

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Borut Igor FJORELI

**UPORABA KORUZNE OMAKALNE VODICE ZA MIKOREMEDIACIJO
ODSLUŽENEGA, Z BAKROVIMI PRIPRAVKI ZAŠČITENEGA LESA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**APPLICATION OF CORN STEEP LIQUOR FOR MYCOREMEDIATION OF
RECOVERED, COOPER TREATED WOOD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija lesarstva. Opravljeno je bilo na Katedri za patologijo in zaščito lesa na Oddelku za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja diplomskega dela imenoval doc. dr. Miha Humarja, ter za recenzenta prof. dr. Franca Pohlevna.

Mentor: doc. dr. Miha Humar

Recenzent: prof. dr. Franc Pohleven

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Tudi vse uporabljene fotografije so posnete tekom raziskav.

Borut Igor Fjoreli

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 630*844.2
KG	les/zaščita/glive/bakrovi biocidi/omakalna vodica/csl/razkroj/prirast
AV	FJORELI, Borut
SA	HUMAR, Miha (mentor)/POHLEVEN, Franc (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. III/34
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI	2008
IN	UPORABA KORUZNE OMAKALNE VODICE ZA MIKOREMEDIACIJO ODSLUŽENEGA, Z BAKROVIMI PRIPRAVKI ZAŠČITENEGA, LESA
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	VIII, 54 str., 6 pregl., 35 sl., 68 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	O toleranci lesnih gliv na bakrove pripravke poročajo že 50 let. Te glive predstavljajo grožnjo z bakrovimi pripravki zaščitenemu lesu v uporabi. Po drugi strani pa bi te glive lahko uporabili za okolju prijazno mikoremediacijo odsluženega, z bakrovimi pripravki zaščitenega, lesa. Ti odpadki predstavljajo vsako leto večje probleme. Za učinkovit postopek bioremediacije potrebujemo cenen vir hranilnih snovi. Ena izmed rešitev, ki se že uporablja v številnih biotehnoloških procesih (biobeljenje, biopulpanje), je koruzna omakalna vodica (CSL). Želeli smo ugotoviti kako koruzna omakalna vodica vpliva na rast izbranih izolatov in razkroj z bakrovimi pripravki zaščitenega lesa. Izvedli smo presejalni test, kjer smo CSL dodali v hranilno gojišče. Sterilizirane vzorce, impregnirane s CCB pripravkom, smo izpostavili na bakrove učinkovine dovzetnim (<i>Antrodia vaillantii</i> , <i>Leucogyrophana pinastri</i>), in nedovzetnim glivam (<i>Postia placenta</i> , <i>Gloephyllum trabeum</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Hypoxylon fragiforme</i>). Rezultati obeh eksperimentov so pokazali, da je prisotnost CSL zmanjšala odpornost tolerantnih gliv. Kontrolni in impregnirani vzorci, prepojeni s CSL, so bili manj razkrojeni kot vzoredni, neprepojeni vzorci.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 630*844.2
CX wood/preservation/fungi/copper biocides/corn steep liquor/decay/increase
AU FJORELI, Borut Igor
AA HUMAR, Miha (supervisor)/POHLEVEN, Franc (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. III/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology
PY 2008
TI APPLICATION OF CORN STEEP LIQUOR FOR MYCOREMEDIATION OF RECOVERED, COOPER TREATED WOOD
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 54 p., 6 tab., 35 fig., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Some fungi are very tolerant on copper compounds which are one of the most frequently used wood preservatives; and this phenomenon has been known for more than 50 years. Fungi present a threat to wood impregnated with copper compounds. On other hand, wood treated with copper compounds represent a big environmental problem. To avoid environmental pollution bioremediation method could be used to decay used impregnated wood. Bioremediation processes require cheap and effective nutrient sources, containing significant amounts of nitrogen, e.g. corn steep liquor (CSL). To elucidate fungal copper tolerance in a nitrogen-rich environment, experiments were performed on a nutrient medium and with wood. CSL was added to nutrient medium containing different copper concentrations. Sterilized CCB-impregnated and control CSL-supplemented specimens were exposed to copper-tolerant (*Antrodia vaillantii*, *Leucogyrophana pinastri*) and copper-sensitive (*Postia placenta*, *Gleophyllum trabeum*, *Trametes versicolor*, *Hypoxylon fragiforme*) fungal species according to the mini block procedure. The result of both experiments showed inhibited growth of the copper-tolerant fungi on nutrient medium containing copper and decreased decay of CCB-preserved wood.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	VIII
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 RAZDGRADNJA LESA.....	2
2.1.1 Insekti.....	2
2.1.2 Bakterije.....	2
2.1.3 Glive.....	2
2.1.3.1 Zgradba gliv.....	4
2.1.3.2 Prehranjevanje gliv.....	5
2.1.3.2.1 Ektoencimi (eksoencimi).....	5
2.1.3.3 Razmnoževanje gliv.....	6
2.1.3.4 Dejavniki okolja, ki vplivajo na rast gliv.....	7
2.1.3.4.1 Zrak.....	7
2.1.3.4.2 Vlažnost.....	8
2.1.3.4.3 Substrat.....	8
2.1.3.4.4 Temperatura.....	8
2.1.3.4.5 Svetloba.....	8
2.1.3.4.6 pH.....	8
2.1.3.5 Delitev gliv glede na spremembo barve lesa, ki jo povzročajo.....	9
2.2 ZAŠČITA LESA.....	13
2.2.1 Odpornost in trajnost lesa.....	13
2.2.2 Kemična zaščita lesa.....	16
2.3 VPLIV KOVIN NA GLIVE.....	16
2.3.1 Razvrstitev in fungicidne lastnosti kovin.....	16
2.3.1.1 Abiotski dejavniki, ki vplivajo na toksičnost kovin.....	17
2.3.1.2 Baker kot pomemben element za zaščito pred glivami.....	17
2.3.1.3 Tolerantnost gliv na baker.....	18
2.3.1.3.1 Možni vzroki za tolerantnost gliv na baker.....	19
2.4 UPORABA TOLERANTNIH GLIV PRI VAROVANJU OKOLJA.....	20
2.4.1 Možnosti uporabe tolerantnih sevov gliv v praksi.....	20
3 MATERIALI IN METODE.....	22
3.1 MATERIALI.....	22
3.1.1 Koruzna omakalna vodica.....	23
3.1.2 Uporabljene lesne glive.....	24
3.2 METODE.....	26

