

The relation between the period of heating (x) and the death-temperature (y) is expressed reasonably well in a curve of the general form: $(y - a) \sqrt{x} = b$.

In sterilizing the soil by steaming it is desirable to keep the ground covered, also after the treatment, for about three hours.

At the following temperatures a thorough killing-off is obtained:

Fusarium 70° C; *Sclerotinia* and *Verticillium* (from cucumber) 60° C; *Heterodera* 55° C; *Verticillium* (from tomato) and *Agriotes* (wireworms) 50° C.

Tomatoseed may be rendered sterile against *Verticillium* by submerging it in water of 45°–50° C for half an hour. By this treatment the germinative power is not harmed in the least.

LITERATUUR

1. CHICK, H., J. Hyg. 8, 1908 en 10, 1910.
2. EYKMAN, C., Folia Microbiologica I, 359, 1912.
3. HOSHINO, H. M. en G. H. GODFREY, Phytopathology 23, 260, 1933.
4. KADOW, K. J., Phytopathology 24, 1265, 1934.
5. KLUYVER, A. J., Versl. XIXe conf. over voedingsmiddelenscheikunde op 13 Dec. 1940 te Amsterdam.
6. MADSEN en NYMAN, Z. Hyg. u. Inf. Krkh. 57, 1907.
7. NEWHALL, S. G., Cornell Univ. Agric. Exp. St. Bull. 731, 1940.
8. OSMUN, A. V., (Dep. of Bot.) Rep. Mass. Agric. Exp. St. Bull. 339, 25, 1937.
9. RAHN, O., J. Gen. Physiol. 13, 395, 1930.
10. RAHN, O., Gold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 2, 70, 1934.
11. RAHN, O. en M. N. BARNES, J. Gen. Physiol. 16, 579, 1933.
12. WILLIAMS, P. H., Cheshunt Exp. and Res. St. Ann. Rep., 29, 1943.

OVER HET ZUIVEREN VAN PLANTENVIREN¹⁾

With a summary: On the purification of plant viruses

DOOR

Dr L. ALGERA, Dr Ir T. H. THUNG en Ir J. P. H. VAN DER WANT
(Lab. v. Bloembollenonderzoek, Lisse; Instituut voor Plantenziekten, Buitenzorg;
Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen)

INLEIDING

De viruszuivering is een onderwerp, waarvoor onder phytopathologen grote belangstelling bestaat. Uit talrijke onderzoeken is duidelijk geworden van welke betekenis de zuivering voor het onderzoek der plantenviren is. Zo is het voor inoculatieproeven soms beter met gezuiverd virushoudend sap te werken dan met ongezuiverd sap. Ook kan men bij het serologisch onderzoek van plantenviren dikwijls met meer succes het proefdier, ter winning van antiserum, inspuiten met een gezuiverde virusoplossing dan met ongezuiverd sap. De electronenmicroscopie, het nieuwste hulpmiddel in het virusonderzoek, vereist tenslotte doorgaans eveneens gezuiverde viruspreparaten.

In de praktijk is de wens geuit met eenvoudige methoden kennis te maken, ten-

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Sept. 1947.

einde in weinig geoutilleerde laboratoria, zoals die der Middelbare landbouwscholen en die der proeftuinen, practisch zuivere viren te verkrijgen.

Aan de hand van de literatuur zullen verschillende methoden van viruszuivering beschreven worden.

Reeds vóór STANLEY hebben enige onderzoekers met meer of minder succes beproefd viren te zuiveren en te concentreren. Na 1935 is de literatuur betreffende de viruszuivering echter belangrijk verrijkt. Een historisch overzicht geeft BAWDEN (1), waarnaar verwezen moge worden.

STANLEY (12) heeft in 1935 het tabaksmozaïekvirus in practisch volkomen zuivere toestand kunnen afscheiden, naar hij meende in de vorm van echte kristallen. Deze opvatting bleek echter later niet geheel juist te zijn. Echte kristallen zijn immers in 3 dimensies regelmatig opgebouwd. Bij de naaldvormige deeltjes van het tabaksmozaïekvirus, die STANLEY na zuivering verkreeg is er slechts een regelmatige rangschikking van de eiwitmoleculen in 2 dimensies, terwijl de rangschikking in de derde dimensie onregelmatig is (5). Men spreekt in dit geval dan ook liever van parakristallen of vloeibare kristallen. Toch zijn er viren bekend, die in ware kristallijne vorm kunnen worden verkregen.

