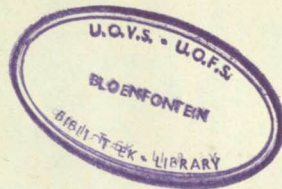


1110508712 02 220000010

i.



'N FISILOGIESE ONDERSOEK OOR DIE

VOEDINGSVEREISTES VAN 'N BODEMFUNGUS, SCOPULARIOPSIS, SP.

HIERDIE EKSEMPLAAR MAG ONDER  
GEEN OMSTANDIGHED E UIT DIE  
BIBLIOTEEK VERWYDER WORD NIE

UOVS - SASOL-BIBLIOTEEK



11105087120222000010

'n Fisiologiese ondersoek oor die voedingsvereistes  
van 'n bodemfungus, Scopulariopsis sp.

deur

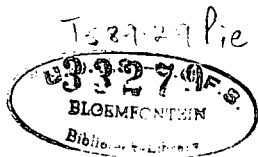
WILLEM GEORGE PIHK, B.Sc.

Verhandeling voorgelê ter vervulling van 'n deel van die  
vereistes vir die graad Magister Scientiae, aan die  
Universiteit van die Oranje-Vrystaat.

1952

Universiteit van die Oranje-Vrystaat,  
BLOEMFONTEIN  
1952.

MEERDE EKSEMPLAAR MAG ONDER  
GEEN OMSTANDIGHEDEN UIT DIE  
BIBLIOTEEK VERWYDER WORD NIE



iii.

Ek verklaar hiermee dat die verhandeling  
wat hierby vir die graad van Magister Scientiae  
aan die Universiteit van die Oranje-Vrystaat deur  
my ingedien word, my eie werk is en nie eerder  
deur my vir 'n graad aan enige ander universiteit  
ingedien is nie.

INHOUDBladsy

VOORWOORD

HOOFSTUK I. Inleiding ... 2 ... 2

HOOFSTUK II. Historiese en Literatuur oorsig ... 4

HOOFSTUK III. Materiaal ... 15

HOOFSTUK IV. Metode ... 26

HOOFSTUK V. Eksperimentele werk ... 30

HOOFSTUK VI. Bespreking ... 63

HOOFSTUK VII. Opsomming ... 71

HOOFSTUK VIII. Bibliografie ... 74

VOORWOORD

Graag wens ek hiermee vir Prof. Dr. W.J. Lütjeharms, Hoof van die Plantkunde Afdeling, U.O.V.S., baie hartlik te bedank vir die waardevolle leiding en raad wat ek van hom ontvang het in die daarstelling van hierdie verhandeling. In besonder waardeer ek ook sy persoonlike belangstelling en aanmoediging waarop ek altyd staat kon maak.

Aan die ander lede van die Plantkunde Afdeling wil ek ook my dank uitspreek vir hulle belangstelling en morele ondersteuning.

HOOFSTUK IINLEIDING

Die fungus waarvan gepoog is om die groei-vereistes vas te stel en wat in hierdie ondersoek gebruik is, is oorspronklik geïsoleer deur Prof. Dr. W.J. Lütjeharms in November 1949 uit grond wat tussen Olifantsgras op die Rietvlei-proefplaas te Pretoria afkomstig is. Kolonies daarvan is aangetref op ureum-agar plate wat gebruik word vir die kwantitatiewe bepaling van die ureumbakterië in die grond. Dit is egter nie op die Rose-Bengal-agar plate, wat vir die bepaling van die aantal fungi in die grond gebruik word, aangetref nie.

Pogings om hierdie fungus verder te isoleer en in rein-kultuur te bring was onsuksesvol aangesien dit nie op enige van die gebruikelike fungus-media t.w. Czapek, Mout- en Pruim-agar wou groei nie. Die enigste medium waarop daar enige tekens van ontwikkeling was, was aartappel-dekstrose-agar (P.D.A.), alhoewel dit baie stadig hierop gegroei het. Spore van die fungus is vervolgens geënt op 'n medium wat gewoonlik gebruik word vir die kweek van bakterië, nl. bouillon-agar (N.A.). Op hierdie medium het die fungus wel ontwikkel en taamlik goed gegroei, veral op die plekke waarop die oorentings gedoen is, alhoewel dit nie soos ander fungi oor die hele oppervlakte van die agar gesprei het nie.

Aangesien N.A. bestaan uit natuurlike en komplekse ekstrakte soos pepton en vleisekstrak het ons tot die gevolgtrekking gekom dat hierdie fungus taamlik hoë eise aan die omgewing stel om te kan groei. Dit word nog meer duidelik as in aanmerking geneem word dat dit nie op 'n sintetiese medium soos Czapek-agar groei nie en ook nie op media wat uit die natuurlike ekstrakte van pruim en mout bestaan nie.

/ Indien.....

Indien hierdie fungus wel sulke hoë eise aan die omgewing sou stel, is dit merkwaardig dat dit wel in die grond voorkom.

Die doel van hierdie ondersoek was dus hoofsaaklik daarop ingerig om te probeer vasstel wat die voedingsvereistes van hierdie fungus is, en of 'n sintetiese medium saamgestel kan word waarop die ras so goed sou groei as op die N.A.



## HOOFSTUK II

### HISTORIESE- EN LITERATUUROORSIG

Die onvermoë van sekere fungi om op sintetiese of ander eenvoudige media te groei, is reeds lankal bekend en kan toegeskryf word aan verskillende oorsake. Die belangrikste van hierdie oorsake is die vereiste vir spesiale C- of N-bronne, die afwesigheid van sekere spoorelemente, 'n ongunstige pH of die aanwesigheid van giftige stowwe. Reeds in 1860 het Pasteur al waargeneem dat die groei van 'n gis op 'n sintetiese medium sterk bevorder word deur die toevoeging van onbekende organiese stowwe wat aanwesig is in sekere natuurlike produkte. Baie mikoloë was bewus van die feit dat sekere fungi slegs groei indien ekstrakte van natuurlike produkte by die media gevoeg word. Vandag weet ons dat die gunstige werking om hierdie ekstrakte toegeskryf kan word aan die verskeidenheid vitamien en ander groei-faktore wat dit bevat. Namate die bestanddele van sintetiese media meer en meer gesuiwer is, is gevind dat 'n groter aantal fungi nie daarop groei nie. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat hierdie faktore, wat slegs in klein hoeveelhede nodig is, aanwesig was in die chemikalie en deur die groter suiwering verwyder is.

Stokes en medewerkers (79) het onder andere aangetoon dat die mikrobiologiese media wat bestanddele soos gisekstrak, vleisekstrak, pepton, trypton, moutekstrak, ens., bevat, in genoegsame mate voorsien is van ten minste die volgende vitamien:- thiamien, biotien, riboflavin, pantotheensuur, nikotiensuur, biotien, pyridoxien, foliensuur en paraaminobenzoësuur (P.A.B.A.). Daar is egter nog sommige fungi, soos die obligate parasiete, wat nog nie in kultuur gekweek is nie, en waarvan die voedingsvereistes dus nog onbekend is.

/Ongetwyfeld.....

Ongetwyfeld word die voedingsvereistes van die fungi meer gekompliseerd namate hulle meer gespesialiseer is of parasities word.

Die klassieke kontroverse tussen Pasteur en Liebig en die verklaring van hierdie verskil deur Wildiers in 1901, het die begin van die studie van groeifaktore ingelei. Wildiers het naamlik aangetoon dat die verskil in grootte van die inoculum wat die twee ondersoekers gebruik het, die oorsaak van die kontroverse was. Deurdat Pasteur blykbaar 'n taamlike groot massa as inoculum gebruik het, het hy sekere onbekende stowwe oorgedra in die nuwe medium en dus groei van die gis verkry. Liebig daarenteen het vermoedelik 'n klein hoeveelheid as inoculum gebruik en dus nie genoeg van die onbekende stowwe oorgedra om groei te verkry nie. Wildiers het hierdie eenaardige onbekende stof „bios" genoem.

#### VITAMIENE

Schopfer (1934) was egter die eerste ondersoeker wat definitief die belangrikheid van vitamien vir fungi aangetoon het. Hy was naamlik getref deur die feit dat *Phycomyces blakesleeanus* op media gemaak van sekere monsters van maltose gegroei het, maar nie op media gemaak van ander monsters nie. Hy het toe vasgestel dat die maltose waarop *Phycomyces* wel gegroei het met thiamien verontreinig was, en dat dit die thiamin is wat verantwoordelik is vir die groei van die fungus.

Wildiers se „bios" is chemies verder ondersoek en gefraksioneer. Daar is gevind dat dit benewens 'n groot verskeidenheid van vitamien, veral van die B-groep, ook nog ander groei-bevorderende stowwe asook aminosure bevat.

Literatuur oor die vitamien-vereistes van fungi het daarna vinnig toegeneem, sodat daar op die oomblik 'n groot massa publikasies beskikbaar is oor fungi en die vitamien wat hulle nodig het om te groei. Steinberg (75), Robbins en Kavanagh (63), Schopfer (71), Fries (30), Steinberg (77), en Hawker (40) het oorsigte gegee oor die groeifaktor-vereistes van fungi.

As 'n mens die talryke voorbeelde van fungi wat een of meer vitamienes of ander groeifaktore nodig het in hierdie oorsigte bestudeer, word dit duidelik dat vitamiengebrek 'n algemene verskynsel onder fungi is. Vitamienes waaraan daar meestal 'n gebrek in media aan is, is thiamien, biotien en pyridoxien, terwyl inositol, nikotiensuur en pantotheensuur deur 'n kleiner aantal fungi benodig word. Vir vitamien A, D, E, K, B<sub>12</sub>, riboflavin, askorbiensuur, foliensuur en cholien is nog nie aangetoon dat hulle absoluut onontbeerlik vir fungi is nie (77), alhoewel sommige fungi beter mag groei by aanwesigheid van hierdie stowwe, soos b.v. *Aspergillus niger* en *Saccharomyces cerevisiae* t.o.v. askorbiensuur (40 en 71). Du Vigneaud (23) het gevind dat biotien vervang kan word deur pimeliesesuur vir *Corynebacterium diphtheriae*, en voorgestel dat dit moontlik gebruik word vir die vorming van biotien. Robbins en Ma (64) egter het 13 fungi getoets en gevind dat virgeen-  
een van hulle biotien vervang kan word deur pimeliesesuur nie.

#### ONBEKENDE FAKTORE

Alhoewel daar dus nou soveel as moontlik van hierdie vitamienes by sintetiese media gevoeg word, is daar egter nog heelwat onbekende faktore in stowwe soos pepton, gisekstrak en vitamien-vrye kasein hidrolisaat wat groeibevorderend op sommige organismes werk en dus die insluiting van sulke natuurlike stowwe in media noodsaaklik maak. Farries en Bell (26) het b.v. gevind dat *Nematospora gossypii* nie groei in 'n medium waarvan die N-bron asparagien is nie, maar wel met pepton. Goeie groei vind ook plaas as die pepton gehidroliseer word tot  
aminosure, wat so na moontlik ooreenstem met die gehidroliseerde produkte van die pepton. Buston en medewerkers (12) het later aangetoon dat inositol 'n groeifaktor vir *N. gossypii* is, maar dat dit ook nog 'n tweede onbekende faktor („second accessory factor”) nodig het. Steinberg (75) het gevind dat in 'n optimale oplossing vir *Aspergillus niger* die glukose gedeeltelik vervang / kan.....

kan word deur 'n kleiner hoeveelheid gisekstrak, sonder om die opbrengs te verminder, terwyl die groeisnelheid verdubbel word. Hy skryf dit toe aan die N-verbindings wat die gisekstrak bevat en wat dus nie eers deur die *Aspergillus* gesintetiseer hoef te word nie.

Robbins en Kavanagh (63) maak melding van die feit dat *Pericystis apis* nie groei in 'n basale medium wat asparagien en ses verskillende vitamienne bevat nie. Groei vind wel plaas wanneer gisekstrak by die medium gevoeg word.

Burkholder en Moyer (11) vind weer dat *Candida albicans* en *Mycoderma vini* nie groei op 'n medium wat ses vitamienne bevat nie maar wel as 'n ekstrak van lewer bygevoeg word.

Veral wat bakterieë betref, is daar baie aanduidings van sulke nog onbekende faktore. Gould (33) vind dat vir *Neisseria gonorrhoeae* die kaseinhidrolisaat gedeeltelik vervang kan word deur glutathione, glutamiensuur en histidien. Die kaseinhidrolisaat, sowel as 'n vleisinfusie, bevat egter faktore wat groei stimuleer.

Peterson and Peterson (61) maak melding van die volgende faktore:-

- (1) 'n "normale-eluate" faktor volop in lewer, gis en mout produkte,
- (2) 'n onbekende faktor in gis, pepton en vitamien-vry kaseinhidrolisaat vir *Erysipelothrix*,
- (3) 'n ander faktor in gisekstrak waasonder propionsuur bakterieë nie groei nie ten spyte van die aanwesigheid van alle bekende groeifaktore, en
- (4) 'n "sporogene vitamien".

Volgens Hildes (28) bevat kasein en die natuurlike aminosure die "sporogene vitamien" in genoegsame hoeveelhede vir groei.

/Sprince.....

Sprince en Woolley (74) gee die naam „strepogenin" aan 'n faktor vir streptococci en lactobacilli wat gevind word in gedeeltelike hidrolisate van vitamien-vry kasein. Hulle meld verder dat dit nie 'n aminosuur is nie, en beskou dit as 'n peptied-verbinding. Hulle beweer dat 'n proteïen al die bekende aminosure mag bevat en nog geen strepogenien aktiwiteit hê nie as die aminosure nie verbind is in die regte kombinasie nie. Hulle vind die grootste strepogenien aktiwiteit by insulien, terwyl eierwit, wat baie meer aminosure bevat, feitlik sonder aktiwiteit is. Proteïene wat ensimaties afgebreek is, is baie meer aktief as die wat met suur gehidroliseer is.

Chattaway en medewerkers (15 en 16) het 'n fraksie gekonsentreer uit 'n suur hidrolisaat van gis wat sterk groei-bevorderende aktiwiteit het vir *Corynebacterium diphtheriae*. Hulle beskou die stof ook as 'n peptied-verbinding en vind dit ook in kaseinhidrolisaat. Vervolgens beweer hulle dat dit baie ooreenkoms vertoon met strepogenien. Hierdie faktor word egter geïnaktiveer deur ninhydrin, terwyl dit nie die geval is met strepogenien nie, en hulle moet dus as twee verskillende faktore beskou word. Deur twee-dimensionele papierchromatografie kon hulle 12 ninhydrin-positiewe bestanddele in die gisfraksie aantoon. Hiervan was vier die vry aminosure glutamiensuur, serien, glycien en isoleucien, vier was definitief van 'n peptiedagtige aard en deur suur hidroliseerbaar terwyl die ander vier stabiel teenoor suur was. Van een van die peptiede is deur hidrolise aangetoon dat dit 'n tripeptied was wat serien, glycien en glutamiensuur bevat het. Hulle maak melding van die feit dat Woolley gedeeltelike strepogenien aktiwiteit gevind het vir seryl-glycyl-glutamiensuur.

Smith en Douglas (73) vind dat *Clostridium bifermentans* baie weinig groei wanneer die vitamien-vry kaseinhidrolisaat vervang word deur verskillende mengsels van aminosure.

Wanneer daar egter aan 'n dergelike medium 'n klein hoeveelheid (0.01 - 0.05 persent) pepton bygevoeg word, vermeerder die groei geweldig. Hulle kom tot die gevolgtrekking dat die kasiënhidrolisaat 'n onbekende faktor bevat wat nodig is vir die optimale groei van *Cl. bifementans*. Die effek van hierdie onbekende stof word nie gegee deur enige van die volgende stowwe nie:- adenien, guanien, xanthen, uracil, cholien, P.A.B.A., thiamien, nikotiënsuur, biotien, pantotheënsuur, pyridoxien, Na-oleaat, foliënsuur of vitamien B<sub>12</sub>. Wanneer al hierdie stowwe saam gebruik word, word nog geen groei verkry al word die volgende bestanddele ook nog bygevoeg:- threonien, asparagien, inositol, glutamien, glukosamien, gisnukleïnsuur, Na-oleaat en glutathion. Die enigste stowwe wat aktief is vir groeibevordering, is die wat verkry word deur die afbraak van proteïen, veral die ensimatiese afbraak van kasein deur trypsien. Hulle stel ook voor dat die aktiewe stof 'n peptied kan wees, maar beskou dit nie as identiek met streptogeenien nie.

Een of meer faktore wat essensieël is vir groei van 'n aantal melksuurbakterië word volgens Kitay en Snel (45) aangetref in kasein wat ensimaties afgebreek en daarna met houtskool behandel is.

Schopfer en Guilloud (72) vind dat *Eremothecium ashbyii* nie in 'n sintetiese medium groei nie, maar wel wanneer pepton bygevoeg word. Wanneer die pepton egter met noriet behandel is die vitamien wat deur die noriet geabsorbeer word, word sowel as die filtraat, sonder effek wanneer hulle afsonderlik gebruik word. Gesamentlik gee hulle egter goeie groei, wat aantoon dat behalwe die vitamien daar ook in die filtraat 'n groei-bevorderende faktor is. Hulle het gevind dat hierdie faktor gedeeltelik vervang kan word deur die aminosure l-leucien en d-arginien, maar hulle kom tog nog tot die gevolgtrekking dat daar bowendien nog 'n onbekende faktor in die pepton is.

Dulaney en Grutter (22) beweer egter dat inositol die enigste essensieële groeifaktor vir hierdie fungus is as die N-bron l-arginien, dl-glutamiënsuur of l-prolien is. w

Yaw (89) kon egter nie die resultate van bogenoemde ondersoekers bevestig nie. Hy het nl. verskillende kombinasies van groeifaktore, essensiële en nie-essensiële aminosure, gehidroliseerde gisnukleinsuur, oleinsuur, indol-3-asynsuur, glutathion, xanthien, hypoxanthien en strepogenien by die sintetiese medium gevoeg. Hy vind dan dat geeneen van hierdie toevoegings groei van die fungus onderhou nie. Daarenteen vind hy dat 'n mengsel van aminosure wel groei tot gevolg het mits die pH van die medium verhoog word van 5.0 tot 5.8. Hy het die aminosure individueel getoets en gevind dat methionien alleen groei veroorsaak. Verder het hy vasgestel dat *E. ashbyii* die nodige methionien self kan vervaardig by pH 6.4, maar by pH 5.8 moet dit voorsien word. Homocysteien cysteien of Na-thioglykolaat kan die methionien vervang, maar nie homocystien of cystien nie.

Die resultate wat hierdie verskillende ondersoekers vir dieselfde organisme gevind het, blyk dus taamlik uiteenlopend te wees. 'n Moontlike verklaring vir hierdie verskil in resultate mag gevind word in die bewering van Steinberg (78) wat nl. lui dat: „An important phase of amino acid nutrition deals with specificity and the comparative needs of different organisms. Data in the literature would indicate that marked specificity exists with bacteria and fungi, accompanied by marked variations between species and even strains“. Die resultate het dit egter in gemeen dat hulle almal duidelik aantoon dat die fungus 'n organiese N-bron in die vorm van een of ander aminosuur vereis.

Verdere aanduidings van tot dusver onbekende faktore vir fungi in gisekstrak word gekry uit die resultate van Hazen (42 en 43), vir *Microsporium audouini*. Leben en Keitt (49) werk met *Venturia inequalis* wat thiamien nodig het, en vind dat daar by aanwesigheid van thiamien 'n groot toename in groei plaasvind as vitamien-vry kaseinhidrolisaat bygevoeg word. Vir *Blastoclada pringsheimii* vind Cantina (13) dat die N-verbinding van kaseinhidrolisaat essensieël is vir groei,

maar hy kon ten spyte van 'n verskeidenheid van proewe, waaronder die insluiting van  $\frac{3}{4}$  van die aminosure in kasein en pepton, nie definitief vasstel wat hierdie verbindings was nie. In 'n latere proefneming (14) vind hy egter dat hierdie fungus methionien nodig het, maar 'n groei bevorder word deur ander aminosure by te voeg.

Benham (6) vind dat tryptose 'n gunstige werking uitoefen op die groei van *Trichophyton rubrum*. Die duidelikste bewys van die gunstige werking van gisekstrak op die groei van fungi, word heelwaarskynlik aangetref in die publikasie van Arêa Lão en Cury (2). Hulle vind nl. dat die volgende fungi gladnie groei op 'n basale sintetiese medium nie, baie swak op 'n basale medium met vier vitamene maar baie goed op 'n medium bevattende gisekstrak: *Trichophyton violaceum*, *T. schoenleinii*, *T. sulfureum*, *T. sabouraudi*, *Coccidioides immitis* (drie verskillende stamme) en *Trichophyton mentagrophytes* (het ook nog thiamien en inositol nodig).

Fergus (27) het vir *Penicillium digitatum* aangetoon dat die groei op 'n basale medium met vitamene nie so goed is as wanneer gisekstrak bygevoeg word nie. Hy beweer dat die stimulerende faktor in die gisekstrak moontlik puriene, pyrimidiene of aminosure kan wees.

#### AMINOSURE

Alhoewel die faktor wat hierbo genoem is nog onbekend of ongedetermineerd is, is daar tog aanduidings dat sommige van hulle miskien aminosure kan wees, of in elk geval gedeeltelik vervangbaar is deur aminosure. Dit kan wel ook verwag word as in aanmerking geneem word dat stowwe soos pepton, gisekstrak en kasein uit 'n groot verskeidenheid aminosure bestaan. 'n Paar voorbeelde waar aangetoon is dat vir die betrokke fungi die onbekende faktor aminosure mag wees, is alreeds hierbo genoem (72, 22, 89, 13, 14, en 27). Verder het Robbins en Ma (65) vir *Trichophyton mentagrophytes* gevind dat dit nie 'n vitamien-gebrek het nie en goed groei op pepton en kaseinhidrolisaat. Hulle het die kasein hidrolisaat



vervolgens vervang deur 'n sintetiese mengsel van die aminosure wat in kaseinhidrolisaat voorkom op te maak, en gevind dat daar hierop wel groei plaasvind, alhoewel nie so goed as op die natuurlike kaseinhidrolisaat nie. Hulle het die aminosure ook individueel getoets en gevind dat die fungus wel kan groei op enigeen van 14 aminosure.

Ajello (1) beweer dat *Polychytrium aggregatum* geen vitamien nodig het nie en goed groei op 'n medium bevattende pepton. Geeneen van 20 aminosure wat getoets is, het so goeie groei as op pepton gegee nie, alhoewel ses hiervan nl. glutamiensuur, asparagiensuur, lysien, arginien, methionien en hydroxyprolien beter as die ander was. Mengsels van hierdie aminosure het ook nie veel beter groei gegee nie, terwyl die volgende stowwe ook sonder uitwerking was: - guanien, xanthien, hypoxanthien, adenien, cytosien, thymien, uracil en orotiensuur.

Sommige van die aminosure is in hulle werking op giste ook al as groeifaktore bestempel. Nielsen en Hartelius (58 en 60) het gevind dat ses aminosure ( $\beta$ -alanien, lysien, arginien, glutamiensuur, asparagien en asparagiensuur) groei-bevorderend werk op *Saccharomyces cerevisiae*. Hiervan beskou hulle  $\beta$ -alanien as 'n groeistof aangesien dit by 'n betreklik lae konsentrasie 'n maksimale werking gee en nie as voedingstof op N-bron assimileerbaar is nie. Die maksimale effek van lysien is by 'n hoër konsentrasie (dieselfde grootteorde egter as vir inositol) maar dit is ook nie assimileerbaar as N-bron nie, en hulle beskou lysien dus ook as groeistof. Die konsentrasies van arginien en glutamiensuur is egter te groot om hulle as groeifaktore te beskou en hulle is wel assimileerbaar as N-bronne. Schopfer (71) beskou hulle as mikro-voedingstowwe. Die werking van asparagien en asparagiensuur is kwantitatief m.a.w. die groei vermeerder by vermeerdering van hierdie stowwe, en hulle word beskou as voedingstowwe. Hierdie aminosure het egter geen enkele /effek.....

wanneer hulle alleen gebruik word nie en is dan eerder giftig, veral  $\beta$ -alanien.  $\alpha$ -alanien werk slegs as groeifaktor mits asparagien of asparagiensuur by die medium gevoeg word.

Nielsen en Hartelius (59) het verder in ander proewe vasgestel dat daar aansienlike verskille is tussen die groeifaktore wat werkzaam is vir *Aspergillus niger*, en die wat *S. cerevisiae* beïnvloed. Hulle vind dat  $\beta$ -alanien vir *A. niger* nie as groeistof werk nie, maar baie giftig is.

Williams en Rohman (88) het ook aangetoon dat sommige aminosure bios-aktiwiteit het, en veral  $\beta$ -alanien. Hulle vind ook die grootste aktiwiteit vir  $\beta$ -alanien by aanwesigheid van asparagiensuur.

In die algemeen egter is aminosure slegs aktief wanneer hulle in groot hoeveelhede gebruik word, en hulle kan dus nie eintlik as groeifaktore beskou word nie.

Dit blyk dus dat daar fungi is wat nie in staat is om op 'n medium met 'n anorganiese N-bron te groei nie, maar organiese N-verbindinge of aminosure nodig het. 'n Paar voorbeelde van sulke fungi is alreeds genoem, nl. *Eremothecium ashbyii* (72, 22 en 89), *Blastocladia pringsheimii* (14), *Trichophyton mentagrophytes* (65) en *Polychytrium aggregatum* (1).

Mosher en medewerkers (56) vind dat aminosure nodig is vir die groei van *Trichophyton interdigitale*, maar dat geen enkele aminosuur onontbeerlik is nie.

Leonian en Lilly (51) het uitgebreide proewe gedoen oor die gebruik van aminosure deur fungi. Hulle het 25 soorte fungi wat thiamien nodig het, getoets en gevind dat die volgende organismes nie groei op 'n medium met anorganiese N-bron nie, maar wel wanneer aminosure toegevoeg word:- *Basidiobolus ranorum*, *Coprinus lagopus*, *Nyctalis asterophora*, *Chaetocladium brefeldii*, *Pythium ranarum*, *Pilaira moreaui* en *Pleurotus corticatus*. Hulle kry verder aanduidings van 'n absolute behoefte aan l-cystien vir *Saprolegnia mixta*, *Achlya conspicua*, *Isoachlya monilifera* en *Aphanomyces camptastylus*, aangesien

/geeneen .....

geeneen van hierdie fungi groei tensy l-cystien tot die medium gevoeg word nie. *Saprolegnia parasitica* groei slegs as l-cystien of dl-leucien bygevoeg word.

Volgens Schade (70) gebruik *Leptomitus lacteus* en *Apodachlya brachynema* nie anorganiese N- nie, maar wel dl-alanien en l-leucien. By aanwesigheid <sup>van</sup> asetaat word glycien en asparagien ook gebruik. Alhoewel *Aspergillus niger* kan groei met anorganiese N-bron vind Steinberg (76) dat die anorganiese N volkome vervangbaar is deur die amino-N van dl-~~o~~-alanien, l-asparagiensuur, d-glutamiensuur, glycien, en die imino-N van d-arginien, l-hydroxyprolien, en prolien, terwyl cysteien en cystien, lysien,  $\beta$ -alanien, en l-histidien baie swak N-bronne is. Groei is gemiddeld tot swak op serien, threonien, tryptofaan, isoleucien, leucien, methionien, fenielalanien, tyrosien en valien.

Georg (31) het waargeneem dat een stam van *Trichophyton violaceum* (stam 365) gladnie groei al word groot hoeveelhede vitamene by die medium gevoeg. Die stam groei egter wel by toevoeging van kaseinhidrolisaat. Hy het toe 'n verskeidenheid van aminosure afsonderlik en in kombinasie by die basale medium gevoeg en gevind dat die fungus 'n volkome vereiste vir l-histidien het. Groei op die maksimale effektiewe konsentrasie van histidien is egter nie so goed as op kasein nie, terwyl die byvoeging van ander aminosure gunstig werk. Dit is in elk geval die eerste duidelike bewys van 'n absolute gebrek aan 'n definitiewe aminosuur by 'n fungus. Geïnduseerde mutasies (soos by *Neurospora*) wat 'n absolute vereiste vir een aminosuur het, word nie hier in aanmerking geneem nie. Hy vind ook (32) dat *Trichophyton gallinae* en *T. megyni* slegs groei as l-histidien aanwesig is. Asparagien, glutamien en arginien het die grootste stimulerende effek by aanwesigheid van histidien.

Dit is ook gevind dat sommige van die aminosure 'n groei-remmende effek op sekere fungi het.

/Cysteien .....

Cysteïen, rem b.v. die groei van *Aspergillus niger* (Steinberg 76) asook  $\beta$ -alanien (Nielsen en Hartelius 59). Threonien, methionien en hydroxyprolien is giftig vir *Trichophyton mentagrophytes* (Robbins en Ma 65) en hydroxyprolien vir *Trichophyton gypseum*, *T. purpureum*, *Microsporum canis* en *Epidermophyton flocculosum* (Robbins en McVeigh 66), en ook vir *Trichophyton gallinae* en *T. megnini* (Georg 32).

Met die uitsondering van 'n paar fungi, behoort die fungi wat hierbo genoem is, en waarvoor gegewens beskikbaar is oor hul aminosuur-voeding, meestal tot die dermatofiete of tot die groep water-skimmels of ander phycomycete.

Oor die aminosuur-voeding of vereistes van fungi wat in die grond voorkom, is daar blykbaar nog weinig werk gedoen en die proefnemings van Steinberg (76) met *Asp. niger* was die enigste wat in die verband gevind kon word.

