

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION GRONINGEN.

Het voorkomen van een bacteriophage in de wortelknolletjes der Leguminosen

DOOR

F. C. GERRETSEN, A. GRIJNS, J. SACK en N. L. SÖHNGEN.

(Ingezonden 11 September 1923).

Binnen de wortelknolletjes van de Leguminosen worden de bacteriën op een tot nu toe onbekende wijze opgelost; de mogelijkheid bestond, dat deze oplossing geschiedde door tusschenkomst van een z.g.n. bacteriophage¹⁾.

Bij een onderzoek in deze richting werd het voorkomen van een bacteriophage in de leguminosenknolletjes door GERRETSEN en SACK (Afd. Microbiologie Rijkslandbouwproefstation) te Groningen en SÖHNGEN en GRIJNS (Microbiologisch Laboratorium Landbouwhoogeschool) te Wageningen onafhankelijk van elkaar vastgesteld. Een onderhoud over dit onderwerp deed ons besluiten de analoge en elkaar aanvullende resultaten gezamenlijk te publiceren.

Voor ons onderzoek werd uitgegaan van volwassen planten van klaver, lupinen en serradella; de knolletjes werden gedurende 15 min. gesteriliseerd met sublimaat (1 : 1000) en herhaaldelijk afgespoeld met alcohol en steriel water. Daarna werden ze met een steriel mes doorgesneden en de inhoud over een agarplaat uitgestreken of wel met een steriele pincet fijngeknepen en in de agar opgeschud.

De gebruikte voedingsbodems bestonden uit een extract van gekiemde groene erwten (of ook wel jonge klaverplanten) met 1½ pct. agar of 12 pct. gelatine, zwak alcalisch gemaakt t.o. van phenolphthaleïne. Daarnaevens werd met goed gevolg gebruik gemaakt van een oplossing van manniet 1 pct., NaNO₃ 0,05 pct.,

¹⁾ Zooals bekend bestaat het zgn. Twort-d'Herell'sche phenomeen daarin dat bepaalde bacteriën, zoowel in cultuurvloeistof als op de plaat uiteenvallen en geheel in oplossing gaan; het lytische agens is filtreerbaar en door d'Herelle wordt verondersteld dat het een levende ultramicrobe is, (Bacteriophage), die onder zekere voorwaarden de bacteriën aantast en oplost.

K_2HPO_4 0,05 pct. in leidingwater, al of niet gestold met $1\frac{1}{2}$ pct. agar.

In het algemeen komen op deze voedingsbodems de koloniën regelmatig op; wel viel het op, dat somtijds rondom stukjes van het knolletje een steriel veldje van 1 à 2 c.M. middellijn ontstond. Daar deze veldjes achterwege bleven, wanneer *niet* met sublimaat was gesteriliseerd, is hier van een bacteriophagwerking geen sprake en is het waarschijnlijk dat ook bij uiterst zorgvuldige afwassing een gedeelte van de sublimaat door den celwand geadsorbeerd wordt, welke sublimaat echter in aanraking met een ander colloid, i. c. agar of gelatine, weer wordt afgestaan. Ook is het niet waarschijnlijk dat in de wortelknolletjes in het algemeen de bacteriophag in zeer geconcentreerden toestand voorkomt, daar noch het extract van lupineknolletjes op een plaat met *Bac. Radicicola lupine* een oplossingveld doet ontstaan, noch een extract van klaverknolletjes op een plaat met *Bac. rad. klaver* den groei ook maar eenigszins belemmerde.

Ter verkrijging van de bacteriophag werden de knolletjes, na sterilisatie, fijngewreven in een steriel mortier en gemengd met voedingsvloeistof. Na een vijftal dagen werd de troebele vloeistof door een bougie gefiltreerd, van het heldere filtraat eenige c.c. gevoegd aan nieuwe cultuuroplossing en deze geënt met de betreffende bacterie. Dit werd een keer of tien herhaald, soms meer, terwijl telkenmale de hoeveelheid filtraat, die aan de vloeistof werd toegevoegd, verminderd werd, zoodat ten laatste nog slechts enkele platinadraad-oogjes vol gebruikt werden.

In den loop van het onderzoek bleek, dat herhaalde malen filtreren en cultiveeren de zekerste weg is om krachtige werkzame bacteriophagen te krijgen.

