

Isolierung von Hyphen aus dem Boden

Von Walter Gams, Imst, Tirol

Bodenbiologisches Institut der Forstlichen Bundes-Versuchsanstalt
Mariabrunn

Einleitung:

Die Ziele, die bei der Erforschung der Bodenpilzflora *) verfolgt werden, lassen sich in folgende vier Punkte zusammenfassen:

Erstens wollen wir wissen, was für Arten im Boden enthalten sind. Dazu müssen wir die Individuen trennen und isolieren, in Reinkultur züchten, bestimmen und fallweise weiter untersuchen. Dazu eignet sich W arc u p's „Soil plate method“ in beschränktem Masse, da etliche sterile Formen verloren gehen (W arc u p, 1957). In diesem Zusammenhang sei auch auf die Methode, die zum Studium räuberischer Pilze verwendet wird, verwiesen (Duddington). Sie erlaubt die Isolierung interessanter Arten, nicht nur räuberischer Natur. Grössere Bodenbrocken werden in Petrischalen auf einen schwachen Maismehlagar gelegt oder damit übergossen. Die sich entwickelnden Pilze wachsen schwach in dem armen Medium und beziehen ihre Nähr- und Wuchsstoffe noch weitgehend aus dem ursprünglichen Boden. Die verschiedenen Arten wachsen kräftig durcheinander, wobei sich also die Verteilung und Konkurrenz einigermassen natürlich beobachten lassen. Je nach der Artenzusammensetzung ist das Bild bei Beobachtung unter dem Binokular mehr oder weniger klar. Interessante Arten lassen sich durch Entnahme einzelner Sporangien oder Konidien mit feinen Nadeln isolieren. Andere Methoden mit massiver Beimpfung von Petrischalen (Wiltgen & Bonnier u. a.), wo die ganze Fläche mit einer Bodenschicht bedeckt wird, sind abzulehnen, da sie nur raschwüchsige Arten aufkommen lassen und kein genaues Studium erlauben.

Zweitens wollen wir die quantitative Verteilung ermitteln. Relative Aussagen erlauben schon in gewissem Masse W arc u p's Soil plates. Um absolute Werte zu bekommen, müssen wir aber den Dispersionsgrad bestimmen. Dazu werden sehr oft Verdünnungspplatten verwendet, eine zu Recht heftig kritisierte Methode (W ar-

*) Wenn man von der „Pilzflora“ schlechthin spricht, sieht man immer von besonderen Gruppen, wie räuberischen Pilzen, niederen Phycomyeten u. a. ab. Manche Gruppen lassen sich mit Allgemeinmethoden nie erfassen. Spezialmethoden werden in der vorliegenden Arbeit mit einer Ausnahme nicht berücksichtigt.

cup, 1955 b, Saitô, 1955 u. a. m.). Viele Arten gehen dabei verloren. Erfasst werden vor allem sporulierende Formen, und diese in einem falschen Verhältnis.

Drittens brauchen wir für quantitative Angaben notwendig Informationen über den augenblicklichen Zustand des Pilzes. Es ist nicht gleichwertig, ob wir eine Kolonie aus einer Dauerspore oder aus aktivem Myzel erhalten. Ohne Aussagen darüber sind quantitative Feststellungen weitgehend wertlos (Garrett).

Viertens interessiert uns ein Einblick in die Dynamik. (Selbst Myzelien sind ja im Boden nicht immer aktiv.)

Zusammenfassend wollen wir also erfahren, wie sich die Pilze im Boden selbst, d. h. unter Beibehaltung aller natürlichen ökologischen Faktoren, verhalten. Uns interessieren dabei besonders die augenblicklich aktiv wachsenden Formen, da nur diese wesentlich am chemischen Geschehen beteiligt sind. Die beste Methode zu ihrem Studium wäre die, die allen vier Anforderungen in einem Arbeitsgang gerecht wird. Von diesen letzten Gesichtspunkten aus seien hier einige bisher verwendete Methoden besprochen.

