FOLIA FORESTALIA POLONICA
SERIA B, ZESZYT 5 1963

Jerzy Ważny

BADANIA NAD ZASTOSOWANIEM BARWNYCH REAKCJI DO OZNACZANIA GRZYBÓW NISZCZĄCYCH DREWNO

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ЦВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANWENDUNG FARBIGER REAKTIONEN ZUR BESTIMMUNG HOLZZERSTÖRENDER PILZE

WSTĘP

Najczęstszą postacią występowania grzybów niszczących drewno jest ich stadium wegetatywne, głównie grzybnia. Grzyby mogą rozwijać się na powierzchni drewna lub w drewnie nie tworząc przez długi okres czasu owocników. W takich przypadkach oznaczenie rodzaju i gatunku grzyba napotyka często poważne trudności. Cały bowiem szereg gatunków grzybów niszczących drewno wytwarza grzybnię o mało zróżnicowanych cechach morfologicznych, szczególnie we wczesnym okresie rozwoju.

Dla ułatwienia oznaczania grzybów niektórzy badacze proponują zastosowanie metody barwnej reakcji polegającej na barwieniu preparatów.

Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu tej metody do oznaczania grzybów niszczących drewno znajdują się u Millera (2). Zastosował on do barwienia grzybni błękit toluidenowy i uzyskał doskonałe rezultaty przy rozróżnianiu grzybów *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr. i *Poria vaporaria* Pers. we wczesnych stadiach ich rozwoju.

Starfinger (10) podaje opis metody barwienia mikroskopowych preparatów sznurów za pomocą brylantowego błękitu Kongo i brunatu bawełnianego, pozwalającej na odróżnienie grzybów *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr., *Merulius silvester* Falck, *Paxillus panoides* Fr., *Poria Vaillantii* (D. C.) Fr. i *Coniophora cerebella* Pers.

Żurawlow (12) zastosował z dobrymi wynikami czerwień Kongo, lakmoid, czerwień metylową i ich mieszaniny do barwienia i rozpoznawania grzybni bardzo zbliżonych wyglądem gatunków grzybów domowych.

Metodę cytochemiczną zastosowali również Ford i Ravlius (4) używając błękitu bromofenolowego do odróżniania *Cronartium ribicola* Fisch. od *Cronartium occidentale* Hedgc.

Zastosowane przez wymienionych autorów metody pozwalały na szybkie oznaczenie gatunku za pomocą barwnych reakcji, nie uwzględniały jednak pewnych czynników mogących mieć wpływ na przebieg i rezultaty badań.

Niniejsza praca miała na celu w miarę możliwości wszechstronne zbadanie metody barwnych reakcji w zastosowaniu do oznaczania najczęściej występujących w Polsce grzybów niszczących drewno przy użyciu dostępnych w kraju barwników oraz ustalenie zakresu i warunków pozwalających na jej zastosowanie w praktyce.

1. CHEMIZM GRZYBNI JAKO PODSTAWA OZNACZANIA GRZYBÓW ZA POMOCĄ BARWNYCH REAKCJI

Związki chemiczne wchodzące w skład grzybów mają różną zdolność barwienia się pod działaniem barwników. Pochłanianie barwników przez komórki grzybni jest złożonym procesem fizyko-chemicznym, w którym odgrywają rolę takie zjawiska i czynniki, jak powinowactwo molekularne, energia dyfuzji, napięcie powierzchniowe, absorpcja, ładunek elektryczny, pH i szereg innych, nie całkowicie poznanych.

Różnice w zabarwieniu mogą być spowodowane:

1) ewentualną różnicą w składzie chemicznym grzybni poszczególnych gatunków grzybów;

2) różną wartością pH substancji komórkowej grzybni związaną z jej składem chemicznym.

Mikrochemiczna metoda oznaczania grzybów może wykorzystywać pierwszą lub drugą z wymienionych różnic w chemicznej charakterystyce grzybni. Skład chemiczny grzybni grzybów niszczących drewno nie jest dotychczas szczegółowo zbadany. Istniejące wyniki analiz świadczą o stosunkowo dużym zróżnicowaniu jakościowym i ilościowym składników w grzybni różnych gatunków grzybów. Ogólnie biorąc grzybnia zawiera dużą ilość wody, która stanowi około 90% ciężaru. Na przykład młoda grzybnia *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr. zawiera 91% wody (9). Pozostała część grzybni, czyli tzw. sucha masa, złożona jest głównie ze związków organicznych wchodzących w skład błony komórkowej i protoplazmy. Błona komórkowa grzybów niszczących drewno zawiera 3—5% chityny w stosunku do ciężaru suchej masy grzybni. Tę ilość wydzielił Proskuriakow (6) z grzybni *Armillaria mellea* Quel., *Lactarius volemus* Fr. i *Psaliota campestris* Fr. gdy tymczasem grzybnia *Polyporus betulinus* (Bull.) Fr. nie zawierała w ogóle chityny w stanie niezmienionym. Przypuszcza się, że w grzybni tego gatunku grzyba, a prawdo-

