

## Wpływ fungicydów dodanych do podłoża na grzyby niszczące zabytkowy papier

A. STRZELCZYK

Instytut Zabytkoznawstwa i Konserwatorstwa  
Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu

Strzelczyk A. (Institute of Conservation and Restoration, Nicolaus Copernicus University, 87-100 Toruń, Sienkiewicza 30/32, Poland), *Studies on the effect of fungicides incorporated into the culture medium on fungi damaging ancient paper*, Acta Mycol. 11 (1) : 3-16, 1975.

The aim of this work was to study the effect of fungicides contained in the medium on spore germination, on growth of colonies and on biosynthesis of cellulolytic enzymes of fungi isolated from damaged ancient books. Influence of various temperatures on the biosynthesis of cellulases was also studied. It was shown that mercuric fungicides were more effective in inhibition of spore germination and cellulolytic enzyme activity than phenolic derivatives. The biosynthesis of cellulases was more effective in 16-18° than in 23 and 30°C. The phenomenon of adaptation to small amounts of fungicides was observed.

### WSTĘP

Mechanizm działania fungicydów na grzyby jest bardzo różnorodny i uzależniony od budowy komórki grzyba oraz od natury środka grzybobójczego. Zależnie od tego fungicydy wchodzi w mniej lub bardziej ścisły kontakt z komórkami grzyba.

W poszczególnych stadiach rozwoju grzyb wykazuje różną wrażliwość na działanie fungicydów. Zarodniki grzybów, jako formy silnie odwodnione, otoczone wysyconą tłuszczami ścianą komórkową, są dość odporne na działanie fungicydów. Niemniej jednak wiadomo, że konidia, a nawet zarodnie workowe mogą adsorbować toksyczne ilości kationów (S u s s m a n n i wsp. 1957).

M c C a l l a n i M i l l e r stosując radioaktywne izotopy metali stwierdzili, że czynne jony fungicydów akumulują się na powierzchni zarodników już po kilkuminutowym kontakcie spor z fungicydem.

Dużą rolę w adsorbowaniu i przenikaniu fungicydów do komórki odgrywiają składniki ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej.

Grupy czynne fungicydów przejawiające charakter zarówno lipofilny, jak i hydrofilny, wykazują powinowactwo do grup hydro- i lipofilnych w ścianie komórkowej oraz błonie protoplazmatycznej (Rich i Horsfall 1952; Borecki i wsp. 1965).

Zjonizowane grupy fungicydów, jak też jony metali, wiążąc się z białkami błony cytoplazmatycznej mogą powodować jej uszkodzenie i idące za tym zachwianie jej półprzepuszczalności. Konsekwencją tego może być plazmoliza lub pęcznienie komórki kończące się często jej pękaniem (Rich 1960).

Pod wpływem chlorku rtęciowego następuje u grzybów zahamowanie przemian azotowych, syntezy białek i kwasów nukleinowych (Tröger 1958).

Enzymy są bardzo wrażliwe na działanie czynników grzybobójczych. Zahamowanie ich syntezy lub działalności przypisuje się toksycznemu działaniu wielu fungicydów (Glover 1964; Lukens 1971).

Zagadnienie wpływu czynników chemicznych na aktywność celulaz omawiają: Siu (1951) oraz Gascoigne i Gascoigne (1960) i inni.

Celulazy, podobnie jak i inne enzymy, są łatwo inaktywowane przez związki chemiczne zawierające jony metali ciężkich jako grupy czynne.

Walseth oraz Pettersson (1968) badali wpływ szeregu fungicydów na celulazy wytwarzane przez grzyby i stwierdzili, że wyraźnie hamujący wpływ na te enzymy wywierał tymol, toluen i octan fenylortęciowy.

Badania spektrofotometryczne wykazały, że ten inhibitor blokował reszty tryptofylowe. Natomiast Dowicide D(2-chloro-4-fenolan sodu) nie hamował aktywności celulaz. W badaniach Reese i Mandelsa (1975) fenol nie hamował aktywności celulaz u takich grzybów, jak *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria* i *Penicillium westerdijkii*.

Podstawione fenole hamowały szczególnie silnie karboksymetylocelulazy. Substancje te nie wpływały natomiast inaktywująco na  $\beta$ -glukozydazy.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu fungicydów dodanych do podłoża na zdolność kiełkowania zarodników, na rozwój kolonii grzybów oraz na aktywność enzymów celulolitycznych u grzybów niszczących zabytkowy papier. Interesował nas również wpływ temperatury na wytwarzanie enzymów celulolitycznych.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano 6 szczepów grzybów wyodrębnionych z zapleśniałych starodruków. Izolowano je metodą punktowego przesiewania skrawków zniszczonego papieru na pożywkę Martina (1950) z różem ben-

galskim. Były to: *Trichothecium roseum* Link, *Penicillium corylophilum* Diercks, *Sepedonium chrysospermum* Bulliard, *Botrytis terrestris* Jensen, *Alternaria humicola* Oudemans i *Mucor christianiensis* Hagen.