Waksman (1916, kritisiert bei Saitô, 1955 a und Warcup, 1958), versuchte das Problem einfach zu lösen, indem er grössere Bodenbrocken auf Agarplatten setzte und isolierte, was innerhalb 24 Stunden auswuchs. Diese Zeit sollte für die Keimung von Sporen zu kurz sein, was sich leider als trügerische Hoffnung erwiesen hat.

Kubiena verwendet eine kostspielige spezielle Auflichtmikroskopie-Einrichtung, womit er den Zustand der Pilze im natürlichen Milieu beobachtet und auch Isolierungen mittels Mikropinzetten durchführt. So lassen sich vor allem Fruchtkörper auffinden. Warcup (1955 a und 1957) fischt aus dem Rückstand von Bodensuspensionen Hyphen heraus und bringt sie mit dem Agar in Petrischalen. Saitô (1955 a) isoliert Hyphen aus zerkrümeltem Boden mit Hilfe von „Mikrostanzen“, am Mikroskopobjektiv befestigten Metallröhrchen, die durch Senken die gewünschten Stücke aus dem Agar ausschneiden. Mit diesen Methoden ergibt sich eine wesentlich andere Artenverteilung, etliche bisher verborgene Formen treten zutage. Die Verfahren sind für den allgemeinen Gebrauch wohl sehr mühsam und unergiebig, da die Infektionsgefahr groß ist und nur ein geringer Teil der anwesenden Hyphen zum Auswachsen gebracht werden kann. Ausserdem sind damit keine Angaben über die wirkliche Aktivität möglich. („though the presence of viable hyphae need not be synonymous with active growth in soil“, Warcup, 1957).

Brown studierte die Anwesenheit von Hyphen in sandigen Böden. Sie entnimmt eine dünne Schicht des Bodens als Abdruck auf klebrig gemachten Objektträgern (Nitrozellulose in Amylazetat) und untersucht die so gewonnenen Präparate mikroskopisch.

Andere Autoren verzichten auf genaue qualitative Aussagen zugunsten einer Beurteilung der Wachstumsaktivität. Die Aufwuchsplatten-Methode nach Rossi und Cholodny verwendet Objektträger, die eine gewisse Zeit im Boden belassen werden; Waid & Woodman nehmen statt dessen Nylongewebe, wobei erstens die Oberflächenverhältnisse natürlicher sind, und zweitens ein Netz zum Auszählen der Hyphen gewonnen wird. Die Präparate werden gefärbt und quantitativ ausgewertet. Lehner, Nowak & Seibold kombinieren Aufwuchsplatten mit Vitalfärbung und Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop, womit genau entschieden werden kann, was lebt und was abgestorben ist. Bei all diesen Verfahren bleiben also die natürlichen Umweltfaktoren weitgehend erhalten.

Um Aufwuchs- und Isolierungsmethoden zu kombinieren, bringen andere Forscher Agar in den Boden. Chesters (1940) verwendete „Immersion tubes“, perforierte Eprouvetten. Statt dessen schlug Thornton (1952) „Screened immersion plates“ vor: Wasseragar wird auf Glasplatten in sehr flachen Plexiglasschachteln gegossen, darüber kommt ein perforierter Deckel, durch dessen Löcher Pilze eindringen sollen. Doch auch dieses Verfahren wird scharf kritisiert. Warcup (1958) wirft ihm vor, dass die Platten der störenden Wirkung von Bodentieren allzusehr ausgesetzt sind. Bei eigenen Versuchen mit alpinem Rohhumus zeigte sich, dass der Boden in Kontakt mit dem Agar kommen muss, damit überhaupt Pilze anwachsen. Sonst müsste man Monate warten, was wieder wegen unvermeidbarer Bodenkontakte und Austrocknen des dünnen Agarfilms nicht möglich ist. Kontrollversuche mit Verdünnungsplatten mit Wasser- und Nähragar zeigten aber, dass auf Wasseragar fast gleich viele Keime auswachsen wie beispielsweise auf Malzagar. Es keimen also viele Sporen, eine Tatsache, die schon länger bekannt ist (Saitô, 1955 b). Auf der „Immersion plate“ werden also nicht nur Hyphen erfasst. Wenn wir warten wollen, bis wirklich aktiv wachsende Hyphen einen nährbodenfreien Zwischenraum überbrücken, bekommen die raschwüchsigen *Mucorales* und *Trichoderma viride* etc. die Überhand. Das Eingraben von Nährboden (auch Wasseragar!) verändert immer die natürlichen ökologischen Bedingungen im Boden und verfälscht das Bild. Immerhin konnte Thornton damit schon mehr sterile Formen (bes. *Rhizoctonia solani*) isolieren. Bei eigenen Versuchen war kein wesentlicher Unterschied in der Artenverteilung gegenüber anderen Methoden zu finden, was an dem Artenbestand des alpinen Rohhumus liegen mag.

