

OVER DE BETEKENIS VAN KOPER VOOR DE GROEI VAN PLANTEN EN MICRO-ORGANISMEN

IN HET BIJZONDER EEN ONDERZOEK NAAR DE
OORZAAK DER ONTGINNINGSZIEKTE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
Ir. C. BROEKEMA, HOOGLEERAAR IN DE VER-
EDELING VAN LANDBOUWGEWASSEN, TE
VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN EEN COMMISSIE UIT DEN SENAAAT DER
LANDBOUWHOOGESCHOOL TE WAGENIN-
GEN OP WOENSDAG 13 APRIL 1938
TE DRIE UUR DOOR

E. G. MULDER



STELLINGEN

I

De door STIELTJES beschreven verdorringsverschijnselen der onderste bladeren van jonge graanplanten zijn geen typische symptomen der ontginningsziekte. (Landbk. T. 49, 852-853, (1937).)

II

Voor de bestrijding der ontginningsziekte verdient het aanbeveling, vooral op veenhoudende gronden, het kopersulfaat zoo vroeg mogelijk te geven en goed met de grond te vermengen.

III

Het gebruik van kopersulfaat bij de ontginning van heide- en hoogveen gronden maakt bemesting met compost niet overbodig.

IV

Actieve immunisatie van planten is mogelijk.

V

Septoria nodorum tast slechts verzwakte graanplanten aan.

VI

De uitspraak van DE VRIES en medewerkers, dat de vastlegging van fosphaten in de grond door micro-organismen van weinig belang is, is in zijn algemeenheid onjuist. (Landbk. T. 49, 790, (1937).)

VII

De primaire oorzaak van de veenkoloniale haverziekte is te zoeken in een tekort aan opneembaar mangaan.

VIII

Voor de bodemkundige is een grondige kennis van de microbiologie onmisbaar.

IX

Daar zink noodig is voor de groei van planten (SOMMER en LIPMAN, *Plant. Phys.* 1, 231, (1926)), dient bij de bemesting van cultuurgronden ook met dit element rekening te worden gehouden.

X

De functie van koper in biochemische processen is die van een oxydatie-katalysator. (KUBOWITZ, *Bioch. Z.* 292, 221, (1937).)

XI

Het is niet waarschijnlijk, dat de door SCHMITZ geïsoleerde „haemocuprine” beschouwd moet worden als de zuurstofoverdragende component van het haemocyanine. (*Z. Phys. Chemie* 194, 232 (1931) en 196, 71 (1931).)

XII

De beteekenis van *Azotobacter* voor cultuurgronden wordt vaak overschat. Daarom moet een gunstige invloed van een molybdeen-toediening op de vruchtbaarheid van de grond twijfelachtig worden geacht. (BORTELS, *Arch. f. Mikrob.* 1, 333, (1930); v. NIEL, *Arch. f. Mikrob.* 6, 215, (1935).)

XIII

Reiniging van afvalwater van aardappelmeel- en stroocartonfabrieken dient wettelijk te worden voorgeschreven. Hierbij is terugwinning van de voor de plantengroei belangrijke voedingsstoffen een economische eisch.

XIV

De teleurstellende resultaten met de Nederlandsche boter op de keuring in 1937 te Berlijn verkregen, maken het nemen van krachtige maatregelen, om tot kwaliteitsverbetering te komen, noodzakelijk. Tot deze maatregelen behooren o.a. uitbreiding van het onderzoekwezen en aanstelling van meer rijkszuivelconsulenten.

INHOUD

INLEIDING	Blz. 1
---------------------	--------

HOOFDSTUK I

LITERATUUROVERZICHT	4
-------------------------------	---

HOOFDSTUK II

VERGELIJKING VAN DE VERSCHIJNSELEN VAN ONTGINNINGSZIEKTE MET DIE VAN KOPER- GEBREK IN WATER- EN KWARTSZANDCULTUREN	12
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

§ 1. Proeven met waterculturen	12
<i>a.</i> Voorbereidende maatregelen	12
<i>b.</i> Opzet en uitvoering der proeven	13
<i>c.</i> Groeiwaarnemingen en resultaten	14
§ 2. Culturen in kwartszand	19
<i>a.</i> Voorbereidende maatregelen	19
<i>b.</i> Opzet en uitvoering der proeven	21
<i>c.</i> Groeiwaarnemingen en resultaten	21
§ 3. Culturen in zieke grond	22
<i>a.</i> Materiaal, herkomst en bijzonderheden	22
<i>b.</i> Opzet en uitvoering der proeven	23
<i>c.</i> Groeiwaarnemingen en resultaten bij zwaar zieke grond uit Nieuw Trimunt	23
<i>d.</i> Proeven met gliede	25
<i>e.</i> Proeven met loodzand	26
<i>f.</i> Proeven met grond uit Heino en Gasselternijeveen	26
<i>g.</i> Proeven met verschillende plantensoorten in zwaar zieke grond uit Nieuw Trimunt	31
§ 4. Vergelijking van de verschijnselen en resultaten van de §§ 1, 2 en 3	32

HOOFDSTUK III

ONDERZOEK NAAR HET GEHALTE AAN OPNEEM- BAAR KOPER IN ZIEKE RESP. GEZONDE GROND . . .	37
§ 1. Inleiding	37
§ 2. Onderzoek met behulp van de methode NEUBAUER	38
a. Werkwijze	38
b. Bepaling van het kopergehalte in plantenmateriaal met behulp van natriumdiaethylthiocarbamaat	38
c. Resultaten	39
§ 3. Onderzoek met behulp van een microbiologische methode	40
§ 4. Onderzoek naar het kopergehalte van planten, gegroeid op zieke resp. gezonde grond	50
§ 5. Bespreking van de in hoofdstuk III verkregen resultaten	55

HOOFDSTUK IV

OORZAKEN VAN DE SLECHTE KOPERVOORZIENING DER PLANTEN OP ONTGINNINGSZIEKE GROND EN MAATREGELEN OM HET VASTGELEGDE KOPER BESCHIKBAAR TE MAKEN	58
§ 1. Bepaling van het door organische stoffen in de grond vastgelegde koper	58
§ 2. Invloed van de met de methode van SMITH uit gliede en andere gronden verkregen extracten en destillaten op de groei van gerst in waterculturen en op de vastlegging van koper	60
§ 3. Beteekenis van verschillende grondsoorten bij het vastleg- gen van koper	
a. Proeven met <i>Aspergillus niger</i>	63
b. Percolatieproeven	63
§ 4. Beteekenis van micro-organismen bij het vastleggen van koper	
a. Inleiding	64
b. Onderzoek naar de bruikbaarheid van kopersulfide voor de voeding van organismen.	66
1. Proeven met <i>Aspergillus niger</i>	66
2. Proeven met gerst in watercultuur	66
3. Proeven met gerst in zieke grond	67

c.	Onderzoek naar de opneembaarheid van het door zwavelwaterstofvormende bacteriën gebonden koper	68
1.	Proeven met <i>Aspergillus niger</i>	68
2.	Proeven met gerst en haver in watercultuur	69
d.	Invloed van het al of niet steriel zijn van de voedingsoplossing op de verschijnselen van kopergebrek bij haver en gerst	71
e.	Over de beteekenis van micro-organismen bij het onoplosbaar maken van koper in de grond	75
§ 5.	Maatregelen om het in de grond vastgelegde koper voor de plantengroei beschikbaar te maken	79
a.	Steriliseeren van de zieke grond.	79
b.	Behandeling van de grond met alcohol en aceton	80
c.	Invloed van verbetering der structuur van de zieke grond	82
d.	Beïnvloeding van de kopervervoorziening der planten door enkele meststoffen	84
e.	Aanhangsel. Invloed van het kopergehalte van het zaai-zaad en van de behandeling van het zaad met koper-sulfaat op de verschijnselen van de ontginningsziekte	85
§ 6.	Bespreking van de in hoofdstuk IV verkregen resultaten	87

HOOFDSTUK V

	VERSCIJNSELEN, DIE SAMENHANGEN MET DE KOPERVOORZIENING DER PLANTEN	89
§ 1.	Het verband tusschen ontginningsziekte en veenkoloniale haverziekte	89
§ 2.	De invloed van verschillende hoeveelheden ijzer, zink en cadmium op de groei van gerst in waterculturen bij opklimmende hoeveelheden koper	96
§ 3.	Het verband tusschen de kopervervoorziening der planten en de gevoeligheid voor parasitaire ziekten	98
§ 4.	Invloed van de vochtigheidsgraad van de lucht op de verschijnselen van kopergebrek.	104
§ 5.	Kopergebrek bij planten als oorzaak van ziekteverschijnselen bij dieren	105

HOOFDSTUK VI

OVER DE BETEEKENIS VAN KOPER VOOR MICRO- ORGANISMEN EN ANDERE PLANTAARDIGE CELLEN 107

§ 1. Literatuuroverzicht	107
§ 2. Proeven met <i>Aspergillus niger</i>	109
§ 3. Proeven met eenige andere schimmels	112
§ 4. Proeven met <i>Azotobacter chroococcum</i>	113
§ 5. Proeven met <i>Acetobacter aceti</i>	114
§ 6. Proeven met mangaanoxydeerende schimmels	117
§ 7. Beschouwingen over de werking van het koper in de levende cel	118
ZUSAMMENFASSUNG	122
LITERATUURLIJST	129

INLEIDING

In 1910 en volgende jaren werd door ELEMA (19) de aandacht gevestigd op ziekteverschijnselen, die zich voordeden bij de cultuur van graangewassen op bepaalde veen- en zandgronden in Drenthe. Bij haver uitten zich deze verschijnselen in het voorkomen van doode witte punten aan de bovenste bladen, terwijl de pluimen, voorzoover ze gevormd werden, loos of zeer slecht met korrels gevuld waren. In tegenstelling tot de gezonde vormen de zieke planten steeds weer nieuwe, groene scheuten, zoodat op het moment, dat een gezond gewas rijp was, het zieke nog een vuilgroen uiterlijk had. Daar het vooral de pas ontgonnen heidegronden waren, waarop de ziekte voorkwam, werd door ELEMA de naam ontginningsziekte ingevoerd. ¹⁾

Oorzaak van deze verschijnselen, noch geneesmiddelen waren aanvankelijk bekend. In 1922 vermeldde HUDIG en MEYER (34), dat men de ziekte kon genezen met een compostbemesting van 30-60.000 kg per ha. Eenige jaren later vonden dezelfde onderzoekers, dat kopersulfaat in hoeveelheden van 50-100 kg per ha de ziekte eveneens kon genezen (35). Na de ontdekking van het geneesmiddel is het gebruik van kopersulfaat op verschillende gronden zeer belangrijk geworden. Naast de ontgonnen heidevelden zijn het vooral de laagveengronden, waar men met kopersulfaat zeer goede resultaten heeft verkregen. Zoo b.v. de gronden langs de Oostermoersche vaart in N.O.-Drenthe, waarop bij gebruik als bouwland de granen vaak zeer slap, grauw gekleurd stroo bezitten, terwijl de korrelvorming zeer te wenschen overlaat. Toediening van kopersulfaat brengt hier groote verbetering.

Vóór dat, in 1925, deze werking hier te lande werd geconstateerd, kende men in Duitsland en in Amerika reeds de zeer goede resultaten van het toevoegen van koperverbindingen aan bepaalde gronden. In Amerika waren het de gronden van de „Everglades”, uitgestrekte

¹⁾ Deze verschijnselen zijn vermoedelijk reeds vroeger opgemerkt en beschreven door G. A. VENEMA in zijn boekje: De hooge veenen en het veenbranden, 1855, bl. 45.

veengebieden in Florida, waarop de boeren geconstateerd hadden (1), dat de cultuur van aardappels een zeer gunstige invloed uitoefende op de vruchtbaarheid van de grond. Al spoedig bleek, dat het niet de aardappels waren, die deze gunstige werking uitoefenden, maar het koper van de Bordeauxsche pap, waarmee de planten werden besproeid ter bestrijding van de door *Phytophthora infestans* veroorzaakte aardappelziekte. Proeven met kopersulfaat, toegediend aan de grond, bevestigden deze resultaten. Sindsdien speelt dit zout een belangrijke rol bij de cultuur van akkerbouwgewassen in de „Everglades”.

In Duitschland leerde men, eveneens op een toevallige manier, de gunstige werking van kopersulfaat reeds in 1901 kennen (26). Voor de bestrijding van onkruid in haver op veengrond had men gebruik gemaakt van ferrosulfaat en van kopersulfaat. Het bleek nu, dat de boonen, die op de haver volgden, op het gedeelte, dat het vorige jaar met kopersulfaat was behandeld, veel beter groeiden en vooral een aanzienlijk hoogere zaadopbrengst leverden dan op het niet behandelde. Meerdere proeven toonden sindsdien de gunstige werking van koperzouten op deze veengronden aan.

Dat er verband zou bestaan tusschen de verschijnselen van de ontginningsziekte, die op de Deutsche zandgronden als *Heidemoorkrankheit*, ook wel *Urbarmachungskrankheit* bekend is, en die, welke men aantreft op de Noordduitsche veengronden, wordt door sommige Deutsche onderzoekers nog steeds ontkend. Zooals evenwel uit de literatuurbespreking in het volgende hoofdstuk zal volgen, zijn er verschillende factoren, die er voor pleiten, dat men in de „Everglades”, zoowel als in de Deutsche veengebieden, te maken heeft met dezelfde verschijnselen als die, welke men bij de ontginningsziekte aantreft.

De bedoeling van het hier te bespreken onderzoek was, de oorzaak van deze ziekteverschijnselen te leeren kennen en aldus de genezende werking van het koper te verklaren. In de laatste jaren zijn hiervoor verschillende, geheel uiteenloopende, verklaringen gegeven, die echter geen van alle met voldoende zekerheid bewezen zijn.

Het door mij in de jaren 1935–1937 verrichte onderzoek heeft zich vooral bezig gehouden met het verband, dat bestaat tusschen de kopervervoorziening van de planten en het vóórkomen der ziekteverschijnselen.

In deze publicatie zijn bovendien een aantal resultaten vermeld, die door wijlen T. KUIPERS, chem. doct., zijn verkregen bij een

onderzoek over de ontginningsziekte. Dit onderzoek vond plaats van 1928–1933, eerst op het Rijkslandbouwproefstation te Groningen, later op het Laboratorium voor Microbiologie te Wageningen. De door KUIPERS verkregen resultaten, die niet gepubliceerd zijn, werden mij in 1934 door de familie ter beschikking gesteld, waarvoor ik ook op deze plaats mijn hartelijke dank uitspreek.

HOOFDSTUK I

LITERATUUROVERZICHT

Door de eerste onderzoekers over de ontginningsziekte, ELEMA (19) en later HUDIG en medewerkers (36), is er reeds op gewezen, dat de ziekte vooral daar voorkomt, waar in de grond zwarte veenachtige stoffen aanwezig zijn. Deze substanties vindt men vaak als een veenlaagje onder de zode van laaggelegen heidegronden, waardoor ze bij ontginning in de bouwvoor kunnen komen. Men spreekt van heideveen, ook wel van gliede, piklaag of smeerlaag. Vooral de laatste namen wijzen er op, dat we te maken hebben met taaie, kneedbare stoffen. Dit geldt zoolang het materiaal vochtig is; bij uitdrogen wordt het hard en neemt later zeer moeilijk weer water op. Volgens ELEMA komt de ziekte echter minstens even erg voor op hoge heidevelden met slechts een zeer dunne heideplag. Het is hem onmogelijk te voorspellen, waar de ziekte niet of wel zal voorkomen (mondelijke mededeeling van Prof. ELEMA).

Vóór 1925, toen alleen compost als geneesmiddel van de ziekte bekend was, schreef men de gunstige werking daarvan toe aan het hoge bacteriegehalte; hierdoor zou de schadelijke humus worden omgezet in onschadelijke.

Door SMITH (73) is echter aangetoond, dat deze opvatting niet juist kan zijn, aangezien de asch van compost dezelfde werking heeft als het materiaal zelf. Hieruit blijkt, dat de genezende werking van compost moet worden toegeschreven aan een in dit materiaal aanwezige minerale stof. Naar aanleiding van de gunstige resultaten met kopersulfaat lag het voor de hand in de eerste plaats aan koper te denken. Door SMITH is deze verklaring echter van de hand gewezen, omdat het hem niet gelukte, in de door hem onderzochte compost koper aan te toonen. In tegenstelling hiermee vond SJOLLEMA (69, 70) een hoog gehalte aan koper in compost, nl. van 200–400 mg per kg vochtig materiaal. Deze compost was afkomstig resp. uit Zutphen en uit Wijster (V.A.M.-compost). Een door het proefstation te Maastricht verrichte analyse van V.A.M.-compost leverde 100 mg Cu per

kg droog materiaal op. Bij een bemesting met 40.000 kg compost brengt men dus, berekend op de cijfers van SJOLLEMA, een hoeveelheid koper van 8–16 kg, overeenkomende met 32–64 kg kopersulfaat, in de grond, een hoeveelheid, die bijna altijd de ziekte kan genezen.

Bij het onderzoek van SMITH werd hoofdzakelijk gebruik gemaakt van de bovengenoemde gliede. Toevoeging aan zandgrond en ook cultuur in uitsluitend gliede, veroorzaakten bij haver de verschijnselen van ontginningsziekte, die achterwege bleven, indien kopersulfaat was toegediend. Dit resultaat voerde SMITH tot de conclusie, dat de gliede stoffen moest bevatten, die in staat waren bij planten de verschijnselen van ontginningsziekte te veroorzaken. Om deze hypothese te bewijzen, werd de vochtige gliede uitgetrokken met warme alcohol van 95%. De door deze extractie verkregen organische stoffen werden toegevoegd aan gezuiverd glaszand, waarna haver werd gezaaid. Bemesting werd aan deze culturen niet toegediend, omdat SMITH vreesde, hierdoor de werking van de toegediende stoffen te niet te doen. Hierdoor kregen de planten al spoedig gebrek aan voedsel; ze bleven klein en onvolledig, zoodat van een normale groei geen sprake was. Het bleek nu, dat de planten in de culturen met gliede-extract na verloop van tijd verschijnselen vertoonden, die volgens SMITH overeenkwamen met die van de ontginningsziekte. Uit deze proef trekt hij de belangrijke conclusie, dat de factoren, die de ontginningsziekte veroorzaken, in het extract aanwezig zijn. M.i. is dit niet toelaatbaar, omdat niet is nagegaan of de door het extract veroorzaakte ziekteverschijnselen te voorkomen resp. te genezen waren door kopersulfaat. Dit toch is wel de meest karakteristieke eigenschap der ontginningsziekte, waardoor ze zich onderscheidt van andere groei-stoornissen.

Een andere onvolledigheid in het onderzoek van SMITH is, dat geen proeven zijn genomen met extracten van gezonde grond. Hierdoor is niet uit te maken, of de werking van het door hem gebruikte alcohol-extract werkelijk typisch is voor gliede en ontginningszieke grond. Ik kan echter de resultaten van uitgebreide onderzoeken van KUIPERS vermelden. Hierbij bleek, dat de volgens de methode van SMITH uit verschillende grondsoorten verkregen extracten, onverschillig of ze uit ontginningszieke of gezonde grond verkregen waren, zeer schadelijk waren voor de plantengroei. De planten bleven klein en vertoonden abnormale kleuren. Verschijnselen van ontginningsziekte waren het volgens KUIPERS niet, terwijl genezing door kopersulfaat niet mogelijk bleek.

Behalve met de door alcohol-extractie uit gliede verkregen stoffen heeft SMITH proeven genomen met het destillaat van dit gliede-extract. Dit werd verkregen door met de waterige oplossing, die achterbleef nadat de alcohol was afgedestilleerd, de destillatie voort te zetten. Er ging toen een eenigszins opaliseerende vloeistof over, waarin na enkele dagen staan kristallen te voorschijn kwamen. Dit destillaat heeft SMITH vervolgens toegevoegd aan haver, die groeide in kwartzand. Hierbij bleek 30 cc van deze vloeistof, toegediend vóór het zaaien van de haver, een dusdanige schadelijke invloed uit te oefenen, dat de planten spoedig te gronde gingen. Werd het materiaal echter toegediend, nadat de planten een zekere ontwikkeling bereikt hadden, dan kwamen na verloop van 7-10 dagen verschijnselen te voorschijn, die volgens SMITH identiek waren met die van de ontginningsziekte. Uit dit feit trekt hij dan de conclusie, dat de oorzaak van de ontginningsziekte moet worden toegeschreven aan de schadelijke werking van een organische stof, door hem gliedine genoemd, die in het bovengenoemde destillaat in gekristalliseerde toestand voorkwam. De gunstige werking van kopersulfaat zou bestaan in het vormen van een onoplosbare verbinding met de gliedine, waardoor de planten deze schadelijke stof niet meer konden opnemen.

Het is m.i. niet gerechtvaardigd, de oorzaak van de ontginningsziekte aan de genoemde gliedine toe te schrijven en wel om de volgende redenen.

1. SMITH gebruikte niet de zuivere gliedinekristallen, maar een destillaat van onbekende samenstelling, waarin o.a. deze kristallen aanwezig waren. Het is dus niet bewezen, dat het de kristallen waren, die de groeibeschadiging veroorzaakten; evengoed kunnen het andere in de oplossing aanwezige stoffen zijn geweest, die hiervoor verantwoordelijk waren.
2. Evenmin als bij de proef met alcohol-extract is bewezen, dat de waargenomen groeibeschadigingen identiek waren met die van de ontginningsziekte, omdat een proef met gliedine-oplossing + kopersulfaat niet is genomen.

In hoofdstuk 9 van zijn dissertatie vermeldt SMITH tenslotte nog enkele proeven met:

1. glaszand;
2. glaszand + CuSO_4 ;
3. glaszand + ingedampt gliede-extract;
4. glaszand + ingedampt gliede-extract + CuSO_4 .

We zijn hier dus voor het eerst in de gelegenheid waar te nemen,

of kopersulfaat in staat is geweest de schadelijke werking van het gliede-extract te niet te doen. Zooals blijkt uit de beschrijving (blz. 109, regel 11 van beneden e.v. en blz. 93, regel 11 van boven e.v.) was dit niet het geval. Hieruit moet m.i. geconcludeerd worden, dat de door dit alcohol-extract veroorzaakte groeibeschadigingen niet identiek zijn met die van de ontginningsziekte.

Resumeerende kunnen we dus zeggen, dat door het onderzoek van SMITH niet bewezen is, dat de ontginningsziekte veroorzaakt wordt door een voor de planten giftige stof.

Door TACKE en medewerkers (80) zijn de proeven van SMITH herhaald. Het gelukte hun niet door toevoeging van gliede aan middelmatig grof zand de ziekteverschijnselen te verkrijgen. Evenmin konden zij de door SMITH gevonden gliedine-kristallen in het destillaat van gliede-extract constateeren, terwijl ook een schadelijke werking van dit destillaat op haverplanten niet werd waargenomen. Wat het eerste deel van dit onderzoek betreft — het niet kunnen verkrijgen van ontginningsziekte door toevoeging van gliede — moet er allereerst op worden gewezen, dat de concentratie van de gliede geringer was dan die, welke SMITH gebruikte. Verder moet er rekening mee worden gehouden, dat op de een of andere manier verontreiniging met koper kan hebben plaats gevonden, hetzij door het zand, hetzij door het water of de voedingszouten. Dit vermoeden wordt nog hierdoor versterkt, dat ook zwaar ontginningszieke grond in potproeven een niet of een slechts weinig ziek gewas leverde. De derde, niet minder belangrijke factor is, dat SMITH de zeer gevoelige witte haver als proefplant gebruikte, terwijl TACKE werkte met de veel minder gevoelige zwarte veenhaver. Het is zeer goed mogelijk, dat ook in andere onderzoekingen, waarbij het niet gelukte in potproeven de verschijnselen van ontginningsziekte te krijgen, een van deze laatstgenoemde redenen een rol speelt.

Volgens BRÜNE (13) is het uitblijven van de ziekteverschijnselen bij potproeven in kassen een gevolg van de betere vochtvoorziening in de potten. Met deze factor heeft men volgens hem ook te maken bij het optreden van de ziekte op het veld: in droge jaren zou ze meer voorkomen dan in vochtige. Ook RADEMACHER (58) komt tot deze conclusie. Over de eigenlijke oorzaak van de ontginningsziekte spreekt BRÜNE zich niet uit. Volgens hem is deze nog geheel onbekend.

FRECKMANN (27), die in 1934 nogmaals wijst op de gunstige werking van kopersulfaat op veengronden, ontkent ten stelligste, dat er verband zou bestaan tusschen deze vorm van koperwerking en die bij

de genezing van de ontginningsziekte. Bij de Duitse veenonderzoekers heerscht de meening, dat de werking van koper op deze veengronden berust op het meer resistent maken van de planten tegen nachtvorstbeschadiging, een verschijnsel, waarmee men daar veel te maken heeft. Deze meerdere resistentie zou volgens FRECKMANN een gevolg zijn van een betere chlorophylvorming bij bemesting met kopersulfaat. FRECKMANN baseert zijn uitspraak, behalve op praktijkwaarnemingen, op een onderzoek van DENSCH en HUNNIUS (17), die een gunstige werking van kopersulfaat constateerden, zonder dat bij de onbehandelde grond de typische verschijnselen van ontginningsziekte konden worden waargenomen. Het bewijs, dat in de proeven van FRECKMANN inderdaad vorstbeschadiging en geen ontginningsziekte in het spel was, is door hem niet geleverd. Hij had dit kunnen doen, door een deel van het onbehandelde veld te vrijwaren voor vorstbeschadiging en dan na te gaan of inderdaad zonder koperbemesting goede opbrengst was verkregen. De kans op verwarring van nachtvorstbeschadiging en ontginningsziekte is vrij groot, omdat bij granen de symptomen van beide verschijnselen zeer veel op elkaar gelijken. Een punt van verschil is, dat bij ontginningsziekte de nieuwgevormde bladen steeds weer de typische verschijnselen vertoonen, wat bij vorstbeschadiging niet het geval is.

Dat men uiterst voorzichtig moet zijn met het toekennen van te groote waarde aan deze nachtvorsttheorie, blijkt ook uit de resultaten, verkregen door de Amerikaansche veen-onderzoekers uit de „Everglades” (1, 14). In tegenstelling tot de Duitse zijn de Amerikaansche veengronden gelegen in een subtropisch klimaat, waar nachtvorst onbekend is, m.a.w. de gunstige werking van koperzouten moet hier aan een andere oorzaak dan die van meerdere vorstresistentie worden toegeschreven. Dat de verschijnselen in de „Everglades” en in het Duitse veengebied identiek zijn en overeenkomen met de ontginningsziekte op onze veen- en zandgronden, is aan de hand van de literatuurgegevens waarschijnlijk. Zoo wordt er in alle gevallen op gewezen, dat het vooral de korrelvorming is, die door een bemesting met koperzouten wordt begunstigd. Verder is de aardappel vrijwel het eenige gewas, dat op de onbehandelde gronden een normale groei en opbrengst geeft.

Ook in de „Everglades” heeft men zich bezig gehouden met de vraag, wat de oorzaak van de gunstige koperwerking kon zijn (BRYAN (14)). Men had een drietal hypothesen; in de eerste plaats werd gedacht aan een desinfecteerende werking van het kopersulfaat, waar-

door voor de planten schadelijke organismen zouden worden vernietigd; een tweede opvatting was, dat het koper bepaalde bodemgiften onwerkzaam zou maken. Deze opvatting komt dus overeen met de door SMITH gegeven verklaring. Als derde mogelijkheid werd gedacht aan een voedende werking van het koper. Door BRYAN worden de eerste twee verklaringen verworpen. Het gelukte hem nl. zieke planten gezond te maken door een verdunde kopersulfaatoplossing op het blad te strijken. Daar er zorgvuldig op werd gelet, dat het kopersulfaat niet met de grond in aanraking kon komen, wordt door deze proef bewezen, dat de koperwerking niet kan berusten op een desinfecteerende werking op in de grond aanwezige plantenparasieten. Dat het koper een rol zou spelen als voedingsstof en niet bij het onoplosbaar maken van schadelijke stoffen werkzaam zou zijn, is door deze proef echter nog niet bewezen. Het is toch denkbaar, dat neutralisatie van opgenomen schadelijke stoffen nu niet in de grond, maar in de plant plaats vindt. De publicaties van FELIX (25), ALLISON (2) en ALLISON, BRYAN en HUNTER (1) geven op dit punt geen nieuwe gezichtspunten. FELIX, die werkte met veengrond, afkomstig uit de buurt van New York, constateerde reeds in 1927, dat het penseelen van een oplossing van kopersulfaat op het blad dezelfde resultaten gaf als toediening aan de grond. ALLISON kon hetzelfde resultaat bereiken door het inspuiten van kopersulfaat in suikerrietplanten.

Dat parasitaire micro-organismen als oorzaak van de ontginningsziekte aangezien moeten worden, vindt men nog weer vermeld in een publicatie van BRANDENBURG (10). Uit wortels van zieke haver, bieten en erwten kon hij bepaalde schimmels isoleren, die in staat waren in waterculturen deze planten te infecteren. Het gelukte echter niet op deze manier bij haver de typische verschijnselen van ontginningsziekte te verkrijgen. Bij bieten en erwten was dat volgens BRANDENBURG wel het geval. Men moet er evenwel aan denken, dat de verschijnselen van ontginningsziekte bij bieten en erwten niet erg typisch zijn, zoodat niet bewezen is, dat de door de schimmels veroorzaakte ziekteverschijnselen identiek waren met die van de ontginningsziekte. Dit onderzoek is echter weinig overtuigend, omdat niet is nagegaan of toediening van kopersulfaat in staat was de schimmels te doden, eventueel de plant immuun te maken tegen infectie.

Het reeds door BRYAN en FELIX uitgesproken vermoeden, dat de oorzaak van de slechte plantengroei in de „Everglades” zou berusten op een tekort aan koper, wint aan waarschijnlijkheid door de resultaten van SOMMER (75) en LIPMAN en MACKINNEY (42). Deze onder-

zoekers toonden nl. voor het eerst aan, dat hogere planten voor een normale ontwikkeling inderdaad sporen koper nodig hebben. Beide onderzoekers werkten met waterculturen, waarvan water en voedingszouten gereinigd waren van koper. SOMMER gebruikte zonnebloemen, tomaten en vlas. Zonder koper bleven de planten klein en vormden weinig droge stof. Bij aanwezigheid van 0,125 mg Cu per liter voedingsoplossing was zoowel de groei als de vorming van droge stof aanzienlijk beter. Uit de beschrijving, welke SOMMER geeft van de kopergebrekssymptomen, valt niet op te maken of deze verschijnselen identiek zijn met die, welke in de „Everglades” voorkomen. Hetzelfde kan gezegd worden van het onderzoek van LIPMAN en MACKINNEY. Zij gebruikten gerst en vonden, dat in waterculturen zonder koper de planten later in aar kwamen, terwijl geen zaad werd gevormd. Bij aanwezigheid van 0,125 mg Cu was dit wel het geval. Ofschoon de verschijnselen, welke zij verkregen in hun culturen zonder koper, ook bij ontginningsziekte voorkomen, hebben zij de typische symptomen hiervan toch niet waargenomen.

Daarentegen verkreeg BRANDENBURG (11) bij haver, gekweekt in waterculturen zonder koper, verschijnselen, die groote overeenkomst vertoonden met die van de ontginningsziekte. Deze verschijnselen, die niet optraden bij aanwezigheid van 0,2 mg CuSO_4 per pot, uitten zich in het ontstaan van witte punten aan de jongere bladen. Het jongste blad stierf geheel, terwijl de hoofdscheut zich niet verder ontwikkelde; vele zijscheuten werden gevormd, waarvan de bladen na eenige tijd weer dezelfde verschijnselen vertoonden. In tegenstelling met zijn vroegere opvatting, dat micro-organismen de ziekte veroorzaken, schrijft BRANDENBURG haar nu toe aan kopergebrek. Daar in dit onderzoek alleen proeven met waterculturen zijn genomen en niet, ter vergelijking, ook met zieke grond, terwijl koperanalyses van plantenmateriaal, evenmin als van grond, zijn verricht, kan men dus niet zeggen, dat door BRANDENBURG bewezen is, dat ontginningsziekte identiek is met kopergebrek. Het kan echter niet worden ontkend, dat van de tot nu toe vermelde mogelijke oorzaken van de ontginningsziekte, de kopergebrek-theorie het meest waarschijnlijk lijkt. Enkele koperanalyses verricht door SJOLLEMA (69, 70) in ontginningsziek resp. gezond plantenmateriaal wijzen inderdaad op een lager kopergehalte in zieke planten dan in gezonde.

Ook RADEMACHER (58) komt tot de conclusie, dat „Kupfermangel mit hoher Wahrscheinlichkeit als die Ursache der Heidemoorkrankheit angesehen werden muss”. Deze publicatie brengt echter weinig

nieuwe gezichtspunten; koperanalyses van planten en grond ontbreken bijna geheel. In een latere publicatie (59) vermeldt RADEMACHER een aantal koperanalyses, waaruit blijkt, dat gezonde haverplanten een hoger kopergehalte bezitten dan zieke.

Met een geheel andere theorie over de oorzaak van de ontginningsziekte komen ARND en SEGEBERG (3). Zij wijzen op het feit, dat een slechte watervoorziening van belang is bij het optreden der ziekte (RADEMACHER, BRÜNE) en denken nu, dat deze ziekte een gevolg is van een gebrek aan water, dat weer een gevolg zou zijn van het sterk gedispergeerd zijn der humuskolloïden in de zieke gronden. De gunstige werking van kopersulfaat zou een gevolg zijn van het doen uitvlokken van deze humuskolloïden, waardoor de waterporiën minder dichtgesmeerd worden, en de kans op verdrogen minder groot zou zijn. Ook zouden Cu-humaten gevormd worden, die de gronddeeltjes zouden omgeven, waardoor de mogelijkheid tot opnemen van vocht („Benetzbarkeit“) aanzienlijk zou worden vergroot.

Naar aanleiding van deze verklaring kan er op worden gewezen, dat verschillende ontginningszieke gronden weinig of geen organische stof bevatten. Dat de kleine hoeveelheid humus, die aanwezig is, in staat zou zijn de vochtopneming van de planten in sterke mate te verminderen, lijkt niet waarschijnlijk. Wanneer alleen verdrogen de oorzaak van de ziekte is, is ook niet in te zien, waarom niet op iedere hooge zandgrond bij verdroging ontginningsziekteverschijnselen voorkomen.

Uit dit literatuuroverzicht blijkt, dat er voldoende aanleiding bestond, om het onderzoek naar de oorzaak van de ontginningsziekte nogmaals op te vatten.

HOOFDSTUK II

VERGELIJKING VAN DE VERSCHIJNSELEN VAN ONTGINNINGSZIEKTE MET DIE VAN KOPERGEBREK IN WATER- EN KWARTSZAND-CULTUREN

In het vorige hoofdstuk is gebleken, dat de ontginningsziekte vermoedelijk in nauw verband staat met de kopervoorziening van de planten. Het lag dus voor de hand, het onderzoek te beginnen met een vergelijking van de verschijnselen der ontginningsziekte, met die welke voorkomen bij kopergebrek.

Achtereenvolgens zullen nu worden besproken proeven met waterculturen, met kwartszand-culturen en met culturen in zieke grond.

§ 1. Proeven met waterculturen

a. Voorbereidende maatregelen.

Daar het reeds van te voren vaststond, dat de koperbehoefte van planten zeer gering was, werden uitgebreide voorzorgsmaatregelen genomen, om de voedingsoplossing zoo veel mogelijk vrij van koper te krijgen. Het gebruikte water werd twee keer gedestilleerd uit glazen toestellen. De voedingszouten, preparaten *pro analysi* van KAHLBAUM en MERCK, werden twee keer omgekristalliseerd uit dit dubbel gedestilleerde water. Daar dit niet mogelijk was bij het tricalciumfosfaat, heb ik hier gebruik gemaakt van oplossingen van Na_2HPO_4 en CaCl_2 , beide twee keer omgekristalliseerd, die bij samenvoeging in alkalisch milieu een wit neerslag leverden van $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Herhaaldelijk decanteeren, en tenslotte uitwassen met dubbel gedestilleerd water op een zuigfilter, leverde het gezuiverde $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Behalve door omkristallisatie der zouten, werden ook goede resultaten verkregen met het filtreren van de voedingsoplossing over kool. De hierbij toegepaste werkwijze was de volgende: per 10 liter voedingsoplossing werd toegevoegd 1 cc van een oplossing van NH_4SH en $12\frac{1}{2}$ gram dierkool (Carbo ossium, *pro analysi* KAHLBAUM). Vervolgens werd flink geschud en gefiltreerd. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ werd bereid uit Na_2HPO_4

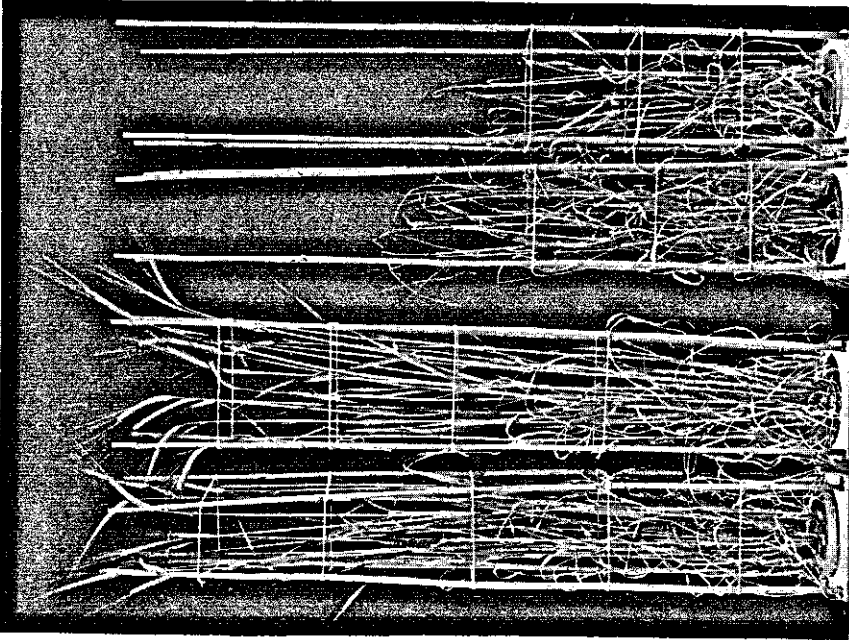


Fig. 1
Gerst in watercultuur;
rechts *zonder*, links *met* 0,6 mg kopersulfaat.

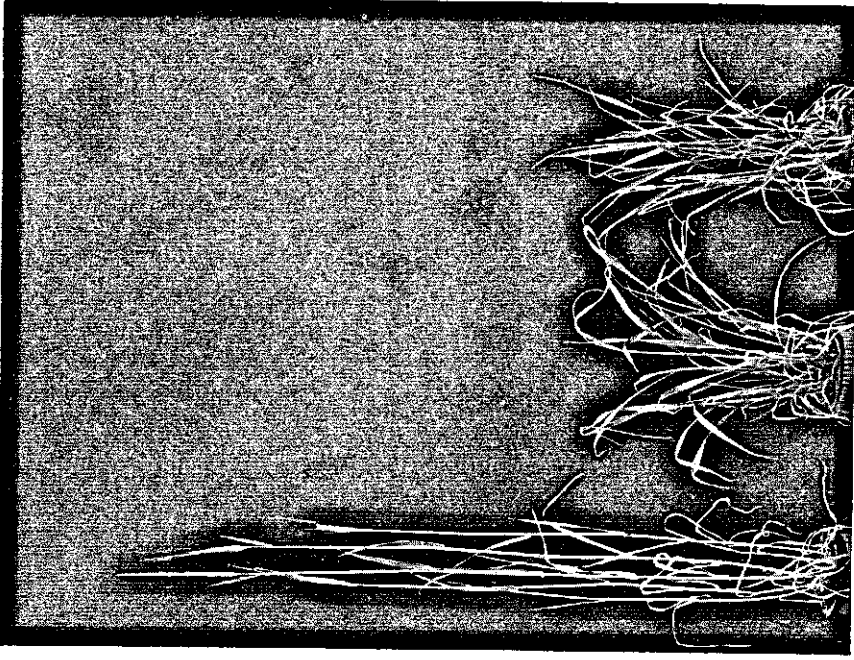


Fig. 2
Gerst in zieke grond;
rechts en midden *zonder*, links *met* 25 mg kopersulfaat.

en CaCl_2 , beide eveneens met behulp van kool gezuiverd van sporen koper.

b. *Opzet en uitvoering der proeven.*

De voedingsoplossing, die voor de waterculturen werd gebruikt, had dezelfde samenstelling als die, waarmee BRANDENBURG (11) heeft gewerkt. Deze oplossing bevatte per liter dubbel gedestilleerd water de volgende zouten:

KNO_3	0,5 g
NH_4NO_3	0,2 "
KCl	0,36 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 "
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,5 "
$\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$	0,175 "
H_3BO_3	0,5 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1-2 "
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 "

Aanvankelijk werden ook nog toegevoegd $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ en K_2SiO_3 . Daar de gunstige invloed hiervan niet is gebleken, zijn deze zouten later niet meer toegevoegd. De voedingsoplossing werd bij de eerste proeven éénmaal per maand ververscht, bij latere meest éénmaal per zes weken. Als cultuurglazen werden gebruikt: Pyrex bekeerglazen van 1 liter inhoud, Weckglazen eveneens van 1 liter en cilinderglazen van 2,4 liter. Alle glaswerk werd vóór het gebruik omgespoeld met heet 15% HCl , daarna met heet 15% HNO_3 en tenslotte met uit glas gedestilleerd water zuurvrij gemaakt. De deksels voor de waterculturen werden aanvankelijk van paraffine gemaakt, later van gearaffineerd cartonpapier, maar de beste resultaten werden verkregen met gearaffineerd gips. Per cylinder kwamen steeds vier planten, die voorgekield waren in gezuiverd kwartzand en met behulp van watten in de deksels werden bevestigd. Deze planten bleven gedurende hun geheele ontwikkeling in een goed geventileerde, niet verwarmde kas.

De eerste serie waterculturen, aangezet begin Maart 1935, omvatte vier zomergranen nl.: zomergerst (var. Goudgerst), zomertarwe (var. van Hoek), witte haver (var. Zege) en kanariezaad (Spaansch). Van iedere plantensoort waren aanwezig vijf potten, drie zonder en twee met 50 γ Cu , in de vorm van $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, per pot. De toediening van koper werd later eenige keeren herhaald, zoodat deze culturen in totaal 300 γ kregen. In deze proef had slechts een deel der potten de beschikking over omgekristalliseerde zouten, de andere hadden gewone preparaten *pro analysi*.

In een tweede proef met gerst, haver, tarwe en rogge waren de gebruikte voedingszouten alle twee keer omgekristalliseerd. In deze proef werd koper toegevoegd in opklimmende hoeveelheden, nl. 0, 2, 10, 50 en 400 γ Cu per cultuur. De laatstgenoemde hoeveelheid werd niet in één keer toegediend, doch verdeeld over een aantal weken.

In een derde proef, met zomertarwe, was de voedingsoplossing gezuiverd met behulp van kool.

Tenslotte werden nog proeven aangezet met winterrogge (Petkuser), wintertarwe (*Trifolium*), erwten (*Unica*) en aardappelen (*Eigenheimer*). In al deze gevallen werd van omgekristalliseerde zouten *pro analysi* gebruik gemaakt.

c. Groeiwaarnemingen en resultaten.

De ontwikkeling van de verschillende planten van de eerste serie was aanvankelijk voorspoedig. Na vijf weken, het tijdstip, waarop de voedingsoplossing voor de eerste maal ververscht werd, waren verschillen nog niet waarneembaar. Twee weken later echter begonnen deze bij gerst, en ongeveer op hetzelfde tijdstip ook bij tarwe, zichtbaar te worden. De planten zonder koper bleven iets achter in ontwikkeling, terwijl de uitgroeiende jonge bladen zich niet ontplooiden, maar om de lengte-as opgerold bleven. Ze kregen hierdoor een spichtig, grasachtig voorkomen. Deze verschijnselen waren het eerst waarneembaar bij de zijscheuten. Enkele dagen later vertoonden ook de hoofdscheuten deze rollingsverschijnselen. De opgerolde bladen groeiden niet meer, kregen gele toppen en begonnen van de top af te verdorren. Intuschen waren van de hoogste reeds ontplooide bladen de bovenste deelen slap geworden. Deze bladeinden verdorpen vervolgens, beginnende bij het punt; ze schrompelden hierbij sterk in, waardoor het naaldachtige karakter optrad, dat ook op de foto's goed waarneembaar is. De kleur van deze bladpunten werd hierbij geelwit. Toen eenmaal dit stadium bereikt was, vond verdere groei nauwelijks meer plaats (fig. 1). Nieuwe scheuten, die uitgroeiden, vertoonden al spoedig dezelfde symptomen.

Bij de andere granen (fig. 3, 5 en 7) waren de verschijnselen van kopergebrek, behoudens kleine verschillen, gelijk aan die bij de gerst. Een punt van verschil was b.v. de kleur van de doode bladpunten; bij gerst waren deze geelwit, bij tarwe bruingrijs, bij haver en kanariezaad wit.

Tarwe onderscheidde zich verder door het zeer slappe karakter van de jongste bladen. Voor haver was kenmerkend, dat groote deelen

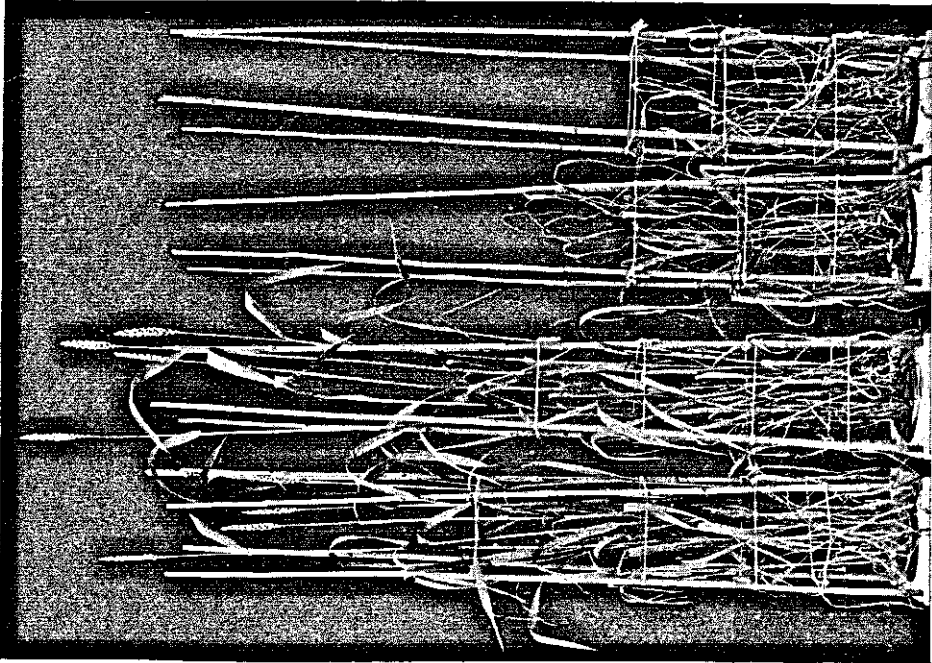


Fig. 3
Tarwe in watercultuur;
rechts zonder, links met 0,6 mg kopersulfaat.

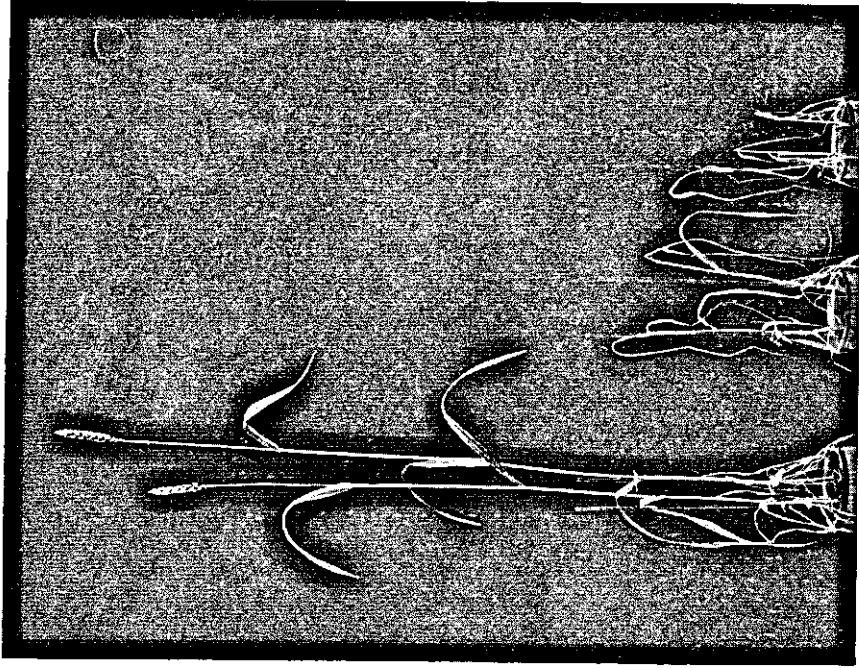


Fig. 4
Tarwe in zieke grond;
rechts en midden zonder, links met 25 mg kopersulfaat.