### HOOFSTUK III

#### MATERIAAL

Die fungus wat in hierdie ondersoek gebruik is, is opgeneem in die kultuurkolleksie van die Plantkunde Afdeling van die U. O.V.S., en word daarin aangehou as F 474. 'n Beskrywing word nou eers gegee van die groei en algemene voorkoms van hierdie fungus.

#### GROEI

Groei baie weinig of gladnie op Czapek- Pruim- en Mout-agar. Die groei op bouillon-agar (N.A.) is wit, melerigen nie vinnig spreidend nie. Geen lugmycelium word gevorm nie, en die wit melerige voorkoms op die agar is toe te skryf aan konidieë wat hoofsaaklik gevorm word op die plekke op die agar waar die oorentings op gedoen is. Op agar-plate sprei dit egter na alle kante met konidieë-vorming die digste rondom die middel (entplek) waar daar ook lugmycelium in die vorm van toue ("ropes") wat konidieë dra, gevorm word. Namate die kolonie egter in omtrek toeneem, neem die digtheid van konidie-vorming af. Periethecia word op hierdie medium gevorm na 'n tydperk van minstens drie weke, en hulle verskyn as swart kolletjies onder die oppervlakte van die agar. Groei op P.D.A. is min of meer dieselfde as op N.A., behalwe dat dit baie stadiger is en die medium aan die onderkant effens bruinerig word.

#### Czapek en gisekstrak medium

Op 'n Cz-medium waarby 1 - 2 per sent Difco gisekstrak gevoeg word, word 'n baie goeie groei verkry. In die middel van die kolonie word 'n taamlike digte massa lugmycelium in die vorm van toue, wat oortrek is met konidieë, gevorm.

/Dis.....

Die vorming van hierdie koremium-agtige toue verminder egter vinniger as die konsentrasie van gisekstrak verminder word. Groei op hierdie medium nie met duidelike konsentrasie ringe nie, alhoewel sodanige ringe baie duideliker word namate die gisekstrak-konsentrasie verminder word.

Geen perithecia is op hierdie medium gevorm voordat die agar-plate uitgedroog was nie, alhoewel dit wel die geval is op 'n medium wat slegs 0.5 persent gisekstrak en agar bevat. Hierop word volop perithecia in konsentrasie ringe gevorm.

Die vorming van perithecia op hierdie medium kan moontlik toegeskryf word aan die feit dat dit nie glukose bevat het nie, of dat die konsentrasie van voedingstowwe laag is. Dit sou in ooreenstemming wees met die resultate van Hawker (4, 35, 36, 37, 38 en 40) wie in 'n reeks ondersoekinge die effek van koolhidrate en groeistowwe op die vrugvorming van *Melanospora destruens* nagegaan het. Haar resultate kan as volg saamgevat word:-

Deur die medium te verdun, of die fungus op 'n swakker medium oor te ent, word perithecium-vorming bevorder. As in 'n medium 'n segment van die agar vervang word deur 'n verdunde medium, word perithecia aan die periferie gevorm. Sy vind ook dat die vermindering van hexose-konsentrasie vrugvorming bespoedig. Die vermeerdering in perithecium-vorming wat verkry word deur die toevoeging van thiamien, word verminder of verhoed deur voldoende glukose by te voeg. Vermeerdering van die thiamien-konsentrasie oorkom egter weer hierdie effek. Hawker en Chaudhuri (41) vind soortgelyke resultate vir ander askomycete.

Lilly en Barnett (52) beweer dat by *Chaetomium convolutum* die konsentrasie van die voedingstowwe invloed uitoefen op perithecium-vorming. Die aantal dae nodig vir vrugvorming verminder as die medium verdun word. Hulle beweer dat vrugvorming blykbaar saamhang met die uitputting van beskikbare voedingstowwe.

## MORFOLOGIE

### 1. Imperfekte vorm

Die mycelium is gesepeteer en hialien terwyl die konidieë ook hialien is.

Die konidie-draers is baie verskillend in samestelling. Konidieë word gevorm op fialides wat gewoonlik opgeswel is aan die basis en geleidelik tot 'n buisvormige punt uitloop. Die fialides word meestal gedra op 'n kort konidiofoor, maar hulle word ook direk op die hifes of verdikte selle daarvan gevorm. Dit kom egter ook dikwels voor dat die konidie-draers gekompliseerder is en bestaan uit 'n konidiofoor, metulae en fialides, wat dan 'n komplekse penicillus vorm. Konidieë word in kettings gevorm op die fialides, en die afsonderlike konidieë word aanmekaar gehou deur disjunktore.

### Voeg in Fig. 1

Twee soorte van konidieë word gevorm, nl.:

- (1) Min of meer ronde konidieë wat dubbelwandig is met duidelike disjunktore en  $3.5 - 4.3 \times 4 - 5^{\mu}$  groot.
- (2) konidieë wat dikwels in kettings die indruk skep min of meer ovaal te wees, en wat ook deur disjunktore verbind is. Wanneer hulle egter afsonderlik en los van die ketting beskou word, kan gesien word dat hulle aan die basis effens afgeplat is en aan die ander end afgerond is, of ook min of meer puntvormig uitloop. Hierdie konidieë is  $2 - 2.5 \times 5 - 6^{\mu}$  groot en glad. Op N.A. het ek slegs die ovaal konidieë waargeneem, terwyl albei tipes gevorm word op P.D.A., Cz. en Cz + gisekstrak.

### 2. Perfekte vorm

Perithecia word onder die oppervlak van die agar gevorm. Hulle is swart, vliesig (dun) en taamlik hard. Verder is hulle rond, sonder 'n opening of ostiolum en tot  $175^{\mu}$  in deursnee. Die asci is rond,  $10 \times 10^{\mu}$ , met agt askospore. (Sien Fig.1).

/ Die .....

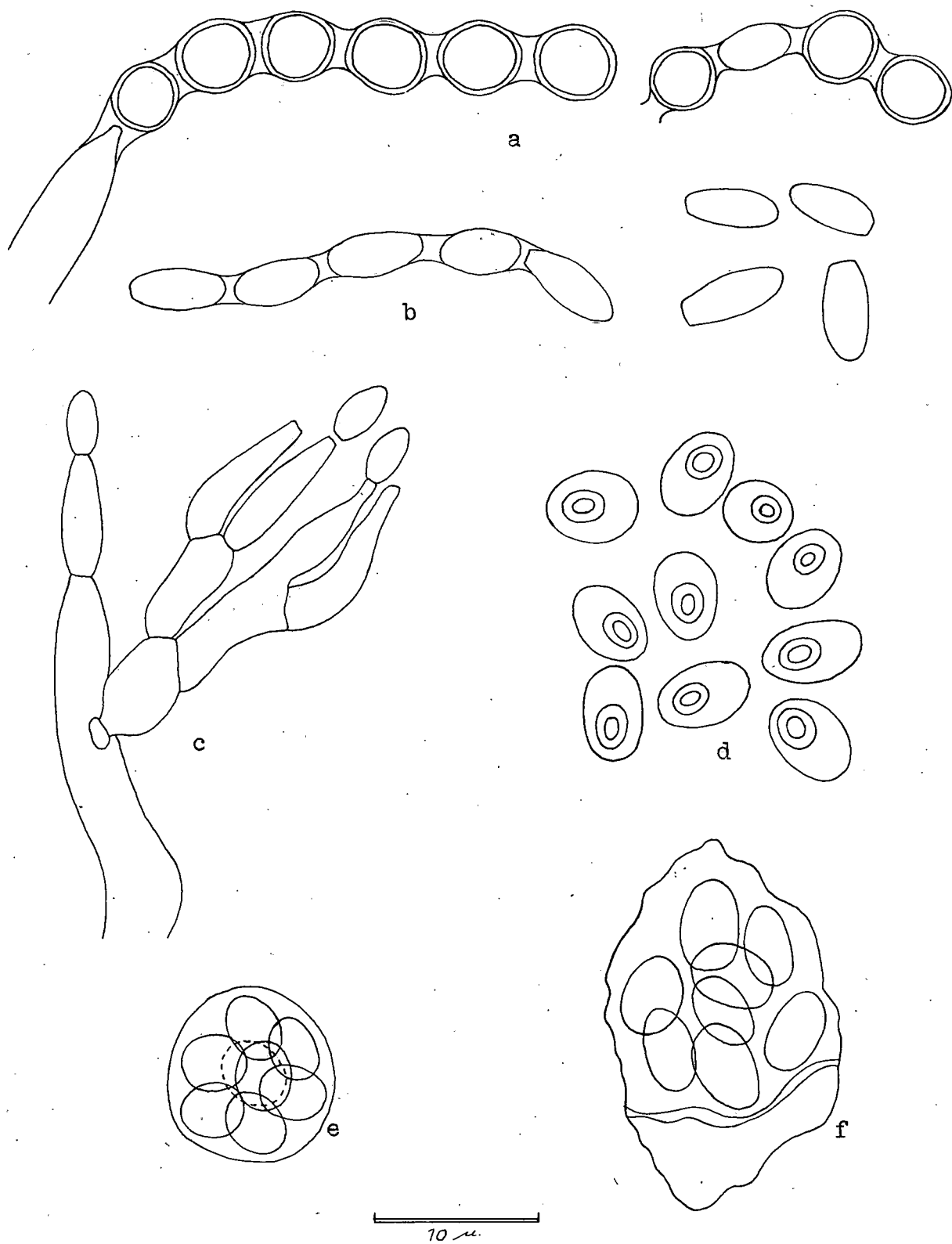


FIG. 1

Figure x 2,800

- a. Ronde, dubbelwandige spore
- b. Ellipsvormige spore in ketting en enkel
- c. Konidie-draers
- d. Volwasse askospore
- e. Askus met 8 jong askospore
- f. 'n Askus nadat dit gedruk is.





Die asci vervloei egter alreeds in 'n baie vroeë stadium en laat die askospore vry in die sentrale hálte van die perithecium. Die jong askospore is hialien en glad en ovaal (ellipsvormig), later word hulle egter ligbruin van kleur terwyl die volwasse spore 'n oliedruppel bevat en  $4 \times 5 - 6$  groot is. Slegs die jong hialiene askospore word in asci aangetref.

#### SISTEMATIES PLEK EN VERWANTSKAP

##### 1. Imperfekte vorm

Mikroskopiese ondersoek van die imperfekte stadium het aan die lig gebring dat hierdie fungus behoort tot die geslag Scopulariopsis Bainier.

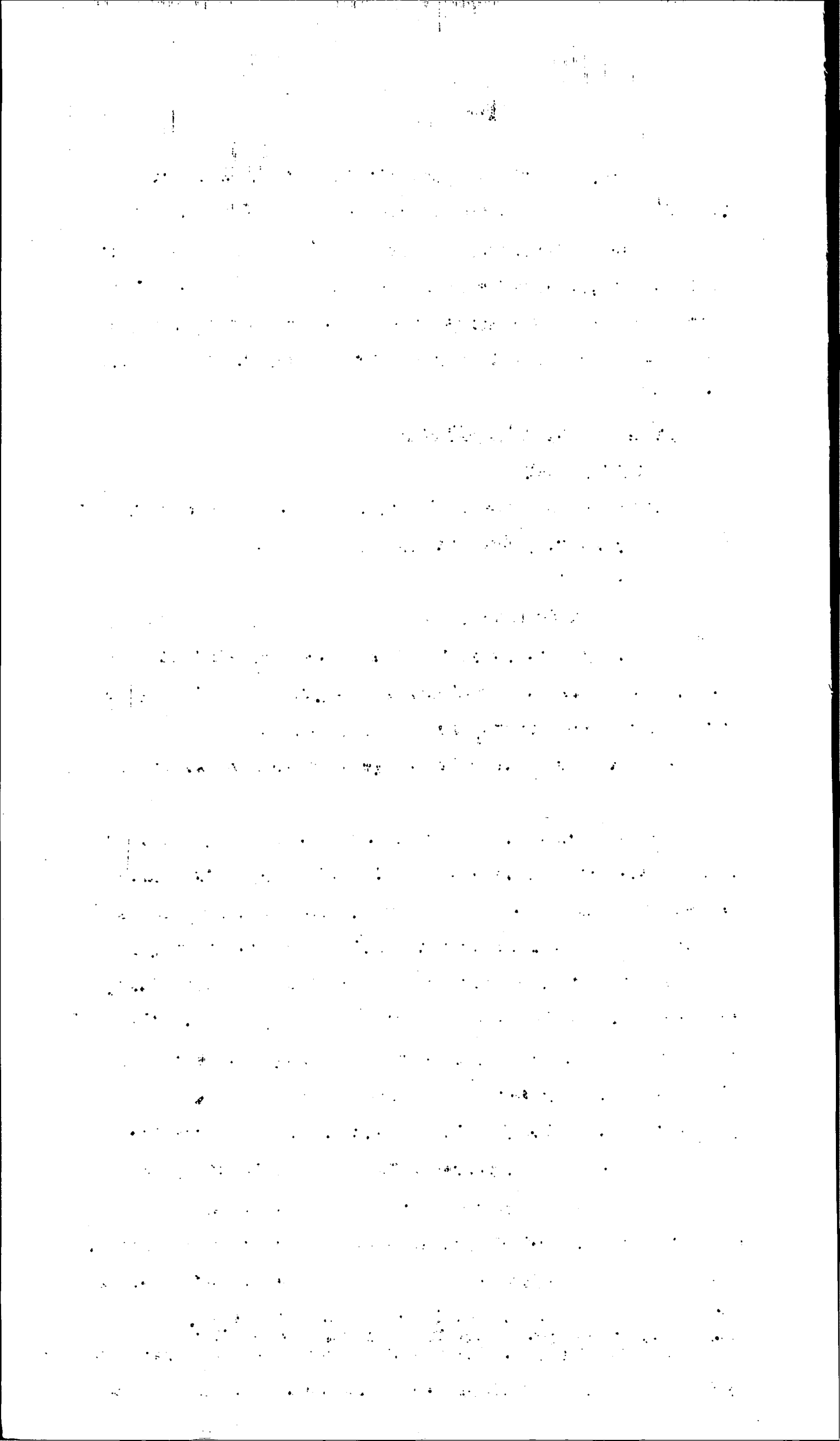
Die geslag Scopulariopsis is in 1907 opgestel deur Bainier met *Penicillium brevicaulis* Sacc. as tipe. Hy skei hierdie en soortgelyke vorme van *Penicillium* op grond van die algemene uiterlik van die fungus, en die vorm van die spore.

Thom (80) gee die volgende genus diagnose vir Scopulariopsis:-

„Conidiophores mostly short or even wanting, commonly borne along funiculose hyphae. Conidial apparatus variable, penicillium-like (i.e. developing a complex penicillus with branches in several superposed series), or consisting of varying and irregular aggregations of branches and sterigmata, at times reduced to single sterigmata (or groups of sterigmata) sessile or nearly so and scattered along the aerial hyphae. Sterigmata more or less specialized, sometimes tapering gradually from a basal tubular section, or even the base itself, towards a conidium-bearing apex, abjointing conidia in chains. Conidia more or less pointed or rounded at the apex and truncate at the base, with a more or less thickened basal ring surrounding a basal germinal pore, walls usually thickened and often variously marked or roughened.”

(Dele tussen hakies ontleen aan Dodge (21) en Raper en Thom (62))

Alhoewel die uiterlik van die soorte wat tot dusver beskryf is in die algemeen voldoen aan bogenoemde diagnose, is daar



In die vorm van die konidieë groot variasie. Die konidieë varieer naamlik van die m.i. tipiese Scopulariopsis-vorm (spore grof, min of meer suurlemoenvormig met 'n afgeplate basis), tot ronde, ovale en spoelvormige vorme waarvan die meeste glad is. Selfs vir *Penicillium brevicule* beweer Stoll (in Lafar 47) dat die spore twee-soortig is. Hy beweer dat dit op verskillende media baie variabel mag wees. Dit mag nml. lang peervormig, ellipsvormig of koeël-vormig en glad of stekelig wees.

Ondanks die groot variasie in konidie-tipes wat reeds beskryf is, kan egter geen ooreenkoms gevind word nie tussen die twee-soortige konidieë van hierdie fungus en die wat bekend is nie. Meer as sestig soorte is vir hierdie geslag beskryf en beskrywings van die meeste van hierdie soorte is verkry in Thom (80), Dodge (21) en nuwere soorte wat daarna beskryf is deur van Beyma (82 en 84) en von Zilvinyi (87). Beskrywings van die soorte wat deur Zach (90) beskryf is, was egter nie beskikbaar nie, alhoewel hulle in elk geval almal pathogene organismes vir die mens is.

Van Beyma (83) het egter 'n fungus beskryf, naamlik *Scopulariopsis diversispora*, wat ook twee tipes spore vorm. Ten opsigte van die konidieë van hierdie fungus maak hy die volgende opmerkings:-

„Eigentümlich ist die Bildung von Konidien zweierlei Art; es entstehen sowohl typische Scopulariopsis-Konidien, welche etwa 5<sup>ll</sup> gross und stachelig, fast sechseckig, doppelwandig und braun gefärbt sind, wie auch kleine spindelformige, leicht braun gefärbte Konidien, etwa 3<sup>ll</sup> lang und 2<sup>ll</sup> breit in langen mitunter verzweigten Ketten. Bei mikroskopischer Betrachtung kan man auch beobachten, wie an den Trägern einmal ausschliesslich die echten Scopulariopsis-Konidien in verhältnismässig kurzen Ketten entstehen, ein andermal ausschliesslich die spindelformigen Konidien in langen Ketten; endlich /gibt.....

gibt es noch Ketten, welche anfänglich aus spindelformigen Konidien bestehen, im Verlauf der Kette nehmen sie aber an Grösse zu, um in die stacheligen Scopulariopsis-Konidien überzugehen. Mehrmals wurde sogar beobachtet, wie sich inmitten einer Kette von spindelformigen Konidien eine einzige grössere stachelige Spore gebildet hatte. Es scheint demnach als wenn die spindelformigen Konidien nur ein Entwicklungsstadium der Stacheligen Konidien darstellen, auf dem diese letzteren zurückbleiben können. Die stacheligen Konidien sind also als die fertigen reifen Sporen aufzufassen. Zu bemerken ist noch dass die spindelformigen Konidien lange im Ketten verbunden bleiben, die Ketten der stacheligen Konidien dagegen sich leicht in die einzelnen Sporen auflösen."

Die enigste ooreenkoms tussen Scopulariopsis diversispora v. B. en die fungus hier beskryf, lê dus net in die feit dat albei twee tipes van konidieë vorm. S. diversispora vorm egter bruin gestekelde ronde asook klein spoelvormige konidieë, terwyl die ronde spore wat F 474 vorm glad en wit is en die ander konidieë nie spoelvormig is nie maar aan die een kant afgeplat is en ni. meer tipies Scopulariopsis-spore is as die ronde spore van S. diversispora, Alhoewel Scopulariopsis F 474 ook die twee tipes spore in dieselfde ketting mag vorm, stem ek nie saam met van Beyma se opvatting dat die klein konidieë slegs 'n ontwikkelingsstadium van die groter ronde spore is. Indien van Beyma reg is sou 'n mens verwag dat die ronde volwasse spore in 'n basipetale rigting sal ontstaan uit die ander spore. Dit is egter nie die geval nie, aangesien in 'n ketting van ronde spore hier en daar 'n enkele klein konidium waargeneem kan word. Volgens sy opvatting sou 'n mens ook verwag dat alle ronde konidieë eers die spoelvormige stadium moet deurgaen. Dit word egter nie gesteun deur die feit dat die ronde konidieë direk uit die fialiedes in kettings ontstaan, en nie eers 'n tussenstadium deurgaen nie. M.i. is albei tipes konidieë volwasse, en



behou hulle identiteit tot by ontkieming.

'n Eienaardige anomalie is egter die feit dat hierdie fungus (F 474) op N.A. slegs die een tipe van konidieë vorm, terwyl op 'n Czapek-oplossing waarop maar slegs 'n teken van groei sigbaar is, en op Cz + gisekstrak oplossing waarop dit weer beter groei as op N.A., albei tipes spore gevorm word. Dit mag wees dat daar sekere stowwe is wat die vorming van albei, of andersyds van slegs een, tipe spoor in die hand werk. As dit die geval is, sou dit nie onmoontlik wees nie dat ander soorte wat beskryf is ook twee tipes konidieë sal ontwikkel mits hulle op die regte medium gekweek word. Ongelukkig kon die effek van verskillende stowwe op konidievorming in hierdie ondersoek nie nagegaan word nie. Gevalle uit die literatuur is egter bekend waar sekere stowwe die vorming van 'n bepaalde spoorvorm bevorder. Benham (6) vind b.v. vir *Trichophyton rubrum* dat tryptose tot die medium gevoeg moet word vir die vorming van makrokonidieë. Hazen (42 en 43) vind vir *Microsporum audouini* dat makrokonidievorming plaasvind by toevoeging van gisekstrak tot die medium.

Aangesien die Plantkunde Departement op hierdie stadium nie oor voldoende materiaal en volledige literatuur oor *Scopulariopsis* beskik nie, moes ek afsien van 'n volledige determinering van F 474. Die geslag *Scopulariopsis* bestaan hoofsaaklik uit bodem- en pathogenefungi met ongeveer sesstig soorte waarvan baie onvolledig beskryf is. Verder is daar geen monografie oor *Scopulariopsis* beskikbaar nie en die soorte is in die mees verspreide literatuur beskryf. (Onder andere, *Mycologia*, *Arch de Parasitol*, *Arch. Derm. Syphilol*, *C.R. Acad. Sci*, *Bull. Acad. Med.*, *Zentrbl. Bakt.*, *Progres Med.*, *C.R. Soc. Biol.*). Die fungus kan dus op die oomblik die beste gekarakteriseer word as *Scopulariopsis spec.*

/ 2. Perfekte .....

## 2. Perfekte vorm

Soorte van Scopulariopsis met 'n perfekte vorm is bekend, en alhoewel hulle onder verskillende name beskryf is, behoort hulle heelwaarskynlik almal tot die geslag *Microascus* Zukal.

Hieronder volg 'n kort oorsig van die perfekte vorme wat beskryf is met Scopulariopsis as imperfekte stadium:-

Blykbaar onbewus van die werk van Bainier, het Sopp (verw. in 80 en 24) in 1912 met *Penicillium brevicaulis* as tipe, ook 'n nuwe geslag, nl. *Acaulium*, opgestel. Sopp beskryf egter ook 'n paar soorte, onder ander *Acaulium albo-nigrescens* en *A. nigrum*, wat perithecia vorm. Emmons en Dodge (24) en ook Curzi (18) vind egter so 'n groot ooreenkoms tussen hierdie soorte <sup>en</sup> ~~van~~ *Microascus* Zukal, dat hulle die *Acaulium*-soorte as synonieme ~~van~~ *Microascus* beskou.

Lechnère (verw. in 24, 18, 69d), beskryf 'n nuwe geslag en soort, t.w. *Peristonium desmosporum*, wat ook deur Emmons en Dodge asook Curzi as 'n synoniem van *Microascus* beskou word. Verder beweer hulle dat die imperfekte stadium hiervan, wat deur Lechnère as *Verticillium*-agtig beskou word, geen verband met *Verticillium* nie, maar tot Scopulariopsis behoort.

In 1924 vind Loubiere (verw. in 18 en 24) dat Scopulariopsis *candida* (Pers) Laub. perithecia vorm, en hy beskryf hierdie perfekte vorm as *Nephrospora mangini*. Thom (80) beweer dat dit dieselfde mag wees as *Acaulium albo-nigrescens* Sopp, maar op grond van 'n vergelyking van die twee kulture beweer Emmons en Dodge (24) dat hulle duidelik verskillend is. Ook Curzi (18) beskou *Nephrospora* as synoniem met *Microascus*. Verder het Emmons en Dodge (24) in 1931 die soort *Microascus trigonosporus* beskryf met Scopulariopsis *trigonospora* as imperfekte vorm. Jones (44) beskryf in 1936 *Microascus lunasporus* met Scopulariopsis *lunaspora* as imperfekte vorm.

/Die volgende....



Die volgende *Microascus*-soorte is ook beskryf, maar geen melding word gemaak van hulle imperfekte vorm nie:-

*M. longirostris* Zukal - as tipe (91 en 69a)

*M. sordidus* Zukal - (69b)

*M. nidicola* Mass. en Salm. - (55 en 69c)

*M. variabilis* Mass. en Salm. - (55 en 69c)

*M. setifer* Schmidt - (69e)

*M. intermedius* Emmon en Dodge - (24).

Om op te som kan dus gesê word dat :-

*Acaulium nigrum* Sopp, *A. albo-nigrescens* Sopp, *Peristomium desmosporum* Lehm., *Nephrospora mangini* Loub., *Microascus trigonosporus* E. en D. en *M. lunasporus* Jones, die enigste perfekte vorme is wat vir *Scopulariopsis* bekend is. Die perithecia van al hierdie vorme het egter, soos die tipe soort (*longirostris*), 'n baie duidelike ostiolum. Ten spyte van die feit dat verskeie mikrotom-seksies van 'n groot aantal perithecia van *Scopulariopsis* F 474 gesny is; kon geen ostiolum hier waargeneem word nie. Emile-Weil en Gaudin (verw. in 24 en 80) het gevind dat *Scopulariopsis cinerea* E-W en G. swart, ronde perithecia vorm, maar hulle maak geen melding van die aanwesigheid van 'n ostiolum nie, of van die verwantskap van die perfekte vorm nie. Emmons en Dodge (24) maak die bewering dat die ostiolum moontlik onopvallend was en hulle waarneming ontglip het. Na aanleiding van die feit dat ek vir *Scopulariopsis* F 474 geen ostiolum in die perithecia gevind het nie, is dit wel moontlik dat die perithecia van *S. cinerea* E.W. en G. ook geen ostiolum gehad het nie.

*Scopulariopsis* F 474 wat in hierdie ondersoek gebruik is, onderskei sigself dus baie duidelik van die ander soorte met perfekte vorme daarin dat die perithecia beslis nie ostiolaat is nie. Die fungus kan dus nie tot die geslag

/Microascus.....

Microascus gereken word nie. Geen definitiewe bewering kan egter op die oomblik gemaak word aangaande die geslag waaraan hierdie askomycete wel behoort nie. Dit is deels toe te skryf aan 'n gebrek aan materiaal van verwante vorme om die fungus mee te vergelyk, en deels aan die onduidelike posisie waarin die sistematiese mikologie nog steeds verkeer, soos reeds beklemtoon deur Lütjeharms (54).

Die indelingsisteme wat in die gewone handboeke (soos Engler-Prantl (25), Clements en Shear (17), Bessey (7), Lindau (53) en Saccardo) aangegee word, is almal ondanks die feit dat hulle kunsmatig is, nie van veel waarde vir persone wat nie 'n deeglike kennis van die groot verskeidenheid van vorme het nie. Dit is wel moontlik om met behulp van die verskillende determineer-tabelle tot 'n naam te kom, maar daar bestaan geen sekerheid dat dit die juiste naam is nie. As 'n mens ten slotte ressorteer tot 'n eliminasië-proses, vind jy dat die beskrywings wat geges word, in sommige gevalle onduidelik of onvoldoende is, terwyl daar ook dikwels nie melding gemaak word van al die geslagte wat bekend is nie.

Die beste oorsig oor die grondslae van die sistematiek van die askomycete is die van Nannfeldt (57). Hy verdeel nl. die askomycete in drie hoofgroepe, waarvan een die Plectascales heet. Hiertoe reken hy alle vorme met ronde asci wat alreeds in 'n vroeë toestand vervloei. Vroeër is tot hierdie groep slegs vorme waarvan die vrugliggaam geslote is gereken. Nannfeldt voeg egter Microascus, die Ophiostomataceae en Chaetomiaceae by hierdie groep ten spyte van die feit dat hulle 'n duidelike monding het.

Bessey (7) beweer dat as Nannfeldt gevolg word en Microascus by die Plectascales gevoeg word, dit tuisgebring sal moet word onder die Aspergillaceae. Fischer (in Engler-Prantl), Lindau, Langeron en Clements en Shear

(Eurotiaceae,.....)

(Eurotiaceae) het in elk geval almal alreeds *Microascus* by hierdie familie ingesluit. Die *Aspergillaceae* is 'n familie wat hoofsaaklik vorme bevat met geslote vrugliggame of cleistothecia. Die uitsondering is *Microascus* wat 'n perithecium, of vrugliggaam met 'n opening, het. Alhoewel die vrugliggaam van *Scopulariopsis* F 474 dus as 'n cleistothecium bestempel sal word, toon dit sover dit die struktuur daarvan betref (ostiolum uitgesluit) 'n groot ooreenkoms met *Microascus*. Albei het nl. 'n harde wand wat uit meerlagige donker selle bestaan. Met die cleistothecium van *Aspergillus*-soorte daarenteen toon dit baie min ooreenstemming, aangesien hulle baie dunner en nie swart is nie.

Op grond van die kenmerke van die *Plectascales* is dit dus definitief seker dat die perfekte vorm van *Scopulariopsis* F 474 tot hierdie orde behoort. Verder kan ook nog met sekerheid beweer word dat dit tuishoort in die familie *Aspergillaceae*.

(Nannfeldt beweer dat die oorgang van die ander *Aspergillaceae* na *Microascus* geskied d.m.v. *Thielavia*. Inagnemend die ooreenkoms van F 474 met *Microascus*, is dit nie onmoontlik nie dat dit 'n posisie tussen hierdie twee vorme inneem nie.)

/ HOOFSTUK IV....

