

'n MIKROBIOLOGIESE STUDIE VAN DIE SAAD-
KLEWENDE MIKROÛRGANISMES VAN STRIGA
LUTEA (LOUR) MET DIE OOG OP
DIE MOONTLIKE ASEPTIESE
KULTIVERING VAN HIER-
DIE ANGIOSPERMIESE
PARASIET.

'n MIKROBIOLOGIESE STUDIE VAN DIE SAAD-
KLEWENDE MIKROËRGANISMES VAN STRIGA
LUTEA (LOUR) MET DIE OOG OP
DIE MOONTLIKE ASEPTIESE
KULTIVERING VAN HIER-
DIE ANGIOSPERMIESE
PARASIEET.

deur

ALBERT EICKER Honn~~s~~.B.Sc.

Verhandeling voorgelê ter vervulling van 'n
deel van die vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTIAE

aan die Potchefstroomse Universiteit vir
Christelike Hoër Onderwys.

Universiteit van die Oranje Vrystaat.

BLOEMFONTEIN.

1960.

V O O R W O O R D

Hiermee wil ek graag my besondere dank uitspreek teenoor Dr. M.C. Papendorf, Senior Lektor in Plantkunde aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, vir sy waardevolle hulp en aanmoediging tydens die ondersoek en ook vir sy kritiese leiding by die opstelling van hierdie manuskrip.

Ek is ook dank verskuldig aan Prof.Dr. A.P.Goossens, Hoof van die Departement Plantkunde, Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, en Prof. Dr.P.J. Botha, van dieselfde departement, vir hulle goeie wenke en belangstelling.

My dank gaan ook aan Prof.Dr. W.J. Lütjeharms, Hoof van die Departement Plantkunde en Instituut vir Bodembioëkologie, Universiteit van die Oranje Vrystaat, en al die lede van sy personeel vir hulle hooggewaardeerde hulp en raad by die uitvoer van die eksperimentele werk.

Laastens gaan my dank aan my ouers vir hulle aanmoediging en bystand waarop ek nog altyd kon staatmaak. Ek wil dan ook graag hierdie verhandeling in alle nederigheid aan hulle opdra.

INHOUD.

Bladsy

HOOFSTUK I. Inleiding.	1
HOOFSTUK II. Metodes.	3
HOOFSTUK III. Die isolering en identifikasie van die saadklewende mikroörganismes.	5
HOOFSTUK IV. Vasstelling van 'n geskikte sui- ker vir die groei van <u>Phoma</u> , <u>Aspergillus</u> en <u>Mucor</u> .	11
HOOFSTUK V. Vasstelling van 'n geskikte glukose- konsentrasievir die groei van <u>Phoma</u> , <u>Aspergillus</u> en <u>Mucor</u> .	25
HOOFSTUK VI. Die invloed van 'n aantal belang- rike vitamienes op die groei van <u>Phoma</u> , <u>Aspergillus</u> en <u>Mucor</u> .	39
HOOFSTUK VII. Bepaling van die optimale tempera- tuur van inkubasie vir die groei en voortplanting van <u>Phoma</u> , <u>Aspergillus</u> en <u>Mucor</u> .	49
HOOFSTUK VIII. Die invloed van verskillende swam- doders op <u>Phoma</u> , <u>Aspergillus</u> en <u>Mucor</u> .	56
HOOFSTUK IX. Die invloed van verskillende bak- teriedoders op die <u>Bacillus</u> sp.	68
HOOFSTUK X. Die sterilisering van <u>Striga lutea</u> saad.	77
HOOFSTUK XI. Ontkieming van die Rooiblomsaad op "vergiftigde" agarplate.	90
HOOFSTUK XII. Die ontkieming en verdere ont- wikkeling van die Rooiblomsaad op Agallol- agarplate.	93
HOOFSTUK XIII. Bespreking.	97
HOOFSTUK XIV. Opsomming.	100
HOOFSTUK XV. Summary.	101
HOOFSTUK XVI. Bibliografie.	102

HOOFSTUK 1.INLEIDING.

Striga lutea (Lour.)(Rooiblom) is 'n parasitiese blomplant wat op lede van die Gramineae voorkom. In die natuurlike veld val dit 'n hele aantal inneeemse grassoorte aan. In Suid-Afrika is die Rooiblom van groot ekonomiese belang waar dit somergraangewasse, soos kafferkoring en mielies, aanval en jaarliks groot verliese ten opsigte van hierdie ooste veroorsaak. Die graangewasse is geskikter gasheergewasse vir die parasiet as die natuurlike veldgrasse, want op hierdie plantsoorte groei dit nie alleen veel geiler as in die natuurlike veld nie, maar dit plant ook vinniger voort (Botha, 1958).

Die Rooiblom is 'n wortelparasiet, wat sy water en anorganiese voedingstowwe betref is dit van die gasheerplant afhanklik en derhalwe stuur dit houstoriums in laasgenoemde se wortelstelsel in (Stevens, 1912). Omdat dit water en anorganiese voedingstowwe uit die gasheerplant verkry, maar gedurende die bogenoemde stadium self, deur die proses van fotosintese, organiese voedingstowwe kan opbou, ressorteer dit onder die hemiparasiete. Daar moet egter op gewys word dat die parasiet gedurende sy ondergrondse stadium ook sy organiese voedingstowwe uit die gasheerplant verkry, en dat dit gevolglik gedurende hierdie stadium as 'n holoparasiet beskou moet word. As gevolg van hierdie parasitisme van die Rooiblom het dit dan ook 'n baie nadelige invloed op die opbrengs van die gewas waarop dit groei (Botha, 1958).

In die Instituut vir Plantkundige navorsing van die Potchefstroomse Universiteit is reeds heelwat navorsing in verband met die Rooiblomplaag gedoen. In die loop van die navorsing was dit nodig dat die saad van die parasiet vir sekere eksperimente asepties ontkiem moes word. Herhaalde pogings is in hierdie verband aangewend, maar tot dusver is geen sukses hiermee behaal nie. Kontaminasie deur saadklewende mikroörganismes het gereeld voorgekom. Alle pogings om die saad uitwendig te steriliseer was tot dusver ook vrugteloos.

Hierdie mislukkings kan moontlik aan twee hoofoor-sake gewyt word. Ten eerste is die saadhuif van die Rooiblom baie ru, met diep oorlangse gleuwe.

In hierdie gleuwe is die spore van fungi en bakterieë waarskynlik baie goed beskerm en derhalwe moeilik bereikbaar vir die ontsmettingsmiddels wat aangewend word. Slegs uiters drastiese behandeling van die saad het steriliteit tot gevolg gehad. Verder is die Rooibloomsaadjies uiters gevoelig teenoor ontsmettingsmiddels. Die drastiese behandelings, wat steriliteit tot gevolg gehad het, het die saad self sodanig beskadig dat geen ontkieming daarna plaasgevind het nie.

Die doel van hierdie ondersoek was hoofsaaklik om 'n geskikte metode te probeer vind waarvolgens die Rooibloomsaad onder aseptiese toestande op 'n kultuurmedium ontkiem kan word met die oog op die uiteindelijke aseptiese kultivering van die kiemplante.

HOOFSTUK 11.

METODES.

'n Sintetiese medium waarop die parasitiese Rooi-blomplant suksesvol gekweek kan word sal sekerklik 'n heel komplekse een wees. Afgesien van sy normale vereistes sal hierdie plant, vanweë sy holoparasitiese aard in 'n vroeë stadium, ook 'n koolstofbron in die groei-medium tot sy beskikking moet hê. Die moontlikheid dat vitamienene en ander groeistowwe ook in die medium nodig sal wees is nie uitgesluit nie. Vir die doel van hierdie ondersoek is daar voorlopig van die Hoagland en Snyder (H & S) kultuur oplossing vir hoërplante as basiese medium gebruik gemaak. By hierdie voedingsoplossing is 3.0% sukrose (30 gram per liter), as koolstofbron, bygevoeg. Waar dit nodig was is daar ook 1.5% agar by die medium gevoeg. Die H & S medium word soos volg saamgestel. (Hewitt, 1952.)

KNO_3	0.51 gm.
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.82 gm.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.49 gm.
KH_2PO_4	0.136 gm.
Ystertartraat (5.0% oplossing)	1.0 ml.
A-Z-spoorelementoplossing	1.0 ml.
Gedistilleerde water	1000 ml.

Die A-Z-spoorelementoplossing is opgemaak deur die genoemde hoeveelhede van die volgende soute in 18 liter gedistilleerde water op te los.

$\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ (1.0 gm.); KI (0.5 gm.); KBr (0.5 gm.); TiO (1.0 gm.); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.5 gm.); LiCl (0.5 gm.); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.0 gm.); H_3BO_3 (11.0 gm.); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 gm.); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.0 gm.); $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.0 gm.); $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ (1.0 gm.).

Die finale pH van hierdie medium is ongeveer 4.6 (gemeet met 'n "Metrohm" pH-meter.)

Rooiblomsaad is op die agarplate, wat van hierdie medium gemaak is, gestrooi, en die mikroörganismes, wat konstant op die plate voorgekom het, is geïsoleer en so noukeurig moontlik geïdentifiseer.

Die groei van die drie belangrikste saadklewende fungi, naamlik Phoma sp., Aspergillus niger en Mucor hiemalis, op die H & S-medium en soos beïnvloed deur die koolstofvoorraad, vitamiengehalte en inkubasietemperatuur is nagegaan/

nagegaan teneinde die optimale groeitoestande vir elkeen van die soorte so noukeurig moontlik vas te stel. Die bepaling van die optimale groeitoestande vir hierdie fungi was nodig teneinde dit moontlik te maak om die minimum-letalekonsentrasie van die verskillende swamdoders te bepaal.

Die invloed van verskillende swamdoders op die drie genoemde fungi is by hierdie optimale toestande nagegaan. Daar is veral gepoog om die minimum-konsentrasie van die swamdoders wat daartoe instaat is om die groei van die fungi onder optimale toestande op H & S agar te voorkom, te bepaal. Die swamdoders wat uit hierdie resultate as doeltreffend beskou kan word, is gebruik om die Rooiblomsaad mee te behandel.

Behalwe die fungi is daar ook 'n saadklewende bakterie geïsoleer. Hierdie bakterie, 'n Bacillus sp., het op feitlik alle plate met saad voorgekom. Die optimale groeitoestande van hierdie bakterie is om dieselfde redes as die vir die fungi nagegaan. By hierdie optimale toestande is die invloed van verskillende bakteriedoders daarop ondersoek en die bakteriedoders wat as doeltreffend beskou is, is gebruik vir die verdere behandeling van die Rooiblomsaad.

In hierdie ondersoek is die moontlikhede van twee metodes vir die aseptiese ontkieming van die saad van Striga lutea oorweeg.

(1) Geweekte sowel as droë Rooiblomsaad is met verskeie swamdoders en bakteriedoders behandel. Na die behandeling van die saad is die mate van steriliteit wat verkry is asook die vermoë daarvan om daarna nog te ontkiem, bepaal.

(2) Onbehandelde Rooiblomsaad is op agarplate, waarby sekere hoeveelhede van sekere ontsmettingsmiddels gevoeg is, geplaas en pogings is aangewend om die saad op hierdie "vergiftigde" agar te laat ontkiem. Die moontlikheid daarvan dat sekere ontsmettingsmiddels die groei van die mikroörganismes kan verhinder, sonder om die saad permanent te beskadig, is ook ondersoek.

Pogings is verder aangewend om die saad, wat op hierdie vergiftigde agarplate ontkiem het, verder te laat ontwikkel. Hierdie aspek van die saak is eintlik 'n volgende stap in die Rooiblomnavorsingsprogram en daar is gevolglik nie veel in hierdie verband gedoen nie.

HOOFSTUK 111.DIE ISOLERING EN IDENTIFISERING VAN DIE
SAADKLEWENDE MIKROÛRGANISMES.

Die ondersoek is met 'n hoeveelheid Rooiblomsaad, wat van die Plantkunde-departement van die Potchefstroomse Universiteit verkry is, uitgevoer.

Volgens wat aan my meegedeel is, is hierdie saad gedurende 1951 in mielielande in die omgewing van Vereeniging, versamel. Die saadmonster, wat uit omtrent 4 - 5 gram saad bestaan het, is in 'n skoon, steriele proefbuis met 'n watteprop geplaas. By die verwydering van 'n hoeveelheid saad uit die houer is deurgaans die strengste voorsorg getref teen enige moontlike verontreiniging van buite.

Isolering van die organismes.

Teneinde vas te stel watter mikroörganismes gereeld op die agarplate waarop Rooiblomsaad uitgesaai is, verskyn, is die volgende proef gedoen. 'n Hoeveelheid van die Rooiblomsaadjies is op H & S agarplate gesaai. Dertig plate is gebruik en op elkeen is van 50 - 100 saadjies uitgestrooi. Die plate is daarna vir drie dae by 30°C geïnkubeer. Na drie dae het daar op al hierdie plate mikroörganismes voorgekom. Die verskillende kolonies is afsonderlik op steriele agarplate oorgebring en volgens die gewone metodes in reinkultuur gebring (Pelczar, 1958). Gerieflikheids~~ent~~halwe is die geïsoleerde fungussoorte van simbole voorsien. Vyf fungi, wat onderskeidelik A, B, C, D en E gemerk is en een bakterie het almal saam op die meeste van die 30 plate voorgekom (sien tabel 1). Behalwe hierdie 6 mikroörganismes is daar op sommige plate ook ander aangetref. Dieselfde organisme het egter nooit op meer as een plaat voorgekom nie, en hulle is dus nie as egte saadklewende mikroörganismes beskou nie, maar as toevallige verontreinigers.

Tabel 1: Die verskyning van die mikroörganismes op die 30 plate waarop die Strigasaad uitgesaai is.

Organismes	A	B	C	D	E	Bakt.	Ander Org.
Aantal plate waarop dit voorgekom het	30	24	20	14	9	30	6
Persentasie voorkoms	100	80	66 $\frac{2}{3}$	46 $\frac{3}{4}$	30	100	20

Uit die gegewens in table 1 is dit duidelik dat fungus A en die bakterie op al die plate voorgekom het, terwyl fungus B ook 'n hoë persentasie van die plate besmet het, naamlik, 80%. Alhoewel fungus C 'n laer persentasie voorkoms het (66 $\frac{2}{3}$ %) is die fungus 'n baie sterk groeier wat die hele plaat spoedig oorgroei. Die soorte D en E het op aansienlik minder plate voorgekom. Op die H & S medium het hierdie twee skimmels ook baie swakker gegroei as die eersgenoemde drie.

Volgens hierdie gegewens kan daar aangeneem word dat, wat hierdie monster saad betref, die skimmels A, B en C en die bakterie, en ook tot 'n mindere mate die skimmels D en E, as die saadklewende mikroörganismes beskou kan word.

Beskrywing en identifisering van die organismes.

Fungus A:

Op H & S agar vorm die fungus 'n vuilwit miselium met 'n wollerige voorkoms. Die miselium vertoon geen sones nie. Na ongeveer ses dae se inkubasie ontwikkel die miselium 'n helderrooi pigment. Hierdie pigmentasie vind egter vinniger plaas by blootstelling aan lig. Die piknidiums, met 'n deursnee van 25 - 150 μ , verskyn na ongeveer drie dae op die H & S agar. Die piknidiums is sferies met 'n donkerbruin tot swart kleur en mag op die agaroppervlakte voorkom, of mag daarin versink wees. Die meeste piknidiums word in die middelste gedeelte van die kultuur gevorm. Op hawermout-agar is die konidiumvorming baie meer intens as op die H & S agar.

Die konidiums is kleurloos, ovaalvormig met ronde uiteindes en is ongeseptheid. Die spore is 2.5 - 4.5 μ lank en 1.5 - 2.3 μ breed. By elke pool van die konidium kom 'n duidelike oliedruppel voor.

Hierdie fungus mag 'n Phoma sp. of 'n Phyllosticta sp. wees. Die enigste onderskeid wat tussen hierdie twee genera bestaan is dat eersgenoemde op die stingels van die gashere voorkom terwyl Phyllosticta op die blare daarvan voorkom. Maar selfs hierdie onderskeid is baie onbetroubaar. Baie soorte van hierdie genera groei ewe goed op blare of stingels van die gasheerplant (Smith, 1954). Aangesien ek nie hierdie fungus van die blare of stingels van die gasheer geïsoleer het nie en laasgenoemde dus onbekend is, kan die identifikasie nie verder gevoer word nie. 'n Kultuur van die fungus is ook na die Sentraalbureau voor Schimmelcultures, te Baarn (van Beverwijk, 75) gestuur vir identifikasie. Hulle bevinding is onge-

lukkig nog nie bekend nie. Uit beskikbare bronne skyn dit egter asof hierdie fungus 'n Phoma sp. is. In die literatuur kon egter geen beskrywing van parasitiese Phomasoorte op Striga gevind word nie. Oudemans (1923) ~~beskryf~~^{noem} wel 'n aantal Phomasoorte wat op halfparasitiese Scrophulariaceae voorkom.

Fungus B:

Die miselium groei vinnig op H & S agar en vertoon effens gelerig. Die konidiofore ontstaan in digte massas direk uit die substraat. Die konidiofoor is kleurloos, met 'n dik wand en 'n sferiese kop met 'n deursnee van $\pm 30 \mu$. Sterigmas van die kop kom in twee reekse voor. Die primêre sterigmas word $\pm 17 \mu$ lank en die sekondêre sterigmas (fialiede) is flesvormig. Die konidiums is sferies met 'n stekelrige wand, koolswart en 'n deursnee van $2.5 - 4.0 \mu$. Geen sklerotiums of geslagtelike proses is waargeneem nie. Die fungus is Aspergillus niger van Tieghem.

Fungus C:

Op H & S agar vul die miselium van hierdie fungus die plaat heeltemal binne vier dae. Die hifes is ryklik vertak en die opeenvolgende vertakings word gaandeweg dunner, met die aan die uiteindes baie dunner as die ouer hifes. 'n Gedeelte van die miselium is in die agar versink. Sporangiofore is onvertak, ontstaan enkeld en groei regop tot 'n lengte van ongeveer 1 sm. Hulle dra 'n enkele, terminale ^{tot} sporangium. Die sporangium het 'n duidelike sferiese/ovaalvormige ~~kalumella~~^{kalumella}. Die kultuur vertoon grys-geel. Die spore is baie ongelyk, ellipties tot verleng, gewoonlik 6.0μ lank en 3.0μ breed. Die wand is dun, glad en kleurloos. Die fungus is Mucor hiemalis (Wehmer).

Fungus D:

Die miselium van hierdie fungus vertoon baie yl op die H & S agar. Die kruipende hifes vul egter die plaat binne drie dae. Risofede ontstaan op die punte waar sporangiofore uit die hifes ontspring. Die sporangiofore ontstaan in groepies van 3 - 5 en word tot 5 m.m. lank. Die sporangiums, wat terminaal gedra word, is hemisferies met 'n deursnee van $\pm 150 - 300 \mu$. Die ~~kalumella~~^{kalumella} is groot, hemisferies, $70 - 80 \mu$ breed en $90 - 100 \mu$ hoog. Die spore is onreëlmatig en wissel van rond tot ovaalvormig, $8-10 \mu$ by $5 - 8 \mu$ met 'n donker grysblou kleur. Die fungus/

fungus is Rhizopus nigricans Ehrenberg.

Fungus E:

Die miselium vertoon 'n swart-groenerige kleur en die kolonies het 'n ronde vorm op H & S agar. Die hifes is goedontwikkel, hialien, geartikuleerd, $\pm 4 \mu$ in deursnee en gesepteerd. Die konidiofore ontstaan enkel en is kort, regop, gesepteerd en onvertak. Die konidiums is kolfvormig met 'n verlengde top en 3 - 7 maal gesepteerd. Aanvanklik is die konidiums kleurloos maar vertoon donker swartgroen by volwassenheid. Die konidiums is omtrent 30 - 40 μ lank. Die fungus is 'n Alternaria spesies.

Die bakterium:

Die standaardmetode vir die identifikasie van bakterieë, soos in die Bergey's Manual (Breed et al, 1957) aangegee, is gebruik. Aangesien die vernaamste fisiologiese kenmerke by die identifikasie bepaal moet word is die standaardmetode effens uitgebrei teneinde die optimale groeitoestande van hierdie bakterie op voedingsagar vas te stel. 'n Vergelyking is toe gemaak ^{van} met die groei op lg. medium met die op H & S agar met verskillende suikers.

In die volgende tabel word die vernaamste morfologiese, kultuur en fisiologiese kenmerke van die bakterie aangegee:

I. MORFOLOGIESE KENMERKE:

(i) Vegetatiewe selle:

Vorm: Stafies. Grootte: 0.7 - 1.0 $\mu \times 2.0 - 3.5 \mu$.

Rangskikking: Lang kettings. Beweeglikheid: Onbeweeglik.

(ii) Spore:

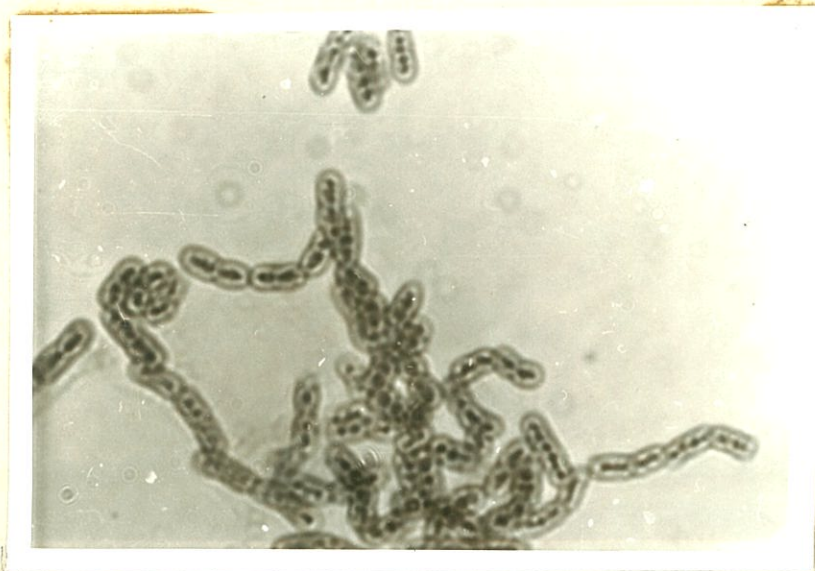
Grootte: 0.5 - 0.9 $\times$ 1.0 - 1.5 μ . Posisie: Sentraal

Vorm: Silindries (Sien figuur 3.)

(iii) Kleuringsreaksies.

Gram: Gramnegatief. Suurvastheid: Negatief.

Grana: Aanwesig. Kapsuul: Aanwesig, 0.5 μ sone.



FIGUUR 3 :Vegetatiewe selle met spore.

II KULTUUR- KENMERKE:

(i) Agarkolonies.

- a) Makroskopiese voorkoms. Vorm: Rond. Grootte. 4-10 m/m. Rand: Gegolf.
- b) Oppervlak: Topografie: Glad. Elevasie: Effens opgehewe. Konsistensie: Botteragtig.
- c) Optiese kenmerke: Deurskynend. Kleur: Dofwit.
- d) Mikroskopiese kenmerke. Rand: Lobbig. Inwendige struktuur: Korrelrig.

(ii) Skuinskultuur (Agar).

- a) Groei. Vorm: Pêrelsnoer-vormig. Hoeveelheid: Oorvloedig.
- b) Oppervlak. Topografie: Glad. Elevasie: Effens opgehewe. Rand: Gegolf. Digtheid: Botteragtig.
- c) Optiese kenmerke: Deurskynend. Kleur: Dofwit.
- d) Medium (diffusie van pigmente): Geen. Reuk: Geen.

(iii) ^{Bouillon} Voedingsoplossing.

Oppervlaktgroe: Vliesagtig. Hoeveelheid: Gering.
Sediment: Karig. Troebling: Troebel. Kleur: Geen.

(iv) Steekkultuur in gelatien.

Vorm: Kratervormig. Hoeveelheid: Beste aan top.
Vervloeiing: Waargeneem vanaf die vyfde dag.

III FISIOLOGIESE KENMERKE:

(i) Temperatuurverhoudinge:

Optimum: 30 - 37°C. Minimum: $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Maksimum: $\pm 50^{\circ}\text{C}$.

(ii) pH - verhoudinge.

Optimum: 7.6. Minimum: 3.9 Maksimum: 10.0

(iii) Suurstofverhoudinge.

Aeroob: Aeroob. Fakultatief: Geen groei. Anaeroob: Geen groei.

(iv) Fermentasie (Suurvorming en gasvorming).

Glukose: Suur, geen gas.

Laktose: Negatief.

Maltose: Suur, geen gas.

Sukrose: Suur, geen gas.

Stysel: Suur, geen gas.

Mannitol: Suur, geen gas.

(v) Indol-produksie.

Medium: Triptonoplossing. Toets: Kovac. Indol: Negatief.

(vi) Hidrogeensulfied-produksie (H₂S).

Medium: Loodasetaat Agar. Toets: Neerslag van lood-sulfied(PbS). H₂S: Negatief.

(vii) Lakmoesmelk/

(vii) Lakmoesmelk.

Reaksie: Suur, dikmelk. Peptonisasie: Geen. Reduksie van lakmoes: Negatief. Gasvorming: Negatief.

(viii) Persmelk.

Reaksie: Suur, dikmelk. Peptonisasie: Geen.

(ix) Inwerking op Nitrate.

Medium: Nitraatoplossing. Temp.: 32°C. Gas(N₂): Negatief.

Nitriete: Positief (Greiss-Ilosva toets). Ammoniak:Negatief.

IV ADDISIONELE TOETSE.

(i) Voges - Proskauer.

Asetiel metielkarbinol: Negatief.(Barritts se metode).

(ii) Metielrooi-toets.

Negatief.

(iii) Hidroliese van stysel.

Positief.

(iv) Katalase-vorming.

Positief.

(v) Groei in 5% natriumchloriedoplossing.

Positief.

(vi) Groei op ertappelstukke.

Positief.

(vii) Hidroliese van kaseien.

Negatief.

(viii) Groei op glukose-^{bouillon-agar}voedingsagar.

Baie beter as op voedingsagar. Vegetatiewe selle nie gevakuoleer nie.

(ix) Groei op H & S - Agar + 3.0% glukose.

Groei net so goed soos op glukose-voedingsagar.

(x) Groei op H & S-Agar + 3.0% sukrose.

Nie so goed soos op glukose-voedingsagar nie.

(xi) Groei op H & S-Agar + maltose.

Nie so goed soos op glukose-voedingsagar nie.

(xii) Groei op H & S-Agar + laktose.

Baie swak.

Op H & S Agar met 3.0% glukose en 'n inkubasie-temperatuur van 35°C is hierdie bakterie dus naby aan sy optimale groeitoestande, volgens hierdie gegewens.

Uit hierdie gegewens kon ek ^{vasstel} aflei dat die bakterie 'n Bacillus spesies is wat baie nou verwant is aan Bacillus subtilis.

HOOFSTUK IV

VASSTELLING VAN 'n GESKIKTE SUIKER VIR
DIE GROEI VAN PHOMA ASPERGILLUS EN MUCOR.

INLEIDING:

Koolstof is van groot belang by die voeding van fungi. Die protoplasma, ensieme, selwand en reserwevoedsel in die selle is verbindings van koolstof. Feitlik die helfte van die droëgewig van die fungus-miselium bestaan uit koolstof (Lilly en Barnett, 1951). Koolhidrate vorm gewoonlik die geskikste koolstofbron vir fungi (Tamiya, 1932). Die meerderheid van kultiveerbare fungi kan volgens Brannon (1923) glukose en fruktose ewe goed gebruik. Steinberg (1939) het gevind dat laktose en glycerol nie geskik is vir die groei en ontwikkeling van Aspergillus niger nie. Die fungus groei egter goed op dekstrose, fruktose, sukrose en l-sorbose. Maltose is vir baie fungi net so 'n goeie koolstofbron as glukose (Hawker, 1950).

