

ALICJA STRZELCZYK

METODY BADANIA GRZYBÓW GLEBOWYCH

Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Komisja Biologii
Przewodniczący — prof. dr J. Gołębiowska

WSTĘP

Grzyby stanowią obok bakterii ważną grupę drobnoustrojów rozwijających się w glebie. Ich grzybnia przenika grudki gleby w formie strzępek tworząc w wolnych przestrzeniach pomiędzy nimi olbrzymie ilości zarodników. W odróżnieniu od grzybni rozwijającej się w glebie i aktywnie uczestniczącej w jej przemianach biochemicznych zarodniki grzybów są formami nieaktywnymi o bardzo słabej przemianie materii.

W glebie występują licznie przedstawiciele następujących klas grzybów: *Phycomycetes* (glonowce), *Ascomycetes* (workowce), *Basidiomycetes* (podstawczaki) oraz *Fungi imperfecti* (grzyby niedoskonałe). Więcej niż połowę ogólnej liczby grzybów rozwijających się w glebie stanowią przedstawiciele grzybów niedoskonałych [5, 7], wśród których najczęściej spotykane są gatunki należące do rodzajów: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* i inne. Rozwijają się one szybko i z łatwością zarodnikują. Szybko rosnące grzyby opanowują łatwiej środowisko wpływając często ograniczająco na rodzaje o słabym tempie wzrostu przez konkurencję pokarmową lub przez wytwarzanie toksycznych produktów przemiany materii. Przedmiotem zainteresowania mikrobiologów są głównie te grzyby, które aktywnie przeprowadzają procesy biochemiczne w glebie, niezależnie od ich zdolności do zarodnikowania. Wyodrębnianie aktywnych form grzybów (strzępek) z gleby jest trudne i wymaga zastosowania specjalnych metod. Trudność stanowi tu również uzyskanie informacji dotyczących systematycznego zróżnicowania grzybów zasiedlających badaną glebę (np. wyodrębnianie podstawczaków obok grzybów niedoskonałych).

Opisane w niniejszej pracy metody należą do najczęściej stosowanych przez mikrobiologów i mikologów. Obejmują one technikę wyodrębniania i oznaczania grzybów rozwijających się w glebie i zasiedlających korzenie roślin oraz metody hodowli, pomiaru wzrostu grzybów, obserwacje organów rozmnażania oraz przechowywania czystych kultur grzybów.

I. POBIERANIE PRÓBEK GLEBY DO BADAŃ MIKOLOGICZNYCH [17]

W y k o n a n i e. Odkazoną łopatką zdejmuje się górną, ok. 3-centymetrową, warstwę gleby i metalowym pierścieniem wycina się słupek gleby odpowiedniej wysokości (ok. 15 cm). W braku odpowiedniego cylindra można pobrać glebę łopatką wyjałowioną z głębokości 3–15 cm. W celu otrzymania średniej próbki pobiera się z jednego miejsca po 5 próbek gleby i miesza dokładnie w jałowym naczyniu lub w worku plastikowym. Do badań bierze się ok. 50 g takiej gleby. W celu uzyskania możliwie dokładnego zespołu mikoflory określonego pola należy pobrać z niego ok. 5 średnich próbek. Próbkę gleby przechowuje się w chłodnym miejscu. Analizę mikrobiologiczną takiej gleby należy przeprowadzać w możliwie najkrótszym czasie po jej pobraniu. W ten sposób pobrane próbki gleby można analizować jedynie metodą rozcieńczeniową. Przy stosowaniu innych metod badania gleba nie powinna być mieszana, gdyż zabieg ten niszczy jej pierwotną strukturę.

II. METODY OKREŚLANIA LICZEBNOŚCI GRZYBÓW W GLEBIE

1. ROZCIĘNCZENIOWA METODA PŁYTKOWA [17]

W y k o n a n i e. Glebę przesiewa się przez sito w celu usunięcia z niej zanieczyszczeń w postaci kamieni, większych resztek roślinnych itp. 10-gramową próbkę gleby umieszcza się w 90 ml jałowej wody destylowanej i wytrząsa silnie przez 5 minut. Tę zawiesinę traktuje się jako rozcieńczenie 1 : 10. Z niej przygotowuje się dalsze rozcieńczenie przenosząc po 10 ml takiej zawiesiny do 90 ml jałowej wody. Po przygotowaniu każdego następnego rozcieńczenia wytrząsa się otrzymaną zawiesinę przez 1 min. Po otrzymaniu odpowiedniego rozcieńczenia końcowego, którego wielkość należy uprzednio ustalić doświadczalnie dla każdej gleby oddzielnie, przenosi się jednomililitrową porcję do płytek Petriego i zalewa rozpuszczonym, przestudzonym agarem glikozowo-peptonowym Martina [17, 34] lub pożywkę OAES [19]. Hodowlę pozostawia się w tem-

peraturze 20–25°C do czasu pojawienia się kolonii. Za najodpowiedniejsze rozcieńczenie gleby należy uznać to, w którym rozwija się średnio 25 kolonii grzybów na płytce. Otrzymane wyniki przelicza się najczęściej na 1 g suchej masy gleby. Wyrosłe na płytkach kolonie odszczepia się na skos z agarem glikozowo-ziemniaczanym [40].

Opisana metoda jest powszechnie stosowana do oznaczania ogólnej liczebności bakterii i promieniowców w glebie. Stosowana jest również do oznaczania liczebności grzybów, chociaż w tym przypadku ma nieco mniejsze zastosowanie. Metoda ta pozwala bowiem na oznaczanie przede wszystkim grzybów szybko rosnących i łatwo zarodnikujących. Pożywka Martina, zawierająca róż bengalski i antybiotyki, uznana jest za najlepszą przy ilościowym oznaczaniu grzybów tą metodą. Jest również lepsza od innych stosowanych przy wyodrębnianiu grzybów z gleby [17, 21]. Róż bengalski ogranicza wielkość kolonii szybko rosnących grzybów nie przeszkadzając innym. Antybiotyk hamuje rozwój bakterii i promieniowców. Kaufmann i in. [19] poleca pożywkę OAES, na której uzyskali największą ilość kolonii o największej różnorodności rodzajów. Na tej pożywce zostaje nieco wstrzymany rozwój grzybów szybko rosnących bez zahamowania tworzenia zarodników, co czyni ją przydatną do identyfikacji grzybów wyrosłych bezpośrednio na płytkach. Nadto pożywka ta jest bezbarwna w przeciwieństwie do pożywki Martina zabarwionej różem bengalskim.

2. METODA PŁYTEK GLEBOWYCH WARCUPA (THE SOIL PLATES) [52]

Wykonanie. Niewielką ilość gleby przenosi się aseptycznie do szalek Petriego. Ilość gleby zależy od jej zasobności w grzyby i dlatego należy ją doświadczalnie ustalić (0,005–0,15 g). Glebę w szalkach zalewa się 8–10 ml przestudzonej pożywki agarowej (agar Czapek-Doxa z dodatkiem 0,05% wyciągu drożdżowego, zakwaszony do pH 4,0 kwasem fosforowym [17]). Płytki inkubuje się w temperaturze 20–25°C.