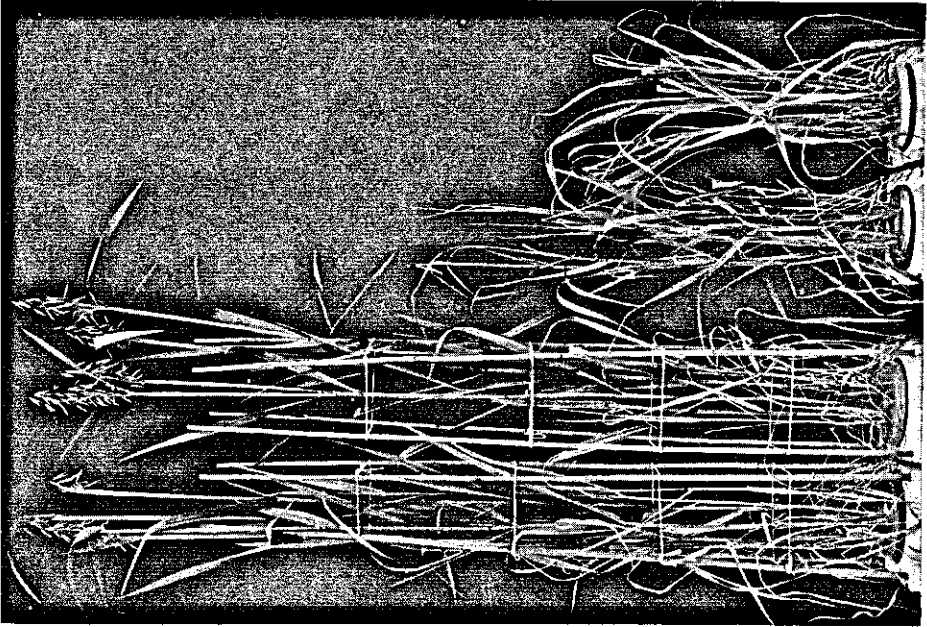


Fig. 5
Haver in watercultuur;
rechts zonder, links met 0,6 mg kopersulfaat.



Fig. 6
Haver in zieke grond;
rechts en midden zonder, links met 25 mg kopersulfaat.

van de jongste bladen vaak een lichtgroene tint aannamen. Deze kleursverandering werd bij de andere granen in veel geringere mate waargenomen.

Zooals te verwachten was, werd door geen dezer planten een aar of pluim gevormd.

Bij aanwezigheid van 300 γ Cu, was bij alle culturen de groei geheel normaal. De planten kwamen normaal in aar, bloeiden en vormden zaad. Dat haver in deze eerste proef geen zaad leverde, is vermoedelijk een gevolg geweest van de hoge temperatuur, die ten tijde van de bloei in de kas heerschte. De opbrengsten van deze proef zijn vermeld in tabel 1.

Tabel 1

Opbrengst aan droge stof bij gerst, haver, tarwe en kanariezaad, gekweekt in waterculturen resp. zonder en met 300 γ Cu per cultuur

Plantensoort	Koper in γ	Korrelgewicht in g ²⁾	Stroogewicht in g ²⁾
Gerst ¹⁾	0	0	7,10
"	0	0	12,10
"	300	9,95	20,00
Tarwe ¹⁾	0	0	5,32
"	0	0	7,81
"	300	0,95	15,60
Haver ¹⁾	0	0	9,07
"	0	0	15,58
"	300	0	28,29
Kanariezaad	0	0	9,88
"	300	1,57	19,13

¹⁾ Alle zouten, behalve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, tweemaal omgekristalliseerd; in de andere culturen zouten niet omgekristalliseerd.

²⁾ Gemiddelden van twee culturen.

Deze cijfers demonstreeren zeer duidelijk de opbrengstverhoging door kleine hoeveelheden koper.

Bij de tweede serie waterculturen waren de gebruikte voedingszouten alle twee keer omgekristalliseerd. Als gevolg hiervan verschenen de symptomen van kopergebrek veel vroeger dan bij de eerste serie. Reeds na achttien dagen begonnen bij gerst de eerste verschijnselen zichtbaar te worden. Dit was bij het uitkomen van het vierde blad. Bij tarwe, haver en rogge verschenen ze enkele dagen later.

Bij deze proef kwam zeer duidelijk de invloed van de weersomstandigheden op het optreden van de gebreksverschijnselen tot uiting.

Bij warm, zonnig weer waren de doode witte vlaggetjes en de spichtige jonge bladeren veel duidelijker dan bij koel, vochtig weer. In dit laatste geval zag men jonge opgerolde bladen, die bij droog weer zeker zouden zijn afgestorven, nog langzaam tot een normaal, zij het ook zeer slap blad uitgroeien. Volgde dan droog, warm weer, dan was van deze slappe bladen in korte tijd een groot deel van de bovenste helft verdord.

Zoals reeds boven is meegedeeld, was in deze proef het koper in opklimmende hoeveelheden toegediend. Bij 2 γ per cultuur waren bij gerst (fig. 9), tarwe en haver de gebreksverschijnselen gelijk aan die bij afwezigheid van koper. Alleen kwamen ze in een later stadium voor den dag. In tegenstelling hiermee was zomerrogge in staat om bij deze kleine hoeveelheid nog aren te vormen; korrels ontwikkelden zich hierin echter niet.

Bij 10 γ koper was van alle planten de groei normaal tot eenige tijd voor het uitkomen van de aren resp. pluimen. Bij haver vertoonde toen het bovenste blad een doode punt, terwijl de rest van het blad veel lichter groen was dan de andere bladen. De pluim kwam slechts gedeeltelijk voor den dag; van de pakjes was maar een gering aantal normaal ontwikkeld; ook deze werden na korte tijd wit en verdorden. Bij gerst was aan de bladen zeer weinig te zien. De aren kwamen echter niet te voorschijn. Tarwe vertoonde bij aanwezigheid van 10 γ koper ook aan de bladen de gebrekssymptomen. De aren kwamen nog wel te voorschijn, bleven echter loos. In tegenstelling tot de andere granen was rogge bij aanwezigheid van 10 γ Cu geheel normaal ontwikkeld, vormde goede aren met behoorlijke korrels.

50 γ Cu per cultuur gaf bij gerst en haver normale planten, die behoorlijk zaad vormden. Alleen voor tarwe was deze hoeveelheid nog niet geheel voldoende; 400 γ gaf hier steviger bladen en betere korrelvorming. In tegenstelling hiermee werd rogge door 50 γ reeds beschadigd. De bladen waren slap, hadden een lichtgroene kleur en tal van necrotische vlekjes.

Uit deze proef blijkt, dat de koperbehoefte van tarwe iets grooter is dan die van haver en gerst en aanzienlijk grooter dan die van rogge. Een hoeveelheid koper, die nog onvoldoende is om bij tarwe optimale groei te geven, veroorzaakt bij rogge reeds groeibeschatiging.

De opbrengsten aan droge stof der planten uit deze proef zijn vermeld in tabel 2. Op het moment van oogsten waren alleen de planten, welke 10 γ koper hadden gekregen, nog groen. Dit was hoofdzakelijk een gevolg van het niet vormen van zaad, waardoor, vooral bij haver en gerst, telkens weer nieuwe scheuten uitgroeiden.

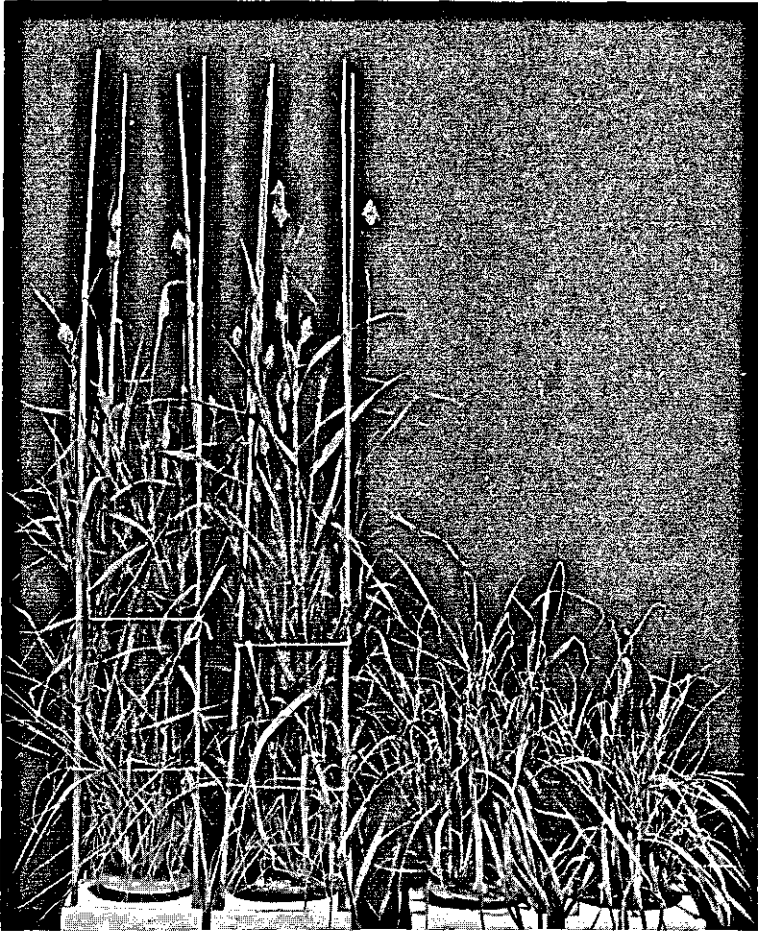


Fig. 7

Kanariezaad in watercultuur; rechts *zonder*, links *met* 0,6 mg Cu SO_4 .

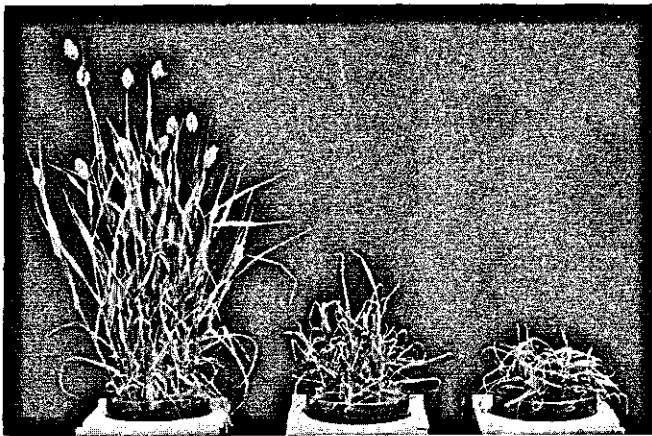


Fig. 8

Kanariezaad in zieke grond;
rechts en midden *zonder*, links *met* 25 mg Cu SO_4 .

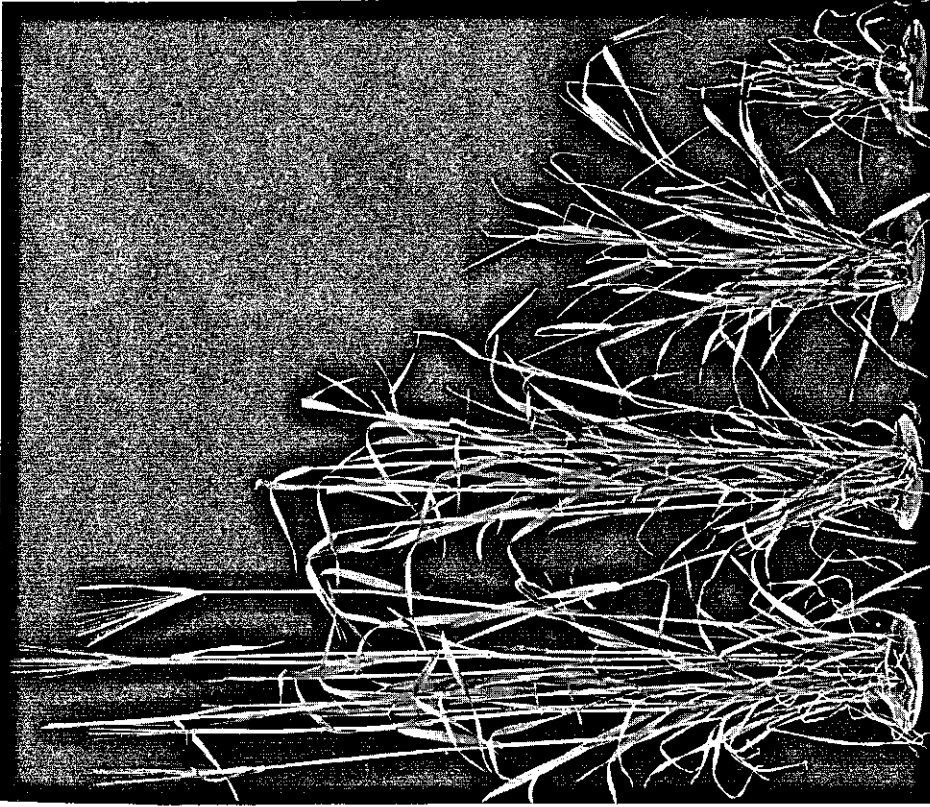


Fig. 9
Gerst in watercultuur, waaraan is toegevoegd van rechts naar links,
0, 2, 10, en 400 γ koper als $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

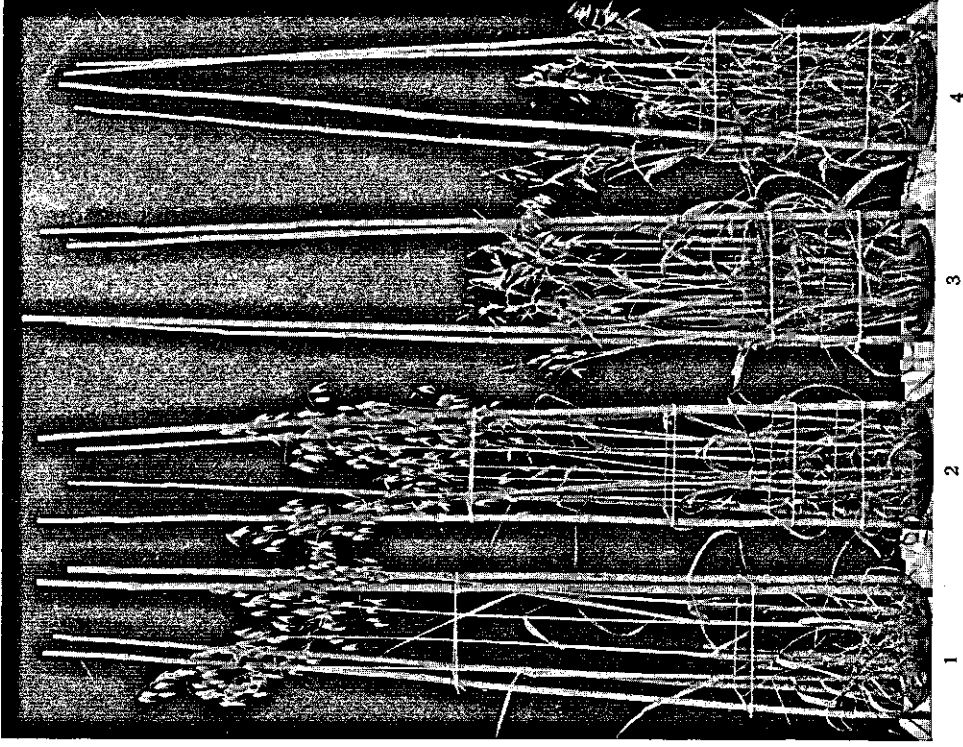


Fig. 10
1 = Kwartzsand + 0,8 mg kopersulfaat
2 = Zieke grond + 50 mg kopersulfaat.
3 = Kopervrij kwartzsand. 4 = Zieke grond.

Tabel 2

Opbrengst aan droge stof van gerst, tarwe, haver en zomerrogge in waterculturen met opklimmende hoeveelheden kopersulfaat

Plantensoort	Cu in voed.opl. in γ	Korrels in g	Stroo in g
Gerst	0	0	0,79 ¹⁾
"	2	0	2,49
"	10	0	5,08
"	50	1,87	7,18
"	400	1,91	7,05
Tarwe	0	0	0,67
"	2	0	3,20
"	10	0	7,11
"	50	1,68	9,78
"	400	2,81	10,22
Haver	0	0	0,58
"	2	0	3,00
"	10	0	11,24
"	50	5,57	11,35
"	400	4,9	11,79
Rogge.	0	0	0,89
"	2	0	4,13
"	10	0,62	7,74
"	50	0,20	5,03

¹⁾ De gewichten zijn telkens de gemiddelden van de opbrengsten van twee culturen.

Zoals uit de cijfers van deze tabel blijkt, is de hoeveelheid droge stof, die zonder koper gevormd wordt, uiterst gering. Ze bedraagt bij haver minder dan $\frac{1}{20}$ en bij tarwe en gerst minder dan $\frac{1}{10}$ gedeelte van de opbrengst bij aanwezigheid van 50 γ koper. Dat de culturen met voldoende koper nu lagere opbrengsten geleverd hebben dan die in de eerste proef, is een gevolg geweest van het minder vaak toedienen van voedingszouten. De lage opbrengst bij gerst is vermoedelijk veroorzaakt door de sterke aantasting door meeldauw. Ofschoon de aren goed gevuld waren met korrels, was het gewicht der afzonderlijke korrels laag. Haver heeft in deze proef, in tegenstelling met de eerste, behoorlijke korrels gevormd. Bij rogge is het lage zaadgewicht een gevolg geweest van het geringe aantal korrels, dat gevormd was. De oorzaak van de geringe korrelzetting is mij niet bekend.

Behalve door omkristallisatie der zouten, werden ook goede resultaten verkregen met het filtreren van de oplossing over kool. Ook op deze manier bleek het mogelijk, de voedingsoplossing zoodanig vrij van koper te krijgen, dat gebreksverschijnselen bij zomertarwe

reeds in een zeer vroeg stadium voor den dag kwamen. Zooals uit tabel 2a blijkt, zijn de cijfers van de droge stof zonder koper in deze proef niet hooger dan die in tabel 2. Dat wil dus zeggen, dat sporen koper op deze manier even goed verwijderd kunnen worden als door het omkristalliseeren van de zouten.

Tabel 2a

Zomertarwe in waterculturen, die door behandeling met kool koper vrij zijn gemaakt, resp. zonder en met toediening van koper

Cu in watercult.	Korrels in g	Stroo in g
0	0	0,78
0	0	0,64
0	0	0,62
250 γ	1,10	9,77
250 γ	1,25	8,94

Proeven met wintergranen.

Behalve bij zomertarwe en zomerrogge konden ook bij wintertarwe (var. *Trifolium*) en winterrogge (var. *Petkuser*) verschijnselen van kopergebrek in watercultuur worden verkregen. Aangezet plm. half Januari, in een niet verwarmde kas, ontwikkelden de planten zich betrekkelijk langzaam, totdat twee maanden later de eerste verschijnselen bij tarwe konden worden waargenomen. Bij rogge verschenen ze eenige tijd later. Daar de symptomen gelijk waren aan die, welke bij de zomergranen voorkwamen, kan hier van de verdere beschrijving worden afgezien.

Proeven met aardappels en erwten.

Aardappelplanten werden verkregen door de korte uitloopers van gekiemde knollen eenige tijd in vochtig zand te bewaren, waarna ze op dezelfde manier als bij de proeven met granen en erwten in de cylinders met voedingsoplossing werden overgebracht. Ofschoon alle zouten tweemaal waren omgekristalliseerd duurde het ongeveer zes weken, voordat bij aardappels verschillen tusschen de planten zonder en die met koper voor den dag kwamen. Van twee maanden oude planten, waarvan het loof zich niet verder ontwikkelde, waren de planten met 20 γ koper 15 à 20 cm langer dan die, welke geen koper hadden ontvangen (fig. 11). In het laatste geval was de kleur donkerder groen, terwijl de jongste blaadjes naar boven waren samengevouwen. De knolvorming was in deze culturen op dit moment nauwelijks begon-

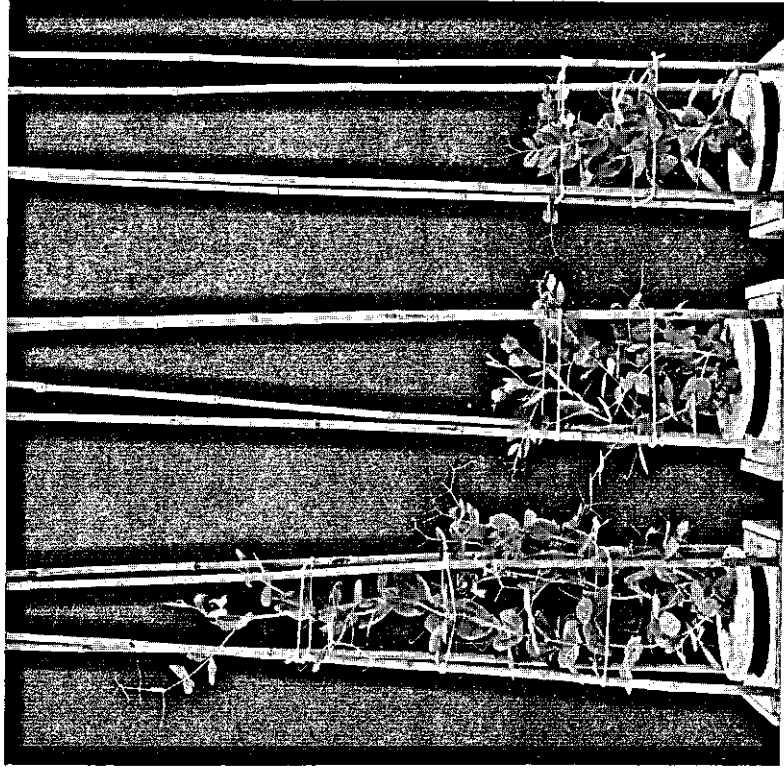


Fig. 12
Erwten in watercultuur;
rechts en midden *zonder*, links *met* 0,08 mg kopersulfaat.

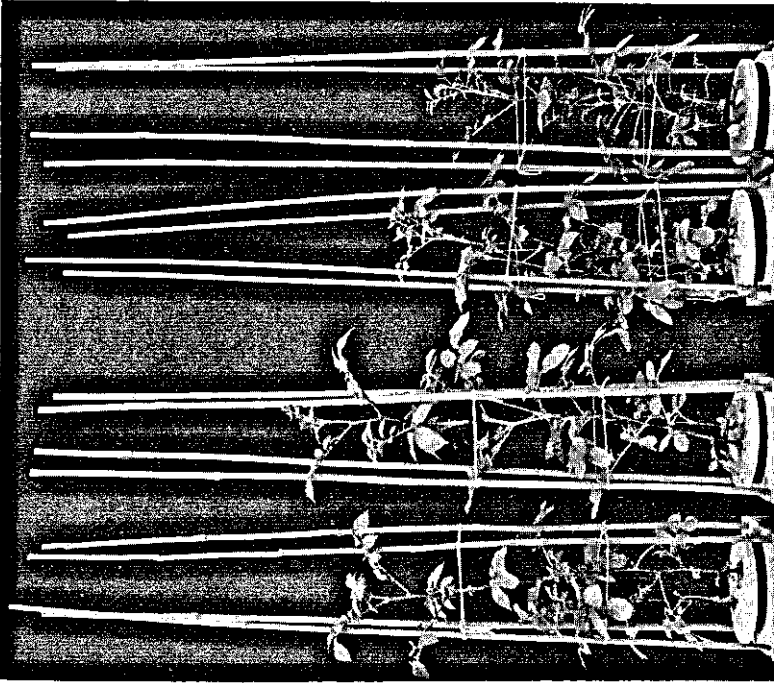


Fig. 11
Aardappels in watercultuur;
rechts *zonder*, links *met* 0,08 mg kopersulfaat.

nen. In tegenstelling hiermee waren in de potten met koper reeds vrij veel knollen gevormd. Evenals de granen vormden ook de zieke aardappelplanten talrijke zijstengels, die niet of in zeer geringe mate gevormd werden bij aanwezigheid van 20 γ koper. Bij het rijpen der planten kwam vooral de betere knolproductie bij de gezonde planten tot uiting (tabel 3). Ook was een duidelijk verschil waar te nemen in de kleur van het rijpe loof; bij de zieke planten was deze grauwwgroen, bij de gezonde grijsgeel.

Bij erwten uitte zich het kopergebrek in een achterblijven in ontwikkeling. Twee maanden oude planten hadden bij aanwezigheid van 20 γ koper een meer dan tweemaal zoo groote lengte bereikt als die, welke geen koper hadden ontvangen (fig. 12). Hoewel bij afwezigheid van koper de kleur van de oudere bladen donkerder groen was dan normaal, gold dit niet voor de allerjongste, nog niet uitgegroeide blaadjes. Deze waren lichtgroen, werden later slap en gingen tenslotte verdorren. In de oksels van deze verdorde bladen ontwikkelden zich soms weer nieuwe scheuten; de nieuwgevormde bladen waren echter niet normaal, ze hadden een bleekgroene tint, terwijl de randen der blaadjes naar beneden waren omgekruld. Ook de bloemen van de zieke planten verwelkten meest vóór dat ze tot volledige ontwikkeling waren gekomen. In overeenstemming met de verschijnselen bij granen, waar vooral de zaadvorming afhangt van de kopervoorziening, vormden ook de erwten zonder koper geen zaad (tabel 3).

Tabel 3

*Opbrengst van erwten (droge stof) en aardappels (versch materiaal),
gegroeid in waterculturen resp. zonder en met koper*

Plantensoort	Koper in γ	Zaad in g	Stroo (loof) in g	Knollen in g
Erwten	0	0	4,14	—
„	20	3,92	8,42	—
Aardappels	0	—	4,86	8,67
„	20	—	3,20	33,92

§ 2. Culturen in kwartszand

a. Voorbereidende maatregelen.

Voor deze culturen heb ik gebruik gemaakt van kwartszand van de glasfabriek te Leerdam. Dit materiaal werd op de volgende manier van sporen koper bevrijd:

1. Eerst werd gedurende ongeveer vijf uur gegloeid in gietijzeren bakken ter verwijdering van de organische stof.
2. Daarna werd het in porceleinen schalen gedurende vijf uur met zoutzuur van 15% op een waterbad behandeld. Na afloop verwijderde ik op een zuigfilter de overmaat zoutzuur, waarna met leidingwater een groot deel van het zuur werd uitgewassen. Er werd echter op gelet, dat de reactie van het filtraat nog duidelijk zuur bleef om eventuele adsorptie van koper uit het leidingwater te voorkomen.
3. Daarna werd gedurende vijf uur met salpeterzuur van 15% op een waterbad verwarmd. Na afloop hiervan werd het zand weer op een zuigfilter gebracht, het zuur afgezogen en vervolgens met uit glas gedestilleerd water gewassen, totdat alle zuur was verdwenen. Het gebruik van zuigfilters heeft het groote voordeel, dat men met kleine hoeveelheden gedestilleerd water het zand zuurvrij kan krijgen. Zoals uit onderstaande resultaten zal blijken, werd op deze manier het zand inderdaad grootendeels van zijn koper bevrijd.

Aanvankelijk volgde ik voor het zuiveren van het kwartzand de in het handboek van HONCAMP (32) beschreven methode. Hierbij werd het zoutzuur, waarmee het zand was behandeld, verwijderd door leidingwater. Dit leidingwater werd tenslotte door gedestilleerd water vervangen. Op deze manier bleek het niet mogelijk het zand „kopervrij” te krijgen. Vermoedelijk werd door het langdurige wassen met leidingwater een deel van het in dit water aanwezige koper door het zand geadsorbeerd. Volgens HONCAMP is het voor het verkrijgen van een goede groei noodig, dat na de zuurbehandeling het zand nog weer wordt gegloeid. De oorzaak van deze gunstige werking is niet met zekerheid te zeggen, maar bestaat vermoedelijk in het verwijderen van de laatste resten HCl.

Volgens SCHOLZ (67) is de schadelijke werking van de behandeling met zoutzuur een gevolg van het verwijderen van de „sporenelementen”. De gunstige werking van het gloeien zou bestaan in het leveren van nieuwe breukvlakken, waardoor weer van dergelijke elementen vrij zouden komen. In verband hiermee heb ik het gloeien van het zand na de zuurbehandeling niet meer toegepast, terwijl zoutzuur vervangen is door salpeterzuur om eventuele chloorbeschadiging te voorkomen.

b. *Opzet en uitvoering der proeven.*

Ook de proeven met kwartszand zijn uitgevoerd in glazen cilindres resp. van 1 en 2,4 liter inhoud, die met resp. 1500 en 2500 g zand werden gevuld. De samenstelling van de gebruikte voedingsoplossing was:

0,160 g $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	} per 1000 g zand
0,160 g KCl	
0,332 g NH_4NO_3	
0,086 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	
1,— g CaCO_3	
$\frac{1}{2}$ mg H_3BO_3	
$\frac{1}{2}$ mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	
$2\frac{1}{2}$ mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	
20 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	
150 cc gedestilleerd water	

Als proefplanten werden gebruikt zomertarwe (van Hoek), witte haver (Zege) en zwarte haver (Orion). Deze culturen bevonden zich gedurende het grootste deel van hun ontwikkeling in de buitenlucht; alleen bij regen en wind werden ze geplaatst in de niet verwarmde kas.

c. *Groeiwaarnemingen en resultaten.*

Daar in deze proef geen omgekristalliseerde zouten zijn gebruikt, maar gewone preparaten *pro analysi* van MERCK en KAHLBAUM, hoeft het niet te verwonderen, dat de gebreksverschijnselen minder hevig waren dan in de waterculturen. Daar komt verder nog bij, dat bij zandculturen de kans op verontreiniging met sporen koper grooter is dan bij waterculturen. Men kan zich voorstellen, dat het gezuiverde zand nog uiterst kleine hoeveelheden koper bevat, die gedurende de groeiperiode ter beschikking van de plant komen.

Toch vertoonden zoowel haver als tarwe in deze culturen zeer duidelijk de verschijnselen van kopergebrek. Beide vormden nog aren resp. pluimen, die echter slechts traag voor den dag kwamen en practisch geheel loos bleven. Als gevolg hiervan verschenen bij haver talrijke zijstengels, waardoor het gewas nog een groene kleur had op het moment, dat de culturen met koper reeds rijp waren (fig. 10). Bij tarwe waren het vooral ook de slappe bovenste bladen, waarvan enkele met doode punten, en verder de gebogen halmen, die als typische gebreksverschijnselen werden waargenomen.

De opbrengsten aan droge stof van deze proef zijn vermeld in tabel 4. Er zij op gewezen, dat drie verschillende partijen zand zijn gebruikt, waarvan twee waren gegloeid en een niet. Laatstgenoemd

materiaal was, zooals het latere onderzoek leerde, minder goed van sporen koper bevrijd, dan het gegloeide.

Tabel 4

Opbrengst aan droge stof van planten, gegroeid in gezuiverd kwartszand, resp. zonder en met kopersulfaat

Plantensoort	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	zand A, gegloeid, 0 mg Cu	0,11	13,35
"	" A, " 0,2 " "	8,90	15,20
"	" B, niet gegloeid, 0 " "	5,30	14,20
"	" B, " " 0,2 " "	9,05	15,30
"	" C, gegloeid, 0 " "	1,03	14,74
"	" C, " 0 " "	1,70	11,86
"	" C, " 0,5 " "	8,80	15,73
"	" C, " 0,5 " "	6,98	13,71
"	" C, " 2 " "	6,10	15,07
"	" C, " 2 " "	6,34	14,22
Haver (witte) .	" A, gegloeid, 0 " "	0	11,84
" " .	" A, " 0,2 " "	7,82	8,27
" " .	" B, niet gegloeid, 0 " "	6,87	10,02
" " .	" C, gegloeid, 0 " "	3,79	16,05
" " .	" C, " 0,5 " "	10,01	11,42
Haver (zwarte) .	" C, " 0 " "	0,68	16,97
" " .	" C, " 0,5 " "	4,50	12,47

Deze cijfers toonen zeer duidelijk de gunstige invloed van geringe hoeveelheden koper op de korrelproductie der granen.

§ 3. Culturen in zieke grond

a. Materiaal, herkomst en bijzonderheden.

De ontginningszieke grond was afkomstig van de volgende plaatsen:

1. *Nieuw Trimunt* (bij Marum). Dit is een humushoudende zandgrond, waarop van 1924–1932 een proefveld van het Rijkslandbouwproefstation te Groningen heeft gelegen. Gedurende 1935, 1936 en 1937 heb ik dit proefveld in beheer gehad. Verschijnselen van ontginningsziekte kwamen in zeer hevige mate voor (zie het verslag van C. MEYER (48)).
2. *Gasselternijeveen*, een dalgrond met een hoog humusgehalte, waarop van 1932–1936 een proefveld van Prof. J. ELEMA (20) heeft gelegen. Verschijnselen van ontginningsziekte kwamen in lichte graad voor.
3. *Heino* (proefboerderij), een zandgrond met eenige procenten humus. Alleen bij bemesting met kopersulfaat kon men hier goede tarwe en gerst verbouwen.

Verder heb ik proeven genomen met:

4. *Loodzand* uit Rolde. Dit is de onder de heideplag aanwezige grijze zandlaag, die volgens de ervaringen van ontginners als cultuurgrond zeer slecht voldoet. Toevoeging van kopersulfaat brengt meestal verbetering.
5. *Gliede* uit Zeyerveld. De door SMITH gebruikte gliede was van dezelfde plaats afkomstig.

b. *Opzet en uitvoering der proeven.*

Voor deze proeven werd gebruik gemaakt van glazen cultuurcilinders van 2,5 liter inhoud, die gevuld werden met plm. 2 kg grond. Per pot werden de volgende voedingszouten gegeven:

320 mg $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
320 mg KCl
1000 mg NH_4NO_3
250 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Als proefplanten werden gebruikt: haver, kanariezaad en zomertarwe, terwijl in een voorloopige proef ook nog gerst was opgenomen. De variëteiten waren dezelfde als die, welke in de water- en zandculturen zijn gebruikt. Van de eerstgenoemde planten werd telkens één pot onbehandeld gelaten, één ontving 5 g CaCO_3 per pot en één 100 mg CuSO_4 . Van zomertarwe werd een grootere serie aangezet met koperhoeveelheden opklimmend van 50–400 mg CuSO_4 per pot resp. met en zonder 5 g CaCO_3 per pot. Deze groote hoeveelheden werden gegeven naar aanleiding van proefveldresultaten (o.a. van ELEMA te Gasselternijeven), waaruit de groote koperbehoefte van tarwe bleek.

c. *Groeiwaarnemingen en resultaten bij zwaar zieke grond uit Nieuw Trimunt.*

Ongeveer een maand na het opkomen der planten kwamen in de grond uit Nieuw Trimunt bij gerst, tarwe en kanariezaad de verschijnselen van ontginningsziekte voor den dag. Bij haver verschenen ze vijf dagen later. Deze symptomen, die bij de vier granen, behoudens geringe verschillen, dezelfde waren, kwamen geheel overeen met die, welke bij de water- en zandculturen zonder koper werden waargenomen (vergelijk blz. 14). Ook hier waren het de jonge uitgroeïende bladen, die zich niet op de normale wijze ontplooiden, maar om de lengteas opgerold bleven. Deze jonge bladen gingen evenals bij de waterculturen spoedig te gronde, terwijl aan de hoogste reeds uitgegroeïde bladen de verdorde en ingeschrompelde blad-

punten ontstonden. Ook hier verschenen op het moment, dat de jongste bladen verdorven weer nieuwe scheuten, die spoedig dezelfde symptomen vertoonden. Bij tarwe had deze uitstoeling bijna niet plaats, waardoor deze planten eerder te gronde gingen dan haver en gerst, die door de vorming van nieuwe scheuten nog vrij lang groen bleven. Bij geen dezer planten werden echter aren of pluimen gevormd (fig. 2, 4, 6 en 8). Deze verschijnselen deden zich voor zoowel bij planten, die in de buitenlucht groeiden, als bij die, welke in de niet verwarmde kas werden gehouden.

De opbrengsten van de proef met grond uit Nieuw Trimunt zijn vermeld in tabel 5 en 6.

Tabel 5

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van planten, gegroeid in ontginningszieke grond uit Nieuw Trimunt resp. zonder en met CuSO_4

Gewas	Kopertoevoeging	Korrelgewicht	Stroogewicht
Gerst	0	0	1,90
"	0	0	2,20
"	25 mg CuSO_4	2,40	3,35
Tarwe	0	0	0,75
"	0	0	0,84
"	25 mg CuSO_4	1,70	4,15
Haver	0	0	3,25
"	0	0	3,40
"	25 mg CuSO_4	1,65	2,90

De planten van tabel 5 zijn gekweekt in kleine glazen potten met plm. $\frac{1}{2}$ kg grond. Zooals uit de cijfers blijkt, is alleen bij toediening van CuSO_4 goede groei mogelijk geweest. Dat deze opbrengsten niet hoger waren, is een gevolg geweest van de geringe hoeveelheid grond, die de planten ter beschikking stond.

In tabel 6 is nogmaals het oogstresultaat van een potproef met grond uit Nieuw Trimunt vermeld. In dit geval stonden groote glazen cilindres met plm. 2 kg grond ter beschikking.

De opbrengstverhooging, door kopersulfaat op deze grond teweeggebracht, spreekt zeer sterk uit deze cijfers. Opvallend is, dat een gift van 50 mg CuSO_4 per 2 kg grond voor tarwe nog niet voldoende is geweest.

Zooals reeds boven is meegedeeld, zijn behalve met grond uit Nieuw Trimunt ook potproeven aangezet met gliede, loodzand en cultuurgronden uit Heino en Gasselternijveen.

Tabel 6

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van tarwe, haver en kanariezaad, gegroeid in ontginningszieke grond uit Nieuw Trimunt resp. zonder en met CuSO_4

Gewas	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	—	0	1,05
"	5 g CaCO_3	0	1,07
"	50 mg CuSO_4	8,89	12,37
"	50 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	8,04	13,46
"	100 mg CuSO_4	9,54	14,47
"	100 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	9,24	15,06
"	200 mg CuSO_4	9,26	14,08
"	200 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	9,57	15,05
"	400 mg CuSO_4	9,03	14,15
"	400 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	9,54	16,15
Haver	—	0	5,71
"	+ 5 g CaCO_3	0	5,89
"	+ 100 mg CuSO_4	9,87	11,13
Kanariezaad	—	0	1,68
"	+ 5 g CaCO_3	0	1,14
"	+ 100 mg CuSO_4	5,55	13,15

d. *Proeven met gliede.*

Gliede bleek in sterke mate de verschijnselen van ontginningsziekte te geven. Deze verschijnselen waren geheel identiek met die in de grond uit Nieuw Trimunt (tabel 7).

Tabel 7

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van planten, gegroeid in gliede resp. zonder en met CuSO_4

Gewas	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	15 g CaCO_3	0	1,43
"	25 g CaCO_3	0	4,95
"	25 g CaCO_3 + 50 mg CuSO_4	5,85	11,22
"	15 g CaCO_3 + 100 mg CuSO_4	7,08	10,51
"	25 g CaCO_3 + 100 mg CuSO_4	6,80	11,28
"	15 g CaCO_3 + 200 mg CuSO_4	4,25	10,88
"	25 g CaCO_3 + 200 mg CuSO_4	7,50	11,77
"	15 g CaCO_3 + 400 mg CuSO_4	6,07	10,88
"	25 g CaCO_3 + 400 mg CuSO_4	7,39	12,08
"	25 g CaCO_3 + 1000 mg CuSO_4	6,63	11,52
Haver	15 g CaCO_3	0	11,37
"	25 g CaCO_3	0	10,76
"	15 g CaCO_3 + 200 mg CuSO_4	4,05	15,78
Kanariezaad	15 g CaCO_3	0	1,21
"	25 g CaCO_3	0	2,71
"	15 g CaCO_3 + 200 mg CuSO_4	3,86	8,40

e. *Proeven met loodzand.*

Ook SMITH heeft proeven met loodzand genomen. Hij constateerde in sommige gevallen een gunstige werking van kopersulfaat, in andere daarentegen weer niet. Hoewel de planten zonder kopersulfaat langer groen bleven dan die, welke dit zout ontvingen, zijn de witte vlaggetjes aan de bovenste bladen door hem niet geconstateerd.

In tegenstelling hiermee zijn door mij in loodzand bij haver zoowel als bij kanariezaad en tarwe de typische verschijnselen van ontginningsziekte verkregen. In overeenstemming hiermee heeft loodzand met kopersulfaat een geheel normaal gewas gegeven. In deze proef is verder nog nagegaan de invloed van een dubbele hoeveelheid kali en phosphorzuur. Dit naar aanleiding van de bij sommigen heerschende meening, dat de onvruchtbaarheid van loodzand een gevolg zou zijn van een zeer sterk gebrek aan voedingszouten, vooral aan kali en phosphorzuur. Zooals uit tabel 8 blijkt, heeft deze maatregel geen gunstig resultaat gehad. Verder is nog onderzocht de invloed van het gloeien van het loodzand. Ofschoon hierdoor een zekere verbetering is verkregen, was de korrelopbrengst nog zeer slecht. Ook de toevoeging van 1 resp. 2 gram asch van goede tarwe bleek niet in staat een goede korrelopbrengst te geven. Aanvankelijk waren deze potten niet te onderscheiden van die, welke kopersulfaat hadden gekregen. Eenige tijd vóór het in de aar komen kwamen de verschijnselen echter op zeer typische wijze te voorschijn. Vooral de resultaten van deze laatste twee proeven pleiten er m.i. voor, dat we bij loodzand te maken hebben met een tekort aan koper, en niet met een schadelijke organische verbinding. Immers door het gloeien is alle organische stof ontleed; niettegenstaande dit was de ziekte niet verdwenen. Ook het feit, dat met tarweasch de planten aanvankelijk volmaakt gezond zijn, later echter ziek worden, wijst er op, dat we hier te maken hebben met een gebrek aan een voedingsstof, die aanvankelijk in voldoende mate aanwezig was, later echter opgebruikt is. Wanneer de ziekte een gevolg zou zijn van een schadelijke humuswerking, die door het in de asch aanwezige koper onvoldoende onwerkzaam gemaakt zou zijn, zou men verwachten, dat juist de jonge planten ziekteverschijnselen zouden vertoonen. Zooals boven is meegedeeld, is dit niet het geval geweest.

f. *Proeven met grond uit Heino en Gasselternijveen.*

De tot nu toe vermelde gronden vertoonden alle in zeer sterke mate de verschijnselen van ontginningsziekte. De beide volgende proeven

Tabel 8

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van planten, gegroeid in loodzand
resp. zonder en met kopersulfaat

Gewas	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	-	0	1,89
"	dubbele hoeveelheid K en P	0	0,95
"	1 g tarweasch	0,31	11,72
"	50 mg CuSO ₄	7,30	9,55
Haver	-	0	12,12
"	dubbele hoeveelheid K en P	0	8,94
"	gegloeid	0,32	14,98
"	1 g tarweasch	0	14,02
"	2 g tarweasch	1,06	16,99
"	50 mg CuSO ₄	10,33	11,70
"	100 mg CuSO ₄	11,85	11,40
Kanariezaad . . .	-	0	1,40
"	dubbele hoeveelheid K en P	0	0,78
"	1 g tarweasch	0	7,82
"	50 mg CuSO ₄	5,14	10,31

zijn genomen met grond resp. uit Gasselternijveen en van de proefboerderij te Heino. Beide zijn gronden, die sinds langen tijd in cultuur zijn. De gunstige werking van koperzouten kwam hier pas tot uiting, toen door de crisismaatregelen de verbouw van tarwe ook tot de lichte gronden werd uitgebreid. Het bleek toen, dat op vele van deze, reeds oude, cultuurgronden geen goede tarwe verbouwd kon worden. Aanvankelijk kende men de oorzaak van dit verschijnsel niet, later bleek de gunstige werking van kopersulfaat.

Aanvankelijk groeiden alle planten in beide gronden geheel normaal. Op het oogenblik, dat de culturen in de grond uit Nieuw Trimunt reeds zwaar ziek waren, was aan die uit Gasselternijveen en Heino nog niets bijzonders te zien. Duidelijke verschijnselen werden pas eenige tijd voor het uitkomen van de aar zichtbaar. Terwijl kanariezaad met kopersulfaat normaal in de aar kwam, was dit niet het geval bij de onbehandelde culturen. Deze vormden slechts sporadisch een aar, die echter loos bleef. Kanariezaad vertoonde verder duidelijke vlaggetjes aan de bovenste bladen. Bij beide grondsoorten bleek toevoeging van CaCO₃ de ziekteverschijnselen te verergeren.

Bij tarwe kwamen de typische symptomen van ontginningsziekte niet voor. Karakteristieke verschillen tusschen onbehandelde en met koper bemeste planten waren de volgende. De van kopersulfaat voorziene planten zijn iets beter ontwikkeld dan die, welke dit zout niet

hebben ontvangen; de bladkleur is iets donkerder groen, terwijl de bladen steviger zijn dan zonder koper. Vooral dit slappe karakter van de bladen blijkt een steeds aanwezig kenmerk van zwak ontginningszieke tarweplanten. Bij voldoende koper staan de bovenste bladen stevig omhoog, terwijl ze bij de onbehandelde planten gebogen zijn. Zijn de verschijnselen iets erger, dan komen aan deze gebogen bladen doode punten voor. De aren van de onbehandelde planten komen eenige dagen later en ook trager te voorschijn dan bij de behandelde. Veelal ook blijft het bovenste halmlid iets korter (fig. 13). Duidelijke verschillen treden verder op tegen het rijpen. De onbehandelde planten rijpen later dan de met koper bemeste; verder is de kleur van het gestorven stengel- en bladmateriaal in het eerste geval duidelijk grauwer; dit geldt niet alleen voor de bovenste bladen, maar ook voor de onderste, waaraan gedurende de groei geen bijzonderheden merkbaar waren. Een zeer typisch kenmerk van deze lichte graad van de ziekte bij tarwe is verder het zich buigen van de halm eenige tijd voordat de plant rijp is (zie fig. 14). Naarmate de rijping vordert neemt deze buiging soms zoodanig toe, dat bij de rijpe plant de neerbuigende aar ongeveer evenwijdig aan de halm kan loopen. Deze gebogen halmen zijn zeer bros en knikken vaak eenige centimeters beneden de aar. Laatstgenoemd verschijnsel, dat ook op het veld herhaaldelijk is waargenomen, geeft vaak een eigenaardig aanzien aan het tarwegewas.

Om uit te maken of verschillende tarwerassen even gevoelig waren voor de hier beschreven verschijnselen, heb ik de invloed van een bemesting met kopersulfaat op de ontwikkeling van acht winter-tarwerassen onderzocht. Hierbij bleek, dat alle acht duidelijk reageerden (vergelijk tabel 10), zoodat van een belangrijk verschil in gevoeligheid niet kan worden gesproken. Het verschil in stevigheid van de bladen, waarop boven gewezen is, was het duidelijkst bij Juliana-tarwe aanwezig, terwijl de gebogen aren bij afwezigheid van koper vooral aan *Trifolium* en in iets geringere mate aan *Invicta* werden waargenomen.

De hier beschreven verschijnselen van ontginningsziekte bij tarwe zijn in de practijk veelvuldig waar te nemen, niet alleen op „nieuwe” gronden, maar ook op cultuurgronden, die reeds honderden jaren geleden ontgonnen zijn. In de oude veenkoloniën b.v. ziet men ze vrij vaak.

Bij haver waren de ziekteverschijnselen eveneens pas eenige tijd voor het rijp worden waarneembaar. Het bleek toen, dat de planten

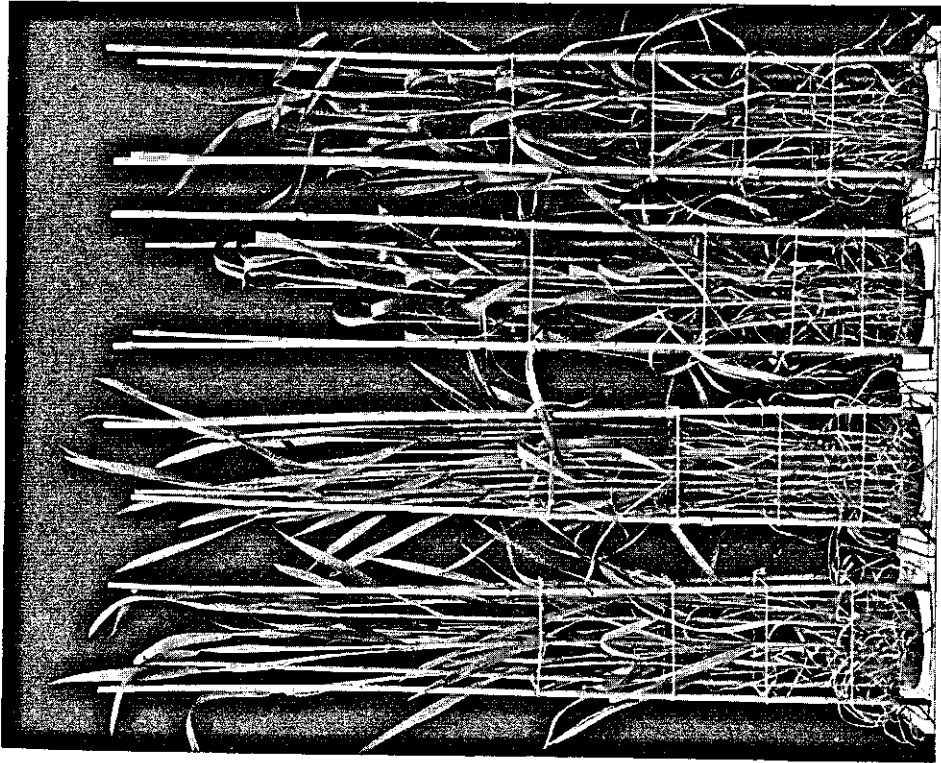


Fig. 13
Julianatarwe in zwak zieke grond;
rechts *zonder*, links *met* 100 mg kopersulfaat.