Sukrose vorm 'n goeie koolstofbron vir 'n groot aantal fungi. Die suiker word dikwels in sintetiese mediums gebruik. Sommige fungi groei egter nie goed op 'n medium wat sukrose as die enigste bron van koolstof bevat nie. 'n Aantal fungi kan glad nie op 'n sukrose-medium groei nie. Die vermoë van 'n bepaalde fungus om sukrose te gebruik hang af van die vermoë daarvan om invertase te vorm. Hawker en Chaudhuri (1946) het so 'n korrelasie tussen groeisnelheid op sukrose en die hoeveelheid invertase wat gevorm is by Podospora sp., Chaetomium cochliodes en Pyronema confluens aangetoon.

Margolin (1942) het gevind dat die droëgewig van Mucor ramannianus die hoogste is waar maltose as koolstofbron gebruik is. Hy het ook hoë waardes gekry met laktose, fruktose en galaktose. Mannose, glukose en sukrose het egter 'n lae droëgewig van die miselium gelewer. Met Rhizopus nigricans kry hy die hoogste waardes met glukose as koolstofbron terwyl sukrose, fruktose en laktose lae waardes gelewer het.

METODE:

By die bepaling van die mate van groei van 'n fungus word hoofsaaklik van twee metodes gebruik gemaak. By die een metode word die droëgewig van die miselium bepaal/

bepaal en by die ander word die liniêre groei van die fungus op 'n vaste bodem gemeet.

Die eersgenoemde metode sluit feitlik altyd die gebruik van 'n vloeibare medium in. 'n Vloeibare medium is nie baie geskik vir die normale groei van die meeste fungi nie. Groei vind egter baie meer normaal plaas as die vloeistof nie baie diep is nie (Hawker, 1950). 'n Groot nadeel van hierdie metode is dat daar nie ~~egter~~ *opteen* - volgende metings van dieselfde kultuur gemaak kan word nie, daar die fungus tydens die bepaling gedood word. 'n Enkele bepaling in hierdie verband is selde van veel waarde. Die metode kan wel voordelig aangewend word waar die totale hoeveelheid groei wat in 'n sekere tydspan plaasgevind het, bepaal moet word.

By die tweede metode word die deursnee van die kolonies op agar gemeet. Die toename in die deursnee van die kolonie dui die groeisnelheid aan. Hierdie metode het die voordele dat dit redelik eenvoudig uitgevoer kan word en dat die fungus nie gedurende die bepaling gedood word nie. Meer as een lesing kan gevolglik op verskillende tye van dieselfde kultuur geneem word. Die grootste nadeel van hierdie metode is dat die deursnee van die kolonie nie 'n ware beeld gee van die hoeveelheid miselium wat gevorm is nie. Kolonies met dieselfde deursnee kan, wat die absolute hoeveelheid miselium betref, aansienlik van mekaar verskil (Hawker, 1950). Brown (1923) het tot die gevolgtrekking gekom dat "the method of linear measurement is the best to apply in exploratory work."

By die bepaling van die groei van 'n fungus word ook van ander metodes gebruik gemaak. Daar is pogings aangewend om die groeisnelheid te koreleer met die respirasiesnelheid, die absorpsie van glukose of ander voedingstowwe uit die medium of die verandering van die pH van die medium. Hierdie metodes is egter gewoonlik baie gekompliseerd en die interpretasie van die resultate is moeilik.

Om te bepaal watter suiker vir die groei van Phoma, Aspergillus en Mucor die geskikste koolstofbron uitmaak is van beide die metodes, nl. die droëgewigsbepaling en die meting van liniêre groei, gebruik gemaak.

I DROÛGEWIGBEPALING:

Die H & S kultuurmedium is as basiese medium vir hierdie proef gebruik. Die suiker, waarvan die invloed op die groei nagegaan is, is in 'n 3.0% konsentrasie by hierdie medium gevoeg. Die invloed van glukose, sukrose, laktose en/

en maltose is nagegaan.

Erlenmeyer-flesse van 250 ml. kapasiteit is in die proef gebruik. In elke fles is 50 ml. van die H & S medium + 3.0% van die bepaalde suiker geplaas. Die flesse is daarna vir 20 minute by een atmosfeer gesteriliseer. Vervolgens is in elke fles 1 ml. van 'n homogene sporesuspensie van die bepaalde fungus, deur middel van 'n steriele pipet, bygevoeg. Die sporesuspensies is berei deur 5 ml. steriele, gedistilleerde water in 'n kultuurbuis wat 'n drie-dae-oue kultuur van die fungus op Sabouraud agar bevat het te pipetteer. Die Aspergillus- en Mucorkulture is daarna goed geskud. By Phoma is die kultuur eers met 'n steriele naald meganies beskadig ten einde die spore uit die piknidiums vry te stel.

Die flesse is by 'n temperatuur van 25°C geïnkubeer. Na 'n inkubasieperiode van agt dae is die flesse uit die inkubator verwyder en die droëgewig van die gevormde miseliums bepaal. Vir hierdie bepaling is die inhoud van elke fles gefiltreer. Die velle filtreerpapier was vooraf genommer en afsonderlik in gemerkte weegbotteltjies geplaas. Die weegbotteltjies is daarna by 105°C gedroog, in 'n eksikator geplaas en toe geweeg. Na die filtrering is die miseliums eers met warm water en daarna met koue, gedistilleerde water gewas. Daarna is die filtreerpapier met die miseliums weer in die bybehorende weegbotteltjies geplaas en vir twaalf uur by 'n temperatuur van 70 - 90°C, gevolg deur twee uur by 105°C, gedroog (Allen, 1953). Nadat die weegbotteltjies met hul inhoud in 'n eksikator afgekoel is, is hulle geweeg en 'n verdere uur by 105°C gedroog, afgekoel en weer geweeg. Die proses is herhaal totdat 'n konstante gewig verkry is. Alle gewigte is tot die eerste desimaal benader.

voeg in tabelle 2A, 2B en 2C.

Uit hierdie gegewens is dit duidelik dat Phoma en Mucor die grootste miseliumgewig lewer wanneer glukose as koolstofbron gebruik word. Aspergillus lewer egter die grootste gewig wanneer maltose gebruik word.

Glukose en sukrose lewer by lg. fungus egter ook 'n baie goeie miseliumgroei. Maltose, glukose en sukrose is dus aldie goeie koolstofbronne vir Aspergillus. Dit stem ooreen met die resultate wat Steinberg (1939) met die fungus verkry het.

Maltose/

Maltose en sukrose het ook goeie miseliumgroei by Phoma en Mucor veroorsaak. Uit die resultate is dit duidelik dat laktose vir al drie hierdie fungi 'n swak koolstofbron uitmaak. Waar laktose voorsien is word 'n baie skerp afname in die droëgewig waargeneem.

Glukose kan beskou word as die geskikste koolstofbron vir hierdie drie fungussoorte. Vir alle toekomstige proewe is glukose in die mediums gebruik.

TABEL 2.

DIE INVLOED VAN VERSKILLENDE SUIKERS OP DIE DROEG-
GEWIG VAN DIE MISELIUM VAN DIE ONDER-
SCEKTE FUNGUS-SOORTE.

2A: PHOMA.

Suiker	Miselium-gewig in ~~m.gm.~~ mg.	Gemiddelde ge- wig in ~~m.gm.~~ mg.
Glukose	146.0 148.4 148.6	147.7
Sukrose	70.0 70.5 71.4	70.7
Maltose	98.0 96.6 96.2	96.9
Laktose	40.4 40.8 41.4	40.9

2B: ASPERGILLUS.

Suiker	Miselium-gewig in ~~m.gm.~~ mg.	Gemiddelde ge- wig in ~~m.gm.~~ mg.
Glukose	401.4 403.2 400.8	401.8
Sukrose	342.4 349.8 346.0	346.1
Maltose	459.8 444.0 446.0	449.9
Laktose	19.6 18.0 16.8	18.1

TABEL 2. Vervolg:

2C: MUCOR.

Suiker	Miselium-gewig in ~~m-gm.~~ mg.	Gemiddelde ge- wig in ~~m-gm.~~ mg.
Glukose	35.8 37.0 36.2	36.3
Sukrose	31.6 30.5 30.8	31.0
Maltose	33.4 32.6 34.2	33.4
Laktose	22.8 - 23.6	23.2

II LINIËRE GROEI:

Die invloed van vier verskillende suikers op die miseliumgroei van die ondersoekte swamme is ook volgens die bepaling van die liniêre groei daarvan bestudeer. Vir hierdie bepalings is daar van petribakkies, met 'n deursnee van 9 sm., gebruik gemaak. In elke bakkie is 25 ml. van die H & S medium, wat reeds die gewenste hoeveelheid van die bepaalde suiker bevat het, ingegiet. Met hierdie reeks bepalings is die invloed van glukose, sukrose, maltose en laktose nagegaan. Hierdie suikers is in 'n konsentrasie van 3.0% (per gewig) tot die medium bygevoeg. Elke bakkie met sy inhoud is vervolgens met 'n platienogie van die sporesuspensie van die gewenste fungus geënt. Elke kultuur is $\pm$ in die middel geënt sodat die kolonies na buite kon ontwikkel. Die kulture is by 25°C geïnkubeer. Na een dag se groei is die eerste bepaling vir die Mucor-kultuur gedoen, aangesien die skimmel baie vinnig groei. Na twee dae se groei is daaglikse metings van die deursnee van die kolonies van al drie die fungi gedoen. 'n Noukeurige liniaal en 'n vergrootglas wat op die regte brandpuntsafstand gestut is, is vir die meting gebruik. Die kulture is van onder af belig deur 'n skuinsinvallende lig. Met hierdie hulpmiddels kon die metings baie noukeurig uitgevoer word.

Voeg in tabelle 3, 4 en 5 en figure 6,7 en 8.

~~Met~~^{uit} hierdie gegewens is dit duidelik dat, behalwe met glukose, daar ook goeie groei plaasgevind het met sukrose en maltose in die medium. Met glukose in die medium het Phoma en Mucor die hoogste waardes gelewer. Aspergillus het maksimale ontwikkeling op maltose getoon, maar goeie groei is ook met sukrose en glukose verkry. Laktose was in alle gevalle die ondoeltreffendste koolstofbron. As hierdie resultate met die droëgewigte van die fungi op dieselfde suikers vergelyk word, is dit opvallend dat daar in hierdie geval 'n baie noue korrelasie bestaan.

'n Aantal duidelike groeikenmerke van hierdie fungi kan waargeneem word in die grafiese voorstelling in figure 6, 7 en 8. Phoma (fig.6) vertoon 'n tipiese groeikromme nl. (i) 'n aanvanklike groeitempo waar die deursnee van die miselium geleidelik plaasvind en (ii) die normale

groeitempo, /

groeitempo, wat hier van ongeveer die derde dag af intree en 'n reëlmatige daaglikse toename toon. Volgens Hawker (1950) is hierdie verskynsel waar die groeitempo aanvanklik stadig toeneem om daarna 'n reëlmatige toename te hê, 'n kenmerk van die nieverouderende fungi. Met laktose as koolstofbron neem die toename in koloniedeursnee vanaf die sesde dag reeds weer af.

By Aspergillus (fig. 7) vind ons dat, net soos in die geval van die droëgewig, glukose, maltose en sukrose baie geskik is vir die groei van die fungus. Die waardes vir maltose is effens hoër as die vir glukose en sukrose, maar die verskil is egter gering. Die waardes wat met laktose as koolstofbron verkry is, is egter baie laer.

Wat dadelik opval uit fig. 8 van Mucor is dat die groeikromme hier baie steiler is as in die vorige twee gevalle. Verder kan daar na die derde dag 'n afname in die groei waargeneem word. Hierdie afname kan moontlik aan twee oorsake toegeskryf word, nl. (i) die voedselvoorrade in die voedingsmedium mag uitgeput raak, en (ii) die fungus kan van die verouderende tipe wees. Laasgenoemde moontlikheid is vir my egter die mins aanneemlike. Volgens Brown (1923) gaan veroudering gewoonlik gepaard met verandering in die vorm van die kultuur. Die rand van die kultuur word baie onreëlmatig en behou nie meer sy ronde vorm nie. In die geval van Mucor het die ronde vorm egter deurentyd behoue gebly en die rand van die kultuur was reëlmatig.

Opsommend kan dus gesê word dat glukose en maltose die geskikste koolstofbronne vir hierdie drie fungi is. Aspergillus kan ewe goed van sukrose gebruik maak terwyl Mucor en Phoma minder suksesvol groei wanneer dit as koolstofbron aangebied word.

TABEL 3.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN PHOMA OP
AGARPLATE MET VERSKILLENDE
SUIKERS AS KOOLSTOFBRON.

		Ouderdom in dae.						
Suiker	Repli- kate.	2	3	4	5	6	7	8
		Deursnee in m,m.						
Glukose	1	7.5	13.4	21.5	32.0	42.5	55.0	66.5
	2	5.5	12.5	21.5	31.0	42.0	54.0	68.5
	3	6.5	14.0	22.0	-	-	-	-
	Gem.	6.5	13.3	21.7	31.5	42.3	54.5	67.5
Sukrose	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	3.0	10.0	18.5	28.5	39.5	50.5	62.0
	3	2.0	9.0	17.5	26.5	39.0	51.0	62.5
	Gem.	2.5	9.5	18.0	27.5	39.3	50.8	62.3
Laktose	1	-	2.5	7.0	10.5	16.0	17.0	19.0
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	3.5	8.0	17.5	26.0	30.0	36.0
	Gem.	-	3.0	7.5	14.0	21.0	23.5	27.5
Maltose	1	6.0	12.5	22.0	28.5	41.5	51.5	64.5
	2	7.0	13.0	21.0	32.0	42.5	53.5	66.0
	3	4.5	12.0	21.5	30.0	40.0	52.0	68.0
	Gem.	5.8	12.5	21.5	30.2	41.3	52.3	66.2

TABEL 4.

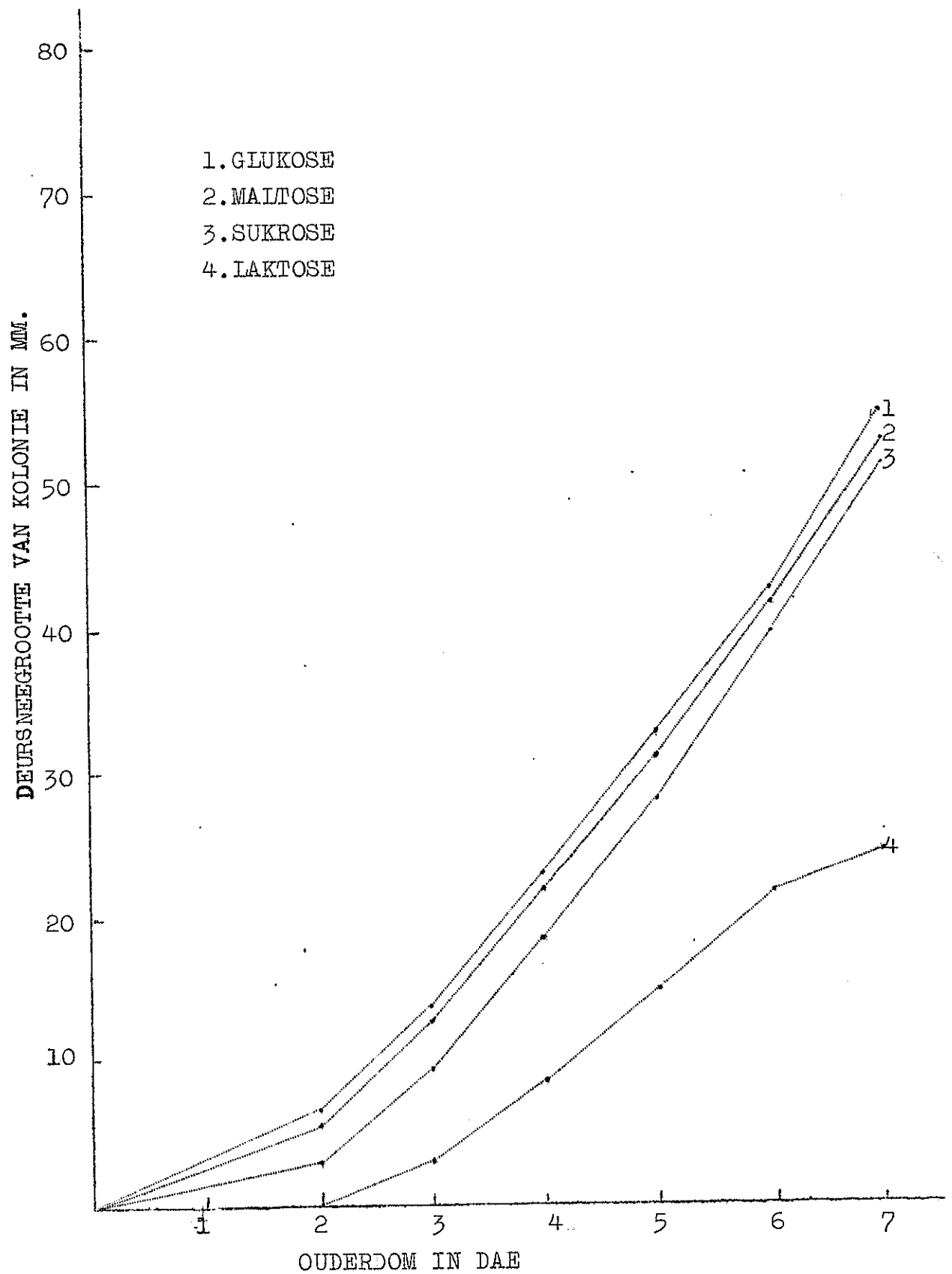
DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN ASPERGILLUS IN ~~M.M.~~ mm.
OP AGARPLATE MET VERSKILLENDE
SUIKERS AS KOOLSTOFBRON.

		Ouderdom in dae.				
		2	3	4	5	6
Suiker	Replikate	Deursnee in mm.				
Glukose	1	18.5	30.5	39.0	61.0	70.0
	2	19.0	29.0	42.0	60.0	71.5
	3	20.0	29.0	41.5	57.5	71.5
	Gem.	19.2	29.5	40.8	59.5	71.0
Sukrose	1	17.5	26.5	44.0	62.0	71.0
	2	17.0	26.0	42.0	60.5	71.5
	3	17.8	27.0	44.0	60.5	71.0
	Gem.	17.4	26.5	43.3	61.0	71.5
Laktose	1	10.0	16.0	18.0	27.0	32.0
	2	10.5	15.5	21.5	27.5	33.0
	3	10.0	14.5	20.0	24.0	29.0
	Gem.	10.2	15.3	19.8	26.2	31.3
Maltose	1	19.5	36.0	50.5	70.0	77.5
	2	21.0	35.0	50.5	70.5	76.0
	3	22.0	32.0	51.0	68.0	75.8
	Gem.	20.8	34.3	50.7	69.5	76.5

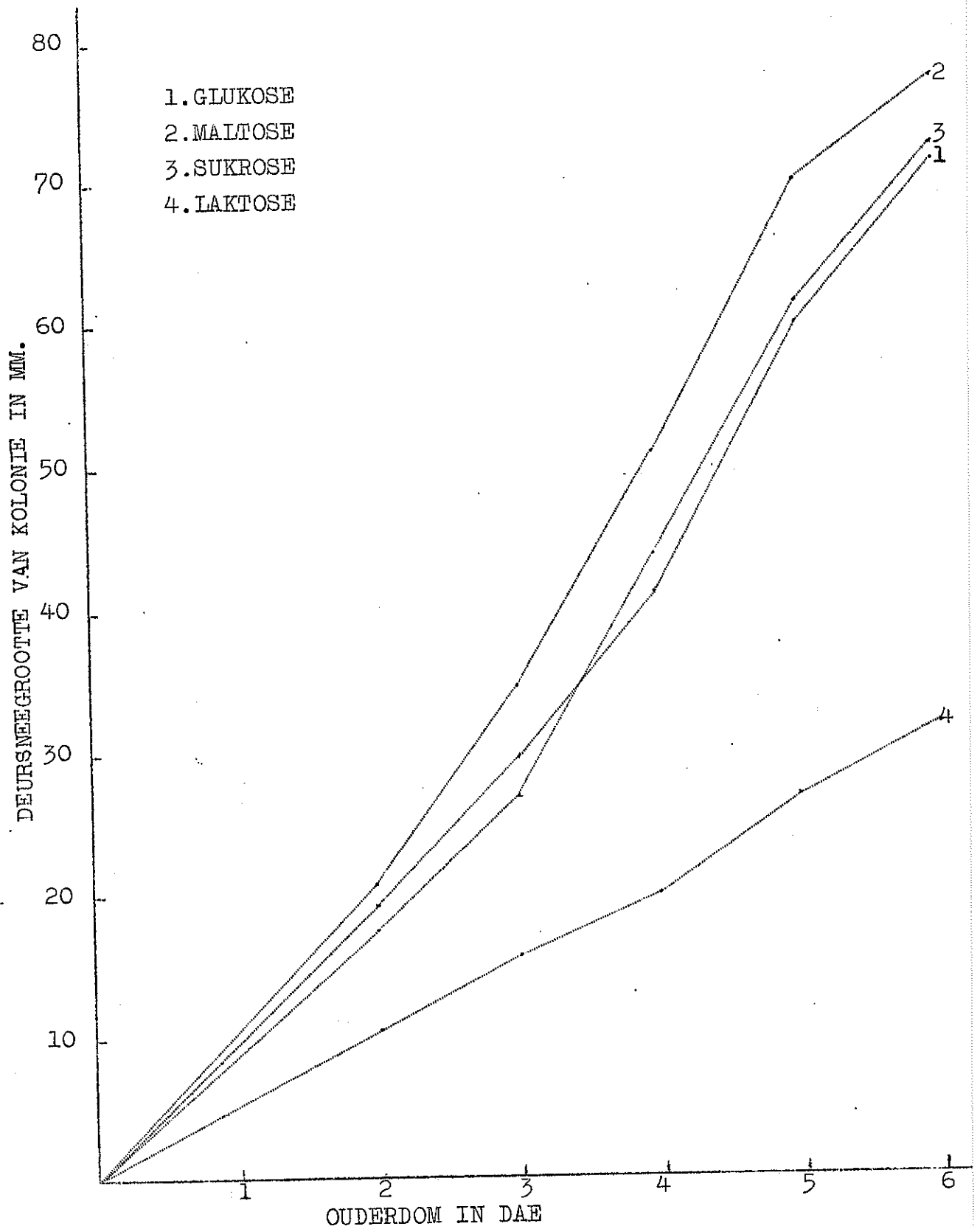
TABEL 5.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN MUCOR IN ~~M.M.~~ mm.
OP AGARPLATE MET VERSKILLENDE
SUIKERS AS KOOLSTOFBRON.

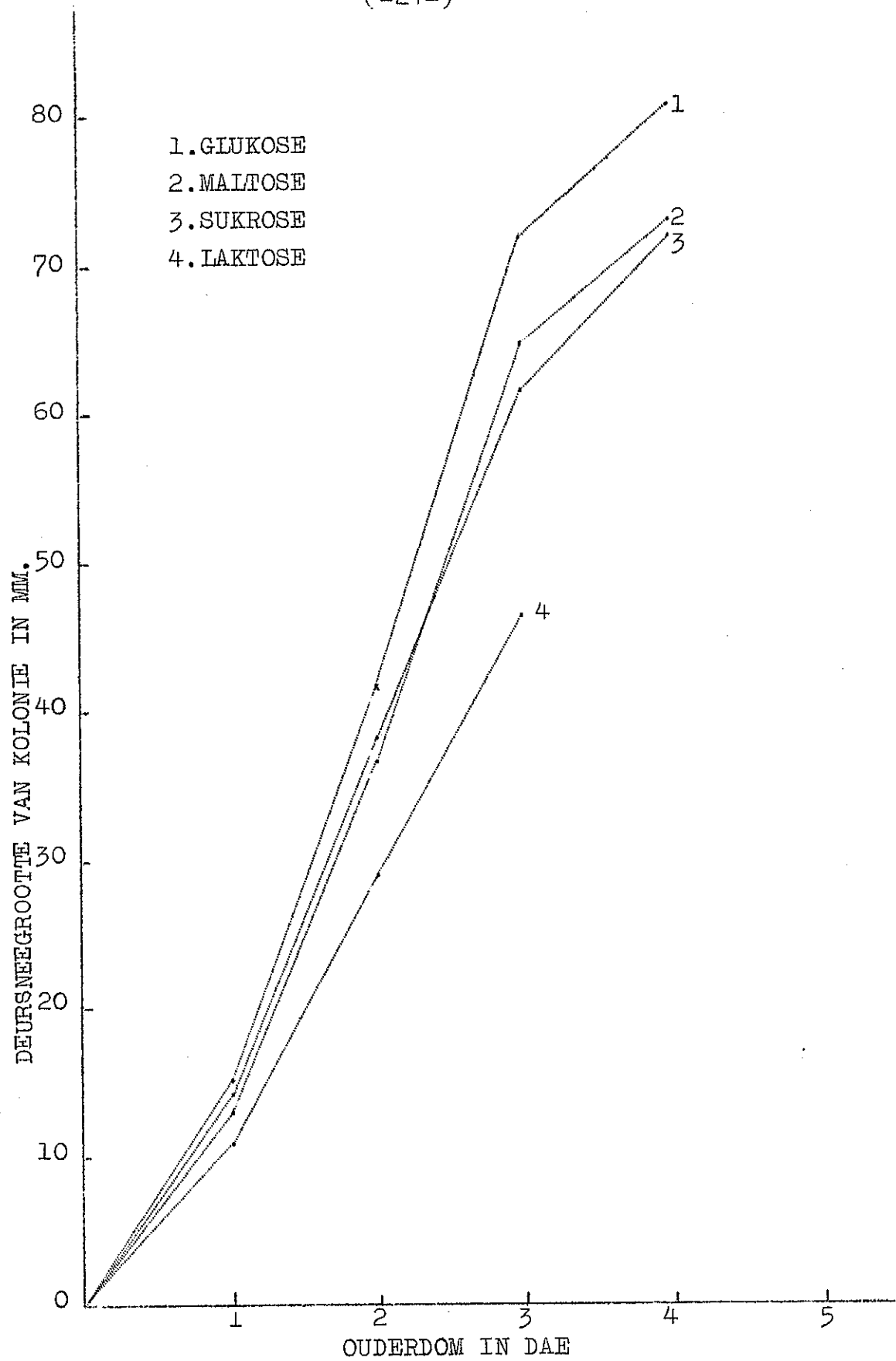
		Ouderdom in dae.			
		1	2	3	4
Suiker	Replikate	Deursnee in m,m.			
Glukose	1	14.5	42.0	75.0	80.0
	2	15.0	41.0	69.0	80.5
	3	15.5	40.5	70.0	79.5
	Gem.	15.0	41.2	71.1	80.0
Sukrose	1	14.5	38.0	60.5	71.0
	2	13.5	37.0	61.0	71.5
	3	14.0	38.5	61.5	72.0
	Gem.	14.0	37.8	61.0	71.5
Laktose	1	11.5	32.0	46.0	
	2	10.5	29.0	46.0	
	3	10.5	25.5	46.0	
	Gem.	10.8	28.8	46.0	
Maltose	1	13.5	35.5	66.0	72.0
	2	12.5	37.0	67.0	72.5
	3	12.5	36.8	60.0	71.5
	Gem.	12.8	36.4	64.3	72.0



FIGUUR 6: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE GROEI VAN PHOMA OP VERSKILLENDE SUIKERS.