podobnie także i innych gatunków występuje substancja zbliżona do chityny, ale prawie pozbawiona azotu, zwana mycetyną. Przy hydrolizie tego związku uzyskuje się jako produkt końcowy nie chitozę, jak przy chitynie, ale mikozę. Ilość chityny w błonie komórkowej jednego gatunku grzyba nie jest wartością stałą. Behr (5) stwierdził, że zawartość chityny zmienia się z wiekiem kultury grzyba; najczęściej zawartość ta zmniejsza się wskutek autolizy. pH podłoża wywiera tu również duży wpływ; na podłożu kwaśnym grzybnia zawiera więcej chityny niż na podłożu zasadowym. Jak podaje Schmidt (5), na zawartość chityny w grzybni wpływa również temperatura otoczenia w czasie rozwoju; nawet niewielkie jej podwyższenie zmniejsza ilość chityny. W błonie komórkowej obok chityny występują związki inkrustujące, głównie hemicelulozy i pektyny. Jaczewski (6) podaje następującą zawartość związków hemicelulozowych w % suchej masy grzybni: *Coniophora cerebella* Pers. — 4,2, *Poria vaporaria* Pers. — 4,01, *Paxillus acheruntius* Schröt. — 2,61, *Deadalea quercina* (Pers.) — 2,93 i *Schisophyllum commune* Fr. — 3,01. W grzybni grzybów niszczących drewno stwierdzono również obecność związków podobnych do ligniny, ale nie zawierających grup metoksylowych i nie dających zwykłych reakcji na ligninę. Substancje te otrzymano przez hydrolizę grzybni stężonymi kwasami, przy czym u *Fomes fomentarius* Fr. stanowiły one 25% suchej masy, u *Polyporus sulphureus* Fr. — 3,40%, u *Fomes igniarius* Fr. — 36,95% i u *Trametes pini* Fr. — 54,08% (5). W błonach komórkowych grzybni *Daedalea quercina* Pers. oprócz związków ligninopodobnych występuje również suberyna (6).

Skład chemiczny protoplazmy komórek grzybni jest bardziej złożony. Analizy wykazują przede wszystkim obecność produktów hydrolitycznego rozpadu białek; są to aminokwasy, jak histydyna, arginina, lyzyna, tryptofan, isoleucyna, walina, fenyloalanina (9). Ogólna ilość białek w % ciężaru suchej masy grzybni wynosi na przykład u *Polyporus ovinus* Fr. — 12,5, u *Hydnum repandum* Fr. — 14,3 (6). Tłuszcze i kwasy tłuszczowe występują w protoplazmie zwykle w formie oddzielnych skupień i kropli, przeważnie w ilości kilku procent. W grzybni *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr. stwierdzono 13,08% tłuszczu, natomiast w owocnikach *Pholiota squarrosa* Karst. 3,5%, *Trametes suaveolens* Fr. 0,8%, *Fomes igniarius* Fr. — 1,08% (6). Protoplazma zawiera znaczne ilości glikogenu, stanowiącego w grzybach podstawową substancję zapasową. Klotrio (6) podaje ilość glikogenu w stosunku do ciężaru suchej masy grzybni dla *Boletus crassus* Mass. 20% i dla *Amanita muscaria* Fr. 14%. Krawkow (6) stwierdził obecność glikogenu w grzybach rodzajów *Polyporus, Agaricus, Boletus* i in. W małej ilości występują w grzybach: skrobia rozpuszczalna, wyższe dekstryny oraz cukry proste, jak glikoza, fruktoza, mannoza i in. Margewicz (6) stwierdził w grzybni *Boletus scaber* Bull. 11,46% mannozy i 1,90% glikozy. Obecności sacharozy

w grzybach nie stwierdzono. Zastępuje ją trenaloza, czyli mikoza, zwana cukrem grzybowym. Według Bourguelota (6) zawartość mikozy wynosi u *Lentinus tigrinus* Bull. 0,28%, a u *Lentinus cochleatus* Pers. — 1,2%. Mikoza przy działaniu nieco podwyższonej temperatury łatwo przemienia się w mannozę.

Grzyby zawierają znaczne ilości różnych kwasów organicznych. Nieliczne wyniki analiz podają następujące kwasy: szczawiowy, winowy, jabłkowy (*Coniophora cerebella* Pers.), fumarowy (*Lenzites betulina* Fr., *Polyporus squamosus* Fr.), mrówkowy, masłowy, palmitynowy, rycynowy i szereg innych (5, 6).