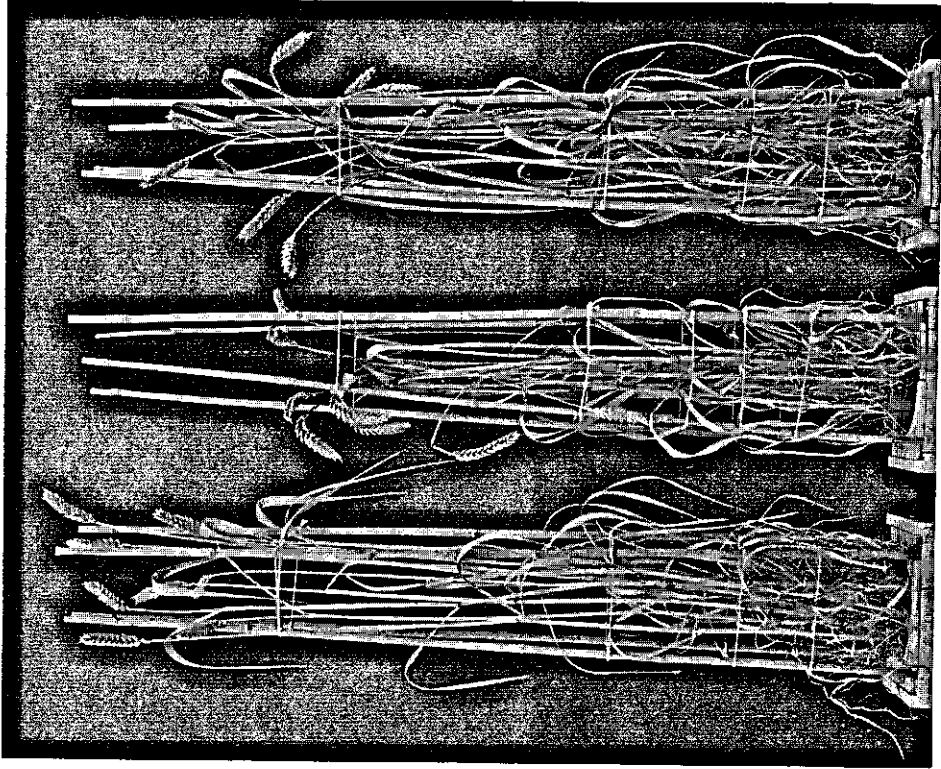


Fig. 14
Trifoliumtarwe in zwak zieke grond;
rechts en midden *zonder*, links *met* 100 mg kopersulfaat.

in de onbehandelde grond, ofschoon ze normale pluimen hadden gevormd en gebloeid hadden, bijna geen zaad leverden: het grootste deel van de pakjes was loos. Als gevolg hiervan liepen weer nieuwe scheuten uit, waardoor op het moment, dat de planten met koper geheel rijp waren, deze onbehandelde planten nog groene halmen hadden.

Tabellen 9, 10 en 11 geven de gewichten van de in grond uit Gasselternijveen en Heino gegroeide planten.

Tabel 9

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van planten, gegroeid in grond uit Gasselternijveen resp. zonder en met toediening van kopersulfaat

Gewas	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	—	5,61	10,70
”	5 g CaCO ₃	6,46	11,94
”	50 mg CuSO ₄	9,34	14,26
”	50 mg CuSO ₄ + 5 g CaCO ₃	10,01	12,70
”	100 mg CuSO ₄	7,11	10,24
”	100 mg CuSO ₄ + 5 g CaCO ₃	9,32	13,23
”	200 mg CuSO ₄	7,28	11,44
”	200 mg CuSO ₄ + 5 g CaCO ₃	9,35	14,17
”	400 mg CuSO ₄	10,00	14,32
”	400 mg CuSO ₄ + 5 g CaCO ₃	9,72	15,00
Haver	—	7,44	18,78
”	5 g CaCO ₃	0,33	22,84
”	100 mg CuSO ₄	12,5	12,21
Kanariezaad	—	0,31	15,62
”	5 g CaCO ₃	0	11,24
”	100 mg CuSO ₄	6,07	10,98

Tabel 10

Invloed van een bemesting met kopersulfaat op de opbrengst van 8 verschillende tarwerassen, gegroeid in grond uit Gasselternijveen

Tarweras	Zonder koper		Met 100 mg CuSO ₄ per pot	
	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g
Carsten's V	9,88 ¹⁾	20,24	15,79 ¹⁾	25,50
Imperiaal IIa	12,68	22,89	16,20	31,91
Invicta	11,98	21,20	14,76	27,07
Juliana	10,23	20,84	16,58	25,70
Prins Hendrik	11,72	24,35	17,56	30,73
Providence	8,50	18,02	11,10	22,15
Siegerländer	12,59	22,00	15,40	28,73
Trifolium	10,58	21,53	16,50	26,45

¹⁾ Gemiddelde cijfers van de opbrengsten van 2 potten.

Tabel 11

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van planten, gegroeid in grond uit Heino resp. zonder en met toediening van CuSO_4

Plantensoort	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	—	9,50	16,50
”	5 g CaCO_3	3,88	13,70
”	50 mg CuSO_4	6,40	12,45
”	50 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	6,40	13,85
”	100 mg CuSO_4	9,10	15,95
”	100 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	8,22	13,05
”	200 mg CuSO_4	11,34	17,65
”	200 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	7,54	12,70
”	400 mg CuSO_4	9,44	14,55
”	400 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	7,65	14,05
Haver	—	6,87	14,48
”	5 g CaCO_3	5,91	20,65
”	100 mg CuSO_4	11,99	12,43
Kanariezaad	—	0	8,30
”	5 g CaCO_3	0	6,16
”	100 mg CuSO_4	6,77	15,45

Zoals uit deze tabellen blijkt, heeft CaCO_3 de ziekteverschijnselen duidelijk verergerd. Alleen bij tarwe in de grond uit Gasselternijveen is dit niet het geval geweest. Bij haver in tabel 11 zien we door toediening van CaCO_3 de korrelobbrengst iets dalen, daarentegen de opbrengst van stroo belangrijk stijgen als gevolg van het steeds weer vormen van zijscheuten. De verhouding korrel : stroo, die een maat is voor de hevigheid der ziekteverschijnselen, daalt hierdoor van 0,47 op 0,29. Verder valt op, dat kopersulfaat bij haver en vooral bij kanariezaad beter gewerkt heeft dan bij tarwe. Dit is eenigszins in tegenstelling met hetgeen eerder is meegedeeld en ook blijkt uit tabellen 5, 6 en 7. Bij die zeer zieke gronden zagen we, dat de opbrengst aan droge stof bij tarwe duidelijk meer wordt verlaagd door de ziekteverschijnselen dan bij haver. Het gaat daar echter alleen om de vorming van vegetatief materiaal; tot korrelvorming komt het bij geen van beide planten. Verschijnt daarentegen de ziekte pas laat, dan blijft haver, niettegenstaande de plant normale pluimen heeft gevormd, grootendeels loos, terwijl tarwe en ook gerst vaak nog wel korrels vormen, die dan echter verschrompeld blijven. Men krijgt dus wel de indruk, dat, voorzoover het de vorming van generatief materiaal betreft, haver nog iets gevoeliger is voor ontginningsziekte dan tarwe en gerst. Zeer goed komt dit verschil in gevoeligheid op verschillende tijdstippen van de ontwikkeling tot uiting bij vergelijking van de

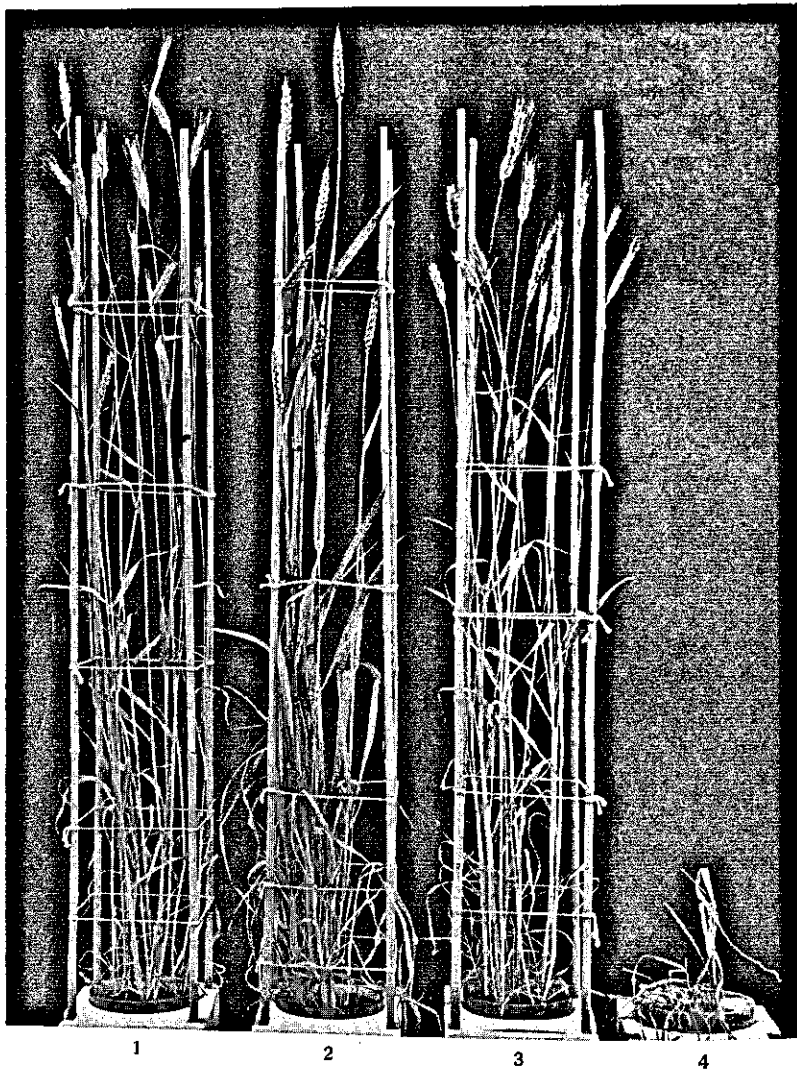


Fig. 15

Tarwe en rogge in zieke grond uit N. Trimunt;
1. rogge met 100 mg kopersulfaat
2. tarwe met 100 mg kopersulfaat
3. rogge zonder kopersulfaat
4. tarwe zonder kopersulfaat

tabellen 9 en 11 met 5, 6, 7 en 8. Uit tabel 8 blijkt, dat in het onbehandelde loodzand tarwe aanzienlijk minder droge stof vormt dan haver. Bij aanwezigheid van 1 gram asch blijkt juist zooveel koper beschikbaar, dat aren resp. pluimen gevormd worden. Tarwe vormt dan nog enkele korrels terwijl haver geheel loos blijft.

Of dit zelfde verschijnsel in de practijk voorkomt, is mij niet bekend, daar vergelijkende veldproeven met haver en tarwe op weinig zieke grond door mij niet zijn genomen. Zeker is echter, dat men als regel de ziekteverschijnselen bij tarwe eerder ziet dan bij haver. Het is echter zeer wel mogelijk, dat op talrijke gronden, waar de tarwe zichtbare verschijnselen vertoont (kromme, geknikte aren, langer groen blijven bij rijping enz.), ook haver zal reageeren op een koperbemesting en wel vooral door een betere korrelvorming.

g. Proeven met verschillende plantensoorten in zwaar zieke grond uit Nieuw Trimunt.

In dit onderzoek werden de volgende planten vergeleken: zomertarwe (van Hoek), zomergerst (Goudgerst), witte haver (Zege), zwarte haver (Orion), kanariezaad (Spaansch), zomerrogge (Petkuser), aardappelen (Eigenheimer) en erwten (Unica).

De eerste vijf plantensoorten vertoonden al spoedig in hevige mate de ziekteverschijnselen. Zwarte haver, waarvan in de literatuur vermeld wordt, dat ze minder gevoelig is dan witte, was in deze proef even erg ziek als deze. Blijkbaar geldt dit minder gevoelig zijn alleen voor de oude landrassen, zooals b.v. Zwarte President en niet voor dit Zweedsche ras. Zeer opvallend was de goede groei van zomerrogge in deze grond (fig. 15). Toediening van kopersulfaat heeft hier de korrelobbrengst niet verhoogd. Op de geringe gevoeligheid van rogge voor ontginningsziekte wordt ook door RADEMACHER (56) gewezen. Bij aardappels werd evenmin een betere groei door kopersulfaat waargenomen. Bij erwten kwamen de verschijnselen goed overeen met de door SMITH gegeven beschrijving: een eenigszins achterblijven in ontwikkeling, verdorren van een deel der bladen en verder weinig of geen zaadvorming, niettegenstaande zich de peulen normaal ontwikkelden. De ziekteverschijnselen waren hier minder hevig dan bij de planten in de waterculturen, die zonder kopertoevoeging in het geheel geen peulen vormden en waarbij ook de verschillen in vegetatieve ontwikkeling tusschen de planten met en zonder koper belangrijk grooter waren dan bij die in zieke grond.

Tabel 12

Opbrengst aan luchtdroog materiaal van verschillende plantensoorten, gegroeid in zeer zieke grond uit Nieuw Trimunt resp. zonder en met CuSO_4

Plantensoort	Geen koper		100 mg CuSO_4 per pot	
	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g
Tarwe	0	0,75	7,66	17,28
Gerst	0	4,37	15,32	11,78
Witte haver	0	9,49	12,90	12,75
Zwarte haver	0	8,26	10,43	13,09
Zomerrogge	10,71	13,28	9,73	13,53
Kanariezaad	0	5,25	5,22	17,34
Erwten	0,31	9,49	7,78	6,85
Aardappels	65,80 ¹⁾	2,75	69,75 ¹⁾	2,38

¹⁾ Knollen (versch).

RADEMACHER, die een zeer uitvoerige beschrijving geeft van de verschijnselen van ontginningsziekte bij verschillende gewassen, komt hierbij tot de conclusie, dat tot de zeer gevoelige planten moeten worden gerekend: witte en gele haver, tarwe en gerst; tot de minder gevoelige: zwarte veenhaver, paardeboonen, gele lupinen en roode klaver; tot de weinig of niet gevoelige: rogge, aardappelen, serradella, wikkens, witte klaver, spurrie en boekweit.

ALLISON, BRYAN en HUNTER (1) hebben op de gronden van de „Everglades” voor een zeer groot aantal plantensoorten, waaronder ook vele tuinbouwgewassen, de beteekenis van kopertoediening nagegaan. Sla, andijvie, spinazie, peterselie, verschillende koolsoorten, tomaten en vele andere tuinbouwgewassen reageerden zeer sterk. Van de zeer vele door hun onderzochte landbouwgewassen, waarop kopersulfaat gunstig werkte, zij hier alleen de aandacht gevestigd op maïs, suikerriet en verschillende leguminosen. Bij de meeste gewassen was de werking al vroeg zichtbaar; bij de leguminosen later: hier was het vooral de zaadvorming, die sterk verbeterd werd. Aardappels en enkele onkruiden waren de eenige planten, die op deze gronden normaal groeiden.

§ 4. Vergelijking van de verschijnselen en resultaten van de §§ 1, 2 en 3

Wanneer we de uitwendige verschijnselen van kopergebrek vergelijken met die van de ontginningsziekte, dan blijkt, dat beide nauwkeurig met elkaar overeenstemmen. Niet alleen geldt dit voor de hevige ziektegevallen, maar ook voor de minder ernstige, waarbij de

typische doode bladpunten niet aanwezig zijn. Door het laten opklimmen van de hoeveelheid koper in de waterculturen van 0-50 γ kan men alle graden van ontginningsziekte verkrijgen, die in de natuurlijke gronden worden waargenomen. Door deze proeven is wel waarschijnlijk geworden, dat ontginningsziekte een gevolg is van onvoldoende kopervoorziening van de planten, maar bewezen is het nog niet. Voor het leveren van dit bewijs is het noodig aan te toonen:

1e dat gronden, waarop de planten verschijnselen van ontginningsziekte vertoonen, een lager gehalte aan opneembaar koper bezitten dan gezonde, terwijl de mate van ziek zijn met dit kopergehalte zal moeten correleeren.

2e dat een correlatie bestaat tusschen het kopergehalte van de planten en de graad, waarin de ziekteverschijnselen aanwezig zijn.

Deze punten zullen in het volgende hoofdstuk worden behandeld.

Wanneer we nu nog de proeven met verschillende plantensoorten in waterculturen en in zieke grond vergelijken dan blijkt, dat aardappels en rogge, die weinig gevoelig zijn voor de ontginningsziekte, eveneens een veel lagere koperbehoefte bezitten dan tarwe, gerst, haver en kanariezaad. Dit pleit voor de kopergebrektheorie. Het is echter duidelijk, dat gevoeligheid voor de ziekte en koperbehoefte niet altijd behoeven te correleeren. Men heeft nl. naast het verschil in koperbehoefte ook nog te maken met verschil in opnemend vermogen en nu is het goed denkbaar, dat planten met een zelfde koperbehoefte verschillend gevoelig zijn voor de ziekte, omdat de eene plant beter in staat is het koper uit de grond op te nemen dan de andere. Voor zoover uit bovenstaande proeven kan worden waargenomen, is het waarschijnlijk, dat aardappels en rogge beter in staat zijn koper uit de grond op te nemen dan haver, gerst en vooral beter dan tarwe. Dit naar aanleiding van het feit, dat verschil in gevoeligheid tusschen rogge (aardappels) en tarwe in zieke grond veel grooter is dan in waterculturen (vergelijk de verschillen tusschen tarwe en rogge in tabel 2 en in tabel 12).

Bij vergelijking van de culturen in voedingsoplossing met die in zieke grond is het opvallend, dat de hoeveelheid koper, die noodig is om gezonde planten te krijgen in het eerste geval veel kleiner is dan in het laatste. Zoo blijkt uit tabel 2, dat 0,05 mg koper voor de waterculturen reeds voldoende is, terwijl voor sommige zieke gronden dit met 50 mg CuSO_4 per 2 kg grond nauwelijks het geval is. Ook bij veldproeven vindt men niet zelden, dat voor humusrijke gronden 100 kg CuSO_4 per ha noodig is om de ziekte geheel te doen verdwijnen.

Uit een eenvoudige proef, waarbij het kopersulfaat in plaats van met de grond gemengd, op de reeds in de pot aanwezige grond werd gebracht, bleek, dat in laatstgenoemd geval de genezende werking veel geringer was dan bij menging door de grond. De reden van deze slechtere werking was waarschijnlijk hierin te zoeken, dat het gegeven koperzout door de grondbestanddeelen werd vastgelegd en daardoor niet de wortels bereikte.

Om de koperbehoefte van planten, die in ontginningszieke grond groeien, te leeren kennen, was het noodzakelijk, het koper zoodanig toe te dienen, dat het niet in aanraking was met de grond, maar toch gemakkelijk door de plant kon worden opgenomen. Om aan deze eischen te voldoen waren twee mogelijkheden aanwezig:

1. koper toe te dienen op de bladen; 2. de planten zoodanig te cultiveeren, dat een deel der wortels in zieke grond groeide en een ander deel in water of kwartszand, waaraan het kopersulfaat kon worden toegediend. Daar de juiste doseering van het koper bij de eerste methode moeilijkheden met zich meebrengt, heb ik alleen met de tweede gewerkt. In een voorloopige proef werden cilinderglazen volgens NEUBAUER van 500 cc inhoud d.m.v. een glasplaat in twee helften verdeeld. In de eene helft kwam zieke grond uit Nieuw Trimunt, in de andere gewasschen kwartszand, waaraan kopersulfaat in opklimmende hoeveelheden werd toegediend. Deze zelfde hoeveelheden kopersulfaat werden ook toegevoegd aan cilinderglazen, waarvan beide helften geheel gevuld waren met grond. Vervolgens werden voorgekiemde gerstkorrels zoodanig op de glasplaat geplaatst, dat een deel der wortels in zieke grond, een ander deel in zand groeide. Het resultaat dezer proef was, dat, bij toediening aan de zieke grond, de grootste hoeveelheid koper, die gegeven was, nl. 400 γ , nog niet in staat was om geheel gezonde planten te leveren. Bij die culturen echter, waarbij het koper in het kwartszand was gebracht, was 20 γ reeds in staat gezonde planten te leveren. Dit resultaat wijst er op, dat de groote koperbehoefte van planten in zieke grond berust op een binding van koper aan de grondbestanddeelen en niet op een grootere koperbehoefte van de in die grond groeiende planten.

In een tweede proef werd het koper niet in kwartszand maar in water toegediend. De planten groeiden met een deel van hun wortels in een voedingsoplossing en met een ander deel in de zieke grond. De voedingsoplossing bevond zich in cilinderglazen van 600 cc, die geplaatst werden in grootere cilinderglazen met zieke grond (fig. 16). Bij een aantal potten was zoowel in de binnenste als in de buitenste

cylinder een voedingsoplossing aanwezig, terwijl bij eenige andere allebei de potten met zieke grond werden gevuld. De proefplanten, gerst en haver, werden, nadat ze waren voorgekiemd, met behulp van

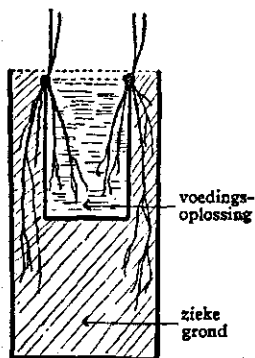


Fig. 16

voor dit doel geconstrueerde houten deksels zoodanig geplaatst, dat de wortels gedeeltelijk in de binnenste en gedeeltelijk in de buitenste pot groeiden. Hoewel de culturen zonder koper in deze proef hogere opbrengsten leverden dan naar aanleiding van vroegere proeven verwacht werd, waren toch ook nu haver zoowel als gerst duidelijk ziek. Toediening van 200 γ koper aan de zieke grond bracht slechts een geringe verbetering (tabel 13b). Werd het koper echter niet aan de grond maar aan de cylinders met voedingsoplossing toegediend, dan was reeds 10 γ voldoende om de ziekte-

verschijnselen te doen verdwijnen. Dit gold zoowel voor de planten, die geheel in voedingsoplossing groeiden, als voor die, welke met een groot deel der wortels in zieke grond groeiden (tabel 13a).

Alleen voor haver was in de grond-water-culturen iets meer koper noodig om zaadvorming te krijgen dan in de waterculturen.

Tabel 13a

Invloed van kopersulfaat op de opbrengst aan droge stof van planten, die in water-grond-culturen en in waterculturen zijn gekweekt

Cu in γ in binnenste cylinder	Gerst				Haver			
	buitenste vat water		buitenste vat grond		buitenste vat water		buitenste vat grond	
	korrel	stroo	korrel	stroo	korrel	stroo	korrel	stroo
0	0	4,91	0	6,70	0	8,03	0	10,66
5	0,87	9,61	0,69	7,58	0	12,77	0	11,36
10	2,03	7,87	1,47	5,86	0,20	13,13	0	11,94
20	3,43	8,13	1,38	9,75	4,36	18,34	0,26	12,21

Tabel 13b

Opbrengstverhooging door toediening van kopersulfaat aan ontginningszieke grond

Cu in γ	Gerst		Haver	
	korrel	stroo	korrel	stroo
0	0	10,86	0	11,55
200	0	12,53	0	16,35

Uit deze proef blijkt, dat niet alleen in watercultuur maar ook in zieke grond, de hoeveelheid koper, die de planten noodig hebben voor een normale ontwikkeling, gering is. De groote hoeveelheid kopersulfaat, die noodig is bij toediening aan de grond, moet worden toegeschreven aan de binding van koper aan de grond, waardoor de plantewortels het slechts onvolledig kunnen opnemen.

Tot eenzelfde conclusie leidde nog een derde proef, waarbij potten van 2,4 liter inhoud voor de eene helft met de zieke grond uit Nieuw Trimunt, voor de andere helft resp. met de weinig zieke grond uit Gasselternijveen en een gezonde tuingrond uit Wageningen gevuld werden. Vervolgens werd de scheidingswand voorzichtig weggenomen, zoodat de wortels gemakkelijk van de eene grond in de andere konden komen. Het bleek nu, dat de planten, die gedeeltelijk in de zieke grond en gedeeltelijk in de gezonde grond groeiden, volmaakt gezond waren terwijl die, welke in de zieke en de weinig zieke grond groeiden slechts zeer geringe ziekteverschijnselen vertoonden (tabel 14). Dat wil dus zeggen, dat de kleine hoeveelheid koper, die de wortels uit de weinig zieke grond kunnen opnemen, bijna voldoende is om gezonde planten te leveren, niettegenstaande het feit, dat de helft der wortels in zwaar zieke grond groeit.

Tabel 14

Grondsoort	Korrel	Stroo	Grondsoort	Korrel	Stroo
Nieuw Trimunt	0	3,66	Gasselternijveen	10,04	10,32
Nieuw Trimunt + Cu	8,70	11,01	Gasselternijev. + Cu	10,94	10,49
$\frac{1}{2}$ N.T. $\frac{1}{2}$ tuingrond	11,64	10,99	Tuingrond	9,79	9,84
$\frac{1}{2}$ N.T. $\frac{1}{2}$ Gasselternijveen	5,90	10,14			

HOOFDSTUK III

ONDERZOEK NAAR HET GEHALTE AAN OPNEEMBAAR KOPER IN ZIEKE RESP. GEZONDE GROND

§ 1. *Inleiding*

Wanneer een tekort aan opneembaar koper de oorzaak van de ontginningsziekte is, dan mag men verwachten, dat planten, die deze ziekte vertoonen, een lager kopergehalte bezitten dan gezonde; verder, dat er een verband is te constateeren tusschen het gehalte aan opneembaar koper van de grond en de graad, waarin de ziekteverschijnselen zich voordoen.

De bepaling van het kopergehalte van plantenmateriaal is, afgezien van enkele technische moeilijkheden, betrekkelijk eenvoudig. Hetzelfde kan gezegd worden van de bepaling van de totale hoeveelheid koper in grond. Het ligt echter voor de hand, dat men aan deze laatste waarde betrekkelijk weinig heeft, daar het zeer goed denkbaar is, dat bij een relatief hoog totaal-gehalte, het voor de planten opneembare gedeelte zeer gering is. De op het einde van het vorige hoofdstuk beschreven proeven wijzen reeds in deze richting.

Ofschoon het denkbaar is, dat door extraheeren met geschikte oplosmiddelen een verschil aangetoond zou kunnen worden tusschen moeilijk en gemakkelijk opneembaar koper, kan deze mogelijkheid buiten bespreking blijven, daar een onderzoek in deze richting niet is ingesteld. Er kan slechts op worden gewezen, dat in het waterig extract van een zieke, noch in dat van een gezonde humeuze zandgrond koper aangetoond kon worden. ¹⁾ Er is daarom naar een andere methode gezocht om het voor de plant opneembare koper te bepalen.

¹⁾ Door 50 g grond gedurende zes uur te schudden met 500 cc gedestilleerd water en daarna te filtreren, konden ARND en HOFFMANN (4) een betrekkelijk groot deel van het in verschillende gronden aanwezige koper uitwasschen. Het gelukte hun echter niet op deze manier een verband aan te geven tusschen vóórkomen van ontginningsziekte en hoeveelheid uitwaschbaar koper.

§ 2. Onderzoek met behulp van de methode Neubauer

a. Werkwijze.

Aanvankelijk werden eenige bepalingen verricht met een methode berustend op het principe van NEUBAUER (51). Met deze methode bepaalt men het opneembare kalium resp. phosphorzuur in grond, door honderd rogge-kiemplanten te laten groeien in een kleine hoeveelheid van deze grond. Na verloop van 17 dagen worden deze planten geoogst en geanalyseerd op K en P. Het gevonden bedrag, verminderd met de hoeveelheid K en P, dat in het zaaizaad aanwezig is, geeft dan de hoeveelheid voor de planten opneembare kali en phosphorzuur. Ofschoon deze methode in het algemeen bevredigende overeenstemming geeft met veldproeven, zijn er toch ook vrij veel uitzonderingen. Deze zullen vermoedelijk een gevolg zijn van de min of meer onnatuurlijke wijze, waarop men de planten laat groeien, nl. 100 planten per 100 gram grond. Het is te verwachten, dat de zeer sterke doorworteling, die op deze manier wordt verkregen, een dusdanige koolzuurproductie veroorzaakt, dat ook moeilijk opneembare verbindingen kunnen worden opgenomen.

Om laatstgenoemd bezwaar zooveel mogelijk te voorkomen, nam ik 400 gram grond, waarin 25 tarwe- resp. haverplanten werden gekweekt. Deze werden geoogst op het moment, dat de eerste verschijnselen van ontginningsziekte zich vertoonden; dit was plm. zes weken na het zaaien van de haver en de tarwe. Vervolgens werd in deze planten het koper bepaald.

b. Bepaling van het kopergehalte in plantenmateriaal met behulp van natriumdiaethylthiocarbamaat.

Het luchtdroge materiaal wordt in een porceleinen bakje in een elektrische oven bij plm. 500° C verascht. Toediening van eenige druppels van een geconcentreerde oplossing van ammoniumnitraat bevordert de destructie. De asch wordt dan overgebracht in een kwartschaaltje en opgenomen in 1,5 cc geconcentreerd HNO₃ en 2 druppels geconcentreerd H₂SO₄, waarna op een electrisch verwarmde plaat wordt drooggedampt. Daarna voegt men 10 cc 5% H₂SO₄ toe, filtreert door een aschvrij filter en wast het filter met 5 cc 5% H₂SO₄. Het filtraat wordt opgevangen in een electrolysevat, waarin platinaelectroden aanwezig zijn, die eerst worden gegloeid, daarna in geconcentreerd HNO₃ gedompeld en tenslotte met gedestilleerd water worden afgespoeld. Vervolgens wordt bij een stroomdoorgang van

0,3 ampère gedurende $\frac{3}{4}$ uur geëlectrolyseerd. Gedurende de electrolyse houdt men met een zeer kleine vlam de vloeistof aan de kook: de hierdoor veroorzaakte beweging versnelt de electrolyse aanzienlijk (PREGL (56)), waardoor na $\frac{3}{4}$ uur al het koper op de kathode is neergeslagen. Vervolgens koelt men het electrolysevat met leidingwater zoo diep mogelijk, waarna bij gesloten stroom zwavelzuur wordt vervangen door gedestilleerd water. Dan neemt men de kathode uit het electrolysevat, lost het neergeslagen koper op in 1 cc heet 20% HNO_3 , waarna 14 cc gedestilleerd water en 5 cc van een oplossing van 0,2% natriumdiaethyldithiocarbamaat worden toegevoegd. Laatstgenoemde verbinding geeft met geringe hoeveelheden koper een gele kleur; de intensiteit hiervan is evenredig met de hoeveelheid koper, zoodat men dus op deze manier het koper colorimetrisch kan bepalen (BROEK (12)). Aanvankelijk werd deze bepaling in een colorimeter volgens JOBIN verricht. Het bezwaar hiervan was, dat zeer vaak een standaardoplossing moest worden gemaakt, omdat de gele kleur na verloop van tijd verandert. Daarom werden de latere bepalingen gedaan met een „Stufen-Photometer” volgens PULFRICH, waarmee men colorimetrische bepalingen kan doen, zonder dat telkens een vergelijkingsoplossing noodig is. Door nl. van een serie standaardoplossingen van opklimmende sterkte de stand van de trommel te bepalen, waarbij beide helften van het gezichtsveld even sterk verlicht zijn, kan men een grafiek samenstellen, die het verband aangeeft tusschen de hoeveelheid koper en de trommelaflezingen. Met behulp van deze grafiek kan men dan uit de stand van de trommel de onbekende hoeveelheid koper bepalen.

Om de nauwkeurigheid dezer methode te leeren kennen, speciaal met het oog op eventueele vervluchtiging van het koper tijdens de verassing, werd een zelfde hoeveelheid tarwemeel, waaraan resp. 0, 10 en 20 γ koper als kopersulfaat waren toegediend, verascht bij resp. 400, 500 en 550 à 600° C, waarna het koper werd bepaald. Hierbij werden de volgende uitkomsten verkregen:

	400°	500°	550-600°	
10 g tarwe	21 $\frac{1}{2}$	22	21	γ koper
10 g tarwe + 10 γ Cu	31	-	32 $\frac{1}{2}$	„ „
10 g tarwe + 20 γ Cu	42 $\frac{1}{2}$	-	42	„ „

c. Resultaten.

Het resultaat van de analyses is vermeld in tabel 15. In de tweede kolom vindt men de gezondheidstoestand van de grond, zooals die

in veld- en potproeven met verschillende graangewassen tot uiting is gekomen.

Tabel 15

Hoeveelheid koper in 25 haver- en tarweplanten, gedurende zes weken gegroeid in verschillende gronden

Herkomst van de grond	Gezondheids- toestand	Cu in γ in ¹⁾ de haver- planten	Cu in γ in ¹⁾ de tarwe- planten
Nieuw Trimunt 1	zeer ziek	13,-	8,5
N.Tr. 1 + CuSO ₄ n. 50 kg per ha	gezond	37,-	27,-
Nieuw Trimunt 2	meer ziek dan 1	7,-	-
N.Tr. 2 + CuSO ₄ n. 50 kg per ha	gezond	26,5	-
N.Tr. 2 gemengd met grof tuin- zand	gezond	29,5	28,-
Heino, proefboerderij	weinig ziek	17,-	9,5
Heino + 5 g CaCO ₃	iets meer ziek dan de vorige	11,-	8,-
Heino + CuSO ₄ n. 50 kg per ha	gezond	25,-	32,-
Gasselternijeven	weinig ziek	17,5	11,-
Gasselternijeven + 5 g CaCO ₃ .	weinig ziek	17,-	-
Gasselternijeven + CuSO ₄ n. 50 kg per ha	gezond	30,-	34,-
Gliede, Zeyerveld	zeer ziek	-	5,-
Gliede + CuSO ₄ n. 50 kg per ha.	gezond	-	37,-
Jipsinghuizen	zeer ziek	8,5	-
Kwartzand m. HNO ₃ behandeld	ziek	9,5	5,5
Kwartzand + 100 γ Cu	gezond	30,-	18,-
Kwartzand + 400 γ Cu	gezond	82,-	-

Zoals uit deze tabel blijkt, bestaat er een goede overeenstemming tusschen de hoeveelheid koper in de haver- en tarweplanten en de gezondheidstoestand van de grond: hoe zieker de grond, hoe lager het kopergehalte in de planten. Ook in deze richting is het onderzoek niet voortgezet, omdat een microbiologische methode werd uitgewerkt, waarmee men op een eenvoudiger en snellere manier het opneembare koper in grond kan bepalen.

§ 3. Onderzoek met behulp van een microbiologische methode

Deze methode berust op het feit, dat de schimmel *Aspergillus niger* voor een normale ontwikkeling kleine hoeveelheden koper noodig heeft. Kweekt men haar in een voedingsoplossing, die zorgvuldig van koper bevrijd is, dan is de myceliumontwikkeling slecht, terwijl sporen niet gevormd worden. Bij toevoeging van 0,2 γ koper op 40 cc

¹⁾ Gemiddelde waarden van twee of meer potten.

voedingsoplossing is de myceliumontwikkeling normaal, terwijl vele sporen gevormd worden, die nu echter niet zwart maar oranjegeel gekleurd zijn. Bij 0,4 γ koper worden meer sporen gevormd terwijl de kleur dezer sporen licht grijsbruin is, bij 1 γ is deze grijsbruin, bij 1,8 γ zwartbruin en bij 2½ γ zwart (zie plaat 1). Nadere bijzonderheden over het gedrag der schimmel tegenover koper zijn vermeld in hoofdstuk VI, waar een beschrijving wordt gegeven van de beteekenis van koper voor micro-organismen.

Het blijkt dus, dat de kleur der Aspergillussporen een maat is voor de hoeveelheid koper, die de schimmel ter beschikking heeft, m.a.w. men kan dit organisme gebruiken als reagens op de hoeveelheid assimileerbaar koper, die in de voedingsoplossing aanwezig is. Door aan de kopervrije voedingsoplossing een bepaalde hoeveelheid grond toe te voegen, is het mogelijk gebleken, de hoeveelheid opneembaar koper in de grond te bepalen. Men vergelijkt hiervoor de sporekleur met die van een standaardserie, waaraan koper in opklimmende hoeveelheden van 0-2½ γ is toegediend.

Voor de uitvoering van dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van een voedingsoplossing van de volgende samenstelling:

gedestilleerd H ₂ O	1000 cc
glucose	50 g
KNO ₃	5 g
K ₂ HPO ₄	2½ g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	1 g
FeCl ₃ .6 H ₂ O	50 mg
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	20 mg
MnSO ₄ .4 H ₂ O	3 mg

De gebruikte zouten zijn de meest zuivere preparaten, die in de handel verkrijgbaar zijn. Daar deze nog kleine hoeveelheden koper bevatten, wordt per liter voedingsoplossing, ½ cc van een oplossing van NH₄SH (Liquor Ammonii hydrosulfurati) en daarna ½% norit toegevoegd. Nadat plm. 5 minuten flink is geschud, wordt op een zuigfilter de kool afgescheiden. IJzer, zink en mangaan worden pas na deze behandeling toegediend om eventueele verliezen door adsorptie aan het norit te voorkomen. De zoo verkregen voedingsoplossing is niet geheel kopervrij. *) Ik heb ook niet getracht algeheele afwezigheid van koper te bereiken, omdat dit m.i. overbodig was. Het kwam er immers slechts op aan, een gemakkelijk reproduceerbare voedingsoplossing te krijgen, die voor de schimmel het uiterste van koperarmoede beteekende, dat met eenvoudige middelen bereikbaar was.

*) De witte mycelia, gegroeid in 40 cc oplossing, bevatten plm. 0,07 γ Cu.

Aan deze voorwaarden voldoet deze vloeistof: de schimmel geeft slechts een wit, steriel mycelium. Algeheele afwezigheid van koper zou de groei van het schimmelmycelium waarschijnlijk onmogelijk gemaakt hebben, zonder dat echter dit resultaat in evenredigheid zou staan tot de groote moeite, aan het verkrijgen van deze vloeistof be-
steed. Van deze voedingsoplossing brengt men dan 40 cc in Erlen-
meyerkolven van Jena-glas van 1 liter inhoud, waarna in een autoclaaf
gedurende 5 minuten op 105° C wordt verhit. Vervolgens wordt
1 gram van de te onderzoeken luchtdroge grond toegevoegd. Het ge-
bruik van vochtige grond is minder gunstig, omdat de hierin aan-
wezige micro-organismen de ontwikkeling van de *Aspergillus* on-
gunstig kunnen beïnvloeden. Met dit bezwaar heeft men niet te maken
bij droge grond, waarschijnlijk omdat dan het grootste deel der micro-
organismen afgestorven of in sporevorm aanwezig is.

Indien de grond zeer humushoudend is, verdient het de voorkeur,
het luchtdroge materiaal eerst met een geringe hoeveelheid van de
voedingsoplossing in de kolven te brengen en met het toevoegen van
de rest van de voedingsoplossing te wachten, totdat de grond goed
vochtig geworden is. Men voorkomt dan het boven drijven van de
humusdeeltjes.

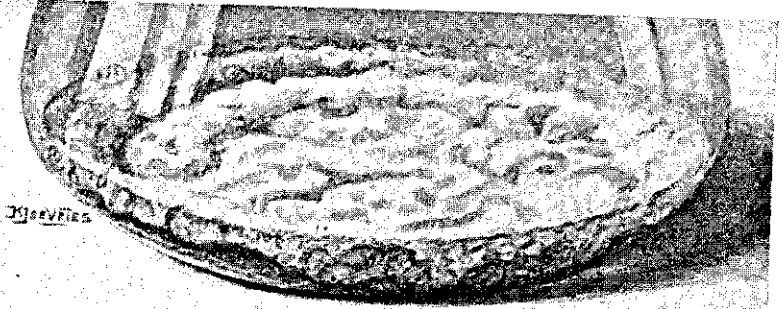
Vervolgens wordt geënt met een suspensie van de schimmelsporen
in kopervrij water of in de kopervrije voedingsoplossing. Daar deze
sporen kleine hoeveelheden koper kunnen bevatten, is het gewenscht,
aan alle kolven evenveel entmateriaal toe te dienen. Goede resultaten
verkrijgt men, wanneer voor 100 kolven het sporemateriaal van één
buis met schuingestolde moutagar wordt gebruikt. ¹⁾

Nadat de kolven geënt zijn, worden ze gedurende 4 à 5 dagen bij
een temperatuur van plm. 30° C geplaatst, waarna de sporen ge-
vormd zijn en de kleur met die van een standaardserie kan worden
vergeleken. Deze standaardserie heeft opklimmende hoeveelheden
koper ontvangen, nl. 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,3; 1,6; 2 en 2½ γ per
kolf. Daar de kleursverschillen tusschen de afzonderlijke trappen van
deze serie duidelijk waarneembaar zijn, kan de bepaling van de hoe-
veelheid voor de schimmel beschikbaar koper met een behoorlijke
nauwkeurigheid geschieden (zie de bijgaande gekleurde platen). Het
is van belang, dat het kopersulfaat aan deze standaardkolven wordt
toegediend, nadat de vloeistof gesteriliseerd is, omdat anders tijdens

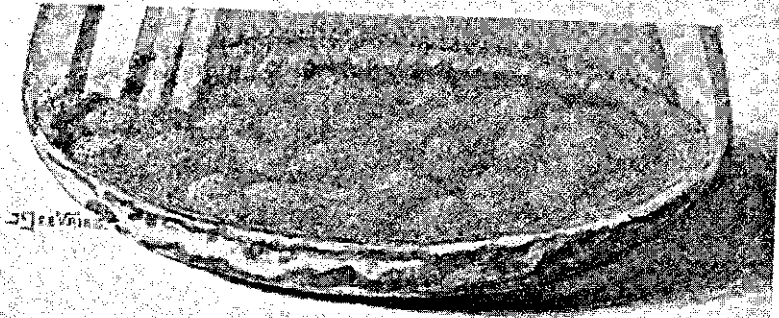
¹⁾ Gebruik van grijsbruine sporen, afkomstig van een koperarme voedings-
bodem, gaf het zelfde resultaat.

PLAAT I

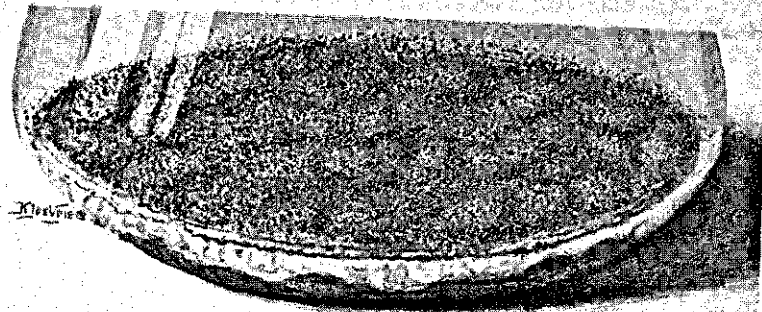
1



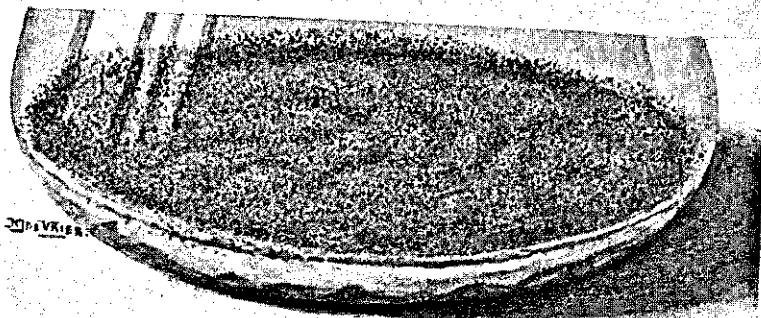
2



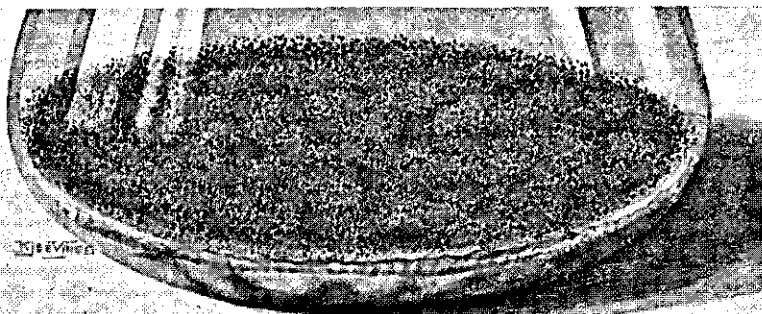
3



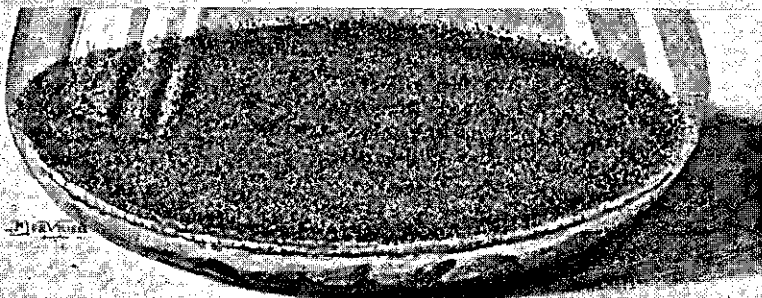
4



5



6



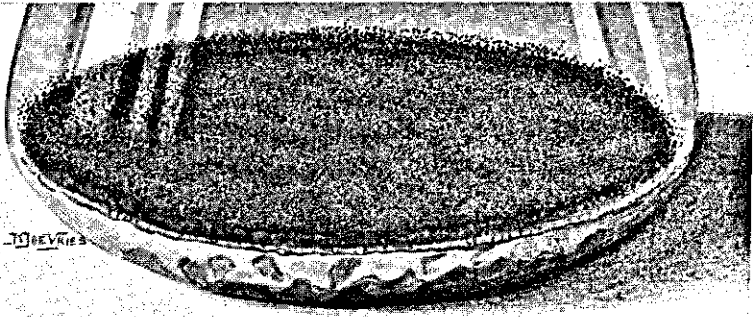
7



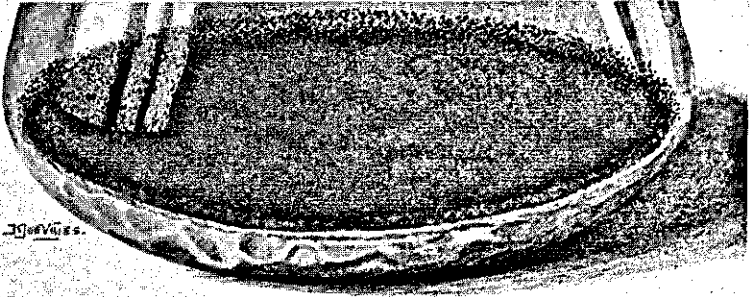
Aspergillus niger in een voedingsoplossing met opklimmende hoeveelheden koper (zie ook blz. 41)

- 1 = zonder toevoeging
- 2 = 0,1 γ koper per 40 cc
- 3 = 0,2 " " " 40 "
- 4 = 0,4 " " " 40 "

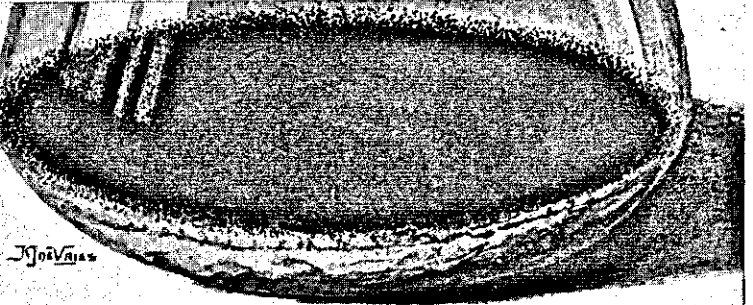
8



9



10



5	=	0,6	γ	кoper	per	40	cc
6	=	1	"	"	"	40	"
7	=	1,3	"	"	"	40	"
8	=	1,6	"	"	"	40	"
9	=	2	"	"	"	40	"
10	=	2,5	"	"	"	40	"

het steriliseeren een deel van het koper aan de glaswand geadsorbeerd wordt, wat onregelmatige kleurverdeelingen kan geven.