Zbadano oddziaływanie na zdolność kiełkowania zarodników, przyrost średnicy kolonii oraz aktywność celulaz  $C_x$  następujących fungicydów dodanych do pożywki: — octanu fenylortęciowego (OFR) prod. RFN; — pięciochlorofenolanu sodu (PCFNa) prod. RFN; — p-chloro-m-krezolanu sodu (PCMCNa) przygotowanego w pracowni z PCMC firmy BDH. Ponadto zbadano wpływ sublimatu ( $HgCl_2$ ) na aktywność celulaz.

#### Wpływ fungicydów zawartych w podłożu na zdolność kiełkowania zarodników

Przygotowano rozcieńczenia następujących fungicydów: PCMCNa i PCFNa w wodzie oraz OFR początkowo w alkoholu (rozcieńczenie macierzyste), a następnie w wodzie. Dawki 1 ml fungicydów w rozcieńczeniach 10-krotnie wyższych od doświadczalnych mieszano w probówkach z 9 ml rozpuszczonego agaru wodnego (woda destylowana + 2% agaru) uzyskując w ten sposób podłoże zawierające odpowiednie stężenia fungicydów. Po wylaniu zawartości probówek do płytek Petriego z zastygniętego podłoża wycinano krążki o średnicy 10 mm i po 3 takie krążki umieszczano na 2 wyjałowionych przedmiotowych szkiełkach mikroskopowych. Szkiełka z krążkami agarowymi umieszczano następnie w jałowych płytkach Petriego z wilgotną bibułą, po czym zaszczerpiano je zawiesiną zarodników grzybów w wodzie. Liczbę zarodników w inokulum dobrano tak, by w jednym polu widzenia pod mikroskopem (pow. ok.  $40\times$ ) znajdowało się nie więcej niż 30 zarodników. Płytki z hodowlami oklejano szczelnie plastrem i inkubowano w temperaturze  $26^\circ C$  przez 1-5 dni. Kontrolę stanowiły hodowle na agarze wodnym z dodatkiem 1 ml wody zamiast roztworu fungicydów.

W badaniach naszych zastosowano następujące stężenia fungicydów (w mcg/ml pożywki): OFR od 0,5 do 2,00; PCFNa od 5,0 do 20,00; PCMCNa od 5,0 do 1000,0; mieszaniny fungicydów PCMCNa + OFR — odpowiednio —

50,0+0,05

50,0+0,10

100,0+0,05

100,0+0,10

oraz PCFNa + OFR w tych samych stężeniach.

W doświadczeniach z mieszaninami środków grzybobójczych do badania zdolności kiełkowania zarodników zastosowano także jako podłoże 3-procentowy wyciąg słodowy z agarem.

Zdolności kiełkowania zarodników badano po 1, 2, 3, 4 i 6 dniach trwania doświadczenia stosując metodę opisaną poprzednio (Strzelczyk 1968, 1969).

W trakcie obserwowania zarodników na agarowych krążkach zwracano także uwagę na zmiany w morfologii zarodników i strzępek rostkowych powstałe pod wpływem fungicydów.

#### Wpływ fungicydów na wzrost grzybni na agarze słodowym

Badania prowadzono na płytkach z agaryzowanym 3-procentowym wyściągim słodowym malto z dodatkiem środków grzybobójczych. Zastosowano następujące stężenia fungicydów (w mcg/ml): OFR od 0,05 do 10,0; PCFNa od 5,0 do 20,0; PCMCNa od 0,05 do 2000,0 oraz PCMCNa + OFR — odpowiednio — 50+0,05 i 50+0,10. Pożywkę taką zawierającą fungicydy zaszczepiano zawiesziną zarodników grzybów nanosząc ją na środek płytki za pomocą ezy o średnicy oczka 4 mm. Po 4 i 8 dniach hodowli mierzono średnicę kolonii grzybów wyrosłych na pożywce z fungicydami i porównywano ją ze średnicą kolonii rozwijających się na pożywce bez nich. Ponadto obserwowano zmiany w wyglądzie i strukturze kolonii oraz w intensywności zarodnikowania grzybów.

#### Wpływ temperatury oraz fungicydów na biosyntezę enzymów celulolitycznych grzybów niszczących zabytkowy papier

Do badań nad aktywnością celulolityczną użyto następujących grzybów: *Chaetomium globosum* Kunze, *Penicillium corylophilum* Diercks, *Trichothecium roseum* Link, *Sepedonium chrysospermum* Bulliard, *Alternaria humicola* Oudemans, *Mucor christianiensis* Hagen oraz *Botrytis terrestris* Jensen.