Angeregt durch eine mündliche Mitteilung in Liverpool von Dr. N. Witkamp (Arnhem), wurde auch versucht, die Geschwindigkeit der Überwachsung nährstofffreier Räume im Labor zu beobachten: Sterile Deckgläser wurden auf die Agaroberfläche gelegt und

darauf Bodenkrümel. Beim Vergleich zwischen Malzagar und Wasseragar wuchsen die Pilze auf Malzagar viel rascher aus (Chemotropismus!), ausserdem gelangten nur raschwüchsige Mortierellen zum Ziel. Dabei muss das Wachstum auch nicht dem natürlichen entsprechen, da das Milieu völlig verändert ist. Über das natürliche Verhalten gibt also auch dieses Verfahren keinen Aufschluß.

Für erschöpfende Angaben über die Methodik sei der Leser auf W a r c u p 1958 und eventuell V e r o n a & S i m o n a r t 1957 verwiesen.

Aussagen über das Wachstum haben bisher also nur die Aufwuchsmethoden von R o s s i & C h o l o d n y und W a i d & W o o d m a n erlaubt. Eine Verbindung dieser Verfahren mit einer qualitativen Untersuchung wurde bisher nur von H o p f (1950) durchgeführt, die von C h o l o d n y - Platten herunter Isolierungen mit Hilfe eines Mikromanipulators ausgeführt hat. Vom selben Prinzip ausgehend, wurde im Bestreben, ein einfacheres Verfahren zu finden, folgender Weg eingeschlagen:

Aufwuchs auf Nylonstreifen.

Statt Glasplatten oder Nylongewebe werden Nylonstreifen, so schmal, dass sich im allgemeinen nur eine Hyphe in der Breite ansiedeln kann, im Boden vergraben. Sie werden wie Aufwuchsplatten besiedelt, erlauben aber durch die geringe Breite eine leichtere Isolierung, indem man sie nachher abspritzt und auf Agarplatten legt. Man kann dann sofort die anwesenden Hyphen mikroskopisch feststellen und auf dem Glas markieren.

Die zu verwendende Nylonfolie muss möglichst dünn sein, damit sie im Boden nicht trüb wird; dadurch würde die nachherige Beobachtung beeinträchtigt. Die Folie wird in Streifen von einem Millimeter Breite geschnitten, so dass diese an den Enden noch zusammenhängen. Ein solches Streifenbündel wird auf einem Objektträger befestigt, indem die Enden umgebogen und mit Zellophanklebstreifen (Tixo, Tesa u. dgl.) angeklebt werden. Dadurch wird das Eingraben erleichtert, und die Streifen bleiben glatt. Sterilität wird durch Einlegen in Alkohol erreicht, wobei sich der Klebstoff nicht löst. Das Eingraben erfolgt wie bei C h o l o d n y durch einen Einschnitt mit einem sterilen Messer, worin dann die Platte eingeschoben wird. Eine Woche Exposition erscheint im allgemeinen für eine genügende Besiedelung geeignet. Nach W a i d & W o o d m a n (1957) nimmt bei längerer Exposition der Bewuchs meist nicht mehr zu, da ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Hyphen sich einstellt. (Bis zum völligen Gleichgewicht braucht es aber Monate). Man wird die kürzest mögliche Expositionszeit wählen, erstens aus praktischen Gründen, zweitens um die wechselnden Witterungsfaktoren mög-

lichst genau erfassen zu können in ihrem Einfluss auf das Pilzwachstum.