Deze methode kan alleen dan bruikbare resultaten geven, wanneer dezelfde sporekleur steeds wordt veroorzaakt door dezelfde hoeveelheid assimileerbaar koper en deze kleur, tenminste binnen zekere grenzen, niet wordt beïnvloed door aanwezigheid van andere elementen. Uit een uitgebreid onderzoek is gebleken, dat aan deze eischen wordt voldaan (zie hoofdstuk VI).

Bij toevoeging van grond is slechts een meer of minder groot gedeelte van het aanwezige koper voor de schimmel bruikbaar. De vraag is nu, of het door de schimmel opneembare koper ook het voor de planten bruikbare is en omgekeerd. Om deze vraag te kunnen beantwoorden werd van de gronden, die volgens de methode van NEUBAUER waren onderzocht, eveneens het door *Aspergillus niger* opneembare koper bepaald. Hierbij bleek, dat een goede overeenstemming bestond tusschen de met beide methoden verkregen resultaten. De zeer zieke gronden, die een laag gehalte aan voor de planten opneembaar koper hadden, gaven in de *Aspergillus*proef gele sporen, d.w.z., dat de hoeveelheid voor de schimmel opneembaar koper niet hoger was dan 0,2 γ per gram luchtdroge grond. De weinig zieke gronden met een hoger kopergehalte in de haver- en tarweplanten gaven grijsbruine sporen, wat overeenkomt met 1 γ voor *Aspergillus* bruikbaar koper. Bij de gezonde en met kopersulfaat genezen gronden, die een hoog gehalte aan door de planten bruikbaar koper hadden, was de kleur der *Aspergillus*sporen zwart, d.w.z., dat de schimmel uit die gronden minstens 2½ γ koper per gram kon opnemen.

De tot nu toe vermelde resultaten zijn alle verkregen met een stam M van *Aspergillus niger*, die in de verzameling van micro-organismen van het Laboratorium voor Microbiologie te Wageningen aanwezig was, terwijl ook de platen betrekking hebben op deze stam. Het was nu echter van belang na te gaan of andere stammen van de schimmel zich op dezelfde manier zouden gedragen. Hiervoor werd deze stam M vergeleken met de stammen NG, AG, Z en B, afkomstig van het Centraalbureau voor Schimmelcultures te Baarn.

Het bleek nu, dat de stammen NG en B, wanneer ze bij opklimmende hoeveelheden koper werden gekweekt, niet de kleurenschaal leverden, zooals die is afgebeeld op plaat 1. Wel bleef bij afwezigheid van koper sporevorming achterwege, doch de gele resp. bruine sporekleur, zooals die bij de andere drie stammen bij toediening van geringe hoeveelheden koper aanwezig is, ontbrak hier. Beide stammen

gaven dan groenachtig-grijze sporen, die bij verschillende koperconcentraties betrekkelijk weinig verschil in kleur vertoonden.

De stammen AG en Z gaven bij opklimmende koperconcentratie wel de afgebeelde kleurenschaal, zij het ook met geringe afwijkingen. Zoo vormde M zonder koper in het geheel geen sporen, terwijl bij AG en Z nog tamelijk veel gele sporen gevormd waren. In tegenstelling hiermee was bij aanwezigheid van 0,2; 0,4 en 0,6 γ koper per cultuur M iets donkerder dan AG en Z. Deze verschillen waren echter gering en bij grotere hoeveelheden koper niet meer aanwezig.

Een drietal gronden, nl. een zeer zieke, een weinig zieke en een gezonde, werd met behulp van deze vijf *Aspergillus*-stammen op opneembaar koper onderzocht. Hierbij bleek, dat met alle stammen duidelijk het verschil in kopergehalte van de drie gronden was waar te nemen. Bij NG en B waren de verschillen minder duidelijk dan bij de andere drie, door het ontbreken van de gele tint bij weinig koper. AG, Z en M gaven resultaten, die goed met elkaar overeenstemden. Met dezelfde grond was de sporekleur van AG telkens iets lichter dan die van M. Dit was vooral het geval met culturen ouder dan vijf dagen. Stam M werd toen donkerder terwijl AG en ook Z weinig veranderden. Daar hierbij gedacht werd aan verandering in de zuurgraad van de voedingsoplossing, werden na 5 en 6 dagen van de voedingsoplossingen de pH-waarden bepaald. De volgende tabel geeft de resultaten.

Tabel 16

*pH-cijfers in voedingsoplossingen met grond,
geënt met verschillende Aspergillusstammen resp. na 5 en 6 dagen*

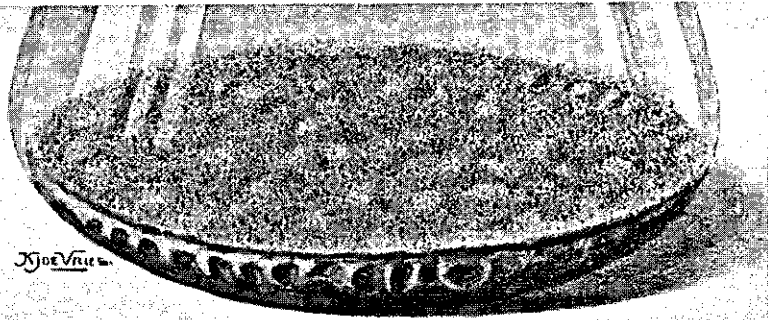
Grond	M		AG		NG		B		Z	
	5 d.	6 d.	5 d.	6 d.	5 d.	6 d.	5 d.	6 d.	5 d.	6 d.
Zeer ziek . .	6,7	8,4	7,6	8,7	3,9	4,5	3,8	5,4	7,5	8,6
Weinig ziek .	6,5	7,5	7,5	8,1	3,8	4,0	5,1	6,8	7,5	8,6
Gezond . . .	7,1	8,4	7,1	8,6	4,0	4,3	4,6	4,9	7,3	8,3

Uit deze cijfers volgt, dat NG en B de voedingsoplossing belangrijk meer verzuren dan de andere drie. Verder geeft M iets lagere pH-waarden dan AG en Z. Ofschoon dit punt niet verder onderzocht is, is het zeer wel mogelijk, dat de lichtere sporekleur, die bij Z en AG gevonden wordt, in verband staat met de lagere zuurgraad, waardoor de oplosbaarheid van het koper geringer is.

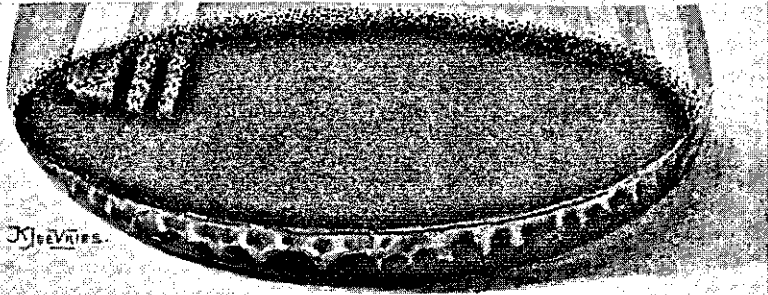
Dat de pH bij de opneembaarheid van koper uit de grond inderdaad van belang is, bleek wel hieruit, dat bij toevoeging van CaCO_3

PLAAT II

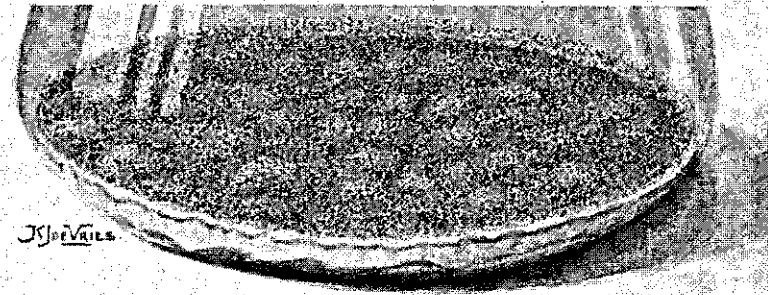
11



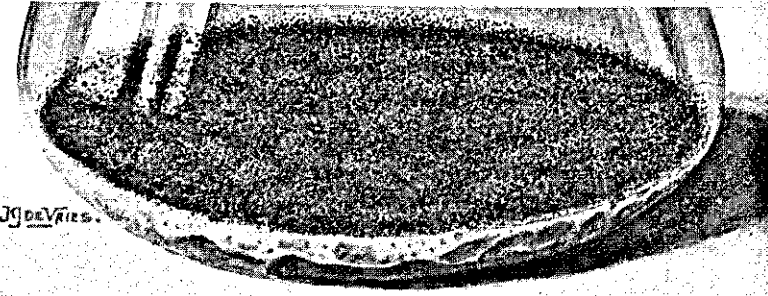
12



13



14



Aspergillus niger in van koper gezuiverde voedingsoplossing, waaraan is toegevoegd: 1 g zeer zieke grond (11), 1 g gezonde grond (12), asch van $\frac{1}{2}$ g zieke tarwe (13), asch van $\frac{1}{2}$ g gezonde tarwe (14). (Zie blz. 45).

aan de grond de sporekleur van *Aspergillus* lichter was. Dit was een gevolg van de minder lage pH van de voedingsoplossing en niet van een calciumwerking, zooals bleek toen bij toediening van CaSO_4 de sporen niet lichter waren.

Uit het hier verkregen resultaat blijkt, dat men voor de microbiologische koperbepaling niet gebonden is aan het gebruik van één bepaalde stam van *Aspergillus niger*. Daar afwijkingen echter kunnen voorkomen, is het raadzaam voor elke te gebruiken stam eerst een standaard met opklimmende hoeveelheden koper vast te stellen.

In het nu te bespreken grondonderzoek werd eerst een vijftal gronden onderzocht ¹⁾, waarvan bijzonderheden door cultuurproeven in 1935 bekend waren. Deze gronden waren de volgende:

- a. de vroeger vermelde humeuze zandgrond uit Nieuw Trimunt, zwaar ontginningsziek (zie tabel 5 en 6).
- b. loodzand uit Rolde, eveneens zeer duidelijk reagerend op een bemesting met kopersulfaat (zie tabel 8).
- c. de eerder genoemde zandgrond van de proefboerderij te Heino. Geeft bij granen in geringe mate de verschijnselen van ontginningsziekte (vergelijk tabel 11).
- d. een dalgrond uit Sappemeer. Reageert niet op een koperbemesting.
- e. een zandgrond uit de proeftuin van het Laboratorium voor Microbiologie te Wageningen. Reageert evenmin als de vorige grond op een koperbemesting.

Het resultaat van deze proef was het volgende: de gronden *d* en *e* leverden mycelia met geheel zwarte sporen; *c* gaf bruine sporen, *b* geelbruine en *a* gele. Was echter aan *a*, *b* en *c*, elk 5 γ koper toegevoegd, dan was de kleur bij alle zwart. We zien dus, dat er een duidelijk verband bestaat tusschen de mate, waarin de ziekteverschijnselen voorkomen en het opneembare kopergehalte, tot uiting komend in de kleur der *Aspergillus*sporen.

Het onderzoek werd voortgezet met 14 gronden, meerendeels bekend wat hun reageren op een koperbemesting betreft. In deze serie zijn ter contrôle ook weer de gronden uit de eerste proef opgenomen.

Het resultaat van deze proef is vermeld in tabel 17. In deze tabel is, evenals in tabel 18 en 19, de kleur van de schimmelsporen vermeld en niet de hoeveelheid koper, waarmee deze correspondeert.

Ook hier is de overeenstemming weer zeer goed te noemen; gronden, die symptomen van ontginningsziekte vertoonen, geven gele

¹⁾ De bepalingen met de *Aspergillus*-methode zijn steeds in twee- of drievoud verricht.

Tabel 17

Resultaat van het *Aspergillus*onderzoek van een 14-tal zand- en veengronden

Herkomst van de grond	Gezondheids- toestand	Sporekleur
Proefveld Nieuw Trimunt	zeer ziek	geel
Proefveld Jipsinghuizen	zeer ziek	geel
Loodzand Rolde	zeer ziek	geel
Proefboerderij Heino	weinig ziek	grijsbruin
Proefveld Gasselternijveen	weinig ziek	grijsbruin
Koper-perceel Nieuw Trimunt	gezond	zwart
Twello ¹⁾	ziek (?)	geel
Diepenveen ¹⁾	ziek (?)	bruinzwart
Sappemeer	gezond	zwart
Westerlee 1	gezond	zwart
Westerlee 2	gezond	zwart
Westerlee 3	zeer zwak ziek	zwart
Westerlee 4	gezond	zwart
Tuin Lab. Microbiologie	gezond	zwart

¹⁾ Monsters van het landbouwconsulentschap te Hengelo.

of bruine sporen; die, welke gezond zijn hebben voldoende koper om de sporen zwart te doen kleuren; wordt aan de kolven met zieke grond 5 γ koper toegediend, dan worden ook hier de zwarte sporen gevormd. Alleen grond 3 uit Westerlee wijkt eenigszins af. Het is een veengrond, die bij de bewerking in 1934 met kopersulfaat is bemest, maar niettegenstaande dit vertoonde de tarwe in 1935 en 1936 nog zwakke symptomen van ontginningsziekte.

De derde serie omvatte een aantal gronden uit de buurt van Ommen, gedeeltelijk afkomstig van bouwlanden lijdende aan ontginningsziekte, gedeeltelijk van graslanden, waarin het vee bepaalde ziekteverschijnselen, bekend als likzucht, kreeg. Door de onderzoekingen van SJOLLEMA (69, 70 en 71) en medewerkers is gebleken, dat in weiden, gelegen in streken, waar verschijnselen van ontginningsziekte bij graangewassen voorkomen, het vee vaak lijdt aan deze likzucht. Het gelukte SJOLLEMA, de zieke dieren te genezen door geringe doses kopersulfaat. Naar aanleiding van dit resultaat en verder ook van verrichte koperanalyses in hooi van goede en „likzucht“-weiden, sprak SJOLLEMA het vermoeden uit, dat een te laag kopergehalte in het geconsumeerde voer de oorzaak van de likzucht zou zijn.

Daar van deze gronden niet bekend was, of ze ontginningsziek waren, daar ze altijd als grasland waren gebruikt, waaraan de ziekteverschijnselen niet of moeilijk zijn waar te nemen, was het dus noodzakelijk potproeven te doen. Hiervoor werden de gronden gebracht in

cylinderglazen volgens NEUBAUER en bemest met NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ en KCl . Van iedere grond werden vier potten aangezet: twee zonder en twee met 20 mg kopersulfaat per pot, die bezaaid werden met kanariezaad. Deze plant is zeer geschikt als indicator van ontginningsziekte en heeft verder het voordeel, weinig massa te vormen, waardoor ze gemakkelijk in kleine cultuurschalen te kweken is. Behalve die uit Ommen zijn weer een aantal bekende gronden in deze serie opgenomen. De resultaten van deze proef zijn in tabel 18 vermeld.

Tabel 18

Vergelijking van de groei van kanariezaad met de uitkomsten van de schimmelproef

Herkomst van de grond	Bijzonderheden.	Gezondheids- toestand kanariezaad	Opbrengst kanariezaad zonder Cu	Opbrengst kanarie- zaad met Cu	Sporekleur bij Aspergillusproef
Ommen 1	grasl. (likzucht)	zeer ziek	0,93	4,10	geelbruin
" 2	" "	zeer ziek	0,15	2,13	geel
" 3	" "	matig ziek	2,47	3,30	lichtbruin
" 4	" "	ziek	2,88	4,96	geel
" 5	" "	zeer ziek	1,06	4,04	geel
" 6	" "	zeer ziek	1,48	4,44	geelbruin
" 7	bouwland, zeer zieke haver	zeer ziek	1,13	3,54	geel
" 8	grasl. (likzucht)	ziek	2,72	5,14	lichtbruin
" 9	" "	matig ziek	3,57	4,82	lichtbruin
" 10	" "	ziek	2,86	5,23	grijsbruin
" 11	" "	ziek	2,10	6,00	lichtbruin
Nieuw Trimunt 1. . .	zeer ziek	zeer ziek	0,40	3,94	geelbruin
Nieuw Trimunt 2. . .	zeer ziek	zeer ziek	0,26	3,67	geelbruin
Sappemeer	gezond	gezond	4,56	4,23	zwart
Westerlee 1.	gezond	gezond	5,21	5,14	zwart
Westerlee 3.	tarwe weinig ziek	gezond	2,49	2,30	zwart
Tuin Lab. Microb. . .	gezond	gezond	1,96	2,21	zwart
Gasselternijeveen . .	weinig ziek	matig ziek	3,06	3,72	grijsbruin
Heino	weinig ziek	ziek	1,23	2,70	grijsbruin

Zoals uit deze tabel blijkt, hebben alle gronden uit Ommen ontginningsziekte in kanariezaad gegeven. In overeenstemming daarmee hebben ook de schimmelculturen in geen dezer gevallen zwarte sporen gevormd. Dit komt dus goed overeen met de opvatting van SJOLLEMA, dat likzucht-weiden arm aan opneembare koperverbindingen zijn. Verder vormen deze gegevens een bewijs hiervoor, dat er nog uitgestrekte streken zijn, waar een bemesting van het grasland met kopersulfaat voordeelen zal afwerpen.

Tabel 19 geeft het resultaat van een proef met een aantal gronden

uit Drenthe, Twenthe en Noord-Brabant, waarbij er op gelet is, dat naast zieke gronden ook een aantal gezonde in het onderzoek is betrokken. Voor dit doel werden een zestal monsters van oude cultuurgronden op de Hondsrug genomen, gronden die volgens Prof. J. ELEMA geen ontginningsziekte in haver en rogge vertoonen.

Tabel 19

Verband tusschen het voorkomen van ontginningsziekte en de hoeveelheid voor *Aspergillus* beschikbaar koper, tot uiting komende in de kleur der sporen

Herkomst van de grond	Gezondheidstoestand	Kleur van de schimmelsporen
St. Anthonis (N.Br.) . . .	tarwe zeer ziek, witte haver matig ziek	lichtbruin
Buurse 1	zeer zieke rogge	lichtgeel, sporeaantal duidelijk gereduceerd
Buurse 2	zelfde perceel als 1, hier goede rogge	geel met bruine plekjes
Buurse 3	zwarte haver duid. ziek	geel
Buurse 4	zwarte haver duid. ziek	geel
Twekkelo	zwarte haver ziek	geel
Langelo (O.)	rogge zwak ziek	geel
Langelo 1, zieke plek . .	witte haver ziek	lichtbruin
Langelo 2, goede plek . .	witte haver gezond	zwart
Boxtel, Proefboerderij . .	zieke tarwe	geel
Boxtel, Proefboerderij . .	gezonde tarwe	zwart met een weinig bruin
Drouwen 1	monsters van oude hu- mushoudende zand- gronden, die volgens ELEMA gezonde haver leveren	zwart
Drouwen 2		zwart
Drouwen 3		zwart
Drouwen 4		zwart
Gieten		zwart
Borger		zwart met weinig zwart-bruin vermengd

Zoals uit de resultaten blijkt, bestaat er weer een goede overeenstemming tusschen de graad, waarin de ziekteverschijnselen zich in het gewas voordoen en de sporekleur van *Aspergillus niger*, d.w.z. de hoeveelheid door de schimmel opneembaar koper.

Dit gedeelte van het onderzoek werd besloten met het *Aspergillus*-onderzoek van 35 zieke en gezonde gronden uit alle deelen van het land. Daar inmiddels gebleken was, dat de sporekleur zeer gemakkelijk te vervangen was door een cijfer, aangevende het aantal gamma's koper, dat noodig is om de bewuste kleur te verkrijgen, wordt in de volgende tabel in plaats van de kleur der sporen, de hoeveelheid

opneembaar koper vermeld, die in 1 gram van de luchtdroge grond aanwezig is.

Tabel 20

Herkomst van de grond	Gezondheidstoestand van het gewas	Opneembaar Cu in γ per gram luchtdroge grond
Appelscha	gezonde wintertarwe	>2,5
Apeldoorn	gezonde witte haver	>2,5
Frederiksoord	gezonde witte haver	2-2,5
Otterloo	gezonde witte haver	1,5
Oosterbeek	gezonde witte haver	>2,5
Harskamp	zeer zieke witte haver	0,2
Heino	weinig zieke witte haver	1,1
Veluwe	gezonde witte haver	>2,5
Borger	gezonde witte haver	2,0
Wolfheze	zieke witte haver	0,3
Emmercompascuum 1 . .	tarwe zeer ziek	0,2
Emmercompascuum 2 . .	kleine plek waar de tarwe gezond is	2-2,5
Emmercompascuum 3 . .	tarwe zeer ziek, rogge gezond	0,2
Wageningsche Berg (proefveld I. v. P.)	gezond kanariezaad	>2,5
Wageningen (proeftuin Plantenz.k. Dienst) . .	gezonde tarwe	>2,5
Nieuw Compagnie	gezonde tarwe	>2,5
Ekelden a ¹⁾	haver zeer ziek	0,3
Ekelden b	overgangsplek	0,3
Ekelden c	haver gezond	0,3 (?)
Gieten	gezonde tarwe	>2,5
Kiel	gezonde tarwe	>2,5
Bennekom	gezonde witte haver	1,8
Tuin Lab. Microbiologie:		
zuur vak	gezond kanariezaad	>2,5
alkalisch vak	gezond kanariezaad	>2,5
zuur veenvak	gezond kanariezaad	1,8
Aalten ¹⁾	zieke haver	0,4
Renkum	slechte haver, geen typische ziekteverschijnselen	0,3
Zuidlaren	gezonde witte haver	2-2,5
Assen	gezonde witte haver	1,3
Zeyerveld, gliede	haver zeer ziek	0,1
N. Trimunt, onbehandeld:		
perceel a	gedeelte, waar de witte haver zeer ziek was	0,25
perceel b	gedeelte, waar de witte haver matig ziek was	0,8
perceel c	gedeelte, waar de witte haver gezond was	1,7
N. Trimunt, in 1924 met CuSO ₄ behandeld . .	gezonde witte haver	>2,5

¹⁾ Monsters ingezonden door het landbouwconsulentschap te Zutphen.

Deze uitkomsten demonstreeren weer duidelijk het lage gehalte aan voor *Aspergillus* opneembaar koper van ontginningszieke grond. Bij zeer zieke gronden is het zelden hooger dan 0,3 γ per gram. Gezonde gronden hebben bijna steeds meer dan 2 γ . Men moet er bij de beoordeeling dezer tabellen aan denken, dat tarwe en kanariezaad de hoogste eischen stellen aan de kopervoeding, gerst en haver iets lagere, terwijl rogge alleen op gronden met een zeer laag gehalte aan opneembaar koper ziekteverschijnselen vertoont.

Uit de in deze paragraaf verkregen resultaten blijkt, dat een goede overeenstemming bestaat tusschen de uitkomsten van de schimmelproef, d.w.z., de hoeveelheid opneembaar koper en de gezondheidstoestand van de graangewassen, die op de betreffende gronden groeien. Hiermee is dus voldaan aan één van de in het begin van dit hoofdstuk gestelde eischen.

§ 4. *Onderzoek naar het kopergehalte van planten, gegroeid op zieke resp. gezonde grond*

Wanneer de ontginningsziekte een gevolg is van onvoldoende kopervoorziening van de planten, kan men verwachten, dat planten, die deze ziekteverschijnselen vertoonen een lager kopergehalte bezitten dan die, welke gezond zijn. Men moet er hierbij echter aan denken, dat dit verschil in kopergehalte alleen dan aanwezig behoeft te zijn, wanneer plantenmateriaal wordt vergeleken, dat zoo veel mogelijk gelijkwaardig is. Vaak wordt in soortgelijke onderzoeken als deze het gehalte in de droge stof vermeld, zonder dat wordt opgegeven in welke organen en op welk tijdstip van ontwikkeling men de bepalingen heeft verricht. Men kan zich voorstellen, dat een ontginningsziek gewas op het moment van ziek worden een lager kopergehalte per droge-stof-eenheid bezit dan het gezonde, maar dat eenige maanden later, wanneer het gezonde gewas korrels heeft gevormd en het zieke loos is gebleven, deze verschillen verdwenen zijn. Dit zal vooral dan het geval zijn, wanneer men stroocijfers vergelijkt. Immers het is zeer goed denkbaar, dat bij de korrelvorming een deel van het aanvankelijk in de stengel en de bladen aanwezige koper naar de korrels wordt getransporteerd.

De bepaling van het kopergehalte in plantenmateriaal werd uitgevoerd op de manier, zooals die in het begin van dit hoofdstuk is beschreven. Verder is ook met de *Aspergillus*methode een aantal bepalingen verricht. Als uitgangsmateriaal wordt nu $\frac{1}{2}$ gram ge-

nomen, die in een elektrische oven wordt verascht, waarna de asch met een glazen staafje voorzichtig wordt fijngemaakt en toegevoegd aan de kolven met gesteriliseerde voedingsoplossing. De verdere behandeling is dan gelijk aan die van het grondonderzoek. Voor een gelijkmatige verdeling van de asch in de voedingsoplossing is het gewenscht de twee dagen oude schimmelcultuur eenige keeren voorzichtig om te schudden.

Zooals uit tabel 25 blijkt, is de overeenstemming tusschen de resultaten van de chemische en van de schimmelmethode bevredigend. Laatstgenoemde methode geeft over het algemeen iets lagere waarden.

Alvorens nu het kopergehalte in volwassen materiaal te vermelden, wil ik nog eens de aandacht vestigen op de resultaten van de potproef volgens NEUBAUER, die in het begin van dit hoofdstuk zijn vermeld. We hebben daar gezien, dat bij de zeer zieke gronden uit Nieuw Trimunt en Jipsinghuizen de hoeveelheid koper, die door haver en tarwe kan worden opgenomen, gering is. Bij de weinig zieke grond uit Gasselternijveen en Heino is de hoeveelheid opgenomen koper duidelijk hooger, terwijl het bij de gronden, die door kopersulfaat of door menging met andere grond gezond zijn gemaakt, nog weer duidelijk hooger is. Rekenen we nu de in tabel 15 voor haver gevonden waarden om in mg koper per kg droge stof, dan komen we tot de volgende cijfers.

Tabel 21

Kopergehalte in mg per kg droge stof in vijf weken oude haverplanten, gegroeid in verschillende gronden

Herkomst van de grond	Gezondheids- toestand	Cu in mg/kg
Nieuw Trimunt	zeer ziek	1,9
Nieuw Trimunt	iets minder ziek	3,5
Nieuw Trimunt + Cu	gezond	8,1
Jipsinghuizen	zeer ziek	2,4
Gasselternijveen	weinig ziek	5,0
Gasselternijveen + Cu	gezond	8,5
Heino	weinig ziek	5,7
Heino + Cu	gezond	8,0

Er zij op gewezen, dat de planten in deze proef zijn geoogst op het moment, dat bij de meest zieke grond de ziekteverschijnselen juist zichtbaar waren. Wanneer we nu deze waarden vergelijken met die, welke bij rijpe planten zijn verkregen, dan blijkt, dat ze tamelijk hoog

zijn. Dit wijst er op, dat de opneming van koper, evenals die van de andere aschbestanddeelen, vooral in het begin van de groei plaats vindt.

Voor gezonde planten, gedeeltelijk gegroeid op kleigrond, gedeeltelijk op gezonde dalgrond, werd het volgende kopergehalte in het zaad gevonden:

Tabel 22

Kopergehalte in mg per kg droge stof in het zaad van gezonde planten

Plantensoort	Grondsoort waarop gegroeid	Methode waarmee Cu is bepaald	Cu in mg per kg droge stof
Julianatarwe	Dollardklei	carbaminaat	6,0
Trifoliumtarwe	Dollardklei	carbaminaat	4,7
Providence tarwe	Zeeuwsche klei	Aspergillus	2,4
Imperiaal IIa tarwe	Zeeuwsche klei	Aspergillus	2,8
Trifolium tarwe	Zeeuwsche klei	Aspergillus	2,5
Julianatarwe	Zeeuwsche klei	Aspergillus	2,5
Winterrogge	Dalgrond	carbaminaat	3,4
Van Hoek zomertarwe	Dalgrond	carbaminaat	2,0
Goudgerst	Dalgrond	carbaminaat	1,7

Een aantal der in tabel 22 vermelde graansoorten is uitgezaaid in potten, gevuld met plm. 2 kg weinig zieke grond uit Gasselternijeven en Heino, en op een dalgrond in Sappemeer. Tabel 23 geeft de bijzonderheden over deze proef en het gehalte aan koper in het zaad.

Uit deze cijfers blijkt allereerst, dat tarwe gegroeid op Dollardklei een betrekkelijk hoog kopergehalte in het zaad bezit. Dezelfde tarwe-soorten afkomstig van de Zeeuwsche klei bevatten belangrijk minder koper. Opvallend is verder het lage gehalte bij planten, die de verschijnselen van de ontginningsziekte in lichte graad vertoonen. We zien, dat het in bovenstaande proef steeds lager is dan 1 mg koper per kg droge stof. Bemesting met kopersulfaat heeft, zooals in het vorige hoofdstuk is gebleken, een duidelijke verhooging in zaad-opbrengst gegeven, terwijl zooals uit bovenstaande cijfers blijkt het kopergehalte in het zaad eveneens belangrijk gestegen is.

Van belang is tenslotte nog het verschil tusschen pot- en veldproeven. Ofschoon in laatstgenoemde proef hoeveelheden van 300 kg CuSO_4 per ha zijn gegeven, is het kopergehalte in het zaad slechts weinig gestegen. Ongetwijfeld is dit een gevolg van de sterke binding van het koper door de humushoudende grond, waardoor bij het toe-

Tabel 23

Kopergehalte in mg per kg droge stof in het zaad van planten, die lichte verschijningsvormen van ontginningsziekte vertoont en van die, welke met CuSO_4 zijn genezen

Plantensoort	Grondsoort	Behandeling	Gezondheids- toestand	Methode waarmee Cu is bepaald	Cu in mg/kg
Van Hoek zomertarwe	zandgrond Heino	-	weinig ziek	Aspergillus	0,9
"	"	5 g CaCO_3 per pot	weinig ziek	"	0,9
"	"	50 mg CuSO_4 per pot met grond gemengd	gezond	"	3,0
"	"	50 mg CuSO_4 + 5 g CaCO_3	gezond	"	2,9
"	"	100 mg CuSO_4 per pot met grond gemengd	gezond	"	4,1
"	"	-	weinig ziek	"	0,7
"	"	5 g CaCO_3 per pot	weinig ziek	"	0,8
"	"	50 mg CuSO_4 per pot met grond gemengd	weinig ziek	"	
"	"	50 mg CuSO_4 per pot met grond gemengd	gezond	"	1,3
"	"	50 mg CuSO_4 per pot met grond gemengd	gezond	"	1,8
Trifolium wintertarwe	zandgrond N. Trim.	-	zeer weinig ziek	Carbaminaat	0,92
"	"	-	gezond	"	1,20
"	"	50 kg CuSO_4 per ha op de grond gestrooid	"	"	1,30
"	"	100 kg CuSO_4 per ha op de grond gestrooid	"	"	1,55
"	"	200 kg CuSO_4 per ha op de grond gestrooid	"	"	1,50
"	"	300 kg CuSO_4 per ha op de grond gestrooid	"	"	1,75
"	"	200 kg CuSO_4 1 jaar van te voren gestrooid	"	"	2,10
Providence wintertarwe	dalgrond Gass.n.veen	onbehandeld	weinig ziek	Aspergillus	0,7
"	"	100 mg CuSO_4 per pot	gezond	"	2,9
Imperiaal Ila wintertarwe	"	onbehandeld	weinig ziek	"	0,7
"	"	100 mg CuSO_4 per pot	gezond	"	2,9
Trifolium wintertarwe	"	onbehandeld	weinig ziek	"	0,8
"	"	100 mg CuSO_4 per pot	gezond	"	2,8

dienen van kopersulfaat als overbemesting, zooals bij de veldproef is geschied, slechts zeer weinig van dit zout de wortels bereiken kan. Mengt men het kopersulfaat door de grond, zooals bij de potproeven is gedaan en tot op zekere hoogte ook is geschied daar, waar het kopersulfaat een jaar vóór het zaaien van de tarwe was toegediend, dan is het kopergehalte duidelijk hooger.

In de volgende tabel is het kopergehalte vermeld van de winter-tarwes Providence en Imperiaal IIa, afkomstig van een proefveld op dalgrond in Westerlee. Hoewel aanvankelijk de tarwe ook zonder toediening van kopersulfaat goed groeide, bleek aan het eind van de groei, dat alleen daar, waar met kopersulfaat was bemest, goede korrels gevormd waren. 200 kg van dit zout per ha gaf nog een beter resultaat dan 100 kg.

Verder is vermeld het kopergehalte in het zaad van Trifolium wintertarwe, gegroeid op een vroeger proefveld van Prof. J. ELEMA te Gasselternijveen. Ook op dit proefveld was op de onbehandelde perceelen de korrelvorming slecht, terwijl groote hoeveelheden koper-sulfaat noodig waren om een goed gewas te verkrijgen.

Tabel 24

Kopergehalte in mg per kg droge stof van tarwekorrels, gegroeid op zwak ontginnings-zieke grond te Gasselternijveen en Westerlee

Grondsoort	Tarwe-variëteit	Behandeling	Gezondheidstoestand	Cu in mg. per kg. dr. stof
Dalgrond Westerlee	Imperiaal IIa	-	slechte korrelvorming	0,6
" "	" "	100 kg CuSO ₄	monster met slechte korrelvorming	0,6
" "	" "	100 kg CuSO ₄	monster met goede korrelvorming	0,9
" "	" "	200 kg CuSO ₄	gezond gewas	1,4
" "	Providence	onbehandeld	slechte korrelvorming	0,6
" Gass.n.veen	Trifolium	onbehandeld	vrij slechte korrelvorming	0,7
" "	"	V.A.M.-compost (50 ton per ha)	vrij goede korrelvorming	1,0
" "	"	200 kg CuSO ₄ in 2 jaar	goede korrelvorming	1,1
" "	"	200 kg CuSO ₄	goede korrelvorming	0,9
" "	"	300 kg CuSO ₄	goede korrelvorming	1,5

Evenals in de voorgaande tabellen zien we ook nu weer bij tarwe, die lichte verschijnselen van ontginningsziekte vertoont, een kopergehalte in het zaad, dat lager is dan 1 mg Cu per kg droge stof. Om

een hooger gehalte te krijgen, wat voor een goede groei blijkbaar noodzakelijk is, moeten op deze humushoudende gronden groote hoeveelheden kopersulfaat worden gegeven.

In tabel 25 zijn tenslotte nog de resultaten verzameld van een aantal koperbepalingen in verschillende plantensoorten, afkomstig van verschillende gronden. Een aantal dezer bepalingen is behalve met de carbaminaat-methode ook met de Aspergillus-methode verricht, zoodat vergelijking van beide methoden mogelijk is.

Uit deze cijfers blijkt, dat evenals tarwe, ook haver met verschijnselen van ontginningsziekte zaad levert met een laag kopergehalte. Van belang is verder, dat rogge, die op zeer zieke grond in Nieuw Trimunt, waar de andere granen geheel mislukten, een normale groei vertoonde, een kopergehalte in het zaad bezit van bijna $2\frac{1}{2}$ mg Cu per kg droge stof. Hieruit blijkt, dat rogge, in vergelijking met de andere granen, beter in staat is uit dergelijke gronden koper op te nemen.

§ 5. *Bespreking van de in hoofdstuk III verkregen resultaten*

De in dit hoofdstuk verkregen resultaten bewijzen, dat gronden, waarop de planten verschijnselen van ontginningsziekte vertoonen, een lager gehalte aan opneembaar koper bezitten dan die, waarop gezonde planten groeien. Dit komt tot uiting in het kopergehalte van de op deze gronden groeiende planten en ook in de hoeveelheid koper, die *Aspergillus niger* uit die gronden kan opnemen. Daar de hoeveelheid koper, waarover de schimmel beschikt, in nauw verband staat tot de kleur van de sporen, kan men uit de sporekleur op eenvoudige wijze de hoeveelheid opneembaar koper in de grond bepalen. Het is nu gebleken, dat zieke gronden als regel een gehalte aan voor de schimmel opneembaar koper bezitten, dat lager is dan 0,4 γ per gram luchtdroge grond; bij gronden, waarop de planten slechts tegen het laatst van de groei de ziekteverschijnselen vertoonen, is dit 1 à 1,5 γ , terwijl gezonde gronden meer dan 2 γ en vaak zelfs meer dan 2,5 γ koper per gram luchtdroge grond bezitten. In vergelijking met die microbiologische methoden, welke met behulp van schimmels het oplosbare kalium en phosphorzuur in de grond bepalen (*Aspergillus*-methode van NIKLAS (52), „Mikrodüngungsmethode” van SEKERA (68)), heeft de door mij gebruikte methode het voordeel, dat men bepalingen kan doen, zonder dat men wegingen van het schimmel-materiaal behoeft uit te voeren, zooals bij het kalium- en phosphor-zuuronderzoek noodzakelijk is.

Tabel 25

Kopergehalte in mg per kg droge stof in ziek resp. gezond plantenmateriaal

Plantensoort	Grondsoort	Behandeling	Gezondheidstoestand	Cu in mg/kg. Aspergillus methode	Cu in mg/kg. Carbamaat methode
Wintertarwe zaad . . .	dalgrond Spitsbergen	-	lichte ziekteverschijnselen	1,1	-
" stroo . . .	"	"	lichte ziekteverschijnselen	1,4	-
" zaad . . .	"	"	gezond	1,7	1,68
" zaad . . .	"	100 kg CuSO ₄ per ha	"	1,7	1,77
" stroo . . .	"	100 " " " "	"	2,2	-
" zaad . . .	"	200 " " " "	"	2,5	2,65
" stroo . . .	"	200 " " " "	"	2,2	-
" zaad . . .	"	onbehandeld	zeer slechte korrelvorming	0,7	-
" " . . .	"	"	vrij goede korrelvorming	0,8	-
" " . . .	"	"	gezond	1,3	1,50
" " . . .	Gasseltern.veen	"	slechte korrelvorming	0,6	0,77
" " . . .	Westerlee	"	slechte korrelvorming	0,6	0,70
" " . . .	Emun.compasc.	"	gezond	3,3	3,33
" " . . .	"	200 kg CuSO ₄ per ha	donkerder groen dan de vorige	4,4	4,66
Haver zaad . . .	zandgrond Steenwijk	onbehandeld	weinig ziek	0,7	0,80
" " . . .	N. Trinumt	"	zeer ziek	0,7	-
" " . . .	"	"	gezond	1,3	-
" " . . .	"	50 kg CuSO ₄ per ha	"	1,5	-
Zomerrogge zaad . . .	"	onbehandeld	"	2,4	-
" " . . .	"	50 kg CuSO ₄ per ha	"	4,0	-
" " . . .	dalgrond Sappemeer	onbehandeld	"	-	1,20
Wintertarwe zaad . . .	"	50 kg CuSO ₄ per ha	"	-	0,75
" stroo . . .	"	50 " " " "	"	-	1,30
" zaad . . .	"	300 " " " "	"	-	0,84
" stroo . . .	"	300 " " " "	"	-	1,75
" zaad . . .	"	"	"	-	1,33

Verder is gebleken, dat ook voor het bepalen van kleine hoeveelheden koper (0-2 γ) in plantenmateriaal men de schimmelmethode kan gebruiken. Deze methode heeft in vergelijking met het chemische onderzoek het voordeel, dat men van zeer kleine hoeveelheden materiaal nog het kopergehalte kan bepalen. Verder, dat men het koper uit de asch niet behoeft te scheiden van andere elementen, waardoor kans op verlies of toevoer door niet geheel zuivere chemicaliën uitgesloten is.

HOOFDSTUK IV

OORZAKEN VAN DE SLECHTE KOPERVEROORZIENING DER PLANTEN OP ONTGINNINGSZIEKE GROND EN MAATREGELEN OM HET VASTGELEGDE KOPER BESCHIKBAAR TE MAKEN

§ 1. *Bepaling van het door organische stoffen in de grond vastgelegde koper*

In de voorgaande hoofdstukken is gebleken, dat ontginningsziekte een gevolg is van een tekort aan koper in de plant. We hebben gezien, dat de hoeveelheid koper, die in graanplanten aanwezig is, als zij gezond zijn en een goede opbrengst leveren, gering is, nl. plm. 1,5 mg per kg droge stof. Stelt men een normale opbrengst aan tarwe op 3000 kg zaad en 5000 kg stroo, dan komt men tot een hoeveelheid koper, benodigd om deze graanopbrengst te leveren, van 12 g. De hoeveelheden voor de andere granen benodigd zullen weinig van dit bedrag afwijken. Deze kleine hoeveelheid koper kan door de zieke gronden echter niet opgeleverd worden. De vraag is nu: komt dit doordat deze gronden zoo weinig koper bevatten of bevindt zich het aanwezige koper in een moeilijk opneembare vorm? Om een antwoord op deze vraag te kunnen geven, werd van een aantal zieke zoowel als gezonde gronden en van de asch van deze gronden met behulp van de Aspergillus-methode het kopergehalte bepaald. Is de totale hoeveelheid koper van een grond gering, dan zal men ook in de asch een laag gehalte moeten vinden, is daarentegen een deel van het koper in moeilijk oplosbare organische verbindingen vastgelegd, dan zal men in de asch een hogere waarde moeten vinden dan die van het bruikbare koper in de grond.

Het resultaat van dit onderzoek is vermeld in tabel 26.

Zooals uit deze tabel blijkt, is er over het algemeen een duidelijk verschil tusschen totaal en opneembaar koper te constateeren. Dit verschil is echter bij de eene grond aanzienlijk grooter dan bij de andere. Zeer klein is het bij de grond uit Sint Anthonis en bij de meeste gronden uit Ommen. Dit wil zeggen, dat bij deze zieke

Tabel 26

Koper in γ per gram luchtdroge grond door *Aspergillus niger* opgenomen uit verschillende gronden resp. vóór en na het verassen

Herkomst van de grond	Gloei- ver- les in %	Gezondheidstoestand	Opgenomen koper uit asch	Opgenomen koper uit grond
Nieuw Trimunt	11,1	zeer ziek	1,2	0,4
Buurse	22,7	zeer ziek	0,6	0,2
Zwarte heide humus .	55,9	zeer ziek	1,3	0,2
Gasselternijeven . .	25,4	weinig ziek	4,5	1,0
Heino	5,3	weinig ziek	1,4	1,0
Sint Anthonis	3,7	vrij ernstig ziek	0,5	0,4
Borger	7,3	gezond	2,8	1,3
Drouwen	6,2	gezond	4,7	2-2,5
Drouwen	4,7	gezond	4,8	2-2,5
Emmercompascuum .	14,4	tarwe zeer ziek	0,3	0,2
Emmercompascuum .	5,4	tarwe zeer ziek	0,6	0,2
Wolfheze	6,0	haver ziek	0,3	0,2
Ommen 1	9,4	kanariezaad zeer ziek	lichtbruin ¹⁾	zwartbruin
" 2	8,1	" zeer ziek	geel	geel
" 3	15,6	" ziek	lichtbruin	bruin
" 4	8,7	" ziek	geel	geel
" 5	10,2	" zeer ziek	geelbruin	geelbruin
" 6	9,8	" zeer ziek	lichtbruin	bruin
" 7	5,4	" zeer ziek	geel	geel
" 8	9,2	" ziek	lichtbruin	lichtbruin
" 9	14,7	" ziek	lichtbruin	bruinzwart
" 10	9,6	" ziek	lichtbruin	bruinzwart
" 11	9,8	" zeer ziek	lichtbruin	bruin
Dalgrond Spitsbergen	13,6	tarwe gezond	8,0	6,4
" "	19,5	tarwe zeer weinig ziek	7,5	6,4
" Sappemeer .	21,5	tarwe gezond	13,0	>5,0

¹⁾ Bij de gronden uit Ommen is de kleur van de sporen vermeld, zooals die verkregen werd bij toevoeging van 1 gram luchtdroge grond resp. asch hiervan.

gronden de totale hoeveelheid koper gering is. De grond uit Heino, die over een lager kopergehalte beschikt dan die uit Gasselternijeven, is niettegenstaande dit toch slechts weinig ziek, daar het aanwezige koper gemakkelijk wordt opgenomen, zoodat de waarde van het bruikbare koper voor beide gronden dezelfde is. Bij de gronden uit Nieuw Trimunt, Buurse, en vooral bij de zwarte heidehumus is het verschil belangrijk grooter. Bij deze gronden is de ontginningsziekte niet zo zeer een gevolg van een laag kopergehalte van de grond, als wel van een niet beschikbaar zijn van het aanwezige koper. Dat vooral in de zwarte heidehumus de oplosbaarheid gering is, is van belang in verband met het feit, dat in verschillende publicaties over de ontginningsziekte wordt gewezen op de beteekenis van bepaalde zwarte humus-

verbindingen bij het ontstaan dezer ziekte (ELEMA, HUDIG, SMITH, RADEMACHER). De door mij onderzochte heidehumus heeft ongetwijfeld zeer veel overeenkomst met het door deze onderzoekers beschreven materiaal.

Verder zij hier nog de aandacht gevestigd op het gedrag der onderzochte dalgronden. Deze gronden, die men aantreft in de veenkoloniën, zijn ontstaan na het afgraven van het hoogveen, door menging van de achtergebleven bonklaag (de bovenste laag van het veen) met zand. Vooral in de oudere veenkoloniën, die plm. 300 jaar geleden zijn ontstaan, heeft men aanvankelijk voor de bemesting gebruik gemaakt van compost uit de steden, een product, dat rijk is aan koper. Als gevolg hiervan mag men in deze streken een hoog kopergehalte van de grond verwachten. De enkele analysecijfers bevestigen dit. Het merkwaardige is nu echter, dat bij de tarweteelt op deze gronden in vele gevallen een gunstige werking wordt geconstateerd van een bemesting met kopersulfaat. Zonder deze bemesting vertoont de tarwe meer of minder duidelijk de verschijnselen, die op blz. 28 zijn beschreven. Dat inderdaad de koperopneming op deze grond te wenschen kan overlaten, wordt bewezen door het lage gehalte van de op deze gronden gegroeide tarwe (zie tabel 25). Wanneer we nu echter de met *Aspergillus* verkregen cijfers van deze grond bekijken, zien we, dat ze een hoog gehalte aan opneembaar koper aangeven, m.a.w. het koper is in deze grond in een zoodanige vorm aanwezig, dat het door *Aspergillus* wel, door tarwe echter in veel geringere mate kan worden opgenomen.

De in deze § verkregen uitkomsten toonen aan, dat de opneembaarheid van het in de grond aanwezige koper, behalve van de hoeveelheid organische stof, vooral ook afhangt van de samenstelling hiervan. Om de invloed van verschillende humussoorten bij de vastlegging van koper te leeren kennen, werd van een aantal gronden het vermogen om koper te binden bepaald. Verder werd nagegaan, of de door SMITH beschreven organische stoffen moeilijk oplosbare koperverbindingen kunnen geven.

§ 2. *Invloed van de met de methode van Smith uit gliede en andere gronden verkregen extracten en destillaten op de groei van gerst in waterculturen en op de vastlegging van koper*

In hoofdstuk I hebben we gezien, dat SMITH de oorzaak van de ontginningsziekte toeschrijft aan de aanwezigheid van schadelijke stoffen in de zieke gronden. Hoewel het m.i. door het voorgaande

onderzoek als vaststaand geacht kan worden, dat onvoldoende koper-voorziening de oorzaak van de ontginningsziekte is, leek het mij niet ondenkbaar, dat de door SMITH beschreven stoffen van belang waren bij het vastleggen van koper in de grond. Ik heb daarom de proeven van SMITH herhaald met een drietal gronden, nl. 1° gliede uit Zeyerveld, afkomstig van dezelfde plaats als het door SMITH gebruikte materiaal, 2° de zwaar ontginningszieke humushoudende zandgrond uit Nieuw Trimunt en 3° een gezonde zandgrond uit Wageningen.

Deze gronden werden op de manier, als door SMITH is beschreven gedurende 1 uur met alcohol van 95% op 85° C verwarmd. Daarna werd heet gefiltreerd, waardoor een bruin extract werd verkregen. Hiervan werd de alcohol afgedampt, waarna een waterige oplossing overbleef, die volgens SMITH de verschijnselen van ontginningsziekte nog kon veroorzaken. Van deze bruingekleurde oplossing werd een deel toegevoegd aan gerst in watercultuur, terwijl een ander deel werd onderworpen aan destillatie, om de door SMITH beschreven gliedine te krijgen. Bij deze destillatie ging een eenigszins opaliseerende vloeistof over, waaraan een eigenaardige geur was waar te nemen. Hoewel in dit destillaat een witachtige troebeling ontstond, zijn de door SMITH beschreven gliedinekristallen door mij niet geconstateerd.