Werd nu van de bacteriophaghoudende vloeistof een weinig gebracht in een voedingsoplossing, die met *Bac. rad.* geënt was, dan werd meestal na eenige dagen de vloeistof troebel om eerst daarna op te helderen (fig. 1).

Van het tijdstip van enten totdat een goede lyse plaats gehad had gingen gewoonlijk tien dagen heen.

Soms gebeurde het echter dat in de vloeistof, waaraan de bacteriophag was toegevoegd, na enting met de betreffende bacteriën, geen groei meer plaats had. Ook was het in een aantal gevallen mogelijk om goed gegroeide oudere cultures door toevoeging van de bacteriophag geheel in oplossing te brengen. Kenmerkend, vooral in het laatste geval, is het strooprige worden van de vloeistof na de lyse.

Ter aantooning van de bacteriophag kregen wij in de meeste gevallen een beter en sneller resultaat door de bacteriophaghoudende vloeistof uit te strijken op een agarplaat en hieroverheen met de bijbehorende bacterie te enten. De met de bacteriophag bestreken plaatsen bleven dan steriel, zooals uit de foto duidelijk blijkt (fig. 2).

Het was van belang te weten of de bacteriophag, verkregen

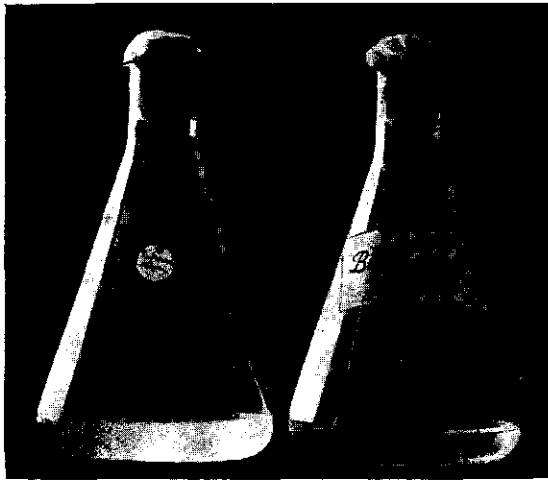


Fig. 1. — Cultuur van *Bac. radicicola* klaver in manniet
nitraat leidingwater. Links zonder bacteriophage
rechts met bacteriophage, na afloop der lyse.

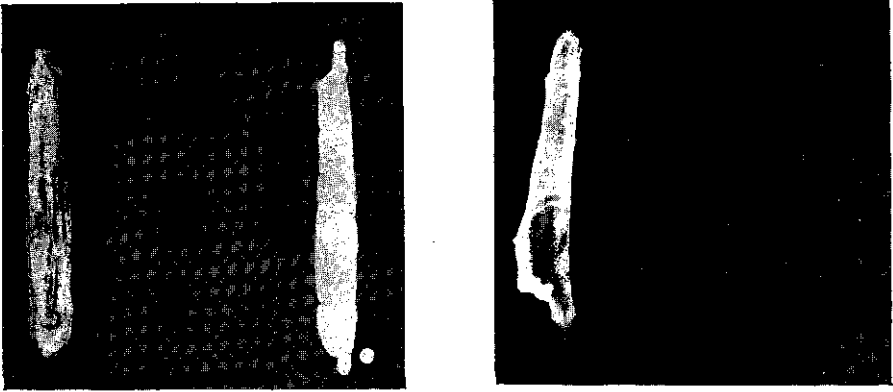


Fig. 2. — Cultuur van *Bac. rad.* uit lupinen en serradella. Links normaal, rechts nadat de plaat met de serradella bacteriophage bestreken is. Hier groeit de serradella bacterie niet meer, wel de lupine bact.

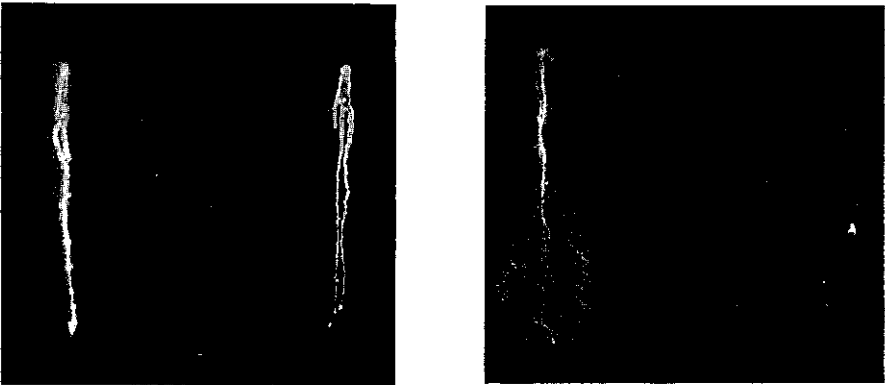


Fig. 3. — Cultuur van twee verschillende stammen van *Bac. rad.* serradella. Links normaal. De rechtsche plaat is met een bacteriophage bestreken. De bijbehorende stam groeit niet, de andere stam groeit ongestoord.