Najpierw próbowano badać aktywność celulaz  $C_1$  tych grzybów w temperaturach 16-18°C, 23°C i 30°C przez 2 tygodnie w płynnej pożywce wg Aschan i Norkrans (1953) z dodatkiem sproszkowanej celulozy Whatmana nr 1, po czym określono aktywność celulaz  $C_1$  w przesączach pochodowlanych posługując się metodą Halliwell (1965).

W trakcie tych badań okazało się jednak, że cukry redukujące, obecne w przesączach pochodowlanych, powodowały tak silną redukcję dwuchromianu potasu (użytego jako akceptora jonów wodorowych z cukrów redukujących), że musiano zaniechać tej metody do oznaczania wpływu fungicydów na aktywność celulaz  $C_1$ .

Posłużono się więc metodą wiskozymetryczną pozwalającą na określenie aktywności celulaz  $C_x$  w obecności fungicydów. Spadek lepkości roztworu CMC (karboksymetylocelulozy) określono metodą wiskozymetryczną wg Hortona i Keena (1965).

Do trzech 100 ml kolbek z 20 ml pożywki wg Aschan i Norkrans (1953) ze sproszkowaną celulozą wprowadzano 1 ml zawiesiny zarodników badanych grzybów i inkubowano przez 3 tygodnie w temperaturze 26°C.

Do badań zastosowano następujące fungicydy (w dawkach 1,0 i 4,0

mcg/ml pożywki): octan fenylortęciowy (OFR), (zastosowano tu dodatkowo stężenie 0,5 mcg/ml,) p-chloro-m-krezol (PCMC), p-chloro-m-krezolan sodu (PCMCNa) i sublimat ( $HgCl_2$ ).

Po inkubacji hodowle sączono, po czym w przesączach oznaczano aktywność celulaz  $C_x$ .

#### WYNIKI BADAŃ

Wpływ środków grzybobójczych na aktywność kiełkowania zarodników i morfologię strzępek rostkowych

W tabeli 1 podano najniższe stężenia fungicydów całkowicie hamujących kiełkowanie zarodników zbadanych grzybów. Wyniki badań nad wpływem fungicydów „łączonych” na aktywność kiełkowania zarodników w hodowlach na agarze wodnym i słodowym przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1—Table 1

Najniższe stężenia 3 fungicydów w pożywce (agar wodny) hamujące całkowicie kiełkowanie zarodników grzybów po 72 godz.

The smallest doses of three fungicides in the medium (water agar) causing complete inhibition of fungal spore germination after 72 hours

Grzyb Fungus	Stężenie fungicydów Concentration of fungicides (mcg/ml)		
	OFR	PCMCNa	PCFNa
<i>Penicillium corylophilum</i>	0,5	15,0	20,0
<i>Trichothecium roseum</i>	1,0	20,0	10,0
<i>Sepedonium</i> <i>chrysospermum</i>	1,0	20,0	15,0
<i>Botrytis terrestris</i>	0,1	200,0	10,0
<i>Alternaria humicola</i>	0,5	200,0	15,0
<i>Mucor christianiensis</i>	0,5	200,0	10,0

Zarodniki grzybów przeniesione na agar wodny wykazywały bardzo wysoką wrażliwość na działanie fungicydów. Najsilniej działającym fungicydem był OFR, którego hamujące i zabójcze działanie na zarodniki opisano już w poprzedniej pracy Strzelczyk (1968). PCMCNa działał najsłabiej hamująco na kiełkowanie zarodników.

Zaobserwowano, że wraz z przedłużaniem hodowli zwiększała się liczba wykiełkowanych zarodników. Następowo to pomimo ogromnych znie-

Tabela 2—Table 2  
 Wpływ mieszaniny środków grzybobójczych w podłożu (agar wodny i agar słodowy) na kiełkowanie zarodków  
 Influence of fungicide mixture in the medium (water agar and malt agar) on spore germination