Het is dus niet alleen mogelijk gebleken met bepaalde kunstgrepen een zeker virus te concentreren en te bevrijden van diverse normale celbestanddelen van de plant, tevens is het mogen gelukken in enkele gevallen het virus in kristallijne of parakristallijne vorm af te scheiden, zoals het reeds genoemde tabaksmozaïekvirus (7,12), het „bushy stunt” virus van de tomaat (3), de verschillende viren van het „tobacco necrosis” type (1), het virus van het „Southern bean” mozaïek (10) en ten slotte dat van het „yellow mosaic” van koolraap en Chinese kool (8). Van een aantal andere viren zijn met de zuiveringsmethoden slechts amorphe producten verkregen.

ZUIVERINGSMETHODEN

Eenvoudig te zuiveren viren. De met beperkte middelen uitvoerbare zuiveringsmethoden worden in Holland door ons in Wageningen en in Lisse toegepast. Wij ontleenden deze methoden aan die gevolgd te Rothamsted (Engeland). De voor naamste van deze methoden verschilt niet wezenlijk van die, welke STANLEY publiceerde. Zij berust hierop, dat men het virus na voorafgaande verwijdering van het gros der normale celbestanddelen uit het virushoudend plantenperssap, uitzout met ammoniumsulfaat. Naar BAWDEN (1) aangeeft, kunnen alle tot nu toe bestudeerde viren in neutraal milieu door toevoeging van ammoniumsulfaat neergeslagen worden. De sterkte van de te gebruiken ammoniumsulfaat-oplossing is van diverse factoren afhankelijk, zoals het soort van virus, de pH van de virus-oplossing, de zuiverheid en de temperatuur.

Vanzelfsprekend kan de zuivering alleen worden toegepast op viren, die met sap kunnen worden overgebracht en die niet binnen zeer korte tijd na het uitpersen van het sap inactief worden.

De methode kan in het volgend schema worden samengevat:

1. Jong virushoudend plantenmateriaal wordt uitgeperst.
2. Het perssap wordt gedurende 10 minuten verhit op 60° C; de planteneiwitten en andere normale celbestanddelen (zoals bladgroenkorrels) slaan neer.

Het virus blijft echter in oplossing. Meestal bevat sap van jonge planten, die gedurende de wintermaanden zijn besmet met een virus en korte tijd na

het tot uiting komen van de ziektesymptomen worden uitgeperst, relatief de minste hoeveelheid normale plantenbestanddelen.

- 2a. Indien het een virus betreft, dat bij 60° C of lagere temperatuur geïnactiveerd wordt, voegt men per 100 cm³ perssap 30 cm³ 4 % Na₂HPO₄-oplossing toe. Hierdoor slaan ook normale celbestanddelen neer, terwijl het virus in oplossing blijft.
3. Het neerslag in het volgens 2 of 2a behandelde sap wordt afgecentrifugeerd (bij 2 tot 3000 omwentelingen per minuut); de heldere bovenstaande vloeistof wordt afgeschonken en per 100 cm³ vloeistof wordt 25 g ammoniumsulfaat bij kleine hoeveelheden tegelijk toegevoegd. De ammoniumsulfaat-oplossing heeft dan ongeveer $\frac{1}{3}$ van de verzadiging bereikt. Door roering brengt men het sulfaat in oplossing, waarna het virusmateriaal zich gaat afscheiden.
4. Het ontstane virusneerslag wordt afgecentrifugeerd; vervolgens wordt de bovenstaande vloeistof afgeschonken. Het virusneerslag wordt in een weinig gedestilleerd water weer in oplossing gebracht.
5. Door middel van centrifugeren kunnen thans ongewenste, niet in oplossing gebrachte onzuiverheden verwijderd worden; het virus blijft echter in oplossing.
6. Het viruseiwit wordt opnieuw neergeslagen met ammoniumsulfaat en afgecentrifugeerd. Eventueel kan men het neerslaan en weer oplossen nog enkele malen herhalen.
7. Het viruseiwit wordt in een geringe hoeveelheid gedestilleerd water opgenomen; deze oplossing wordt in cellophaanhulzen gedialyseerd om het zout te verwijderen: 2 maal een etmaal ten opzichte van leidingwater, vervolgens 2 maal een etmaal ten opzichte van gedestilleerd water.