3.2.1	Priprava hranilnega gojišča	26
3.2.2	Priprava izhodiščnih kultur	27
3.2.3	Mešanje hranilnega gojišča s koruzno omakalno vodico	28
3.2.4	Določanje odpornosti gliv s presejalnim testom na hranilni podlagi	28
3.2.5	Vizualno ocenjevanje rasti gliv na hranilnem mediju	30
3.3	MINI BLOK METODA	30
3.3.1	Vezava bakra ter prepojitev vzorcev s CSL	31
3.3.2	Priprava in inokulacija hranilnega gojišča	31
3.3.3	Vstavljanje vzorčkov na okuženo hranilno gojišče	32
3.3.4	Določanje izgube mase	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1	PRESEJALNI TEST	33
4.2	MINI BLOK TEST	42
4.2.1	Vpliv koruzne omakalne vodice na fungicidne lastnosti impregnirane in neimpregnirane smrekovine	43
5	SKLEPI	47
6	POVZETEK	48
7	VIRI	49
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Evropski razredi izpostavitve lesa glede na mesto uporabe (SIST EN 335 – 1/2, 1992)	13
Preglednica 2: Evropski razredi izpostavitve lesa glede na povzročitelje (SIST EN 335 – 1/2, 1992)	13
Preglednica 3: Uporabljene lesne glive	24
Preglednica 4: Uporabljene koncentracije raztopin bakrovega sulfata za test na hranilni podlagi	28
Preglednica 5: Vizualne ocene priraščanja micelija gliv	30
Preglednica 6: Izgube mas neimpregniranih ter impregniranih vzorcev s CCB potopljenih v CSL	42

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Mikroskopski posnetek konice hife glive	4
Slika 2: Shematski prikaz celične stene hife glive <i>Neurospora crassa</i>	5
Slika 3: Prikaz izgube strukturnih komponent lesa smreke okuženega z glivo <i>Oligoporus placenta</i>	9
Slika 4: Oksidativna razgradnja celuloze pri rjavi trohnobi (Eaton in Hale 1993)	10
Slika 5: Rast micelija bele hišne gobe po vodni površini (Foto: Franc Pohleven)	11
Slika 6: Shema predlaganega procesa za detoksifikacijo zaščitenega lesa s CC, CCA in CCB zaščitnim sredstvom	21
Slika 7: Proces predelave koruznih zrn	23
Slika 8: Sestava koruznega zrna	23
Slika 9: Sestavine ki sodelujejo pri mokrem mletju koruze	23
Slika 10: Micelij bele hišne gobe	24
Slika 11: <i>Gloephyllum trabeum</i>	25
Slika 12: <i>Leucogyrophana pinastris</i>	25
Slika 13: <i>Trametes versicolor</i>	26
Slika 14: Avtoklav (Foto: Aleš Malnarič)	27
Slika 15: Laminarij za sterilno delo (Foto: Aleš Malnarič)	27
Slika 16: Rastna komora (Foto: Aleš Malnarič)	27
Slika 17: Epruveta, pripravljena za presejalni test	28
Slika 18: Vzorci izpostavljeni glivi <i>T. versicolor</i>	32
Slika 19: Grafični prikaz rasti <i>Antrodia Vaillantii</i> pri različnih koncentracijah bakra	34
Slika 20: Presejalni test za <i>Antrodia Vaillantii</i>	34
Slika 21: Grafični prikaz rasti <i>Leucogyrophana Pinastris</i> pri različnih koncentracijah bakra	35
Slika 22: Presejalni test za <i>Leucogyrophana Pinastris</i>	35
Slika 23: Grafični prikaz rasti <i>Postia Placenta</i> pri različnih koncentracijah bakra	36
Slika 24: Presejalni test za <i>Postia Placenta</i>	37
Slika 25: Grafični prikaz rasti <i>Gloephyllum Trabeum</i> pri različnih koncentracijah bakra	37
Slika 26: Presejalni test za glivo <i>Gloephyllum Trabeum</i>	38
Slika 27: Grafični prikaz rasti <i>Trametes Versicolor</i> pri različnih koncentracijah bakra	39
Slika 28: Presejalni test za glivo <i>Trametes Versicolor</i>	39
Slika 29: Grafični prikaz rasti <i>Hypoxylon Fragiforme</i> pri različnih koncentracijah bakra	40
Slika 30: Presejalni test za glivo <i>Hypoxylon Fragiforme</i>	40
Slika 31: Grafični prikaz izgube mase za neimpregnirane vzorce v odvisnosti CSL za posamezno glivo	43
Slika 32: Grafični prikaz izguba mase impregniranih vzorcev (1 % CCB) glede na prisotnost različnih koncentracij CSL	44
Slika 33: Grafični prikaz izguba mase impregniranih vzorcev (5 % CCB) glede na prisotnost različnih koncentracij CSL	45
Slika 34: Slika vzorcev izpostavljenih glivi <i>Postia placenta</i>	46
Slika 35: Slika vzorcev izpostavljenih glivi <i>Trametes versicolor</i>	46

1 UVOD IN POSTAVITEV PROBLEMA

Les je organska snov in nanj delujejo številni razkrajajoči dejavniki. Trajnost nezaščitenega lesa v stiku z zemljo je v primerjavi z zaščitenim lesom zanemarljiva. Želja po večji obstojnosti lesa je stara kot človeška civilizacija. Da bi čim bolj podaljšali trajnost lesa so Kitajci potapljali gradbeni les v morsko vodo, Grki obdelovali lesene kipe z različnimi olji, Rimljani šteli svoje dragocenosti z oljčnim oljem, na Orientu pa so les potapljali v zemeljska olja (katran). Za enega najstarejših postopkov zaščite velja poogljavanje površine lesa z obžiganjem (Kervina – Hamović, 1990).

Zaščita lesa je prispevala k izboljšanju življenjskega standarda, saj je les z njo pridobil na trajnosti in uporabnosti, še posebej kadar ga uporabljamo na prostem. Žal ima zaščita lesa tudi svoje negativne strani. Številna zaščitna sredstva, ki se danes uporabljajo, vsebujejo težke kovine, ki močno obremenjujejo okolje. Zato po preteku življenjske dobe, zaščiten les uvrščamo med posebne odpadke, ki jih je potrebno čim bolj varno in ekonomično uničiti ali pa jih spremeniti v okolju prijazne izdelke.

Razvrščanje odsluženega zaščitenega lesa, kot posebnega odpadka, privede najprej do nastanka deponij. Izkaže se, da ta rešitev ni najboljša, saj je količina strupenih težkih kovin v lesu, v primerjavi s celotnim volumnom skladiščenega lesa, relativno majhna. Torej porabimo ogromno prostora za relativno malo strupene snovi. Poleg tega je kapaciteta teh skladišč omejena, javno mnenje pa ni naklonjeno odpiranju novih (Stephan in Peek, 1992). Po drugi strani s tem samo prelagamo rešitve na kasnejše rodove, saj deponije nikoli ne morejo biti trajna rešitev. Sežiganje odpadnega lesa bi lahko bila ustrezna rešitev, če bi bilo možno opravičiti ogromne stroške, ki nastanejo pri tem načinu uničenja. Namreč, sežig je mogoče izvesti samo v posebnih sežigalnih napravah s kvalitetnim filtriranjem dimnih plinov, kar stane približno 500 EUR/t lesa (Ribeiro s sod., 2000). Torej je potrebno najti okoljsko in ekonomsko sprejemljivo metodo razstrupljanja odpadnega zaščitenega lesa. Izhodišče je, da mora biti vsebnost težkih kovin v očiščenem lesu primerljiva z vsebnostjo v nezaščitenem lesu. Ena od možnosti razstrupljanja zaščitenega lesa je uporaba na baker tolerantnih gliv razkrojevalk lesa (Stephan in Peek, 1992; Stephan in sod., 1996; Clausen in Smith, 1998).