Nach der Entnahme wird die Platte an der Streifenseite mit sterilem Wasser gründlich abgespritzt, die Streifen mit einer abgeflammtten Rasierklinge heruntergeschnitten und in Petrischalen auf Agar gelegt, die exponierte Seite nach oben. Ein Teil der Streifen wird zur genaueren mikroskopischen Kontrolle zurückbehalten (Färbung!). Bei sehr dichtem Bewuchs können die Streifen auch in kleinere Stücke geschnitten werden. Als Nährmedium wurde Moser's b-Boden *) gewählt, der auch das Wachstum vieler Basidiomyceten erlaubt. Er ist klar und wird in dünner Schicht gegossen, um die darauffolgende Beobachtung zu ermöglichen. Auch die zu verwendenden Petrischalen müssen möglichst dünn und glatt sein. Zusatz eines wirksamen Antibiotikums ist notwendig. Wir verwendeten 3 gamma Aureomyzin pro Milliliter (Johnson). Gleich anschliessend wird unter dem Mikroskop oder Binokular bei ca. 100-facher Vergrösserung bei umgekehrter Petrischale beobachtet und anwesende Hyphen mit einem Tintenfleck gekennzeichnet. Die Beobachtung wird jeden Tag fortgesetzt. Bis zum dritten, längstens vierten Tag ist die Isolierung fällig. Sie wird zweckmässigerweise möglichst bald nach dem Auswachsen der Hyphen unter dem Binokular bei umgekehrter Platte mit einer feinen Nadel durchgeführt. Es erscheinen natürlich mehr Kolonien als Hyphenpunkte markiert waren. Meist sind jedoch über 50% aus Hyphen hervorgegangen; die übrigen werden vernachlässigt. Es wachsen auch nicht alle markierten Hyphen aus, da einerseits schon abgestorbene Hyphen am Nylon haften bleiben, andererseits vermögen wir viele Formen bisher überhaupt noch nicht auf Agar zu kultivieren.

Ergebnisse:

Die Isolierungen lassen sich leicht rein bekommen, wenn man noch einmal auf Petrischalen mit Aureomyzin überimpft. Es wurden damit bisher gewöhnliche Bodenpilze, wie *Penicillium*, *Fusarium* und *Mortierella* mehrfach isoliert, daneben aber auch in vermehrtem Masse sterile Myzelien. Gerade für die Isolierung von Basidiomyceten ergeben sich auf diese Weise viel grössere Möglichkeiten. Auf die Verwendung anderer Methoden wird man nie ganz ver-

*) Maltose	20 gr	ZnSO ₄	0,5 ml Lösg. 1 : 500	Hefeextrakt	0,2 gr
Glukose	10 gr	FeCl ₃	1,0 ml 1% ige Lösg.	Aneurin	50 gamma
Pepton	2 gr	CaCl ₂	5,0 ml 0,1 mol Lösg.	Biotin	1 gamma
KH ₂ PO ₄	0,5 gr	MnSO ₄	0,5 ml 1% ige Lösg.	Inosit	50 mg
MgSO ₄	0,5 gr			Agar	15—20 gr
				aq. dest.	1000 ml

Für die meisten gewöhnlichen Bodenpilze würde auch ein einfacher 3% iger Malzextraktagar genügen.

