



Physiologische onderzoekingen over *Ceratostomella ulmi* (Schwarz) Buisman

<https://hdl.handle.net/1874/319227>

A. g. c. 192, 1934.

PHYSIOLOGISCHE
ONDERZOEKINGEN OVER
CERATOSTOMELLA ULMI
(SCHWARZ) BUISMAN

M. S. J. LEDEBOER

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

s.
cht

PHYSIOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN OVER
CERATOSTOMELLA ULMI (SCHWARZ) BUISMAN

Diss Utrecht 1934

PHYSIOLOGISCHE
ONDERZOEKINGEN OVER
CERATOSTOMELLA ULMI
(SCHWARZ) BUISMAN

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. C. W. STAR BUSMANN, HOOGLEERAAR IN
DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-
KUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG
2 JULI 1934 DES NAMIDDAGS TE DRIE UUR

DOOR

MARIA SARA JOHANNA
LEDEBOER
GEBOREN TE ROTTERDAM

BAARN — N. V. HOLLANDIA-DRUKKERIJ — 1934

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN MOEDER
AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER

Het afsluiten van mijn studietijd met dit proefschrift stelt mij in de gelegenheid, aan degenen, die mij in de wetenschap hebben ingeleid, mijn dank te betuigen.

In de eerste plaats geldt die U, Hooggeleerde *W e s t e r d i j k*, Hooggeachte Promotor, die mij de phytopathologie als belangrijke en levenskrachtige wetenschap heeft leeren kennen.

Nadat Uw heldere colleges en het boeiende praktische werk over phytopathologische vraagstukken reeds mijn bijzondere belangstelling voor Uw studierichting hadden gaande gemaakt, was het mij een groot voorrecht, gedurende eenige jaren Uw assistente aan het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” te mogen zijn. Toen die werkkring plaats moest maken voor het bewerken van dit proefschrift, heeft U mij steeds bereidwillig Uw volle medewerking verleend tot het tot stand komen ervan. Daarvoor wil ik U op deze plaats nog eens hartelijk dank zeggen.

Hooggeleerde *W e n t*, U zal ik er steeds dankbaar voor blijven, dat ik onder Uw leiding inzicht mocht krijgen in de plantenfysiologie, die ook voor de studie van de plantenziekten van zoo direct belang is.

Uw belangstelling, ook voor wie niet tot Uw leerlingen in den engeren zin behooren, heeft mij steeds aangenaam getroffen.

Uw colleges, Hooggeleerde *J o r d a n*, hebben mij zeer geboeid door het begrip dat zij mij gaven van de veelzijdige problemen, die de levensverschijnselen van mensch en dier opleveren.

U, Hooggeleerde *P u l l e*, dank ik zeer voor Uw interessante colleges, en bovendien voor de behalve leerzame ook aangename excursies, die ik onder Uw leiding meemaakte.

Hoewel de geologie niet tot mijn speciale studierichting behoort, wil ik niet nalaten, ook U, Hooggeleerde *R u t t e n*, te bedanken voor de manier, waarop U door middel van colleges en excursies

de geologische studie aantrekkelijk weet te maken; U heeft er ook bij mij een blijvende belangstelling voor wakker geroepen.

Zeer bijzonderen dank ben ik U verschuldigd, Zeergeachte v a n L u i j k. Ieder, die ooit in het Baarnsche Laboratorium gewerkt heeft, kent Uw groote hulpvaardigheid; maar vooral zij, die er een proefschrift bewerkt hebben, beseffen, van hoe groote waarde Uw opbouwende critiek en Uw gedegen feitenkennis zijn naast Uw onbegrensde bereidwilligheid. Dat ook ik daarvan heb mogen profiteren, stel ik op hoogen prijs.

Verder spreek ik hier aan allen, die mij op eenige wijze geholpen hebben bij het werk voor mijn dissertatie, mijn welgemeenden dank uit.

Ten slotte dank ik het Bestuur van de Stichting „Willie Commelin Scholten” voor de in haar laboratorium genoten gastvrijheid.

INHOUD

	blz.
INLEIDING	1
H o o f d s t u k I. METHODE	
A. Verschillende isolaties	3
B. Proefmateriaal	3
C. Cultuurmethode	5
D. Bepaling van de opbrengst	
1. Drooggewichtsbepaling	6
2. Bepaling van de gemiddelden, enz.	7
E. Bepaling en regeling van de pH van de oplossing	8
F. Tijd van oogsten	9
H o o f d s t u k II. TEMPERATUUR EN ZONLICHT	11
H o o f d s t u k III. ZUURGRAAD	
A. Literatuur	19
B. Eigen onderzoek	21
H o o f d s t u k IV. VOEDINGSPROEVEN	
Inleiding	37
A. Concentratie van de totale oplossing.	
1. Literatuur	41
2. Proeven	41
B. Koolstof	44
C. Stikstof.	48
D. Invloed van fosphaten	51
E. Andere anionen	53
F. Metaalionen	
1. Kalium.	56
2. Natrium	57
3. Magnesium en Calcium	59
4. IJzer en Zink.	66
5. Koper	72
6. Mangaan	77
7. Kwik	79
G. Tannine	80
H. Groeibevorderende stoffen	85
CONCLUSIES	87
ZUSAMMENFASSUNG	89
LITERATUURLIJST	92

INLEIDING

Over de physiologie van schimmels zijn in den loop der jaren verschillende onderzoekingen gedaan. Oorspronkelijk kwamen daarvoor voornamelijk soorten uit de geslachten *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis* en *Mucor* in aanmerking; daarvan heeft in de laatste jaren *Aspergillus niger* van T i e g h e m de grootste belangstelling tot zich getrokken, zoodat er nu heel wat physiologische bijzonderheden van deze schimmel bekend zijn, terwijl er aan den anderen kant natuurlijk juist weer veel strijdpunten zijn tengevolge van het groote aantal onderzoekers, die met andere methodes vaak tegenstrijdige resultaten meenen te vinden.

Er valt op dit gebied dus nog veel te onderzoeken, dat van physiologisch standpunt gezien belangrijk is; de resultaten van dergelijke proeven winnen aan algemeen-biologische beteekenis, indien ze bij andere proefobjecten bevestigd worden, of juist door bepaalde oorzaken anders uitvallen. Daarom is het van belang een onderzoek naar de gedragingen van een typischen parasiet te stellen naast dat over *Aspergillus niger*. Een schimmel, die zich voornamelijk ontwikkelt in den sapstroom van een levenden boom, zooals *Ceratostomella ulmi* (S c h w a r z) B u i s m a n zich in den iep voornamelijk in de levende houtvaten en gedurende de groeiperiode uitbreidt, heeft wel een leefwijze, die totaal verschilt van die van een saprophyt als *Aspergillus niger*.

Niet alleen ter vergelijking met *Aspergillus niger*, maar in de eerste plaats vanuit phytopathologisch gezichtspunt werd *Ceratostomella ulmi* als proefobject voor deze onderzoekingen gekozen: immers, als het mocht blijken, dat de veroorzaker van de iepenziekte een bepaalde gevoeligheid zou vertoonen tegenover zekere elementen of stoffen, die de iep wel zou kunnen verdragen, zou er kans te meer bestaan om de ziekte uit te roeien. Eenige kennis

omtrent de physiologie van de schimmel was voor dat onderzoek onontbeerlijk, daar men den eventueelen secundairen invloed, dien de toevoeging van een bepaalde stof zou hebben, moet kennen, wil men de specifieke werking ervan kunnen beoordeelen.

In verband hiermee moet de eenige publicatie, die hetzelfde probleem stelt, n.l. die van Boudru (1933), genoemd worden; deze verscheen, toen mijn onderzoek bijna ten einde was. Boudru onderzocht de fungicide werking van verschillende kleurstoffen met een methode, die over de meer algemeene physiologie van *Ceratostomella ulmi* geen uitsluitel kon geven; de enkele voorbereidende proeven, die hij daarover heeft gedaan, werden door mij herhaald en leverden andere resultaten op dan die, waarop Boudru zijn conclusies baseerde.

De verwekker van de iepenziekte wordt hier met den correcten naam *Ceratostomella ulmi* (Schwarz) Buisman genoemd (Buisman, 1932), hoewel er voor het proefmateriaal werd uitgegaan van de „Graphium”-vorm, d.w.z. de schimmel, zooals die uit het zieke iepenhout geïsoleerd wordt, dus niet van de combinatie van een + en een — stam, die noodig is voor het verkrijgen van peritheciën van *Ceratostomella*.

HOOFDSTUK I

METHODE

A. *Verschillende isolaties*

De meeste proeven, die in het volgende beschreven worden, zijn met één isolatie van *Ceratostomella ulmi* gedaan (d.w.z. met den Graphium-vorm van de schimmel, zooals die uit het zieke iepenhout komt groeien); verschillende echter werden herhaald met andere isolaties. Een essentieel verschil in gedrag ten opzichte van bepaalde veranderingen in de voedingsoplossingen, dat men misschien zou kunnen verwachten tusschen de isolaties, welke gistsporen en die, welke coremia vormen in de culturen op moutagar, kon daarbij niet geconstateerd worden. In totaal werden voor de proeven tien stammen gebruikt, waarvan er acht door mij uit zieke iepetakken uit verschillende deelen van Nederland, en twee door Dr. Chr. Buisman uit binnen- en buitenlandsch materiaal waren geïsoleerd. Bovendien werd voor één bepaalde proef van een isolatie van M. Boudru (Gembloux) gebruik gemaakt.

B. *Proefmateriaal*

Alle isolaties groeiden goed op verdund mout- of kersextract. Maar in het begin van het onderzoek was het moeilijk om een stam te vinden, die een goeden groei en flinke drooggewichtopbrengst gaf op een synthetische voedingsoplossing. Naderhand bleek het, dat ook het entmateriaal genomen uit éénzelfde isolatie zeer uiteen kon loopen, wat zijn vermogen betrof om op zulk een oplossing te groeien. Wanneer er n.l., voor het vinden van een geschikten stam, van agarbuisjes werd overgeënt op telkens niet meer dan vier erlen-

meyers, dan was de kans op slagen gering. Zoo groeide er van resp. 6, 9, 12 en 18 willekeurige isolaties telkens één goed op een synthetische oplossing, die voor een anderen stam gunstig was gebleken, en die eene stam dan nog niet eens in alle (4) erlenmeyers. Ook van een sporenuitzaaiing op mout- of kersagar van één isolatie groeien de overentingen uit sommige kolonies goed op een synthetischen bodem, andere weer niet. Was die uitzaaiing afkomstig van een stam, die eerder al goed op een synthetische oplossing was gegroeid, dan was de verhouding bijv. 1 : 1, dus wel iets gunstiger dan 1 : 6, 1 : 9, 1 : 12 of 1 : 18.

Bovendien is gebleken, dat de geschiktheid van een bepaalden stam om op een oplossing te groeien door allerlei omstandigheden gedurende zijn groei op kers- of moutagar kan veranderen: een isolatie, die talloze malen zeer goede opbrengsten geleverd had op synthetische oplossingen, gaf later, na een periode van cultuur op agar, waarvan een korten tijd in de thermostaat bij 24° C., onvergelykelyk veel minder drooggewichtopbrengst, zoodat zij onbruikbaar voor voedingsproeven was geworden.

Al deze verschillende gedragingen zouden te verklaren zijn door een selectie tengevolge van den groei van de schimmel: zijn er bij verschillende overgeënte stukjes uit één cultuur op agar toevallig ook eenige, waarvan de sporen of het mycelium beter dan de rest op de oplossing kunnen groeien, dan krijgt dit gedeelte door zijn groei de overhand. Wordt de ontstane selectie weer op de agar teruggebracht, dan krijgen ook de varianten naar den anderen kant weer een kans. De eerste behoeven dan echter nog niet geheel overvleugeld te worden, daar mycelia en sporen, die op oplossingen kunnen groeien, het bovendien zeer goed op agar doen. Voor selectie door snelleren groei pleit ook het feit, dat men door telkens weer overenten van een goed groeienden stam op de synthetische oplossing geregeld goede culturen krijgt. De onregelmatigheid, die bij het enten uit culturen op agar optrad, komt dan niet meer voor, als men er tenminste op let, telkens van jonge vloeistofculturen over te enten: 6 reeksen, die na resp. 40, 47, 47, 47, 48 en 74 dagen overgeënt waren uit ongeveer 30 c.c. oplossing, groeiden niet; meer dan 50 reeksen, uit 9—37 dagen oude culturen overgeënt, groeiden wel. Werd uit 50 c.c. oplossing geënt na 63 dagen, dan had nog wel groei plaats. Hier ligt de grens dus bij hooger en ouderdom.

„Voorraden”, d.w.z. entmateriaal voor proefseries, werden dan ook voor alle zekerheid in een ruime hoeveelheid oplossing „be-
waard”.

De groeikromme van uit oudere culturen overgeënte series loopt in de eerste zes weken typisch anders dan die van series, die uit jonge cultures zijn overgeënt. Ze komen blijkbaar moeilijker op gang, zoodat het steile gedeelte pas later komt. (Vgl. figuur 6 en 7 op blz. 74).

Men zou als bezwaar tegen die proeven met een blijkbaar sterk geselecteerden stam kunnen opperen, dat zulk een stam niet meer als maatstaf mag worden gebruikt voor het gedrag van den parasiet. Het positieve resultaat van infectieproeven met een stam, die al gedurende meer dan een jaar van de eene synthetische oplossing op de andere was overgeënt, toonde echter aan, dat deze stam waarschijnlijk ook geen exceptioneele positie innam, wat zijn physiologie betreft.

C. *Cultuurmethode*

De cultuur had plaats in 25 of 30 c.c. oplossing in erlenmeyers van 100 c.c. inhoud.

De oplossingen werden gedurende 1 uur bij $\frac{1}{2}$ Atm. overdruk gesteriliseerd, en zoo spoedig mogelijk daarna, dus nog heet, met een steriele pipet overgebracht in de erlenmeyers, die, droog en van een wattenprop voorzien, gedurende 2 uren bij ongeveer 160° C droog gesteriliseerd waren; op diezelfde manier, maar dan in papier gepakt, was de pipet behandeld.

Voor het enten werden van den rand van een schimmellaag in een oplossing met een scherpe, platgeslagen entnaald zooveel mogelijk gelijke stukjes afgesneden en in de versche oplossing overgebracht. Natuurlijk zijn die stukjes onmogelijk even groot te nemen, alleen al daarom, omdat de dikte van de laag plaatselijk zeer kan verschillen.

De andere mogelijkheid was: uit een grooten voorraad voedingsoplossing met sporensuspensie te pipetteeren; die sporensuspensie moest dan gelijkelijk over alle oplossingen van een proef verdeeld zijn. Maar deze methode had als eerste bezwaar, dat een sporensuspensie van een vloeistofcultuur onvermijdelijk veel van de oor-

spronkelijke oplossing met zich meebrengt, hetgeen niet bevorderlijk is voor de zuiverheid van de voedingsproeven. Bovendien is door de noodige manipulaties en de noodzaak om de oplossing koud te pipetteeren, de kans op verontreiniging grooter dan wanneer, zooals door mij steeds gedaan werd, de oplossing dadelijk na het steriliseeren, dus flink heet, in de kolfjes werd gepipetteerd.

Uit een vergelijkende proef bleek, dat de regelmaat in opbrengst van een serie niet kleiner is bij deze methode van enten dan bij die van een sporensuspensie. De grootteverschillen tusschen de overgeënte stukjes zouden theoretisch ook alleen in het aller-eerste begin invloed op de gewichtopbrengst kunnen hebben. Zelfs het enten van één serie uit verschillende erlenmeyers van denzelfden ouderdom en oplossing verminderde die regelmaat niet.

Daar men zou kunnen verwachten, dat nu en dan omschudden van de kolfjes de gelijkmatige verdeling van de omstandigheden voor de verschillende deelen van het mycelium zou bevorderen, werd er ook beproefd, of de regelmaat van de opbrengst op die manier grooter zou zijn. Dit was echter niet het geval; bovendien verminderden de opbrengsten door deze bewerking zeer (bijv. 48 m.g. in plaats van 78 m.g.); deze methode werd dus niet toegepast.

Verontreinigingen traden met de beschreven methode hoogst zelden op, en bedroegen in elk geval minder dan 1%.

D. *Bepaling van de opbrengst*

1. *Drooggewichtsbepaling*

Naast den habitus van de cultuur werd als maatstaf voor den groei het drooggewicht genomen. Om dat te bepalen werden de culturen op het gewenschte tijdstip afgefiltreerd op filtreerpapiertjes, die van te voren tot op 5 m.g. nauwkeurig gewogen waren. Een weging tot op het m.g. nauwkeurig had hierbij geen zin, daar de papiertjes, die bij 45° C gedroogd waren, gedurende het wegen al enkele milligrammen in gewicht toenamen, daar zij bij kamertemperatuur blijkbaar weer vocht opnamen. Om de voedingsoplossing te verwijderen uit het filtreerpapier werd er met minstens 50 c.c. leidingwater van kamertemperatuur nagespoeld. Deze maatregel bleek noodzakelijk, daar een niet nagespoeld filter bij een oplossing, die 10% suiker bevatte op 100 m.g. droogge-

wicht gemiddeld 30 m.g. meer woog dan die, waaruit de suiker weggespoeld was. Door met meer dan 50 c.c. na te spoelen veranderde het drooggewicht niet meer; deze hoeveelheid was dus voldoende om de genoemde foutenbron, waarop ook N i e t h a m m e r (1925) wijst, uit te schakelen.

De filtreerpapierijtjes, met de schimmelopbrengst erin gevouwen, werden bij 45° C. gedroogd, totdat het gewicht constant bleef, en dan weer gewogen tot op 5 m.g. nauwkeurig.

2. Bepaling van de gemiddelden, enz.

Waar niet uitdrukkelijk iets anders is vermeld, bedroeg het aantal erlenmeyers, dat per keer en per reeks werd afgefiltreerd, en waarvan de gemiddelde opbrengst werd bepaald, acht of tien; door berekening van de middelbare fout van het gemiddelde werd bepaald, of alle opbrengstgetallen binnen den afstand van driemaal de standaardafwijking van dat gemiddelde lagen (J o h a n n s e n, 1909). Getallen, die daar buiten bleken te liggen, werden uitgeschakeld; dat kwam echter hoogst zelden voor. Of het verschil tusschen de gemiddelden van twee reeksen op een voldoende zekeren grond berustte, werd uitgemaakt, door te bepalen, of de middelbare fout van het verschil tusschen de gemiddelden inderdaad minder dan 1/3 van dat verschil bedroeg. Waar dit niet het geval was, kon aan een „verschil” geen beteekenis toegekend worden.

Voorbeeld: aan een voedingsoplossing werden resp.: geen, 0.5 en 2% pepton toegevoegd, met het resultaat, dat de opbrengsten (in m.g.) bedroegen:

	na 3 weken	na 10 weken
zonder pepton	76	98
met 0.5% pepton	102	110
met 2% pepton	75	96

Uit de berekening van de middelbare fout van deze gemiddelden bleek, dat bij den eersten oogst 75 en 76 niet van elkaar, maar deze beide gemiddelden wel van 102 „werkelijk” verschilden. Bij den tweeden oogst blijken de drie gemiddelden niet „werkelijk” van elkaar te verschillen, en evenmin de opbrengst van de reeks met 0.5% pepton van die na 3 weken. De conclusie uit deze proef

was dus, dat 0.5% pepton de schimmel hetzelfde maximum eerder doet bereiken dan de beide andere oplossingen.

Het kan voorkomen, dat de verschillen van een bepaalde proefreeks met de naar weerszijden opvolgende termen niet grooter dan 3 maal hun middelbare fout zijn, en dus niet zeker, maar dat de uiterste termen, bijv. eerste en derde, wel genoeg van elkaar verschillen. Dan kan berekening van de correlatie (bijv. tusschen het percentage toegevoegde stof en drooggewicht) volgens J o h a n n s e n uitmaken, of ook de middelste term in het verband past van de stijging resp. daling der opbrengsten.

E. Bepaling en regeling van de pH van de oplossing

Bij het affiltreeren werd vaak de pH van het filtraat bepaald. Evenals bij het bepalen van den zuurgraad van een voedingsoplossing vóór het aanzetten van een proef, geschiedde dit colorimetrisch door vergelijking met de kleurenkaart van W. Mansfield Clark. Deze methode bleek zeer goed bruikbaar te zijn; alleen een pH van ± 3 was niet nauwkeurig te bepalen, daar de kaart geen zuivere bepaling tusschen de pH's 2.6 en 3.3, het grensgebied tusschen de indicatoren thymolblauw (zuur) en broomphenolblauw mogelijk maakt. Een enkelen keer was het dus twijfelachtig, of een pH 2.8 of 3.1 bedroeg, maar voor de meeste proeven was dit volmaakt onbelangrijk.

Waar het er op aankwam een „gemiddelde pH” van een serie te bepalen, werd er op gelet, of die van de afzonderlijke culturen niet meer dan 1.0 pH-getal van elkaar aflagen. Volgens J a n c k e (1931) is n.l. slechts dan het nemen van een gemiddelde, door optelling der afzonderlijke waarden en deeling door het aantal, geoorloofd.

Van series, waarbij de zuurgraad ongeveer constant moest worden gehouden, werd bijv. eens per week een aantal erlenmeyers afgefiltreerd en de pH van het filtraat bepaald. Als maatstaf voor het bijstellen van de verdere serie werd de hoeveelheid NaOH- of KOH-oplossing gebruikt, die gemiddeld aan dat filtraat moest worden toegevoegd om de pH weer op het oorspronkelijke niveau terug te brengen. Dat dit slechts een globale regeling is, spreekt vanzelf; daar deze methode echter bruikbare resultaten leverde, en een

meer nauwkeurige methode toch noodzakelijk meer manipulaties met de culturen zou vereischen, werd er de voorkeur aan gegeven, de kans op verontreiniging zoo klein mogelijk te maken, en dus de eenvoudigste methode toe te passen.

F. *Tijd van oogsten*

Oogst men de proefreeksen na zeer korten tijd, dan zijn alle opbrengstgetallen, ook van de gunstigste oplossing, laag en de verschillen met die van minder gunstige oplossingen klein, en dus onduidelijk. Ook zeggen de vroeg afgebroken proeven niets over het tenslotte bereikte maximum. Aan den anderen kant kan op den langen duur door twee series, ook bij een zeer verschillend verloop van den groei, tenslotte dezelfde oogst geleverd worden. Wanneer men dus zeer lang wacht met het oogsten der culturen, bestaat er de kans, dat eventueele verschillen in groeisnelheid, die door het verschil in voedingsoplossing veroorzaakt zijn, maar die zich op den duur nivelleeren, in het geheel niet aan den dag komen.

Uit een serie, waarvan men, 't zij vroeg, 't zij laat, slechts éénmaal de opbrengst bepaalt, wordt men dus niets gewaar over het verloop van de ontwikkeling in een bepaalde oplossing.

Daarvoor moet men minstens twee bepalingen doen, en die bij voorkeur op zeer bepaalde tijdstippen, die men eigenlijk pas kan kiezen, als men van het verloop in een dergelijke voedingsoplossing al eenigszins op de hoogte is door eerdere waarnemingen.

Nadat bijv. voor de culturen op 25 c.c. van een bepaald soort oplossing gevonden was, dat zij na 3 weken al een flinke opbrengst leveren en toch nog in hun vollen groei zijn, en dat na ongeveer 8 weken het maximumgewicht bereikt wordt, werden die twee tijdstippen meestal voor de eersten en tweeden oogst gekozen, als er met soortgelijke oplossingen gewerkt werd.

Deze tijdstippen beteekenen natuurlijk niet voor alle proeven overeenkomstige punten van de groeikromme, daar die in de eerste plaats tengevolge van een andere temperatuur, en in de tweede plaats naar gelang van den leeftijd van de cultuur, waaruit was geënt, anders kan verlopen (zie blz. 5). Echter, al bereikt de schimmel, uit een oudere cultuur overgeënt, misschien iets later haar maximum, de twee waarnemingen, die dan gedurende haar

groei gedaan zijn, behouden toch hun waarde: uit de graphische voorstelling ervan kan men heel wat meer concludeeren, dan uit slechts één van de twee getallenreeksen.

Ook Butkewitsch en Orlov (1922), die onderzoekingen verrichtten over den invloed van stoffen als $ZnSO_4$ op den oeconomischen coëfficiënt bij *Aspergillus niger*, kwamen tot deze conclusie: „Um eine vollständige und richtige Vorstellung vom Einflusse der „Reizstoffe“ auf die Entwicklung des Pilzes zu erhalten, darf man sich nicht auf eine Untersuchung irgendeines Momentes dieser Entwicklung beschränken, sondern ist es notwendig, den ganzen Gang derselben zu verfolgen.“ Het bepalen van een reeks opbrengstgetallen op slechts één oogenblik werd daarom alleen bij uitzondering toegepast.

HOOFDSTUK II

TEMPERATUUR EN ZONLICHT

Voor het nemen van voedingsphysiologische proeven was het noodzakelijk iets te weten over het gedrag van de schimmel bij verschillende temperaturen. Immers, naarmate de temperatuur, waarbij een bepaalde proef genomen wordt, minder gunstig is, zullen, behalve de totale opbrengsten, ook de verschillen tusschen de series onderling minder groot, dus minder duidelijk, zijn dan wanneer men de proef neemt bij een temperatuur, die dicht bij het optimum ligt. Bovendien concludeert Pringsheim (1914), die bij verbetering van de overige omstandigheden (w.o. ook de temperatuur genoemd wordt) de in minimum aanwezige stof beter „ausgenutzt” zag worden, dat de invloed van een in minimum aanwezige stof zich des te minder zal laten gelden, naarmate de overige factoren verder van hun optimum verwijderd zijn.

