

BAKTERİYEL DUT YANIKLIĞININ SİMPATOMATOLOJİSİ VE ETMENİ (*Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens) ' NİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Kâzım TÜRKÖĞLÜ¹

Yavuz Emin ÖKTEM²

G İ R İ Ş

Bakteriyel dut yanıklığı yurdumuzun bir çok yerinde Beyaz dut (*Morus alba*) üzerinde tesbit edilmiştir. Bremer et al. (1947 hastalık etmeni (*Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens) 'nin İzmir, Ankara ve Divriği' te tesbit edildiğini bildirmektedirler.

Bremer (1954) genç yaprakların hastalığa yakalanmasıyla, gayri muntazam bir gelişme gösterdiklerini, hastalığın çok ileri dönemlerinde ise yaprakların sararıp döküldüğünü, bazen meyvelerin kısmen veya tamamen siyahlaştuğunu, Karaca (1966) bakteriyel dut yanıklığının yapraklarda sarı lekeler halinde başladığını, bu lekelerin zamanla kahverengine sonra da siyaha döndüğünü, lekelerin etrafında sarı renkli bir halenin meydana geldiğini ve sürgünlerdeki lekelerin zamanla kabuk nekrozu haline dönüştüğünü bildirmektedirler.

Klement et al. (1960) hastalığın Avrupa'da yaygın olduğuna ve Macaristan'ın bir çok bölgelerinde beyaz dut ağaçlarının yaprak, süngün ve dallarında zararlar yaptığına işaret etmekte, *P.s. mori* ile yapılan enfeksiyon çalışmalarını sonucunda genç süngünlerde ölüm meydana geldiğini bildirmektedirler. Adı geçen yazarlar *P.s. mori* var. *huzi* 'nin dut yaprak ve sürgünlerinde meydana getirmiş olduğu simptomların *P.s. mori* 'nininkine tam olarak benzediğine fakat biyokimyasal özellikleri, faj aktivitesi ve antijenik strüktür bakımından farklı olduğuna işaret etmektedirler.

Breed et al. (1957) *P.s. mori* 'nin King B ortamında fluoresan pigment teşkil ettiğini, nitratlardan nitrit meydana getirmediğini, jelatin, H_2S ve indol testlerinden negatif sonuçların alındığını bildirmekte, % 4 lük $NaCl$ -etsuyu ortamında üreme olmadığına, süt testinde yalnız alkalizasyon elde edildiğine işaret etmekte, karbonhidratların fermentasyonunda gaz çıkışı tesbit edilmediğini bildirmektedir.

Klement et al. (1960), Klement ve Lovrekovich (1960) *P.s. mori* 'nin jelatin ve nişastanın hidrolizi, H_2S ve indol teşkilinde negatif, amonyak ve nitrat testlerinde pozitif sonuç verdiğini bildirmektedir. Süt testinde koagülasyon ve peptonizasyonun negatif, alkalizasyonunun ise pozitif olduğuna işaret

1 Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Meyva ve Bağ Hastalıkları Laboratuvarı Şefi - ANKARA.

2 Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Meyva ve Bağ Hastalıkları Laboratuvarı Başasistanı - ANKARA.

etmektedirler. Karbonhidratların fermantasyonunda gaz çıkışı tesbit edilmediğini, asit teşkilinin arabinoz, xyloz, glükoz, mannoz ve galaktozda kuvvetli, fruktoz ve rafinozda zayıf, gliserin ve mannitolde çok zayıf olduğunu bildirmektedirler. Maltoz, laktoz, dextrin, dulcitol ve salisin'de asit teşkili kaydedilmediğine işaret etmektedirler.

Bu çalışmanın amacı Ankara'nın Delice Kazasındaki hastalıklı dutların yaprak ve sürgünlerinden izole edilen patojen bakterinin meydana getirdiği belirtileri incelemek ve biyokimyasal özelliklerini detaylı olarak araştırmaktır. Bu konuyla ilgili çalışmalar Ankara Bölge Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsünde yapılmıştır.

M A T E R Y A L V E M E T O D

Çalışmada kullanılan hastalıklı materyal Ankara ilinin Delice ilçesindeki Beyaz dut ağaçlarından temin edilmiştir.

A — Patojenin izolasyonu :

Nekrozlu sürgün, yaprak ve yaprak saplarından alınan parçalar % 01 lik sodyum hipoklorit eriyiğinde tutulduktan sonra steril suyla yıkayıp kurutma kağıtları arasında kurutulmuştur. Steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra aseptik olarak NSA (Nutrient Sucrose Agar) ortamına inokule edilip 26°C de inkube edilmiştir.