Met deze eenvoudige werkwijze gelukte het BAWDEN en PIRIE (3) het „bushy stunt”-virus van de tomaat in zuivere kristallijne vorm af te zonderen. Bij deze zuivering werd tevens gebruik gemaakt van de eigenschap, dat het virus bij kamertemperatuur na toevoeging van ammoniumsulfaat in amorphe toestand neerslaat, doch bij 0° C in de vorm van fraaie dodecaheders. Het bleek, dat de verhitting van het virushoudend perssap gedurende 10 minuten op 60° C ter coagulatie van de normale sapbestanddelen, een enigszins inactiverende invloed op het virus uitoefende. Daarom was het beter de normale plantenstoffen neer te slaan met Na₂HPO₄. Dit is door BAWDEN en PIRIE (4) beschreven, waarbij zij tevens vermelden, dat de virusoplossing, verkregen door het met ammoniumsulfaat uitgezoute virus weer in water op te lossen, bevrijd kan worden van onzuiverheden door de pH van de oplossing met verdund azijnzuur op 4 te brengen. Het virus blijft bij deze pH in oplossing, de onzuiverheden slaan neer. Na afcentrifugeren van dit neerslag is de werkwijze als volgt: men voegt onder roering druppelsgewijze een verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing toe tot een zwakke troebeling ontstaat, waarna men het virushoudend sap in smeltend ijs plaatst. Na enige tijd verdwijnt de troebeling weer en gaat het virus zich in kristallijne toestand afscheiden. Binnen 48 uur is al het virus uitgekristalliseerd.

Ook ons gelukte het op deze eenvoudige wijze de kristallen van het „bushy stunt” virus te verkrijgen. Deze zuiveringsmethode werd ook toegepast op het virus, dat de ratelziekte van de tabak veroorzaakt. Deze ziekte is door QUANJER (11) beschreven. De eerste zuivering van het virushoudend perssap van jonge tabakszischeuten kon door een verhitting gedurende 10 minuten op 60° C be-

werkstelligd worden, aangezien het virus pas tussen 70 en 75° C geïnactiveerd wordt. Het virusneerslag, dat met ammoniumsulfaat verkregen werd, was amorph en bruin gekleurd. Na $2 \times$ uitzouten met ammoniumsulfaat kon het na afcentrifugeren en weer oplossen in een weinig gedestilleerd water minstens 3 maanden lang bij 12° C bewaard worden, zonder zijn infectievermogen te verliezen.

Bij de viruszuivering kunnen echter nog andere middelen dan het uitzouten met ammoniumsulfaat te hulp geroepen worden. Zo kan men b.v. na het oplossen van het met ammoniumsulfaat verkregen neerslag van het tabaksmozaïekvirus, dit virus in vrij zuivere vorm afscheiden door de pH van de virusoplossing op 3,4 te brengen; dit is nl. het isoëlectrische punt van dit virus (6).

Men kan dit bereiken met verdund zout- of azijnzuur, waarbij men reageert t.o.v. broomphenolblauw, welks omslagpunt bij ongeveer $\text{pH} = 3,4$ ligt. Bepaalde onzuiverheden, die door de voorafgaande behandeling met ammoniumsulfaat te zamen met het virusproteïne waren neergeslagen, blijven thans in oplossing, zodat de aanzuring sneller tot het doel: de zuivering van het virus, leidt. Volgens BAWDEN en PIRIE (4) is het virus echter alleen onoplosbaar bij $\text{pH} = 3,4$ in aanwezigheid van zouten, in dit geval restanten ammoniumsulfaat.

Een oplossing van tabaksmozaïekvirus in een weinig gedestilleerd water vertoont sterke dubbelbreking bij stroming. Zuurt men deze oplossing aan dan ontstaat een neerslag, dat een fraaie zijdeachtige glans vertoont. Dit is het tabaksmozaïekvirus in vrij zuivere vorm.