Przytoczona metoda jest szeroko stosowana w badaniach ekologicznych nad rozmieszczeniem różnych grup grzybów w glebie. Bezpośrednie umieszczenie gleby w płytce zapewnia wzrost grzybów zasiedlających większe cząstki mineralne i organiczne gleby (humus), które w metodzie rozcieńczeń zostają pominięte wskutek opadania ich na dno naczynia z zawiesiną. Nadto masy zarodników mają tu prawdopodobnie większą szansę zachowania swego naturalnego układu pozostając nie rozbite. Tą metodą udaje się wyodrębnić większą ilość rodzajów grzybów w porównaniu z metodą rozcieńczeniową. Warcup wykazał, że wiele wyhodowanych tą metodą grzybów pochodzi z cząstek humusu.

3. MODYFIKACJA METODY WARCUPA [18, 29, 30, 31]

W y k o n a n i e. Z 6 miejsc badanego pola pobiera się ok. 100 g próbki gleby z głębokości 3–15 cm do jałowych kolbek. Po przeniesieniu do pracowni miesza się je dokładnie razem. Małą ilość gleby przenosi się następnie do płytki i miesza ruchem rotacyjnym, aby najdrobniejsze cząstki gleby osadziły się na dnie. 1 g tej najdrobniejszej frakcji miesza się następnie w moździerzu z niewielką ilością jałowego, drobnego piasku kwarcowego, odsypanego z 74 g porcji. W przypadku gleby mało próchnicznej należy mieszać krótko i łagodnie. Glebę silnie próchniczną rozciera się ok. 2 min. Po uzyskaniu bezgrudkowej mieszaniny przenosi się ją do kolby z resztą piasku. W ten sposób uzyskuje się proporcję gleby do piasku równo 1 : 74. Glebę z piaskiem miesza się łagodnie obracając naczynie lub tocząc je po stole przez 10 min. Porcję ok. 30 mm³ tej mieszaniny przenosi się do płytek i zalewa przestudzoną pożywką (agar Martina z dodatkiem 0,5% wyciągu glebowego). Inkubuje się w 21–23°C.

M a ń k a i współpracownicy stosowali tę metodę do gleb zawierających bogatą makroflorę.

III. METODY BEZPOŚREDNIEGO BADANIA MIKROFLORY GLEBOWEJ

1. METODA SZKIEŁEK KONTAKTOWYCH CHOŁODNY-ROSSI [1]

W y k o n a n i e. Szkiełka przedmiotowe umieszcza się bezpośrednio w glebie. Po upływie 1, 2 i 3 tygodni wyjmuje się je ostrożnie z gleby, usuwa większe grudki gleby przez opłukanie ich lekkim strumieniem wody lub zanurzając w naczyniu z wodą. Szkiełka suszy się, następnie utrwała w słabym płomieniu, barwi erytrozyną przez 5–6 min i mikroskopuje.

2. MODYFIKACJA METODY CHOŁODNY-ROSSI WEDŁUG ZIEMIĘCKIEJ [55]

W y k o n a n i e. Szkiełka przedmiotowe powleka się roztworem badanego substratu (np. glikozy, skrobi, peptonu itp.) i umieszcza w glebie. W określonych odstępach czasu wyjmuje się szkiełka z gleby, utrwała i barwi jak wyżej. W ten sposób można badać metabiozę (następczy rozwój) drobnoustrojów.

Metody przygotowania szlifów glebowych do obserwacji drobnoustrojów w strukturalnej (nie naruszonej) glebie, utwardzonej agarem lub żywicą syntetyczną, znaleźć można w pracach Kubienny [22], Harlova i Weiss-Fogha [13], Alexandra i Nicholasa [6].

IV. METODA IZOLOWANIA GRZYBÓW Z GLEBY

1. IZOLOWANIE Z PŁYTEK AGAROWYCH

Najczęściej stosowanym sposobem wyodrębniania grzybów z gleby jest odszczepianie kolonii wyrosłych na płytkach agarowych (przygotowanych metodami II.1–II.3) na skosy z uniwersalną pożywką (najczęściej agar glikozowo-ziemniaczany lub pożywka z wyciągiem słodowym).

2. METODA BEZPOŚREDNIEGO SZCZEPIENIA GLEBĄ
(DIRECT INOCULATION) [17, 51]

Wykonanie. Grudkę gleby ok. 1 cm średnicy przenosi się jałowo na środek płytki z zestaloną pożywką agarową (agar glikozowo-ziemniaczany lub pożywka Martina). Płytki inkubuje się w 20–22°C przez 24 godz. Po tym czasie odszczepia się grzybnię wyrastającą z grudki gleby.

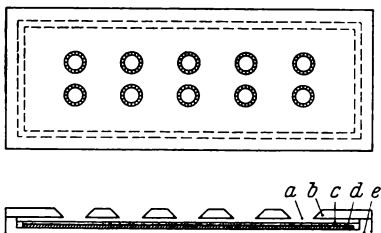
Metoda ta pozwala na wyodrębnienie grzybów przerastających glebę w postaci grzybni. Czas hodowli jest tu krótki, aby wystarczył na wytworzenie z zarodników obecnych w glebie grzybni widocznej gołym okiem. Przyjmuje się więc, że uzyskane grzyby pochodzą ze strzępek, a nie z zarodników grzyba.

3. METODA PŁYTEK PERFOROWANYCH (SCREENED IMMERSION PLATES) [49]

Jest to modyfikacja metody opisanej w punkcie III. 2.

Wykonanie. Szkiełko przedmiotowe w wymiarach 10,5×4,0 cm umieszcza się w ściśle pasującym płytkim pudełeczku z pleksiglasu (rys. 1). Wierzch pudełeczka zakrywa się płytką z pleksiglasu o grubości 1 mm, w której znajdują się 2 rzędy po 5 otworów o średnicy 5 mm. Po wyjąłowieniu urządzenie to umieszcza się w dużej aluminiowej płytce i zalewa wodnym agarem (2% agaru). Agar nalewa się przez jeden z otworów w perforowanej płytce zwracając uwagę, aby ta płytka nie zetknęła się z warstwą agaru. Po zakrzepnięciu agaru perforowaną płytkę zamienia się drugą płytką, a otwory zabezpiecza przed infekcją zakrywając dużym jałowym nakrywkowym szkiełkiem. Całe urządzenie przenosi się w płytce na pole. Tam wyjąłowionym nożem wykonuje się odkrywki, do których przytwierdza się szalki wraz z całym urządzeniem. Uprzednio usuwa się z powierzchni szkiełko zakrywające otwory. Zależnie od celu pracy serię płytek perforowanych umieszcza się w płaszczyźnie pionowej lub poziomej profilu glebowego. Należy uważać, aby szkiełka nie były przetrzymywane zbyt długo w glebie, gdyż strzępki wyrastające z gleby

do agaru przez pory w płytce z pleksiglasu mogą przerastać się nawzajem tworząc kolonie mieszane lub wzajemnie się hamować. Po wyjęciu płytek z gleby szkiełka przedmiotowe umieszcza się (agarem w dół) pod mikroskopem na metalowym statywie. Zaobserwowane strzępki grzyba odszczepia się na świeżą pożywkę.