zichten können, da mit den Nylonstreifen Formen mit sehr kurzen Aktivitätsperioden leicht verloren gehen. Eine quantitative Beurteilung des Pilzwachstums (Myzeleinheiten pro Dezimeter) ist ebenso wie bei Choldny-Platten nicht sehr verlässlich, da der Bodenkontakt ein nicht restlos kontrollierbarer Faktor ist. Ausserdem bevorzugen die Bodenpilze zu ihrem Wachstum und zu ihrer Fruktifikation Bodenhohlräume (Kubiena). Beim Abspritzen können auch locker haftende Hyphen verloren gehen. Gegenüber Warcup's Hyphenisolierungsmethode hat das Verfahren die Vorteile, dass die Arbeit wesentlich vereinfacht ist und dass Angaben über das Wachstum möglich sind, wenngleich etwas beschränkt, da manche Störungen durch das Eingraben nie vermieden werden können.

Modifikation für zellulolytische Pilze.

Tribe verwendet zum Studium zellulolytischer Pilze Zellophanfolie, wovon kleine Rechtecke auf einem Deckglas im Boden eingegraben werden. Mit einiger Vorsicht lässt sich die Folie auch in der hier beschriebenen Form verwenden, wodurch die Isolierung erleichtert wird. Die Platten müssen zum Bewuchs aber meist etwas länger im Boden bleiben, damit das Zellophan selektiv wirken kann. Ausserdem muss die Auswertung nachher unbedingt mit einer sorgfältigen mikroskopischen Prüfung verbunden werden, was am besten an breiteren Streifen, die auf demselben Objektträger eingegraben und hernach in Anilinblau gefärbt werden, geschieht. Zur Herstellung der Platten muss das Zellophan nass verwendet werden, damit es sich nicht nachträglich wellt. Es wurde folgendermassen vorgegangen: Ca. 1 cm breite Streifen werden nass ohne grosse Spannung (Reissgefahr!) auf den Objektträger gelegt, abgetrocknet, die Enden angeklebt, und dann erst mit einer Rasierklinge Streifen von 1 mm geschnitten. Anschliessend werden die Platten in Alkohol gelegt. Nach der Entnahme aus dem Boden werden die Streifen abgespritzt und mit einem sterilen Pinsel gründlich abgewischt.

Dieses Verfahren wird nie Aufschluss über die natürliche Verteilung und den Zustand zellulolytischer Pilze im Boden geben (genau so wenig wie alle anderen Methoden, wo Zellophan oder Filterpapier eingegraben wird), sondern soll lediglich die Isolierung erleichtern. Oft wurden Myzelien beobachtet, die auf gekeimte Sporen zurückgingen. Im Gegensatz zu den Nylonplatten wird das Zellophan zuerst langsam bewachsen, dann jedoch immer rascher fortschreitend bis zu seiner völligen Auflösung. Es ist daher erst durch Vorversuche zu ermitteln, nach welcher Zeit die Isolierung am zweckmässigsten ist. Am besten würde das Verfahren nachher noch mit einem selektiven Nährboden (mit Carboxymethyl-Zellulose, Burges) kombiniert.

Für seine stete Hilfsbereitschaft und Anregung bei meinen Versuchen danke ich herzlich meinem Lehrer Dz. Dr. Meinhard Moser.

Summary.

Several methods used in the study of soil fungi are discussed how far they are able to reveal fungal activity. A new method for the isolation of actively growing fungi from the soil is described: Narrow nylon stripes are fixed upon microscopic slides and buried in the soil for a week. After this period the plates are removed, rinsed, and the stripes are plated on nutrient agar with aureomycin. Hyphae visible in the microscope are marked by a point of ink on the glass surface. One or a few days later the developing colonies can be isolated. By the use of cellophane instead of nylon isolation of cellulolytic fungi is possible, according to Tribe.

Literatur.