B — Suni inokulasyon çalışmaları :

NSA ortamıyla izole edilen bakterilerin saf kültürleri elde edilmiştir. Eğri besin ortamına ekim yapılmış ve 48 saatlik üremeden sonra beyaz dut fidanlarının sürgün, yaprak ve yaprak saplarına enjektörle bakteri süspansiyonu inokule edilmiştir. İnokulasyon yerleri steril ıslak pamukla kapatılmıştır. Kontrol olarak bırakılmış olan dut fidanlarının sürgün, yaprak ve yaprak saplarına da steril su inokule edilmiş steril ıslak pamukla kapatılarak diğer fidanlarla birlikte naylon torbalar içerisine alınmış ve 72 saat sonra torbalar çıkarılmıştır.

Sürgün, yaprak ve yaprak saplarında meydana gelmiş olan belirtiler üzerinde kesit çalışmaları yapılmıştır.

C — Kültürel özellikler :

Patojen bakterinin NSA ortamında gelişmesi, koloni rengi ve şekli ve büyüklüğü incelenmiştir. Gram metoduyla boyanmıştır. Ayrıca hareketlilik muayenesi yapılmıştır.

D — Biyokimyasal testler :

Floresan pigment teşkili : Cowan ve Steel (1970) e göre yapılmıştır.

Oksidaz testi : Kovacs (1956) metoduna göre hazırlanmıştır. Ayrıca olarak % 1 lik Tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride kullanılmıştır. 10 saniye içerisinde mor rengin teşekkülü pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz testi : % 3 lük H₂O₂ solusyonu kullanılmış gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Glükozun kullanılması : Hugh ve Lefson (1953) a göre yapılmıştır.

Jelatinin hidrolizi : Beef ext. 3 gr, Pepton 5 gr, Jelatin (Difco) 120 gr. Destile su 1000 ml olarak hazırlanmıştır. Ortamın pH'si 7.0 dir. 115 °C de 20 dakika sterilize edilmiştir. İnokulasyondan 7 ve 10 gün sonra değerlendirme yapılmıştır.

Nişastanın hidrolizi : Pepton 5 gr, Beef ext. 5 gr, Nişasta 2 gr, Agar (Difco) 15 gr, Destile su 1000 ml olarak hazırlanmıştır. Ortamın pH 7.0 dir. 10 lb 10 dakika sterilize edilmiştir. İnokulasyondan 3 ve 6 gün sonra Lugol solusyonu ile kontrol edilmiştir.

Nitratlardan nitrit teşkili : Cruickshank et al. (1965) e göre yapılmıştır. İnokulasyondan 4 gün sonra A ve B solusyonları ile kontrol edilmiş ve meydana gelen kırmızı renk pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Solusyon A. 8 gr sulphanilic asit 1 litre 5 N asetik asit içerisinde çözülerek elde edilmiştir.

Solusyon B. 5 gr a-naphthylamine 1 litre 5 N asetik asit içerisinde çözülerek elde edilmiştir.

NaCl tolerans : % 4 NaCl ihtiva eden nutrient broth kullanılmıştır. İnokulasyondan 7 gün sonra değerlendirme yapılmıştır.

Amonyak teşkili : Wilson ve Miles (1957) ye göre yapılmıştır. İnokulasyondan 5 gün sonra Nessler ayraç ile kontrol edilmiştir. Kahverengi renk teşekkülü pozitif olarak kabul edilmiştir.

İndol teşkili : Ewing ve Davis (1970) metoduna göre yapılmıştır. Kovacs ayraç ile kontrol edilip pembe, koyu kırmızı renkler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Metol Red : Cruickshank et al. (1965) e göre yapılmıştır. İnokulasyondan 5 gün sonra metil-red indikatörü ile kontrol edilip açık kırmızı renk pozitif, sarı renk ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Voges Proskauer testi : Cruickshank et al. (1965) e göre yapılmıştır. İnokulasyondan 5 gün sonra O'Mera ve Barritt ayraçları ile kontrol edilip pembe rengin teşkili pozitif olarak değerlendirilmiştir.

H₂S teşkili : Peptonlu su kullanılmıştır. H₂S teşkili kurşun asetat emdirilmiş filtre kâğıtları ile kontrol edilmiştir.

Süt testi : Yağı alınmış taze süte % 1 oranında bromkresolpurpur ilâve edilip tindelize edilmiştir. İnokulasyondan sonra meydana gelen değişmelere göre değerlendirme yapılmıştır.