HOOFSTUK IVMETODES1. MEDIA

As basale sintetiese oplossing is gebruik gemaak van 'n gewysigde Czapek-oplossing wat as volg saamgestel is:-

$\text{NaNO}_3$	0.6 gm.
KCl	0.05 gm.
$\text{MgSO}_4$	0.05 gm.
$\text{FeSO}_4$	0.001 gm.
Glukose	2.0 gm.

Gedistilleerde water 100 cc.

By hierdie oplossing is ook nog gevoeg 1 ml. per liter van 'n oplossing bevattende die volgende spoorelemente:- Mn, Zn, B, Cu en Mo. Hierdie oplossing is in alle eksperimente gebruik en is so opgemaak dat dit die volgende hoeveelhede spoorelemente per ml. bevat het (Kuehner 46):-

$\text{MnSO}_4$  - 0.01 mg.,  $\text{ZnCl}_2$  - 0.07 mg.,  $\text{HBO}_3$  - 0.01 mg.,  
 $\text{CuCl}_2$  - 0.01 mg.,  $\text{MoO}_3$  - 0.01 mg.

Wanneer die bouillon-oplossing gebruik is, het dit bevat 0.3 persent vleisekstrak en 0.5 persent pepton in gedistilleerde water.

Alle oplossings is steeds in hoeveelhede van 25 ml. in 100 ml. Erlenmeyer-flesse gebruik. Die flesse is vooraf eers skoongemaak met 'n bichromaat-swaelsuur oplossing en deeglik uitgespoel met gedistilleerde water. By elke fles is vooraf 23 ml. van die voedingsoplossing gevoeg, waarna dit van 'n watteprop voorsien is en gesteriliseer is by 15 lb. druk per vierkante duim vir 20 minute. Twee ml. gesteriliseerde fosfaat-oplossing is daarna asepties by elke fles gevoeg.

2. BUFFERS

Om die pH van die voedingsoplossings so konstant as moontlik te hou, is van 'n taamlike sterk fosfaat-oplossing gebruik gemaak, t.w. 'n mengsel van 2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en

" 2M.....

en 2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (van Zinderen Bakker 85). In alle gevalle is 'n totaal van 2 ml. van die fosfaat-oplossings per 25 ml. gebruik. Hierdie oplossings is behalwe as buffers ook nog gebruik om die oplossings op die gewenste pH in te stel deur die verhouding van die twee oplossings te varieer (b.v. 1.4 ml.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0.6 ml.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

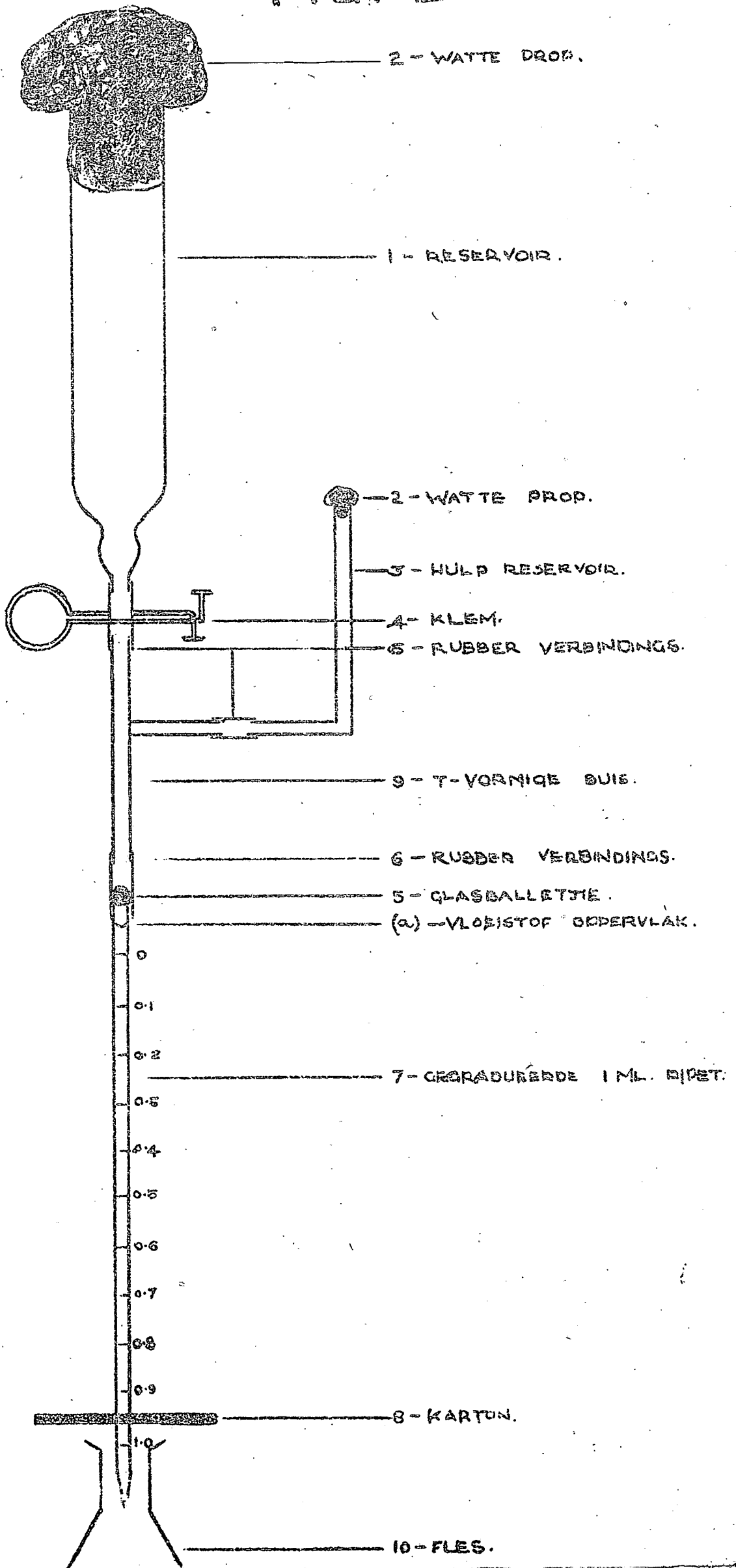
Om te voorkom dat presipitate gevorm word, of ander ongewenste veranderinge plaasvind, is die fosfaat-oplossings afsonderlik van die voedings-oplossings gesteriliseer en daarna asepties by laasgenoemde oplossings gevoeg.

Om verontreiniging sowel as moontlik te voorkom, is die apparaat, soos in Fig. 2 afgebeeld, ontwerp om die twee fosfaat-oplossings asepties by die voedings-oplossings te voeg.

#### VOEG IN FIG. 2

Die onderdele van hierdie apparaat is elk afsonderlik gesteriliseer nadat alle openinge met watte toegemaak is. Dit is gedoen aangesien die rubber-verbindings styf oor die glas gespan het en by die autoklaaf temperatuur gebars het. Nasterilisasie is die onderdele asepties aanmekeer gesit, en die fosfaat-oplossing, wat in 'n fles gesteriliseer is, in die reservoir gegiet. Vir elke fosfaat-oplossing is 'n afsonderlike apparaat gebruik. Die apparaat word as volg gebruik:-

Deur die klem 4 oop te maak word die oplossing in die T-vormige buis 9 ingelaat en dit word weer toegemaak wanneer die vloeistof ongeveer die vertakking van die T-buis bereik. Indien die klem dalk te lank oopgehou word, stoot die vloeistof in die hulp-reservoir 3 in. In die rubber-verbinding tussen die T-buis 9 en die gegradeerde 1 ml. pipet 7, is 'n klein glasballetjie 5 wat verhoed dat die vloeistof uit die buis vloei. Dit is egter baie gevoelig, en sodra die rubber-buis effens gedruk word op die plek waar die balletjie is, word die vloeistof in die pipet ingelaat. Deurdat dit so /gevoelig .....



gevoelig is, gee die glasballetjie 'n baie goeie regulering van die hoeveelheid vloeistof wat uitgelaat moet word. Die oplossing word dus in die pipet ingelaat en vul dit heeltemal. Die glasballetjie word egter nog oopgehou totdat die boonste oppervlak van die vloeistof in die pipet sigbaar is. Die klem 4 word nou weer oopgemaak totdat die oplossing die T-buis tot by die vertakking vul. Daarna word die glasballetjie weer gedruk en die vloeistof in die pipet sak terwyl dit terselfdertyd weer ingelaat word uit die T-buis. Die vloeistof wat in die pipet is, en die wat ingelaat word, is egter geskei deur 'n lugborrel. Die vloeistof word uitgelaat totdat dit die merk van die pipet bereik, waarna die vereiste hoeveelheid vloeistof uitgelaat kan word deur die verskuiwing van die lugborrel dop te hou. Hierdie lugblaas word voortdurend daargestel deur die vloeistof eers ongeveer die merk (a) te laat bereik voordat die klem 4 oopgemaak word om vloeistof in die T-buis in te laat. Die proses word dan in 'n kringloop voortgesit aangesien die pipet alreeds weer vol is wanneer die lugblasie die onderste opening van die pipet bereik.

Rondom die opening van die pipet is 'n deurboorde stuk karton aangebring wat die bek van die fles toemaak terwyl intapping van die fosfaat-oplossing geskied en die fles dus teen verontreiniging vrywaar.

### 3. pH-BEPALING

Die pH van die oplossings is elektrometries bepaal d.m.v. 'n Beckman pH meter met glaselektrode. Dit is in alle proewe gedoen na toevoeging van die 2 fosfaat-oplossings voordat die flesse geënt is. Na afloop van die proef is die pH van die filtrate ook gemeet.

### 4. ENTING EN INKUBASIE

Elke fles is geënt met 'n ogievol van 'n konidieë-suspensie van die fungus wat op N.A. gegroei het, en daarna in 'n inkubator by  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  geplaas. 'n Bakkie met water is ook in die inkubator geplaas om oormatige verdamping van die oplossings te voorkom.

## 5. DROOG-GEWIG BEPALING

Na afloop van 'n eksperiment is die mate van groei op die oplossings bepaal deur die droog-gewig van die mycelium-massa te bepaal. Vir hierdie bepaling is die oplossing saam met die mycelium deur filtreerpapier gefiltreer. Die filtreerpapier was vooraf genommer en afsonderlik geplaas in gemerkte weegbotteltjies. Die weegbottels met filtreerpapier is daarna gedroog by  $110^{\circ}\text{C}$ , in 'n eksikator geplaas en geweeg. Na filtrasie is die mycelium eers gewas met warm water en daarna met gedistilleerde water. Daarna word die filtreerpapier met mycelium weer in die bybehorende weegbottels geplaas, gedroog en geweeg.



HOOFSTUK V

EKSPERIMENTELE WERK

EKSPERIMENT 1 - VASSTELLING VAN DIE OPTIMALE pH

Ten einde die optimale pH te bepaal is die fungus in 'n voorlopige eksperiment op ongebufferde bouillon-oplossings van verskillende pH-waarde gekweek. Na tien dae inkubasie was die pH van die verskillende oplossings as volg:-

Oorspronklike pH	4.1	5.2	6.2	7.0	7.7	8.4	9
pH na tien dae	4.1	5.2	8.4	8.7	8.8	8.8	8.8

Op die oplossings met 'n pH van 4.1 of 5.2 het geen groei plaasgevind nie, terwyl dit op die ander oplossings min of meer dieselfde was. Dit blyk dus dat daar op al die oplossings waarop die fungus gegroei het, behalwe die laaste, 'n taamlike groot toename in die pH-waardes was. Die fungus is dus alkali-vormend. Aangesien dit van groot belang is om in voedings-eksperimente die pH van die oplossing so gunstig moontlik vir die organisme te maak en te hou, is 'n eksperiment gedoen om die optimum pH vir hierdie fungus in 'n gebufferde oplossing na te gaan. Hiervoor is die fungus weer gekweek op bouillon-oplossings wat op ses verskillende pH-waardes ingestel was. Die pH van die oplossings is ingestel deur gebruik te maak van verskillende kombinasies van die 2 fosfaat-oplossings, terwyl hulle terselfdertyd ook as buffers gedien het.

Om 'n pH-reeks met voldoende variasie te kry, is die volgende hoeveelhede fosfaat-oplossing gebruik per 25 ml.:-

	1	2	3	4	5	6
ml. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.9	1.6	1.1	0.8	0.2	0.0
ml. $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1	0.4	0.9	1.2	1.8	2.0
pH	5.6	6.1	6.5	7.0	7.6	8.0

Vier-en-vyftig Erlenmeyer flesse (100 ml.) is elk voorsien van 23 ml. bouillon-oplossing en gesteriliseer, waarna die steriele fosfaat-oplossings bygevoeg is. Die fosfate is bygevoeg in die kombinasies hierbo aangegee, en wel so dat daar vir elke pH-waarde 9 flesse was, dus 6 groepe van 9 flesse elk. Alle flesse is vervolgens geënt met 'n ogievol van 'n konidieë-suspensie van die fungus, en in die inkubator geplaas.

Na tien dae is 3 flesse van elke groep uit die inkubator gehaal en die inhoud gefiltreer, gedroog en geweeg, terwyl die pH van die filtrate ook bepaal is. Na 17 dae is dieselfde gedoen met nog 3 flesse van elke groep, terwyl die droog-gewigte van die mycelium in die oorblywende 3 flesse na 24 dae bepaal is.

## RESULTATE

### 1. Droog-gewigte

Die waardes van die droog-gewigte wat op die verskillende oplossings verkry is na 10, 17 en 24 dae, word weergegee in Tabel 1, en grafies voorgestel in Fig. 3 en 4.

#### VOEG IN TABEL 1, FIG. 3, 4

Uit die resultate kan die volgende gevolgtrekkings gemaak word:-

Na tien dae word die beste groei verkry op die oplossing met 'n oorspronklike pH van 8.0. Die droog-gewig wat op hierdie medium verkry is, is heelwat hoër as die op die ander media wat nie groot verskille met mekaar toon nie. Die waarde van 5 (pH 7.6) is enigszins teenstrydig met die algemene neiging, en 'n hoër waarde sou hier verwag word.

Na 17 dae was die hoogste waarde wat verkry is die op die oplossing van pH 7.0 (medium 4). Dit was egter nog laer as die waarde na tien dae op medium 6 (pH 8.0). Die verskil tussen die hoogste en laagste waardes is egter nie so groot as wat na tien dae die geval was nie, terwyl die waardes onderling ook baie min verskil toon. In vergelyking met die

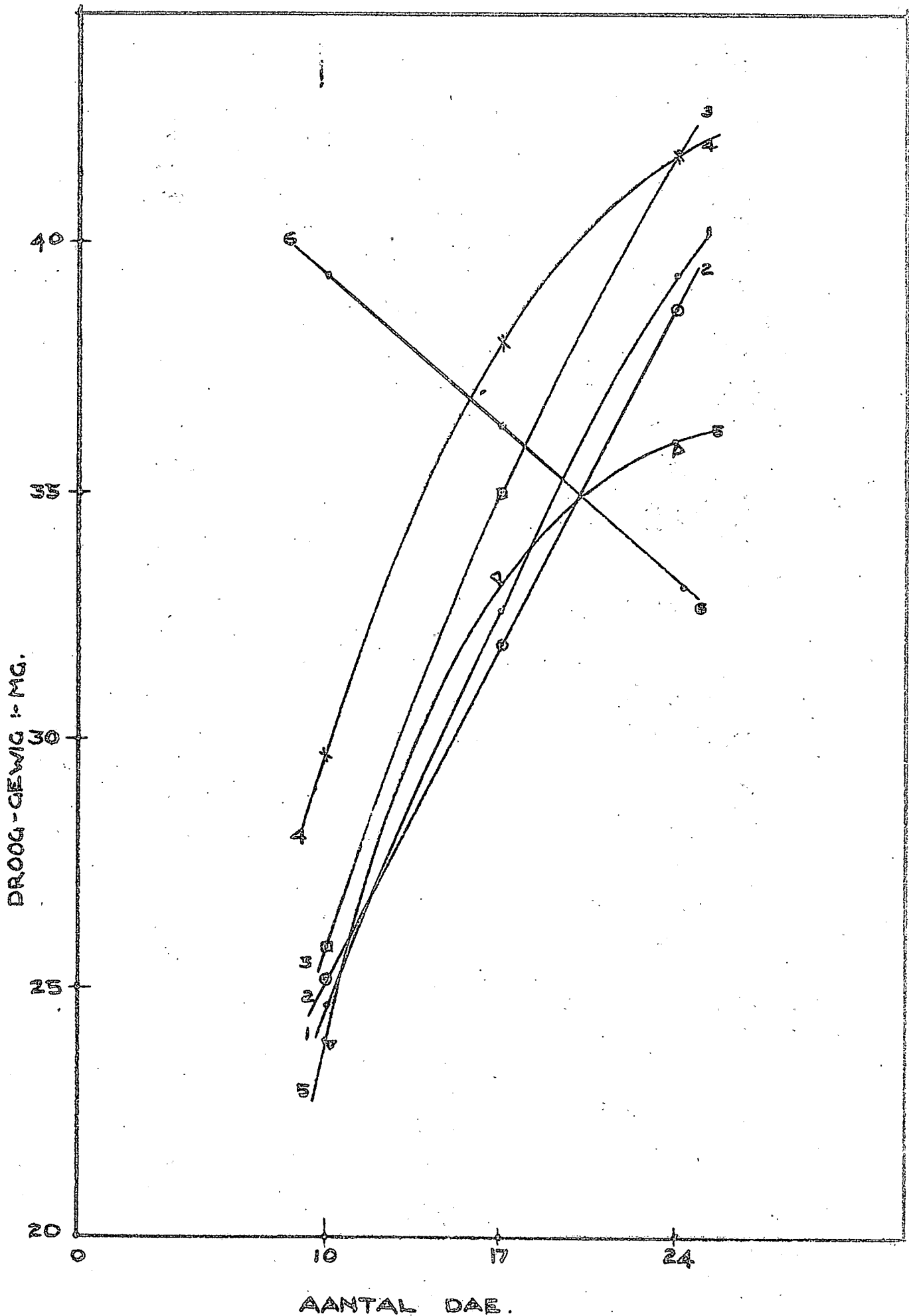
/ waardes.....

-31(a)-  
-32(a)-

TABEL 1

DROOG-GEWIGTE VAN MYCELUM NA 10, 17 EN 24 DAE EN GEKJEEK  
BY VERSKILLENDE pH-WAARDES. GEWIGTE UITGEDRUK IN MG.

No.	Oorspr. pH	Aantal dae					
		10		17		24	
			<u>Gem.</u>		<u>Gem.</u>		<u>Gem.</u>
1	5.6	20.2	24.7	33.3	32.6	42.6	39.3
		26.2		33.4		35.1	
		27.7		32.1		40.4	
2	6.1	26.4	25.2	33.9	31.9	37.7	38.7
		23.6		32.0		37.2	
		25.6		30.0		41.3	
3	6.5	23.9	25.8	34.8	35.0	41.2	41.7
		27.2		36.0		43.0	
		26.5		34.2		40.9	
4	7.0	29.7	29.6	35.0	38.0	42.8	41.7
		32.4		42.3		40.4	
		26.9		36.7		41.9	
5	7.6	23.7	23.9	36.6	33.1	32.4	36.0
		24.2		31.5		36.2	
		-		31.2		39.3	
6	8.0	38.2	39.3	34.4	36.3	32.4	33.4
		41.5		37.1		34.4	
		38.4		37.4		33.3	



AANTAL DAE.

FIG. 3

DROOG-GEWICHTEN VAN DIE MYCELIA OP DIE OPLOSSINGS MET VERSKILLENDE  
pH VAN EKSPERIMENT 1, NA 10, 17 EN 20 DAE

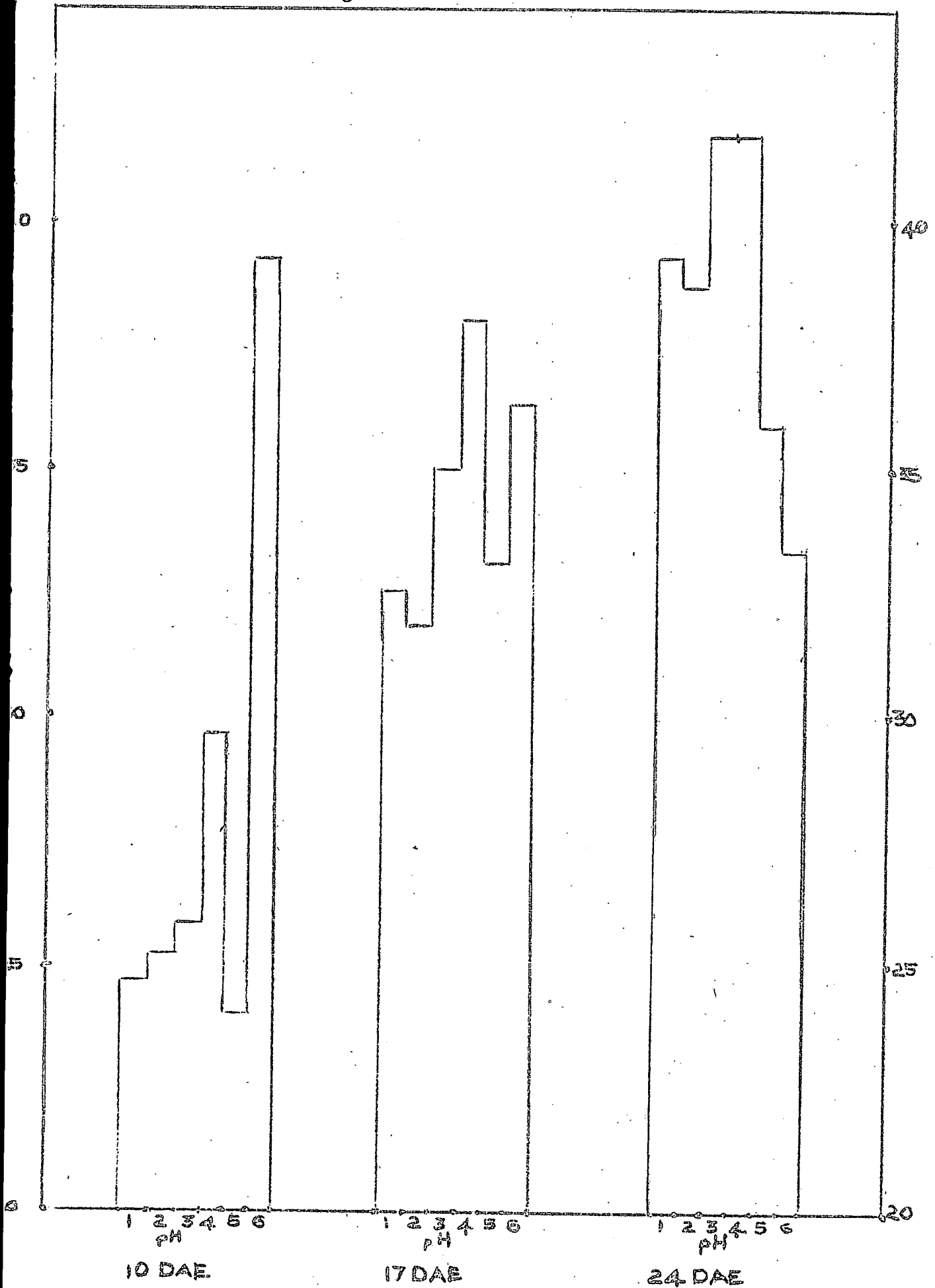


FIG. 4

DROOG-GEWIGTE VAN DIE MYCELIA OP DIE VERSKILLENDE pH OPLOSSINGS  
VAN EKSPERIMENT 1. NA 10, 17 EN 24 DAE

waardes wat na tien dae verkry is, is daar 'n definitiewe toename in gewig vir elke reeks behalwe die laaste een (pH 8.0). Die waarde in hierdie geval is laer as die na tien dae en dit dui moontlik daarop dat in hierdie oplossing daar alreeds autoliese ingetree het.

Na 24 dae het dit blykbaar die beste gegroei op media 3 en 4, alhoewel hulle in elk geval nie baie hoër waardes gegee het as 1 en 2 nie, en die verskille nie groot is nie. 'n Baie duidelike vermindering in gewig word egter waargeneem in die waarde van medium 6 wat weer laer is as die waarde na 17 dae. Hierdie verskynsel blyk baie duidelik uit Fig. 4, en dit is dus seker dat op die medium met 'n pH van 8.0 autoliese alreeds na die tiende dag, of selfs nog voor dit, ingetree het. Verder blyk dit dat die waardes vir 5 dwarsdeur aldrie reekse afwykend was van die algemene neiging wat waargeneem kon word, nl. dat 'n alkaliese medium (veral in die beginstadia) beter groei gee as 'n medium met 'n pH aan die suurkant. Veral na 10 en 17 dae sou daar hoër waardes op hierdie medium verwag kon word.

Nog 'n gevolgtrekking wat gemaak kan word, is dat die nadelige effek wat 'n suur medium blykbaar het, langsaam hand uitgeskakel word. Dit blyk uit die feit dat die verskille in die gewigte op hierdie en die meer alkaliese media hoe langer hoe kleiner word. Na 24 dae is daar baie weinig verskil in gewig tussen b.v. 1 (pH 5.6) en 4 (pH 7.0). Dit kan moontlik verklaar word deur die feit dat die fungus alkalie-vormend is, en die medium dus meer alkalies en meer gunstig gemaak word.

## 2. Verandering in pH

Die verandering in pH van die oplossings verskyn in Tabel 2 en Fig. 5.

### VOEG IN TABEL 2 EN FIG. 5

/ Wanneer.....

TABEL 2

VERANDERING VAN pH VAN MEDIUM NA 10, 17 EN 24 DAE

No.	Oorspr. pH	Aantal dae		
		10	17	24
1	5.6	6.1	6.5	6.7
		6.15	6.5	6.6
		6.1	6.5	6.6
2	6.1	6.4	6.7	6.7
		6.4	6.7	6.7
		6.4	6.7	6.7
3	6.5	7.0	7.3	7.3
		7.0	7.3	7.3
		7.0	7.3	7.3
4	7.0	7.2	7.5	7.5
		7.2	7.5	7.5
		7.2	7.5	7.5
5	7.6	8.1	8.9	8.6
		8.05	8.9	8.6
		-	8.9	8.6
6	8.0	8.6	9.2	8.95
		8.65	9.2	9.0
		8.6	9.2	8.9

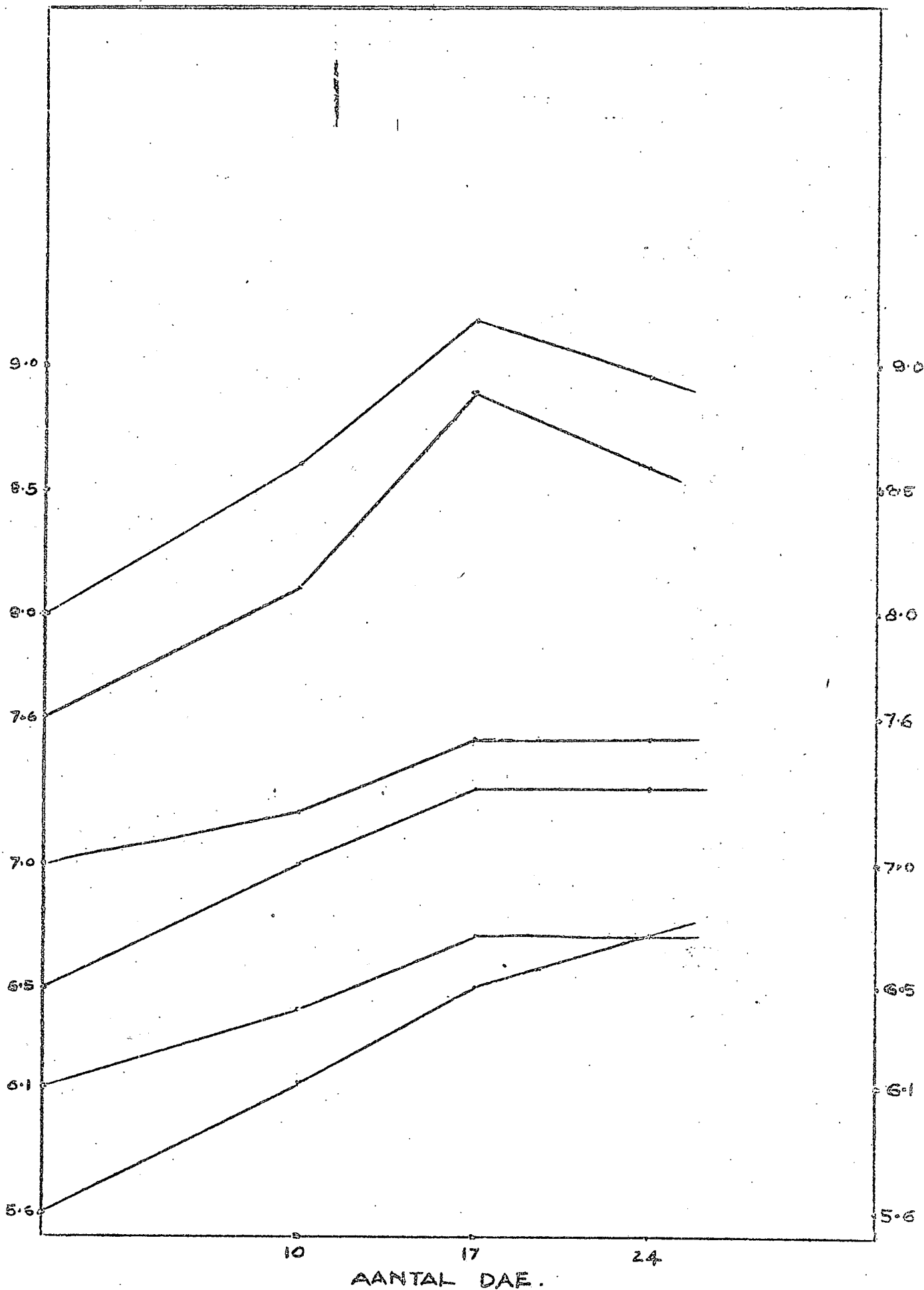


FIG. 5

VERANDERING VAN pH VAN DIE OPLOSSINGS VAN  
EKSPERIMENT 1. NA 10, 17 EN 24 DAE



Wanneer op die pH-verandering getel word, blyk dat daar na tien dae 'n toename in die pH van al die media was. Daarna het die pH ook nog toegeneem en na 17 dae was dit nog hoër as na 10 dae. Ons kan opmerk dat daar 'n baie goeie ooreenstemming tussen die replikate is wat betref die verandering in pH (Sien Tabel 2). Na 17 dae het die pH van media 1, 2, 3 en 4 min of meer konstant gebly, terwyl daar in die geval van media 5 en 6 egter 'n afname in pH plaasgevind het. Vir medium 6 kan dit moontlik verklaar word deurdat daar alreeds autoliese ingetree het (aangedui deur gewigsvermindering) en die pH gevolglik afneem. Indien dit altyd die geval sou wees, dan sou die pH-vermindering by 5 moontlik daarop kan dui dat autoliese ook hier plaasgevind het. Hier is egter geen gewigsvermindering nie, maar dit sou moontlik so verklaar kan word dat die groei in hierdie geval reeds in die periode tussen 17 en 24 dae sy maksimum bereik het en daarna weer afgeneem het. Dit sal egter deur 'n reeks eksperimente met korter tussenperiodes bevestig moet word.