Rys. 1. Płytką perforowaną, widziana z góry oraz z boku wraz z pudełeczkiem, według Johnsona [17]

a — otwory w płytce, b — płytka perforowana, c — warstewka agaru, d — szkiełko przedmiotowe, e — pudełeczko

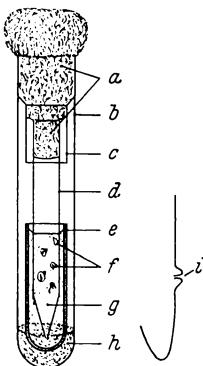
Screen immersion plate seen from top and side according to Johnson [17]

a — perforation in screen, b — screen, c — agar film, d — slide, e — box

Thronton [50] podał modyfikację tej metody. Perforowana płytka jest w niej zastąpiona wieczkiem przykrywającym pudełeczko ze szkiełkiem przedmiotowym. Średnica otworów wynosi w nim ok. 0,3 cm.

4. METODA RUREK PERFOROWANYCH (THE IMMERSION TUBE) [9, 10, 17]

Wykonanie. W glebie wywierca się otwór za pomocą odpowiedniej długości korkobora. Na miejsce usuniętej gleby umieszcza się perforowaną rurkę z pożywką (rys. 2). Grzyby wrastają do pożywki przez otwory. Rurkę perforowaną przygotowuje się z grubościenną probówką, której dno



Rys. 2. Rurka perforowana do jałowienia, według Johnsona [17]

a — korki z waty, b — probówka do wyjaławiania, c — kapturek szklany, d — rurka perforowana, e — probówka ochronna, f — kapilary, g — pożywka agarowa, h — podkładka z waty, i — wpukłona kapilara, widoczna z boku

Immersion tube prepared to sterilisation according to Johnson [17]

a — jacket tube, b — sterilisation tube, c — glass hood, d — perforated tube, e — jacket tube, f — invaginated capillaries, g — agar medium, h — cotton bed, i — invaginated capillary seen from side

wyciąga się nad płomieniem, aby powstał szpiczasty koniec. Jednocześnie z dolnej połowy rurki wyciąga się 4–6 kapilar wzdłuż spiralnej linii obiegającej probówkę. Te kapilary skręca się, rozgrzewa i za pomocą nawoskowanej igły wpukła do wewnątrz (rys. 2, F, I). Ostre końce tych kapilar, wnikaające w światło rurki, spiłowuje się tak, aby średnica otwo-

rów w kapilarach wynosiła ok. 1,5 mm. Kapilary nie powinny zbyt głęboko wnikać w światło rurki. Dolną część rurki, zaopatrzoną w kapilary, umieszcza się w niskiej próbówce ochronnej o nieco większej średnicy (rys. 2, E). Od góry rurka zamknięta jest korkiem i zakryta szklanym kapturkiem, który w warunkach polowych ma chronić korek przed zamknięciem. Całość umieszcza się w grubej próbówce i zamyka korkiem z waty. W tej próbówce rurkę perforowaną poddaje się wyjałowieniu. Następnie napełnia się ją pożywką agarową do wysokości 1 cm nad najwyżej położony otwór. Agaryzowana pożywka napełnia rurkę i przez otwory przedostaje się do próbówki ochronnej. Po napełnieniu pożywką całość jałowi się ponownie. Gdy wyjałowiona pożywka zakrzepnie, rurkę wyjmuje się z próbówki ochronnej i usuwa się wyjałowioną igłą resztki na zewnątrz zakrzepniętego agaru. Powierzchnię przeciera się alkoholem i umieszcza w jałowej próbówce. W takim stanie komplet rurek przenosi się na pole i po wyjęciu z próbek umieszcza w otworach wywierconych w glebie. Rurki pozostawia się w glebie przez 7 dni. W tym czasie grzybnia z gleby przerasta do pożywki przez kapilarne otwory. Po wyjęciu rurek z gleby do ich wnętrza wprowadza się metalowy korkobor (0,6 cm średnicy) i wycina słupek agaru z rurki. Słupek ten wypycha się jałową bagietką z korkoboru zaznaczając położenie najwyższej i najniższej kapilary. Następnie taki słupek dzieli się na 4 różne części i każdą z nich przenosi do jałowej płytki. Z kolei cząstki te tną się na 4 równoległe krążki, które umieszcza się przy brzegach płytki. Na środek płytki nalewa się ostrożnie przestudzoną pożywkę agarową, która otacza krążki agarowe i zastyga. Rozwijające się po paru dniach kolonie grzybów odszczepia się i porównuje z grzybami wyrosłymi z krążków umieszczonych w sąsiedztwie poszczególnych otworów w rurce.

Metoda ta pozwala na uzyskanie informacji w zespołach grzybów przerastających glebę w formie aktywnej grzybni. Modyfikację tej metody podają: Mueller i Durrell [37] oraz Mac-Whithey [24].

Metodą pozwalającą na wyodrębnienie z gleby grzybów należących do rzędu *Oomycetes* opisują Mańka i Kowalski [32], Miller [35] oraz Etchells i inni [11] podając metody wyodrębniania drożdży, a Warcup [54] — metodę wyodrębniania podstawczaków z gleby.

5. IZOLOWANIE STRZĘPEK GRZYBNI Z GLEBY

a. Metoda Warcupa [55]

Wykonanie. Grudkę gleby 1,0–1,5 g umieszcza się w wodzie do nasycenia. Po 4–5 min rozbija się ją silnym strumieniem wody wodociągowej. Całość pozostawia się na 1–1,5 min w celu opadnięcia większych

cząstek. Zawiesinę wylewa się pozostawiając osad, który przepłukuje się tak długo, dopóki woda ponad nim nie stanie się zupełnie klarowna. Osad składający się z szybko opadających cząstek przenosi się następnie z odrobiną wody do trzech jałowych płytek. W nich pod mikroskopem znajduje się poszczególne kawałki grzybni i delikatnie przenosi do kropli wody umieszczonej w innej jałowej płytce. Strzępki obrastające cząstki mineralne lub cząstki humusu powinny być starannie wypreparowane. Skupienia strzępek należy rozdzielić na pojedyncze fragmenty, gdyż przeważnie składają się one z wielu gatunków grzybów. 20–50 fragmentów strzępek umieszcza się na jednej szalce, po czym zalewa 10–13 ml przestudzonej agarowej pożywki. Po zestawieniu agaru ogląda się odwróconą płytkę pod mikroskopem i zaznacza miejsca rozmieszczenia fragmentów grzybni. Codziennie przeprowadza się obserwacje wzrostu. Z wyrosłej grzybni obcina się końce strzępek i wraz z bloczkiem agaru przenosi na świeżą pożywkę. Odszczepia się tylko kolonie wyrastające z grzybni, a nie z zarodników. Kolonie wyrastające z zarodników lub z bogatych w nie szczątków humusu należy usunąć, gdyż mogą zagłuszyć rozwój powoli rosnących lub nie zarodnikujących grzybów. Począwszy od dziesiątego dnia obserwacje przeprowadza się co kilka dni. Jako pożywkę poleca się agar Czapek-Doxa, z dodatkiem 0,5% wyciągu drożdżowego o pH 5,6–5,8, rozcieńczoną 1 : 6 [52].

