenen, die het gebruik van pruimenagar aanraadt.

¹⁾ l.c. blz. 9.

²⁾ J. König, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel III, Teil 2, 622.

³⁾ J. A. Imhoff, Chem. Wkbl. 23, 293 (1926).

⁴⁾ A. v. Raalte, Chem. Wkbl. 28, 199 (1931).

„ Chem. Wkbl. 28, 423 (1931).

HOOFDSTUK II

GEWIJZIGDE SCHIMMELPROEF I

Daar de schimmelproef, op boven beschreven wijze uitgevoerd, niet het gewenschte resultaat geeft, zijn wij begonnen met een nieuwe methode te onderzoeken, nl. door gebruik te maken van speciaal voor schimmels geschikte voedingsbodems.

In de literatuur worden verschillende daarvoor genoemd; men kan ze verdeelen in:

1. natuurlijke, gemaakt van vruchten als pruimen, rozijnen, kersen, verder van rijst, aardappelen, wortelen, mout e.d. en
2. kunstmatige, bestaande bijv. uit een waterige oplossing van anorganische zouten en een suiker als koolstofbron.

De bereiding en samenstelling van deze voedingsbodems zijn als volgt:

Pruimenagar.

Het voorschrift, dat Boddaert¹⁾ hiervoor geeft, luidt: 200 gram ontpitte, gedroogde pruimen worden met 1 liter water $\frac{1}{2}$ uur gekookt, gecoleerd, opgekookt en gefiltreerd. Het filtraat wordt na toevoeging van 2 0/0 agar gedurende 20 minuten in een autoclaaf bij 120° C gesteriliseerd.

De agar, die wij op deze wijze maakten, bleek bij afkoeling tot kamertemperatuur niet geheel stijf te worden en dus niet goed gebruikt te kunnen worden. Het zure pruimen-

¹⁾ Mededeeling aan Dr. J. D. Filippo, secretaris van de Commissie ex art. 17 van de Warenwet.

aftreksel zal de agar bij het verhitten op 120° C gedurende 20 min gedeeltelijk ontleed hebben, waardoor deze niet meer vast wordt. Wij hebben daarom het pruimendecoct en de agar afzonderlijk gesteriliseerd en deze daarna samengevoegd, waardoor dit bezwaar was opgeheven.

Wij geven hieronder het voorschrift, dat wij volgden:

200 g ontpitte, gedroogde pruimen worden met 500 cm³ water $\frac{1}{2}$ uur gekookt, gecoleerd, daarna 1 uur verhit op 120° C, gefiltreerd, en 20 minuten gesteriliseerd op 120° C. Daarnaast worden 25 g agar opgelost in 500 cm³ water, 5 min voorverhit op 120° C, gefiltreerd, daarna 20 min gesteriliseerd op 120° C. Het pruimenaftreksel en de agar worden hierna op steriele wijze en onder schudden bij elkaar gevoegd, in steriele Erlenmeijer kolven van 250 cm³ geschonken en, afgesloten met een wattenprop, bewaard.

Voor het gieten van de platen smelt men de agar in kokend water. Als men zorgt, dat men de pruimenagar na samenvoegen niet lange tijd boven 100° C verhit, blijft zij goed en verliest de agar niet haar speciale stollings-eigenschappen.

De op deze wijze verkregen pruimenagar had een P_H , die varieerde van 3.8 tot 4.2.

Rozijnen- en kersenagar.

Deze worden op dezelfde wijze bereid. De kersen worden ontpit en de rozijnen worden zoo goed mogelijk in een mortier fijngewreven. Ook hier is het wenschelijk het vruchtenaftreksel en de agar van elkaar gescheiden te steriliseeren, hetgeen vooral bij kersen noodzakelijk is, daar deze nog sterker zuur reageeren dan pruimen.

Rozijnenagar $P_H = 3.8$. Kersenagar $P_H = 3.5$.

Moutagar.

Een mengsel van 49 0/0 moutextract, 49 0/0 water en 2 0/0 agar 1 uur voorverhitten op 120° C, filtrereen, buizen vullen

met elk 10 cm³ en deze 20 minuten steriliseeren op 120° C. Ook hier hebben wij het eenmaal gehad, dat de agar niet mooi stijf werd, zoodat het ook hiervoor waarschijnlijk aan te bevelen is, het moutextract en de agar eerst na sterilisatie samen te voegen. Moutagar $P_H = 3.7$.

De P_H hebben wij door toevoeging van een passende indicator (methyloord of methyloranje) in de comparator bepaald. Hiervoor is het, voornamelijk bij moutagar omdat deze zeer donker van kleur is, noodig, de agar eenige malen te verdunnen, voordat men in de comparator beoordeelen kan. Dit maakt de bepaling natuurlijk minder nauwkeurig, maar voor ons doel is zij voldoende.

Anorganisch agar-milieu.

(Levine and Schoenlein¹⁾ No. 23.)

Gedestilleerd water	3000 cm ³
MgSO ₄	1.5 g
K ₂ HPO ₄	3.0 g
KCl	1.5 g
FeSO ₄	0.03 g
agar	60 g

Pepton — saccharose — glucose — agar.

pepton	0.5 ‰
glucose	2 ‰
saccharose	3 ‰
KH ₂ PO ₄	0.1 ‰
MgSO ₄	0.05 ‰
agar	2 ‰

¹⁾ M. Levine and H. W. Schoenlein, A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms, 1930, 23.

Zetmeelagar, bereid volgens Levine and Schoenlein ¹⁾
No. 2099.

Deze laatste drie voedingsbodems bleken minder geschikt te zijn. Wij wilden nl. een voedingsbodem bereiden, speciaal voor schimmels, waarop de bacteriën niet of weinig groeiden. Voor dit doel waren de anorganische agar, de pepton-saccharose-glucose-agar en de zetmeelagar niet zuur genoeg. Bovendien groeiden op de anorganische agar aanmerkelijk minder soorten schimmels.

Behalve deze hebben wij nog een appelagar onderzocht, maar daarop groeiden de schimmels in 't geheel niet.

De andere voedingsbodems, pruimen-, kersen-, mout- en rozijnenagar zijn alle evengoed bruikbaar. Op alle komen de verschillende schimmelsoorten goed op.

Wij hebben bij onze verdere proeven nagenoeg uitsluitend pruimenagar gebruikt, om het voordeel, dat gedroogde pruimen het geheele jaar door te verkrijgen en goedkoop zijn en men dus niet, zoals bij kersenagar het geval zou zijn, in de zomer groote voorraden zou moeten bereiden en bewaren, wat natuurlijk zijn practische bezwaren heeft.

De eerste proeven, om de schimmelproef uit te voeren op een vaste voedingsbodem en deze daardoor minder subjectief en meer quantitatief te maken, zijn genomen door Van Raalte. ²⁾ Deze deed zijn proeven met pruimenagar als voedingsbodem en onderzocht verschillende hoeveelheden der waar, nl. 25, 50 en 75 mg op het aantal aanwezige schimmelsporen, om na te gaan, of inderdaad het aantal opkomende schimmels evenredig was met de hoeveelheid gebruikt materiaal en om uit te maken, welke hoeveelheid materiaal voor de beoordeeling het meest geschikt was. De platen werden 2×24 uur

¹⁾ l.c. blz. 12.

²⁾ A. v. Raalte, Chem. Wkbl. 28, 423 (1931).

bij 37° C bebroed. Proeven zijn gedaan met tarwebloem, kindermeel, maizena en nootmuscaat. Bij een klein aantal opgekomen kolonies bleek van een directe evenredigheid geen sprake te zijn; bij een opkomen van tien of meer schimmels op de plaat van 75 mg was de geleidelijke opklimming in aantal met de geënte hoeveelheid echter wel duidelijk. Waarschijnlijk zou men, indien men met een grooter aantal schimmels per plaat had gewerkt, wel betere evenredigheid hebben verkregen, want in de microbiologie gaat de evenredigheid in het algemeen niet tot minder dan tien kolonies per plaat. Op de beoordeeling van zijn platen komen wij later terug.

Een nauwkeurig voorschrift van hun werkwijze is niet gepubliceerd. Ook wordt niet vermeld op welke wijze de pruimenagar is bereid.

Boddaert¹⁾ beveelt een methode ter onderzoek aan, die als volgt luidt: 1 gram meel, resp. cacao, wordt met 10 cm³ steriel water in een steriel mortiertje aangewreven, met een steriele pipet wordt 0.1 cm³ gebracht op de oppervlakte van pruimenagar, welke zich bevindt in een Petri-schaal van 12 cm diameter, en daarop met een metalen draad zoo gelijk mogelijk verdeeld. De plaat wordt daarna in een broedstoof van ca 34° C geplaatst. Na 24 uur worden de schimmelkolonies geteld. Later geeft hij nog aan de proef, in plaats van met 0.1 cm³, met 0.2 cm³ van de suspensie uit te voeren en de platen ook na 2 × 24 uur te beoordeelen.

Verder zegt hij, indien 10 kolonies per 0.1 cm³ zijn opgekomen, de uitkomst als positief te beschouwen.

Door het aanmengen met water wordt het meel, de cacao enz., beter in de pruimenagar verdeeld dan wanneer men het materiaal droog met de pruimenagar mengt.

Het verdeelen van de suspensie over de oppervlakte van

¹⁾ Mededeeling aan de Commissie ex art. 17 v. d. Warenwet.

de agar gaat met behulp van een metalen draad niet gemakkelijk. Men kan daarvoor beter een steriele glazen Drigalsky-spatel nemen. Het bezwaar hiervan, nl. dat er vrij veel van het meel aan blijft hangen, is op te heffen, door op een tweede plaat een tweede 0.1 cm^3 met dezelfde spatel uit te strijken, waarbij men mag verwachten, dat hieraan ongeveer een zelfde hoeveelheid meel of andere materie blijft kleven. Het is echter niet noodzakelijk dit te doen, omdat ons gebleken is, dat deze fout ver binnen de proeffout valt. De fout is nl. $\pm 1\%$ en deze overeenkomst bereiken de duplo-bepalingen nimmer.

Wij hebben bij onze bepalingen de methode nog iets gewijzigd, nl. door van de suspensie van 1 g der waar in 10 cm^3 water, 1 cm^3 in een Petri-schaal te brengen en hieraan de nog juist vloeibare pruimenagar toe te voegen, waarna de plaat wordt rondgezwent, teneinde het meel goed in de agar te verdeelen.

De reden, dat wij 1 cm^3 , dus vijfmaal zooveel als Boddaert, van het materiaal gebruiken, is, dat wij liefst zooveel mogelijk kolonies per plaat wilden verkrijgen, zooveel, dat de plaat nog goed telbaar, d.w.z. met goed gescheiden schimmelkolonies bedekt, was, omdat dit getal het meest overeen zal komen met het werkelijke aantal kiembare schimmelsporen in de waar.

Ten tweede verdeelen wij de suspensie in de pruimenagar en strijken haar niet over de oppervlakte uit. In het laatste geval zou men de plaat niet kunnen omkeeren, omdat 1 cm^3 water niet door de pruimenagar wordt opgenomen, maar er op blijft liggen. Wij gaven er de voorkeur aan, de platen omgekeerd in de broedstoof te plaatsen om geen hinder te hebben van condenswater, dat zich tegen het deksel van de Petri-schaal verzamelt en op de voedingsbodem druppelt.

Men zal hier het bezwaar kunnen opperen, dat het beter

is, de schimmelsporen over de oppervlakte van de voedingsbodern uit te strijken dan hen in deze te verdeelen, omdat schimmels sterk aëroob zijn. Wij hebben echter steeds gewerkt met een dunne laag pruimenagar in de Petri-schaal en het bleek, dat op deze wijze dezelfde schimmels in hetzelfde aantal opkwamen, als bij verdeling over de oppervlakte. De schimmelsporen schijnen door deze dunne laag agar gemakkelijk te kunnen uitgroeien tot de oppervlakte en daar een kolonie te vormen. Zie hiervoor tabel II.

TABEL II.

No.	0.1 g suspensie, daarop agar.	Agar, daarop 0.1 g suspensie.
<i>Cacao</i>		
138	20	21
863	4	3
390	1	2
144	6	5
136	2	3
4544	41	48
<i>Maizena</i>		
74	ontelbaar	ontelbaar
102	40	35
134	18	25
213	34	30
298	19	20

Bij waren, als nootmuscaat e.d., waarin harde brokjes voorkomen en waarvan geen, pipetteerbare, suspensie te maken is, hebben wij 0.1 g in de Petri-schaal afgewogen, even met een weinig steriel water bevochtigd, opdat wij deze beter in de pruimenagar konden verdeelen en zij niet in klontjes aan elkaar zouden blijven hangen, om daarna de agar toe te voegen.

Wij hebben nog proeven genomen met het vermahlen van nootmuscaat tot een fijnheidsgraad B 20 in een goed gereinigde molen, maar voordeelen bleek dit niet te bieden.

Blijft de kwestie van de *broedtemperatuur*. De temperatuur van 37° C, die in het K.B. aangegeven staat, is allerminst de juiste. Deze temperatuur werd waarschijnlijk gekozen, omdat het meeste bacteriologische onderzoek bij die temperatuur wordt uitgevoerd en het alleen de bedoeling was het materiaal bij grootere vochtigheid en een verhoogde temperatuur te observeren. Deze temperatuur is echter voor het merendeel der schimmels te hoog. Gaat men na, welke de optimumtemperatuur van de verschillende, meest voorkomende schimmels is ¹⁾, dan blijkt, dat, wil men zoo veel mogelijk alle aanwezige schimmelsporen op de plaat zien verschijnen, men een temperatuur tusschen 20° C en 30° C zal moeten kiezen.

Bij het zoeken naar de geschikte temperatuur bleek het volgende:

Proeven met meelmonsters, afkomstig van de Keuringsdienst te Utrecht ²⁾:

Pruimenagar bij 22° C.