Grzyb Fungus	Dawki fungicydów Doses of fungicides (mcg/ml)	Procent zarodków nie kiełkujących (w porównaniu z serią kontrolną) Percentage of non-germinating spores (as compared with control)									
		na agarze wodnym on water agar					na agarze słodowym on malt agar				
		po dniach — after days									
		1	2	4	1	2	3	1	2	3	5
<i>Mucor christianiensis</i>	PCMCNa+OFR	100	100	45	27	0	0	32x	S	SA	—
	50+0,05	100	100	100	100	100	S	70	S	SA	—
	50+0,10	100	100	100	100	100	S	100	97	45S	SA
	100+0,05	100	100	100	100	100	S	100	96	S	SA
<i>Penicillium corylophilum</i>	PCMCNa+OFR	100	100	100	43	0	0	60	17	0	—
	50+0,05	100	100	100	100	21	13	100	22	S	—
	50+0,10	100	100	100	100	100	62	56v	8	S	—
	100+0,05	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Trichothecium roseum</i>	PCMCNa+OFR	100	100	100	47	3	0	100	100	100	100
	50+0,05	100	100	—	100	100	S	100	100	100	100
	50+0,10	100	100	—	100	100	S	100	100	100	100
	100+0,05	100	100	—	100	100xv	100xv	100	100	100	100
	PCMCNa+OFR	100	100	100	100	100	100xv	100	100	100	100
	50+0,05	100	100	—	100	100	100xv	100	100	100	100
	50+0,10	100	100	—	100	100	100xv	100	100	100	100
	100+0,10	100	100	—	100	100xv	100xv	100	100	100	100

Objaśnienia (Explanation):

S — tworzenie zarodków sporadycznie (sporadic spore formation);

A — adaptacja — wzrost cętkowany (adaptation);

V — zarodniki napezniałe, rozdeptane (spores swollen);

X — kiełki bardzo skrócone (germ tubes very shortened).

kształceń morfologicznych, jakim ulegały zarodniki i strzępki rostkowe w pierwszych dniach hodowli w obecności fungicydów.

Subletalne dawki fungicydów powodowały tak wyraźne napęcznienie zarodników, że często wyglądały one jak protoplasty. Tworzące się rostki były bąblowate i napęczniałe. Często tworzyły pęczki drobnych odgałęzień. Te objawy występowały szczególnie wyraźnie pod wpływem OFR, a także niekiedy w obecności PCMCNa. Ten ostatni fungicyd wywoływał mniej drastyczne objawy skracania i pęcznienia zarodników.

Najsilniejsze objawy deformacji stwierdzono u zarodników *Penicillium corylophilum*, *Trichothecium roseum* i *Mucor christianiensis*.

Badania nad aktywnością kiełkowania zarodników grzybów na agarze wodnym i słodowym z dodatkiem fungicydów wykazały wyraźne różnice w reagowaniu na środki grzybobójcze. Stężenia fungicydów wynoszące 10 mcg/ml hamowały całkowicie kiełkowanie zarodników na agarze wodnym. Wrażliwość zarodników na fungicydy wyraźnie zmalała na agarze słodowym z dodatkiem mieszaniny fungicydów PCMCNa + OFR oraz PCFNa + OFR, gdzie zahamowanie kiełkowania zarodników wszystkich badanych szczepów było stosunkowo niewielkie, odwrotnie niż na agarze wodnym, na którym zahamowanie kiełkowania zarodników przy wszystkich badanych stężeniach mieszanin fungicydów było prawie całkowite.

Na agarze słodowym najefektywniej hamująco działała mieszanina PCMCNa + OFR (100 mcg + 0,10 mcg/ml) oraz PCFNa + OFR w tym samym stężeniu. Szczep *Trichothecium roseum* był najbardziej wrażliwy, natomiast *Mucor christianiensis* nawet przy najwyższych użytych stężeniach wykazywał pewne cechy adaptacji przejawiające się kiełkowaniem nielicznych tylko zarodników. Zarodniki te w obrębie naniesionej na agar kropli tworzyły bardzo drobne, gwiazdkowate kolonie, bardzo słabo owocujące.

#### Wpływ fungicydów na wzrost grzybni na agarze słodowym

W poprzedniej pracy (S t r z e l c z y k 1968) zwrócono uwagę na pobudzenie wzrostu grzybów przez bardzo małe stężenia fungicydów obecnych w podłożu.

W obecnych badaniach pobudzenie rozwoju kolonii obserwowano u grzybów z rodzaju *Mucor*, *Alternaria* i *Botrytis* w obecności 0,05-2,0 mcg/ml PCMCNa oraz u *Altenaria* i *Sepedonium* pod wpływem OFR o stężeniu 0,1-1,0 mcg/ml.

Najsilniej hamująco działał OFR, a najslabiej PCMCNa (tab. 3). Zastosowanie mieszaniny fungicydów, prawdopodobnie wskutek swego wielostronnego działania, wpływały hamująco na badane grzyby już w niższych stężeniach niż stosowane pojedynczo.