### 3. Gevolgtrekking

Samevattend kan dus gesê word dat 'n alkaliese medium baie vinniger groei gee as 'n suur medium, maar dat autoliese ook gou intree. Ten spyte van die sterk buffers, word alle oplossings aanvanklik meer alkalies waardeur die suurder media gevolglik gunstiger gemaak word. Om autoliese uit te skakel en terselfdertyd 'n lang groei-periode te verkry, sou dit dus die beste wees om die fungus op media van pH 6.5 of 7.0 vir 24 dae te kweek.

Ingeval 'n medium moontlik saamgestel sou word waarop die fungus baie vinniger en beter groei as op die bouillon-oplossing, sal autoliese egter kan intree by 'n lang groei-periode. As voorsorgmaatregel hierteen, is alle toekomstige media ingestel op 'n pH van 7.0 en die fungus gekweek vir 18 dae.

EKSPERIMENT 2 - WERKING VAN GRONDEKSTRAK EN UREUM

Aangesien die fungus op 'n ureum-agar plaat uit grond geïsoleer is, het ons die volgende eksperiment gedoen om vas te stel of grondekstrak of ureum enige gunstige werking het op die groei van hierdie fungus.

Grondekstrak van twee tipes grond is gebruik en die groei hierop is vergelyk met die op kombinasies van ander stowwe. Aangesien die fungus goed gegroei het op 'n vleisekstrak-pepton bouillon, het ek 'n aantal kombinasies gemaak waarby vleisekstrak deur ander ekstrakte (gisekstrak, grond ekstrak en pepton as N-bron deur trypton en ureum vervang is.

Die proef is as volg saamgestel:-

	1	2	3 Grondekstrak	
	Vleisekstrak	Gisekstrak	(a)	(b)
A Pepton	A1	A2	A3	A4
B Trypton	B1	B2	B3	B4
C Ureum	C1	C2	C3	C4

Oplossings

Alle oplossings is van dubbele sterkte gemaak, en aangesien alle media uit 'n kombinasie van twee oplossings bestaan het, het elke fles 11.5 cc. van die een en 11.5 cc. van die ander oplossing gekry. (Totaal dan 23 ml. van die regte konsentrasie).

Bestanddele

Vleisekstrak- „Bacto-Beefextract" is gebruik in 'n konsentrasie van 0.3 persent.

Gisekstrak - „Difco-produk, konsentrasie 0.5 persent

Grondekstrak - gemaak deur 1 Kg. grond met 1 liter water te autoklaveer by 1 atmosfeer oordruk vir half uur, waarna CaSO<sub>4</sub> bygevoeg en dit filtreer is. Filtraat is opgemaak tot 1 liter.

Grondekstrak (a) is gemaak van 'n klei-erige grond waarop geen vegetasie gegroei het nie, en 'n pH van 5.7. Grondekstrak (b) is gemaak van 'n goeie grond waarop rooigras dig gegroei het en met 'n pH van 7.9.

/ Ureum - .....

Ureum, trypton en pepton is in hoeveelhede gebruik om almal dieselfde N-konsentrasie, en wel 0.1 persent, te gee. Hiervoor moes die volgende hoeveelhede van die verskillende stowwe per 100 ml. gebruik word:-

Ureum - bevat per molekule 46.67 persent N.

0.214 gm. per 100 ml. gee 'n konsentrasie van 0.1 persent N.

Pepton - In die „Difco Manual" (19) word die persentasie van N in pepton aangegee as 16.16 persent. Vir 0.1 persent N konsentrasie moet dan 0.619 gm. per 100 ml. gebruik word.

Trypton - Hiervoor word 'n konsentrasie van 13.14 persent N aangegee (19) en 0.761 gm. moet per 100 ml. gebruik word.

Die oplossings is in die verskillende kombinasies in Erlenmeyer-flesse geplaas en gesteriliseer, waarna die steriele fosfaat-oplossings asepties bygevoeg is. Die kombinasies hiervan is vooraf uitgewerk. Die flesse is daarna soos voorheen geënt en in die inkubator geplaas.

Die pH-waardes van die oplossings na toevoeging van die fosfaat-kombinasies, word aangegee in Tabel 3.

#### VOEG IN TABEL 3

#### RESULTATE

Na 18 dae is die oplossings gefiltreer en die droog-gewigte van die mycelia bepaal. Die gewigte word aangegee in Tabel 4 en Fig. 6, terwyl die finale pH's van die oplossings aan die einde van die groei-periode in Tabel 3 verskyn.

#### VOEG IN TABELLE 3 EN 4 EN FIG. 6

Uit hierdie waardes is dit opvallend dat daar op alle oplossings wat ureum bevat het feitlik geen groei plaasgevind het nie.

Op die oplossings met grondekstrak was die groei ook maar swak, behalwe waar die grondekstrak met trypton gekombineer is (B<sub>3</sub> en B<sub>4</sub>). Hierop is die groei egter beter as op pepton en vleisekstrak (A<sub>1</sub>). Dit is tewens ook die geval op alle oplossing wat trypton bevat het, nl. dat groei hierop baie beter is

/as.....

TABEL 3

pH-WAARDES VAN DIE VERSKILLENDE OPLOSSINGS VAN  
EKSPERIMENT 2

(a) Voor begin van die proef.

(b) Aan einde van die proef

	1		2		3		4	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
A	6.8	7.3	6.95	7.7	6.9	7.3	6.9	7.35
	6.8	7.3	6.95	7.7	6.9	7.3	6.9	7.35
B	6.8	7.3	6.95	7.75	6.8	7.4	6.8	7.4
	6.8	7.3	6.95	7.75	6.8	7.4	6.8	-
C	6.85	7.3	6.8	7.3	6.8	7.1	6.8	7.1
	6.80	7.2	6.8	7.5	6.8	7.1	6.8	-

TABEL 4

DROOG-GEWIGTE VAN DIE MYCELIUM OP DIE VERSKILLENDE OPLOSSINGS  
VAN EKSPERIMENT 2

DUPLIKATE WAARDES VIR ELKE OPLOSSING

	1	2	3	4
A	27.4	56.2	15.5	17.4
	29.2	56.4	12.5	17.9
B	41.7	57.2	34.7	35.2
	42.7	57.4	31.9	-
C	2.8	6.5	2.8	5.8
	2.8	12.6	5.1	-

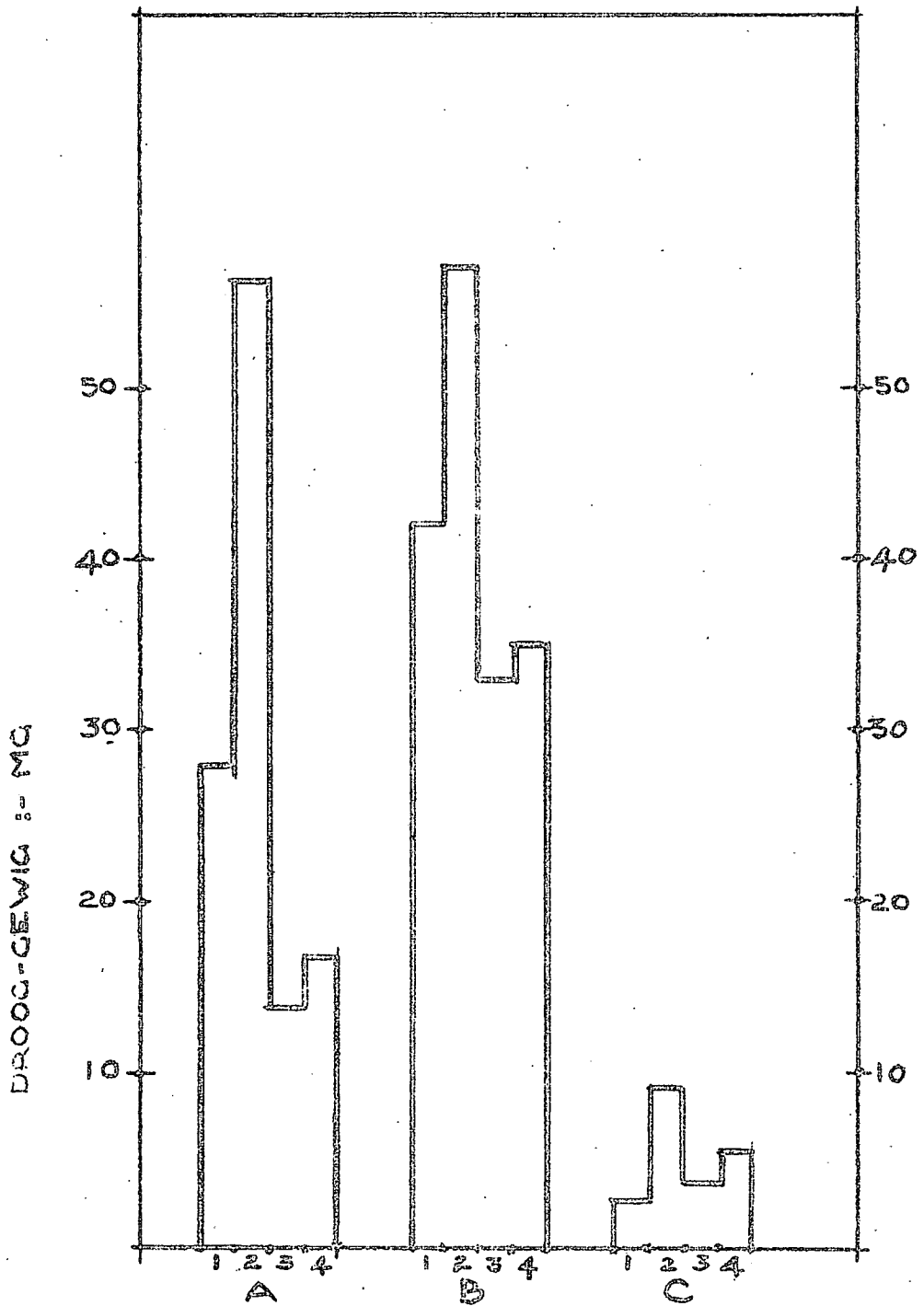


FIG. 6

DROOG-GEWICHT VAN DIE MYCELIUM OP PEPTON (A), TRYPTON (B), EN UREUM (C) IN KOMBINASIE MET VLEISEKSTRAK (1), GISEKSTRAK (2) EN GRONDEKSTRAKTE (3 EN 4). NA 18 DAE (SIEN EKSPERIMENT 3)

as die oplossings wat pepton bevat het. Die enigste uitsondering hier was egter A<sub>2</sub> en B<sub>2</sub> wat gisekstrak bevat het.

Die hoogste waardes wat verkry is, was dan ook op hierdie twee oplossings (A<sub>2</sub> en B<sub>2</sub>) gewees. Dit blyk dus dat gisekstrak sterk groei-bevorderend werk.

Alhoewel groei op pepton met verskillende ekstrakte baie swakker was as wanneer die pepton deur trypton vervang is, is dit egter nie die geval wanneer pepton saam met gisekstrak gebruik word nie. Dit skyn dus asof trypton een of meer faktore bevat wat die groei gunstig beïnvloed, maar dat gisekstrak in so'n mate groeibevorderend werk dat die groei op pepton en trypton geen verskil meer toon nie. Hierdie faktore word blykbaar in 'n maksimale hoeveelheid voorsien deur die gisekstrak aangesien die trypton in hierdie geval geen gunstige effek teenoor pepton getoon het nie. Dat die bestandele van pepton in elk geval van belang is, blyk uit die feit dat op gisekstrak plus ureum (C<sub>2</sub>) baie min groei plaasgevind het.

Gisekstrak is meer groeibevorderend as vleisekstrak, terwyl daar tussen die waardes op die twee grondekstrakte nie groot verskille is nie.

Uit Tabel 3 kan gesien word dat die pH van alle oplossings tot dieselfde waarde (7.3) toegeneem het, behalwe by A<sub>2</sub> en B<sub>2</sub> waar die pH gestyg het tot 7.7. Dit is dan ook die oplossings waarop die beste groei verkry is.

Ten slotte kan dus gesê word dat gisekstrak baie sterker groeibevorderend werk as vleisekstrak, trypton of pepton, maar dat trypton en pepton wel ook van belang is. Trypton gee beter groei as pepton, behalwe in kombinasie met gisekstrak. Ureum kan blykbaar nie as N-bron geassimileer word nie, terwyl die twee grondekstrakte blykbaar nie van belang vir groei is nie.

EKSPERIMENT 3 - GROEI OP 'N PEPTON- EN CZAPEK-MEDIUM MET  
TOEVOEGING VAN TYROSIE EN TRYPTOFAAN

Uit die resultate van eksperiment No.2 het geblyk dat media wat trypton bevat oor die algemeen beter groei gee as media met pepton. 'n Moontlike rede hiervoor is toe gesoek in die samestelling van die twee stowwe soos aangegee in die „Difco Manual". Hieruit het geblyk dat die twee stowwe kwalitatief dieselfde samestelling het, maar verskil in die hoeveelheid waarin die bestandele voorkom. Die bestandele wat die grootste verskille getoon het, was tyrosien en tryptofaan. Trypton bevat nl. 4.39 persent tyrosien en 0.98 persent tryptofaan teenoor die 0.77 persent en 0.29 persent respektiewelik van pepton. Hierdie verskille is nog verder vergroot deurdat in die vorige eksperiment 'n groter hoeveelheid trypton gebruik is om die totale N-konsentrasie van die media dieselfde te kry. In gram per 100 ml. was die verskille dan as volg:-

Trypton - In eksperiment No. 2 is 0.761 gm. trypton per 100 ml. gebruik, wat uitwerk op 0.033 gm. tyrosien en 0.006 gm. tryptofaan.

Pepton - 0.619 gm. is gebruik per 100 ml. en dit werk uit op 0.007 gm. tyrosien en 0.002 gm. tryptofaan. Die medium met trypton bevat dus 0.027 gm. tyrosien en 0.004 gm. tryptofaan meer as die pepton medium.

Proef No. 3 is dus gedoen om vas te stel of toevoeging by pepton van die hoeveelhede tyrosien en tryptofaan, afsonderlik en gesamentlik, wat dit minder bevat as trypton, enige gunstige effek sal hê. Verder is hierdie twee aminosure ook nog by die basiese Czapek-oplossing (wat  $\text{NaNO}_3$  bevat om die N-konsentrasie 0.1 persent te maak) gevoeg. Die aminosure is bygevoeg in die hoeveelhede wat in trypton aanwesig is.

Die eksperiment is as volg saamgestel:-

/ 1. Pepton.....



1. Pepton + tyrosien (0.026 gm./100 ml.)
2. Pepton + tryptofaan (0.004 gm./100 ml.)
3. Pepton + 0.026 gm. tyrosien + 0.004 gm. tryptofaan
4. Czapek + tyrosien (0.033 gm.)
5. Cz. + tryptofaan (0.006 gm.)
6. Cz. + 0.033 gm. tyrosien + 0.006 gm. tryptofaan

groei op 1 - 6 word vergelyk met groei op

7. Trypton alleen (0.5 persent)
8. 0,5 persent Trypton + 0.5 persent gisekstrak
9. Czapek + 0.5 persent gisekstrak.

Die pepton, trypton en gisekstrak is gebruik soos in eksperiment No.2 en die Czapek-oplossing soos in Hoofstuk III aangegee.

Al hierdie oplossings is van dubbele sterkte opgemaak en hiervan is 11.5 ml. per fles gebruik. Die tyrosien- en tryptofaan-oplossings is in viervoudige sterkte opgemaak. 5.75 ml. per fles is gebruik asook 5.75 ml. gedistilleerde water, behalwe in flesse wat beide tyrosien en tryptofaan bevat het. Die oplossings is in 100 ml. Erlenmeyer-flesse gesteriliseer, waarna die kombinasies fosfaat, soos vooraf bepaal, asepties bygevoeg is. Die flesse is daarna geënt en in die inkubator geplaas, by 28 - 30°C. Na 18 dae is die oplossings gefitreer en die droog-gewigte van die mycelia bepaal.

#### RESULTATE

Ongelukkig was in hierdie eksperiment 'n groot aantal flesse verontreinig, en wel alle flesse van die reekse 6 en 7. Die feit dat die sewende reeks met trypton alleen, verontreinig was, maak die waardes wat wel verkry is feitlik waardeloos vir die oorspronklike doel van die eksperiment, nl. om vas te stel of die <sup>goeie</sup> toevoeging van tyrosien en tryptofaan tot pepton net so'n groei sal gee as trypton. Die mycelia-gewigte (in mg.) wat wel verkry is, met die pH-verandering van die media, was soos in Tabel 5 en Fig.6.

VOEG IN TABEL 5 EN FIG. 6(a)

/ Alhoewel.....

TABEL 5

DROOG-GEWIGTE VAN DIE MYCELIA EN DIE VERANDERING VAN DIE pH  
OP DIE VERSKILLENDE OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 3

No.	Droog-gewig (duplikate)			pH-verandering	
	a.	b.	gemid.	voor	na
1	39.2	36.4	37.8	7.0	7.15
2	18.5	-	18.5	7.0	7.18
3	36.0	31.3	33.6	6.95	7.15
4	28.7	27.2	27.95	7.05	7.1
5	18.0	13.4	15.7	7.05	7.0
8	64.5	63.1	63.8	6.9	7.65
9	96.5	99.5	98.0	7.1	7.1

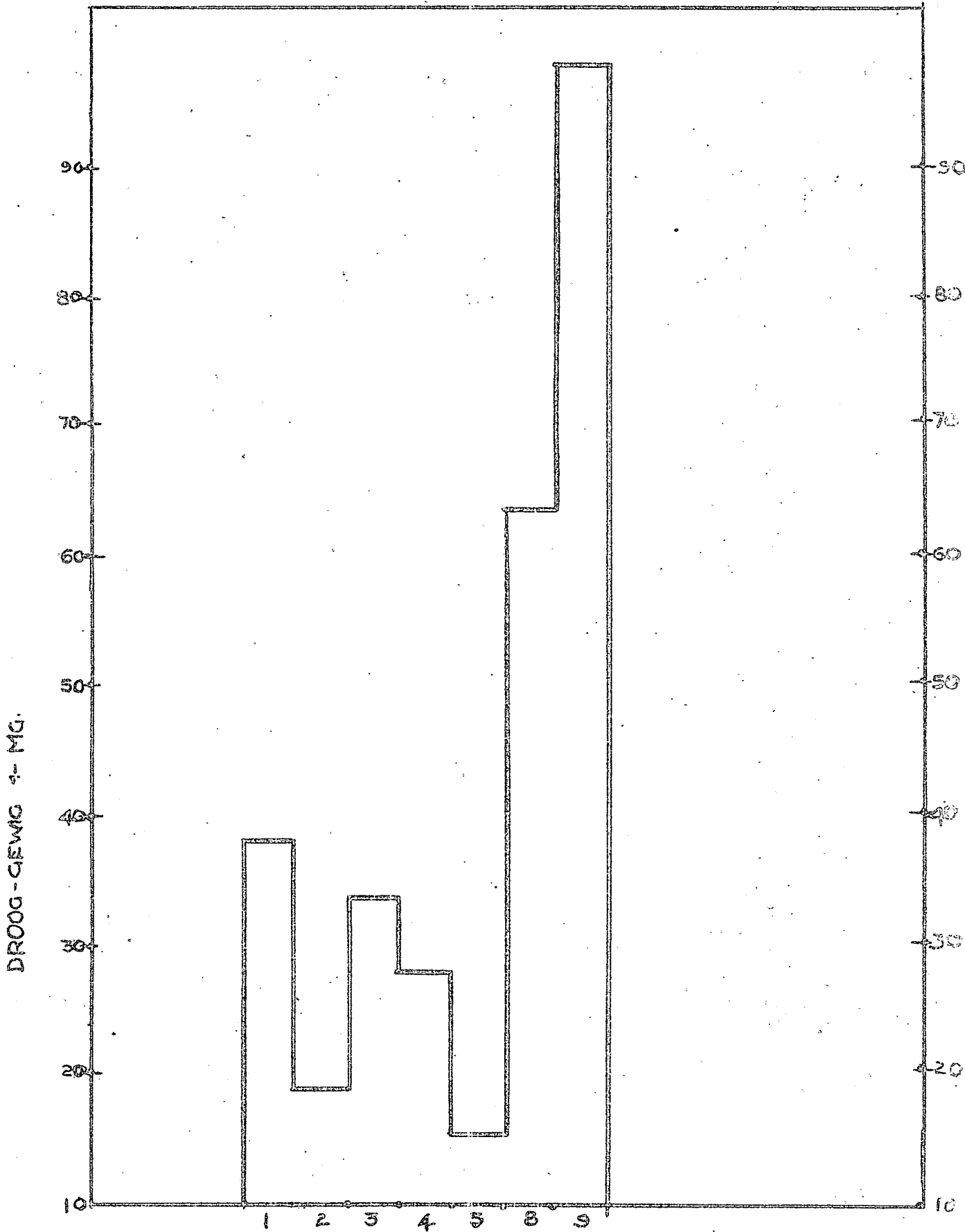


FIG. 6(a)

GEMIDDELDE WAARDES VAN DIE DROOG-GEWIGTE VAN DIE MYCELIA OP DIE  
VERSKILLENDE OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 3

Alhoewel die eksperiment vir die eintlike doel dus minder geslaag was, kan nogtans sekere gevolgtrekkings uit hierdie waardes gemaak word.

Die belangrikste hiervan is die feit dat die beste groei verkry is op die medium bestaande uit Cz + gisekstrak (medium 9). Groei hierop was baie beter as op die medium met trypton en gisekstrak (medium 8). Dit kan heelwaarskynlik toegeskryf word aan die glukose-gehalte van die Czapek-oplossing wat moontlik 'n beter C-bron is as die voorsien deur trypton.

Verder blyk ook dat die pH van die media wat Czapek bevat (4, 5, en 9) geen verandering ondergaan het nie, terwyl die grootste verandering in pH op die medium met trypton (8) plaasgevind het. Die media met pepton (1, 2 en 3) toon ook 'n toename in pH, alhoewel dit nie so groot is nie. Dit blyk dus of pepton, maar veral trypton, alkali-vorming in die hand werk.

'n Verdere gevolgtrekking wat gemaak kan word is dat die media waarby tyrosien gevoeg is, nl. 1 en 4, beter groei gegee het as die media met tryptofaan (2 en 5). In teenstelling hiermee egter het die medium 3 met tyrosien en tryptofaan 'n effens laer waarde gegee as medium 1.

Groei wel op Cz met tyrosien of tryptofaan, alhoewel baie swak.

#### EKSPERIMENT 3A - INVLOED VAN UREUM-KONSENTRASIE OP GROEI

Na aanleiding van die uiters swak groei wat in eksperiment 2 op ureum-bevattende oplossings gekry is, en die fungus oorspronklik op ureum agar gevind is, is hierdie proef gedoen om vas te stel of sterker konsentrasies van ureum dalk 'n beter groei sal gee. Die verskillende ureum konsentrasies om 0.1 persent, 0.4 persent, 0.6 persent, 0.8 persent en 1.0 persent N te gee, is gevoeg by vleis-, gis- en grondekstrak (gemaak soos vroeër beskryf). Nadat die oplossings gesteriliseer en buffers hieraan toegevoeg is, is hulle geënt en gekubeer vir 18 dae by 28 - 30°C.

/Groei.....

Groei was egter so swak op vleis- en grondekstrak, dat hulle nie gefiltreer is nie. Die droog-gewigte is slegs bepaal van die oplossing met gisekstrak, en was as volg:-

Ureum konsentrasie	0.1	0.4	0.6	0.8	1.0 persent
	3.4	2.8	3.2	7.6	4.9 mg.
	-	3.6	3.9	7.3	3.0 mg.

Hier kan dus nogeens nie daarin geslaag word om enige gunstige effek van ureum op die groei van die fungus vas te stel nie, aangesien baie weinig groei verkry is. 0.8 persent skyn die optimum konsentrasie te wees, en is toevallig ook die konsentrasie soos in ureumagar gebruik. Verder is dit ook opvallend dat die gebruikte grondekstrak geen groei tot gevolg gehad het nie.

In elk geval sou op die oplossings met gisekstrak baie meer groei verwag word, ten spyte van ander stowwe aan-of afwesig, aangesien op 'n agarplaat wat net uit gisekstrak bestaan het, goeie groei verkry is. Dit is dus nie onmoontlik dat ureum 'n remmende werking op die groei het nie.

#### EKSPERIMENT 4 - INVLOED VAN VITAMIENE OP GROEI

Na aanleiding van die goeie groei wat in eksperiment 2 en 3 verkry is op oplossings bevattende gisekstrak, trypton en pepton, is die fungus vervolgens gekweek op verskillende vitamien-oplossings om vas te stel of dit enige van die vitamien nodig het om te groei. Stokes en medewerkers (79) het nl. aangetoon dat stowwe soos pepton, trypton en veral gisekstrak, ryk is aan vitamien.

Om na te gaan of van die vitamien enige invloed op die groei uitoefen, is hulle op twee verskillende maniere getoets, nl. (A) in kombinasies waaruit in elke reeks een vitamien weggelaat word, en (B) in reekse waarby slegs een vitamien per reeks gevoeg is. Die invloed van die volgende vitamien

/is.....

is nagegaan: - thiamien, biotien, pyridoxien, pantotheensuur, inositol, riboflavin, nikotiensuur en para-amino-benzoësuur (P.A.B.A.), en groei hierop is vergelyk met die groei op Czapek-oplossings en Czapek-oplossings plus gisekstrak.

In Table 6 word die kombinasies van vitamienes weergegee wat verskillende ondersoekers gebruik het, en daaruit blyk dat daar groot verskille in die gebruikte konsentrasies is.

#### VOEG IN TABEL 6

In die algemeen egter is dit duidelik dat biotien slegs in baie klein hoeveelhede gebruik word, terwyl inositol in groot hoeveelhede nodig is. In hierdie eksperimente is die vitamienes in die volgende konsentrasies gebruik: - 200 $\gamma$ /liter vir alle vitamienes, behalwe biotien (0.4 $\gamma$ /liter) en inositol (500 $\gamma$ /liter). Per fles (25 ml.) is dus gebruik 0.01 $\gamma$  biotien, 12.5 $\gamma$  inositol en 5 $\gamma$  van die ander genoemde vitamienes.

A. Hierdie proef is as volg saamgestel: -

1. Czapek-oplossing + 8 vitamienes
2. Soos 1 minus P.A.B.A.
3. Soos 1 minus nikotiensuur
4. Soos 1 minus riboflavin
5. Soos 1 minus inositol
6. Soos 1 minus pantotheensuur
7. Soos 1 minus pyridoxien
8. Soos 1 minus biotien
9. Soos 1 minus thiamien
10. Czapek-oplossing + 0.5 persent gisekstrak
11. Slegs Czapek-oplossing.

Die vitamien oplossings word as volg opgemaak: -

Biotien	: 1 mg./100 ml., 1 ml. hiervan verdun tot 100 ml., d.i. 0.01 $\gamma$ /1 ml.
Inositol	: 1 mg./80 ml. d.i. 12.5 $\gamma$ /1 ml.
Res	: 1 mg./200 ml. d.i. 5.0 $\gamma$ /1 ml.

/ Reeks 1.....

TABEL 6

KONSENTRASIE VAN VITAMIEË (IN γ PER LITER) SOOS DEUR  
VORIGE ONDERSOEKERS GEBRUIK

1. Burkholder (10)
2. Villela (86)
3. Kuehner (46)
4. Barnett (5)
5. Schopfer (71)
6. Konsentrasie in eksperiment 4 gebruik.