Na vier dagen broeden, ontstaan platen met vele kleine, goed van elkaar gescheiden schimmelkolonies, hoofdzakelijk bestaande uit *Penicillium glaucum* en *Mucor stolonifer*. Deze platen zijn goed telbaar. *Aspergillus*-soorten komen bij deze temperatuur *niet* op. In reïncultuur groeien zij bij 22° C wel, zij het niet vlug, maar in de Petri-schaal, waar het gaat om de survival of the fittest, is *Penicillium glaucum* in het voordeel, die 22° C als optimum-temperatuur heeft.

Pruimenagar bij 37° C.

Na 2 à 3 dagen broeden, ontstaan platen, waarvan een

¹⁾ Zie hiervoor F. Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, 1904—1914. G. Lindau, Die mikroskopischen Pilze, 1922 e.a. handboeken.

²⁾ Voor het bereidwillig afstaan dezer en andere monsters willen wij den Directeur van die dienst op deze plaats nogmaals onze hartelijke dank betuigen.

groot deel overgroeid, dus niet meer telbaar zijn. Dit is voornamelijk het geval bij meelsoorten, waarin zich sporen van *Mucor stolonifer* bevinden, die zich bij deze temperatuur zeer snel ontwikkelen en in korte tijd de geheele plaat overgroeien. Daar dit een zeer veel voorkomende schimmel is, is het dus niet aan te bevelen de proef alleen bij 37° C uit te voeren. *Penicillium glaucum* komt dan zelfs in het geheel niet op. Bij 37° C ontstaan voornamelijk kolonies van *Mucor stolonifer* en van verschillende *Aspergillus*-soorten.

Echter is de proef ook niet alleen bij 22° C in te zetten. Als men de proef bij beide temperaturen uitvoert, zoowel bij 37° C, als bij 22° C, brengt men op deze wijze alle soorten tot ontwikkeling en krijgt men een overzicht van de schimmelrijkdom, kwalitatief, zoowel als kwantitatief, van de waar.

Omdat het de bepaling zou vereenvoudigen, werd gezocht naar een temperatuur, gelegen tusschen 22° C en 37° C, waarbij zich zooveel mogelijk alle schimmelsoorten zouden ontwikkelen, terwijl de platen niet te snel zouden worden overgroeid, dus goed telbaar bleven.

Pruimenagar bij 30° C.

Deze temperatuur bleek nog te hoog te zijn. *Aspergillus*-soorten groeiden te snel, vormden te groote kolonies, terwijl aanwezige *Penicillium glaucum* niet geregeld opkwam.

Pruimenagar bij 25° C.

Dit bleek een goede tusschen-temperatuur te zijn. De meest voorkomende soorten komen hier goed op. De platen zijn in het algemeen goed telbaar, soms reeds na drie, meestal na vier dagen. Hiermede is natuurlijk niet gezegd, dat men *alle* aanwezige schimmelsporen bij deze temperatuur tot ontwikkeling zal brengen. Dit zal waarschijnlijk ook wel niet het geval zijn, maar deze temperatuur is, volgens ons, de meest ge-

schikte, omdat er zich zoo *veel mogelijk* soorten bij ontwikkelen.

De schimmelproef wordt dan als volgt uitgevoerd:

1 g der waar wordt met 10 cm³ steriel water in een steriel mortiertje verwreven, zoodat een homogene suspensie wordt verkregen. Hiervan wordt, met een steriele pipet, 1 cm³ in een Petri-schaal, met diameter van 9 à 10 cm gebracht en een dunne laag, nog vloeibare, pruimenagar toegevoegd, waarvoor \pm 10 cm³ agar noodig is. Door rond te zwenken wordt het materiaal gelijkmatig in de agar verdeeld. Men laat nu de plaat afkoelen en stollen, waarna zij omgekeerd in een broedstoof van 25° C wordt geplaatst. Na vier dagen wordt het aantal schimmelkolonies geteld.

Het groote voordeel van het gebruik van pruimenagar, boven de methode van het K.B., is, dat men alle aanwezige, kiembare schimmelsporen op de plaat tot kolonies ziet uitgroeien. Het is heel begrijpelijk, dat bijvoorbeeld op het cacaopapje, dat men maakt volgens het K.B., niet alle schimmels zullen groeien. Dit bleek dan ook heel treffend bij een cacaomonster (No. 184), waarbij, volgens het K.B., na 24 uur de geheele plaat overdekt was met schimmel van één bepaalde soort, nl. *Mucor stolonifer*. Op pruimenagar bleek, dat er, behalve deze schimmel, in die cacao sporen aanwezig waren van *Penicillium glaucum*, *Monilia spec.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* en *Botrytis cinerea*. Deze sporen waren dus bij het volgen van de K.B.-methode niet opgekomen. Het zal blijken, dat men op deze manier in staat is de schimmelproef, althans voor een gedeelte der waren, quantitatief uit te voeren, door een maximum aan het aantal opgekomen schimmelkolonies te stellen.

Zooals wij later zullen zien, is het aan te bevelen, om bij een onderzoek naar schimmeligheid of schimmelbaarheid van cacao en meel, de proef volgens het K.B. te vervangen door die op pruimenagar.

Het zal blijken, dat voor specerijen de oude methode de voorkeur verdient.

De beoordeeling van het resultaat behoort te geschieden, rekening houdende met de voorafgegane behandeling van het product; men mag niet aan alle waren, als meel, cacao en specerijen, zoo totaal verschillend in aard, wezen en samenstelling, dezelfde graad van reinheid stellen, zooals het K.B. dit doet.

Men kan zich afvragen, of het noodig is, dat men de proef steriel uitvoert, omdat in de praktijk de waren ook niet steriel behandeld worden. Dit is in ieder geval noodig, om een zoo juist mogelijk beeld te krijgen van de toestand, waarin de waar zich bevindt, omdat de mogelijkheid bestaat, dat bij de reiniging van het glaswerk nog schimmelsporen hierin achterblijven, die de proef minder nauwkeurig zouden doen uitvallen, te meer, daar jonge schimmelsporen zéér groote kiemkracht bezitten.

HOOFDSTUK III

GEWIJZIGDE SCHIMMELPROEF II

Invloed van eenige aetherische oliën en anorganische zouten op de groei van Mucor stolonifer

Deze schimmel behoort tot de Phycomycetes en wel tot de Mucorineae (+ en — vormen → zygosporen). Zij vormt lange, onvertakte hyphen zonder tusschenschotten en hecht zich door middel van zoogenaamde rhizoiden aan het substraat. Aan het einde van elke hyphe vormt zich bij Mucor stolonifer een sporangium met columella. Dit sporangium is geheel gevuld met sporen en springt bij het rijp zijn der sporen open, waardoor deze laatste worden verspreid.

Men ziet bij een cultuur in een Petri-schaal een grijs-witte massa van lange, dooreengevlochten hyphen en een groote hoeveelheid zwarte kopjes, de sporangia. Mucor stolonifer komt zeer verspreid in de natuur voor en is dientengevolge vrij geregeld in cacao, meel e.d. producten aan te treffen.

Voert men met deze waren de schimmelproef uit, dan is bij aanwezigheid van sporen van deze schimmel binnen drie dagen de geheele pruimenagar-oppervlakte bedekt met de hyphenmassa, die van één spore afkomstig kan zijn. Hierdoor kan men kolonies van andere, aanwezige, schimmelsporen niet zien en als gevolg daarvan geen goed beeld krijgen van de schimmelrijkdom van de waar.

Beziet men tabel IX ¹⁾ van de schimmelproeven van de

¹⁾ Zie blz. 70.

waren cacao en meel, dan bemerkt men, dat tallooze malen de platen overgroeid waren, soms bij één, maar dikwijls bij beide ingezette proeven. Deze overgroeiing is bijna steeds aan *Mucor stolonifer* te wijten. Een enkele maal was *Mucor racemosus* de oorzaak, eveneens een veel voorkomende schimmel, die na verwant is aan *Mucor stolonifer*, waarvan de hyphen echter racemeus vertakt zijn, terwijl de hyphen van *Mucor stolonifer* onvertakt zijn.

Ons doel was om te trachten de een of andere stof aan de pruimenagar toe te voegen, waardoor de groei van *Mucor stolonifer* een weinig werd belemmerd en deze niet zóó sterk uitgroeide, terwijl de andere schimmelsoorten er geen, of tenminste heel weinig, hinder van zouden ondervinden.

In de literatuur zijn vrij veel proefnemingen te vinden over werkingen van vergiften op schimmels, maar vele van deze proeven zijn uitgevoerd met *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger* e.a. *Penicillium*- en *Aspergillus*-soorten, maar niet velen hebben *Mucor stolonifer* als proefobject gebruikt.

In 1902 beschrijft Pulst¹⁾ proeven, genomen over de „Empfindlichkeit der Vegetation und Fruktifikation der Schimmelpilze gegen Cu-, Ni- und Zn-salzen”. Hij gaat dit na voor *Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*, *Botrytis vulgaris* en *Penicillium glaucum*. Hij gebruikt de volgende voedingsoplossing:

Rietsuiker	40.0	g	} + water tot 1 liter.
Pepton	5.0	„	
KH_2PO_4	1.035	„	
KNO_3	0.13	„	
MgSO_4	0.16	„	

Hij ging de invloed na van koper in de vorm van koper-sulfaat en complex gebonden als tartraat, verder van zink-

¹⁾ C. Pulst, Jahrb. wiss. Bot. 37, 205 (1902).

sulfaat en nikkelsulfaat en geeft de volgende „obere Grenzwerte“:

TABEL III.

	Mucor mucedo		Asp. niger		Botr. vulg.		Pen. glauc.	
	veget.	frukt.	veget.	frukt.	veget.	frukt.	veget.	frukt.
CuSO ₄ . . .	1/2000	1/20000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/0.75	1/0.75
CuC ₄ H ₄ O ₆ .	1/200	1/1000	1/10	1/10	1/10	1/10	—	—
ZnSO ₄ . . .	1/2000	1/20000	1/200	1/200	1/200	1/200	1/0.75	1/0.75
NiSO ₄ . . .	1/2000	1/20000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/10	1/10

1/2000 enz. beteekent 1 mol in 2000 enz. liter.

Hij kwam bij zijn proeven ook tot het, door het werk van Richards ¹⁾ e.a. reeds bekende feit, dat kleine hoeveelheden van deze metaalionen een vermeerdering van de groei bewerkstelligen, maar dat een iets grootere hoeveelheid vrij sterk remmend daarop werkt.

Uit bovenstaande en ook uit andere tabellen blijkt, dat volgens Pulst *Penicillium glaucum* de grootste hoeveelheid van deze zouten kan verdragen, dan volgen *Aspergillus niger* en *Botrytis vulgaris* en het gevoeligst is *Mucor mucedo*.

Andere onderzoekingen over dit onderwerp zijn o.a. die van Fargher, Galloway en Probert ²⁾, die de giftigheid van salicylanilide, o-chloormercuriphenol, p-acetoxymercuria-nilide, thalliumcarbonaat, p-nitro- en trichloorphenol nagingen voor enkele soorten van de geslachten *Penicillium* en *Aspergillus*, o.a. *Aspergillus niger* en *Aspergillus flavus* en *Rhizopus arrhizus*, *Cladosporium herbarum* en *Fusarium*. Zij gebruikten niet *Mucor stolonifer* als proefobject, dus deze waarnemingen geven ons geen vergelijkingsmateriaal, evenmin de proeven

¹⁾ H. M. Richards, *Jahrb. wiss. Bot.* 30, 665 (1897).

²⁾ R. G. Fargher, L. D. Galloway, M. E. Probert, *Journ. Textile Inst.* 18, 99 (1927); *Journ. Textile Inst.* 21, 245 (1930).

van Burgess¹⁾, die voornamelijk de werking van de vetzuren naging, waarvan capryl-, capron- en laurinezuur de groei van schimmels bleken te vertragen, terwijl de meer samengestelde vetzuren, als bijvoorbeeld oliezuur, deze bevorderen.

Behalve van bovengenoemde stoffen, is het bekend, dat ook aetherische oliën een sterk remmende werking op de schimmelgroei uitoefenen. Burgess geeft ook aan, dat deze oliën wol tegen schimmelvorming beschermen. Twintig jaar voor hem vond Bitting²⁾, dat piment, kaneel en kruidnagelen sterker antiseptische eigenschappen bezitten dan de andere specerijen. Hij ging hiervan de werking na op een schimmel, waarvoor hij *Penicillum glaucum* nam, en een gist, die niet nader is omschreven. Reeds geringe hoeveelheden van een waterig extract van kaneel en kruidnagelen verhinderden de groei van de schimmel; mosterd, paprika en cayenne-peper belemmerden de groei wel, maar konden deze niet geheel tegengaan, terwijl gember, foelie en zwarte peper geen uitwerking hadden.

De resultaten met de gist verschilden weinig hiermede. Kaneel vertoonde de sterkste werking, dan volgde kruidnagelen, na deze cayenne- en zwarte peper, terwijl gember, mosterd en foelie geen invloed uitoefenden.

Later publiceerden Hoffmann en Evans³⁾ en Bachmann⁴⁾ resultaten van uitgebreidere onderzoeken, die in het algemeen met het werk van Bitting overeenstemmen. Voornamelijk kaneelaldehyde en eugenol vertoonen een zeer sterke werking, welk feit door Bachmann⁵⁾ later nogmaals werd bevestigd.

¹⁾ R. Burgess, *Journ. Textile Inst.* **20**, T 333-72 (1929).

²⁾ Bitting, *Bur. Chem. U.S. Dept. Agric. Bull. No. 119* (1909).

³⁾ C. Hoffmann en A. C. Evans, *J. Ind. Eng. Chem.* **3**, 835 (1911).

⁴⁾ F. M. Bachmann, *J. Ind. Eng. Chem.* **8**, 620 (1916).