Ook moeten de proeven bij een ongunstige temperatuur langer voortgezet worden, eer het maximumbedrag aan opbrengst bereikt is, en dus onnoodig veel tijd nemen.

Om de groeisnelheid van *Ceratostomella ulmi* bij verschillende temperaturen te meten, werd de schimmel gekweekt op moutagar, die n.l. een zeer gunstige voedingsbodem is. Soms werd geënt in het midden van een petrischaal, soms in een lange buis. Met tusschenpoozen van 4 dagen werd in het eerste geval de diameter van de kolonie, in het tweede geval de afstand van de uiterste myceliumdraden tot het entstukje gemeten. In beide gevallen moest voorzichtig geënt worden, zoodat er geen sporen buiten het entstukje op de agar kwamen; anders zou het beeld van de groeisnelheid vertroebeld worden door de kolonies, waaraan die sporen het

aanzijn hadden gegeven. Om denzelfden reden moet aanslag van condensatiewater tegen het deksel van de petrischalen of tegen de wanden van de buizen vermeden worden.

Met drie stammen van *Ceratostomella ulmi* van verschillende herkomst werd in de eerste plaats geconstateerd, dat de groeisnelheden onderling zeer verschilden, en in de tweede plaats, dat de drie isolaties zich ten opzichte van de temperaturen 20°, 24° en 34.5° C. parallel gedroegen; een en ander blijkt uit de volgende tabel:

TABEL 1

STAM:	20°	24°	34.5°
„Baarn”	56	63	0
„Rotterdam”	39	48	0
„Duno 5”	74	99	0

De getallen geven den gemiddelden groei van drie schalen in m.M. bij de aangegeven temperatuur in 9 dagen. De bedragen voor stam „Duno 5” moesten omgerekend worden voor 9 dagen, daar na 5 dagen die schalen al bijna volgegroeid waren; de omrekening kon eenvoudig bestaan uit een vermenigvuldiging met 9/5 van het bedrag, dat na 5 dagen bereikt was, daar de groei gedurende de 5 resp. 9 dagen ook bij de andere stammen regelmatig verliep. Deze regelmatigheid verkrijgt men slechts dan, wanneer men de entstukjes eerst minstens 3 dagen laat uitgroeien voor men de eerste meting verricht.

Een andere proef, die over 8 dagen liep, gaf hetzelfde resultaat, zooals tabel 2 aangeeft.

Voor de voedingsphysiologische proeven komen de verschillen in groeisnelheid tusschen de verschillende isolaties en stammen er niet op aan, mits de temperatuurkrommen van die stammen maar ongeveer parallel loopen.

Zoo kan men uit de genoemde proeven al wel voor alle stammen concluderen, dat de maximum-temperatuur voor *Ceratostomella ul-*

mi bij minder dan 34.5° C. ligt, dus tamelijk laag, als men bedenkt, dat de iepenziekte, die door *Ceratostomella ulmi* veroorzaakt wordt, vooral op heete zomerdagen, als de temperatuur in de schaduw al wel tot 30° oploopt, aan den dag treedt. Maar hierbij moet men in aanmerking nemen, dat de temperatuur in de houtvaten van den

TABEL 2

STAM:	20°	24°	34.5°
„Duno 4" v. opl. . . .	50	59	0
„Duno 4" v. agar. . .	35	51	0
„Baarn" v. agar	38	65	0

iep zeker niet zoo hoog zal zijn, en dat bovendien het acute optreden van de iepenziekte op heel warme dagen zijn aanleiding niet vindt in den momenteel sterken groei van den parasiet, maar veeleer in de sterke verdamping, waartegen de watertoevoer door de waarschijnlijk reeds langer door *Ceratostomella ulmi*, thyllen en gomproppen gedeeltelijk verstopte vaten niet opgewassen is.

Het optimum ligt waarschijnlijk in de buurt van 24° . Dat het niet veel hooger zal liggen, wordt waarschijnlijk gemaakt door een proef, waarbij culturen, die eerst 5 dagen resp. bij 24° en 31° waren gegroeid, in een omgeving van 28° werden gebracht. Bij 28° was de groei in de schalen, afkomstig van de

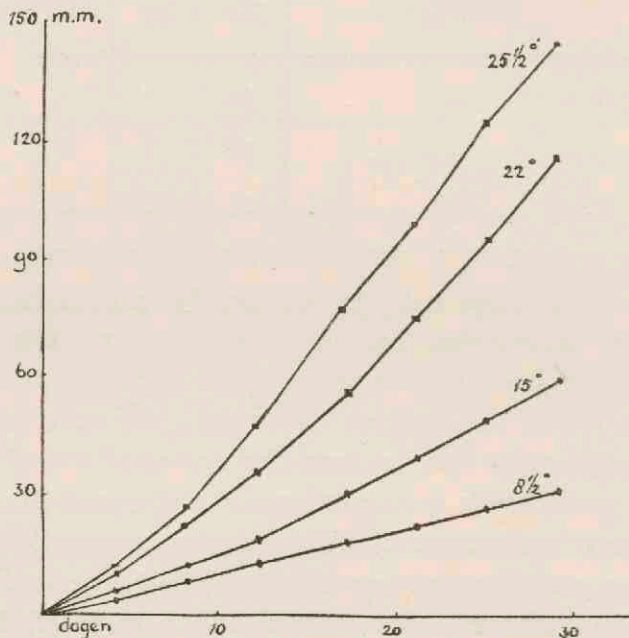
thermostaat van 24° (groei in 5 dagen gem. 23 m.M.)
na 8 dagen 12 m.M.

in die van de „ „ 31° (groei in 5 dagen gem. 5 m.M.)
na 8 dagen 11 m.M.

Hieruit blijkt dus, behalve dat de voorbehandeling met verschillende temperaturen geen invloed heeft op de groeisnelheid bij een bepaalde temperatuur (hier 28° C.), dat bij 28° de groei al aanmerkelijk langzamer is dan bij 24° . Het optimum zal dus in ieder geval niet ver boven 24° liggen. Bovendien blijkt, dat bij 31° de groei al bijna stilstaat; de cultuur ziet er bij die temperatuur dan ook niet welvarend uit: de randen van de kolonie worden bruin

door chlamydo-sporenvorming; dat de cultuur niet afgestorven is, blijkt uit den normalen groei bij 28° , die erna plaats heeft.

Om uit te maken, of het optimum boven of onder 24° lag, en een proef van langeren duur te kunnen nemen, werden 30 c.M. lange buizen met een laag moutagar na enting met *Ceratostomella ulmi* op temperaturen van resp. 8.5° , 15° , 22° en 25.5° C. gehouden gedurende 4 weken, nadat eerst alle entstukjes bij een temperatuur van 20° uitgegroeid waren. Figuur 1 geeft den gemiddelden groei



Figuur 1.

Groei op moutagar bij verschillende temperaturen.

in m.M. aan de oppervlakte van de moutagar in telkens vier buizen gedurende 29 dagen bij de verschillende temperaturen.

De conclusie uit deze getallen is, dat het optimum niet onder 24° ligt, daar bij 25.5° de groeisnelheid nog aanmerkelijk grooter is dan bij 22° . Het optimum ligt dus waarschijnlijk bij ongeveer 25° C; bij dalende temperatuur neemt de groeisnelheid langzaam, bij stijgende snel, af. Dit optimum bij 25° C is niet in overeenstemming met wat Liming (1932) publiceert over Amerikaanse isolaties van *Graphium ulmi*; deze zouden n.l. 22° C als temperatuuroptimum hebben.

Het is dus geraden bij physiologische proeven geen hogere temperatuur dan 24° C te gebruiken. Alle proeven bij 24° in de thermostaat uit te voeren, was wegens plaatsgebrek ondoenlijk. Goed uitvoerbaar bleken zij bij de temperatuur van 20°, die de laboratoriumzaal meestal had. Het is gebleken, dat, indien groei in een ongunstige oplossing of van een slecht op synthetische oplossingen groeienden stam bij 20° uitbleef, dit ook bij 24° het geval was.

Zoodra er groei plaats kon hebben, wat stam en milieu betreft, bleek dezelfde afhankelijkheid van de temperatuur te bestaan in culturen op vloeistof als in die op agar, wanneer men de gewicht-opbrengsten in de eerste groeiperiode als maat voor die afhankelijkheid neemt.

Een voorbeeld geven de volgende opbrengstgetallen; na 10 dagen was de drooggewichtopbrengst van telkens 6 erlenmeyers gemiddeld:

	in synthetische oplossing	in kersextract
bij 13°	0	36
„ 17°	1	40
„ 25°	13	46

Behalve den invloed van de temperatuur op de groeisnelheid, valt er ook een invloed op het uiterlijk van *Ceratostomella ulmi* waar te nemen.

Bij temperaturen van 24° en hooger is de neiging tot vorming van coremia bij alle stammen grooter dan bij 20° en lager. Stammen, die in de oorspronkelijke culturen op moutagar heelemaal geen coremia vormden, gaan er soms na een verblijf van 12 dagen in de thermostaat geregeld vormen, ook in de volgende generaties, die op minder dan 25° gehouden worden. De coremiavorming hangt dus niet alleen af van de omstandigheden, waaronder die bepaalde cultuur, waarin ze optreden, is gegroeid, maar evenzeer van de omstandigheden van een vorige generatie. Het blijven optreden in de latere overentingen zal een dergelijke oorzaak hebben als het bekende verschijnsel, dat schimmels, waarvan men geregeld slechts mycelium overent, het vormen van sporen gaan nalaten.

Het eerste optreden van coremia kan zijn oorzaak hebben in uitdroging zoowel als in de hooge temperatuur.

Voor uitdroging pleit in de eerste plaats, dat op oplossingen en

vloeibare milieu's, zoals mout- of kersextract, nooit coremia zijn opgetreden (hoogstens enkele donkere hyphen, die zich tegen elkaar aanleggen), in de tweede plaats, dat op moutextract, waarmee vergruisde puimsteen doordrenkt was, na 8 dagen een veld van coremia optrad. Echter vormden zich geen coremia, als de puimsteen in plaats van met mout- met kersextract of een overigens gunstige synthetische oplossing overgoten was.

Tegen uitdroging (van den voedingsbodem althans) pleit, dat een cultuur in een petrischaal met moutagar, na 4 uren in een thermostaat van 45° C gestaan te hebben, in de volgende dagen wel eerst een ring van grijs mycelium (een soort tusschenstadium tusschen wit mycelium en zwarte coremia) vormt, daarbuiten echter weer normaal wit mycelium en gistsporen. Laat men de cultuur 23 uren op 45° C, dan sterft de kolonie af.

Bij lagere temperaturen (bijv. 11° C) is de neiging tot gistachtigen groei bij een stam, die oorspronkelijk behalve mycelium ook gistsporen produceerde, duidelijk grooter dan bij 20° en hooger.

Of een „coremiumstam” weer „gist” kan gaan vormen na een verblijf bij 10° C, is niet nagegaan.

Aan den invloed, dien verhooging van temperatuur op *Ceratosomella ulmi* uitoefent, is die van het directe zonlicht verwant: zooals op blz. 15 vermeld werd, vertoont een cultuur, die op 25° C gehouden wordt, meer neiging tot het vormen van coremia dan degene, die men bij 11° C kweekt; en nu is het mij gebleken, dat het directe zonlicht de vorming van coremia in nog sterkere mate bevordert. Wanneer n.l. culturen op kers- of moutagar in petrischalen *zonder* deksel 15, 30 of 45 minuten aan het zonlicht waren blootgesteld, en daarnaast dergelijke schalen *met* deksel, dan vertoonden de culturen van de eerste categorie 4 dagen later al duidelijk meer pigment; en weer 3 dagen later was er een dichte ring van zwarte coremia ontstaan, die ongeveer de middellijn had van de cultuur op den dag der proefneming. Ook binnen dien ring had het mycelium eenig pigment gevormd, zoodat het een grijze tint had, ongeveer zooals bij de culturen was opgemerkt, die eenige uren bij 45° C hadden gestaan. De warmtestralen zullen ook hier hun invloed hebben uitgeoefend, maar daardoor is de invloed van het zonlicht nog niet verklaard, want de invloed van 3 uren op

45° was lang niet zoo ingrijpend als die van 15 minuten zonlicht; daar het verschil tusschen de schalen met deksel en die zonder deksel enorm was, zullen de ultraviolette stralen waarschijnlijk wel een belangrijk aandeel aan de werking van het zonlicht hebben. Het is trouwens algemeen bekend, dat ultraviolette stralen, mits met mate toegediend, de sporenvorming van vele schimmels bevorderen. Zoo vonden Ramsay en Bailey (1930), dat 15 minuten dagelijksche bestraling met ultraviolet licht meer effect had dan 45 minuten. Ook bij mijn proeven werden er na 15 minuten bestraling meer coremiën gevormd dan na 45 minuten.

Het mycelium, dat buiten den ring van coremia gevormd werd, was weer wit; de bestraling van den voedingsbodem, voordat hij begroeid was, had dus geen invloed; hetzelfde werd gevonden met versche voedingsbodems, die in de open schalen bestraald werden, voordat de schimmel erop geënt werd.

De mogelijkheid bestaat, dat het zonlicht ook gunstig werkt op de vorming van perithecia van *Ceratostomella ulmi*. Deze werden tot nog toe n.l. kunstmatig alleen verkregen op gesteriliseerde iepetakken, indien deze overgoten waren met een sporensuspensie van een + en een — stam (Buisman, 1932). In culturen op agar treden zij nooit op.

De enkele proeven, die met het oog hierop werden genomen, waren de volgende: 1°: de sporensuspensie van + en — stam uitgegoten over een petrischaal met kersagar; deze werd daarna 20 minuten open in een zonlicht geplaatst; 2°: + en — stam, die door hun groei tot elkaar genaderd waren op kersagar, werden in een open petrischaal 20 minuten in het zonlicht gezet. In beide gevallen was het resultaat negatief.

Daar uit de proeven van Brinkman (1931) bleek, dat de ultraviolette stralen het ontstaan van perithecia van *Pleospora herbarum* (Pers.) Rbh. bevorderen, maar dat deel van het zonlicht, dat door het glas van de petrischalen heendrong, juist hun vorming belemmerde, kan het negatieve resultaat van bovengenoemde proeven het gevolg zijn van de gelijktijdige werking van die twee tegengestelde invloeden.

Het gedrag van *Ceratostomella ulmi* ten opzichte van temperatuur en zonlicht laat zich als volgt samenvatten:

Verschillende isolaties, hoezeer ook in groeisnelheid verschillend, gedragen zich gelijk ten opzichte van de temperatuur. Hun optimumtemperatuur ligt bij 25° C, het maximum voor den groei bij $\pm 34^{\circ}$ C. Het minimum werd niet bepaald; bij 8.5° had nog vrij goede groei plaats.

De temperatuur heeft ook invloed op de morphologie van de schimmel: bij 24° en hooger valt in het algemeen een voorkeur voor de vorming van coremia, bij 20° en lager een voorkeur voor gist-sporenproductie waar te nemen.

Bestraling gedurende 15 minuten met direct zonlicht van een cultuur op mout- of kersagar geeft aanleiding tot het ontstaan van een ring van coremia. Perithecia konden op deze wijze bij combinatie van een + en een — stam niet worden verkregen.

HOOFDSTUK III

ZUURGRAAD

A. Literatuur

1. Over *Ceratostomella ulmi*

Over de eischen, die *Ceratostomella ulmi* aan den zuurgraad van het milieu stelt, is in de literatuur het volgende te vinden:

Sibilia (1930) liet *Graphium ulmi* in gedestilleerd water groeien, resp. in gedestilleerd water, waaraan 5% glucose en 1% asparagine was toegevoegd. In beide series constateerde hij, dat *Graphium* de oplossing alkalischer maakte: na 4 weken was in de eerste serie de pH 8.1, 8.2, > 8.1, 8.1 (contrôle 8.1), in de tweede serie 6.8, 6.9, 7.0, 7.0 (contrôle 5.2). De conclusie, dat *Graphium* de eerste serie alkalischer maakte, is onbegrijpelijk; nog onbegrijpelijker is trouwens, hoe in gedestilleerd water groei mogelijk was.¹⁾

Liming (1932) vermeldt, dat het pH-optimum voor *Graphium ulmi* tusschen 5 en 6 ligt, zonder nadere gegevens.

Volgens Boudru (1933) ligt het pH-optimum van *Ceratostomella ulmi* tusschen 3.2 en 4.4, terwijl de invloed van de pH tusschen 4.4 en 7.4 ongeveer niet verandert. Wat betreft het pH-

¹⁾ Sibilia's proef met 5% glucose en 1% asparagine werd door mij herhaald. De begin-pH was hier 4.7; er had haast geen groei plaats; na 3 en na 6 weken was de gemiddelde pH van 10 erlenmeyers resp. 4.7 en 4.8, dus bijna onveranderd; dit is begrijpelijk, daar de groei miniem was. Een betere groei in een zoo onvolledige voedingsoplossing is dan ook alleen door onzuiverheden te verklaren.

verloop gedurende zijn proeven, dit kan beter bij het eigen onderzoek van dit hoofdstuk besproken worden.

Boudru's opbrengstgetallen, die na 6 weken hoogstens 61 m.g. bedragen, zijn niet overtuigend voor eenige conclusie omtrent het pH-optimum van *Ceratostomella ulmi*. Dat dit tusschen 3.2 en 4.4 zou liggen, besluit Boudru zeker uit het feit, dat in de reeksen met asparagine als N-bron na 6 weken de maximale opbrengst (die echter niet meer dan 35 m.g. bedraagt) bereikt wordt bij pH 4.4, en uit het feit, dat in de series met pepton als N-bron na 6 weken diegene met pH 3.2 de maximum-opbrengst levert, n.l. 61 m.g. De pH-kromme verloopt in deze reeksen echter zoo vreemd, dat men geneigd is te denken aan een storenden invloed van het aan de helft der series toegevoegde wijnsteenzuur (ter verkrijging van den gewenschten zuurgraad), dat in die series misschien als C-bron naast glucose en saccharose fungeerde. Bovendien zegt deze opbrengstbepaling van culturen, die zes weken lang op een oplossing met een bepaalde begin-pH gegroeid hadden, daarom al weinig omtrent het pH-optimum van de schimmel, omdat Boudru de pH's ondertusschen niet meer bijstelde. Volgens zijn graphische voorstellingen verlopen zij dan ook gedurende de proeven sterk naar den zuren kant, wat zeer begrijpelijk is in een oplossing, die niet gebufferd is.

De series met asparagine als N-bron leveren na 6 weken tusschen de pH's 3.6 — 4.4 — 6.3 — 7.4 geen „werkelijke" verschillen op bij berekening van de middelbare fouten der gemiddelden, die Boudru zelf n.l. bij de vorige series uitgebreid opgeeft.

De slotsom is dus, dat ook Boudru's proeven geen uitsluitsel geven omtrent de minimum-, optimum-, of maximum-pH van *Ceratostomella ulmi*.

2. Over andere schimmels

In de literatuur over schimmeligroei in verband met den zuurgraad van hun milieu is gebleken, dat verschillende invloeden van chemische verbindingen op schimmels op een indirecten invloed, via de pH, berusten.

Zoo bestaan er b.v. over den invloed van Zn (Bortels (1929) contra Steinberg (1919, 1932)) op *Aspergillus niger* van Tieghem tegenstrijdige meeningen. Uit de betreffende publicaties

blijkt, dat er, behalve aan een directe werking van het metaal en van de pH, zoowel aan de mogelijkheid van indirecte werking van het metaal via de pH (Steinberg) als aan een indirecte werking van de pH via het metaal (Bortels) gedacht moet worden. Tegenwoordig zal dus een onderzoeker de veranderingen in het gedrag van een schimmel ten gevolge van de toevoeging van een chemische verbinding niet meer eenvoudig door de werking van de toegevoegde elementen, of ionen, mogen verklaren. Eerst zal hij zich op de hoogte moeten stellen van de eischen en gevoeligheden van het proefobject ten aanzien van den zuurgraad van zijn milieu.

De eventueele invloed van aan de oplossing toegevoegde ionen kan dus altijd het gevolg van een specifieke werking, bijv. van metaalionen, zijn; maar wel zal men daarbij steeds ook de mogelijkheid van een niet-specifieke werking via den zuurgraad in het oog moeten houden.

Dit was de reden, waarom ook in mijn onderzoek proeven over den zuurgraad voorafgingen aan die over den invloed van verschillende metalen.

B. *Eigen onderzoek*

Waar het doel van mijn onderzoek over *Ceratostomella ulmi* o.a. was, den invloed van verschillende metaalionen op den groei van de schimmel na te gaan, moesten er aan een zoo gunstig mogelijke synthetische voedingsoplossing zouten van die metalen toegevoegd worden. Die zouden allicht ook den zuurgraad van het milieu veranderen. Allereerst moest dus de invloed van de pH zelf nagegaan worden in een milieu met overigens zoo gering mogelijke verschillen in gehalte aan metaalionen.

Reeds door de eerste proeven, waarbij gezocht werd naar een bruikbare synthetische oplossing voor *Ceratostomella ulmi*, was een mogelijke gevoeligheid voor den zuurgraad aan den dag gekomen: eenzelfde isolatie kon op drie variaties van de oplossing van Raulin met een pH tusschen 7.8 en 8.4 absoluut niet groeien — op een andere oplossing, die pH 6.3 had, echter wel.

Het lag dus voor de hand, zoodra er een gunstige oplossing gevonden was, den invloed van de pH op de bruikbaarheid daarvan na te gaan.

Bij het bepalen van de *optimum-pH* deed zich de moeilijkheid voor, dat de pH, zoodra de schimmel groeide, sterk terugliep. Gedurende de toename in gewicht van het mycelium verloopt de pH n.l. naar den zuren kant; en met de geringe hoeveelheid fosphaat, die in de eerste series gebruikt werd, verliep de pH zeer snel: in 6 series met verschillende pH's tusschen 3.9 en 6.2 was na 4 dagen de pH ± 4 geworden. Wel waren toch eenige conclusies te trekken omtrent min of meer gunstigen zuurgraad, doordat de series met de hoogste pH in die dagen duidelijk het best groeiden. Maar, aangezien de oplossingen, die 1% KH_2PO_4 bevatten, niet gebufferd waren, was zelfs ten naasten bij constant houden van den zuurgraad blijkbaar onmogelijk.

Voor een optimumbepaling, resp. bepaling van minimum en maximum was dus in de eerste plaats buffering noodig. In de tweede plaats bleek een hooge fosphaatconcentratie gunstig voor de buffering te zijn. Zonder buffering geeft n.l. 0.3% KH_2PO_4 in een oplossing, die oorspronkelijk pH 6.1 had, een langzamere verandering van den zuurgraad dan 0.1% KH_2PO_4 in een oplossing, die oorspronkelijk pH 6.4 had en overigens dezelfde samenstelling: na 3 weken was de pH van de eerste serie gemiddeld tot 3.0, die van de laatste tot 2.5 gezakt.

Buffering door gelijke hoeveelheden KH_2PO_4 en K_2HPO_4 geeft bij toenemende fosphaatconcentratie het volgende resultaat te zien. Na 50 dagen is de pH, die oorspronkelijk 6.6 of 6.7 was, gemiddeld geworden:

in oplossing met totaal	0.2%	fosphaat	3.2,
" " " "	0.5%	"	3.8,
" " " "	1.0%	"	4.2.

Deze verschillen zijn inderdaad het gevolg van het buffervermogen van de oplossingen en niet aan verschil in voedselverbruik te wijten, daar de drooggewichten overeenkwamen (zie tabel 10). Nog sterkere buffering, bijv. met 2% fosphaat, was niet bruikbaar, daar *Ceratostomella ulmi* in die concentraties niet groeien kan.

De eerste proef, waarmee ik het pH-optimum trachtte te bepalen, liep over 15 dagen, zonder dat intusschen de pH nog eens gecontroleerd werd. Behalve de in tabel 3 genoemde N-bron bevatten de oplossingen: 0.5% fosphaat, n.l. KH_2PO_4 en K_2HPO_4 in ver-

schillende verhoudingen; 0.012% $MgCO_3$; 0.012% $CaCO_3$; 0.002% $ZnSO_4$; 5% saccharose.

De conclusie uit de drooggewichten van de tabel, dat pH 6.3 het optimum is, is niet geheel betrouwbaar, daar zelfs die „optimale” opbrengsten gering zijn.

TABEL 3

PH.:	3.9	5.9	6.3	6.6	6.8	7.2
0.3 % NH_4NO_3	0	32	35	17	12	0
0.3 % $(NH_4)_2SO_4$	0	23	45	18	0	0
0.3 % KNO_3	0	7	8	7	0	0

Bij deze proef bracht het *pH-verloop* geen bezwaren met zich mee, omdat het juist door den slechten groei zeer gering was. Zonder een behoorlijk groote opbrengst in de optimale serie kunnen echter geen duidelijke verschillen met de minder gunstige geconstateerd worden. Een bruikbaar opbrengstgetal kan ook in het gunstigste geval eerst na ± 3 weken verwacht worden en dan zal de pH al ver van zijn oorspronkelijke waarde verwijderd zijn. Zal echter een proef uitsluitsel geven over den invloed, dien een bepaalde zuurgraad op een schimmel heeft, dan moet die zuurgraad gedurende de proef zooveel mogelijk constant gehouden worden.