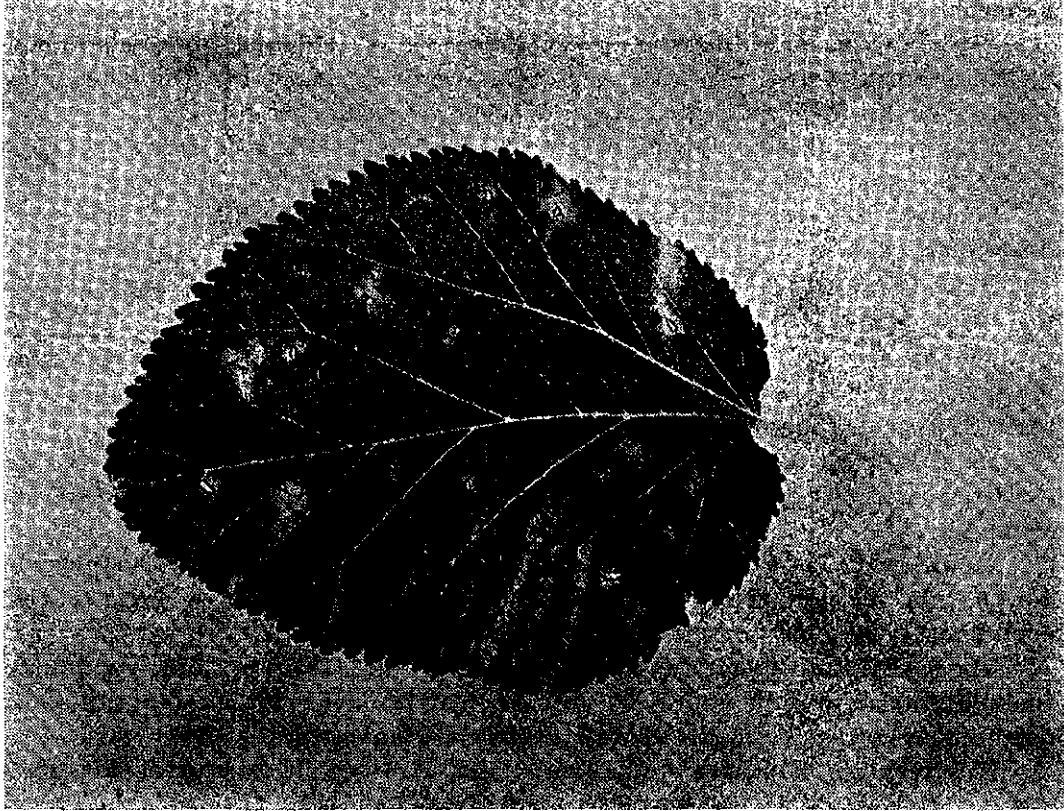
Tween 80 in hidrolizi : Sierra (1956) ya göre yapılmıştır.

Kazeinin hidrolizi : Skim milk % 10, Pepton, % 02, Beef ext. % 1, Agar (Difco) % 4 olarak hazırlanmış ve skim milk ayrı olarak 15 lb 5 dakika sterilize edilmiştir. Diğerleri ise 10 lb 10 dakika sterilize edilip karıştırıldıktan sonra inokulasyon yapılmıştır. 7 gün sonra koloniler etrafında teşekkül eden opak zon pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Karbonhidratların fermantasyonu : Bronthymolblue ilâve edilmiş olan peptonlu su kullanılmıştır. Bu ortama % 1 oranında aşağıdaki şekerlerden ilâve edilmiştir. Hekzozlar : fruktoz, galaktoz, glüköz, Disakaritler : laktoz, maltoz. Trisakaritler : rafinoz. Alkoller : gliserin, mannitol. İnokulasyondan sonra devamlı olarak yapılan gözlemlerle asit ve gaz çıkışına göre değerlendirme yapılmıştır.

S O N U Ç L A R

Hastahklı dut sürgünleri, yaprak nekrozları ve saplarından yapılan izolasyonlarda gelişmiş olan bakterilerin saf kültürleri elde edilmiştir. Bu kültürlerle yapılan inokulasyonlardan 20 gün sonra yaprak ve yaprak saplarında yer yer nekrozlar tesbit edilmiştir. Yapraklardaki nekrozların orta kısmı başlangıçta kahve renkli olup zamanla siyahlaşmaktadır. Nekrozların etrafı sarı renkli bir hale ile çevrilmiştir (Şekil 1).