⁵⁾ F. M. Bachmann, *J. Ind. Eng. Chem.* **10**, 121 (1918).

Wij hebben nu zelf proeven genomen, om de invloed van aetherische oliën, zoowel als van eenige anorganische zouten op de meest voorkomende schimmels na te gaan, hierbij dus speciaal lettende op het verschillend gedrag van *Mucor stolonifer* ten opzichte van de andere schimmels.

De eerste proeven zijn uitgevoerd met kaneel- en kruidnagelolie. Deze oliën hebben een zeer sterk antiseptische werking; kaneel en kruidnagelen geven dan ook altijd een negatieve schimmelproef. Onttrekt men echter de aetherische olie, bijvoorbeeld door extractie met aether — waarvan, zooals kon worden vastgesteld, de schimmelsporen geen nadeelige invloed ondervinden; immers, het aantal kiembare sporen op pruimenagar van een pepermonster, dat met aether werd behandeld, bleek, voor en na de extractie, gelijk — dan kan het resultaat van de schimmelproef volgens het K.B. wel degelijk positief zijn.

Bijvoorbeeld:

	Kaneel, gedurende 10 uur geëxtraheerd met aether.		
	K.B. bij 37° C	K.B. bij 25° C	Pruimenagar 25° C
vóór extractie	—	—	0
ná extractie	+++	+++	24 kolonies

Ditzelfde verschijnsel merkt Imhoff op in zijn: „De schimmelproef en haar beteekenis voor de beoordeeling van voedingsmiddelen”¹⁾.

Uit de proef met kaneel ziet men, dat zelfs de kleine hoeveelheid olie, in 0.1 g kaneel aanwezig, een hoeveelheid, die bij een gehalte van 1.5% vluchtige olie in kaneelbast, overeenkomt met 0.0015 g aetherische olie, op 10 cm³ pruimenagar gebracht, de schimmelsporen belet te ontkiemen.

Bij het nagaan van de invloed, die de verschillende schimmelsoorten van aetherische oliën ondervinden, zijn wij steeds op de volgende wijze te werk gegaan:

¹⁾ J. A. Imhoff, Chem. Wkbl. 23, 293 (1926).

Buisjes, gevuld met 10 cm³ pruimenagar, werden in kokend water geplaatst, daarna afgekoeld tot de inhoud nog juist vloeibaar was. Met behulp van een steriele pipet voegden wij bepaalde hoeveelheden aetherische olie aan de agar toe en daarna werden de buisjes geënt met reïncultures van verschillende schimmelsoorten. Daarna, uitgegoten in steriele Petri-schalen en geplaatst in de broedstovf van 25° C, gingen wij na, bij welke concentratie der aetherische olie nog groei optrad, wáár de schimmel een minder sterke groei ging vertoonen en wáár de grens van groei werd bereikt. Er werd altijd een blancoproef, d.w.z. de schimmel, geënt op zuivere pruimenagar, ter contrôle mede ingezet; een contrôle aan de eene kant, of de schimmelcultuur nog kiemkrachtig was, aan de andere kant ter beoordeeling van het verschil in groeïsterkte en uiterlijk van een even oude cultuur van de schimmel zonder toevoeging van aetherische olie aan de agar.

De schimmelcultures, waarmede wij deze proeven uitvoerden, zijn uit verschillende waren door middel van de plaatmethode geïsoleerd; zij bleken bij onderzoek rein.

De schimmelsoorten, die onderzocht werden, waren steeds *Mucor stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus niger* en *Penicillium glaucum*, soms aangevuld met enkele andere, veel voorkomende schimmels. In het bijzonder werd gelet op het gedrag van *Mucor stolonifer* en *Mucor racemosus*.

Zouden wij een vluchtige olie vinden, die de gewenschte belemmering van de groei van deze schimmels bewerkstelligde, zonder tevens de groei van de andere schimmels in merkbare mate te beïnvloeden, dan zouden wij deze olie op verschillende monsters met alle mogelijke schimmelsoorten nagaan en zien, of het *aantal* opgekomen kolonies met en zonder toevoeging van die olie praktisch met elkaar overeenstemt.

Kaneelolie gaf het volgende resultaat:

	2 oogjes olie/10 cm ³ pr.agar	1 oogje	0.1 oogje ¹⁾
Asp. niger . .	—	+	++
Pen. glaucum .	—	+	++
Muc. racemosus	+	++	++

De *Mucor* ondervond hiervan dus minder hinder dan de andere soorten, dus was voor het ons gestelde doel deze olie niet te gebruiken.

Hierna hebben wij *kruidnagelolie* en ook *eugenol*, het hoofdbestanddeel van de aetherische olie, zoowel van de kruidnagelen, als van piment, onderzocht, maar het resultaat voldeed ook hier niet; *Mucor stolonifer* kon nog meer verdragen dan *Penicillium glaucum*.

De hoeveelheden, die men van deze sterk antiseptische oliën moet toevoegen om algeheele schimmelgroei tegen te gaan, zijn zóó gering, nl. een concentratie van 2 oogjes olie op 10 cm³ pruimenagar, dat men hiervan misschien bij sterk schimmelende stoffen ter schimmelwering gebruik zou kunnen maken, hoewel men hierbij bedacht zal moeten zijn op reuk en smaak, omdat de olie daarop invloed zal kunnen uitoefenen. Er zijn in deze richting wel eens proeven genomen, o.a. door Bitting²⁾, maar, zoover ons bekend, niet met een practisch resultaat.

Nu was het ons reeds eerder opgevallen, dat bij de schimmelproeven met peper nooit en met nootmuscaat zelden overgroeiing van de platen met *Mucor* optrad. De mogelijkheid bestond dus, dat de oorzaak hiervan de aanwezige aetherische olie zou zijn. Dat deze olie sterk remmend op de schimmelgroei werkt, is trouwens een bekend feit.

¹⁾ 0.1 oogje verkregen wij, door 1 oogje olie op te lossen in 1 cm³ alcohol en hiervan 0.1 cm³ in 10 cm³ agar te verdeelen, daar deze hoeveelheid alcohol geen invloed op de schimmelgroei uitoefent.

²⁾ Bitting, Bur. Chem. U. S. Dept. Agric. Bull. No. 119 (1909).

Bij peper kwam op de pruimenagar hoofdzakelijk *Aspergillus niger* op, met een klein percentage van andere schimmels. Bij nootmuscaat *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, een enkele maal nog andere *Aspergillus*-soorten als *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus amstelodami* e.a. Eenmaal is hierbij *Aspergillus galeritus* Blochw. geconstateerd; verder *Penicillium*-soorten, *Botrytis cinerea*, enkele malen *Mucor mucedo* en hoogst zelden *Mucor stolonifer*.

Daarom hebben wij hierna de invloed van nootmuscaat- en peperolie, zoowel als van piperine nagegaan. Nootmuscaatolie en piperine zijn in de handel aanwezig, peperolie niet. Wij hebben ons daarom door stoomdestillatie uit zwarte peper een hoeveelheid van deze olie zelf bereid.¹⁾ Hiertoe zijn wij uitgegaan van 250 g zwarte peper. Deze werden in een rondbodempkolf met water en iets zwavelzuur aangemengd, zoodat de reactie ten opzichte van congopapier zuur was, dit ter hydrolyse van het zetmeel. De olie werd hierna overgestoomd, hetgeen eenige dagen duurde; het destillaat, na verzadiging met keukenzout, met aether uitgeschud, de aetherische oplossing op uitgegloeid natriumsulfaat gedroogd en de aether hierna op een waterbad van $\pm 45^{\circ}$ C afgedestilleerd. Uit 250 g zwarte peper verkregen wij op deze wijze 1.76 g aetherische olie. Deze was lichtgroen van kleur, had een aangename, niet prikkelende geur. Van deze olie en van piperine hebben wij de invloed op verschillende schimmels nagegaan.

Piperine bleek de groei van geen der schimmels tegen te gaan. Daar deze stof in water zeer moeilijk oplosbaar is, hebben wij haar in alcoholische oplossing toegevoegd, er voor zorg dragende niet meer dan 0.1 cm³ alcohol per 10 cm³ pruimenagar toe te voegen; deze hoeveelheid alcohol heeft nl. geen invloed op de schimmelgroei. Wij hebben tot 13 mg

¹⁾ F. Hoffmann u. E. Gildemeister, Die Aetherischen Öle, 1929, II, 457.

pipérine per 10 cm³ pruimenagar toegevoegd en alle schimmelsoorten, inclusief *Mucor stolonifer*, tierden welig. Meer dan 10 mg toe te voegen had geen zin, daar die grootere hoeveelheid bij toevoeging aan de pruimenagar voor een groot deel uitkristalliseerde; 10 mg bleef practisch geheel in oplossing.

Met de *peperolie* kregen wij het resultaat, hetwelk in tabel V op blz. 44 is weergegeven.

Wij zien daar, dat *Mucor stolonifer* en *Aspergillus niger* ongeveer evenveel, *Penicillium glaucum* minder kan verdragen. Voor het tegengaan van het uitgroeien van *Mucor stolonifer* is dan ook deze olie niet te gebruiken.

De ervaring, die wij opgedaan hebben met de schimmelproef op peper volgens het K.B., die vrijwel altijd negatief is, klopt hiermede. Men kan dit als volgt berekenen: men neemt 5 g peper + 10 cm³ water, dus een verhouding 1 : 2 en aangenomen, dat peper $\pm 2\%$ aetherische olie bevat, bevat dus het peper + water-papje 0.7 % olie, hetgeen overeenkomt met 10 cm³ pruimenagar, waaraan 0.07 cm³ olie is toegevoegd. Uit de tabel ziet men, dat deze hoeveelheid, bij een beoordeeling na drie dagen, weliswaar niet voor alle schimmels een algeheele groeibelemmering zal zijn, maar dat toch vele er door in meerdere of mindere mate worden tegengehouden.

Hierna zijn wij met het onderzoek van *nootmuscaatolie* begonnen. Hierbij werd eenig resultaat bereikt. Het bleek nl., dat bij een toevoeging van 0.007 cm³ olie op 10 cm³ pruimenagar, *Mucor stolonifer* niet zoo'n dichte, witte hyphenmassa vormde, maar ijler groeide. *Aspergillus niger* ondervond geen merkbare invloed van deze hoeveelheid olie, terwijl *Penicillium glaucum* iets kleinere, maar nog zeer duidelijk zichtbare en goed herkenbare kolonies vormde. Wij hebben vervolgens een cacaomonster in onderzoek genomen, dat vrij veel schimmel bevatte, o.a. ook *Mucor stolonifer* in merkbare hoeveelheid

en hiervan 0.1 g, zoowel op pruimenagar, als op pruimenagar + 0.007 cm³ nootmuscaatolie per 10 cm³ agar gezet. Vergeleek men de platen na een broedtijd van vier dagen bij 25° C, dan trad er een duidelijk verschil in het oog. De aanwezige sporen van *Mucor stolonifer* hadden bij de plaat zonder olie deze geheel overgroeid. Men zag weliswaar onder deze hyphenmassa de kleuren schemeren van de andere aanwezige schimmelkolonies, maar het tellen van het aantal kolonies bleek practisch onmogelijk. Anders was het op de plaat, waaraan olie was toegevoegd. Hier was *Mucor stolonifer* niet zoo dicht gegroeid en konden de andere schimmelkolonies mooi en duidelijk begrensd worden gezien. Deze platen waren dan ook inderdaad telbaar. Bij oppervlakkige beschouwing leek dit resultaat dus fraai, maar bekeek men de kolonies der opgekomen soorten aandachtiger, dan zagen zij er zeer ongewoon uit. Ook het microscopische beeld was geheel verschillend van het normale. De hyphen van de verschillende schimmelsoorten waren op vele plaatsen sterk gezwollen, terwijl de sporenvorming abnormaal was. De schimmels zagen er uit, alsof zij op een voedingsbodem waren gegroeid, waarop zij zich in het geheel niet thuis voelden.

Nu is dit voor het tellen van de kolonies wel geen bezwaar, maar het geeft geen normaal beeld van de schimmels. Daarom zijn wij naast de aetherische oliën onze proeven begonnen met *anorganische zouten*.

Wij begonnen ons onderzoek met zinksulfaat en koper in complexe oplossing aan wijnsteen zuur gebonden, omdat volgens Pulst¹⁾ *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger* en *Botrytis vulgaris* daarvan veel meer kunnen verdragen dan *Mucor mucedo*. Wij wilden thans van deze stoffen de invloed op *Mucor stolonifer* nagaan.

Wij maakten van deze anorganische zouten oplossingen

¹⁾ C. Pulst, Jahrb. wiss. Bot. 37, 205 (1902).

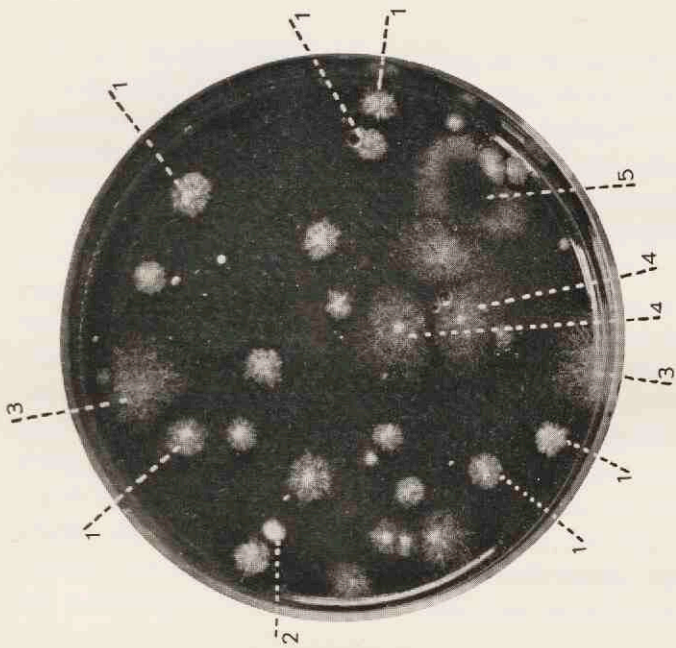
van bekende sterkte, steriliseerden deze in de autoclaaf, voegden met behulp van een steriele pipet een bepaalde hoeveelheid aan de pruimenagar toe, waarna het buisje werd geënt met de schimmel en hierna de inhoud in een steriele Petri-schaal werd uitgegoten. Broedtijd vier dagen bij 25° C.