Daarom werden series aangezet, waarvan wekelijks de pH bijgeregeld werd; bovendien werden elke week eenige drooggewichten bepaald; de filtraten van die opbrengsten werden gebruikt als maatstaf voor het bijstellen (met KOH) van de pH der overige culturen van dezelfde serie. Deze maatstaf was vaak zeer betrouwbaar, als n.l. de pH's van de 5 afgefilterde oplossingen van één serie onderling slechts 0.1 of 0.2 verschilden, maar een anderen keer konden de pH's van één serie 0.8 of 1.4 uiteenloopen. Het spreekt vanzelf, dat in zulke gevallen het bijstellen niet anders dan globaal was, zoodat er na meermalen bijregelen groote afwijkingen konden optreden. Hierdoor zijn eenige onregelmatigheden in de uitkomsten

van de volgende proeven te verklaren. Lang voortzetten van zulke proeven heeft dus geen zin.

1ste Proef

Begin-pH's: 6.3 — 6.7 — 7.1 — 7.7 — 8.3; deze werden verkregen door een wisselende verhouding tusschen KH_2PO_4 en

TABEL 4

Begin-pH	na 1 week		na 2 weken		na 3 weken		na 4 weken	
	opbrengst	pH	opbrengst	pH	opbrengst	pH	opbrengst	pH
6.3	18	5.8	59	3.4	62	4.5	106	5.4
niet geregeld			54	3.4	80	2.5	—	—
6.7	18	6.5	55	4.1	70	5.2	96	6.3
niet geregeld			38	3.8	73	2.5	—	—
7.1	13	6.7	67	4.6	57	6.2	90	6.4
niet geregeld			45	4.0	116	2.9	—	—
7.7	12	7.0	29	6.4	35	6.7	50	6.9
niet geregeld			34	5.4	64	3.4	—	—
8.3	14	7.3	31	7.0	23	7.3	25	7.9
niet geregeld			33	6.3	74	3.9	—	—

Eerste proef: 0.2 % fosphaat; verdere oplossing: 0.1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.02 % MgCO_3 ; 0.02 % CaCO_3 ; 0.002 % ZnSO_4 ; 5 % saccharose.

K_2HPO_4 bij een totale hoeveelheid van 0.2% fosphaat. Elke week werden van elke serie, die oorspronkelijk uit 20 culturen bestond, 5 erlenmeyers afgefiltreerd en het drooggewicht van de opbrengst bepaald. Tevens werd naar gelang van de pH der filtraten die van de rest weer op de uitgangspH bijgesteld.

Parallel liepen series met dezelfde begin-pH's, waarvan ook na resp. 1, 2 en 3 weken de drooggewichten bepaald werden, maar die *niet* wekelijks weer op de oorspronkelijke pH werden bijgesteld. Hierbij kon dus bovendien het verloop van de pH worden nagegaan in oplossingen van verschillende uitgangs-pH, als die culturen aan zich zelf werden overgelaten.

De resultaten van deze serie zijn samengevat in tabel 4.

Daaruit ziet men, dat in de series 6.3 — 6.7 — 7.1 de pH — indien niet ondertusschen bijgesteld — in drie weken terugloopt tot 2.6. Bovendien is uit de tabel te zien, dat in de derde week de groei van de niet bijgeregelde series (vooral van de laatste 3) veel grooter is dan van de bijgeregelde. Aan het einde van de tweede week was de pH van de niet geregelde oplossingen teruggelopen (van oorspr. 6.3) tot 3.5

(6.7) „ 3.6

(7.1) „ 4.0

(7.7) „ 5.4

(8.3) „ 6.3

De conclusie, dat pH 4 gunstiger zou zijn dan 7.1, klopt niet met de overige pH-resultaten. Men zou hier kunnen denken, dat er andere pH-optima gelden voor het eerste uitgroeien van een entstukje in een verse oplossing dan voor het doorgroeien in de derde week van cultuur; bovendien is dan de samenstelling van de oplossing veranderd door de stofwisseling van de schimmel.

Het optimum voor den groei van *Ceratostomella ulmi* ligt volgens deze proef waarschijnlijk tusschen pH 6 en 7.

2e Proef

Daar in de vorige proef de pH's van de filtraten onderling soms meer dan 1.0 verschilden, konden er na eenige keeren bijstellen fouten insluipen. In deze proef werd nu 0.5% fosphaat in plaats van 0.2% gebruikt, zoodat de pH minder snel verliep en de foutenkans dus kleiner werd. Het volgende lijstje geeft een idee van het verschil in buffering in de oplossingen van deze proef en die van de eerste. Het resultaat van 3 weken groei op niet bijgestelde oplossingen is duidelijk verschillend.

6.3 verliep tot 2.5 in de 1ste proef, tot 3.1 in de 2de proef.

6.7	2.5
6.9				3.8	..
7.1	2.9
7.5				5.2	..
7.7	3.4
8.3	3.9
8.4				6.8	..

De resultaten van de tweede proef zijn vastgelegd in tabel 5, de drooggewichten bovendien in figuur 2; deze proef bevestigt dus

TABEL 5

Begin-pH	na 1 week		na 2 weken		na 3 weken		na 4 weken	
	opbrengst	pH	opbrengst	pH	opbrengst	pH	opbrengst	pH
6.0 niet geregeld	20	4.2	63	3.4	68	5.1	64	5.5
			67	3.3	76	2.6	—	—
6.3 niet geregeld	24	5.1	75	3.8	107	5.3	133	4.6
			67	3.4	95	3.1	—	—
6.9 niet geregeld	11	6.6	82	4.6	129	4.4	107	6.3
			93	4.2	109	3.8	—	—
7.5 niet geregeld	4	7.0	21	6.9	19	7.1	25	7.3
			19	6.5	33	5.2	—	—
8.4 niet geregeld	0	8.0	0	8.1	1	8.2	14	7.5
			5	7.3	16	6.8	—	—

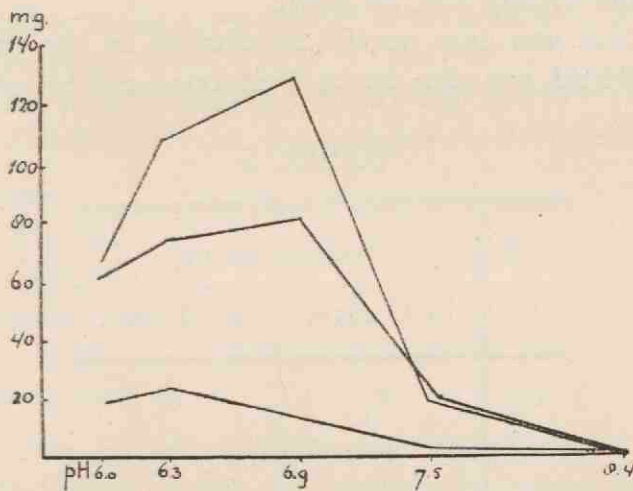
Tweede proef; 0.5 % fosphaat, verdere oplossing als in de eerste proef.

de resultaten van de eerste, en bovendien blijkt er uit, dat het pH-optimum inderdaad niet lager dan 6.3 ligt.

Het ziet er hier uit, alsof bij de niet geregelde series het maxi-

male drooggewicht sneller bereikt wordt, maar er tenslotte een groeiremming optreedt tengevolge van den hoogen zuurgraad.

Wat het bedrag van de maximale opbrengst betreft: dat schijnt niet te verschillen bij de geregelde en de niet geregelde series, voor zoover hun uitgangs-pH niet beneden 6.3 ligt. De series met lagere pH verzuren te snel, dan dat dezelfde maximumopbrengst nog bereikt kan worden; die met pH tusschen 6.3 en ± 8.3 bereiken waarschijnlijk tenslotte hetzelfde bedrag aan drooggewicht, al zal dit na zéér verschillenden tijd gebeuren. — Daar bij pH 8.3 en



Figuur 2.

Drooggewichten na resp. 1, 2 en 4 weken
bij verschillende pH's.

8.4 *Ceratostomella ulmi* al zeer moeilijk op gang komt, zijn geen hogere pH's beproefd.

Sterker bufferen dan in deze proef was niet aan te bevelen, daar *Ceratostomella ulmi* in oplossingen met de hooge fosphaatconcentratie, die daarvoor noodig zou zijn, zeer onregelmatig groeit, zooals bij pH's van 5.3 tot 8.2 was geconstateerd.

3e Proef

Door de beide vorige proeven werden de grenzen van groei-mogelijkheid, wat het pH-maximum betreft, vrij duidelijk vastgelegd. Tenslotte werden er dus series aangezet, die de grens naar beneden moesten bepalen. Deze grens is gemakkelijker te trekken dan die naar den alkalischen kant. Bij een pH als 8.3 bijv. ver-

betert het milieu gaandeweg, als de schimmel maar even aan het groeien kan komen; is dit echter in het andere grensgebied, bij een ongunstige pH van < 5 het geval, dan wordt het milieu steeds zuurder, dus nog ongunstiger, en wordt de groei daardoor al gauw gestuit. Aan dezen kant zal dus niet na eenige weken een inhalen van de goede culturen door de oorspronkelijk in ongunstige condities verkeerende plaats vinden, zooals dit het geval is bij de hooge pH's. — Het resultaat zal zich dus na betrekkelijk korten proefduur al duidelijk afteekenen, en niet meer schijnbaar veranderen na voortzetting van de proef.

Het resultaat van deze proef (zie tabel 6) is, dat de grens van groeimogelijkheid aan den zuren kant ongeveer bij pH 5 ligt.

TABEL 6

pH.	opbrengst in m. g.	
	na 15 dagen	na 43 dagen
6.8	85	103
6.4	67	98
6.0	67	61
5.1	5	18
4.6	0	0
3.4	0	0

De conclusies uit de drie behandelde proeven zijn dus:

- minimum-pH ± 5 ,
- optimum tusschen 6 en 7,
- maximum bij ± 8 .

De pH-grenzen van *Ceratostomella ulmi* (5—8) zijn dus niet wijd, als we ze vergelijken met die van enkele andere schimmels, waarvan de gegevens bekend zijn:

Aspergillus niger van Tieghem (Nielsen en Hartelius, 1933) 1.3— > 8.5 .

Helminthosporium gibberosporum Curzi 3—8.6.

(Rabinovitz-Sereni, 1931)

Armillaria mellea (Vahl) Quel. 2.9—7.3 (Reitsma, 1932).

Nigrospora oryzae (B. et Br.) Petch 3.5—8.4.

(Savalescu en Rayss, 1932).

Waarschijnlijk kunnen de grenzen echter varieeren naar gelang van de samenstelling van de oplossing. Een aanwijzing in die richting werd bij de eerste proef al vermeld; er bleek n.l., dat in een oplossing, waarop de schimmel drie weken lang gekweekt was, en waarin de pH inmiddels ongeveer 4 was geworden, de groei nog duidelijk voortging.

Toen ik dus in de publicatie van Boudru (1933) zag, dat er op een voedingsbodem van de volgende samenstelling:

1% pepton

0.24% $MgSO_4$

0.266% KH_2PO_4

spoor $FeCl_3$

2.25% glucose

3.4% saccharose

een pH-optimum bij 3.2 gevonden was voor *Ceratostomella ulmi*, zocht ik de verklaring van het afwijkende gedrag in de andere samenstelling van het milieu, temeer daar mij al gebleken was, dat het verloop van de pH in een oplossing, die pepton bevat, afwijkt van het verloop in een milieu, dat als N-bron alleen $(NH_4)_2SO_4$ bevat. (Zie blz. 35).

Weliswaar konden mijns inziens Boudru's pH-reeksen onderling niet zuiver vergeleken worden, daar hij aan de bovengenoemde oplossing, hetzij 0.1 N NaOH, hetzij 0.1 N wijnsteenzuur toevoegde om de gewenschte begin-pH te krijgen. Nu zou het niet te verwonderen zijn, indien het wijnsteenzuur als C-bron fungeerde, zoodat de invloed ervan zich niet beperkte tot den zuurgraad. Bovendien vond ik de lage opbrengstgetallen niet overtuigend; het optimale bedrag was n.l. 61 m.g.; Boudru vermeldt dan ook, dat het hem niet gelukt is op eenige voedingsoplossing laagvorming door *Ceratostomella ulmi* te verkrijgen. Daar de schimmel bij mijn proeven wel een laag aan de oppervlakte van de vloeistof vormde, en de optimale opbrengsten na 6 weken dan ook veel hooger dan 61 m.g.

waren, meende ik een duidelijker resultaat te mogen verwachten van een pH-reeks met de oplossing van Boudru. In dit geval werd ook door mij van 0.1 N NaOH en 0.1 N wijnsteenzuur gebruik gemaakt om de gewenschte pH's te verkrijgen. Toch trad er niet die grillig verloopende pH-kromme op, die ik bij Boudru's resultaten aan het wijnsteenzuur had toegeschreven.

Zie tabel 7.

TABEL 7

Begin pH	na 3 weken		na 6 weken		na 9 weken	
	opbrengst	pH	opbrengst	pH	opbrengst	pH
3.9	23	3.6	85	3.7	115	3.7
4.8	72	4.2	114	4.1	134	4.1
7.0	165	4.8	213	6.3	143	8.3

De pH werd hier gedurende de proef niet meer op de oorspronkelijke bijgesteld, daar ook Boudru dat niet gedaan had.

Toch komt hier een duidelijke pH-kromme voor den dag, die evenwijdig loopt aan die van figuur 2. Dat wil dus zeggen, dat er geen sprake van is, dat de pH tusschen 4.4 en 7.4 ongeveer even gunstig blijft, zooals Boudru meent; een aanwijzing voor een optimum bij 3.2 is er evenmin. Wel ligt de pH-grens naar beneden toe duidelijk lager dan bij de andere oplossing, aangezien hier bij 3.9 (in de tweede periode van drie weken zelfs bij 3.6) de groei nog tamelijk goed is, en ginds pH 5 al de grens vormde.

Het „Centraalbureau voor Schimmelcultures" stelde mij een cultuur van *Ceratostomella ulmi* ter beschikking, afkomstig van den Heer M. Boudru, waar deze zijn proeven mee genomen had. Daardoor was ik in de gelegenheid de voorgaande resultaten te vergelijken met die, welke de isolatie van Boudru opleverde (cf. tabel 8).

Het blijkt, dat het gedrag van de beide isolaties in hoofdzaak overeenkomt: ook bij deze proef steekt een pH van ± 7 zeer gunstig af bij die van 3.7 en 4.7. Ook het pH-verloop komt overeen:

de begin-pH's 3.7 en 4.7 veranderen slechts weinig, terwijl 7.2 naar den zuren kant verloopt; de proef met de isolatie van Boudru werd niet lang genoeg voortgezet om de stijging, die in de eerste proef op de daling volgde, nog te kunnen constateeren.

De optimale opbrengst, die hier verkregen werd na 4 weken, n.l. 264 m.g., geeft wel het recht tot conclusies, die in tegenspraak zijn met Boudru's proef, waarbij de optimale opbrengst na 4 weken slechts 33 m.g. bedroeg.

TABEL 8

Begin pH	na 2 weken		na 4 weken	
	opbrengst	pH	opbrengst	pH
3.7	39	3.6	58	3.6
4.7	32	4.3	65	4.3
7.2	119	6.6	264	4.6

Dit groote verschil in opbrengst van dezelfde isolatie in dezelfde oplossing tusschen mijn proeven en die van Boudru is te verklaren, doordat Boudru waarschijnlijk niet eerst een strenge selectie heeft gemaakt tusschen de verschillende culturen, die uit agar waren overgeënt en als materiaal voor de proef werden gebruikt (zie ook blz. 4).

Inderdaad blijken de pH-grenzen dus naar gelang van het milieu wijd of nauw te zijn. Dit was ook, hoewel in geringere mate, het geval bij *Aspergillus niger*, wanneer Nielsen en Hartelius (1933) aan de voedingsoplossing „groeistof B” toevoegden. De veronderstelling, geuit bij de eerste proef, dat een nieuw entstukje andere eischen aan den zuurgraad zou stellen dan een reeds groeiende cultuur, is dus onnoodig. Dat bleek ook uit twee proeven met gesteriliseerd filtraat van een 2 maanden, resp. 5 weken, oude cultuur (pH resp. 4 en 3.5): nieuwe entstukjes groeiden daarin wel degelijk uit, en gaven nog een maximale opbrengst van 25 m.g., terwijl in de laatste serie de pH nog terugliep tot 2.6. Deze cul-

turen vormden opvallend weinig gistsporen; dit is wel in scherpen tegenspraak met Boudru's meening, dat de pH's beneden 5 het domein van gistsporen vormende culturen zouden zijn.

Hier volgen nog eenige waarnemingen omtrent *het verloop van de pH*, als de cultuur aan zichzelf wordt overgelaten.

In de eerste proef werd na 3 weken pH 2.6 geconstateerd. Dit is het gewone laagtepunt. Een enkelen keer daalde de pH tot 2.4, maar lager nooit.

Neemt men de pH na langeren proefduur nog eenige malen op, dan blijkt weer een langzame stijging op te treden, die echter bij pH 4.9 halt maakt. Die stijging begint in 10 c.c. oplossing uiteraard vlugger dan in bijv. 25 c.c. n.l. na ± 6 weken; in 25 c.c. na ± 15 weken, dus in ongeveer omgekeerde evenredigheid met de hoeveelheid voedingsvloeistof.

In tabel 9 zijn de pH's met de corresponderende opbrengsten na een bepaald aantal weken weergegeven.

TABEL 9

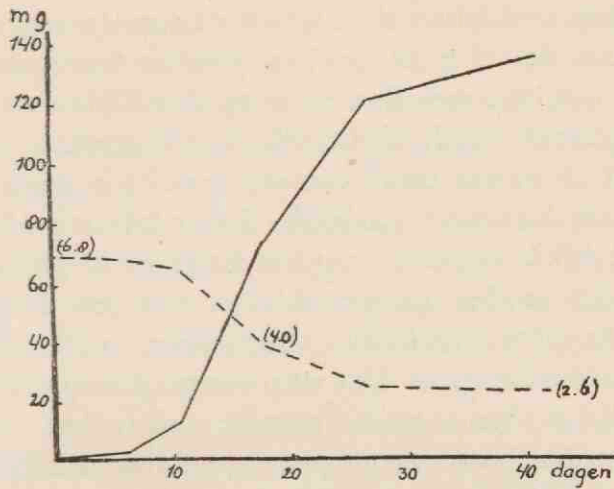
Aantal weken	2	4	6	8	10	11	15	17	18	20	21
m. g. opbrengst	23	64	68	73	63	60	57	60	57	51	49
pH.	—	—	—	3.5	3.9	4.7	4.9	4.6	4.7	4.5	4.2

De begin-pH was 6.8.

Op het verloop van de pH doet, zooals reeds eerder (blz. 26) ter sprake is gekomen, het fosphaat-gehalte zijn bufferenden invloed gelden.

Daar, waar de opbrengsten gelijk zijn, dus bijv. na 50 dagen bij 0.2, 0.5 en 1.0% fosphaat, is het pH-verschil inderdaad aan *buffering* van de oplossingen toe te schrijven.

Het pH-verloop in verband met den groei van de schimmel is duidelijk te zien aan figuur 3, waarop de punten, die de getallen van de drooggewichten, en die, welke de pH-getallen na verschillende tijden voorstellen, zijn samengebracht. Hier-



Figuur 3.

Toename in drooggewicht gedurende 6 weken (———),
en gelijktijdig pH-verloop (-----).

in ziet men de ontwikkeling gedurende 6 weken in 30 c.c. voedingsoplossing (samenstelling: 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.25% KH_2PO_4 ;

TABEL 10

Begin-pH	% fosphaat	na 7 dagen		na 19 dagen		na 50 dagen	
		opbrengst	pH	opbrengst	pH	opbrengst	pH
6.7	0.2	14	6.3	80	3.1	127	3.2
6.7	0.5	30	6.4	121	3.8	120	3.8
6.6	1.0	13	6.6	93	5.6	124	4.2
6.6	2.0	2	6.6	13	6.6	10	6.4

0.25% K_2HPO_4 ; 0.02% MgCO_3 ; 0.02% CaCO_3 ; 0.002% ZnSO_4 ;
5% saccharose; begin-pH: 6.8).

Op de graphische voorstelling is duidelijk te zien, dat het pH-

verloop gelijken tred houdt met den groei van de schimmel: in die periode, waarin de schimmel snel in gewicht toeneemt, daalt ook de pH snel (hier tusschen den 6den en den 27sten dag). Zoodra de groei langzamer wordt, daalt ook de pH minder.

Evenals bij de eerste proef van dit hoofdstuk werd waargenomen, is het ook hier weer duidelijk, dat er bijv. na 18 dagen, als de pH al tot 4.0 is gedaald, nog krachtige groei plaats vindt.

Evenmin als van den zuurgraad, is er een terugloopen van de opbrengsten in deze graphische voorstelling te zien, daar deze slechts zes weken bestrijkt. Dat ook daarna zuurgraad en drooggewicht hand in hand gaan, spreekt echter uit tabel 9; de pH loopt dan blijkbaar weer op door autolyse van het mycelium, tot er waarschijnlijk een evenwichtstoestand bereikt wordt: het organisme sluit zich eenigszins af van de omringende vloeistof door het vormen van chlamydo-sporen.

Boudru (1933) meent voor *Ceratostomella ulmi* twee isometabolische punten gevonden te hebben. Volgens Sideris (1925) is het isometabolische punt van een bepaalde oplossing (voor een bepaalde schimmel) die zuurgraad, die gedurende den groei van het organisme niet verandert, en waartoe oplossingen, die aanvankelijk een andere pH hadden, door dien groei naderen. Nu noemt Boudru de pH's 3.7 en 2.9 de isometabolische punten voor resp. de mycelium- en de gistvorm van *Ceratostomella ulmi*, en wel op grond van een proef met 0.1% asparagine (waarin de maximale opbrengst slechts 35 m.g. bedraagt) en een proef met 1% pepton als N-bron. Hier moet ik, evenals bij de bespreking van het pH-optimum, wijzen op de geringe en grillige opbrengsten, die Boudru krijgt; en ik stel er mijn eigen resultaten met dezelfde oplossingen tegenover. Voor die met pepton verwijs ik naar blz. 30; met de oplossing, die in plaats van pepton 0.1% asparagine bevatte, kreeg ik het volgende resultaat bij een begin-pH 6.6:

	na 3 weken	na 6 weken	na 9 weken
pH	4.2	3.7	3.7
m.g. opbrengst	100	123	155

Dit resultaat zou dus in het kader van Boudru kunnen passen, maar het werd niet gecontroleerd door andere begin-pH's.

Wat de pepton-series betreft: noch de reeks met begin-pH 4.8, noch die met begin-pH 3.9 verloopt verder dan tot 3.6. Volgens Boudru zou dit niet mogen, daar immers culturen met begin-pH < 5 bij het isometabolische punt 2.9 behooren. Begin-pH 7.0 nadert zelfs na weken nog niet tot een van Boudru's isometabolische punten, hoewel de groei in die reeks bepaald zeer goed is.

Daar pepton echter (ook volgens Sideris) een aparte plaats inneemt bij de pH-verschuivingen in het milieu, kan men andere, mogelijk duidelijker resultaten verwachten van een onderzoek naar een isometabolisch punt van een meer „gewone” oplossing. De aanwijzingen, die ik hiervoor kon vinden in de beschreven proeven, zijn de volgende: de oplossingen, die in de meeste pH-series gebruikt zijn, met een oorspronkelijk pH tusschen 5.1 en 8.4, werden door den groei van *Ceratostomella ulmi* steeds zuurder. Het isometabolische punt zou men dus bij een pH lager dan 5 moeten zoeken; ongelukkigerwijze groeide *Ceratostomella ulmi* bij pH's < 5 heelemaal niet (zie tabel 6), zoodat er ook geen isometabolisch punt voor den dag kon komen. Sideris stelt immers als voorwaarde voor een isometabolisch punt o.a., dat de zuurgraad in een oplossing, waarin de begin-pH op het isometabolische punt ligt, gedurende den groei van de schimmel niet verandert. Tot een isometabolisch punt van een oplossing had Boudru dus niet mogen besluiten, voor hij die bepaalde begin-pH constant had zien blijven.

De resultaten van de proeven met betrekking tot den zuurgraad zijn dus de volgende:

In de standaardoplossing vereischte *Ceratostomella ulmi* voor haar groei een pH tusschen 5 en 8; daarbij lag het optimum tusschen 6 en 7.

In een serie, waarbij als N-bron pepton diende in plaats van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, liep de pH-kromme voor het gedeelte, dat onderzocht werd (3.9—7.0), parallel met de voorgaande. Wel is er in deze oplossing nog groeimogelijkheid bij 3.9, wat in de andere uitgesloten was.

Naar gelang van de samenstelling van de voedingsoplossing kunnen dus de pH-grenzen wijd en nauw zijn. Dit verklaart ook het feit, dat culturen met een begin-pH tusschen 6 en 7 na bijv. drie

weken nog krachtig groeien, hoewel inmiddels de pH tot beneden 4 gedaald is; hier verruimen de stofwisselingsproducten van het organisme zelf de pH-grenzen.

