

INSTITUUT VOOR PHYTOPATHOLOGIE.

DE ROTTING DER TOMATEN-VRUCHTEN. VEROORZAAKT
DOOR PHYTOBACTER LYCOPERSICUM N. SP.,

DOOR

J. GROENEWEGE,

in 1911 adsistent van het Instituut voor Phytopathologie.

In den zomer van 1911 kwamen aan het Instituut voor Phytopathologie te Wageningen herhaaldelijk inzendingen van tomatenvruchten, die, gewoonlijk op de vroegere inplantingsplaats van den stijl, een enkele maal ook op andere plaatsen, een bruine, rotte plek vertoonden.

Te oordeelen naar den graad der aantasting bij verschillende vruchten, schijnt de rotting, van een bepaalde plaats uitgaand, zich kringvormig uit te breiden, en het daaronder gelegen weefsel gaat inzinken. Wordt de vrucht overlangs doorgesneden, dan blijkt de rotting reeds vrij ver te zijn doorgedrongen.

Bij mikroskopisch onderzoek treft men in het aangeaste weefsel alleen bacteriën aan. Is de vrucht reeds in een vergevorderd stadium der ziekte, dan ontwikkelt zich een enkele maal een schimmelvegetatie, die hoofdzakelijk bestaat uit eene *Fusarium* species, welke echter uitsluitend secundair is.

Deze ziekte werd in Nederland voor het eerst waargenomen in 1904 ¹⁾. Verder wordt er melding van gemaakt in de Jaarverslagen over 1906 en 1910 van het Instituut voor Phytopathologie te Wageningen.

1) Verslag van het Phytopathologisch Instituut Willie Commelin Scholten. 1904.

PRILLIEUX ¹⁾ schijnt deze ziekte het eerst te hebben waargenomen in Noord-Frankrijk. Hij geeft in zijn werk over plantenziekten een afbeelding, die geheel in overeenstemming is met het door mij waargenomen ziektebeeld. Zeer in 't kort vermeldt hij, dat door hem uitsluitend bacteriën zijn gevonden, die, wanneer ze in een gezonde vrucht gebracht werden, dezelfde rottingsverschijnselen gaven.

EARLE ²⁾ nam de ziekte waar in Noord-Amerika. Hij geeft een korte beschrijving van geslaagde infectieproeven met het geïsoleerde organisme. Daar infectie alleen optreedt bij verwonding, is hij de meening toegedaan, dat kleine insecten wondjes veroorzaken, waardoor de bacterie binnendringt. Hij beveelt derhalve insecticiden als bestrijdingsmiddel aan.

ROSTRUP ³⁾ deelt in zijn werk het een en ander mede over de verbreiding der ziekte in Engeland en Denemarken.

De beschrijvingen der infectieproeven, door Prillieux en EARLE verricht, zijn zeer onvolledig, terwijl een beschrijving van de geïsoleerde bacterie geheel ontbreekt, zoodat VAN HALL ⁴⁾ omtrent deze ziekte m. i. zeer terecht opmerkt: „Het is dan ook zeer wel mogelijk, dat dit werkelijk een bacterieele ziekte is; om dit te bewijzen, zijn echter uitvoeriger en nauwkeuriger infectieproeven noodzakelijk.”

Door Prof. RITZEMA BOS werd ik in de gelegenheid gesteld, in het Westland praktische waarnemingen te doen betreffende het voorkomen en de verbreiding dezer ziekte. Een korte samenvatting van mijn bevindingen moge hier volgen.

In het algemeen treedt de ziekte in ons land nog niet hevig op, hoewel ze in nagenoeg alle kweekerijen voorkomt. Het eerste hangt ongetwijfeld hiermee samen, dat de tomatenkultuur in het Westland eerst in den allerlaatsten tijd belangrijk is uitgebreid, zoodat op tal van kweekerijen voor de eerste of tweede maal tomaten werden

1) *Maladies des plantes agricoles* I. 1895. p. 19.

2) *Notes on some tomato diseases*. Alabama Stat. Bull. 1896. p. 19.

3) *Rostrup. Plantepatologi*.

4) *Van Hall. Bijdragen tot de kennis der bacterieele plantenziekten*. Diss. 1902.

gekweekt. Het is immers bekend, dat een langdurig voortgezette kultuur van eenzelfde gewas het optreden van ziekten sterk in de hand werkt.

Dit hangt voor het door ons beschouwde geval ongetwijfeld samen met de volgende omstandigheden:

10. De onafgebroken kultuur van tomaten is een zeer gunstige conditie voor de ontwikkeling van de bacterie, die de rotting veroorzaakt. Men heeft hier, als 't ware, te doen met een „ophoeringsproef.”

20. Een dergelijke kultuurmethode brengt een eenzijdige uitputting („moeheid”) van den bodem met zich, die blijkbaar niet geheel kan worden opgeheven door bemesting. Daardoor kan de plant op den duur minder weerstand bieden aan infectie.

Deze opvatting wordt nog gesteund door het feit, dat bij lang voortgezette kultuur de bloemen, die het verst van den hoofdstengel staan, niet meer in staat zijn, het tot vruchtzetting te brengen, maar vóór dien tijd reeds afvallen.

Op een kweekkerij onder Honselaarsdijk, waar drie jaren achtereen tomaten waren gekweekt, trad in 1911 de ziekte zoo hevig op, dat naar schatting 10 % van den oogst verloren ging.

Bij een kweekker in de nabijheid van Wageningen vertoonde zich in de eene kas de rotting veel sterker dan in de andere. Hoe langer er in een bepaalde kas tomaten waren gekweekt, des te grooter was het percentage rotte vruchten.

Werd echter uit deze kassen de bovenste grondlaag ter dikte van 25—30 c. M. verwijderd en daarvoor andere grond van buiten ingebracht, dan was deze bodem weer uitnemend geschikt geworden voor tomatenkultuur. Dit wijst er op, dat de parasiet algemeen in den bodem voorkomt en zich bij aanwezigheid van tomaten, blijkbaar sterk vermeerderd. Die sterke vermeerdering wordt natuurlijk krachtig in de hand gewerkt door de aangetaste vruchten, die wel afgeplukt, maar niet uit de kas verwijderd worden. Iedere neergeworpen vrucht vormt een uitnemenden voedingsbodem voor de bacterie. Er kan derhalve niet genoeg op gewezen worden, dat het noodig is, deze vruchten zorgvuldig te verzamelen en te vernietigen. Verder spreekt

het vanzelf, dat de rotte vruchten niet op den mesthoop mogen worden geworpen, daar anders het uit de kas verwijderen nutteloos werk is.