Behalve met gliede werden dezelfde resultaten verkregen bij de zieke grond uit Nieuw Trimunt en de gezonde tuingrond uit Wageningen. Hoewel de alcohol-extracten nu minder bruin gekleurd waren dan bij de gliede, wat in verband met het lagere gehalte aan organische stof niet behoeft te verwonderen, geleken de destillaten van deze gronden zeer veel op die van de gliede. De opaliseerende vloeistof met witachtige troebeling en typische geur is dus niet karakteristiek voor zieke gronden, maar kan ook van gezonde verkregen worden.

Om te weten te komen of de extracten en destillaten van deze gronden in staat waren de verschijnselen van ontginningsziekte te veroorzaken, werden ze toegevoegd aan gerstplanten van plm. 2½ week, groeiende in waterculturen. Deze planten hadden 3 γ koper per cultuur ontvangen, een hoeveelheid, die slechts gedurende korte tijd in de koperbehoefte kon voorzien. Een aantal culturen had 10 γ koper extra ontvangen.

Het bleek nu, dat noch de extracten noch de destillaten in staat waren, bij de koperarme gerstculturen de verschijnselen van ontginningsziekte eerder te voorschijn te laten komen, dan zonder toevoeging van deze stoffen het geval was. Wel veroorzaakte een groote hoeveelheid van de destillaten, afkomstig van de gliede en van de zieke

grond, een duidelijke groeibeschadiging bij de gerst. De planten kregen een sterk gereduceerd wortelstelsel, dat in hevige mate door bacteriën was aangetast, hadden verder zeer lichtgroene bladen, terwijl de groei practisch stil stond. Deze verschijnselen, die niet identiek waren met die van de ontginningsziekte, kwamen zoowel bij de kleine als bij de grootere hoeveelheid koper voor, zoodat ze blijkbaar niet in verband stonden met de kopervoorziening der planten. Bij het destillaat, afkomstig van de gezonde tuingrond, kon deze schadelijke werking niet worden geconstateerd. Deze resultaten vormen grootendeels een bevestiging van het werk van KUIPERS, die bij toevoeging van destillaten, afkomstig van zieke gronden, aan zandculturen van haver eveneens groeibeschadigingen waarnam, die niet identiek waren met die van de ontginningsziekte en ook door koper niet waren te genezen. In tegenstelling tot het door mij gevonden resultaat constateerde KUIPERS deze beschadiging ook, wanneer hij uitging van gezonde grond.

Nadat uit deze proeven gebleken was, dat de extracten en destillaten van zieke gronden niet in staat waren de verschijnselen van ontginningsziekte bij planten te veroorzaken, werd nagegaan of ze indirect van invloed konden zijn, door koper in onoplosbare verbindingen vast te leggen. Om dit te onderzoeken werd gebruik gemaakt van de Aspergillusproef. Aan 1, $2\frac{1}{2}$ en 5 cc van de bovengenoemde vloeistoffen werd 2 γ koper toegevoegd, waarna ze werden toegediend aan kolven met voedingsoplossing voor *Aspergillus niger*, die vervolgens met een sporensuspensie werden geënt. Het bleek nu, dat geen der drie destillaten in staat was het koper in een voor de schimmel onoplosbare vorm te binden. Bij de extracten was bij de grootste hoeveelheid, die toegediend was, de kleur der sporen iets minder zwart dan die van de standaard met 2 γ koper. Het verschil was echter zoo gering, dat de aanwezigheid van koperbindende stoffen in deze vloeistoffen als uitgesloten beschouwd kan worden. Tot dezelfde conclusie leidde nog een proef, waarbij grootere hoeveelheden, nl. 5, 10, 25 en 50 cc destillaat van de zieke grond waren toegediend.

Dat aan de gliede zelf wel een koperbindende werking kan worden toegeschreven bleek hieruit, dat bij toevoeging van 2 γ koper met 1 g vochtige gliede aan schimmelculturen, de kleur der *Aspergillus*-sporen belangrijk lichter was dan zonder de gliede.

§ 3. *Beteekenis van verschillende grondsoorten bij het vastleggen van koper*

a. *Proeven met Aspergillus niger.*

Om de koperbinding van de zwarte heidehumus te leeren kennen, werd aan 2 g van dit materiaal 30 cc water met resp. 3, 5, 10 en 20 γ koper toegediend. Na een etmaal bij kamertemperatuur te hebben gestaan, werd de natte humus gesteriliseerd bij 110° C, gevoegd bij een voedingsoplossing voor *Aspergillus niger*, waarna geënt werd met een sporensuspensie van de schimmel. Het resultaat dezer proef was als volgt:

	opneembaar koper
2 g zwarte heidehumus (totaal Cu : 2,6 γ)	0,2 γ
2 g " " + 3 γ Cu	0,6 γ
2 g " " + 5 γ Cu	0,8 γ
2 g " " + 10 γ Cu	1,0 γ
2 g " " + 20 γ Cu	2,0 γ

De koperbinding van deze humus komt hier duidelijk tot uiting. Turfstrooisel gaf ongeveer hetzelfde resultaat, terwijl zwarte turfhumus uit Gasselternijveen een geringere werking vertoonde. Zooals aan het einde van de vorige § is meegedeeld, is ook gliede in staat koper in een voor *Aspergillus niger* moeilijk opneembare vorm vast te leggen. Bij het verdere onderzoek bleek nu, dat het verhitten van de humus op 110°, nadat het koper was toegediend, de vastlegging in belangrijke mate versterkte. Tot op zekere hoogte kon dit zelfde resultaat worden bereikt, indien na het toedienen van het koper de vochtige humus bij 40° C werd gedroogd.

b. *Percolatieproeven.*

De binding van koper door grond kon ook worden aangetoond door percolatieproeven. Hiervoor werden 40 g van een gezonde zandgrond uit Wageningen en eveneens 40 g van de eerdergenoemde zieke grond uit Nieuw Trimunt gebracht in glazen buizen van 1½ cm diameter en ± 35 cm lengte, die aan de onderzijde waren afgesloten door een prop glaswol. Daarna werd gedurende 8 à 10 uur gepercoleerd met een oplossing van ¼% kopersulfaat met een snelheid van ± 100 cc per uur.

Vervolgens werd zoolang gedestilleerd water doorgeleid, totdat de reactie op koper, met carbaminaat, nagenoeg negatief was. Hierna werd gepercoleerd met een oplossing van 1% Ca(NO₃)₂. Nadat ± 30 liter hiervan waren doorgedruppeld en per 10 cc vloeistof niet

meer dan 2 γ Cu aanwezig was, werd de grond verascht en het nog aanwezige koper bepaald. Hierbij werden per gram organische stof (gloeiverlies) de volgende cijfers gevonden:

	met $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ uitgewassen	in de grond nog aanwezig
zieke grond	46,7 mg Cu	24,3 mg Cu
gezonde grond	37,8 mg Cu	5,1 mg Cu

Uit deze cijfers blijkt in de eerste plaats, dat de totale hoeveelheid koper, die kan worden gebonden, bij de zieke grond aanzienlijk hoger is dan bij de gezonde. Verder zien we, dat van het gebonden koper bij de zieke grond 34% niet met $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ is uit te wassen, terwijl dit bij de gezonde slechts 11,5% is.

Bij een andere proef werden dezelfde zieke grond en een gezonde dalgrond gedurende een aantal dagen geschud met een oplossing van kopersulfaat. Daarna werd op een zuigfilter de overmaat kopersulfaat met gedestilleerd water uitgewassen, waarna zoolang met $\frac{1}{20}$ N. HCl werd behandeld, totdat in het filtraat niet meer dan 2 γ koper per 10 cc vloeistof aanwezig was. Tenslotte werd de grond verascht en het hierin aanwezige koper bepaald. De resultaten dezer proef zijn de volgende:

	met HCl uitgewassen	in de grond nog aanwezig
zieke grond (per g organische stof) . . .	75,5 mg Cu	0,4 mg Cu
gezonde grond (per g organische stof) . . .	40,7 mg Cu	0,3 mg Cu

Uit deze cijfers blijkt, dat de totale hoeveelheid gebonden koper bij de zieke grond weer belangrijk hoger is dan bij de gezonde. Behandeling van de gronden met $\frac{1}{20}$ N. HCl doet echter, zowel bij de zieke als bij de gezonde, vrijwel al het koper uitspoelen.

§ 4. *Betekenis van micro-organismen bij het vastleggen van koper*

a. *Inleiding.*

Daar het niet ondenkbaar werd geacht, dat micro-organismen in staat zijn, oplosbare koperverbindingen in moeilijk oplosbare om te zetten, trachtte ik op de volgende manier eenig inzicht in deze kwestie te krijgen. Op vaste voedingsbodems, bestaande uit vleeschagar met $\frac{1}{4}$ % glucose, $\frac{1}{4}$ % CaCO_3 en $\frac{1}{200}$ % CuSO_4 , werden entstrepen getrokken van verschillende micro-organismen. Na verloop van enkele dagen, toen de bacteriën goed waren gegroeid, werden de platen overgoten met een oplossing van 0,2% carbaminaat. Het bleek nu, dat

enkele van de onderzochte bacteriën om hun kolonies een veld hadden, dat veel minder intensief kleurde dan de rest van de plaat, die door het kopercarbaminaat goudgeel was geworden. Duidelijk waren deze verschijnselen bij *B. coli* en *B. aerogenes*. De kolonies van deze bacteriën, die op de platen zonder koper wit waren, hadden bij aanwezigheid van koper een bruine kleur en werden na toevoeging van het reagens nog meer gekleurd. Dit wijst erop, dat het koper uit de omgeving in de bacteriekolonies was opgehoopt. De bruine kleur van de kolonies was vermoedelijk een gevolg van de vorming van kopersulfide. Bovengenoemde bacteriën zijn nl. in staat op eiwithoudende voedingsbodems zwavelwaterstof te vormen. Ook het feit, dat een druppel HNO_3 in staat was de bruinkleuring te doen verdwijnen, terwijl HCl dit niet kon doen, wijst op aanwezigheid van CuS .

Behalve op vaste voedingsbodems kon dit verschijnsel ook in vloeibare voedingsoplossingen worden verkregen. Hiervoor werden verzeleken:

- | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. vleeschextract, steriel 2. vleeschextract + $\frac{1}{4}\%$ CaCO_3 + $\frac{1}{4}\%$ glucose, steriel 3. vleeschextract geënt met <i>B. coli</i> 4. vleeschextract + $\frac{1}{4}\%$ glucose, geënt met <i>B. coli</i> 5. vleeschextract + $\frac{1}{4}\%$ CaCO_3 + $\frac{1}{4}\%$ glucose, geënt met <i>B. coli</i> | } | <p>van deze oplossingen was plm. 15 cc in reageerbuisen aanwezig, waaraan $\frac{1}{2}$ mg Cu was toegediend.</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Na verloop van 2 dagen, toen carbaminaat werd toegevoegd, werden de series 1 en 2 sterk geel gekleurd, 3 en 4 minder, terwijl 5 bijna kleurloos bleef. Dit wijst erop, dat vooral bij aanwezigheid van glucose en CaCO_3 het oplosbare koper uit de oplossing verdwijnt. Dat het kleurloos blijven in deze culturen inderdaad berustte op het neerslaan van het koper en niet op een onwerkzaam worden van het reagens, werd bewezen door de bacteriesuspensie te filtreren door een filterkaars, waarna het bacterievrije filtraat met HNO_3 en H_2SO_4 werd gedeutreerd, geëlectrolyseerd en vervolgens colorimetrisch op koper werd onderzocht. Het bleek nu, dat het kopergehalte van het filtraat van de culturen, onder 5 genoemd, minder dan $\frac{1}{20}$ deel was van dat der niet geënte culturen.

Wanneer de bruine kleur van de bacteriekolonies op voedingsplaten met CuSO_4 een gevolg was van de vorming van CuS , moest dit verschijnsel versterkt worden door die maatregelen, die de H_2S -vorming bevorderen. Tot deze maatregelen behoort de toediening van cystine

(VAUGHN en LEVINE (83) gebruiken cysteïne). Inderdaad was op platen van vleeschagar + 1% pepton, 0,1% cystine en $\frac{1}{200}\%$ CuSO_4 een zeer krachtige H_2S -vorming waar te nemen. Als gevolg hiervan waren de kolonies van *B. coli* en *B. aerogenes* reeds spoedig donkerbruin gekleurd. Ook aan de oppervlakte van de plaat vormde zich een dun laagje van CuS .

Naar aanleiding van deze proeven kwam de vraag op, of ook bij het vóórkomen van een tekort aan opneembaar koper in de grond zwavelwaterstofvormende bacteriën een rol zouden kunnen spelen. Om hierop een antwoord te kunnen geven was noodig allereerst de bruikbaarheid van CuS voor micro-organismen en hogere planten te leeren kennen.

b. Onderzoek naar de bruikbaarheid van CuS voor de voeding van organismen.

1. Proeven met *Aspergillus niger*.

Aan Erlenmeyerkolven met 40 cc voedingsoplossing voor *Aspergillus* werd toegevoegd:

a. 2 γ Cu ;

b. een mengsel van 2 γ Cu + 1 cc $\frac{1}{10}$ N. H_2S -oplossing;

c. een mengsel van 2 γ Cu + 1 cc $\frac{1}{10}$ N. H_2S -oplossing, vóór toevoeging opgekookt;

d. alleen 1 cc $\frac{1}{10}$ N. H_2S -oplossing;

e. geen toevoeging.

Na vijf dagen hadden a en c geheel zwarte sporen. b was iets achter met de sporevorming, maar vormde na eenige tijd ook zwarte sporen. Bij d en e waren geen sporen gevormd. Dit resultaat bewijst, dat het chemisch verkregen CuS , vermoedelijk door oxydatie tot CuSO_4 , door *Aspergillus* practisch even goed bruikbaar is als CuSO_4 . Het zelfde resultaat werd verkregen, indien het koper met een oplossing van NH_4SH werd neergeslagen.

2. Proeven met gerst in watercultuur.

Behalve bij de schimmelculturen werd ook bij gerst in watercultuur en in ontginningszieke grond de werking van CuS vergeleken met die van CuSO_4 . Bij de waterculturen bleek, dat aanvankelijk het sulfaat veel beter werkte dan het sulfide. Daarna begonnen de culturen met sulfide zich langzaam te herstellen, om ten slotte zelfs een hogere opbrengst te leveren dan die met sulfaat.

Werd echter aan de culturen met CuS regelmatig een weinig H_2S -

houdend water toegediend, dan bleven de verschijnselen van kopergebrek bestaan, blijkbaar tengevolge van het feit, dat de omzetting (vermoedelijk oxydatie) in oplosbare koperverbindingen achterwege bleef. Dat deze slechte groei een gevolg zou zijn van een schadelijke werking van de zwavelwaterstof, moet naar aanleiding van de resultaten van de straks te beschrijven proeven met H_2S -vormende bacteriën onwaarschijnlijk worden geacht.

3. Proeven met gerst in zieke grond.

Bij een proef met ontginningszieke grond werkte het sulfide even goed en bij lagere concentratie zelfs duidelijk beter dan het sulfaat, zooals uit onderstaande tabel blijkt. Het toegevoegde CuS wordt in de grond dus blijkbaar snel in een oplosbare koperverbinding omgezet.

Tabel 28 ¹⁾

Vergelijking van CuS en $CuSO_4$ in ontginningszieke grond; potproeven met gerst

Koperbemesting	Korrel in g	Stroo in g
0,625 mg als sulfide	14,28	11,44
0,625 mg als sulfaat	2,37	17,82
1,25 mg als sulfide	13,41	10,23
1,25 mg als sulfaat	15,23	11,28

Uit deze proeven blijkt duidelijk, dat het chemisch gevormde koper-sulfide in voedingsoplossingen en in grond goed bruikbaar is voor de verschillende organismen. Het is echter denkbaar, dat het door micro-organismen gevormde CuS zich anders gedraagt. De volgende proef geeft hierover eenige aanwijzingen.

Op platen van vleeschagar met $\frac{1}{4}\%$ pepton, $\frac{1}{20}\%$ koperacetaat en resp. met en zonder $\frac{1}{4}\%$ cystine, werd een verdunde suspensie van *B. coli* uitgestreken. Bij aanwezigheid van cystine trokken de bacteriën zich van de hoge koperconcentratie niets aan en groeiden even goed als zonder koper, alleen waren in het eerste geval de kolonies bruin gekleurd door aanwezigheid van CuS , terwijl ze zonder koper wit waren. Zonder cystine daarentegen vond aanvankelijk in het geheel geen groei plaats; eerst na eenige dagen begonnen de kolonies zichtbaar te worden, terwijl pas na eenige weken de normale koloniegrootte bereikt was.

Het lijkt mij waarschijnlijk, de reden van dit verschillend gedrag te zoeken in de sterke vorming van zwavelwaterstof bij aanwezigheid

¹⁾ Tabel 27 is vervallen.

van cystine. Hierdoor wordt de oplosbaarheid van het koper vermindert, waardoor de bacteriën hiervan geringere hoeveelheden opnemen en niet worden beschadigd. Dat cystine als zoodanig de opneembaarheid van het koperzout vermindert, moet onwaarschijnlijk worden geacht naar aanleiding van een proef met *Aspergillus niger*, waarbij, ondanks de toevoeging van cystine, de opneembaarheid van het koper gelijk bleef. Merkwaardig was nu, dat de traag groeiende kolonies van *B. coli* op de platen zonder cystine een groene kleur hadden. Om te bewijzen, dat deze kleur veroorzaakt werd door een koperverbinding werd de plaat boven een flesch met H_2S -houdend water geplaatst. In weinige oogenblikken was de kleur overgegaan in bruin, als gevolg van de vorming van CuS ; ook de plaat zelf was bruin gekleurd. Bleef deze plaat na de H_2S -behandeling enkele uren aan de lucht staan, dan verdween de bruine kleur van kolonies en agar, waarbij beide hun groene kleur terug kregen. Het verdwijnen van de bruine kleur wijst op een oxydatie van het gevormde kopersulfide. Deze oxydatie bleef echter achterwege, indien het CuS door de bacteriën zelf uit cystine gevormd was. In dit geval waren de kolonies na vele weken nog even bruin als bij het begin van de groei. Wat hier vermeld is voor een hooge koperconcentratie zal ongetwijfeld ook gelden bij aanwezigheid van weinig koper, zoodat het zeer goed denkbaar is, dat H_2S -vormende bacteriën de kopervoorziening van de planten kunnen verminderen.

c. *Onderzoek naar de opneembaarheid van het door zwavelwaterstofvormende bacterien gebonden koper.*

1. *Proeven met Aspergillus niger.*

Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van vleeschwater met 0,1% cystine. Hiervan kwam 15 cc in reageerbuisen, waaraan resp. 0, 2 en 3 γ Cu per buis werd toegediend. Daarna werd geënt met *B. coli* en *Bll. putrificus*. Laatstgenoemde bacterie is een anaeroob organisme, dat krachtig zwavelwaterstof kan vormen. Nadat de bacteriën goed gegroeid waren, werden de culturen $\frac{1}{2}$ uur op 65° verwarmd, waarna ze werden toegevoegd aan Erlenmeyerkolven met voedingsoplossing voor *Aspergillus*, die vervolgens met een suspensie van schimmelsporen werden geënt. Na vijf dagen was het resultaat als volgt:

Contrôle, geen koper	geen sporen
3 γ Cu als sulfaat	zwarte sporen
15 cc vleeschwater + 0,1% cystine (steriel)	" "

15 cc vleeschwater	+0,1%	cystine	+ 2 γ Cu als sulfaat	
	(steriel)			zwarte sporen
15 „ „	+0,1%	cystine	+ 3 γ Cu als sulfaat	
	(steriel)			„ „
15 „ „	+0,1%	cystine (met B.coli)		grijsbruine sporen
15 „ „	+0,1%	cystine	+ 2 γ Cu (met B.coli).	zwarte sporen
15 „ „	+0,1%	cystine	+ 3 γ Cu (met B.coli).	„ „
15 „ „	+0,1%	cystine (met Bll. putrificus)		gele sporen
15 „ „	+0,1%	cystine	+ 2 γ Cu (m. Bll. putrif.)	„ „
15 „ „	+0,1%	cystine	+ 3 γ Cu (m. Bll. putrif.)	lichtbruine sporen

Duidelijke aanwijzingen zijn hier verkregen, dat *B. coli*, maar vooral *Bll. putrificus*, in staat is koper zoodanig te binden, dat *Aspergillus* het niet meer kan opnemen.

Deze proef werd, voorzoover het *Bll. putrificus* betreft, herhaald met opklimmende hoeveelheden koper. Verder werd nagegaan de beteekenis van het al of niet steriliseeren van de bacterieculturen, voordat deze aan de kolven voor *Aspergillus* werden toegevoegd. Het resultaat was hetzelfde als bij de vorige proef; zelfs 20 γ gaf nog geen zwarte sporen. Het steriliseeren van de bacteriecultuur bleek de opneembaarheid van het koper belangrijk te verminderen. Dat we bij deze proeven inderdaad te maken hadden met een verminderde koperopneming en niet met een groeibeschadiging van de schimmel, als gevolg van de stofwisselingsproducten van de bacteriën, werd hierdoor bewezen, dat toevoeging van een uitgewerkte, gesteriliseerde bacteriecultuur aan een *Aspergillus*cultuur, waaraan 2 γ koper was toegediend, geheel zwarte sporen gaf. Of de vastlegging van koper door H_2S -vormende organismen berust op de vorming van CuS of op de vorming van moeilijk oplosbare organische koperverbindingen, is zonder nader onderzoek niet uit te maken. Dat deze koperbinding niet een algemeene eigenschap van bacteriën is, werd bewezen door *B. coli* en *B. herbicola* te laten groeien onder aerobe omstandigheden in een voedingsoplossing met minerale zouten en glucose, waarin de vorming van H_2S wel uitgesloten mag worden geacht. Onder deze omstandigheden kon vastlegging van het koper in een voor *Aspergillus* niet bruikbare vorm niet worden waargenomen.

2. Proeven met gerst en haver in watercultuur.

De resultaten van deze proeven met *Aspergillus* waren aanleiding, de invloed van H_2S -vormende bacteriën bij de kopervoorziening van gerst en haver in waterculturen te onderzoeken. Bij deze proeven werd behalve *B. coli* ook *Vibrio desulfuricans* gebruikt. Deze laatste

is de voornaamste vertegenwoordiger van de sulfaatreducerende bacteriën, streng anaerobe organismen, die de zuurstof uit sulfaten benutten om organische verbindingen te oxydeeren. Als gevolg van deze sulfaatreductie worden groote hoeveelheden zwavelwaterstof gevormd. Voor de isolatie van *Vibrio desulfuricans* werd gebruik gemaakt van de door BAARS (5) opgegeven werkwijze. Met een voedingsoplossing van de volgende samenstelling:

Leidingwater	1000 cc
K_2HPO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,- g
$CaSO_4$	1,- g
$MgSO_4 \cdot 7 aq.$	2,- g
Calciumlactaat	5,- g
$FeCl_3 \cdot 6 aq.$	50 à 75 mg

werden stopfleschjes gevuld, waarna geënt werd met sloopmodder. Na zes dagen werd van deze cultuur geënt in een tweede fleschje, waaraan 5 cc $\frac{1}{10}$ N. H_2S -oplossing per fleschje van 60 cc was toegevoegd. De bedoeling hiervan was het milieu meer anaeroob te maken, waardoor sneller een reincultuur werd verkregen. Na nog enkele overentingen werd tenslotte een cultuur verkregen, die bij microscopisch onderzoek overwegend uit de snelbewegende *Vibrio desulfuricans* bestond. Van deze cultuur werd geënt in een vloeistof, die voor $\frac{1}{3}$ deel bestond uit de cultuurvloeistof volgens BAARS en voor $\frac{2}{3}$ deel uit de voor de watercultuur van granen gebruikte voedingsoplossing (zie blz. 13). Bovendien werd nog $\frac{1}{2}$ g $CaSO_4$ toegediend. Voor *B. coli* werd dezelfde voedingsoplossing gebruikt, alleen was in plaats van gips 0,1% cystine gegeven.

Nadat in deze cultuur de H_2S -vorming begonnen was, werd 10 γ Cu per cultuur toegediend. Vijf dagen later werden de verschillende voedingsoplossingen met bacteriën gebracht in waterculturen van plm. 3 weken oude gerst- en haverplanten, waaraan juist de eerste verschijnselen van kopergebrek waren waar te nemen; aan enkele planten werd de steriele voedingsoplossing toegediend. Bij deze laatste verdween het kopergebrek reeds na enkele dagen; de planten groeiden krachtig door en vertoonden pas tegen het eind van hun ontwikkeling zwakke symptomen van kopergebrek. Dit feit wijst er op, dat de voedingsoplossingen, waarin *Vibrio desulfuricans* en *B. coli* groeiden, vrij veel koper bevatten. Ondanks dit, en ondanks de 10 γ koper, die de bacterieculturen extra hadden ontvangen, was 14 dagen na toediening hiervan aan de waterculturen nog geen spoor van een koperwerking merkbaar. In alle culturen waren zeer ernstige gebreks-

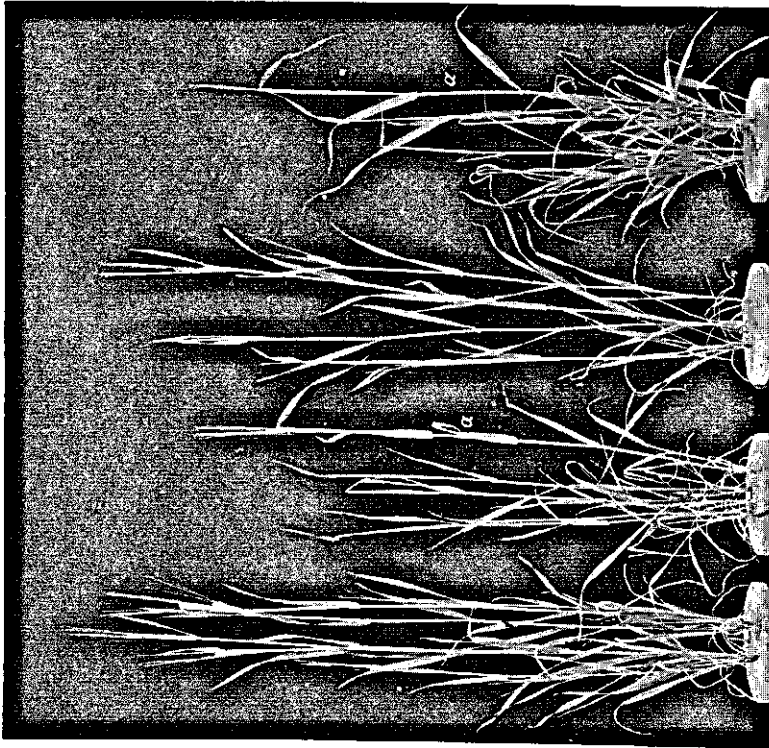


Fig. 17
 Gerst in watercultuur
 1: 20 γ Cu, niet geënt
 2: 30 γ Cu, geënt met *Vibrio* desulfuricans
 3: 20 γ Cu, niet geënt
 4: 30 γ Cu, geënt met *B. coli*
 a: koper op de bladen gekregen

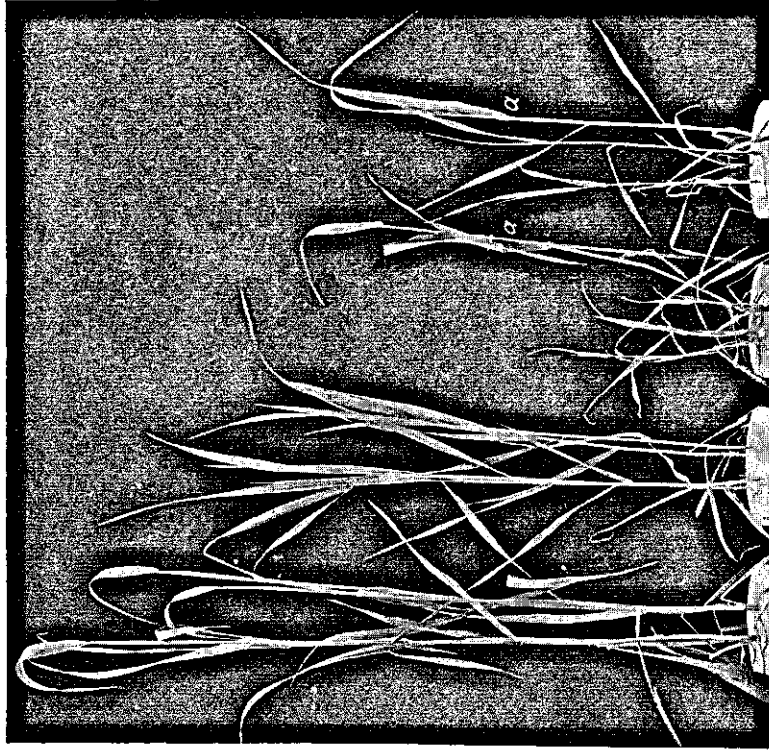


Fig. 18
 Haver in watercultuur
 5: 10 γ Cu, niet geënt
 6: geënt met *Vibrio* desulfuricans, + 1000 γ Cu
 7: 30 γ Cu, niet geënt
 8: 30 γ Cu, geënt met *B. coli*

Vastlegging van koper door zwavelwaterstofvormende bacteriën

symptomen aanwezig. Om nu te bewijzen, dat deze verschijnselen alleen op een tekort aan koper berustten en niet op een schadelijke werking der bacteriën of hun stofwisselingsproducten, werd bij één van de vier planten van iedere pot een weinig van een verdunde oplossing van kopersulfaat op de bladen gestreken. Het gevolg hiervan was, dat deze plant reeds na korte tijd begon door te groeien, terwijl de andere drie ziek bleven (fig. 17 en 18). Hetzelfde resultaat werd bereikt door toediening van een extra hoeveelheid koper aan de voedingsoplossing. Deze resultaten, die bij beide bacteriesoorten, bij gerst zoowel als bij haver verkregen werden, bewijzen dus, dat de planten kopergebrek hadden, ondanks de aanwezigheid van $\pm 30 \gamma$ koper in de voedingsoplossing.

Ruim vier weken na toediening van de oplossingen begonnen ook de niet van extra koper voorziene planten in geringe mate door te groeien. De oorzaak hiervan was waarschijnlijk te zoeken in het langzaam vrij komen van het gebonden koper. Groot waren deze hoeveelheden echter niet, daar de nieuw verschenen bladen reeds voordat ze geheel waren uitgegroeid weer afgestorven bladpunten vertoonden (fig. 17 en 18). Later zijn de verschillen geleidelijk iets vervaagd, doordat de zieke planten langzaam doorgroeiden.

Uit deze proeven met waterculturen is duidelijk gebleken, dat zwavelwaterstofvormende bacteriën in staat zijn de oplosbaarheid van koper zeer sterk te verminderen.

d. Invloed van het al of niet steriel zijn van de voedingsoplossing op de verschijnselen van kopergebrek bij haver en gerst.

Naar aanleiding van de in dit hoofdstuk verkregen resultaten vraagt men zich af, welke betekenis eventueel aanwezige micro-organismen hebben bij het ontstaan der ziektesymptomen bij koperarme culturen, zooals die in hoofdstuk II zijn beschreven. Vooral rijst deze vraag, wanneer men de resultaten ziet, die door GERRETSEN (29) zijn verkregen bij een onderzoek naar de oorzaken der veenkoloniale, haverziekte, een ziekte, die op sommige humushoudende gronden voorkomt en die door toediening van mangaansulfaat kan worden genezen. Bij dit onderzoek bleek, dat men de verschijnselen dezer ziekte kon verkrijgen, wanneer de planten gekweekt werden in mangaanarme water- en zandculturen, die niet steriel werden gehouden. Werden daarentegen de wortels van deze culturen vrij van micro-organismen gehouden, dan groeiden de planten wel slechter dan bij aanwezigheid van mangaan, maar de typische ziektesymptomen bleven achterwege.

De reden van dit verschijnsel ziet GERRETSEN in de groote gevoeligheid van mangaanarme planten voor saprophytische organismen. Het door deze organismen veroorzaakte wortelrot beschouwt hij als oorzaak van de typische ziektesymptomne.

Daar de gewone waterculturen, zooals die door mij zijn gebruikt, niet steriel zijn, leek het mij gewenscht ook bij de koperarme culturen de invloed van het al of niet aanwezig zijn van micro-organismen op de gebrekssymptomen te onderzoeken. Om steriele culturen te verkrijgen, werden twee verschillende wegen gevolgd. Bij de eerste methode werd de geheele plant steriel gehouden. Dit gebeurde door te cultiveeren in glasbuizen van 65 cm lengte en 5 cm diameter, met plm. 300 cc voedingsoplossing, waarin de gesteriliseerde, voorgekiemde gerst- of haverkorrel op een stukje tule, op plm. 1 cm boven de vloeistof kwam te liggen (fig. 19). Deze tule was bevestigd aan

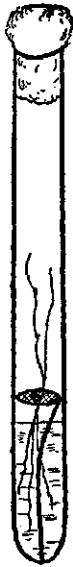


Fig. 19

een rondgebogen glazen staaf met een verticaal aanzetstuk, dat rustte op de bodem van de buis. Aan de bovenzijde was deze buis afgesloten door een wattenprop, die verschillende bewerkingen had ondergaan om het doorgroeien van schimmels te voorkomen. Hiervoor werd de bovenzijde van de wattenprop zwart gebrand, waarna werden aangebracht een laagje katadynebolus, een zilverpreparaat, dat sterk kiemdoodend werkt en tenslotte een met sublimaat en germisan behandelde laag watten, die aan de bovenzijde weer zwart werd gebrand. Door deze maatregelen gelukte het, de culturen gedurende meer dan drie maanden steriel te houden.

Bij de tweede methode werd alleen het wortelstelsel steriel gehouden, terwijl bladen en stengels in de vrije lucht groeiden. Het voordeel van deze methode is, dat de groeiomstandigheden meer natuurlijk zijn dan in het vorige geval. Daar staat tegenover, dat uitgebreide maatregelen genomen moeten worden om infectie van de voedingsoplossing te voorkomen.

De methodiek, welke gevolgd werd, was grootendeels gelijk aan die van GERRETSEN (28). De voedingsoplossing bevindt zich in Erlenmeyerkolven van Jenaglas van 1 liter inhoud (fig. 20). Deze zijn afgesloten met een gummikurk, waarin zich twee buizen bevinden. Een dezer buizen, die een diameter van $1\frac{1}{2}$ cm en een lengte van 13 cm heeft, is aan de onderzijde, die zich eenige cm boven de oppervlakte van de voedingsoplossing bevindt, afgesloten met een stukje

tule, waarop de voorgekiemde haver- of gerstkorrel wordt gelegd.

Nadat het eerste blad van de kiemplant de wattenprop is ge-

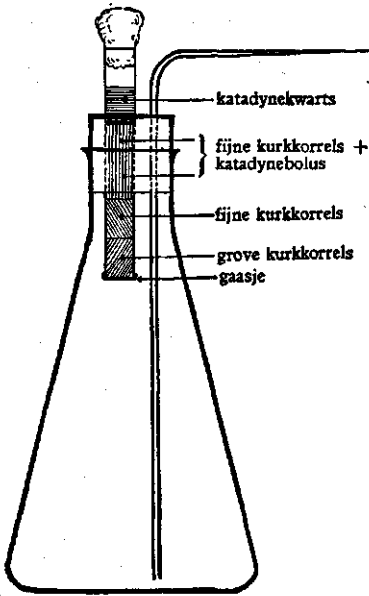


Fig. 20. Apparatuur voor steriele cultuur van planten

naderd, waarmede de buis aan de bovenzijde is afgesloten, worden op het gaasje achtereenvolgens aangebracht een laag van $1\frac{1}{2}$ à 2 cm grove kurkkorrels, $1\frac{1}{2}$ à 2 cm fijne kurkkorrels met een diameter van plm. $\frac{1}{2}$ à 1 mm, plm. 4 cm fijne kurkkorrels gemengd met katadynebolus en 1 à 2 cm katadynekwarts. Het gebruik van de katadynepreparaten heeft tot doel, invallende bacteriën en schimmels door de oligodynamische werking van het zilver te doden. De kurkkorrels, die door behandeling met een oplossing van 1% paraffine in aceton van een dun laagje paraffine zijn voorzien om vocht aantrekking tegen te gaan, werken als een bacteriefilter.

De andere buis heeft een diameter van $\frac{1}{2}$ cm, loopt door tot onder in de

kolf, is aan de bovenzijde rechthoekig omgebogen en loopt daar uit in een dunne punt. Deze buis dient om voedingsoplossing steriel te kunnen aftappen. Voor dit doel wordt de punt afgebrand, waarna een steriele pipet met een slangetje om de buis wordt geschoven. Vervolgens wordt de punt afgebroken, een monster van de vloeistof kan worden opgezogen, waarna de buis weer wordt dichtgesmolten.

Voor het steriliseeren van de apparaten worden ze in een autoclaaf twee maal gedurende 20 minuten op 115° C verhit.

Het steriliseeren der zaden geschiedde in een toestelletje (fig. 21), dat berust op een door WEISZFLOG (88) aangegeven principe. Twee glazen buizen A en B met aanzetbuisjes zijn d.m.v. gummislange-tjes verbonden met een glazen kruisstuk K, dat verbonden is met de kolf D, waarin zich gedestilleerd water bevindt, en met de afvoerbuisc C.

Nadat dit apparaat twee maal gedurende 20 minuten bij 115° C in een autoclaaf gesteriliseerd is, worden de te steriliseeren zaden in een der buisjes A of B gelegd. Ze liggen hier op doorboorde porcelainen plaatjes, die rusten op glazen ringetjes. Nadat de kranen 1 en 2 zijn

gesloten, worden A en B gevuld met een oplossing van 1% germisan, die men plm. 2 uur laat inwerken. Daarna worden kraan 1, 2 en 4 geopend, waardoor de germisanoplossing kan wegvloeien. Door nu 4 te sluiten en 3 te openen, kan men met behulp van de blaasballon E, die door middel van een met watten gevulde buis F met D in verbinding staat, steriel water naar A en B pompen om de resten van de germisan-

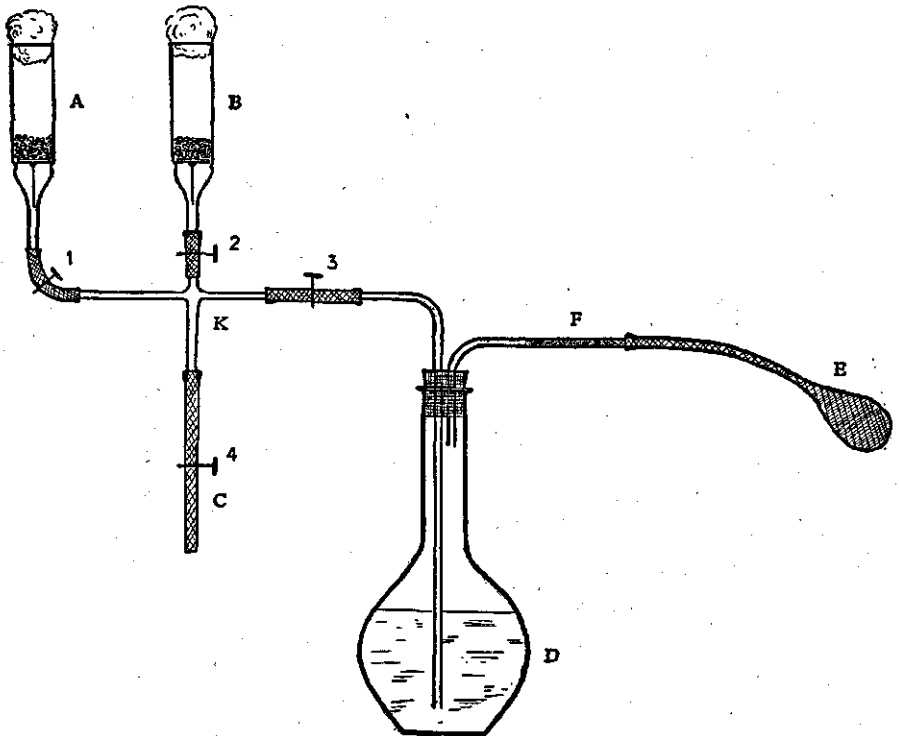


Fig. 21. Apparatuur voor het steriliseeren van zaden

oplossing te verwijderen. Deze waschvloeistof kan dan door openen van 4 weer worden afgevoerd. Deze manipulatie wordt eenige keeren herhaald. Daarna worden de gesteriliseerde zaden in een steriele entkast met een pincet overgebracht in petrischalen met vleeschagar + $\frac{1}{4}$ % glucose en hier te kiemen gelegd. Deze maatregel heeft het voordeel, dat eventueel aanwezige micro-organismen zich op de voedingsbodem ontwikkelen tot kolonies, waardoor niet goed gesteriliseerde zaden gemakkelijk kunnen worden herkend.

Met de hier beschreven sterilisatiemethode werden zeer goede

resultaten bereikt; de zaden waren voor practisch 100% steriel, niet-tegenstaande de door GERRETSEN aangegeven alcoholbehandeling in het luchtledige vóór de desinfectie met germisan niet werd toegepast. Deze behandeling veroorzaakte bij gerst en in geringere mate ook bij haver een beschadiging van de zaden.

Met behulp van de hier beschreven methode gelukte het om steriele culturen te krijgen van gerst en haver zoowel zonder als bij aanwezigheid van 10 γ koper. Dat de culturen inderdaad steriel waren, werd bewezen door van de op de bovenbeschreven manier genomen monsters 1 druppel uit te zaaien op platen van mout-, bouillon- en grondagar, waaraan een weinig bouillonagar was toegevoegd. Op deze platen verschenen geen kolonies, in tegenstelling met die, welke geënt waren met 1 druppel van een niet steriele cultuur. In dit geval kwam na korte tijd een groot aantal kolonies van bacteriën en schimmels te voorschijn.

Het bleek nu, dat de verschijnselen van kopergebrek in de steriele culturen geheel identiek waren met die bij aanwezigheid van micro-organismen. Hieruit volgt dus, dat voor het verkrijgen van de ziekteverschijnselen in koperarme culturen, zooals die in hoofdstuk II beschreven zijn, de medewerking van micro-organismen niet noodig is.

Van de twee beschreven methoden is de eerstgenoemde verreweg het eenvoudigst, terwijl ook de kans op infectie geringer is dan bij de andere. Daar staat echter tegenover, dat de planten groeien in een atmosfeer, die bijna steeds met waterdamp verzadigd is. Onder deze abnormale omstandigheden kwamen de typische verschijnselen van kopergebrek zoowel in de steriele als in de niet steriele culturen minder duidelijk tot uiting dan bij de planten, die in de vrije lucht groeiden. Bij de tweede methode echter, waarbij de omstandigheden meer natuurlijk waren, kwamen de gebreksverschijnselen zoowel in de steriele als in de niet steriele culturen precies overeen met die, welke in de vroeger beschreven waterculturen werden geconstateerd.

e. Over de beteekenis van micro-organismen bij het onoplosbaar maken van koper in de grond.

Naar aanleiding van bovenstaande resultaten kan men zich voorstellen, dat ook bij de verminderde opneembaarheid van koper in de grond micro-organismen een rol kunnen spelen. Dit zal vooral dan gebeuren, wanneer H_2S -vorming plaats vindt, d.w.z. onder anaerobe omstandigheden. Het is b.v. te verwachten in gronden, die een overmaat water bevatten. Van belang is in dit verband een mededeeling

van ALLISON (2), die, schrijvende over de gronden van de „Everglades”, wijst op de sterke H_2S -vorming in de nog niet ontgonnen veengronden. Als gevolg hiervan is het grondwater daar vaak rijk aan H_2S . Het blijkt nu, dat deze gronden, wanneer ze pas in cultuur zijn, hevige verschijnselen van kopergebrek vertoonen. Eenige jaren later worden ze, ook zonder toediening van koperzouten, veel minder ziek. Dit wijst dus op het vrijkomen van koper uit moeilijk oplosbare verbindingen.

Om te weten te komen of onder anaerobe toestanden in de grond de kopervoorziening van de in die grond groeiende planten minder gunstig is, werd uitgegaan van twee gronden, een zwak zieke zandgrond uit Heino en een gezonde dalgrond uit Sappemeer. Om een zooveel mogelijk anaerobe toestand te krijgen werden twee werkwijzen gevolgd:

1. de grond werd flink vochtig gemaakt, in glazen cilindres gebracht en daarna zeer stijf aangedrukt;
2. er werd zooveel water toegevoegd, dat een brijachtige massa werd verkregen. Deze werd in glazen cilindres gebracht en onder water gezet.

In beide gevallen werd nog vergeleken het resultaat van het al of niet toevoegen van een voedingsoplossing van gistextract + 1% glucose. De potten werden vervolgens vier weken in een warme kamer van $30^\circ C$ gezet, waarna ze op dezelfde vochtigheidsgraad werden gebracht. Daarna bleef van iedere serie telkens één pot onbehandeld, één ontving kopersulfaat, terwijl van een derde de grond werd losgemaakt en daarna op normale wijze weer in de pot teruggebracht. Ter vergelijking waren potten met goede vulling aanwezig. In deze proef werd haver als proefplant gebruikt.

De groei van de planten was aanvankelijk bij de dichte vulling veel slechter dan bij de goede. Toediening van kopersulfaat noch losmaken van de grond hadden hierop eenige invloed. Een deel der culturen met de grond uit Heino ging zelfs geheel te gronde. Bij aanwezigheid van gistextract was de groei duidelijk beter dan zonder deze voedingsoplossing. De reden hiervan is zeer waarschijnlijk te zoeken in de betere stikstofvoeding. Verder bleek, dat het onder water zetten minder schadelijk was geweest dan het dichte vullen. Ontginningsziekteverschijnselen waren tegen het laatst van de groei waarneembaar. Bij de dichte grond waren ze in iets sterkere mate aanwezig dan bij de goede vulling. Erg belangrijk waren deze verschillen, zooals ook in de opbrengstcijfers (tabel 29) tot uiting komt, echter niet. De op-

brengsten van de grond uit Sappemeer zijn niet vermeld, omdat hier in het geheel geen verschillen aanwezig waren.

Tabel 29

Invloed van de vulling der potten op de ontginningsziekteverschijnselen bij haver in weinig zieke grond

Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Goede vulling	8,80	9,77
„ „ + CuSO ₄	10,12	9,63
Goede vulling + gistextract	13,55	10,13
„ „ + „ + CuSO ₄	14,02	11,16
Dichte vulling + gistextract	7,80	9,42
„ „ + „ + CuSO ₄	11,16	9,53
„ „ + „ losgemaakt	14,42	11,02
4 weken onder water	9,56	12,10
4 „ „ „ + CuSO ₄	11,28	9,40
4 „ „ „ losgemaakt	9,08	7,44
4 weken onder water + gistextract	15,07	11,29
4 „ „ „ + „ + CuSO ₄	14,49	11,11
4 „ „ „ + „ losgemaakt	15,56	11,38

Behalve op bovenstaande manier werd de invloed van de luchtvoorziening nog op een andere manier nagegaan. Uit drie gronden, nl. een zeer zieke, een weinig zieke en een gezonde, werd de humus door middel van afslibben verwijderd van het zand. Daarna werd deze humus gevoegd bij zand van verschillende korrelgrootte nl. zeer fijn loodzand, middelmatig fijn zand van de glasfabriek Leerdam en zeer grof rivierzand. Dit zand was eerst gegloeid, daarna behandeld met heet HCl en HNO₃ en ten slotte met uit glazen toestellen gedestilleerd water zuurvrij gemaakt. Van iedere humussoort werd 10% toegevoegd. Verondersteld werd, dat door het verschil in korrelgrootte van het zand verschil in luchtvoorziening van de grond werd verkregen. Als proefgewas werd haver gezaaid. Bij de humus uit de zeer zieke grond werden de planten al spoedig ziek. Invloed van de zandsoort was niet merkbaar. Van de humus uit de weinig zieke en gezonde grond gold precies hetzelfde, alleen was het ziektebeeld hier resp. minder ernstig en niet aanwezig. Daar verschillen in opbrengst door aanwezigheid van de verschillende zandsoorten niet werden verkregen, zullen de opbrengstcijfers hier niet worden vermeld.

Na het oogsten van de planten werden de potten met grond intact gelaten, zoo nu en dan bevochtigd en het volgende voorjaar opnieuw gebruikt. Van een aantal potten werd nu de grond flink losgemaakt en doorgewerkt, de andere bleven zooals ze waren. Vervolgens werd gerst gezaaid. In tegenstelling tot de resultaten van het voorgaande jaar kwamen nu bij aanwezigheid van de weinig zieke humus duidelijke verschillen te voorschijn. In de niet losgemaakte potten met loodzand waren de symptomen van kopergebrek in zeer duidelijke mate aanwezig. Aren kwamen nauwelijks te voorschijn, terwijl van een korrelvorming geen sprake was. Deze zelfde grond, losgemaakt en goed bewerkt, gaf bijna geheel normale planten. Bij het middelmatig grove zand uit Leerdam was de korrelvorming duidelijk beter dan bij aanwezigheid van loodzand, echter was ook hier de invloed van het losmaken weer duidelijk waarneembaar. Het grove rivierzand gaf zonder deze maatregel nog een behoorlijke opbrengst.