Za učinkovit postopek bioremediacije potrebujemo cenen vir hranilnih snovi. Ena izmed rešitev, ki se že uporablja v številnih biotehnoških procesih (biobeljenje, biopulpanje), je koruzna omakalna vodica (CSL). Namen naloge je ugotoviti kako koruzna omakalna vodica vpliva na rast in razkroj z bakrovimi pripravki zaščitenega lesa okuženega z izbranimi zlati lesnih gliv, predvsem z glivami tolerantnimi na bakrove učinkovine.

2 PREGLED OBJAV

2.1. RAZGRADNJA LESA

Razgradnjo lesa povzročajo abiotični in biotični dejavniki:

Abiotični so dejavniki nežive narave, med katere prištevamo ogenj, vremenske vplive (visoke in nizke temperature, vlago, veter...), UV svetlobo, oksidacijo, mehanske sile, kemikalije... Ogenj v požarih uniči velike količine lesa in je največji destruktore lesa.

Med biotične dejavnike žive narave prištevamo glive, insekte in bakterije. Le ti se z lesom hranijo in mu s tem spreminjajo mehanske in kemijske lastnosti.

2.1.1 Insekti

Insekti so skupina živali, ki po množičnosti prekašajo vsa druga živa bitja na Zemlji. Do danes je opisanih okoli milijon vrst. Insekte, ki na kakršenkoli način živijo na lesu, imenujemo ksilofagni insekti. Delimo jih glede na različne kriterije:

- po stanju lesa in količini vlage v lesu, ki ga napadajo,
- po debelini materiala in globini prodiranja,
- po izvoru.

Glede na stanje lesa in količino vlage v lesu jih delimo na **primarne** (napadajo zdrava drevesa), **sekundarne** (napadajo fiziološko oslabela drevesa ali sveže posekana), **terciarne** (napadajo zračno suh les) in **kvarterne** (napadajo moker in že nekoliko razkrojen les).

2.1.2 Bakterije

Bakterije spadajo med prokariote in so enocelični organizmi brez oblikovanega celičnega jedra. Bakterije se množijo s cepitvijo. Iz prvotne celice nastaneta novi. Najdemo jih v vseh ekosistemih. Sposobne so preživeti pri zelo neugodnih življenjskih razmerah, saj imajo izredno sposobnost prilagajanja (nekatero žive tudi pri 100 °C). Prehranjujejo se z organskimi snovmi, ki jih razkrajajo. So zelo pomembne za kroženje snovi v naravi.

2.1.3 Glive

Ljudje se že od vedno srečujemo z glivami. Glive lahko najdemo v vseh ekosistemih. Nahajajo se na kopnem, v vodi in v zraku (spore). Po načinu prehranjevanja so paraziti na človeku, živalih in rastlinah, simbionti ter saprofiti (Eaton in Hale, 1993). Osnovne značilnosti gliv bi lahko podali v naslednjih točkah:

- imajo heterotrofen način prehranjevanja,
- presnavljajo lizotrofno,
- v celičnih stenah imajo hitin,
- rezervna snov je glikogen.

V osemnajstem stoletju se je zgodil velik preskok v poznavanju gliv. Odkritje mikroskopa je omogočilo opazovanje hif in spor. Leta 1969 je Whittaker celične organizme razdelil na evkarionte in prokarionte. Evkarionte je razdelil na eno in večcelične organizme. Živali, rastline in glive so predstavniki večceličnih evkariontskih organizmov (Charlile in Watkinson, 1994).

Glive so heterotrofni organizmi, ki se lahko oskrbujejo z organskimi snovmi kot saprofiti, paraziti ali simbionti. Za lesarje so najpomembnejše saprofitske glive oziroma gniloživke. Njihova značilnost je, da z encimi razkrajajo komponente lesa ter se na ta način oskrbujejo z organskimi snovmi (Pohleven, 2000). Sestavljene so iz prehranjevalnega in razmnoževalnega dela, ki sta jasno ločena pa čeprav sta obadava sestavljena iz hif. Prehranjevalni ali vegetativni del tvorijo hife, ki se sčasoma pričnejo med seboj prepletati in na ta način tvoriti podgobje oziroma micelij. Na njem se razvije razmnoževalni del ali trosnjak, ki je velikokrat viden kot klobuk oziroma goba, dejansko pa imamo tudi tukaj preplet hif. Glive se razmnožujejo s trosi, ki se razvijejo na trosnjaku in ob dozoritvi sprostijo v ozračje (Schmidt, 1994).

Za razvoj in obstoj gliv je pomembnih več dejavnikov, ki morajo biti čim bolj optimalen, da gliva uspeva. Najpomembnejši dejavniki so: vlažnost lesa (30 – 60 %), relativna zračna vlažnost (90 %), temperatura (23 – 30 °C) in pH (4 – 5). Če v njihovem razvoju manjka eden od faktorjev, lahko gliva prične hirati in sčasoma tudi odmre. To dejstvo s pridom izkoriščamo pri preventivni zaščiti lesa in odpravljanju okužb, če je do njih že prišlo.

Okužbo z glivami prepoznamo po fizikalnih (izguba mase, mehanskih lastnosti in strukture) in kemičnih (barvne spremembe) spremembah, zaradi katerih les izgubi svoje naravne lastnosti. Spremembe se odražajo predvsem v razkroju lesne mase, kar imenujemo trohnenje. Dejansko se okužba z glivami najprej pokaže v spremembi naravne barve lesa, tako da jih po tej karakteristiki lahko uvrstimo v naslednje skupine:

- glive plesni, povzročiteljice površinskih sprememb barv,
- glive modrivke, obarvajo površino oziroma beljavo,
- glive bele ali korozivne trohnobe in piravosti,
- glive povzročiteljice rjave ali destruktivne trohnobe.
- glive mehke trohnobe

2.1.3.1 Zgradba gliv

Tako kot pri vseh organizmih, je tudi pri glivah celica osnovni gradnik. Glivna celica ima tipično evkariontsko zgradbo. Celice gliv so sestavljene iz celične membrane, protoplasta (citoplazma in organeli) in celične stene. Celična membrana obdaja citoplazmo v kateri se nahajajo celični organeli, ki regulirajo sprejemanje hrane in izločanje metabolnih produktov. V citoplazmi se nahaja več organelov (ribosomi, endoplazmatski retikulum, jedra, mitohondriji, vakuola...). Jedra regulirajo razvoj in rast celotne celice. Jedro vsebuje beljakovine in večje količine DNA, ki je nosilec genetskih informacij (Adamič, 1992).