Wij hadden met geen van de bovengenoemde stoffen enig succes, want de schimmels verdroegen van kopertartraat alle een gelijke, zeer groote hoeveelheid; van zinksulfaat bleek een concentratie van 1/600, d.w.z. 1 g zinksulfaat op 600 cm³ pruimenagar, alle evenzeer te beïnvloeden en *Mucor stolonifer* niet op de door ons gewenschte wijze.

Betere resultaten werden verkregen met kopersulfaat. Dit zout bleek veel sterker op de schimmels te werken dan zinksulfaat. Concentraties van 1/10000, 1/5000 en 1/2000 konden alle soorten verdragen; bij een concentratie van 1/1500, d.w.z. 1 g op 1500 cm³ agar, zagen wij echter op de plaat, waarop *Mucor stolonifer* geënt was, de kolonies minder sterk uitgroeien; de hyphen waren nog wel lang en verspreidden zich over de geheele oppervlakte van de pruimenagar heen, maar de schimmel vormde geen ondoorzichtige witte massa's van draden meer, daarentegen minder talrijke, fijne draden. Deden wij een proef met een cacaomonster, waarin zich allerlei soorten schimmelsporen bevonden, dan zagen wij een zeer duidelijk verschil, indien wel of geen kopersulfaat was toegevoegd. De platen zonder kopersulfaat waren geheel overgroeid en bedekt met schimmeldraden, terwijl de platen met kopersulfaat afzonderlijke, duidelijk te tellen kolonies vertoonden. De foto geeft een afbeelding hiervan. Niet altijd was de overgroeiing zoo afdoende verdwenen als hier, soms waren nog wel lange hyphen van de *Mucor stolonifer*-kolonies over de plaat heengegroeid, maar steeds waren in die gevallen de onderliggende kolonies van de andere schimmelsoorten, goed afgegrensd, zichtbaar. Op de foto ziet men ook het verschil in uiterlijk van de kolonies, die behalve hieraan,



Schimmelgroei op pruimenagar



Schimmelgroei op pruimenagar + kopersulfaat

1. *Aspergillus flavus*
2. *Penicillium glaucum*
3. *Mucor stolonifer*
4. *Mucor racemosus*
5. *Aspergillus niger*

ook aan de kleur, bij eenige ervaring, macroscopisch reeds zijn te herkennen. Men ziet eenige kolonies van *Aspergillus flavus*, één kolonie van *Penicillium glaucum*, twee kolonies van *Mucor stolonifer*, twee *Mucor racemosus* en één *Aspergillus niger*.

Als men het resultaat vergelijkt van de toevoeging van kopersulfaat en van die van nootmuscaatolie, die, zooals boven beschreven, ook een dergelijke invloed heeft, verdient ongetwijfeld de eerste de voorkeur. Door kopersulfaat toch worden de andere schimmels lang niet zoo sterk beïnvloed. Ook hier zijn de kolonies, voornamelijk van *Aspergillus flavus*, kleiner dan normaal en ook de kleur is iets lichter, maar toch zijn de kolonies gelijk van vorm en niet zoo afwijkend als op pruimenagar, waaraan nootmuscaatolie is toegevoegd.

Uit onderstaande tabel blijkt, dat aan geen der schimmelsporen, door de toevoeging van kopersulfaat, het uitgroeien tot kolonie wordt belet. Het aantal schimmelkolonies op platen met en zonder kopersulfaat stemt voldoende met elkaar overeen:

TABEL IV.

No.	Pruimenagar	Pruimenagar + kopersulfaat
<i>Cacao</i>		
1246	60-94	74-102
1281	2-0	1-0
1219	5-2*	2-4
1354	4-0	1-1
184	*-*	2-5
400	106*-99*	83-63
2249	*-*	24-31
<i>Maizena</i>		
2148	29-*	14-27
2353	18-20	19-25
2463	*-*	22-22
2572	4-1	1-4
2580	3*-2*	3-6

* beteekent overgroeid.

Voor wij ook het microscopische uiterlijk van de schimmelkolonies in de beschouwing betrekken, willen wij volledigheidshalve vermelden, dat wij nog proeven hebben genomen met zilvernitraat en zilver als protargol, dus complex gebonden, geen van beide echter met eenig resultaat; beide hadden een veel te sterk remmende invloed op de schimmelgroei.

Hierna hebben wij nog proeven gedaan met het plaatsen van een dunne, metalen plaat in de Petri-schaal, om op deze wijze de oligodynamische werking van het metaal na te gaan. Deze plaat paste juist in de doos van de Petri-schaal. Wij legden haar in de deksel en plaatsten de doos met pruimenagar, met schimmelsporen geënt, er omgekeerd bovenop, zoodat de metalen plaat door een luchtlaag van de voedingsbodem gescheiden was. Dit geheel werd dan in de broedstoof geplaatst. Met een zinken en messingplaat was, na enting met *Mucor stolonifer*, de plaat na twee dagen, met een rood-koperen en met een zilveren na drie dagen geheel volgegroeid. Van een remmende invloed was dus nagenoeg niets te bemerken.

Wij hebben nu na het macroscopisch goede resultaat met kopersulfaat ook microscopisch de schimmelkolonies, die op de kopersulfaat-houdende pruimenagar waren gegroeid, bestudeerd. Het bleek, dat het microscopische beeld van bijna alle schimmels, die wij onderzochten, normaal was gebleven. *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Botrytis cinerea* en ook *Mucor stolonifer* en *Mucor racemosus* vertoonden het gewone beeld. Alleen *Aspergillus flavus* zag er iets afwijkend uit. Ook macroscopisch is de kolonie van deze schimmel niet geheel normaal. Zij groeit niet zoo hoog op de voedingsbodem, maar spreidt zich meer over de oppervlakte hiervan uit. Ook de kleur is niet groengeel, maar meer zuiver geel. Microscopisch vertoonden de myceliumdraden op vele plaatsen opzwellingen en men ziet verder, dat het blaasvormige

einde van de conidiëndrager niet rondom met sterigmen is bezet, zooals anders het geval is. Er zijn veel minder sterigmen op aanwezig en deze zijn een weinig gezwollen en iets afwijkend van vorm. Ook zijn niet dergelijke lange sporenketens te zien als op zuivere pruimenagar. Dit is echter de eenige schimmel, waarvan wij microscopisch een afwijkend beeld konden constateeren.

Als resultaat willen wij dus aanraden, bij aanwezigheid van *Mucor stolonifer*, de schimmelproef op pruimenagar met koper-sulfaat in een concentratie van 1/1500, d.w.z. 1 g op 1500 cm³ agar, uit te voeren, daar dit de overgroeiing, zoodat een behoorlijk voldoende telling uitvoerbaar blijft.

HOOFDSTUK IV

UITVOERING EN BEOORDEELING DER GEWIJZIGDE SCHIMMELPROEF

Cacao.

Bij cacao is uit zeer veel schimmelproeven gebleken, dat een positief resultaat een aanwijzing is voor een in bederf verkeerend der waar. Dikwijls gaat hiermede een hooge zuurgraad van het vet gepaard. Hiernevens echter komen ook cacaomonsters voor, die, terwijl zij duidelijk muff rieken en onder het microscoop schimmeldraden blijken te bevatten, niettemin een negatieve schimmelproef geven!

Men kan hier tegen in brengen, dat deze schimmels en/of sporen kunnen zijn afgestorven en dat de schimmelproef hier ook niet meer noodig was, omdat de cacao reeds op het oog schimmelig was, dus reeds direct afgekeurd moest worden, maar toch bleek hier eenige malen, dat, indien de proef bij een dergelijk cacaomonster bij lagere temperatuur, bijv. bij 22° C, werd ingezet, zij wel degelijk een positief resultaat gaf. Bij de methode op pruimenagar bleken de schimmelsporen dan ook niet alle dood geweest te zijn, want er ontstond een groot aantal kolonies op de plaat.

Dergelijke, en ook omgekeerde gevallen, nl. een positieve schimmelproef bij cacao met volkomen normale geur en smaak, komen niet veel voor en in 't algemeen kan men zeggen, dat de schimmelproef volgens het K.B. voor cacao een goede beoordeeling van de toestand veroorlooft.

Gaat men nu de tabel na van de schimmelproeven van het K.B. en van die op pruimenagar, tabel IX aan het einde

van dit proefschrift, dan ziet men, dat alle monsters, die na 24 uur positief waren — hetwelk hier beteekent: de geheele plaat met schimmel bedekt, welke monsters dus afgekeurd werden — op pruimenagar na vier dagen bij 25° C meer dan 50 schimmelkolonies vertoonden.

Men ziet hiernaast nog aangegeven: pruimenagar bij 37° C. Men gaat nl. in de praktijk wel eens zoo te werk, dat men — indien de proef volgens het K.B. bij cacao na 24 uur positief is en men het niet aandurft de cacao hierop reeds af te keuren — tevens de proef op pruimenagar inzet, eveneens bij 37° C en eerst als hierop veel kolonies ontstaan, de cacao afkeurt. Bij deze temperatuur komen echter, zie boven, maar een deel der aanwezige schimmelsporen op. Men ziet, dat de getallen in de vierde kolom ook altijd grooter zijn dan in de derde.

Beziet men tabel IX, dan lijkt het ons, dat men voor cacao zal kunnen volstaan met de proef op pruimenagar bij 25° C. Indien hier meer dan 50 kolonies per 0.1 g cacao zich ontwikkelen, is deze af te keuren.

De vraag, of deze schimmels ook in staat zijn cacao te doen beschimmelen, kan bevestigend beantwoord worden, daar ons uit vergelijkende proeven is gebleken, dat de schimmelsoorten, die op de vochtige cacao, zooals de K.B.-methode deze voorschrijft, gegroeid zijn, ook op de pruimenagar voorkomen. Er zijn door ons uit cacao geen schimmels geïsoleerd, die op de pruimenagar wél en op de cacao niét groeien, de cacao dus bij aanwezigheid niet duf zullen maken. Was dit wél het geval, dan zou de eisch, aan het aantal schimmelkolonies op de pruimenagar gesteld, te scherp zijn voor de praktijk. Bovendien blijkt hieruit, dat er geen reden bestaat, de proef van het K.B. naast de proef op de pruimenagar uit te voeren.

Het maximum van 50 kolonies per 0.1 g wordt op grond van onze waarnemingen genoemd, staat evenwel nog niet

onwrikbaar vast. Daarvoor is het aantal cacaomonsters, dat wij onderzocht hebben, feitelijk nog te klein.

Maizena.

Hiervoor geldt in hoofdzaak hetzelfde, als voor cacao, dus kunnen wij hierover kort zijn. Het aantal maizena-monsters, dat wij onderzocht hebben, is vrij wat kleiner dan van cacao en dus is het maximum aantal kiembare sporen, hetgeen wij als grens zouden willen stellen, zelfs nog minder zeker dan daar, maar toch kregen wij sterk de indruk, dat men hier niet meer dan 25 kolonies per 0.1 g zal mogen toelaten.

Specerijen.

Deze zijn niet alle over één kam te scheren, zooals in het K.B. geschiedt, waar aan alle dezelfde eisch wordt gesteld.

Ten eerste kunnen wij *kruidnagelen*, *kaneel* en *piment* buiten beschouwing laten, daar deze nooit schimmelen. Zooals wij reeds boven gezien hebben, bevatten deze specerijen voldoende aetherische olie om alle schimmelmoei tegen te gaan. Ook al komen er schimmelsporen op of in voor, wat zeker het geval is, want zij zullen er reeds uit de lucht op vallen, dan nog kunnen zij deze specerijen niet doen beschimmelen. Van deze waren behoeft dus nooit een schimmelproef ingezet te worden.

Wij hebben ons in hoofdzaak beperkt tot *peper* en *nootmuscaat*.

Bij *peper* is de schimmelproef volgens het K.B. meestal negatief, soms zwak positief, een enkele maal positief. Onder *zwak positief* wordt hier verstaan, dat een deel der plaat, bijv. de helft, met schimmel is bedekt; *positief*, dat de plaat praktisch geheel met een dun laagje schimmel begroeid is; *sterk positief*, als de geheele plaat dik met schimmel is bedekt. Heeft de schimmelmoei zoodanig plaats gehad, dat afzonder-

lijke kolonies te tellen zijn, dan komt men bij een 40-tal per plaat tot een beoordeeling: positief.

Het bleek bij onderzoek van een aantal pepermonsters, dat bij witte peper een positieve schimmelproef meer voorkomt dan bij zwarte peper.

Voert men de proef zoodanig uit, dat men, indien deze volgens het K.B. positief verloopt, tevens de proef op pruimenagar inzet, dan kan men onherroepelijk alle witte peper uit de handel afkeuren, want op deze platen ontstaat steeds een ontelbaar aantal schimmelkolonies. Ook de pepermonsters met negatieve schimmelproef volgens het K.B. bevatten een groot aantal schimmelsporen! Bij witte peper schommelt dit aantal gewoonlijk tusschen 1000 en 3000 kolonies per 0.1 g peper, bij zwarte peper is het ongeveer 100—200. Zelfs de niet gemalen peperkorrel bevat reeds vrij veel sporen, hoewel dit aantal door infectie bij het malen nog sterk vergroot wordt. Wij hebben naast elkaar het aantal schimmelsporen bepaald in de peperkorrel, die wij daartoe in een steriel mortiertje fijnmaalden en hiervan 0.1 g op pruimenagar zetten en in het, in de fabriek daarvan gemalen, peperpoeder. Dit laatste getal bleek vrij wat grooter, wat ook niet verwonderlijk is, omdat in een dergelijke malerij de lucht en de maalwerken zeer veel schimmelsporen zullen bevatten.