Dat de lagere opbrengst in de niet losgemaakte potten inderdaad veroorzaakt werd door kopergebrek en niet door andere factoren, wordt hierdoor bewezen, dat bij toediening van kopersulfaat in dergelijke potten een goede groei werd verkregen. Tabel 30 vermeldt de opbrengsten van deze proeven.

Tabel 30

Invloed van de korrelgrootte van het gebruikte zand en van de bewerking van de grond op de opbrengst van gerst, gegroeid in verschillende humus-zandmengsels

Herkomst van de humus	Behandeling	Loodzand		Middelmatig grof zand		Grof rivierzand	
		Korrel	Stroo	Korrel	Stroo	Korrel	Stroo
Zeer zieke grond . .	slecht bewerkt	0	6,47	0	4,14	0	4,50
" " " . .	goed bewerkt	-	-	0	4,95	0	5,56
" " " . .	slecht bewerkt + CuSO ₄	14,33	12,32	-	-	12,09	12,85
Weinig zieke grond .	slecht bewerkt	0	12,09	0,41	14,89	4,50	13,77
" " " . .	goed bewerkt	5,95	14,01	4,28	14,73	5,26	16,13
" " " . .	slecht bewerkt + CuSO ₄	14,74	14,45	-	-	13,70	11,15
Gezonde grond . .	slecht bewerkt	13,72	8,4	13,87	9,12	-	-
" " " . .	goed bewerkt	14,74	10,43	15,61	9,63	14,74	12,62
" " " . .	slecht bewerkt + CuSO ₄	13,28	10,04	-	-	-	-

Of de in deze laatste beide proeven verkregen resultaten een gevolg zijn van de werkzaamheid van micro-organismen, is moeilijk te zeg-

gen, is echter naar aanleiding van de resultaten met waterculturen niet uitgesloten.

§ 5. *Maatregelen om het in de grond vastgelegde koper voor de plantengroei beschikbaar te maken*

Zoals reeds in het begin van dit hoofdstuk is aangetoond, is in de meeste gronden aanzienlijk meer koper aanwezig dan de planten noodig hebben. Het verhoogen van de bruikbaarheid van dit vastgelegde koper moet dus op gronden, die ontginningsziekte vertoonen, een gunstige uitwerking hebben. Achtereenvolgens zullen nu eenige maatregelen worden besproken, die de kopervoorziening van de planten bevorderen.

a. Steriliseeren van de zieke grond.

Reeds SMITH heeft proeven gedaan om zieke grond door stoomsterilisatie te genezen. Hiervoor steriliseerde hij in een stoomsterilisator bij 100° C drie keer gedurende telkens drie uur, met tusschenpoozen van 24 uur. Het resultaat was, dat een weinig zieke grond geheel was genezen, een middelmatig zieke bijna, terwijl bij een zeer zieke grond de ziekteverschijnselen zich in veel geringere mate voordeden. SMITH verklaart dit gunstige resultaat door aan te nemen, dat de gliedine, de schadelijke organische stof, die volgens hem de ziekte veroorzaakt, door de sterilisatie verdampt. Daar ik in hoofdstuk II en III van dit proefschrift meen te hebben aangetoond, dat de oorzaak van de ontginningsziekte te zoeken is in een tekort aan opneembaar koper, geloof ik de gunstige werking van de sterilisatie te moeten zoeken in een vergrooting van de hoeveelheid voor de plant opneembaar koper. Hetzelfde ziet men gebeuren met andere voedingsstoffen, die na een stoomsterilisatie in aanzienlijk grootere hoeveelheden door de planten kunnen worden opgenomen (RUSSELL (62), WAKSMAN (86)). Ook JØRGENSEN (38) constateerde de gunstige werking van stoomsterilisatie bij gronden, waarop ontginningsziekte voorkwam. Met chemische middelen gelukte het hem niet, verbetering te krijgen. De door hem gebruikte preparaten waren: zwavelkoolstof, sublimaat, formaline en toluol. In tegenstelling met JØRGENSEN kon BRANDENBURG (10) wel een verbetering constateren na behandeling van een zieke grond met uspulun en formaline. Zelfs het drogen aan de buitenlucht bleek in dit onderzoek reeds een gunstig resultaat te hebben.

Ook door mij kon een belangrijke verbetering door stoomsterilisatie

worden verkregen. De zeer zieke grond uit Nieuw Trimunt werd hiervoor in de cultuurecilinders op twee achtereenvolgende dagen telkens een half uur op 115° C gesteriliseerd. Na afloop werd van een aantal potten de grond flink bewerkt en geënt met plm. 10 gram van de niet behandelde grond; bij de andere gebeurde dit niet. Vervolgens werd gerst gezaaid. In de niet behandelde grond werden de planten na betrekkelijk korte tijd ziek. In de gesteriliseerde daarentegen waren ziekteverschijnselen niet waarneembaar. De korrelvorming was echter in die potten, die na de sterilisatie geënt waren, beter dan in de niet geënte (vergelijk tabel 31). Dit is vermoedelijk een gevolg van de intensieve afbraak van organische stof, die men in gesteriliseerde grond na enten met micro-organismen steeds kan waarnemen.

Tabel 31

Invloed van het steriliseeren van ontginningszieke grond op de vorming van droge stof door gerst

Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Onbehandeld	—	4,98
„	—	7,67
Gesteriliseerd	1,87	5,33
„	1,88	5,34
„	1,21	5,38
„ daarna geënt	3,39	4,71
„ „ „	3,74	4,45
„ „ „	4,02	5,23

De totale hoeveelheid koper in de zieke planten was gemiddeld $9\frac{1}{2}$ γ per cultuur. Bij die in de gesteriliseerde grond was dit $15\frac{1}{2}$ γ . Door het enten van de gesteriliseerde grond was de hoeveelheid in de planten aanwezig koper niet hoger geworden, zoodat de hoogere korrelopbrengsten van deze potten blijkbaar niet aan een betere kopervoorziening moeten worden toegeschreven. In tegenstelling tot de resultaten met gerst kon met de Aspergillusmethode, direct na het steriliseeren, geen verhooging van het bruikbare koper worden aangetoond.

b. *Behandeling van de grond met alcohol en aceton.*

Door KUIPERS konden zeer gunstige resultaten worden verkregen door de grond te overgieten met alcohol of aceton. Drie weken later

werd de alcohol zonder verwarming, door blootstellen aan de lucht, verdampt, waarna de grond voor de potproeven werd gebruikt. Tabel 32 geeft de door KUIPERS verkregen resultaten.

Tabel 32

*Invloed van de behandeling van ontginningszieke grond met alcohol en aceton
Proefgewas witte haver*

Herkomst van de grond	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Nieuw Trimunt A. . .	Onbehandeld	0,2	5,3
" " " . .	"	0,2	6,0
" " " . .	" + CuSO ₄	9,2	11,8
" " " . .	3 weken met alcohol	7,7	13,2
" " " . .	3 " " "	7,2	12,3
" " " . .	3 " " " + CuSO	8,8	12,9
" " " . .	3 " " " + CuSO ₄	10,0	13,1
" " " . .	3 weken met aceton	7,7	12,9
" " " . .	3 " " "	4,3	14,0
" " " . .	1 jaar na de alcoholbehandeling	1,8	16,3
" " " . .	1 jaar na de acetonbehandeling	3,1	15,8
Nieuw Trimunt B. . .	onbehandeld	0,3	19,6
" " " . .	"	0,2	17,4
" " " . .	" + CuSO ₄	14,6	14,8
" " " . .	" + CuSO ₄	15,4	13,9
" " " . .	3 weken met alcohol	10,8	11,8
" " " . .	3 weken met aceton	9,8	13,1
Wolfheze	onbehandeld	0,9	9,0
"	"	0,2	7,9
"	" + CuSO ₄	12,5	14,0
"	3 weken met alcohol	5,6	11,9
"	3 " " "	5,3	13,5

We zien, dat deze behandeling de zieke grond bijna geheel gezond heeft gemaakt. Dat deze verbetering echter slechts van tijdelijke aard is geweest, blijkt uit de resultaten, in het tweede jaar na de behandeling verkregen. De behandelde grond was toen slechts weinig beter dan de onbehandelde. De oorzaak van deze gunstige werking moet ongetwijfeld worden gezocht in een verbetering van de kopervervoering van de planten. Dit blijkt uit door KUIPERS verrichte koperbepalingen in planten, gegroeid in de niet en wel behandelde gronden. Deze planten, die geoogst waren op het moment van ziek worden, bevatten op de behandelde gronden ongeveer twee maal zooveel koper als op de niet behandelde. Een jaar later, toen de gunstige werking van de alcoholbehandeling niet meer waarneembaar was, was ook dit verschil

in voor de plant opneembaar koper verdwenen. Of de verhooging van het beschikbare koper een gevolg is van de sterilisatie, die door de alcohol- en acetonbehandeling veroorzaakt wordt, of dat nog andere factoren aanwezig zijn, is zonder nader onderzoek niet uit te maken. Dat toevoer van koper met de chemicaliën zal hebben plaats gevonden lijkt onwaarschijnlijk. In dit geval toch zouden zoowel alcohol als aceton een aanzienlijke hoeveelheid koper moeten hebben bevat. Ofschoon het niet mogelijk is het kopergehalte van de door KUIPERS gebruikte chemicaliën te vermelden, bleek de door mij onderzochte handelsalcohol slechts 10 γ Cu per liter te bevatten. In een door mij verrichte proef, waarbij de alcohol tweemaal uit een glazen toestel was gedestilleerd, bleek, dat bij de zeer zieke grond uit Nieuw Trimunt een alcoholbehandeling gedurende 12 uur het voor de schimmel bruikbare koper verhoogde van 0,2 tot 0,4 γ per gram grond.

c. Invloed van verbetering der structuur van de zieke grond.

Zooals we op blz. 78 gezien hebben, is de kopervoorziening in goed bewerkte grond in sommige gevallen beter dan in slecht bewerkte. Men zal dus, uitgaande van de daar vermelde proeven, kunnen verwachten, dat ook op zieke akkers onder bepaalde omstandigheden een goede grondbewerking de beschikbaarheid van koper kan verbeteren.

Volgens CLEVERINGA (16) kan men dergelijke resultaten in de landbouwpraktijk herhaaldelijk aantreffen. Aan de hand van veldervaringen en proefveldresultaten heeft hij getracht duidelijk te maken, dat de structuur van de grond, die voor een belangrijk deel door de wijze van bewerken wordt bepaald, van zeer groote beteekenis is voor de gezondheidstoestand van de gewassen. Dit zou niet alleen voor talrijke voedingskwesties gelden, maar in verband daarmee ook voor vele parasitaire aantastingen. Ontginningsziekte is volgens CLEVERINGA zeer vaak een gevolg van een slechte structuur en het is volgens hem mogelijk, door verbetering van de structuur de hoeveelheid beschikbaar koper te vergrooten.

We zullen nu deze theorie aan een nadere beschouwing onderwerpen. Zooals we boven hebben gezien, is in verschillende gronden niet het totale koper, maar het opneembare koper in onvoldoende mate aanwezig. Door ingrijpende behandelingen (verhitting, alcoholbehandeling enz.) gelukt het inderdaad, de hoeveelheid beschikbaar koper te vergrooten. Is dit nu ook mogelijk door minder krachtige maatregelen, die ook door de boeren uitgevoerd kunnen worden? CLEVERINGA wil

dit doen door het scheppen van gunstige voorwaarden voor een krachtig microbenleven. Hierdoor zouden ook de geconserveerde voedingsstoffen uit hun isolement worden verlost en voor de planten beschikbaar komen. Om deze krachtige flora van micro-organismen te krijgen, is toevoer van organische stof noodig. Dit kan gebeuren in de vorm van stalmest, of als groenbemesting. Men komt nu echter voor de moeilijkheid te staan, dat stalmest ook meer of minder koper in de grond brengt, zoodat men bij het constateeren van een verbetering niet kan uitmaken, of deze een gevolg is van het vrijkomen van reeds aanwezig koper of van een toevoer van deze stof met de stalmest.

Bij gebruikmaking van groenbemesting, waarmee eveneens gunstige resultaten door *CLEVERINGA* zijn geconstateerd, ontbreekt deze toevoer van buiten. Men moet hier echter, vooral wanneer het gewas, dat voor de groenbemesting wordt gebruikt, diep wortelt, zooals b.v. lupinen, rekening houden met de mogelijkheid, dat koper uit de diepere lagen wordt opgenomen, in de groene deelen terecht komt en na verrotting hiervan ter beschikking van het volgende gewas komt.

Ofschoon het voor het practische resultaat van de groenbemesting weinig of niets afdoet, of het aanwezige materiaal uit boven- of ondergrond stamt, is het voor de theoretische verklaring wel van belang. In het laatste geval toch heeft men niet te maken met een mobilisatie van in de bouwvoor reeds aanwezig, moeilijk opneembaar koper, maar met een verrijking van de bouwvoor ten koste van de ondergrond. Dat deze laatste factor inderdaad van belang kan zijn, blijkt uit een door *RADEMACHER* (58) genomen proef met gele lupinen. Gekweekt in een pot met zieke grond was de plant zeer gevoelig voor ontginningsziekte; in het vrije veld slechts weinig. De oorzaak van dit verschijnsel is volgens *RADEMACHER* hierin te zoeken, dat op het veld de planten diepe lagen kunnen bereiken, waar de kopervoorziening beter is dan in de bouwvoor.

Daarnaast heeft men te maken met het feit, dat de eene plantensoort beter in staat is koper uit moeilijk oplosbare verbindingen op te nemen dan de andere. Met het gebruik van eerstgenoemde planten voor de groenbemesting zal men dus betere resultaten kunnen verwachten dan met de laatste.

Een andere factor, waarmee men nog rekening moet houden, is, dat de betere koperopneming een gevolg kan zijn van een betere beworteling van de planten in gronden met goede structuur. Hierdoor wordt het aanrakend oppervlak van plant en grond aanzienlijk vergroot, wat een verhoogde koperopneming tengevolge kan hebben.

Ik kan in dit verband nog een tweetal proeven vermelden, die ten doel hadden, de werking van een groenbemesting resp. een toevoer van organische stof te leeren kennen. Voor de groenbemesting werd gebruik gemaakt van een veldproef op zwaar ontginningszieke grond in Nieuw Trimunt. In 1936 werden op dit proefveld gele lupinen gezaaid, die een zeer goed gewas leverden, dat op het onbehandelde deel slechts weinig slechter was dan op het met koper bemeste. In het voorjaar van 1937 werden de lupinen ondergeploegd, waarna eenige tijd later haver gezaaid werd. Na eenige maanden, toen de haver hevig ziek werd, was een gunstige invloed van de groenbemesting niet merkbaar.

De andere proef had de bedoeling, de kopervoorziening van de planten te verbeteren door verhooging van de microbiologische werkzaamheid in de grond. Om iedere toevoer van koper met deze organische stof te voorkomen, werd gebruik gemaakt van mycelia van *Aspergillus niger*, gegroeid in kopervrije voedingsoplossingen. Behalve deze mycelia, die vóór toevoeging in een mortier werden fijn-gemalen, werd ook de voedingsoplossing, waarin de schimmel was gegroeid, toegevoegd. De aldus behandelde grond werd gebracht in glazen cylinders en bleef eenige maanden bij 20° C staan. Daarna werd gerst gezaaid. Ook bij deze proef kon geen verbetering door de toevoer van organische stof worden geconstateerd. In beide gevallen waren de planten zeer ziek; korrels werden niet gevormd, terwijl de gemiddelde stroo-opbrengst van 2 potten met organische stof was 7,4 g, van de onbehandelde 6,3 g. Er moet op worden gewezen, dat het juist deze grond is, waarmee gunstige resultaten door sterilisatie en alcoholbehandeling konden worden verkregen.

Hoewel het niet onmogelijk is, dat verbetering door de toevoer van organische stof pas later tot uiting komt, blijkt uit deze negatieve resultaten wel, dat men zich van het verbeteren van zwaar zieke grond op deze manier niet al te veel moet voorstellen.

Anders echter staat het met de weinig zieke gronden. Het is zeer goed denkbaar, dat men juist op deze gronden, waar dikwijls voldoende koper aanwezig is, met de door CLEVERINGA aangegeven middelen belangrijke resultaten zal kunnen bereiken. De proeven op blz. 78 met weinig zieke grond wijzen sterk in deze richting.

d. Beïnvloeding van de kopervoorziening der planten door enkele mesistoffen.

Reeds in de onderzoekingen van HUDIG komt de nadeelige werking

van CaCO_3 op ontginningszieke gronden voor den dag. Ook in de boven besproken potproeven met haver, tarwe en kanariezaad komt deze tot uiting. De oorzaak van dit verschijnsel zal vermoedelijk zijn te zoeken in een verminderde koperopneming bij verhooging van de pH. Dat niet het calcium hier werkzaam is, blijkt uit proeven van KUIPERS, die bij bemesting met CaSO_4 geen ongunstige invloed kon waarnemen. Ook in waterculturen met weinig koper kon door mij geen nadeelige werking van de toevoeging van CaCl_2 worden geconstateerd.

Wanneer een verhooging van de pH van de grond nadeelig is voor de oplosbaarheid van het koper, is het denkbaar, dat meststoffen, die alkalivormend werken, (NaNO_3), de ziekte verergeren, terwijl anderzijds zuurvormende meststoffen, ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), gunstig werken. Om dit te onderzoeken werd de zeer zieke grond uit Nieuw Trimunt bemest resp. met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en NaNO_3 , beide preparaten *pro analysi* van KAHLBAUM.

Zooals uit tabel 33 blijkt, was de invloed van de verschillende bemesting inderdaad zeer duidelijk waarneembaar; de opbrengstverhoging door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ t.o.v. NaNO_3 was zelfs meer dan 50%. Of we naast de invloed van de pH-verandering hierbij ook nog moeten denken aan een invloed van de zouten als zoodanig, is uit deze proef niet op te maken.

Tabel 33

Invloed van de aard van de stikstofbemesting op de kopervoorziening in ontginningszieke gronden

Herkomst van de grond	Stikstofbemesting	Korrel in g	Stroo in g
Nieuw Trimunt	NaNO_3	0	9,46
" "	"	0,15	11,62
" " + CuSO_4	"	16,45	16,53
" "	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,24	14,76
" "	"	1,61	16,79
" " + CuSO_4	"	18,63	17,41

e. *Aanhangsel. Invloed van het kopergehalte van het zaaizaad en van de behandeling van het zaad met kopersulfaat op de verschijnselen van ontginningsziekte.*

Tenslotte wil ik nog wijzen op twee maatregelen om het kopergehalte der planten te verhooen, zonder dat men de bruikbaarheid van het in de grond aanwezige koper verbetert: 1e het gebruik van

zaaizaad met een hoog kopergehalte en 2e het behandelen van het zaad met een oplossing van kopersulfaat. De beteekenis dezer maatregelen blijkt uit de volgende proeven.

In een proef met zomerrogge in watercultuur werd gebruik gemaakt van zaad, dat afkomstig was van planten, die gegroeid waren in voedingsoplossingen met resp. 10 en 200 γ koper¹⁾ per cultuur. Het bleek nu, dat de planten, die zich ontwikkeld hadden uit het zaad met het lage kopergehalte, de gebrekssymptomen in veel ernstiger mate vertoonden dan die, welke uit het koperrijke zaad groeiden (fig. 22 en 23, tabel 34). Dat het hier alleen een verschil in kopergehalte betrof, werd bewezen door het feit, dat bij toediening van 100 γ koper deze verschillen niet aanwezig waren.

Tabel 34

Invloed van het kopergehalte van het zaaizaad op de vorming van droge stof bij rogge in voedingsoplossingen zonder en met 100 γ koper

Zaaizaad	Voedingsoplossing	Korrel in g	Stroo in g
Arm aan koper	geen koper	0	2,33
Rijk " "	" "	0	7,58
Arm " "	100 γ Cu ¹⁾	2,99	10,12
Rijk " "	100 γ Cu	2,92	9,37

Bij een tweede proef werd zomergerst, eveneens afkomstig van planten, die in waterculturen bij aanwezigheid van weinig en veel koper waren gegroeid, uitgezaaid in ontginningszieke grond. Ook hier was een gunstige werking van het in het zaad aanwezige koper duidelijk waarneembaar. Toch was deze hoeveelheid veel te klein om gezonde planten te leveren (zie tabel 35).

Tabel 35

Invloed van het kopergehalte van het zaad op de vorming van droge stof bij gerst, gegroeid in ontginningszieke grond

Zaaizaad	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Arm aan Cu	-	0	7,36
Rijk " "	-	0,1	10,54
Arm " "	50 mg CuSO ₄ per pot	18,27	17,38
Rijk " "	50 mg CuSO ₄ per pot	14,8	15,52

¹⁾ Om beschadigingen te voorkomen werd het koper toegediend bij hoeveelheden van 25 γ telkens met tusschenpoozen van 1 à 2 weken.

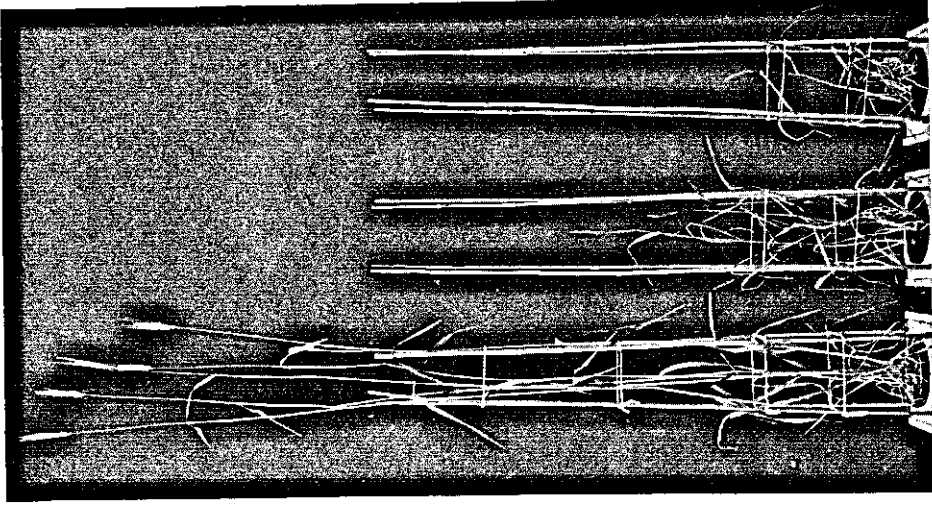


Fig. 22

Rogge in watercultuur;
Zaaizaad arm aan koper; rechts en midden zonder, links met
0,4 mg. kopersulfaat.

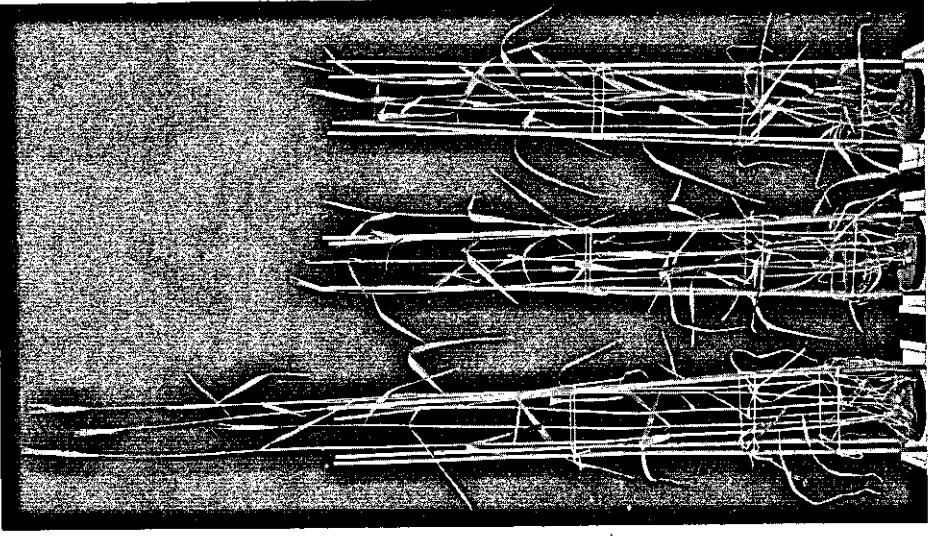


Fig. 23

Rogge in watercultuur;
Zaaizaad rijk aan koper; rechts en midden zonder, links met
0,4 mg kopersulfaat.

Uit deze beide proeven volgt, dat het in de zaden aanwezige koper wel een zekere beteekenis voor de planten heeft, maar dat deze hoeveelheid toch geheel onvoldoende is, om op zieke gronden gezonde planten te leveren.

Door de zaden vóór de zaai gedurende 24 uur met een oplossing van 0,3% kopersulfaat te behandelen, kon eveneens een opbrengstverhoging worden verkregen. Echter was ook nu (vergelijk tabel 36) van een gezonde plantengroei geen sprake. Toch zijn de verkregen opbrengstverhogingen van dien aard, dat een verder onderzoek in deze richting gewenscht is. Vooral op minder zieke gronden kan men op deze manier misschien goede resultaten verkrijgen.

Tabel 36

Invloed van een behandeling van het zaai zaad met een oplossing van 0,3% CuSO₄ op de vorming van droge stof bij gerst en tarwe, gegroeid in zieke grond

Plantensoort	Behandeling	Korrel in g	Stroo in g
Zomergerst	—	0	12,03
”	zaad met CuSO ₄	0,63	19,25
”	grond met CuSO ₄	15,85	9,06
Zomertarwe	—	0	7,33
”	zaad met CuSO ₄	0,50	13,70
”	grond met CuSO ₄	12,49	12,50

§ 6. *Bespreking van de in hoofdstuk IV verkregen resultaten*

De in dit hoofdstuk verkregen resultaten toonen aan, dat het gehalte aan opneembaar koper van een grond niet parallel gaat met de totale hoeveelheid koper, die aanwezig is, maar afhangt van de hoeveelheid organische stof en vooral van de hoedanigheid hiervan. Bij een zelfde hoeveelheid koper zal de grond des te meer ziek zijn naarmate meer organische stof aanwezig is en naarmate deze meer het type van het zwarte heide- resp. turfveen nadert. Zeer goed komt deze beteekenis van de organische stof te voorschijn bij vergelijking der resultaten met uitgegloeid kwartzand en met zieke grond. Eerstgenoemd materiaal geeft reeds een goede groei bij toediening van 200 γ koper op 1 kg zand (hoofdstuk II), d.i. een hoeveelheid van 0,2 γ op 1 g zand. In hoofdstuk III is echter gebleken, dat alle gronden met 0,2 γ door *Aspergillus* opneembaar koper in sterke mate de ontginningsziekte vertoonen. Deze schijnbare tegenstrijdigheid is een gevolg van het feit, dat practisch alle cultuurgronden een zekere hoe-

veelheid organische stof bevatten, terwijl dat met het uitgegloeide zand niet het geval is. Hierdoor blijft het koper in dit kwartzand min of meer beweeglijk, d.w.z., dat ook koper door de planten wordt opgenomen uit zand, dat niet in de onmiddellijke omgeving der wortels is gelegen. Deze mogelijkheid zal bij de grond echter grootendeels uitgesloten zijn en wel des te meer naarmate meer van de zwarte veenhumus aanwezig is, die het koper zelfs zoo kan binden, dat *Aspergillus niger* en vermoedelijk ook de plantenwortels het niet kunnen opnemen.

Deze redeneering verklaart ook de gunstige resultaten, die men in de practijk verkrijgt met de bedekking van zieke gronden met zand uit de ondergrond. Hoewel dit zand, voor zoover door mij is onderzocht, arm is aan koper, is de uitwerking van deze maatregel vaak zeer gunstig. Waarschijnlijk is dit een gevolg van het feit, dat het weinige in het zand aanwezige koper goed beschikbaar is voor de plantengroei, terwijl ook het met de gewone bemestingszouten, als verontreiniging, aangevoerde koper voor een groot deel kan worden benut.

In verband met dit resultaat is eenige voorzichtigheid geboden bij het gebruik van de *Aspergillus*methode bij gronden, die uit zuiver zand bestaan. In dit geval kan men bij een laag „*Aspergillus*cijfer” een, in verhouding hiermee, te goede plantengroei verwachten.

Dat micro-organismen onder bepaalde omstandigheden koper kunnen vastleggen, hebben we in § 4 gezien. Hoewel het zeer goed denkbaar is, dat deze werking ook in de grond kan worden uitgeoefend, is het bewijs hiervoor niet geleverd.

In § 5 worden verschillende maatregelen genoemd om het in de grond aanwezige koper beter voor de planten beschikbaar te maken. Tot deze maatregelen behooren: sterilisatie, behandeling met chemicaliën, zooals alcohol en aceton, verbetering van de structuur en toediening van stikstof in de vorm van ammoniumsulfaat. Tenslotte wordt nog gewezen op de beteekenis van het in het zaad aanwezige koper en op de mogelijkheid om het koper, in plaats van aan de grond, aan de zaden toe te dienen.

HOOFDSTUK V

VERSCIJNSELEN, DIE SAMENHANGEN MET DE KOPERVOORZIENING VAN DE PLANTEN

§ 1. *Het verband tusschen ontginningsziekte en veenkoloniale haverziekte*

In hun laatste publicatie over de ontginningsziekte wijzen HUDIG, MEYER en GOODIJK (36) erop, dat op met kalk behandelde ontginningszieke gronden, die met kopersulfaat genezen zijn, de planten vaak de verschijnselen van de zgn. veenkoloniale haverziekte vertoonen. Ook KUIPERS heeft dit geconstateerd, terwijl ik in eigen proeven eveneens het verschijnsel heb waargenomen. Van deze ziekte, die door HUDIG en SJOLLEMA reeds in 1909 beschreven is (37), weet men, dat ze vooral dan te voorschijn komt, wanneer de reactie van de grond neutraal tot zwak alkalisch is. Verder is de aanwezigheid van organische stof van belang. Het waren vooral de humushoudende veenkoloniale dalgronden, waar door het langdurige gebruik van Chilisalpeter de grond neutraal tot zwak alkalisch was geworden, dat de haver en ook de andere granen in hevige mate van deze ziekte te lijden hadden.

De meest kenmerkende symptomen van de ziekte zijn: het verschijnen van necrotische vlekken op de bladen, die bij haver vooral gelocaliseerd zijn in het middelste gedeelte van het blad. Vaak zijn de bladen hier ingesnoerd en geknikt. Opvallend is, dat de toppen van dergelijke bladen nog zeer lang groen kunnen blijven. In ernstige gevallen leveren de zieke planten geen zaad.

Door HUDIG en medewerkers is geconstateerd, dat men de ziekte kan genezen met zuurreagerende stoffen. Een ander middel bleek te zijn mangaansulfaat, dat, toegediend kort voor het zaaien van de granen, eveneens gezonde planten kon leveren. De werking van $MnSO_4$ is meestal slechts van korten duur. De verlaging van de pH daarentegen geeft blijvende genezing.

Talrijk zijn de verklaringen, die in de loop der jaren zijn gegeven voor de oorzaak van de veenkoloniale haverziekte. Een overzicht hiervan vindt men bij GERRETSEN (29).

Een nieuw licht werd in 1929 op het probleem geworpen door het

onderzoek van SAMUEL en PIPER (63, 64). Deze onderzoekers konden aantonen, dat men de verschijnselen van de veenkoloniale haverziekte, („grey speck disease”), kon verkrijgen, door planten te laten groeien in een voedingsoplossing, die zorgvuldig van mangaan bevrijd was. Werden echter enkele milligrammen $MnSO_4$ per cultuur toegediend, dan groeiden de planten geheel normaal. Nadat gevonden was, dat ook zieke planten steeds een veel lager mangaangehalte hadden dan gezonde, kwamen ze tot de conclusie, dat de oorzaak van de ziekte een gevolg is van een tekort aan opneembare mangaanverbindingen. Wat de oorzaak is van het niet opneembaar zijn van het vaak in belangrijke hoeveelheden aanwezige mangaan weten SAMUEL en PIPER niet.

In dit verband kan er op worden gewezen, dat door SÖHNGEN (74) reeds in 1914 het vermoeden is uitgesproken, dat de veenkoloniale haverziekte een gevolg is van een tekort aan opneembare mangaanverbindingen. De oorzaak van het vastleggen van mangaan ziet hij in de eigenschap van sommige micro-organismen, oplosbare mangaanverbindingen te kunnen omzetten in onoplosbaar mangaanoxijde.

Het is tenslotte GERRETSEN geweest, die de betekenis van micro-organismen bij het te voorschijn komen van mangaangebrek duidelijk heeft aangetoond. Het bleek hem, dat het mogelijk was gezonde planten te krijgen op zieke grond, die door middel van een formalinebehandeling steriel was gemaakt en die gedurende de groei steriel werd gehouden. Werd deze steriele grond echter gemengd met een kleine hoeveelheid niet gesteriliseerde zieke grond, dan werden de planten spoedig ziek. De opgenomen hoeveelheid mangaan bleek in het laatste geval 78% te zijn gedaald. Verder bleek, dat in steriele, mangaanarme waterculturen de planten wel iets slechter groeiden dan bij aanwezigheid van mangaan, maar de typische ziekteverschijnselen bleven achterwege. Werden deze mangaanarme culturen echter geënt met een weinig zieke grond of met een worteltopje van een zieke plant, dan kwamen in korte tijd de ziekteverschijnselen voor den dag.

Volgens GERRETSEN is het aandeel der micro-organismen bij het tot stand komen van deze ziekteverschijnselen tweeledig. In de eerste plaats kunnen zij bij geschikte zuurgraad (pH 6,3–7,8) oplosbare mangaanverbindingen in onoplosbare omzetten. In de tweede plaats bleek het wortelstelsel van mangaanarme planten veel gevoeliger voor microben-aantasting te zijn, dan dat van planten, die over voldoende mangaan beschikten. Men moet zich volgens GERRETSEN voorstellen,

dat deze sterke aantasting der wortels door microben aanleiding is tot de vorming van bepaalde stoffen, die, opgenomen door de plant, oorzaak zijn van de vorming der typische bladvlekken, die bij de zieke graanplanten steeds aanwezig zijn.

Behalve door SÖHNGEN en GERRETSEN, is door BEIJERINCK (7) en VON WOLZOGEN KÜHR (94) aangetoond, dat de mangaanvastlegging door micro-organismen een gevolg is van de oxydatie van oplosbare mangaanzouten tot onoplosbare mangaanoxiden. Bij nadere beschouwing blijkt deze mangaanoxydatie op verschillende manieren tot stand te kunnen komen. In de eerste plaats, zooals door BEIJERINCK en door VON WOLZOGEN KÜHR is beschreven, door bacteriën en schimmels, die de bij het mangaanoxydatieproces vrijkomende energie kunnen gebruiken voor de opbouw van hun cellen. Men kan deze organismen kweken op agarplaten met minerale zouten en mangaancarbonaat, waaraan verder nog een weinig natriumacetaat is toegevoegd. Bacteriën geven op dergelijke voedingsbodems kleine zwartbruine kolonies; schimmels groeien meest over een groot deel van de plaat, daarbij groote zwartbruine vlekken van bruinsteen vormend. Naast deze zuiver biologische omzetting kunnen micro-organismen ook indirect een rol spelen bij de chemische oxydatie. Deze chemische mangaanoxydatie geschiedt volgens VON WOLZOGEN KÜHR in gefiltreerd duinwater, waardoor lucht wordt geblazen, alleen bij een pH van 10 en hooger. Door SÖHNGEN is nu aangetoond, dat oxy-zuren in staat zijn deze chemische oxydatie belangrijk te versnellen, waardoor ook bij lagere pH-waarden dan de bovengenoemde deze omzetting tot stand kan komen. SÖHNGEN toonde dit aan door stukjes NaHCO_3 te leggen op agarplaten, waaraan was toegevoegd 2% MnSO_4 en 2% calciumgluconaat of een ander oxyzuur-zout. Na korte tijd vormde zich op dergelijke platen om het NaHCO_3 een donkerbruin veld van mangaanoxiede. Dit geschiedde niet, wanneer geen oxyzure zouten aanwezig waren: noch vetzure, noch anorganische zouten, konden de mangaanoxydatie bevorderen. Ook verschillende bacteriesoorten kunnen deze omzetting bewerkstelligen en SÖHNGEN schrijft deze werking toe aan de verhooging van de pH, die ze op deze voedingsbodems veroorzaken en die bij aanwezigheid van oxyzuren aanleiding is tot de mangaanoxydatie. De bacteriewerking is in dit geval dus blijkbaar indirect. Het is van belang te weten of ook in de grond deze tweede manier van mangaanvastlegging voorkomt. Wanneer dit het geval blijkt te zijn, zal het niet langer noodig zijn, dit proces alleen aan specifieke mangaanorganismen toe

te schrijven, indien tenminste op de aanwezigheid van oxyzuren mag worden gerekend. Waarschijnlijk is dit het geval, aangezien uit het onderzoek van SÖHNGEN gebleken is, dat bij de aerobe afbraak van cellulose oxyzuren ontstaan. Verder bleek, dat talrijke gewone bodembacteriën, als *Azotobacter chroococcum*, *B. coli*, *B. aerogenes* en *B. herbicola*, op platen van bovengenoemde samenstelling mangaanoxijde kunnen vormen.

Door een grondsuspensie uit te strijken op een agarvoedingsbodem met minerale zouten, $MnCO_3$ en 1% calciumcitraat kon ik talrijke bruinzwarte bacteriekolonies verkrijgen. Deze bacteriën, overgebracht op platen van dezelfde samenstelling, waarin calciumcitraat vervangen was door calciumacetaat, vormden daar witte kolonies; m.a.w. alleen bij aanwezigheid van het oxyzure zout kunnen ze mangaan onoplosbaar maken.

We zullen nu terugkeeren tot het uitgangspunt van dit hoofdstuk en aan de hand van het bovenstaande een verklaring trachten te geven voor het geconstateerde feit, dat bemesting met koper op ontginningszieke grond in sommige gevallen de veenkoloniale haverziekte doet verschijnen.

In de eerste plaats is het denkbaar, dat in dergelijke gronden naast een tekort aan opneembaar koper ook een tekort aan opneembaar mangaan aanwezig is; in de tweede plaats, dat het koper de vastlegging van mangaan bevordert. Hoewel de eerstgenoemde oorzaak in bepaalde gevallen aanwezig zal zijn, is zij niet in staat alle waargenomen verschijnselen te verklaren. Zoo vermelden HUDIG en MEYER, dat de door kopersulfaatbemesting veroorzaakte veenkoloniale haverziekte zeer moeilijk door $MnSO_4$ te genezen is. Men zou hieruit kunnen concluderen, dat het gegeven mangaansulfaat zeer snel onwerkzaam wordt gemaakt. In dit verband kan ook worden gewezen op een onderzoek van WILLIS en PILAND (90), die een zeer gunstig resultaat constateerden van een bemesting met kopersulfaat op mangaan- en ijzerhoudende vulcanische gronden in Noord-Carolina en Virginia. De planten groeiden op deze gronden zeer slecht, wat volgens genoemde onderzoekers een gevolg zou zijn van een te hoog mangaangehalte. De gunstige werking van het kopersulfaat schrijven zij toe aan een verminderde oplosbaarheid van het mangaan.

Dat een toediening van kopersulfaat de microbiologische mangaanoxijdatie bevordert, zullen we in hoofdstuk VI zien. Het betreft hier mangaanoxijdeerende schimmels, die op koperarme agarvoedingsbodems, waaraan minerale zouten, $MnCO_3$ en CH_3COONa zijn toe-

gevoegd, aanzienlijk minder bruinsteen vormen dan bij toevoeging van 5 γ koper per plaat. Het is zeer goed mogelijk, dat in de koperarme grond de toediening van kopersulfaat dezelfde uitwerking heeft als op de agarvoedingsbodems. Het bewijs hiervan is echter nog niet geleverd.

Bij de chemische mangaanoxydatie (onderzocht volgens de boven beschreven methode van SÖHNGEN) kon een gunstige invloed van een kopertoevoeging niet worden geconstateerd.

Om het verband tusschen de koper- en mangaanvoorziening nader te leeren kennen, werden waterculturen aangezet met verschillende hoeveelheden koper, gecombineerd met verschillende hoeveelheden mangaan. De eerste proef werd genomen met gerst als proefplant. Koper werd gegeven in hoeveelheden van 0, 2, 10 en 300 γ Cu per cultuur, terwijl bij mangaan deze hoeveelheden waren: 0,015, 1,5 en 100 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ per cultuur.

De verschijnselen van mangaangebrek bij de culturen met 0,015 mg MnSO_4 kwamen reeds vrij spoedig te voorschijn. De planten waren zeer slap, kregen lichtgroene bladen, waarop talrijke grijsgele necrotische vlekjes verschenen. In sommige gevallen waren deze vlekjes meer op het middelste gedeelte van de bladen aanwezig, soms kwamen ze echter over het geheele blad verspreid voor. Een opvallend kenmerk was verder het om de lengteas schuitvormig samengevouwen zijn van het onderste derde deel van de bladen.

Van belang was, dat deze verschijnselen onafhankelijk van de koperconcentratie voorkwamen. Omgekeerd kan gezegd worden, dat de verschijnselen van kopergebrek onafhankelijk van de mangaanconcentratie waren. Bij de serie met 100 mg MnSO_4 werden na verloop van tijd de wortels geheel bruin gekleurd; dit gold vooral voor de hogere deelen, die zich gedeeltelijk boven de voedingsoplossing, gedeeltelijk in het bovenste deel hiervan, bevonden. Onder in de vloeistof waren ze geheel wit. Het merkwaardige was nu, dat deze bruine wortels niet aanwezig waren in de culturen zonder koper. We hebben hier blijkbaar te doen met een oxydatie van het mangaansulfaat tot mangaanioxyden, die door koper bevorderd wordt. Of deze omzetting een gevolg is geweest van micro-organismen, die op de wortels aanwezig waren, of door de plantencellen zelf uitgevoerd kan worden, is zonder nader onderzoek niet te zeggen.

De opbrengst aan droge stof van deze proef is in tabel 37 vermeld. Hieruit blijkt, dat de lage opbrengst, die bij afwezigheid van koper verkregen wordt, onafhankelijk is van de hoeveelheid mangaan, die in de voedingsoplossing aanwezig is; eveneens wordt de bij weinig

mangaan verkregen opbrengst niet beïnvloed door de hoeveelheid koper.

Tabel 37

Opbrengst aan droge stof van gerst, gekweekt in waterculturen met verschillende hoeveelheden mangaan en koper

Koper in γ	0,015 mg MnSO ₄		1,5 mg MnSO ₄		100 mg NnSO ₄	
	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g
0	0	2,01	0	1,23	0	1,60
2	0	2,57	0	3,96	0	3,40
10	0	3,01	0	10,91	0	7,82
300	0	2,87	7,57	11,86	5,63	10,10

In een tweede proef werden tarwe, gerst, rogge en haver als proefplanten gebruikt. De hoeveelheid mangaan was aanvankelijk bij alle culturen gelijk, nl. 0,2 mg MnSO₄ · 4 H₂O per cultuur. Koper werd gegeven in hoeveelheden van 0, 2, 10, 50 en 300 γ Cu per cultuur, uitgezonderd rogge, waar de hoogste gift 50 γ Cu was. Het verloop van deze proef was aanvankelijk, zooals dat reeds eerder voor culturen met opklimmende hoeveelheden koper was waargenomen (vergelijk blz. 16). Mangaangebrek was niet waarneembaar. Toen de planten ongeveer een maand oud waren, begonnen de roggeculturen met de grootste hoeveelheid koper (50 γ) eigenaardige verschijnselen te vertoonen. De planten werden lichtgroen en waren zeer slap, terwijl op de bladen talrijke witte necrotische vlekjes verschenen. Deze verschijnselen leken zeer veel op die van mangaangebrek. Bij de planten met 10 γ koper waren de verschijnselen niet aanwezig. Om te weten te komen of bij de culturen met 50 γ Cu inderdaad mangaangebrek aanwezig was, werd aan een deel der culturen 3 mg MnSO₄ toegevoegd. Reeds twee dagen later bleek de gunstige werking van deze toediening. Nieuwe stevige bladen werden gevormd, die een normale groene kleur vertoonden en geen necrotische vlekken kregen. Ongeveer een week later was de achterstand bij die met 10 γ koper bijna geheel ingehaald. Hoewel later nog weer zwakke verschijnselen van mangaangebrek waargenomen werden, zijn de planten normaal in aar gekomen en hebben ook korrels gevormd. Dit in tegenstelling tot de planten, die geen extra mangaan hadden ontvangen. Deze hebben geen aren gevormd en zijn reeds vroeg te gronde gegaan.

Bij de lagere koperconcentraties kwamen later ook geringe symptomen van mangaangebrek te voorschijn. Ze waren echter veel geringer dan bij aanwezigheid van 50 γ koper en ze verhinderden de

planten niet om aren te vormen, terwijl ook de droge stof opbrengst zooals uit tabel 38 blijkt, niet beïnvloed werd.

Tabel 38

Opbrengst aan droge stof van rogge, gekweekt in voedingsoplossingen met twee verschillende hoeveelheden mangaan en opklimmende hoeveelheden koper

Koper in γ	0,2 mg MnSO ₄		3 mg MnSO ₄	
	Korrel in g	Stroo in g	Stroo in g	Korrel in g
0	0	1,17	0	0,61
2	0	3,18	0	5,08
10	0,20	9,06	1,04	6,43
50	0	1,18	0,15	5,03

Uit deze proef volgt, dat 50 γ koper per cultuur in staat is, bij rogge in mangaanarme voedingsoplossing groeibeschedigingen te veroorzaken, die door toevoeging van MnSO₄ kunnen worden genezen en die dus waarschijnlijk door een tekort aan bruikbaar mangaan worden veroorzaakt. Bij lagere koperconcentraties is dezelfde hoeveelheid mangaan blijkbaar wel voldoende om normale groei te geven.

Of we hier te maken hebben met een onder invloed van de grootere koperconcentratie verhoogde microbiologische mangaanoxydatie of met een sterkere mangaanvastlegging in de plant, kan alleen door verder onderzoek worden uitgemaakt.

Niet te verklaren is, dat zich deze verschijnselen alleen bij rogge hebben voorgedaan en niet bij haver, gerst en tarwe, niettegenstaande deze planten gevoeliger voor mangaangebrek worden genoemd en niettegenstaande ze een nog aanzienlijk hogere kopergift hadden gekregen. Wel vertoonden deze planten lichte verschijnselen van mangaangebrek, maar een beïnvloeding hiervan door de koperconcentratie was niet waarneembaar. De opbrengstcijfers van deze proeven zullen daarom niet worden vermeld.

Tenslotte werd nog nagegaan of de toediening van een flinke gift kopersulfaat aan een grond, die geen kopergebrek vertoonde, de verschijnselen van mangaangebrek kon verergeren. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een perceel zwak alkalische tuingrond, waarop kanariezaad vrij duidelijk de verschijnselen van de veenkoloniale ziekte vertoonde. Op dit perceel werden strooken van 1 m breedte behandeld met resp. CuSO₄ en MnSO₄, naar 100 kg per ha, terwijl een deel onbehandeld werd gelaten. Dezelfde reeks werd aangelegd op zwak zuur reagerende grond, waarop de verschijnselen van man-

gaangebrek niet aanwezig waren. Inderdaad bleek op het alkalische perceel CuSO_4 schadelijk te hebben gewerkt; de verschijnselen van mangaangebrek, die zich bij kanariezaad uitten in een slap, lichtgroen gewas met necrotische vlekjes op de bladen, waren in sterkere mate aanwezig dan op de onbehandelde contrôlestrook. De toediening van MnSO_4 had, zooals te verwachten was, zeer gunstig gewerkt. Op het zure perceel, waar ook de onbehandelde strook een normaal gewas leverde, was een werking van mangaan- resp. kopersulfaat niet waarneembaar.

§ 2. Invloed van ijzer, zink en cadmium

In aansluiting op bovenstaande proeven over het verband tusschen koper en mangaan is vervolgens de invloed van verschillende hoeveelheden zink, ijzer en cadmium op de groei van gerst in waterculturen met opklimmende hoeveelheden koper onderzocht. De inrichting dezer proeven was dezelfde als bovenbeschreven. Koper werd gegeven in hoeveelheden van 0, 2, 10 en 200 γ Cu per cultuur, bij ijzer waren deze hoeveelheden 0,27, 40,6 en 88,45 mg Fe als $\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$, terwijl de culturen met de grootste hoeveelheid ijzer bovendien nog 1 g $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ontvingen en bij zink: 0,1 en 17 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ per cultuur.

a. De planten met de kleinste hoeveelheid ijzer vertoonden geelgroene bladen en hebben als gevolg daarvan een belangrijk lagere opbrengst aan droge stof geleverd. Tusschen de grootste en de normale hoeveelheid waren geen verschillen waarneembaar: in beide gevallen goede groei met donkergroene bladen. Een verband tusschen koper en ijzer was niet te constateeren: de verschijnselen van kopergebrek waren onafhankelijk van de ijzerconcentratie, en die van ijzergebrek onafhankelijk van de koperconcentratie (zie tabel 39).