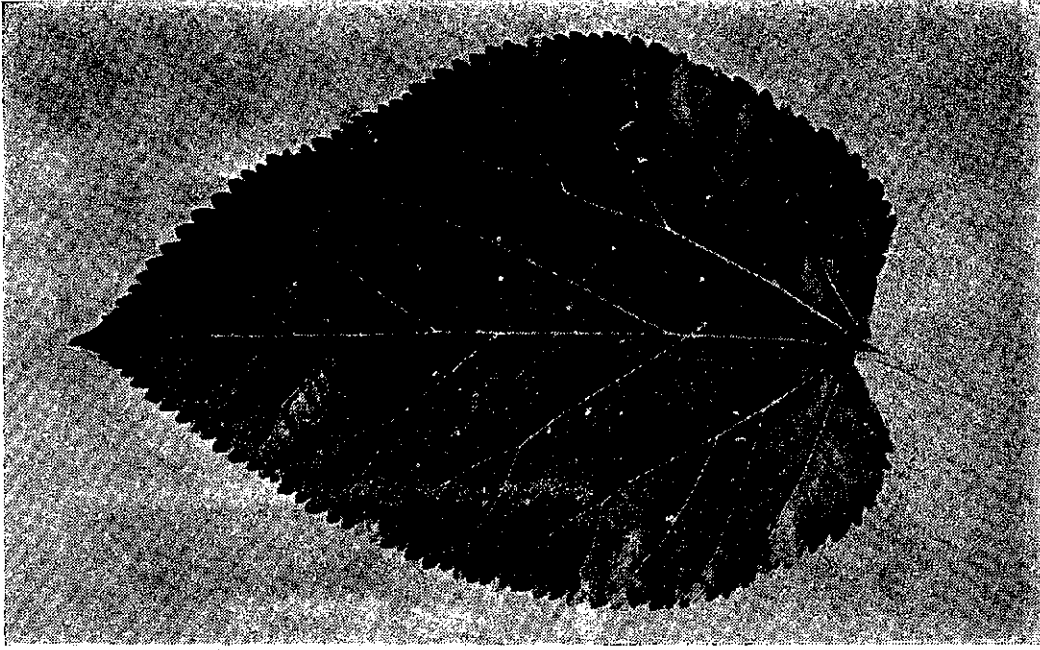
Şekil 1. P. s. mori'nin suni inokulasyonu sonucunda dut yapraklarında meydana gelen nekrozlar ve etrafındaki sarı renkli hale

Dut yapraklarında meydana gelen lekeler ve etrafındaki sarı renkli kısımlar üzerinden alınan kesitlerde hücre içerisinde tamamen bakteri kitlesiyle dolu olduğu, hücre zarlarının eridiği tesbit edilmiştir.

Kontrol olarak steril su inokule edilmiş olan dut yaprak ve yaprak saplarında herhangi bir gelişme tesbit edilmemiştir.

Inokulasyon yerleri etrafındaki dokunun sağlam ve normal yeşil renkli olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Laboratuvar şartlarında yapraklarda elde edilmiş olan lekeler doğa şartlarındaki semptomla tam bir benzerlik göstermiştir. Bu nekrozların zamanla büyüyerek birbiriyle birleştiği ve lekelerin orta kısmının kuruyarak döçüldüğü yaprağın parçalı bir şekil aldığı görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 2. Steril su inokule edilmiş olan kontrol yaprak.

Suni inokulasyon sonucunda sürgünlerde meydana gelmiş olan siyah lekeler incelendiğinde doku içerisinde bakteri kitlesinin kesif olduğu görülmüştür. Bu lekeler zamanla uzunlamasına gelişmeler göstermiş, sürgünün her tarafına yayılarak gelişmesini engellemiş ve daha sonra da kurummasına yol açmıştır (Şekil 4,5,6).

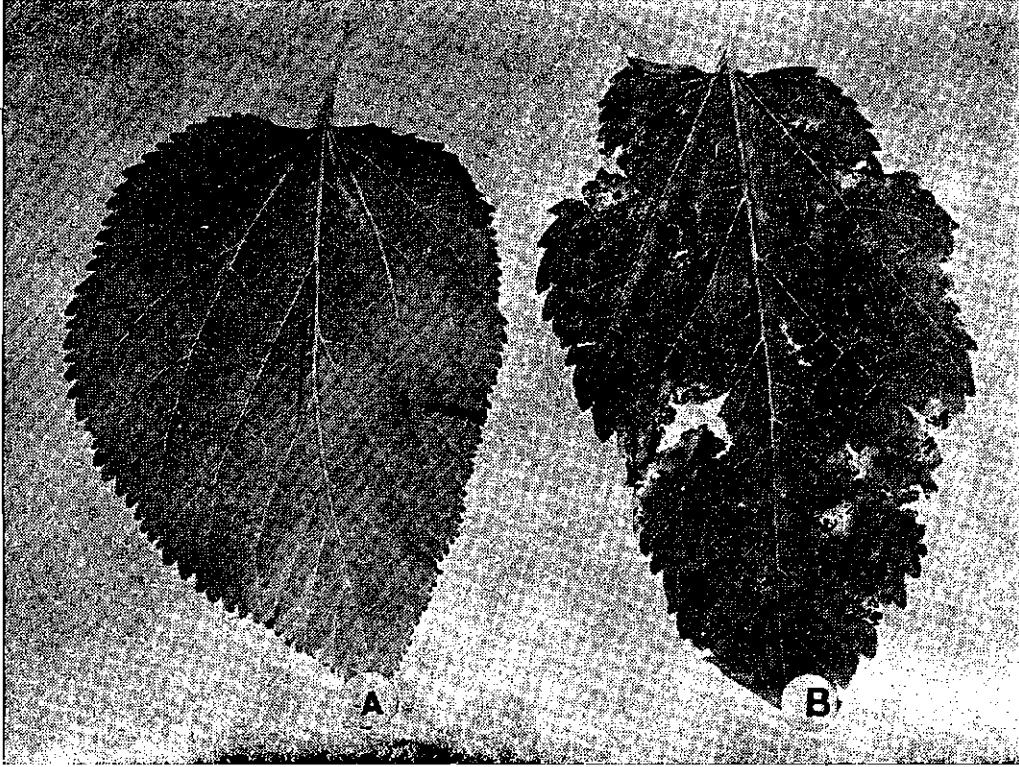
Kontrol olarak steril su inokule edilmiş olan sürgünlerde herhangi bir gelişme görülmemiştir.