Opisana metoda pozwala na uzyskanie rodzajów grzybów glebowych pomijanych zwykle w wysiewach innymi metodami. Wykazano bowiem, że w czasie przygotowywania wodnej zawiesiny gleby w metodzie rozcieńczeniowej, jak również w badaniach grzybów glebowych innymi metodami wiele grzybów nie udaje się wykryć, gdyż pozostają w osadzie.

b. Metoda pasków z folii nylonowej [12]

Stosuje się wąskie paski oddzielone od siebie tak, aby strzępka określonego grzyba mogła rozwijać się wzdłuż jednego tylko paska.

W y k o n a n i e. W prostokącie z folii nylonowej wycina się paseczki o szerokości 1 mm pozostawiając je połączone na jednym jego boku. Paseczki te w miejscu połączenia przylepia się do szkiełka przedmiotowego, a końce ich umocowuje przylepcem na drugim końcu szkiełka (ułatwia to wyprostowanie i zagrzebanie pasków w glebie). Paski na szkiełku jałowi się alkoholem i umieszcza w glebie, podobnie jak w metodzie Chołodny-Rossi-Ziemięckiej. Pozostawia się je w glebie przez okres jednego tygodnia. Po wyjęciu z gleby szkiełko wraz z paskami płucze się jałową wodą, paski odcina wyjałowioną żyłką i układa na płytkach z pożywką, stroną eksponowaną do góry. Część pasków pozostawia się w osadzie.

stawia się do dokładnej kontroli mikroskopowej. W razie zbyt silnego wzrostu grzybów na paskach tnie się je w poprzek przed wyłożeniem na pożywkę. Następnie płytki odwraca się i pod mikroskopem przy powiększeniu 100-krotnym zaznacza się położenie strzępek grzybów. Obserwacje wzrostu kolonii przeprowadza się codziennie przez 3–4 dni odszczepiając cienką igielką pojawiające się kolonie. Izolaty oczyszcza się na świeżej pożywce.

G a m s izolował tą metodą wiele rodzajów grzybów glebowych, m.in. *Fusarium*, *Penicillium*, *Mortierella*, grzyby nie owocujące — *Mycelia sterilia* oraz podstawczaki.

c. Wyodrębnianie strzępek celulolitycznych [12]

W y k o n a n i e. Wilgotne paski celofanowe ok. 1 cm szerokości nakłada się na szkiełka, suszy i końce przytwierdza przylepcem. Wycina się z nich żyłkę paseczki szerokości 1 mm. Jałowi się w alkoholu i umieszcza w glebie. Czas pozostawiania ich w glebie należy ustalić doświadczalnie. Powinien on być dłuższy niż w metodzie pasków nylonowych z uwagi na to, że celofan jako pożywka ma działać selekcyjną na mikroflorę sprzyjając rozwojowi grzybów celulolitycznych. Po wyjęciu z gleby paski służy się jałową wodą i oczyszcza jałowym pędzelkiem. Ma to na celu ułatwienie obserwacji i izolowania grzybów. Wpływa zaś w bardzo nieznacznym stopniu na skład jakościowy i ilościowy wyodrębnianych grzybów. Paski układa się następnie na selektywnym podłożu dla grzybów błonnikowych z karboksymetylocelulozą (np. agar Czapeka z dodatkiem 1% karboksymetylocelulozy lub rozdrobnionej bibuły filtracyjnej Whatman 1) [8, 16].

V. BADANIE GRZYBÓW ZASIEDLAJĄCYCH KORZENIE ROŚLIN

1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK KORZENI DO BADAŃ

W y k o n a n i e. Rośliny wykopuje się z całym systemem korzeniowym, otrząsa je z przylegającej gleby i wyjałowioną żyłką lub nożyczkami obcina cienkie, nie zdrewniałe korzenie. W przypadku roślin o grubych zdrewniałych korzeniach (np. rośliny drzewiaste lub lucerna) do badań przeznaczają się korzenie boczne, nie zdrewniałe, grubości do 3 mm.

2. OZNACZANIE LICZEBNOŚCI GRZYBÓW W RIZOSFERZE ROŚLIN [44]

Wykonanie. Około 10 g korzeni umieszcza się w jałowej wodzie (90 ml) w wytarowanej butelce i wytrząsa przez 5 min (rozcieńczenie 10^{-1}). Z tej zawiesiny przygotowuje się wyższe rozcieńczenie wytrząsając silnie każdorazowo następne rozcieńczenie przez 1 min w wytarowanej butelce. Po uzyskaniu odpowiedniego rozcieńczenia końcowego (rzędu 10^{-4} – 10^{-6}) dozuje się w 1 ml porcję zawiesiny gleby rizosferowej na płytki i zalewa przestudzoną pożywką Martina.

Korzenie pozostałe na dnie pierwszej butelki (10^{-1}) opłukuje się dokładnie i odrzuca. Pozostałą w butelkach glebę z rozcieńczenia 10^{-1} i 10^{-2} łączy się i odparowuje. Pozostałość suszy się w 105°C . Otrzymane wyniki przelicza się na 1 g suchej masy gleby rizosferowej.

3. IZOLOWANIE GRZYBÓW Z RIZOSFERY ROŚLIN

a. Metoda

Metoda ta podana przez Harley'a i Waida [14] została wielokrotnie zmodyfikowana. Znajduje jednakże szerokie zastosowanie w badaniach nad składem gatunkowym grzybów zasiedlających rizosferę roślin [31, 39, 47]. Poniżej podaje się modyfikację Mańki [31].

Wykonanie. Przygotowuje się serię dziewięciu 200-mililitrowych kolb zawierających po 70 ml jałowej wody. Ostatnia z serii zawiera oprócz wody 30 g jałowego drobnego piasku. Wytrząsa się 1 g korzeni kolejno po 2 min w serii kolb z wodą. Po jednej kropli zawiesiny uzyskanej w każdej kąpeli korzeni nakrapla się na płytki z pożywką Martina i rozprowadza po płytce za pomocą szklanej szpachelki. Po 6 dniach hodowli w temperaturze 23°C kolonie grzybów wyrosłe na powierzchni odszczepia się i oznacza.

Metoda ta może mieć zastosowanie przy ilościowym oznaczaniu grzybów zasiedlających rizosferę.