Tabel 39

Opbrengst aan droge stof van gerst, gekweekt in waterculturen met verschillende hoeveelheden koper en ijzer

Koper in γ	0,27 mg Fe		40,6 mg Fe		88,45 mg Fe	
	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g
0	0	2,75	0	1,23	0	2,62
2	0	3,02	0	3,96	0	4,72
10	0	7,50	0	10,91	0	12,22
300	1,36	7,67	7,57	11,86	7,70	11,33

In tegenstelling tot deze resultaten met waterculturen is door WILLIS en PILAND (90, 92) geconstateerd, dat door toediening van kopersulfaat aan zeer ijzerhoudende gronden een verminderde ijzeropneming plaats vond. Dit zou een gevolg zijn van een door koper bevorderde omzetting van ferro- tot ferriverbindingen.

b. In de culturen zonder zink kwamen verschijnselen van zinkgebrek bij ongeveer één maand oude planten te voorschijn. De bladen waren iets lichter groen dan die met zink, terwijl ze om hun lengteas gedraaid waren. De groei was practisch stopgezet, terwijl eenige tijd later groote, onregelmatige, grijswitte, necrotische vlekken op de bladen ontstonden. Ook doode bladpunten waren aanwezig, die eenigszins gedraaid waren. Nadat een groot deel van de planten was afgestorven, vormden zich nieuwe scheuten, die echter zeer langzaam groeiden en kleine smalle blaadjes vormden, die onregelmatig van vorm waren en als kurkretrekkers gedraaid. Deze verschijnselen waren bij de grootste hoeveelheid koper in iets sterkere mate aanwezig dan bij weinig koper (zie tabel 40). Dat omgekeerd een groote hoeveelheid zink de werkzaamheid van het koper vermindert, is in deze proef, zooals ook uit de opbrengstcijfers te zien is, niet gebleken.

Tabel 40

Opbrengst aan droge stof van gerst, gekweekt in waterculturen met verschillende hoeveelheden koper en zink

Cu in γ	Zonder zink		1 mg ZnSO ₄		17 mg ZnSO ₄	
	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g
0	0	1,45	0	1,23	0	2,06
2	0	1,12	0	3,96	0	4,25
10	0	1,03	0	10,91	0	10,55
300	0	1,04	7,57	11,86	7,20	10,41

c. Cadmium werd in het onderzoek betrokken, omdat gebleken was, dat bij *Aspergillus niger* aanwezigheid van dit element de werking van koper kon verminderen.

Twee reeksen waterculturen met gerst werden aangezet resp. met 20 en 100 γ Cu per cultuur, waaraan cadmiumsulfaat in opklimmende hoeveelheden werd toegediend. Aanvankelijk waren deze hoeveelheden gering, daar volgens SCHARRE en SCHROPP (65) cadmium zeer schadelijk voor de hoogere planten zou zijn. Toen van een schadelijke werking niets bleek, werd de cadmiumconcentratie geleidelijk verhoogd, zoodat tenslotte per cultuur de volgende hoeveelheden

aanwezig waren: 0, 65, 105, 160, 570, 1180, 2000 en 3460 γ Cd als $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Ofschoon de planten met de grootste giften cadmium slechter groeiden en een lichter groene kleur hadden dan die van de contrôleculturen zonder cadmium, kan van een zeer groote giftigheid van dit element, zooals SCHARRER en SCHROPP die constateerden, toch niet gesproken worden. Ook een gunstige werking van zeer kleine hoeveelheden cadmium, zooals genoemde schrijvers vermelden, is door mij niet waargenomen.

Evenmin kon de antagonistische werking tusschen koper en cadmium, zooals die in zoo sterke mate bij de proeven met *Aspergillus niger* voor den dag kwam, worden geconstateerd (zie tabel 41).

Tabel 41

Opbrengst aan droge stof van gerst, gekweekt in waterculturen bij twee verschillende hoeveelheden koper en opklimmende hoeveelheden cadmium

Cd in γ	20 γ Cu per cultuur		100 γ Cu per cultuur	
	Korrel in g	Stroo in g	Korrel in g	Stroo in g
0	5,52	8,02	7,03	10,07
64	4,42	8,12	6,93	9,45
105	4,59	7,65	6,70	10,05
160	5,41	8,74	6,47	9,70
570	5,58	8,05	6,83	9,50
1180	5,65	8,55	6,45	9,95
2000	4,75	7,97	5,62	8,57
3460	4,44	8,08	5,49	10,34

Tenslotte kan nog worden vermeld, dat ook bij een proef in tuingrond met opklimmende hoeveelheden CdSO_4 de grootste hoeveelheid van dit zout een groeivertraging bij gerst veroorzaakte, die door toediening van kopersulfaat niet opgeheven kon worden.

§ 3. *Het verband tusschen de kopervoorziening der planten en de gevoeligheid voor parasitaire ziekten*

Toen eenige jaren geleden de tarweteelt zich op de zand- en veengronden sterk uitbreidde, constateerde men soms, dat het aanvankelijk goed groeiende tarwegewas tegen het rijpen een donkerbruine kleur kreeg en een slechte zaadopbrengst leverde. Bij onderzoek bleken de bovenste deelen van de halm en vooral de kafjes voorzien van chocoladekleurige vlekken, die volgens sommigen veroorzaakt zouden worden door de zwam *Septoria nodorum*. Men had de indruk,



Fig. 24
Aren van Trifolium-tarwe, bezet met
zwartbruine streepjes.

dat bepaalde omstandigheden, zooals legering door overmatige stikstofbemesting en dichte stand van het gewas de ziekteverschijnselen bevorderden, terwijl een gunstige werking geconstateerd werd van het toedienen van kopersulfaat. Een van de eerste plaatsen, waar de beteekenis van kopersulfaat in verband met deze verschijnselen geconstateerd werd, was te Gasselternijeven op het proefveld van Prof. J. ELEMA bij Gebrs. REILING.

Dit proefveld was aangelegd op een perceel vrij laag gelegen dalgrond, waarop bij tarwe in 1932 in sterke mate de boven beschreven verschijnselen aanwezig waren. Het bleek, dat men door het toedienen van flinke hoeveelheden kopersulfaat belangrijke verbeteringen kon krijgen. Het rijpe gewas vertoonde toen de normale gele strookleur, terwijl de zaadopbrengst belangrijk hooger was.

In de jaren 1935 en 1936 toen *Trifolium*-tarwe werd verbouwd, is dit proefveld herhaaldelijk door mij bezocht, terwijl de grond voor talrijke potproeven werd gebruikt. Zooals bij de bespreking dezer potproeven in de voorgaande hoofdstukken is gebleken, vertoonde de grond van dit proefveld een tekort aan opneembaar koper, waardoor de tarwe lichte verschijnselen van ontginningsziekte kreeg. Deze verschijnselen, die eenige weken voor het uitkomen van de aren te voorschijn kwamen, en die zich uitten in slappe bovenste bladen, traag uitgroeierende aren, gebogen halmen en langzame rijping, waren zoowel in de potproeven te Wageningen als op het proefveld waarneembaar. Hoewel de planten in de potproeven zonder koperbemesting wel een grauwere kleur hadden dan bij toevoeging hiervan, ontbraken de bruine vlekken, die op het proefveld in sterke mate aanwezig waren. Reeds drie à vier weken vóór de rijping begon hier de tarwe op de bovenste halmleden en op de aren bruine verkleuringen te vertoonen. Deze verschijnselen begonnen meestal met kleine, zwartbruine streepjes en vlekjes op de kelkkafjes, terwijl op de bovenste halmleden langgerekte bruinzwarte vlekken verschenen. Bij nader onderzoek bleken de zwarte streepjes te worden veroorzaakt door een verkleuring van de chlorophylbanen, die op gezonde kelkkafjes als groene streepjes te zien zijn. In een later stadium was ook het tusschen de streepjes gelegen weefsel vaak bruinzwart gekleurd, zoodat een groot deel van de kelkkafjes en ook een deel van de kroonkafjes deze kleur hadden. Een goed beeld van deze verschijnselen geeft fig. 24, waarop het ziektebeeld van links naar rechts in hevigheid toeneemt.

Het bleek nu, dat het begin van deze verschijnselen op zeer vele

planten aanwezig was, ook op die van de met kopersulfaat behandelde perceelen. In het laatste geval bleven ze echter grootendeels beperkt tot deze lichte verschijnselen, terwijl op de onbehandelde perceelen de uitbreiding tot de groote bruine vlekken plaats vond. Vooral in het laatst van de ontwikkeling, toen de planten met koper reeds rijp waren en die van het onbehandelde perceel nog niet, waren de verschillen vaak zeer karakteristiek. Het langer groen blijven van de koperarme planten is vermoedelijk een belangrijke factor bij de uitbreiding dezer verschijnselen.

Het hier beschreven ziektebeeld wordt hoogstwaarschijnlijk niet veroorzaakt door *Septoria nodorum*. Pycniden van deze zwam, die bij de straks te bespreken aantasting door *Septoria* steeds aanwezig zijn, ontbraken hier, terwijl het ook door talrijke isolatieproeven niet gelukt is, deze schimmel te verkrijgen. Bij uitstrijken van de aange-taste plantendeelen op verschillende voedingsbodems (vleeschagar + $\frac{1}{4}\%$ glucose, bouillonagar en moutagar) werden hoofdzakelijk bacteriën verkregen en daarnaast eenige gisten en gistachtige organismen. De bacteriën behooren voor een groot deel tot *B. herbicola*. Ze vormen gele kolonies op vleeschagar-glucose en op bouillonagar, waarin zoëgloënvorming plaats vindt. De bacteriën zijn beweeglijk, gramnegatief, vervloeien de gelatine langzaam, vormen geen indol uit pepton en tryptophaan en zijn positief voor de reactie van VOGES-PROSKAUER.¹⁾ Behalve deze kwamen ook vertegenwoordigers van *B. fluorescens* in vrij sterke mate voor.

Daar ook van groene, gezonde kafjes deze bacteriën konden worden verkregen, terwijl verder uit het onderzoek van DÜGGELI (18) en MACK (43) blijkt, dat *B. herbicola* en *B. fluorescens* tot de normale bewoners van groene plantendeelen behooren, is het twijfelachtig, of de geïsoleerde organismen in eenig verband staan tot de bruine streepjes. Alleen door besmettingsproeven, die door mij echter nog niet zijn verricht, kan een beter inzicht worden verkregen.

Ofschoon het ziektebeeld overeenkomst vertoont met dat van de door ERWIN SMITH (72) beschreven „black chaff”, lijkt het mij toch niet waarschijnlijk, dat beide verschijnselen identiek zijn. Uitscheidingen van groote hoeveelheden bacteriehoudende slijmmassa's, zooals dat door SMITH voor de „black chaff” is beschreven en waaruit de veroorzaker van deze ziekte, *B. translucens* var. *undolosum*, geïsoleerd kon worden, is door mij nooit geconstateerd.

¹⁾ Deze bepalingen zijn verricht door den heer C. W. C. VAN BEEKOM.

De boven beschreven streepjesverschijnselen komen bij het eene tarweras in veel sterkere mate voor dan bij het andere. Het ras *Trifolium*, dat in het boven beschreven geval gebruikt werd, is tamelijk gevoelig evenals Juliana, Prins Hendrik, *Invicta* en eenige andere rassen. Zeer gevoelig is het Fransche ras *Providence*.

Het voorkomen dezer verschijnselen is niet altijd beperkt tot gronden met onvoldoende kopervoorziening. Bij *Providence* b.v. zijn bijna steeds de zwarte streepjes op de kafjes aanwezig, ook al wordt ze verbouwd op kleigrond. De bruinkleuring blijft dan echter beperkt tot de chlorophylbanen, terwijl de zeer sterke verkleuring, zooals die bij de planten met kopergebrek voorkomt, ontbreekt.

Het verband tusschen de kopervoorziening van de planten en de gevoeligheid voor deze kafjesziekte, is behalve op het proefveld te Gasselternijveen, ook nog nagegaan op een proefveld te Westerlee en een te Sappemeer.

Het proefveld te Westerlee werd aangelegd in het najaar van 1935 op een dalgrond, die in dat jaar een zeer slecht gewas tarwe had geleverd, dat buitengewoon sterk door de boven beschreven verschijnselen was aangetast. Twee tarwerassen werden gezaaid, nl. *Providence* waarvan bekend was, dat ze gevoelig was voor de streepjesziekte en *Imperiaal IIa*, die niet gevoelig zou zijn. Kopersulfaat werd gegeven in hoeveelheden, die overeenkwamen met 100 en 200 kg per ha.

De verschillen tusschen de perceelen met en zonder koper kwamen op dit proefveld zeer laat voor den dag. De planten zonder koperbemesting waren iets korter, hadden slappere bladen en gebogen aren, terwijl ze meer dan tien dagen later rijp waren dan die, welke kopersulfaat hadden gekregen. Bij *Providence* waren de kafjes en de aarspil zeer sterk van bruine streepjes voorzien. Reeds begin Juli begonnen deze zichtbaar te worden. Naarmate de rijping naderde, werd de verkleuring steeds erger, zoodat begin Augustus een groot deel van de kafjes bruin gekleurd was. Hoewel de planten op de met kopersulfaat bemeste perceelen lang niet vrij waren van de aantasting, waren ze toch op de niet bemeste perceelen nog in belangrijk sterkere mate aangetast. Vooral in het allerlaatste deel van de ontwikkeling, toen de planten met koper reeds rijp waren, werden de aren en bovenste halmleden van de onbehandelde planten bijna geheel zwartbruin.

Het andere tarweras, *Imperiaal IIa*, vertoonde niet de streepjesverschijnselen. Hier kwamen echter, ongeveer twee weken vóór de rijping, verschijnselen voor den dag, die zeer sterk deden denken aan die, welke voor *Septoria nodorum* zijn beschreven (BOCKMANN

(8)). Beginnende aan de top, werden groote deelen van de kelkkafjes donker grijsbruin gekleurd. Van vele kafjes waren de bovenste helften afgestorven, terwijl de benedenste helften nog normaal groen waren. In tegenstelling tot de streepjesgewijze aantasting van Providence waren hier typische vlekken aanwezig. Bij microscopisch onderzoek bleken in de cellen van het aangetaste weefsel vele schimmeldraden aanwezig, terwijl de zwarte puntjes, die met het bloote oog op de bruine kafjes waren te zien, pycniden bleken te zijn, waarin talrijke sporen gevormd waren. Dit beeld komt overeen met hetgeen voor aantasting door *Septoria nodorum* beschreven is. Door de pycnosporen op moutagar uit te zaaien werd een witte schimmel verkregen, die morphologisch zeer veel overeenkomst vertoonde met de van het Centraalbureau voor Schimmelcultures te Baarn ontvangen *Septoria nodorum*.

Bij deze aantasting door *Septoria* was de invloed van de koperbemesting nog duidelijker waarneembaar dan bij de streepjesziekte. Vermoedelijk zal dit een gevolg zijn geweest van het feit, dat de infectie eerst plaats vond op een tijdstip, dat de aren met goede kopervoorziening reeds bezig waren te rijpen. Hierdoor heeft de schimmel zich op deze aren niet kunnen uitbreiden. In tegenstelling hiermee waren de aren van de onbehandelde planten op dat tijdstip nog geheel groen en zijn dat ook nog vrij lang gebleven. Hierdoor had de schimmel de gelegenheid zich uit te breiden, wat ook in belangrijke mate gebeurd is.

Een overeenkomstig beeld kan men aantreffen bij tarwe, die door overmatige stikstofbemesting pleksgewijs is gaan legeren. Dergelijke legerende plekken blijven meestal langer groen dan het staande gewas. In de veenkoloniën kan men nu bij deze legerende planten vaak een sterke aantasting door *Septoria nodorum* waarnemen, die bij de staande planten slechts in geringe mate aanwezig is.

Wanneer we de oogstresultaten van het proefveld te Westerlee bekijken, zien we, dat de verhouding van korrel : stroo van de onbehandelde perceelen minder dan $\frac{1}{3}$ deel is van die van de met koper bemeste perceelen (zie tabel 42). Dit is een gevolg van de zeer slechte korrelvorming op de onbehandelde perceelen. Hoewel kopergebrek als voornaamste oorzaak van deze lage korrelopbrengst beschouwd moet worden, is het waarschijnlijk, dat ook de afsterving van de kafjes de vorming van goede korrels heeft tegengewerkt.

Het proefveld te Sappemeer was eveneens gelegen op dalgrond. Als tarwerassen werden gezaaid *Trifolium* en *Juliana*. Kopersulfaat

Tabel 42

Invloed van een bemesting met kopersulfaat op de verhouding van korrel : stroo van twee verschillende soorten wintertarwe. Westerlee 1936

Behandeling	Providence	Imperiaal IIa
-	0,21	0,16
100 kg CuSO ₄	0,43	0,51
200 kg CuSO ₄	0,51	0,58

werd gegeven in hoeveelheden berekend naar 200 kg per ha. Ook hier waren tusschen de planten met en zonder kopertoediening de reeds eenige keeren beschreven verschillen aanwezig. Hoewel zwarte verkleuringen op de kafjes in minder sterke mate voorkwamen dan bij de vorige proefvelden, was een gunstige werking van de koperbemesting toch ook hier duidelijk waarneembaar. Het waren vooral de boven beschreven streepjesverschijnselen, die bij de onbehandelde planten in meerdere mate voorkwamen.

De korrelopbrengst werd op dit proefveld door de koperbemesting met 14,2% verhoogd, de stroo-opbrengst bleef gelijk.

In tegenstelling tot de veldproeven vertoonden de planten in de potproeven slechts in zeer geringe mate de bruine streepjes op de kafjes, terwijl de vlekken van *Septoria* geheel afwezig waren. Pas nadat de planten waren afgestorven, kwamen verschillen voor den dag. Zonder koper was het stroo grauw van kleur, terwijl een sterke aantasting door saprophytische schimmels plaats vond, die bij aanwezigheid van voldoende koper slechts in geringe mate aanwezig was. De strookleur was in het laatste geval grijsgeel.

Uit de in deze § verkregen gegevens volgt, dat tarweplanten met lichte verschijnselen van kopergebrek in sterkere mate worden aangetast door micro-organismen dan die, welke over voldoende koper beschikken. De reden van dit verschijnsel zal waarschijnlijk voor een deel moeten worden toegeschreven aan het langer groen blijven der eerstgenoemde planten. Het feit echter, dat ook bij de rijpe planten een sterke aantasting door saprophytische organismen plaats vond, kan een aanwijzing zijn, dat het stroo van tarwe met een te laag kopergehalte rijker aan voedingsstoffen is dan dat van gezonde planten. Daar bij zieke tarwe de zaadvorming belangrijk slechter is dan bij gezonde, is het denkbaar, dat de assimilaten, die voor de zaden bestemd zijn, nu in het stroo blijven.

§ 4. *Invloed van de vochtigheidsgraad van de lucht op de verschijnselen van kopergebrek*

Bij de beschrijving van de symptomen van kopergebrek is er op gewezen, dat een verminderde turgescentie van de jonge bladen tot de eerste verschijnselen behoort. Bij de ernstige ziektegevallen wordt deze al spoedig gevolgd door een verdorring van het slappe weefsel, die evenwel bij de minder ernstige geheel achterwege kan blijven.

Het is nu gebleken, dat de vochtigheidstoestand van de lucht van invloed is op de mate van afsterven van deze slappe bladen en als gevolg daarvan op de hevigheid der ziekteverschijnselen. Wanneer nl. bij het verschijnen van de slappe bladen of bladpunten bij koperarme culturen de vochtigheidsgraad van de lucht gering is, zijn dergelijke bladen binnen korte tijd verdroogd of voorzien van doode bladpunten. Dit plotseling verschijnen van de ontginningsziekte bij warm en droog weer kan men ook op het veld waarnemen.

Houdt men echter door bepaalde maatregelen de vochtigheidsgraad van de lucht hoog, dan verschijnen, tenminste bij gerst in waterculturen zonder kopertoediening, waarvoor ik dit onderzocht heb, de doode bladen en bladpunten niet of in zeer geringe mate (fig. 25). Het blijkt mogelijk de planten zonder toediening van koper veel langer te laten doorgroeien dan bij normale vochtigheidsgraad mogelijk is. Deze proeven werden genomen door de gerstplanten te plaatsen in een kleine kas, die geheel afgesloten was van de buitenlucht en die verzadigd werd gehouden met waterdamp.

De resultaten dezer proeven geven de indruk, dat bij onvoldoende kopervoorziening de planten gevoeliger zijn voor verdroging dan bij voldoende kopervoorziening. Op welke manier dit tot stand komt, is niet te zeggen. In dit verband kan nog worden gewezen op de mededeelingen van BRÜNE (13) en FRECKMANN (26), dat de gunstige werking van kopersulfaat op de plantengroei van laagveengronden moet worden toegeschreven aan meerdere resistentie van de planten tegen nachtvorst. Ofschoon het m.i. vaststaat, dat we op de Deutsche evenals op de Nederlandsche venen te maken hebben met een slechte kopervoorziening der planten, is het niet ondenkbaar, dat planten met een laag kopergehalte, behalve voor verdroging, ook gevoeliger voor nachtvorst zullen zijn dan die met voldoende koper. In deze richting is verder onderzoek zeker nog gewenscht.

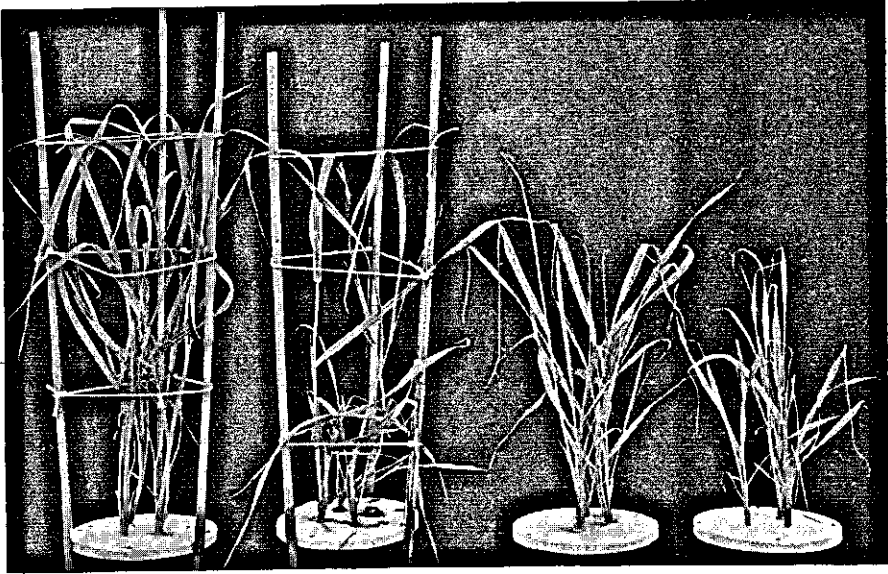


Fig. 25

Gerst in watercultuur zonder koper; links gegroeid in een zeer vochtige, rechts in een goed geventileerde kas.

§ 5. *Kopergebrek bij planten als oorzaak van ziekteverschijnselen bij dieren*

Behalve bij planten is koper ook van beteekenis bij de voeding van dieren. Door de onderzoekingen van HART, STEENBOCK, WADDELL en ELVEHJEM (31) is gebleken, dat ratten, die alleen met koemelk gevoerd werden, een anaemie kregen, die met ijzer alleen niet te genezen was. Werden echter naast ijzer nog geringe hoeveelheden kopersulfaat toegediend, dan herstelden de dieren zich in korte tijd en groeiden verder normaal. De werking van het koper kon niet worden uitgeoefend door een van de volgende elementen: Zn, Cr, Ge, Co, Ni, Sn, Pb, Cd, Hg, Sb, As en Mn (85).

Door ELVEHJEM (22) is aangetoond, dat bij dergelijke aan anaemie lijdende dieren, die ijzer maar geen koper toegediend kregen, het ijzer zich ophoopte in de lever, terwijl een verhooging van het haemoglobinegehalte niet werd geconstateerd. Werd daarentegen naast ijzer een geringe hoeveelheid koper gegeven, dan daalde het ijzergehalte van de lever zeer sterk, terwijl tegelijkertijd het haemoglobinegehalte van het bloed belangrijk steeg. Blijkbaar kon het ijzer alleen benut worden voor de vorming van haemoglobine als voldoende koper ter beschikking stond.

Aan de genoemde onderzoekers gelukte het, behalve bij ratten ook bij konijnen en kuikens een anaemie te verkrijgen, die door toediening van sporen koper kon worden opgeheven (21).

Behalve deze door bepaalde voorzorgsmaatregelen verkregen verschijnselen van kopergebrek, kent men een onder natuurlijke omstandigheden voorkomende ziekte bij koeien, schapen, geiten en varkens, die door een tekort aan koper schijnt te worden veroorzaakt. Deze ziekte, „salt-sick” genoemd, is in Amerika bekend op verschillende veen- en zandgronden in Florida (BRYAN en BECKER (15)). De aangetaste dieren hebben een zeer laag haemoglobinegehalte in het bloed, hebben weinig eetlust, groeien zeer slecht en gaan, wanneer geen verandering in voer wordt gegeven, vaak te gronde. Daar het gras van dergelijke gronden arm aan ijzer en koper is en verder door toediening van ijzer- en koperzouten aan de dieren de ziekte kan worden genezen, wordt de oorzaak dezer ziekteverschijnselen toegeschreven aan een tekort aan ijzer en koper in het opgenomen voedsel. Het is moeilijk te zeggen in hoeverre men hier met een tekort aan beide metalen te doen heeft, omdat als geneesmiddel bijna altijd een mengsel van ijzer en koper gegeven wordt. Dat koper in ieder geval

noodzakelijk is, blijkt uit de publicatie van NEAL, BECKER en SHEALY (50), die met ijzerzouten alleen geen genezing konden krijgen, maar wel met een mengsel van ijzer en koper.

De in Florida voorkomende ziekte vertoont groote overeenkomst met de hier te lande door SJOLLEMA (71) bij koeien beschreven „likzucht” (zie hierover hoofdstuk III). Ook bij deze ziekte heeft men, zooals door SJOLLEMA en door THIJN (81) is aangetoond, te maken met een laag haemoglobinegehalte in het bloed, terwijl daarnaast slechte eetlust, sterke vermagering en slechte groei kenmerken dezer ziekte zijn. Dat er een duidelijk verband bestaat tusschen het voorkomen van likzucht en van ontginningsziekte is ook reeds in hoofdstuk III nader uiteengezet.

HOOFDSTUK VI

OVER DE BETEEKENIS VAN KOPER VOOR MICRO-ORGANISMEN EN ANDERE PLANTAARDIGE CELLEN

§ 1. Literatuuroverzicht

Dat ook sommige micro-organismen voor een normale ontwikkeling sporen koper nodig hebben, is voor het eerst overtuigend aangetoond door BORTELS (9). Evenals bij vele andere proeven over voedingsfysiologische kwesties werd ook in dit onderzoek gebruik gemaakt van de schimmel *Aspergillus niger*.¹⁾

Om zijn voedingsoplossing kopervrij te krijgen, filterde BORTELS haar over kool (*Carbo medicinalis* MERCK), nadat een geringe hoeveelheid van een oplossing van ammoniumsulfide was toegevoegd. In de aldus gezuiverde oplossing vormde *Aspergillus niger* geen zwarte, maar gele sporen. Toevoeging van kleine hoeveelheden koper gaf zwarte sporen, terwijl dan ook het myceliumgewicht iets hooger was. Uit dit onderzoek bleek verder nog, dat koper niet te vervangen was door: Si, Mn, Al, Cd, Co, Hg, As en Zn.

ROBERG (61) kon de resultaten van BORTELS bevestigen. Om zijn voedingsoplossing kopervrij te krijgen, kristalliseerde hij de verschillende voedingsstoffen eenige malen om uit dubbel gedestilleerd water, dat uit een toestel van kwarts was verkregen.

METZ (47) constateerde eveneens de gele sporen bij *Aspergillus niger*, indien koper werd weggelaten. Het bleek hem, dat de verschillende stammen van de schimmel zich niet identiek gedroegen. Behalve *Aspergillus niger* onderzocht hij nog een aantal andere schimmels. *Aspergillus flavus*, die bij aanwezigheid van koper donkerbruine sporen had, was zonder koper lichtgeel. Bij *Penicillium luteum*, die bij aanwezigheid van koper groene sporen vormde, werden zonder kopertoevoeging geen sporen gevormd.

WOLFF en EMMERIE (93), die eveneens *Aspergillus niger* gebruikten,

¹⁾ In verschillende oudere publicaties, o.a. van ONO (54), vindt men reeds gegevens over de gunstige werking van koper op de vorming van droge stof door *Aspergillus niger*.

maakten de voedingszouten door middel van electrolyse kopervrij. Ze losten ze op in H_2SO_4 -houdend water, waarna bij $70^\circ C$ en $2\frac{1}{2}$ volt spanning gedurende ongeveer een week werd geëlectrolyseerd. De negatieve electrode werd zoo nu en dan met HNO_3 afgespoeld om het neergeslagen koper te verwijderen. Na afloop van de electrolyse werd met een zeer zuivere soda-oplossing de zuurgraad op het gewenschte peil gebracht, waarna saccharose en wijnsteenzuur werden toegediend, die met norit gereinigd waren.

In tegenstelling tot de eerstgenoemde onderzoekers, die na verwijdering van het koper steeds nog een aanzienlijke sporevorming kregen, bleef in de gezuiverde culturen van WOLFF en EMMERIE sporevorming geheel achterwege. In het mycelium, dat gegroeid was in 250 cc van de voedingsoplossing, konden zij echter nog $0,2 \gamma$ koper aantoonen. Om na te gaan of bij afwezigheid van koper de groei geheel achterwege bleef, werd van een koperarme cultuur vier dagen na de enting met een sporensuspensie het gevormde mycelium weggenomen, waarna de vloeistof werd overgeschonken in een andere kolf, en opnieuw werd geënt met een sporensuspensie. Er ontwikkelde zich geen mycelium; werd $0,1 \gamma$ Cu toegevoegd dan gebeurde dit wel, m.a.w. ook voor de myceliumvorming van *Aspergillus niger* zijn sporen koper vereischt. STEINBERG (76, 77, 78), die zijn voedingsoplossing zuiverde door ze in een autoclaaf bij $120^\circ C$ met $CaCO_3$ te behandelen en daarna te filtreren, kreeg bij *Aspergillus niger* ongeveer 50% minder droge stof dan bij toevoeging van enkele gamma's koper.

Het onderzoek van GOLLMICK (30) geeft weinig nieuwe gezichtspunten. Ook hij gebruikte *Aspergillus niger*, die in de met kool gezuiverde voedingsoplossing de bekende verschijnselen vertoonde.

McHARGUE en CALFEE (46) konden bij *Aspergillus flavus* en *Rhizopus nigricans* een slechtere groei in koperarme voedingsmedia constateren. Bij de eerstgenoemde schimmel was de sporekleur zonder koper geelgroen, bij aanwezigheid van dit element blauwgroen. Datzelfde onderzoekers (45) vonden, dat gisten zonder koper minder droge stof vormden dan bij aanwezigheid van sporen van dit element. De verschillen bedroegen ongeveer 15%.

Ook ELVEHJEM (24) kon bij gist een gunstig resultaat van een toediening van sporen koper waarnemen. In dit onderzoek gebruikte hij bakkersgist, die gekweekt werd in een minerale voedingsoplossing met saccharose als koolstofbron. Hij nam Erlenmeyer-kolven van 1 liter, waarin zich 200 cc voedingsoplossing bevond, waardoor perio-

diek lucht geblazen werd. Bij aanwezigheid van koper vormde zich plm. 25% meer droge stof, terwijl ook de ademhaling belangrijk hooger was. Van de door ELVEHJEM onderzochte concentraties gaf 20 γ koper per kolf de beste resultaten, 80 γ gaf aanvankelijk een geringe remmende werking, die echter spoedig verdween, terwijl 320 γ een sterke groeiremming veroorzaakte.

§ 2. Proeven met *Aspergillus niger*

Zoals reeds in hoofdstuk III is vermeld, is de onmisbaarheid van koper voor de normale ontwikkeling van *Aspergillus niger* ook door mij geconstateerd. Voor de uitvoering dezer proeven kan worden verwezen naar blz. 40.

Zoals uit tabel 43 blijkt, ontbreken in de koperarme voedingsoplossing de sporen en is ook de myceliumontwikkeling aanzienlijk geringer dan bij toevoeging van geringe hoeveelheden koper.

Tabel 43

Invloed van opklimmende hoeveelheden koper op myceliumgewicht, kleur der sporen en pH van de voedingsoplossing bij Aspergillus niger

Cu in γ per cultuur.	Myceliumgewicht in mg	Kleur der sporen	pH van de voedingsoplossing na 4 dagen ¹⁾	pH van de voedingsoplossing na 5 dagen.
0	263 ¹⁾	geen sporen gevormd ²⁾	8,6	8,9
0,2	452	oranjegeel ²⁾	8,4	8,3
0,4	520	lichtbruin ²⁾	6,0	6,3
0,6	555	licht grijsbruin	4,3	4,7
1	560	grijsbruin	3,9	4,2
1,5	560	donker grijsbruin	3,9	4,1
2	570	zwartbruin	3,7	4,1
3	615	zwart	3,7	3,8
5	562	"	3,8	4,0
10	560	"	3,5	3,7
25	695	"	2,7	3,3
100	610	"	2,6	3,3

¹⁾ Gemiddelde gewichten van twee culturen.

²⁾ Vergelijk de kleurenschaal op plaat 1.

³⁾ pH bij begin der proef : 6,7.

Reeds bij 0,4 γ koper is ongeveer de normale myceliumontwikkeling bereikt; grotere concentraties verhoogden deze slechts weinig. Van belang is ook de invloed, die de kopervoorziening heeft op de zuurgraad van de voedingsoplossing; de vorming van zuren uit glu-

cose kan blijkbaar alleen plaats vinden, indien geringe hoeveelheden koper aanwezig zijn.

Voor de vorming van zwarte sporen is 2 à 3 γ koper noodig. Deze hoeveelheid is belangrijk lager dan die, welke door WOLFF en EMMERIE wordt aangegeven, nl. 25 à 50 γ per kolf. De reden van dit verschil kan ten deele verklaard worden uit het feit, dat genoemde onderzoekers per kolf 250 cc voedingsoplossing gebruikten, terwijl dit in mijn proeven slechts 40 cc was. Zoo bleek mij, dat 2 γ koper bij aanwezigheid van 25 cc voedingsoplossing geheel zwarte sporen leverde, bij 50 cc zwartbruine, terwijl bij 100 cc de sporen bruin waren. Men moet zich blijkbaar voorstellen, dat de vorming van de grootere hoeveelheid mycelium bij 100 cc voedingsoplossing meer koper vereischt, waardoor er minder overblijft voor de sporevorming.

Om te weten te komen of de koperwerking bij *Aspergillus niger* specifiek is, werden de volgende elementen aan koperarme schimmelculturen toegevoegd.

Lithium	als LiCl	Cobalt	als CoCl ₂
Barium	„ BaCl ₂ .2H ₂ O	Titaan	„ Ti(SO ₄) ₂ .3H ₂ O
Zilver	„ AgNO ₃	Vanadium	„ VOSO ₄ .2 H ₂ O
Lood	„ (CH ₃ COO) ₂ Pb.3 H ₂ O	Molybdeen	„ Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O
Aluminium	„ Al ₂ (SO ₄) ₃ .18 H ₂ O	Borium	„ H ₃ BO ₃
Tin	„ SnCl ₂ .2 H ₂ O	Jodium	„ J
		Cadmium	„ 3CdSO ₄ .8 H ₂ O

Van deze stoffen werd zooveel toegevoegd, dat 20 γ van het gewenschte element per cultuur aanwezig was. Verder werd aan culturen met 1 γ koper 40 γ van deze elementen toegediend. De bedoeling hiervan was een eventueele „antagonistische” werking tusschen koper en de andere elementen te leeren kennen. Van de bovengenoemde stoffen bleken in de koperarme culturen cobalt en vanadium in uiterst geringe mate en aluminium in iets sterkere mate lichtgele sporen ten gevolge te hebben. Alle andere culturen waren evenals de onbehandelde contrôle sporevrij. De geringe werking die Co, V en Al uitgeoefend hebben, bleek echter een gevolg te zijn van het verontreinigd zijn der betreffende zouten met sporen koper. Door omkristallisatie uit dubbel gedestilleerd water werden kopervrije preparaten verkregen, die, toegediend in bovengenoemde hoeveelheden, niet in staat waren de werking van het koper te vervangen. Aluminium was nu toegevoegd als Al₂K₂(SO₄)₄.24 H₂O, dat gemakkelijker kristalliseert dan Al₂(SO₄)₃.

In de culturen met 1 γ Cu kwam een zeer duidelijke werking van

CdSO₄ aan het licht. Bij aanwezigheid van dit zout waren de sporen belangrijk lichter gekleurd dan met koper alleen. Om dit koper-cadmium „antagonisme” nader te leeren kennen, werd aan *Aspergillus* culturen met resp. 0, 2, 6 en 20 γ Cu per cultuur CdSO₄ in opklimmende hoeveelheden toegediend. Het resultaat dezer proef is vermeld in tabel 45.

Tabel 45 *)

Sporekleur van *Aspergillus niger* bij opklimmende hoeveelheden CdSO₄ en koper

3CdSO ₄ ·8 H ₂ O in γ	0 γ Cu	2 γ Cu	6 γ Cu	20 γ Cu
0	lichtgeel	zwart	zwart	zwart
25	„	„	„	„
50	„	bruinzwart	„	„
100	„	„	„	„
200	geen sporen	bruingrijs	bruinzwart	„
500	„ „	geel)	„	bruinzwart
1000	„ „	oranjegeel ¹⁾	bruin	„
2000	„ „	„ ¹⁾	geelbruin	bruin

1) Spore-aantal ook verminderd.

We zien, dat er een typische tegenwerking bestaat tusschen cadmium en koper, voorzoover het betreft de sporevorming van *Aspergillus* en de kleurstofvorming van deze sporen. Het bleek zelfs mogelijk, van dit verschijnsel gebruik te maken bij het aantoonen van verschillen in opneembaar koper bij koperrijke gronden. Voor deze proef gebruikte ik de grond, afkomstig van het proefveld te Gasselternijeven. Van de perceelen 5, 6 en 8 van dit proefveld, resp. onbehandeld, met 200 en met 300 kg CuSO₄ per ha werd telkens 1 g droge grond toegevoegd aan schimmelculturen met opklimmende hoeveelheden CdSO₄. Het resultaat dezer proef is vermeld in tabel 46.

Tabel 46

Invloed van opklimmende hoeveelheden CdSO₄ op de sporekleur van *Aspergillus niger*, bij aanwezigheid van grond met verschillend kopergehalte

3CdSO ₄ ·8 H ₂ O in γ	Onbehandeld	200 kg CuSO ₄	300 kg CuSO ₄
0	bruinzwart	zwart	zwart
25	—	bruinzwart	„
50	geelbruin	bruin	„
100	geel, aantal verminderd	geelbruin	„
500	zeer weinig gele sporen, mycelium slecht ontwikkeld	geel	bruin

*) Tabel 44 is vervallen.

Terwijl bij afwezigheid van cadmium tusschen de perceelen slechts kleine verschillen bestaan, komen deze bij opklimmende hoeveelheden CdSO_4 veel duidelijker tot uiting.

Vervolgens is nog de invloed van verschillende hoeveelheden ijzer en zink op de sporekleur van *Aspergillus niger* bij verschillende hoeveelheden koper nagegaan. In deze proef was ijzer toegediend in hoeveelheden van 0,25, 2,5 en 15 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ per cultuur, terwijl bij zink deze hoeveelheden waren 0,1, 0,5 en 3 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Koper werd toegediend resp. 0, 0,2, 0,4, 0,6, 1 en 2,5 γ Cu per cultuur (d.i. per 40 cc voedingsoplossing).

Het resultaat van deze proef was, dat de sporekleur onafhankelijk was van de ijzerconcentratie. Bij zink kon bij aanwezigheid van 1 γ Cu per cultuur een gering verschil tusschen 0,1 en 0,5 mg ZnSO_4 worden waargenomen. De lagere zinkconcentratie gaf iets donkerder sporen dan de hoogere.

Bij de kleuring der sporen werkt het koper waarschijnlijk als oxydatie-katalysator. Wanneer men nl. (GOLLMICK (30)) aan zes dagen oude culturen met gele sporen een druppel van een verdunde oplossing van kopersulfaat toedient en vervolgens een deel dezer culturen in een zuurstofvrije waterstof- of stikstofatmosfeer zet en een ander deel bij zuurstoftoetreding laat staan, dan zijn in het laatste geval reeds na 24 uur practisch alle sporen zwart, terwijl ze bij afwezigheid van zuurstof onveranderd blijven.

§ 3. Proeven met eenige andere schimmels

Behalve *Aspergillus niger* werden ook de aanwezige laboratoriumstammen van *A. glaucus*, *A. flavus* en *Penicillium glaucum* gekweekt in de voedingsoplossing, die ook voor *Aspergillus niger* gebruikt werd. *A. flavus* leverde zonder kopertoediening een slechte myceliumontwikkeling met lichtgele sporen; bij aanwezigheid van 5 γ koper werd belangrijk meer mycelium gevormd, terwijl de kleur van de sporen diepgroen was.

Bij *A. glaucus* was vooral het verschil in myceliumontwikkeling zeer belangrijk. De sporevorming van deze schimmel was, ook bij aanwezigheid van voldoende koper, slecht.

Penicillium glaucum vertoonde behalve een verschil in myceliumgewicht een belangrijk verschil in sporevorming. Zonder koper bleef deze geheel achterwege; bij aanwezigheid van 5 γ koper per 40 cc voedingsoplossing werden zeer vele groene sporen gevormd.

§ 4. Proeven met *Azotobacter chroococcum*

Vervolgens werd nagegaan de beteekenis van koper bij de groei en zwartkleuring van *Azotobacter chroococcum*. Deze stikstofbindende bacterie vormt op vaste voedingsbodems groote witte kolonies, die na verloop van enkele dagen een zwartbruine kleur krijgen. RIPPEL en LUDWIG (60) (zie ook UNGERER (82)) beschouwen het zwarte pigment als een melanineachtig product, ontstaan door enzymatische oxydatie van tyrosine. Door OMELIANSKY (53) is aangetoond, dat de aanwezigheid van zuurstof noodzakelijk is bij de vorming van het pigment.

Aanvankelijk werd de bacterie gekweekt op een agarvoedingsbodem met 1% glucose, 0,2% CaCO_3 , 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,0005% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 0,0025% $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Verder was toegevoegd een weinig extract van een zeer koperarme grond. Zuivering van voedingsoplossing en agar geschiedde door schudden met en daarna filtreren over norit, na toevoeging van een spoor van een oplossing van NH_4SH . Behandeling van de heete gesmolten agar met norit voerde niet tot een volledige verwijdering van koper, ook al werd dit drie keer herhaald. Deze gezuiverde agar, toegevoegd aan *Aspergillus*culturen, leverde nog zwarte sporen.

Op platen van bovengenoemde samenstelling groeide *Azotobacter chroococcum* zoowel zonder als met 5γ Cu per plaat zeer goed. Na vier dagen begonnen echter duidelijke verschillen zichtbaar te worden. Op de platen zonder kopertoevoeging waren de bacteriën toen nog zuiver wit, terwijl bij aanwezigheid van koper reeds een duidelijke bruinkleuring was waar te nemen (fig. 26). De volgende dag was het kleurverschil nog grooter; daarna begon ook de cultuur zonder kopertoevoeging te verkleuren. Uit deze proef blijkt, dat koper in staat is de bruinkleuring bij *Azotobacter chroococcum* te bevorderen.

Behalve agar is ook kiezelzuur gebruikt om vaste voedingsbodems voor *Azotobacter* te maken. Voor de bereiding van kiezelplaten werd een mengsel van kaliumsilicaat en zoutzuur in een collodiumzakje zoolang gedialyseerd tegen gedestilleerd water, dat telkens ververscht werd, totdat geen chloorreactie meer was waar te nemen. Het kiezelsol werd daarna gebracht in petrischalen, waarna de bovengenoemde voedingsoplossing werd toegevoegd. Vervolgens werd door toevoeging van Na_2CO_3 , CaCO_3 of MgCO_3 de plaat tot stollen gebracht.

Ook op deze platen kon de gunstige werking van koper op de melaninevorming worden geconstateerd. Echter werd eenige dagen later

ook hier, evenals bij de vorige proef, de cultuur zonder koper bruin, zij het ook minder donker dan bij aanwezigheid van 5 γ koper.

Daar ook bij deze kiezelplaten aanwezigheid van sporen koper niet onwaarschijnlijk werd geacht, werd een derde proef¹⁾ aangezet met een voedingsoplossing in Erlenmeyer-kolfjes van 200 cc. De voedingsoplossing, die voor deze proef werd gebruikt, had de volgende samenstelling: glucose 2%; K_2HPO_4 0,1%; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,05%; $CaCO_3$ 0,1%; $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,0001%; $MnSO_4 \cdot 5 H_2O$ 0,00005%; $NaMoO_4$ 0,00005%; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 0,001%. Gebruikt werden zouten *pro analysi* van KAHLBAUM en MERCK, die door een behandeling met norit van de eventueel aanwezige kopersporen werden bevrijd.

Evenals bij de vorige proeven was ook nu de groei van de bacterie onafhankelijk van het al of niet aanwezig zijn van koper. Daarentegen bleef de bruinkleuring van het bacterievlies, die bij de culturen met koper reeds na eenige dagen aanwezig was, bij weglating van koper geheel achterwege. Ook na twee weken was dit verschil nog steeds aanwezig.

§ 5. Proeven met *Acetobacter aceti*

Een andere oxydatiereactie, die onderzocht werd, is de omzetting van aethylalcohol tot azijnzuur door *Acetobacter aceti*. Deze bacterie kan men kweken in een minerale voedingsoplossing, waaraan als koolstofbron aethylalcohol is toegevoegd. De omzetting hiervan tot azijnzuur levert de energie, die noodig is voor het leven en de groei van deze organismen.

HOYER (33) en VISSER 'T HOOFT (84) maken bij het kweken van *Acetobacter aceti* gebruik van een voedingsoplossing van de volgende samenstelling:

Gedestilleerd H_2O	100 cc
$(NH_4)_3PO_4$	0,1 g
KH_2PO_4	0,1 g
$Mg_3(PO_4)_2$	0,1 g
Na-acetaat	0,1 g
Alcohol	3 cc

Verder wordt zoo veel phosphorzuur toegevoegd, totdat de vloeistof helder wordt, resp. een pH van 4,0–4,2 heeft bereikt.

Zwavel, calcium, ijzer en mangaan zouden voor deze bacteriën niet

¹⁾ Deze proef is uitgevoerd door den Heer R. v. D. MEULEN.

noodig zijn. Daar bijzondere voorzorgsmaatregelen bij het samenstellen van de voedingsoplossingen door deze onderzoekers niet genomen zijn, is het zeer goed mogelijk, dat deze elementen in de vorm van verontreinigingen in de andere zouten toch aanwezig zijn geweest.

Door mij werd daarom de volgende voedingsoplossing gebruikt:

Uit glas gedestilleerd water . . .	100 cc
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
NH ₄ NO ₃	0,1 g
CaCl ₂ .6 H ₂ O	0,01 g
CH ₃ COONa (dit is slechts aan een deel der culturen toegevoegd)	0,1 g
Aethylalcohol	3 cc
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	100 γ
FeCl ₃ .6 H ₂ O	500 γ
MnSO ₄ .4 H ₂ O	60 γ

De zouten van deze voedingsoplossing waren, uitgezonderd de zink-, ijzer- en mangaanzouten, met norit behandeld. De alcohol was 2 maal gedestilleerd uit glazen apparaten. Gekweekt werd in Erlenmeyerkolven van 300 cc, resp. van Jenaglas en kwarts, waarin zich 50 cc voedingsvloeistof bevond. Koper werd als kopersulfaat toegediend in hoeveelheden van 0,5, 2, 5 en 50 γ Cu per kolf. Als maatstaf voor de bacterieontwikkeling werd, behalve van de troebeling van de voedingsoplossing, ook gebruik gemaakt van de azijnzuurvorming. Hiervoor werd 5 cc uit de oplossing gepipetteerd en hierin met $\frac{1}{20}$ N. NaOH het azijnzuur getitreerd. Zooals uit fig. 27 blijkt, is zonder koper de azijnzuurvorming belangrijk geringer, dan bij aanwezigheid van sporen van dit element. Hoewel ook zonder koper de hoeveelheid gevormd zuur langzaam stijgt, is toch na 16 dagen nog slechts 50 à 75% gevormd van de hoeveelheid, die bij toevoeging van sporen van dit metaal gevonden wordt. De geringe bacterie-ontwikkeling, die in de eerstgenoemde culturen nog mogelijk is en verantwoordelijk voor deze zuurvorming, is misschien een gevolg van de zeer kleine hoeveelheden koper, die in de gezuiverde voedingsoplossing achtergebleven zijn.