Wordt de grondvernieuwing met niet te groote tijdsruimte uitgevoerd, dan blijft de ziekte beperkt tot een zeer gering percentage der vruchten.

In het Westland gaat men ook wel zoo te werk, dat men om de twee jaar den grond tot op een diepte van ongeveer 60 c. m. omspit. Men drage daarbij zorg, dat een geheel nieuwe grondlaag bovenkomt, terwijl de bovengrond naar beneden gewerkt wordt. Het is duidelijk, dat deze wijze van grondbewerking op hetzelfde neerkomt als de eerstgenoemde, n.l. de bouwkuin vrij maken van parasieten. En dat ze ten slotte alleen kan worden uitgevoerd op een bodem, waar de ondergrond geschikt is voor de kultuur.

Het blijkt, dat groote vochtigheid, die een gunstige faktor is voor het bakteriënleven, de ziekte krachtig bevordert. Het is derhalve aan te bevelen, de kassen vaak te luchten, wat in kunstmatig verwarmde kassen geen bezwaar oplevert. Bij kassen, waar men alleen is aangewezen op de zonnewarmte, dient men echter rekening te houden met de vertraging in het groeiproces, en zal het vaak niet mogelijk wezen, zoo veel te luchten, als wel wenschelijk is. Op deze kwestie, die er een is van zuiver economisch belang en die iedere kweeker voor zich het beste kent, behoeft hier niet nader te worden ingegaan.

In den regel worden de laagsthangende vruchten het eerst aangetast, en gewoonlijk blijft de rotting tot deze beperkt, een omstandigheid, die er m. i. voor pleit, dat de infectie van den bodem uitgaat.

Uit de door mij uitgevoerde infectieproeven, die men in de volgende bladzijden beschreven vindt, blijkt, dat de bacterie een wondparasiet is. Of nu bij natuurlijke infectie de bacterie de primaire oorzaak is, of dat men met EARLE moet aannemen, dat kleine insekten steekwonden maken in de vruchten, waardoor de bacterie kan binnendringen, durf ik niet beslissen. Zoo veel is zeker, dat de opvatting van EARLE tot nu toe een zuivere hypothese is. In geen geval is het daarom te rechtvaardigen, insecticiden als bestrijdingsmiddel toe te passen. Nog minder is het m. i. aan te bevelen, omdat het praktisch vrijwel onuitvoerbaar is.

De insecticiden toch bevatten vergiften, die uiterst gevaarlijk zijn voor den mensch. Zijn dus de vruchten met een dergelijk middel bespoten, dan moeten ze, nadat ze geplukt zijn, zorgvuldig worden schoongemaakt. Waar op sommige kweekerijen de oogst soms eenige duizenden per dag bedraagt, behoeft het wel geen nadere toelichting, dat deze schoonmakerij een onbegonnen en uiterst kostbaar werk zou zijn.

Isoleering en infectieproeven.

Het materiaal, waaruit de bakterie werd geïsoleerd, was afkomstig uit verschillende plaatsen van ons land, waar de ziekte zich vertoonde.

Het verkrijgen van een reinkultuur uit de aangetaste vruchten is uiterst eenvoudig. De tomaten worden onder de waterleiding met zeep zorgvuldig gewasschen, daarna eenige minuten gelegd in een $\frac{1}{100}$ sublimaatoplossing, met een schoonen doek afgedroogd en doorgesneden met een vooraf geflambeerd en afgekoeld mes. Van het rotte gedeelte wordt wat uitgestreken op vleeschgelatine en gecultiveerd bij een temperatuur van 22° . Bij de talrijke isolaties, die ik verrichtte, kwam ik steeds weer tot een reinkultuur van hetzelfde organisme. De pathogene eigenschappen van de bakterie laten zich het eenvoudigst onderzoeken aan versch gesneden schijven van een tomatenvrucht. Wordt zoo'n schijf geïnfecteerd, dan is deze bij temperaturen van $20-22^{\circ}$ na één dag, bij temperaturen van $14-16^{\circ}$ na 2—3 dagen, veranderd in een dun vloeibaar, kwalijk riekend papje. Het zachtere weefsel, waarin de zaden gelegen zijn, wordt het snelst aangetast en laat spoedig geheel los van het overige, meer stevige weefsel. Deze verschillende graad van aantastbaarheid is een gevolg van de groote hoeveelheid pektinestoffen, die in het de zaden omgevende weefsel aanwezig is. Niet geïnfecteerde schijven blijven dagen lang levend. Het is niet gewenscht, steriel water aan de geïnfecteerde schijven toe te voegen, daar het watergehalte van de tomaat 92—95 % bedraagt, zoodat ontijdig afsterven door uitdroging uitgesloten is.

Infecties met saprophytische bakteriën, b.v. met den aan *Phytobacter lycopersicum* zeer na verwanten *Bacillus herbicola* DÜGGELE (= *Bacillus anglomerans* BEYERINCK) geven

geen aanleiding tot rottingsverschijnselen, zelfs niet bij temperaturen van 28—30°. Wel is er zwakke groei waar te nemen, maar dit is een gevolg van de omstandigheid, dat doorgesneden en daardoor afgestorven cellen door de saprophytische bacteriën als voedsel kunnen worden gebruikt.

Om zekerheid te hebben, dat steeds gewerkt werd met virulent materiaal, werden infecties aan de levende plant uitgevoerd met kulturen op tomatenschijven. De planten, die voor de infectie gebruikt werden, stonden in een koude kas, waar nog nooit tomaten gekweekt waren. Toch werd een deel der proefplanten voor de contrôle niet geïnfecteerd, omdat ook in de praktijk een hoogst enkele maal de ziekte, hoewel in zeer geringen graad, optreedt in kassen, waar voor het eerst tomaten worden gekweekt. Van mijne niet geïnfecteerde planten bleven echter alle vruchten onaangetast.

De eerste serie infecties werd ingevoerd aan de bloemen, door op den stempel een druppel ent-materiaal te brengen. Door Prillieux is namelijk het denkbeeld geopperd, dat op dit tijdstip de infectie zou kunnen plaats hebben door bloemenbezoekende insecten. Evenmin als genoemden onderzoeker gelukte het mij, op deze wijze infectie tot stand te brengen.

De tweede serie infecties betrof de groene vruchten in verschillende stadiën van ontwikkeling. Op de vroegere inplantingsplaats van den stijl werd geïnfecteerd met en zonder verwonding, echter zonder succès.