W celu wyodrębnienia grzybów z powierzchni korzeni (rizoplana) wypłukane w 9-krotnej kąpeli korzenie (jak wyżej) osusza się w warunkach jałowych, tnie na fragmenty długości 5 mm i umieszcza na płytkach z pożywką Hagen-Melin [31] lub na agarze Martina. Inkubacja trwa 6 dni w temperaturze 23°C . Potem odszczepia się i identyfikuje wyrosłe grzyby.

b. *Modyfikacja wg Parkinsona [17, 38]*

Wykonanie. Pozbawione gleby (przez otrząśnięcie) korzenie (jak w punkcie 1) przenosi się do jałowej płytki i przez wstrząsanie nią oddziela się najdrobniejsze części gleby rizosferowej, przylegającej do korzeni. Porcje gleby o ciężarze 0,005–0,01 g przenosi się do następnych jałowych płytek i rozkrusza igłą. Na tę glebę nalewa się 8–10 ml ostudzonej pożywki agarowej i dokładnie miesza. Wyrosłe grzyby przesiewa się na skosy agarowe (np. agar glikozowo-ziemniaczany).

c. *Izolowanie grzybów z powierzchni korzeni (rizoplana) [39, 47]*

Wykonanie. Rośliny wykopuje się ostrożnie nie naruszając systemu korzeniowego. Korzenie otrząsa się z przylegającej gleby i opłukuje w bieżącej wodzie. Wypreparowuje się cienkie nie zdrewniałe korzonki, które tnie się na fragmenty długości 5 cm i umieszcza w 50-mililitrowych kolbach Erlenmeyera z 20 ml jałowej wody. Wytrząsa się przez 5 min, dekantuje i 4-krotnie zmienia wodę wytrząsając za każdym razem przez 1 min. Następnie korzenie przenosi się do świeżej porcji wody i 4-krotne płukanie powtarza jeszcze 5 razy. Wypłukane fragmenty korzeni przenosi się na jałową płytkę i obcina 5-milimetrowe odcinki z obu końców każdego fragmentu. Te odcinki wkłada się na pożywkę Martina i hoduje w temperaturze 20–22°C. Wyrosłe strzępki przesiewa się na skosy.

d. *Izolowanie grzybów z wnętrza korzeni [25, 26, 27, 28]*

Wykonanie. Korzenie tnie się na odcinki długości 3 cm, płucze starannie wodą wodociągową i dezynfekuje (alkohol etylowy — 10–15 sek, sublimat — 30 sek, woda destylowana i jałowa po 90 sek). Po wyjałowieniu korzenie tnie się na odcinki 5 mm i wkłada na agar glikozowo-ziemniaczany. Po inkubacji w temperaturze pokojowej odszczepia się rozwijające się kolonie na skosy agarowe.

VI. METODY BADANIA INTENSYWNOŚCI WZROSTU GRZYBÓW

Mają one zastosowanie w badaniach nad wpływem różnych czynników na grzyby.

1. POMIAR PRZYROSTU ŚREDNICY KOLONII [57]

Wykonanie. Przygotowuje się zawiesinę zarodników grzybów w półpłynnym agarze wodnym (0,3% agaru). Taką zawiesiną zaszczepia

się płytki z agarem glikozowo-ziemniaczanym umieszczając kroplę zawiesiny na środku płytki. W celu uniknięcia rozpryskiwania się zarodników szczepienia dokonuje się przy odwróconej płytce. Płytki inkubuje się w temperaturze 21–25°C dokonując przez 10 dni co 24 godz. pomiarów średnicy kolonii grzyba.

2. OZNACZANIE PRZYROSTU SUCHEJ MASY GRZYBÓW [33, 43, 47]

W y k o n a n i e. Płynną pożywkę dla grzybów w ilości 20 ml rozlewa się do 100-mililitrowych kolbek Erlenmeyera i zaszczenia 0,5 ml wodnej zawiesiny zarodników grzyba. Zawiesinę przygotowuje się z 7-dniowej kultury grzyba na skosie agarowym splukując ją 5 ml jałowej wody. Po 10 dniach hodowli w temperaturze 20–25°C grzybnię oddziela się od pożywki na zważonym sączku bibułowym, tkaninie jedwabnej lub sicie o bardzo drobnych oczkach, przemywa dokładnie wodą i suszy do stałej wagi w temperaturze 80°C.

Grzyby rozwijające się słabo w płynnych pożywkach można hodować na płytkach agarowych. Po inkubacji płytki podgrzewa się w celu rozpuszczenia agaru, następnie odsąca się na bibule i płucze gorącą wodą. Dalsze postępowanie jak wyżej.

VII. BADANIA ZDOLNOŚCI KIEŁKOWANIA ZARODNIKÓW

1. BADANIE WPŁYWU ANTAGONISTÓW NA KIEŁKOWANIE ZARODNIKÓW [42]

W y k o n a n i e. Szczep drobnoustroju antagonistycznego, wyrosły w postaci rysy na płytce, zalewa się 2 ml zawiesiny zarodników badanego grzyba w rozpuszczonym agarze glikozowo-ziemniaczanym. Kiełkowanie zarodników sprawdza się umieszczając płytki pod mikroskopem po 1, 3 i 7 dniach. Po zaobserwowaniu strefy zahamowania wzrostu grzyba wycina się skalpelem paski agaru z tych stref. Umieszcza się je następnie na szkiełku przedmiotowym, utrwala i barwi roztworem błękitu bawełnianego laktofenolu (2–3 min), następnie się płucze. Sprawdza się pod mikroskopem zahamowanie kiełkowania zarodników.

2. BADANIE WPŁYWU FUNGICYDÓW NA KIEŁKOWANIE ZARODNIKÓW [3, 4, 20]

W y k o n a n i e. Na dwóch szkiełkach przedmiotowych umieszcza się po 3 krążki wykonane z parafiny, o wewnętrznej średnicy 7 mm. W nich umieszcza się po ok. 0,05 ml roztworu badanego preparatu, który wysusza

się w temperaturze pokojowej. Na suchy osad środka grzybobójczego nanosi się 0,05 ml zawiesiny zarodników. Przygotowuje się ją z 5-dniowej hodowli grzyba spłukując wzrost wodą. Zaleca się przemyć spłukanych zarodników jałową wodą i odwirowanie. Szkiełka z naniesionymi kroplami umieszcza się następnie na 24–42 godz. w wilgotnej komorze w 20°C. Po tym czasie oblicza się pod mikroskopem procent skielkowanych zarodników, analizując po 50 zarodników w każdym krążku (razem 300 zarodników). Wyniki wyraża się w procencie zarodników nie wykiełkowanych oraz w stopniach skuteczności obliczonych w stosunku do kontroli (bez fungicydu). Stopień skuteczności oblicza się wg wzoru:

$$\frac{A-B}{A} \times 100$$

gdzie:

A — ilość zarodników wykiełkowanych w kombinacji kontrolnej,

B — ilość zarodników wykiełkowanych w kombinacji badanej.

Na podstawie co najmniej 5 stężeń preparatu wykreśla się krzywą *ED* (effective dose) i graficznie wyznacza wartość *ED*₅₀ (dawka hamująca kiełkowanie w 50%).

VIII. OTRZYMYWANIE KULTUR Z JEDNEGO ZARODNIKA [41]

1. **W y k o n a n i e.** 10 ml rozpuszczonej pożywki agarowej szczepi się niewielką ilością zarodników grzyba i wylewa na płytkę. Reszta pożywki pozostała w probówce służy jako inoculum do zaszczepienia następnej próbki z rozpuszczoną pożywką, którą wylewa się również na płytkę. W ten sposób otrzymuje się coraz rzadszą zawiesinę zarodników w pożywce. Po 24–48 godz. hodowli wybiera się z płytek pod lupą lub pod małym powiększeniem mikroskopu 1 wykiełkowany zarodnik, wycina się go wraz z otaczającym agarem i przenosi na świeżą pożywkę.