Dat inderdaad de koperbehoefte van *Acetobacter aceti* zeer gering is, volgt wel hieruit, dat reeds $\frac{1}{2}$ γ van het metaal per 50 cc voedingsoplossing een normale ontwikkeling geeft; 25 γ, dit is dus 0,00005% Cu, werkt reeds duidelijk schadelijk. Deze schadelijke werking, die vooral in het begin van de ontwikkeling aan de geringe troebeling van de culturen is waar te nemen, verdwijnt echter reeds vrij spoedig weer.

cc $\frac{1}{20}$ N zuur

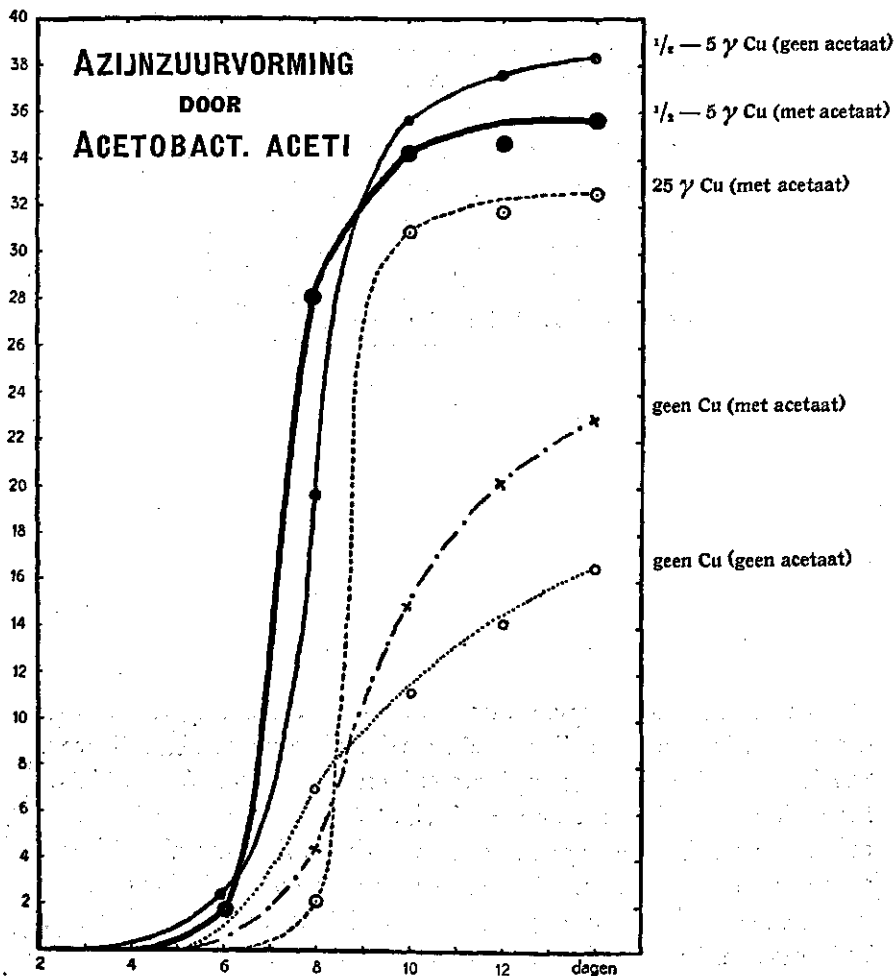


Fig. 27

Zoals verder uit deze proeven bleek en ook in fig. 27 tot uiting komt, is ook zonder natriumacetaat normale groei van *Acetobacter aceti* mogelijk. Merkwaardig is, dat in dit geval de verschillen tusschen de culturen met en zonder koper grooter zijn dan bij aanwezigheid van 0,1% CH_3COONa .



Fig. 26

Azotobacter chroococcum; rechts zonder, links met toediening van 5 γ koper per plaat.

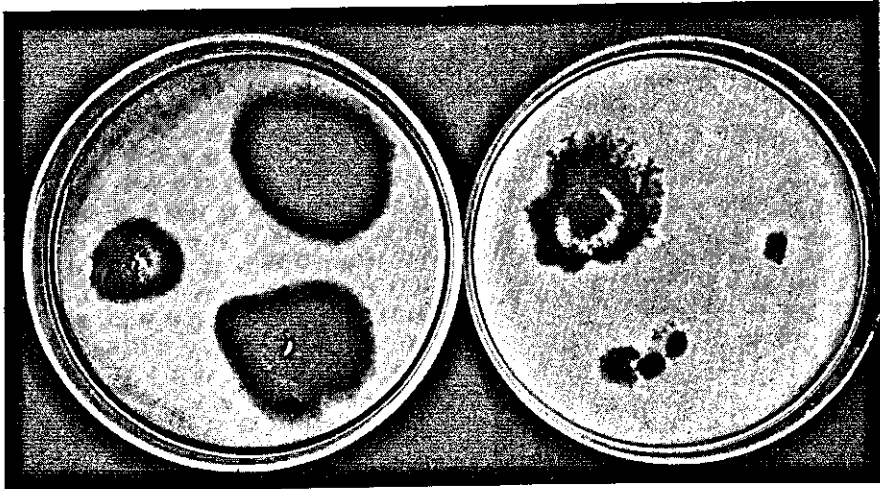


Fig. 28

Mangaanoxydeerende schimmel; rechts zonder, links met 5 γ koper per plaat.

§ 6. Proeven met mangaanoxydeerende schimmels

Een ander microbiologisch proces, waarvoor de beteekenis van koper is nagegaan, is de omzetting van manganocarbonaat tot mangaanioxyde. Zooals we in hoofdstuk V hebben gezien, is er door BEIJERINCK, SÖHNGEN en later door VON WOLZOGEN KÜHR en door GERRETSEN op gewezen, dat bepaalde bacteriën en schimmels in staat zijn mangaanzouten te oxydeeren tot bruinsteen (MnO_2). Volgens BEIJERINCK kunnen deze organismen zich op een zuiver minerale voedingsbodem niet ontwikkelen, maar hebben ze daarnaast nog een geringe hoeveelheid organische stof noodig. Ook zonder $MnCO_3$ kreeg BEIJERINCK bacteriegroei, maar bij aanwezigheid van dit zout was deze aanzienlijk beter. Dit wijst er op, dat de mangaanorganismen de bij de bovengenoemde oxydatie vrijkomende energie kunnen benutten voor de opbouw van organische stof.

Mangaanoxydeerende schimmels konden worden verkregen door grint uit een waterfilter af te strijken op voedingsbodems van de volgende samenstelling:

Leidingwater	1000 g
Agar	20 g
Na-acetaat	5 g
NH_4NO_3	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g
$MnCO_3$	plm. 10 g

Op deze melkwitte platen kwamen reeds na eenige dagen zwart-bruine vlekken te voorschijn, die gevormd werden door schimmels. Bij microscopisch onderzoek bleek de zwarte kleur te worden veroorzaakt door buiten de schimmeldraden liggende zwarte bolletjes, die ook door BEIJERINCK en VON WOLZOGEN KÜHR zijn beschreven en waarvan door laatstgenoemde is bewezen, dat ze bestaan uit MnO_2 .

Nadat een aantal dezer schimmels in reïncultuur was gebracht, werden ze geënt op platen van bovengenoemde samenstelling, waarvan water en zouten op de reeds eerder beschreven manier van koper bevrijd waren. $MnCO_3$ werd verkregen door samenvoeging van oplossingen van $MnSO_4$ en Na_2CO_3 , die ieder afzonderlijk waren gereïngd. Aan deze voedingsagar werd bovendien nog toegevoegd: 10 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 2 mg $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ en 50 mg $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ per liter voedingsoplossing. Aan een deel der platen werd 5 γ koper, als $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, toegevoegd.

Het bleek nu, dat bij aanwezigheid van koper de vorming van bruinsteen in aanzienlijk sterkere mate plaats vond dan zonder kopertoevoeging, m.a.w. ook de microbiologische mangaanoxydatie wordt door koper versterkt (fig. 28). Dat op de platen zonder kopertoevoeging nog vrij veel bruinsteen werd gevormd, kan een gevolg zijn geweest van de sporen koper, die in de agarvoedingsbodem nog aanwezig waren.

§ 7. Beschouwingen over de werking van het koper in de levende cel

Uit hetgeen in de voorgaande hoofdstukken is medegedeeld volgt, dat het koper in de physiologie van plant en dier een belangrijke functie vervult. De werking van dit element kan, voor zoover het tot nu toe is onderzocht, noch bij dieren noch bij planten door eenig ander element worden uitgeoefend, zoodat men moet aannemen, dat koper een specifieke functie heeft in de physiologie van levende organismen.

Welke is nu de werking van het koper? Allereerst kan er op worden gewezen, dat dit metaal, met zink en mangaan, gerekend moet worden tot die elementen, die slechts in zeer geringe hoeveelheden voor het levende organisme noodig zijn, terwijl in iets grootere concentraties deze stoffen reeds een schadelijke werking uitoefenen. Zoo is b.v. in de door mij voor de cultuur van granen gebruikte voedingsoplossing kalium aanwezig in een hoeveelheid van plm. 350 mg per liter, koper daarentegen in een concentratie van slechts 50 γ per liter, d.i. dus een verhouding van 7000 : 1, of, in ionenconcentraties, van 11.400 : 1. Verhoogt men de koperconcentratie, dan wordt al spoedig beschadiging waargenomen. Hoewel van mangaan en zink wel iets grootere hoeveelheden verdragen kunnen worden, zijn ook van deze elementen voor de normale groei toch slechts sporen vereischt.

Van de werking van kleine hoeveelheden koper bij chemische reacties zijn in de literatuur tal van voorbeelden bekend. Meestal zijn het oxydatieve reacties, waarbij dit het geval is. Een bekend voorbeeld is de oxydatie van fructose in ammoniakale oplossing, die volgens KREBS (39) berust op een zuurstofoverdraging door zware metalen. Hij kwam tot deze conclusie naar aanleiding van het feit, dat de oxydatie werd geremd door HCN, H₂S en pyrofosfaat, terwijl anderzijds toevoeging van zware metalen (Cu, Mn en Fe) de zuurstofopneming versnelde, vooral indien tegelijkertijd ook CaCl₂ aanwezig was. Van de genoemde metalen was koper het sterkst werkzaam: 30 γ Cu brach-

ten in 6 cc van een oplossing van 1½% fructose de O₂-binding van 57 op 503 cc per ½ uur (bij een pH van 8,5). Mn en Fe waren op dezelfde wijze, zij het ook in geringere mate, werkzaam.

Door ELVEHJEM (23) is de oxydatie van cysteïne tot cystine door sporen koper nader bestudeerd. Het door hem gebruikte gezuiverde preparaat bleek 1,2 cc zuurstof per uur per 8 mg cysteïne op te nemen. Toevoeging van 0,1 γ koper gaf een vermeerdering van 86 cc per uur per 8 mg. Behalve koper werken echter ook ijzer en mangaan katalytisch bij deze oxydatie (WARBURG (87)).

Ook de oxydatie van ascorbinezuur (vitamine C) tot dehydroascorbinezuur wordt door kleine hoeveelheden koper zeer belangrijk versneld (v. SZENT-GYÖRGYI (79)). In tegenstelling tot de twee voorgaande reacties zou men in dit geval te maken hebben met een katalytische werking, die alleen door koper en niet door de andere zware metalen kan worden uitgeoefend (MACK en KERTESZ (44)).

Een ander voorbeeld is de door WERTHEIMER (89) beschreven oxydatie van α -naphтол en p-phenyleendiamine tot indophenolblauw, die door zeer geringe hoeveelheden koper in sterke mate wordt bevorderd.

Voor de verklaring van de werking van koper in de levende cel is van belang, dat volgens het onderzoek van KUBOWITZ (40) de aardappelxydase, die identiek heet te zijn met de phenol- en polyphenolxydase, een koper-proteïneverbinding is. De zuurstofoverdragende werking van dit enzym, dat phenolen kan oxydeeren tot chinonen, blijkt te berusten op het aanwezige koper. Het door KUBOWITZ onderzochte enzympreparaat had een kopergehalte van 0,165%.

Wanneer we nu deze literatuurgegevens vergelijken met de bovenbeschreven resultaten, waar de betekenis van koper bij de vorming van azijnzuur uit aethylalcohol door *Acetobacter aceti*, van MnO₂ uit MnCO₃ door schimmels, van het bruine pigment bij *Azotobacter chroococcum* en van het zwarte pigment in de sporen van *Aspergillus niger* tot uiting komt, dan valt het m.i. niet moeilijk, de werking van het koper in deze biologische reacties te zien als die van een oxydatiekatalysator. In hoeverre nu deze door koper gekatalyseerde oxydatie van algemeen belang is in de levende cellen en in verband staat met de ademhaling, zal door verder onderzoek moeten worden uitgemaakt. Van belang is in dit verband een onderzoek van ELVEHJEM (24) met gist, waarbij bleek, dat in koperarme voedingsoplossingen de gistcellen zeer weinig cytochroom a bevatten.

Naar aanleiding van de resultaten bij micro-organismen is het goed

denkbaar, dat ook bij de hogere planten koper de rol van een oxydatie-katalysator vervult. M.i. komt een dergelijke verklaring van de koperwerking meer overeen met de verschijnselen, die men als regel bij kopergebrek kan waarnemen dan die, welke het koper een functie bij de bladgroenvorming toekent. Bij de beschrijving van de verschijnselen van kopergebrek in hoofdstuk II hebben we gezien, dat de ziekte steeds plotseling te voorschijn komt en reeds spoedig aanleiding is tot het afsterven van bladen en bladpunten; verder, dat verschijnselen van chlorose, die een kenmerk van onvoldoende bladgroenvorming zijn, niet of in geringe mate voorkomen. Dit in tegenstelling tot het beeld, dat we krijgen bij onvoldoende voorziening met stikstof en ijzer, beide elementen, waarvan bekend is, dat ze bij de chlorophylvorming van beteekenis zijn. In deze gevallen ziet men lichtgroene bladen en als gevolg hiervan een slechtere groei. Van een plotseling afsterven van jonge weefsels zooals men dat bij gebrek aan koper ziet, is geen sprake, veeleer van een kwijnend bestaan tengevolge van onvoldoende assimilatie.

Dat, behalve in de hier veronderstelde functie, het koper ook nog van belang is bij de chlorophylvorming, moet naar aanleiding van literatuurgegevens niet geheel uitgesloten worden geacht.

DENSCH en HUNNIUS (17) constateerden op verschillende grondsoorten door toediening van kopersulfaat een belangrijke verhooging van het chlorophylgehalte van de op deze grond groeiende planten. Als gevolg hiervan werden duidelijke opbrengstverhoogingen geconstateerd.

In Florida kent men op bepaalde grondsoorten bij citrusboomen ziekteverschijnselen, die bekend staan onder de naam van „frenching”. De bladen van dergelijke zieke boomen zijn niet normaal groen, maar geel gevlekt. Kopersulfaat blijkt een goed middel te zijn om de ziekte te genezen. ORTH, WICKWIRE en BURGE (55) hebben bij zieke en door koper genezen boomen het chlorophylgehalte in de bladen bepaald en daarbij gevonden, dat dit in laatstgenoemd geval 4,6 maal zoo hoog was als bij de zieke boomen. Naar aanleiding van dit resultaat beschouwen zij het koper als belangrijk element bij de chlorophylvorming. Tot dezelfde conclusie komt VAN SCHREVEN (66) naar aanleiding van proeven met suikerbieten.

In dit verband kan ook nog worden gewezen op eigen waarnemingen. Zooals in het voorgaande hoofdstuk is vermeld, kan men bij veldproeven, bij bemesting met kopersulfaat, soms een donkerder groene bladkleur waarnemen, zonder dat de onbehandelde planten

verschijnselen van ontginningsziekte vertoonen. De kopertoediening uit zich dan op dezelfde wijze als een stikstofbemesting. Zeer duidelijk is dit door mij waargenomen op de proefboerderij te Emmercompascuum. Dat hier niet het gewone beeld van kopergebrek aanwezig was, volgde, behalve uit het ontbreken van de typische symptomen, ook uit het kopergehalte van de onbehandelde planten, dat aanzienlijk hooger was dan hetgeen bij ontginningszieke planten werd gevonden.

In hoeverre we bij deze veldproeven ook rekening moeten houden met een indirecte invloed tengevolge van een werking van koper in de grond, zal door verder onderzoek moeten worden uitgemaakt; hier zij alleen nog gewezen op het onderzoek van KWIECIŃSKY (41), die in met kopersulfaat behandelde veengrond een hooger gehalte aan ammoniak-stikstof kon waarnemen dan in onbehandelde.

ZUSAMMENFASSUNG

EINLEITUNG UND KAPITEL I

1. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, die Ursache der Urbarmachungs- (Heidemoor-) krankheit kennen zu lernen. Diese Krankheit, die zum ersten Male von ELEMA beschrieben worden ist, kommt auf vielen Sand- und Moorböden in Holland, Deutschland, Dänemark und wahrscheinlich auch auf den „Everglades“-moorböden in Florida vor. Die Ursache der Krankheit wird von einigen Autoren (SMITH, JÖRGENSEN) auf die Wirkung besonderer Giftstoffe, von anderen auf schädliche Mikroorganismen zurückgeführt, während nach der Entdeckung des Kupfers als notwendiges Element der Pflanzenernährung (SOMMER, LIPMAN, BRANDENBURG) vielfach ein Kupfermangel als Ursache der Krankheit betrachtet wird.

KAPITEL II

2. Es wurden darum zunächst die Krankheitserscheinungen bei Getreide, Erbsen und Kartoffeln verglichen mit den Kupfermangelerscheinungen derselben Pflanzen in Wasser- und Sandkulturen.

Wasserkulturen. Das Wasser dieser Kulturen war zweimal destilliert aus Apparaten von Pyrex-Glas; die Salze, *pro analysi* Präparate von Kahlbaum und Merck, wurden zweimal umkristallisiert aus kupferfreiem Wasser. Für die Zusammensetzung der Nährlösung sehe S. 13.

Die gläsernen Kulturgefäße wurden mit heisser Salzsäure, dann mit heisser Salpetersäure behandelt und zuletzt mit kupferfreiem Wasser säurefrei gewaschen. In diesen Kulturen zeigten sich bei den Getreidearten schon nach $2\frac{1}{2}$ Wochen Kupfermangelerscheinungen: die jüngsten Blätter rollten sich um ihre Längsachse und fingen an von der Spitze her zu verdorren. Die jüngsten schon ausgewachsenen Blätter bekamen dürre, verschrumpfte Spitzen, die bei Hafer und Kanariensamen weiss, bei Gerste und Roggen gelbweiss, und bei Weizen graugelb gefärbt waren. Zur Aehrenbildung

kam es bei diesen Pflanzen überhaupt nicht. Es entwickelten sich zahlreiche Seitenhalme, die schon nach kurzer Zeit wieder ein ähnliches Bild zeigten (Abb. 1, 3, 5, 7).

Beim Zusatz von 10 γ Kupfer als $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ entwickelten sich Gerste, Weizen und Hafer anfangs ganz normal. Aehren und Rispen wurden aber bei diesen Pflanzen noch nicht ausgebildet (Abb. 9).

Nur der Roggen bildete bei dieser kleinen Menge Kupfer normale Aehren mit Körnern. Weizen, Hafer und Gerste brauchten hierzu 50 γ (Tab. 2). Kartoffeln ohne Kupfer zeigten eine Wachstumshemmung (Abb. 11); die jüngsten Blättchen falteten sich nach oben, während die Laubfarbe dunkler war als beim Zusatz von 20 γ Kupfer; auch die Knollenbildung war schlecht (Tab. 3).

Auch bei Erbsen trat ohne Kupfer gehemmtes Wachstum ein; die jüngsten Blätter hatten eine hellgelbe Farbe, wurden schlaff und vertrockneten. Die Blumen welkten meist vor der Blüte, während Früchte nicht gebildet wurden (Abb. 12, Tab. 3).

3. Nicht nur durch Umkristallisierung der Salze, sondern auch durch Behandlung mit Aktivkohle konnte die Nährlösung von Kupferverunreinigungen befreit werden. (Tab. 2a).

4. *Quarzsandkulturen.* Zur Entfernung des Kupfers wurde der Sand zuerst geglüht, dann während etwa 5 Stunden zuerst mit 15%iger Salzsäure, nachher mit 15%iger Salpetersäure auf dem Wasserbad erwärmt und zum Schluss mit kupferfreiem Wasser auf der Nutsche säurefrei gewaschen. Die Sandkulturen mit Hafer und Weizen wurden angestellt in Glasgefäßen von 1,3 und 2,4 l, und gedüngt mit einer Nährlösung der auf S. 21 erwähnten Zusammensetzung. Ebenso wie in den Wasserkulturen zeigten sich auch im Quarzsand ohne Kupfer bei den Pflanzen typische Mangelerscheinungen, während der Zusatz von 0,2 mg Kupfer je Gefäß ganz normale Pflanzen lieferte (Abb. 10, Tab. 4).

5. *Kulturen in krankem Boden.* Zu diesen Versuchen benutzte ich einen sehr kranken humosen Sandboden, einen Bleichsand, einen s.g. „Gliede“, einen wenig kranken Sandboden und einen wenig kranken Moorboden.

Die Symptome der Urbarmachungskrankheit zeigten sich bei Hafer, Weizen, Gerste und Kanariensamen in den erstgenannten drei Böden in einer sehr schweren Form. Diese Symptome waren vollkommen identisch mit den Mangelerscheinungen in den Wasser- und Sandkulturen ohne Kupfer (Abb. 2, 4, 6, 8, Tab. 5, 6, 7, 8). Ebenso waren die leichten Erscheinungen der Krankheit den leichten

Kupfermangelerscheinungen sehr ähnlich (Abb. 13, 14, Tab. 9, 10, 11).

6. Es stellte sich heraus, dass Pflanzenarten, die wenig empfindlich sind gegen die Urbarmachungskrankheit (Kartoffeln, Roggen) ein niedrigeres Kupferbedürfnis haben als die sehr empfindlichen Pflanzen wie Weizen, Gerste und Hafer. Ausserdem haben sie ein stärkeres Aneignungsvermögen für das Bodenkupfer.

7. Zur Heilung urbarmachungskrankter Böden muss man meistens viel mehr Kupfer hinzufügen als zur Beseitigung des Kupfermangels in Wasser- und Quarzsandkulturen erforderlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hier um eine Bindung des Kupfers an die Bodenbestandteile handelt, sodass nur ein kleiner Teil des angewandten Kupfersulfates von den Wurzeln aufgenommen werden kann. Wenn man nämlich die Pflanzen derart kultiviert, dass ein Teil der Wurzeln in krankem Boden wächst und die Uebrigen in kupferhaltigem Quarzsand oder vollwertiger Nährlösung (Abb. 16), so braucht die Kupfermenge nur sehr klein zu sein um gesunde Pflanzen zu erhalten (Tab. 13 A und B).

KAPITEL III

8. Mittels einer modifizierten Methode nach Neubauer wurde das pflanzenlösliche Kupfer in kranken und gesunden Böden bestimmt. Es wurden deutliche Differenzen gefunden zwischen sehr kranken, wenig kranken und gesunden Böden (Tab. 13).

9. In späteren Untersuchungen verwendete ich eine mikrobiologische Methode. Dieselbe gründet sich darauf, dass für die normale Entwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* kleine Quantitäten Kupfer erforderlich sind. Kultiviert man in einer Nährlösung der auf S. 41 beschriebenen Zusammensetzung, die mit Aktivkohle, nach dem Zusatz einer Spur NH_4SH , von Kupfer befreit worden ist, so bildet der Pilz keine Sporen, während auch das Mycel sich ziemlich schlecht entwickelt. Ein Zusatz von 0,2 γ Cu je 40 cc Nährlösung gibt normales Mycelwachstum mit gelben Sporen, 1 γ Cu gibt graubraune Sporen, während die Bildung schwarzer Sporen 2,5 γ erfordert.

Weil unter gleichen Umständen dieselbe Kupfermenge immer dieselbe Farbe der Schimmelsporen auslöst, kann man diese Farbe benutzen als Maszstab für die in der Nährlösung enthaltene assimilierbare Kupfermenge (siehe die Farbentafel).

Zur Bodenuntersuchung setzt man 1 g lufttrockenen Boden zu

40 cc der kupferfreien Nährlösung hinzu. Man kultiviert in Erlenmeyerkolben von 1 l. bei einer Temperatur von 30° C. Es wurde mit dieser Methode von etwa 75 kranken und gesunden Böden das pilzlösliche Kupfer bestimmt. Dabei ergab sich, dass sehr kranke Böden weniger als 0,4 γ verfügbares Kupfer je 1 g lufttrockenen Boden enthielten, wenig kranke 0,8–1,3 γ , während gesunde Böden mehr als 2 und öfters mehr als 2,5 γ pilzlösliches Kupfer aufwiesen (Tab. 17, 18, 19 en 20)

Diese Versuche zeigen, dass eine deutliche Korrelation besteht zwischen dem Gehalt der Böden an verfügbarem Kupfer und dem Vorkommen der Urbarmachungskrankheit.

10. Darauf wurde in Weizen, Hafer und Roggen gesunder und kranker Böden das Kupfer bestimmt. Das Pflanzenmaterial wurde in einem elektrischen Ofen bei ungefähr 500° C. verascht, darauf das Kupfer in verdünnter Schwefelsäurelösung elektrolytisch abgeschieden, wieder gelöst in Salpetersäure und mit Natriumdiaethyldithiokarbaminat im Pulfrich-Photometer kolorimetrisch bestimmt. Daneben sind eine Anzahl Bestimmungen ausgeführt worden mit der Aspergillus-methode. Aus diesen Versuchen ergab sich, dass bei kranken Pflanzen der Kupfergehalt der Samen niedriger war als 1 mg Cu je kg Trockensubstanz, bei gesunden immer höher (siehe Tab. 21–25).

KAPITEL IV

11. Es wurde untersucht, welche die Ursache des niedrigen Gehaltes heidemoorkranker Böden an pflanzenlöslichem Kupfer war. Dabei ergab sich, dass es kranke Böden gibt mit sehr niedrigem Totalkupfergehalt; daneben findet man aber solche, worin das Kupfer in schwerlöslicher organischer Form festgelegt ist (Tab. 26).

12. Es wurde gezeigt, dass schwarzer Heidehumus, sowie Gliede und Hochmoorhumus Kupfer in pilzunlöslicher Form festlegen können. Die mit der Smithschen Methode aus Gliede, kranken und gesunden Sandböden erhaltenen Extrakte und Destillate konnten diese Wirkung nicht ausüben. Ebenso wenig gelang es durch den Zusatz dieser Flüssigkeiten zu Wasserkulturen von Gerste die Urbarmachungskrankheit hervorzurufen. Grosse Mengen der Destillate übten zwar einen dem Pflanzenwachstum schädlichen Einfluss aus, aber die Schädigung war nicht identisch mit jener der Urbarmachungskrankheit und konnte im Einklang damit nicht mit Kupfer-

sulfat geheilt werden. Die von SMITH beschriebenen Gliedekristalle wurden nicht erhalten.

13. Schwefelwasserstoffbildende Bakterien vermögen Kupfer in eine für *Aspergillus niger* und höhere Pflanzen nicht verfügbare Form festzulegen (Abb. 17, 18). Es handelt sich dabei wahrscheinlich nicht um die einfache Bildung von Kupfersulfid, da dieser Stoff leicht umgebildet wird und alsdann von *Aspergillus* sowie von höheren Pflanzen in Wasserkulturen und in krankem Boden gut verwendet werden kann.

14. Auch in sterilen Kulturen konnten bei der Gerste die typischen Kupfermangelsymptome erhalten werden. Zur Sterilerhaltung dieser Kulturen wurde das von GERRETSEN beschriebene Verfahren mit Katadynsilber benutzt (Abb. 20).

15. Zur Erhöhung der Menge pflanzenlöslichen Kupfers gibt es folgende Massnahmen:

- 1) Dampfsterilisation (Tab. 31).
- 2) Behandlung des Bodens mit Alkohol oder Aceton (Tab. 33).
- 3) Düngung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ statt NaNO_3 (Tab. 33).
- 4) Verbesserung der Bodenstruktur, wodurch in einigen Fällen gute Resultate erhalten wurden (Tab. 30).

16. Pflanzen, aus kupferarmen Samen gewachsen, zeigten die Kupfermangelerscheinungen in einem früheren Stadium als solche aus kupferreichen Samen (Abb. 22, 23, Tab. 34, 35). Behandlung der Samen mit 0,3-procentiger Kupfersulfatlösung hatte ebenfalls ein besseres Pflanzenwachstum zur Folge. Es gelang aber nicht in dieser Weise auch auf schwerkrankem Boden gesunde Pflanzen zu erziehen (Tab. 36).

KAPITEL V

17. Wenn man einen überkalkten, urbarmachungskranken Boden durch Kupfersulfat geheilt hat, tritt öfters die sogenannte Dörrfleckenkrankheit auf. Diese Krankheit ist wahrscheinlich zurückzuführen auf einen Mangel an pflanzenverfügbarem Mangan. Es spielen dabei gewisse Mikroorganismen eine Rolle, die imstande sind, lösliche Manganverbindungen in unlösliche Manganoxyde zu verwandeln. Es hat sich nun gezeigt, dass auf kupferarmen, Mangankarbonat enthaltenden Agarnährböden der Zusatz kleiner Mengen Kupfer die von Pilzen ausgelöste Manganoxydation fördern kann. Wahrscheinlich spielt sich auch im Boden dieser von

Kupfer geförderte Manganumsatz ab. In manganarmen Wasserkulturen mit Roggen veranlasste der Zusatz von 50 γ Kupfer Symptome des Mangankmangels, die bei 10 γ kaum wahrnehmbar waren (Tab. 38).

18. Die Kupfermanglerscheinungen bei der Gerste in Wasserkulturen waren unabhängig von der Eisen-, Mangan-, Zink- und Kadmiumkonzentration (Tab. 39, 40, 41).

19. Weizen mit schwachen Kupfermangelsymptomen wird leichter von Mikroorganismen befallen als solcher mit guter Kupferversorgung. Es konnte dies gezeigt werden für zwei Aehrenkrankheiten, die eine veranlasst von dem Pilz *Septoria nodorum*, welcher auf den Spelzen schwarzbraune Flecken bildet, die andere von einem noch unbekanntem Mikroorganismus, welcher ebenfalls auf den Spelzen und auf den oberen Halmteilen längliche schwarzbraune Flecken verursacht (Abb. 24).

20. Es wird auf eine von einem niedrigen Kupfergehalt des Futters veranlasste Krankheit beim Rindvieh hingewiesen (Lecksucht). Zwischen dem Vorkommen dieser Krankheit und der Urbarmachungskrankheit konnte eine deutliche Beziehung konstatiert werden (Tab. 18).

21. In einem mit Wasserdampf gesättigten Gewächshaus zeigten sich bei der Gerste die Kupfermangelsymptome in weitaus weniger scharfer Form als im gut ventilierten Raum (Abb. 25).

KAPITEL VI

22. Nicht nur in der Sporenfarbe und der Mycelbildung, sondern auch in der Säurebildung konnte bei *Aspergillus niger* ein deutlicher Einfluss der Kupfermenge gezeigt werden (Tab. 43).

23. Das Kupfer konnte in seiner Wirkung auf *Aspergillus niger* nicht ersetzt werden durch eins der folgenden Elemente: Ba, Li, Ag, Pb, Al, Sn, T, V, Co, Mo, Bo, J, Cd, Mn und Zn.

24. Das Kupfer und das Kadmium zeigten hinsichtlich ihrer Wirkung auf *Aspergillus* einen deutlichen Antagonismus. Mit steigenden Kadmiummengen musste man steigende Mengen Kupfer zur Nährlösung hinzusetzen um dieselbe Sporenfarbe zu erhalten (Tab. 45, 46).

25. Auch zur normalen Entwicklung der Pilze *Aspergillus glaucus*, *Asp. flavus* und *Penicillium glaucum* sind kleine Kupfermengen

erforderlich. Das gilt nicht nur für die Menge und Farbe der Sporen, sondern auch für die Mycelbildung.

26. Die Schwarzfärbung älterer Kulturen von *Azotobacter chroococcum* bleibt aus, wenn der Nährboden von Kupfer befreit worden ist (Abb. 26). Ein Einfluss dieses Elementes auf das Wachstum von *Azotobacter* konnte jedoch nicht ermittelt werden.

27. Es ergab sich, dass kleine Mengen Kupfer von grosser Bedeutung sind bei der von *Acetobacter aceti* veranlassten Umsetzung von Aethylalkohol in Essigsäure (Abb. 27) und weiter bei der von Pilzen verursachten Manganoxydation (Abb. 28).

28. Auf Grund der katalytischen Wirkung kleiner Mengen Kupfer bei chemischen und biochemischen Oxydationsreaktionen ist es wahrscheinlich, dass auch in der lebenden Zelle dieses Element die Rolle eines Oxydationskatalysators spielt.

L I T E R A T U U R

1. ALLISON, R. V., BRYAN, O. C. en HUNTER, J. H., The stimulation of plant response on the raw peat soils of the Florida Everglades through the use of coppersulfate and other chemicals. Univ. of Florida Bull. 190, (1927).
2. ALLISON, R. V., The importance of the use of copper, manganese and zinc salts in the agricultural development of the lowmoor soils of the Florida Everglades. Sec. intern. congr. of soil sc. comm. VI, 257, (1930).
3. ARND, TH. en SEGEBERG, H., Über das Wasserbindungsvermögen des Torfes und dessen Zusammenhang mit den sogenannten Bodenkrankheiten (Urbarmachungskrankheit u.a.). Z. f. Pfl. Ern. u. Dg., 43, 134, (1936).
4. ARND, TH. en HOFFMANN, W., Spurenelemente und ihre Wirkung auf das Pflanzenwachstum unter besonderer Berücksichtigung von Versuchsergebnissen mit Kupfer. Landw. Vers. stat. 129, 71, (1937).
5. BAARS, J. K., Over sulfaatreductie door bacteriën. Diss. Delft, (1930).
6. BECKER, R. B., NEAL, W. H. en SHEALY, A. L., Salt sick: its cause and prevention Univ. of Florida, Agric. Exp. Sta. Bull. 231, (1931).
7. BEIJERINCK, M. W., Oxydation des Mangankarbonates durch Bacterien und Schimmelpilze. Folia microbiologica II, 123, (1913).
8. BOCKMAN, H., Ein Beitrag zur Biologie und wirtschaftlichen Bedeutung des Erregers der Braunfleckigkeit der Weizens: *Macrophoma hennebergii* (Kühn). Angew. Bot. XIV, 79, (1932).
9. BORTELS, H., Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. (Unter besonderer Berücksichtigung von *Aspergillus niger*). Bioch. Z. 182, 301, (1937).
- × 10. BRANDENBURG, E., Onderzoekingen over ontginningsziekte. T. over Plantenziekten 37, 17, (1931).
- × 11. BRANDENBURG, E., Onderzoekingen over ontginningsziekte II. T. over Plantenziekten 39, 189, (1933).
12. BROEK, A., Over het koper-, mangaan- en zinkgehalte van melk. Diss. Utrecht (1935).
13. BRÜNE, FR., Neuere Erfahrungen auf dem Gebiete der Moor- und Heidekultur. Mitt. d. Ver. z. Förd. d. Moorkultur. 51, 20, (1933).
14. BRYAN, O. C., The stimulating effect of external application of copper and manganese on certain chlorotic plants of the Florida Everglades Soils. Am. Soc. Agron. 21, 923, (1929).
15. BRYAN, O. C. en BECKER, R. B., The mineral content of soil types as related to „salt sick” of cattle. J. Am. Soc. Agron. 27, 120, (1935).
16. CLEVERINGA, O. J., De beteekenis van de structuur (werkzaamheid) van den bouwgrond in verband met het optreden van plantenziekten en beschadigingen. Landb. T. 50, 18, (1938).
17. DENSCH, A. en HUNNIUS, W., Versuche mit Kupfersulfat. Z. f. Pfl. Ern. u. Dg. A 3, 369, (1924).
18. DÜGGELI, M., Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflänzchen. Zentralbl. f. Bakt. 2e Abt. 12, 602, (1904), 13, 56, 198, (1904).

19. ELEMA, J., Prov. Dr. en Asser Courant, 8 Aug. 1910; zie ook Drentsch Landbouwblad van 5 Aug. 1920.
20. ELEMA, J. Dr. Lb. blad 19 Nov. 1936.
21. ELVEHJEM, C. A. en HART, E. B., The relation of iron and copper to hemoglobin synthesis in the chick. *J. Biol. Chem.* 84, 131, (1929).
22. ELVEHJEM, C. A., The action of copper in iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 97, XVI, (1932).
23. ELVEHJEM, C. A., The so-called autoxidation of cysteine. *Science* 74, 568, (1931).
24. ELVEHJEM, C. A., The rôle of iron and copper in the growth and metabolism of yeast. *J. Biol. Chem.* 90, 111, (1930).
25. FELIX, E. L., Correction of unproductive muck by the addition of copper. *Phytopath.* 17, 49, (1927).
26. FRECKMANN, W., Über den Einfluss von Kupfersulfat auf das Gedeihen der Pflanzen auf Niedermoor. *Mitt. d. Ver. z. Förd. d. Moorkult. i. Deutschen Reiche* 34, 245, (1916).
27. FRECKMANN, W., Können wir die Frostschäden auf unseren Mooren vermindern oder gar verhüten? *Mitt. d. Ver. z. Förd. d. Moorkult. usw.* 52, 117, (1934).
28. GERRETSEN, F. C., Das Katadyn-Verfahren zur sterilen Kultur höherer Pflanzen. *Planta* 23, 593, (1935).
29. GERRETSEN, F. C., Een onderzoek naar de oorzaken der veenkoloniale haverziekte. *Versl. v. landbk. onderz. Rijkslandb. proefst. Groningen*, 42, (1), A. (1936).
30. GOLLMICK, F., Der Einfluss von Zink, Eisen, Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. *Zentralbl. f. Bakt. 2e Abt.* 93, 421, (1935-'36).
31. HART, E. B., STEENBOCK, H., WADDELL, J. en ELVEHJEM, C. A., Copper as a supplement to iron for hemoglobinbuilding in the rat. *J. Biol. Chem.* 77, 797, (1928).
32. HONCAMP, F., *Handbuch der Pflanzenernährung und Düngerlehre*, Erster Bd. (1931), blz. 657.
33. HOYER, D. P., *Bijdrage tot de kennis van de azijnbacteriën*. Diss. Leiden, 1898.
34. HUDIG, J. en MEYER, C., *Bodemziekten III*, Rijkslandbouwproefst. Groningen (1922), zie ook *De Veldbode* van 3 Mei 1924.
35. HUDIG, J. en MEYER, C., *De ontginningsziekte en haar bestrijding*. *De Veldbode* van 24 Jan. 1925 en 13 Maart 1926.
36. HUDIG, J. MEYER, C. en GOODIJK, J., Über die sogenannte „Urbarmachungskrankheit“ als dritte Bodenkrankheit. *Z. f. Pfl. Ern. u. Dg. A.* 8, 14, (1926-'27).
37. HUDIG, J. en SJOLLEMA, B., *Onderzoek naar de oorzaken der vruchtbaarheidsafname van enkele gronden in de Groningsche en Drentsche veenkoloniën*. *Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandb. proefstat.* 5, (1909).
38. JØRGENSEN, C. A., *Gulspidssygen*. *T. for Planteavl.* 34, 76, (1928).
39. KREBS, H. A., Über die Rolle der Schwermetalle bei der Autoxydation von Zuckerlösungen. *Bioch. Z.* 180, 377, (1927).
40. KUBOWITZ, F., Über die chemische Zusammensetzung der Kartoffeloxydase. *Bioch. Z.* 292, 221, (1937).
41. KWIECINSKY, R., Contribution à la connaissance de l'action exercée par le sulfate de cuivre sur les sols tourbeux. *Mém. de l'Inst. nat. pol. d'écon. rur. à Pulawy* 11, 576, (1930).

42. LIPMAN, C. B. en MACK INNEY, C., Proof of the essential nature of copper for higher green plants. *Plant Physiology* 6, 593, (1931).
43. MACK, E., Untersuchungen über *Bacterium herbicola*. *Zentralbl. f. Bakt.* 2e Abt. 95, 218, (1936-'37).
44. MACK, G. L. en KERTESZ, L. I., The oxidation of ascorbic acid by metallic catalysts. *Food Research* 1, 377, (1936).
45. MCHARGUE, J. S. en CALVEE, R. K., Effect of manganese, copper and zinc on the growth of yeast. *Plant Physiology* 6, 559, (1931).
46. MCHARGUE, J. S. and CALVEE, R. K., Effect of manganese, copper and zinc on growth and metabolism of *Aspergillus flavus* and *Rhizopus nigricans*. *Bot. Gaz.* 91, 183, (1931).
47. METZ, O., Über Wachstum und Farbstoffbildung einiger Pilze unter dem Einfluss von Eisen, Zink und Kupfer. *Archiv f. Mikrob.* 1, 197, (1930).
48. MEYER, C., Verslag over een achtiental bemestingsproeven met koper-sulfaat. *Versl. v. landbk. onderz. der Rijkslandb. proefstations*, 40, 67, (1934).
49. NEAL, W. N. en BECKER, R. B., The composition of feedstuffs in relation to nutritional anemia in cattle. *J. Agric. Res.* 47, 249, (1933).
50. NEAL, W. N., BECKER, R. B. en SHEALY, A. L., A natural copper deficiency in cattle rations. *Science* 74, 418, (1931).
51. NEUBAUER, H., Die Keimpflanzenmethode nach Neubauer und Schneider, blz. 882 in *Honcamp. Handb. Pfl. Ern. u. Dg. lehre*, 1e Bd. (1931).
52. NIKLAS, H., Der Ausbau der *Aspergillus*methode usw., blz. 849 in *Honcamp.* Zie ook *Z. Pfl. Ern. u. Dg.* A 18, 129, (1930), id. id. B 12, 109, (1933), id. id. A 24, 167, (1932).
53. OMELIANSKY, W. L. en SSEWEROWA, O. P., Die Pigmentbildung in Kulturen des *Azotobacter chroococcum*. *Zentralbl. Bakt.* 2e Abt. 29, 643, (1911).
54. ONO, N., Zur Frage der chemischen Reizmittel. *Zentralbl. Bakt.* 2e Abt. 9, 154, (1902).
55. ORTH, O. S., Wickwire, G. C. en BURGE, W. E., Copper in relation to chlorophyl and hemoglobin formation. *Science* 79, 33, (1934).
56. PREGL, F., Die quantitative organische Mikroanalyse (1930), blz. 185.
57. RADEMACHER, B., Die Weiszährigkeit des Hafers, ihre verschiedene Ursachen und Formen. *Archiv f. Pfl.bau* 8, 456, (1932).
58. RADEMACHER, B., Die Heidemoorkrankheit (Urbarmachungskrankheit) unter besonderer Berücksichtigung der Kupferfrage. *Arb. a. d. biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch.*, 21, 531, (1936).
59. RADEMACHER, B., Kupfergehalt, Kupferbedarf und Kupferaneignungsvermögen verschiedener Hafersorten als Grundlage für die Züchtung gegen die Heidemoorkrankheit widerstandfähiger Sorten. *Z. f. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz*, 47, 545, (1937).
60. RIPPEL, A. en LUDWIG, O., Die Schwarzfärbung von *Azotobacter chroococcum* Beij. als Melaninbildung. *Zentralbl. Bakt.*, 2e Abt., 64, 161, (1925).
61. ROBERG, M., Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen bei *Aspergillen*. *Zentralbl. f. Bakt.*, 2e Abt., 74, 333, (1928).
62. RUSSELL, Sir E. JOHN, Soil conditions and plant growth, (1932), blz. 442.
63. SAMUEL, G. en PIPER, C. S., Grey speck (manganese deficiency) disease of oats. *J. of the departm. of agricult. of South Austr.* 31, 696 en 789 (1927-'28).
64. SAMUEL, G. en PIPER, C. S., Manganese as an essential element for plant growth. *Ann. of appl. biol.*, XVI, 493, (1929).
65. SCHARRER, K. en SCHROPP, W., Sand- und Wasserkulturversuche über die Wirkung des Zink- und Kadmiumions. *Z. Pfl. Ern. u. Dg.* A 34, 14, (1934).

66. SCHREVEN, D. A. VAN, Kopergebrek bij de suikerbiet. Meded. v. h. Inst. voor suikerb.teelt, Bergen op Zoom, VI, 37, (1936); zie ook Phytopath. 26, 1106, (1936).
67. SCHOLZ, W., Die Reinigung von Hohenbockaer Quarzsand zwecks Durchführung von Nährstoffmangelversuchen. Z. Pfl. Ern. u. Dg. 43, 1, (1936).
68. SEKERA, F. en SCHÖBER, K., Der Mikro-Düngungsversuch zur Bestimmung der Düngerwirkung von Phosphorsäure und Kali. Phosphorsäure 4, 321, (1934), id. id. 5, 261 en 527 (1935).
69. SJOLLEMA, B., Kupfermangel als Ursache von Krankheiten bij Pflanzen und Tieren. Bioch. Z. 267, 151, (1933).
70. SJOLLEMA, B., Likzucht en Ontginningsziekte. Landb.k. T., 45, 722, (1933).
71. SJOLLEMA, B., Over het wezen en de genezing van likzucht. T. v. Diergeneesk., 60, 1137, (1933).
72. SMITH, ERW. F., An introduction to bacterial diseases of plants (1920), blz. 20.
73. SMITH, W. S., Een onderzoek naar het voorkomen en de oorzaken van de verschijnselen, welke worden aangeduid met den naam „ontginningsziekte”. Diss. Wageningen, (1927).
74. SÖHNGEN, N. L., Umwandlungen von Manganverbindungen unter dem Einfluss mikrobiologischer Prozesse. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt. 40, 545, (1914).
75. SOMMER, A. L. Copper as an essential for plant growth. Plant Physiology, 6, 339, (1931).
76. STEINBERG, R. A., The nutritional requirements of the fungus *Aspergillus niger*. Bull. Torrey Bot. Club, 62, 81, (1935).
77. STEINBERG, R. A., Nutrient-solutions purification for removal of heavy metals in deficiency investigations with *Aspergillus niger*. J. of Agric. Res., 51, 413, (1935).
78. STEINBERG, R. A. Some effects of the heavy metals essential for the nutrition of *Aspergillus niger* upon its growth. Am. J. Bot., 23, 227, (1936).
79. SZENT-GYÖRGYI, A. v., Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Bioch. J., 22, 1387, (1928).
80. TACKE, B., ARND, TH., HOFFMANN, W., POOK, A., Die Urbarmachungs- oder Heidemoorkrankheit. Mitt. d. Ver. z. Förd. d. Moorkult. i. Deutschen Reiche, 47, 247, (1929).
81. THIJN, J. W., Over een, naar aanleiding van likzucht, ingesteld morphologisch bloedonderzoek bij het gezonde en het zieke rund. Diss. Utrecht (1936).
82. UNGERER, E., Über die Entstehung des Pigmentes von *Azotobacter chroococcum*. Z. Pfl. Ern. u. Dg. A 36, 287, (1934).
83. VAUGHN, R. en LEVINE, M., Hydrogen sulfide production as a differential test in the colon group. J. of Bact. 32, 65, (1936).
84. VISSER 'T HOOFT, F., Biochemische onderzoekingen over het geslacht *Acetobacter*. Diss., Delft. (1925).
85. WADDELL, J., STEENBOCK, H. en HART, E. B., The specificity of copper as a supplement to iron in the cure of nutritional anemia. J. Biol. Chem. 84, 115, (1929).
86. WAKSMAN, S. A., Principles of soil microbiology (1932), blz. 723.
87. WARBURG, O., Methode zur Bestimmung von Kupfer und Eisen und über den Kupfergehalt des Bluteserums. Bioch. Z. 187, 255, (1927).
88. WEISZFLOG, J., Studien zum Phosphorstoffwechsel in der höheren Pflanze. II. Zur sterilen Kultur der höheren Pflanze. Planta 19, 170, (1933).
89. WERTHEIMER, E., Ein autoxydables System als Modell einer Schwermetallkatalyse. Fermentforschung 8, 497, (1926).

90. WILLIS, L. G. en PILAND, J. R., The function of copper in soils and its relation to the availability of iron and manganese. *J. agric. Res.* 52, 467, (1936).
91. WILLIS, L. G. en PILAND, J. R., Some recent observations on the use of minor elements in North Carolina agriculture. *Soil Sc.* 44, 251, (1937).
92. WILLIS, L. G. en PILAND, J. R., The influence of copper sulfate on iron absorption by cornplants. *Soil Sc.* 37, 79, (1934).
93. WOLFF, L. K. en EMMERIE, A., Über das Wachstum des *Aspergillus niger* und den Kupfergehalt des Nährbodens. *Bioch. Z.* 228, 443, (1930).
94. WOLZOGEN KÜHR, C. A. H. VON, Manganese in Waterworks. *J. Am. Water Works Ass.* 18, 1, (1927).