In de meeste series, n.l. die, waarbij als C-bron saccharose en als N-bron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegediend was, verliep de pH, hoe hoog die aanvankelijk ook was, tot 2.6. Drooggewicht en pH staan in duidelijke relatie tot elkaar: bij het laagtepunt van de pH bereikt de cultuur haar maximale myceliumopbrengst; later, als de pH weer oploopt tot 4 of 5, neemt het drooggewicht weer af; autolyse is dus de oorzaak van de laatste pH-verandering.

Een isometabolisch punt werd in geen van de proeven gevonden.

HOOFDSTUK IV

VOEDINGSPROEVEN

Inleiding

Om den invloed van verschillende metalen op den groei en het drooggewicht van *Ceratostomella ulmi* te kunnen constateeren, moest er eerst een geschikte standaardoplossing gevonden worden, waaraan dan vervolgens de zouten van die metalen konden worden toegevoegd.

Eerst leek het moeilijk om zulk een oplossing te vinden. Later bleek het, dat er groote individueele verschillen bestonden tusschen de stukjes mycelium van een cultuur op kers- of moutagar, die als entmateriaal gebruikt werden: op een (later als standaardoplossing gebruikt) milieu groeiden bijv. slechts 5 van de 130 culturen zeer goed, 35 tamelijk, terwijl er 90 bijna niet uitgegroeid waren.

Op mout- of kersextract groeide steeds 100% van de entstukjes tot een laag aan de oppervlakte van de vloeistof uit. De meeste isolaties, die ook op de synthetische oplossing goed groeiden, leverden toch op moutextract een grootere opbrengst; op kersextract was de opbrengst echter aanmerkelijk kleiner. Een vergelijking tusschen de verschillende isolaties, wat haar gedrag ten opzichte van moutextract en een gunstige synthetische oplossing betreft, geeft tabel 11.

Een extract van iepetakken gaf wel een snellen groei in de eerste dagen, maar reeds na 2 weken slechts de helft van de opbrengst, die in de standaardoplossing werd verkregen; later werd het verschil nog grooter. Naast de verschillende plantaardige aftreksels slaat de meest gebruikte standaardoplossing dus een vrij goed figuur.

De samenstelling van die oplossing kwam op de volgende manier tot stand.

Door variatie van en toevoeging aan de oplossing van Richards (1897):

- 1% NH_4NO_3
- 0.5% KH_2PO_4
- 0.25% MgSO_4
- spoor FeSO_4
- 5% saccharose

werd gevonden, dat KNO_3 niet, NH_4 -zouten wel bruikbaar waren, dat Fe gemist kon worden, maar Zn noodig was, enz. De bruikbaarheid van verschillende C-bronnen en anionen, en de gunstige concentraties van de verschillende verbindingen moesten worden onderzocht, voordat de invloed van verschillende metalen kon worden nagegaan. Als standaardoplossing werd op die manier gevonden:

- 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0.25% KH_2PO_4
- 0.25% K_2HPO_4
- 0.02% MgCO_3
- 0.02% CaCO_3
- 0.002% ZnSO_4
- in gedestilleerd water.

De pH hiervan was 6.9.

TABEL 11

Isolatie	Opbrengst in moutextract		Opbrengst in standaard-oplossing	
	na 3 weken	na 6 weken	na 3 weken	na 6 weken
„Duno”	150	149	98	74
„Umbria II”	92	123	96	95
„Baarn”	144	173	57	135
„Rotterdam”	181	194	16	25

Op grond van gegevens in de literatuur over andere schimmels worden in dit hoofdstuk de volgende metalen op hun invloed op *Ceratostomella ulmi* onderzocht:

1° *K*

Dit element wordt in alle voedingsoplossingen genoemd, en dus beschouwd als een belangrijke voedingsstof.

2° *Na*

Dit is vaak een antagonist van Ca bevonden; *Aspergillus niger* (B u r o m s k y, 1913) is er echter volmaakt onverschillig voor.

3° *Mg en Ca*

Hiervan is vooral Mg voor vele schimmels belangrijk gebleken. Ook L o e w (1892), B u r o m s k y (1913) en R i p p e l en S t o e s s (1932) beschouwen den invloed van deze elementen in onderling verband.

4° *Zn en Fe*

De invloed op *Aspergillus niger* is herhaaldelijk onderzocht; de stimulerende werking van Zn-zouten is als voorbeeld gaan gelden van „stimulatie”, waarvan de werking als „voedingsstof” van andere elementen essentieel zou verschillen (S t e i n b e r g, 1932). Waarin het essentiele van dit verschil bestaat, is echter nog niet uitgemaakt (L o h m a n n, 1934).

5° *Cu*

Als CuSO_4 heeft het een bekende fungicide werking, terwijl er bovendien van de lagere concentraties een stimulatie uitging (vnl. *Aspergillus niger*, B o r t e l s (1929), enz.).

6° *Mn*

Voor *Aspergillus niger* (B e r t r a n d (1912), N i e t h a m m e r (1927), B o r t e l s (1929)) werd de invloed van MnSO_4 nagegaan, die soms stimulerend bleek te zijn.

7° *Hg*

Het desinfectans HgCl_2 blijkt volgens B u t k e w i t s c h en O r l o f f (1922) toch ook stimulerend te kunnen werken.

Over het algemeen blijken stoffen, die in een bepaalde concen-

tratie stimuleeren, in een hogere concentratie giftig te zijn voor schimmels. Naar gelang van het proefobject en van de overige omstandigheden zullen die invloeden echter zeer kunnen verschillen.

De invloed van enkele van de genoemde metaalzouten op *Cerastomella ulmi* werd ook door Boudru (1933) nagegaan; zijn resultaten zijn echter niet te vergelijken met de mijne, omdat Boudru hun werking op de schimmel beoordeelde naar den groei in cultuurbuisjes op een agarbodem; hierbij kwamen slechts drie graden van ontwikkeling in aanmerking: 1° geen groei, 2° enkele kolonies, 3° krachtige groei. Dat deze methode hoogstens oriënteerende resultaten kan opleveren, spreekt uit de resultaten, die Boudru kreeg op een agarmilieu, waaruit resp. de C-, N-, P- en K-bron werden weggelaten: geen van die reeksen groeiden langzamer dan de contrôle, die den volledigen voedingsbodem kreeg; de reeksen, waaraan de C-, N- of K-bron ontbrak, verschilden daar in het geheel niet van, terwijl die zonder P zelfs iets sneller groeiden dan de contrôle. Hieruit blijkt dus wel heel duidelijk, dat de groei op een synthetischen agarbodem geen goede maatstaf voor den invloed van bepaalde elementen in het milieu is; de oorzaak daarvan kan liggen in het feit, dat de hyphen zich op een arm milieu wijder uitspreiden, en daardoor bij meting van den begroeiden diameter schijnbaar hetzelfde resultaat opleveren als de cultuur op een intenser begroeide agar, die rijker aan voedingsstoffen is; een tweede oorzaak kan de onzuiverheid van de agar zijn.

Deze methode om den invloed van elementen na te gaan werd door mij dus niet toegepast. Alleen bij de proeven met tannine werd van moutagar gebruik gemaakt (in navolging van Baven-damm), omdat er op moutagar geen sprake van een „armen” bodem kan zijn, en verontreiniging met tannine al zeer onwaarschijnlijk is.

De enkele proeven, die met groeibevorderende stoffen werden genomen, vonden hun aanleiding in de resultaten van proeven over den invloed van den zuurgraad.

A. Concentratie van de totale oplossing

1. Literatuur

Pringsheim (1914) ging voor verschillende saprophyten na, tot op welke concentratie van de totale voedingsoplossing er evenredigheid tusschen opbrengst en voedselhoeveelheid bleef bestaan. Dit bleek o.a. af te hangen van den duur van de proef: bij lage concentraties, tot op een bepaald „optimum”, bleek vanaf het begin evenredigheid met de opbrengst te bestaan. Bij concentraties, die boven dat „optimum” lagen, werd pas na langeren tijd een dergelijke proportionaliteit bereikt. Schijnbaar verschuift zich dus bij langeren duur van de proef het optimum naar een hogere concentratie. In het algemeen geldt dan ook, dat bij hogere concentraties het maximale gewicht later bereikt wordt, ongeacht natuurlijk de eventuele schadelijke werking van die hoge concentraties.

De resultaten van Niethammer (1925) komen hiermee overeen. Zij vond o.a. voor *Aspergillus niger*, dat na 4 dagen de opbrengst van de hoge concentraties in verhouding lager was dan die van de lage. Na 9 dagen echter bestond al evenredigheid tot 20% saccharose toe.

Daar zowel Pringsheim (voor $ZnSO_4$) als Niethammer (voor $Fe_2(SO_4)_3$) tot de conclusie kwamen, dat de invloed van toegevoegde metaalzouten bij hogere voedselconcentraties veel duidelijker aan het licht kwam dan bij lagere, lag het voor de hand om de hoogste voedselconcentratie te bepalen voor *Ceratomyxa ulmi* (in een oplossing, die gunstig van samenstelling was gebleken te zijn), dus die concentratie, waarbij zich blijkens de groeikromme ten opzichte van die der lagere concentraties nog geen schadelijke werking doet gelden.

2. Proeven

Een proef, waarbij slechts éénmaal de opbrengst wordt gewogen, kan geen uitsluitsel geven over de optimale concentratie. Een duidelijk beeld wordt pas verkregen uit het verloop van den groei, daar men niet van te voren kan weten, hoezeer de tijden, noodig voor het bereiken van de respectievelijke maximum-opbrengsten, voor de verschillende reeksen uiteen kunnen lopen.

Het negatieve resultaat van de volgende proef wil dus nog niet zeggen, dat *Ceratostomella ulmi* onverschillig voor de concentratie van zijn voedingsoplossing is. De oplossing (1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% KH_2PO_4 , 0.12% MgCO_3 , 0.12% CaCO_3 , 0.02% ZnSO_4 , 20% saccharose in aqua dest.) werd verdund op de helft en 1/10.

Resultaat: „1” 52 m.g. drooggewicht na 22 dagen
 „0.5” 53 „ „ „ „ „
 „0.1” 53 „ „ „ „ „

Hier is dus absoluut geen verschil te zien.

Om bovengenoemde reden werd de proef op een andere wijze overgedaan.

TABEL 12

Reeks	Opbrengst in m. g. na:		
	3 weken	8 weken	15 weken
1	16	50	57
$\frac{1}{2}$	71	143	121
$\frac{1}{4}$	57	77	77
$\frac{1}{8}$	33	38	28
$\frac{1}{16}$	11	14	12
$\frac{1}{32}$	1	8	5

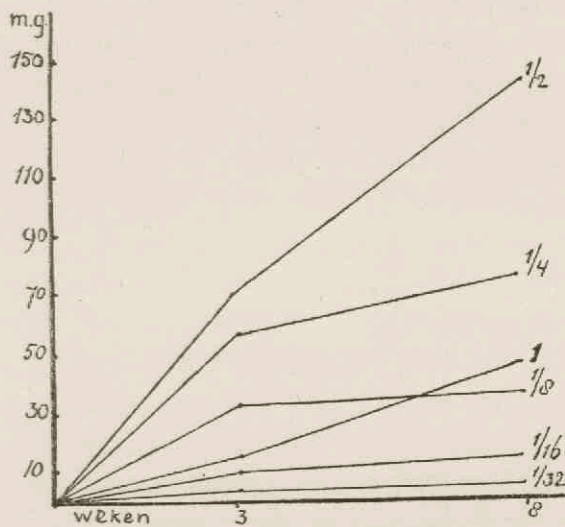
Een oplossing van 0.4 g. NH_4NO_3 , 0.5 g. KH_2PO_4 , 0.5 g. K_2HPO_4 , 0.04 g. CaCO_3 , 0.06 g. MgSO_4 , 0.004 g. ZnSO_4 en 10 g. saccharose in 100 c.c. gedestilleerd water werd verdund tot $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ en $\frac{1}{32}$. De pH's van deze oplossingen liepen uiteen van 6.7—7.1, welk verschil voor de opbrengsten geen gewicht in de schaal kan hebben gelegd.

Het resultaat na verschillende tijden is in tabel 12 te zien, terwijl ook figuur 4 een overzicht van den groei geeft.

Na 6 dagen was een begin van groei in alle reeksen waar te nemen. Vooral „ $\frac{1}{8}$ ” en „ $\frac{1}{4}$ ” groeiden goed; „ $\frac{1}{32}$ ” en „ $\frac{1}{16}$ ” vrij

goed; in „ $\frac{1}{2}$ ” en „1” was de groei armelijk, n.l. alleen op den bodem.

Na 10 dagen had „ $\frac{1}{2}$ ” de andere al ingehaald, en waren deze serie en „ $\frac{1}{4}$ ” er duidelijk het beste aan toe; „1” alleen bleef nog slechts verspreid in de vloeistof groeien, terwijl alle andere meer of minder dikke laagjes aan de oppervlakte hadden gemaakt. Dat de culturen in de laagste concentraties, die in het allereerste begin zoo'n voorspoedigen indruk maken, het weldra afleggen tegen die



Figuur 4.

Drooggewichten, verkregen in voedingsoplossingen van verschillende concentraties.

in hoogere, blijkt verder uit tabel 12, waaruit duidelijk te lezen is, dat de series „ $\frac{1}{8}$ ”, „ $\frac{1}{16}$ ”, en „ $\frac{1}{32}$ ” na 3 weken weinig meer toenemen in gewicht.

Blijkbaar is voor alle series (als men de middelbare fout in aanmerking neemt, ook voor „1”) het maximumgewicht na 8 weken reeds bereikt. Van een dergelijke serie als „ $\frac{1}{2}$ ” was dit tijdstip van maximumopbrengst trouwens reeds eerder (zie blz. 9) vastgesteld op 8 weken na het aanzetten van de proef. Alleen voor de laagste concentraties bestaat de kans, dat dit tijdstip al voorbij is, en dat er dus al autolyse heeft plaats gehad. Daar echter zelfs de „ $\frac{1}{2}$ ” reeks in de tweede periode (zie figuur 4) langzamer groeit

dan in de eerste, kan het verloop van de andere krommen, zooals die getrokken zijn, niet ver van de werkelijkheid afwijken; de opbrengstgetallen na 8 weken geven dus werkelijk ten naasten bij de maximum-drooggewichten van alle reeksen.

Deze getallen moeten dus nu getoetst worden aan de stelling van Pringsheim en Niethammer, volgens welke de opbrengst na voldoende tijdsruimte evenredig is met de voedselconcentratie, mits die concentratie niet zoo hoog is, dat zij schadelijk werkt.

Als men nu uitgaat van de waarde 143 van de optimale reeks „ $\frac{1}{2}$ ”, komt de verhouding tusschen de opbrengstgetallen van de reeksen met lagere concentraties inderdaad vrijwel overeen met de theorie, zooals uit dit staatje blijkt.

Reeks	Werkelijke opbrengst	Theoretische opbrengst overeenk. met 143 voor „ $\frac{1}{2}$ ”
$\frac{1}{2}$	143	143
$\frac{1}{4}$	77	71
$\frac{1}{8}$	38	36
$\frac{1}{16}$	14	18
$\frac{1}{32}$	8	9

Die stelling blijkt dus ook voor *Ceratostomella ulmi* op te gaan.

Bovendien is gebleken, dat de reeks met de hoogste concentratie geheel buiten die evenredigheid valt. Uit het feit, dat deze reeks zelfs op den langen duur van 15 weken de andere niet inhaalt, maar een veel lager maximum bereikt dan de 2 of 4 maal verdunde concentraties, mag de conclusie getrokken worden, dat zich hier de schadelijke invloed van een te hooge concentratie reeds deed gelden.

Om een zoo gunstig mogelijk resultaat van proeven omtrent den invloed van metaalzouten te kunnen verwachten, moest de oplossing „ $\frac{1}{2}$ ” zooveel mogelijk benaderen. De meeste proeven op dat gebied zijn dan ook met een dergelijke oplossing uitgevoerd.

B. Koolstof

Zonder geschikte koolstofbron in de voedingsoplossing heeft er geen groei plaats. Hoogstens groeit het entstukje dan uit tot eenige flarden mycelium, die 5 tot 10 m.g. wegen.

Als C-bronnen werden geprobeerd: saccharose, maltose, lactose,

glucose, galactose, glycerine, manniet, zetmeel, pepton, palmitine en cellulose.

Van de in water oplosbare verbindingen werden verschillende percentages met elkaar vergeleken. De resultaten van de meeste proeven hierover zijn in tabel 13 verzameld.

Van de biosen blijken maltose en lactose in geringe mate achter te staan bij saccharose. Met een van de monosen, glucose of galactose, als C-bron groeit *Ceratostomella ulmi* in de eerste 3 weken langzamer; daarna halen die series de saccharose-reeks echter in; na 11 weken is die met galactose zelfs ver vooruit, en komt het drooggewicht overeen met dat, welk in verdund moutextract in denzelfden tijdsduur bereikt wordt. Met 5% glycerine wordt ongeveer dezelfde opbrengst verkregen als met 5% saccharose, terwijl met 1% het resultaat nog iets gunstiger is dan met 1% saccharose. Was er aan de oplossing 1, 3 of 5% „amylum solubile” toegevoegd, dan was de ontwikkeling vrij goed; daar die voedingsoplossingen slecht filtreerbaar waren, als ze 3 of 5% zetmeel bevatten, was de opbrengst daarin alleen bij uitzondering te bepalen.

Van al deze stoffen was 5% gunstiger dan 1%, al was dat soms pas op den langen duur te zien. Van saccharose, die het meest als C-bron gebruikt werd, omdat ze in de eerste 3 weken al een regelmatig en goeden groei gaf, werden ook hogere percentages geprobeerd (4e proef). Na 3 weken proefduur geven 1, 5 en 10% ongeveer dezelfde opbrengst; daarna treedt echter bij 1% saccharose autolyse in, terwijl de groei nog voortgaat in 5 en 10%, die in hun opbrengsten blijven overeenkomen; de met een accolade vereenigde getallen verschillen n.l. niet zoodanig van elkaar, dat er conclusies uit die verschillen getrokken mogen worden (zie blz. 7); 15 en 20% zijn bepaald ongunstiger.

Voor de eventueele functie van pepton als C-bron wordt verwezen naar de bespreking van verschillende N-bronnen (blz. 50), waaruit blijkt, dat pepton als C-bron ongeschikt is.

Om de mogelijkheid van palmitinevertering na te gaan, paste ik de methode van R a h n (1906) toe: voor elke erlenmeyer wordt 0.25 g. palmitine afgewogen en daarin gesteriliseerd; nadat het vet in een zoo dun mogelijk laagje tegen bodem en wand van de erlenmeyer gestold is (echter zóó, dat er een deel van de wand doorzichtig blijft), wordt er de overige voedingsbodem bijgevoegd;

TABEL 13

	1 ^e proef		2 ^e proef		3 ^e proef			4 ^e proef		
	3 weken	8 weken	3 weken	8 weken	3 weken	8 weken	11 weken	3 weken	5 weken	7 weken
geen C			1	4						
1 % saccharose				36	33	30		82	41	42
5 % ..	95	157	89	124	54	92		92	117	102
10 % ..								78	104	109
15 % ..								24	65	35
20 % ..								6	19	24
1 % maltose					31	38				
5 % ..	37	140			48	89				
1 % lactose					8		32			
5 % ..					2		85			
1 % glucose			39	37	31	42				
5 % ..	82	155	37	127	14	79				
1 % galactose					0		52			
5 % ..					12		206			
1 % glycerine			43	82						
5 % ..			67	128						
1 % manniet					0		41	6	25	20
5 % ..					4		46	5	10	39
1 % zetmeel			38	35	56		24			
3 % ..							113			
5 % ..			niet te filtreeren (groei goed)							

die bestond uit 1° de gewone standaardoplossing, 2° de standaardoplossing zonder suiker, 3° de standaardoplossing, waarvan 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vervangen was door 0.5% asparagine, 4° de standaardoplossing, waaruit de suiker was weggelaten, en 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was vervangen door 0.5% pepton. Na 2 maanden werden de opbrengsten bepaald; zij bedroegen voor:

de 1ste reeks	175 m.g.	(zonder palmitine	: 144)
„ 2de „	15 „	(„ „	: 8)
„ 3de „	167 „	(„ „	: 173)
„ 4de „	50 „	(„ „	: 33)

Waar de volledige voedingsoplossing aanwezig was, schijnt met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-bron dus wel, met asparagine als N-bron geen vet verteerd te worden. Volgens R a h n heeft juist in de meeste gevallen alleen vetvertering plaats, als er organische N gegeven wordt. Dit zou wel overeenkomen met de resultaten van de 2de en 4de reeks, die, evenals bij R a h n 's proeven het geval was, geen van beide naast het vet een bruikbare C-bron bevatten: met pepton wordt de opbrengst door palmitine wel vergroot, met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ niet.

De groeibevordering door palmitine was niet van dien aard, dat vet in aanmerking kwam voor C-bron in de standaardoplossing; daarom werd er op dit onderwerp niet verder ingegaan.

Wordt de C als cellulose (in den vorm van filtreerpapier) gegeven, dan groeit de schimmel evenmin als in een oplossing zonder C. Is er bovendien 5% saccharose in de oplossing aanwezig, dan vormt zich op het filtreerpapier (maar los daarvan) een myceliumlaag, die na 3 weken evenveel weegt als een laag, die zich in dezelfde oplossing, maar zonder filtreerpapier heeft ontwikkeld; het filtreerpapier blijkt zijn oorspronkelijke gewicht te hebben behouden.

Cellulose werd dus noch bij aanwezigheid, noch bij afwezigheid van een andere C-bron verteerd.

Voor de organische voeding van *Ceratostomella ulmi* blijken verschillende suikers te kunnen dienen; saccharose was daarvan het best bruikbaar voor de standaardoplossing.

Glycerine was ook een goede C-bron; manniet en zetmeel leverden aanmerkelijk lagere opbrengsten.

Pepton is als C-bron niet geschikt.

De aanwezigheid van palmitine werkt slechts in enkele gevallen gunstig.

Cellulose wordt niet aangetast.

C. Stikstof

Bij het zoeken naar een geschikte synthetische voedingsvloeistof voor *Ceratostomella ulmi* bleek het, dat NH_4NO_3 als N-bron voldeed. Nu was het nog de vraag, of de schimmel zoowel het ammoniak als het nitraat of slechts een van beide gebruiken kon. Het snelle verlopen van de pH naar den zuren kant was er al een aanwijzing voor, dat het ammoniak de voorkeur had; uit het feit, dat KNO_3 als N-bron volkomen nutteloos was (zie tabel 3), bleek dat nog duidelijker. Inderdaad was de ontwikkeling even goed, indien het ammonium als sulfaat, fosphaat of chloride werd toegediend, als met NH_4NO_3 , indien de hoeveelheid N evenredig was (n.l. overeenkomend met 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Werd echter de overeenkomstige hoeveelheid N in den vorm van ureum gegeven, dan was de opbrengst belangrijk lager. Dit kwam dus niet als N-bron in aanmerking. Met asparagine werden goede opbrengsten verkregen.

Toen bij den aanvang van het onderzoek op een oplossing in leidingwater, waaraan 0.06% KH_2PO_4 , 0.6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 10% saccharose was toegevoegd, een matige groei werd verkregen, bleek het, dat toevoeging van 0.05 en 0.1% pepton een vrij gunstigen en van 0.5 en 1% pepton een zeer gunstigen invloed had: de opbrengst bedroeg n.l. na 15 dagen:

bij de contrôlereeks (zonder pepton):	46 m.g.
„ „ reeks met 0.05% pepton	: 74 „
„ „ „ „ 0.1% „	: 74 „
„ „ „ „ 0.5% „	: 123 „
„ „ „ „ 1% „	: 173 „

Daar overigens — ook in leidingwater — zonder Mg en Zn geen goede ontwikkeling plaats had en aan deze oplossing geen

Mg- of Zn-zout was toegevoegd, is de invloed van de pepton hier sterk geaccentueerd, doordat het die elementen waarschijnlijk als verontreinigingen bevat.¹⁾ De werking als N-bron kon hier niet beoordeeld worden, daar er naast pepton ammoniakstikstof aanwezig was; door middel van de volgende proef werd nu nagegaan, of het als enkele N-bron of juist in combinatie met een andere N-bron een gunstige voedingsstof voor *Ceratostomella ulmi* was; tevens werd hierbij onderzocht, of het misschien ook als C-bron dienst deed (zie tabel 14).

TABEL 14

Oplossing	Begin-pH	Opbrengst na 3 weken	Opbrengst na 10 weken	Eind-pH
Synthetische oplossing	6.6	76	98	3.3
Dito, + 0.5 % pepton	6.6	102	110	3.8
„ + 2 % pepton	5.7	75	96	4.6
0.5 % pepton	5.9	5	0	8.3
2 % pepton	5.0	17	8	8.0
Zonder N, + 0.5 % pepton . . .	6.3	153	137	—
„ „, + 2 % pepton . . .	5.7	85	121	—
„ C, + 0.5 % pepton . . .	6.5	17	13	—
„ „, + 2 % pepton . . .	5.7	28	24	—
Zonder N en C, + 0.5 % pepton .	6.5	23	20	—
„ „ „ „, + 2 % pepton .	5.0	29	20	—

De conclusies, die men uit tabel 14 kan trekken, zijn de volgende:

- 1°. Pepton alleen voldoet niet aan de behoeften van de schimmel: op een peptonoplossing van 0.5 of 2% heeft haast geen groei plaats; ondanks dien geringen groei heeft er een geweldige pH-verschuiving plaats, die na 3 weken al de ongunstige waarde 8.3 bereikt.