FIGUUR 7: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE GROEI VAN ASPERGILLUS OP VERSKILLENDE SUIKERS.



FIGUUR 8: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE GROEI VAN MUCOR OP VERSKILLENDE SUIKERS.

HOOFTUK V.

VASSTELLING VAN 'n GESKIKTE
GLUKOSEKONSENTRASIE VIR DIE GROEI VAN PHOMA,
ASPERGILLUS EN MUCOR.

INLEIDING:

Die konsentrasie van koolhidrate in die medium het 'n verreikende invloed op die groei van fungi. As die koolhidraatkonsentrasie bokant 'n sekere waarde verhoog word, word groei vertraag (Hawker, 1950). Die invloed van die konsentrasie van die bestanddele van die medium as geheel oefen ook dieselfde invloed uit op die groei van fungi. By baie lae koolhidraatkonsentrasies tree tekens van verhongering in. Die hifes ontwikkel baie swak en vertakking is gering. By 'n toename in die konsentrasie neem die groei toe, meer hifes word gevorm en hul vertak ook meer geredelik. Bokant 'n sekere optimumwaarde neem groei dan weer vinnig af. (Hawker, 1950). Hierdie optimumwaarde varieër geweldig van fungus tot fungus. Die optimale glukosekonsentrasie vir Ustilago violaceae is bv. slegs 0.2% (Horsfall en Zentmyer, 1944). Pencillium javanicum het weer volgens Lindgren en Harvey (1952) 'n optimum van 21.3%. Die osmotiese waarde van die medium is volgens Cochrane (1958) die beperkende faktor by sulke hoë koolhidraatkonsentrasies.

By koolhidraatkonsentrasies bokant die optimumwaarde tree veroudering van 'n kultuur dikwels ook gouer in. Brown (1923) skryf dit toe aan die vinnige ophoping van toksiese stowwe in die medium as gevolg van die meer intense metabolie. Cochrane (1958) skryf die vinnige afname in groeisnelheid van fungi op mediums met 'n hoë koolhidraatkonsentrasie ook toe aan die ophoping van toksiese metaboliese produkte.

Die verhoging van die koolhidraatgehalte van die medium bring nie altyd 'n ooreenstemmende toename in die droëgewig van fungi mee nie. Dit kan daaraan toegeskryf word dat die ander bestanddele van die medium, veral die stikstof, 'n beperkende uitwerking op die groei kan uitoefen. Binne sekere perke neem die groei egter eweredig toe met die toename in koolhidrate, mits daar voldoende stikstof in die medium aanwesig is. (Burkholder en Veigh, 1940).

Die uitwerking van die koolhidraatkonsentrasie is nie net merkbaar by die groei van die fungi nie, maar ook

by/

by die spoorvorming. Die konsentrasie wat die gunstigste is vir vegetatiewe groei is feitlik altyd te hoog vir spoorvorming. Spoorvorming word gewoonlik gestaak voordat die optimum vir vegetatiewe groei bereik is (Hawker, 1950). 'n Toename in die glukosekonsentrasie verminder, bv., die aantal peritesiums wat deur Chaetomium gevorm word nog voordat die optimum vir vegetatiewe groei bereik is (Tschudy, 1937).

METODE:

Uit die vorige eksperiment het dit geblyk dat aldrie die fungi gunstig groei met glukose as koolstofbron in die medium. Hierdie eksperiment is uitgevoer ten einde te bepaal by watter konsentrasie daarvan die fungi die beste groei. Hier is ook van beide metodes, nl. die droëgewigbepaling en die meting van liniêre groei gebruik gemaak.

(i) DROËGEWIGBEPALING:

Vir hierdie deel van die ondersoek is vyf reekse met die volgende glukosekonsentrasies in die H & S-kultuurmedium opgestel nl. 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0% en 3.5%. Elke reeks het uit drie replikate bestaan. Daar is op hierdie konsentrasies besluit nadat vooraf eers 'n aantal steekproewe uitgevoer is en wat aangetoon het dat die optimum in hierdie omgewing van glukosekonsentrasie geleë is. Die metode het verder presies ooreengestem met die wat in die vorige eksperiment beskryf is. Elke fles is van 50 ml. kultuurmedium voorsien en die kulture is vir agt dae by 'n temperatuur van 25°C geïnkubeer. Na die inkubasielperiode is die miseliummassas deur filtrasie afgesonder, gedroog en geweeg.

Voeg in tabelle 9A, 9B en 9C en figure 10, 11 en 12.

In figuur 10 kan daar 'n baie duidelike toename in die droëgewig van die miselium van Phoma bespeur word namate die konsentrasie styg. Hierdie gewigsvermeerdering neem toe tot by 'n konsentrasie van 3.0%. By 3.5% is die droëgewig egter aansienlik laer as by 3.0% en selfs laer as by 2.5%. 'n Glukosekonsentrasie van 3.5% is dus reeds bokant die optimumwaarde vir hierdie fungus. Uit die gegewens kan dan ook met 'n redelike mate van sekerheid afgelei word dat die optimale waarde in die omgewing van 3.0% geleë is. In alle gevalle lê die optimum tussen 2.5 en 3.5%.

Met Aspergillus (tabel 9B en figuur 11) kan 'n soortgelyke afleiding gemaak word. Die kromme vertoon ook 'n duidelike optimum by 3.0% glukose en 'n skerp daling/

daling na 3.5%. Die optimale glukosekonsentrasie van hierdie fungus lê dus ook in die omgewing van 3.0%.

Uit tabel 9C en figuur 12 kan die volgende afleiding gemaak word. Die droëgewig van die miselium van Mucor is relatief baie laer as die van die ander twee fungi. Die verskille in droëgewig by die verskillende glukosekonsentrasies is verder baie gering. Nogtans vertoon die kromme 'n optimum by 3.0%.

In hierdie gedeelte van die proef is daar nie aandag aan die spoorvorming geskenk nie, hoofsaaklik omdat Phoma geen pikridiums ⁱⁿ ~~op~~ 'n vloeibare medium vorm nie. In die tweede gedeelte van hierdie proef is spoorvorming op die verskillende konsentrasies ook nagegaan.

Uit die resultate blyk dit dus dat aldrie die fungi maksimale groei vertoon by 'n glukosekonsentrasie van $\pm$ 3.0%.

TABEL 9.

MISELIUMGEWIG VAN PHOMA, ASPERGILLUS EN
MUCOR BY VERSKILLENDE GLUKOSEKONSENTRASIES.
 (DROEGGEWIG AANGEVEE IN ^{mg.}M.GM).

9A: PHOMA.

Gluk.Konsentr.	Miselium-gewig	Gemiddeld.
1.5%	85.9 85.0 87.1	86.0
2.0%	101.0 98.7 101.7	100.8
2.5%	126.0 125.9 126.7	126.2
3.0%	150.2 146.2 148.2	148.3
3.5%	100.2 104.8 102.2	102.4

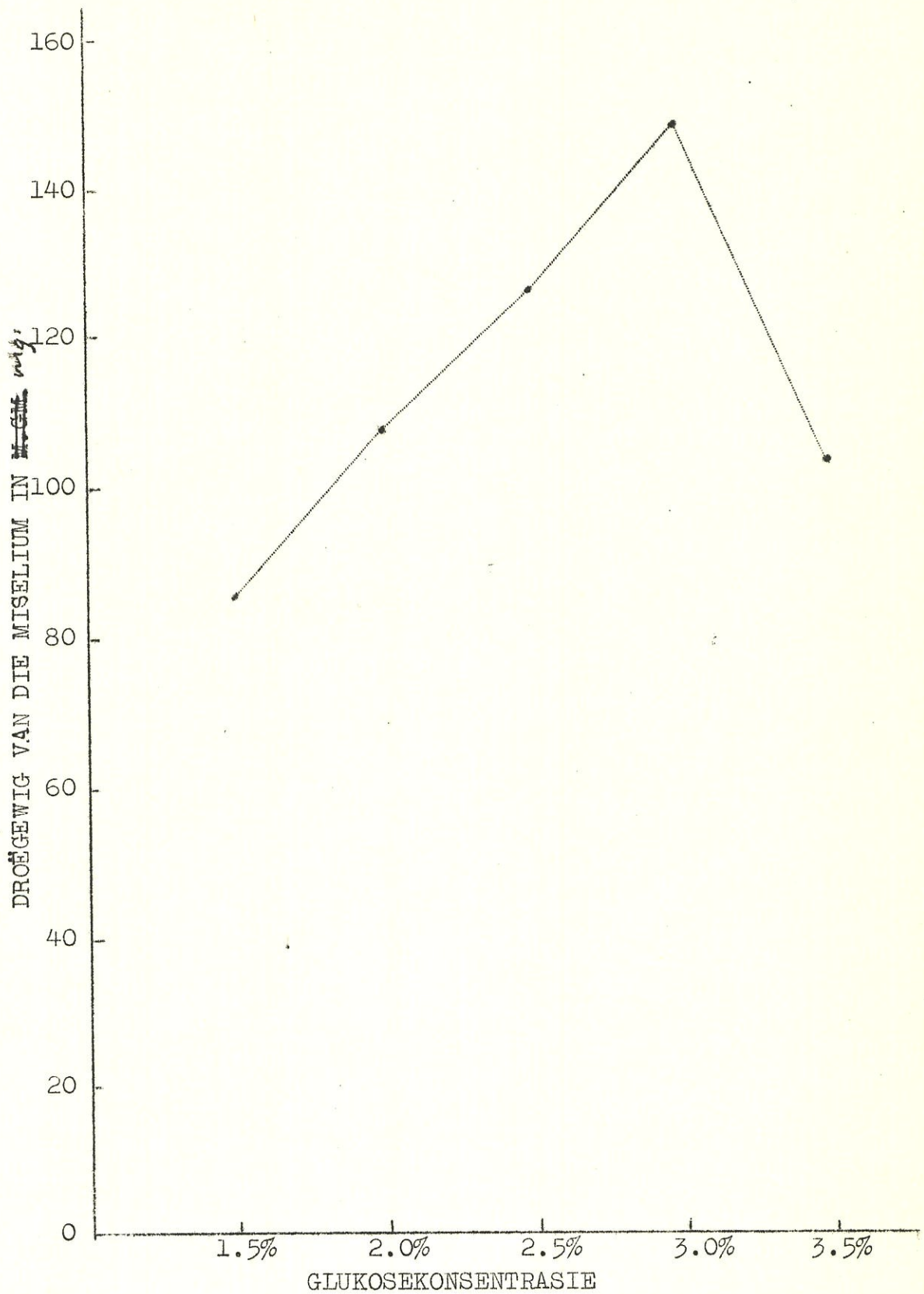
9B: ASPERGILLUS.

Gluk.konsentr.	Miselium-gewig	Gemiddeld.
1.5%	273.2 278.6 276.5	276.1
2.0%	353.5 350.2 353.3	354.3
2.5%	383.2 379.2 383.6	382.0
3.0%	390.2 386.6 392.0	389.6
3.5%	351.2 352.4 -	351.8

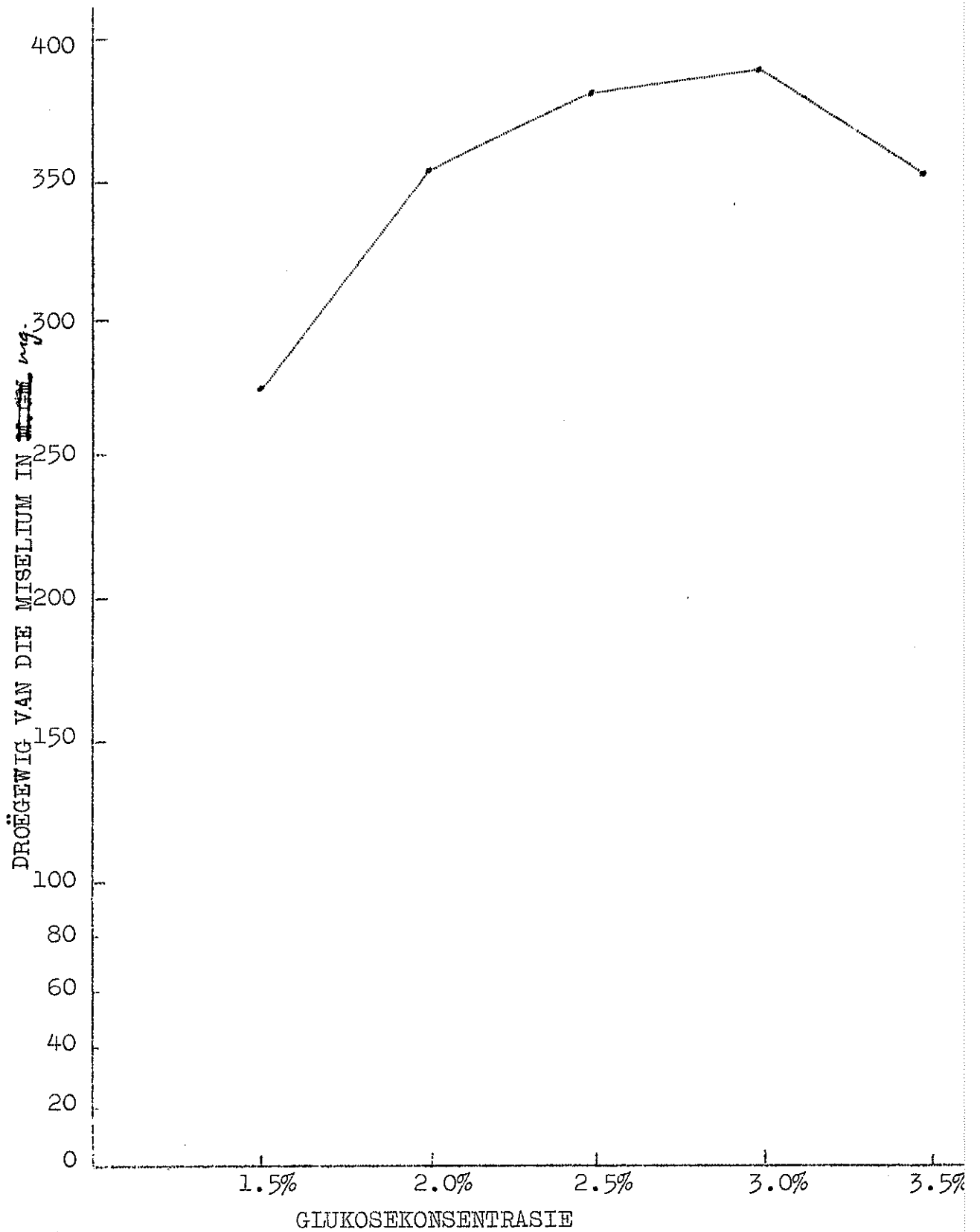
Tabel 9 vervolg:

9C: Mucor.

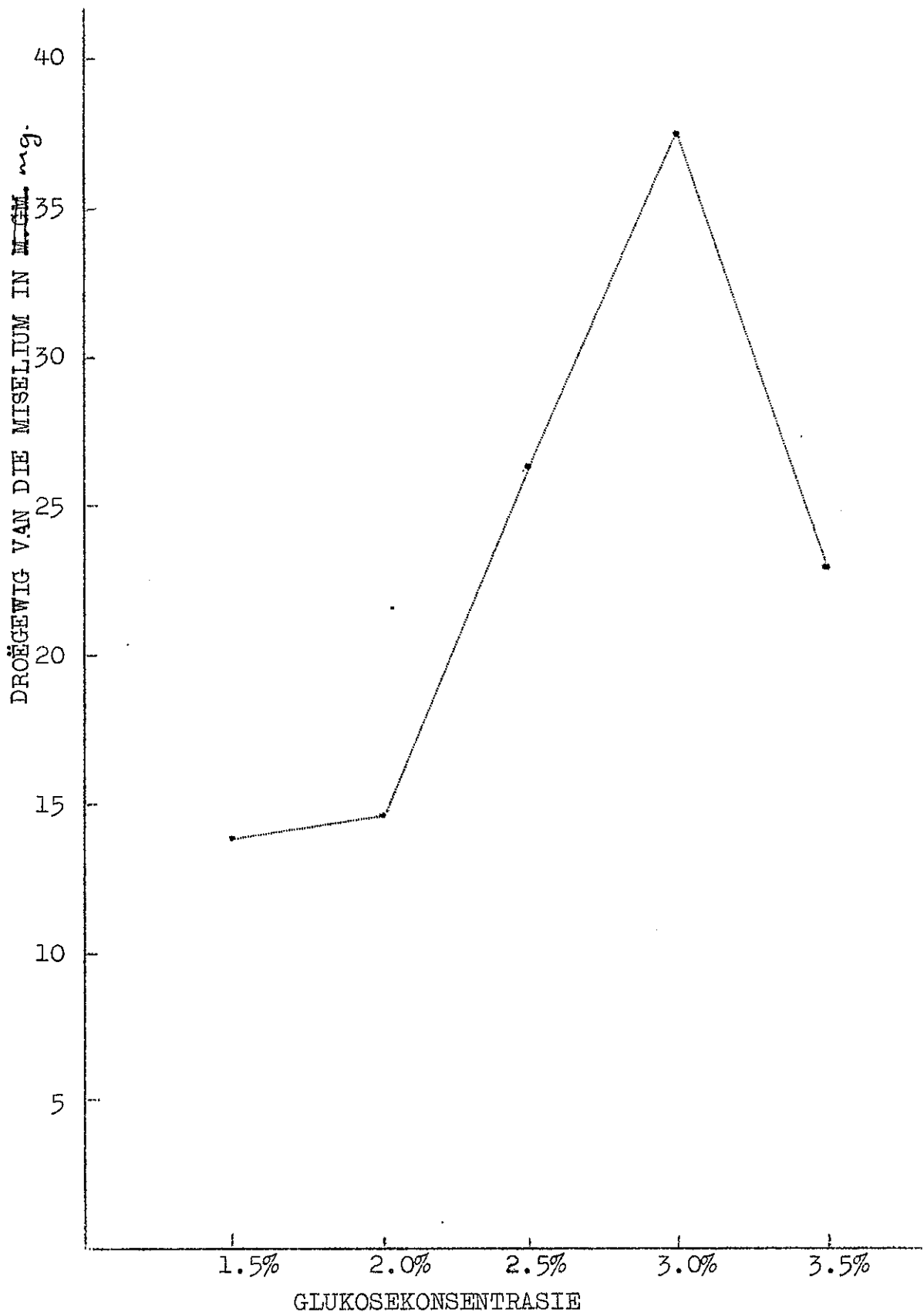
Gluk.konsentr.	Miselium:Gewig	Gemiddeld.
1.5%	15.2 12.8 13.4	13.8
2.0%	14.8 15.4 13.6	14.6
2.5%	26.8 24.0 28.4	26.4
3.0%	39.2 36.0 37.3	37.5
3.5%	18.2 24.8 25.4	22.8



FIGUUR 10: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE DROËGEWIG VAN DIE MISELIUM VAN PHOMA BY VERSKILLENDSE GLUKOSEKONSENTRASIES.



FIGUUR 11: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE DROËGEWIG VAN DIE MISELIUM VAN ASPERGILLUS BY VERSKILLENDE GLUKOSEKONSENTRASIES.



FIGUUR 12: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE DROËGEWIG VAN DIE MISELIUM VAN MUCOR BY VERSKILLENDSE GLUKOSE-KONSENTRASIES.

(ii) LINIËRE GROEI EN SPOORVORMING:

Teneinde in hierdie verband groter sekerheid te verkry, is die optimale glukosekonsentrasie ook hierna bepaal deur van die metode van liniêre groeimeting en spoorvorming gebruik te maak. By die H & S medium is 1.5% agar bygevoeg en 'n reeks is opgemaak wat 2.0%, 2.5%, 3.0% en 3.5% glukose bevat het. Die metode vir die meting van die liniêre groei op agar is uitgevoer soos beskryf onder die eksperiment in hoofstuk 4. Die kulture is by 25°C geïnkubeer.

Die deursnee van die kulture op agar soos daaglik bepaal is, word in tabelle 13, 14 en 15 aangegee. Vir gegewens betreffende Phoma en Aspergillus soos op die sesde dag bepaal en die vir Mucor soos op die vierde dag bepaal word in figuur 16 voorgestel.

Voeg in tabelle 13, 14 en 15 en figuur 16.
--

Uit die resultate kan die volgende afleidings vir die verskillende soorte gemaak word.

Phoma: Volgens die deursnee van die kolonies op die sesde dag van inkubering (fig. 16), vind ons dat daar, net soos in die geval van die droëgewig, ook 'n optimum by $\pm 3.0\%$ bestaan hoewel nie so duidelik nie. Wat die piknidiumvorming betref was daar 'n duidelike voorsprong by konsentrasies van 2.5 en 3.0%. By die hoëre konsentrasie nl. 3.5%, was piknidiumvorming baie swak, nieteenstaande die feit dat vegetatiewe groei nog aktief voortgegaan het.

Aspergillus: Figuur 16 toon dat daar nie 'n groot verskil tussen die liniêre groei soos bepaal by glukose-konsentrasies van 3.0 en 3.5% nie, maar die neiging vir die optimum om nader aan 3.0% as aan 3.5% te wees word tog waargeneem. Figure 11 en 16 toon baie duidelik die opvallende korrelasie wat by die fungus met die twee metodes van groeibepaling verkry is.

Die opvallendste konidiumvorming het by 2.5 en 3.0% voorgekom. Geen sigbare verskil in spoorvorming by hierdie twee konsentrasies kon waargeneem word nie. By 'n 2.0% glukosekonsentrasie het ook 'n goeie spoorvorming plaasgevind, maar dit was duidelik swakker as by die twee hoëre konsentrasies. By 3.5% was daar 'n baie besliste vermindering in die konidiumvorming sodat aangeneem kan word dat hierdie konsentrasie bokant die optimum vir spoorvorming geleë is.

Mucor/

Mucor: By die verskillende glukosekonsentrasies vertoon die liniêre groei van Mucor baie geringe verskille. In elk geval vertoon die resultate (tabel 15 en figuur 16) 'n optimum by 3.0%.

Daar is in hierdie proef slegs geringe verskille, wat die spoorvorming by 2.0, 2.5 en 3.0% betref, waargeneem. By 3.5% was die spoorvorming egter opvallend minder.

GEVOLGTREKKING:

By aldrie die fungussoorte is 'n toevoeging van 3.0% glukose by die H & S kultuurmedium ± optimaal. Van al die konsentrasies wat aangewend is het laasgenoemde groei die beste onderhou.

Teneinde optimale groeitoestande te verseker is by alle verdere proewe van hierdie aard 3.0% glukose by die basiese medium bygevoeg.

TABEL 13.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN PHOMA
IN ~~mm~~ OP AGARPLATE MET VERSKILLENDEN
GLUKOSEKONSENTRASIES.

		Ouderdom in dae.						
		2	3	4	5	6	7	8
Suiker- kons.	Repli- kate.	Deursnee in m,m.						
2.0%	1	3.5	8.5	14.5	21.7	32.0	41.0	50.4
	2	3.4	8.3	13.5	21.0	30.8	41.5	50.7
	3	3.6	8.2	14.0	21.8	31.7	40.5	50.4
	Gem.	3.5	8.0	14.0	21.5	31.5	41.0	50.5
2.5%	1	5.0	9.5	17.6	24.5	35.6	46.2	58.0
	2	4.0	9.4	17.0	25.5	35.3	45.3	57.6
	3	4.5	9.0	17.4	25.0	35.0	45.0	51.5
	Gem.	4.5	9.3	17.0	25.0	35.3	45.5	55.7
3.0%	1	6.5	14.1	21.5	31.5	42.6	54.8	68.0
	2	5.5	13.4	21.4	31.0	42.5	54.7	67.5
	3	6.0	13.0	21.0	30.5	42.4	54.6	67.0
	Gem.	6.0	13.5	21.3	31.0	42.5	54.7	67.5
3.5%	1	4.0	8.3	14.4	22.4	31.5	42.6	52.8
	2	3.8	8.0	-	-	-	-	-
	3	4.2	9.2	14.6	22.6	32.5	42.8	53.2
	Gem.	4.0	8.5	14.5	22.0	32.0	42.7	53.0

TABEL 14.

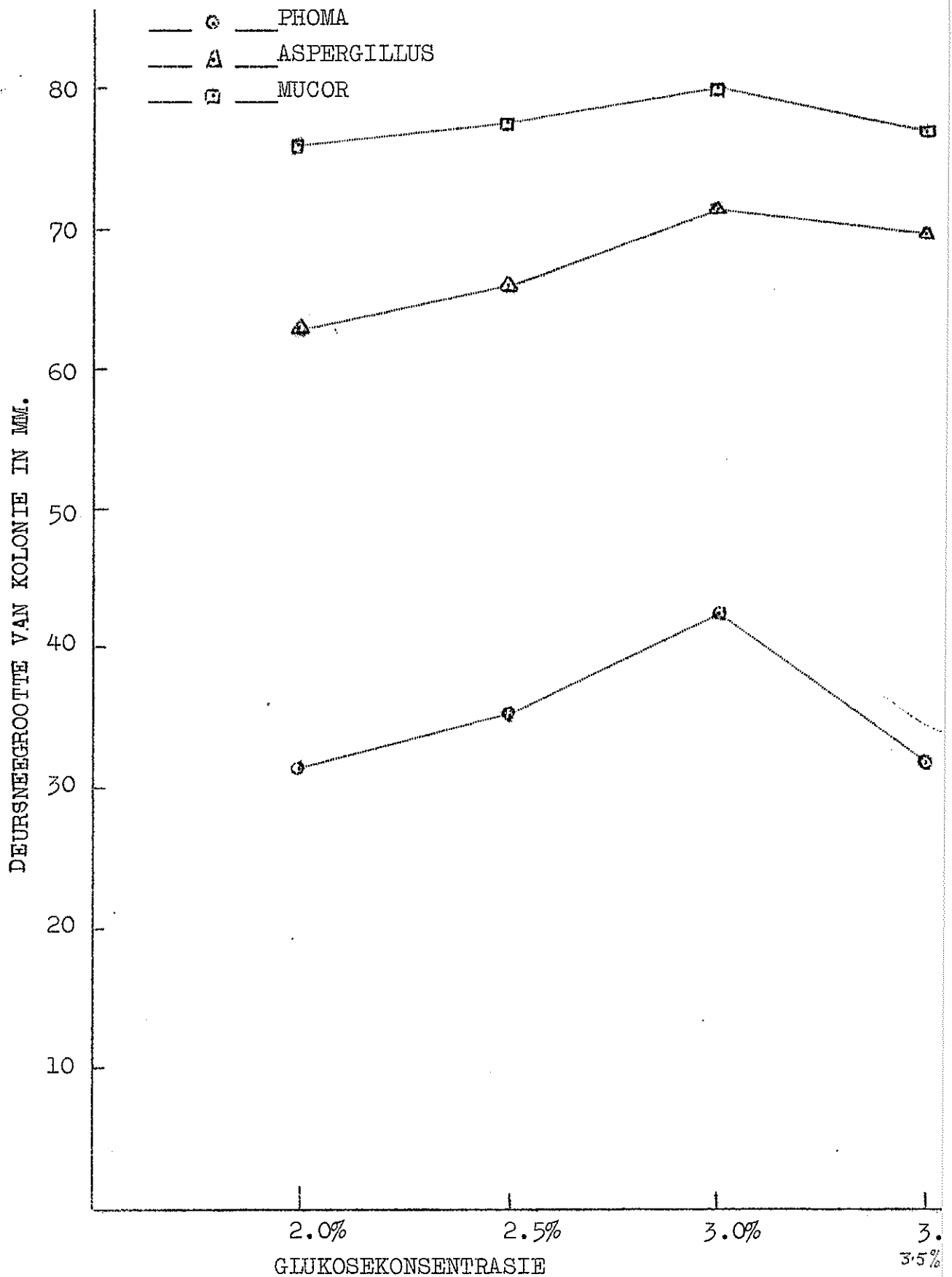
DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN ASPERGILLUS IN
mm.
mm. OP AGARPLATE MET VERSKILLENDE
GLUKOSEKONSENTRASIES.