Dat deze groote hoeveelheid schimmelsporen nog niet altijd een positieve schimmelproef tengevolge heeft, komt door de aanwezigheid van de aetherische olie. Gaat men de hoeveelheid peperolie na, die verschillende schimmels kunnen verdragen, dan blijkt het volgende:

TABEL V.

Hoeveelheid peperolie per 10 cm ³ agar	Mucor stol. bij 25° C		Asp. niger bij 25° C		Pen. glaucum bij 25° C	
	3 dagen	4 dagen	3 dagen	4 dagen	3 dagen	4 dagen
0.001 cm ³	+	+	+	+	+	+
0.005 "	+	+	+	+	+	+
0.01 "	+	+	+	+	w.	+
0.02 "	w(einig)	+	w.	+	—	w.
0.05 "	w.	+	z.w.	+	—	—
0.1 "	—	z.w.	—	w.	—	—

Zooals reeds op blz. 34 is aangetoond, bevat het mengsel peper + water in de verhouding 1 : 2, zooals het K.B. voorschrijft, ± 0.7 % vluchtige olie, d.w.z. 10 cm³ agar + 0.07 cm³ olie.

Uit de tabel blijkt, dat *Aspergillus niger* en *Mucor stolonifer* op een dergelijke voedingsbodem na drie dagen wel, hoewel weinig, *Penicillium glaucum* in 't geheel niet zichtbaar wordt. De schimmel, die men na de schimmelproef op peper dan ook in verreweg de meeste gevallen aantreft, is *Aspergillus niger*.

Bij de proef op pruimenagar voegt men aan 10 cm³ hiervan 0.1 g peper toe, hetgeen dus, bij een aetherisch oliegehalte van 2 %, neerkomt op 0.002 g aetherische olie, met een s.g. van ± 0.9 , dus 0.0022 cm³ olie. Deze hoeveelheid kunnen de schimmels zeer goed verdragen, dus groeien alle aanwezige sporen op de pruimenagar tot kolonies uit.

Voor peper kan men de proef op pruimenagar dus beter achterwege laten.

De schimmelproef volgens het K.B., maar dan bij 25° C uitgevoerd, is bruikbaar. Behalve door schimmels heeft men bij peper ook dikwijls een positief resultaat wegens ontleding door bacteriën. In dat geval moet de peper ook afgekeurd worden.

Het is dus niet gelukt hier een quantitatief resultaat te verkrijgen.

Nootmuscaat.

Beziet men tabel IX ¹⁾ van de serie schimmelproeven volgens het K.B. en op de pruimenagar, dan komen de uitkomsten hiervan, in tegenstelling met cacao en maizena, waar dit wel het geval was, geenszins overeen. Men ziet monsters, die volgens het K.B. na twee dagen reeds positief zijn en toch niet veel schimmelsporen bevatten en aan de andere kant monsters met meer dan 100 kolonies per 0.1 g nootmuscaat, die niettemin in het geheel niet schimmelen of slechts een zwak positieve schimmelproef vertoonen.

De reden van een positieve of negatieve schimmelproef kan dus niet liggen aan een groot, resp. klein aantal schimmelsporen in de nootmuscaat, maar moet een andere zijn.

Wij hebben gedacht aan de mogelijkheid, dat het *aetherisch oliegehalte* van nootmuscaat juist op de grens zou liggen van hetgeen de schimmels kunnen verdragen. Is dit het geval, dan zal dit de bepalende factor zijn en alleen als dit gehalte laag is, zullen de aanwezige schimmelsporen kunnen uitgroeien en de waar beschimmelen. Is het aan de hooge kant, dan zullen de sporen, al komen er ook nòg zooveel op voor (vgl. peper), niet kunnen uitgroeien en het nootmuscaatpoeder blijft dus bij het bewaren volkomen goed.

Wij hebben verschillende aetherische olie-bepalingen gedaan. Hiertoe zijn wij steeds uitgegaan van 5 g nootmuscaat, voegden 30 g keukenzout toe en 100 cm³ water en destilleerden met stoom de vluchtige olie over, waartoe ongeveer 300 cm³ water overgedestilleerd moesten worden. Deze werden met keukenzout verzadigd en hierna met aether uitgeschud. De aetherische oplossing droogden wij op chloorcalcium; later gebruikten wij

¹⁾ Zie blz. 70.

liever pentaan of loco-pentaan ¹⁾ voor het uitschudden, omdat dit in het geheel geen water opneemt. De aether, resp. pentaan, wordt op een waterbad van $\pm 45^{\circ}$ C afgedampt, de olie, die achterblijft in een vacuumexsiccator even van de laatste resten aether ontdaan en gewogen:

TABEL VI.
NOOTMUSCAAT

Pruimenagar 25° C aantal kol. per 0.1 g	Aetherisch oliegehalte	Schimmelproef K.B.			
		sterk-pos.	pos.	zwak-pos.	neg.
160	2.16	+++	++		
73	2.30	+++			
211	2.58	+++	++		
89	2.62		++		
287	2.78	+++	++		
19	2.98	+++	++		
7	3.02				
17	3.08		++		
353	3.10	+++			
132	3.16		++	+	
8	3.38			+	
110	3.58			+	
45	3.82			+	—
1	4.06				—
349	4.54			+	—
110	4.62			+	

In deze tabel, die de bepalingen ²⁾ bevat, hebben wij de monsters gerangschikt naar opklimmend aetherisch oliegehalte. Links daarvan staat het aantal schimmelkolonies, dat ontstaan is uit de sporen in 0.1 g nootmuscaat op pruimenagar bij 25° C. Er is in het geheel geen verband te zien tusschen dit aantal en het gehalte aan aetherische olie. Rechts is de schimmel-

¹⁾ Laagst kokende fractie van petroleumaether (kpt 27°—40° C).

²⁾ Deze zijn gedeeltelijk door Dr. F. Th. v. Voorst in Alkmaar uitgevoerd, waarvoor wij hem hier nogmaals onze hartelijke dank betuigen.

proef volgens het K.B. aangegeven; het blijkt, dat de meeste sterk-positieve en positieve resultaten zijn te vinden bij een laag aetherisch oliegehalte en de meeste zwak-positieve en negatieve bij hoog gehalte hieraan. Inderdaad schijnt dus dit oliegehalte beslissend te zijn voor de vraag, of de waar kan beschimmelen of niet. Een verband tusschen de schimmelbaarheid en het aantal aanwezige sporen is er niet; hiervoor is dus geen maximum te stellen.

Om na te gaan, of het *vet*, aanwezig in nootmuscaat, invloed op de schimmelgroei uitoefent, hebben wij ons een hoeveelheid daarvan uit nootmuscaatpoeder bereid. Daartoe werd het poeder gedurende 10 uur met aether geëxtraheerd, waardoor wij zoowel de aetherische, als de vette olie verkregen. Dit mengsel werd aan een stoomdestillatie onderworpen en de achtergebleven rest nogmaals met aether geëxtraheerd. Op deze wijze verkregen wij uit 10 g nootmuscaatpoeder 2.5 g vet met een smeltpunt van 49° — 50° C.

Wij hebben dit vet, samen met steriele pruimenagar, opgesmolten in kleine steriele buisjes, flink dooreengeschied en daarna snel in koud water afgekoeld, onderwijl de buisjes schuin houdende. Het mengsel van vet en agar stolt onmiddellijk en op de schuine oppervlakte werden sporen van verschillende schimmels geënt, waarvan in de broedstoof bij 25° C de groei werd nagegaan.

Hierbij is ons gebleken, dat sporen van *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger* en *Mucor stolonifer* het percentage vet, hetwelk in nootmuscaat aanwezig is, nl. 30—40 %, gemakkelijk kunnen verdragen. De groei wordt hierdoor in het geheel niet belemmerd of zelfs maar vertraagd.

De *aetherische olie* blijkt dus voor de schimmelgroei de bepalende factor te zijn.

Men kan, volgens ons, zoowel bij nootmuscaat als bij

peper, de pruimenagar achterwege laten, daar de uitslag hiervan niets zegt en volstaan met de proef volgens het K.B. bij 25° C. Indien hier de plaat na 3×24 uur geheel, of tenminste voor drievierde gedeelte, met schimmel is bedekt, is de waar af te keuren.

HOOFDSTUK V

SCHIMMELS, VOORKOMENDE IN CACAO, MAIZENA, PEPPER EN NOOTMUSCAAT ¹⁾

Bij ons onderzoek over de schimmelproef hebben wij zeer veel schimmelsoorten kunnen isoleeren, meest veel voorkomende, maar ook enkele, minder bekende soorten.

Hieronder volgt een kort overzicht, dat geenszins volledig alle soorten, die in de onderzochte waren kunnen voorkomen, beschrijft, maar toch de belangrijkste daarvan. Zij bleken te behooren tot de volgende geslachten:

Geslachten *Rhizopus* en *Mucor* behooren beide tot de familie der Mucoraceae en tot de klasse der Phycomycetes. Het mycelium is rijk ontwikkeld; de hyphen zijn sterk vertakt en ongedeeld. De lange sporangiëndrager bezit aan het einde een sporangium met columella. Het sporangium is kogelrond, de grootte loopt sterk uiteen; het bevat een groot aantal sporen, waarvan de oppervlakte meestal glad is, hoogstens met fijne stekeltjes bezet. Vorm en kleur dezer sporen zijn kenmerkend voor de soort.

Bij vele soorten van het geslacht *Mucor* komen in de hyphen cellen voor van afwijkende, meer afgeronde vorm, die men chlamydosporen noemt.

Mucor mucedo is een schimmel, die overal verspreid in de

¹⁾ Voor de uitvoering der determinatie van de verschillende schimmels, welke Prof. Dr. Joh^a. Westerdijk zoo vriendelijk was, in haar laboratorium in Baarn te doen uitvoeren, willen wij op deze plaats nogmaals onze hartelijke dank uitspreken.

natuur voorkomt en ook in alle mogelijke voedingsmiddelen, die aan de lucht blootgesteld geweest zijn, wordt aangetroffen. De hyphen zijn sterk vertakt. Technische beteekenis komt haar niet toe; als sterke eiwit-splitser is deze schimmel dikwijls de oorzaak van het bederf van zuivelproducten.

Van de vele andere, voorkomende Mucorsoorten willen wij nog noemen:

Mucor racemosus met sporangiëndragers met racemeuse vertakking. Deze schimmel vormt een sterk ontwikkeld, grauwgrijs mycelium op vruchten, brood, mest, rottende stoffen enz., komt zeer verspreid in de natuur voor. De kleine sporangiën bevatten elliptische sporen, geelgrijs-bruin van kleur; in het mycelium worden veel chlamydo-sporen gevormd. *Mucor racemosus* invertteert rietsuiker en vormt in suikerhoudende voedingsbodems tot 7 % alcohol.

Mucor stolonifer of *Rhizopus nigricans* is wel een van de meest voorkomende schimmels. Zij is door vele onderzoekers, zoowel in Europa als daarbuiten, uit talrijke grondstoffen geïsoleerd. Wij hebben haar ook in alle onderzochte waren aangetroffen. Zij vormt uitloopers, stolonen, waarmede zij zich aan het substraat hecht. De hyphen en sporangiën zijn in jonge toestand wit en kleuren zich later donker. De sporen zijn onregelmatig gevormd, gestreept en donkerbruin van kleur. Chlamydo-sporen komen niet voor. *Rhizopus nigricans* vormt talrijke enzymen, waardoor eiwitten en koolhydraten kunnen worden ontleed.

Geslacht **Penicillium**. In 1809 gaf Link deze naam aan schimmels, waarbij de conidiëndrager een penseelvormige vertakking vormt, aan het einde waarvan lange ketens conidiën worden afgesnoerd. Zeer vele onderzoekers hebben zich met deze belangrijke groep van schimmels beziggehouden. Een van de laatsten was Thom, wiens boek „The Penicillia”¹⁾

¹⁾ Ch. Thom, The Penicillia, 1930.

van groot nut is bij het determineeren van onbekende *Penicillium*soorten. Wel de meest verspreide schimmel van dit geslacht is de groene penseelschimmel *Penicillium glaucum*. Deze vormt een grijsgroen mycelium, dat bij het ouder worden iets verkleurt. De conidiën komen in de lucht, in de grond, op granen, vruchten enz. voor; zij groeien zeer gemakkelijk tot uitgebreide schimmelvegetaties uit. Algemeen bekend is de door deze schimmel veroorzaakte schimmelige of muffe smaak en reuk. De penseelschimmel heeft haar optimum temperatuur bij $\pm 20^{\circ}$ C, ontleedt vele organische zuren, waaronder appelzuur, wijnsteenzuur en citroenzuur. Daarnaast heeft een neutralisatie van deze zuren plaats door gevormde ammoniak. Naast talrijke andere enzymen vormt zij ook proteolytische en kan hierdoor peptonen en eiwitten sterk ontleden, waarbij veel ammoniak ontstaat.

Bijzondere *Penicillium*soorten worden daarom ook in de kaasbereiding, bij de rijping van bepaalde kaassoorten, gebruikt. Zoo veroorzaakt *Penicillium roqueforti*, die blauw-groene conidiën vormt, in de Roquefortkaas een afbraak van de caseïne onder vorming van verbindingen met een zeer bepaalde smaak en geeft de groene adering in het inwendige der kaas.

De voor de Camembertkaas typische rijpings-schimmel is *Penicillium camemberti*.

Volgens Thom is *Penicillium roqueforti* dezelfde als *Penicillium glaucum*. Dergelijke dubbele benamingen komen bij schimmels zeer veel voor en zijn bij determinatie een groote moeilijkheid.

