

DE INVLOED VAN KOPERVERBINDINGEN OP DE ONTWIKKELING VAN ENKELE SCHIMMELS IN VITRO¹⁾

*Mit einer Zusammenfassung: Der Einfluss von Kupfermitteln auf das Wachstum
von Pilzen in vitro*

DOOR

Ir. G. v. D. ENDE en K. VERHOEFF²⁾

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten,” Baarn

INLEIDING

Bij het onderzoek naar de werking van koperverbindingen als bestrijdingsmiddel tegen *Septotinia populiperda* WATERM. et CASH bleek, dat voor de remming der ascosporen-kieming in vitro ongeveer 7 tot 8 mg. koper per liter nodig was (v. D. ENDE 1954). Daarnaast werd nagegaan, bij welke concentratie van het koper er geen myceliumgroei van de schimmel in vitro meer optrad. Hierbij deed zich het merkwaardige verschijnsel voor, dat de schimmel in staat was, de aan de voedingsbodem toegevoegde koper-verbinding af te breken en in een andere onoplosbare koperverbinding onder de myceliummat neer te slaan. Dit gebeurde zowel wanneer koper in de vorm van kopercarbonaat (0,04 en 0,2 %), als in de vorm van koperoxychloride (0,2 en 1 %) aan de voedingsbodem werd toegevoegd.

Naar aanleiding hiervan wilden wij nagaan, of dit verschijnsel zich ook voor kan doen bij andere, meer of minder belangrijke parasieten.

LITERATUUR OVERZICHT

Er zijn in de literatuur over dit verschijnsel weinig gegevens te vinden. GÄUMANN (1950) en RABANUS (1939, 1940) hebben onderzoek verricht naar de werking van koperverbindingen als impregneringsmiddel tegen houtaantastende fungi.

RABANUS ging de ontwikkeling van 11 houtschimmels na op kunstmatige voedingsbodems waaraan kopercarbonaat was toegevoegd. Vier ervan vertoonden geen noemenswaardige uitbreiding; acht schimmels gaven een duidelijke opheldering van de voedingsbodem rond de entplaats, waarna onder het geënte mycelium-schijfje een duidelijk neerslag ontstond. RABANUS gaf hiervoor de volgende verklaring: Bij de 4 geremde schimmels ontstond eerst even een opheldering van de voedingsbodem op de plaats van aanraking. De schimmel heeft bij zijn poging om te groeien zuren gevormd, waardoor het carbonaat gedeeltelijk werd opgelost. De ontstane opgeloste koperverbinding hield echter de verdere groei van het mycelium tegen.

In de praktijk komt dit proces dus neer op een vrijwaring van de aantasting. Bij de andere 8 schimmels zijn de uiterste hyfentoppen in staat een zuur te vormen, dat het kopercarbonaat oplost. Onmiddellijk achter de myceliumtoppen

¹⁾ Aangenomen voor publikatie 1-5-1957.

²⁾ Thans werkzaam aan het Proefstation voor groenten en fruit onder glas te Naaldwijk.

zou de schimmel echter een ander zuur afscheiden, dat het in oplossing gegane koperzout weer in een onoplosbare verbinding neerslaat. Bij deze 11 schimmels vond hij ook een sterke zuurvorming in het medium gedurende de eerste vier weken. Het is bekend, dat vele schimmels in vitro organische zuren in het milieu afscheiden, o.a. oxaalzuur (MC CALLAN c.s., 1936, RABANUS, 1939 en WALKER c.s., 1927), citroenzuur (NARAYANAMURTI c.s., 1952) en appelzuur (GOLDSWORTHY c.s., 1936).

EIGEN ONDERZOEK

Door ons werden 10 schimmelsoorten gebruikt, welke in drie groepen zijn in te delen.

1. Zes parasieten, die de bovengrondse delen van planten aantasten, nl. *Alternaria brassicae* (BERK.) BOLLE, *Cercospora beticola* SACC., *Cladosporium fulvum* COOKE, *Phomopsis dauci* v. ARX, *Septotinia populiperda* WATERM. et CASH. en *Venturia inaequalis* (CKE) ADERH.
2. Twee parasieten, die de plant via de grond aantasten, nl. *Fusarium oxysporum* (LINF.) f. *pisi* ras 1 SN. ET H. en *Moniliopsis aderholdi* RUHL.
3. Twee houtschimmels, *Trametes radiciperda* FR. en *Poria vaporea* PERS, en *Penicillium citrinum* THOM. als controle. Het is nl. uit vorige proeven bekend, dat deze schimmel sterk het vermogen bezit om koperverbindingen af te breken en het koper in een andere, onoplosbare vorm neer te slaan.