¹⁾ Gebruikt werd „Peptone granulée (Chassaing)“.

- 2°. Als er geen C-bron in de oplossing aanwezig is, ontwikkelt *Ceratostomella ulmi* zich met 0.5 of 2% pepton slecht; als C-bron kan het dus niet fungeeren. De opbrengsten blijken hierbij onafhankelijk te zijn van de aanwezigheid van een andere N-bron naast pepton.
- 3°. Aan een volledige synthetische oplossing toegevoegd, versnelt 0.5% pepton den groei, zoodat na 3 weken reeds het maximum-gewicht opgebracht wordt. Dit maximum is hetzelfde als wanneer er geen of 2% pepton wordt gegeven; de serie met 2% pepton in de oplossing groeit weer in hetzelfde tempo als die zonder pepton. De eind-pH is hierbij evenredig met de hoeveelheid toegevoegde pepton.
- 4°. Als pepton de eenige N-bron is, wordt ook weer het maximum sneller bereikt met 0.5% pepton; ditmaal is dat maximum echter hooger dan dat van de synthetische oplossing; ook hier is de groei in 2% pepton langzamer dan in 0.5%, maar toch iets beter dan wanneer bovendien $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aanwezig was. Een overmaat van N is dus, noch in den vorm van pepton, noch in dien van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, gunstig.

Bij een andere proef was gebleken, dat de optimale concentraties van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tusschen 0.05 en 0.5% liggen; daar er in de synthetische oplossing van deze proef al 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aanwezig was, bracht toevoeging van 2% pepton de hoeveelheid N over haar optimum heen; bovendien is immers 2% pepton als eenige N-bron al niet zoo gunstig meer als 0.5% pepton.

Over de N-voeding van *Ceratostomella ulmi* laat zich in het kort dus het volgende zeggen:

Nitraten zijn ongeschikt.

Ammoniumzouten, asparagine en pepton worden goed opgenomen. Hoewel 0.5% pepton een snelleren groei geeft, werd het in het algemeen niet als N-bron gebruikt: in de eerste plaats, omdat het waarschijnlijk allerlei onzuiverheden bevat en in de tweede plaats, omdat het een uitzonderlijke plaats inneemt, wanneer men op het pH-verloop in de oplossing let.

D. Invloed van phosphaten

1. Phosphaatgebrek

Wordt uit een volledige voedingsoplossing het fosfaat weggelaten, dan heeft er ongeveer geen groei plaats; in sommige culturen ontstaat op den langen duur toch nog een laagje, dat dan geheel zwart en bros van substantie is; het mycelium blijkt uit ongewoon dikke, donkere draden te bestaan, en bevat in plaats van de normale kleine, dikke oliedruppels. Deze hyphen vallen tenslotte uiteen in zeer donkere chlamydosporen. Ent men deze over op een versche, volledige voedingsoplossing, dan zijn zij niet meer aan het uitgroeien te krijgen.

Hetzelfde verschijnsel doet zich op een fosfaatvrijen voedingsbodem voor, waaraan agar is toegevoegd: ook daarop vormt zich een langzaam groeiend donker mycelium.

2. Verschillende concentraties van kaliumphosfaat

Voor een serie, waarin het pH-optimum bepaald en de pH dus gedurende den proeftijd zoo veel mogelijk constant gehouden moest worden, werd, om een grootere buffercapaciteit te verkrijgen, in totaal 2% fosfaat toegevoegd, in plaats van 0.1 tot 0.5%, zooals in de overige proeven gebruikt werd: voor de pH's 5.3, 5.9, 6.3, 6.5, 6.9, 7.3, 8.2 werden KH_2PO_4 en K_2HPO_4 in de verhouding 2 : 0 tot 0.25 : 1.75% gebruikt. Het resultaat was een mislukking van de proef, daar de drooggewichtopbrengsten na 11 dagen, ongeacht de pH, hoogstens gemiddeld 11 m.g. bedroegen, en er bovendien, vooral na langeren duur, in elke reeks een groote onregelmatigheid optrad, zoodat het bepalen van een gemiddelde geen zin meer zou hebben. Na 3 weken waren er bijv. in de serie pH 6.5 : 10 erlenmeyers zonder een spoor van groei,

14 met flarden mycelium, verspreid in de vloeistof,

6 met een witte myceliumlaag, en

4 met een laag, waar zwarte plekken in voorkwamen.

Die zwarte stukken in een myceliumlaag waren in enkele culturen van elke pH boven 6.3 te zien, en deden zich meestal voor aan de randen van de oorspronkelijke kolonies, die tot een laag waren samengegroeid. Een enkele maal (bij pH's 7.3 en 8.2) trad

ook een geheel zwarte laag op (waarboven plukjes grijs mycelium uitstaken), die bij microscopisch onderzoek bleek te bestaan uit een compact vlechtwerk van donkere draden, die zich soms op een manier, die aan coremia deed denken, tegen elkaar aanlegden.

De zwarte culturen vertoonen op het eerste gezicht overeenkomst met die, welke in de reeksen zonder fosphaat optreden; maar de lagen, die in een overmaat van fosphaat ontstaan, zijn veel steviger van bouw en vallen dan ook niet in losse stukjes uiteen, zooals die, welke fosphaatgebrek lijden. Bovendien zijn er in deze hyphen slechts de normale vetdruppeltjes te zien, in tegenstelling met de abnormaal groote in de gebrekkijgende.

Daar dus een fosphaatconcentratie van 2% onbruikbaar is, blijkt *Ceratostomella ulmi* tamelijk gevoelig op dit punt te zijn in vergelijking met *Armillaria mellea* (Vahl) Quél., die volgens Reitsma bij 2% nog een zeer goede opbrengst geeft, en zelfs bij 8% nog groeit.

Om de grens van schadelijkheid nog wat nader te bepalen, werden de opbrengsten na één, drie en zeven weken bij ongeveer gelijke begin-pH's en varierende fosphaatconcentraties vergeleken (zie tabel 15).

TABEL 15

Concentraties in %		Totale fosphaatconcentratie in %	Begin-pH	Opbrengst in m. g.			pH na 7 weken
KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄			na 1 week	na 3 weken	na 7 weken	
0.15	0.05	0.2	6.7	14	80	127	3.2
0.3	0.2	0.5	6.7	30	121	120	3.8
0.5	0.5	1.0	6.6	13	93	124	4.2
0.9	1.1	2.0	6.6	2	13	(10)	(6.3)

Behalve de fosphaten bevatte de oplossing: 0.1% (NH₄)₂SO₄; 0.02% MgCO₃; 0.02% CaCO₃; 0.002% ZnSO₄; 5% saccharose.

De laatste getallen van de laatste twee kolommen zeggen weinig, daar er wegens de groote onregelmatigheid in die reeks na 7 weken eigenlijk geen „gemiddelde” op te geven was: de groote

meerderheid der culturen bracht maximaal 15 (gemiddeld 10) m.g. op, maar daarnaast kwamen er twee voor met opbrengsten van 220 en 265 m.g. Dit is dus dezelfde onregelmatigheid, die ook bij de vorige proef ter sprake kwam. Deze blijkt in het algemeen in ongunstige cultuurvloeistoffen op te treden, en is dus steeds een symptoom van de grens van groeimogelijkheid voor de schimmel.

Ter verklaring van dit feit blijken twee mogelijkheden te bestaan: òf bijkomstige, oncontroleerbare factoren hebben juist in dit grensgebied een doorslaggevenden invloed op den groei, òf de individuele verschillen tusschen de uitgroeierende myceliumdraden en sporen, die als entstukje in de oplossing zijn gebracht, maken in de eene cultuur groei mogelijk, in de andere niet.

Over de eischen, die *Ceratostomella ulmi* aan haar P-voeding stelt, valt dus het volgende te zeggen: *zonder fosphaat* heeft er geen groei plaats, of ontstaat er een bros laagje zwart, abnormaal mycelium, dat in chlamydosporen uiteenvalt.

Ook bij *te hooge* concentratie (2%) ontstaat soms een zwarte laag, die echter niet bros is en uit tamelijk normale hyphen bestaat; nog vaker groeit de schimmel heelemaal niet bij die concentratie: een typische onregelmatigheid in opbrengst treedt dan op.

Een totale fosphaatconcentratie van 0.5% is optimaal bij de gegeven omstandigheden.

Daar door combinatie van K_2HPO_4 en KH_2PO_4 een goede buffering verkregen en meteen het noodige K gegeven wordt, werden die twee zouten meestal als P-bron gebruikt.

E. Andere Anionen

Toen de gunstige invloed van $MgCO_3$ gevonden was (blz. 60), werd er nagegaan of de toevoeging van andere Mg-verbindingen dezelfde uitwerking had. Daartoe werden er verschillende Mg-zouten toegevoegd, die in hun hoeveelheid Mg aequivalent waren met 0.02% $MgCO_3$ (zie tabel 16, eerste kolom). Het resultaat was, dat de andere Mg-zouten ook een goede ontwikkeling veroorzaakten, maar toch, en ten deele ver, achterbleven bij $MgCO_3$.

Een tweede proef, waarbij de toegevoegde Mg-zouten aequivalent waren met 0.04% $MgCO_3$, bevestigde dat resultaat; ditmaal

bleven de reeksen met MgCl_2 , MgSO_4 en $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ nog verder achter, hetgeen het gevolg kan zijn geweest van een sterkere pH-verschuiving. Waarschijnlijk bestaat trouwens de gunstige werking van het $-\text{CO}_3$ grootendeels in het verlangzamen van het pH-verloop; wanneer er n.l. heelemaal geen $-\text{CO}_3$ in de oplossing aanwezig is, doordat Ca en Mg in den vorm van fosphaten zijn gegeven, vermindert de opbrengst na resp. 3 en 6 weken van 94 en 119 tot 79 en 104, en is de pH na 3 weken tot 2.5 gedaald in plaats van slechts tot 3.2.

Bij een derde proef bleken de verhoudingen tusschen de verschillende zouten dezelfde te zijn na 3 en na 6 weken (zie tabel 16;

TABEL 16

Aequivalente Mg-zouten	Eerste proef (0.02 % MgCO_3)	Tweede proef (0.04 % MgCO_3)	Derde proef (0.02 % MgCO_3)	
	na 3 weken	na 3 weken	na 3 weken	na 6 weken
MgCO_3 *) .	102	99	—	—
MgClO_3 . .	84	60	85	110
MgHPO_4 *) .	76	63	62	102
MgCl_2 . .	49	17	49	79
MgSO_4 *) .	47	22	49	65
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.	54	18	55	70

hierbij werden weer hoeveelheden Mg aequivalent met 0.02% MgCO_3 gegeven).

De rubrieken, waarin de zouten ondergebracht kunnen worden door ze naar de opbrengsten te rangschikken, komen overeen met de respectievelijke sterkten der zuren, waar ze van afgeleid zijn.

Waarschijnlijk is de werking van deze anionen dan ook niet zoozeer specifiek, als wel indirect door middel van de zuurgraadverschuiving van belang. Zoo was de pH in de tweede proef bij

*) De anionen van deze zouten waren al vertegenwoordigd in de verdere oplossing; deze week van de standaardoplossing af, daar zij slechts 0.1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en geen K_2HPO_4 bevatte, en dus niet gebufferd was.

Mg(NO₃)₂, MgCl₂ en MgSO₄ na 3 weken al tot dezelfde waarde (± 3) gezakt als die bij MgCO₃, hoewel de opbrengsten en dus het verbruik van voedingsstoffen onvergelykelyk veel minder was. Na 3 weken nam het gewicht hier dan ook niet meer toe.

Ik zou de hier geconstateerde werking der verschillende anionen op dezelfde wijze willen verklaren als Ritter (1909), die concludeerde, dat de opname van ammoniak uit anorganische ammoniumzouten in direct verband staat met de resistentie van een bepaalde schimmel ten opzichte van de vrijkomende minerale zuren.

Bij het gebruik van ammoniumzouten vond ik, in overeenstemming met de vorige proeven, dat de zouten van HCl, HNO₃ en H₂SO₄ dezelfde opbrengsten geven; wel was hier het fosphaat in de eerste 3 weken achtergebleven, maar na 6 weken had het de andere reeksen ingehaald. Voor den invloed van phosphaten wordt verder naar blz. 51 verwezen.

Ook uit de volgende proef blijkt, dat de aanwezigheid van -Cl of -SO₄ van geen belang voor *Ceratostomella ulmi* is:

(NH ₄) ₂ SO ₄ + MgCO ₃	geeft na 3 weken	119,	na 6 weken	141
m.g. opbrengst,				
(NH ₄) ₂ SO ₄ + MgSO ₄	„ „ 3 „	83,	„ 6 „	131
m.g. opbrengst,				
NH ₄ Cl + MgCO ₃	„ „ 3 „	114,	„ 6 „	163
m.g. opbrengst,				
NH ₄ Cl + MgSO ₄	„ „ 3 „	85,	„ 6 „	126
m.g. opbrengst,				

In de reeksen met NH₄Cl als N-bron is behalve 0.002% ZnSO₄ geen sulfaat aanwezig. Toch blijkt de toevoeging van MgSO₄ minder gunstig te werken dan van MgCO₃, hoewel er al een carbonaat (n.l. 0.02% CaCO₃) in de oplossing aanwezig was. De opbrengstgetallen blijken (het duidelijkst bij den eersten oogst) van de toevoeging van MgCO₃ af te hangen, onverschillig, of daarnaast NH₄Cl of (NH₄)₂SO₄ aanwezig is. Ook het Cl-ion is dus onbelangrijk voor *Ceratostomella ulmi*. Of SO₄⁻ volkomen gemist kan worden, of dat de hoeveelheid, die 0.002% ZnSO₄ levert, in de behoefte van de schimmel voorziet, is niet nader onderzocht.

Uit deze proeven over den invloed van eenige anionen op de

ontwikkeling van *Ceratostomella ulmi* is van een mogelijk bestaande specifieke werking niets gebleken, daar de verschillen in opbrengst, die bij hun verwisseling optreden, eenvoudiger te verklaren zijn door een indirecten invloed via den zuurgraad.

F. Metaalionen

1. Kalium

Daar als phosphaten meestal KH_2PO_4 en K_2HPO_4 werden gebruikt, was het van belang na te gaan, in hoeverre K invloed heeft, en of het eventueel uit de oplossing gemist zou kunnen worden. Daartoe werd de volgende proef genomen.

Aan een oplossing, die al 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.002% ZnSO_4 ; en 5% saccharose bevatte, was resp. toegevoegd:

- 1/ 0.1% KH_2PO_4 ; 0.05% MgCO_3 ; 0.012% CaCO_3
- 2/ 0.18% MgHPO_4 ; 0.012% CaCO_3
- 3/ 0.09% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; 0.05% MgCO_3 ;
- 4/ 0.1% NaH_2PO_4 ; 0.05% MgCO_3 ; 0.012% CaCO_3

De oplossingen bevatten dus aequivalente hoeveelheden P, op de MgHPO_4 -serie na, die de dubbele hoeveelheid P kreeg, zoowel wat fosphaat- als wat Mg-concentratie betreft (cf. ook blz. 52) dus in gunstiger omstandigheden verkeerde dan de rest.

Hieronder worden de opbrengsten gegeven (na 5 weken) van de verschillende series, die naar hun fosphaat zijn genoemd.

KH_2PO_4	Begin pH	6.8	Opbrengst	93
MgHPO_4	„	7.8	„	46
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	„	6.3	„	49
NaH_2PO_4	„	6.8	„	49

Men kan hieruit de volgende conclusies trekken: het Na, dat in geen andere serie dan de laatste voorkomt, blijkt niet den minsten invloed te hebben. Mg en Ca waren in de overige oplossing al aanwezig; van die elementen kan dus op deze wijze geen specifieke werking aan den dag treden.

Ver boven de andere steekt de serie met K-phosphaat uit; daar de andere series ook buiten hun fosphaat geen K bevatten, is die gunstige werking zeer zeker aan het K toe te schrijven.

Om nu ook nog te bepalen, bij welke concentratie het gebrek aan K in de oplossing zich gaat doen voelen, werden er aan een

oplossing, die een gunstige hoeveelheid fosphaat bevatte in den vorm van 0.15% MgHPO_4 en 0.15% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, verschillende hoeveelheden K_2SO_4 toegevoegd, tot 1% K_2SO_4 toe. Hierbij bleek de grootste opbrengst geleverd te worden door de series met 0.001 en 0.01% K_2SO_4 , terwijl ook bij deze proef die optimale opbrengst ongeveer 2 maal zoo groot was als die welke zonder toevoeging van K of met 0.00001% K_2SO_4 bereikt werd. De series met 0.001 en 0.01% K_2SO_4 bevatten evenveel K als zulke, die 0.0015 en 0.015% KH_2PO_4 zouden hebben gekregen. De snellere groei van *Ceratostomella ulmi* in een oplossing met 0.5% fosphaat, vergeleken met 0.2% fosphaat (zie blz. 52), is dus inderdaad alleen het gevolg van de fosphaatconcentratie, en niet van het gelijktijdig toegevoegde K.

Daar de handelssuiker, die hier gebruikt werd, volgens de warenwet 0.05% asch mag bevatten, en hiervan ongeveer de helft K is, kan ook het gehalte aan K van die oplossing, waaraan geen K_2SO_4 werd toegevoegd, nog $0.05 \times 0.5 \times 0.05 = 0.00125\%$ zijn geweest. Dit is een aanzienlijk bedrag, als men in aanmerking neemt, dat 0.001% K_2SO_4 reeds de optimale opbrengst gaf.

Om uit te maken, of er nog sterkere K-gebrekssymptomen voor den dag konden komen, werd daarom de laatste proef herhaald met „glucose purissimum” als C-bron. Het resultaat was echter ook ditmaal een slechts 2 maal zoo groote opbrengst, indien 0.01% K_2SO_4 werd toegevoegd.

Uit deze proeven is dus gebleken, dat K een zeer gewenscht element voor *Ceratostomella ulmi* is, en dat de standaardoplossing in die K-behoefte ruimschoots voorziet.

2. Natrium

Mevius (1927) vond, dat de schadelijke werking van alkaliën op plantenwortels versterkt wordt door een hoogere temperatuur. De verklaring vindt hij in het feit, dat zoowel temperatuursverhooging als die ionen schade teweegbrengen door middel van permeabiliteitsverhooging van het protoplasma. Ca zou door het tegengaan van die permeabiliteitsveranderingen die schadelijke werking opheffen, en op die wijze antagonistisch ten opzichte van K-, Na-, en Mg-ionen werken.

Nu kan ook bij schimmels de schadelijke werking van een giftige stof afhankelijk van de temperatuur zijn (Rippel, 1932). De mogelijkheid bestaat dus, dat hier de schade op een wijze, analoog aan die bij hogere planten, wordt toegebracht. Dan zouden er ook dergelijke antagonismen kunnen optreden.

Om deze reden werd de invloed van Na al dan niet naast Ca nagegaan. Bij de proef met de verschillende phosphaten (blz. 56) had ik al gevonden, dat de toevoeging van 0.019% Na (bij afwezigheid van K) onverschillig was voor de opbrengst na 5 weken. Een noodzakelijke voedingsstof is Na dus zeker niet. (Dit komt overeen met wat Buronsky (1913) voor *Aspergillus niger* vond). In deze oplossing was echter ook Ca aanwezig; de mogelijkheid van een schadelijke werking van Na bleef dus nog bestaan. Daarom werd er, behalve een proef, waarin de invloed van NaCl in verschillende concentraties werd nagegaan, ook een reeks aangezet, waarbij Ca uit de oplossing was weggelaten. Indien hier dus een antagonisme tusschen Ca en Na bestond, zou dat moeten blijken uit het verschillende resultaat van de proeven.

Het Na werd gegeven als NaCl; 0.016% Cl heeft volgens een andere proef (blz. 55) geen invloed; dit percentage is meer dan met 0.1 en minder dan met 1.0% NaCl wordt toegediend. In tabel 17 zijn de twee proeven met elkaar te vergelijken. De eerste oogst had plaats na 3, de tweede na 7, en de derde na 17 weken.

Daar deze twee proeven niet tegelijk werden aangezet, zijn de getallen van de eene proef niet direct met die van de andere te vergelijken.

In de proef zonder Ca treedt alleen bij den tweeden oogst een schadelijke werking aan den dag van de percentages 0.0001—0.1 ten opzichte van 0—0.00001%. Groot is die schade zeker niet te noemen, daar niet alle termen, die onder de eerste groep vallen, genoeg verschillen van de afzonderlijke termen van de andere groep (bijv. 141—139). De eenige duidelijke schade, die wordt toegebracht, is die van 1% NaCl. Daar dit % hooger ligt dan het onverschillig gebleken percentage Cl, is niet met zekerheid te zeggen, of die schade aan Na of aan Cl is toe te schrijven.

In de proef met Ca in de oplossing treedt bij den eersten oogst een schadelijke, bij den tweeden een gunstige werking van NaCl op in de percentages 0.00001—0.1; in die percentages is in den tweeden

oogst al het maximum aan opbrengst bereikt; m.a.w. het NaCl vertraagt eerst, doch versnelt vervolgens den groei, zoodat weliswaar hetzelfde maximumgewicht, maar eerder dan in de contrôle, bereikt wordt. Daar het drooggewicht van de contrólereeks (0% NaCl) bij den tweeden oogst echter abnormaal laag is, is de laatste conclusie niet geheel gerechtvaardigd. Ook in deze proef is alleen 1% NaCl duidelijk nadeelig, ook op den langen duur.

TABEL 17

% NaCl	Proef met 0.02 % CaCO ₃			Proef zonder Ca		
	1 ^e oogst	2 ^e oogst	3 ^e oogst	1 ^e oogst	2 ^e oogst	3 ^e oogst
0	101	94	130	81	148	171
0.00001	74	134	142	67	141	147
0.0001	76	133	137	59	126	161
0.001	76	129	125	78	130	165
0.01	77	143	132	74	134	162
0.1	83	109	122	67	139	152
1.0	5	17	29	2	19	59

Van een antagonisme tusschen Ca en Na kwam intusschen niets te voorschijn: ten eerste was de schade door Na toegebracht niet duidelijk, en ten tweede trad er bij den eersten oogst juist alleen in de proef met Ca een schadelijke werking van Na op.

3. Magnesium en Calcium

Verschillende onderzoekers vonden de onmisbaarheid van Mg voor hun proefschimmels.

B u r o m s k y (1913) bijv. vindt een 24 maal zoo kleine opbrengst zonder Mg als met 0.25% MgSO₄ in de oplossing, waarin hij *Aspergillus niger* kweekt. Den geringen gunstigen invloed van 0.25% CaSO₄ verklaart B u r o m s k y als volgt: het Ca zou het Mg als base vervangen en dus door het vrijmaken van Mg de concentratie ervan verhoogen; en zelfs nog tusschen 0.25 en 0.5% MgSO₄ werkt concentratieverhooging gunstig; Ca werkt dus alleen gunstig via Mg.

Rabinovitz-Sereni (1933) constateert, dat *Penicillium glaucum*, *Botrytis cinerea* en *Alternaria tenuis* zonder Mg niet groeien; bij een zeer lage concentratie (minder dan 0.04% MgSO_4) heeft wel groei, maar late en geringe sporenvorming plaats, bij 0.5 en 1% MgSO_4 optimale groei, en bij nog hogere concentraties (tot 40%) geen schadelijke werking behalve die, welke door den hoogen osmotischen druk veroorzaakt wordt.

Door beurtelings verschillende elementen uit een complete voedingsoplossing weg te laten, vond ik, dat Mg ook voor *Ceratostomella ulmi* onontbeerlijk is. De complete oplossing („c”) bevatte:

0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	} a
0.5% KH_2PO_4	
10% saccharose	
0.02% FeSO_4	
0.02% ZnSO_4	
0.12% MgCO_3	
0.12% CaCO_3 .	

De opbrengsten (in m.g.) bedroegen:

Van „c”	na 16 dagen	110,	na 28 dagen	162
„ „a”	„ „ „	7,	„ „ „	5
„ „c”— FeSO_4	„ „ „	95,	„ „ „	171
„ „c”— ZnSO_4	„ „ „	50,	„ „ „	39
„ „c”— MgCO_3	„ „ „	5,	„ „ „	12
„ „c”— CaCO_3	„ „ „	69,	„ „ „	87

De afwezigheid van CaCO_3 veroorzaakt een aanmerkelijke vermindering van de opbrengst, maar die invloed is gering vergeleken bij dien van MgCO_3 ; het weglaten daarvan heeft hetzelfde effect als het gebruik van de oplossing „a”.