W wielu przypadkach przy subletalnych stężeniach fungicydów obser-

Tabela 3—Table 3

Najniższe dawki środków grzybobójczych hamujące całkowicie wzrost grzybni na agarze słodowym

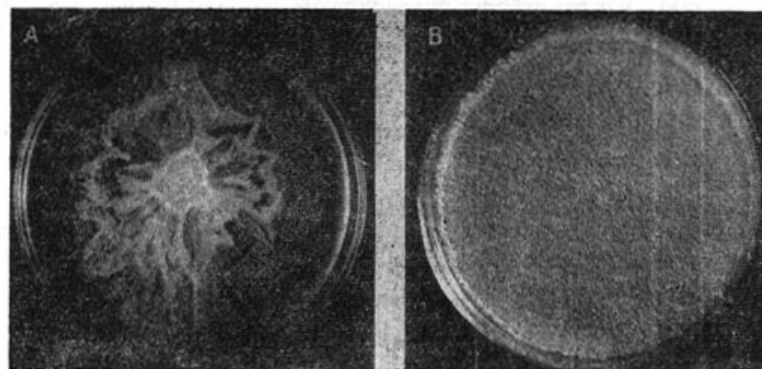
The smallest doses of fungicides inhibiting completely the growth of mycelium on malt agar

Grzyb — Fungus	Dodane do agaru słodowego dawki Doses added to malt agar (mcg/ml)			
	OFR	PCFNa	PCMCNa	PCMCNa+ +OFR
<i>Penicillium corylophilum</i>	2	20 A	120 A	100+0,10
<i>Trichothecium roseum</i>	3 A	20	100	100+0,10
<i>Sepedonium chrysospermum</i>	2 A	10 A	100 A	—
<i>Botrytis terrestris</i>	1	15 A	100	—
<i>Alternaria humicola</i>	2	20 A	130	—
<i>Mucor christianiensis</i>	5	20 A	200	100+0,10

Objaśnienia: A — stężenie subletalne, przy którym rozwijały się kolonie odporne o wzroście cętkowanym.

Explanation: A — sublethal concentration at which resistant colonies with a striped type of growth developed.

wowano wzrost bujny ale nierównomierny. Rosnące powoli kolonie, wytwarzały w pewnych okresach szybko rosnące wachlarzowate wypustki bujnej grzybni (fot. 1).



Fot. 1. 2-tygodniowa kolonia *Penicillium corylophilum*

Phot. 1. 2-week colony of *Penicillium corylophilum*

A — w obecności OFR (1,0 mcg/ml), z widocznymi wachlarzowatymi wypustkami szybko rosnącej grzybni; B — na agarze słodowym bez fungicydów

A — in the presence of OFR (1.0 mcg/ml), with visible fan-like outgrowths of fast growing mycelium; B — on malt agar without fungicides



Wpływ temperatury oraz środków grzybobójczych  
na zmiany aktywności celulolitycznej grzybów

Temperatura wpływała w znacznym stopniu na aktywność celulolityczną badanych grzybów. Na ogół kultury inkubowane w niższych temperaturach (16, 23°C) wykazywały znacznie wyższą aktywność enzymów

Tabela 4—Table 4

Wpływ temperatury na aktywność celulaz C<sub>1</sub> u badanych grzybów  
Influence of temperature on C<sub>1</sub> cellulase activity in tested fungi

Grzyb — Fungus	Ilość celulozy (%) zużytej przez grzyb Amount of cellulose used (%) by the fungus		
	w temperaturze — at temperature		
	16-18°C	23°C	30°C
<i>Chaetomium globosum</i>	87,6	53,0	22,1
<i>Penicillium corylophilum</i>	65,0	42,6	14,9
<i>Trichothecium roseum</i>	70,6	96,0	19,1
<i>Sepedonium chrysospermum</i>	97,2	70,9	46,8
<i>Alternaria humicola</i>	99,1	53,0	19,1
<i>Mucor christianiensis</i>	70,8	53,0	24,8
<i>Mucor</i> sp. (c)	51,3	77,0	46,8
<i>Mucor</i> sp. (e)	62,2	53,0	—
% zużycia celulozy (średnio) % (average)	75,5	62,3	27,7

C<sub>1</sub>, niż kultury inkubowane w temperaturze 30°C, przy czym z wyjątkiem *Trichothecium roseum* i grzybni *Mucor* sp., pozostałe rozwijały się dobrze i wykazywały najwyższą aktywność celulolityczną w najniższej temperaturze 16-18°C.

Dane te świadczą o możliwości destrukcyjnego oddziaływania badanych grzybów na zabytkowy papier także w stosunkowo niskiej temperaturze pokojowej.

W tabeli 5 przedstawiono wyniki badań nad wpływem środków grzybobójczych na aktywność celulaz C<sub>x</sub>. Sublimat wpływał najsilniej hamująco na aktywność celulaz C<sub>x</sub>, co przejawiało się już przy dawce tego związku chemicznego wynoszącej 4,0 mcg/ml.