Als andere *Penicillium*soorten willen wij nog noemen: *Penicillium majusculum*, *Penicillium crustaceum* en *Penicillium luteum*, die alle zeer verspreid in de natuur voorkomen en tengevolge hiervan ook in de door ons onderzochte waren zijn gevonden.

Geslacht **Aspergillus**. Soorten van dit geslacht komen ook

overal in de natuur voor. Deze schimmels zijn na verwant aan de *Penicillia*, alleen is de conidiëndrager aan het einde niet vertakt maar blaasvormig opgezwollen. Deze blaas is rondom bezet met sterigmen, die vertakt kunnen zijn en op deze wijze in twee rijen zijn te onderscheiden, aan het einde waarvan lange ketens conidiën worden afgesnoerd. Door middel van de kleur van het mycelium en de sporen, de vorm van de blaasvormige verdikking, de vertakking van de sterigmen en de grootte der sporen, worden de soorten onderverdeeld¹⁾.

De meest voorkomende soorten zijn *Aspergillus niger* (zwart), *Aspergillus flavus* (geelgroen), *Aspergillus glaucus* (grijsgroen), *Aspergillus ochraceus* (geel) en vele anderen.

Wij zijn in eenige monsters nootmuscaat sporen tegengekomen van *Aspergillus chevalieri* en *Aspergillus amstelodami*. Deze behoren beide tot de *Aspergillus glaucus*-groep, gelijken zeer veel op elkaar, vormen groengele peritheciën, gevuld met asci, die elk acht ascosporen bevatten. Deze ascosporen zijn eivormig en zijn door de verschillende teekening van elkaar te onderscheiden.

Eén monster nootmuscaat bevatte sporen van *Aspergillus galeritus*. Deze schimmel is tot nu toe niet in Europa gevonden, maar komt in de tropen en in Amerika voor en is dus waarschijnlijk met deze nootmuscaat in Nederland gekomen. De kleur van deze schimmel is geelbruin, het mycelium is weinig boven de voedingsbodem verheven, meer over de oppervlakte van de agar uitgespreid. Microscopisch blijkt onder de blaasvormige verdikking aan het einde van de conidiëndrager, deze eenigszins ingesnoerd te zijn. Er zijn twee rijen sterigmen — op één van de eerste rij bevinden zich drie à vier van de tweede rij — die voornamelijk aan één zijde van de blaas zijn ingeplant; niet, zoals bij *Aspergillus*

¹⁾ Zie Ch. Thom and M. B. Church, *The Aspergilli*, 1926.

flavus, waar de blaas straalsgewijze aan alle zijden met sterigmen is bezet.

Geslacht **Citromyces** omvat maar weinig soorten, die zoowel van *Penicillium*, als van *Aspergillus* goed zijn te onderscheiden. De sterigmen staan verspreid ingeplant op een kleine blaasvormige verdikking aan het einde van de conidiëndrager. Alle soorten kunnen vrij groote hoeveelheden citroenzuur uit suiker vormen en komen veel op rottende vruchten voor.

Geslacht **Verticillium** is van *Penicillium* te onderscheiden door de vorming van sterigmen in kransen. Zeer algemeen voorkomend is *Verticillium glaucum*, blauwgroen van kleur.

Geslacht **Botrytis** komt veel op organisch materiaal voor. Kenmerkend is de stand van de conidiën in kransen. *Botrytis cinerea* is de best bekende soort, die algemeen verspreid op plantendeelen en in vele voedingsstoffen voorkomt. Aan deze schimmel is het bruin worden van wijn te danken ¹⁾.

Geslacht **Fusarium**. Deze veroorzaken veelal het bederven van groenten. Ook zijn soorten van dit geslacht geïsoleerd als de oorzaak van het bederf van kaas en komen zij in afvalwater voor. Vooral in deze groep heerscht bij de benaming zeer groote verwarring. Deze schimmels zijn in het bezit van meercellige sporen, die typisch sikkelvormig zijn, hyalien en aan beide einden toegespitst.

Geslacht **Sporotrichum**, o.a. *Sporotrichum carougeaui*, die wij uit cacao isoleerden. Deze is wit van kleur en vormt lange sporenketens.

¹⁾ F. Fuhrmann, Einführung in die Grundlagen der techn. Mykologie, 1926. S. 470.

Verder hebben wij nog enkele soorten van de geslachten *Oidium* en *Monilia* geïsoleerd.

Het geslacht **Oidium** beschrijft Wichmann¹⁾ als volgt: „Die Arten der Gattung *Oidium* sind durch ein typisches Mycelium charakterisiert, das aus gefächerten, unregelmäßig verzweigten Hyphen besteht, welche meist an den Enden, aber auch in der Mitte, in kurz-zylindrische Zellen von fast rechteckigem, nur an den Ecken etwas abgerundeten Umriss zerfallen. Sprossung kommt im Bereiche dieser Gattung nur ausnahmsweise vor“. De meest bekende schimmel van dit geslacht is wel *Oidium lactis*, die zeer verspreid voorkomt en op zure melk bijna altijd is te vinden. Hierop vormt zij een witte schimmellaag. Ook in boter en vele andere voedingsmiddelen wordt deze schimmel dikwijls aangetroffen.

Monilia is een geslacht, dat tusschen de gisten en de schimmels instaat. *Monilia candida* is de meest bekende saprophyt van dit geslacht. Andere soorten zijn nog *Monilia sitophila* en *Monilia variabilis*.

¹⁾ H. Wichmann, Die Monilien und Oidien.

F. Lafar, Handbuch der techn. Myk. Bd. IV, 342 (1905-1907).

HOOFDSTUK VI

BACTERIOLOGIE VAN CACAO, MAIZENA, PEPER EN NOOTMUSCAAT

Naast een onderzoek naar de schimmels wilden wij de, door ons ter hand genomen, waren eveneens aan een bacteriologisch onderzoek onderwerpen, om op deze wijze een volledig inzicht te verkrijgen in de microbiologische gesteldheid van deze producten. In de inleiding zijn bij de behandeling van de processen, waaraan de producten worden onderworpen, reeds de dientengevolge aanwezige bacteriën en schimmels besproken, waarbij tevens de rol, die deze organismen hierbij spelen, gebleken is. Om niet in herhalingen te vervallen, willen wij hiernaar verwijzen.

De geïsoleerde bacteriën zullen blijken geen andere te zijn, dan die, welke men op grond van de bewerkingen en de infectiemogelijkheden kan verwachten aan te treffen.

Bij de beoordeeling van de schimmelproef wordt ook aan de bacteriën aandacht geschonken. Er wordt immers op gewezen, dat de waar nòch beschimmeld, nòch op andere wijze bedorven of ontleed mag zijn, welke ontleding in vele gevallen door aanwezige bacteriën wordt veroorzaakt.

De eenvoudigste *methode* om na te gaan, hoeveel en welke soorten bacteriën in de waar aanwezig zijn, zou wezen, een emulsie te maken in steriel water en deze emulsie op agar- en gelatineplaten uit te strijken. Hierbij bleek ons echter, dat het aantal kolonies op deze platen slecht te tellen was door de aanwezige cacao-, resp. meel- of nootmuscaatdeeltjes. De

methode, door Amos en Kent Jones ¹⁾ aangegeven bij hun onderzoek over meel en bloem, nl. het schudden met steriel zand, dit te laten bezinken en van de bovenstaande suspensie verdunningen op platen te maken, is bij fijngespoederde waren als cacao e.d. niet aan te bevelen, omdat de fijne deeltjes hiervan niet zinken, maar blijven zweven, waardoor zij later het tellen der platen zeer bemoeilijken; het is dikwijls op de wijze, waarop de platen geteld worden, nl. met een loupe bekeken, niet zoo gemakkelijk uit te maken, of men met een kolonie, dan wel met een korreltje meel of cacao te doen heeft.

Wij hebben daarom onze suspensie, verkregen door 1 gram der waar in een steriel mortiertje met 10 cm³ steriel water te verwrijven, door steriel filtreerpapier gefiltreerd en van dit filtraat verdunningen op agar- en gelatineplaten gemaakt. De agarplaten werden als regel na 1, 2 en 3 dagen geteld, de gelatineplaten na 3, 4 en 5 dagen, dikwijls na nog langere tijd.

Als *voedingsbodems* hebben wij alkalische bouillonagar resp. -gelatine gebruikt. Veelal wordt voor het onderzoek van meelproducten zetmeelagar verkozen, maar voor de waren, die wij onderzocht hebben — dezelfde, als die aan de schimmelproef worden onderworpen, nl. cacao, maizena, peper en nootmuscaat — bood zetmeelagar geen enkel voordeel. Wij hebben vergelijkende proeven verricht met zetmeelagar en alkalische bouillonagar, waaruit ons bleek, dat in vele gevallen de kolonies op zetmeelagar later opkwamen. Het aantal op beide platen was gelijk, dus gaven wij de voorkeur aan alkalische bouillonagar en -gelatine.

Wat het *aantal kolonies* betreft, dit loopt bij cacao en meel sterk uiteen, nl. van 1000—30.000 per gram; bij sommige

¹⁾ A. J. Amos en D. W. Kent Jones, *Analyst* 55, 248 (1930).

monsters was dit getal nog aanzienlijk grooter! In het algemeen was het aantal kolonies, hetwelk bij 37° C op de agarplaten opkwam, grooter dan op de gelatineplaten bij 22° C. Amos en Kent Jones¹⁾ vonden bij hun proeven over meel een aantal kolonies, dat overeenstemt met het door ons gevondene, maar in tegenstelling verkregen zij als regel op de gelatine meer kolonies dan op de agarplaten.

Gaan wij van dezelfde monsters het schimmel- en bacteriegehalte na, dan blijkt hiertusschen geenerlei verband te bestaan. Hieronder volgt een tabel, waarin eenige onzer bepalingen zijn samengevat:

TABEL VII

	Bacteriekolonies per gram		Schimmels per gram pruimenagar 4 d bij 25° C
	agar 37° C	gelatine 22° C	
Cacao	70	—	20
"	12700	110	60
"	870	340	280
"	6900	2000	20
"	23300	3000	160
Maizena	33400	18400	170
"	1700	700	80
"	2000	6600	70
"	400	200	90

Vervolgens een klein overzicht van de *verschillende bacteriën*, die wij uit de waren isoleerden, waarbij zal blijken, dat behalve degene, die er door de bereiding reeds in zijn te verwachten, door luchtinfectie de aanwezigheid der andere bacteriën is te verklaren. Zooals wij reeds in de inleiding betoogden, is de kans op besmetting bij deze waren groot, zoowel uit de lucht, als van het materiaal en de handen

¹⁾ A. J. Amos en D. W. Kent Jones, *Analyst*, 55, 248 (1930).

der arbeiders. Men zal dus een groote verscheidenheid van bacteriën hierin kunnen aantreffen.

De sterkst vertegenwoordigde groep bleek die der:

Aërobe sporenvormende bacteriën.

Een identificatie in deze groep is zeer moeilijk; dit komt vnl. door de eenvormigheid van de stofwisseling dezer bacteriën, zoodat de indeeling bijna uitsluitend op morphologische verschillen moet berusten. De beste onderzoekingen over deze groep organismen zijn in 1916 verricht door Ford en medewerkers¹⁾, die in de voor die tijd heerschende groote verwarring orde schiepen en dubbele namen deden verdwijnen. Zij onderzochten hiertoe meer dan 1700 cultures op morphologie, Gramkleuring, gelatinevervloeiing en wijze van sporenvorming: grootte, vorm en ligging der sporen. Zij kwamen op grond hiervan tot een indeeling in de volgende 9 groepen:

Groep I. *Subtilis-groep.*

Kleine, homogene, sterk bewegelijke staafjes; afmeting 0.375 bij 1.5—2.5 μ . Op glucoseagar kolonies zonder uitloopers. Centrale of excentrische, ovale sporen, 0.5 bij 0.75—0.875 μ , dikwijls met aanhangende resten protoplasma. Op vaste voedingsbodems harde, in het medium dóódringende kolonies; in vloeibaar milieu gekweekt, wordt een taaie oppervlaktehuid gevormd.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis viscosus.

Groep II. *Mesentericus-groep.*

Kleine, homogene, zeer bewegelijke staafjes; afmeting: 0.5 bij 2—4 μ . Op glucoseagar vormen zij veelal kolonies met lange uitloopers. Centrale of excentrische, ovale sporen,

¹⁾ J. S. Lawrence and W. W. Ford, J. Bact. 1, 273 (1916).

C. A. Laubach, J. L. Rice and W. W. Ford, J. Bact. 1, 493 (1916).

0.5 bij 1—1.125 μ , met aanhangende resten protoplasma. Op vaste voedingsbodems vormen zij een zachte massa met een neiging tot rimpelen, op vloeibare media een broze, gemakkelijk breekbare oppervlaktehuid.

- Bacillus mesentericus vulgatus
- Bacillus mesentericus fuscus
- Bacillus mesentericus niger
- Bacillus mesentericus ruber
- Bacillus mesentericus flavus
- Bacillus mesentericus panis viscosi
(onbewegelijk)
- Bacillus lactis niger.

Groep III. *Cohaerens-groep*.

Bewegelijke staafjes, iets grooter dan *Bacillus subtilis* of *Bacillus mesentericus*; grootte 0.375—0.75 bij 0.75—3 μ . Op glucoseagar ontstaan dikkere en langere vormen. Involutievormen komen reeds in jonge cultures voor. Cylindrische, centraal gelegen sporen, 0.56—0.75 bij 1—1.5 μ . Op vaste voedingsbodems vormen zij een zachte massa, in vloeibare groeien zij diffuus troebel, vormen geen of een weinig ontwikkelde oppervlaktehuid.

- Bacillus cohaerens
- Bacillus simplex
- Bacillus agri.

Groep IV. *Mycoides-groep*.