Dat op dit tijdstip de infectie niet slaagt, hangt zeer waarschijnlijk samen met den hoogen zuurgraad van onrijpe vruchten. Voor verschillende variëteiten is de aciditeit weer eenigszins verschillend, zoodat door mij een hoogst enkele maal groene vruchten werden aangetroffen, die reeds waren aangetast. Als regel kan gerust worden aangenomen, dat eerst het beginstadium der rijping — dus wanneer de vruchten een geelgroene tot gele kleur aannemen — het gunstige tijdstip is voor het tot stand komen der infectie. De invloed van de aciditeit is trouwens ook duidelijk te zien bij infectie van schijven, die van nog groene vruchten gesneden zijn. De rotting verloopt hier aanmerkelijk langzamer. Is de parasiet eenmaal in de vrucht ingedrongen, dan worden de eiwitachtige stoffen

afgebroken tot aminoverbindingen en ammoniak, waardoor de zuren geheel of ten deele geneutraliseerd worden.

Het aangetaste gedeelte reageert neutraal of zwak zuur, wat gemakkelijk met een lakmoespapier bij rottende vruchten kan worden nagegaan.

Als een punt van wezenlijk belang dient nog opgemerkt te worden, dat verschillende variëteiten belangrijk verschillen in gevoeligheid voor infectie. In een kweekrij in het Westland, waar in eenzelfde kas twee variëteiten werden gekweekt, werd bij de „Sunrise” geen enkele rotte vrucht aangetroffen, terwijl de andere, waarvan door mij de naam niet kon worden vastgesteld, vrij hevig was aangetast.

Bij de talrijke infecties, die aan rijpende vruchten werden uitgevoerd, was voor het slagen der infectie steeds verwonding noodzakelijk. Bij eenige contrôle-planten werden in rijpende vruchten prikjes gegeven met een steriele naald, ten einde na te gaan, of hierbij de ziekte zich zou vertoonen. Alle vruchten bleven echter gezond. In een kas, waar de ziekte in hevige mate optrad, werden een aantal vruchten op dezelfde wijze met een steriele naald behandeld, met het gevolg dat al deze vruchten in rotting overgingen. Hier was dus blijkbaar de parasiet algemeen verspreid. Niet zelden treft men vruchten aan, waar de rotting van een andere plaats dan de voet van den stijl uitgaat. Dit kan of een gevolg zijn van toevallige verwonding, of een gevolg van de scheuren, die bij sommige variëteiten bij het rijpen ontstaan, en wel vooral bij die met een vermeerderd aantal vruchtbladen.

De door mij verrichte infecties aan stengel, bladstelen en bladeren van de plant bleven zonder gevolg. De bacterie is dus blijkbaar alleen parasitair voor de vruchten, en zoo- ver mijn waarnemingen strekken, uitsluitend een wondparasiet. In 't oog dient echter te worden gehouden, dat men in het algemeen bij parasitaire ziekten, met twee factoren te doen heeft:

- 1°. de onmiddellijke ziekte-oorzaak, dus den parasiet;
- 2°. de praedispositie.

Nu is onze kennis van de praedispositie voor ziekten bij planten tot op heden nihil. We zullen derhalve bij kunstmatige infecties resultaten krijgen, die slechts een zeer onvolledig beeld geven van de werkelijkheid. Het is

duś volstrekt niet uitgesloten. dat onder de natuurlijke omstandigheden de infectie kan plaats hebben zonder voorafgaande verwonding.¹⁾

We hebben reeds opgemerkt, dat het voortdurend kweken van tomaten op eenzelfde grond het toenemen der ziekte krachtig in de hand werkt. Het lag derhalve voor de hand, te trachten, het organisme uit den grond te isoleeren. Daartoe werd op tomatenschijven een weinig grond gebracht en gekultiveerd bij 28°. Er ontwikkelde zich een krachtige bakteriënvegetatie, en het vruchtweefsel stierf langzaam af. Overenting op versehe schijven werd niet verdragen. De zich daarbij ontwikkelde flora bleek in hoofdzaak te bestaan uit fluorescenten, die, wanneer ze van den kunstmatigen voedingsbodem weer op tomatenschijven gebracht werden, niet in staat bleken, rottingsverschijnselen teweeg te brengen. Het afstervingsverschijnsel bij infectie met grond moet waarschijnlijk aldus verklaard worden: De bakteriën beginnen te groeien van het materiaal, dat geleverd wordt door de doode cellen in het snijvlak, en door de voedende bestanddeelen in den grond. De daarbij in hoofdzaak tot ontwikkeling komende organismen zijn fluorescenten, die onder bepaalde omstandigheden parasitair kunnen worden. De door deze mikroben gevormde stofwisselingsprodukten kunnen dan doodend werken op het daaronder gelegen, nog levende weefsel.

Wordt dezelfde proef met een aardappelschijf genomen, dan is er geen gevaar voor aantasting, daar de parenchymcellen onder het snijvlak door deeling kurkweefsel gaan vormen.²⁾

1) Deze uiterst interessante kwestie, die voor de phytopathologie een vraagstuk is, dat nog geheel op oplossing wacht, wordt uitvoerig besproken in: ERWIN F. SMITH, *Bacteria in relation to plant diseases*. Vol II 1911.

2) In het oog dient te worden gehouden, dat de temperatuur hier een belangrijke faktor is voor het tot stand komen der infectie. Boven bepaalde temperaturen worden sommige bodembakteriën wel degelijk parasitair voor de aardappelschijf. Ik heb hier het oog op *Bacillus subtilis* en *Bacillus mesentericus vulgatus*, die met betrekking tot hun parasitair aard uitvoerig beschreven zijn door VAN HALL, „Bijdragen tot de kennis der bacterieele plantenziekten.”