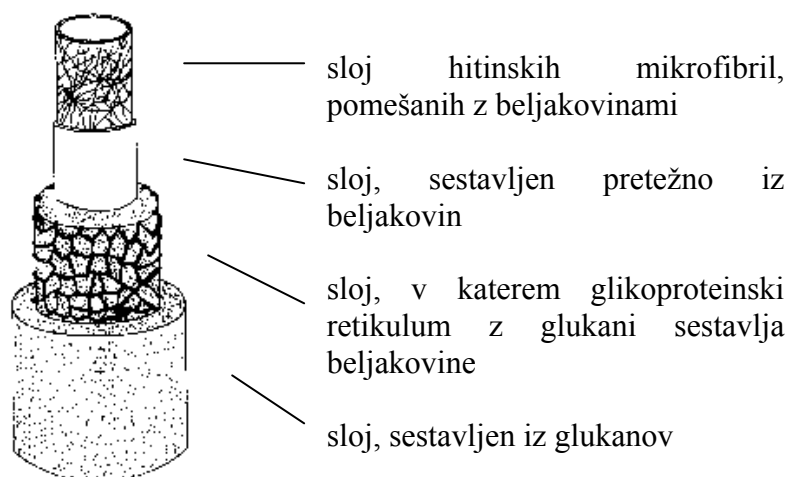
V celici glive najdemo podobne strukture kot pri živalski in rastlinski celici, vendar se od enih in drugih razlikuje. Najbolj bistvena razlika je v zgradbi celične stene, ki pri višjih glivah vsebuje hitin.

Hife višjih gliv (*Ascomycotina*, *Basidiomycotina* in *Deuteromycotina*) so septirane. Večina sept pri višjih glivah je perforiranih in omogoča prehod snovi vzdolž ene v drugo celico. Septe dajejo oporo hifi. Neseptirane hife so brez prečnih sten (pojavljajo se le kjer je gliva poškodovana) in imajo obliko cevki. Značilne so za nižje glive (*Zigomycotina* in *Mastigomycotina*) (Zabel in Morrell, 1992) (slika 1).



Premer hif je lahko zelo različen. Tudi znotraj posamezne vrste lahko pride do razlik, zaradi različnih vplivov okolja in njihovega položaja v koloniji. Vseeno pa so razlike med vrstami. Premer hif pri določeni vrsti je lahko od 3 - 4 μm , pri drugi pa vse do 30 μm (Carlile in Watkinson, 1994) (slika 2).

Slika 1: Mikroskopski posnetek konice hife glive *Aspergillus niger*. Na sliki s 25000 \times povečavo je mogoče videti ribosome, mitohondrije, golgijev aparat in celično steno (Zabel in Morrell, 1992)



Slika 2: Shematski prikaz celične stene hife glive *Neurospora crassa* (Peberdy in Ferenczy, 1985)

Celične stene konic hif se razlikujejo od vzdolžnih sten in sept. Struktura celične stene je različna pri različnih skupinah gliv. Pri večini gliv je glavni gradnik celične stene hitin, pri pododelku *Zygomycotina* pa hitozan. Celična stena razreda *Oomycetes* je sestavljena iz celuloze (Gunde-Cimerman, 1996). Preplet večjega števila hif imenujemo micelij ali podgobje.

2.1.3.2 Prehranjevanje gliv

Podgobje izloča ektoencime. Ti razgradijo substrat v razgradne produkte, ki jih gliva nato črpa za svojo prehrano. Podgobje služi tudi za razširitev glive na nova področja. Na reproduktivnih hifah se razvije razmnoževalni del ali trosnjak, ki ga pri višjih glivah imenujemo goba ali karpofor (gr. karmo-plod, phoros-nositi). Glive so heterotrofni organizmi. Glavni vir energije pridobijo iz organskih snovi. Prehranjujejo pa se lizotrofno. To pomeni, da v substrat sproščajo eksoencime, ki razgradijo substrat, presnovne produkte nato posrkajo v hife.

2.1.3.2.1 Ektoencimi (eksoencimi)

Encimi so biokatalizatorji, ki nastopajo v skoraj vseh kemičnih reakcijah, ki so povezane z živimi organizmi. Encime delimo glede na kemično reakcijo v šest skupin (Zabel in Morrell, 1992; Čepin, 1999):

- oksireduktaze - so encimi biološke redukcije in oksidacije, ki delujejo na alkoholne hidroksilne skupine, aldehide, C-N skupine in dvojne vezi,
- transferaze - transformirajo radikale (amino, metil ali acetil),
- hidrolaze - cepijo kisikove mostove (eterske, estrske, glikozidne, peptidne...),
- liaze - vplivajo na tvorbo dvojne vezi (C=C, C=O, C=N),
- izomeraze - katalizirajo spremembo izomerne molekule,
- ligaze - so encimi, ki tvorijo novo vez ob istočasni porabi ATP, kot vira energije.

Encimi, ki razkrajajo les, najprej razgradijo polimerne molekule v substratu (celulozo, škrob, beljakovine, hemiceluloze in lignine) na monomerne molekule, ki jih celice hif nato lahko vsrkajo. Glavne vrste encimov, ki so vključeni v razgradnjo lesa so: celulaze (endocelulaze in eksocelulaze), hemicelulaze, β - glukozidaze, oksidaze in drugi encimi, ki razgrajujejo lignin (Wainwright, 1992; Eaton in Hale, 1993).

Glive so edini organizmi na Zemlji, ki so sposobni popolne razgradnje lignina. Izmed vseh gliv so to sposobnost tekom evolucije najbolj razvile glive, povzročiteljice bele trohnobe, iz pododelka *Basidiomycotina* (Reid, 1994). Pri razgradnji lignina se glive bele trohnobe srečajo s tremi ovirami (Kirk in Cullen, 1998):

- polimerna molekula lignina je velika,
- elementi polimera so povezani z etrskimi in C-C vezmi,
- polimer je stereoiregularen.

2.1.3.3 Razmnoževanje gliv

Razmnoževanje gliv poteka s sporami na spolni in nespolni način. Spore imajo dve glavni nalogi: razširitev na novo področje in preživetje. Do razmnoževanja s sporami pride le takrat, kadar so izpolnjeni pogoji za sporulacijo. Razširitvene spore se pojavljajo v velikem številu in so slabše prilagojene za daljše preživetje. Preživetvene spore so precej velike z močnim ovojem in vsebujejo veliko hranljivih snovi. Prilagojene so za dolgo obdobje dormance.

Spolni način razmnoževanja poteka pri pravih glivah. Pri spolnem razmnoževanju dobimo naslednje vrste spor:

- zigospore,
- askospore,
- bazidiospore.

Nespolno razmnoževanje imenujemo tudi vegetativno in poteka s sporami ali s cepitvijo micelija. Spore se sprostijo iz trosišča brez predhodne združitve dveh spolno diferenciranih jeder. Poznamo več vrst nespolnih spor:

- sporangiospore,
- konidiospore,
- artrospore,
- hlamidiospore.

Razmnoževanje s cepitvijo micelija se zgodi, kadar se micelij glive fizično pretrga oziroma poškoduje. Ob ugodnih razmerah se prvotni in odtrgani micelij regenerira. V nasprotnem primeru pa lahko micelij odmre.