Van deze schimmels werden nagegaan:

- A. De veranderingen van de zuurgraad in een voedingsoplossing ten gevolge van de groei van de schimmel.
- B. Het vermogen om in vaste voedingsbodems koperverbindingen af te breken en het koper in een andere vorm neer te slaan.
- C. Bij welke koper-concentraties in de voedingsbodems de schimmels nog kunnen groeien.

A. Om de veranderingen van de zuurgraad in de voedingsoplossingen onder invloed van de groei van de schimmels na te gaan werden deze geënt in erlenmeyers van 250 ml gevuld met 50 ml aardappelwater of 50 ml Czapek-Dox-oplossing. Van elke schimmel werden 8 culturen in aardappelwater en 8 in Czapek-Dox-oplossing gemaakt. Om de 15 dagen werd van elke schimmelsoort het mycelium uit 2 kolven van elke reeks afgefilterd en van de vloeistof werd met behulp van de Beckmann pH-meter de zuurgraad bepaald. Uit Fig. 1 en 2 blijkt, dat het zuurvormend vermogen van de schimmels zeer verschillend is. Sommige maken het voedingsmedium steeds zuurder, andere doen de pH stijgen. In een derde groep schommelt de pH om die van de controle-oplossing, terwijl tenslotte een aantal schimmels de pH eerst doen dalen en daarna stijgen. De aard van de voedingsbodem is hierbij evenwel van invloed. In aardappelwater als voedingsmedium liggen de resultaten der pH-metingen over het algemeen iets hoger dan in Czapek-Dox-oplossing.

Penicillium, *Phomopsis* en *Cercospora* geven in beide grafieken een verschillend beeld te zien. De pH van de voedingsoplossing zonder schimmel daalde iets gedurende het verloop van de proef.