Stosunkowo znaczny udział w suchej masie grzybni mają związki nieorganiczne. Na przykład grzybnia *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr. zawiera w stosunku do suchej masy 6,33—9,66% soli, *Polyporus officinalis* Fr. — 1,08%, *Armillaria mellea* Quel. — 7,5%. Stosunek ilości soli rozpuszczalnych do nierozpuszczalnych zależny jest od części grzyba (6). Owocnik *Merulius lacrymans* zawiera soli nierozpuszczalnych 11,4%, a rozpuszczalnych — 88,6%. W grzybni tego gatunku stosunek jest odwrotny: 82,6% soli nierozpuszczalnych i 17,4% rozpuszczalnych. Ilość różnych pierwiastków w popiele grzybni waha się w szerokich granicach, od dziesiątych procenta do kilkudziesięciu procent. Grzybnia *Merulius lacrymans* zawiera na przykład potasu 9,8%, sodu 0,24%, wapnia 14,71%, żelaza z aluminium 26,65%, manganu 1,48%, fosforu 36,23%, krzemu 3,5%, chloru 1,21% (13).

Skład chemiczny grzybni nie jest jednak wartością stałą dla gatunku grzyba, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym. Różne warunki rozwoju, a przede wszystkim różne rodzaje podłoża wywierają wpływ na przebieg przemiany materii, a tym samym decydują o zawartości różnych składników (5).

Ze składem chemicznym błony i substancji komórkowej, a w szczególności z zawartością składników kwaśnych i zasadowych w komórce związana jest koncentracja jonów wodorowych, czyli pH. Wpływ pH podłoża na rozwój grzybów był tematem licznych prac, natomiast wartość pH substancji komórkowej grzybni była przedmiotem tylko nielicznych badań. Odczyn substancji komórkowej po raz pierwszy oznaczył Robbins (5), który stwierdził dla *Rhizopus nigricans* Ehrenb. pH 5,0 i dla *Fusarium dycopersici* B. pH = 5,5. Armstrong (7) określił pH soku wyciśniętego z owocników grzybów kapeluszowych na 5,9 do 6,2. Mahdihassan (8) oznaczył wartość pH substancji komórkowej *Fusarium sp.* na 6,1. Bünnig (3) posługując się indykatorami ustalił, że pH substancji komórkowej *Aspergillus niger* v. Tiegh. waha się w granicach 4,2—5,0 i zależy od kwasowości środowiska, w którym grzyb się rozwija.

W literaturze naukowej brak danych dotyczących wartości pH substancji komórkowej grzybów niszczących drewno. Badania nad tym zagadnieniem przeprowadził autor niniejszego opracowania (11).

2. MATERIAŁY BADAWCZE

Badania nad zastosowaniem metody barwnych reakcji do oznaczania grzybów niszczących drewno przeprowadzono na czystych kulturach 14 gatunków, a mianowicie: *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fr., *Poria vaporaria* Fr., (*Coriolus vaporarius* (Fr.) Bond. et Sing.), *Poria Vaillantii* DC. (*Fibuloporia Vaillantii* (DC.) Bond. et Sing.), *Poria medulla — panis* Bres., *Poria callosa* Fr., (*Coriolellus serialis* (Fr.) Murr.), *Peniophora gigantea* (Fr.) Mass., *Polystictus versicolor* Fr., *Daedalea quercina* Pers., *Lentinus lepideus* Fr., *Schisophyllum commune* Fr., *Coniophora cerebella* Pers., *Paxillus acheruntius* Schröt., *Merulius pinastri* Fr., *Lenzites sepiaria* Fr. (*Gloeophyllum sepiarium* (Wulf.) Karst). Wymienione gatunki wytwarzają grzybnię koloru białego lub żółtokremowego, trudną w wielu przypadkach do odróżnienia. Grzyby hodowane były na pożywce agarowo-brzeczkowej o składzie: agaru 7,5 g, brzeczki piwnej 150 g, wody destylowanej 350 g.

Próby barwienia przeprowadzono następującymi barwnikami: czerwień metylowa, czerwień Kongo, chryzoidyna, erytrozyna, lakmus, oranż metylowy, karmin, błękit bromofenolowy, treopeolina 00, czerwień obojętna, indygokarmin, fiolet krystaliczny, błękit metylenowy, zieleń metylowa, zieleń melachitowa, zieleń brylantowa, zieleń bromokrezolowa, błękit trypanowy, zieleń Janusa, zieleń świetlana, fiolet metylenowy, fiolet Gencjana, anilina, eozyna, brunat Bismarcka, alizaryna czerwona, oranż G. i lakmoid. Barwniki stosowano w ich powszechnie używanych roztworach.

3. PRÓBA OZNACZANIA GRZYBÓW PRZY ZASTOSOWANIU RÓŻNYCH BARWNIKÓW

Do badań użyto grzybnię po 15 dniach od chwili zaszczepienia w płytkach Petriego. Z brzegu kultury pobierano kawałki grzybni o wielkości zbliżonej do objętości kropli roztworu barwnika, umieszczano na szkiełku przedmiotowym i zalewano kroplą roztworu barwnika. Tak przygotowane preparaty poddawano badaniom mikroskopowym.