PRICE (10) paste bij de zuivering van het „Southern bean” mozaïekvirus alcohol toe. Hij precipiteerde eerst met ammoniumsulfaat, loste daarna weer op in water en voegde vervolgens 30 % alcohol toe. Het virus is hierin oplosbaar, doch bepaalde verontreinigingen niet. Na afcentrifugeren van deze verontreinigingen kon de virusoplossing ten tweede male met ammoniumsulfaat worden behandeld. Het virus werd, door ultracentrifugeren van de met ammoniumsulfaat behandelde virusoplossing, in kristallijne vorm verkregen.

Het laatste virus, dat in kristallijne vorm is verkregen, is dat van het „turnip yellow mosaic” (8). Het perssap van viruszieke Chinese kool werd door centrifugeren van de grove delen bevrijd, waarna het met $\frac{1}{3}$ volume 97 % alcohol werd gemengd. Het neerslag, dat thans ontstond, bevatte het virus. Het werd na enige uren staan afgecentrifugeerd, de lichtgekleurde vloeistof werd afgeschonken en het groene neerslag uitgetrokken met $\frac{1}{2}$ % NaCl-oplossing; de hoeveelheid nodige NaCl-oplossing was ongeveer $\frac{1}{3}$ tot $\frac{1}{2}$ van de oorspronkelijke hoeveelheid perssap. Daarna werden de onopgeloste bijproducten afgecentrifugeerd. Door toevoeging van ammoniumsulfaat aan de heldere vloeistof tot $\frac{1}{3}$ verzadiging werd het virus in kristallijne vorm neergeslagen. Na enige tijd was de smetstof volledig geprecipiteerd en konden de kristallen afgecentrifugeerd worden.

Moeilijker te zuiveren viren. Gelukte het bij de bovenbeschreven viren meer of minder gemakkelijk het virus in para-kristallijne of zelfs kristallijne toestand af te scheiden, bij het aardappel X-virus vormen de para- (of vloeibare) kristallen zich slechts bij zeer sterk gezuiverde preparaten, daar hun vorming bemoeilijkt wordt door de aanwezigheid van onzuiverheden (1).

In de regel gaat men bij de zuivering uit van geïnfecteerde tabaksplanten, daar het X-virus hierin een hogere concentratie bereikt dan in de aardappelplant.

BAWDEN en PIRIE (2) bevroren het perssap eerst en voegen na het ontdooien 15 g Na_2HPO_4 per liter sap toe. Na centrifugeren wordt of 185 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per liter toegevoegd of het sap wordt met 0,1 n HCl op $\text{pH} = 4,5$ gebracht. Bij beide methoden wordt al het virus neergeslagen. Het neerslag wordt afgecentrifugeerd en opgelost in een volume water, dat gelijk is aan een tiende deel van het oorspronkelijke sap. De suspensie wordt met NaOH geneutraliseerd en gecentrifugeerd tot zij helder is. De bovenstaande vloeistof vertoont nu stromingsdubbelbreking als zij in een buisje tussen gekruiste nicols wordt geschud.

Op deze wijze is dus reeds de aanwezigheid van het X-virus aan te tonen. Wil men verder zuiveren, dan dient men het neerslaan met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ een aantal malen te herhalen, waarbij telkens met behulp van enkele druppels NaOH-oplossing de pH neutraal moet worden gehouden. Zodra de bovenstaande vloeistof geheel helder is, wordt de pH met azijnzuur op 4,5 gebracht. Het door dit aanzuren gevormde neerslag bevat in de regel al het X-virus. Door wassen met water van $\text{pH} = 4,5$ wordt dit neerslag van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bevrijd. Hoewel het preparaat nu sterke stromingsdubbelbreking vertoont, is het steeds bruinegekleurd en nooit vloeibaar kristallijn. Voor verdere zuivering is of trypsine of een centrifuge met hoog toerental nodig.

In het eerste geval wordt het viruspreparaat gedurende 90 minuten bij $\text{pH} = 7,5$ en 38°C met 0,05 % trypsine behandeld. Wel wordt hierbij ongeveer een derde deel van het X-virus ontleed, doch de onzuiverheden zijn gevoeliger voor de trypsine zodat het preparaat in de regel kleurloos wordt. Na een aantal precipitaties met ammoniumsulfaat en zuur, vormt zich een vloeibaar kristallijne oplossing.