B. Het vermogen van de schimmels om koperverbindingen af te breken en het

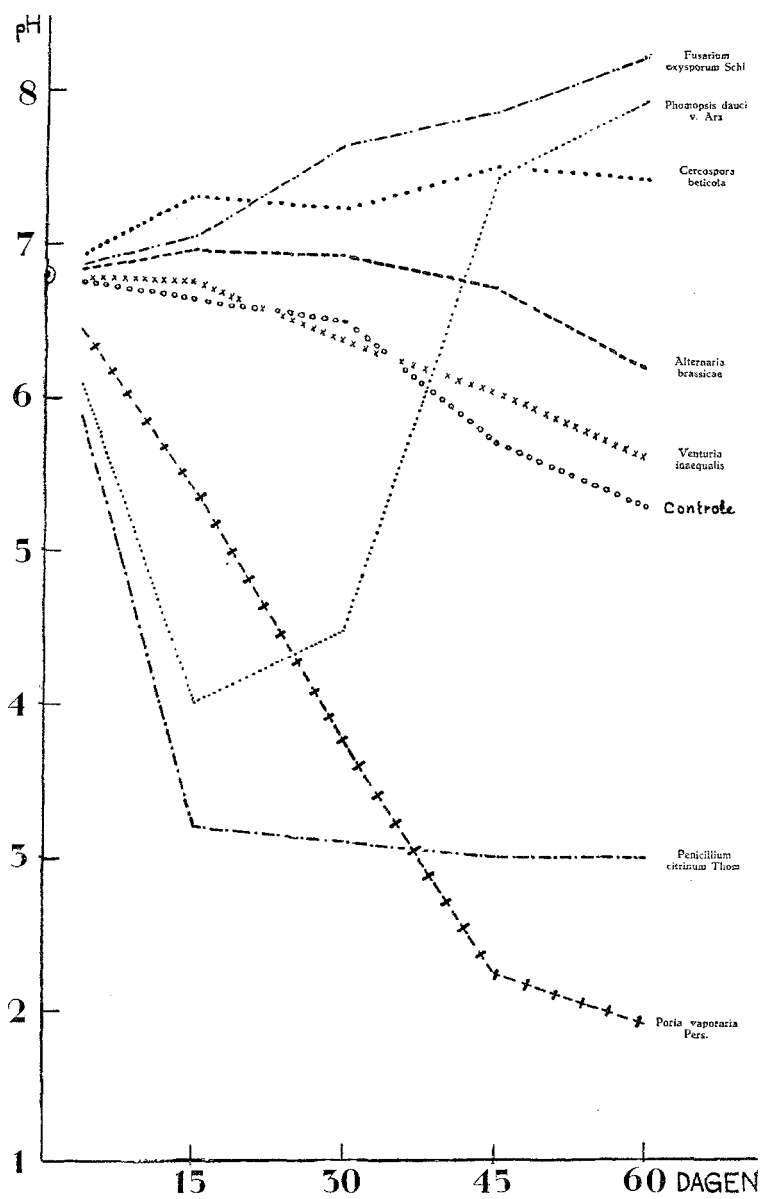


FIG. 1. Veranderingen in de zuurgraad van aardappel-glucose-oplossing ten gevolge van de groei van enige schimmels.

Durch das Mycelwachstum bedingte Veränderungen des Säuregrades einer Kartoffel-Glukose-Nährlösung.

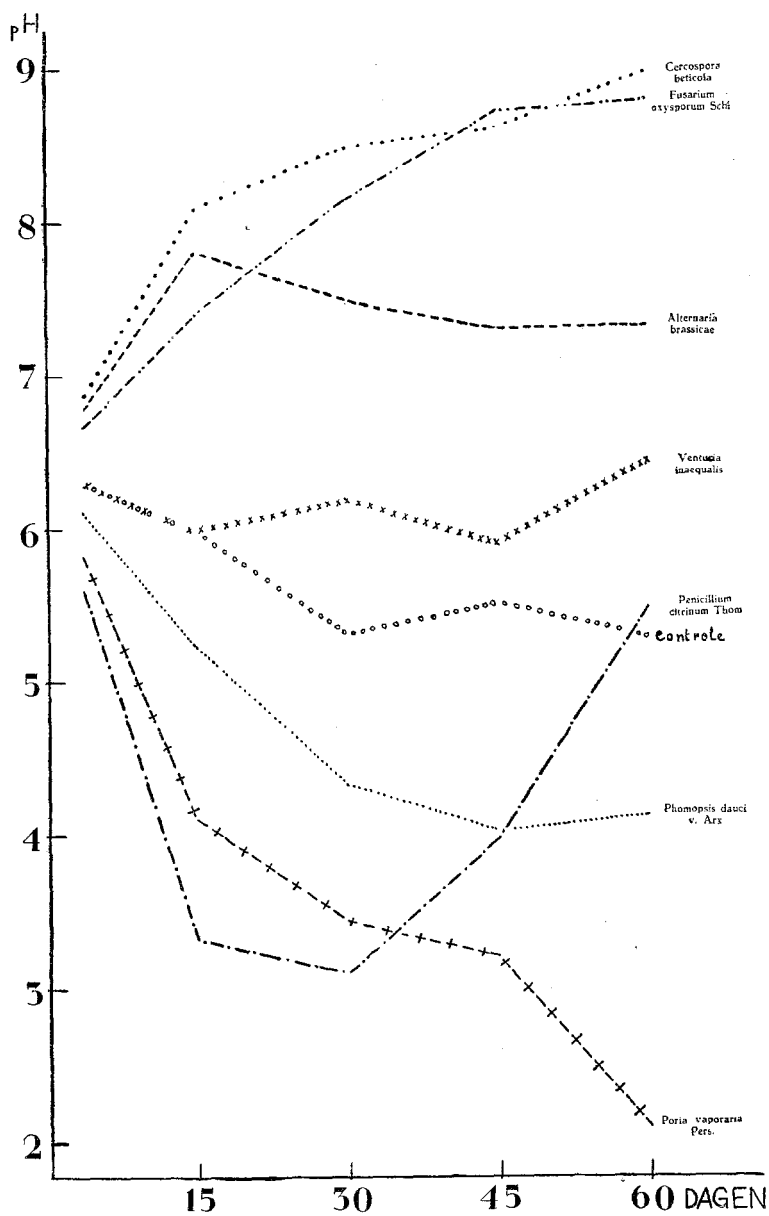


FIG. 2. Veranderingen in de zuurgraad van Czapek-Dox-oplossing ten gevolge van de groei van enige schimmels.