Badana reakcja poszczególnych grzybów na obecność tego fungicydu w pożywce była jednak różna. Grzyby z rodzaju *Chaetomium*, *Alternaria* i *Mucor* reagowały stosunkowo najsilniejszym, a niekiedy prawie całkowitym zahamowaniem aktywności tych celulaz, natomiast u pozostałych badanych gatunków grzybów aktywność tych enzymów była tylko w róż-

Tabela 5—Table 5

Zmiany aktywności celulaz  $C_x$  badanych grzybów pod wpływem różnych dawek fungicydów na agarze słodowym

Changes in the cellulases  $C_x$  activity in the examined fungi due to the effects of various doses of fungicides on malt agar

Grzyb Fungus	Aktywność celulaz $C_x$ (w %) w stosunku do kontroli przy różnych dawkach (mcg/ml) fungicydów Activity of $C_x$ cellulases (in %) in respect to the activity of control at various fungicide concentration (mcg/ml)									
	OFR			HgCl <sub>2</sub>		PCMC		PCMCNa		
	0,5	1,0	4,0	1,0	4,0	1,0	4,0	1,0	4,0	
<i>Chaetomium</i>	27,3	36,4	0	0	0	80,0	61,0	65,2	65,2	
<i>Penicillium</i>	89,9	89,9	82,0	101,0	65,2	96,6	96,6	95,0	95,0	
<i>Trichothecium</i>	121,0	75,3	75,3	70,7	70,7	94,7	94,7	97,7	97,7	
<i>Sepedonium</i>	90,6	83,0	76,7	93,0	70,0	83,0	72,0	93,0	80,0	
<i>Botrytis</i>	—	—	58,0	—	36,0	—	66,0	—	66,2	
<i>Alternaria</i>	98,0	92,0	104,6	93,0	0	143,6	109,2	162,7	135,0	
<i>Mucor</i>	51,0	43,3	40,5	81,0	15,0	86,4	81,0	86,4	59,5	

nym stopniu i na ogół nieznacznie ograniczona, a zbadane grzyby reagowały zupełnie podobnie na obecność OFR w podłożu. Stopień zahamowania aktywności enzymów był nieco mniejszy niż w obecności HgCl<sub>2</sub>, ale różnice we wrażliwości poszczególnych gatunków grzybów na zastosowane dawki były stosunkowo niewielkie.

Pochodne fenolowe jak p-chloro-m-krezol (PCMC) i p-chloro-m-krezolan sodowy (PCMCNa) oddziaływały tylko nieznacznie hamująco na aktywność celulaz  $C_x$ . W niektórych wypadkach aktywność enzymatyczna szczepów hodowanych w obecności różnych dawek tych fungicydów była podobna (np. u *Penicillium*, *Trichothecium*, *Alternaria* i *Chaetomium*).

Poza tym w obecności najniższych dawek fungicydów stwierdzono niekiedy wzrost aktywności celulaz w porównaniu z serią kontrolną. Szczególnie wyraźnie reakcja ta nastąpiła u grzyba z rodzaju *Alternaria* w obecności PCMC i PCMCNa (tab. 5).

#### DYSKUSJA

Zaobserwowano znane zjawisko obniżania się toksyczności środków grzybobójczych w obecności substancji organicznej w podłożu (tab. 2). Przyczyną tego zjawiska mógł być fakt łatwego łączenia się fungicydów

zawierających jony metali z grupami tiolowymi obecnymi w środowisku. Z badań Gascoigne'a i Gascoigne'a (1960), Ashworth'a i Amina (1964), Ashidy (1965) oraz Szajera i wsp. (1971) wynika, że białka zawierające te grupy łączą wtedy część fungicydów wprowadzonych do podłoża, przez co maleje ich toksyczność wobec komórek grzyba.

Nie bez znaczenia może tu być także fizyczna adsorpcja fungicydów na połączeniach organicznych. Chacko i Lockwood (1966) podają np., że PCNB (pięciochloronitrobenzen) może znikać z płynnej pożywki, w której hoduje się grzyby i że może być adsorbowany przez grzybnię. Autorzy ci podają też, że nawet zabita grzybnia może wykazywać podobną właściwość.

Fakt ewentualnego zmniejszania się toksyczności fungicydów w obecności substancji organicznej w podłożu powinien być więc brany pod uwagę przy wyznaczaniu dawek fungicydów stosowanych do odkażania zabytkowego papieru. Papier taki zawiera, jak wiadomo, znaczne ilości kleju (zwykle żelatynowego), który m. in. może być też adsorbentem grup czynnych fungicydów.