In het tweede geval kan $\frac{1}{5}$ tot $\frac{1}{3}$ deel van het virus worden gesedimenteerd door het preparaat gedurende 3 uren te centrifugeren in een veld van $16000 \times$ de zwaartekracht. Het sediment wordt in water opgelost. Uit deze oplossing kan bruin materiaal, dat veel koolhydraten bevat, worden verwijderd door centrifugeren bij 3000 toeren per minuut. Door herhaling van afwisselend centrifugeren bij hoog en laag toerental kan een kleurloos viruspreparaat worden verkregen.

PFANKUCH en KAUSCHE (9) verdunnen het perssap (weer van de tabak) eerst met het dubbele volume water en roeren dit verdunde sap dan bij kamertemperatuur gedurende 20 minuten zeer krachtig met $\frac{1}{4}$ van zijn volume chloroform. Men dient hierbij te voorkomen, dat de roerder lucht door de vloeistof zuigt en de oplossing schuimt. De door de chloroform gecoaguleerde sapbestanddelen worden onmiddellijk daarna gedurende 20 minuten bij 3000 toeren afgecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof gedurende minstens 15 uren in een koelkast bewaard. Na centrifugeren bij 3000 toeren wordt aan de afgeschonken vloeistof het halve volume koude verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oplossing toegevoegd. Na ongeveer een half uur volgt afcentrifugeren van het in deze $\frac{1}{3}$ verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oplossing ontstane neerslag; nu lost men het sediment op in $\frac{1}{30}$ m fosfaatbuffer $\text{pH} = 7$. Deze oplossing is slechts zwak gekleurd en bevat geen laag-moleculaire eiwitten meer.

De ammoniumsulfaat-behandeling wordt nog eenmaal herhaald en het sediment weer in fosfaatbuffer opgelost. Het aan het sediment hechtende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wordt verwijderd door dialyse in cellophaan gedurende liefst 15 uren in stromend leidingwater. De gedurende deze behandeling gevormde vlokken centrifugeert men af.

Uit deze oplossing kan ongeveer $\frac{1}{3}$ tot $\frac{1}{4}$ deel van het aanwezige X-virus worden neergeslagen door 3 uren lang te centrifugeren bij 15000 toeren per minuut. Het gesedimenteerde X-virus wordt opgelost in gedestilleerd water of $\frac{1}{10}$ m fosfaatbuffer pH = 7.

Zoals uit het bovenstaande blijkt, kan in alle tot nu toe bestudeerde gevallen het uitzouten met ammoniumsulfaat worden toegepast om viren te concentreren. Voor een praktische toepassing van de viruszuivering zal dit in de meeste gevallen voldoende zijn. Met vrij eenvoudige hulpmiddelen kan men dan volstaan; slechts dient men de beschikking te hebben over een centrifuge met een omwentelings-snelheid van 2-3000 toeren per minuut.

Om viren in kristallijne, resp. parakristallijne toestand te verkrijgen, zijn doorgaans gecompliceerder methoden nodig, waarbij men diverse chemicaliën toepast. Het gebruik van deze chemicaliën is echter afhankelijk van de eigenschappen van het virus, dat men wil isoleren. De middelen, die in het ene geval voldoen, behoeven in het andere geen gunstig resultaat op te leveren. Slechts door het experiment kan men uitmaken welke methode het beste gevolgd zal kunnen worden.

SUMMARY

Some methods of virus purification are discussed. A distinction has been made between the purification, which can be obtained in a rather simple way (e.g. of the viruses of tobacco mosaic, tomato bushy stunt and turnip yellow mosaic) and that, which require a more complicated manipulation (e.g. of the potato virus X).

Information is given about the concentration through salting out with ammonium sulphate of the virus causing the „ratelziekte” of tobacco. Previously the normal cell constituents had been mostly removed by heating the expressed sap of diseased tobaccoplants during 10 minutes at 60° C and then centrifuging off the coagulum. The partly purified virus (a brown, amorphous product has been obtained) could be preserved at 12° C during at least 3 months without losing infective power.