Spośród zastosowanych do badań 28 barwników różnych typów pozytywne rezultaty dały tylko nieliczne. Poszczególne barwniki, tak zwane strukturalne powodowały prawie identyczne zmiany zabarwienia grzybni różnych gatunków. Jedynie były nieco odmienne szybkości wnikania. Należy przypuszczać, że różnice w składzie chemicznym substancji komórkowej różnych gatunków grzybów nie są na tyle duże, by mogły spowodować wystąpienie różnego jej zabarwienia. Dobre rezultaty dały natomiast barwniki mające charakter wskaźników wartości pH. Zależnie od kwasowości wywołują one zmianę zabarwienia substancji w pewnych

określonych i stałych dla każdego z nich przedziałach pH. Do celów określania grzybów przydatne okazały się tylko te indykatory, których zakres działania odpowiada zakresowi pH grzybni. Ponieważ roztwory barwników wnikają do komórek grzybni stosunkowo wolno, w dalszych badaniach zastosowano pewne zabiegi, mające na celu przyspieszenie reakcji. W tym celu grzybnię zalaną roztworem barwnika miażdżono na szkiełku przedmiotowym pałeczką szklaną. Ewentualna zmiana zabarwienia zachodziła natychmiast i była doskonale widoczna gołym okiem. Z tego powodu w dalszych badaniach nie używano już mikroskopu. Zmieniono również szkiełko przedmiotowe na zegarkowe, co znacznie ułatwiało i przyspieszało przebieg badania. Barwę, jaką przybrała zmiażdżona grzybnia pod wpływem barwnika, określano za pomocą skali barw Bondarcewa (1). Ze względów technicznych pionowe współrzędne skali, zamiast literami rosyjskimi, oznaczono cyframi. Nazwy barw występujących w przeprowadzonych badaniach i ich oznaczenia podano w tabeli 1. Wyniki badań z 5 powtórzeń uzyskane dla różnych grzybów podaje tabela 2. Nazwy barw zastąpiono w niej, jak i w następnych tabelach oznaczeniami z tabeli 1. W tabelach podano również wartość pH badanej grzybni, oznaczaną metodą kolorymetryczną (11). Stwierdzono, że błękit bromofenolowy, czerwień Kongo, oranż metylowy, lakmoid, czerwień metylowa i zieleń bromokrezolowa powodują wprawdzie zróżnicowane zabarwienie grzybni, ale często barwnik nadaje identyczną barwę grzybni kilku gatunków grzybów. Fakt ten uniemożliwia dokonanie ostatecznego oznaczenia, pozwalając jedynie na eliminację. W niektórych przypadkach zastosowanie kilku wymienionych barwników po kolei może diagnozę bardziej uściślić. Żaden ze zbadanych barwników nie okazał się więc uniwersalnym dla diagnostyki grzybów.

Tabela 1

Wykaz barw

Lp.	Nazwa barwy	Oznaczenie wg skali Bondarcewa
1	Złocisto-żółty (*aureus*)	XII—7
2	Szaro-żółty (*sulphureus*)	IX—1
3	Oliwkowo-żółty (*olivaceo-flavus*)	II—7
4	Pomarańczowy (*aurantiacus*)	XIV—3
5	Ciemno-pomarańczowy (*atro-aurantiacus*)	XV—5
6	Cielisto-różowy (*incarnatoroseus*)	XIV—5
7	Różowo-liliowy (*roseololiliacinus*)	VII—3
8	Cynamowo-czerwony (*cinnabarinus*)	XV—7
9	Czerwony (*ruber*)	XII—5
10	Ciemno-czerwony (*astro-purpureus*)	IV—1
11	Rdzawy (*ferrugineus*)	VII—1
12	Kasztanowy (*castaneus*)	X—4
13	Ciemno-kasztanowy (*atro-castaneus*)	XIV—7
14	Żółto-zielony (*flavo-virens*)	II—3
15	Błękitno-zielony (*caerulescenti-viridis*)	IX—5
16	Błękitny (*caeruleus*)	XIII—3
17	Fioletowy (*violaceus*)	—
18	Szaro-fioletowy (*lividus*)	XIII—2
19	Śliwkowy (*prunicolor*)	XIV—1

Tabela 2

Zabarwienie grzybni pod wpływem różnych barwników

Lp.	Gatunek grzyba	pH grzybni	Barwa grzybni					
			błękit bromofenolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	lakmoid	czerwień metylowa	zieleń bromokrezolowa
1	*Merulius lacrymans*	4,0	17	10	5	10	7	14
2	*Poria vaporaria*	4,0	17	10	5	10	7	14
3	*Poria Vaillantii*	3,8	19	10	11	10	7	14
4	*Poria medullapanis*	4,0	17	10	5	10	7	14
5	*Poria callosa*	3,6	19	13	11	10	7	14
6	*Peniophora gigantea*	5,2	17	9	5	19	4	16
7	*Polystictus versicolor*	5,0	17	12	5	19	6	15
8	*Daedalea quercina*	5,2	17	9	5	19	5	16
9	*Lentinus lepideus*	4,4	17	12	5	10	7	15
10	*Schisophyllum commune*	5,4	17	9	5	19	5	16
11	*Coniophora cerebella*	3,6	19	13	11	10	7	14
12	*Paxillus acheruntius*	4,2	17	10	5	10	7	14
13	*Merulius pinastri*	3,6	19	13	11	10	7	14
14	*Lenzites sepiaria*	4,2	17	10	11	10	7	14

4. WPŁYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW NA WYNIKI OZNACZANIA GRZYBÓW ZA POMOCĄ BARWNYCH REAKCJI

Wpływ różnych szczepów grzybów. Aby stwierdzić, czy barwa, jaką przybiera grzybnia jednego gatunku grzyba pod wpływem określonego barwnika, jest zawsze taka sama, przeprowadzono uzupełniające doświadczenie. Do badań wzięto 5 szczepów *Merulius lacrymans*, w tym trzy szczepy formy *domesticus:* standard (Eberswalde), Warszawa I, Warszawa II i dwa szczepy formy *silvester:* Warszawa III i Warszawa IV oraz 5 szczepów *Coniophora cerebella:* standard (Eberswalde), Warszawa I, Warszawa II, Warszawa IV i Moskwa. Kultury tych szczepów hodowano na pożywce agarowo-brzeczkowej w temperaturze 22° C i wilgotności względnej powietrza 75%. Oznaczenie prowadzono w 5 powtórzeniach na 15-dniowej grzybni pobranej z brzegu kultury, stosując barwniki: błękit bromofenolowy, czerwień Kongo, oranż metylowy, lakmoid, czerwień metylowa i zieleń bromokrezolowa. Uzyskane wyniki zebrane w tabeli 3 wykazują, że grzybnia różnych szczepów tego samego gatunku przybiera różne zabarwienia pod wpływem określonego barwnika.

Wpływ wieku. Z grzybni grzybów *Merulius lacrymans, Poria vaporaria* i *Coniophora cerebella* zaszczepionej na pożywce agarowo-brzeczkowej pobierano po 5 próbek dla każdego z nich w odstępach 5-dniowych poczynając od 5 dnia po zaszczepieniu i kończąc na 60 dniu. Próbki

Tabela 3

Zabarwienie grzybni różnych szczepów

Szczep	pH grzybni	Barwa grzybni					
		błękit bromofenolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	lakmoid	czerwień metylowa	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans					
Standard	4,0	17	10	5	10	7	14
Warszawa I	4,8	17	12	5	18	4	15
Warszawa II	4,8	17	12	5	18	4	15
Warszawa III	3,6	19	13	11	10	7	14
Warszawa IV	3,2	12	13	8	10	7	2
		Coniophora cerebella					
Standard	3,8	19	10	11	10	7	14
Moskwa	4,8	17	12	5	18	4	15
Warszawa I	3,8	19	10	11	10	7	14
Warszawa II	3,8	19	10	11	10	7	14
Warszawa IV	3,8	19	10	11	10	7	14

barwiono barwnikami: błękit fenolowy, czerwień Kongo, oranż metylowy oraz zieleń bromokrezolowa. Wyniki zebrane w tabeli 4 wykazują, że barwa grzybni traktowanej odpowiednim barwnikiem zmienia się zależnie od jej wieku.

Wpływ różnych pożywek. Grzybnię *Merulius lacrymans, Poria vaporaria* i *Coniophora cerebella* zaszczepiono na 4 rodzajach pożywek:

1) pożywka agarowo-brzeczkowa (agaru 7 g, brzeczki piwnej 150 g, wody destylowanej 350 g);

2) pożywka agarowo-sacharozowa (agaru 3 g, sacharozy 3 g, wody destylowanej 150 g);

3) pożywka trocinowo-brzeczkowa (trocin sosnowych 10 g, brzeczki piwnej 5 g);

4) pożywka syntetyczna Tubeufa (NH_4NO_3 1 g, KH_2PO_4 0,5 g, $MgSO_4$ 0,1 g, kwasu mlekowego 0,2 g, wody destylowanej 100 g, bibuła filtracyjna).

Po 15 dniach wzrostu grzybnię poddawano oznaczeniom za pomocą 4 poprzednio stosowanych barwników stosując 5 powtórzeń. Rezultaty badań zebrane w tabeli 5, wykazały wpływ typu pożywki na zabarwienie grzybni powodowane przez wymienione barwniki.