Podobnie, jak w badaniach nad wpływem par środków grzybobójczych na kiełkowanie zarodników grzybów (Strzelczyk 1968, 1969), w niniejszej pracy stwierdzono stymulowanie kiełkowania zarodników przez minimalne dawki fungicydów. Podobne zjawisko zaobserwowano w badaniach nad wpływem fungicydów na przyrost kolonii. Być może, iż fungicydy działając na przepuszczalność błony cytoplazmatycznej przyczyniają się do pobudzenia pęcznienia zarodników, co może przyspieszać ich kiełkowanie i start rozwoju kolonii. Prawdopodobnie ten stan występuje także w trakcie rozwoju grzybni, przyspieszając pobieranie przez nią zwiększonych ilości substancji pokarmowych.

W obecności minimalnych dawek niektórych fungicydów (tab. 4) zaobserwowano także zwiększoną aktywność celulaz  $C_x$ . O stymulującym wpływie niskich dawek fungicydów na różne centra funkcjonalne komórki donosi wielu autorów, m. in. Jarmyn (Gascoigne i Gascoigne 1960). Nikt jednakże nie tłumaczy tego zjawiska. Gascoigne i Gascoigne (1960) podają, że „...wpływ każdego związku na celulazę może być zmieniony z hamującego na stymulujący lub odwrotnie przez tylko nieznaczną zmianę zewnętrznych warunków”.

Zaobserwowano również, że niektóre szczepy wykazane w tab. 3 w obecności subletalnych dawek fungicydów wytwarzały wachlarzowate wypustki grzybni wegetatywnej zdolne do szybszego wzrostu, niż pozostała część kolonii. Te oznaki, świadczące jak gdyby o pewnym uodpornieniu się tych szczepów (fot. 1) mogą świadczyć o uzdolnieniach do przystosowywania się do obecności fungicydu w środowisku zwłaszcza PCFN.

## WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników można przedstawić następujące wnioski:

1. Kiełkowanie zarodników u zbadanych grzybów najsilniej hamowały: octan fenylortęciowy (OFR), następnie pięciochlorofenolan sodu (PCFNa), a słabiej p-chloro-m-krezolan sodu. Na agarze słodowym zarodniki wykazywały większą odporność na działanie fungicydów niż na agarze wodnym.
2. Obserwowano bardzo silne zniekształcenia strzępek rostkowych i komórek grzybni pod wpływem subletalnych dawek fungicydów.
3. Stosunkowo najintensywniejsze wytwarzanie celulaz  $C_1$  przez zbadane grzyby obserwowano w temperaturze 16-18°C. W dwóch pozostałych zastosowanych temperaturach (23 i 30°C) aktywność celulaz  $C_1$  była słabsza. Fakt ten może wskazywać na przystosowanie zbadanych grzybów do rozwoju i działalności w temperaturze, jaka utrzymuje się zwykle w magazynach archiwalnych i bibliotekach.
4. Karboksymetylocelulazy (enzymy  $C_x$ ) zbadanych grzybów reagowały silnym obniżeniem aktywności na obecność sublimatu, natomiast były tylko nieznacznie hamowane przez organiczny fungicyd rtęciowy (OFR) i fungicydy fenolowe.
5. W trakcie badań zaobserwowano obok zjawiska hamowania rozwoju grzybni i ich aktywności enzymatycznej przez fungicydy, także stymulowanie tych procesów przez stosunkowo najniższe dawki tych preparatów. Dotyczyło to szczególnie stymulowania kiełkowania zarodników, przyrostu średnicy kolonii oraz aktywności celulaz  $C_x$ .

## SUMMARY

The present work is the continuation of studies reported earlier (Strzelczyk, 1968, 1969).

The aim of this work was to study the mechanism of fungicidal action on the fungal cell and on the activity of fungi. In general the effect of fungicides incorporated into the culture medium on: 1. spore germination, 2. growth of colonies and 3. biosynthesis of cellulolytic enzymes in fungi were studied. The optimum temperature for cellulolytic enzymes synthesis was also determined.

The following fungi were used in our studies: *Trichothecium roseum*, *Penicillium corylophilum*, *Sepedonium chrysospermum*, *Botrytis terrestris*, *Alternaria humicola* and *Mucor christianensis*.

The effect of the following fungicides added to the medium on spore germination, growth of colonies and on synthesis of  $C_x$  enzymes was studied: sodium pentachlorophenolate (PCFNa), sodium p-chloro-m-cresolate (PCMCNa) and phenylmercuric acetate (OFR).

Spore germination activity was studied on agar discs (water or malt agar) containing one or more fungicides. Such discs were inoculated and placed on microscopic

slides in humid chambers. The percent of germinated spores was evaluated after 1-6 days.