Met nog 4 andere isolaties werd hetzelfde resultaat verkregen bij Mg-gebrek:

Stam I	brengt op	11 m.g.	na 3 weken	(contrôle	98)
„ II	„ „	8	„ „ „	(„	96)
„ III	„ „	5	„ „ „	(„	57)
„ IV	„ „	5	„ „ „	(„	16)

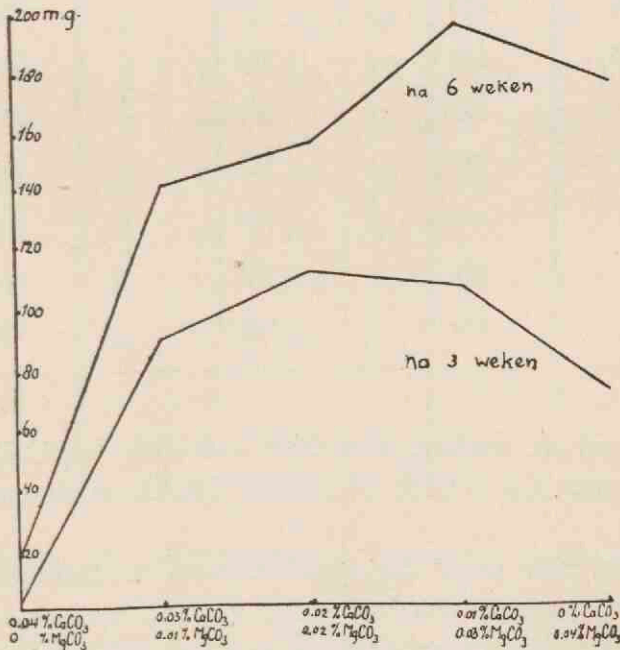
Een tweede proef laat den invloed zien van lagere concentraties dan die in de eerste werd gebruikt:

Zonder $MgCO_3$ was de opbrengst na 22 dagen gemiddeld 1 m.g.

Met 0.002% „ „ „ „ „ „ „ „	37	„
„ 0.01% „ „ „ „ „ „ „ „	26	„
„ 0.05% „ „ „ „ „ „ „ „	72	„
„ 0.1% „ „ „ „ „ „ „ „	86	„

Daar volgens sommigen Ca en Mg elkaars werking versterken, en er volgens anderen een antagonisme tusschen deze twee elementen bestaat (Rippel en Stoess, 1932), moet het gelijktijdige Ca-gehalte van de oplossingen in aanmerking genomen worden: in de eerste proef was 0.12%, in de laatste 0.012% $CaCO_3$ aanwezig.

Om te onderzoeken, of er zulk een antagonistische werking op *Ceratostomella ulmi* voorkwam, werden voedingsoplossingen gegeven met een totaal gehalte aan carbonaat van 0.04%, dat als



Figuur 5.

Vergelijking tusschen de opbrengsten, wanneer $MgCO_3$ en $CaCO_3$ in verschillende verhoudingen aanwezig zijn.

MgCO₃ en CaCO₃ in verschillende verhoudingen toegediend was. Het resultaat na 3 en 6 weken geeft figuur 5.

Rippel en Stoess vonden, dat gelijke hoeveelheden CaSO₄ en MgSO₄ elkaar compenseerden; dan zou dus hier bij ongeveer gelijke hoeveelheden MgCO₃ en CaCO₃ de hoogste opbrengst gevonden moeten worden. Dit is echter niet het geval: tusschen 0 en 0.03% MgCO₃ blijkt de Mg-concentratie den doorslag te geven. Alleen de daling in de lijnen tusschen 0.03 en 0.04% MgCO₃ zou op antagonisme kunnen wijzen. Om dat uit te maken moest in ieder geval 0.04% MgCO₃ vergeleken worden met een oplossing, die bovendien Ca bevatte. Daartoe werd de volgende proef genomen (zie tabel 18).

TABEL 18

% MgCO ₃	0 % CaCO ₃	0.02 % CaCO ₃	0.04 % CaCO ₃
0.001	125	141	154
0.005	128	156	170
0.01	122	167	126
0.02	126	157	150
0.03	144	184	167
0.04	161	184	184
0.05	134	171	167

Hierin werd de invloed van 0.001—0.05% MgCO₃ nagegaan, wanneer er geen Ca, 0.02% of 0.04% CaCO₃ in de oplossing aanwezig was.

In de tabel zijn weer die getallen, wier onderlinge verschillen verwaarloosd kunnen worden, door een accolade verbonden. In de laatste kolom komen onder deze getallen groote verschillen voor, maar, doordat er van deze series, die oorspronkelijk 8 erlenmeyers omvatten, eenige culturen wegens verontreiniging onbruikbaar geworden waren, werden de middelbare fouten naar evenredigheid

grooter; de verschillen konden dus schijnbaar grooter zijn, zonder dat zij op werkelijkheid berustten.

De conclusies, die uit de tabel getrokken mogen worden, zijn de volgende:

1. De gunstige werking van Ca is onafhankelijk van de $MgCO_3$ -concentratie tusschen 0.001 en 0.05%, en berust dus niet op antagonisme.

TABEL 19

MgCO ₃ -concentratie of aequivalent MgSO ₄	MgCO ₃				MgSO ₄ (andere isolatie)			
	0 % Ca		0.02 % CaCO ₃		0 % Ca		0.02 % CaCO ₃	
	na 4 weken	na 8 weken	na 4 weken	na 8 weken	na 4 weken	na 8 weken	na 4 weken	na 8 weken
0	0	4	1	13	10	5	8	8
0.00001 %	2	1	9	22	9	10	18	31
0.0001 %	0	38	12	20	9	26	8	21
0.001 %	7	28	1	27	37	68	39	120
0.01 %	16	56	19	55	46	69	49	129
0.05 %	27	44	11	82	—	—	—	—
0.1 %	16	71	24	79	66	125	76	132
0.5 %	28	—	20	—	—	—	—	—
1.0 %	—	—	—	—	17	106	11	51
10 %	—	—	—	—	0	3	3	1

2. Ongeacht het Ca-gehalte van de oplossing, werkt een verhooging van de concentratie van $MgCO_3$ gunstig op de ontwikkeling van *Ceratostomella ulmi*, d.w.z. de concentraties 0.03—0.05 zijn gunstig ten opzichte van 0.001—0.02%. De verschillen in opbrengst tusschen deze twee categorieën zijn echter niet te vergelijken met die, welke men bij het al of niet weglaten

van $MgCO_3$ te zien krijgt. In de tweede proef was trouwens ook reeds gebleken, dat 0.002% $MgCO_3$ al een tamelijk goede ontwikkeling toelaat.

Het was nu dus van belang om de minimale Mg-concentratie te zoeken, waarbij *Ceratostomella ulmi* nog kan groeien.

Daarom werd aan twee parallelle reeksen, waaraan geen, of 0.02% $CaCO_3$ was toegevoegd, 0.00001—0.5% $MgCO_3$ gegeven. De stam, waarmee de proef werd gedaan, leverde na 8 weken zelfs in de gunstigste oplossing een vrij lage opbrengst; hierom, en ook om een contrôle op de proef te hebben met een andere Mg-verbinding, werd er met een andere isolatie een proef met $MgSO_4$ aanzet. Om de vergelijking gemakkelijker te maken, werden hierbij concentraties van 0.000015, 0.00015%, enz. gebruikt, die in hun Mg-gehalte aequivalent waren met 0.00001, 0.0001% enz. $MgCO_3$. De resultaten geeft tabel 19.

Die getallen, waarin de gunstige werking van Mg duidelijk merkbaar is, zijn vet gedrukt. Het blijkt dan, dat de resultaten van de twee proeven ongeveer overeenkomen. Uiteraard is die invloed bij den stam, die hoogere opbrengsten levert, duidelijker te zien.

Die gunstige werking is blijkbaar onafhankelijk van de aanwezigheid van $CaCO_3$: pas, als er voldoende Mg aanwezig is, treedt vergroting van de opbrengst op, en dan ook meteen bevordering van den groei door $CaCO_3$. Dit pleit voor de opvatting van Buromsky, dat Ca gunstig zou werken door het vrijmaken van Mg. Een andere aanwijzing in die richting is het verschil na 8 weken tusschen de series met en zonder Ca, die 1.5% $MgSO_4$ gekregen hebben; deze hoeveelheid Mg is ongunstig, en een vermeerdering van het beschikbare Mg door de aanwezigheid van Ca zal dus ditmaal geen verhoogde opbrengst geven; inderdaad is bij deze Mg-concentratie de aanwezigheid van Ca ongunstig.

De conclusie uit deze proeven is, dat 0.0015% $MgSO_4$ de minimale concentratie is, die een goede ontwikkeling van *Ceratostomella ulmi* toelaat, terwijl de maximale concentratie bij meer dan 0.15% ligt, en afhankelijk van de aanwezigheid van Ca is.

Het leidingwater van de Utrechtsche Waterleidingmaatschappij bevat volgens de opgave van Mes (1930) 2.4 m.g. MgO per Liter, hetgeen overeenkomt met 0.0007% $MgSO_4$. Dit is de helft van bovengenoemde minimumconcentratie; het is dus begrijpelijk,

dat er in een oplossing in leidingwater, waaraan geen Mg is toegevoegd, toch nog eenige groei plaats heeft.

Bij de ongunstige concentraties in de buurt van het maximum (0.5% MgCO_3 of 1.5% MgSO_4 in bovengenoemde proeven) treedt een groote onregelmatigheid op tusschen de individueele culturen, zoodat de opbrengsten variëren van 0—125 (gemiddeld 28) en van 10—125 (gemiddeld 51). Dit is weer hetzelfde verschijnsel als bij de hooge phosphaatconcentraties werd geconstateerd.

TABEL 20

Mg	Ca	Zn	Opbrengst na 3 weken	Opbrengst na 6 weken
+	+	+	94	119
+	+	—	88	97
+	—	—	56	85
+	—	+	67	71
—	+	—	23	24
—	+	+	18	36
—	—	+	7	10
—	—	—	17	18

De invloed van Ca liet zich in deze proeven dus niet gelden bij een hoeveelheid Mg, die overeenkwam met 0.00015% MgSO_4 of minder. Toch zijn er bij een andere proef aanwijzingen verkregen, dat er ook bij afwezigheid van Mg een gunstige invloed van Ca kan optreden: van een complete voedingsoplossing (samenstelling: 0.02% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.25% KH_2PO_4 ; 0.25% K_2HPO_4 ; 0.02% CaCO_3 ; 0.03% MgSO_4 ; 0.002% ZnSO_4 ; 5% saccharose) werden beurtelings, en verder in alle mogelijke combinaties, de Ca-, de Mg- en de Zn-bron weggelaten. Het resultaat wordt weergegeven door tabel 20.

Het blijkt, dat er duidelijk drie rubrieken zijn (zie accolades),

die overeenkomen met resp. „-Ca”, „-Mg”, en „-Mg” en „-Ca”, waarbij de laatste nog duidelijk lagere opbrengsten geeft dan die, waarin alleen Mg ontbreekt. De culturen, waarin Mg ontbrak, hadden alle een rose kleur in hun gistsporen, die zeer duidelijk was, waar men ze in massa bij elkaar zag, maar in de enkele cellen onder het microscoop niet opviel.

Bij een soortgelijke proef, waarvoor als Mg-bron in plaats van MgSO_4 MgCO_3 gebruikt was, zag men den invloed van Ca niet zoo duidelijk, waarschijnlijk, doordat CaCO_3 in die proef niet het eenige carbonaat was. Inderdaad gaf een contrôle op de proef, die in de tabel is weergegeven, een verminderde opbrengst bij afwezigheid van $-\text{CO}_3$; wanneer n.l. de aequivalente hoeveelheid Ca als fosphaat werd gegeven, waren de opbrengsten na 3 en na 6 weken resp. 79 en 104 in plaats van 94 en 119. Het $-\text{CO}_3$ bleek het verlopen van de pH tegen te gaan: in plaats van tot 2.5 was die bij aanwezigheid van $-\text{CO}_3$ na 3 weken slechts tot 3.2 gedaald. Hiermee is de gunstige werking van het $-\text{CO}_3$ verklaard; maar daarnaast blijft toch ook nog de invloed van het Ca zelf bestaan, die dus niet alleen via Mg (Buromsky) tot uiting komt.

Het gedrag van *Ceratostomella ulmi* tegenover Mg komt in zoverre met dat van *Aspergillus niger* (Buromsky) en de objecten van Rabinovitz-Sereni overeen, dat er bij ontstentenis van Mg geen groei plaats heeft. De optimumconcentratie ligt echter aanmerkelijk lager dan bij 0.5 of 1% MgSO_4 , zooals Rabinovitz-Sereni opgeeft. De minimale Mg-concentratie, waarbij behoorlijke groei mogelijk is, ligt bij 0.0015% MgSO_4 , de optimale bij ongeveer 0.15%. Tusschen deze twee concentraties in heeft de aanwezigheid van 0.02% CaCO_3 een gunstigen invloed. Bij lagere concentraties, waarbij dus in ieder geval slechts een schamele ontwikkeling plaats heeft, heeft Ca ook nog een, zij het geringen, gunstigen invloed.

Van een antagonisme tusschen Mg en Ca, zooals dit soms blijkt uit de opheffing van den schadelijken invloed van Mg door Ca (Rippel en Stoess), was hier bij de schadelijke Mg-concentraties (1.5 en 15% MgSO_4) niets te zien.

4. IJzer en Zink

In de bekende voedingsoplossing van Richards (1897) is

een „spoor” FeSO_4 aanwezig, terwijl in zijn eigen proeven met variaties van de standaardoplossing bleek, dat toevoeging van 0.0005% ZnSO_4 de opbrengst van eenige schimmels (w.o. *Aspergillus niger*) al verhoogt, en 0.002% die verdubbelt. Sindsdien is er over den invloed van Fe en Zn op den groei van *Aspergillus niger* een groot aantal onderzoekingen verricht, waarvan ik slechts die resultaten wil vermelden, die in verband met het volgende van belang zijn.

In het algemeen is dan gebleken, dat Fe, maar vooral Zn, de structuur van de myceliumlaag beïnvloedt (M e t z, 1930): zonder Zn zijn de culturen bros. De giftigheid van een te hoge Zn-concentratie (waaronder ook reeds de concentraties 0.0001 en 0.001% ZnSO_4 vallen), wordt volgens R o b e r g (1928) opgeheven door de aanwezigheid van Fe. B o r t e l s (1929) meent, dat deze feiten verklaard worden door een antagonisme tusschen Fe en Zn; deze elementen zouden essentieel verschillende reacties katalyseeren: zoo bevordert Zn de N-stofwisseling, en den vegetatieven groei, Fe daarentegen de C-stofwisseling en de fructificatie.

In al deze gegevens over *Aspergillus niger* vond ik voldoende aanleiding om den invloed van Fe en Zn, en speciaal ook in onderling verband, na te gaan bij *Ceratostomella ulmi*.

In een proef, waarvan de contrôle Zn noch Fe bevatte, was 0.001% FeSO_4 van geen invloed op de opbrengst na 16 dagen, 0.01% ongunstig, terwijl er bij 0.1% heelemaal geen groei plaats had.

Bij de voedingsproef van blz. 60 kon Fe heel goed gemist worden, Zn daarentegen slecht. De culturen zonder Fe zagen er volkomen normaal uit, die zonder Zn waren geheel doorzichtig, en van een gelatineuze consistentie.

Dit uiterlijk is waarschijnlijk het gevolg van een lossere bouw van de cultuur, die het beste te vergelijken is met den verspreiden groei van de hyphen, dien men waarneemt, als de schimmel gekweekt wordt op een agar, die arm aan voedingsstoffen is.

Ook met een andere isolatie van *Ceratostomella ulmi* was het resultaat, dat het weglaten van Zn uit een oplossing, waarin 0.002—0.02% FeSO_4 voorkwam, een verminderde opbrengst gaf.

Ook hier trad in alle series een glazigheid van de schimmellaag op, die echter in de meeste culturen na 6 weken overwonnen was. Een tijd lang bevatte eenzelfde serie dus naast elkaar glazige en niet-glazige culturen, die gemiddeld bijv. resp. 55 en 173 m.g. drooggewicht hadden, en waarvan dus moeilijk een gemiddelde opbrengst bepaald kon worden. Uit het resultaat na 3 weken

TABEL 21

$\%$ FeSO_4	Zonder Zn	0.02 $\%$ ZnSO_4
0	69	67
0.002	46	95
0.005	53	86
0.01	56	69
0.02	41	78

spreekt echter al duidelijk, dat Fe bij afwezigheid van Zn niet gunstig werkt, en dus best uit de voedingsoplossing gemist kan worden (tabel 21). Wel was de verhouding tot de contrôlereeks (zonder Fe) met dezen stam iets anders, als er 0.02% ZnSO_4 aanwezig was: dan trad met 0.002 en 0.005% FeSO_4 een onmiskenbare stimuleering van den groei op, die echter na 6 weken weer ingehaald was door de contrôle.

Uit het feit, dat de contrôles van deze twee, tegelijk aangezette, series overeenkwamen (resp. 67 en 69, zie tabel 21), blijkt bovendien, dat Zn bij afwezigheid van Fe geen invloed heeft op het gemiddelde drooggewicht; de invloed van Zn op de structuur van de laag komt in de drooggewichten tot uiting in een kleinere variabiliteit: de middelbare fout van het gemiddelde was in de contrôlereeks met Zn 3 à 4 maal zoo klein als in die zonder Zn.

In een andere serie trad zulk een stimulatie door Fe bij aanwezigheid van Zn niet op; daar deed zich (na 8 weken) een toenemende remming door 0.002—0.05% FeSO_4 gevoelen:

Opbrengst van de serie zonder	FeSO ₄ :	133 m.g.
„ „ „ „ met	0.002% „ :	113 „
„ „ „ „ „	0.005% „ :	97 „
„ „ „ „ „	0.01% „ :	95 „
„ „ „ „ „	0.02% „ :	89 „
„ „ „ „ „	0.05% „ :	79 „

Bij deze proeven was als Zn-dosis steeds 0.02% ZnSO₄ gegeven. Om te weten te komen, of ook met lagere concentraties van ZnSO₄ de glazigheid van de culturen verhinderd kon worden, en in welke concentraties het eventueel schadelijk zou werken, werd de volgende proef genomen: bij series, die 3, 6 of 9% saccharose bevatten, werd 0.002—0.1% ZnSO₄ gevoegd. Door parallele proeven met verschillende suikerconcentraties zouden n.l. verschillen te voorschijn kunnen komen, die bij één bepaalde suikerconcentratie achterwege blijven. Niethammer (1927) vond immers, dat de groei van *Aspergillus niger* bij 5% saccharose door geen enkele ZnSO₄-concentratie gestimuleerd werd, terwijl er bij 10% saccharose wel stimulatie (n.l. door 0.005% ZnSO₄) optrad. Wellicht zou er dus ook hier bij een bepaalde suikerconcentratie stimulering kunnen plaats hebben, hoewel die bij 5% saccharose en afwezigheid van Fe niet geconstateerd was.

Het resultaat van deze proef geeft tabel 22 (opbrengst na 25 dagen).

Evenmin als bij 5% saccharose blijkt er dus bij 6% saccharose stimulatie plaats te hebben, wel echter bij de minder gunstige suikerconcentraties: 3 en 9%; deze blijven achter bij de reeks met 6%, tenzij 0.002—0.01% ZnSO₄ aanwezig is. Bij 3% saccharose stimuleert zelfs 0.1% ZnSO₄ nog, een concentratie, die in de andere series duidelijk remt. Ook Niethammer vond remming bij 0.1% ZnSO₄ en hogere concentraties.

Ceratostomella ulmi is dus niet zeer gevoelig voor hoge concentraties van ZnSO₄, als men deze resultaten vergelijkt met wat er over *Aspergillus niger* bekend is.

In de serie met 6% saccharose, die de gewone voedingsoplossing met 5% het meest nabij komt, is 0.01% ZnSO₄ al haast de hoogste concentratie, waarbij nog optimale groei plaats heeft. De in de vorige proeven gebruikte hoeveelheid van 0.02% is dus

rijkelijk hoog; in de normale voedingsoplossing voor de verdere proeven werd dan ook slechts 0.002% $ZnSO_4$ gebruikt. Deze concentratie bleek n.l. ook hoog genoeg te zijn om glazigheid van de cultuur te voorkomen.

Inderdaad bleek de schimmel zich dus hier, evenals *Aspergillus* bij Niethammer, in de minder gunstige suikerconcentraties anders te gedragen ten opzichte van de stimuleerende werking van Zn dan in de optimale concentratie.

TABEL 22

% $ZnSO_4$	% Saccharose		
	3	6	9
0	82	144	96
0.002	146	155	144
0.005	155	153	151
0.01	136	133	135
0.1	123	104	68

De percentages van stimulatie (0.002—0.01) en schadelijkheid (0.1) van $ZnSO_4$ komen voor een suikerconcentratie van 9% overeen met wat Niethammer voor 10% saccharose vond; ook komt het met haar resultaten overeen, dat er bij 6% geen stimulatie, wel echter de schadelijke werking van 0.1% $ZnSO_4$ optreedt.

Tegen mijn resultaten kunnen niet de argumenten gelden, die Roberg (1931) tegen Niethammer aanvoert, n.l. dat de suiker, die zij gebruikt, met Fe verontreinigd zou zijn, en dat daardoor pas bij een hoge suikerconcentratie stimulatie door Zn zou optreden. Bij de proef van tabel 22 is n.l. de stimulatie door $ZnSO_4$ niet evenredig aan de suikerconcentratie.

Kan er nu bij *Ceratostomella ulmi* van een antagonisme tusschen Fe en Zn gesproken worden?

Een schadelijke werking van Fe is zoowel bij aanwezigheid als bij afwezigheid van Zn geconstateerd, een stimulerende werking alleen bij aanwezigheid van ZnSO_4 .

Aan den anderen kant werkt Zn, althans bij suikerconcentraties van 5 of 6%, slechts stimulerend, als Fe aanwezig is.

Men zou dus kunnen zeggen, dat in die gevallen van stimulatie Zn (resp. Fe) een schadelijken invloed van Fe (resp. Zn) opheft. Dit is echter in het geheel niet bewezen, daar de factoren, die in het eene geval de stimulatie door FeSO_4 en in het andere de remming bepalen, nog niet bekend zijn.

Toch geeft het volgende een aanwijzing in de richting van antagonisme: uit een oplossing, die geen Fe bevatte, werd evenals bij de proef van blz. 60 0.02% ZnSO_4 weggelaten met een gunstig resultaat. Deze ZnSO_4 -concentratie was dus iets te hoog (zie ook tabel 22), tenzij er 0.002—0.02% FeSO_4 aanwezig was, zooals uit vergelijking met tabel 21 blijkt. Nu 0.02% ZnSO_4 dus op het randje van schadelijkheid blijkt te liggen, is ook de schijnbare tegenstrijdigheid der resultaten van het onderzoek naar een eventueel antagonisme tusschen Fe en Zn te begrijpen.

Bij een nader onderzoek zou bovendien vooral het verloop van de ontwikkeling in de verschillende oplossingen van belang zijn, speciaal ook in oplossingen met verschillende suikerconcentraties: één enkele oogst (tabel 22) geeft geen zuiver beeld van dat verloop, aangezien de culturen in de hoge suikerconcentraties hun maximum later bereiken dan in de lage.

De voornaamste conclusies omtrent den invloed van Fe en Zn zijn de volgende:

Voor een normale ontwikkeling van *Ceratostomella ulmi* is het toevoegen van Fe aan de voedingsoplossing niet noodzakelijk, van Zn daarentegen wel. Zonder Zn is de drooggewichtopbrengst zeer veel geringer, terwijl de schimmellaag doorzichtig en volumineus is, dus blijkbaar lossier van bouw.

Voor normalen groei is toevoeging van 0.002—0.02% ZnSO_4 geschikt, terwijl 0.1% meestal remt.

Voor een antagonisme tusschen Fe en Zn zijn hoogstens aanwijzingen gevonden.

5. Koper

Het is van algemeene bekendheid, dat Cu — meest in den vorm van kopersulfaat gegeven — een fungicide werking heeft. Daar aan den anderen kant gevonden is, dat het een oligodynamische gunstige werking uitoefent op verschillende fungi, lag het voor de hand ook de gevoeligheid van den veroorzaker van de iepenziekte ten opzichte van dat metaal na te gaan.

Ook in de proeven werd het als sulfaat aan de voedingsoplossing toegevoegd.

In de eerste plaats werd het in verschillende percentages bij moutextract gevoegd. De resultaten van twee proeven zijn samengevoegd in tabel 23; in beide werd de opbrengst na 3 weken bepaald.

TABEL 23

% CuSO ₄	1 ^e proef	2 ^e proef
0	157	132
0.001	173	—
0.01	200	127
0.02	—	44
0.05	—	0
0.1	0	—

In de eerste proef bleek de zône van schadelijke percentages juist overgeslagen te zijn, daar 0.001% zoowel als 0.01% CuSO₄ schijnbaar zelfs gunstig werkte. Uit berekening van de middelbare fout blijkt echter, dat het verschil tusschen 173 en 153 maar schijnbaar is; dat tusschen 200 en 157 is wèl werkelijk, zoodat slechts aan de concentratie van 0.01% een stimuleerende werking kan worden toegeschreven. Bij 0.1% bleek absoluut geen groei mogelijk. In de tweede proef werden de grenzen van de schadelijke zône nauwer getrokken: 0.01% gaf een normale, 0.02% een sterk verminderde, en 0.05% geen opbrengst meer.

Het feit, dat in de eerste proef 0.01% gunstigen invloed had, en in de tweede niet, kan door verschillen in de samenstelling van het moutextract verklaard worden.

Het was dan ook te verwachten, dat er in een synthetische voedingsoplossing andere uitkomsten gevonden zouden worden.