Wpływ zawartości cukru w pożywce. Przygotowano pożywki agarowe z różnym dodatkiem glikozy w granicach od 0 do 10% (tab. 6). Na pożywkach zaszczepiono grzybnię *Merulius lacrymans, Poria vaporaria* i *Coniophora cerebella*. Po 15 dniach grzybnię barwiono wy-

Tabela 4

Zabarwienie grzybni w zależności od wieku

Wiek grzybni dni	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromofenolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
5	4,2	17	10	5	14
10	4,0	17	10	5	14
15	3,8	19	10	11	14
20	3,8	19	10	11	14
25	3,8	19	10	11	14
30	3,8	19	10	11	14
35	3,6	19	13	11	14
40	3,6	19	13	11	14
45	3,6	19	13	11	14
50	3,4	19	13	11	2
55	3,4	19	13	11	2
60	3,4	19	13	11	2
		Poria vaporaria			
5	4,0	17	10	5	14
10	3,8	19	10	11	14
15	3,6	19	13	11	14
20	3,4	19	13	11	2
25	3,2	12	13	8	2
30	3,0	12	19	8	1
35	3,0	12	19	8	1
40	3,0	12	19	8	1
45	3,0	12	19	8	1
50	3,0	12	19	8	1
55	3,0	12	19	8	1
60	3,0	12	19	8	1
		Coniophora cerebella			
5	4,0	17	10	5	14
10	3,8	19	10	11	14
15	3,6	19	13	11	14
20	3,6	19	13	11	14
25	3,6	19	13	11	14
30	3,4	19	13	11	2
35	3,4	19	13	11	2
40	3,4	19	13	11	2
45	3,2	12	13	8	2
50	3,2	12	13	8	2
55	3,2	12	13	8	2
60	3,2	12	13	8	2

Tabela 5

Zabarwienie grzybni na różnych pożywkach

Rodzaj pożywki	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromokrezolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
Agarowo-brzeczkowa	3,8	19	10	11	14
Sacharozowa	4,0	17	10	5	14
Trocinowa	4,2	17	10	5	14
Syntetyczna	4,6	17	12	5	15
		Poria vaporaria			
Agarowo-brzeczkowa	3,8	19	10	11	14
Sacharozowa	3,4	19	13	11	2
Trocinowa	3,8	19	10	11	14
Syntetyczna	4,0	17	10	5	14
		Coniophora cerebella			
Agarowo-brzeczkowa	3,6	19	10	11	14
Sacharozowa	4,4	17	12	5	15
Trocinowa	4,2	17	10	5	14
Syntetyczna	4,0	17	10	5	14

mienionymi 4 barwnikami, stosując po 5 powtórzeń. Stwierdzono, że zabarwienie grzybni pod wpływem barwników zmienia się w pewnym stopniu, zależnie od stężenia glikozy w pożywce.

Wpływ pH pożywki. Grzybnię 3 wymienionych gatunków grzybów zaszczepiono na pożywce agarowo-brzeczkowej o wartościach pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Odczyn pożywek regulowano przez dodawanie kwasu mlekowego albo NaOH. Po 15 dniach pobierano grzybnię powietrzną, nie mającą bezpośredniego kontaktu z podłożem, i oznaczono za pomocą 4 barwników, stosując po 5 oznaczeń. Stwierdzono (tab. 7), że zabarwienie grzybni przy tym samym barwniku zmienia się w pewnych granicach w zależności od pH podłoża.

Wpływ gatunku drewna. Szereg grzybów niszczących drewno może rozwijać się na różnych gatunkach drewna, często zarówno liściastych, jak i iglastych. Aby stwierdzić wpływ drewna (jako podłoża dla rozwoju grzybów) na zabarwienie pod wpływem barwników, przeprowadzono następujące doświadczenie. Próbki czterech gatunków drewna, tj. sosny, świerka, buka i dębu, poddano działaniu grzybów *Merulius lacrymans, Coniophora cerebella* i *Poria vaporaria* w oddzielnych kolbach Erlenmayera. Po trzech tygodniach próbki wyjęto, oczyszczono z grzybni

Tabela 6

Zabarwienie grzybni w zależności od zawartości cukru w pożywce

Zawartość glikozy w procentach	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromokrezolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
0	3,8	19	10	11	14
0,5	3,6	19	13	11	14
1,0	3,6	19	13	11	14
3,0	4,0	17	10	5	14
5,0	4,2	17	10	5	14
8,0	4,2	17	10	5	14
10,0	4,2	17	10	5	14
		Poria vaporaria			
0	4,0	17	10	5	14
0,5	4,4	17	12	5	15
1,0	4,6	17	12	5	15
3,0	4,8	17	12	5	15
5,0	5,0	17	12	5	15
8,0	5,2	17	9	5	16
10,0	5,2	17	9	5	16
		Coniophora cerebella			
0	3,8	19	10	11	14
0,5	4,2	17	10	5	14
1,0	4,2	17	10	5	14
3,0	4,0	17	10	5	14
5,0	4,0	17	10	5	14
8,0	3,8	19	10	11	14
10,0	3,8	19	10	11	14

i umieszczono w wilgotnych kamerach. Na powierzchni próbek rozwinęła się bujnie grzybnia powierzchniowa, której próbki poddawano następnie działaniu 4 barwników stosując po 5 powtórzeń. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 8. Stwierdzono, że grzybnia pochodząca z różnych gatunków drewna zabarwia się pod wpływem tego samego barwnika w rozmaity sposób.