Glukose- kons.	Repli- kate	Ouderdom in dae.					
		2	3	4	5	6	7
		Deursnee in m.m.					
2.0%	1	13.5	22.5	35.0	50.0	62.0	70.0
	2	12.0	22.0	34.0	49.5	62.5	71.0
	3	12.0	22.0	33.5	51.0	63.0	70.0
	Gem.	12.5	22.2	34.3	50.2	62.5	70.3
2.5%	1	13.5	24.0	36.0	52.5	67.0	71.5
	2	13.0	24.0	35.0	51.5	64.5	71.0
	3	14.0	23.5	36.0	53.0	66.0	72.0
	Gem.	13.5	23.8	35.7	52.3	65.8	71.5
3.0%	1	15.0	26.5	38.5	56.5	72.0	75.5
	2	15.5	25.5	37.5	54.0	70.0	76.0
	3	15.5	26.0	39.0	56.5	71.0	77.5
	Gem.	15.3	26.0	38.3	55.7	71.0	76.3
3.5%	1	14.0	26.0	38.0	54.5	70.0	73.0
	2	14.0	25.5	37.0	53.5	69.0	73.5
	3	13.5	26.0	37.5	55.0	68.0	74.0
	Gem.	13.8	26.2	37.8	54.5	69.0	73.5

TABEL 15.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN MUCOR
IN ^{mm.} ~~m.m.~~ OP AGARPLATE MET VERSKILLENDE
GLUKOSEKONSENTRASIES.

Glukose- kons.	Repli- ate.	Ouderdom in dae.			
		1	2	3	4
		Deursnee in m/m.			
2.0%	1	15.8	35.0	63.0	76.5
	2	16.0	35.5	61.5	75.9
	3	16.2	36.0	62.0	75.4
	Gem.	16.0	35.5	62.2	75.9
2.5%	1	18.1	36.0	62.0	77.5
	2	17.9	39.0	64.0	76.0
	3	17.4	38.0	63.0	77.5
	Gem.	17.8	37.7	63.0	77.0
3.0%	1	20.3	40.0	65.0	79.0
	2	19.6	38.0	64.0	80.0
	3	20.4	40.5	65.5	79.5
	Gem.	20.1	39.5	64.8	79.5
3.5%	1	19.6	38.0	64.0	75.9
	2	19.4	37.5	62.0	77.0
	3	18.6	37.5	61.5	76.0
	Gem.	19.2	37.7	62.5	76.3



FIGUUR 16: GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE DEURSNEEGROOTTE VAN DIE KOLONIES VAN PHOMA EN ASPERGILLUS OP DIE SESDE DAG VAN INKUBASIE EN DIE VAN MUCOR OP DIE VIERDE DAG VAN INKUBASIE BY VERSKILLENDE GLUKOSEKONSENTRASIES.

HOOFSTUK VI

DIE INVLOED VAN 'n AANTAL BELANGRIKE VITAMIENE OP DIE GROEI VAN PHOMA, ASPERGILLUS EN MUCOR.

INLEIDING:

Die verskynsel dat sekere fungi nie op sintetiese mediums kan groei nie is reeds lank bekend en word aan 'n hele aantal oorsake toegeskryf. Van die belangrikste is die afwesigheid van besondere koolstof- of stikstof-bronne en van sekere spoorelemente, ongunstige waterstofioonkonsentrasie of die aanwesigheid van giftige stowwe in die medium. Reeds in 1860 het Pasteur waargeneem dat die groei van gis op sintetiese mediums sterk bevorder word deur die toevoeging van klein hoeveelhede organiese stowwe wat in natuurlike produkte voorkom, maar wat destyds nog ongeïdentifiseer en dus onbekend was. Hy het ook aangetoon dat die toevoeging van uiesap tot die medium die groei van melksuurbakterieë bevorder (Schopfer, 1943). Tans weet ons dat hierdie ekstrakate 'n verskeidenheid vitamien en ander groeifaktore bevat, wat groei kan stimuleer. Sedert die chemikalieë wat in voedingsbodems gebruik word, chemies suiwerder berei word, is gevind dat 'n groter aantal fungi gebrekkig groei wanneer sulke stowwe gebruik word. Dit is omdat hierdie meer gesuiwerde stowwe nie voldoende van die groeifaktore wat in die onsuier chemikalieë aanwesig is, bevat nie.

Nadat Pasteur sy waarnemings gemaak het, het ook ander navorsers hul aandag hieraan begin skenk. So het Wildiers in 1901 die term "bios" ingevoer vir die onbekende stof wat Pasteur se giste beter laat groei het. In 1912 het Casimir Funk uit sy eie waarnemings, sowel as dié van ander navorsers, tot die gevolgtrekking gekom dat spore van definitiewe en spesifieke organiese stowwe saam met minerale, suikers, vette en proteïene noodsaaklike bestanddele in die voeding van diere is. Hy het hierdie stowwe "vitamien" genoem, 'n term wat baie gou deur ander navorsers aangeneem is (Schopfer, 1943).

Die eerste ondersoeker wat definitief die belangrikheid van vitamien vir die groei en ontwikkeling van fungi aangetoon het, was die ^{Switser} ~~Sweedse~~ wetenskaplike, Schopfer, en wel in 1943. Hy het gevind dat Phycomyces blakesleeanus op onsuier maltose gegroei het, terwyl dit op chemies suiwer maltose nie wou groei nie. Hy/

Hy kon toe aantoon dat die onsuier maltose tiamien bevat het. Hieruit het hy afgelei dat tiamien 'n vereiste is vir die groei van hierdie fungus. Na hierdie waarnemings van Schopfer is 'n nuwe tydvak op die gebied van die vitamien ingelei en literatuur in verband met die vitamienvereistes van fungi het begin toeneem. Oorsigte oor die groeifaktorvereistes van fungi is onder andere gegee deur Steinberg (1939 en 1950), Robbins en Kavanagh (1942), Schopfer (1943), Fries (1948) Hawker (1950) en Cochrane (1958).

Uit hierdie oorsigte is dit duidelik dat 'n groot aantal fungi een of meer groeifaktore ~~vir~~ hul normale groei benodig. Onder fungi kom daar dus dikwels 'n groeifaktorgebrek voor. Dit is veral tiamien, biotien en piridoksien, en tot 'n mindere mate ook inositol, nikotiensuur en pantoateensuur, wat as eksterne bronne deur fungi benodig word. Tiamien (Aneurien of vitamien B₁): Meer as 200 fungi is tans bekend wat hierdie vitamien nodig het vir optimale groei.

Biotien (Vitamien H): Die vitamien is oorspronklik geïsoleer as groeifaktor vir sekere giste. Tenminste dertig fungi wat heterotroof is t.o.v. biotien, is bekend.

Piridoksien (Vitamien B₆): Sekere Ophiostoma soorte, 'n aantal suurdeegstamme en die meeste Dermatofiete is heterotroof t.o.v. piridoksien.

Inositol: Hierdie vitamien is in aansienlik groter hoeveelhede werkzaam as die ander vitamien. Vir tenminste twee fungi is dit onontbeerlik nl. Nematospora gossypii en Trichophyton discoides (Fries, 1948).

METODE:

Teneinde te bepaal of tiamien, biotien, i-inositol en piridoksien enige invloed uitoefen op die groei van Phoma, Aspergillus en Mucor is die volgende proef gedoen. By die H & S-kultuurmedium waarby 3.0% glukose gevoeg is, is hierdie vitamien afsonderlik en ook gesamentlik in bepaalde konsentrasies bygevoeg en die groei van die fungi is nagegaan. Die droëgewig van die miseliums sowel as die lengtegroei is bepaal. Die volgende konsentrasies en kombinasies van die vitamien is gebruik:

- a) H & S sonder die toevoeging van vitamien.
- b) H & S met tiamien (100 µgm./L.)
- c) H & S met biotien (5 µgm./L.)
- d) H & S met tiamien (100 µgm./L.), biotien (5 µgm./L.), inositol (5 m.gm./L) en piridoksien (100 µgm./L.).

i. Droëgewigsbepaling/

i. DROÛGEWIGBEPALING:

Dieselfde metode wat by die vorige proewe vir die bepaling van die droëgewig gebruik is, is hier toegepas. Die verskillende vitamienbevattende oplossings is met die betrokke fungus geënt en die kulture is vir agt dae by 25°C geïnkubeer. Na die inkubasie is die droëgewig van die miseliums afsonderlik bepaal.

Die droëgewigte van die miseliums ⁱⁿ~~op~~ die verskillende vitamienoplossings word in tabelle 17A, 17B en 17C aan-gegee.

Voeg in Tabela 17A, 17B en 17C.

TABEL 17:

DIE INVLOED VAN VITAMIEËN OP DIE GROEI VAN
PHOMA, ASPERGILLUS EN MUCOR.

17A: PHOMA .

Vitamien	Miselium-gewig	Gemiddelde gewig
Vitamienvry	125.1	126.9
	125.4	
	130.2	
Tiamien	127.0	124.8
	121.8	
	125.6	
Biotien	124.2	124.1
	125.8	
	123.3	
Inositol, Piri- doksien, Bio- tien, Tiamien	124.8	125.4
	124.7	
	126.7	

17B: ASPERGILLUS

Vitamien	Miselium-gewig	Gemiddelde gewig
Vitamienvry	390.4	391.5
	393.0	
	391.1	
Tiamien	383.3	387.4
	386.8	
	392.1	
Biotien Biotien	389.6	393.1
	395.4	
	395.4	
Inositol, piri- doksien, Bio- tien, Tiamien	387.3	390.2
	391.4	
	391.9	

Tabel 17 vervolg:

17C: PHOMA

Vitamien	Miseliuwig	Gemiddelde gewig
Vitamienvry	35.9	35.8
	35.3	
	36.2	
Tiamien	39.3	36.2
	35.2	
	34.1	
Biotien	37.5	38.2
	36.8	
	39.3	
Inositol, Piri- doksien, Bio- tien, Tiamien	40.3	35.6
	32.2	
	34.1	

Alhoewel daar klein verskille tussen die gemiddeldes van die reekse bestaan (tabel 17), is die verskille tussen die drie waardes van een stel bepalinge so groot, dat hierdie verskille wat tussen die gemiddeldes van die reekse bestaan, nie as betekenisvol beskou kan word nie. In al die gevalle is die droëgewigte wat op die vitamienbevattende mediums verkry is dieselfde as die op die vitamienvrye mediums. Uit die resultate wat behaal is, blyk dit dus duidelik dat die onderhewige vitamene nie enige betekenisvolle invloed op die groei van die drie fungussoorte uitoefen nie.

(ii) LINIËRE GROEI EN SPOORVORMING:

Teneinde vas te stel of die toevoeging van 'n aantal vitamienes enige invloed op die liniêre groei en spoorvorming van die drie betrokke fungi het, is die volgende proef uitgevoer. Die konsentrasies en kombinasies van die vitamienes wat gebruik is, was dieselfde wat in die eerste gedeelte van hierdie eksperiment gebruik is.

Nadat die agarkulture geënt is is hul by 25°C geïnkubeer en daar is daaglikse metings van die deursnee van die kolonies gedoen. Die resultate word in tabelle 18, 19 en 20 aangegee.

Voeg in tabelle 18, 19 en 20.

Wat die groeitempo van die drie fungi betref, is dit duidelik dat daar geen verskil tussen die gemiddeldes van die reekse bestaan nie. Die reekse wat met vitamienes voorsien is het dieselfde mate van groei vertoon as die vitamienevrye kontroles.

Ook wat die spoorvorming betref, kon geen verskille by die verskillende vitamientoedienings waargeneem word nie.

GEVOLGTREKKING:

Phoma, Aspergillus en Mucor is selfonderhoudend wat tiamien, biotien, i-inositol en piridoksien betref. Geen uitwendige bron van hierdie vitamienes word vir die normale groei of voorplanting van hierdie fungi benodig nie.

TABEL 18.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN PHOMA IN
~~m.m.~~ OP AGARPLATE MET VER-
SKILLEND E VITAMIE NE.

		Ouderdom in dae.						
		2	3	4	5	6	7	8
Vitamiene	Repli- kate	Deursnee in m.m.						
Tiamien	1	7.2	13.5	21.4	31.4	41.7	55.9	68.5
	2	6.0	14.5	21.4	30.5	42.7	56.3	69.5
	3	6.3	14.0	21.7	31.2	42.5	55.8	69.6
	Gem.	6.5	14.0	21.5	30.7	42.3	56.0	69.2
Biotien	1	6.8	14.1	21.4	31.5	42.8	57.2	69.5
	2	6.6	14.0	21.5	31.6	42.8	56.0	70.5
	3	6.2	14.5	21.2	30.8	43.4	57.2	70.3
	Gem.	6.6	14.2	21.7	31.3	43.0	56.8	70.1
Piridoksien, Inositol, Biotien & Tiamien	1	6.4	14.4	21.8	32.5	43.5	56.1	68.8
	2	6.5	14.6	22.0	31.0	43.0	55.4	70.4
	3	6.0	14.5	22.2	31.5	43.4	56.2	69.3
	Gem.	6.3	14.5	22.0	31.0	43.3	55.9	69.5
Vitamien- vry	1	6.5	14.8	21.0	31.6	42.7	56.5	69.8
	2	7.0	14.5	21.5	31.2	42.1	56.0	71.0
	3	6.6	14.8	22.0	31.7	42.7	57.6	69.2
	Gem.	6.7	14.7	21.5	31.5	42.5	56.7	70.0

TABEL 19.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN ASPERGILLUS IN

mm.
M.M. OP AGARPLATE MET VERSKILLENDEVITAMIENE.

		Ouderdom in dae.					
		2	3	4	5	6	7
Vitamiene	Replika- te.	Deursnee in m.m.					
Tiamien	1	21.0	30.0	48.0	63.5	72.5	76.0
	2	19.5	30.5	47.0	63.5	72.5	77.5
	3	19.0	31.0	47.0	64.0	73.0	78.0
	Gem.	19.8	30.5	47.3	63.7	72.7	77.2
Biotien	1	21.5	31.5	48.0	63.5	72.0	77.5
	2	19.5	29.0	46.0	61.0	71.0	76.5
	3	21.0	32.0	46.0	64.0	72.0	78.0
	Gem.	20.7	30.8	46.7	62.8	71.7	77.3
Piridoksien Inositol, Biotien & Tiamien	1	19.0	31.0	46.5	63.5	73.5	76.0
	2	19.0	31.5	47.0	-	-	-
	3	21.0	30.5	46.0	65.0	72.0	80.0
	Gem.	19.7	31.0	46.5	64.2	72.8	78.0
Vitamien- vry	1	21.5	30.5	48.0	63.0	73.0	78.0
	2	20.0	31.5	47.0	65.0	71.5	79.0
	3	19.5	30.0	47.0	65.0	72.0	77.0
	Gem.	20.3	30.7	47.3	64.3	72.2	78.0

TABEL 20.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN MUCOR IN ~~M.M.~~mm.
OP AGARPLATE MET VERSKILLENDE VITAMIENE.

		Ouderdom in dae.		
		2	3	4
Vitamiene	Repli- kate.	Deursnee in mm.		
Tiamien	1	38.5	65.5	76.0
	2	37.0	68.0	79.5
	3	39.0	67.0	81.0
	Gem.	38.2	66.8	78.8
Biotien	1	38.0	65.0	91.0
	2	36.0	64.5	85.0
	3	37.5	67.0	84.0
	Gem.	37.2	65.8	86.7
Piridoksien, Inositol, Biotien & Tiamien	1	40.0	66.0	87.0
	2	38.0	63.5	85.0
	3	37.0	65.0	85.0
	Gem.	38.3	64.8	85.7
Vitamien- vry	1	40.5	65.0	84.0
	2	39.5	68.0	85.0
	3	39.0	68.5	85.0
	Gem.	39.7	67.2	84.7

HOOFTSTUK VII

BEPALING VAN DIE OPTIMALE TEMPERATUUR VIR DIE GROEI

EN VOORTPLANTING VAN PHOMA, ASPERGILLUS

EN MUCOR.

INLEIDING:

Temperatuur het 'n groot invloed op die groeitempo van lewende organismes, insluitende die fungi. Die respirasietempo, en die daarmee gepaard gaande vrystelling van lewensbelangrike energie, word baie deur temperatuur beïnvloed (Hawker, 1950). Talle fisiologiese prosesse soos die opneem van water en opgeloste stowwe uit die medium en die talryke prosesse betrokke by die afbreek van voedingstowwe en die sintese van organiese verbindings staan almal onder die invloed van temperatuur (Hawker, 1950).

Die temperatuurgrense waartussen fungi groei verskil van soort tot soort. Die oorgrote meerderheid groei egter gladnie of baie swak by 0°C (Lilly en Barnett, 1951). Aan die anderkant is daar 'n baie geringe aantal fungi wat by temperature hoër as $30 - 35^{\circ}\text{C}$ nog enige groei vertoon (Hawker, 1950). Volgens laasgenoemde outeur is die optimale temperatuur vir die groei van fungi gewoonlik in die gebied tussen 20 en 30°C . Die kardinale temperature in die vegetatiewe groei van die meeste fungi lê volgens ~~hem~~ ^{haar} in die omgewing van $0 - 5^{\circ}\text{C}$, $20 - 30^{\circ}\text{C}$ en $30 - 35^{\circ}\text{C}$. Daar bestaan egter heelwat uitsonderings. Brooks en Hansford (1923) toon bv. aan dat Cladosporium herbarum nog by -10°C groei. Verder vind hulle dat Penicillium expansum en Torula botryoides goed ontwikkel by 0°C en bv. vleis in koelkamers aantast. In teenstelling hiermee is daar fungi wat weer baie hoë temperature kan verdra. Hawker (1950) noem bv. die geval van sekere Sordaria - soorte wat temperature van $40 - 42^{\circ}\text{C}$ kan verdra. La Touche (1948) vind dat sekere Chaetomium-soorte, wat op hooi voorkom, groei in 'n temperatuurgebied wat strek van 25°C tot 62°C met 'n optimum tussen 40 en 50°C .

Muller (1956) vind dat die optimumtemperatuur vir die vegetatiewe groei van Aspergillus niger 30°C is, terwyl dié vir Penicillium italicum en Rhizopus nigricans 25°C is.

Temperatuur/

Temperatuur het ook 'n groot invloed op die spoorvorming van fungi. Daar is voldoende bewyse dat temperature wat gunstig is vir die ontkieming of vegetatiewe groei van fungi effens laer is as die gunstig vir voortplanting (Wolf en Wolf, 1947). Ames (1915) het gevind dat die spore van Thielaviopsis paradoxa by 5 - 6°C ontkiem het en dat, alhoewel daar geringe groei by 10°C plaasgevind het, hierdie organisme by temperature hoër as 10°C gehou moet word om spoorvorming te induseer. Klebs (1900) het daarop gewys dat die temperatuurgrense waartussen voortplanting plaasvind baie nouer is as die waartussen vegetatiewe groei plaasvind. Phoma apiicola groei, byvoorbeeld, goed tussen 5 - 28°C, maar piknidiums word slegs by temperature van 13 - 26°C gevorm (Beran et al, 1954). Die optimumtemperatuur vir vegetatiewe groei van Aspergillus niger is, soos reeds genoem 30°C. Konidiumvorming vind egter die gunstigste plaas by 30 - 35°C (Muller, 1956).

Die bodem waarop die fungus voorkom mag ook die temperatuuroptimum van beide groei en voortplanting beïnvloed. Hawker (1947) vind byvoorbeeld, dat Melanospora destruens 'n laer optimum vir groei en 'n hoër optimum vir peritesiumvorming op 'n sukrose-medium het as op 'n glukose-medium.

METODE:

Om vas te stel wat die optimale temperature vir die groei en voortplanting van Phoma, Aspergillus en Mucor is, is die drie fungi op H & S agarmedium ^{+ 3% glukose} in petribakkies by verskillende temperature gekweek. Die kulture is by 0°C, 18°C, 25°C en 35°C geïnkubeer. Die deursnee van die kolonies is daaglik gemeet en die mate van spoorvorming by die verskillende temperature is noukeurig genoteer.

Voorlopige steekproewe het aangetoon dat nie een van hierdie fungi by 40°C gegroei het nie. Dit stem nie ooreen met die resultate wat voorheen deur Bonner (1948) met Aspergillus niger verkry is nie, maar wel met dié van Muller (1956).

Die daaglikse deursnee van die kolonies van die drie fungi op agarplate by verskillende temperature word in tabelle 21, 22 en 23 aangegee en grafies voorgestel in figuur 24.

Voeg in Tabelle 21, 22 & 23 en Figuur 24.

PHOMA:

Tabel 21 dui die volgende aan. By 0°C het geen groei plaasgevind nie. By 'n temperatuur van 18°C het die miselium redelik goed ontwikkel, maar by 25°C het maksimale ontwikkeling plaasgevind. By 30 en 35°C het die ontwikkeling egter weer baie vinnig afgeneem. Uit die resultate, soos in figuur 24 voorgestel, is dit duidelik dat die optimumtemperatuur vir die miseliumgroei van hierdie fungus in die omgewing van 25°C geleë is. By hierdie temperatuur was die deursnee van die miseliummassa ook gedurende die hele inkubasieperiode aansienlik hoër as die deursnee by 18°C of by 30°C (tabel 21).

Piknidiums is die geredelikste by temperature van 25°C tot 30°C gevorm. By 18°C het die ontwikkeling van piknidiums wel voorgekom maar hulle was baie kleiner en minder as die by 25 en 30°C . By 35°C is geen piknidiumvorming waargeneem nie.

ASPERGILLUS:

Die fungus het 'n relatief hoë temperatuuroptimum van ongeveer 30°C (tabel 22). By hierdie temperatuur was die deursnee van die kolonies aansienlik meer as by 25 en 35°C . By 0°C was daar geen meetbare groei nie, terwyl by 18°C ook slegs 'n baie geringe mate van groei waargeneem is.

Konidiumvorming het vinniger en geredeliker by die hoër temperature, naamlik, 30° en 35°C plaasgevind as by die laer temperature. Teen die derde dag van inkubasie by 30° en 35°C was konidiums reeds oor die hele kultuur sigbaar. Daar kon geen sigbare verskil in spoorvorming by 30° en 35°C waargeneem word nie. Die optimumtemperatuur vir die ongeslagtelike voortplanting van hierdie fungus lê dus tussen 30° en 35°C .

MUCOR:

Hierdie fungus groei vinniger as die vorige twee. By 'n temperatuur van 25°C was die hele agarplaat reeds teen die vierde dag oorgroei. By hierdie temperatuur is die deursnee van die kolonie ook baie groter as by 18° en 30°C (tabel 23). 'n Skerp afname in groei bokant 25°C is baie opvallend (figuur 24); by 35°C was die groei van die fungus uiters swak, hifes was yl verspreid en die rand van die kolonie nie skerp afgebaken nie; by 0°C is geen groei waargeneem nie.

Spoorvorming het die geredelikste by 25°C plaasgevind, hoewel daar ook 'n goeie produksie by 18°C waargeneem is. By 30° en 35°C was spoorvorming egter baie swak en by laasgenoemde temperature is slegs enkele en verspreide sporangiums op die miselium waargeneem.

GEVOLGTREKKING:

Uit die resultate is dit duidelik dat die optimumtemperatuur vir die vegetatiewe groei van Phoma en Mucor by + 25°C geleë is. Aspergillus het 'n aansienlik hoër optimum, naamlik, 30°C.

By twee van die fungi, naamlik Aspergillus en Phoma, is die optimumtemperatuur vir spoorvorming nie dieselfde as die vir vegetatiewe groei nie. In beide gevalle lê die optimum waarskynlik effens hoër as die vir miseliumgroei. By Mucor is die optimum vir groei en voortplanting 25°C.

By alle latere proewe met hierdie drie fungi is Phoma en Mucor by 25°C en Aspergillus by 30°C geïnkubeer.

TABEL 21.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN PHOMA IN ~~m.m.~~
OP AGAR BY VERSKILLENDE TEMPERATURE.

		Ouderdom in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
Tempe- ratuur	Repli- kate	Deursnee in m.m.						
0°C	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
18°C	1	4.5	11.8	14.5	21.7	33.2	43.5	55.0
	2	5.2	10.7	14.3	20.8	32.7	42.5	54.3
	3	4.7	10.8	15.0	22.9	33.7	43.6	54.5
	Gem.	4.8	11.1	14.6	21.8	33.0	43.2	54.9
25°C	1	6.5	13.3	21.5	31.0	43.0	54.8	68.1
	2	6.0	13.7	21.0	31.1	42.2	55.7	67.3
	3	6.4	14.4	21.7	31.8	42.7	54.5	67.7
	Gem.	6.3	13.8	21.4	31.3	42.7	55.0	67.7
30°C	1	3.5	9.5	11.8	15.9	23.5	29.0	36.5
	2	4.0	9.2	11.5	16.5	24.2	28.8	37.8
	3	3.0	9.2	10.9	16.5	23.7	29.8	38.5
	Gem.	3.5	9.3	11.4	16.3	23.8	29.2	37.6
35°C	1	-	-	1.0	2.0	4.3	5.9	9.5
	2	-	-	1.0	2.0	4.2	6.1	9.5
	3	-	-	1.0	2.0	4.4	6.0	9.5
	Gem.	-	-	1.0	2.0	4.3	6.0	9.5

TABEL 22.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN ASPERGILLUS IN ~~M.M.~~ mm.
OP AGAR BY VERSKILLENDEN TEMPERATURE.

		Ouderdom in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
Tempera- tuur	Repli- kate	DEURSNEE in ~~M.M.~~ mm.						
0°C	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
18°C	1	1.0	2.5	7.5	14.3	21.0	23.5	32.0
	2	1.0	3.0	7.0	14.7	19.0	25.5	29.5
	3	1.0	4.0	8.5	14.5	-	-	-
	Gem.	1.0	3.2	7.7	14.5	20.0	24.5	30.7
25°C	1	6.0	14.0	27.0	42.8	57.0	64.0	74.0
	2	5.5	13.5	26.0	43.5	55.5	70.0	73.0
	3	6.5	14.5	26.0	42.7	57.5	71.0	73.5
	Gem.	6.0	14.0	26.3	43.0	56.7	70.0	73.5
30°C	1	11.2	21.5	39.5	56.5	71.5	79.0	
	2	10.3	22.0	39.0	57.3	71.0	81.0	
	3	11.0	23.5	38.5	56.2	71.5	81.5	
	Gem.	10.5	22.3	39.0	57.0	71.3	79.9	
35°C	1	7.6	19.0	35.1	53.5	65.5		
	2	7.2	18.8	34.5	52.4	65.0	74.6	77.5
	3	6.5	17.7	33.9	51.0	64.5	73.4	76.3
	Gem.	7.1	18.5	34.5	52.3	65.0	74.0	76.9

TABEL 23.

DEURSNEE VAN DIE MISELIUM VAN MUCOR IN ~~M.M.~~ mm.
OP AGAR BY VERSKILLENDE TEMPERATURE.