In de derde proef werd aan de oplossing (0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.1% KH_2PO_4 ; 0.012% MgCO_3 ; 0.012% CaCO_3 ; 0.002% ZnSO_4 ; 5% saccharose) 0.00005—0.1% CuSO_4 toegevoegd. Het resultaat, dat een tamelijk slecht groeiende stam daarmee opleverde, is in de eerste kolom van tabel 24 te zien.

TABEL 24

% CuSO_4	3 ^e proef 0.02 % Mg- en CaCO_3	4 ^e proef 0.02 % Mg- en CaCO_3		5 ^e proef 0.06 % MgSO_4	
	na 22 dagen	na 21 dagen	na 42 dagen	na 21 dagen	na 42 dagen
0	17	123	141	59	211
0.00001	—	112	158	67	176
0.00005	36	129	205	56	174
0.0001	41	114	207	64	241
0.0005	41	121	229	37	215
0.001	37	114	257	14	61
0.005	18	43	172	5	4
0.01	9	19	9	6	4
0.05	0	—	—	15	24
0.1	0	—	—	—	—

In de tabel zijn die bedragen, uit wier onderlinge verschillen geen conclusies getrokken mogen worden, door een accolade verbonden. Blijkbaar stimuleeren 0.00005, 0.0001, 0.0005 en 0.001% den groei in de eerste 3 weken, en ligt de grensconcentratie, waarbij nog geen groei plaats heeft, tusschen 0.01 en 0.05% CuSO_4 .

Dit komt dus overeen met wat er in moutextract gevonden werd.

De opbrengstgetallen zijn echter ook in de gunstigste series van de derde proef laag, en eer er conclusies uit dit resultaat werden getrokken, werd de vierde proef genomen met een stam van *Cerastomella ulmi*, die betere opbrengsten leverde. De oplossing, waarvan ik uitging, bevatte 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.25% KH_2PO_4 ; 0.25% K_2HPO_4 ; 0.02% CaCO_3 ; 0.02% MgCO_3 ; 0.002% ZnSO_4 ; 5% saccharose. Hierbij is na 3 weken (zie tabel 24) groeiremming bij de concentraties 0.005 en 0.01%, maar geen stimulatie te zien, zoals bij de derde proef gevonden was. Na 6 weken echter brengen de concentraties 0.00005, 0.0001, 0.0005 en 0.001% duidelijk meer op dan de controle. Op den langen duur werkt ook 0.005% niet meer remmend op den groei zoals in het begin. Bij 0.01% is daarentegen de groei na 3 weken al tot stilstand gekomen, zoodat het verschil in werking tusschen 0.005% en de dubbele hoeveelheid 0.01% CuSO_4 na 6 weken zeer groot is.

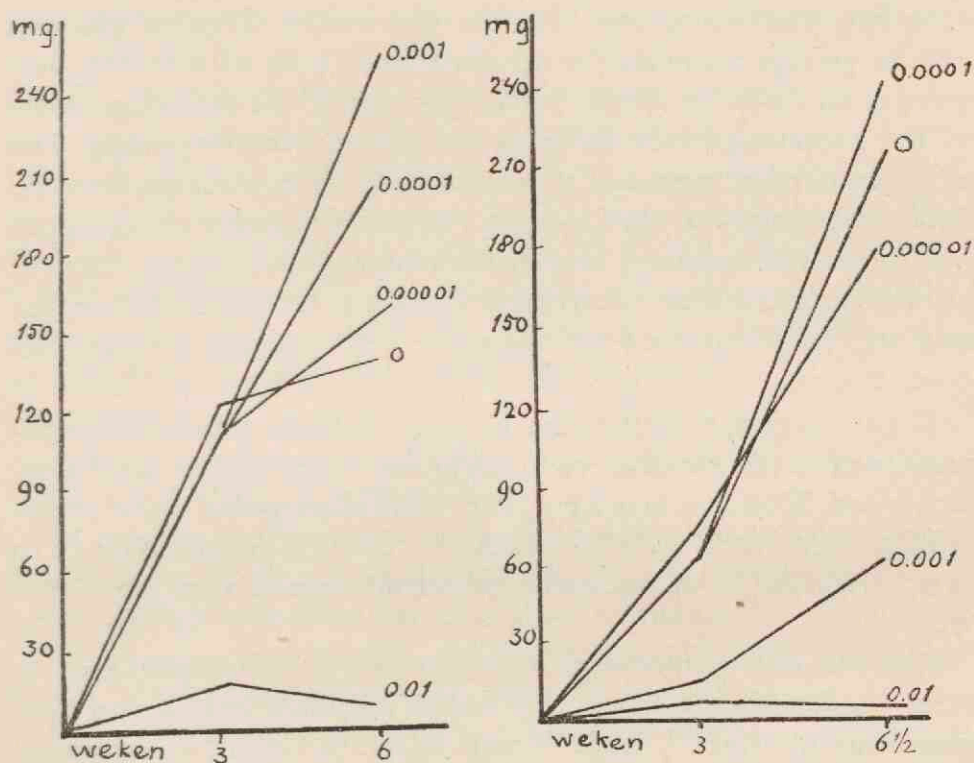
Hoewel met een andere isolatie gewerkt werd, en de concentraties der voedingsstoffen in de twee oplossingen eenigszins verschilden, komt, wat de schadelijke werking betreft, het resultaat van de vierde proef op hetzelfde neer als dat van de derde.

Daar in beide oplossingen zoowel het Mg als het Ca in den vorm van carbonaten aanwezig waren, was het waarschijnlijk, dat een deel van het Cu tot het slecht oplosbare CuCO_3 gebonden werd, en dus de werkzame hoeveelheid Cu, d.i. het aantal Cu-ionen afkomstig van het CuSO_4 , niet overeenkwam met het toegevoegde percentage CuSO_4 .

Om den invloed van dezen factor na te gaan, werd in de voedingsoplossing MgCO_3 door MgSO_4 vervangen, en vervolgens weer CuSO_4 in verschillende percentages toegevoegd. Het resultaat na 3 en 6 weken is, dat de schadelijke werking zich al bij resp. 0.0005 en 0.001% CuSO_4 laat voelen, terwijl dit in de vierde proef eerst het geval was bij resp. 0.005 en 0.01% CuSO_4 . De invloed van de binding van het koper door de oplossing moet zich dus evenals in de vierde ook in de derde proef en de proeven met moutextract hebben doen gelden.

Uit de vierde en vijfde proef, waarbij de opbrengst op twee tijdstippen bepaald werd, bleek, dat zoowel de optimale als de schadelijke concentraties zich gedurende de proef naar hogere CuSO_4 -percentages verplaatsen (zie figuren 6 en 7, waarin ter-

wille van de overzichtelijkheid de uitkomsten van telkens slechts vijf proefreeksen zijn weergegeven). Dit komt overeen met de resultaten van Schwartz en Steinhart (1931), n.l. dat door *Aspergillus niger* in de schadelijke concentraties (0.0001% CuCl_2 en hooger) het maximumdrooggewicht later bereikt wordt dan in de stimulerende concentraties van 0.000001% en 0.00001%.



Figuren 6 en 7.

Toevoeging van verschillende hoeveelheden CuSO_4 .

Fig. 6: 4^e proef; oplossing bevat 0.02 % MgCO_3 ; geënt uit cultuur van 24 dagen.
 Fig. 7: 5^e proef; oplossing bevat 0.06 % MgSO_4 ; geënt uit cultuur van 36 dagen.

Wanneer men het gedrag van *Ceratostomella ulmi* tegenover Cu vergelijkt met wat er in de literatuur over andere schimmels bekend is, dan blijkt in de eerste plaats een tamelijke onverschilligheid ten opzichte van de laagste concentraties. Dit geldt alleen niet voor de derde proef en de tweede periode van de vierde en vijfde proef; mogelijk kwamen slechts in die oplossingen Cu-ionen voor; de zuurgraad van de oplossing van de derde proef (6.1 in

plaats van 6.7) en van de beide andere oplossingen, nadat *Ceratomyxa ulmi* er reeds 3 weken op gegroeid had (± 3.4), zal meer Cu-ionen in oplossing houden, en dus eerder stimulatie mogelijk maken.

Daar de bestanddeelen van de overige voedingsoplossingen niet op hun Cu-gehalte werden onderzocht, is het ook mogelijk, dat geen van de series absoluut Cu-vrij was, en dus daardoor de stimulatie niet steeds aan het licht kon komen. Hiervan zou dan ook de geringe stimulatie in de vijfde proef zelfs na 6 weken, vergeleken bij die in de vierde, het gevolg zijn: in die oplossing, waarin het toegevoegde Cu in goed oplosbare vorm aanwezig kan zijn, kan ook het eventueel als verontreiniging in minimale hoeveelheden aanwezige Cu als Cu-ionen zijn stimulerenden invloed doen gelden, in een oplossing met veel carbonaat daarentegen zal een eventuele zeer kleine hoeveelheid Cu gauw gebonden zijn, en dus nog wel de gelegenheid tot stimulatie door hogere concentraties open blijven.

Door dergelijke verschillen en zeer geringe verontreinigingen vindt men in de literatuur vaak schijnbaar tegenstrijdige resultaten. Zoo vond Niethammer (1927), dat *Aspergillus niger* onverschillig was voor 0.00001—0.0001% CuSO_4 , terwijl Bortels (1929) 0.00001% de optimale concentratie noemt voor die schimmel.

Als men deze percentages vergelijkt met de overeenkomstige in tabel 24, dan blijkt althans na 6 weken stimulatie ook in veel hogere concentraties, n.l. 0.001¹⁾ resp. 0.0005% CuSO_4 op te treden. Wellicht zouden echter ook Niethammer en Bortels bij langer voortzetten van hun proeven tot andere resultaten zijn gekomen. Want ook in mijn proeven trad na 3 weken nog geen stimulatie aan den dag, en verschoof het optimum zoowel als schadelijkheid in de tweede periode duidelijk naar hogere concentraties.

Merkwaardig is in dit verband ook, dat er in de hoogste concentratie van de vijfde proef, n.l. 0.05% CuSO_4 , die in de derde proef in het geheel geen groei toeliet, volgens de vijfde proef wel groei mogelijk is, die vooral na langeren proefduur dien in 0.005 en

¹⁾ Het getal 172 van de serie met 0.005% CuSO_4 verschilt niet werkelijk van de controle (141), zoodat bij die concentratie niet van stimulatie gesproken mag worden.

0.01% duidelijk zichtbaar overtreft. Dat de giftwerking bij hogere concentraties van de giftige stof weer afneemt, is o.a. geconstateerd bij de werking van een mengsel van zoutzuur en alcohol op *Bacterium coli* (Lockemann en Ulrich, 1933). Iets dergelijks blijkt hier op te treden. Het mycelium nam in die serie een groenachtige kleur aan, maar zag er microscopisch volkomen normaal, n.l. Cephalosporium-achtig, uit; op agar of voedingsoplossing overgeënt, geeft het aanleiding tot een normale cultuur. Werd het op een versche oplossing met eveneens 0.05% CuSO_4 overgeënt, dan groeide de schimmel daarop veel sneller dan een overent uit de serie van dezelfde proef, die geen Cu bevatte, en wel even goed als op een oplossing, waarin geen Cu was, zoodat na 4 weken opbrengsten van 240 m.g. bereikt werden. Hier had dus een duidelijke aanpassing aan de CuSO_4 -concentratie van 0.05% plaats gehad. Of een geleidelijke aanpassing aan nog hogere concentraties, zooals Pulst (1902) dit voor *Penicillium spec.* constateerde, mogelijk was, werd niet nagegaan.

Samengevat zijn de resultaten van het onderzoek naar den invloed van CuSO_4 de volgende:

Bij geringe concentraties kan, afhankelijk van de verdere omstandigheden in de voedingsoplossing, die het vrijkomen van Cu-ionen regelen, stimulatie van den groei optreden.

Bij hogere concentraties, varierende naar diezelfde omstandigheden, wordt de groei geremd, tenslotte verhinderd.

Ceratostomella ulmi blijkt echter een zeker aanpassingsvermogen aan hoge concentraties te bezitten.

6. M a n g a a n

Over de werking van het element Mn op schimmels werd o.a. het volgende gevonden: Bertrand (1912) constateerde, dat *Aspergillus niger* geen sporen vormde in een voedingsoplossing, die geheel vrij van Mn was. Niethammer (1927) vond met 0.001—4% MnSO_4 eerst stimuleering van den groei van *Aspergillus niger*, indien de oplossing 10 of 20% saccharose bevatte; met 5% saccharose kon zij geen gunstigen invloed van Mn constateeren. Volgens Bortels (1929) ondervonden *Aspergillus niger* en *Citromyces* geen invloed van 0.02% MnSO_4 .

Of de toevoeging van Mn gunstige resultaten zou opleveren bij *Ceratostomella ulmi*, werd nagegaan door MnCO_3 aan de standaardoplossing toe te voegen (tabel 25). De stimuleering door 0.0001% MnCO_3 na 3 weken blijkt slechts schijnbaar te zijn, als de middelbare fouten van de getallen in aanmerking genomen worden; zelfs blijkt de correlatie tusschen het MnCO_3 -gehalte van de oplossingen en de opbrengsten 93—105—114 te klein (n.l. $+ 0.410$, middelbare fout 0.152) te zijn dan dat er conclusies uit

TABEL 25

% MnCO_3 in de eerste, % MnSO_4 in de tweede proef	Eerste proef		Tweede proef	
	na 3 weken	na 8 weken	na 3 weken	na 8 weken
0	93	126	102	119
0.00001	105	120	80	130
0.0001	114	125	99	132
0.001	102	114	93	130
0.01	111	117	103	150
0.1	154	160	90	150

getrokken mogen worden; 0.1% MnCO_3 is echter zonder twijfel gunstig, zooals in de opbrengsten na 3 zoowel als na 8 weken tot uiting komt.

Daar bij deze proef de gunstige werking ook aan het carbonaat zou zijn toe te schrijven, werd er een dergelijke proef genomen met MnSO_4 in plaats van MnCO_3 (tabel 25).

Ditmaal zijn er uit de getallen van den eersten oogst geen conclusies te trekken; bij den tweeden oogst echter blijken de series met 0.1 en 0.01% MnSO_4 gunstig af te steken tegen die met 0.001—0.00001% MnSO_4 en die op haar beurt tegen de contrólereeks.

De gunstige invloed van MnCO_3 is dus wel degelijk aan Mn toe te schrijven, daar MnSO_4 een dergelijken invloed uitoefent.

Waarschijnlijk zullen hogere concentraties dan er in deze proe-

ven gebruikt werden, schadelijk gaan werken; een aanwijzing daarvoor vond ik in series op minder gunstige voedingsoplossingen; daarbij was bijv. met 0.1% MnSO_4 het optimum al overschreden; een andere serie, waarvan de verdere oplossing 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.012% MgCO_3 , 0.012% CaCO_3 , 0.002% ZnSO_4 en 5% saccharose bevatte, leverde na 4 weken:

zonder Mn		45 m.g. opbrengst
met 0.000001% MnCO_3	47	„ „
„ 0.00001% „	82	„ „
„ 0.0001% „	79	„ „
„ 0.001% „	83	„ „
„ 0.01% „	46	„ „

Hier liggen de stimuleerende concentraties dus bij slechts 0.00001—0.001%.

Mn oefent dus zeker invloed uit op den groei van *Ceratostomella ulmi*; de resultaten waren echter niet van dien aard, dat dit element als vast bestanddeel van de voedingsoplossingen werd gebruikt.

7. Kwik

Onder de fungiciden nemen de Hg-verbindingen een belangrijke plaats in. In lage concentraties kunnen zij echter zelfs stimuleerend werken, zooals gebleken is bij de proeven van Butkewitsch en Orlov (1922): 0.001% HgCl_2 had nog een gunstigen invloed op den groei van *Aspergillus niger*.

Om na te gaan, of dit ook het geval was bij *Ceratostomella ulmi*, of dat deze schimmel een bijzondere gevoeligheid voor de schadelijkheid van sublimaat aan den dag legde, werd er HgCl_2 in percentages tusschen 0.000001 en 0.1% aan de standaardoplossing toegevoegd. De opbrengstgetallen na resp. 3, 6 en 9 weken geeft tabel 26.

Zoowel de getallenserie van de opbrengsten na 3 weken als die na 6 weken geeft een maximum bij 0.00001% HgCl_2 te zien.

Na 3 weken is het verschil van dat maximum met de opbrengsten van de series met 0.000001%, 0.0001% en die zonder Hg echter niet groot genoeg om er conclusies omtrent stimuleering uit te trekken; 0.001% HgCl_2 veroorlooft nog een geringen groei.

Uit de getallen, die de opbrengsten na 6 weken aangeven, mag echter wel besloten worden, dat 0.00001% HgCl_2 stimuleerend op den groei gewerkt heeft. Van 0.000001% is dit niet met zekerheid te zeggen, daar de opbrengst van die reeks, 108 m.g., niet voldoende van de eerste (94 m.g.), noch van de derde reeks (117 m.g.) verschilt, d.w.z. de middelbare fout van het verschil bedraagt daar meer dan $\frac{1}{3}$ van dat verschil. Ook van de correlatie (n.l. — 0.393) tusschen de opbrengsten 94—108—117 en het gehalte aan HgCl_2 was de middelbare fout te groot (n.l. 0.157) om er de conclusie uit te trekken, dat ook 0.000001% HgCl_2 al een gun-

TABEL 26

% HgCl_2	na 3 weken	na 6 weken	na 9 weken
0	79	94	115
0.000001	80	108	112
0.00001	88	117	112
0.0001	76	103	98
0.001	13	87	82
0.01	0	0	0
0.1	0	0	0

stigen invloed had. Tusschen de opbrengsten van de 3e, 4e en 5e reeks en de bijbehorende HgCl_2 -concentraties (0.00001, 0.0001 en 0.001%) bestaat echter een duidelijke negatieve correlatie (n.l. — 0.600, middelbare fout 0.117), zoodat men mag concluderen, dat de sterkste stimuleering bij 0.00001% plaats heeft en dat bij 0.0001% en 0.001% de stimulatie al plaats gaat maken voor den schadelijken invloed.

Bij 0.001% HgCl_2 wordt na 6 weken ongeveer dezelfde opbrengst geleverd als bij de contrólereeks; in de 2e periode van 3 weken is de groei hier dus pas goed op gang gekomen. In 0.01 en 0.1% HgCl_2 bleek echter ook op den langen duur geen groei mogelijk te zijn.

De opbrengsten na 9 weken bevestigen de conclusies, die in het voorgaande werden getrokken. In 0.001% HgCl_2 wordt een lager maximum bereikt dan in de standaardoplossing.

Inderdaad werd dus ook bij *Ceratostomella ulmi* stimulatie door HgCl_2 gevonden, en wel met zekerheid bij de concentratie van 0.00001% en misschien bovendien bij 0.000001% en 0.0001%.

Bij 0.001% HgCl_2 , de concentratie, die volgens *B u t k e w i t s c h* en *O r l o w* stimulerend op *Aspergillus niger* werkt, werd hier de groei aanvankelijk vertraagd. *Ceratostomella ulmi* blijkt dus iets gevoeliger te zijn voor de schadelijke werking van HgCl_2 dan *Aspergillus niger*.

G. Tannine

1. Literatuur

Onder de schimmels, waarmee proeven over tannine zijn gedaan, nemen de *Ceratostomella's* een bijzondere plaats in.

C o o k en *T a u b e n h a u s* (1911) constateerden, dat de hout-aantasters: *Ceratostomella cana*, *coerulea* en *piceae* resistenter ten opzichte van tannine waren dan de meeste schimmels. Er trad stimulatie van den groei op bij 0.025% en 0.05% tannine, remming pas bij 0.4—0.6% en stilstand bij 1%.

B a v e n d a m m's proeven (1928) over houtaantasters houden zich behalve met 31 andere ook met *Ceratostomella piceae* bezig. Deze vormde in zooverre een uitzondering op de andere onderzochte schimmels, dat er bij toevoeging van 2% tannine aan vleeschmout-agar nog een uitstekende ontwikkeling plaats had, terwijl voor de andere schimmels 2% ongeveer de grens van ontwikkelingsmogelijkheid aangeeft (wel groeiden alle schimmels nog bij 1% tannine).

Ceratostomella piceae is dus in den oorspronkelijken zin „tannophil”, daar n.l. de resistentie tegen tannine relatief groot is; in de beteekenis echter, die *B a v e n d a m m* aan dat woord geeft, is *Ceratostomella piceae* niet zoo zeker tannophil te noemen, daar de schimmel niet duidelijk een „Hof” om de kolonie heen vormt van de humine-achtige oxydatieproducten van de tannine, die zouden wijzen op een afscheiding van oxydase, zooals die optreedt

bij de zogenaamde corrosieschimmels, d. z. de ligninespecialisten.

Loos (1932) vindt, dat *Ceratostomella fagi* geen „Hof” vormt op tannine-agar. Daar deze *Ceratostomella* bovendien geen cellulose aantast, kan men deze soort noch bij de lignine-, noch bij de cellulose-specialisten onder de houtaantasters rangschikken.

De diverse soorten van het geslacht *Ceratostomella* gedragen zich dus zeer verschillend ten opzichte van tannine. Hoe *Ceratostomella ulmi*, die weer een heel andere biologie heeft dan de besproken *Ceratostomella*'s, op tannine zou reageren, was dan ook niet te voorspellen.

2. Eigen proeven

Om den invloed van tannine op den groei van *Ceratostomella ulmi* na te gaan, werden aan viermaal verdund moutextract 0.0005—0.1% tannine toegevoegd. De opbrengsten na 8 dagen ziet men hieronder. In al deze concentraties remt tannine den groei.

% tannine:	0	0.0005	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1
opbrengst in m.g.:	62	55	37	27	20	23	(20)

De mout, waaraan 0.1% tannine was toegevoegd, was na 8 dagen donkerbruin geworden, en liet een neerslag achter op het filtreerpapier, zoodat het getal 20 in de laatste kolom geen maat voor de werkelijke opbrengst is; er had n.l. in die serie nog slechts heel weinig groei plaats gehad. Wel wees die donkere verkleuring van de vloeistof op een oxydeerende werking van de schimmel op de tannine, zooals volgens B a v e n d a m m uit de „Hof”-vorming om de kolonies blijkt.

Met hogere concentraties tannine in moutextract, die de verkleuring nog duidelijker zouden moeten demonstreeren, n.l. 0.5, 1 en 2% werd echter geen resultaat, wat „Hof”-vorming betreft, bereikt, daar er absoluut geen groei in plaats had.

Om de resultaten beter met die van B a v e n d a m m en L o o s te kunnen vergelijken, werden ook culturen met moutagar aangezet. De gemiddelde diameters van telkens zes kolonies in petrischalen, werden hier als maat gebruikt voor de groeisnelheid na toevoeging van bepaalde percentages tannine:

% tannine:	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
Diameter in m.M.						
na 12 dagen:	67	60	55	47	25	1

Ook hier treedt dus bij alle concentraties groeiremming op. Al is die bij 0.01% tannine gering, toch is dit een heel ander resultaat dan Cook en Taubenhauß met de blauwrot veroorzakende *Ceratostomella*'s kregen, n.l. stimulatie bij 0.025—0.05%. Ook Bavendam's resultaat, dat *Ceratostomella piceae* nog uitstekend groeide op agar, die 2% tannine bevatte, verschilt hier wel sterk van.

Over de „Hof”-vorming valt het volgende op te merken.

Bij de hoogste concentraties van tannine (1%) zou een eventuele „Hof”-vorming het duidelijkst te constateeren moeten zijn; aangezien echter bij dit tanninegehalte de moutagar niet meer geheel stijf wordt, zooals ook Bavendam ondervond, was slechts bij één enkele schaal een kleine kolonie aan de oppervlakte gegroeid; die was inderdaad door een zeer donkere, bruine zône omgeven van nog niet begroeide mouttannineagar (die overigens, zooals Bavendam het uitdrukt, de kleur van „koffie met veel melk” had); terwijl de diameter van de kolonie ongeveer 5 m.M. bedroeg, was die van de verkleurde zône 17 m.M. Op den langen duur, n.l. na 23 dagen, bleek er ook in drie van de overige vijf schalen groei plaats te hebben. Door den slappen, half vloeibaren toestand van de agar was de uitbreiding van het erin wegzakkende mycelium niet te meten; aan de donkerbruine verkleuringen in den voedingsbodem met diameters van resp. 20, 15 en 15 m.M. was echter duidelijk te zien, dat er groei, althans oxydase-afscheiding plaats gehad had.

Ook bij de serie met 0.5% tannine was een donkere zône om de kolonie heen te zien; bovendien liep die zône duidelijk ook onder de schimmellaag door in de agar: als men de schalen van onderen bekeek, bleken de culturen ook daar zeer donker verkleurd te zijn.

Dezelfde verkleuring, hoewel zwakker, werd geconstateerd bij de concentraties van 0.1 en 0.05%. Daar Bavendam meedeelt, dat de „Hof” bij concentraties beneden 0.25% al onduidelijk wordt, is dit resultaat omtrent de oxydase-(tannase-)vorming

door *Ceratostomella ulmi* zeer zeker positief te noemen.