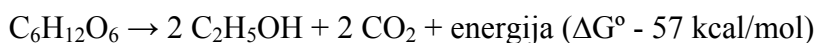
2.1.3.4 Dejavniki okolja, ki vplivajo na rast gliv

Za razvoj in nemoteno rast gliv so pomembni nekateri dejavniki: zrak, vlažnost, hranilne snovi, temperatura, svetloba, pH... Vsi ti dejavniki morajo biti za rast in razvoj čim bolj optimalni. V nasprotnem primeru pride do hiranja in gliva lahko odmre. Spoznanja o zunanjih dejavnikih lahko zelo pripomorejo pri biološkem zatiranju gliv.

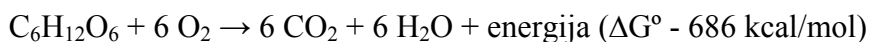
2.1.3.4.1 Zrak

Zrak je mešanica plinov. Sestavlja ga 78 % dušika (N₂), 21 % kisika (O₂), 0,03 % (300 ppm) ogljikovega dioksida (CO₂) in 0,07 % ostalih plinov.

Kisik: Nekatero glive, predvsem plesni, so sposobne pridobivati energijo direktno iz spojin s procesom fermentacije. To se zgodi, kadar so količine kisika zelo nizke, ali ko kisika ni. V tem primeru so sladkorji le delno presnovljeni. Z dihanjem se pridobi več energije kot s fermentacijo. Enačba fermentacije (Zabel in Morrell, 1992):



Večina gliv pa potrebuje kisik (O₂) za številne metabolične reakcije, vključno za pridobivanje energije ali za sintezo. Organizmi lahko dobijo energijo z dihanjem. Pri dihanju služi kisik kot reaktant, ki sprejema protone in elektrone. Omeniti je potrebno, da se pri dihanju sladkorji (glukoza) popolnoma oksidirajo in s tem se sprosti velika kemična energija v obliki ATP. Enačba dihanja (Zabel in Morrell, 1992):



Glede na potrebo po kisiku lahko glive razdelimo na:

- obligatne aerobe (glive, ki za svoje dihanje nujno potrebujejo kisik),
 - fakultativne anaerobe (glive, ki lahko energijo pridobijo z dihanjem kisika ali s fermentacijo),
 - obligatne anaerobe (glive, ki pridobijo energijo le s fermentacijo).
- Večina gliv spada med obligatne aerobe.

Ogljikov dioksid: Glive za razliko od avtotrofnih organizmov ne morejo uporabljati ogljikovega dioksida za tvorbo ogljikovih hidratov. Vendar je prav tako zelo pomemben element pri različnih metabolnih reakcijah:

- sintezi aminokislin iz amoniaka,
- sintezi purinskih baz,
- sintezi pirimidinskih baz,
- sintezi maščobnih kislin.

Glive, ki živijo v anaerobnih ekosistemih in so običajno izpostavljene visoki količini ogljikovega dioksida, imajo tudi visoke zahteve po ogljikovem dioksidu. Npr. *Aquasalinderella* uspešno raste le takrat, kadar ima na razpolago visoko koncentracijo ogljikovega dioksida (5 - 20 %). Nekatero vrsto gliv, kot je *Coccidioides immitis*, spremenijo način rasti ob visoki koncentraciji ogljikovega dioksida (Muntañola-Cvetković, 1987).

2.1.3.4.2 Vlažnost

Voda je zelo pomemben dejavnik, saj v vodnem okolju potekajo vsi biološki procesi. Rastoče celice in hife morajo imeti bolj propustno celično steno in plazemsko membrano kot nerastoče. To pomeni, da lahko voda prehaja v celico ali iz nje, kar je odvisno od vodnega potenciala v celici in njeni okolici. Od razlike v vodnem potencialu med celico in okolico je odvisno, v katero smer bo voda difundirala. Lahko se zgodi, da voda izhaja iz celice (plazmoliza), kar lahko povzroči izsušitev in celo odmrtnje.

V lesu je prisotna prosta in vezana voda. Prosta voda zapolnjuje celične lumne, medtem ko je vezana voda vezana v celični steni lesne celice. Pravšnja količina vode v lesu je bistvenega pomena za sposobnost gliv, da okužijo les in za njihovo rast. Kadar je vlažnost lesa pod 20 %, je les varen pred okužbo gliv. Obstajajo tudi nekatere izjeme npr. glive iz vrste *Aspergillus*, ki lahko rastejo pri vlažnosti 15 % ter glive *Peronospora destructor*, *Botrytis cinerea* ter *Serpula lacrymans*, ki rastejo pri vlažnosti 17 % (Muntañola-Cvetković, 1987). Tudi prevelika količina vlage v lesu preprečuje okužbo lesa z glivami. Ta dva podatka sta zelo pomembna pri preventivnih ukrepih zaščite lesa, saj lahko na relativno poceni način učinkovito obvarujemo les pred okužbo z glivami.

2.1.3.4.3 Substrat (hrana)

Kot heterotrofi, si morajo glive s prehrano omogočiti (Zabel in Morrell, 1992):

- energijo, ki jo pridobijo z oksidativnimi procesi,
- metabolite ki jih potrebujejo za sintezo življensko potrebnih snovi (hitin, glukan, encime, proteine, lipide...),
- vitamine, ogljikov dioksid, dušik in druge manj pomembne elemente.

2.1.3.4.4 Temperatura

Glive lahko prenesejo temperaturo od nekaj stopinj nad ničlo do 30 - 40 °C. Glive, ki lahko rastejo pri okoli 0 °C, imenujemo psihrotolerantne glive. Psihrofilne imenujemo tiste glive, ki rastejo pri temperaturi do 20 °C. Termofilne glive so tiste, ki ne morejo rasti pod 20 °C, medtem ko so termotolerantne sposobne preživeti pri temperaturi do 50 °C. Najvišja temperatura, pri kateri so izmerili rast glive, je bila 60 °C (Zabel in Morrell, 1992).

2.1.3.4.5 Svetloba

Svetloba je potrebna za oblikovanje reproduktivnih struktur in vpliva na metabolizem gliv. Učinek svetlobe je odvisen od intenzitete, trajanja, valovne dolžine svetlobe... Na glive najbolj zaviralno deluje UV svetlobni spekter.