Tempera- tuur	Repli- cate	Ouderdom in dae.					
		1	2	3	4	5	6
		Deursnee in m/m.					
0°C	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
18°C	1	8.0	20.5	4.0	58.0	74.0	76.0
	2	8.8	22.0	43.0	59.2	73.5	76.5
	3	8.7	21.0	43.3	58.3	73.0	77.0
	Gem.	8.5	21.2	42.2	58.5	73.5	76.5
25°C	1	14.7	35.5	61.0	80.5		
	2	14.8	36.5	63.0	80.0		
	3	15.5	36.0	62.0	80.4		
	Gem.	15.0	36.0	62.0	80.3		
30°C	1	11.8	29.0	44.0	58.5	74.1	80.0
	2	12.3	26.5	42.0	58.8	73.8	78.0
	3	11.9	28.0	43.0	59.7	74.1	77.5
	Gem.	12.0	27.8	43.0	59.0	74.0	78.5
35°C	1	5.6	13.5	23.3	34.0	43.5	49.5
	2	5.5	13.2	22.5	31.9	42.5	48.1
	3c	5.4	12.3	21.7	33.1	41.5	47.0
	Gem.	5.5	13.0	22.5	33.0	42.5	48.2

HOOFSTUK VIII

DIE INVLOED VAN VERSKILLENDSE SWAMDODERS OP

PHOMA, ASPERGILLUS EN MUCOR.

INLEIDING:

Nadat die optimale groeitoestande vir die drie fungi in die voorafgaande aantal eksperimente bepaal is, is die invloed van verskillende swamdoders op die groei van die fungi by hierdie optimale toestande nagegaan. Die doel van hierdie eksperiment was om die minimum-letale konsentrasies van die swamdoders by die optimale groeitoestande van die fungi vas te stel. Dit is gedoen met die oog daarop om later die Rooiblomsaad hiermee te behandel teneinde die fungi wat daarop voorkom te vernietig.

By die ^{bestryding} beheer van fungi deur swamdoders is daar twee basiese beginsels betrokke, beskerming en genesing. Twee wyduiteenlopende metodes word toegepas by die beskerming van 'n gasheer teen fungi deur die aanwending van swamdoders.

- (i) Die swamdoder kan aangewend word om die fungus in sy russtadium te dood, hetsy voor of nadat dit die gasheer bereik het.
- (ii) Die swamdoder kan in die vorm van 'n blywende lagie aan die buitekant van die gasheer aangewend word, om sodoende aantasting deur die fungus teen te werk (Horsfall, 1956).

Daar is tans 'n baie groot aantal swamdoders in gebruik vir die ^{bestryding} beheer van fungi. Van die belangrikste swamdoders is sekere swaarmetale en hul soute, swawelverbindings, organiese swawelverbindings en sekere heterosikliese verbindings. Swaar metale en swaarmetaalsoute ressorteer onder die belangrikste en oudste swamdoders. 'n Tweede groep belangrike swamdoders is swawel en swawelverbindings. Die toksiese eienskappe van swawel is baie eeue reeds bekend. Homer^{us} het in 1000 v. C. gepraat van: "the pest-averting sulph^{ur}." Tans is dit veral die organiese swawelverbindings wat as swamdoders gebruik word en belangrik onder hulle is die ditiokarbamate, ^{thiouron} ~~thiouron~~, die ~~thi~~iosianate en sekere antibiotika soos tiasiensuur en gliotoksien.

METODE:

Vir die bepaling van die swamdodende eienskappe van chemikalieë word veral van drie metodes gebruik gemaak (Horsfall, 1956):

- (i) Fungusspore word in water ontkiem in die aanwesigheid van die fungisied.
- (ii) Die fungus word op 'n vergiftigde bodem gekweek. D.w.s. die stof word met die agar, weefsel, hout, of wat ookal as voedingsbodem gebruik word, gemeng.
- (iii) Die respiratoriese aktiwiteit van die behandelde fungus word bepaal.

By 'n vergelyking tussen die spoorontkiemingsmetode en die vergiftigde bodemtegniek het Gottlieb(1945) met Stemphylium sarcinaeforme die volgende resultate gekry. Hy het die fungus met tagtig verskillende verbindings behandel en gevind dat 50% van die verbindings dieselfde resultate by albei metodes opgelewer het, dat 35% meer nadelig was vir groei as spoorontkieming en dat 15% meer nadelig vir spoorontkieming as vir groei was.

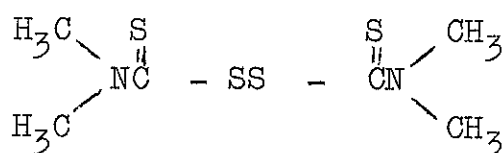
Die metode om die miseliumgroei van fungi op vergiftigde agar kwantitatief te bepaal kan teruggevoer word na Falck (1907). Hy het aangetoon dat daar 'n korrelasie bestaan tussen die deursnee van 'n kolonie op agar en die periode van inkubasie. Hy het ook verder aangetoon dat die aanwesigheid van gifstowwe in die medium geen afbreuk doen ^{aan} in hierdie korrelasie nie. Volgens hierdie metode is dit dan moontlik om die uitwerking van 'n toksiese stof op die groei van 'n fungus te bepaal deur (a) die aantal dae wat 'n kolonie groei om 'n bepaalde deursnee te bereik in vergelyking met die tyd wat 'n kontrolekultuur neem om die deursnee te bereik, ^{was te ster} of (b) die deursnee wat 'n kolonie na 'n sekere inkubasieperiode in vergelyking met 'n kontrole bereik ~~te~~ ^{bepaal}.

Alhoewel die vergiftigde bodemtegniek hoofsaaklik .. toegepas word by die bepaling van die doeltreffendheid van stowwe vir die preservering van hout (Horsfall, 1945), het ek die metode om die volgende rede hier toegepas. In latere proewe is pogings aangewend om onbehandelde Rooibloomsaad op vergiftigde agar te laat ontkiem. Daar is geredeneer dat die vergiftigde agar moontlik die groei van fungi sou teenwerk sonder om die Rooibloomsaad nadelig te beïnvloed. Vir die proef was dit nodig om te weet by watter minimumkonsentrasies die betrokke swamdoders in staat is om die groei van fungi geheel en al te verhinder.

Terselfdertyd is die metode ook waardevol gevind om 'n aanduiding te kry van die doeltreffendheid van die betrokke swamdoder.

In hierdie eksperiment is die invloed van die volgende swamdoders ondersoek. As swawelbevattende swamdoders is die volgende drie stowwe gebruik.

1. Cosan (mikroswawelpreparaat, 80% swawel).
2. ~~Thiourea~~ ^{Thiourea} (thiocarbamied) $H_2NC(S)NH_2$.
3. Thiulin (tetrametiel-thioram-disulfied). Die swamdoder staan ook bekend as Thiosan, Thioram en T.M.T.D. Dit het die volgende chemiese formule.



Dit word tans wêreldwyd as swamdoder gebruik. Muskett en Colhoun (1940) het die eerste verslag oor die uitwerking van Thiulin gepubliseer en wel in verband met die behandeling van vlssaad in Ierland.

Van die swaarmetaalbevattende swamdoders is die volgende stowwe gebruik.

- (1) Kopersulfaat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.
- (2) Rooi kwikoksied, HgO .
- (3) Kwikchloried (sublimaat), $HgCl_2$.
- (4) Trigosan Slurry (10% organies gebonde kwik, 6% kwik).
- (5) Trigosan (2.5% organies gebonde kwik, 1.5% Hg .)
- (6) Ceresan (2.0% etielkwikchloried) C_2H_5HgCl .
- (7) Agallol (4.5% metoksie-etielkwikchloried, 3% Hg).
- (8) "A.C.P. Rose & Floral Dust" wat soos volg saamgestel is.

Ferridimetiel-ditiokarbenaat ^{amaat} ("Fermate") 7.6%

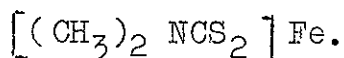
Swawel 20 %

Dichloro-difeniel-trichloroetaan (73% para para) 5.0%

p-chlorofeniel-p-chlorobenseensulfonaat 2.5%

Onaktiewe bestanddele ("carrier") 64.4%

Die aktiewe swamdoder in hierdie poeier is Fermate



- (9) Cupravit (85% Koperoksiechloried, 50% Cu).

Chemiese formules is ^{ont} ~~ver~~leen aan die Merck Index (1952).

Die eksperimentele werk is soos volg uitgevoer.

H & S agar is in hoeveelhede van 250 ml. in Erlenmeyer-flesse gesteriliseer. Na sterilisasie is elke fles onder lopende kraanwater tot handwarmte afgekoel en die bepaalde

swamdoder is daarna asepties deur middel van 'n vooraf-gesteriliseerde pipet in die verlangde konsentrasie (sien tabelle 25 - 36) by die agar gevoeg. Die agar is vervolgens goed geskud en van elke fles is tien agarplate van $\pm$ 25 ml. agar gegiet. Nadat die agar gestol het, is die plate afsonderlik met die drie fungi geënt. Al die proewe is in triplikaat uitgevoer en swamdodevrye kontroles is ook opgestel.

Phoma en Mucor is by 25°C en Aspergillus is by 30°C geïnkubeer. Daaglikse metings van die deursnee van die kolonies is geneem. Die konsentrasie van elke swamdoder is geleidelik verhoog, totdat daar geen groei meer op die plate voorgekom het nie. Hierdie konsen-^{minimum}trasies is as die letale beskou.

Voeg in tabelle 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 en 36.

Uit die resultate is dit duidelik dat Aspergillus die minste deur die swamdoders aangetas word. Mucor het blykbaar die geringste weerstand daarteen. In vyf gevalle, naamlik, by behandeling met kwikoksied, koper-sulfaat, Thiulin, Ceresan en Cosan is die groei van Mucor totaal verhinder by konsentrasies waar die ander twee skimmels nog redelik goed gegroei het. Kwik-chloried en ~~Thiouracil~~^{thiouracil} het die groei van Phoma weer heeltemal voorkom by konsentrasies waar Aspergillus en Mucor nog gegroei het.

By baie lae konsentrasies van die swamdoders is die nadelige uitwerking op die skimmels nie baie duidelik waarneembaar nie. Die daaglikse toename in die deursnee van die kolonies vergelyk goed met die van die kontrole, behalwe dat die kolonies effens kleiner is. Sodra die konsentrasies van die swamdoders egter verhoog word tot bokant 'n sekere waarde, tree daar gewoonlik 'n lang rusperiode in voordat die fungus begin groei. Voorbeelde van hierdie lang rusperiode kan in die tabelle gevind word. By 'n konsentrasie van 100 dpm. kwikoksied begin Aspergillus eers teen die vierde dag groei (tabel 26). Phoma begin eers die derde dag groei by 230 dpm. Cosan (tabel 34), terwyl Mucor, byvoorbeeld eers teen die vierde dag meetbare groei toon op agar met 500 dpm. Cupravit (tabel 33). Vincent (1947) maak ook melding van hierdie verskynsel, naamlik dat gifstowwe in die medium

'n baie lang onaktiewe periode in die hand werk. Volgens laasgenoemde outeur dui die rusperiode die tyd aan wat die fungus nodig het "to learn to live with the compound".

As die uitwerking vandie verskillende swamdoders, wat uitgetoets is, vergelyk word (sien tabelle), is dit duidelik dat kwikchloried en Trigosan Slurry die mees effektiewe is. Hierdie twee stowwe verhinder die groei van aldie die fungi geheel en al by 'n lae konsentrasie, so laag as 10 dpm. Selfs by 'n aanwending van 5 dpm. is hul nadelige invloed op die fungi baie duidelik waarneembaar. Die verskillende stowwe kan soos volg in volgorde van doeltreffendheid as fungisiede gerangskik word. Die letale konsentrasies word tussen hakies aangegee. Kwikchloried (10 dpm.); Trigosan Slurry (10 dpm.); Thiulin (20 dpm.); Agallol (40 dpm.); Ceresan (40 dpm.); Trigosan (40 dpm.); kwikoksied (200 dpm.); "ACP Rose & Floral Dust" (230 dpm.); Cosan (500 dpm.); Cupravit (750 dpm.); kopersulfaat (1500 dpm.); ^{thiourea} ~~Thiourea~~ (10,000 dpm.).

TABEL 25:

DIE INVLOED VAN KWIKCHLORIED OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m.m.						
5 d.p.m.	Phoma							
	Asper- gillus	4.5	12.0	23.0	35.0	50.0	58.5	63.0
	Mucor	7.0	16.5	33.0	47.0	63.0	72.5	
10 d.p.m.	Phoma	-						
	Asper- gillus	-						
	Mucor	-						
Kontrole	Phoma	6.0	11.5	19.0	30.5	42.5	54.3	66.5
	Asper- gillus	11.0	24.5	39.5	56.5	71.0	79.5	
	Mucor	15.0	36.0	62.5	80.0			

TABEL 26:

DIE INVLOED VAN ROOI KWIKOKSIED OP DIE
GROEI VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae.					
		1	2	3	4	5	6
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m.m.					
50 d.p.m.	Phoma	-	-	0.5	2.0	3.5	5.5
	Asper- gillus	0.5	1.0	2.0	3.3	5.0	7.5
	Mucor	-	-	-	-	-	-
100d.p.m.	Phoma	-					
	Asper- gillus	-	-	-	1.5	2.5	4.0
	Mucor	-					
200d.p.m.	Phoma	-					
	Asper- gillus	-					
	Mucor	-					
Kontrole	Phoma	6.4	14.5	22.0	31.5	42.7	54.0
	Asper- gillus	10.3	21.5	38.0	56.5	71.5	79.0
	Mucor	14.8	36.5	62.0	80.4		

TABEL 27.

DIE INVLOED VAN KOPERSULFAAT OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van die miselium in dae						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van die miselium in m.m.						
500 dpm. (0.05%)	Phoma		8.0	13.5	18.0	20.3	21.5	22.0
	Asper- gillus		14.0	24.5	36.0	42.3	44.5	46.0
	Mucor		26.5	41.7	50.5	54.0	56.0	57.5
1000 dpm. (0.10%)	Phoma		3.0	4.5	6.0	7.0	8.5	10.0
	Asper- gillus		6.5	9.0	11.5	13.5	15.0	16.5
	Mucor		-					
1500 dpm. (0.15%)	Phoma		-					
	Asper- gillus		-					
	Mucor		-					
Kontrole	Phoma		5.0	14.0	22.5	32.0	43.5	55.5
	Asper- gillus		9.5	21.0	37.9	55.7	70.0	79.6
	Mucor		13.0	36.6	64.0	79.5		

TABEL 28.

~~Tiourea~~
DIE INVLOED VAN ~~THIOUREA~~ OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van die miselium in dae					
		1	2	3	4	5	6
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van die miselium in m.m.					
1000dpm (0.10%)	Phoma		7.0	10.0	14.1	17.5	20.0
	Asper- gillus		12.0	15.3	17.5	19.7	21.5
	Mucor		19.0	30.1	37.0	43.6	54.0
5000dpm (0.50%)	Phoma		-				
	Asper- gillus		5.0	7.2	9.0	10.5	11.5
	Mucor		8.3	11.0	13.5	17.0	19.5
10,000 dpm. (1.00%)	Phoma		-				
	Asper- gillus		-				
	Mucor		-				
Kontrole	Phoma		13.5	22.0	32.5	43.0	54.5
	Asper- gillus		22.0	39.4	56.8	71.5	80.0
	Mucor		36.2	63.5	80.5		

(-63-)

TABEL 29.

DIE INVLOED VAN THIULIN OP DIE GROEI VAN
DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m.m.						
5 dpm.	Phoma	5.0	11.5	19.0	26.5	35.0	44.0	51.5
	Asper- gillus	1.5	4.5	6.5	10.0	14.0	17.5	23.0
	Mucor	4.0	9.5	16.5	26.0	38.0	50.5	
10 dpm.	Phoma	-						
	Asper- gillus	-	2.0	2.5	3.5	3.6	3.8	4.0
	Mucor	-						
20 dpm.	Phoma	-						
	Asper- gillus	-						
	Mucor	-						
Kontrole	Phoma	6.0	14.0	21.5	31.0	42.5	56.0	67.0
	Asper- gillus	11.0	22.5	39.0	57.5	69.5	79.0	
	Mucor	15.0	37.0	64.0	80.5			

TABEL 30.

DIE INVLOED VAN TRIGOSAN SLURRY OP DIE
GROEI VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m.m.						
5 dpm.	Phoma	1.5	3.0	6.0	8.5	11.0	12.5	14.0
	Asper- gillus	1.0	3.0	5.5	9.0	13.5	18.0	
	Mucor	2.0	5.0	7.5	11.5	15.0	19.0	
10 dpm.	Phoma	-						
	Asper- gillus	-						
	Mucor	-						
Kontrole	Phoma	5.5	14.0	21.0	30.5	41.0	55.5	66.0
	Asper- gillus	10.5	23.0	40.0	58.0	70.5	80.0	
	Mucor	14.5	38.0	65.5	81.5			

TABEL 31.

DIE INVLOED VAN AGALLOL OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m,m.						
10 dpm.	Phoma	2.0	4.5	8.0	11.5	17.5	24.0	39.5
	Asper- gillus	4.0	8.6	16.5	29.0	47.0	63.5	72.0
	Mucor	3.0	7.0	14.5	21.0	29.5	39.0	51.5
20 dpm.	Phoma	1.0	2.5	5.0	8.0	11.5	18.0	24.0
	Asper- gillus	2.0	5.0	8.5	14.0	19.5	24.5	28.0
	Mucor	2.0	4.5	7.0	11.0	15.5	20.0	25.5
40 dpm.	Phoma	=						
	Asper- gillus	-						
	Mucor	-						
Kontrole	Phoma	6.0	12.5	20.5	32.0	42.0	53.5	55.0
	Asper- gillus	10.5	22.0	41.0	56.5	70.0	78.5	
	Mucor	14.5	36.0	61.0	81.5			

TABEL 32.

DIE INVLOED VAN CERESAN OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m,m.						
10 dpm.	Phoma		2.5	4.0	6.5	10.0	14.5	17.5
	Asper- gillus	1.0	3.8	10.0	19.6	31.5	45.0	60.5
	Mucor	4.0	9.5	15.5	22.0	29.3	37.0	44.0
20 dpm.	Phoma	-	1.0	1.5	3.0	4.5	6.5	8.0
	Asper- gillus	0.5	2.5	6.0	9.5	14.0	18.5	23.0
	Mucor	-						
40 dpm.	Phoma	-						
	Asper- gillus	-						
	Mucor	-						
Kontrole	Phoma	6.0	12.0	19.5	31.0	42.5	54.0	65.5
	Asper- gillus	11.0	22.5	42.0	57.0	71.0	78.5	
	Mucor	15.0	35.5	62.0	80.0			

TABEL 33.

DIE INVLOED VAN CUPRAVIT OP DIE GROEI VAN
DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae.					
		1	2	3	4	5	6
Konsen- trasie	Skimmel	Deursnee van miselium in m.m.					
80 dpm.	Phoma	1.5	3.0	6.0	11.0	16.5	24.0
	Asper- gillus	5.0	11.5	21.0	30.0	43.5	53.5
	Mucor	2.5	6.0	9.0	15.0	18.5	25.0
180dpm.	Phoma	1.0	3.0	5.5	10.0	15.0	20.5
	Asper- gillus	4.5	10.0	16.5	25.0	34.0	43.0
	Mucor	1.5	4.5	8.0	12.5	17.0	23.0
230dpm.	Phoma	-	2.5	5.0	8.0	12.5	18.0
	Asper- gillus	3.0	8.0	14.0	21.0	29.5	40.0
	Mucor	1.0	2.0	4.5	8.0	11.0	15.0
500dpm.	Phoma	-	1.0	3.0	5.5	8.0	10.0
	Asper- gillus	-	2.5	6.0	11.0	16.0	20.5
	Mucor	-	-	-	2.5	4.0	6.0
750dpm.	Phoma	-					
	Asper- gillus	-					
	Mucor	-					
Kontrole	Phoma	6.0	14.0	21.5	30.5	43.0	55.5
	Asper- gillus	10.0	23.0	38.5	57.0	70.5	80.0
	Mucor	14.5	36.0	62.5	79.5		

TABEL 34.

DIE INVLOED VAN COSAN OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS.

		Ouderdom van miselium in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
Konsen- trasie.	Skimmel	Deursnee van miselium in m,m.						
40 dpm.	Phoma	3.0	7.5	13.5	22.5	31.5	41.0	49.5
	Asper- gillus	5.0	12.0	22.0	36.0	49.5	60.0	68.0
	Mucor	4.0	10.0	18.0	25.5	33.5	41.0	
80 dpm.	Phoma	2.0	4.5	8.0	12.5	16.5	21.0	24.5
	Asper- gillus	4.0	10.0	17.0	28.0	40.0	51.0	58.5
	Mucor	3.0	8.0	14.0	21.0	27.5	33.0	
180dpm.	Phoma	1.5	3.0	5.5	9.0	12.5	17.0	21.5
	Asper- gillus	2.0	6.0	12.0	21.5	33.0	44.0	49.0
	Mucor	1.5	3.5	7.0	11.0	15.0	18.5	
230dpm.	Phoma	-	-	2.5	4.5	6.0	8.0	10.5
	Asper-	-	3.0	4.5	8.0	11.5	15.0	20.0
	Mucor	-						
500dpm.	Phoma	-						
	Asper- gillus	-						
	Mucor	-						
Kontrole	Phoma	5.5	13.5	21.0	31.0	44.0	56.0	67.5
	Asper- gillus	10.5	24.0	39.5	57.0	71.5	79.5	
	Mucor	15.0	36.5	62.0	79.0			

(-67-)

TABEL 35.

DIE INVLOED VAN TRIGOSAN OP DIE GROEI
VAN DIE DRIE SKIMMELS!

Konsen- trasie.	Skimmel	Ouderdom van die miselium in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
		Deursnee van miselium in m.m.						
10 dpm.	Phoma	-	2.5	4.5	6.5	8.5	11.0	15.0
	Asper- gillus	-	4.5	11.5	18.5	30.0	44.5	58.0
	Mucor	-	6.0	12.5	18.5	23.0	30.0	35.0
20 dpm.	Phoma	-	-	4.0	9.5	17.5	29.0	31.0
	Asper- gillus	-	-	4.0	9.5	17.5	29.0	31.0
	Mucor	-	-	-	-	-	-	-
40 dpm.	Phoma	-	-	-	-	-	-	-
	Asper- gillus	-	-	-	-	-	-	-
	Mucor	-	-	-	-	-	-	-
Kontrole	Phoma	6.0	14.5	22.0	31.0	42.5	55.0	66.0
	Asper- gillus	9.5	22.0	38.0	56.5	68.5	78.5	
	Mucor	15.0	37.0	63.5	81.0			

TABEL 36.

DIE INVLOED VAN "A.C.P. ROSE EN FLORAL DUST"
OP DIE GROEI VAN DIE DRIE SKIMMELS.

Konsen- trasie.	Skimmel	Ouderdom van miselium in dae.						
		1	2	3	4	5	6	7
		Deursnee van miselium in m.m.						
40 dpm.	Phoma	4.5	10.5	17.0	23.5	30.0	36.0	41.5
	Asper- gillus	4.0	10.0	17.0	25.5	36.5	47.0	
	Mucor	3.5	7.0	13.0	18.5	23.0		
180dpm.	Phoma	3.0	6.5	9.0	13.0	17.0	21.5	
	Asper- gillus	3.5	9.0	15.0	22.5	30.0	37.0	
	Mucor	1.5	4.5	9.0	13.5	20.0		
230dpm.	Phoma	-	-	-	-	-	-	-
	Asper- gillus	-	-	-	-	-	-	-
	Mucor	-	-	-	-	-	-	-
Kontrole	Phoma	6.0	14.5	22.5	31.5	43.0	54.5	65.5
	Asper- gillus	9.5	22.5	38.5	57.0	71.0	80.5	
	Mucor	15.0	37.5	64.5	80.0			

HOOFSTUK IX

DIE INVLOED VAN VERSKILLENDEN BAKTERIEDODERS

OP DIE BACILLUS SPESIE.

INLEIDING:

Uit hoofstuk III is dit duidelik dat die geïsoleerde, saadklewende bakterie goed groei op 'n vleis-~~plus~~ glukose-agarmedium. Verder het ek gevind dat die bakterie, wat as 'n Bacillus geïdentifiseer is, ewe goed op 'n H & S + 3% glukose-agarmedium groei. In hierdie eksperiment is aandag geskenk aan die invloed van 'n aantal bakteriedoders op die groei van die Bacillus. Daar is gepoog om verteenwoordigende bakteriedoders uit al die hoofgroepe te gebruik.

Pelczar (1958) onderskei nege hoofgroepe van chemikalieë wat bakteriedodende eienskappe vertoon

1) Fenol en fenolverbindings.

Fenol was vir baie jare as 'n kiemdoder gebruik. Tans word dit deur 'n hele aantal ander bakteriedoders, wat meer doeltreffend is, vervang. Sekere fenolderivate, byvoorbeeld die kresole, is sterker ontsmettingsmiddels as fenol. 'n Belangrike kommersiële ontsmettingsmiddel is "Lysol", waar kresol in 'n geëmulgisierte toestand voorkom, met 'n seep as die emulsieagens (Salle, 1954). Volgens Reichel (1909) is die werking van fenol meer fisies as chemies van aard. Fenol kan oplos in gekoaguleerde proteïene, vette, lipofiede bakteriesitoplasma. Reichel meen dat fenol die selle in 'n kolloïdale toestand indring.

2) Alkohole.

Verdunde alkoholoplossings is gewoonlik meer toksies teenoor bakterieë as absolute alkohol. Die maksimale bakteriedodende eienskappe tree by 'n konsentrasie van 77.0% alkohol te voorskyn (Salle, 1954). Smith (1947) vind dat alkohol baie effektief is teenoor Mycobacterium tuberculosis. Die hoër alkohole, byvoorbeeld propiel-, butiel-, amielalkohol en andere, is meer toksies as etielalkohol.

Alkohole koaguleer proteïene en is ook sterk dehidrerend. Aan hierdie twee eienskappe skryf Pelczar (1958) die toksiese werking van die alkohole toe.

3) Jodium.

Jodium is nie selektief teenoor verskillende bakterieë nie. Hoewel die meganisme waarvolgens jodium antibakteriese aktiwiteite teweegbring nog nie bekend is nie,

word dit veronderstel dat dit met sekere sellulêre proteïene(moontlik ensieme) verbind en hulle vernietig.

4) Chloor en Chloorverbindingse.

Hoewel chloorgas 'n uitstekende ontsmettingsmiddel is, beperk die moeilikhede wat met die hantering van die gas ondervind word, die gebruik daarvan. Dit word egter dikwels by grootskaalse inrigtings, soos die behandeling van water, gebruik.

Sekere chloorverbindingse, veral die hipochloriede en chlooramines, is net sulke goeie bakteriedoders. Die werking van hierdie verbindingse is hoofsaaklik oksiderend van aard. By die ontbinding van hipochloorsuur in sout-suur word nasente suurstof vrygestel (Pelczar, 1958).

5) Swaarmetale en hul verbindingse.

Die swaarmetale en hul soute is baie toksies teenoor mikroörganismes. Kenmerkend van die werking van swaarmetale is dat hul besonder aktief is, selfs in die geringste konsentrasies. Kwikchloried, mercurochrome, silwernitrat, silwerlaktat en kopersulfaat is van die meer bekende swaarmetaalverbindingse wat as bakteriedoders gebruik word.

6) Kleurstowwe.

Sekere koolteerkleurstowwe, veral van die tri-fenielgroep, is toksies teenoor bakterieë. Aanvanklik is gemeen dat hierdie kleurstowwe bakteriedodend is maar mettertyd het dit duidelik geword dat hulle dikwels net die groei inhibeer. Churchman (1912) het hierdie inhiberende werking as 'n bakteriostatiese werking beskryf.

Die gramreaksie van 'n bakterie bepaal dikwels of dit deur 'n bepaalde kleurstof nadelig beïnvloed sal word. Kleurstowwe is dus dikwels spesifiek in hul werking (Salle, 1954). Kristalviolet is, byvoorbeeld, selektief teenoor grampositiewe bakterieë, terwyl malachiet-groen gramnegatiewe bakterieë doeltreffend beheer.