	1	2	3	4	5	6
thiamien	300	5.0	200	100	40	200
biotien	0.4	0.01	0.2	5.0	0.1	0.4
pyridoxien	200	5.0	200	100	40	200
pantotheensuur	200	5.0	200	-	6.0	200
inositol	500	5.0	1,000	5,000	5,000	500
riboflavien	100	5.0	100	-	-	200
nikotiensuur	500	5.0	-	-	-	200
askarbiensuur	500	-	-	-	-	200
P.A.B.A.	-	5.0	100	-	-	200

Reeks 1 kry dan per fles 11.5 ml. Czapek-oplossing van dubbele sterkte, 8 ml. vitamieene en 3.5 ml. gedistilleerde water.

Reekse 2 - 9 kry 11.5 ml. Czapek-oplossing, 7 ml. vitamieene en 4.5 ml. gedistilleerde water.

Reeks 10 kry 11.5 ml. Czapek-oplossing en 11.5 ml. 1 persent gisekstrak oplossing.

Reeks 11 kry 11.5 ml. Czapek-oplossing en 11.5 ml. gedistilleerde water.

Die oplossings is in die Erlenmeyerflesse gesteriliseer waarna 2 ml. van die steriele fosfaat-oplossings bygevoeg is. Kombinasies van die twee fosfaat-oplossings om die gewenste pH te gee, is soos voorheen vooraf bepaal. Daarna is die pH van die oplossings bepaal (Sien Tabel 7).

#### VOEG IN TABEL 7

Die flesse is vervolgens geënt met 'n ogievol van 'n konidieë-suspensie van die fungus wat op N.A. gegroei het.

B. In die tweede proef is die vitamieene slegs een op 'n slag by die Cz-oplossing gevoeg. In hierdie geval is van 'n negende vitamien, nl. askorbiensuur ook gebruik gemaak, wat nie die geval in A was nie. Die askorbiensuur is ook gebruik in 'n konsentrasie van 200  $\mu$ /liter. Die verskillende reekse is as volg opgestel:-

1. Czapek-oplossing + 9 vitamieene
2. Czapek-oplossing + P.A.B.A.
3. Czapek-oplossing + askorbiensuur
4. Czapek-oplossing + nikotiensuur
5. Czapek-oplossing + riboflavin
6. Czapek-oplossing + inositol
7. Czapek-oplossing + pantotheensuur
8. Czapek-oplossing + pyridoxien
9. Czapek-oplossing + biotien
10. Czapek-oplossing + thiamien

/ 11. Czapek.....



TABEL 7

pH VAN DIE VITAMIEN OPLOSSING VAN EKSPERIMENT 4 NA  
FOSFAATTOEVOEGING

Oplossings	Triplikate		
	a.	b.	c.
1	7.0	7.0	7.1
2	6.95	6.6	7.1
3	7.05	6.95	7.05
4	7.05	7.05	7.05
5	7.0	7.1	7.1
6	7.1	7.15	7.15
7	7.1	7.1	7.7
8	7.05	7.05	7.1
9	7.05	7.05	7.2
10	7.0	7.05	7.05
11	7.0	7.05	7.1

11. Czapek-oplossing + 0.5 persent gisekstrak

12. Slegs Czapek-oplossing.

In hierdie geval kry reekse 2 - 10 behalwe die 11.5 ml. Czapek-oplossing slegs 1 ml. vitamien-oplossing, en die res word dus aangevul met gedistilleerde water. Verdere behandeling net soos vir proef A.

In albei gevalle, A en B, is die flesse in die inkubator gehou vir 18 dae by 28 - 30°C.

#### RESULTATE

A. Die droog-gewigte van die mycelia op die vitamien-oplossings van proef A word weergegee in Tabel 8.

#### VOEG IN TABEL 8

B. Die oplossings van proef B is nie gefiltreer nie en die droog-gewigte dus nie bepaal nie.

Wanneer die waardes van 1 - 9 in Tabel 8 vergelyk word met die waardes wat op 11 (slegs Cz-oplossing) en 10 (Cz-oplossing en gisekstrak) gekry is, is dit duidelik dat die vitamien geen noemenswaardige invloed op die groei van hierdie fungus het nie. Die verskille wat daar wel tussen die reekse is, is so klein, en die verskille tussen triplike so groot, dat hulle nie van veel betekenis kan wees nie.

Dieselfde resultate is verkry met die tweede proef (B). Groei was op die vitamien-oplossings 1 - 10 net so weinig as op die Czapek-oplossing (12), en wel so gering dat dit geen sin gehad het om die droog-gewigte daarvan te bepaal nie.

'n Mens kan dus geredelik tot die gevolgtrekking dat hierdie fungus geen uitwendige bron van enige van hierdie vitamien nodig het nie, en dus in staat moet wees om hulle te sintetiseer.

TABEL 8

DROOG-GEWICHTEN IN MG. VAN DIE MYCELIA OP DIE VERSKILLENDE  
VITAMIEN-OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 4A

a, b, en c is die waardes van triplikate.

No.	a.	b.	c.	gemid.
1	8.6	7.2	-	7.9
2	5.4	9.5	3.1	6.0
3	8.9	7.4	6.0	7.4
4	10.1	16.4	9.1	11.9
5	8.5	7.2	12.9	9.5
6	-	8.5	6.6	7.0
7	11.7	6.9	9.0	9.2
8	15.5	13.9	8.5	12.6
9	10.8	7.1	9.6	9.2
10	100.1	84.9	91.8	92.3
11	8.0	4.5	5.5	6.0

EKSPERIMENT 5 - INVLEOD VAN VERSKILLENDE KONSENTRASIES VAN GISEKSTRAK

Uit die vorige eksperiment het geblyk dat die fungus nie een van die 9 vitamienes wat getoets is, nodig het vir groei nie. Die moontlikheid het egter nog bestaan dat die fungus een of meer ander groeifaktore wat in gisekstrak aanwesig is, nodig mag hê. Indien dit die geval is, sou dit aangetoon kon word deur verskillende verdunnings van gisekstrak te gebruik, aangesien die groeifaktore of vitamienes slegs in baie klein hoeveelhede nodig is om die groei gunstig te beïnvloed.

Hierdie eksperiment is dus gedoen om die groei by verskillende konsentrasies van gisekstrak na te gaan. In teenstelling met vorige eksperimente is in hierdie geval gebruik gemaak van agar-plate en die groei daarop bepaal deur daaglik die diameter van die kolonies te meet.

Ek het nl. verwag dat die resultate en gevolgtrekkings moontlik gouer gemaak sal kan word as wat met die ander metode die geval is. (Aangesien die tydrowende filtreer en weeg vermy kan word) Dit blyk egter dat die metode van groeimetings op agar-plate nie vinniger is as die kultuurmetode op vloeistof nie en dat dit buitendien nog ander nadele het wat later bespreek word. Die enigste voordeel is dat die groei-toename daaglik vasgestel kan word.

METODE

Die Czapek-oplossing is van dubbele sterkte gemaak, terwyl 'n 1 persent gisekstrak-oplossing gemaak is. Die verskillende media is opgemaak deur 25 ml. Cz-oplossing en veranderende hoeveelhede gisekstrak-oplossing in flesse te voeg en die totaal op te maak tot 50 ml. met gedistilleerde water. Verder is 1.5 persent Bacto-agar by elke fles gevoeg.

Hieronder volg die konsentrasies van gisekstrak wat gebruik is en die hoeveelhede daarvan wat per reeks bygevoeg is om sodanige konsentrasie te verkry:-

/ (1) 2.0 persent....

- (1) 2.0 persent - 25 ml. Cz. + 1.0 gm. gisekstrak + 25 ml. aq. dist
- (2) 1.0 persent - 25 ml. Cz. + 0.5 gm. gisekstrak + 25 ml. aq. dist
- (3) 0.5 persent - 25 ml. Cz. + 25 ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 0 ml. aq. dist.
- (4) 0.2 persent - 25 ml. Cz. + 10 ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 15 ml. aq. dist.
- (5) 0.1 persent - 25 ml. Cz. + 5.0 ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 20 ml. aq. dist.
- (6) 0.05 persent - 25 ml. Cz. + 2.5 ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 22.5 ml. aq. dist.
- (7) 0.02 persent - 25 ml. Cz. + 1.0 ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 24.0 ml. aq. dist.
- (8) 0.01 persent - 25 ml. Cz. + 0.5 ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 24.5 ml. aq. dist.
- (9) 0 persent. - 25 ml. Cz. + geen ml. van 1 persent gisekstrak-oplossing + 25.0 ml. aq. dist.

Na toevoeging van die agar is hierdie oplossings gesteriliseer, waarna dit gebuffer en die pH-gestel is d.m.v. die fosfaat-oplossing. Aangesien die oplossings agar bevat het, moes dit in 'n gesmelte toestand gehou word, en dit het veroorsaak dat presipitate gevorm is by toevoeging van die fosfate. Die agar-oplossing van elke reeks is vervolgens gegiet in drie plate wat, nadat die agar styf geword het, in die sentrum geënt is met 'n ogievol van 'n konidieë-suspensie. Die plate is vervolgens geinkubeer by 28 - 30°C. Vanaf die tweede dag is die deursnee van die kolonies daaglik gemeet.

#### RESULTATE

Die daaglikse diameter in mm. van die kolonies word aangegee in Tabel 9 en grafies voorgestel in Fig. 7, 8 en 9.

#### VOEG IN TABEL 9 EN FIG. 7, 8 EN 9

Die grafieke is getrek van die gemiddelde van die drie waardes. Daar was goeie ooreenstemming tussen die waardes van triplikate. Een plaat van elk van die reekse 2, 3 en 4 was verontreinig.

TABEL 9

DIAMETER IN MM. VAN KOLONIES OP PLATE MET VERSKILLENDE KONCENTRASIES GISEKSTRAK,  
VANAF 2DE TOT 20STE DAG EN OOK OP SINTETIESE GISEKSTRAK (SIEN EKSPERIMENT 5)

AANTAL DAE

Konsentrasie	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 2.0%	7	11	15	18	22	25	30	33	36	40	44	47	51	54	58	61	64	68	70
	6	10	14	18	21	25	29	33	37	42	45	50	54	59	65	68	72	76	80
	8	11	14	18	23	27	30	34	38	42	47	50	53	57	62	64	67	69	70
Gemiddeld	7.0	10.7	14.3	18.0	22.0	25.7	29.7	33.3	37.0	41.3	45.3	49.0	52.7	56.7	61.7	64.3	67.7	71.0	73.3
2 1.0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	10	14	17	22	25	30	33	37	41	45	49	53	57	62	65	67	70	76
	7	11	15	19	23	26	30	34	38	42	46	50	53	57	61	63	65	67	70
Gemiddeld	7.0	10.5	14.5	18.0	22.5	25.5	30.0	33.5	37.5	41.5	45.5	49.5	53.0	57.0	61.5	64.0	66.0	68.5	73.0
3 0.5%	7	10	14	17	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	10	13	17	21	24	28	32	34	39	43	46	49	52	55	58	59	60	62
	6	10	13	16	21	23	28	29	32	35	39	43	47	49	52	56	58	60	66
Gemiddeld	6.0	10.0	13.3	16.7	20.7	23.5	28.0	30.5	33.0	37.0	41.0	44.5	48.0	50.5	53.5	57.0	58.5	60.0	64.0
4 0.2%	6	9	13	16	19	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	10	13	16	20	23	27	32	32	35	38	42	46	48	51	54	56	59	62
	6	10	14	17	21	24	29	30	36	38	42	45	49	52	55	55	58	59	62
Gemiddeld	6.0	9.7	13.3	16.3	20.0	22.7	28.0	31.0	34.0	36.5	40.0	43.5	47.5	50.0	53.0	54.5	57.0	59.0	62.0
5 0.1%	6	9	13	16	19	22	25	28	31	33	36	39	43	47	49	52	55	56	61
	7	10	14	16	19	22	25	28	31	33	37	40	43	46	49	51	53	56	59
	6	10	13	17	20	24	28	30	32	37	41	44	46	51	54	53	57	61	62
Gemiddeld	6.3	9.7	13.3	16.3	19.3	22.7	26.0	28.7	31.3	34.3	38.0	41.0	44.0	48.0	50.7	52.0	55.0	57.7	60.7
6 0.05%	6	9	12	15	18	21	23	26	29	30	33	35	39	41	43	46	49	49	53
	5	8	11	14	17	20	23	25	28	30	34	36	40	42	44	46	48	49	51
	6	9	12	15	18	21	23	25	28	30	33	36	40	42	45	48	50	52	56
Gemiddeld	5.7	8.7	11.7	14.7	17.7	20.7	23.0	25.3	28.3	30.0	33.3	35.7	39.7	41.7	44.0	46.7	49.0	50.0	53.3

Konsentrasie	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
7 0.02%	6	9	13	15	18	20	24	27	28	31	31	36	37	38	40	44	47	48	50
	6	9	12	14	17	20	23	25	27	30	32	35	37	39	41	44	47	49	50
	6	9	11	14	17	20	23	25	27	30	34	35	38	40	43	-	-	-	-
	Gemiddeld	6.0	9.0	12.0	14.3	17.3	20.0	23.3	25.7	27.3	30.3	32.3	35.3	37.3	39.0	41.3	44.0	47.0	48.5
8 0.01%	6	9	11	15	18	21	23	25	28	31	33	36	38	39	40	42	44	45	47
	6	9	11	14	17	20	23	25	28	30	33	36	38	40	42	44	47	49	50
	6	9	12	14	17	21	23	25	28	30	34	36	38	41	42	46	49	50	51
	Gemiddeld	6.0	9.0	11.3	14.3	17.3	20.7	23.0	25.0	28.0	30.3	33.3	36.0	38.0	40.0	41.3	44.0	46.7	48.0
9 0%	5	8	11	14	17	20	22	25	27	30	33	36	39	41	44	46	49	51	54
	6	10	12	15	18	20	22	25	27	31	32	36	37	40	40	43	44	47	48
	5	9	11	15	18	20	22	25	27	30	32	34	35	38	40	40	44	47	48
	Gemiddeld	5.3	9.0	11.3	14.7	17.7	20.0	22.0	25.0	27.0	30.3	32.3	35.3	37.0	39.7	41.3	43.0	45.7	48.3
10	8	11	13	15	17	19	22	24	26	28	30	31	33		36				
	7	11	13	15	17	19	21	23	26	28	30	32	34		-				
	6	8	10	13	15	16	19	21	23	26	27	29	32		36				
	Gemiddeld	7.0	10.0	12.0	14.3	16.3	18.0	20.7	22.7	25.0	27.3	29.0	30.7	33.0		36.0			
11	5	9	12	16	20	24	26	29	31	32	35	39	40	43	44	48			
	5	9	13	16	20	24	26	29	31	35	35	39	40	43	46	47			
	3	7	11	15	20	23	25	28	30	32	35	37	38	41	43	45			
	Gemiddeld	4.3	8.3	12.0	15.7	20.0	23.7	25.3	28.7	30.7	33.0	35.0	38.3	39.3	42.3	44.3	46.7		
12	7	10	12	14	16	18	21	22	24	27	29	30	33		36				
	7	10	12	14	16	18	20	23	25	28	30	32	34		43				
	7	10	13	14	17	18	20	23	24	27	30	32	34		45				
	Gemiddeld	7.0	10.0	12.3	14.0	16.3	18.0	20.3	22.7	24.3	27.3	29.7	31.3	33.7		41.3			

- 45 (a) -

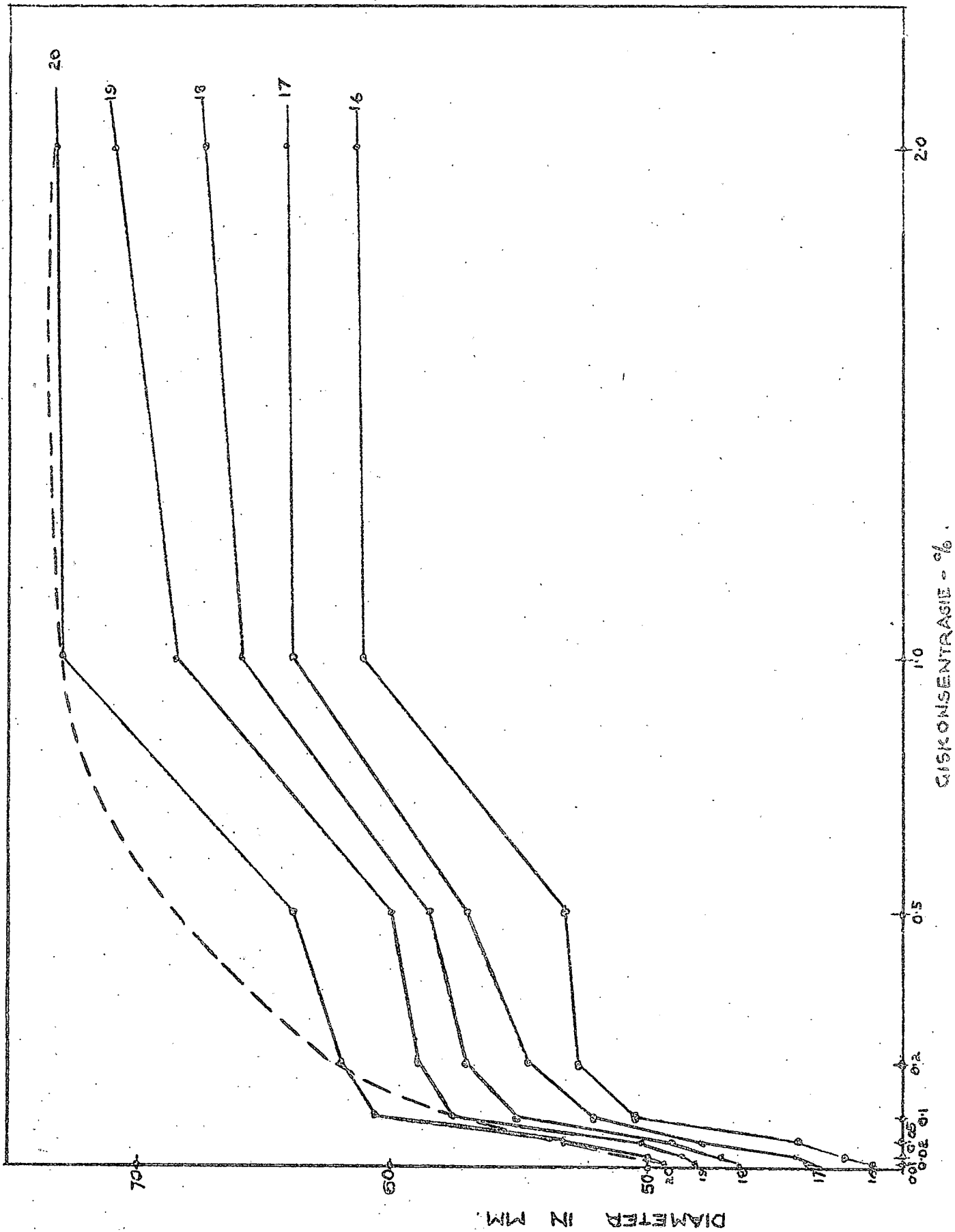


FIG. 7

DIAMETER IN MM.

GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE DIAMETER VAN DIE KOLONIES NA 17, 18, 19 EN 20 DAE TEENoor DIE PERSENT GISKONSENTRASIE (SIEN EKSPERIMENT 5)



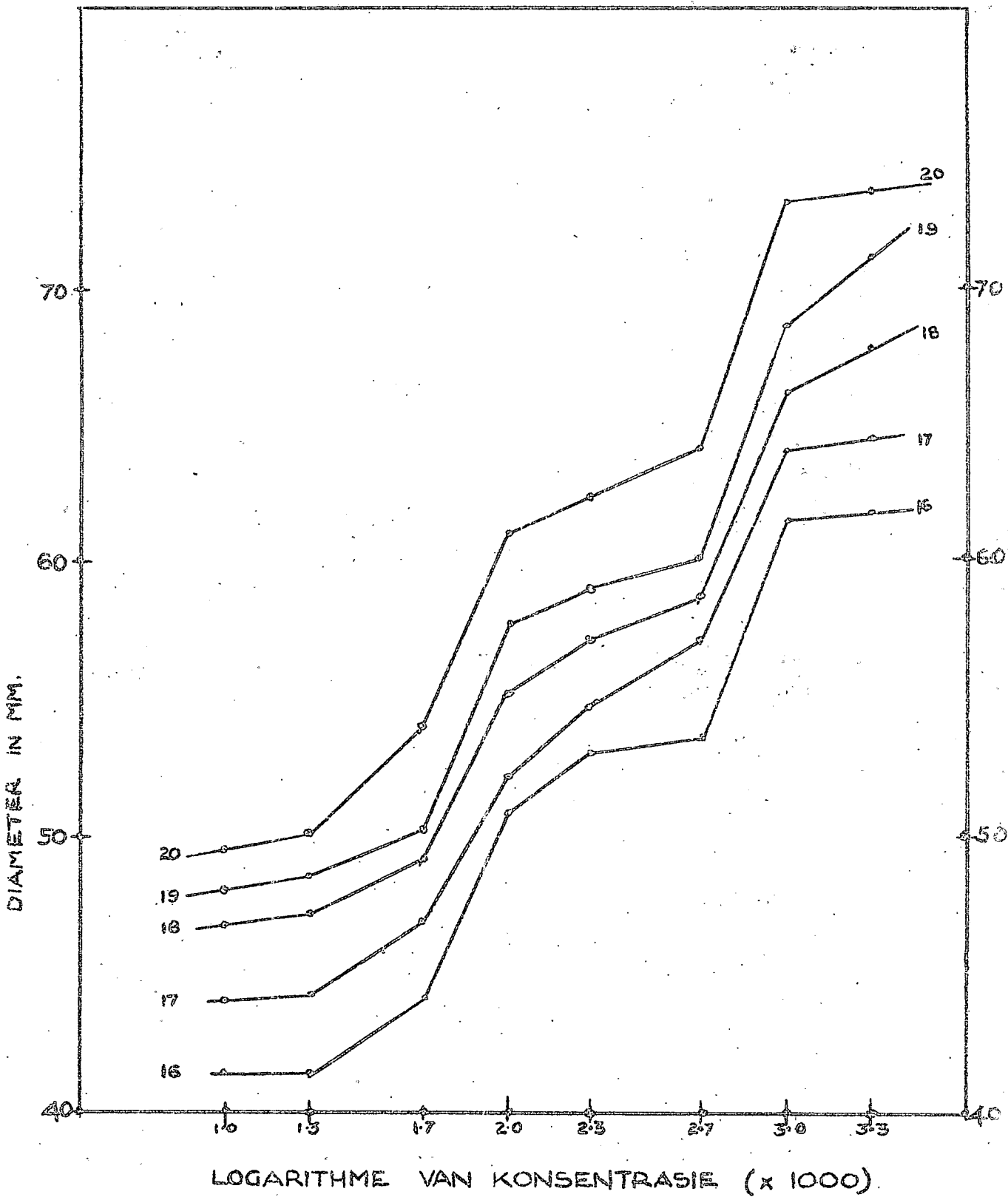
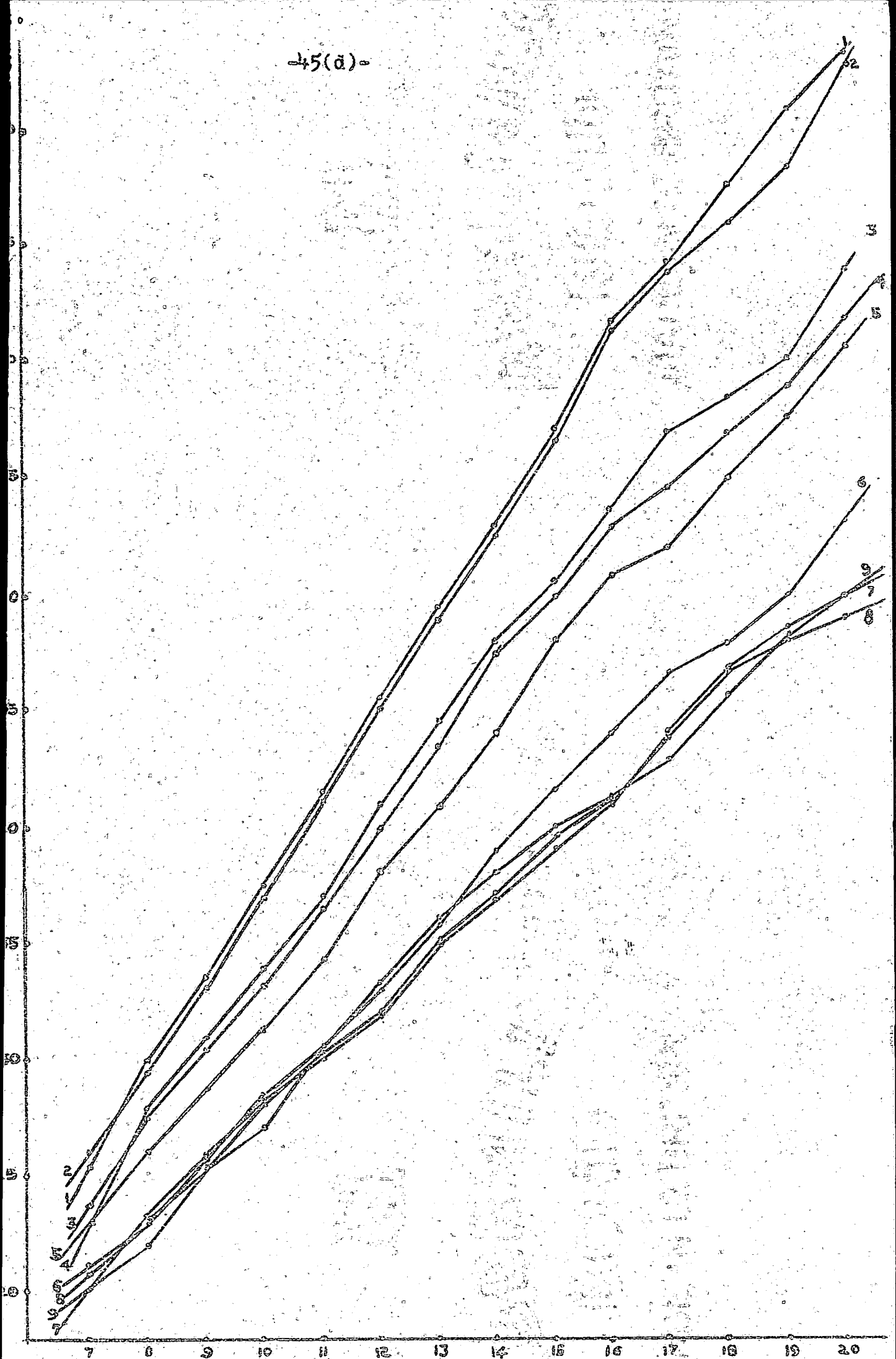


FIG. 8

GRAFIESE VOORSTELLING VAN DIE DIAMETER VAN DIE KOLONIES  
NA 16, 17, 18, 19 EN 20 DAG TEENOR DIE LOGARITME VAN  
KONSENTRASIE (SIEN EKSPERIMENT 5)

-45(d)-



AANTAL DAE

FIG. 9

TOENAME IN DIAMETER VAN KOLONIES BY VERSKILLENDE G2 KONSENTRASIES  
VANAF DIE 7DE TOT DIE 20STE DAE (SIEN EKSPERIMENT 5)

1. In Fig. 7 is die diameter van die kolonies voorgestel as 'n funksie van die giskonsentrasie.

Wanneer die krommes in hierdie figuur volgens die algemene neiging geteken word, word min of meer 'n gelykenis met 'n logaritmiese kromme verkry. Wanneer dit egter volgens die werklike punte geteken word, is daar 'n duidelike min of meer horisontale gedeelte wat as 't ware 'n knik in die kromme veroorsaak.

2. Indien dit egter werklik 'n logaritmiese funksie sou wees, sou by die afsetting van die diameter teenoor die logaritme van die konsentrasie, min of meer 'n reguit lyn verkry moet word. Dit is gedoen in Fig. 8. Hieruit blyk dat die kromme nie 'n reglyne neiging het nie, maar dat die knikke in die lyne eerder duideliker as minder duidelik word. Daar is ook geen aanduiding dat die knikke met verloop van tyd mag verdwyn nie. Dit sou daarop wys dat die knikke moontlik nie aan eksperimentele foute te wyte mag wees nie, maar wel een of ander betekenis mag hê.

3. Die diameter van die kolonies is vervolgens afgesit teenoor die tyd, soos in Fig. 9. Uit hierdie grafiek blyk dat daar nie baie groot verskille is tussen die waardes van die konsentrasies 6, 7, 8 en 9 (0.05, 0.02, 0.01 en 0 persent) nie. Die waardes vir die volgende konsentrasie, nl. 5 (0.1 persent), is egter heelwat hoër as vir die voriges, sodat daar 'n duidelike „sprong” in die grafiek voorkom. Die waardes vir 5, 4, en 3 (0.1, 0.2 en 0.5 persent) is weer min of meer dieselfde, terwyl daar tussen 3 en 2 (0.5 en 1.0 persent) weer 'n duidelike sprong is. Die waardes van 2 en 1 (1.0 en 2.0 persent) is weer ongeveer dieselfde. Die waardes is dus as volg saam gegroepeer: 6, 7, 8 en 9 en 3, 4 en 5 en 1 en 2. Dit vertoon in die figuur as 3 duidelik van mekaar verskillende bundels van lyne.

/ Hierdie.....

Hierdie groepering en verskil tussen die groepe word definitief bewys deur die statistiese analiese van die regressie-lyne wat aan die einde van hierdie eksperiment aangegee word. (Sien later).