2. **W y k o n a n i e.** Na płytkę z pożywką agarową wylewa się rzadką zawiesinę zarodników grzyba w wodzie. Po paru minutach nadmiar wody zlewa się. Część zarodników pozostaje przytwierdzona do powierzchni agaru. Po krótkiej inkubacji wszczepia się pojedyncze zarodniki na płytki ze świeżą pożywką.

Lilly i Barnett [23] podają łatwy sposób wyizolowania pojedynczych zarodników z agaru. Małą igłą do szycia umieszcza się ostrym końcem w uchwycie. Drugi jej koniec zagina się tak, aby mógł być umieszczony równolegle do powierzchni agaru. Uszko zaokrągla się i spiłowuje w ten sposób, aby od strony agaru tworzyło oczko. Na płytce pod małym powiększeniem mikroskopu znajduje się skielkowany pojedynczy zarodnik. Igłą umieszcza się nad nim w ten sposób, aby przez

uszek można było widzieć zarodnik. Wbija się uszek w agar i wraz z nim przenosi zarodnik na świeżą pożywkę.

3. **W y k o n a n i e.** Zawiesinę spor w wodzie lub w płynie fizjologicznym rozcieńcza się dotąd, dopóki 1 eza nie zawiera 1 zarodnika (sprawdzić pod mikroskopem). Następnie przenosi się ezą krople zawiesiny na agar sprawdzając pod mikroskopem, gdzie znajdują się pojedyncze zarodniki. Miejsca te zaznacza się na dnie płytki. Po inkubacji kolonię powstałą z 1 zarodnika przeszczepia się na świeżą pożywkę.

4. **Metoda Hansena wyodrębniania grzybów o dużych zarodnikach [15].**
W y k o n a n i e. Sporządza się zawiesinę spor w rozpuszczonej pożywce agarowej. Wciąga się ją do kapilar o świetle nieznacznie większym od średnicy zarodników. Pod mikroskopem wynajduje się miejsca w kapilarach zawierające po jednym zarodniku. Te miejsca wyłamuje się z kapilar, jałowi zewnętrznie i przenosi na płytki ze świeżą pożywką.

IX. METODY OBSERWACJI ORGANÓW ROZMNAŻANIA U GRZYBÓW

1. BEZPOŚREDNIA OBSERWACJA MIKROSKOPOWA

Jest to najprostszy i najpowszechniejszy sposób obserwowania organów rozmnażania u grzybów.

W y k o n a n i e. Grzyby hoduje się na pożywkach uniwersalnych, np. pożywka glikozowo-ziemniaczana, brzeczkowa, pożywka z wyciągu słodowego lub pożywka Czapek-Doxa. Po otrzymaniu obfitego wzrostu (9–12 dni hodowli lub dłużej) do wieczka odwróconej płytki wlewa się kilka mililitrów 5–10-procentowego roztworu formaliny i jałowi się grzyb przez 10–12 godz. Po tym zabiegu można z hodowli grzyba wykrawać wycinki do obserwacji mikroskopowej. W przypadku grzybów trudno owocujących należy stosować pożywki naturalne, jak pożywka marchwiowa, fasolowa, śliwkowa i inne.

W pracy z grzybami należy zwracać baczną uwagę na aseptyczne warunki pracy, gdyż wszelka nieostrożność, np. preparowanie żywych zarodnikujących hodowli, powoduje rozsiewanie się zarodników w powietrzu, co następnie uniemożliwia utrzymanie grzybów w czystych hodowlach i grozi zakażeniem pracowników przez grzyby chorobotwórcze, występujące w glebie.

2. MIKROKULTURY

Ten typ hodowli grzybów stosuje się do rodzajów tworzących małe sporofory. W hodowlach tego typu można również obserwować aktywność kiełkowania zarodników.

Wykonanie. Dwa szkiełka przedmiotowe umieszcza się w płytce na zgiętej trójkątnie grubej bagietce. Całość jałowi się w autoklawie. Z pożywki agarowej wylanej na płytkę wycina się dwa krążki i przenosi na szkiełka umieszczone w płytce. Krążki zaszczepia się kulturą badanego grzyba i zakrywa wyjałowionym szkiełkiem nakrywkowym. Na dno płytki nalewa się kilka mililitrów jałowego 20-procentowego roztworu glicerolu, w celu zapewnienia odpowiedniej wilgotności powietrza w płytce. Po kilku dniach inkubacji obserwuje się sporofory wyrastające pod szkiełkiem nakrywkowym na brzegu krążka agarowego.

3. HODOWLA NA KWADRACIKACH CELOFANOWYCH [41]

Wykonanie. Kwadraciki celofanowe nasycą się rozcieńczoną pożywką, osuszą bibułą i umieszcza w płytce. Jałowi się w bieżącej parze wodnej. 6–8 kwadracików umieszcza się w jałowej płytce na zwilżonej bibule. Każdy kwadracik szczepi się w jednym lub kilku miejscach i inkubuje. Kwadraciki wyjmuje się co pewien czas w celu sprawdzenia pojawiania się ciał owocujących. W celu otrzymania przejrzystych cienkich kolonii należy używać pożywki rozcieńczonej 10–100-krotnie. W celu obserwacji zdolności kiełkowania zarodników tą metodą używa się pożywek o pełnym składzie.

X. METODA PRZECHOWYWANIA KULTUR

1. PRZECHOWYWANIE POD OLEJEM PARAFINOWYM

Jest to najczęściej stosowany sposób przechowywania kultur grzybów. W tych warunkach pozostają one prawie nie zmienione zachowując żywotność przez kilka lat.

Wykonanie. Grzyb hoduje się na krótkim skosie agarowym. Po uzyskaniu dobrego wzrostu i zarodnikowania hodowlę zalewa się jałowym olejem parafinowym (jałowić 30 min przy ciśnieniu 1 at) zanurzając całą hodowlę pod olej.

2. PRZECHOWYWANIE W JAŁOWEJ GLEBIE

Wykonanie. Zmieszać 1 część ogrodowej gleby, 1 część grubego piasku, 1% CaCO_3 , rozdzielić do probówek, zakorkować watą, wyjałowić 30 min w 1 at. Sprawdzić jałowość gleby na bulionie odżywczym. Zaszczepić ok. 2 ml zawiesiny zarodników. Po ok. 10 dniach inkubacji uszczelnić korki parafiną.

3. PRZECHOWYWANIE NA ŻDZBŁACH SŁOMIANYCH

Wykonanie. Umieścić w probówkach źdźbła słomy długości 2–3 cm. Dodać 2–3 ml wody, wyjałować, zaszczyć grzybem. Wychodować go w ciągu ok. 10 dni, dopóki woda na dnie nie wyschnie. Następnie cały korek z waty wkręcić do próbówki, a wylot uszczelnić parafiną.

Podobnie można przechowywać kultury grzybów na wysuszonych skosach agarowych.