Pelczar (1958) meen dat kleurstowwe met die sellulêre proteïene in verbindings tree en dat die proteïene daardeur 'n verandering ondergaan wat nadelig is vir die bakterie.

7) Sepe en sintetiese suiweringsmiddels.

Die vermoë van seep om oppervlakspanning te verlaag en sodoende as benattingsagens op te tree, maak dit baie bruikbaar, veral saam met ander ontsmettingsmiddels soos fenole en swaarmetale. McCulloch (1940) het die aktiwiteit van 'n aantal kommersiële sepe teenoor Streptococcus agalactiae getoets. Hy kom tot die slotsom

dat hulle meer doeltreffend is as fenol en selfs van die sterkste hipochloriet-middels. McCulloch het verder gevind dat die byvoeging van cresol by hierdie sepe geen toename van hul kiemdodende eienskappe teweeggebring het nie. Byvoeging van swaarmetale het egter die ^{giftigheid} ~~toesiteit~~ verhoog.

8) Kwartêre Ammoniumverbindings.

Die kwartêre Ammoniumverbindings is oppervlakaktiewe stowwe en word dikwels as ontsmettingsmiddels vandie huid gebruik. Hulle is veral baie aktief teenoor grampositiewe bakterieë. 'n Voorbeeld van so 'n verbinding is "Ceepryn" (cetyl-pyridinium-chloried).

9) Ander stowwe.

Hieronder bespreek Pelczar waterstofperoksied, sure, alkalieë, gasvormige kiemdoders, formaldehyd en etileen-oksied. Behalwe hierdie groep bakteriedoders is daar nog 'n groep naamlik die antibiotika.

Antibiotika word van ander kiemdoders daarin onderskei dat hulle, op 'n paar uitsonderings na, biosinteties van oorsprong en gevolglik natuurlike stowwe is. (Pelczar, 1958). Die verskillende antibiotika verskil baie in die manier waarop hulle antibakteriese werking teweegbring. Sommige antibiotika strem die groei en voortplanting, ander beïnvloed die respirasie van die bakterium terwyl nog ander die afbreek van vitale metaboliese stowwe beïnvloed. Antibiotika mag bakteriedodend wees in hoë konsentrasies en bakteriostaties in laer konsentrasies (Salle, 1954).

METODE:

Vir die bepaling van die doeltreffendheid van 'n bakteriedoder kan daar van 'n hele aantal metodes gebruik gemaak word. Van die tegnieke wat die algemeenste gebruik word, is die belangrikste die kultuurverdunningsmetode, die agarplaattellingsmetode, die spoorontkiemingsmetode, die silinderplaatmetode, die papierskyfiesmetode en die turbidimetriese-metode. Die papierskyfie-plaatmetode is deur Loo et al. (1945) ontwikkel en word toegepas by die bepaling van die invloed van streptomisien op verskillende mikroörganismes. Hierdie metode is deur Thornberry (1950) so gewysig dat dit kan dien as 'n doeltreffendheidstoets vir verskillende bakteriedoders. Die metode is volgens Thornberry baie betroubaar en dit lewer vinnige resultate. In hierdie eksperiment is die metode, met slegs geringe wysiginge, net so oorgeneem. H & S agar is in plek van "Streptomycin Assay Agar" gebruik.

Die agarplate is soos volg voorberei. H & S agar is deur middel van 'n pipet in petribakkies met 'n deursnee van 90 m.m. gepipetteer. 'n Pipet met 'n groot opening is gebruik. Die groot opening laat die agar vinnig vloei terwyl dit nog warm is en sodoende word 'n egalige lagie verseker. Elke petribakkie is van 20 ml. agar voorsien. Geen spesiale aseptiese voorsorgmaatreëls is nodig met die giet van die agar nie (Thornberry, 1950). Intussen is agar, wat vooraf in 5 ml. hoeveelhede in proefbuisse gesteriliseer is, gesmelt. Nadat die agar in die proefbuisse weer tot handwarmte afgekoel is is elk met 'n oëvol bakteriesuspensie geënt en geskud. Die bakteriesuspensie is berei deur 5 ml. steriele, gedistilleerde water op te skud met 'n drie-dae-ou kultuur van die Bacillus. Nadat die H & S agar in die petribakkies gestol het is in elk 5 ml. van die bogenoemde, geënte agar gegiet. Die bakkies is liggies heen en weer gekantel om 'n egalige top-lagie te verseker. Hierdie kulture is in 'n yskas by 2 - 4°C gehou en was onmiddellik gereed vir gebruik.

Van filtreerpapier (No.595) is met 'n kurkboor papierskyfies met 'n deursnee van 12.7 m.m. (1/2 duim), gesny. Die papierskyfies is in 'n skoon petribakkie geplaas en vir twee uur by 150°C gesteriliseer. Vir elke agarplaat is drie van hierdie papierskyfies, wat op gelyke afstande van mekaar op die agar geplaas is, gebruik (Sien figuur 4). Onmiddellik nadat die papierskyfies op die agar geplaas is is die toetsstof soos volg toegedien: 'n Aantal voorlopige proewe het aangetoon dat 0.05 ml. vloeistof net genoeg was om die papierskyfies te versadig. Met behulp van 'n 0.1 ml. mikropipet is elke papierskyfie van 0.05 ml. van die betrokke toetsstof in die betrokke konsentrasies voorsien.

Die volgende bakteriedoders se aktiwiteit teenoor die Bacillus is nagegaan. Fenol, para-cresol, Lysol, ~~§d~~- naphthol, Lugol se jodiumoplossing, kwikchloried, silwernitraat, Cupravit, kristalviolet, malaxchietgroen, Pinex en Thiulin. Drie antibiotika is ook uitgetoets nl. streptomisien, chloramfenikol en tetrasiklien. Aldrie hierdie antibiotika is aktief teenoor grampositiewe sowel as gramnegatiewe bakterieë (Waksman, 1947).

Die agarkulture is vir 24 uur by 35°C (optimum van die Bacillus, sien hoofstuk III) geïnkubeer. Die deursnee van die inhibisiesones is daarna tot die naaste 0.5 m.m. gemeet. 'n Metrieke liniaal en 'n vergrootglas, op die regte brandpuntsafstand gestut, is gebruik. Die kulture

is van onder belig deur middel van 'n elektriese lamp.

Voeg in tabel 37.

Thornberry (1950) het met sy proewe gevind dat 'n inhibisiesone met 'n deursnee van meer as 17 m.m., (papierskyfie met deursnee van 12.7 m.m.), 'n goeie aanduiding is dat die toetsstof toksies is teenoor die toetsorganisme by daardie betrokke konsentraie. Aangesien my metode met die van Thornberry ooreengestem het, het ek ook 'n inhibisiesone met 'n deursnee van 17 m.m. as die minimumwaarde geneem. Alle konsentrasies wat 'n deursnee van meer as 17 m.m. gelewer het het ek as doeltreffend beskou. Op grond hiervan kan die volgende afleidings uit tabel 37 gemaak word.

By 'n vergelyking van malachietgroen en kristalviolet is dit duidelik dat die eersgenoemde kleurstof baie meer aktief teenoor die bakterium is as kristalviolet. Malachietgroen is veral aktief teenoor gramnegatiewe bakterieë terwyl kristalviolet aktief is teenoor grampositiewe bakterieë. Aangesien die Bacillus gramnegatief is stem die resultate ooreen met wat verwag is.

Die byvoeging van sekere oppervlakaktiewe stowwe, soos seepoplossings, verhoog dikwels die doeltreffendheid van 'n kiemdoder aanmerklik (Valko en Dubois, 1944). 'n Para-cresol oplossing van 7.0% lewer, byvoorbeeld, 'n inhibisiesone van 20 m.m. Die byvoeging van 1.0% Teepol tot die oplossing vergroot die inhibisiesone tot 30.0 m.m. Byvoeging van 1.0% Lysol, wat seep bevat en self 'n kiemdoder is, verhoog die inhibisiesone van 7.0% ^{van 20} cresol na 32.0 m.m. α -Naphthol se giftigheid is ook verhoog deur die toevoeging van verskillende seepoplossings (sien tabel 37).

Die swaarmetaalsoute, wat hier gebruik is, was baie aktief. Selfs by relatief lae konsentrasies is hoë waardes verkry. Met 'n kwikchloriedoplossing met 'n sterkte van 12.5 dpm. is die deursnee van die inhibisiesone 23.5 m.m. en met 'n 0.1% silwernitraatoplossing is dit 21.0 m.m.

Tobie en Ayres (1944) wys daarop dat daar nie noodwendig 'n korrelasie bestaan tussen die papierskyfplaatmetode en die reeksverdunningsmetode, soos toegepas by die bepaling van die fenolkoeffisiënt, nie. Volgens hulle speel die diffusie deur die agar in die eerge-

noemde metode 'n groot rol. Die lae waardes wat selfs met die hoë konsentrasies (7.0%) fenol verkry is, kan moontlik toegeskryf word aan swak diffusie deur die agar.

Wat die drie antibiotika wat getoets is betref, is gevind dat chloramfenikol en tetrasiklien meer toksies is teenoor die Bacillus as streptomisien. Tetrasiklien was in alle gevalle die doeltreffendste antibiotikum en het die hoogste waardes vir die deursnee van die inhibisiesone gelewer.

GEVOLGTEKKING:

Op grond van die resultate wat met hierdie eksperiment verkry is is die volgende bakteriedoders in die konsentrasies, wat tussen hakies aangegee word, as doeltreffend beskou:

Malanchietgroen (10 dpm.); kwikchloried (12.5 dpm.); fenol (7.0%); Lysol (4.0%); para-Cresol (7.0%); p-Cresol en Teepol (5.0% en 1.0% resp.); para-Cresol en Lysol (5.0% en 1.0% resp.); Thiulin (40 dpm.); Pinex (2.0%); silwer-nitraat (0.1%); Cupravit (200 dpm.); ~~1,8~~-Naphthol en Teepol (3.0% en 2.0% resp.); ~~1,8~~-Naphthol en Lysol (3.0% en 2.0% resp.); ~~1,8~~-Naphthol en Pinex (2.0% en 1.0% resp.); streptomisien (1000 dpm.); chloramfenikol (100 dpm.); tetrasiklien (100 dpm.)

Hierdie stowwe is in die volgende eksperiment gebruik om die Rooiblomsaad mee te behandel.

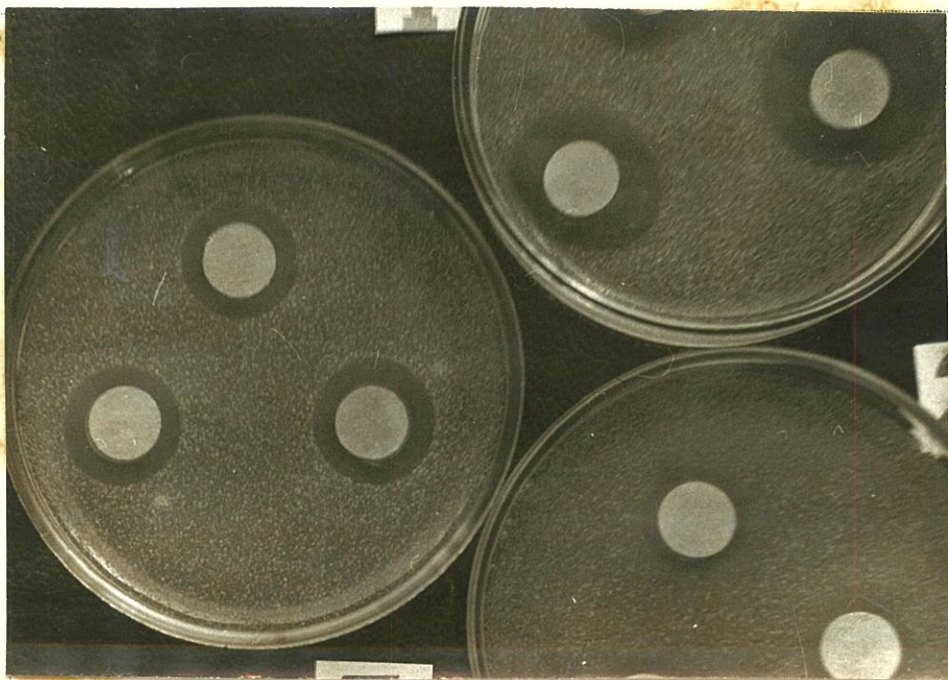
TABEL 37.

DIE DEURSNEE VAN DIE INHIBISIESONES VERKRY MET
VERSKEIDENE KONSENTRASIES VAN BAKTERIEDODERS.

Bakterie- doder	Konsen- trasie	Deursnee van inhibi- sie sone (m.m.)
Kristal- violet	5 dpm.	-
	7.5dpm.	-
	20.0dpm.	-
	50.0dpm.	16
Malachiet- groen	5.0dpm.	15
	7.5dpm.	16
	10.0dpm.	17.5
	20.0dpm.	21.0
	40.0dpm.	26.5 (Fig.4).
Lugol se Jodiumopl.	20.0dpm.	-
	40.0dpm.	-
	100 dpm.	-
	1.0%	-
	3.0%	-
Kwikchloried	2.5dpm.	-
	5.0dpm.	15
	12.5dpm.	23.5
	1.0%	45
Fenol	0.5%	-
	1.0%	-
	3.0%	-
	5.0%	-
	7.0%	17
Lysol	1.0%	15
	2.0%	16.5
	3.0%	17.0
	4.0%	17.5
	5.0%	23.5 (Fig.4).

TABEL 37: Vervolg:

Bakteriedoder	Konsentrasie	Deursnee van inhibisiesone (m.m.)
p-Cresol	2.0%	-
p-Cresol	5.0%	15.5
p-Cresol	7.0%	20.0
p-Cresol + Teepol	5.0 & 1.0% resp.	26.5
p-Cresol + Lysol	5.0 & 1.0% resp.	28.0
p-Cresol + Teepol	7.0 & 1.0% resp.	30.0
p-Cresol + Lysol	7.0 & 1.0% resp.	32.0
Thiulin	40 dpm. 0.2%	21.0 35.0
Pinex	2.0% 3.0% 5.0%	17.5 19.0 20.5
Silwernitraat	0.1% 0.2%	21.0 22.5 (Fig.4)
Cupravit	100 dpm. 200 dpm.	- 20.0
α-Naphthol + Teepol	3.0 & 2.0% resp.	30.0
α-Naphthol & Lysol	3.0 & 2.0% resp.	31.0
α-Naphthol & Pinex	2.0 & 1.0% resp.	25.0
<u>ANTIBIOTIKA.</u>		
Streptomisien	10 dpm. 100 dpm. 1000 dpm. 10,000 dpm.	- 14.5 26.0 40.0
Chloramfenikol	10 dpm. 100 dpm. 1000 dpm. 10,000 dpm.	15.0 20.0 23.0 46.0
Tetrasiklien	10 dpm. 100 dpm. 1000 dpm. 10,000 dpm.	17.0 40.0 48.0 53.0



FIGUUR 4; DIE INHIBITIEZONES VAN BAKTERIEDODERS.

Rechts bo: Malachietgroen 40 ~~dm~~ ^{mg}.
Links onder: Silwernittraat 0.2%
Rechts onder: Lysol 4.0%

HOOFSTUK X.

DIE STERILISERING VAN DIE SAAD VAN STRIGA LUTEA.

INLEIDING:

Nadat die doeltreffendheid van verskillende swamdoders en bakteriedoders vir die vernietiging van die ver- naamste saadklewende mikroörganismes van die Rooibloom onder optimale groeitoestande nagegaan is, is verder aandag geskenk aan die moontlikheid om, deur die aanwending van hierdie stowwe, die saad van hierdie mikroörganismes te suiwer.

Die assosiasie tussen plantsiekteveroorsoekende organismes en saad is al meer as 200 jaar gelede waargeneem deur boere naby Bristol in Engeland. Hulle het gevind dat koringosaad, wat met seewater in aanraking was, nie met brandfungi besmet was nie. Hierdie waarneming is deur Jetro Tull in 1733 beskryf en daaruit het die gebruik om koring- saad met soutwater te behandel ontstaan (Orton, 1931). In 1755 het Tillet bewys dat "brand" van koring veroorsaak word deur spore van Tilletia wat deur die saad oorgedra word (Crocker en Barton, 1953). Die bewys dat ook bakterie- siektes deur saad oorgedra kan word is later deur Beach in 1892 gelewer. Hy kon bewys dat Bacterium phaseoli op saad voorkom (Crocker en Barton, 1953).

Sedert die publis^{kasie}ering van hierdie vroeë waar- nemings het 'n massa literatuur verskyn wat saadklewende parasitiese organismes beskryf. Orton (1931) gee 'n oor- sig van "seed borne" parasiete. Neergaard (1940) gee 'n lys van siektes wat deur saad oorgedra word. Dit sluit 137 organismes in wat op die saad van veertig verskillende genera voorkom.

Die waarde van saadbehandeling by die beheer van plantsiektes word in 'n oorsig deur Leukel (1926) saam- gevat. Die oorsig word hoofsaaklik gewy aan die beskrywing van siektes, hul bestryding en die swamdoders wat hiervoor aangewend word. In 'n latere oorsig bespreek Leukel (1948) die meer resente ontwikkeling op die gebied van saadbe- handeling. Walker (1948) gee 'n oorsig van die behandeling van groentesaad. Hierin skenk hy veral aandag aan kwik- vrye, organiese swamdoders.

Vir eksperimente waar plante in reinkultuur gekweek word is dit nodig dat die saad van hierdie plante vooraf

eers/

eers gesteriliseer moet word (Hewitt, 1952). Vroeëre werk op die gebied van saadsterilisering is deur Wilson (1915) beskryf. Tot op daardie tydstip was alkohol, formalien, fenol, waterstofperoksied, broomwater, kwikchloried, silwernitraat en kopersulfaat algemeen in gebruik. Wilson beveel 'n behandeling met kalsiumhipochloried en 2.0% chloor aan. Volgens hom is dit nie fitotoksies vir 'n hele aantal saadtipes. Die tyd van behandeling wissel van vier minute vir koolsaad tot 15 minute vir koringsaad.

In die verlede is kwikchloried dikwels gebruik vir die sterilisering van saad en wel in 'n 0.1% konsentrasie. Hopkins et al (1931) het peulsade vir vyf minute met kwikchloried behandel terwyl Barker en Broyer (1942) skorsiesade gesteriliseer het deur dit vir een minuut met kwikchloried te behandel. Baie navorsers het by die sterilisering van saad met kwikchloried eers 'n voorbehandeling met 95% alkohol toegepas. Die alkohol het volkome en vinnige benatting van die saad verseker. Audus (sien Hewitt, 1952) het die volgende metode ontwikkel vir die sterilisering van klein saadtipes. Die saad is eers vir drie minute in 75% alkohol gedoop, daarna vir drie minute met 4.0% kwikchloried behandel gevolg deur twintig afspoelinge in steriele, gedistilleerde water.

Silwernitraatoplossings is ook dikwels vir saadsterilisering gebruik. Steinberg (1947) het tabaksaad gesteriliseer deur dit met 0.1% silwernitraat te behandel. Richards en Templeman (1936) het formaldehyd gebruik vir die sterilisering van grassaad. Vir die sterilisering van ertjie-, slaai- en spanspeksaad het Stephenson (1942) die saad vir twee uur in 'n versadigde oplossing van Lemesan (hidroksie kwikchlorofenol) geweek en dit daarna in 3.0% broomwater nagespoel. Daarna het hy die saad goed met steriele gedistilleerde water afgespoel en dit op klam, steriele filtreerpapier of watte laat ontkiem.

Een van die jongste ontwikkelinge op die gebied van saadsterilisering is die gebruik van organiese swamdoders. Die swawelverbindings en die *kunone* is bekende voorbeelde hiervan. Onder eersgenoemde groep ressorteer Tetrametiel-~~th~~ioramdisulfied (T.M.T.D.), Ferridimetiel dit~~th~~iokarbamaat ("Fermate") en Sinkdimetiel dit~~th~~iokarbamaat ("Zerlate") Onder die *kunone* is Tetrachloro-para-benzok~~un~~on ("Spergon") en 2 - 3 dichloro 1 - 4, naphthok~~un~~on (Phygon") die belangrikste (Horsfall, 1945).

Leukel (1948) deel die swamdoders wat vir die sterilisering van saad gebruik word soos volg in:

- 1) Kwikverbindings, organies sowel as anorganies.
- 2) Anorganiese koper en sinkverbindings.
- 3) Kwikvrye organiese verbindings, metaalbevattend of metaalvry.

Dan kan daar volgens Leukel nog 'n vierde groep bygevoeg word wat behandeling met swawel, warm water, damp, droë hitte, gasse, ultravioletlig en kortgolf en frekwensie ossilasies insluit.

Hofer (1937 en 1938) het 'n noukeurige studie van saadsterilisering, veral ten opsigte van peulsade, gemaak. Hy kom tot die gevolgtrekking dat dit feitlik onmoontlik is om die saad te steriliseer sonder om die saad in sekere opsigte nadelig te beïnvloed. Verder vind hy dat selfs al word die saad vir vyftien minute by vyftien pond druk in 'n outoklaaf gesteriliseer (die saad word sodoende gedood) dit dikwels nog nie volkome vry van bakterieë is nie. Hierdie groot weerstand van die saadklewende bakterieë kan daaraan toegeskryf word dat die organismes beskerm lê in die micropyle of selfs dieper in die saad. (Hofer, 1938).

Dekker (1957) beskryf 'n metode waarvolgens inwendige sterilisasie van ertjiesaad teweeggebring kan word. Hy gebruik die twee antibiotika Rimocidin en Pimaricin en week die sade vir 24 uur in 'n oplossing bevattende 75 dpm. van die aktiewe stof. Met hierdie behandeling het die persentasie besmette sade afgeneem van 15 - 40% tot 0.5 - 1.5%. Die behandeling het die saad egter nie van alle fungi gesuiwer nie. Dekker het verder gevind dat, by 'n toename in die konsentrasie van die antibiotika, die ontkieming van die saad gestrem word. 'n Hele aantal outeurs het gevalle beskryf waar antibiotika 'n stremmende uitwerking op saadontkieming uitgeoefen het. So het Brian (1957) gevind dat die vier antibiotika "Actidione", "Azaserine", "Alternaric acid" en "Polymixin", saadontkieming gestrem het. Hy het egter gevind dat ander antibiotika, wat normaalweg baie doeltreffend is, byvoorbeeld streptomisien en chloramfenikol, in redelike hoë konsentrasies deur plante opgeneem kan word sonder enige merkbare nadelige invloed op hul groei en metabolisme.

METODE:

Hierdie eksperiment is in twee dele uitgevoer. In die eerste gedeelte is geweekte Rooibloomsaad met verskillende ontsmettingsmiddels behandel terwyl ongeweekte saad in die tweede gedeelte gebruik is. Vir die behandeling van die saad is die apparaat, wat in figuur 1 afgebeeld is, gebruik.

Voeg in figuur 1.

Die afsuigkolf (9) bevat gedistilleerde water. Voordat die apparaat gesteriliseer word, word die gomlastiekbal (12) eers verwyder aangesien die steriliseringsproses dit mag beskadig. Die res van die apparaat, behalwe die glasbeker (7), word vir 30 minute in 'n outoklaaf by 15 lb. druk gesteriliseer. Gedurende die sterilisering daarvan moet die twee klemme A en B (5 en 8) toe wees. Nadat die apparaat afgekoel het word die gomlastiekbal weer aangeheg aan die buis (10) wat met 'n watterfilter gevul is. Die apparaat is nou gereed en word soos volg gebruik.

Die Rooibloomsaad wat behandel moet word, word asepties in die Allihnsfiltreerbuis (2) oorgebring. Die rand van die filtreerbuis word geflambeer elke keer wanneer die watterprop (1) verwyder word. Klem B word oopgemaak en die gomlastiekbal word gedruk. Die water styg in die vertikale been van die T-buis (6) op. Sodra die waterhoogte die filter van die filtreerbuis bereik word klem B toegemaak. Die ontsmettingsmiddel word vervolgens asepties in die filtreerbuis gegiet. Die filtreerbuis word gedurende die behandelingsperiode met kort tussenposes geskud om te verseker dat al die saad met die ontsmettingsmiddel in aanraking kom.

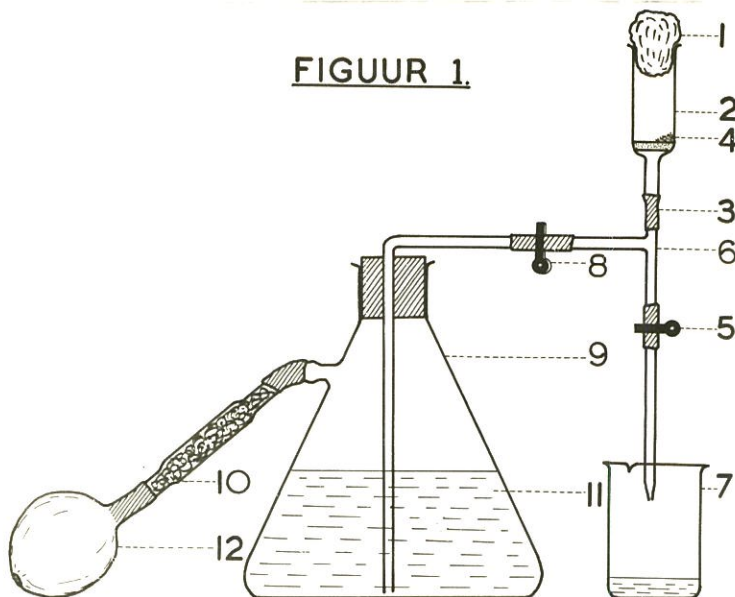
Na afloop van die behandelingsperiode word klem A oopgemaak. Die ontsmettingsmiddel vloei uit in die glasbeker terwyl die saad deur die filter teruggehou word. Nadat al die ontsmettingsmiddel uitgeloop het word klem A weer toegemaak. Klem B word oopgemaak, die gomlastiekbal gedruk en water styg in die filtreerbuis in. Klem B word dan weer toegemaak, klem A word oopgemaak en die water vloei uit. Deur herhaling word die saad goed met water nagespoel. In hierdie eksperiment is alle behandelde saad 20 maal met gedistilleerde water afgespoel teneinde alle spore van die ontsmettingsmiddel te verwyder.

A. Geweekte saad:

Vir hierdie gedeelte van die eksperiment is die Rooibloomsaad eers voorafbehandel deur dit vir tien dae te week. Volgens Braun (1920) kan baie van die nadelige invloede wat chemiese stowwe op saad uitoefen voorkom word

as/

FIGUUR 1.



VERKLARING:

1. WATTEPROP
 2. ALLIHNIS-FILTREERBUIS
 3. GOMLASTIEKVERBINDING
 4. ROOIBLOMSAAD
 5. KLEM A
 6. T-BUIS
 7. GLASBEKER
 8. KLEM B
 9. AFSUIGKOLF
 10. BUIS MET WATTE
 11. GEDISTILLEERDE WATER
 12. GOMLASTIEKBAL
-

as die saad vooraf eers goed geweek word. Volgens hom word die chemikalie wat in die geweekte saad indiffundeer verdun en word sodoende minder nadelig. Die Rooiblomsaad is soos volg geweek. Skoon riviersand is in 'n petribakkie geplaas en twee velle filtreerpapier is op die sand neergelê. Die petribakkie met sy inhoud is vir twee uur by 150°C in 'n elektriese oond gesteriliseer. Voldoende steriele gedistilleerde water om die sand goed klam te maak is vervolgens in die bakkie gegiet. Die Rooiblomsaad is hierna tussen die filtreerpapier gestrooi en vir tien dae by 'n temperatuur van 30°C in 'n inkubator gehou. Die water in die petribakkie is voortdurend aangevul sodat die saad gedurende die hele periode klam gebly het (Botha, 1958).