2.1.3.4.6 pH

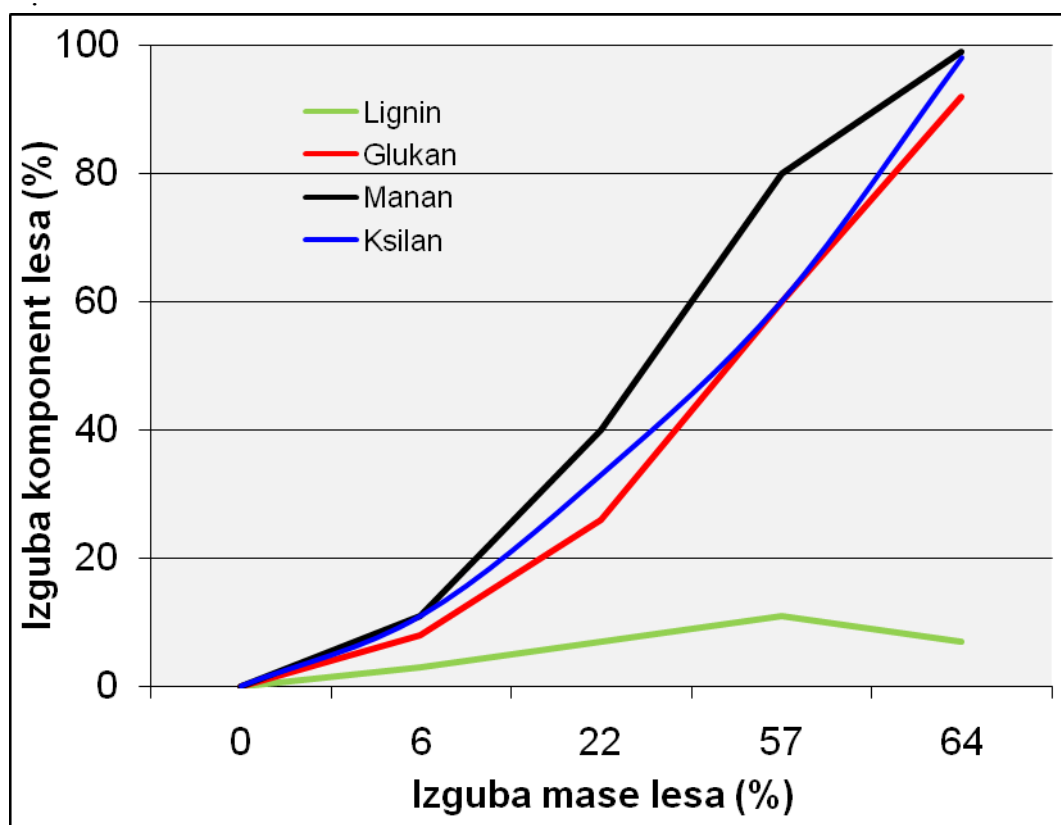
Optimalna vrednost pH (podlage) za rast gliv je okoli 4,5 do 5. Za večino lesnih gliv je značilno, da izločajo organske kisline (oksalno, jabolčno, citrsko...) in si s tem tudi same zakisajo podlago in uravnajo optimalen pH za razkroj.

2.1.3.5 Delitev gliv glede na spremembo barve lesa, ki jo povzročajo

Sprememba barve lesa je ena izmed prvih vidnih sprememb, ki jo opazimo ob okužbi. V končni fazi razkroja lahko mnogokrat že po barvi in stanju lesa določimo, katera skupina lesnih gliv je les okužila. Vendar moramo biti pazljivi, saj barvne spremembe na lesu povzročajo tudi abiotični dejavniki, npr. vpliv atmosferskih dejavnikov, prisotnost kovin, kemične reakcije...

Rjava ali destruktivna trohnoba: Glive, ki povzročajo rjavo trohnobo, označujemo kot glive prave razkrojevalke lesa in spadajo v pododdelek *Basidiomycotina*. Pogosteje okužijo les iglavcev kot listavcev. Razgrajujejo celulozo in hemicelulozo, medtem ko ostane lignin skoraj nerazkrojen in les, zaradi prebitka lignina postane rdečkasto rjav do temno rjav. Proti koncu razkroja se na lesu pojavijo globoke razpoke in na koncu se zdrobi v prah.

Glive povzročiteljice rjave trohnobe zelo hitro povzročijo močan padec natezne trdnosti. To se zgodi še preden opazimo izgubo mase lesa. Ta proces pripisujejo depolimerizaciji polioznih molekul in začetni razgradnji hemiceluloze (Green s sod., 1991; Humar s sod., 2000). Stopnja polimerizacije celuloze se zmanjša z okoli 10000 na 250 glukoznih enot (Kirk s sod., 1991). Znano je tudi, da glive rjave trohnobe hitreje razgradijo celulozo kot glive bele trohnobe (slika 3).



Slika 3: Prikaz izgube strukturnih komponent lesa smreke okuženega z glivo *Oligoporus placenta* (Kirk in Highley, 1973)

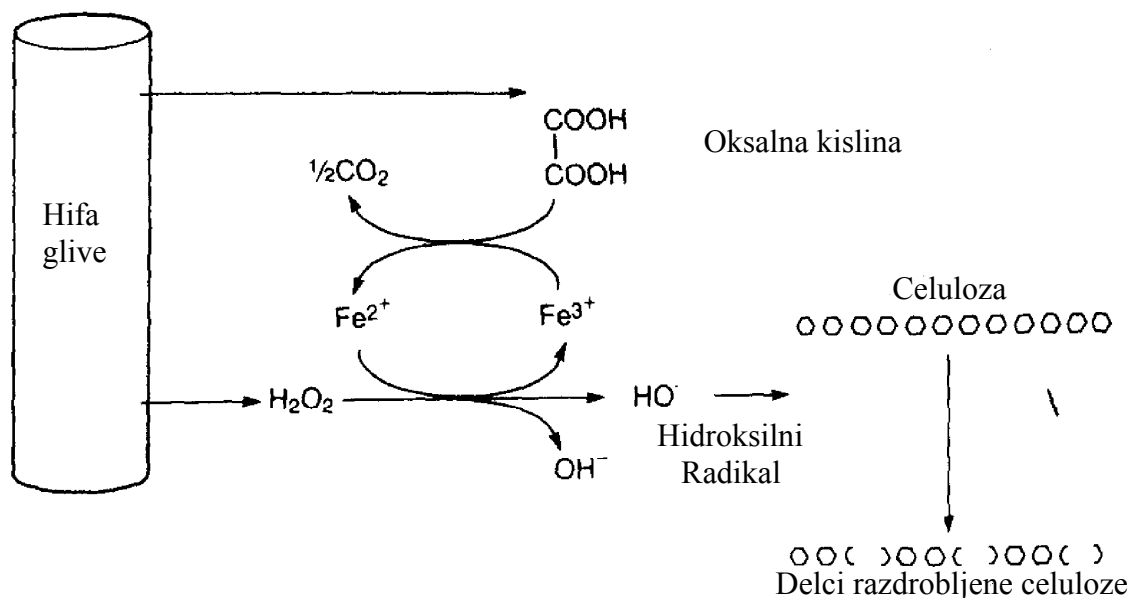
Mehanizmi, odgovorni za razkroj celuloze, še niso dobro znani (Shimada s sod., 1991). Znano pa je, da so tudi najmanjše molekule encima celuloze prevelike, da bi lahko prodrle preko vrzeli v celični steni. Na podlagi teh dognanj se sklepa, da začetni razkroj celuloze ni encimatski (Blanchette, 1995; Humar s sod., 2000;). Trenutno se domneva, da je povzročitelj depolimerizacije celuloze pri glivah rjave trohnobe močno reaktivna snov z majhno molekulsko maso (Micales, 1995).

Raziskave o mehanizmu razkroja pri glivah rjave trohnobe so osredotočene na tri področja, ki se med seboj povezujejo (Green s sod., 1991):

- fentonska reakcija,
- oksidacija z enim elektronom (e^-),
- produkcija oksalne kisline.

Schmidt je ponudil možnost, da glive razkrajajo celulozo s fentonsko reakcijo (H_2O_2/Fe^{2+}), oksalno kislino in hidroksilnim radikalom (Micales, 1995).