XI. SPIS PODSTAWOWYCH POŻYWEK

Agar glikozowo-peptonowy Martina [17, 34]

Agar	20,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
pepton	5,0 g
glikoza	10,0 g
woda destylow.	1000,0 ml
róż bengalski	10,0 ml roztworu 1 : 300
streptomycyna	30 mcg/ml
lub aureomycyna	2 mcg/ml

Przygotowanie. Wszystkie składniki, oprócz różu bengalskiego i antybiotyku, rozpuszcza się w wodzie. Mieszaninę ogrzewa się powoli do zagotowania. Odstawia się i dodaje roztwór różu bengalskiego. Przed wylaniem pożywki na płytki dodaje się roztwór antybiotyku w jałowej wodzie. Ze względu na liczne drobnoustroje streptomycynoodporne spotykane w glebie bardziej polecane jest stosowanie aureomycyny.

Ekstrakt glebowy [18]

500 g badanej gleby zalać 1500 ml wody. Po 24 godz. zdekantować i przesączyć przez filtr bakteriologiczny. Dodawać do pożywki po wyjałowieniu, przed wylaniem na płytki.

Agar glikozowo-ziemniaczany [17, 40]

Agar	17,0 g
ziemniaki (obrane i pokrojone)	200,0 g
glikoza	20,0 g
woda	1000,0 ml

Ziemniaki gotuje się przez 1 godz. lub paruje w autoklawie przez 40 min z 500 ml wody. Agar rozpuszcza się w pozostałych 500 ml wody. Wyciąg z ziemniaków dekantuje się i sączy łącząc go z rozpuszczonym

agarem i glikozą. Objętość dopełnia się wodą do 1000 ml. Jałowi się w bieżącej parze przez 3 dni po 30 min.

Agar Czapek-Doxa [17, 48]

Agar	15,0 g
NaNO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
sacharoza	30,0 g
woda destylowana	1000,0 ml

Sacharozę dodaje się tuż przed jałowieniem. Można dodać do pożywki 1 g wyciągu drożdżowego.

Pożywka Hagen-Melin [31]

Glikoza	20,0 g
wyciąg słodowy	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
amon bursztynian	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄	0,5 ml (1 : 500 roztw. wodnego)
cytrynian żelaza	0,5 ml (1% roztw. wodnego)
witamina B	50 mcg
agar	15,0 g
woda destylowana	1000,0 ml

Pożywka na wyciągu słodowym

Wyciąg słodowy	30,0 g
„Malto”	
agar	17,0 g
woda	1000 ml

Pożywka marchwiowa z glikozą [41]

100 g marchwi pokrojonej drobno gotuje się 1 godz. w 1 l wody. Sączy się, dopełnia wodą do 1 l, dodaje 2% sacharozy oraz 1,5–2,0% agaru. Jałowość 20–30 min przy ciśnieniu 1 at.

Podobnie przygotowuje się pożywkę z fasoli (50 g fasoli na 1 litr wody). Pożywka ze śliwek (80 g suszonych śliwek na 1 l wody) bez dodatku cukru nadaje się do hodowli większości grzybów.

Pożywka OAES (wg przepisu Ohio Agricultural Experimental Station) [19]

Glikoza	5,0 g
ekstrakt drożdżowy	2,0 g

NaNO ₃	1,0 g
MgSO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
siarczan streptomycyny	0,050 g
chloromycetyna	0,050 g
oxgall	1,0 g
propionian sodu	1,0 g
agar	20,0 g
woda destylowana	1000 ml

Jałowić w 3/4 at przez 15 min.

Roztwór błękitu bawełnianego w laktofenolu [41]

Błękit bawełniany	0,05 g
laktofenol	100,0 ml

Laktofenol do utrwalania hodowli [41]

Fenol	10,0 g
kwask mlekowy	10,0 g
glicerol	20,0 g
woda destylowana	10,0 ml

Fenol z wodą ogrzewa się do rozpuszczenia. Następnie dodaje się kwas mlekowy i glicerol.

LITERATURA

- [1] Allen O. N.: Experiments in soil bacteriology. Burgess Publ. Co. Minneapolis, 1951.
- [2] Alexander F. E. S., Jackson R. M.: Preparation of sections for study of soil microorganisms. Soil Zoology, Butterworth Scientific Publications-London, Acad. Press, New York 1955.
- [3] Borecki Z., Burkowicz A.: Badania biologiczne nad fungicydem *Rodator* i jego zastosowaniem w ochronie sadów. Acta Agrobot., XII, 149-173, 1962.
- [4] Borecki Z., Czerwińska E., Eckstein Z., Kowalik R.: Chemiczne środki grzybobójcze-fungicydy, PWRiL, Warszawa 1965.
- [5] Burges A.: The soil microflora—its nature and biology. Ecology of soil born plant pathogens—prelude to biological control. Univ. Calif. Press, Berkeley, Los Angeles 1965.
- [6] Burges A., Nicholas D. P.: Use soil sections in studying amount of fungal hyphae in soil. Soil Sci., 92, 25-29.
- [7] Burges A.: Microorganisms in the soil. Hutchinson Univ. Library, London 1964.
- [8] Chakravarty T., Bose R. G., Basu S. N.: Fungi growing in jute fabrics deteriorating under weather exposure and in storage. Appl. Microbiol., 10, 5, 1962, 441-447.
- [9] Chesters C. G. C.: A method for isolating soil fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 24, 1940, 352-355.
- [10] Etchels J. L., Costilow R. N., Bell T. A., Demain A. L.: Appl. Microbiol., 2, 1954, 296-300.