Monsters van hierdie geweekte saad is met verskillende ontsmettingsmiddels behandel deur gebruik te maak van die beskryfde apparaat. Na die behandeling is 'n gedeelte van die saadmonster asepties uit die filtreerbuis (sien figuur 1) op H & S-agarplate oorgebring teneinde die mate van steriliteit van die saad vas te stel. Die agarplate, met die saad, is vir 3 - 5 dae by 30°C (optimum vir die saad) geïnkubeer. Na die inkubasieperiode is die plate ondersoek. Die oorblywende gedeelte van die behandelde saadmonster is gebruik om die ontkiemingspersentasie vas te stel.

Die ontkiemingstegniek vir die saad van Striga lutea is deur Botha (1958) beskryf. Die Rooibloom is van sy gasheer afhanklik vir die ontkieming van sy saad. Die verskynsel dat Rooiblomsaad nie onafhanklik kan ontkiem nie, maar geaktiveer moet word deur een of ander stof wat deur die wortels van sekere gasheerplante afgeskei word, is reeds geruime tyd bekend. Fuller (1900) het dit reeds waargeneem en beskryf (sien Botha, 1958).

Oplossings van worteluitskeidings is soos volg verkry. 'n Aantal kafferboonsade (Vigna sinensis, seleksie 37-c-6) is in skoon riviersand ontkiem. Na omtrent tien dae is twee van die saailinge versigtig uit die sand verwyder en hul wortels is deeglik met gedistilleerde water afgespoel. Hierdie plante is in 'n 30 ml. proefbuis oorgebring en die proefbuis is met gedistilleerde water gevul. Die plante is in posisie gehou deur 'n watteprop in die bek van die proefbuis. Die wande van die proefbuis is verdonker, maar die lugdele van die plante is aan daglig blootgestel. Na 'n paar dae by kamertemperatuur is die water in die proefbuis vervang deur vars, gedistilleerde water en na 48 uur is hierdie water, wat die

afskeidings/

afskeidings van die wortels bevat, afgegiet. Die so-verkrygte oplossings is gebruik om die saad van die Rooibloom te aktiveer.

'n Druppel van hierdie "worteloplossing" is op 'n voorwerpglasie gebring en 50-100 van die behandelde parasiet-saadjes is uit die filtreerbuis daarin oorgebring. Die voorwerpglasie is op 'n holgeslypte voorwerpglas lugdig met "vaspar" vasgeheg, en wel op so 'n wyse dat die druppel met die saadjies in die holte van die kultuurglas gehang het. Na 'n inkubasieperiode van drie dae by 30°C is die ontkiemingspersentasie onder die mikroskoop vasgestel. Vir elke ontkiemingsproef is vier replikate gebruik en hieruit is 'n gemiddelde ontkiemingspersentasie bereken.

Die swamdoders en bakteriedoders wat volgens die resultate van die twee vorige proewe (sien hoofstukke 8 en 9) as doeltreffend beskou kan word, is gebruik. Behalwe hierdie stowwe is 'n aantal ander chemikalieë ook gebruik om die saad mee te behandel, naamlik, natriumhipochloried, waterstofperoksied, Bordeaux mengsel (Amer. Phyt.Soc., 1943) en formalien.

RESULTATE:

In tabel 38 is die mikroörganismes wat kontaminasie van die agarplate veroorsaak het van dieselfde simbole soos in hoofstuk 3 voorsien.

Voeg in tabel 38.

Wat die steriliteit van saad, na die behandeling betref, kan die volgende afleidings uit die resultate van tabel 38 gemaak word. Slegs enkele van die stowwe het 'n algehele steriliteit bewerkstellig. In al hierdie gevalle waar steriliteit verkry is, is geen ontkieming van die saad waargeneem nie. By 'n vermeerdering van die konsentrasie van die ontsmettingsmiddels is 'n definitiewe afname in die aantal oorlewende, saadklewende organismes waargeneem. Die bakterie en Phoma het die grootste weerstand teen die ontsmettingsmiddels gebied. Dat die Bacillus so weerstandbiedend is kan moontlik aan die volgende oorsaak toegeskryf word. Die bakterie is spoorvormend en van hierdie spore lê waarskynlik goed in die gleuwe van die saadhuid van die Rooibloom beskerm en is gevolglik nie maklik bereikbaar nie. Piknidiums van Phoma kan weer duidelik saam met die saad onder die mikroskoop waargeneem

word/

word. Hierdie piknidiums beskerm die ingeslote spore van die fungus waarskynlik tot 'n groot mate teen die ontsmettingsmiddels.

Die duur van die behandeling het nie 'n baie groot invloed op die uiteindelijke mate van steriliteit van die saad nie. Dieselfde organisme kom bv. voor op saad wat met 40 dpm. Agallol vir 30, 60 en 90 minute behandel is. Die duur van die behandeling het egter 'n verreikende invloed op die ontkiemingspersentasie van die saad. Agallol (40 dpm.) gee na 'n behandeling van 30 minute 20% ontkieming, na 60 minute 3% en na 90 minute is geen ontkieming van die saad waargeneem nie. Meer drastiese behandelings, waar die saad met hoër konsentrasies vir kort periodes behandel is het ook geen sukses opgelewer nie. Hierdie behandelings het wel steriliteit van die saad veroorsaak maar geen ontkieming van die saad is waargeneem nie.

Uit die resultate in tabel 38 blyk dit baie duidelik dat die ontkieming van Rooibloomsaad baie gestrem word deur behandeling met ontsmettingsmiddels. Die merendeel van die ontsmettingsmiddels wat gebruik is, het die ontkieming van die saad waarskynlik nadelig beïnvloed. Selfs by die laagste konsentrasies was die ontkiemingspersentasie aanmerklik laer as die van die kontrole wat 'n gemiddelde van 65.0% gehad het. Die hoogste ontkiemingspersentasie is verkry by 'n behandeling met 20 dpm. Malazchietgroen, naamlik 51.2%.

Geen behandeling van die geweekte saad het dus enige steriele saad wat kan ontkiem, opgelewer nie.

TABEL 38.

DIE UITWERKING VAN VERSKILLENDE ONTSMETTINGS-
MIDDELS OP GEWEEKTE ROOIBLOMSAAD.

Ontsmettings- middel	Kons.	Behandel- ingstyd in min.	% Ont- kiem- ing	Mate v. sterili- teit-bepaal vol- gens organismes wat nie gedood is nie.
Thiourea	1.0%	30	-	A, D & Bakt.
Kwikchloried	0.1%	2	-	Steriel
Kwikchloried	10dpm.	30	-	A, E & Bakt.
Kwikchloried (Alkohol 1 min.)	10dpm.	30	-	Steriel
Kopersulfaat	0.15%	30	-	A & Bakt.
Thiulin	0.1%	2	-	A & Bakt.
Thiulin	10dpm.	30	24.0	A, B & Bakt.
Thiulin	20dpm.	30	-	A & Bakt.
Thiulin	10dpm.	60	-	A & Bakt.
Trigosan Slurry	0.1%	2	-	Steriel
Trigosan Slurry	10dpm.	30	27.5	A, D & Bakt.
Trigosan Slurry	20dpm.	30	2.0	A & Bakt.
Trigosan Slurry	30dpm.	30	1.8	A
Trigosan Slurry	40dpm.	30	-	A
Trigosan Slurry	10dpm.	60	-	A
Agallol	0.1%	2	4.0	A & Bakt.
Agallol	0.1%	5	-	A
Agallol	40dpm.	30	20.0	A & Bakt.
Agallol	80dpm.	30	7.1	A & Bakt.
Agallol	100dpm.	30	-	A
Agallol	40dpm.	60	3.0	A & Bakt.
Agallol	40dpm.	90	-	A & Bakt.
Ceresan	0.1%	5	-	A
Ceresan	40dpm.	30	10.0	A, D & Bakt.
Ceresan	80dpm.	30	8.0	A & Bakt.
Ceresan	100dpm.	30	-	A & Bakt.
Ceresan	40dpm.	60	-	A & Bakt.
Trigosan	0.1%	2	-	Steriel
Trigosan	40dpm.	30	2.0	A, C, D, & Bakt.
Trigosan	50dpm.	30	-	A, D & Bakt.
A.C.P. Rose & Floral Dust	230dpm.	30	25.0	A, B & Bakt.
A.C.P. Rose & Floral Dust	250dpm.	30	14.0	A & Bakt.
A.C.P. Rose & Floral Dust	500dpm.	30	11.5	A & Bakt.
A.C.P. Rose & Floral Dust	1000dpm.	30	-	Bakt.
A.C.P. Rose & Floral Dust	230dpm.	60	-	A, C & Bakt.
Phenol	7.0%	30	-	A, C & Bakt.
Phenol (Teepol 1 min.)	7.0%	30	-	Bakt.

TABEL 38: Vervolg.

Cosan	230 dpm.	30	28.0	A,B,C,D & Bakt.
Cosan	500 dpm.	30	2.5	A,C & Bakt.
Cosan	800 dpm.	30	-	A & Bakt.
Cosan	230 dpm.	60	-	A,D & Bakt.
Cupravit	230 dpm.	30	3.4	A,B & Bakt.
Cupravit	500 dpm.	30	-	A & Bakt.
Cupravit	230 dpm.	60	-	A
Lysol	3.0%	30	-	Bakt.
p-Cresol	7.0%	30	-	A,B & Bakt.
p-Cresol & Teepol	5.0 & 1.0 %	30	-	A
Pinex	2.0%	30	2.5	A,D & Bakt.
Pinex	2.5%	30	-	A & Bakt.
Silwernitraat	0.5%	5	-	A & Bakt.
Silwernitraat	0.1%	30	-	Steriel
Silwernitraat	0.2%	30	-	Steriel
Malachietgroen	20 dpm.	30	51.2	A,E & Bakt.
Malachietgroen	40 dpm.	30	30.0	A & Bakt.
Malachietgroen	70 dpm.	30	2.8	A & Bakt.
Malachietgroen	80 dpm.	30	-	A
Malachietgroen & A.C.P. & Floral Dust	35 & 250 dpm.	30	-	Steriel
Malachietgroen & Teepol (1 min)	50 dpm.	30	-	Steriel
Malachietgroen	40 dpm.	60	-	A & Bakt.
Malachietgroen	40 dpm.	90	-	A
~~80~~ Naphthol & Teepol	3.0 & 2.0%	30	2.3	A & Bakt.
~~80~~ Naphthol & Teepol	5.0 & 2.0%	30	-	A
Natriumhipo-chloried	7.0%	30	-	Bakt.
Waterstof-peroksied	10.0%	30	-	Bakt.
Bordeaux mengsel	vol sterk-te	30	-	A
Bordeaux mengsel & Teepol (1 min.)	vol sterk-te	30	-	Steriel
Formalien	0.5%	30	-	A,C & Bakt.
Chloramfenikol	100 dpm.	30	10.0	A,C,D & Bakt.
Chloramfenikol	1000 dpm.	30	1.4	A,D & Bakt.
Chloramfenikol	1000 dpm.	60	-	A & Bakt.
Tetrasiklien	100 dpm.	30	-	A & Bakt.
Streptomisien	1000 dpm.	30	-	A,D & Bakt.
Kontrole			65%	

B : DROÛ SAAD.

In hierdie gedeelte van die eksperiment is droë (d.w.s. nie-geweekte) Rooibloomsaad met verskillende ontsmettingsmiddels behandel, waarna die saad onder aseptiese toestande geweeke is. Die saad is volgens die reedsbeskryfde metode behandel deur gebruik te maak van die apparaat in figuur 1. Aangesien die droë saad dikwels bo-op die ontsmettingsmiddels gedryf het en sodoende nie goed daarmee in aanraking gekom het nie, is elke behandeling van die saad voorafgegaan deur 'n kort indompeling daarvan in 96% alkohol. 'n Indompeling van 10 - 15 sekondes in die alkohol het geen merkbare invloed op die ontkiemingspersentasie van die saad gehad nie, maar dit het wel volkome benatting daarvan bewerkstellig. Na behandeling met die ontsmettingsmiddels is die saad asepties uit die filtreerbuis oorgebring in voorafgesteriliseerde petribakkies met sand en filtreerpapier (sien vorige gedeelte van die eksperiment). Die petribakkies met hul inhoud is vir tien dae by 30°C gehou. Die sand is gedurig klam gehou deur van tyd tot tyd steriele, gedistilleerde water asepties toe te dien.

Na afloop van die wekingsproses is 'n gedeelte van die saad asepties op H & S agarplate oorgebring ten einde die mate van steriliteit van die saad vas te stel. Hierdie plate is van 3 - 5 dae by 30°C geïnkubeer en daarna ondersoek (sien figuur 5). Die oorblywende gedeelte van die geweekte saad is gebruik om die ontkiemingspersentasie te bepaal. Die ontkiemingstegniek, wat in die eerste gedeelte van hierdie eksperiment beskryf is, is toegepas.

Voeg in tabel 39.

Uit die resultate in tabel 39 kan die volgende gevolgtrekkings gemaak word. Slegs twee behandelings, naamlik die met Ceresan en silwernitrat, het algehele steriliteit van die saad bewerkstellig. In beide hierdie gevalle is geen ontkieming van die saad waargeneem nie. In al die gevalle waar ontkieming van die saad plaasgevind het, het die Bacillus en Phoma die behandeling ook oorleef.

Die resultate wat met hierdie metode van droë saad-behandeling verkry is, stem dus tot 'n groot mate ooreen met die wat verkry is met die behandeling van die geweekte saad.

GEVOLGTREKKING:

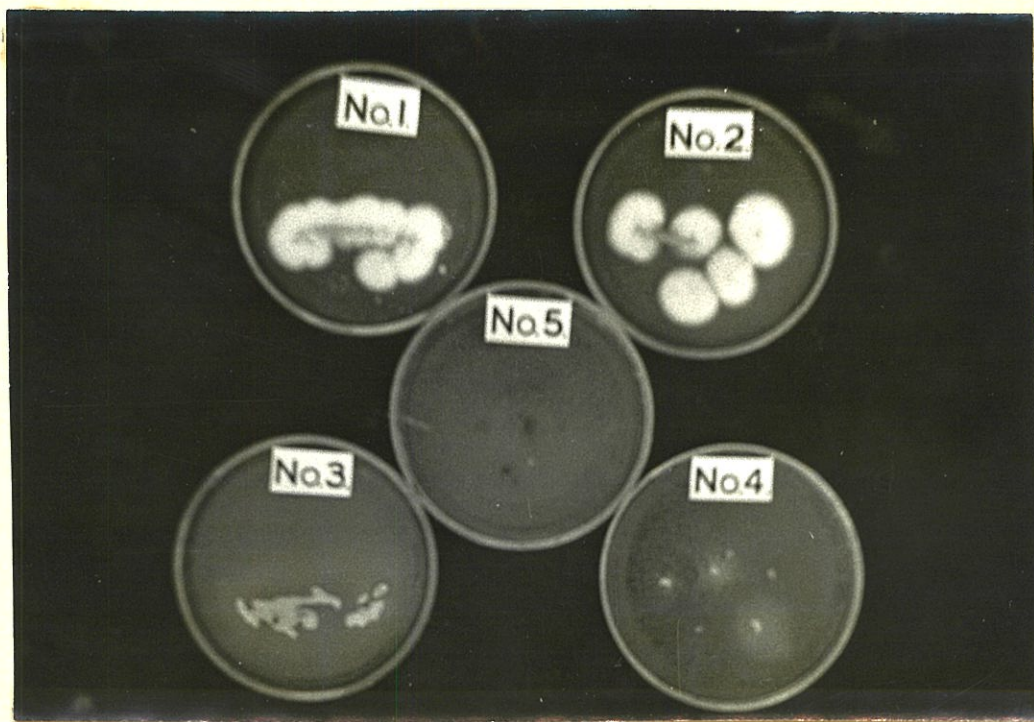
Geen behandeling het steriele saad wat kon ontkiem opgelewer nie. Die doel van hierdie eksperiment, naamlik om die saad steriel te laat ontkiem, is nie bereik nie.

TABEL 39.

DIE UITWERKING VAN VERSKILLENDEN ONTSMETTINGS-

MIDDELS OP DIE NIE-GEWEEKTE ROOIBLOMSAAD.

Ontsmettings- middel	Kons.	Behandel- ingstyd in min.	% Ont- kiem- ing.	Mate v. Sterili- teit: bepaal vol- gens organismes wat nie gedood is nie.
Kwikchloried	0.1%	5	-	Bakt.
Kwikchloried	10 dpm.	30	-	A & Bakt.
Thiulin	100dpm.	5	-	A & Bakt.
Thiulin	200dpm.	5	-	Bakt.
Thiulin	10dpm.	30	2.1	A, C & Bakt.
Agallol	200dpm.	5	3.0	Bakt.
Agallol	300dpm.	5	-	Bakt.
Ceresan	200dpm.	5	26.0	A & Bakt.
Ceresan	400dpm.	5	17	A
Ceresan	600dpm.	5	-	Steriel
Malaxchietgroen	100dpm.	5	-	C & Bakt.
Malaxchietgroen	20dpm.	30	5.0	A & Bakt.
Malaxchietgroen	40dpm.	30	-	A & Bakt.
Silwernitraat	0.5%	5	1.0	Bakt.
Silwernitraat	0.6%	5	-	Steriel
A.C.P. Rose & Floral Dust	1.0	5	-	Bakt.
Alkohol	96%	5	48.0	A, B & Bakt.
Alkohol	96%	10	12.0	A & Bakt.
Alkohol	96%	20	-	A & Bakt.
Pinex	5.0%	5	-	A & Bakt.
Cosan	500dpm.	5	7.0	A, C & Bakt.
Cosan	800dpm.	5	-	A, C & Bakt.
Chloramfenikol	1000dpm.	5	12.5	A, B & Bakt.
Chloramfenikol	1000dpm.	20	-	A & B.
Kontrole			54.0%	



FIGUUR 5: AGARPLATE MET BEHANDELTE ROOIBLOMSAAD.

1. Behandeling: 5 minute met 100 dpm. Thiulin
Kontaminante: Phoma en Bacillus.
 2. Behandeling: 5 minute met 200 dpm. Ceresan
Kontaminante: Phoma en Bacillus.
 3. Behandeling: 5 minute met 200 dpm. Agallol.
Kontaminante: Bacillus
 4. Behandeling: 5 minute met 100 dpm. Malachietgroen.
Kontaminante: Mucor en Bacillus
 5. Behandeling: 5 minute met 0.6 % silwernitraat.
Kontaminante: Geen.
-

HOOFSTUK XI

ONTKIEMING VAN DIE ROOIBLOMSAAD OP

"VERGIFTIGDE" AGARPLATE.

Aangesien daar geen sukses met die sterilisering van die Rooiblomsaad in die vorige eksperiment behaal is nie, is 'n poging aangewend om onbehandelde saad op 'n "vergiftigde" agarmedium te laat ontkiem. Daar is in hierdie eksperiment, benewens die H & S kultuurmedium, ook gebruik gemaak van die kultuurmedium van White (Loomis et al, 1937).

Die agarmedium is in 20 ml. hoeveelhede in groot proefbuise gesteriliseer. Na die sterilisering is elke proefbuis tot handwarmte afgekoel en die bepaalde hoeveelheid van die betrokke ontsmettingsmiddel is asepties daar bygevoeg. Die proefbuis is goed geskud en 'n agarplaat is van elk gegiet. Die konsentrasies van die ontsmettingsmiddels is vasgestel volgens die konsentrasies wat deur die vorige eksperimente as letaal aangewys is. Slegs die ontsmettingsmiddels waarmee nog ontkieming van die Rooiblomsaad in eksperiment 10 waargeneem is, is hier gebruik.

Om die saad met die worteloplossing in aanraking te bring is van ronde filtreerpapierskyfies, met 'n deursnee van 1 duim, gebruik gemaak. Meyer & Anderson (1941) beskryf 'n metode waarvolgens saad op klam filtreerpapier ontkiem kan word. Volgens hierdie outeurs is die metode by uitstek geskik vir die ontkieming van klein saadjies, byvoorbeeld slaaisaad. Die filtreerpapierskyfies is vooraf vir twee uur by 150°C in 'n petribakkie gesteriliseer. Op elke vergiftigde agarplaat is een van hierdie papierskyfies deur middel van 'n steriele pinset geplaas en op elke papierskyfie is 5 ml. steriele worteloplossing gepipetteer. Aangesien die worteloplossing moontlik nie sterilisering in die outoklaaf sou weerstaan nie, is dit met behulp van 'n Seitz asbes-filter gesteriliseer. Op elkeen van hierdie deurweekte papierskyfies is 100-200 onbehandelde, geweekte saad oorgebring en die kulture is by 30°C geïnkubeer. Na drie dae is die ontkiemingspersentasie van die Rooiblomsaad vasgestel en na vyf dae is die plate vir die mate van steriliteit ondersoek.

Voeg in tabelle 40 en 41.

Uit die gegewens in tabel 40 kan die volgende afleidings gemaak word. Die konsentrasies van die swam/

swamdoders, wat volgens eksperiment 8 as doeltreffend beskou is, het alle fungusgroei hier voorkom. Op die H & S agarplate wat swamdoders bevat het, het geen fungi gegroei nie. Slegs die Bacillus is waargeneem. Die bakteriedoders was egter nie so doeltreffend nie aangesien daar by 'n hele aantal gevalle nog kolonies van die bakterie op die vergiftigde plate voorgekom het. 'n Inhibisiesone met 'n deursnee van net meer as 17 m.m. (sien eksperiment 9) is hiervolgens dus nie altyd 'n betroubare aanduiding dat die betrokke bakteriedoder, by daardie konsentrasie, geskik is om die groei van die bakterie te voorkom nie. In 'n paar gevalle byvoorbeeld met Pinex en 8-naphthol plus Teepol, het die bakteriedoders egter algehele steriliteit van die agarplate met saad opgelewer. Fungi het vryelik voorgekom op die plate met die antibiotika asook die met malanchietgroen. Slegs chloramfenikol, by 'n konsentrasie van 1000 dpm., kan die groei van die Bacillus inhibeer.

Die Rooibloomsaad het in hierdie eksperiment 'n baie lae ontkiemingspersentasie getoon met die hoogste, naamlik 8.5% op Agallol, aansienlik laer as die van die kontrole waar dit 28.5% was. Ontkieming van die saad is slegs op vier reekse van die "vergiftigde" mediums waargeneem naamlik op Agallol, Agallol en malanchietgroen, tetrasiklien en chloramfenikol. By die laasgenoemde drie gevalle was die plate egter ook nie steriel nie. Slegs in die geval van Agallol, en wel by 'n konsentrasie van 40 dpm., is ontkieming waargeneem op plate waarop geen mikroörganismes voorgekom het nie.

Op die medium van White (tabel 41) is soortgelyke waarnemings gedoen. Slegs geringe verskille in steriliteit en ontkiemingspersentasie is waargeneem op die twee mediums. Daar was byvoorbeeld geen ontkieming op die chloramfenikol-plate nie, terwyl die ontkiemingspersentasie van die saad op die Agallol plate hoër was as op die H & S-Agallol plate.

Aangesien hierdie reeks eksperimente die moontlikheid van 'n suksesvolle aseptiese ontkiemingsmetode ingehou het, het ek dit in die volgende reeks verder ondersoek met die verwagting om die metode moontlik so té kan standardiseer dat dit vir toekomstige werk van hierdie aard as roetine-metode gebruik kan word. Hiermee sou dan die doel van hierdie hele ondersoek ook verwesenlik wees.

TABEL 40.

DIE ONTKIEMING VAN ROOIBLOMSAAD OP H & S
AGARMEDIUM MET VERSKILLENDE KONSENTRASIES VAN
ONTSMETTINGSMIDDELS.

No.	Ontsmettingsmiddel	Kons.	Pers.ontk.	Mate van Steriliteit.
1	Thiulin	20dpm.	-	Bakt.
2	Trigosan slurry	10dpm.	-	Bakt.
3	A.C.P.Rose & Floral Dust	230dpm.	-	Bakt.
4	Malachietgroen	20dpm.	-	A, C & Bakt.
5	Agallol	40dpm.	8.5%	Steriel
6	Pinex	2.0%	-	Steriel
7	~~8~~ naphthol & teepol	3.0 & 2.0%	-	Steriel
8	Mal.groen & ACP Rose & Floral Dust	20 & 230dpm.	-	Bakt.
9	Ceresan	40dpm.	-	Bakt.
10	Trigosan	40dpm.	-	Bakt.
11	Cupravit	750dpm.	-	Steriel
12	Agallol & mal.groen	20 & 10dpm.	13.6%	Bakt.
13	Tetrasiklien	100dpm.	7.0%	A & Bakt.
14	Tetrasiklein	1000dpm.	-	A
15	Streptomisien	1000dpm.	-	A & Bakt.
16	Chloramfenikol	100dpm.	3.5%	A, C, D & Bakt.
17	Chloramfenikol	1000dpm.	-	A & D.
	Kontrole		30.0%	Oorgroei.

TABEL 41:

DIE ONTKIEMING VAN ROOIBLOMSAAD OP WHITE
AGARMEDIUM MET VERSKILLENDE KONSENTRASIES VAN
ONTSMETTINGSMIDDELS.

No	Ontsmettingsmiddel	Kons.	Pers.ontk.	Mate van Steriliteit.
1	Thiulin	20dpm.		Bakt.
2	Trigosan Slurry	10dpm.		Bakt.
3	ACP Rose & Floral Dust	230dpm.		Bakt.
4	Malachietgroen	20dpm.		A, B & Bakt.
5	Agallol	40dpm.	13.0%	Steriel
6	Pinex	2.0%		Steriel
7	~~8~~ naphthol & teepol	3.0 & 2.0%		Steriel
8	Mal.groen & ACP Rose & Floral Dust	20 & 230dpm.		Bakt.
9	Ceresan	40dpm.		Bakt.
10	Trigosan	40dpm.		Bakt.
11	Cupravit	750dpm.		Steriel
12	Agallol & Mal.groen	20 & 10dpm.	10.0%	A & Bakt.
13	Tetrasiklien	100dpm.	5.0%	A & Bakt.
14	Tetrasiklien	1000dpm.	-	A
15	Streptomisien	1000dpm.		A, D & Bakt.
16	Chloramfenikol	100dpm.		A, C & Bakt.
	Kontrole		28.5%	Oorgroei

HOOFSTUK XII

DIE ONTKIEMING EN VERDERE ONTWIKKELING VAN DIE ROOIBLOMSAAD OP AGALLOL-AGARPLATE.

I. ONTKIEMING VAN DIE ROOIBLOMSAAD.

In hierdie eksperiment is verdere aandag aan die Agallol-agarplaatmetode geskenk. Die invloed van verskillende konsentrasies Agallol op die ontkieming sowel as die mate van steriliteit van die Rooiblomsaad wat verkry word, is nagegaan. Hier is weer van die H & S, sowel as die White medium gebruik gemaak. Elke proef het uit drie replikate bestaan waaruit 'n gemiddelde ontkiemingspersentasie vir elke konsentrasie van die swamdoder bereken is. Die metode wat hier gebruik is, is dieselfde as die wat in die vorige eksperiment beskryf is.

Voeg in tabel 42.