uit een bepaalde leguminose, ook lytisch werkt op de bacteriën van andere leguminosen. De serradellabacteriophraag werd onderzocht t.o. van de bacteriën van lupinen, wikke, erwten, duivenboonen, klaver en esparcette, maar van een oplossende werking was niets te bespeuren (fig. 3).

De *Bac. rad.* uit boonen werd daarentegen door de klaverbacteriophraag langzaam aangetast, die uit lupinen niet. Evenmin werkte de bacteriophraag uit de lupinen op *Bac. rad.* uit klaver en boonen. Ook *Bac. coli*, *Azotobacter chroococcum*, *Radiobacter*, *Bac. fluorescens liq.* en *Bac. violaceus* werden geen van alle door de lupinen- of klaverbacteriophraag aangetast.

Wij zien hier dus een sterk uitgesproken specificiteit, die nog duidelijker uitkwam bij de volgende proef. Ten einde n.l. onze serradellabacterie te vergelijken met een van andere herkomst was een reïncultuur aangevraagd uit PRIBAM's (voorheen KRAL's) verzameling te Weenen.

De ontvangen cultuur groeide heel slecht, wat het vermoeden deed ontstaan dat zij reeds een bacteriophraag bevatte. Na overenting in cultuurvloeistof en herhaaldelijk filtreren bleek dit inderdaad het geval te zijn¹⁾.

Het merkwaardige was echter, dat de bacteriophraag afkomstig uit deze reïncultuur niet lytisch werkte op de door ons geïsoleerde serradellabacterie en omgekeerd onze bacteriophraag niet op de serradella van PRIBAM. Een dergelijke specifieke werking van de bacteriophraag t.o. van verschillende stammen van dezelfde bacteriënsoort vinden wij o.a. ook bij KUTTNER²⁾ en JANSEN en WOLFF³⁾, waar de typhusbacteriophraag groote verschillen in werkzaamheid vertoonde t.o. van typhusbacteriën van verschillende herkomst.

In verband met het voorkomen van de knolletjesbacteriën binnen het celweefsel van de plant was het van belang te weten in hoeverre de bacteriophraag in staat zou zijn door een membraam heen te diffundeeren. Hiertoe werd een weinig van de bacteriophaghoudende vloeistof in een collodiumzakje gedaan en dit gehangen in een buisje met gedestilleerd water, dat zwak alcalisch was gemaakt en waaraan wat lactose was toegevoegd om te voorkomen dat er een te groot verschil in osmotischen druk tusschen de vloeistof binnen en buiten het collodiumzakje zou bestaan.

¹⁾ Tal van andere onderzoekers (o.a. BAIL, Wiener Klin. Wochenschr. 34, blz. 447-449, OTTO en MUNTER, Deutsche Med. Wochenschr. 47, blz. 1579 KUTTNER, Journal Bact. VIII, blz. 81) isoleerden bacteriophagen uit oude zoowel als jonge reïnculturen. Het komt ons voor dat men hieruit in geen geval besluiten mag dat de bacteriophraag ontstaat uit de bacteriën zelf en de aanname van d'Hérelle, dat het een ultramicrobe is, overbodig is. Integendeel, wanneer het een ultramicrobe is, spreekt het vanzelf dat het even lastig is een bacterie bacteriophag-vrij te krijgen, als een hooger organisme bacterievrij. Ook de door KUTTNER (i.e. blz. 99) voorgeslagen cultuur uit één cel geeft enkele garantie dat daarop geen bacteriophraag aanwezig is.

²⁾ Journal. Bact. VIII, blz. 94.

³⁾ Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. Jaarg. 1922, blz. 1320.