- [11] Chesters C. G. C.: A contribution to the study of fungi in the soil. Trans. Brit. Mycol. Soc., 30, 1948, 100-117.
- [12] Gams W.: Isolierung von Hyphen aus dem Boden. Sydowie, Annales Mycologic., II, 13, 1959, 1-6.
- [13] Haarlov a. Weiss-Fogh: A microscopical technique for studying the undisturbed texture of soils. Soil Zoology. Butterworth Scientif. Publications, London Acad. Press N. Y., 1955.
- [14] Harley J. L., Waid J. S.: A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. Trans. Brit. Mycol. Soc., 38, 1955, 104-119.
- [15] Hansen H. N.: A simple method of obtaining single spore cultures. Sci. 64, 1926, 384.
- [16] Horton J. C., Keen N. T.: Regulation of induced cellulose synthesis in *Pyrenochaeta terrestris* Gorntz at al. by utilizable carbon compounds. Can. J. Microbiol., 12, 1966, 209-220.
- [17] Johnson F. L., Curl E. A., Bond J. H., Fribourg H. A.: Method for studying soil microflora-plant disease relationships. Burgess Publ. Comp., Minneapolis, Minn., 1960.
- [18] Johnson F. L., Mańka K.: Modification of Warcup's soil plate method for isolating soil fungi. Soil Sci., 92, 1961, 79-84.
- [19] Kaufmann D. D., Williams L. E., Sumner C. B.: The effect of plating medium and incubation temperature on growth of fungi in soil dilution plates. Can. J. Microbiol., 9, 1963, 741-751.
- [20] Koopmans M. J.: Fungicide Research. Philips Technical Review, 17 (7-8), 1956, 222-229.
- [21] Kulińska D., Molska I.: Metody inwentaryzacji grzybów glebowych. Post. Mikrobiol., 2, 1962, 245-252.
- [22] Kubiena W. L.: Micropedology, Iowa 1938.
- [23] Lilly V. G., Barnett H. L.: Fizjologia grzybów. Tłumaczenie, PWRiL, Warszawa 1959.
- [24] Mac Writhey H. S.: Another modification of the Chester's tube method for examination of soil microflora. Rept. 36th Ann. Conven. Norwest Ass. Hort. Etomol. and Plant Pathol., 1957.
- [25] Mańka I.: Badania terenowe i laboratoryjne nad opieńką miodową *Armillaria mellea* (Vahl) Quel. Warszawa 1953.
- [26] Mańka K., Truszkowska W.: Próba mykologicznej analizy korzeni świerka *Picea excels* LK. Acta Soc. Bot. Pol., XVII, 1958, 45-73.
- [27] Mańka K., Gierczak M.: Badania nad florą grzybową korzeni sosny zwyczajnej *Pinus silvestris* (L). P.T.P.N. IX, 1961, 1, 3-47.
- [28] Mańka K., Rząsa S.: Badania nad mikroflorą korzeniową drzew leśnych. Folia Forest. Polon., 6, A, 1961, 27-48.
- [29] Mańka K., Błońska A., Wnękowski S.: Badania nad składem mikoflory kilku rodzajów gleb i jej oddziaływanie na rozwój niektórych pasożytniczych grzybów glebowych. Prace Nauk. Inst. Ochr. Roślin, 3, 2, 1961, 145-231.
- [30] Mańka K.: Próby dalszego udoskonalenia zmodyfikowanej metody Warcupa izolowania grzybów z gleby. P.T.P.N., 17, 1964, 29-45.
- [31] Mańka K.: Saprophytic soil fungi as a factor determining the development of phytopathogenic fungi living in the soil. Wyd. Powiel. IOR, Poznań 1965.
- [32] Mańka K., Kowalski S.: Porównawcze studium nad metodami izolowania z gleby grzybów należących do podklasy *Oomycetes*. P.T.P.N., w druku.

- [33] Marshall C. K., Alexander M.: Competition between soil bacteria and *Fusarium*. *Plant a. Soil*, 2, 1960, 143.
- [34] Martin J. P.: Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method of estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 69, 1950, 215-233.
- [35] Miller J. J.: Isolation of yeasts from soil with the aid of acid, rose bengal and oxgall. *Soil Sci.*, 77, 1954, 197-204.
- [36] Mindermann G.: The preparation of microtome sections of unaltered soil for the study of soil organisms in situ. *Pant and Soil*, 8, 1956, 42-48.
- [37] Mueller K. E., Durrell L. W.: Sampling tubes for soil fungi, *Phytopathol.*, 1957, 47, 423.
- [38] Parkinson D.: New methods for the qualitative and quantitative study of fungi in the rhizosphere. *Symposium Methodes d'Etudes Microbiologiques du Sol*, Louvain.
- [39] Peterson E. A.: Observations of fungi associated with plant roots. *Can. J. Microbiol.*, 4, 1958, 257-265.
- [40] Riker A. J., Riker R. S.: Introduction to research on plant diseases. John Swift and Co., St. Louis, Mo., 1936.
- [41] Smith G., Raistrick H.: An introduction to industrial mycology. Ed. Arnold and Co. Ltd., London 1946.
- [42] Stevenson I. L.: Antibiotic activity of actinomycetes in soil as demonstrated by direct observation techniques. *J. Gen. Microbiol.*, 15, 1956, 372-380.
- [43] Strzelczyk E., Strzelczyk A.: Wpływ środków owadobójczych i grzybobójczych na mikroflorę gleby. *Annales UMCS, Sec. E*, 18, 1963, 55-71.
- [44] Strzelczyk E.: Studies on the rhizosphere microflora of plants resistant and susceptible to soil borne diseases. I. Microbial characteristics of rhizosphere and non-rhizosphere soil. *Acta Microbiol. Polon.*, 12, 1963, 211-223.
- [45] Strzelczyk E.: Studies on the rhizosphere mikroflora of plants resistant and susceptible to soil borne diseases. II. Effect of aminoacids and vitamins on growth of *Thielaviopsis basicola* and *Fusarium oxysporum f. lini*. *Acta Microbiol. Polon.*, 13, 1964, 137-148.
- [46] Strzelczyk E.: Studies on the rhizosphere microflora of plants resistant and susceptible to soil borne diseases. III. Incidence of antagonists and competitors of *Fusarium oxysporum f. lini* and *Thielaviopsis basicola* in rhizosphere and non rhizosphere soil. *Acta Microbiol. Polon.*, 14, 1965, 87-100.
- [47] Strzelczyk E., Szember A., Wyczółkowski A.: Fungi associated with roots of tobacco resistant and susceptible to black root rot. *Acta Microbiol. Polon.*, 14, 1965, 315-320.
- [48] Thom C., Raper K. B.: A manual of *Aspergilli*. Williams a. Wilkins Co., Baltimore Md. 1945.
- [49] Thornton R. H.: The screend immersion plate — a method of isolating soil microorganisms. *Research*, 5, 1952, 190-191.
- [50] Thornton R. H.: Rhizoctonia in natural grassland soils. *Nature*, 177, 1956, 230-231.
- [51] Waksman S. A.: Do fungi live and produce mycelium in the soil? *Sci.*, N.S., 44, 1916, 320-322.
- [52] Warcup J. H.: The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature*, 166, 1950, 117-118.
- [53] Warcup J. H.: Isolation of fungi from hyphae present in soil. *Nature*, 175, 1955, 953-955.

- [54] Warcup J. H.: Studies on *Basidiomycetes* in soil. Trans. Brit. Soc. Mycol., 1, 1959, 227-231.
- [55] Ziemięcka J.: Mikrobiologia gleby i nawozów organicznych. PWRiL, Warszawa 1958.
- [56] Ziemięcka J.: The ecology of soil fungi. Intern. Symp. Liverpool Univ. Press, 1960.
- [57] Vincent J. M.: J. Soc. Chem. Ind., 66, 1947, 149. Opracowano w 1967 r.

А. СТРЖЕЛЬЧИК

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ

Польское Общество Почвоведов, Комиссия Биологии

Резюме

Описаны методы наиболее часто применяемые почвенными микробиологами и микологами. Методы касаются техники изолирования и идентификации грибов развивающихся в почве и в корневой системе растений. Описаны также методы культивирования, определения интенсивности их возраста, наблюдения органов размножения и хранения чистых культур грибов.

A. STRZELCZYK

METHODS OF STUDYING OF SOIL FUNGI

Polish Soil Science Society. Commission of Biology

Summary

The Methods most often applied by soil microbiologists and mycologists are described.

They comprise the techniques of isolation and determination of fungi habitating the soil and plant roots, the methods of their cultivation, and growth measurment, the observation of fruit bodies and storage of fungal pure cultures.