Groote, rechthoekige staafjes, die dikwijls lange draden vormen. Afzonderlijke cellen 0.5 bij 3—6 μ . Op glucoseagar vormen zij dikkere en langere staven, gevuld met bolvormige elementen. Sporen centraal of excentrisch, rond of ovaal tot cilindrisch, 0.75—1 bij 1—2 μ . Sporen zijn zeer wisselend van grootte en vormen dikwijls ketens. Groei op vaste

voedingsbodems droog en dóódringend in het medium, op vloeibare voedingsbodems flink ontwikkelde, taaie oppervlaktehuid.

Bacillus mycoides
 Bacillus prausnitzii
 Bacillus adhaerens (onbewegelijk).

Groep V. *Cereus-groep*.

Groote, bewegelijke staafjes, met ronde hoeken, 0.75 bij 2.25—4 μ . Groeien soms in korte ketens. Op glucoseagar dikker en langer, met inwendig bolvormige lichaampjes. Centrale of excentrische, cilindrische sporen, 0.5—0.75 bij 1.125—1.5 μ . Sporen dragen resten protoplasma aan één of beide einden. Zij gelijken dikwijls op groote subtilis- of mesentericussporen. Groeien op vaste voedingsbodems als een zachte massa, soms rimpelig, in een vloeibare voedingsbodem gekweekt, vormen zij een dikke, broze oppervlaktehuid.

Bacillus cereus
 Bacillus albolactis
 Bacillus cereus var. fluorescens.

Groep VI. *Megatherium-groep*.

Zeer groote, sterk bewegelijke staafjes, 0.75—1.25 bij 3—9 μ , dikwijls in lange draden liggend, die hun cytoplasma verliezen en aan de peripherie eigenaardige protoplasma-aanhangsels vertoonen. Protoplasma verandert snel in sterk lichtbrekende, bolvormige lichaampjes, speciaal op glucose-agar. Er ontstaan reeds vroeg doorschijnende vormen. Sporen centraal, excentrisch of eindstandig, ovaal tot cilindrisch, 0.75—1.125 bij 1.5—2 μ , varieeren sterk in vorm, soms rond, soms rechthoekig, dikwijls niervormig. Groei op vaste voedingsbodems als een dikke, zachte massa, in vloeibare diffuus troebel met geen of een weinig ontwikkelde oppervlaktehuid.

Bacillus megatherium
 Bacillus petasites
 Bacillus ruminatus.

Groep VII. *Groep met ronde, eindstandige sporen.*

Kleine, sterk bewegelijke staafjes, 0.5—0.75 bij 1.5—3 μ , vormen in oude cultures dikwijls lange draden. Protoplasma homogeen. Sporen eindstandig, rond, dikker dan het overige deel van het organisme, 1—1.5 μ in diameter.

Bacillus pseudotetanicus
 Bacillus fusiformis.

Groep VIII. *Groep met cilindrische, eindstandige sporen.*

Kleine, smalle, sterk bewegelijke staafjes, 0.375—0.5 bij 2.5—4 μ . Op glucoseagar iets grooter, maar geen verandering in het protoplasma. Sporen eindstandig, cilindrisch, 0.75 bij 1.125—1.5 μ .

Bacillus circulans
 Bacillus brevis
 Bacillus terminalis.

Groep IX. *Groep met centrale sporen.*

Lange, sterk bewegelijke staafjes, aan de einden toegespitst, 0.375—0.5 bij 1.125—4 μ . Op glucoseagar iets grooter, maar geen verandering in het protoplasma. Sporen ontwikkelen zich in het midden van het staafje, waardoor dit spoelvormig wordt. Sporen cilindrisch, groot, 0.625—0.875 bij 1.125—1.5 μ .

Bacillus centrosporus
 Bacillus laterosporus.

Ford deelt deze bacillen dus primair in naar morfologie, bewegelijkheid en wijze van sporenvorming, secundair naar de cultureele eigenschappen.

Tegenwoordig zijn reeds meer dan 28 soorten geïsoleerd;

Bergey ¹⁾ geeft 95 verschillende aërobe, niet-pathogene sporendragers, die hij echter niet in groepen indeelt.

Vele van de genoemde bacteriën komen in de door ons onderzochte waren voor, hetgeen ook niet te verwonderen is, daar het bacteriën zijn, die in groote getale in lucht, water en aarde voorkomen.

Door ons zijn geïsoleerd:

uit cacao, 15 stammen, behoorende tot de soorten:

Bac. mes. vulgatus
 Bac. mes. fuscus
 Bac. megatherium
 Bac. danicus
 Bac. laterosporus
 Bac. subtilis
 Bac. robur
 Bac. mycoides
 Bac. cereus.

uit maizena, 23 stammen, behoorende tot de soorten:

Bac. mes. vulgatus
 Bac. mes. fuscus
 Bac. mes. panis viscosi
 Bac. megatherium
 Bac. petasites
 Bac. simplex
 Bac. adhaerens
 Bac. graveolens
 Bac. subtilis.

uit nootmuscaat, 24 stammen, behoorende tot de soorten:

Bac. mes. vulgatus
 Bac. mes. fuscus
 Bac. mes. ruber
 Bac. adhaerens

¹⁾ D. H. Bergey, Manual of Determinative Bacteriology, 1934.

Bac. cohaerens

Bac. subtilis

Bac. simplex.

De determinatie van deze soorten is geschied op grond van hun morphologische en biochemische eigenschappen door middel van vorm, bewegelijkheid, wijze van groei op agar, gelatine, aardappel, in bouillon, melk, vorming van indol in peptonwater, zuur uit suikers, vervloeiing van gelatine. Verder werden, indien noodig, nog de thermotolerantie, haemolyse e.a. eigenschappen nagegaan.

Zooals wij reeds in de inleiding zagen, ontwikkelen deze aërobe, sporendragende bacteriën zich in cacao reeds tijdens de fermentatie en veroorzaken daar een ontleding van organische stoffen, welke ontleding van niet te lange duur mag zijn, daar anders rotting gaat optreden. Tot deze groep behoren nl. uitgesproken rottingsorganismen.

Aërobe, niet-sporogene bacteriën.

De belangrijkste vertegenwoordigers hiervan zijn Bact. coli en Bact. lactis aerogenes (zie blz. 65). Uit cacao is door ons verder nog Bact. crinatum geïsoleerd, een onbewegelijke, niet-pathogene bacterie, behorende tot de Anthrax-groep¹⁾.

Coccen.

De geïsoleerde soorten hiervan bleken veelal tot de „lucht-coccen” te behoren, d.w.z. coccen, die veelvuldig in de lucht voorkomen en dus vandaar uit de waren hebben besmet.

Wij hebben geïsoleerd:

Micrococcus aurantiacus

Micrococcus cereus

Micrococcus subcitreus

Micrococcus flavus

Micrococcus candidus

¹⁾ Zie F. D. Chester, A Manuel of Determinative Bacteriology, 1901.

Micrococcus freudenreichii.

Verder bevatten verschillende monsters cacao *Streptococcus lacticus*, waarschijnlijk afkomstig van de fermentatie.

Anaërobe bacteriën.

Wij hebben voor het onderzoek hiervan gebruik gemaakt van de methode „Veillon”. Deze methode munt nl. uit door eenvoud en geeft zeer goede resultaten. Negen monsters nootmuscaat zijn door ons op de aanwezigheid van anaërobe bacteriën nagegaan, waarvan zes alleen aërobe organismen bleken te bevatten. Uit de overblijvende drie monsters verkregen wij vijf stammen, die bij nader onderzoek bleken niet obligaat anaëroob te zijn, maar aëroob-fac. anaëroob. Van deze vijf stammen waren vier coccen, behoorende tot de soorten:

Micrococcus freudenreichii

Micrococcus candidus

Micrococcus cereus.

Bij deze laatste stam hebben wij als bijzonderheid opgemerkt, dat de bacteriën, afkomstig van de kolonies, die diep in de agar, dus anaëroob waren gegroeid, veel op boonvormige diplococcen geleken. Na eenige malen overenten op alkalische bouillon en alkalische glucosebouillon, werd het aantal normale micrococcen steeds grooter en na 3—4 maal overenten, bestonden zij weer geheel uit micrococcen. Het is ons niet bekend, dat in de literatuur dit verschijnsel reeds eerder is beschreven. De andere coccen vertoonden niet een dergelijke vormverandering.

De vijfde stam bleek een sporendrager te zijn, en wel *Bac. cohaerens*.

Faecaalverontreiniging.

Zoals bij het water- en melkonderzoek deze verontreiniging nagegaan wordt door het opsporen van de typische faecaal-

organismen: *Bact. coli*, streptococcon en *Bac. enteritidis sporogenes*, werden de door ons onderzochte waren volgens de daar gebruikelijke methoden op de aanwezigheid dezer organismen nagegaan.

Wij gingen uit van de gefiltreerde emulsie van cacao, maizena en nootmuscaat met steriel water. Als ophoopingsvloei-stof voor *Bact. coli* werd gebruik gemaakt van zure-lactose-neutraalrood-bouillon, voor streptococcon van alkalische glucosebouillon, voor *Bac. enteritidis sporogenes* van steriele melk.

Wij zullen niet een geheel overzicht geven van alle, door ons verrichte proeven, maar volstaan met het algemeene resultaat:

Bact. coli, bij alle waren in $\pm 10\%$ van de gevallen aanwezig.

Streptococcon, in alle gevallen afwezig.

Bac. enteritidis sporogenes in alle gevallen afwezig.

Naast *Bact. coli* hebben wij ook eenige malen *Bact. lactis aerogenes* geïsoleerd.

Actinomyces.

Van deze groep organismen hebben wij tweemaal een vertegenwoordiger geïsoleerd:

Stam 1, afkomstig uit cacao.

Stam 29, afkomstig uit nootmuscaat.

Bij de determinatie dezer organismen stuit men op vele moeilijkheden, vnl. omdat nog geen bevredigend systeem hiervoor bestaat. Wij zullen daarom volstaan met de eigenschappen van de beide geïsoleerde stammen te vermelden:

	Stam 1	Stam 29
vorm	lange, vertakte draden	lange, vertakte draden
bewegelijkheid	onbewegelijk	onbewegelijk
kol. op agarplaat	klein, rond, wit, hard, glanzend, gaafrandig, ondoorzichtig	wit, droog, hard, met geplooid uiterlijk
reuk	reukeloos	sterk aardachtig
Gramkleuring	Gram +	Gram +
GLP (zuur-gas)	— —	— —
LLP (zuur-gas)	— —	— —
SLP (zuur-gas)	— —	— —
gelatinesteek	langzame vervloeiing	langzame vervloeiing
melk	onveranderd	peptonisatie wit-lichtgele oppervlaktehuid
aardappel	wit-grijswit, droog	wit, kalkachtig; na 5 weken bruingekeurd
alk. bouillon	kleine vlokjes op de bodem	grootte vlokken op de bodem
nitraat	geen ontleding	geen ontleding
indol	—	—
bloedplaat	na 4 dagen haemolyse	geen haemolyse
bloedserum	sterk vertakte draden geen conidiën	sterk vertakte draden geen conidiën
ontleding van 1 0/0 zetmeel	na 7 dagen erythrodextr. na 14 dagen geheel ontleed	na 14 dagen erythrodextr. na 21 dagen geheel ontleed

Met deze eigenschappen lijkt het waarschijnlijk, dat stam 29 *Actinomyces albus* zou zijn, een vrij veel voorkomende, mesophyle saprophyt¹⁾. Aan een voorspelling omtrent de identiteit van stam 1 hebben wij ons niet gewaagd.

Inloed van aetherische oliën op bacteriën.

Daar ons bij het onderzoek over de schimmelproef gebleken was, welke sterk remmende werking de aetherische oliën uit de specerijen op de groei der schimmels uitoefenen, zijn wij tevens de werking hiervan op eenige bacteriestammen nagegaan.

¹⁾ Zie D. H. Bergey, *Manual of Determinative Bacteriology*, 1934.

In peper, nootmuscaat en kaneel is aanwezig \pm 2—3% olie, in kruidnagelen tenminste 12%.

Uit de tabel blijkt, dat de bacteriën van peper- en nootmuscaatolie geen hinder ondervinden. Zelfs een verblijf van 7 uur in een 5% olieëmulsie heeft geen invloed op de levende cel. Anders is het bij kaneelolie, kruidnagelolie en eugenol. Kaneelolie blijkt, zelfs in 0.5% emulsie, *Bact. coli*, *Bact. lactis aerogenes* en *Bact. proteus* te doden, terwijl *Bac. mes. vulgatus* en *Str. lacticus* nog een 5% emulsie verdragen kunnen. Kruidnagelolie blijkt iets sterker te werken, daar hier *Str. lacticus* in de 5% emulsie is afgestorven. Eugenol heeft de sterkste werking; alleen *Bac. mes. vulgatus* kan dit verdragen. Het was trouwens te verwachten, dat de eenige sporendrager, die bij ons onderzoek gebruikt werd, het beste tegen de invloed der oliën bestand zou zijn.

Men mag, na deze werking te zijn nagegaan, nog geen oordeel vellen over het voorkomen van deze bacteriën in de specerijen, daar de omstandigheden hierin geheel anders zijn dan in een door ons kunstmatig gemaakte emulsie.

Na dit overzicht over de voorkomende bacteriën in de verschillende waren kunnen wij nog geen uitspraak doen over de waarde en de beteekenis hiervan voor de beoordeeling der waar.

Het zou zeker aanbeveling verdienen ook deze zijde te beschouwen, met als resultaat: het stellen van een maximum aan het aantal aanwezige bacteriën, hetgeen aan de hygiënische gesteldheid der producten zeer zeker ten goede zou komen.

Dit na te gaan viel echter buiten het kader van ons onderzoek.