Het bleek dat alleen bij gebruik van zeer dunne collodiumzakjes de bacteriophag naar buiten diffundeerde, terwijl door een dikkeren wand alles werd tegengehouden. Dit is in overeenstemming met de onderzoekingen van D'HERELLE¹⁾, die vond dat de bacteriophag slechts collodiummembranen kon passeeren, welke voor eiwitmoleculen doorlatend zijn. De mogelijkheid dat deze bacteriophag door dunne celwanden heengaat is hiermede aangetoond, zoodat het niet uitgesloten is dat men de bacteriophag ook vindt in de plant zelf op plaatsen waar geen bacteriën aanwezig zijn. Het bleek inderdaad mogelijk om de bacteriophag te isoleeren uit de wortels van klaverplantjes, waarvan de knolletjes zorgvuldig waren verwijderd, terwijl de wortels met sublimaat en alcohol waren gesteriliseerd. Ook was het mogelijk om de bacteriophag uit de stengels te halen, waarbij drie van de zeven proeven positief uitvielen. Met de bladeren waren alle zes proeven negatief. Wanneer in den celwand en binnen in de cel eenmaal de bacteriophag aanwezig is, dan is het aannemelijk dat deze voor de betreffende bacteriën onaantastbaar is geworden (vooral ook gezien de resultaten van de afstrijkingsproeven in fig. 2). Tevens kan dit wellicht een verklaring zijn voor het feit dat niet het geheele wortelstelsel door de bacteriën wordt aangestast, doch deze zich slechts plaatselijk kunnen ontwikkelen.

Ook kan de bacteriophag geïsoleerd worden uit cultuurgrond (tuin- en akkergrond) mits een hoeveelheid van minstens 100 gram in bewerking werd genomen. Met heide- en boschgrond waren alle zes proeven negatief.

Het is waarschijnlijk dat de aanwezigheid van de bacteriophag in den grond direct verband houdt met het al of niet aanwezig zijn van *Bac. rad.* In hoeverre de sterke specificiteit van deze bacteriophag een bezwaar zal zijn om uit haar aanwezig zijn in den grond indirect tot de aanwezigheid der betreffende leguminoscbacterie te kunnen besluiten, moet nog door nadere proeven worden uitgemaakt.

In dit verband was het van belang na te gaan of de bacteriophag tegen uitdrogen bestand is. Een hoeveelheid bacteriophaghoudende vloeistof werd in een reep filtreerpapier opgezogen. Om te voorkomen dat bij het opdrogen de concentratie van de aanwezige zouten zóó hoog wordt, dat hierdoor de bacteriophag geschaad wordt, werd het filtreerpapier met een punt in gedestilleerd water gehangen, waarbij heel langzaam een deel der zouten uit het papier diffundeerde. Eerst daarna werd het papier in den exsiccator boven chloorcalcium gedroogd. De bacteriophag behoudt gedroogd zijn werkzaamheid gedurende minstens twee maanden. Ten slotte werd nog nagegaan hoe de bacteriophag zich gedraagt zoowel t.o. van verwarming als t.o. van bestraling met ultra violet licht.

¹ *Der Bacteriophage*, 1922, blz. 81.

Ter bepaling van de temperatuur, waarbij de bacteriophag haar werkzaamheid verliest, werd de bacteriophaghoudende vloeistof in dunwandige capillaire buisjes opgezogen; nadat deze waren dichtgesmolten werden zij geheel in water van bepaalde temperatuur gedompeld. Het bleek dat de serradella-bacteriophag haar werkzaamheid verliest, wanneer zij gedurende een half uur bij 60° verhit is geworden. Deze temperatuur is betrekkelijk laag vergeleken bij die, welke andere onderzoekers opgeven. Zoo geeft D'HERELLE¹⁾ aan dat nog 65° verdragen wordt, DAIVISON²⁾ verwarmt tot 67°, terwijl ook de klaver- en lupinen-bacteriophagen tegen hoogere temperatuur kunnen en een verwarming tot op 65° gedurende 15 min. kunnen verdragen.

De invloed van de bestraling met het U. V. licht werd op twee wijzen nagegaan, n.l. op agarplaten, welke met bacteriophaghoudende vloeistof bestreken waren en in vloeistofcultures. De platen werden op 30 c.M. afstand van de kwartslamp (4 Amp. 220 V. Heraeus) aan het ultra violette licht blootgesteld gedurende 5, 15 en 30 minuten en daarna bestreken met een serradellacultuur. Op geen der platen had groei plaats, waaruit blijkt, dat in dezen tijd de bacteriophag nog niet door de bestraling had geleden. Ten overvloede werd nog nagegaan of er in de platen tengevolge van de bestraling geen chemische stoffen gevormd waren, die voor de bacteriën schadelijk waren, hetgeen niet het geval bleek.