LITERATUUR

1. BAWDEN, F. C.: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass. 1943.
2. BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE: Liquid crystalline preparations of potato virus „X”. The Brit. Journ. of Exper. Path. 19, 66-82, 1938.
3. BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE: Crystalline preparations of tomato bushy stunt virus. The Brit. Journ. of Exper. Path. 19, 251-263, 1938.
4. BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE: Methods for the purification of tomato bushy stunt and tobacco mosaic virus. The Biochem. Journ. 37, 66-70, 1943.
5. BERNAL, J. D. and I. FANKUCHEN: Structure types of protein „crystals” from virus infected plants. Nature 139, 923-924, 1937.
6. BEST, R. J.: Precipitation of the tobacco mosaic virus complex at its isoelectric point. Austr. Journ. of Exper. Biol. and Med. Science 14, 1-13, 1936.
7. KOOT, I. J. VAN: Viruszuivering en wat zij ons leert omtrent den aard van het virus. Tijdschr. o. Plz. 46, 97-126, 1940.

8. MARKHAM, R. and K. M. SMITH: A new crystalline plant virus. *Nature* 157, 300, 1946.
9. PFANKUCH, E. und G. A. KAUSCHE: Über Darstellung, Eigenschaften und quantitative Bestimmung von Tabakmosaik-Virus¹ und Kartoffel-X-virus und ihre physikochemische Differenzierung. *Biochem. Zeitschr.* 299, 334-345, 1938.
10. PRICE, W. C.: Crystallization of Southern bean mosaic virus. *Science* 101, 515-517, 1945.
11. QUANJER, H. M.: Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleigrond. *Tijdschrift o. Plz.* 49, 37-51, 1943.
12. STANLEY, W. M.: Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science* 81, 644-645, 1935.

WISSELBOUW VAN AARDAPPELRASSEN ALS BESTRIJDINGSMIDDEL TEGEN SCHURFT ¹⁾

With a summary: Rotation of potato varieties as a control of scab.

DOOR

H. L. G. DE BRUYN

Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen

Het is gebleken, dat er verschillende rassen van *Actinomyces* bestaan, die schurft op aardappelen veroorzaken (1, 5, 7 en 8). Deze rassen verwekken op hetzelfde aardappelras verschillende typen van schurft, terwijl tevens vastgesteld werd, dat de aardappelrassen verschillend vatbaar zijn voor bepaalde *Actinomyces*-rassen. ²⁾

Gezien dit feit werd in 1939 (DE BRUYN, 1) de vraag gesteld of wisselbouw van aardappelrassen van invloed zou zijn op het optreden van schurft bij langdurige aardappelverbouw op hetzelfde land. Op Bintje komt een oppervlakkig type schurft voor, veroorzaakt door een ander ras dan dat, welke de diepe schurft verwekt. Voor dit laatste is Eigenheimer zeer vatbaar. Bij langdurige verbouw van Bintje zal het ras van de oppervlakkige schurft in stand blijven en zich tevens sterk vermeerderen. Wordt verbouw van Bintje afgewisseld door die van Eigenheimer, dan gaat de ontwikkeling van dit ras achteruit.

Er werd vastgesteld, dat een passage door aardappel de virulentie van de schurftorganismen versterkt. Deze factor brengt bij voortdurende verbouw van hetzelfde aardappelras de ziekteverwekkers eveneens in het voordeel. Bij teelt van aardappelrassen, die voor vele schurfttypen resistent zijn, wordt de verzwakking van een groot aantal schurftassen waarschijnlijk, zowel wat betreft de virulentie als wat betreft hun aantal. Dit zou de schurftaantasting van daarna geteelde vatbare aardappelrassen doen verminderen.

Om bovengenoemde theorie aan de praktijk te toetsen werd in 1939 met een proef begonnen. In een bak werd sterk met schurft besmet zand gebracht, af-

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Juli 1947.

²⁾ In verband met de nog weinig uitgewerkte systematiek van de *Actinomyceten* is geen verschil tussen rassen en soorten van *Actinomyces* gemaakt en wordt in dit artikel alleen van rassen gesproken.