SAMENVATTING

In dit proefschrift is een onderzoek ingesteld naar de zogenaamde „Schimmelproef”, waaraan cacao, meel en specerijen hier te lande worden onderworpen, om na te gaan of deze schimmelig zijn of bij het bewaren groote kans hebben, spoedig te gaan schimmelen en dus aan het gebruik moeten worden onttrokken. De methode, die in de Koninklijke Besluiten voor deze proef staat aangegeven, biedt vele moeilijkheden, voornamelijk bij de interpretatie der resultaten.

Om de subjectiviteit, die aan deze interpretatie is verbonden, uit te sluiten, wordt een quantitative methode gegeven met behulp van pruimenagar. Broedtijd 4 dagen bij 25° C.

Om de uitgroeiing van *Mucor stolonifer* tegen te gaan, welke schimmel geheele platen overgroeit en dientengevolge ontelbaar maakt, wordt aan de pruimenagar kopersulfaat toegevoegd in een concentratie van 1 g op 1500 cm³ agar.

Behalve met anorganische zouten zijn ook proeven verricht, om de invloed van verschillende aetherische oliën op de groei van *Mucor stolonifer* en andere schimmels na te gaan. Hierbij bleken kaneel- en kruidnagelolie de sterkste werking uit te oefenen, daarna volgden peper- en nootmuscaatolie.

Vervolgens is een klein overzicht gegeven van de schimmels, die in de verschillende waren aan te treffen zijn. Het laatste hoofdstuk is aan de bacteriologie dezer waren gewijd.

TABEL IX

Overzicht over de verrichte schimmelproeven volgens het Koninklijk
Besluit en op pruimenagar

CACAO

Mon- ster	Volgens K.B. 1.5 g cacao		Pruimenagar 37° C 0.1 g cacao		Pruimenagar 25° C ¹⁾ 0.1 g cacao	
	24 uur	2 × 24 uur	24 uur	2 × 24 uur	4 × 24 uur	
3922	3	16			9	— ov. ²⁾
4020	7	+			15	— 8
4065	8	+				ov.— 6
4090	2	+				ov.— 6 ov.
4175	2	+			12	— 7 ov.
4331	+	*)	70		87	— 60 ov.
4380	13	+			51	— 45 ov.
4528	1	11			4	— 3
4544	+	*		38	58	ov.— 36 ov.
4554	8	+			86	— 50 ov.
4581	16	+			8	— 13
4590	—	+			9	ov.— 26
4638	10	+			40	ov.— 45 ov.
4653	—	+			9	— 6
4663	2	+			18	— 17
4679	—	4			43	ov.— 53
4681	—	6			7	— 9
4750	+	*	22	60	95	— 106
4770	+		1	10	157	— 104
4823	—	2			2	— 3
4843	—	12			102	— 94
4901	—	+			7	— 6
4919	—	10			3	— 5
4952	5	+			15	— 17
4981	—	24			6	— 4
5047	—	5			4	ov.— 8 ov.
5096	6	+			18	ov.— 16 ov.
5119	—	6			10	— 11
5183	—	9			3	— 2
5193	3	25			10	— 20
5214	2	+			26	— 33
136	—	—			6	— 3
138	1	+			20	— 21
144	—	zw. +			3	— 0
182	—	31			11	— 12

¹⁾ Deze kolom geeft duplo-bepalingen aan.

²⁾ = overgroeid.

³⁾ Deze monsters werden afgekeurd.

Mon- ster	Volgens K.B. 1.5 g cacao		Pruimenagar 37° C 0.1 g cacao		Pruimenagar 25° C 0.1 g cacao	
	24 uur	2 × 24 uur	24 uur	2 × 24 uur	4 × 24 uur	
216	5	+			76 ov.—	64 ov.
219	—	+			20 —	17
262	3	+			4 ov.—	10
276	—	+			7 ov.—	15
330	—	1			5 —	8
351	—	3			4 ov.—	6
388	—	—			2 —	1
459	3	+			70 ov.—	ov.
490	12	+			49 ov.—	46 ov.
511	—	zw.+			3 ov.—	9 ov.
546	3	+			0 —	ov.
581	—	5			0 —	0
587	—	16			3 —	0
601	—	18			21 —	27
636	—	8			7 —	4
660	—	+			14 —	10 ov.
675	10	+			ov.—	14 ov.
689	zw.+	+			13 —	5
690	—	+			23 —	16
714	—	+			19 —	18
741	1	+			39 —	9 ov.
803	—	+			13 —	6
843	9	+			10 —	17
846	3	+			13 ov.—	19 ov.
848	2	+			10 —	8
883	—	46			12 —	12
986	1	10			2 —	3
995	2	+			9 —	10
997	3	zw.+			ov.—	2
1002	13	+			9 —	16
1067	1	+			21 —	12 ov.
1105	—	+			11 —	6
1180	5	+			19 —	58
1187	9	+			6 —	8 ov.

MAIZENA

Mon-ster	Volgens K.B. 1.5 g maizena			Pruimenagar 37° C 0.1 g maizena		Pruimenagar 25° C 0.1 g maizena		
	24 u	2×24 u	3×24 u	24 uur	2×24 uur	4 × 24 uur		
2913			+++		20	17	—	12 ov.
4115	—	zw.+	+			7	—	4
4224	—	—	—			3	—	7
4167	—	—	—			5	—	11
4381	—	1	zw.+			2	—	1
4406	—	11	+			3	—	5
4441	—	—	—			1	—	2
4494	—	6	+			2	—	1
4499	—	—	—			10	—	9
4642	—	—	7			1	—	0
4690	—	—	—			1	—	0
4769	—	—	3			1	—	2 ov.
5010	—	zw.+	+			5	—	1 ov.
5014	—	—	—			1 ov.	—	0
5075	—	4	zw.+			12	—	4
3	—	—	5			1	—	1
55	—	—	—			2	—	3
141	—	22	+			0	—	5
152	—	23	+			0	—	1
268	—	2	29			3	—	1
376	—	4	+			1	—	0
460	—	5	+			4	—	ov.
774	—	2	3			8 ov.	—	8 ov.
836	—	—	—			0	—	3
1428	—	35	+			ov.	—	35
1617	—	+	—					
1626	—	3	+					
2353	—	14	—			18	—	20
2463	+	—	*			28	—	28
2543	+	—	*			33	—	26
2580	2	40	—			3	—	6

WITTE PEPER

Mon- ster	Volgens K.B. 5 g peper			Pruimenagar 37° C 0.1 g peper		Pruimenagar 25° C 0.1 g peper
	24 u	2 × 24 u	3 × 24 u	24 uur	2 × 24 uur	4 × 24 uur
3861	—	+	++ *		1072	2290
4030	—	—	—			90 — 99
4196	—	—	—			910 — 880
4618	—	—	zw.+			960 — 1020
4669	—	+	— *	350		1860 — 2120
5095	—	—	—			1540 — 1260
5213	—	—	zw.+			1100 — 870
23	—	—	—			> 500
191	—	zw.+	+ *	sterk +	ontelbaar	3520 — 4400
767	—	+	— *		ontelbaar	3000 à 4000
861	—	—	zw.—+			2480 — 3100
886	—	—	—			2270 — 2700
951	—	—	—			920 — 820
963	—	—	zw.+			1230 — 1530
988	—	+	—		270	3000 à 4000
1053	—	—	—			2010 — 1470
1075	—	—	—			2150 — 2220
1137	—	—	—			8160 — 7200
1190	—	—	—			3160 — 3360
1194	—	—	zw.+			2930 — 3300
1237	—	—	—			4040 — 3000
1280	—	—	—			3310 — 3890
1312	—	zw.+	zw.+			1220 — 1390
1362	—	+	— *		ontelbaar	2540 — 2910
1503	—	—	—			2850 — 2590
1507	—	—	zw.+			3320 — 2910

ZWARTE PEPER

Mon- ster	Volgens K.B. 5 g peper			Pruimenagar 37° C 0.1 g peper		Pruimenagar 25° C 0.1 g peper	
	24 u	2 × 24 u	3 × 24 u	24 uur	2 × 24 uur	4 × 24 uur	
4013	—	—	—			230	— 293
4197	—	—	—			123	— 139
4330	—	—	—			211	— 260
4361	—	—	—			207	— 225
4685	—	—	—			173	— 170
4688	—	—	—			118	— 130
4687	—	—	zw. +			118	— 144
4736	—	—	z.z. +			710	— 790
5011	—	—	—			360	— 510
309	—	—	2			14 ov.	— 55
456	—	—	—			132	— 140
539	—	—	—			183	— 195
609	—	—	—			90	— 98
682	—	—	18			ontelbaar	
765	—	—	—			70	— 69
842	—	—	—			28	— 26
887	—	—	—			60	— 58
1191	—	—	—			124	— 117

NOOTMUSCAAT

Mon- ster	Volgens K.B. 5 g nootmuscaat			Pruimenagar 37° C 0.1 g nootmuscaat		Pruimenagar 25° C 0.1 g nootmuscaat	
	24 u	2 × 24 u	3 × 24 u	24 uur	2 × 24 uur	4 × 24 uur	
3761	—	+	++ *		108	77	— 70
4014	—	28	68			24	— 18
4086	—	—	9			0	— 2
4135	—	zw.+	+		9	19	— 13
4168	—	18	54			20	— 13
4223	—	48	+			15	— 15
4357	—	zw.+	+			17	— 24
4383	—	1	7			68	— 60
4463	—	8	52			1	— 4
4536	—	16	zw.+			17	— 14
4579	—	—	—			158	— 161
4583	—	— 8	35			114	— 96
4588	—	zw.+	+			18	— 20
4597	—	zw.+	+			6	— 9
4716	—	zw.+	+			247	— 260
4864	—	7	42			3	— 11
4874	—	1	zw.+			43	— 61
4939	—	—	—			41	— 37
5024	—	zw.+	+	—	26	30	— 28
5036	—	—	zw.+			129	— 144
5107	—	12	zw.+			11	— 17
5117	—	—	—	900		2540	— 2260
5206	—	—	10			69	— 65
5211	—	9	zw.+			11	— 10
108	—	zw.+	+			11	— 10
148	—	—	—	—	ontelbaar	1040	— 980
161	—	—	11			192	— 156
190	—	zw.+	+	—	20	14	— 12
206	—	zw.+	+	—	160	113	— 109
241	—	—	—			20	— 16
242	—	—	12			192	— 188
279	—	21	+			9	— 11
387	—	9	zw.+			11	— 18
397	—	zw.+	+			48	— 51
411	—	zw.+	+			64	— 55
420	—	zw.+	+			300	— 390
516	—	—	zw.+			27	— 23
618	—	zw.+	+	—	60	82	— 72
638	—	+	+	—	100	152	— 153
695	—	—	—			3	— 4
688	—	—	—			7	— 4
947	—	2	+			120	— 111
959	—	12	zw.+			30	— 22
999	—	—	zw.+			15	— 12
1107	—	—	zw.+			100	— 126
1336	—	zw.+	+			30	— 33
1623	—	+	+			20	— 28

INHOUD

	Blz.
Inleiding	1
HOOFDSTUK I	
De schimmelproef	9
HOOFDSTUK II	
Gewijzigde schimmelproef I	15
HOOFDSTUK III	
Gewijzigde schimmelproef II	26
Invloed van eenige aetherische oliën en anorga- nische zouten op de groei van <i>Mucor stolonifer</i> .	
HOOFDSTUK IV	
Uitvoering en beoordeeling der gewijzigde schimmel- proef	40
HOOFDSTUK V	
Schimmels, voorkomende in cacao, maizena, peper en nootmuscaat	49
HOOFDSTUK VI	
Bacteriologie van cacao, maizena, peper en noot- muscaat	55
Samenvatting	69
Overzicht over de verrichte schimmelproeven volgens het Koninklijk Besluit en op pruimenagar . .	70

STELLINGEN

I.

Het is wenschelijk, de schimmelproef uit het Koninklijk Besluit voor cacao en meel te vervangen door die op pruimenagar, waaraan per 1500 cm³ agar 1 gram kopersulfaat wordt toegevoegd.

II.

Het onderscheid, dat Hruszek geeft voor humane en bovine tuberculine, moet aan verontreinigingen worden toegeschreven.

H. Hruszek, Dermat. Wschr. 1, 641 (1934).

P. Kallós, Beitr. z. Klin. d. Tbk. 86, 378 (1935).

III.

De onderzoekingen van Pellegrini vormen geen bewijs voor de pathogeniteit van *Bacillus subtilis*.

F. Pellegrini, Soc. Intern. Microbiol. Boll. della Sez. Ital. 6, 492 (1934).

IV.

Een bewijs voor een stoechiometrische reactie bij de oxydatie van hexosen door koperhoudende alkalische oplossingen is door Spengler, Tödt en Scheuer niet gegeven.

O. Spengler, F. Tödt en M. Scheuer, Zeitschr. d. Wirtschaftsgruppe Zuckerind., Techn. Teil, 86, 130 (1936).

V.

Het verdient de voorkeur de bepaling van het vetgehalte in melkbrood te verrichten in de kruim als zoodanig.

Bijlage van het Broodbesluit (21 Dec. 1925, Stbl. No. 478, sub 2).

S. C. L. Gerritzen en M. Kauffman, Chem. Weekbl. 29, 742 (1932).

F. Th. v. Voorst, Chem. Weekbl. 33, 42 (1936).

VI.

Kristallen zijn opgebouwd uit deeltjes van bepaalde ultra-microscopische afmetingen, welke een zekere stabiliteit bezitten.

D. Balarew, Z. Krist. A 93, 173 (1936).

VII.

De interpretatie van de adsorptie-isotherm volgens Cunningham biedt voordeelen boven die van Langmuir.

G. E. Cunningham, J. Phys. Chem. 39, 69 (1935).

VIII.

De verklaring, die Bertram geeft voor de cis-transisomerie van oliezuur en elaidinezuur, is onjuist.

S. H. Bertram, Chem. Weekbl. 33, 3 (1936).

J. Stuurman, Chem. Weekbl. 33, 201 (1936).