Durch das Mycelwachstum bedingte Veränderungen des Säuregrades einer Czapek-Dox-Nährlösung.

koper in een onoplosbare vorm neer te slaan werd nagegaan op schalen met aardappel- en Czapek-Dox-agar, waaraan de volgende percentages koper in de vorm van kopercarbonaat of koperoxychloride waren toegevoegd: 0,1, 0,3, 1,0 en 2,0 %.

Deze proeven werden in duplo uitgevoerd met drie herhalingen. Het bleek, dat de schimmels op verschillende manieren op de gesuspendeerde koperverbindingen reageerden: bij *Septotinia*, *Poria*, *Trametes*, *Phomopsis*, *Penicillium* en *Moniliopsis* ontstond om het entstukje een doorzichtige zone (Fig. 3 en 4), afstekend tegen de groene kleur van de voedingsbodem, te zien als een donkere ring op de foto's, die werden genomen op een donkere ondergrond. *Phomopsis* groeide meestal niet verder (Fig. 5), maar vertoonde soms wel ontwikkeling indien 0,1 % koper in de vorm van kopercarbonaat aan Czapek-Dox-agar toegevoegd was. Bij deze zes schimmels ontstond onder het mycelium een neerslag, soms in schijven, soms in ringen. Bij het verder groeien van de schimmels nam de hoeveelheid neerslag toe. Bij *Venturia inaequalis* zagen we echter alleen een duidelijke omzetting van de koperverbindingen in een kleurloze amorphe verbinding onder de langzaam groeiende schimmel (Fig. 6). Dit verschijnsel was bij alle gebruikte koperconcentraties waar te nemen, zowel bij kopercarbonaat als bij koperoxychloride. *Fusarium oxysporum* kon bij alle genoemde concentraties over de gehele plaat groeien, zonder dat er uiterlijk iets bijzonders aan de schimmel te zien was. *Cercospora beticola* deed dit eveneens, maar alleen bij de lagere concentraties, nl. 0,1 en 0,3 % koper, bij 1 en 2 % groeide de schimmel niet meer. *Alternaria brassicae* en *Cladosporium fulvum* groeiden alleen bij lagere concentraties van het toegevoegde bestrijdingsmiddel; vooral bij *Cladosporium* verliep het groeiproces langzaam.

C. Tenslotte werd de groei van deze schimmels ook nagegaan op concentraties koperoxychloride, variërend tussen 0,01 en 10 % gesuspendeerd in de voedingsbodem. Deze proef werd in cultuurbuizen gedaan. Namen we als voedingsbodem aardappelagar, dan groeiden *Septotinia*, *Fusarium*, *Moniliopsis* en *Penicillium* nog bij 10 %. Ook op Czapek-Dox hielden deze 4 het langste vol. De andere schimmels staakten de groei bij 0,1 tot 0,5 % koperoxychloride (Tab. 1 en 2.).

BESPREKING DER RESULTATEN

Vergelijken we de resultaten van deze drie proeven, dan blijkt, dat van de door ons gebruikte schimmels alleen die in staat zijn het koper in de voedingsbodem om te zetten, welke bij groei in een voedingsoplossing het milieu sterk zuur maken of de pH ongeveer gelijk laten aan de oorspronkelijke pH van de voedingsoplossing. Voor de zuurvormende groep is de correlatie duidelijk, voor de groep die de pH constant houdt is het omzetten van de koperverbindingen te verklaren door aan te nemen, dat er een zeker evenwicht ontstaat tussen de zuurproductie van de schimmel en de hoeveelheid zuur in de voedingsbodem. Wordt dus zuur bij het omzetten der koperverbinding verbruikt, dan wordt weer nieuw zuur gevormd.

Ook schimmels zoals *Fusarium* en *Cercospora*, die het milieu alkalisch maken, konden bij hogere concentraties van het bestrijdingsmiddel nog goed groeien. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn, dat de mycelium-mat van, deze schimmels als het ware een micromilieu op de voedingsbodem vormt doordat de zure stoffen van de voedingsbodem door de schimmel worden ge-

TABEL 1. De groei van enige schimmels op verschillende concentraties koperoxychloride in aardappelagar.

Das Wachstum einiger Pilze auf Kartoffelagar mit verschiedenen Konzentrationen Kupferoxychlorid.