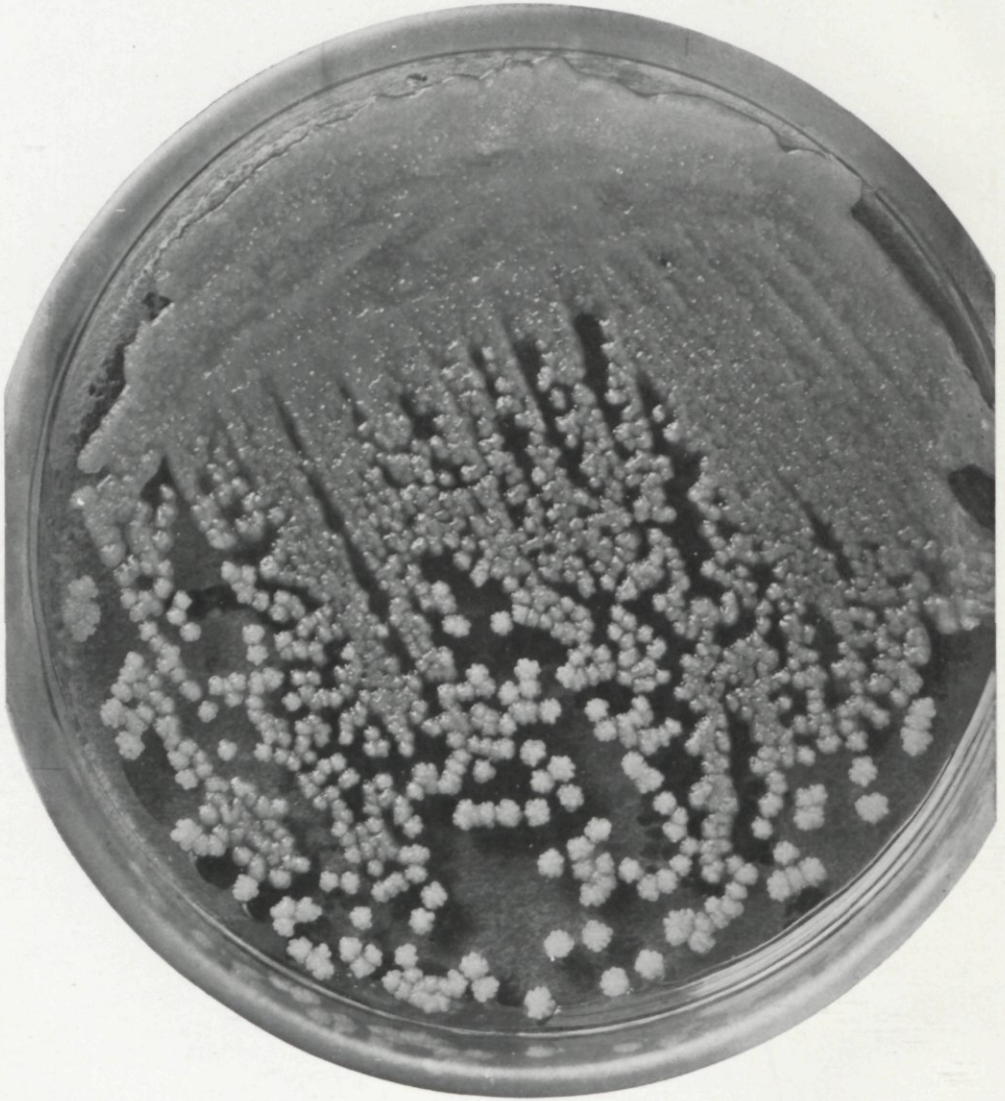
Toch schijnt *Bacillus subtilis* werkelijk een parasiet te kunnen zijn, want een door mij geïsoleerde stam bleek in staat, om nog bij 20° aardappelschijven tot rotting te brengen. De asporogene mutant van *Bacillus subtilis* werd daarentegen eerst virulent voor levende aardappelschijven bij een temperatuur van 26°.

PLAAT I.



Normaaltvorm. Moutgelatine. Temp. 20°. 3 dagen oud. Duidelijke vorming van uitloopers in de streep.

PLAAT II.



Mutant I. Moutgelatine. Temp. 20°. 3 dagen oud.

PLAAT III.



Mutant II. Moutgelatine. Temp. 20°. 3 dagen oud.

PLAAT IV.



Mutant III. Moutgelatine. Temp. 20°. 3 dagen oud.

PLAAT V.



Mutant IV. Moutgelatine. Temp. 20°. 3 dagen oud.

De virulentie van *Phytobacter lycopersicum* werd nog onderzocht voor de volgende planten:

Aardappel. Wordt bij geen enkele temperatuur aangetast.

Hyacinth. Wordt niet aangetast.

Suikerbiet. Schijven van suikerbiet worden krachtig aangetast bij temperaturen van 20, 26 en 30°. De aangetaste deelen vertoonen een bruingele verkleuring en inzinking van het weefsel. De schijf gaat ten slotte geheel over in een breiachtige massa.

Daucus carota. Gaat bij infectie in rotting over, maar het rottingsproces verloopt hier veel langzamer dan bij suikerbiet.

Het verloop van het rottingsproces.

Volgens MANGIN vormt het pektinezuur in den vorm van zijn Ca-zout de intercellulaire stof (middenlamel) van levende, parenchymatische weefsels. De bakterie, die de tomaat aantast, is in staat, de middenlamel op te lossen, zoodat de cellen geïsoleerd worden.

Het vermogen, om de intercellulaire stof op te lossen, is een eigenschap, die niet gebonden is aan het levende protoplasma van het mikroorganisme. Bij onderzoek van aangetaste deelen der vrucht blijkt namelijk, dat op plaatsen, waar de bakterie nog niet is doorgedrongen, de middenlamel reeds bruingekeurd is, gevolgd door het loslaten der cellen van elkaar, zoodat blijkbaar een diffundeerende stof wordt geproduceerd, die de pektinestoffen oplost.

BOURQUELOT en HÉRISSEY hebben deze hydrolyseerende stoffen, die naar der aard harer eigenschappen tot de enzymen gerekend moeten worden, samengevat onder den naam van pektinasen.

BEYERINCK en VAN DELDEN, die bij de vlasroting een oplossing van de intercellulaire stof waarnamen, hebben aan het enzym, dat door de daarbij werkzame bakteriën wordt afgescheiden, den naam van pektosinase gegeven. Van Hall schrijft aan de diffundeerende stof een giftige werking toe en spreekt derhalve van toxine. Of men in de door genoemden onderzoeker beschreven gevallen werkelijk met een toxische werking dan wel met een enzymwerking te doen heeft, is moeilijk te beslissen. Er valt hieromtrent alleen op te merken, dat aan de mogelijkheid van het

afsterven der cel gedacht kon worden, nog vóórdát het enzym de intercellulaire stof zichtbaar begint op te lossen. Immers het onwerkzaam maken der middenlamel (dus het isoleeren der cellen) behoeft niet noodzakelijk samen te vallen met haar zichtbaar oplossen. In navolging van Jones is men er later toe overgegaan het enzym „hemicellulase” te noemen in overeenstemming met de tegenwoordige opvatting, dat de stof der middenlamel een hemicellulose is ¹⁾).