Doğa şartlarında dut sürgünlerinde meydana gelmiş olan kabuk nekrozları incelendiğinde siyahlaşmanın sadece kabuğa inhisar ettiği tesbit edilmiştir. Ancak uzun zamandan beri nekroze olmuş sürgünlerde siyahlaşmanın kambiyuma kadar ilerlediği ve kabuğun içeriye doğru çökmüş olduğu kaydedilmiştir (Şekil 6).

Hastalıklı dut sürgünlerinde bulunan meyvelerde de yer yer siyahlaşmalar tesbit edilmiştir. Bu meyvelerden yapılan izolasyonlardan sonuç elde edilememiştir.

Patogen olduğu gerçekleşmiş olan bakteri NSA ortamında beyaz parlak renkli küçük koloniler meydana getirmiştir. Gram-negatif olarak tesbit edilmiş olan bakterinin hareketli olduğu görülmüştür.

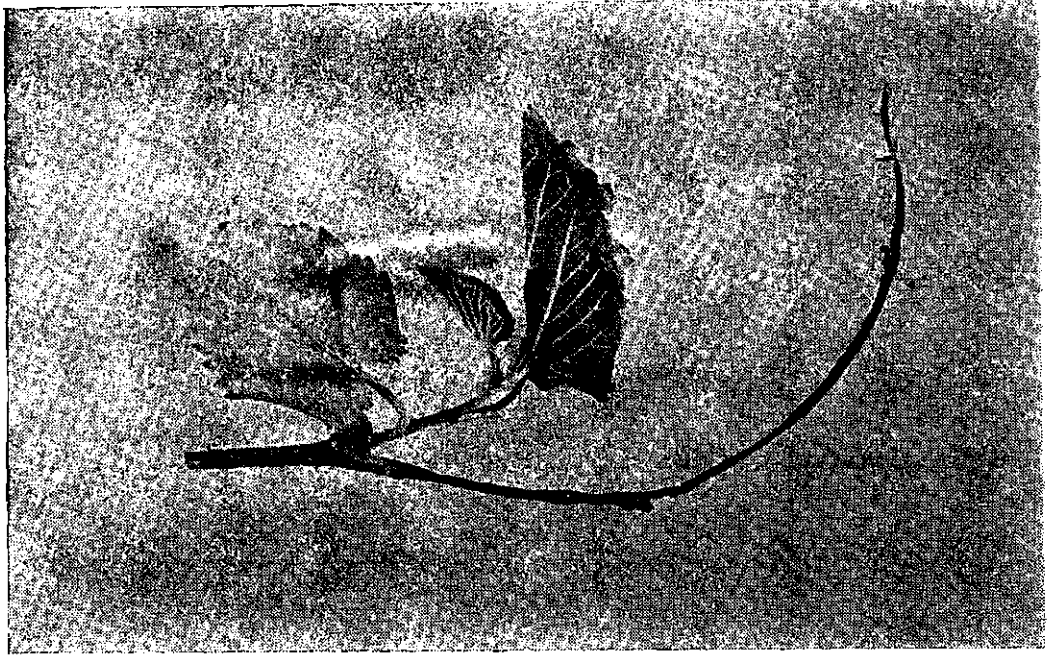
Inokulasyon çalışmaları sonucunda meydana gelmiş olan nekrozlardan yapılan re-izolasyonlarda aynı patojen elde edilmiştir.



Şekil 3. A — Sağlam dut yaprağı B — Lekelerin kuruyup dökülmesi sonucu parçalanmış hasta yaprak

Enfeksiyon çalışmaları sonucunda patojen olduğu kati olarak tesbit edilmiş olan kültürün King B ortamında pigment teşkil ettiği görülmüştür. Oksidaz testinden negatif sonuç alınmıştır, zira 10 saniye içerisinde renk değişimi olmamıştır. Jelatinin ve nişastanın hidrolizinden negatif sonuçlar alınmıştır.