	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Alternaria br.	**** ¹⁾	****	**	*	—	—	—	—	—	—
Venturia in.	***	***	**	*	*	—	—	—	—	—
Cercospora bet.	****	****	*	*	*	—	—	—	—	—
Cladosporium f.	***	***	**	*	—	—	—	—	—	—
Septotinia pop.	****	****	***	***	**	**	**	**	**	**
Phomopsis dauci	****	****	*	*	—	—	—	—	—	—
Fusarium oxysp.	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
Moniliopsis ad.	****	****	****	****	****	*	*	*	*	*
Poria vaporaria	****	****	—	—	—	—	—	—	—	—
Trametes rad.	****	****	—	—	—	—	—	—	—	—
Penicillium ctr.	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

- ¹⁾ **** = goede groei = *gutes Wachstum*
 *** = vrij goede groei = *ziemlich gutes Wachstum*
 ** = matige groei = *mässiges Wachstum*
 * = geringe groei = *geringes Wachstum*

TABEL 2. De groei van enige schimmels op verschillende concentraties koperoxychloride in Czapek-Dox-agar.

Das Wachstum einiger Pilze auf Czapek-Dox-agar mit verschiedenen Konzentrationen Kupferoxychlorid.

	0	0,01	0,05	0,1	0,5	2,5	5,0	7,5	10,0
Alternaria br.	***	***	***	***	**	—	—	—	—
Venturia in.	****	***	***	***	**	—	—	—	—
Cercospora bet.	****	**	**	***	**	—	—	—	—
Cladosporium f.	****	****	***	***	—	—	—	—	—
Septotinia pop.	****	****	****	****	****	****	****	—	—
Phomopsis dauci	****	*	*	*	—	—	—	—	—
Fusarium oxysp.	****	****	****	****	****	****	*	—	—
Moniliopsis ad.	****	****	****	****	*	*	****	*	—
Poria vaporaria	****	****	***	***	—	—	—	—	—
Trametes rad.	****	***	*	*	—	—	—	—	—
Penicillium ctr.	****	****	****	****	****	****	****	****	**

- ¹⁾ **** = goede groei = *gutes Wachstum*
 *** = vrij goede groei = *ziemlich gutes Wachstum*
 ** = matige groei = *mässiges Wachstum*
 * = geringe groei = *geringes Wachstum*

neutraliseerd in de bovenste lagen van het medium, zodat het koper nog minder in oplossing kan gaan. Het zijn immers juist de koper-ionen, die toxisch zijn (GOLDSWORTHY c.s. 1936 en 1938).

Het neerslag gevormd onder de mat van *Poria vaporaria* werd op het laboratorium voor Analytische Scheikunde der Rijks-Universiteit te Utrecht onderzocht. Het bleek te bestaan uit een verbinding van koper met een organische zuurrest. Deze zuurrest was niet afkomstig van oxaalzuur. ¹⁾

¹⁾ Aan Dr. H. A. Cysouw wordt dank betuigd voor de verrichte analyses.

RABANUS (1939) nam voor het oplossen en neerslaan van het koper twee zuuren aan, die resp. door de myceliumtoppen en oudere myceliumdraden gevormd zouden worden. Deze hypothese lijkt niet erg aannemelijk, omdat het onwaarschijnlijk is, dat door hetzelfde mycelium op verschillende plaatsen een ander zuur zou worden afgescheiden.

Aannemelijker is de hypothese, dat de schimmel één zuur afscheidt, dat met het koper-ion een complexe verbinding vormt. Van dergelijke verbindingen is nl. bekend, dat zij in lage concentraties in oplossing blijven, maar in hogere neerslaan. Immers door de concentrische groei van de hyfen over de plaat bevindt zich aan de rand van de cultuur veel minder mycelium dan in het midden, en aan de omtrek zal dan ook minder zuur gevormd worden dan onder het oudere gedeelte van de kolonie. De lichte zone zou dus ontstaan door de opneming van koper in een complexe verbinding met behulp van het organische zuur, door de schimmel afgescheiden, waarbij de genoemde complexe verbinding in oplossing gaat. Onder de mycelium-mat stijgt de concentratie van het zuur en daardoor die van de complexe verbinding, welke dientengevolge neerslaat.