Znano je, da les vsebuje zadostne količine železa. Da bi bila fentonska reakcija mogoča, mora biti prisotna tudi oksalna kislina. Fentonska reakcija poteče ob prisotnosti dvovalentne kovine, bakra, železa, ali podobne kovine (predlagan je bil tudi mangan) (Ritschkoff in Viikari, 1991; Jordan s sod., 1996,) povzroči nastanek hidroksilnega radikala (OH^\cdot) oz. podobnega reaktivnega radikala. Do sedaj še ni bila dokazana prisotnost vodikovega peroksida (H_2O_2) v okuženem lesu. Prisotnost hidroksilnega radikala pa so dokazali s številnimi metodami (Humar s sod., 2000) (slika 4).



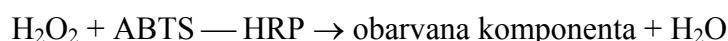
Slika 4: Oksidativna razgradnja celuloze pri rjavi trohnobi (Eaton in Hale, 1993).

Številne študije so pokazale, da so razgradni produkti celuloze, ki je bila okužena z glivo rjave trohnobe, podobni tistim v celulozi, oksidirani z vodikovim peroksidom.

Razlog, da se vodikovega peroksida v lesu ne zazna, bi lahko bil (Ritschkoff in Viikari, 1991):

- nizka koncentracija vodikovega peroksida, ki ga z dostopnimi metodami ni mogoče zaznati,
- hitra poraba vodikovega peroksida ob prisotnosti ustrezne kovine (oksidacija).

Ritschkoff in Viikari (1991) sta dokazali prisotnost vodikovega peroksida pri glivah rjave trohnobe *Serpula lacrymans* in *Poria placenta*. Uporabili sta metodo s kromogenom 2,2'-azinobis(3 - etil-benzotiazoline - 6 - sulfonsko kislino) in hrenove peroksidaze. Princip metode za detekcijo vodikovega peroksida je naslednji:



V proces razkroja celuloze je nedvomno vključena tudi oksalna kislina, ki je najmočnejša organska kislina ($\text{pK}_1 = 1,27$, $\text{pK}_2 = 4,26$) (Takao, 1965; Green s sod., 1991; Micales, 1995; Humar s sod., 2000.).

Akamatsu s sodelavci (1994) je dokazal, da glive rjave trohnobe kopičijo večje količine oksalne kisline kot glive bele trohnobe. S tem, ko glive kopičijo velike količine oksalne kisline, povzročijo zakisanje podlage. Gliva *Coniophora cerebella*, v tekočem mediju s sproščanjem oksalne kisline, zakisa substrat do pH 2,2, gliva *Laetiporus sulphureus* pa zakisa substrat do pH 1,55 (Green s sod., 1991). Humar s sod., (2000) poroča, da gliva bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*) v dveh tednih zakisa vodo z začetnih pH 7 na končno vrednost pH 2,5 (slika 5).



Študije Gilbertsona so pokazale, da obstaja 106 vrst gliv, ki povzročajo rjavo trohno. Najpogostejše glive, ki povzročajo rjavo trohno so glive iz rodu bele hišne gobe (*Antrodia*) ter glive kletna goba (*Coniophora puteana*), siva hišna goba (*Serpula lacrymans*), luskasta nazobčanka (*Lentinus lepideus*), tramovki (*Gloeophyllum trabeum* in *Gloeophyllum saepiarium*) in (*Oligoporus placenta*) (Eaton in Hale, 1993; Humar s sod., 2000.)...

Slika 5: Rast micelija bele hišne gobe po vodni površini (Foto: Franc Pohleven)

Bela ali korozivna trohnoba: Glive, ki povzročajo belo trohno, so sposobne razgradnje lignina. Zaradi oksidativne razgradnje les postaja vse svetlejši. Les se začne vlaknasto cepiti.

Na mikromorfološki in kemični stopnji bi lahko ločili glive povzročiteljice bele trohnobe in glive povzročiteljice "sočasne trohnobe". Glive bele trohnobe razgradijo najprej lignin in hemicelulozo, medtem ko povzročiteljice sočasne trohnobe sočasno in v enakem obsegu razgradijo lignin, hemicelulozo in celulozo (Eaton in Hale, 1993).

Glive povzročiteljice bele trohnobe pogosteje okužijo listavce kot iglavce. Med najpogostejšimi so: pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*), grbasta ploskocevka (*Trametes gibbosa*), kosmata ploskocevka (*Trametes hirsuta*), dlakava slojevka (*Sterum hirsutum*), škrlatnordeča slojevka (*Chondrostereum purpureum*), pahljačica (*Schizophyllum commune*), ostrigar (*Pleurotus*), štorovka (*Armillariella mellea*)...

Mehka trohnoba ali soft rot: izraz soft rot je uvedel Savory in opisuje glive iz rodu *Ascomicotin* in *Deuteromicotin*, ki razkrajajo celulozo. Okužba se zgodi, kadar zaradi različnih dejavnikov (prevelike vlažnosti, slabih zračnih pogojev), okužba bolj aktivnih in tekmovalnih gliv iz skupine *Basidiomicotin* ni mogoča (Eaton in Hale, 1993).

Površina okuženega lesa je mehka in izrazito rjave barve, kadar je les moker. Pri suhem lesu se pojavijo razpoke podobne kot pri rjavi trohnobi, le da so te bolj plitke. Notranjost lesa pa ostane nepoškodovana. Nekateri predstavniki gliv, ki povzročajo mehko trohnobo so: *Cheatomium globosum*, *Lecythophora hoffmannii*, *Monodictys putredinis*...

Modrenje: glive modrivke povzročajo globinske barvne spremembe na iglavcih in listavcih. Okužijo beljavo iglavcev ter topol, brezo, lipo... Trosi gliv modrivk se razvijejo le, če padejo direktno na beljavo. Tudi nekateri insekti zanesejo trose v drevo, predvsem podlubniki. Modrivke se hranijo s škrobom in sladkorji, zato ne oslabijo mehanskih lastnosti lesa. Vendar pomodrel les onemogoči vsestransko uporabo lesa.

Plesni: povzročajo le površinska obarvanja lesa. Okužen les je najrazličnejših barv (črne, modre, zelene, rdeče, rožnate, sive...). Tudi po obliki obarvanih madežev lahko ugotovimo, da gre za obarvanost, ki jo povzročijo plesni. Le redko se dogaja, da bi bila obarvana celotna površina. Obarvanja, ki nastanejo zaradi plesni, so največkrat neenakomerna. Le ta so lahko pikčasta, pegasta, razporejena v madežih... Plesni ne predstavljajo velike ekonomske škode, saj je les tudi po njihovi okužbi še vedno uporaben. S skobljanjem ali brušenjem lesa se lahko delno ali pa v celoti odstrani madeže.

2.2 ZAŠČITA LESA

2.2.1 Odpornost in trajnost lesa

Les kot organski material pod vplivom biotičnih in abiotičnih dejavnikov razpade v anorgansko snov. V naravi je ta proces nujno potreben, saj je del naravnega kroženja snovi. Na lesu, ki ga uporabljamo, pa bi radi ta proces čim bolj upočasnili in tako podaljšali njegovo trajnost.