De conclusie hieruit is, dat *Ceratostomella ulmi* zeker geen „cellulosespecialist” is.¹⁾ Volgens B a v e n d a m m missen cellulosespecialisten n.l. het vermogen om den benzolkern van tannine aan te tasten en er door middel van tannase-werking de suiker aan te onttrekken, met achterlating van de donkere, humineachtige stoffen. Dit is het privilege van de „ligninespecialisten”, de z.g. corrosieschimmels, waarvan *Trametes radiciperda* en *Stereum rugosum* typische vertegenwoordigers zijn. Nu is *Ceratostomella ulmi* niet te rekenen onder „corrosieschimmels”, daar bij de iepenziekte geen vertering van hout optreedt, die eenigszins met die van de genoemde typische corrosieschimmels te vergelijken zou zijn. Wel zijn de wanden der iepenhoutvaten gevoelig voor de schimmel; de schadelijke werking van *Ceratostomella ulmi* bestaat immers in de eerste plaats in het veroorzaken van gomvorming in houtvaten en houtparenchym. Die werking laat zich echter alleen in de onmiddellijke nabijheid van de aangetaste houtvaten gelden, en plant zich niet horizontaal in het houtlichaam voort. De levenswijze van *Ceratostomella ulmi* is dan ook veel strenger parasitair dan van *Trametes* bijv.; *Ceratostomella ulmi* tast het iepenhout alleen aan in en gedurende den sapstroom naar de bladeren, en alleen in den jongsten jaarring.

Al is deze schimmel dus, wat tannine aantasting betreft, volgens B a v e n d a m m 's classificatie een „ligninespecialist”, toch kan men *Ceratostomella ulmi* bezwaarlijk onder de „corrosieschimmels” rangschikken.

Ceratostomella ulmi is, vergeleken bij andere, vroeger onderzochte *Ceratostomella*'s gevoelig voor de schadelijke werking van tannine. Een stimulatie van den groei werd bij geen concentratie geconstateerd; 1% tannine is ongeveer de hoogste concentratie, die door de schimmel verdragen wordt.

Ceratostomella ulmi geeft op mouttannine-agar aanleiding tot een duidelijke „Hof”-vorming, die volgens B a v e n d a m m wijst op oxydase-(i.c. tannase-)afscheiding, en zou dus volgens B a-

¹⁾ Hiermee is in overeenstemming, dat het mij niet gelukt is, deze schimmel in een synthetische oplossing cellulose te laten verteren (zie blz. 47).

v e n d a m m tot de corrosieschimmels gerekend moeten worden. Wat zijn levenswijze betreft, vertegenwoordigt *Ceratostomella ulmi* echter een heel ander type.

H. Groeibevorderende stoffen

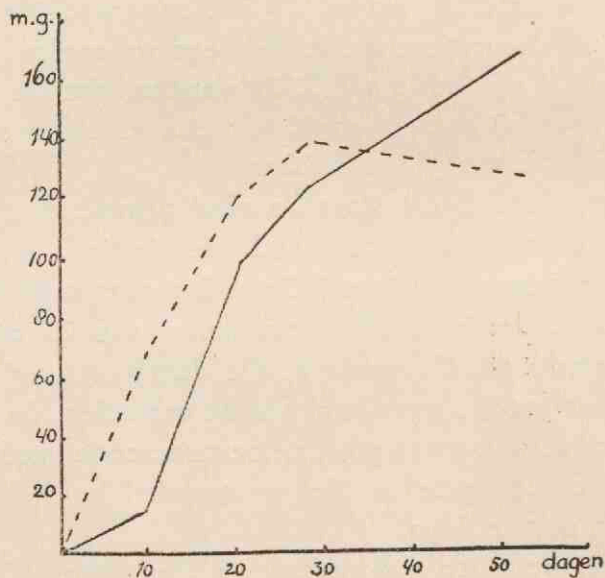
Bij het onderzoek naar de afhankelijkheid van den zuurgraad was aan den dag gekomen (zie blz. 25), dat er in reeds gebruikte cultuuroplossingen met $\text{pH} = 4$ of minder nog groei plaats had, indien ze na sterilisatie opnieuw met *Ceratostomella ulmi* werden geënt, terwijl er in een versche voedingsoplossing met een pH , die lager dan 5 was, geen ontwikkeling mogelijk was geweest. Hieruit werd de conclusie getrokken, dat de grenzen van den zuurgraad in die oplossing wijder konden zijn ten gevolge van de veranderde samenstelling ervan. Bij die samenstelling kunnen natuurlijk ook groeibevorderende stoffen een rol spelen; immers, ook Nielsen en Hartelius (1933) vonden, dat de kieming van *Aspergillus niger* bij aanwezigheid van een groeibevorderende stof bij een lagere pH kan plaats hebben.

Daar de stof, die *Ceratostomella ulmi* geproduceerd had, blijkbaar kookhitte kon verdragen (n.l. sterilisatie), werd een gebruikte oplossing ingedampt tot $1/3$ van het oorspronkelijke volume, en vervolgens 2 druppels tot 1 c.c. ervan aan 25 c.c. voedingsoplossing toegevoegd. De reeksen, die daarmee werden aangezet, groeiden echter precies even snel als de contrôles; de concentratie van de eventueel aanwezige groeibevorderende stof (hoogstens $1/8$ van de concentratie in de oorspronkelijke oplossing) was waarschijnlijk ook te laag.

Behalve met de eigen producten van *Ceratostomella ulmi* werd er ook een proef genomen met de groeibevorderende stof, die door de gewone gist wordt geleverd, n.l. bios.

De bios werd uit de gist bereid volgens de methode van Narayanan (1930), zoals die gewijzigd werd door Wassink (1934). Het product van deze bereiding (overeenkomende met „filtraat 3c” van Wassink), dat ondanks neutralisatie met KOH een zure lucht had, veranderde den zuurgraad van de voedingsoplossing niet, indien er 2 druppels van aan 25 c.c. werden toegevoegd.

Het verschil tusschen de reeksen met en zonder bios was na 3 dagen al heel duidelijk: toen was er in de culturen van de eerste reeks zonder uitzondering een ondergedoken myceliumvliesje gevormd, terwijl de contrôlereeksen niet zichtbaar gegroeid waren. Ook na 10 dagen, toen de eerste opbrengst bepaald werd, was het verschil zeer duidelijk; allengs werd dit echter genivelleerd, zoodat het verschil na 3 weken nog slechts uit de drooggewichten bleek. Na 6 weken was de verhouding zelfs omgekeerd geworden (zie figuur 8): de reeks met bios was al over haar maximum heen, terwijl de contrôle nog steeds toenam in gewicht. Dit is hetzelfde verschijnsel als Nielsen en Hartelius (1933) waarnamen bij *Aspergillus niger*, als er de z.g. groeistof B bij werd gevoegd: dan trad er veel eerder autolyse in dan anders.



Figuur 8.

Drooggewichten, verkregen in voedingsoplossing met (---) en zonder (—) bios.

CONCLUSIES

EVENTUEELE BESTRIJDINGSMOGELIJKHEDEN VAN CERATOSTOMELLA ULMI MET CHEMISCHE MIDDELEN

Zooals in de inleiding reeds werd betoogd, bestaat de kans, dat een onderzoek naar de gevoeligheden van *Ceratostomella ulmi* resultaten oplevert voor een directe bestrijding van de iepenziekte. Tevens werd er de nadruk op gelegd, dat een dergelijk onderzoek pas tot conclusies kan leiden, indien er van de physiologie van de schimmel reeds de voornaamste punten bekend zijn. Het doel van dit onderzoek was dan ook in de eerste plaats om die punten vast te leggen, voordat de invloed van fungiciden werd nagegaan. Daar, zooals ook in de literatuur is gebleken, de meeste giftstoffen in zeer lage concentraties stimulerend op verschillende organismen werken, kwamen er bij het nagaan van de stimulerende werking van bepaalde elementen in het milieu bekende giftstoffen ter sprake, en bleken omgekeerd stoffen, die op hun giftigheid voor *Ceratostomella ulmi* werden onderzocht, in sterke verdunning een gunstig bestanddeel van de voedingsoplossing te zijn.

Bij het beoordeelen van de mogelijkheid, die er bestaat, om op grond van de resultaten van dit onderzoek de iepenziekte te bestrijden, moet men in aanmerking nemen, dat de directe bestrijding van den parasiet niet zal kunnen bestaan in een eenvoudige bespuiting van de zieke (of gezonde) boomen, daar het middel de schimmel dan niet zal bereiken. Men moet daarom eerder denken aan een inwendige therapie, bijv. door inspuiting van de fungicide stof in de vaten van den iep. De eventueel toe te passen stof, die zeer schadelijk zou werken op *Ceratostomella ulmi*, mag dus aan den anderen kant in geen geval schade aan den iep toebrengen. Over de te verwachten resultaten kan dus niet geoordeeld worden, voordat er proeven in die richting zijn genomen.

Aan mijn proeven zijn geen positieve aanwijzingen voor een bruikbare stof te ontleenen. Weliswaar werken de meeste elementen in een bepaalde concentratie remmend op den groei, maar die concentratie is dan zoo hoog, dat er aan een toepassing daarvan binnen den iep niet te denken valt. Zoo werkte bijv. CuSO_4 , een stof, die ongetwijfeld sterk giftig voor den iep is, bij mijn proeven eerst in concentraties van ongeveer 0.01% zeer schadelijk op *Ceratostomella ulmi*; van HgCl_2 werd 0.001% nog verdragen; ook daarvan is 0.01% noodig om *Ceratostomella ulmi* buiten gevecht te stellen. Lagere concentraties van beide stoffen werken stimulerend, zoodat ook uit dat oogpunt toepassing ervan gewaagd zou zijn.

In deze richting bestaan echter nog vele mogelijkheden. Het zou aanbeveling verdienen, met de door mij gebruikte methode proeven te nemen over andere fungicide stoffen, bijv. met die kleurstoffen, wier invloed B o u d r u in agarbodems onderzocht.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Physiologie von *Ceratostomella ulmi* (Schwarz) Buisman, dem Erreger der bekannten Ulmenkrankheit, wurde hauptsächlich in synthetischen Nährlösungen studiert. Um darin einen möglichst hohen Ertrag zu erhalten, musste von jungen Kulturen ausgegangen werden, die bereits in synthetischer Nährlösung gewachsen waren. Um dem Wachstumsverlauf nachzugehen, wurde der Ertrag öfters gewogen.

1. Einfluss von Temperatur und Licht. Bei $8\frac{1}{2}^{\circ}$ C war des Wachstum schon ziemlich gut. Das Optimum lag bei 25° , das Maximum bei $\pm 34^{\circ}$ C. Besonders der Teil des Sonnenlichtes, der nicht durch gewöhnliches Glas absorbiert wird, wirkt fördernd auf die Bildung von Coremien.
2. Einfluss des pH. Jede Woche wurde das pH einiger Kulturen bestimmt und danach das pH der übrigen wieder auf das ursprüngliche Niveau gebracht. Das Minimum der gewöhnlich gebrauchten Nährlösung lag bei ± 5 , das Optimum zwischen 6 und 7 und das Maximum bei ± 8 . Die Grenzen des pH scheinen von der Zusammensetzung der Nährlösung abhängig zu sein. Bei Vorhandensein von Pepton in der Lösung war bei einem pH von 3.6 noch Wachstum möglich. Pepton nimmt überhaupt hinsichtlich des pH eine Sonderstellung gegenüber andern Stickstoffquellen ein, denn mit Pepton kann das pH während des Wachstums erhöht werden, während es mit andern N-Verbindungen stets saurer wird und erst nach Eintritt von Autolyse die Lösung alkalischer reagiert. Der stärkste Säuregrad, der je festgestellt wurde, war ein pH von 2.4.
3. Nährstoffe: Nicht nur das Verhältnis der Nährstoffe zueinander ist von Wichtigkeit, sondern ebenso ihre Gesamtkonzentration.

- C Als Kohlenstoffquelle wurde meistens 5% Saccharose gebraucht, da damit bereits nach 3 Wochen ein erheblicher Ertrag erhalten wurde. In 5% Glucose war der maximale Ertrag ungefähr der gleiche; aber in den ersten 3 Wochen blieben Kulturen mit dieser Kohlenstoffquelle hinter denen mit Saccharose zurück. *Ceratostomella ulmi* ist im stande als Kohlenstoffquelle auch folgende Stoffe zu verwerten: Maltose, Lactose, Galactose, Glycerin, Mannit und Stärke, wovon 5% stets eine günstigere Wirkung ausübt als 1%. Palmitin kann unter besonderen Umständen gespalten werden, Zellulose wird nicht angegriffen, Pepton ist als Kohlenstoffquelle auch unbrauchbar.
- N Sowohl NH_4 -Verbindungen als auch Asparagin und Pepton können als N-Quelle fungieren. Harnstoff jedoch ist eine schlechte N-Quelle und KNO_3 ist gänzlich unbrauchbar. Ferner wurde dem Einfluss der verschiedenen Metallionen auf das Wachstum nachgegangen.
- K ist von sehr grossem Einfluss, wenn es als 0.1% KH_2PO_4 oder als 0.001—0.01% K_2SO_4 zu der Nährlösung zugegeben wird.
- Na NaCl wirkte in einer Konzentration von 0.1% schädlich. Es war dabei jedoch nicht eindeutig, ob die schädliche Wirkung auf Na oder Cl beruhte. Eine antagonistische Wirkung zwischen Na und Ca war nicht erkennbar.
- Mg ist unentbehrlich. Einigermassen gutes Wachstum kam erst bei Anwesenheit von 0.0015% MgSO_4 zu stande. Die optimale Menge beträgt 0.15%.
- Ca hat günstigen Einfluss auf das Wachstum, vor allem, wenn die Mg-Konzentration zwischen obengenanntem Minimum und Optimum liegt. Antagonistische Wirkungen zwischen Mg und Ca wurden nicht gefunden.
- Zn hat sich als wichtig für die Struktur der Myzeliumschicht erwiesen. Ohne Zn-Zufuhr ist sie nämlich durchsichtiger und lockerer, als wenn sich 0.002—0.02% ZnSO_4 in der Lösung befindet. 0.1% ZnSO_4 hemmt das Wachstum meist deutlich.
- Fe gehört nicht zu den unentbehrlichen Metallen. Für eine antagonistische Wirkung gegenüber Zn sind höchstens Andeutungen vorhanden.
- Cu Geringe Cu-Konzentrationen (abhängig von der Zusammensetzung der übrigen Nährlösung), können stimulierend auf

das Wachstum wirken. Höhere Konzentrationen wirken hemmend, bzw. lassen kein Wachstum aufkommen. Der Pilz zeigt unverkennbar ein Anpassungsvermögen an hohe Konzentrationen.

- Mn Durch MnCO_3 und MnSO_4 liess sich eine stimulierende Wirkung feststellen. Die stimulierende Wirkung ist auch hier von der übrigen Nährlösung abhängig.
- Hg Niedrige Konzentrationen von HgCl_2 stimulierten *Ceratostomella ulmi*. Die maximale Konzentration liegt zwischen 0.001 und 0.01% HgCl_2 .
4. Tannine. Stimulierende Wirkungen durch Tannine waren nicht erkennbar. Die Maximalkonzentration beträgt 1%. *Ceratostomella ulmi* bildet einen deutlichen Hof auf Bierwürze-Tannine-Agar.
5. Wachstumsfördernde Stoffe. Die Zusammensetzung der Nährlösung kann während des Wachstums so verändert werden, dass das pH-Minimum erniedrigt wird. Ein wachstumfördernder Stoff, der dies verursachen könnte, liess sich nicht nachweisen. Mit Bios (s. Wassink) wird das Wachstum anfangs stark gefördert, aber durch Eintritt von Autolyse bleibt der Maximalertrag hinter dem der Kontrollen zurück.
6. Bekämpfungsmöglichkeiten mit chemischen Mitteln: Die hier ausgeführten Untersuchungen haben dafür keine Anhaltspunkte geboten, da die hemmenden Konzentrationen zu hoch liegen um für die Bekämpfung der Ulmenkrankheit in Betracht zu kommen, denn mit den zu verwendenden Mitteln würde sich ebenfalls eine sehr starke Beschädigung der Ulmen bemerkbar machen. Es besteht daher eher die Möglichkeit, dass andere Stoffe, die auf *Ceratostomella ulmi* hemmend wirken und die hier nicht untersucht worden sind, zur Bekämpfung der Ulmenkrankheit wirksam sein könnten.

LITERATUURLIJST

- BAVENDAMM, W., Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzzerstörender Pilze, II: Gerbstoffversuche.
1928, Centralbl. f. Bakt. u.s.w., Abt. II, Bd. 76, p. 172.
————— Ueber das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen.
1928, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh., Bd. 38, p. 257.
- BERTRAND, G., Sur le rôle capitale du manganèse dans la production des conidies de l'*Aspergillus niger*.
1912, C. R. de l'Ac. d. Sci. Paris, T. 154, p. 381.
- BORTELS, H., Biokatalyse und Reaktionsempfindlichkeit bei niederen und höheren Pflanzen.
1929, Zeitschr. f. Angew. Bot., Bd. 11, p. 285.
- BOUDRU, M., Quelques notes sur la biologie du *Ceratostomella ulmi* (Schwarz) Buisman, agent de la thylose parasitaire de l'orme.
1933, Bull. d. l'Inst. Agron. et d. Stat. d. Rech. d. Gembloux, T. 2, p. 310.
- BRINKMAN, A., De roodneuzenziekte van *Phaseolus vulgaris* L., veroorzaakt door *Pleospora herbarum* (Pers.) Rbh.
1931, Diss. Amsterdam.
- BUISMAN, C., *Ceratostomella ulmi*, de geslachtelijke vorm van *Graphium ulmi* Schwarz.
1932, Tijdschr. over Plantenziekten, Jaarg. 38, p. 1.
- BUROMSKY, J., Die Salze Zn, Mg und Ca, K und Na und ihr Einfluss auf die Entwicklung von *Aspergillus niger*.
1913, Centralbl. f. Bakt. u.s.w., Abt. II, Bd. 36, p. 54.
- BUTKEWITSCH, W. und ORLOW, Fr. W. G., Zur Frage nach den „ökonomischen Koeffizienten“ bei *Aspergillus niger*.
1922, Biochem. Zeitschr., Bd. 132, p. 556.
- COOK, M. T. and TAUBENHAUS, J. J., The reaction of parasitic fungi to the contents of the cells of the host plants, I: The toxicity of tannin.
1911, Delaware Coll. Agric. Exp. Sta., Bull. 91.

- JANCKE, O., Zur rechnerischen Auswertung von pH-Untersuchungen.
1931, *Phytopath. Zeitschr.*, Bd. 3, p. 335.
- JOHANNSEN, W., Elemente der exakten Erblchkeitslehre.
1909, Jena.
- LIMING, O. N., Present status of Dutch elm disease.
1932, *Phytopathology*, Vol. 22, p. 17.
- LOCKEMANN, G. und ULRICH, W., Alkohol-Säure-Gemische in ihrer keimtötenden Wirkung I.
1933, *Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh.*, Bd. 114, p. 584.
- LOEW, O., Ueber die physiologischen Funktionen der Ca- und Mg-Salze im Pflanzenorganismus.
1892, *Flora oder Bot. Ztg.*, Bd. 50, p. 368.
- LOHMANN, G., Nährstoffwirkung und Giftwirkung bei *Aspergillus niger*.
1934, *Arch. f. Mikrobiol.*, Bd. 5, p. 31.
- LOOS, W., Ueber eine buchenholzbewohnende *Ceratostomella*.
1932, *Arch. f. Mikrobiol.*, Bd. 3, p. 370.
- MEVIUS, W., Kalziumion und Wurzelwachstum.
1927, *Jahrb. f. Wiss. Bot.*, Bd. 66, p. 183.
- NARAYANAN, B. T., The chemical investigation of „Bios”, Part I.
1930, *Biochem. Journ.*, Vol. 24, p. 6.
- NIELSEN, N. and HARTELIUS, V., Investigations on the growth of *Aspergillus niger* at different hydrogen ion concentrations, with and without the addition of growth promoting substance B.
1933, *C. R. d. trav. du Lab. Carlsberg*, 19e Vol., p. 1.
- NIETHAMMER, A., Ueber das Gesetz vom Minimum bei Pilzkulturen.
1925, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 165, p. 168.
- Die Stimulationswirkung von Giften auf Pilze, und das Arndt-Schultzsche Gesetz.
1927, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 184, p. 370.
- PRINGSHEIM, E., Ueber den Einflusz der Nährstoffmenge auf die Entwicklung der Pilze.
1914, *Zeitschr. f. Bot.*, Bd. 6, p. 577.
- RABINOVITZ-SERENI, D., Ricerche sulla fisiologia dell' *Helminthosporium gibberosporum*.
1931, *Boll. R. Staz. d. Patol. Veg.*, N. S., A. 11, p. 244.
- Influenza del magnesio sullo sviluppo di alcuni funghi.
1933, *Boll. R. Staz. d. Patol. Veg.*, N. S., A. 13, p. 203.

- RAHN, O., Die Zersetzung der Fette.
1906, Centralbl. f. Bakt. u.s.w., Abt. II, Bd. 15, p. 56, p. 422.
- RAMSAY, G. B., and BAILEY, A. A., Effects of ultra-violet radiation upon Sporulation in *Macrosporium* and *Fusarium*.
1930, Bot. Gaz., V. 89, p. 113.
- REITSMA, J., Studien über *Armillaria mellea* (Vahl) Quéf.
1932, Phytopath. Zeitschr., Bd. 4, p. 461.
- RICHARDS, H. M., Die Beeinflussung des Wachstums einiger Pilze durch chemische Reize.
1897, Jahrb. f. Wiss. Bot., Bd. 30, p. 665.
- RIPPEL, K., Ueber die Wirkung von Fungiciden auf *Cladosporium fulvum* Cooke und die Aussichten einer chemotherapeutischen Bekämpfung des Pilzes.
1932, Arch. f. Mikrobiol., Bd. 3, p. 543.
- RIPPEL, A., und STOEISS, U., Ist Calcium ein für Mikroorganismen notwendiges Element?
1932, Arch. f. Mikrobiol., Bd. 3, p. 492.
- RITTER, G., Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze.
1909, Ber. d. D. Bot. Ges., Bd. 27, p. 58.
- ROBERG, M., Weitere Untersuchungen über die Bedeutung des Zinks für *Aspergillus niger*.
1931, Zentralbl. f. Bakt. u.s.w., Abt. II, Bd. 84, p. 196.
- SAVULESCU, T. et RAYSS, T., Influence des conditions extérieures sur le développement de *Nigrospora oryzae*, parasite de Maïs en Roumanie.
1932, C. R. Acad. d. Sci., T. 194, p. 262.
- SCHWARTZ, W. und STEINHART, H., Untersuchungen über die oligodynamische Wirkung des Kupfers, I. Teil.
1931, Arch. f. Mikrobiol., Bd. 2, p. 261.
- SIBILIA, C., La moria degli olmi prodotta da *Graphium ulmi* Schwarz.
1930, Boll. R. Staz. d. Patol. Veg., N. S., A. 10, p. 311.
- SIDERIS, C. P., Studies on the behavior of *Fusarium cromocephalon* in carbohydrates, glucosides, proteins, and various decoctions; with a discussion on the „isometabolic point“ of substances.
1925, Phytopathology, Vol. 15, p. 129.
- STEINBERG, R. A., A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*.
1919, Amer. Journ. Bot., Vol. 6, p. 330.
- Iron, Zinc and *Aspergillus*. A reply to H. Bortels.
1932, Zentralbl. f. Bakt. u.s.w., Abt. II, Bd. 86, p. 139.

WASSINK, E. C., Begrenzende Bedingungen bei der Atmung von
Phycomyces.
1934, Rec. d. Trav. bot. néerl., Vol. 31, p. 583.

STELLINGEN

I

Het aanpassingsvermogen van schimmels aan een ander milieu kan niet in het algemeen door „selectieve eliminatie” in den zin van Brierley verklaard worden.

II

Bij het bestudeeren van gebrekziekten van boomen moet men ook aandacht schenken aan het inbrengen van stoffen door injectie.

III

Het is waarschijnlijk, dat de ziekte, die den laatsten tijd het zee-gras aan de Atlantische kusten aantast, door een schimmel veroorzaakt wordt.

IV

De waarneming van Peyronel, dat in gescheurd weiland alle, en in langer bebouwde akkers slechts weinige tarwewortels mycorrhizaschimmels herbergen, levert geen argument voor zijn opvatting, dat het voorkomen van mycorrhiza verband houdt met de stikstofvoeding.

V

Het feit, dat Bodnár en zijn medewerkers een toename van reduceerende suikers constateeren in een bladrij van *Tropaeolum majus*, indien zij aan formaldehyddampen wordt blootgesteld, geeft geen steun aan hun theorie, dat die reduceerende suikers rechtstreeks van het formaldehyd afkomstig zijn.

VI

De critiek van Knudson op de proeven, die Rayner heeft gedaan over het steriel kweken van zaailingen van *Calluna vulgaris*, is niet gerechtvaardigd.

VII

Het verdient aanbeveling, in art. 49bis van de Internationale Regels der Botanische Nomenclatuur de zinsnede „à la téléutospore ou son équivalent” te vervangen door „à l'urédospore ou à la téléutospore (sporophyte)”, zooals door Arthur op het 5de Internationale Botanische Congres werd voorgesteld.

VIII

De voorstelling van Heller, dat de gal o.m. de beteekenis heeft om opname van onvolledig verteerde eiwitproducten in het organisme te voorkomen, is in tegenspraak met zijn meening, dat aan de gal de functie toegeschreven moet worden om bij zure reactie van den darminhoud de tryptische vertering mogelijk te maken.

19