Een duidelijk verdwijnen van de intercellulaire stof neemt men waar, wanneer gezond en ziek weefsel gekleurd wordt met het reagens van MANGIN, het rutheniumrood. Terwijl bij gezond weefsel de middenlamel intensief rood gekleurd wordt, is dit bij door de bakterie aangetaste weefsels niet of nagenoeg niet het geval, ook op die plaatsen, waar nog alleen het enzym en niet het mikroörganisme zelf is doorgedrongen.

Men kan trouwens nog langs andere wegen aantonen, dat een oplossen van de middenlamel plaats heeft door een door de bakterie geproduceerd, diffundeerend enzym.

Men kan een bakteriënkultuur door een CHAMBERLAND-PASTEUR-filter persen, zoodat men een kiemvrij filtraat krijgt. Voor het onderzoek naar de aanwezigheid van hemicellulase is deze methode niet aan te bevelen, daar er aan het werken met het C.-P.-filter groote bezwaren verbonden zijn.

In het hier onderzochte geval kon een kiemvrij enzym-preparaat verkregen worden, door een kultuur gedurende 10 minuten aan een temperatuur van 54° bloot te stellen. Deze temperatuur is voldoende om alle bakteriën te doden en het enzym blijft zijn werkzaamheid behouden. Het spreekt vanzelf, dat deze methode slechts toereikend is in gevallen, waar de doodingstemperatuur van het mikroörganisme betrekkelijk laag ligt.

Zeer goede resultaten verkrijgt men ook met de methode VAN HALL, die hierin bestaat, dat men het enzym door agar laat diffundeeren. Hetzelfde kan gezegd worden van het precipiteeren van het enzym met 96 % alkohol. Het aldus verkregen precipitaat wordt verzameld, gedroogd,

1) Centralblatt für Bakteriologie, II^e Abt. Bd. 14, 1907.

H. C. SCHELLENBURG, Untersuchungen über das Verhalten einiger Pillze gegen Hemicellulosen. Flora, Bd. 98, 1908,

hetzij boven H_2SO_4 , of bij een temperatuur van 40° , dan wel in het vacuüm, en het droge poeder op een tomatenschijf gebracht.

De gunstige temperaturen voor de pektinasewerking liggen tusschen 40 en 45° . Bij 37° was de werking reeds beduidend minder en bij 28° verliep ze slechts uiterst langzaam.

Beschrijving van Phytobacter lycopersicum n. sp.

Morphologie.

Staatjes van veranderlijke lengte. De grootte is niet alleen afhankelijk van het voedingsmedium, maar in eenzelfde voedingsbodem loopen de afmetingen sterk uiteen. Bij een 24 uur oude kultuur in vleeschbouillon varieerde de lengte van $1,5-2,5 \mu$ en de dikte van $0,5-0,7 \mu$. Aan deze morphologische eigenschap, in het bijzonder aan de lengte, mag daarom m.i. weinig waarde worden gehecht.

Sporen werden onder geen enkele voedingsconditie waargenomen en bestaan zeer waarschijnlijk niet, hetgeen ook blijkt uit het geringe weerstandsvermogen der bacteriën tegen hitte.

In jonge kulturen is de bacterie sterk beweeglijk, maar deze eigenschap gaat spoedig verloren door de vorming van zoogloeën. De slijmige zoogloeënmassa, waarin de bacteriën liggen, is een omgeving, waarin beweeglijkheid is uitgesloten. Onder den mikroskoop doen deze zoogloeën zich voor als een complex van staafjes, bijeengehouden door een visceus slijm.

Kultuurkenmerken.

Vleeschgelatine.

Bij kultuur bij 20°C. , verschijnen na 2—3 dagen zeer kleine kolonies. Aanvankelijk is de kleur wit tot geelachtig wit, spoedig okergeel wordend, het eerst op die plaatsen, waar de kolonies het dichtst bij elkaar liggen of over elkaar heen groeien. De vorm is rond, de randen zijn gaaf en de middellijn bereikt zelfs na weken een grootte van niet meer dan 1—2 m.M. middellijn. De groei wordt sterk bevorderd door toevoeging van 5—10 % saccharose. Na eenige dagen heeft zich in de gelatine een wit precipitaat

gevormd, dat door kaliloog onveranderd blijft, maar heel gemakkelijk oplost in verdunde zuren. Waarschijnlijk is dit geprecipiteerd Calciumfosfaat.

Bij streepkultuur heeft alleen groei plaats in de streep. Uitloopers worden niet of uiterst zwak gevormd. Vervloeien der gelatine eerst na 10—14 dagen zichtbaar.

Vleeschagar.

Bij optimum-temperatuur ($\pm 28^{\circ}$ C) zijn de kolonies aanvankelijk wit, spoedig geel wordend, weer het eerst op de plaatsen met dichtsten groei. De vorming van ammoniummagnesiumfosfaat kristallen wijst op de productie van ammoniak. De vorming van geel pigment is op vleeschagar iets minder dan op vleeschgelatine.

Bij 40° ontstaat geen groei meer, bij 37° nog zeer zwakke groei. De maximum-temperatuur, waarbij nog groei plaats had, werd niet nauwkeurig bepaald.

Steekkultuur in vleeschagar en gelatine.

Groei het sterkst aan de oppervlakte. Eerst na eenige dagen zeer zwakke groei in de steek. Dit wijst er op, dat de bacterie obligaat aëroob is, daar de geringe groei, die later in de steek optreedt, uitsluitend te wijten is aan de lucht, die langzaam in de agar en gelatine diffundeert.

Vleeschbouillon.

Na 24 uur een lichte troebeling, die na eenige dagen niet is toegenomen, zoodat een voorwerp, dat achter het buisje wordt gehouden, duidelijk te zien is. Langzamerhand vormt zich op den bodem van het buisje een precipitaat. De aanwezigheid van glucose in vleeschbouillon werkt groeibevorderend. Een hoeveelheid van 16 % glucose, werkt zelfs nog gunstig, vergeleken met bouillon zonder glucose. Bij titratie bleek de kultuurvloeistof met glucose amphotet of slechts zeer zwak zuur te zijn.

Moutgelatine.

Krachtige groei, zoodat na 24 uur bij een temperatuur van 22° de cirkelronde kolonies een middellijn van ongeveer 3 m.M. bereikt hebben. Krachtige slijmvorming. Kleur wit, na eenige dagen door vorming van pigment in het midden der kolonie geel wordend. In de streep vertoonen zich na 2—3 dagen uitloopers, die een geheel anderen habitus hebben dan de normale kolonies. Wordt deze vorm opnieuw uitgestreken, dan krijgt men kolonies van

een gedaante, die geheel afwijkt van den normaalvorm. Op dit merkwaardig verschijnsel van mutatie komen we straks terug.