Glikozun kullanılmasında sadece açık tüplerde gelişme olmuş, parafinle kaplı tüplerde çok az bir renk değişimi görülmüş, böylece patojenin glikozu oksidatif olarak kullandığı tesbit edilmiştir. Katalaz testinden pozitif sonuç alınmıştır. % 5 lik NaCl ihtiva eden nutrient broth ortamında üreme tesbit edilmemiş ve NaCl toleransı negatif olarak değerlendirilmiştir. Amonyak teşkil pozitif olarak sonuçlanmıştır. İndol, metil-red ve H₂S testlerinden negatif değerler elde edilmiştir. Voges-Proskauer testinden gecikmeli pozitif bir netice alınmıştır. Süt testinde koagülasyon ve peptonizasyon görülmemiş olup alkolizasyon tesbit edilmiştir. Tween 80 nin hidrolizinde koloniler etrafında opak bir zon tesbit edilmiş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Nitrit teşkil negatif sonuç vermiştir. Kazeinin hidrolizinde koloniler çevresinde opak bir çember görülmemiş ve negatif olarak tesbit edilmiştir. Biyokimyasal test sonuçları Cétvel 1 de topluca verilmiştir.



Şekil 4. Suni inokasyon çalışmaları sonucunda *Ps. mori*'nin kuruttuğu sürgün

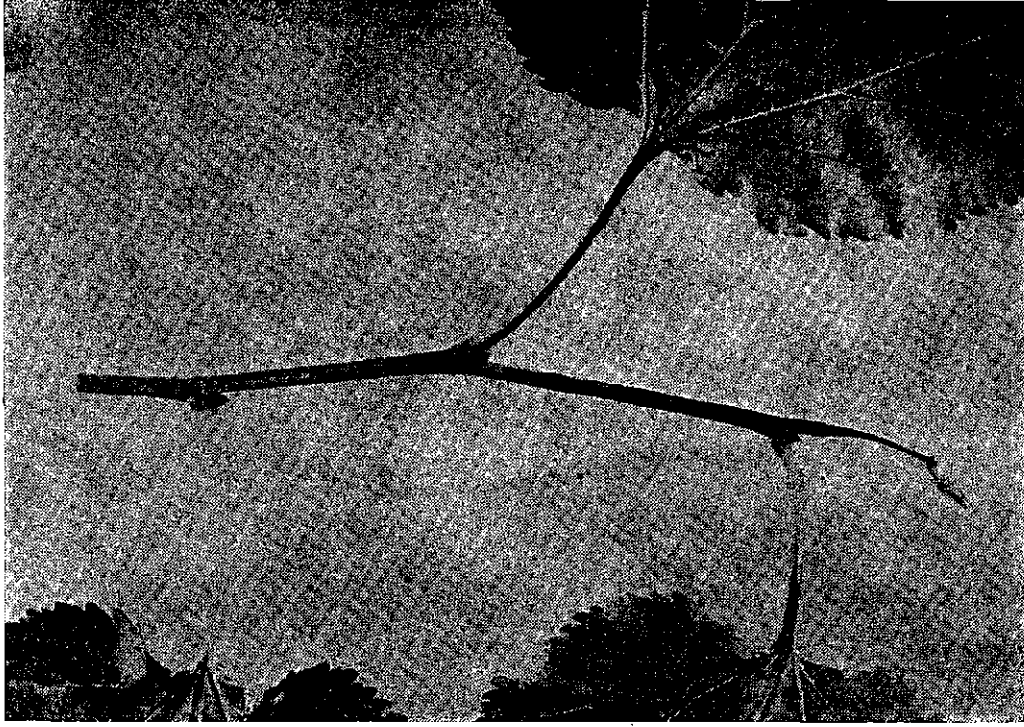
C E T V E L 1

Ps. mori'nin biyokimyasal test sonuçları

King B ortamında pigment teşkili	+
Oksidaz	—
Jelatinin hidrolizi	—
Nişastanın hidrolizisi	—
Glikozun kullanılması	—
Açık	+ oksidatif
Kapalı	—
Katalaz	+
NaCl tolerans	—
Amonyak teşkili	+
İndol testi	—
Nitratlardan nitrit teşkili	—
Metil Red testi	—
Süt testi	Alkalizasyon
V.P. testi	+ gecikmeli
Kazeinin hidrolizi	—
Tween 80 nin hidrolizi	+

+ Pozitif sonuç

— Negatif sonuç



Şekil 5. Suni inokulasyon çalışmaları sonucunda *Ps. mori*'nin sürgün ve yaprak sapında meydana getirmiş olduğu siyah lekeler

Karbonhidratların fermantasyonunda gaz çıkışı tesbit edilmemiştir. Patojenin, arabinoz, xyloz, glikoz ve galaktoz da kuvvetli, fruktoz ve rafinozda zayıf, gliserin ve mannitolde çok zayıf asit teşkil ettiği tesbit edilmiştir. Laktoz ve maltoz'da asit teşkili görülmemiştir (Cetvel 2).