- Brown, J. C. 1958: Fungal Mycelium in dune soils estimated by a modified impression slide technique. *Trans. Brit. Myc. Soc.* **41**, 81—88.
- Burges, A. 1939: Soil fungi and root infection. *Broteria* **8**, 64—81.
- Chesters, C. G. C. 1940: A method of isolating fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* **24**, 352.
- Chesters, C. G. C. & Thornton, R. H. 1956: A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* **39**, 301—313.
- Cholodny, N. 1930: Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. *Arch. Mikrobiologie*, **1**, 620—52.
- Duddington, C. L. 1955: Notes on technique of handling predacious fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* **38**, 97—103.
- Gams, W. 1959: Die Bodenpilze im zentralalpinen Rohhumus. Dissertation. Innsbruck (vom Autor vervielfältigt).
- Garrett, S. D. 1955: Presidential address: Microbial ecology of the soil. *Trans. Brit. Myc. Soc.* **38**, 1—9.
- Hopf, M. 1950: Untersuchungen über die natürliche Mikroflora des Bodens. *Arch. Mikrob.* **14**, 661—677.
- Johnson, L. F. 1957: Effect of antibiotics on the numbers of bacteria and fungi isolated from soil by the dilution plate method. *Phytopathology*, **47**, 630—631.
- Kubiena, W. 1932: Über Fruchtkörperbildung und engere Standortwahl von Pilzen in Bodenhohlräumen. *Arch. Mikrobiol.* **3/4**, 607—42.
- Lehner, A., W. Nowak und L. Seibold, 1958: Eine Weiterentwicklung des Boden-Fluorochromierungs-Verfahrens mit Acridin-Orange zur Kombinationsmethode. *Landwirtschaftl. Forschung* **11**, 121—127.
- Moser, M. 1958: Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. *Forstw. Cbl.* **77**, 32—40.
- Saitô, Toshi 1955 a: The significance of plate counts of soil fungi and the detection of their mycelia. *Ecological Review*, **14**, 69—74.
- 1955 b: Germination of fungus spores, *ibid.* 75—80.
- Thornton, R. H. 1952: The screened immersion plate. A method of isolating soil microorganisms. *Research*, **5**, 190—191.
- Tribe, H. T. 1957: Ecology of microorganisms in soils as observed during their development upon buried cellulose film. *Microbial Ecology*. 7th Symp. Soc. gen. Microb., Cambr. Univ. Press, 287—298.
- 1958: Decomposition of buried Cellulose Film, with special reference

to ecology of certain Soil Fungi. Symp. on the Ecology of Soil Fungi. Liverpool Univ. Press 1958 (im Druck).

Verona, O. et P. Simonart, 1957: Méthodes d'étude des microchampignons. Sympos. sur les Méthodes d'Etudes Microbiologiques du Sol. Pédologie, Gand **7**, 35—45.

Waid, J. S. and Woodman, M. J. 1957: A method of estimating hyphal activity in soil. Sympos. sur les Méthodes d'Etudes Microbiologiques du Sol. Pédologie, Gand, **7**, 155—185.

Waksman, S. A. 1916: Do fungi actually live in the soil and produce mycelium? Science, N. S., **44**, 320—322.

Warcup, J. H. 1950: The soil-plate method. Nature, London, **170**, 166/167.
— 1955 a: Isolation of fungi from hyphae present in soil. Nature, London, **175**, 953.

— 1955 b: On the origin of fungi developing on soil dilution plates. Trans. Brit. Myc. Soc. **38**, 298—301.

— 1957: Studies on the occurrence and activity of fungi in a wheat field soil. Trans. Brit. Myc. Soc. **40**, 237—259.

— 1958: Methods for isolation and estimation of activity of fungi in soil. Symp. on the Ecology of Soil Fungi. Liverpool, Univ. Press (im Druck).

Wiltgen, N. et Ch. Bonnier, 1952: A propos de l'examen mycologique du sol. Description d'une méthode. Bull. de l'Inst. Agronomique et des Stations de recherche de Gembloux, **20**, 391—396.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sydowia](#)

Jahr/Year: 1959

Band/Volume: [13](#)

Autor(en)/Author(s): Gams Walter

Artikel/Article: [Über die Gattung Myxothecium Kunze. 87-94](#)