CONCLUSIES

Uit bovengenoemde proeven kan het volgende worden geconcludeerd:

1. Niet alleen houtaantasters, maar ook sommige andere fungi zijn in staat koperverbindingen in vitro af te breken en deze in een andere vorm weer neer te slaan.
2. Dit vermogen om koperverbindingen af te breken en om te zetten is gebonden aan het zuurvormend vermogen van de schimmels.
3. Er dient een duidelijk onderscheid gemaakt te worden tussen kopermiddelen als preventief bestrijdingsmiddel, bedoeld tegen de sporekieming, en als curatief bestrijdingsmiddel, bedoeld tegen reeds aanwezig mycelium.
4. Geen verband kon worden vastgesteld tussen de graad van zuurvormend vermogen van een schimmel en het vermogen te groeien op voedingsbodems, waaraan koperverbindingen in verschillende concentraties toegevoegd waren.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss von Kupfermitteln auf das Wachstum von Pilzen in vitro.

Aus der Arbeit von RABANUS (1939) ist bekannt dass holzerstörende Pilze in vitro bestimmte Kupferverbindungen abbauen und in eine unlösliche Form überführen können. Dasselbe wurde auch bei *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH gefunden. Nach dieser Beobachtung wurde nachgegangen ob diese Reaktion auch bei anderen parasitischen Pilzen zu finden ist. Zehn verschiedene Pilze wurden auf folgende Reaktionen untersucht:

- A. Die Änderungen im Säuregrad einer Nährlösung, verursacht durch das Wachstum des Pilzmycels.
- B. Die Möglichkeit um Suspensionen von Kupfermitteln in Agarmedien umzusetzen und als unlösliche Verbindungen nieder zu schlagen.
- C. Bestimmung der höchsten Konzentration des Kupfermittels im Agarmedien in der der Pilz noch zu wachsen vermag.

A. Das Vermögen der verschiedenen Pilze um in einer Nährlösung Säure zu

produzieren war sehr verschieden (siehe Fig. 1 und 2). Die Art des Substrates beeinflusste jedoch die Säureproduktion der Pilze.

B. Die verschiedenen Pilze wurden hinsichtlich ihres Vermögens um Kupfermittel um zu setzen in Petrischalen auf Kartoffel- und Czapek-Dox-Agar geprüft. Den Nährböden waren verschiedene Konzentrationen von Kupfer (0,1, 0,3, 1,0 und 2,0 %) als Kupferkarbonat oder als Kupferoxychlorid in feiner Suspension zugefügt. Ein ausgestochenes Scheibchen Agar mit Myzel des Pilzes wurde in die Mitte der Schale geimpft. Unter dem Einfluss der Stoffwechselprodukte von folgenden Pilzen wurde das Kupfermittel vor und unter dem heranwachsenden Mycel abgebaut zu einer farblosen Verbindung: *Septotinia populiperda*, *Poria vaporaria*, *Trametes radiciperda*, *Phomopsis dauci*, *Penicillium citrinum* und *Moniliopsis Aderholdi* (siehe Fig. 3, 4, 5). Anschließend wurde das Kupfermittel wieder niedergeschlagen als unlösliche, kristalline Verbindung. So entstand am Rande des Mycelrasens im Agar eine farblose kreisringförmige Partie. Diese Partie ist in den Figuren 3 und 4 als dunkler Ring sichtbar. Dieser Kreisring erweiterte sich mit dem Wachstum des Pilzes. *Venturia inaequalis* vermochte die Kupfermittel wohl in eine farblose amorphe Verbindung um zu setzen; es entstand aber kein unlöslicher Niederschlag (siehe Fig. 6). Diese Umsetzungen traten bei allen gebrauchten Konzentrationen von Kupferkarbonat und Kupferoxychlorid auf. *Fusarium oxysporum* wuchs gut bei allen gebrauchten Kupferkonzentrationen, *Cercospora beticola* nur bei 0,1 und 0,3 % Kupfer.

C. Die Tabellen 1 und 2 zeigen das Wachstum der Pilze auf Konzentrationen Kupfer von 0,01 bis 10 %, suspendiert in Czapek-Dox-, und Kartoffelagar. *Septotinia*, *Fusarium*, *Moniliopsis* und *Penicillium* wuchsen noch auf Kartoffelagar mit 10 % Kupfer. Auf Czapek Dox-agar wuchsen dieselben Pilze ebenfalls bei hohen Konzentrationen. Die übrigen Pilze wuchsen nur bei einer Kupferkonzentration von 0,1–0,5 %.