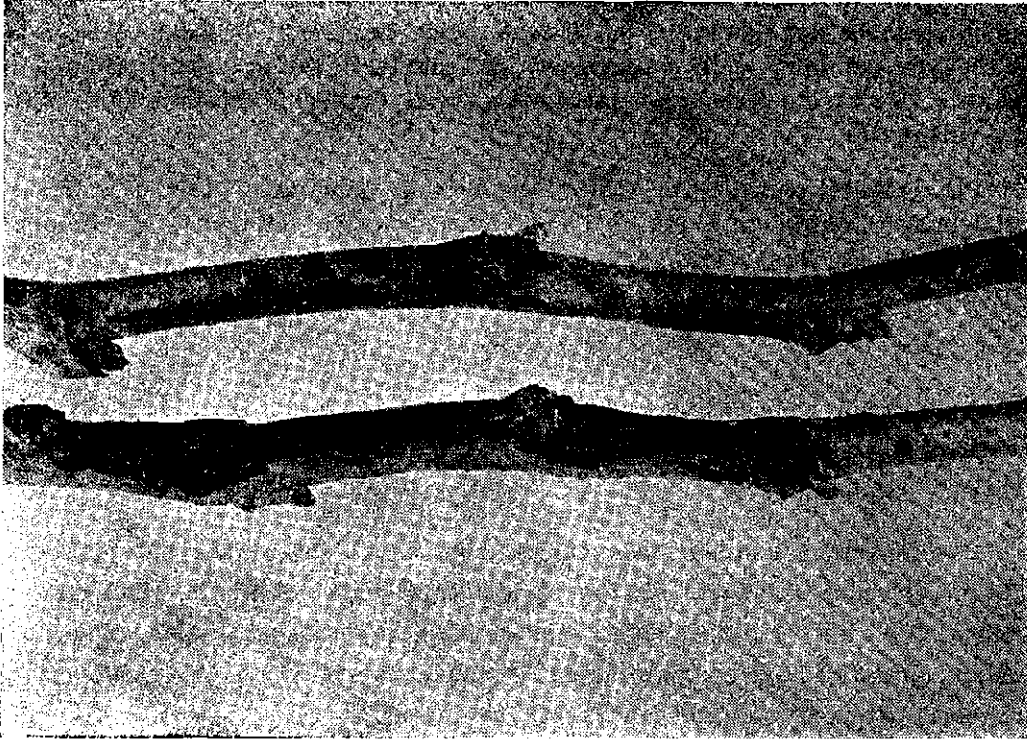
C E T V E L 2

Ps. mori'nin karbonhidratlara etkisi

	Arabinoz	Laktoz	Raffinoz	Xyloz	Glikoz	Fruktoz	Maltoz	Galaktoz	Gliserin	Mannitol
Asit 1	+++	—	++	+++	+++	++	—	+++	+	+
Gaz 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1 Asit : Asit teşkili kuvvetli +++, Zayıf ++, çok zayıf +, Yok —

2 Gaz : Gaz teşkili yok —



Şekil 6. Ps. mōri'nin doğa şartlarında meydana getirdiği kabuk nekrozları

M Ü N A K A Ş A V E K A N A A T

İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilmiş olan bakterilerin saf kültürleriyle yapılan patojenisite çalışmaları müsbet neticeler vermiştir. Dut fidanlarının sürgün, yaprak ve yaprak saplarında meydana getirmiş olduğu belirtiler kullanılmış olan kültürün patojen olduğunu ispatlanmıştır.

Sonuçlar bölümünde belirtildiği üzere patojenisite çalışmaları sonucunda elde edilmiş olan belirtiler Bremer (1954), Karaca (1966) ve Klement et al. (1960) tarafından doğrulanmaktadır.

Patojenin kültürel özellikleri, King B ortamında fluoresan pigment teşkil etmesi, H₂S, nitratlardan nitrit teşkili ve indol testlerinden negatif sonuçlar vermesi, sütün alkalizasyonu, jelatini hidrolize etmemesi ve % 4 lük NaCl ihtiva eden et suyu ortamında ürememesi Breed et al. (1957) tarafından doğrulanmaktadır.

Amonyak teşkilinin pozitif ve nişastanın hidrolizinde negatif sonuçlar vermesi, arabinoz, xyloz, glikoz ve galaktozun fermantasyonunda asit teşkilinin kuvvetli, fruktoz ve raffinozda zayıf, gliserin ve mannitolde çok zayıf olması, maltoz ve laktozda asit teşkil etmemesi, fermantasyon sırasında gaz teşkilinin görülmemesi Klement et al. (1960), Klement ve Lovrekovich (1960) tarafından teyit edilmektedir.