Uit die resultate is dit duidelik dat 'n toename in die Agallolkonsentrasie 'n skerp afname van die ontkiemingspersentasie bewerkstellig. Die ontkiemingspersentasie is oor die algemeen hoër op die White medium as op die H & S medium. 'n Geringe aantal van die saadjies het ook nog op White-agarmedium met 50 dpm. Agallol ontkiem. As daar op die mate van steriliteit van die saad gelet word, is dit duidelik dat 'n konsentrasie van 40 dpm. Agallol daartoe instaat is om die groei van al die mikroörganismes te voorkom. By die laer konsentrasies van die swamdoder was die saadontkieming wel hoër, maar mikroörganismes het nog te voorskyn gekom. Die hoëre konsentrasies het saadontkieming tot 'n groot mate voorkom. Dit het dus geblyk dat 40 dpm. die gunstigste konsentrasie vir hierdie doel is.

Vervolgens is nagegaan of die ontkiemingspersentasie konstant bly wanneer 40 dpm. Agallol gebruik word. Van die saad wat op hierdie plate ontkiem het is ook mikroskopies ondersoek teneinde vas te stel of die swamdoders enige sigbare invloed op hul morfologiese kenmerke het.

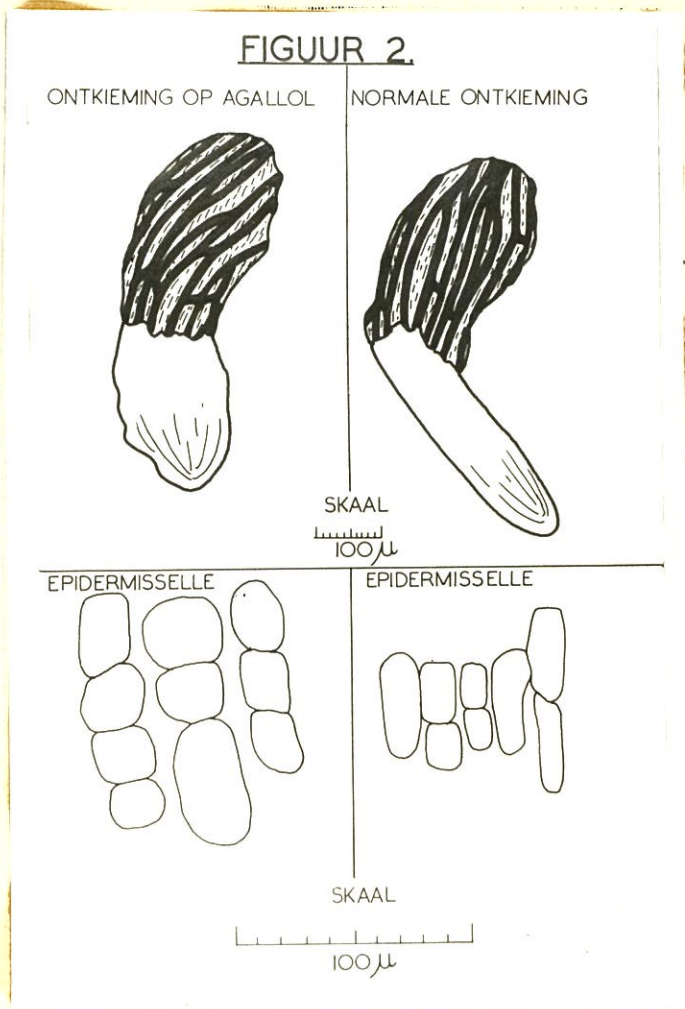
Voeg in tabel 43.

Uit hierdie tabel is dit duidelik dat die ontkiemingspersentasie van die saad op die Agallol-agarplate baie variëer.

Op die H & S-medium is daar tot 13.7% ontkieming by een replikaat waargeneem terwyl die saad van een replikaat glad nie ontkiem het nie. By die White-medium het die ontkiemingspersentasie tussen 3.2% en 16.4% gevarieër. Die gemiddelde ontkiemingspersentasie op die White agar-medium was egter, net soos in die geval van die vorige proewe, hoër as die vandie H & S agarmedium naamlik 9.95% teenoor 8.35%.

Uit hierdie resultate kan die gevolgtrekking gemaak word dat die Agallol-agarplate wel geskik is vir die ontkieming van die Rooiblomsaad onder steriele toestande.

'n Mikroskopiese ondersoek van die saadjies wat op die Agallol-agarplate ontkiem het, het aandig lig gebring dat die swamdoder die een of ander invloed op die morfologie van die gevormde kiemwortel uitoefen (sien figuur 2).



Die ondersoek het baie duidelik die verskil aangetoon wat daar bestaan tussen die Agallol-ontkiemde saad en die saad wat volgens die reedsbeskryfde hangende-druppel-metode (sien eksperiment 10) ontkiem is.

Die kiemwortel van die saadjie wat op Agallol ontkiem het is kort en baie geswolle in vergelyking met die normale een. In figuur 2 is ook 'n aantal epidermisselle van beide die saadjies se kiemwortels voorgestel. Hier is die abnormale toestand net so duidelik sigbaar. Die afsonderlike selle van die epidermis van die kiemwortel wat op Agallol gevorm is, is baie groter as die van die normale kiemwortel. Die Agallol oefen dus die een of ander invloed op die selle uit wat hulle laat uitswel. Ek kon in die literatuur geen verklaring vir hierdie verskynsel vind nie.

II. VERDERE ONTWIKKELING VAN DIE ONTKIEMDE SAAD.

Om vas te stel of die ontkiemde Rooiblomsaad verder kan ontwikkel is daar in twee rigtings ondersoek ingestel. Eerstens is die ontkiemde saad op die Agallol-plate gelaat en van tyd tot tyd ondersoek om vas te stel of daar enige verdere groei plaasvind. Die kiemwortels het uitgegroeï tot 'n lengte van 200-300 μ en nie verder ontwikkel nie. Op die Agallol-agarplate het die Rooiblomsaad dus net ontkiem en nie verder gegroeï nie.

Ek het vervolgens van hierdie ontkiemde saad asepties op Agallol-vrye H & S- sowel as White-agar-plate oorgebring. Daar is baie versigtig tewerk gegaan om die kiemwortels nie te beskadig nie. Hierdie plate, met die ontkiemde saad het in meer as 80% van die gevalle steriel gebly na die oorplasing van die saad. Kontaminasie deur die ontkiemde saad was die uitsondering. Die ontkiemde saad op hierdie plate is vir 'n paar dae lank noukeurig dopgehou teneinde vas te stel of daar enige verdere groei van die kiemwortels plaasgevind het. Geen groei is egter waargeneem nie en die kiemwortels het na 'n tyd verdroog.

TABEL 42:

DIE ONTKIEMING VAN ROOIBLOMSAAD OP H & S EN
WHITE AGARPLATE MET VERSKILLENDEN AGALLOL
KONSENTRASIES.

Agallol kons.	Persentasie ontkieming		Mate v. steriliteit	
	H & S agar	White agar	H & S agar	White agar
10 dpm.	18.5	21.0	A & Bakt	A, B & Bakt.
20 dpm.	14.5	17.0	A	A & Bakt.
30 dpm.	9.0	14.0	A & Bakt	Bakt.
40 dpm.	7.9	11.5	Steriel	Steriel
50 dpm.	-	2.0	Steriel	Steriel
60 dpm.	-	-	Steriel	Steriel.

TABEL 43:

DIE ONTKIEMING VAN ROOIBLOMSAAD OP H & S EN
WHITE AGARPLATE MET 40 D.P.M. AGALLOL.

Replikate	Ontkiemingspersentasie	
	H & S agar	White agar.
1	8.3	11.3
2	12.5	16.4
3	6.8	12.8
4	0	4.2
5	5.7	10.5
6	12.3	7.6
7	5.5	15.0
8	8.4	3.2
9	13.7	6.5
10	10.3	12.0
Gem.	8.35	9.95

HOOFSTUK XIII

BESPREKING.

Die doel van die ondersoek was om 'n metode te probeer vind waarvolgens Rooiblomsaad bevry kan word van die mikroörganismes wat daaraan kleef en dit by ontkieming aantast. Uit die ondersoek het baie duidelik geblyk dat sekere mikroörganismes besonder konstant op die saad voorkom en dat dieselfde soorte gereeld kontaminasie veroorsaak as die saad op 'n kultuurmedium oorgebring word. Hierdie mikroörganismes het in rein-kultuur nie 'n baie groot weerstand teen die ontsmettingsmiddels, wat aangewend is, gehad nie. Die swamdoders wat gebruik is, kon die groei van die fungi by redelike lae konsentrasies inhibeer, soos wat eksperiment 8 duidelik aangetoon het. 'n Ongeïdentifiseerde Bacillus sp. is ook maklik deur die verskillende bakteriedoders vernietig (Eksperiment 9). In assosiasie met die saad het hierdie organismes egter 'n verrassende hoë weerstand teen die ontsmettingsmiddels geopenbaar. Slegs die mees drastiese behandelings het steriele saad tot gevolg gehad. Dit laat die vermoede ontstaan dat hierdie mikroörganismes op die een of ander manier baie doeltreffend op of in die saad beskerm word. Die saadhuid van hierdie saad is, soos reeds in die inleiding genoem, baie ru met diep oorlangse gleuwe. Spore mag in hierdie gleuwe voorkom en sodoende teen die ontsmettingsmiddels beskerm word. In so 'n geval sou die aanwending van sekere oppervlakaktiewe stowwe, soos seepoplossings en alkohol, vermoedelik die spore makliker bereikbaar maak vir die ontsmettingsmiddels. Dit was egter nie altyd die geval nie, soos duidelik uit eksperiment 10 geblyk het. Hierdeur word die vermoede versterk dat die spore moontlik dieper in die

saad aanwesig mag wees. Indien dit so is bied dit 'n verklaring vir hul groot weerstand teen die ontsmettingsmiddels. Hofer (1938) het, byvoorbeeld, gevind dat ontsmettingsmiddels baie selde in genoegsame hoeveelhede deur die saadhuid dring om spore binne in die saad te dood.

As dit die geval is, naamlik dat ontsmettingsmiddels nie in groot konsentrasies deur die saadhuid dring nie, is dit moeilik om te verklaar waarom die ontkieming van die Rooiblomsaad so drasties deur hierdie stowwe beïnvloed word. Dat die Rooiblomsaad egter uiters sensitief teenoor sekere chemikalieë is ly geen twyfel nie. Selfs die antibiotika, wat normaalweg ⁿgeringe toksiese uitwerking op hoër plante het, het 'n baie nadelige invloed op die ontkieming van die saad uitgeoefen. Antibiotika in konsentrasies van 1000 dpm. en meer het alle ontkieming voorkom (sien eksperiment 10). Dit is dus moontlik dat die ontsmettingsmiddels wat wel deur die saadhuid gedring het, en nie gekonsentreerd genoeg was om die spore te dood nie, genoeg was om die ontkieming van die saad te voorkom. Daar is dus tydens hierdie ondersoek nie daarin geslaag om die saad deur die aanwending van ontsmettingsmiddels direk op die saad op so 'n manier uitwendig te steriliseer dat die saad nog kiemkrachtig gebly het nie.

Die pogings wat in hierdie ondersoek aangewend is om die onbehandelde saad op "vergiftigde" mediums te laat ontkiem, was egter meer suksesvol. Weliswaar is geen hoë ontkiemingspersentasies waargeneem nie, maar die resultate wat met Agallol verkry is, het aangedui dat daar tog 'n moontlikheid bestaan dat die Rooiblomplante wel asepties gekultiveer sal kan word.

Alhoewel die kiemwortels van die saad wat op Agallol ontkiem het, morfologiese afwykings vertoon het enp_ok nie verder gegroei het nie, selfs al was dit op

Agallol-vrye mediums oorgeplaas, moet mynsinsiens nie soseer aan die nadelige invloed van die swamdoder op die saad toegeskryf word nie, maar eerder aan sekere gebreke in die medium. Daar moet in gedagte gehou word dat die Rooibloom 'n parasiet is, en dat dit baie spesifiek is wat sy parasitisme betref. Dit val naamlik net lede van die Gramineae aan. Selfs plante wat daartoe instaat is om deur hul worteluitskeidings die Rooibloomsaad tot ontkieming te stimuleer, word nie altyd deur die parasiet aangeval nie. Voorbeelde van sulke plante is die kafferboon en die sonneblom. Die gasheergewas voorsien dus blykbaar meer as net anorganiese voedingstowwe en water aan die parasiet. Die vermoë van die parasiet om op 'n plant te parasiteer berus blykbaar op die beskikbaarheid van sekere groeistowwe wat in die gasheerplant aanwesig is. 'n Medium wat nie van hierdie groeistowwe voorsien is nie sal nie daartoe instaat wees om die groei van die Rooibloom te onderhou nie. Mynsinsiens is dit dan ook die waarskynlike afwesigheid van hierdie onbekende stowwe in die White- en die H & S-mediums wat daartoe aanleiding gegee het dat die saad nie verder daarop ontwikkel het nie.

Dit is wenslik dat daar in die toekoms verder op hierdie aspek van die probleem ingegaan sal word.

HOOFSTUK XIV

OPSOMMING.

1. Van die saad van Striga lutea Lour. (Rooibloom) is 5 fungi en 1 bakterie geïsoleer. Hierdie mikroörganismes het gereeld verontreiniging van die voedingsmedia waarop die saad gebring is veroorsaak.
2. Die groei van die belangrikste saadklewende fungi, naamlik Phoma sp., Aspergillus niger en Mucor hiemalis, op die Hoagland en Snyder medium en soos beïnvloed deur die koolstofbron, vitamiengehalte en inkubasietemperatuur is nagegaan ten einde die optimale groeiomstandighede te bepaal. Die invloed van verskillende swamdoders op die genoemde fungi is by hierdie optimale toestande nagegaan.
3. Die optimale groeitoestande van die bakterie, 'n ongeïdentifiseerde Bacillus sp., is ook bepaal en die invloed van verskillende bakteriedoders op die bakterie is nagegaan.
4. Die swamdoders en bakteriedoders wat op grond van die voorafgaande proewe as doeltreffend beskou is, is gebruik om die geweekte sowel as ongeweekte Rooibloomsaad mee te steriliseer. Die steriliseringsproses het die saad egter sodanig beïnvloed dat geen ontkieming daarna plaasgevind het nie.
5. Onbehandelde Rooiblomsaad is op agarplate waarby sekere hoeveelhede van verskillende ontsmettingsmiddelsgevoeg is, geplaas en pogings is aangewend om die saad op hierdie "vergiftigde" agar onder aseptiese omstandighede te laat ontkiem. Met hierdie reeks proewe is vasgestel dat die saad op agar met 40dpm. Agallol (4.5 % metoksie-etielkwikchloried) ontkiem het en terselfdertyd steriel was. Die saad het egter nie verder as die ontkiemingsstadium ontwikkel nie, waarskynlik a.g.v. die tekort aan sekere groeistowwe in die media wat gebruik is (sien bespreking op bladsy 97).

HOOFSTUK XV

SUMMARY

1. Five fungi and one bacterium were isolated from the seeds of Striga lutea Lour. (Witchweed). These micro-organisms appeared regularly on agar media on which these seeds were placed.
 2. The growth of the three main seedborne fungi, viz Phoma sp., Aspergillus niger and Mucor hiemalis, on the Hoagland and Snyder medium and the influence of the source of carbon, the vitamin quality and the temperature of incubation were investigated in order to determine their optimal growth conditions. The influence of different fungicides on these fungi were examined at these optimal conditions.
 3. The optimal growth conditions of the bacterium, an unidentified Bacillus strain were also determined and the influence of different bactericides were examined.
 4. The effective fungicides and bactericides were used to sterilize soaked as well as unsoaked Witchweed seeds. These disinfectants, however, had such an influence on the seeds that no germination took place after the treatment.
 5. Untreated Witchweed seeds were placed on agar into which certain amounts of different disinfectants were incorporated, and attempts were made to germinate the seeds on this "poisoned" agar under aseptic conditions. Sterile germination took place on agar which was supplied with 40 ppm. Agallol (4.5 % methoxy ethyl mercury chloride). The seeds did not, however, develop ^e beyond the germination stage. As discussed on page 97 this might be due to the lack of certain growth substances in the media that were used.
-

HOOFTUK XVI

BIBLIOGRAFIE.

(Die publikasies met 'n X gemerk is nie in die oorspronklike vorm geraadpleeg nie).

1. Allen, O.N., 1953:
Experiments in soil bacteriology
(Burgers Publishing Co. Minnesota.).
2. Amer. Phyt. Soc., 1943:
Standard laboratory bordeaux mixture
(Phytopath. 33:633).
3. Ames, A., 1915:
The temperature relations of some fungi causing
storage rots (Phytopath. 5: 11-19)
4. Andus, L.J., nie gepubliseer, sien Hewitt, 1952.
5. Barker, H.A. & T.C. Broyer, 1942:
Notes on the influence of microorganisms on
growth of squash plants in water culture with
special reference to manganese nutrition (Soil
Sci. 53: 467).
- 6.^x Beran, F.A., A. Janke & G. Schmidt, 1954:
Phytot.-Phytopham. 1954 (special issue) 543-547
(Chem. Abs. 50: 13353, 1956).
7. Bonner, J.T.A., 1948:
A study of the temperature and humidity require-
ments of Aspergillus niger (Mycologia 40: 728-738).
8. Botha, P.J., 1950:
The germination of the seeds of angiospermous
root-parasites, I. The nature of the changes
occurring during pre-exposure of the seeds of
Alectra vogelii Benth. (Ibid., 17: 59-72).
9. Botha, P.J., 1958:
Die saadontkieming en bestryding van die Rooi-
blom (Striga lutea Lour.) (Koers XXVI).
10. Brannon, J.M., 1923:
Influence of glucose and fructose on growth
of fungi (Bot. Gaz. LXXVI: 257-273).
11. Braun, H. 1920:
Presoak method of seed treatment: A means of
preventing seed injury due to chemical disin-
fectants and of increasing germicidal effi-
ciency (Journ. Agric. Res. 19: 363-392).

12. Breed, Robert S., E.G.D.Murray & N.R.Smith, 1957:
Bergey's manual of Determinative Bacteriology
(Williams & Wilkins Co., Baltimore).
13. Brian, P.W., 1957:
Effects of antibiotics on plants (Ann.Rev. of
Plant Phys. 8: 413-426).
14. Brooks, F.T. & C.G. Hansford, 1923:
Mould growth upon cold-store meat (T.B.M.S.
VIII : 113 - 141).
- 15.^x Brown, W., 1923:
Experiments on the growth of fungi on culture
media (Ibid. 37 : 105 - 29).
- 16.^x Burkholder, P.R. & I. McVeigh, 1940.
(Amer. J. Botany 27: 634 - 640).
- 17.^x Churchman, J.W., 1912:
The selective bactericidal action of gentian
violet (J. Exp. Med. 16: 221)
18. Cochrane, Vincent W., 1958:
Physiology of Fungi (Chapman & Hall Ltd., London).
19. Crocker, Wm. & L.V. Barton, 1953:
Physiology of seeds (Chron. Bot. Co., Waltham).
20. Dekker, J., 1957:
Internal seed disinfection of peas infected
by Ascochyta pisi by means of the antibiotics
rimocidin and pimarinic, and some aspects of
the parasitism of this fungus (Lab. Phytopath.,
Univ. Wageningen)(Biol. Abs., 32: 3, 10379).
21. Engler, A. & K. Prantl, 1897:
Die natürlichen Pflanzenfamilien, Teil I (Wilhelm
Engelman, Leipzig).
22. Falck, R., 1907:
Wachstumsgesetze, Wachstumsfaktoren und Temperatur-
werte der holzzerstörenden Mycelien (Haussch-
wammforschungen I: 53-154, Jena). Abs. in
Centr. Bakt. Parasit. und Infec. 20: 348, 1908.
23. Forster, J.W., 1949:
Chemical activities of fungi (Acad. Press Inc.
New York).
24. Fries, N., 1948:
The nutrition of fungi from the aspect of growth
requirements (T.B.M.S.30: 118-134).
25. Frobisher, M., 1950:
Fundamentals of Bacteriology (W.B. Saunders Co.,
London).

26. Gilman, Joseph G., 1945:
A manual of soil Fungi (The Collegiate Press, Inc., Iowa).
27. Gottlieb, D., 1945:
A comparison of agarplate and test-tube-dilution methods for the preliminary evaluation of fungicides (Phytopath., 35: 485).
28. Hawker, L.E., 1947:
Effects of temperature of storage on the rate of loss of fertility of stock cultures of Melanospora destruens (Nature CLIX: 136).
29. Hawker, L.E., 1950:
Physiology of Fungi (University of London Press Ltd.).
30. Hawker, L.E. & S.D. Chaudhuri, 1946:
Growth and fruiting of certain Ascomycetes fungi as influenced by the nature and concentration of carbohydrate in the medium (Ann. Bot., N.S. 10 (38) : 155 - 194).
31. Hewitt, E.J., 1952:
Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition (Commonwealth Agric. Bureaux, Bucks, England).
32. Hofer, A.W. & H.C. Hamilton, 1937:
Seed sterilization (Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 2: 253 - 254).
33. Hofer, A.W. & H.C. Hamilton, 1938:
Further studies on seed sterilization (Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 3: 167 - 168).
- 34.^x Hopkins, E.W., P.W. Wilson & E.B. Fred, 1931:
A method for the growth of leguminous plants under bacteriologically controlled conditions (J. Amer. Soc. Agron. 23: 32).
35. Horsfall, James G., 1945:
Quantitative bioassay of fungicides in the laboratory (Bot. Rev. 11: 357).
36. Horsfall, James G., 1956:
Principles of fungicidal action (Waltham, Mass.).
37. Horsfall, J.G. & A.E. Dimond, 1951:
Plant chemotherapy (Ann. Rev. of Microbiol. 5: 209 - 222).
38. Horsfall, James G. & G.A. Zentmyer, 1944 :
(Phyt. 34 : 1004).

39. Klebs, G., 1966³⁶:
Zur Physiologie der Forflanzung einiger Pilze
III Allegemeine Betrachtungen(Jahrb.wiss. Botan.
35 : 80 - 203).
40. La Touche, C.J., 1948:
A chaetomium-like thermophilic fungus on fer-
menting straw (Nature CLXI: 320).
41. Leukel, R.W., 1926³:
The present status of seed treatment with special
reference to cerials (Bot. Rev. 2: 498 - 527).
42. Leukel, R.W., 1948:
Recent development in seed treatment (Bot.Rev.14:
235).
43. Lilly V.G. & H.L. Barnett, 1951:
Physiology of Fungi (McGraw Hill Book Co.,New York).
44. Lindgren, R.M. & Harvey, M.H., 1952:
(J.Forest Products Res. Soc. 2: 1 - 7).
45. Loo, Y.H., P.S. Skell, H.H. Thornberry, J. Ehrlich,
J.M.McGuire, G.M.Savage & J.C. Sylvester, 1945:
Assay of streptomycine by the paper disc plate
method (Journ. Bact. 50: 701 - 709).
46. Loomis, Walter E. & Charles A. Shull, 1937:
Methods in Plant Physiology (McGraw-Hill Book
Co., New York).
- 47.^x Margolin, A.S. 1942:
Thesis, West Virginia University. (Sien Lilly &
Barnett, 1951).
- 48.^x McCulloch, E.C., 1940:
The efficiency of soaps and other disinfectants
in destroying mastitis streptococci (Amer. J,
Public Health 38: 493).
49. Merck Index of chemicals and drugs, The, 1952
(Merck & Co., U.S.A.).
50. Meyer, B.S. & D. B. Anderson, 1941:
Laboratory Plant Physiology (D. von Nostrand
Co., New York).
51. Muller, Walter H., 1956:
Influence of temperature on growth and sporulation
of certain fungi (Bot. Gaz. 117: 336 - 343).
52. Muskett, A.E. & J. Colhoun, 1940:
Prevention of seedling blight in the flax crop
(Nature 146: 32).

- 53.^x Neergaard, P., 1940:
Seedborne fungous diseases of horticultural plants (Proc. Internat. Seed Test. Ass. 12:47-71).
54. Orton, C.R., 1931:
Seed borne parasites. A bibliography (West Virginia Agric. Exp. Sta. Bull. 245: 1 - 77).
55. Oudemans, C.A.J.A., 1923:
Enumeratio Systematica Fungorum. Vol iv (Hagae comitum, Apud Martinum Nyhoff).
56. Pelczar, M.J. & R.D. Reid, 1958:
Microbiology (McGraw Hill Book Co., New York).
57. Reichel, H., 1909:
Zur Theorie der Desinfection: die Desinfectionswirkung des Phenol (Biochem. Z. 22: 149)
58. Richards, F.J. & W.G. Templeman, 1936:
Physiological studies in plant nutrition. IV. Nitrogen metabolism in relation to nutrient deficiency and age in leaves of barley (Ann. Bot. Lond. 50: 367).
59. Robbins, W.J. & V. Kavanagh, 1942:
Vitamin deficiencies of the filamentous fungi (Bot. Rev. 8:411 - 471).
60. Salle, A.J., 1939:
Fundamental Principles of Bacteriology (McGraw Hill Book Co., New York).
61. Schopfer, W.H., 1943:
Plants and Vitamins (Chronica Botanica, Waltham).
- 62.^x Smith, C.R., 1947:
Alcohol as a disinfectant against the tubercle bacillus (Pub. Health Reports 62: 1285).
63. Smith, G., 1954:
An introduction to industrial mycology. (Edward Arnold Ltd., London).
64. Steinberg, R.A., 1939:
Growth of fungi in synthetic nutrient solutions (Bot. Rev. 5: 327 - 350).
65. Steinberg, R.A., 1947:
Growth responses to organic compounds by tobacco seedlings in aseptic culture (J. Agric. Res. 75:81).

66. Steinberg, R.A., 1950:
Growth of fungi in synthetic nutrient solutions
(Bot. Rev. 16: 208-228).
67. Stephenson, R.B., 1942:
Sterilization technique for grass seeds
(Plant Phys. 17: 324)
68. Stevens, E.L., 1912:
The structure and development of the houstoriums
of Striga lutea (Ann. Bot. 26: 1067 & 1125).
- 69.^x Tamiya, H., 1932:
Über die Verwendbarkeit van vershiedenen
Kohlenstoffverbindungen im Bau-und Betriet-
stoffwechsel der schimmelpilze. Studien über
die Stoffwechselphysiologie van Aspergillus
oryzae. iv. (Acta. Phytochim. vi: 1 - 129).
70. Thom, C. & K.B. Raper, 1945:
A manual of the Aspergilli (The Williams &
Wilkins Co., Baltimore).
71. Thornberry, H.H., 1950:
A paper-disk plate method for the quantative
evaluation of fungicides and bactericides
(Phytopath. 40: 419 - 429).
72. Tobie, W.C. & G.B. Ayres, 1944:
Lack of correlation between plate tests and
phenol coeffisient determinations on germicides
and antiseptics (J. Bact. 47: 109).
73. Tschudy, R.H., 1937:
Experimental morphology of some species of
Chaetomium under various conditions of culti-
vation (Amer. Journ. Bot. XXIV: 657 - 65).
74. Valko, E.I. & A.S. Du Bois, 1944:
The antibacterial action of surface cations
(J.Bact. 47: 15).
75. van Beverwijk, Mej. A.L.,
Centraalbureau voor schimmelcultures, Javalaan 20,
Baarn, Nederland (Persoonlike mededeling).
76. Vincent, J.M., 1947:
The esters of 4 - hydroxybenzoic acid and
related compounds, Part 7.
Methods for the study of their fungistatic
properties (Journ. Soc. Chem. Ind., London 60:
149 - 155).
77. Waksman, Selman A., 1947:
Microbial Antagonisms and Antibiotic substances
(The Commonwealth Fund, New York).

78. Walker, J.C., 1948:

Vegetable seed treatment.
(Bot. Rev. 14: 588.

79. Wolf, F.A. & F.T. Wolf, 1949:

The Fungi Volume II.
(John Wiley & Sons, London).

80. Wilson, J.K., 1915:

Calcium hypochlorite as a seed sterilizer.
(Amer. J. Bot. 2: 420).