Die Resultate werden besprochen und einige Hypothesen gegeben. Der Niederschlag, geformt durch *Poria vaporaria* war eine Verbindung von Kupfer mit einem organischen Säurerest. Wahrscheinlich ist es eine komplexe Verbindung, welche gelöst bleibt bei niedrigen Konzentrationen und bei höheren ausflockt.

Die folgenden Schlüsse wurden gezogen:

1. Nicht allein holzzerstörende, sondern auch andere parasitische Pilze besitzen die Möglichkeit mit ihren Stoffwechselprodukten für sie toxische Kupferverbindungen in vitro abzubauen und in einer unschädlichen Form als Komplex oder als unlösliche Verbindung zu eliminieren.
2. Die Möglichkeit um Kupfermittel zu eliminieren ist verbunden mit dem Vermögen der Pilze um Säuren zu bilden.
3. Es ist wünschenswert einen deutlichen Unterschied zu machen zwischen Kupfermitteln, die als ein vorbeugendes Bekämpfungsmittel die Keimung der Sporen zu verhindern und solchen, die als kurative Mittel das Wachstum der Hyphen zu unterbinden haben.
4. Kein Zusammenhang wurde gefunden zwischen der Möglichkeit der Pilze um in vitro Säure zu bilden und der Möglichkeit, um auf Kulturböden, denen Kupfermittel in verschiedenen Konzentrationen beigelegt wurden, zu wachsen.

LITERATUUR

- ENDE, G., v. D., – 1954. Het parasitaire karakter van *Septotinia populiperda* Waterman & Cash. Tijdschrift over plantenziekten 60:253–255.
- GATTANI, M. L., – 1954. Adaptation of Fungi to fungicides and its significance in agriculture Huitième Congrès international de Botanique. Rapports et Commun. aux Sections 18, 19 en 20:174.
- GÄUMANN, E., BRAUN, R. & BAZZIGHER, G., – 1950. Ueber induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen. Phytopath. Zeitschr. 17:36–62.
- GOLDSWORTHY, M. C. & GREEN, E. L., – 1936. Availability of the copper of bordeaux mixture residues and its absorption by the conidia of *Sclerotinia fructicola*. Journ. Agric. Res. 52:517–553.
- GOLDSWORTHY, M. C. & GREEN, E. L., – 1938. Effects of low concentrations of copper on germination and growth of conidia of *Sclerotinia fructicola* and *Glomerella cingulata*. Journ. Agric. Res. 56:489–505.
- MC. CALLAN, S. E. A. & WILCOXON, FR., – 1936. The action of fungus spores on Bordeaux mixture. Contr. Boyce Thompson Inst. 8:151–165.
- NARAYANAMURTI, D., GEORGE, J. & VERMA, G. M., – 1952. Säureproduktion der Pilze. Holz als Roh und Werkstoff 10:227–229.
- RABANUS, A., – 1939. Ueber die Säureproduktion von Pilzen, und deren Einfluss auf die Wirkung von Holzschutzmitteln. Mitteil. Fachausschusz. Holzfragen, Verein Deutscher Ing. 23:77–89.
- RABANUS, A., – 1940. Beitrag zur laboratoriumsmässigen Prüfung von Holzschutzmitteln. Holz als Roh und Werkstoff 3:233–238.
- WALKER, T. K., SUBRAMANIAN, V. & CHALLENGER F., – 1927. The mechanism of the formation of citric and oxalic acids. Reprinted Journ. Chem. Soc.: 3044–3054.

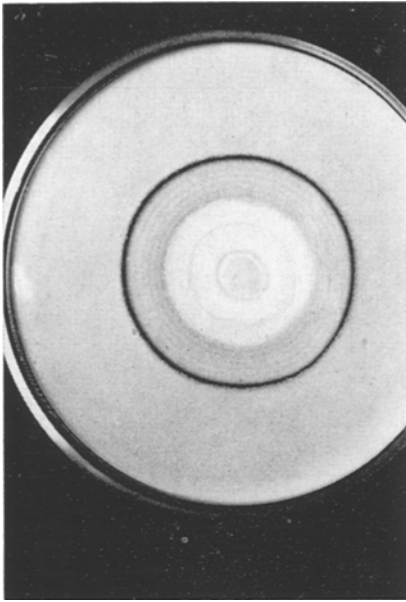


FIG. 3.