Die oorsaak van die „spronge“ is onduidelik, aangesien die giskonsentrasie taamlik eweredig versprei is. Elke konsentrasie is nl. ongeveer die helfte van die konsentrasie net hoër, of ongeveer tweemaal die waarde van die laer konsentrasie. 'n Moontlike rede vir hierdie spronge kan wees dat by die laer konsentrasies van 0.1, 0.01, 0.02 en 0.05 persent, 'n sekere faktor beperkend is wat dan by 'n konsentrasie van 0.1 persent sodanig vermeerder word (bo die drempelwaarde kom) dat dit 'n taamlike toename in groei kan gee. Hierna kan 'n ander faktor of groep van faktore weer beperkend wees wat eers by 'n konsentrasie van 1.0 persent voldoende aanwesig is om 'n verdere duidelike toename te gee.

Die diameter van die kolonies alleen gee egter nie 'n volledige beeld van die groei van die kolonies aangesien hulle geen aanduiding van die digtheid van groei gee nie. In werklikheid was die groei op die reekse 6 - 9 baie swakker as wat deur die waardes aangetoon word. Hieronder volg dus 'n visuele vergelyking van die groei op die verskillende plate. Daar kan net gemeld word dat 'n sodanige vergelyking die gevolgtrekkings wat hierbo gemaak is eerder versterk as weerspreek.

Groei is by verreweg die beste op reekse 1 en 2 en dig oor die hele plaat versprei. Dit kolonies lyk effens roomkleurig (dit kan miskien 'n kontraswerking wees deurdat hierdie media taamlik donkerbruin is) en donkerder as op die plate van ander reekse, waarvan die oppervlakte van die mycelium spierwit was. Die kolonies is in die middel, vir 'n diameter van ongeveer 15 mm. rondom die entplek, taamlik tou-agtig, d.w.s. hier is heelwat lug mycelium wat in toue gegroeper is en konidië dra. Tussen 1 en 2 is geen verskil sigbaar nie.

/ Vir.....

Vir reekse 3, 4 en 5 is daar op die oog baie weinig verskil in groei van die verskillende kolonies. Groei is hier egter baie duidelik swakker as op reekse 1 en 2, maar baie beter as die groei op reekse 6 tot 9. Tussen reekse 5 en 6 is daar baie duidelik 'n groot verskil in groei. Konidië-vorming op 3, 4 en 5 is goed.

Vanaf reeks 6 to 9 neem die groei en konidië-vorming geleidelik af en is dit baie swakker as op reekse 1 tot 5. Op reeks 9 is die groei uiters swak. Die kolonies is yl en deurskynend en baie min konidië word gevorm. Die konidië wat wel gevorm word ontstaan in die middel rondom die plek van enting.

Die kolonies van reeks 8 is ook swak, maar minder deurskynend en met meer konidië-vorming. Groei op reekse 6 en 7 ongeveer soos op 8.

Gelyktydig met hierdie eksperiment is die fungus ook geënt op agar plate van 'n „sintetiese" gisekstrak wat berei is op grond van die gegewens wat op versoek verstrekk is deur die Difco laboratoria (20). Hulle gee nl. die volgende analiese van die gisekstrak wat deur hulle vervaardig word:- (Sien Tabel 10).

In dieselfde tabel word ook die hoeveelhede van die verskillende bestanddele aangegee wat per liter gebruik is, en 'n 0.5 persent oplossing gee. Threonien was nie beskikbaar nie en is dus nie bygevoeg nie. Kalium en fosfor is voorsien deur die buffers wat gebruik word, terwyl die elemente Si, Pb en As, waarvan die funksie onbekend is, nie toegevoeg is nie. Afsonderlike oplossings is gemaak van die vitamene, aminosure en soute, en wel so dat hulle wanneer saamgevoeg 'n oplossing van dubbele sterkte gee. By 25 ml. van hierdie oplossing van dubbele sterkte is 25 ml. Czapek-oplossing, ook van dubbele sterkte, gevoeg, asook 0.75 gm. Bacto-agar. Voor sterilisasie is die pH van die oplossing eers gestel op  $\pm$  7 d.m.v. NaOH en na sterilisasie met fosfate. Aminosure maak die oplossings te suur, en veroorsaak dan hidrolise van die agar. Aangesien die /fosfate....

TABEL 10

1. SAMESTELLING VAN BACTO-GISEKSTRAK  
 2. GEWIG GEBRUIK PER LITER VIR 'N 0.5 PERSENT  
OPLOSSING (eksperiment 5)

Bestanddele	1	2
	percent	
As	10.1000	
Totale N	9.1800	
Chloriedes	0.1900	
Swael (totaal)	1.3900	
Fosfor	0.8900	
Yster	0.0200	FeSO <sub>4</sub> - 1.0 mg.
SiO <sub>2</sub>	0.0520	
Kalium	0.0420	
Natrium	0.3200	NaCl - 16.0 mg.
Magnesium	0.0300	MgSO <sub>4</sub> - 1.5 mg.
Kalsium	0.0406	CaCl <sub>2</sub> - 2.0 mg.
Lood	16.00 ppm	
Arseen	0.11 ppm	
Mangaan	7.80 ppm	MnSO <sub>4</sub> - 0.01 mg.
Sink	88.00 ppm	ZnSO <sub>4</sub> - 0.01 mg.
Koper	19.00 ppm	CuCl <sub>2</sub> - 0.01 mg.
	percent	
Arginien	0.78	40.0 mg.
Asparagiensuur	5.10	250.0 mg.
Glutamiensuur	6.50	3250.0 mg.
Glycien	2.40	1250.0 mg.
Histidien	0.94	50.0 mg.
Isoleucien	2.90	150.0 mg.
Leucien	3.60	180.0 mg.
Lysien	4.00	200.0 mg.
Methionien	0.79	40.0 mg.
Fenielalanien	2.20	110.0 mg.
Threonien	3.40	-
Tryptofaan	0.88	450.0 mg.
Tyrosien	0.60	30.0 mg.
Valien	3.40	175.0 mg.
Gamma per gram		
Biotien	1.4	7.0 %
Thiamien	3.2	32.0 %
Nikotiensuur	279.0	1250.0 %
Riboflaviën	19.0	100.0 %
Pyrodoxien	20.0	100.0 %

fosfaat-buffers bygevoeg moes word terwyl die agar in 'n gesmelte toestand en dus warm was, kon die vorming van presipitate nie verhoed word nie. Drie plate is van elke reeks gegiet.

Drie verskillende gis-oplossings is gemaak, t.w.

10. volledige sintetiese gis (soos in tabel 10)

11. sintetiese gis sonder die aminosure

12. sintetiese gis sonder die vitamienes.

'n Kenmerk van die sintetiese gisekstrak soos hierbo berei, is dat dit na sterilisasie 'n bruin kleur vergelykbaar met die van oplossings 1 en 2 gehad het, en dat dit ook 'n soortgelyke reuk as die natuurlike gisekstrak gehad het.

Die deursnee van <sup>die</sup> kolonies op hierdie media word ook weergegee in Tabel 9. In hierdie geval is die waardes baie misleidend aangesien die fungus op medium 11 baie swak gegroei het en vergelykbaar was met die op 9. Op media 10 en 12 daarenteen het die kolonies nie so vinnig gesprei nie en die diameter was dus nie groot nie, maar die digtheid van groei was besonder goed en vergelykbaar met die op media 1 en 2.

Dit blyk dat die fungus goed kan groei in die afwesigheid van vitamienes, maar nie wanneer die aminosure uitgelaat word nie.

Opsommend kan dus gesê word dat hierdie eksperiment definitief aangetoon het dat die fungus nie groeifaktore of vitamienes nodig het om te groei nie. Dit is egter duidelik dat daar 'n gisekstrak faktor aanwesig is wat 'n voordelige invloed op die groei uitoefen, maar dat dit by konsentrasies laer as 0.1 persent nie in genoegsame hoeveelhede aanwesig is om goeie groei te gee nie. In die geval van sintetiese gisekstrak blyk dit dat aminosure van die grootste belang is vir die voeding.

Verder is gevind dat 'n blote waarneming van die diameter van die kolonies misleidend mag wees, en dat die verskille nie duidelik genoeg is nie. Die eksperiment het ook langer geduur as die 18 dae van die ander eksperimente, sodat daar ook geen tydbesparing was nie.

STATISTIESE ANALISE

Wanneer ons terugkeer na Fig. 9, sal ons sien dat die lyne in die figuur almal min of meer in 'n reguitlyn voortgesit word. Daar is van die veronderstelling uitgegaan dat die lyne in beginsel reguit is (reglynige regressie), en die regressie is vervolgens bepaal. Om die neiging van die lyne vas te stel, is van die metode van die kleinste kwadrate gebruik gemaak, en dit is ontleen aan Arkin en Colton (3). Dit is as volg gedoen:-

Die formule vir 'n reguit lyn is:

$$Y = a + bX$$

a en b kan bepaal word deur die volgende twee vergelykings:-

$$(1) \sum (Y) = Na + b \sum (X)$$

$$(2) \sum (XY) = a \sum (X) + b \sum (X^2)$$

Die waardes van X (tyd in dae) Y (diameter), XY en X<sup>2</sup> kan bepaal word. Wanneer hierdie waardes gesubstitueer word in (1) en (2) en die vergelykings opgelos word, word die waardes van a en b verkry. a en b kan dan gesubstitueer word in Y = a + bX en grafies voorgestel word deur vir X twee of meer van die waardes daarvoor aangegee te substitueer. Die verskillende waardes van X en Y is bepaal van die gemiddelde van die waardes in Tabel 9 en is slegs bereken vanaf die sewende dag. Hierdie waardes word aangegee in Tabel 11 terwyl die waardes van a en b en die waardes van Y wanneer X = 1 en X = 10 in Tabel 12 aangegee word. Hierdie waardes van Y is grafies voorgestel in Fig. 10.

VOEG IN TABELLE 11 EN 12 EN FIG. 10

In die grafiek is X = 1 die waarde vir die agste dag en X = 0 die waarde vir die sewende dag. Hierdie grafiek toon 'n merkwaardige ooreenkoms met Fig. 9 en die neiging van die lyne is dieselfde as vir daardie figuur. Die veronderstelling dat die groeikurwes in 'n reguitlyn voortgesit word is dus heeltemal geregverdig. Verder blyk ook dat die groepering van die lyne in drie bundels ook behoue gebly het.



TABEL 11

WAARDES VAN  $\Sigma X$ ,  $\Sigma Y$ ,  $\Sigma XY$  EN  $X^2$  VAN DIE  
WAARDES IN TABEL 9 VANAF DIE 7DE DAG

No.	$\Sigma X$	$\Sigma Y$	$\Sigma XY$	$\Sigma X^2$
1	91	708.7	5463.4	819
2	91	706.0	5417.5	819
3	91	629.0	4795.0	819
4	91	618.7	4694.5	819
5	91	582.9	4505.3	819
6	91	520.7	3965.6	819
7	91	501.0	3783.4	819
8	91	503.6	3789.0	819
9	91	496.9	3758.1	819

-50(b)-

TABEL 12

WAARDES VAN a EN b VAN DIE FORMULE  $Y = a + bX$  EN DIE WAARDES VAN Y WANNEER  $X = 1$  EN  $X = 10$ , WAT GEBRUIK IS IN FIGUUR 10. WANNEER  $X = 0$  IS DIE WAARDE VAN  $Y = a$

No.	a	b	Y=	Y(X = 1)	Y(X = 10)
1	26.14	3.766	$26.14 + 3.766 X$	29.906	63.800
2	26.757	3.641	$26.757 + 3.641 X$	30.398	63.167
3	24.742	3.105	$24.742 + 3.105 X$	27.847	55.792
4	24.965	2.958	$24.965 + 2.958 X$	27.923	54.545
5	21.165	3.149	$21.165 + 3.149 X$	24.314	52.655
6	20.591	2.554	$20.591 + 2.554 X$	23.145	46.131
7	20.731	2.316	$20.731 + 2.316 X$	23.047	43.891
8	21.240	2.266	$21.240 + 2.266 X$	23.506	43.900
9	20.400	2.321	$20.400 + 2.321 X$	22.721	43.610

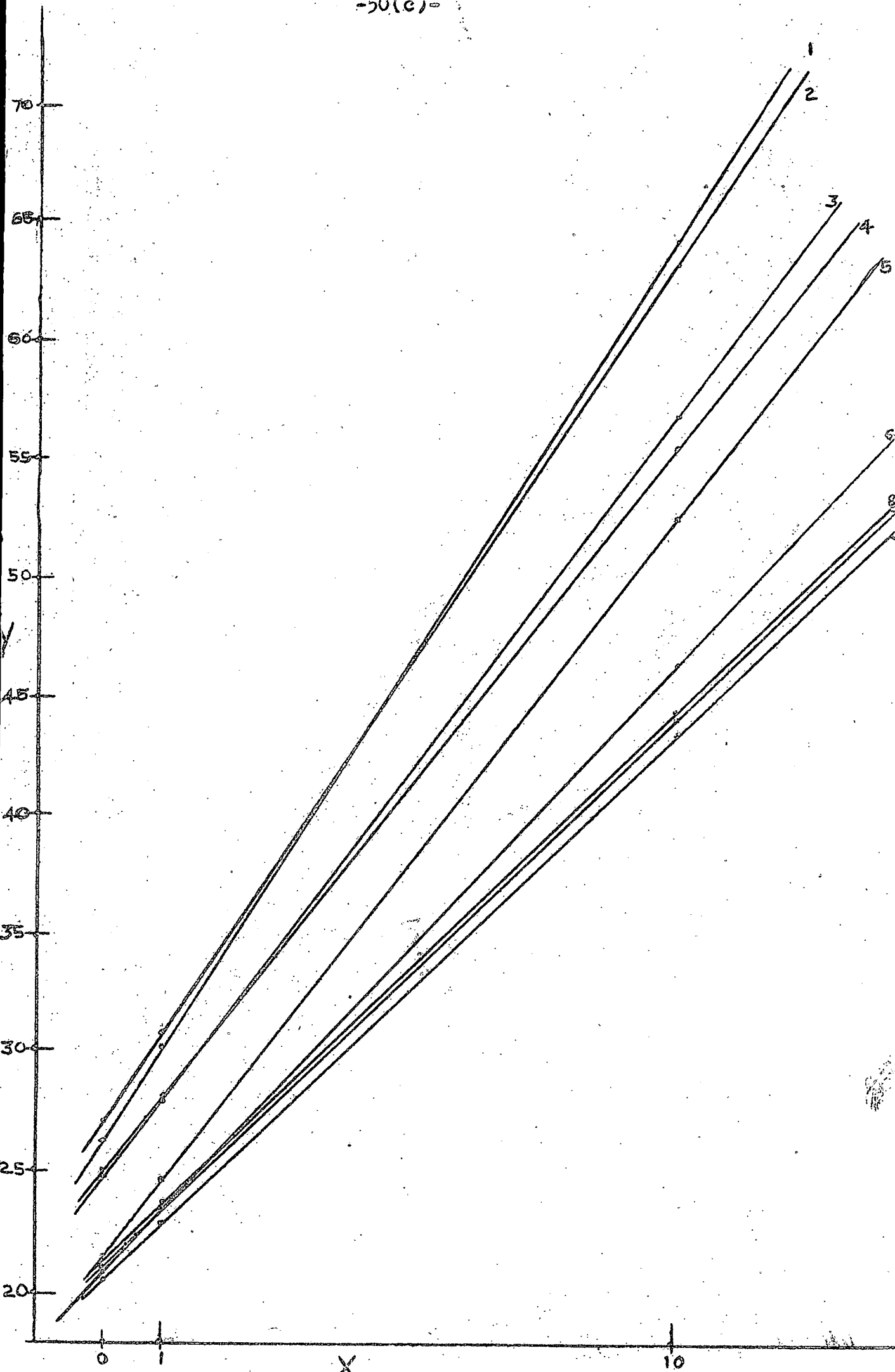


FIG. 10

REGRESSIE LYNE GETEKEN VAN DIE WAARDES VIR Y EN X IN TABEL 12

Om die betroubaarheid ("significance") van hierdie groepering te bepaal, is 'n statistiese proefanalise van slegs enkele lynpare gemaak, nl. 1 en 2, 1 en 3, en 3 en 6.

"Student" se t-metode (Goulden 34) is gebruik en die volgende resultate is verkry:-

Vir 1 en 2 is  $t = 1.388$

Vir 1 en 3 is  $t = 6.892$

Vir 2 en 3 is  $t = 5.085$

Vir 3 en 6 is  $t = 6.362$ .

Vir 13 grade van vryheid (D.F.) gee Goulden in Tabel 94, bl. 267 (ontleen aan Fisher) die volgende waardes vir  $t$  by die waarskynlikhede  $P$  :-

D.F.	P		
	0.10	0.05	0.01
13	1.77	2.16	3.01

Vir 1 en 2 val  $t = 1.388$  dus onderkant  $P = 0.10$ . d.w.s. dat in meer as 10 persent van alle gevalle 'n verskil gelyk aan of kleiner as die wat waargeneem is, verwag kan word. Die verskil is derhalwe van geen betekenis nie.

Vir die pare 1 en 3, 2 en 3, 3 en 6 waarvan elke lid tot 'n verskillende bondel behoort, is  $t$  aansienlik/as <sup>groter</sup>  $t$  vir die valk van  $P = 0.01$ , d.w.s. dat in minder as 1 persent van alle gevalle 'n dergelike verskil op toeval berus, m.a.w. dat hierdie verskil van hoë betekenis is.

Hoewel 'n dergelike analise nie vir alle lynpare en bondels gemaak is nie, is bostaande tog 'n aanduiding dat die verskil tussen die bondels nie toevallig is nie, maar op wesenlike verskil berus.

/ EKSPERIMENT 6.....



EXPERIMENT 6 - GROEI OP VERSKILLENDE KONSENTRASIES  
GISEKSTRAK EN „SINTETIESE“ GISEKSTRAK  
DEUR BEPALING VAN DIE DROOG-GEWIG

Uit die vorige eksperiment het geblyk dat 'n blote waarneming van kolonie-diameter waardes misleidend mag wees, en dat die verskille nie duidelik genoeg is nie. Dit blyk dus dat droog-gewig waardes verkieslik is aangesien dit waarskynlik meer duidelik en konkrete verskille sal gee.

Om 'n beter beeld te kry van die invloed van gisekstrak, is die vorige eksperiment herhaal vir drie konsentrasies van gisekstrak, maar in hierdie geval is die fungus op oplossings gekweek en die droog-gewig bepaal.

Die proewe met die „sintetiese“ gisekstrak is ook herhaal, maar aangesien die oplossings bruin word na sterilisasie, is 'n reeks ingesluit wat gesteriliseer word deur filtrasie deur 'n Berke-feld filter. Alle oplossings was soos die in eksperiment 5 gebruik, behalwe dat geen agar bygevoeg is nie. Die pH-waardes is na sterilisasie gestel d.m.v. die fosfaat-oplossings, en die flesse is geënt met 'n oglevol van 'n konidië-suspensie.

Die proef is as volg saamgestel:-

- (1) 0.5 persent gisekstrak
- (2) 0.2 persent gisekstrak
- (3) 0.05 persent gisekstrak
- (4) 0.0 persent gisekstrak
- (5) 0.5 persent „sintetiese“ gisekstrak - in autoklaaf gesteriliseer.
- (6) 0.5 persent „sintetiese“ gisekstrak deur Berkefeld filter gesteriliseer.
- (7) 0.5 persent „sintetiese“ gisekstrak sonder vitamienes - in autoklaaf gesteriliseer
- (8) 0.5 persent „sintetiese“ gisekstrak sonder vitamienes - deur Berkefeld filter gesteriliseer.
- (9) Suur hidrolisaat van pepton
- (10) Alkali hidrolisaat van pepton

Die Berkefeld-filter, die nodige 100 ml. Erlenmeyer-flesse en 'n suigfles met 'n waterfilter by die opening waar die suigpomp aankom, is voeraf in die autoklaaf gesteriliseer en die oplossings daarna daardeur gefiltreer.

Om die effek van anikoseure wat verkry is deur hidroliese van pepton na te gaan, is reekse 9 en 10 bygevoeg. Reeks 9 het bestaan uit 'n pepton hidrolisaat wat verkry is deur pepton as volg met  $H_2SO_4$  te hidroliseer:-

10 gm. pepton en  $\pm$  30 ml. 22.5 persent  $H_2SO_4$  is verhit vir  $\pm$  twee uur oor 'n waterbad en daarna met 'n terugvloei-koeler gekook vir 18 uur. 'n Swart stof (waarskynlik van humienagtige aard) word gevorm. Die oplossing is verdun met gedistilleerde water en die suur geneutraliseer met  $BaCO_3 + Ba(OH)_2$  en getoets met lakmoes. Daarna is die presipitaat gefiltreer en gekook met gedistilleerde water, en die filtraat ingedamp op 'n waterbad tot 'n gerieflike volume. Die oormaat  $Ba(OH)_2$  is gepresipiteer met 10 persent  $H_2SO_4$ , gefiltreer en die presipitaat gewas met gedistilleerde water.

Die hidrolisaat van reeks 10 is verkry deur alkaliese hidroliese met NaOH, as volg:-

10 gm. pepton is verhit met 50 ml. 5 N NaOH op 'n waterbad en met 'n terugvloei-koeler gekook vir 10 uur. Die oplossing is geneutraliseer met 22.5 persent  $H_2SO_4$  met onmiddelijke vorming van 'n wit presipitaat. Die presipitaat is gefiltreer en herhaaldelik gewas met gedistilleerde water.

Die konsentrasies van die hidrolisate in die oplossings was egter onseker, maar lê in elk geval tussen 0.55 en 0.65 gm. per 100 ml.

Die gevormde mycelia is na 'n inkubasie tydperk van 18 dae afgefiltreer en die pH van die filtrate en die droog-gewigte van die mycelia bepaal.

Die droog-gewig waardes word aangegee in Tabel 13 terwyl in Tabel 1 die oorspronklike pH waardes van die oplossings na fosfaat toevoeging, sowel as die finale pH waardes na afloop van die eksperiment aangegee word.

VOEG IN TABEL 13 EN 14

Die oplossings wat deur die Berkefeld-filter "gesteriliseer" was, was sodanig verontreinig met bakterië dat hulle nie gefiltreer is nie.

Uit 'n beskouing van die gewigte in Tabel 13, blyk dit dus dat daar 'n baie duidelike verskil is tussen die waardes wat vir die verskillende giskonsentrasies verkry is. Terwyl in eksperiment 5 die konsentrasies 0.5 persent en 0.2 persent in dieselfde groep was en dus min of meer dieselfde koloniediameter gegee het, is hier 'n baie groot verskil tussen die twee konsentrasies. Die opbrengs van 0.5 persent gisekstrak is nl. meer as twee maal so groot as die van 0.2 persent. Dit wys ook duidelik op die onbetroubaarheid van die agar-plaat metode. Verder dui dit ook op 'n duidelike kwantitatiewe werking van die gisekstrak.

Die groei op die twee verskillende „sintetiese" gisekstrak oplossings is taamlik goed en min of meer dieselfde. Die droog-gewig is egter nog heelwat laer as die wat op 'n 0.5 persent gisoplossing verkry is. In die begin van die eksperiment is waargeneem dat ontwikkeling op die twee „sintetiese" gisoplossings minstens drie dae later begin het as op die ander media. Dit sou die indruk skep dat die ontkieming moontlik vertraag is, en dus sou aandui dat natuurlike gisekstrak ontkieming bevorder in vergelyking met die sintetiese oplossings.

Soos reeds genoem is die waardes van oplossings 9 en 10 nie juis vergelykbaar nie, aangesien die definitiewe konsentrasie onseker is. Die droog-gewig waardes wat verkry is, is egter duidelik hoër as die op 0.5 persent gisekstrak. 'n Mens kom dus in elk geval tot die gevolgtrekking dat hierdie fungus in staat is om goed te groei op 'n mengsel van aminosure, soos voorsien deur die hidroliese van pepton.

TABEL 13

DROOGGEWIGTE VAN DIE MYCELIA OP DIE VERSKILLENDE  
GISKONSENTRASIES, SINTETIESE GISOPLOSSINGS EN  
PEPTONHIDROLISATE VAN EKSPERIMENT 6.

WAARDES VAN TRIPLIKATE IN MG.

No.	a.	b.	c.	gemid.
1	78.0	89.3	-	83.6
2	47.1	45.4	41.0	44.3
3	41.1	36.9	28.3	35.4
4	6.9	2.9	19.3	9.7
5	60.1	93.1	50.5	67.9
6	-	102.3	-	-
7	-	70.9	59.5	65.2
8	-	-	-	-
9	127.2	134.5	125.1	128.9
10	102.5	90.4	103.6	98.8



TABEL 14

OORSPRONKLIKE (1) EN FINALE DH - WAARDES (2) VAN DIE  
VERSKILLENDE OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 6

No.	1.			2.		
	a.	b.	c.	a.	b.	c.
1	7.0	7.2	7.15	7.2	7.2	-
2	7.0	7.0	7.1	6.9	7.0	7.0
3	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0
4	7.1	7.1	7.1	6.75	7.0	7.0
5	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4
6	7.3	7.3	7.3	-	7.9	-
7	7.3	7.3	7.3	-	7.45	7.45
8	7.3	7.3	7.3	-	-	-
9	7.1	7.1	7.1	7.45	7.45	7.45
10	7.0	7.0	7.0	7.4	7.4	7.4

EKSPERIMENT 7 - VERGELYKING VAN GROEI OP VERSKILLENDE KONSEN-  
TRASIES „SINTETIESE" GISEKSTRAK EN MENGSELS VAN  
SINTETIESE AMINOSURE SOOS AANWESIG IN KASEIN-  
HIDROLISAAT MET GROEI OP BACTO-GISEKSTRAK EN  
BACTO-KASEINHIDROLISAAT

Hierdie eksperiment is uitgevoer om vas te stel of 'n  
verhoging in konsentrasie van die aminosure van „sintetiese"  
moontlik so 'n goeie groei sal gee as Bacto-gisestrak  
gisekstrak. Groei op hierdie oplossings is vergelyk met die  
groei verkry op 0.5 en 1.0 persent gisekstrak en 0.5 en 1.0  
persent Bacto-kasein-hidrolisaat. Terselfdertyd is drie  
verskillende konsentrasies van aminosuur mengsels gemaak met  
min of meer dieselfde samestelling as kaseinhidrolisaat.  
Hierdie aminosuurmengsels word voortaan gerieflikheidshalwe  
aangedui as „sintetiese kasein" oplossings.

Die eksperiment as geheel is as volg saamgestel:-

- (1) Czapek-oplossing
- (2) Czapek-oplossing + 0.5 persent gisekstrak
- (3) Czapek-oplossing + 1.0 persent gisekstrak
- (4) Czapek-oplossing + 0.5 persent kasein hidrolisaat
- (5) Czapek-oplossing + 1.0 persent kasein hidrolisaat
- (6) Czapek-oplossing + 0.25 persent „sintetiese" gisekstrak
- (7) Czapek-oplossing + 0.50 persent „sintetiese" gisekstrak
- (8) Czapek-oplossing + 1.0 persent „sintetiese" gisekstrak
- (9) Czapek-oplossing + 2.0 persent „sintetiese" gisekstrak
- (10) Czapek-oplossing + „sintetiese kasein" (a)
- (11) Czapek-oplossing + „sintetiese kasein" (b)
- (12) " " " " (c)
- (12) Czapek-oplossing + (Asparagien + glutamien + glutathion)

Die „sintetiese" gisekstrak oplossings is opgemaak soos  
in eksperiment 6. Tabel 15 gee die hoeveelhede van elke  
aminosuur wat vir elke konsentrasie gebruik is. Die gewigte  
in die laaste kolom is afgeweeg en opgemaak tot 100 ml.  
Dit verteenwoordig 'n konsentrasie tweemaal so sterk as die  
hoogste konsentrasie wat gebruik word.

VOEG IN TABEL 15

Die .....

TABEL 15

HOEVEELEDE IN MG. VAN DIE AFSONDERLIKE AMINOSURE  
WAT GEBRUIK IS VIR DIE SAMESTELLING VAN VERSKILLENDE  
KONSENTRASIES SINTETIESE GISEKSTRAK, IN EKSPERIMENT 7

Die hoeveelheid in die laaste kolom (4) is afgeweg  
per 100 ml.

Aminosuur, persent	0.25%	0.5%	1.0%	2.0%	4.
arginien, persent	2.0	4.0	8.0	16.0	32.0
asparagiensuur, persent	12.5	25.0	50.0	100.0	200.0
glutamiensuur, persent	162.5	325.0	650.0	1300.0	2600.0
glycien, persent	62.5	125.0	250.0	500.0	1000.0
histidien, persent	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0
isoleucien, persent	7.5	15.0	30.0	60.0	120.0
leucien, persent	9.0	18.0	36.0	72.0	144.0
lysien, persent	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0
methionien, persent	2.0	4.0	8.0	16.0	32.0
fenielaalanien, persent	5.5	11.0	22.0	44.0	88.0
tryptofaan, persent	22.5	45.0	90.0	180.0	360.0
tyrosien, persent	1.5	3.0	6.0	12.0	24.0
valien, persent	87.5	175.0	350.0	700.0	1400.0

Die hoeveelhede van hierdie oplossing wat per 100 ml. medium gebruik moet word om die nodige konsentrasie te verkry was dus as volg:-

0.25 persent	-	6.25 ml.
0.50 persent	-	12.5 ml.
1.0 persent	-	25.0 ml.
2.0 persent	-	50.0 ml.

Die verskillende aminosure en hoeveelhede daarvan wat gebruik is om die „sintetiese kasein“ saam te stel word in Tabel 16 aangegee.