Studies on the effect of fungicides on growth of colonies were carried out with fungi grown on malt agar containing one or more fungicides. The increase in colony diameter in comparison with control was recorded after 4 and 8 days of incubation.

The  $C_1$  cellulases activity was studied according to Halliwell (1965). For the determination of  $C_x$  cellulases in the fungal culture fluids the viscosimetric method of Horton and Keen (1966) was applied.

It was found that fungal spores inoculated on malt agar were more resistant to the fungicidal action than those inoculated on water agar (tab. 2). The most toxic among the fungicides was phenylmercuric acetate. Less toxic were sodium pentachlorophenolate and sodium p-chloro-m-cresolate (tab. 1). The germ tubes produced by spores in the presence of sublethal doses of fungicides were degenerated, shortened and swollen.

It was found that the  $C_1$  enzymes were most intensively synthesized by the fungi at 16-18°C (tab. 4).

The  $C_x$  enzymes were sensitive to mercury containing fungicides but were only imperceptibly inhibited by phenolic fungicides (tab. 5). Phenylmercuric acetate exhibited a similar inhibitory effect on growth of the fungal colonies. In the presence of phenolic fungicides adaptation of fungi to these substances was observed.

Fungal spores inoculated on agar media did not produce normal colonies, their germination was delayed and produced a flat spot adhering to the agar surface. Sometimes however stimulation of spore germination, growth of colonies and  $C_x$  cellulases activity was noted.

#### LITERATURA

- Aschan K., Norkrans B., 1953, A study on the celulolytic variation for wild types and mutants of *Collybia velutipes*. I. *Physiol. Plant.* 6: 564-583.
- Ashida J., 1965, Adaptation of fungi to metal toxicants. *Ann. Rev. Phytopath.* 3: 153-174.
- Ashworth L. J., Amin J. V., 1964, A mechanism for mercury tolerance in fungi. *Phytopathology* 54: 1459-1463.
- Borecki Z., Czerwińska E., Eckstein Z., Kowalik R., 1965, Chemiczne środki grzybobójcze, PWRiL, Warszawa.
- Chacko C. I., Lockwood J. L., 1966, Degradation and uptake of 8-chlorinated hydrocarbon pesticides by microorganisms. *Phytopathology* 56 (8): 873-874.
- Gascoigne J. A., Gascoigne M. M., 1960, *Biological Degradation of Cellulose*, London, Butterworths.
- Gilman J. C., 1957, *Manual of Soil Fungi*. The Iowa State College Press, USA.
- Grover R. K., 1964, Effect of fungicides on pectolytic enzyme activity of *Sclerotinia sclerotinorum* and *Botrytis allii*. *Phytopathology*, 54: 130-133.
- Halliwell G., [In:] Bergmeyer H. U., 1965, *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie GmbH: 64-78.
- Horton J. C., Keen T., 1965, Regulation of induced cellulase synthesis in *Pyrenochaete terrestris* by utilizable carbon compounds. *Can. J. Microbiol.*, 12: 209-220.
- Lukens R. J., 1971, *Chemistry of Fungicidal Action*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Martin J. P., 1950, Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method of estimating soil fungi, *Soil. Sci.*, 69: 215-233.

- Pettersson G., 1968, Structure and function of a cellulase from *Penicillium notatum* as studied by chemical modification and solvent accessibility. Arch. Biochem. and Biophys. 126: 776-784.
- Rich S., Horsfall J. G., 1952, The relation between fungitoxicity, permeation and lipid solubility, Phytopathol, 42: 457-460.
- Rich S., 1960, Plant Pathology, Academic Press New York.
- Siu R. G. H., 1951, Microbial Decomposition of Cellulose, Reinhold Publ. Corp., New York.
- Strzelczyk A. B., 1968, Influence of antifungal vapors on spore germination of fungi isolated from deteriorated old books. Can. J. Microbiol. 14 (7): 901-906.
- Strzelczyk A. B., 1969, Wpływ tymolu i octanu fenylortęciowego na kiełkowanie zarodników i zmiany w morfologii strzępek grzybów niszczących zabytkowe książki, Acta Myc. 5: 213-218.
- Szajer I., Szajer Cz., Kurenko S., 1971, Wpływ aminokwasów siarkowych oraz hydrochinonu i pirokatecholu na syntezę i aktywność enzymów celulozowych, Annales UMCS, E, 26: 45-55.
- Sussman A. S., von Boventer-Heidenhain B., Lowery R. J., 1957, Physiology of the cell surface of *Neurospora* ascospores. VI. The function of surface binding sites. Plant Physiol. 32: 585-590.
- Tröger R., 1958, Studien zur Fungizidwirkung der Schwermetallsalze, Arch. f. Mikrobiol. 29: 430-437.