Het vervloeien der moutgelatine begint na 5—6 dagen bij kamertemperatuur, dus veel krachtiger trypsineproductie dan op vleeschgelatine.

Moutagar.

Evenals op moutgelatine overvloedige groei en krachtige slijmvorming. Ofschoon wat minder duidelijk, is de vorming van mutanten, die als sektoren uit de streep groeien, nog goed zichtbaar.

Moutextract.

Zeer krachtige groei en zoogloeënvorming. De zoogloeën zetten zich aan het niveau van de vloeistof aan den wand van het buisje vast. Na eenige dagen is een dik, geel precipitaat ontstaan.

Tomatendecoctgelatine 1).

Zooals te verwachten was, was de groei op dezen voedingsbodem zeer krachtig. Na 2 dagen bij 20° hadden zich halve bolvormige kolonies gevormd, die aan den top een lichtgeel pigment bevatten.

De groei is zeer karakteristiek en de habitus der kolonies vertoont veel overeenkomst met die van *Bacterium radicicola* op erwtenloof-rietsuikergelatine.

Om na te gaan, welke koolstof- en stikstofverbindingen geassimileerd worden, werd gebruik gemaakt van de auxonographische methode van BEYERINCK 2). Met KNO_3 als N-bron werd eerst nagegaan, welke C-verbindingen konden worden verbruikt en daarna werden met de beste C-bron de N-verbindingen onderzocht.

Aan platen, bestaande uit:

duinagar 100

KNO_3 0,1

K_2HPO_4 0,05

werden achtereenvolgens als C-bron toegevoegd:

1) Van een rijpe tomatenvrucht werden 20 gram gedurende 15 minuten gekookt met 100 c.c. water, afgefiltreerd, het filtraal geneutraliseerd op lakmoes met natriumcarbonaat, 10 % gelatine toegevoegd, geklaard en gefiltreerd.

2) Archives néerlandaises. T XXIII pag. 367.

<i>C-bron</i>	<i>groei</i>
saccharose	+ zeer krachtig
glucose	+ " "
laevulose	+ " "
lactose	--
maltose	+
raffinose	+ (zwak)
manniet	+
Na-acetaat	--
propionaat	--
formiaat	--
oxalaat	--
butyraat	--
succinaat	+
tartraat	+
citraat	+
malaat	+
lactaat	+

Voor het bepalen der assimileerbare N.-verbindingen, werden deze toegevoegd aan platen van de samenstelling:

	duinagar	100	
	saccharose	2	
	K ₂ HPO ₄	0,05	
<i>N-bron</i>			<i>groei</i>
KNO ₃			+
(NH ₄) ₂ SO ₄			+
(NH ₄) Cl			+
NH ₄ Na-tartraat			+
NH ₄ -citraat			+
„ -succinaat			+
„ -acetaat			+
„ -lactaat			+
„ -malaat			+
asparagine			+

Indicaan wordt krachtig gesplit (moutagar + $\frac{1}{10}$ % indicaan), ureum niet (vleeschwater + $\frac{1}{2}$ % ureum).

Cellulose wordt niet aangetast in een kultuurvloefstof, bestaande uit:

duinwater	100
cellulose	2
(NH ₄) Cl	0,1
K ₂ HPO ₄	0,05

Wel was na ongeveer een week zwakke groei ontstaan, wat echter moet worden toegeschreven aan de aanwezigheid van sporen zetmeel in het filtreerpapier, want de cellulose gaf geen blauwkleurig meer met I-KI-oplossing.

Melk.

Gesteriliseerd bij 120°, waardoor ze eenigszins bruin gekleurd werd door caramelisatie der lactose. Aanvankelijk vorming van een bleekgeel huidje op de melk. In de tweede week had een zeer langzame afscheiding van de caseïne plaats.

Het geprecipiteerde caseïne, dat niet vlokkelig neerslaat, naar een slijm massa vormt, wordt na eenige weken langzaam en voor een deel gepeptoniseerd. Gasvorming heeft niet plaats. De reactie bleef steeds amphoteer. De melk blijft reukeloos.

Aardappel.

Aardappelschijven worden steriel gesneden en daarna in een glasdoos door chloroformdamp gedood. Zooals bekend is, wordt de schijf door de tyrosinase reactie zwart gekleurd, aanvankelijk het sterkst onmiddellijk onder de epidermis, wat er op wijst, dat de tyrosinase hoofdzakelijk gelocaliseerd is dicht onder de epidermis. De groei was gering. De geheele schijf werd bedekt met een okergele bacterienlaag. De slechte groei was blijkbaar een gevolg van voedselgebrek, want na toevoeging van rietsuiker was de groei aanmerkelijk beter.

Suikerbiet.

Op dezelfde wijze behandeld als de aardappel. Overvloedige groei. Na 2 dagen is de geheele schijf bedekt met een dikke, aanvankelijk witte, later bleekgeel wordende slijmlaag. Deze krachtige groei is ongetwijfeld een gevolg van de aanwezigheid van groote hoeveelheden rietsuiker.

Gistingsvermogen.

Dit werd nagegaan in gistingskolfjes met assimileerbare suikers als C-bron. Nooit trad gasvorming op.

Alkalivorming.

In vooraf geneutraliseerd vleeschwater kan met lakmoes-papier gemakkelijk de aanwezigheid van alkali worden aangetoond. (Zie ook bij vleeschagar).

Indol.

In kulturen in vleeschbouillon, die $\frac{1}{2}$ % pepton bevatten, was eerst na 10—14 dagen zeer weinig indol gevormd. De reactie werd aldus uitgevoerd, dat aan een kultuur in 15 cc. vleeschbouillon, een paar druppels eener zeer verdunde natriumnitriet-oplossing en eenige c.c. 25 % zwavelzuur werden toegevoegd. Bij aanwezigheid van indol trad dan de bekende roodkleuring op. De aanwezigheid van veel pepton bleek in hooge mate bevorderlijk te zijn voor de indolvorming, wat blijkt uit onderstaande proefjes, waarbij na 24 uur de reactie op indol werd nagegaan.