Oksidaz, katalaz, glikozun kullanılması, metil red, Voges-Proskauer, tween 80 ve kazeinin hidrolizinden alınmış olan neticeler adı geçen yazarların çalışmalarında yer almamıştır. Fakat 1892 numaralı orijinal *P. s. mori* kültürüyle yapılmış olan mukayeseli çalışmada, orijinal kültür, izole edilen patojen *Pseudomonas* ile biyokimyasal testlerin hepsinde aynı sonuçları vermiştir.

Patojenisite çalışmaları, kültürel ve biyokimyasal testler sonucunda izole edilen patojenin *Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens olduğu kanaatine varılmıştır.

Ö Z E T

Ankara'nın Delice Kazasında dutlarda tesbit edilmiş olan bakteriyel hastalığın teşhisini yapmak amacıyla izolasyon, patojenisite ve biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

Patojenisite çalışmaları sonucunda izole edilen bakterinin patojen olduğu saptanmış ve re-izolasyonlarda da aynı bakteri elde edilmiştir. 1892 numaralı orijinal *P. s. mori* kültürüyle yapılan biyokimyasal çalışmalardan aynı sonuçlar alınmış, böylece patojenin *Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens olduğu kanaatine varılmıştır.

T E Ş E K K Ü R

Bu çalışmanın yapılmasında ihtiyaç duyduğumuz bazı kimyasal maddelerin ve literatürün temininde gösterdikleri ilgiden dolayı BDH Chemicals Ltd.'e ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumuna teşekkür ederiz.

S U M M A R Y

STUDIES ON THE SYMPTOMATOLOGY AND THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BACTERIAL MULBERRY BLIGHT CAUSE (*Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens).

The study was carried out in order to identify the cause of the bacterial disease which was seen on mulberry (*Morus alba*) trees in Delice province of Ankara.

Pure cultures of the pathogene were obtained by several isolations and the bacteria suspension was inoculated in the leaves and twigs of mulberry, and the inoculated portions are kept in polyethylene bags. Sterile water was inoculated in the control twigs and leaves. The bags were taken off three days later.

Necroses have been observed on the leaves and twigs during the check-ups which were made 20 days after the inoculation. Those twigs died off afterwards. The same pathogene bacteria were found in the later re-isolations.

The bacterium was found to be gram-negative, slow growing, shiny, white and in small colonies.

The biochemical tests such as King B, oxidative metabolism of glucose, ammonia production and hydrolise of Tween 80 were found to be positive but oxidase test, indol production, starch hydrolysis, methy red, casein hydrolysis gave negative result. Alkalisisation was obtained in milk.

In the fermentation of carbohydrates, arabinose, xylose, glucose, galactose acid formotion is fast, with raffinose and fructose it is slow but very slow with glycerol and mannitol. No gas formation is found.

The pathogene is found to be *Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens after the symptoms, cultural characteristic and biochemical studies.

L I T E R A T Ü R

- BREMER, H., H. İŞMEN, G. KAREL, H. ÖZKAN und M. ÖZKAN, 1947. Beitrage Zur Kenntnis der parasitischen Pilee der Turkei. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası: XII (2) 125.
- , 1954. Türkiye Fitopatolojisi (Bahçe Kùltürleri Cilt III). Ziraat Ve-kâleti yayınları No. 715.
- BREED, R.S., E.G.D., MURRAY, and N.R. SMITH, 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- COWAN, S.T. and K.J. STEEL, 1970. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge at the University press.
- CRUICKSHANK, R., J.P. DUGUID, and R.H.A. SWAIN, 1965. Medical Microbiology. A Guide to the laboratory diagnosis and control of infection. E. and S. Livingstone Limited, Edinburgh and London.
- EWING, W.H. and B.R. DAVIS, 1970. Media and test for differentiation of Enterobacteriaceae. U.S. Department of Health, Education and welfare Public Health Service, Atlanta.
- HUGH, R. and E. LIEFSON, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbonhydrates by various Gram negative bacteria, J. Bact 66, 244.
- KARACA, İ., 1966. Sistematik Bitki Hastalıkları (Bakteriyel Hastalıklar) Cilt 1. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No. 124 Bornova-İzmir.

KLEMENT, Z. and L. LOVREKOVICH, 1960. Comparative study of *Pseudomonas* species affecting hemp and the mulberry tree. Acta Microbiologica Z, 113-119.

———, ———, and M. HEVESI, 1960. Studies on the biochemistry, phage sensitivity and serological properties of *Pseudomonas* pathogenic to mulberry. Phytopath Z. 38, 18-32.

KOVACS, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond. 178, 703.

SIERRA, G., 1956. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organism and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie von Leeuwenhoek 23, 15-22.

WILSON, G.S. and A.A. MILES, 1957. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. Vol 1, Edward Arnold LTD. London.