Wpływ środków grzybobójczych. W praktyce mają miejsce przypadki rozwoju grzybów na drewnie nasyconym słabymi roztworami środków grzybobójczych.

W celu zbadania wpływu różnych koncentracji środka grzybobójczego na zabarwienie grzybni różnymi barwnikami przygotowano serię próbek z pożywką agarowo-brzeczkową, do której dodano różne ilości fluorku

Tabela 7

Zabarwienie grzybni w zależności od pH pożywki

pH pożywki	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromokrezolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
2	—	—	—	—	—
3	3,4	19	13	11	2
4	3,6	19	13	11	14
5	3,8	19	13	11	14
6	4,0	17	10	5	14
7	4,0	17	10	5	14
8	4,0	17	10	5	14
9	—	—	—	—	—
		Poria vaporaria			
2	—	—	—	—	—
3	3,6	19	13	11	14
4	3,6	19	13	11	14
5	3,8	19	10	11	14
6	4,0	17	10	5	14
7	4,2	17	10	5	14
8	4,2	17	10	5	14
9	—	—	—	—	—
		Coniophora cerebella			
2	—	—	—	—	—
3	3,6	19	13	11	14
4	3,6	19	13	11	14
5	3,8	19	10	11	14
6	3,8	19	10	11	14
7	4,0	17	10	5	14
8	4,0	17	10	5	14
9	4,0	17	10	5	14

sodu (NaF). Uzyskano w ten sposób następujące stężenia fluorku sodu w pożywce: 0 (stężenie kontrolne) — 0,02 — 0,04 — 0,06 — 0,08 — — 0,10 — 0,12 — 0,14. Na pożywce zaszczepiono grzybnię *Merulius lacrymans, Poria vaporaria* i *Coniophora cerebella*. Po 15 dniach wzrostu przeprowadzono barwienie próbek pobranych z grzybni 4 barwnikami, stosując po 5 powtórzeń. W tabeli 9 przedstawiono wyniki tylko dla tych stężeń fluorku sodu, przy których wzrost grzybni jeszcze zachodził. Wyniki wskazują, że grzybnia rozwijająca się na podłożu o różnej zawartości środka grzybobójczego zabarwia się pod wpływem tego samego barwnika w rozmaity sposób.

Tabela 8

Zabarwienie grzybni z różnych gatunków drewna

Gatunek drewna	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromokrezolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
Sosna	4,0	17	10	5	14
Świerk	4,2	17	10	5	14
Buk	3,8	19	10	11	14
Dąb	3,4	19	13	11	2
		Poria vaporaria			
Sosna	3,4	19	13	11	2
Świerk	3,6	19	13	11	14
Buk	3,4	19	13	11	2
Dąb	3,2	12	13	8	2
		Coniophora cerebella			
Sosna	4,8	17	12	5	15
Świerk	4,4	17	12	5	15
Buk	3,6	19	13	11	14
Dąb	3,4	19	13	11	2

Tabela 9

Zabarwienie grzybni w zależności od stężenia środka grzybobójczego w pożywce

Stężenie fluorku sodu w pożywce procent	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromokrezolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
0	3,8	19	10	11	14
0,02	3,8	19	10	11	14
0,04	4,0	17	10	5	14
0,06	4,2	17	10	5	14
0,08	4,4	17	12	5	15
		Poria vaporaria			
0	4,0	17	10	5	14
0,02	4,2	17	10	5	14
0,04	4,0	17	12	5	15
		Coniophora cerebella			
0	3,6	19	13	11	14
0,02	3,8	19	10	11	14
0,04	3,8	19	10	11	14
0,06	4,0	17	10	5	14
0,08	4,2	17	10	5	14
0,10	4,4	17	12	5	15

Wpływ temperatury wzrostu grzybni. Grzybnię *Merulius lacrymans, Poria vaporaria* i *Coniophora cerebella* hodowano w trzech temperaturach 5, 20 i 30° C. Po 15 dniach przeprowadzono barwienie próbek czterema barwnikami, stosując po 5 powtórzeń.

Wyniki przedstawia tabela 10. Stwierdzono, że temperatura wzrostu grzybni wywiera wpływ na jej zabarwienie wywołane tym samym barwnikiem.

Tabela 10

Zabarwienie grzybni w zależności od temperatury wzrostu

Temperatura wzrostu w °C	pH grzybni	Barwa grzybni			
		błękit bromokrezolowy	czerwień Kongo	oranż metylowy	zieleń bromokrezolowa
		Merulius lacrymans			
5	5,2	17	9	5	16
20	4,8	17	12	5	15
30	3,8	19	10	11	14
		Poria vaporaria			
5	5,2	17	9	5	16
20	4,6	17	12	5	15
30	3,6	19	13	11	14
		Coniophora cerebella			
5	4,6	17	12	5	15
20	3,6	19	13	11	14
30	3,4	19	13	11	2

WYNIKI I WNIOSKI

Stwierdzono, że barwniki strukturalne nie dają zróżnicowanego zabarwienia grzybni różnych gatunków, przydatnego do oznaczania.