Vleeschbouillon, bevattende	Indolreactie
$\frac{1}{2}$ % pepton	—
1 $\frac{1}{2}$ „ „	± (twijfelachtig)
3 $\frac{1}{2}$ „ „	+
7 $\frac{1}{2}$ „ „	++
11 $\frac{1}{2}$ „ „	+++
15 $\frac{1}{2}$ „ „	++++

Reduktie van kleurstoffen.

Deze werd alleen voor methyleenblauw nagaan. Aan 15 cc. vleeschbouillon werd 1 druppel van een 1 % methyleenblauwoplossing in 10 % alkohol toegevoegd. Steeds werd de kleurstof slechts ten deele gereduceerd. Na ongeveer een maand keert de blauwe kleur gedeeltelijk terug en verandert niet meer bij schudden.

Nitraatreduktie.

Nitraten worden niet gereduceerd.

Indroging.

De bacterie is bestand tegen indroging. Stukjes filtreerpapier werden bevochtigd met een kultuur in moutextract, daarna bij 30° gedroogd en na eenige dagen in moutextract gebracht. Na 24 uur vertoonde zich sterke groei. De kulturen werden gecontroleerd (met het oog op mogelijke ingeslopen infectie) door uitstrijken op moutgelatine.

Zwavelwaterstofvorming.

In een 24 uur oude kultuur in vleeschbouillon + 5 %

pepton werd een in loodacetaat gedrenkt filtreerpapier vastgeklemd tusschen de hals van het kolfje en de watterprop. Na een verblijf van 24 uur in den thermostaat van 28° was duidelijk zwartkleurig opgetreden.

Doodingstemperatuur.

Deze werd nagaan in 24 uur oude kultuur in vleeschbouillon. Eerst werd een globale bepaling gedaan, door de buisjes, bevattende 10 cc. kultuurvloeistof, gedurende 10 minuten op temperaturen van 45, 50, 55 en 60° te houden.

Bij de nauwkeurige bepaling bleek de bacterie niet gedurende 10 minuten een temperatuur van 53,5° te kunnen verdragen.

Optimumtemperatuur.

Een nauwkeurige bepaling van het optimum werd niet verricht. Uit eenige globale bepalingen bleek, dat deze ongeveer ligt bij 28°.

Zuren.

Organische zuren worden goed verdragen. In moutextract met 5 % citroenzuur kwam nog groei.

Enzymen.

Trypsine. De vorming van trypsine bleek steeds gering te wezen. Vleeschgelatine begint eerst na ongeveer 10—14 dagen te vervloeien en in buisjes met 10 cc vleeschgelatine duurt het 6—8 weken, voordat deze geheel gesmolten is.

Moutgelatine, waarop de groei veel gunstiger is, begint te vervloeien na 5 of 6 dagen. Merkwaardig is de invloed van saccharose op het smelten der gelatine-platen. Bij kleine hoeveelheden heeft het vervloeien veel langzamer plaats en groote hoeveelheden (vleeschgelatine + 20 % rietsuiker) houden het smelten geheel tegen.

Deze invloed van de saccharose op de trypsinereactie kan drie oorzaken hebben:

- 1°. de trypsineproductie vermindert met stijgende hoeveelheden saccharose;
- 2°. de saccharose belemmert de diffusie van het gevormde trypsine in de gelatine;
- 3°. het trypsine wordt voor een deel onwerkzaam gemaakt door de aanwezige saccharose.

Het onder 2 genoemde werd als volgt onderzocht:

Er werden in even groote PETRI-schalen gelijke hoeveel-

Pigmentvorming.

De bacterie vormt een geel pigment, dat niet in den voedingsbodem diffundeert. Vooral op vleeschgelatine is de kleurstofvorming zeer krachtig, terwijl deze op moutgelatine eerst na eenige dagen kan worden waargenomen, en dan nog het eerst op die plaatsen, waar de groei het dichtst is. Langzamerhand beginnen ook de afzonderlijk liggende kolonies in het midden eenigszins te kleuren. Bij vleeschagar bij optimumtemperatuur is er na 24 uur geen kleurstof gevormd, maar ook hier heeft daarna het optreden van het pigment op dezelfde wijze plaats als bij moutgelatine. Deze verschijnselen maken het aannemelijk, ongunstige voedingsconditiën als een belangrijke factor voor de pigmentvorming te beschouwen. Een nieuwen steun voor deze meening vond ik in het gedrag van de mutanten op rietsuiker-kaliumnitraat-agar (2 % saccharose, 0,1 % KNO_3 0,05 % K_2HPO_4). De beide vormen, die hierop rijkelijk groeien, blijven gedurende eenige dagen volkomen wit, terwijl de andere vormen, die hierop spaarzamen groei vertoonen, dadelijk gele kleurstof vormen.

Met petroleumaether kan de kleurstof niet worden uitgeschud, zoodat het geen carotine is, wanneer we ons houden aan de definitie, die daarvoor gegeven is door TSWETT 1). Waarschijnlijk mag het pigment gerekend worden tot de biologische groep der carotinoiden, waartoe TSWETT ook de verschillende leden van de lipochroomreeks brengt 2).

Gemakkelijk oplosbaar is het pigment in een verzadigde ammoniumcarbonaatoplossing in waterstofperoxyd, aethyl- en methylalcohol.

Bij culturen in verschillend gekleurd licht kon geen verschil in pigmentvorming worden waargenomen.

1) Ueber den makro-und mikrochemischen Nachweis des Carotins; Berichte der deutschen bot. Gesellschaft, Bd. XXIX Heft 9, 1911.

2) Evenmin carotinehoudend is *Bacillus vulpinus* (VAN ITERTON). Het bruinroode pigment, dat deze bakterie vormt, wanneer zij in het licht gecultiveerd wordt, vervult blijkbaar een biologische functie, hetgeen blijkt bij cultuur in verschillend gekleurd licht. Het blijkt dan, dat de pigmentvorming hoofdzakelijk plaats heeft onder den invloed van lichtstralen met korte golflengten. Wordt het organisme aan rood licht blootgesteld, dan wordt maar weinig pigment gevormd, terwijl onder den invloed van blauw licht veel meer pigment ontstaat dan in het daglicht.

Vorming van mutanten (zie de platen).