Verder werd de bacteriophaghoudende vloeistof in een dunne laag aan het U. V. licht blootgesteld gedurende 15 en 30 min. Hiertoe werd in een kwartsbuisje een tweede buis van glas gedaan, zoodat tusschen beide buizen slechts een ruimte van enkele millimeters overbleef, welke met bacteriophaghoudende vloeistof gevuld werd.

Daar op deze wijze slechts de voorste helft van de vloeistofkolom bestraald werd, werd de buis geregeld gedraaid en de belichtingstijd voor de helft in rekening gebracht.

Daar de bestraling gedurende 30 min. de bacteriophag niet schaadde, werd de proef herhaald met een langere belichting. Hierbij bleek dat na twee uur (netto) bestraling de bacteriophag nog intact was, doch na twee en een half uur onwerkzaam was geworden.

Ook GILDEMEISTER³⁾ geeft aan dat de door hem onderzochte bacteriophag, welke op een afstand van enkele centimeters van de lamp gedurende 30—40 min. bestraald werd, soms nog werkzaam was. Vergelijken wij dit met de resistentie van bepaalde enzymen, dan blijkt dat naar gelang van hun aard de gevoeligheid dermate uiteenloopt, dat uit den tijd, waarin de bacteriophag haar werkzaamheid verliest, geen conclusies te trekken zijn aan-

¹⁾ l. c. blz. 15.

²⁾ Journ. Bact. Vol. VII, blz. 482.

³⁾ Jour. Bact. VIII, blz. 99.

gaande het al of niet enzymatisch karakter. Wel is het merkwaardig dat de bacteriophage na twee uur bestraling nog onveranderd is, terwijl de serradellabacteriën zelf reeds binnen 15 minuten gedood zijn.

Volgens KUTTNER¹⁾ zou de bacteriophage een autolysine zijn, waardoor het evenwicht tusschen de opbouwende en afbrekende krachten in de cel ten gunste van de laatsten verstoord zou worden. De cel lost dientengevolge op en er komt op die wijze steeds meer autolysine vrij.

Bij de bestraling met het U. V. licht blijkt de reproductie — d. i. de opbouwende functie — veel gevoeliger te zijn dan de bacteriophage (of het z.g.n. autolysine) en het ligt alzoo voor de hand dat na de bestraling de bacteriën, waarin dus de opbouwende functie verstoord is en het autolysine intact is gebleven, door dit autolysine na korteren of langeren tijd worden opgelost²⁾. Daar dit niet het geval is, komt het ons voor dat de theorie van KUTTNER niet houdbaar is. De theorie van L'HERELLE daarentegen, waarbij de bacteriophage beschouwd wordt als een ultramicrobe, die slechts onder bepaalde voorwaarden zich in, liefst jonge, levende microben ontwikkelt, is met het bovenstaande niet in strijd.

Resumé.

Uit de wortelknolletjes van klaver, lupine en serradella werd bacteriophagen geïsoleerd en daarmee mogelijk een verklaring gevonden voor de wijze, waarop binnen de wortelknolletjes de bacteriën in oplossing worden gebracht.

Deze bacteriophagen zijn zeer specifiek in hun lytische werking; zij tasten in het algemeen slechts de bacteriën aan, die de wortelknolletjes van de betreffende leguminosen vormen.

De bacteriophagen werden ook geïsoleerd uit de wortels en de stengels der leguminosen, niet echter uit de bladeren.

Uit tuin- en akkergrond, niet uit heide- en boschgrond konden de leguminosenbacteriophagen geïsoleerd worden.

De bacteriophagen zijn, naar gelang van hun soort, bestand tegen verhitting gedurende 15 min. op 60°—65°, zijn bestand tegen uittroeven en passeeren dunne collodiumhuidjes.

De resistentie van de bacteriophagen t.o. van ultra violet licht is minstens achtmaal grooter dan van de betreffende bacteriën.

1) Jour. Bact. VIII, blz. 99.

2) De autolyse van celweefsels wordt volgens OPPENHEIMER, (die Fermente 1913 blz. 504) zoowel door radium als Röntgen bestraling bevorderd.