Barwa, jaką przybierała grzybnia pod wpływem danego barwnika, zależna była od wartości pH substancji komórkowej i zmieniała się zależnie od szczepu grzyba, wieku grzybni, rodzaju pożywki, zawartości cukru w pożywce, pH pożywki, gatunku drewna, stężenie środka grzybobójczego w pożywce oraz temperatury wzrostu. Opierając się na przeprowadzonych doświadczeniach można stwierdzić, że metoda oznaczania grzybów niszczących drewno przy pomocy barwnych reakcji nie daje pewnych wyników. Może ona znaleźć zastosowanie jako metoda uzupełniająca przy innych sposobach oznaczania gatunków grzybów.

Z Zakładu Fitopatologii Leśnej i Konserwacji Drewna Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Praca wpłynęła do Komitetu Redakcyjnego 8 września 1960 r.

LITERATURA

1. Bondarcew A. S.: Szkała cwietow. Izd. Ak. N. SSSR, Moskwa—Leningrad 1954.

2. Bondarcew A. S.: Posobje dla opriedielenija domowych gribow. Izd. A. N. SSSR, Moskwa—Leningrad 1956.

3. Bünning E.: Über die Farbstoff und Nitrataufnahme bei Aspergillus niger. „Flora" 1936, 131.

4. Ford D. H., Ravlius F. E.: Impoved cytochemical methods for differentiating Cronartium ribicola from Cronartium occidentale on Ribes. „Phytopathology" 1956, 46.

5. Foster J. W.: Chemical activities of fungi. New Jork 1949.

6. Jaczewski A. A.: Osnowy mykologii. Gosizdat, Moskwa—Leningrad 1933.

7. Lilly V. G., Barnett H. L.: Physiology of the fungi. New Jork 1951.

8. Mahdihassan S.: Die Wasserstoffionenkoncentration im Zellinnern von Fusarium lini B. und Hefe. „Biochem. Zeitschrift" 1930, 226.

9. Rypáček V.: Biologie dřewokazných hub. Nakład Česk. Ak. Véd. Praha. 1957.

10. Starfinger K.: Färben der Stränge von Bauholzpilzen zur mikroskopischen Artbestimmung. „Holz-Zentralblatt" 1953, 157.

11. Ważny J.: Badania nad wartością pH grzybni niektórych grzybów niszczących drewno. „Acta Soc. Bot. Pol." 1960, 29.

12. Żurawlow I. I.: Diagnostika bolezniej lesa pri pomoszczi fizicze-skich i chemiczeskich mietodow. CNIILCH, Leningrad 1955.

13. Zellner J.: Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ЦВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ

Краткое содержание

Были проведены исследования по возможности применения метода цветных реакций для определения вегетативной стадии дереворазрушающих грибов, рекомендуемого некоторыми учеными. Констатировано, что структурные красители не дают дифференцированной окраски мицелия различных видов пригодной для их определения.

Положительные результаты были получены при применении красителей-индикаторов pH, но лишь в пределах их действия. Окраска, которую приобретал мицелий под влиянием данного красителя, зависела от величины pH клеточного вещества и изменялась в зависимости от штамма гриба, возраста мицелия, рода питательной среды, содержания сахара в среде, pH среды, вида древесины, концентрации фунгисида в среде и температуры роста.

Обосновываясь на проведенных опытах можно констатировать, что определение дереворазрушающих грибов методом цветных реакций не дает надежных результатов. Он может найти применение как дополнительный метод при других способах определения видов грибов.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANWENDUNG FARBIGER REAKTIONEN ZUR BESTIMMUNG HOLZZERSTÖRENDER PILZE

Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, ob die Methode farbiger Reaktionen, die von manchen Forschern empfohlen wird, sich zur Bestimmung vegetativen Stadiums holzzerstörender Pilze anwenden lässt. Man hat festgestellt, dass Struktur-Farbstoffe keine unterschiedliche Färbung dem Myzel verschiedener Pilzarten geben, die zu ihrer Bestimmung brauchbar wäre.

Positive Ergebnisse hat man bei Verwendung von Farbstoff-Anzeigern des pH-Wertes erzielt, aber nur im Bereich ihrer Wirkung. Farbe, die das Myzel unter dem Einfluss gegebenen Farbstoffes annahm, war also vom pH-Wert der Zellsubstanz abhängig und veränderte sich je nach dem Pilzstamme, dem Myzelalter, der Art des Nährsubstrats, dem Zuckergehalt im Substrat, dem ph-Wert des Substrats, der Holzart, der Fungizid-Konzentration im Substrat und der Wuchstemperatur.

Auf Grund der durchgeführten Versuche kann man feststellen, dass die Methode zur Bestimmung holzzerstörender Pilze mittels farbiger Reaktionen keine zuverlässigen Ergebnisse gibt. Sie kann nur als eine ergänzende Methode bei Bestimmung von Pilzarten nach anderen Verfahren verwendet werden.