Bij de beschrijving van *Phytobacter lycopersicum* vestigde ik er reeds de aandacht op, dat zich in de streepkulturen sektorvormige uitloopers (Plaat I) vormen, die bij overenting geheel andere kolonien geven dan de normaalvorm. Deze „sektorvarianten” treden bij tal van andere mikro-organismen op.¹⁾

Voor zoover onze waarnemingen strekken, werpt de hier beschouwde bakterie vier verschillende vormen af, die bij voortgezette kultuur constant blijken te zijn. Er bestaat dus grond, om aan te nemen, dat we hier te doen hebben met mutaties, d.z. discontinuïteiten van erfelijke natuur. Van den aard dezer verschijnselen weten we bij mikroben, evenmin als bij hogere planten, feitelijk nog niets. Alleen zou men geneigd zijn, aan gunstige physiologische factoren een de mutatie bevorderenden invloed toe te schrijven.

Ent men de verkregen nieuwe vormen over in vloeibare voedingsmedia, dan blijken ze steeds constant, zelfs in eenige weken oude moutextract- en vleeschbouillonkulturen. Alleen de mutant I (zie Plaat II), die kolonien vormt, welke op een complex van asci lijken, geeft in oude kulturen meer of minder kiemen van den normaalvorm. De andere mutanten daarentegen slaan niet tot den normaalvorm terug, zelfs niet onder zeer ongunstige voedingscondities, zooals b.v. in eenige weken oude vleeschbouillonkulturen.

Zeër karakteristiek is het verschil in phytopathogene eigenschappen. Terwijl de normaalvorm en mutant I de tomatenschijven krachtig aantasten, is dit aanzienlijk minder bij de andere drie mutanten. Men zou geneigd zijn, het meestal zeer geringe verschil in pathogeniteit van den normaal vorm en van mutant I, toe te schrijven aan een geheel of gedeeltelijk terugslaan van mutant I tot den normaalvorm. Dit is echter niet het geval, want werd, wanneer het rottingsproces in vollen gang was, de mutant I weer op moutgelatine overgebracht, dan bleek ze volkomen constant te zijn gebleven.

De normaalvorm en mutant I produceeren zeer weinig trypsine, zoodat eerst op eenige (5—7) dagen oude mout-

1) Een uitvoerig overzicht van deze verschijnselen vindt men in een verhandeling van M. W. BEYERINCK, „Mutation bei Mikroben”. *Folia Microbiologica*, I, 1911.

gelatineplaten een begin van smelten is te bespeuren, terwijl bij de andere mutanten in denzelfden tijd nagenoeg de geheele gelatineplaat vervloeid is.

Nog andere, zeer typische verschillen neemt men waar bij kultuur op een voedingsbodem die samengesteld is uit:

duinagar	100
rietsuiker	2
KNO ₃	0,1
KHPO ₄	0,05

De groei van den normaalvorm en den mutant I is hierop zeer krachtig en gaat gepaard met een overvloedige slijmvorming, die vooral bij mutant I zoo sterk kan wezen, dat ze hetzelfde voedingsmedium, waaruit de agar is wegge laten, kan veranderen van een vloeistof in een gelatineuze massa. Dit slijm is aanvankelijk helder wit, om na eenige weken geelwit te worden. De groei der andere mutanten is in dit voedingsmedium spaarzaam, met geen of nagenoeg geen slijmvorming en productie van een geel, niet diffundeerend pigment.

De waarde van de mutatieverschijnselen bij mikroben voor de erfelijkheidsleer vindt men uitvoerig besproken in de boven aangehaalde verhandeling van prof. BEYERINCK.

Vermoedelijk zullen deze verschijnselen o.a. van belang zijn voor de diagnose der phytopathogene bakteriën.

Zoo komt algemeen in den bodem verbreid, een saprophytische bakterie voor, *Bacillus herbicola*. die niet alleen groote overeenkomst in physiologische eigenschappen vertoont met de hier beschreven bakterie, maar tevens mutanten afwerpt, welke morphologisch volkomen overeenstemmen met de door mij verkregene. De door BEYERINCK met de namen „ascococcus” en „colioides” aangeduide mutanten van *B. herbicola* zijn morphologisch niet te onderscheiden van de mutanten I en II van *Phytobacter lycopersicum* en physiologisch alleen door hun gedrag ten opzichte van tomaten.

Wanneer men aanneemt, dat het parasitisme een modificatie is, dan zijn er geen bezwaren, om aan te nemen, dat de saprophytische vorm van *Phytobacter lycopersicum* de algemeen verbreide *Bacillus herbicola* is.

Hetzelfde geldt voor een groep van bakteriën, waarvan

er een viertal nauwkeurig beschreven zijn door E. F. SMITH ¹⁾.

Hoogstwaarschijnlijk is *Bacillus vascularum*, die volgens COBB de oorzaak van de gomziekte van het suikerriet zou wezen, na verwant aan de „yellow pseudomonas group” van SMITH. Er blijft echter onzekerheid bestaan als een gevolg van de geheel onvoldoende beschrijving, die COBB van dit organisme gegeven heeft.

Al deze plantenparasieten zijn waarschijnlijk gespecialiseerde (met betrekking tot de voedsterplant), facultatief-parasitaire mutanten van den saprophytischen vorm. De door SMITH gekozen benaming „yellow pseudomonas group” zou vervangen kunnen worden door het physiologische geslacht „*Phytobacter*” ²⁾

Voor zoover onze kennis der phytopathogene bacterien thans reikt, kan men het geslacht *Phytobacter* beschouwen als te zijn samengesteld uit twee groepen van bacteriën, waarvan de saprophytische vormen *Bacillus herbicola* DÜGGLI en *Bacillus fluorescens liquefaciens* FLÜGGE zouden zijn.

SCHUSTER ³⁾ heeft onlangs de aandacht gevestigd op de betrekking, die er bestaat tusschen *Bac. fluor. liquef.* en de fluoresceerende, krachtig trypsine produceerende bacterien, die phytopathogeen zijn.

Het is mij een aangename plicht, mijn dank te betuigen aan prof. dr. M. W. BEYERINCK en dr. H. M. QUANJER, die mij het werk door hun vele raadgevingen zeer vergemakkelijkten.

1) The cultural characters of *Pseudomonas hyacinthi*, *Ps. campestris*, *Ps. phaseoli* and *Ps. stewarti*; U. S. Dep. of Agric. Bulletin No. 28, 1901.

2) Ik meen hier te mogen volstaan met te verwijzen naar: M. W. BEYERINCK, Sur la formation de l'hydrogène sulfuré dans les canaux et le genre nouveau *Aërobacter*; Arch. néerl. 1900, en naar Orla Jensen, Die Hauptlinien des natürlichen Bakterien-systems. Centralbl. f. Bakt. IIe Abt. Bd. XXII, 1909.

3) Arb. a. d. K. Biol. Anst. f. L. u. F. wirtschaft. Bd. VIII, 1912.