De groei van *Poria vaporaria* op Czapek-Dox-agar met 1% Kopercarbonaat.

Das Wachstum von Poria vaporaria auf Czapek-Dox-agar mit 1% Kupferkarbonat.

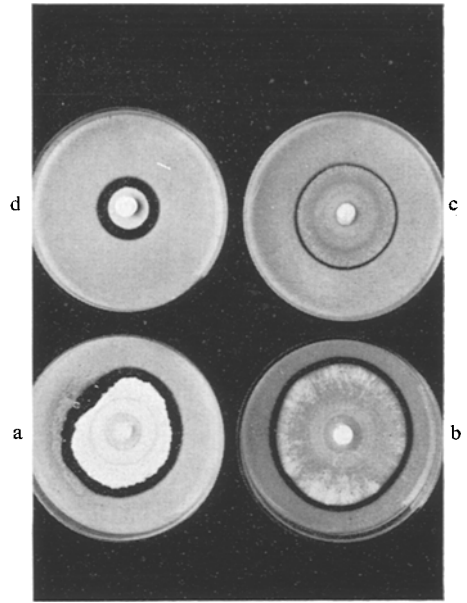


FIG. 4.

De groei van *Poria vaporaria* op Czapek-Dox-agar met koperoxychloride.

Das Wachstum von Poria vaporaria auf Czapek-Dox-agar mit Kupferoxychlorid.

a. 0,1% b. 0,3% c. 1,0% d. 2,0%

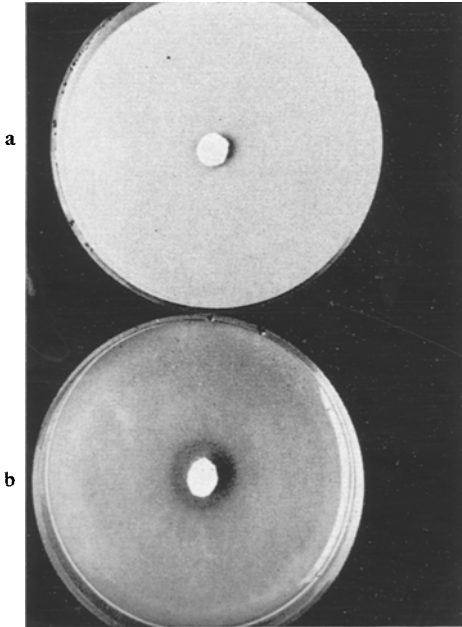


FIG. 5.

De groei van *Phomopsis dauci* op aardappel-agar met resp. 0,1% kopercarbonaat (a) en 0,1% koperoxychloride (b).

Das Wachstum von Phomopsis dauci auf Kartoffelagar mit 0,1% Kupferkarbonat (a) und 0,1% Kupferoxychlorid (b).

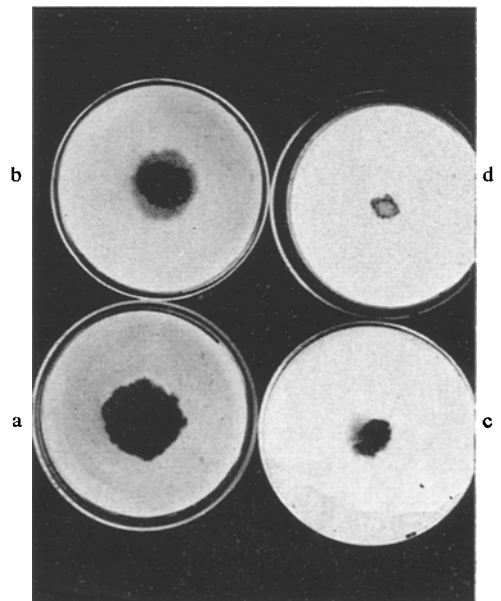


FIG. 6.

De groei van *Venturia inaequalis* op Czapek-Dox-agar met resp. 0,1 (a) 0,3 (b), 1,0 (c) en 2,0% (d) koperoxychloride. De foto vertoont de onderzijde van de petrischalen.

Das Wachstum von Venturia inaequalis auf Czapek-Dox-agar mit 0,1 (a), 0,3 (b), 1,0 (c) en 2,0% (d) Kupferoxychlorid. Unterseite der Schalen fotografiert.