VOEG IN TABEL 16

Die drie konsentrasies is (a), (b) en (c) waarvan (b) tweemaal die konsentrasie van (a) is, en (c) tweemaal die van (b). Die waardes aangegee vir (a) is ongeveer die gemiddelde van die waardes wat aangegee word deur Robbins en Ma (65) en Smith en Douglas (73). Die gewigte in die laaste kolom is afgeweg en opgemaak tot 100 ml. oplossing. Van hierdie oplossing is die volgende hoeveelhede gebruik per 100 ml. medium om die verskillende konsentrasies te verkry:-

- (a) 12.5 ml.
- (b) 25.0 ml.
- (c) 50.0 ml.

Van die asparagien, glutamien en glutathion is 0.25 gm. van elk per 100 ml. gebruik.

Die Czapek- en bufferoplossings is in konsentrasies soos voorheen gebruik. Die oplossings is in 25 ml. hoeveelhede in 100 ml. Erlenmeyerflesse gevoeg.

Na sterilisasie het alle oplossings, behalwe No. 13, 'n lig - tot - donkerbruin kleur gehad, en ook die karakteristieke geur van gisekstrak. Die verkleuring berus waarskynlik op die Maillard-reaksie tussen aminosure en suikers. Dit sou moontlik vermy kon word deur afsonderlike sterilisasie van die bestandele, wat egter onder omstandighede ondoenlik was. Die pH is daarna gestel d.m.v. die buffers. /Die.....

TABEL 16

DIE VERSKILLENDE AMINOSURE EN HOEVEELHEDE IN MG. DAARVAN  
WAT GEBRUIK IS OM DIE 3 KONSENTRASIES VAN „SINTETIESE  
KASEIN“ IN EKSPERIMENT 7 SAAM TE STEL

Waardes in laaste kolom (d) is die hoeveelheid wat per  
 100 ml. afgeweg is.

Aminosuur	(a)	(b)	(c)	(d)
$\alpha$ -Alanien	15.0	30.0	60.0	120.0
$\beta$ -alanien	15.0	30.0	60.0	120.0
arginien	20.0	40.0	80.0	160.0
asparagiensuur	25.0	50.0	100.0	200.0
cystien	2.5	5.0	10.0	20.0
cystien	2.5	5.0	10.0	20.0
glycien	3.5	7.0	14.0	28.0
glutamiensuur	190.0	380.0	760.0	1520.0
histidien	18.0	36.0	72.0	144.0
hydroxyprolien	2.0	4.0	8.0	16.0
isoleucien	50.0	100.0	200.0	400.0
leucien	25.0	50.0	100.0	200.0
lysien	25.0	50.0	100.0	200.0
methionien	20.0	40.0	80.0	160.0
fenielaalanien	30.0	60.0	120.0	240.0
prolien	65.0	130.0	260.0	520.0
tryptofaan	20.0	40.0	80.0	160.0
tyrosien	50.0	100.0	200.0	400.0
valien	60.0	120.0	240.0	480.0

Die pH van die oplossings na toevoeging van die fosfate en na afloop van die eksperiment word aangegee in Tabel 17.

VOEG IN TABEL 17

Na enting van die oplossings met 'n oëievool van 'n konidië-suspensie, is hulle in die inkubator (28-30°C) geplaas, en die mycelia gefiltreer en geweeg is na 18 dae.

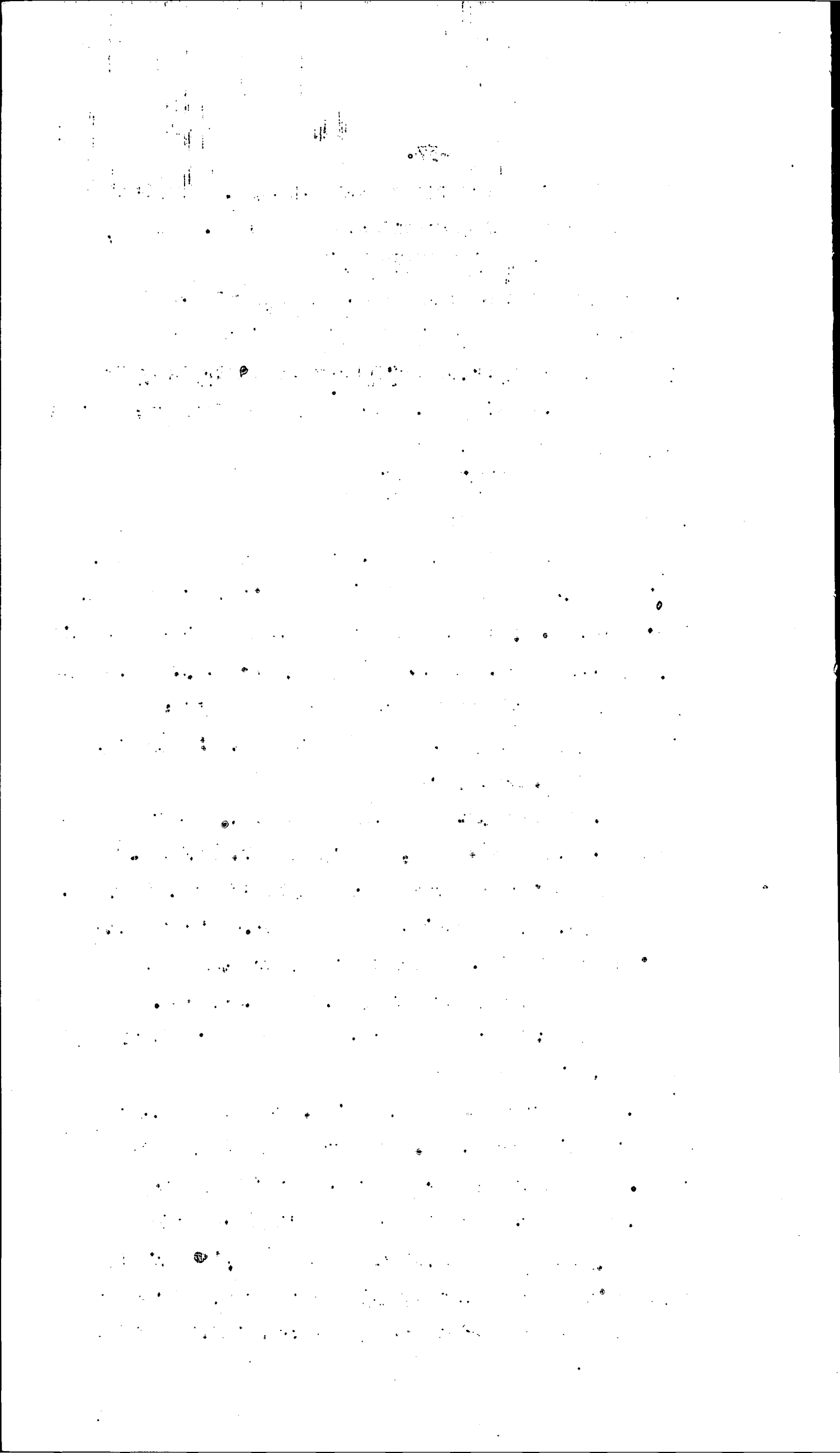
Die droog-gewigte van die mycelia op die verskillende oplossings verskyn in Tabel 18.

VOEG IN TABEL 18

Uit die resultate blyk:

1. Dat 'n verhoging in konsentrasie van sintetiese gisekstrak (vgl. oplossings 6, 7, 8 en 9) nie 'n groot invloed uitoefen op die groei van die fungus nie. Die waardes vir 0.5, 1.0 en 2.0 persent het onderling nie 'n groot verskil nie, maar is almal effens hoër as vir 0.25 persent. In vergelyking met die groei op gisekstrak (2) is groei op hierdie oplossings nog swak.
2. Dat die beste groei verkry is op 'n 1.0 persent kasein-hidrolisaat oplossing. Ongelukkig was die reeks met 1.0 persent gisekstrak verontreinig. Goeie groei, heelwat beter as op 0.5 persent gisekstrak en 0.5 persent kasein-hidrolisaat, is verkry op die drie „sintetiese kasein” oplossings (10, 11 en 12). Die waardes vir hierdie drie oplossings is baie na aan mekaar en dit is dus onwaarskynlik dat die konsentrasie hier 'n effek het.
3. Dat die fungus waarskynlik 'n groot verskeidenheid aminosure nodig het om goed te groei. Dit blyk uit die baie hoër waardes wat verkry is op „sintetiese kasein” wat meer aminosure bevat as die sintetiese gisekstrak.
4. Dat groei op 'n kombinasie van asparagiëen, glutamien en glutathion min of meer dieselfde is as op sintetiese gisekstrak, terwyl die groei op Czapek-oplossing alleen baie swak bly.

/ Die feit.....



TABEL 17

COORSPRONKLIKE (1) EN FINALE (2) pH-WAARDES VAN  
DIE VERSKILLENDE OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 7.  
A, B EN C - TRIPLIKATE

No.	(1)			(2)		
	a	b	c	a	b	c
1	7.0	7.0	7.0	6.7	6.7	6.7
2	7.1	7.1	6.5	7.0	7.1	6.5
3	7.1	7.1	7.1	-	-	-
4	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0
5	7.1	7.1	7.1	7.15	7.15	7.15
6	8.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0
7	7.1	7.1	7.1	7.1	7.2	7.0
8	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0
9	7.1	7.1	7.1	7.1	7.0	5.5
10	7.2	7.2	7.2	7.25	7.3	7.25
11	7.2	7.2	7.2	7.3	7.25	7.3
12	7.2	7.2	7.2	7.25	7.3	7.25
13	7.2	7.1	7.1	7.25	7.3	7.25



TABEL 18

DROOG-GEWIGTE VAN DIE MYCELIA OP DIE VERSKILLENDE  
OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 7  
A. B. EN C IN TRIPLIKATE

No.	a	b	c	gemid.
1	20.4	16.1	11.1	15.8
2	89.1	97.3	77.6	88.0
3	-	-	-	-
4	99.6	68.8	80.9	83.1
5	142.3	131.0	121.7	131.7
6	34.3	43.6	31.1	36.3
7	52.8	42.7	43.9	46.5
8	37.1	45.4	49.1	43.8
9	52.9	42.2	36.9	44.0
10	104.0	104.1	109.7	105.9
11	103.1	92.7	99.7	98.5
12	97.4	104.5	92.7	98.2
13	34.3	43.2	42.9	40.1

Die feit dat die fungus beter groei op die drie konsentrasies van „sintetiese kasein“ as op 0.5 persent kasein-hidrolisaat, wys daarop dat dit wel goed kan groei op 'n sintetiese medium. Daarenteen egter word 'n baie beter groei verkry op 'n 1.0 persent kasein-hidrolisaat oplossing. Dit toon dat by 'n hoër konsentrasie van kasein-hidrolisaat daar waarskynlik ander faktore is wat sodanig vermeerder is om groei verder te bevorder. Dit mag b.v. wees dat die twee aminosure, serien en threonien, wat nie by die „sintetiese kasein“ gevoeg is nie, genoegsaam voorsien is by die hoër konsentrasie om 'n verdere effek op die groei te hê.

Verder sou dit egter ook ander faktore, soos b.v. peptied-verbindinge mag wees. Ook die moontlikheid dat in die „sintetiese kasein“ een of meer van die aminosure 'n teëwerkende effek mag hê, mag nie uit die oog verloor word nie.

#### EKSPERIMENT 8 - ONONTBEERLIKHEID VAN AMINOSURE

Vervolgens is 'n proef opgestel om vas te stel of enige van die aminosure wat in die vorige eksperiment gebruik is absoluut onontbeerlik is vir die groei van hierdie fungus. Dit is gepoog deur uit die volledige aminosuur-medium afsonderlik een of meer aminosure weg te laat, en sodoende die effek daarvan na te gaan.

As gevolg van onvoldoende inkubator ruimte, egter, kon die aminosure nie een op 'n slag uitgelaat word nie. Gevolglik is besluit om die aminosure sover moontlik in pare van twee uit te laat, en wel die wat chemies die naaste verwant is in dieselfde paar weg te laat. Dit was nie steeds moontlik om in alle gevalle twee verwante aminosure uit te laat nie, so moes b.v. glycien en valien gelyktydig uitgelaat word. In Tabel 19 word die aminosure wat 'n paar uitmaak aangegee, sowel as hulle chemiese formules.

~~HOOFSTUK IV~~.....

VOEG IN TABEL 19

TABEL 19

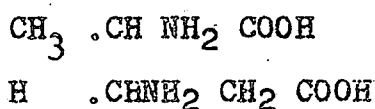
GROEPERING EN FORMULES VAN DIE AMINOSURE  
(SIEN EKSPERIMENT 8)

H & W - Hopkins en Williams

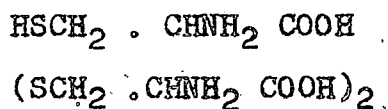
E - K - Eastman Kodak

L.Co. - Light & Co.

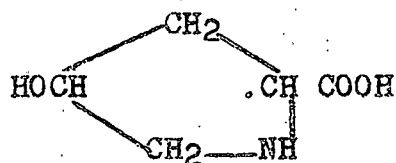
(DL -  $\alpha$ -alanien H & W  
 (  $\beta$ -alanien E - K



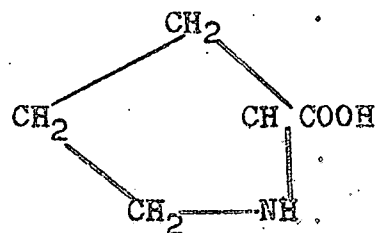
(L - cysteien L.Co  
 (L - cystien E - K



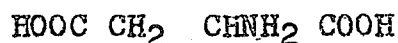
(L - hydroxyprolien L.Co.



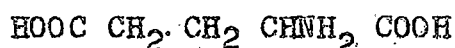
(DL - prolien L.Co.



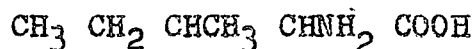
(DL - asparagiensuur H & W



(L - (+) - glutamiensuur E - K



(DL - isoleucien L.Co.



(DL - leucien E - K



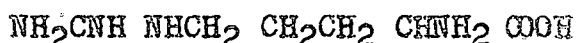
(DL -  $\beta$ -fenielalanien E - K



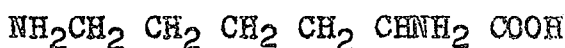
(L - tyrosien "difco"



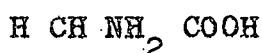
(L - (+) - arginien HCl E - K



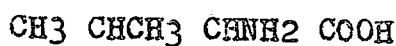
(DL - lysien 2 HCl E - K



( glycien Analar

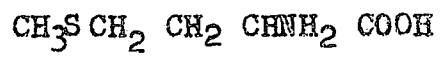


(DL - valien L. Co.



- 58(aa)-

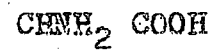
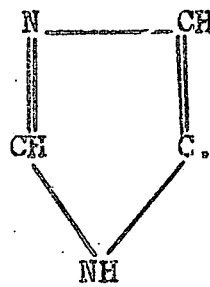
DL - methionien L.Co.



DL - tryptofaan E - K



L - histidien HCl L.Co



Aangesien groei in eksperiment No. 7 soveel beter was op die „sintetiese kasein“ as op die sintetiese gisekstrak, is in hierdie eksperiment 'n reeks gevoeg wat slegs die aminosure bevat wat in die sintetiese gisekstrak gebruik is maar in dieselfde konsentrasies as in die „sintetiese kasein“. In 'n verdere groep is die asparagien- en glutamiensuur vervag deur dieselfde hoeveelhede asparagien en glutamien. In die reeks waaruit methionien weggelaat moes word, is die cysteïen en cystien ook saam uitgelaat, sodat die oplossing van hierdie reeks geen organiese S bevat het nie.

Die konsentrasies van al die aminosure was soos vir die „sintetiese kasein“ in eksperiment No. 7. Elke aminosuur is opgemaak in hoeveelhede 15 maal die gewig wat per 100 ml. gebruik word. Hierdie hoeveelhede is opgelos in 75 ml. gedistilleerde water en 5 ml. (1/15) hiervan is gebruik per 100 ml. medium, behalwe in die geval van cysteïen en tyrosien wat moeilik oplosbaar is en dus opgelos is in 150 ml. en 225 ml. gedistilleerde water respektiewelik. Hiervan word dan respektiewelik 10 ml. en 15 ml. per 100 ml. medium gebruik. Aminosure wat in pare weggelaat is, is saam opgelos.

Die eksperiment is as volg opgestel:-

(alle oplossings het as basis Czapek-oplossing bevat soos in vorige eksperimente):

1. Volledig (19 aminosure)
2. Volledig - ( $\alpha$ -alanien +  $\beta$ -alanien)
3. Volledig - (cysteïen + cystien)
4. Volledig - (hydroxyprolien en prolien)
5. Volledig - ( $\alpha$ -alanien, cysteïen, cystien, hydroxyprolien en prolien)
6. Volledig - (asparagien- en glutamiensuur)
7. Volledig - (isoleucien en leucien)
- / 8. Volledig.....

8. Volledig - (fenielalanien en tyrosien)
9. Volledig - tryptofaan
10. Volledig - histidien
11. Volledig - methionien en (cysteien en cystien)
12. Volledig - (arginien en lysien)
13. Volledig - (glycien en valien)
14. 1.0 persent kasein hidrolisaat
15. Volledig, maar asparagien- en glutamiensuur vervang deur dieselfde hoeveelhede asparagien en glutamien.

Na sterilisasie en toevoeging van fosfate is die pH van die verskillende oplossings bepaal en is hulle geënt met 'n ogievol van 'n konidië-suspensie van die fungus, waarna dit in die inkubator geplaas is vir 18 dae by 28 - 30°C.

Die pH waardes van die oplossings na toevoeging van die buffers, en na afloop van die eksperiment word aangegee in Tabel 20.

VOEG IN TABEL 20

Die droog-gewig van die mycelium op die verskillende oplossings verskyn in Tabel 21.

VOEG IN TABEL 21

Die gemiddeldes van hierdie waardes kan volgens grootte as volg gerangskik word:-

15. 90.4 mg.
14. 80.8 mg.
1. 77.0 mg.
3. 76.9 mg.
12. 75.3 mg.
10. 71.8 mg.
11. 69.3 mg.
4. 68.9 mg.
9. 68.2 mg.
2. 67.7 mg.

TABEL 20

OORSPRONKLIKE (1) EN FINALE (2) pH-WAARDES VAN DIE VERSKILLENDE  
OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 8

No.	(1)			(2)		
	a.	b.	c.	a.	b.	c.
1	7.1	7.0	7.0	7.3	7.1	7.3
2	7.1	7.1	6.5	7.3	7.5	7.0
3	7.1	7.1	7.1	7.3	7.4	7.4
4	7.1	7.1	6.6	7.5	7.5	6.8
5	7.1	7.1	7.1	7.45	7.5	7.4
6	7.1	7.1	6.9	6.2	7.05	6.9
7	7.1	7.1	7.1	7.4	7.2	7.2
8	7.1	7.1	7.1	7.2	7.3	-
9	7.1	7.05	7.05	-	7.4	7.35
10	7.1	7.1	7.05	7.2	7.2	7.2
11	7.05	7.1	7.05	7.25	7.4	7.3
12	7.1	7.1	7.05	7.2	7.2	7.15
13	7.1	7.05	7.05	-	7.3	7.4
14	7.0	7.0	7.0	7.4	7.45	7.4
15	7.1	7.05	7.05	-	7.05	7.15

TABEL 21

DROOG-GEWIGTE VAN DIE MYCELIA OP DIE VERSKILLENDE  
OPLOSSINGS VAN EKSPERIMENT 8. WAARDES VAN TRIPLI-  
KATE a. b EN c IN MG.

No.	a	b	c	gemid.
1	78.4	79.2	73.4	77.0
2	68.6	69.7	64.8	67.7
3	70.6	80.2	80.0	76.9
4	68.0	69.8	-	68.9
5	64.0	65.0	58.6	62.8
6	65.5	55.8	67.8	63.0
7	41.8	66.8	75.6	61.4
8	60.9	-	67.0	63.9
9	60.8	72.5	71.4	68.2
10	79.5	60.7	75.3	71.8
11	64.7	75.5	67.7	69.3
12	70.2	81.3	74.3	75.3
13	-	62.1	63.2	62.6
14	78.0	70.0	94.5	80.8
15	-	89.6	91.2	90.4



- 8. 63.9 mg.
- 6. 63.0 mg.
- 5. 62.8 mg.
- 13. 62.6 mg.
- 7. 61.4 mg.

Daar sal egter opgemerk word dat daar taamlike groot verskille is tussen replikate in sommige van die reekse, en dat daar ook 'n groot mate van oorvleueling is tussen die waardes van die verskillende reekse. Verder is daar ook nie groot verskille tussen die gemiddeldes nie, en slegs beperkte gevolgtrekkings kan dus gemaak word.

Die waardes van die laaste vyf reekse in die kolom hierbo (reekse 8, 6, 5, 13 en 7) is egter sodanig laer as die res, dat hulle baie duidelik daarvan geskei kan word. 'n Mens sou dus tot die gevolgtrekking kan kom dat die aminosure wat uit hierdie reekse weggelaat is die belangrikste is vir die voeding van hierdie fungus. Dit sou dan die volgende aminosure wees:-

isoleucien, leucien, glycien, valien, asparagiensuur, glutamiensuur, fenielalanien en tyrosien.

In elk geval blyk uit hierdie eksperiment dat hierdie fungus geen absolute afhanklikheid van een besondere aminosuur het nie, en dat 'n groot verskeidenheid van aminosure die beste groei verseker.

Verder blyk dat die verskil tussen waardes verkry op 0.5 persent kasein hidrolisaat (14) en op 'n mengsel van 19 aminosure (1) baie gering en van weinig betekenis is. Die resultate toon ook dat die beste groei verkry word wanneer asparagien- en glutamiensuur vervang word deur hulle onderskeie amiedes asparagien en glutamien. Organiese N mag die beperkende faktor gewees het, aangesien die amiedes tweemaal soveel N bevat.

/ Die.....

Die verskille wat daar tussen die ander reekse bestaan is maar gering en van min betekenis, en sal waarskynlik nie die toets van 'n statistiese analise deurstaan nie. 'n Uitsondering hier is dat daar wel 'n duidelike verskil is tussen reekse 1 en 2.

Opsommend kon dus gesê word dat :-

(a) cysteïen, cystien, arginien, lysien, histidien, methionien, hydroxyprolien, prolien en tryptofaan waarskynlik min invloed uitoefen op die groei van die fungus.

(b) isoleucien, leucien, glycien, valien, asparagiensuur, glutamiensuur, fenielalanien, tyrosien en  $\alpha$ - en  $\beta$ -alanien wel groei bevorder.

Rekening moet hier gehou word met die feit dat hierdie aminosure in pare weggelaat is en dit dus moontlik net een van die twee aminosure van die paar mag wees wat die groei beïnvloed.

## HOOFSTUK VI

### BESPREKING

Uit die eerste proef het geblyk dat die fungus alkali-vormend is, en dat geen groei plaasvind by 'n pH van 5.1 en laer nie, terwyl dit nog wel by 'n pH van 9 groei. Dit blyk dat die alkali-vorming nie nadelig vir groei is en later dus 'n groei-beperkende faktor kan word nie, aangesien in die eksperimente die pH nie hoër as 9.2 gestyg het nie. Na die eerste tien dae was die hoogste droog-gewig-waarde die op 'n medium met 'n oorspronklike pH van 8.0, na 17 dae die op 'n oorspronklike pH 7.0, en na 24 dae die op 'n oorspronklike pH 7.0 en 6.5. Die pH van hierdie media het egter toegeneem tot na 17 dae waarna dit konstant gebly het, of in gevalle waar autolise waarskynlik ingetree het, het dit gedaal. In latere eksperimente is nie meer 'n pH-verhoging waargeneem nie, en dit kan wees deurdad hierdie media animosure bevat het, en hulle is bekend as goeie buffers. Pepton en trypton egter is ook veronderstel goeie buffers te wees, en tog het op media waarin hulle ingesluit was, die grootste pH verhoging plaasgevind.

Aangesien die fungus dus blykbaar 'n alkaliese medium verkies en alkali-vormend is, is dit in staat om 'n medium meer gunstig te maak vir die groei daarvan. Op media met 'n hoër pH word die maksimale groei in 'n kort tyd bereik, waarna autoliese intree, terwyl op media met 'n laer pH die pH mettertyd verhoog word en die fungus dus beter kan ontwikkel. By 'n onbeperkte voedselvoorraad sal die optimum, pH van hierdie fungus heelwaarskynlik ongeveer 8.0 wees, wat 'n sterk kontras vorm met ander fungi, wat gewoonlik hul optimum pH aan die suur kant het. Uit die waardes wat na 24 dae verkry is, sou egter afgelei kan word dat die optimum van hierdie fungus 6.5 is, wat ook aan die suur kant is. Daar moet egter onthou word dat die fungus goed en vinnig groei by 'n hoër pH

/en .....

en die voedingstowwe dus baie gouer opgebruik word en die groei dus ophou en autoliese intree. Die goeie effek van 'n pH van 8.0 kom dus later nie te voorskyn nie.

Dit opper die vraag of 'n langer tydperk van groei, soos algemeen die gebruik is, verkieslik is bo 'n korter tydperk. M.i. veroorsaak 'n lang groeiperiode 'n verbetering in groei omstandighede en verberg dus die nadelige invloed wat sommige faktore mag hê. Dit blyk in elk geval so te wees vir die effek van die pH op hierdie fungus, en mag ook geld vir ander faktore. Steinberg (76) b.v. het by die bepaling van die groei van *Aspergillus niger*, 'n groeiperiode van slegs vier dae gebruik. Hy beskou sekere aminosure as primêr en beweer dat die ander aminosure wat benodig word, uit hierdie primêre aminosure gesintetiseer word. In hierdie geval is dit dus ook moontlik dat 'n lang groeiperiode die effek van sekere aminosure sal verberg, aangesien die ander aminosure in die tussentyd gesintetiseer word en die groei dan as gevolg daarvan baie vinniger toeneem.

Vasstelling van die effek van verskillende faktore na drie of selfs meer groeitydperke, sal waarskynlik die verkieslikste wees, maar dit vergroot en bemoeilik die eksperimente sodanig, dat dit nie altyd prakties uitvoerbaar is nie.

Hierdie fungus was nie in staat om te groei op sintetiese media met 'n anorganiese N-bron of met ureum as N-bron nie. Die gebrek aan groei kon nie toegeskryf word aan die afwesigheid van spoorelemente nie, aangesien alle bekende spoor-elemente by die media gevoeg is, en in een geval ook nog grondekstrak. Dit was dus 'n aanduiding dat die fungus in die loop van sy filogenese die vermoë verloor het om een of meer van die stowwe wat nodig is vir die voeding daarvan te sintetiseer. Eksperimente het aangetoon dat dit geen uitwendige bron van enige van die vitamene thiamien, biotien, pyridoxien, pantotheensuur, nikotiensuur, askorbiensuur, riboflavin of para-aminobenzoësuur of ander vitamene en

/onbekende,.....

onbekende groeifaktore in gisekstrak nodig het nie, sodat dit wel in staat was om alle nodige vitamene te sintetiseer. Ten spyte van die feit dat die fungus uit die grond geïsoleer is, kan geen noemenswaardige groei op 'n medium bevattende grondekstrak verkry word nie. Protein-agtige stowwe soos gisekstrak, trypton en pepton oefen egter 'n gunstige invloed op die groei van die fungus uit. Hierdie stowwe blyk egter nie 'n goeie C-bron vir die fungus te wees nie, aangesien beter groei verkry word op 'n Cz-oplossing plus gisekstrak as op gisekstrak plus trypton. Deurdat die  $\text{NaNO}_3$  van die Czopok-oplossing nie geassimileer kan word nie, moet dit dus die glukose gehalte van die Cz-oplossing wees wat die beter groei veroorsaak.

Die onvermoë van die fungus om te groei op media met 'n anorganiese N-bron, tesame met die feit dat goeie groei verkry word op hidrolisate van pepton en kasein, dui op 'n vereiste vir organiese N-verbindings. Alle aanduidings het dus daarop gewys dat die fungus 'n uitwendige bron van aminosure nodig het om goed te kan groei. Daar is egter vasgestel dat die fungus nie 'n absolute vereiste vir een bepaalde aminosuur het nie, maar dat 'n groot verskeidenheid aminosure die beste invloed op die groei uitoefen. 'n Stimulerende werking .t.o.v. die ander aminosure is egter vasgestel vir die volgende aminosure:- asparagiensuur, glutamiensuur, fenielalanien, tyrosien, isoleucien, leucien, valien en glycien.

Die beste groei word verkry wanneer asparagiensuur en glutamiensuur vervang word deur asparagien en glutamien, moontlik deur die feit dat hulle stadia in die sintese proses is. (Thorne 81). Hulle het egter ook 'n hoër N-gehalte as die aminosure. Op 'n mengsel van 19 aminosure was die groei egter nog nie so goed as op 'n 1.0 persent kasein-hidrolisaat-oplossing nie. Dit is egter moontlik dat dieselfde groei

/bereik.....

(The following text is extremely faint and largely illegible due to the quality of the scan. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a report or a letter, containing several lines of text per paragraph. The content is mostly lost to noise and low contrast.)

[Illegible text block 1]

[Illegible text block 2]

[Illegible text block 3]

[Illegible text block 4]

[Illegible text block 5]

[Illegible text block 6]

[Illegible text block 7]

[Illegible text block 8]

[Illegible text block 9]

[Illegible text block 10]

[Illegible text block 11]

[Illegible text block 12]

[Illegible text block 13]

[Illegible text block 14]

[Illegible text block 15]

[Illegible text block 16]

[Illegible text block 17]

[Illegible text block 18]

[Illegible text block 19]

[Illegible text block 20]

[Illegible text block 21]

[Illegible text block 22]

[Illegible text block 23]

[Illegible text block 24]

[Illegible text block 25]

[Illegible text block 26]

[Illegible text block 27]

[Illegible text block 28]

[Illegible text block 29]

[Illegible text block 30]

[Illegible text block 31]

[Illegible text block 32]

[Illegible text block 33]

[Illegible text block 34]

[Illegible text block 35]

[Illegible text block 36]

[Illegible text block 37]

[Illegible text block 38]

[Illegible text block 39]

[Illegible text block 40]

[Illegible text block 41]

[Illegible text block 42]

[Illegible text block 43]

[Illegible text block 44]

[Illegible text block 45]

[Illegible text block 46]

[Illegible text block 47]

[Illegible text block 48]

[Illegible text block 49]

[Illegible text block 50]

[Illegible text block 51]

[Illegible text block 52]

[Illegible text block 53]

[Illegible text block 54]

[Illegible text block 55]

[Illegible text block 56]

[Illegible text block 57]

[Illegible text block 58]

[Illegible text block 59]

[Illegible text block 60]

[Illegible text block 61]

[Illegible text block 62]

[Illegible text block 63]

[Illegible text block 64]

[Illegible text block 65]

[Illegible text block 66]

[Illegible text block 67]

[Illegible text block 68]

[Illegible text block 69]

[Illegible text block 70]

[Illegible text block 71]

[Illegible text block 72]

[Illegible text block 73]

[Illegible text block 74]

[Illegible text block 75]

[Illegible text block 76]

[Illegible text block 77]

[Illegible text block 78]

[Illegible text block 79]

[Illegible text block 80]

[Illegible text block 81]

[Illegible text block 82]

[Illegible text block 83]

[Illegible text block 84]

[Illegible text block 85]

[Illegible text block 86]

[Illegible text block 87]

[Illegible text block 88]

[Illegible text block 89]

[Illegible text block 90]

[Illegible text block 91]

[Illegible text block 92]

[Illegible text block 93]

[Illegible text block 94]

[Illegible text block 95]

[Illegible text block 96]

[Illegible text block 97]

[Illegible text block 98]

[Illegible text block 99]

[Illegible text block 100]

bereik sou word as serien en threonien, wat in kasein-hidrolisaat aanwesig is en nie in die sintetiese aminosuur-oplossing ingesluit was nie, ook bygevoeg word.

Soortgelyke resultate is verkry deur Ajello (1) vir *Polychytrium aggregatum*. Hy vind nl. die beste groei op pepton en 'n-ensimatiëse afbreek produk van kasein. Die fungus het ook geen vereiste vir een besondere aminosuur nie, maar hy vind dat die ses aminosure, asparagiensuur, glutamiensuur, lysien, arginien, methionien en hydroxyprolien beter is as die ander aminosure.

Vir *Penicillium digitatum* vind Fergus (27) dat gisekstrak beter is as 'n sintetiese medium bevattende vitamienë, puriene, pyrimidiene en aminosure. Alhoewel Georg (31 en 32) vind dat *Trichophyton violaceum*, *T. gallinae* en *T. megnini* 'n absolute vereiste vir histidien het, word dit nogtans gestimuleer deur asparagien, glutamien en arganien.

*Trichophyton mentagrophytes* groei volgens Robbins en Ma (65) goed op pepton, kasein-hidrolisaat en ander proteïen hidrolisate, maar nie so goed op 'n mengsel van sintetiese aminosure soortgelyk aan die wat in kasein-hidrolisaat voorkom nie. Kombinasies van aminosure was egter altyd beter as slegs een, en dit is heelwaarskynlik toe te skryf aan direkte assimilasie.

Tesame met ons *Scopulariopsis* het al hierdie fungi dit dus in gemeen dat hulle nie so goed groei op 'n mengsel van 'n groot aantal sintetiese aminosure as op kaseinhidrolisaat nie. Dit dui dus daarop dat hulle wel nog gestimuleer word deur 'n ander faktor of faktore wat aanwesig is in kaseinhidrolisaat. Dit is wel moontlik dat meer komplekse verbindings van aminosure, soos b.v. peptied-verbindings, vir die groter stimuleering van kasein-hidrolisaat verantwoordelik kan wees. Dit is dan ook meestal hidrolisate van die natuurlike proteïene wat die groei stimuleer in vergelyking met sintetiese aminosure.

Dit is dus moontlik dat die hidrolise tot aminosure nie volledig is nie en daar dan saamgestelde verbindings van aminosure in die hidrolisate aanwesig is. Net soos aminosure direk geassimileer kan word in die proteïenstruktuur, kan dit ook wees dat peptiede 'n soortgelyke funksie kan hê en direk geassimileer kan word. Dit sal dan in elk geval die noodigheid van sekere sintetiese stappe uitsluit, en vinniger groei verseker. Dit is egter ook nie onmoontlik nie dat een of meer van die sintetiese aminosure 'n teêwerkende effek op die groei kan hê nie. Dit is wel gevind vir cysteïentien opsigte van *A. niger* (76) en vir threonien, methionien en hydroxyprolien teenoor verskillende soorte van *Trichophyton* (65, 32 en 66) en *Microsporum* en *Epidermophyton* (66).

Alle fungi wat 'n organiese N-verbinding nodig het om te groei, het dus die vermoë verloor om anorganiese N-soute te assimileer en die deur hulle vereiste aminosure daaruit op te bou. In die gevalle waar slegs een aminosuur as organiese N-bron voldoende groei verseker, blyk dit dat hierdie aminosuur gebruik word vir die sintese van al die N-bevattende bestanddele. Vir *Trichophyton mentagrophytes* beweer Robbins en Ma dat die fungus die aminosuur transformeer in al die verskillende aminosure wat benodig word vir die vorming van protoplasma-proteïene sonder om dit eers te ammonifiseer. Foster (29) daarenteen beweer dat aminosuur-sintese plaasvind via die gebruik van ammonia en sekere  $\alpha$ -ketosure. Hy beskou dus die vereiste vir organiese N-stowwe slegs as 'n middel om ammonia vir selsintese te bekom. Die voorkeur vir organiese bo anorganiese stowwe sou volgens hom toe te skryf wees aan die groter permeabiliteit van eersgenoemdes. Die spesifieke werking van of behoefte aan bepaalde ~~amino~~<sup>amin</sup>sure word hiermee egter nie verklaar nie.

/Thorne.....



Thorne (81) beweer dat assimilasië van N uit 'n mengsel van aminosure plus asparagien groter is as van aminosure alleen. Hy verklaar dit deur aan te neem dat asparagien en glutamien tussenstadia is in die sintese van proteïene uit ammonia.

Alhoewel volledige kennis aangaande die proses van biosintese van aminosure nog ontbreek, is dit moontlik dat dit in die toekoms volledig opgelos sal word deur die gebruik van mutasies van *Neurospora* (of ander fungi) waarby die biosintese vermoë vir een besondere aminosuur ontbreek. (Bonner 8 en Foster 29).

In gevallé egter, soos ook vir ons *Scopulariopsis* waar een aminosuur nie voldoende is om te voorsien in die N-behoeftes nie, maar 'n groter of kleiner verskeidenheid van aminosure vereis word, is die probleem meer gekompliseerd. Dit blyk dat die fungus ook die vermoë verloor het om effektief alle aminosure uit een aminosuur te sintetiseer. Dit sou daarop wys dat die verskillende aminosure verkieslik direk opgeneem word. Die feit dat sommige van die aminosure, wanneer hulle afwesig is, nie so 'n groot invloed uitoefen as ander nie, mag aantoon dat daar vir hierdie aminosure 'n groter mate van sintetiese vermoë vanuit ander aminosure oorgebly het. Die feit dat die fungus nie 'n absolute vereiste vir 'n besondere aminosuur het nie, dui daarop dat daar wel nog die moontlikheid van sintese, van die nodige aminosure bestaan. Dit lyk egter, asof hierdie proses so stadig plaasvind dat die fungus voorkeur gee aan die direkte opname van die verskillende aminosure.

Dat daar in die grond heelwaarskynlik voldoende voedingstowwe vir hierdie fungus is, sou blyk uit die bevindings van Bremner (9). Hy vind dat 24 - 37 persent van die stikstof in grond by suur-hidrolise vrygestel word as  $\alpha$ -amino-N. Verder vind hy 20 verskillende aminosure in elke suurhidrolisaat van 10 verskillende gronde en verklaar voorts: =

"These....."

"These results establish the protein nature, or more accurately the peptide nature, of about one-third of the organic nitrogen of soil. This estimate must be regarded as minimal since destruction of amino acids undoubtedly takes place during hydrolysis. Moreover, soil hydrolysates contain large quantities of ammonia and some of this may be derived from the acid-amide (asparagine and glutamine) residues of protein material."

'n Volledige analise van die presiese behoeftes van ons Scopulariopsis vir die vasstelling van aminosuur-assimilasie, sou egter die grense van die beskikbare tyd oorskry het.

Uit 'n grafiese voorstelling van die diameter-waardes wat vir die fungus op agar-media verkry word (sien eksperiment 5), blyk dit dat die fungus 'n reglynige groeiverhouding het. Ryan (67 en 68) kry ook dieselfde tipe grafiek wanneer hy die diameter van *Neurospora crassa* teenoor die tyd stel, terwyl Ledeboer (50) dieselfde vind vir *Ceratostomella ulmi*. Hawker (40) noem die fungi waarvan die groei min of meer met 'n eenvormige spoed plaasvind totdat alle groeistowwe opgebruik is, die "non-staling" tipe. Teoreties word die groeikromme dan oneindig in 'n reguitlyn voortgesit, maar weens die uitputting van voedingstowwe hou die fungus mettertyd op om te groei, en autoliese tree in.

Op die eerste gesig lyk dit enigszins eienaardig dat die groeikromme reglynig is, d.w.s. dat die diameter van die mycelium in gelyke tye met 'n konstante bedrag toeneem.

'n Mens sou eerder verwag dat die oppervlakte van die mycelium reglynig sou toeneem en die toename dus telkens minder sou wees. 'n Moontlike verklaring hiervoor is deur Prof. Dr. W.J. Lütjeharms aan die hand gegee, en lui as volg:

As elke punt op die omtrek van die mycelium as 'n groeipunt beskou word waarvandaan groei konsentries plaasvind,

/dan.....

dan word deur die raaksirkel aan die afsonderlike sirkels,  
'n nuwe sirkel verkry waarvan die diameter telkens konstant  
groter sal wees as die oorspronklike een.

/HOOFSTUK VII.....

## HOOFSTUK VII

### OPSOMMING

1. 'n Fungus wat uit die grond geïsoleer is se imperfekte stadium het geblyk te behoort tot die geslag Scopulariopsis. Die perfekte vorm het ag askospore in 'n vroeg vervloeiende askus. In teenstelling met die perfekte vorm van Scopulariopsis-soorte wat beskryf is, en behoort tot die geslag Microascus, het hierdie perithaecium geen ostiolum nie. Die fungus neem blykbaar 'n besondere plek in die klassifikasie in, en by verdere ondersoek mag dit heelwat lig werp op die verwantskap van Penicillium, Aspergillus, Scopulariopsis, Thielavia en Microascus.
2. 'n Oorsig word gegee oor die vitamien- en aminosuurvereistes en ander onbekende faktore vir fungi. In vergelyking met bakterieë is die aminosuurvoeding en vereistes van fungi nog betreklik onbekend. Met uitsondering van geïnduseerde mutasies is daar nog slegs vir een enkele fungus 'n absolute vereiste vir 'n besondere aminosuur vasgestel, met aanduidings van 'n paar ander.
3. Die fungus het geblyk alkali-vormend te wees en groei vind nie plaas by 'n pH van 5.1 en laer nie. Die maksimum pH wat dit sal verdra is nie vasgestel nie, maar dit groei nog by 'n pH van 9.0. Die optimum pH op 'n gebufferde oplossing is vasgestel as 6.5 - 7.0.
4. Dit groei nie op sintetiese media met 'n anorganiese N-bron nie, en ook nie met ureum as N-bron nie. Die gebrek aan groei is nie te wyte aan spoorelemente nie, aangesien voldoende voorsiening daarvoor in die media gemaak is.

/ 5. Dit.....

5. Dit groei goed op media bevattende gisekstrak, trypton, pepton, kaseinhidrolisaat of pepton-hidrolisaat. Hierdie stowwe dien nie in die eerste plek as C-bron nie, aangesien glukose verkieslik gebruik word in hulle teenwoordigheid.
6. Die fungus het nie 'n uitwendige bron van enige van die volgende 9 of ander vitamene in gisekstrak, of ander onbekende faktore, nodig nie; thiamien, biotien, pyridoxien, pantotheensuur, nikotiensuur, askorbiensuur, riboflavin, inositol en para-aminobenzoësuur.
7. Op agar media word 'n reglynige groei-verhouding verkry, en die fungus is dus van die "non-staling" tipe. Die bepaling van die diameter van kolonies is vir hierdie fungus nie 'n geskikte ondersoek-metode nie.
8. Op agar media met verskillende gisekstrakkonsentrasies, is drie bondels van reglynige groeikrommes verkry, wat wys op die voorkoms van onbekende groeifaktore wat eers in bepaalde konsentrasies (bokant 'n drempelwaarde) invloed op die groei uitoefen.
9. Die fungus groei goed op 'n Czapek-oplossing waarby die volgende aminosure gevoeg word: L en B-alanien, arginien, asparagiensuur, cysteïene, cystien, glycien, glutamiensuur, histidien, hydroxyprolien, isoleucien, leucien, lysien, methionien, fenielalanien, prolien, tryptofaan, tyrosien en valien. Die groei is nog beter as asparagiensuur en glutamiensuur vervang word deur asparagien en glutamien.
10. Groei op 19 aminosure is egter nog nie so goed as op 'n 1.0 persent kasein-hidrolisaat oplossing nie. Die moontlikheid word bespreek dat die verskil toegeskryf mag word aan fisiologies aktiewe peptied- of ander komplekse verbindings van aminosure, of aan 'n teëwerkende effek wat sommige sintetiese aminosure mag hê.

11. Geen absolute vereiste vir een aminosuur kan vasgestel word nie, alhoewel sommige van die aminosure 'n groter stimulerende werking as ander het. Belangrikste vir die voeding van hierdie fungus is, asparagiensuur, glutamiensuur, fenielalanien, tyrosien, isoleucien, leucien, valien en glycien.

12. Die fungus blyk dus 'n baie komplekse groei vereiste te hê en dit sal wel interessant wees om die eksperimente verder voor te sit.

HOOFSTUK VIII

BIBLIOGRAFIE

1. Ajello, L., A cytological and nutritional study of *Polychytrium aggregatum*. Part III. Nutrition. Amer. J. Bot., 35:135 - 140, 1948.
2. Arêa Lêão, A.E. Deficiências vitamínicas de cogumelos and Cury, A. Patogénicos. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 5(1): 79 - 90, 1950.
3. Arkin & Colton An outline of statistical methods. Fourth Edition, 1947.
4. Asthana, R.P. & Hawker, L.E. The influence of certain fungi on the sporulation of *M. destruens* Shear and of some Ascomycetes. *Ann. Bot.*, 50(198): 323 - 343, 1936.
5. Barnett, H.L. & Lilly, V.G. The relation of thiamin to the production of perithecia by *Ceratostomella fimbriata*. *Mycologia*, 39(6): 699 - 708, 1947.
6. Benham, R.W. Effect of nutrition on growth and morphology of the dermatophytes. 1. Development of macroconidia in *Trichophyton rubrum* *Mycologia* 40(2): 232 - 240, 1948.
7. Bessey, E.A. Morphology and taxonomy of fungi. Blakiston Co. Toronto. Phila. 1950.
8. Bonner, D. Biochemical mutations in *Neurospora* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 11:14 - 24, 1946.
9. Bremner, J.M. The nature of soil - nitrogen complexes *J. Sci. Food Agric.*, 3(11): 497 - 500, 1952
10. Burkholder, P.R. Pyridoxine as a growth factor for *Graphium* & McVeigh, I. *Science*, 95: 127 - 128, 1942.
11. Burkholder, P.R. Vitamin deficiencies of fifty yeasts & Moyer, D. and moulds. *Bull. Torrey Bot. Club.* 70(4): 372 - 377, 1943.
12. Buston, H.W. et. al. The nitrogen requirements of *Nematospora gossypii* in synthetic media. *Ann. Bot., N.S.*, 2(6): 373 - 379, 1938.
13. Cantina, E.C. The vitamin nutrition of an isolate of *Blastoclada Pringsheimii*. *Amer. J. Bot.*, 35:238 - 242, 1948.
14. Cantina, E.C. The physiology of the aquatic Phycomycet, *Blastoclada Pringsheimii*, with emphasis on its nutrition and metabolism. *Amer. J. Bot.*, 36: 95 - 112, 1949.
- / 15. Chattaway.....

15. Chattaway, F.W. et. al., A growth factor for *Corynebacterium diphtheriae* from yeast  
I. Preparation.  
*Biochem. J.*, 43: lix, 1948
16. Chattaway, F.W. et. al., A growth factor for *Corynebacterium diphtheriae* from yeast.  
2. Identification of the components.  
*Biochem. J.* 43: Lix, 1948.
17. Clements, F.E. & Shear, C.L. The genera of fungi.  
H.W. Wilson & Co., New York, 1931.
18. Curzi, M. The relations between the genera *Microascus* Zukal and *Scopulariopsis* Bainier  
Abstract: *R.A.M.* 11: 6, 1932.
19. Difco, Manual of dehydrated culture media and reagents. Seventh Edition, 1944.  
Difco Laboratories, Inc. Detroit, Michigan.
20. Difco Laboratories Brief-wisseling
21. Dodge, C.W. Medical Mycology.  
London, Henry Kimpton, 1935
22. Dulaney, E.L. & Grutter, F.H. The nutritional requirements of *Eremothecium ashbyii* Guillermond  
*Mycologia*, 42: 717 - 722, 1950
23. du Vigneaud, V. et. al., The growth-stimulating effect of biotin for the diphtheria bacillus in the absence of pimelic acid.  
*Science*, 96 (2486): 186 - 187, 1942.
24. Emmons, C.W. & Dodge, B.O. The ascocarpic stage of species of *Scopulariopsis*.  
*Mycologia*, 23: 313 - 331, 1931.
25. Engler, A. & Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien.  
I. Teil. Abteilung 1, 1897.
26. Farries, E.A.M. & Bell, A.F. On the metabolism of *Nematospora gossypii* and related fungi, with special reference to source of nitrogen.  
*Ann. Bot.*, 44(174): 423 - 455, 1930.
27. Fergus, C.L. The nutrition of *Penicillium digitatum* Sacc.  
*Mycologia* 44(2): 183 - 199, 1952.
28. Fildes, P. The tryptophan and "sporogenes vitamin" requirements of *B. botulinus*.  
*Brit. J. Exp. Path.*, 16: 309 - 314, 1935.
29. Foster, J.W. Chemical activities of fungi.  
Academic Press Inc., New York, 1949.
30. Fries, N. The nutrition of fungi from the aspect of growth factor requirements.  
*T.B.M.S.*, 30: 118 - 134, 1948.
31. Georg, L.K. The relation of nutrition to the growth and morphology of *Trichophyton violaceum*.  
I. The vitamin and amino acid requirements of *T. violaceum*  
*Mycologia*, 43(3): 297 - 309, 1951.



32. Georg, L.K. Cultural and nutritional studies of *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton megnini*. *Mycologia* 44(4): 470 - 492, 1952.
33. Gould, R.G. et. al., On the growth requirements of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bact.*, 47: 287 - 292, 1944.
34. Goulden, C.A. Methods of statistical analysis. John Wiley and Sons. N.Y. 1949, pg.38
35. Hawker, L.E. The influence of various sources of Carbon on the formation of perithecia by *M. destruens* in the presence of accessory growth factors. *Ann. Bot.*, N.S., 3(10): 455 - 468, 1939.
36. Hawker, L.E. The effect of vitamin B<sub>1</sub> on the concentration of glucose optimal for the fruiting of certain fungi. *Ann. Bot.*, NS., 6(24): 631 - 636, 1942.
37. Hawker, L.E. The effect of vitamin B<sub>1</sub> on the utilization of glucose by *Melanospora destruens* Shear. *Am. Bot.*, N.S., 8(29): 79 - 90, 1944.
38. Hawker, L.E. Further experiments on growth and fruiting of *M. destruens* Shear in the presence of various carbohydrates, with special reference to the effects of glucose and of sucrose. *Ann. Bot.*, N.S. 11(42): 245 - 260, 1947.
39. Hawker, L.E. The effect of certain growth substances on mycelial growth and fruiting of *Melanospora destruens* Shear. *T.B.M.S.*, 30: 135 - 140, 1948.
40. Hawker, L.E. Physiology of fungi. London, 1950. p.72 - 93.
41. Hawker, L.E. & Chaudhuri, S.D. 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): 185 - 194, 1946.
42. Hazen, E.L. *Microsporium audouini*: the effect of yeast extract, thiamine, pyridoxine and *Bacillus Weidmaniensis* on the colony characteristics and macroconidial formation. *Mycologia*, 39(2) : 200 - 209, 1947.
43. Hazen, E.L. Effect of nutrition on the colony characteristics and macroconidial formation of *Microsporium audouini*. *Mycologia*, 43(3) : 284 - 296, 1951.
44. Jones, P.M. A new species of *Microascus* with a *Scopulariopsis* stage. *Mycologia*, 28: 503 - 509, 1936.

/ 45. Kitay.....

45. Kitay, E. & Snell, E.E. Some additional requirements of certain lactic acid bacteria. J. Bact., 60(1): 49 - 56, 1950.
46. Kuehner, C.C. The effect of added B-vitamins on the growth and ester production of *Hansenula anomala* (Hansen) Sydow. Mycologia, 43(4): 389 - 401, 1951.
47. Lafar, F. Handbuch der technischen Mykologie. Band 4. Gustav Fischer, Jena. 1907. pp.230 - 231.
48. Langeron, M. Precis de Mycologie. Paris, 1945. (Lewis & Co., London)
49. Leben, C. & Keitt, G.W. *Venturia inaequalis* (Cke) Winter V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins on growth in vitro. Amer. J. Bot., 35: 337 - 343, 1948
50. Ledebøer, M.S.J. Physiologische ondersoekinge over *Ceratomyxa ulmi* (Schwarz) Buisman Thesis, 1934.
51. Leonian, L.H. & Lilly, V.G. Studies on the nutrition of fungi. I. Thiamin, its constituents and source of nitrogen. Phytopathology, 28: 531 - 548, 1938.
52. Lilly, V.G. & Barnett, H.L. The influence of concentrations of nutrients Thiamin and Biotin, upon growth and formation of perithecia and ascospores by *Chaetomium convolutum*. Mycologia, 41(2): 186 - 196, 1949.
53. Lindau, G. Die mikroskopischen Pilze. Bd. 2 Abt.1. Berlin, 1922, 2 Aufl.
54. Lütjeharms, W.J. Review: A Manual of the soil fungi. J.C. Gilman J.S.A. Bot., 12(2): 78 - 79, 1946.
55. Masee, G. & Salmon, E.S. Research on coprophilous fungi. Ann. Bot. 15(58): 313 - 357, 1901.
56. Mosher, W.A., et. al., Nutritional requirements of the pathogenic mould *Trichophyton interdigitale*. Plant. Phys., 11(4): 795 - 806, 1936.
57. Nannfeldt, J.A. Studien über die morphologie und systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten Discomyceten. Uppsala, 1932.
58. Nielsen, N. & Hartelius, V. Untersuchungen über die Wachstoffsstoffwirkung der Aminosäuren gegenüber Hefe. Biochem. Zeitsch., 295) 211 - 225, 1938.
59. Nielsen, N. & Hartelius, V. Versuche über den Einfluss des Alanins auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Biochem. Zeitschr, 296: 171 - 173, 1938.

60. Nielsen, N. & Hartelius, V. Untersuchungen über die Wuchstoffwirkung von  $\beta$ -alanin,  $\beta$ -alanyl-glycin, Asparaginsäure, Glycyl-Asparaginsäure und verwandte stoffe auf Hefe  
Bioch. Zeitschr., 296: 359 - 366, 1938.
61. Peterson, W.H. & Peterson, M.S. Relation of bacteria to vitamins and other growth factors.  
Bact. Revs. 9(2): 49 - 109, 1945.
62. Raper, K.B. & Thom, C. A Manual of the Penicillia.  
Wilkins & Wilkins, Baltimore, 1949.
63. Robbins, W.J. & Kavanagh, V. Vitamin deficiencies of the filamentous fungi.  
Bot. Rev., 8(7): 411 - 471, 1942.
64. Robbins, W.J. & Ma, R. Pimelic acid, biotin and certain fungi  
Science, 96(2496): 406 - 407, 1942
65. Robbins, W.J. & Ma, R. Growth factors for Trichophyton mentagrophytes.  
Amer. J. Bot. 32: 509 - 523, 1945.
66. Robbins, W.J. & McVeigh, J. Effect of hydroxyproline on Trichophyton mentagrophytes and other fungi.  
Amer. J. Bot., 33: 638 - 647, 1946.
67. Ryan, F.J. Back-mutation and adaptation of nutritional mutants.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11: 215 - 227, 1946.
68. Ryan, F.J. & Lederberg, J. Reverse-mutation and adaptation in leucine-less Neurospora.  
Proc. Nat. Acad. Sci., 32(6): 163 - 173, 1947.
- 69 Saccardo, P.A. Sylloge Fungorum
- 69a Idem., 9:483, 1891
- 69b Idem., 11:279, 1895
- 69c Idem., 17:610, 1905
- 69d Idem., 24:229, 1926
- 69e Idem., 24<sup>2</sup>:838, 1928
70. Schade, A.L. The nutrition of Leptomitus.  
Amer. J. Bot., 27: 376 - 384, 1940.
71. Schopfer, W.H. Plants and vitamins  
Chronica Botanica, 1943.
72. Schopfer, W.H. & Guilloud, M. La culture d'Eremothecium Ashbyii en milieu synthétique  
Experientia 1(1): 22 - 23, 1945.

73. Smith, L.D. & Douglas, H.C. Factors necessary for maximum growth of *Clostridium bifermentans*. J. Bact., 60(1): 9 - 15, 1950.
74. Sprince, H., & Woolley, D.W. The occurrence of the growth factor Streptogenin in purified proteins. J. Amer. Chem. Soc., 67(10): 1734 - , 1945.
75. Steinberg, R.A. Growth of fungi in synthetic nutrient solutions Bot. Rev., 5(6): 327 - 350, 1939.
76. Steinberg, R.A. Effects of trace elements on growth of *Aspergillus niger* with amino acids. J. Agric. Res., 64: 455 - 475, 1942.
77. Steinberg, R.A. Growth of fungi on synthetic nutrient solutions. II. Bot. Rev. 16(4): 208 - 228, 1950.
78. Steinberg, R.A. & Thom, C. Reversions in morphology of nitrite-induced "mutants" of *Aspergilli* grown on amino acids. J. Agric. Res. 64: 645 - 652, 1942.
79. Stokes, J.L. & Gunness, M. & Foster, J.W. Vitamin contents of ingredients of microbiological culture media. J. Bact., 47: 293 - 299, 1944.
80. Thom, C. The Penicillia 1930. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
81. Thorne, R.S.W. Mechanisms of nitrogen assimilation by yeast and their relation to the problem of yeast growth in wort. Wall. Lab. Comm., 13(43): 319-340, 1950.
82. Van Beyma thoe Kingma, F.H. Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem "Centraalbureau voor Schimmelcultures" Baarn (Holland) III Mitteilung Zentr. bld. Bakt. u.s.w. II Ab. 91: 345 - 355, 1935.
83. Van Beyma thoe Kingma, F.H. Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem "Centraalbureau voor Schimmelculture" Baarn (Holland) IV Mitteilung Zentr bl. Bakt., u.s.w. II Ab. 96: 411 - 432, 1937.
84. Van Beyma thoe Kingma, F.H. Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem "Centraalbureau voor Schimmelcultures" Baarn (Holland) V Mitteilung Zentr bl. Bakt., u.s.w. II Ab. 99: 381 - 394, 1939.
85. Van Zinderen Bakker, E.M. Investigations about the morphology and physiology of *Physalospora Cydoniae* Arnoud. Leiden, 1935. Dr. thesis
86. Villela, G.G. & Cury, A. Studies on the vitamin nutrition of  *Allescheria Boydii* Shear. J. Bact., 59(1): 1 - 11, 1950.

- ~~87. Van Szilvinyi, A.~~
87. Von Szilvinyi, A. Mikrobiologische Bodenuntersuchungen im Lunzer Gebiet  
III Teil. Die Schimmelpilz flora  
Zentr. Bakt. II 103: 172 - 175, 1941.
88. Williams, R.J.  
& Rohrman, E.  $\beta$ -alanine and "Bios"  
J. Amer. Chem. Soc. 58: 695, 1936.
89. Yaw, K.E. Production of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* grown in a synthetic medium.  
Mycologia 44(3): 307 - 317, 1952.
90. Zach, F. Untersuchungen über einige neue Arten der Gattung *Scopulariopsis* Bainier.  
Abstract R.A.M. 14: 36, 1935.  
Oster. Bot. Ztschr., 82: 173 - 186, 1934.
91. Zukal, H. Ueber einige neue Pilze, Myxomyceten und Bakterien.  
Verh. k.k. Zool. bot. Ges. Wien. 35 (1885): 333 - 342, 1886.