Trajnost lesa lahko povečamo na več načinov. Eden izmed njih je vsekakor primerna izbira lesne vrste in z njo povezana naravna zaščita. Druga možnost je kemična zaščita. Vrsto zaščitnega pripravka in same zaščite izberemo glede na naravno odpornost lesa in mesto uporabe. Pri tem si pomagamo z evropskimi standardi izpostavitve lesa glede na mesto uporabe (preglednica 1) in povzročitelje (preglednica 2). Glede na razred izpostavitve lahko določimo potencialne možne škodljivce in s tem tudi preventivno zaščito.

Preglednica 1: Evropski razredi izpostavitve lesa glede na mesto uporabe (SIST EN 335 – 1/2, 1992)

Razred izpostavitve	mesto uporabe	Vlaženje	Vsebnost vlage
I.	nad tlemi, pokrito	stalno suho	pod 20 %
II.	nad tlemi, pokrito, nevarnost močenja	občasno močenje	občasno nad 20 %
III.	nad tlemi, nepokrito	pogosto močenje	pogosto nad 20 %
IV.	v tleh ali vodi	stalno izpostavljen močenju	stalno nad 20 %
V.	v morski vodi	stalno izpostavljen močenju morske vode	stalno nad 20 %

Preglednica 2: Evropski razredi izpostavitve lesa glede na povzročitelje ogroženosti (SIST EN 335 – 1/2, 1992)

Razred izpostavitve	Mesto uporabe	Povzročitelji ogroženosti			
		Insekti	Glive	Izpiranje	Modrivke
I.	nad tlemi, pokrito	+	-	-	-
II.	nad tlemi, pokrito, nevarnost močenja	+	+	-	-
III.	nad tlemi, nepokrito	+	+	+	+ / -
IV.	v tleh ali vodi	+	+	+	+
V.	v morski vodi	+	-	+	-

V prvem razredu izpostavitve ogrožajo les le insekti. V višji razred kot gremo, več je možnih škodljivcev oziroma povzročiteljev ogroženosti. Tako imamo pri lesu v stiku s tlemi in vodo, ne glede na to ali je morska ali sladka, največ dejavnikov, ki ogrožajo les. Pri kemični zaščiti lesa v stiku z vodo moramo biti še posebej pozorni, saj moramo upoštevati okoljevarstvene vplive. S tem je mišljena predvsem uporaba čim manj strupenih sredstev, ki se čim manj izpirajo iz lesa. Na žalost je to zelo težko doseči, vendar čedalje več raziskav poteka v tej smeri. Poleg čim boljše vezave, želimo pri novejših zaščitnih pripravkih doseči tudi čim bolj ciljno delovanje. Novejša zaščitna sredstva imajo posledično točno določen namen zaščite in ožji spekter delovanja (Humar, 2004). Na primer: les zaščiten s pripravki na osnovi bakra in etanolamina, bomo uporabljali le v tretjem in četrtem razredu izpostavitve. V drugem razredu, pa bomo uporabljali za okolje bistveno manj obremenjujoče pripravke na osnovi bora.

Tretjina zaščitenega lesa v Evropi je impregnirana s pripravki na osnovi bakra. Glede na to, da se bakrove zaščitne pripravke uporablja že več kot 200 let, moramo pojasniti razloge za njegovo uporabo. Prednosti bakrovih pripravkov so:

- bakrovi pripravki so že v relativno nizkih koncentracijah učinkoviti za glive, bakterije in alge, pri čemer na višje rastline ne vplivajo. V nizkih koncentracijah je baker celo nujno potreben za rast in razvoj rastlin (Gupta, 1979),
- zaščitna sredstva na osnovi bakra so relativno poceni in sorazmerno varna v primerjavi z drugimi zaščitnimi pripravki (Richardson, 1997),
- prepoved oziroma strožji nadzor nad nekaterimi klasičnimi organskimi biocidi za les, zaradi strupenosti ali njihove okoljske neprimernost (kreozotno olje, PCP, DDT, Lindan...) (Pohleven, 1998),
- hiter razvoj dežel tretjega sveta in s tem povezane večje potrebe po zaščitenem lesu (Richardson, 1997).

Običajno imajo tudi bakrovi pripravki prednosti in pomanjkljivosti. Največja slabost je izpiranje. Baker namreč s komponentami lesa ne reagira, kar posledično privede do izpiranja (Richardson, 1993). Čedalje večji problem povzročajo tudi na baker tolerantni sevi gliv (Zabel, 1954; Tsunoda s sod., 1997; Woodward in De Groot, 1999). Tolerantni sevi gliv ogrožajo zaščiten les oziroma les z največjo funkcionalno in komercialno vrednostjo (Humar in Pohleven, 2005) ter s tem povzročajo precejšnjo škodo.

Leta 1838 je Bethell razvil metodo globinske impregnacije lesa s katero se začenja doba industrijske zaščite. S tem je omogočil zaščito železniških pragov in drogov s kreozotnim oljem, ter tako pospešil gradnjo železniške in električne infrastrukture. Bethellovim raziskavam je sledil Boucherie, ki je patentiral zaščito lesa z bakrovim(II) sulfatom, primerljive bakrove učinkovine pa so zelo pomembne v zaščiti lesa še danes.

Na začetku 20. stoletja so večino raziskav na področju zaščite lesa namenjali razvoju vodotopnih pripravkov na osnovi floridov, kromatov, nitrofenolov in arzenatov.

Prelomnico v razvoju zaščitnih pripravkov predstavlja Bruningovo odkritje (1913), da kromove spojine bistveno izboljšajo vezavo aktivnih komponent in omilijo korozijo materialov med obdelavo zaščenega lesa. To odkritje je predstavljalo razcvet uporabe kompleksnih zaščitnih pripravkov. Prvi tak zaščitni pripravek je patentiral (1926) Gilbert Gunn, na osnovi bakrovega(II) sulfata in natrijevega dikromata. To zaščitno sredstvo pa ni bilo odporno proti termitom in tolerantnim izolatom gliv (Humar in Pohleven, 2005). Leta 1933 ga je izboljšal indijski raziskovalec Sonti Kamesan z odkritjem, da krom poleg bakra, fiksira tudi arzenove spojine. Razvil je vodotopni pripravek na osnovi kromovih, bakrovih in arzenovih spojin oziroma pripravek CCA (Humar, 2004). Osnovna sestava tega pripravka se uporablja v nekaterih državah še danes. V začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so, zaradi okoljevarstvenih in zdravstvenih razlogov, pričeli z iskanjem alternativnih sredstev zdravju škodljivim kromovim in arzenovim spojinam. Arzenove spojine niso bile dodane samo pripravkom na osnovi bakra in kroma temveč tudi na osnovi bakra in amoniaka. Tak pripravek z imenom Chemonite je leta 1940 patentiral Gordon. Zaradi pritiska javnosti, so sčasoma pričeli arzenove spojine opuščati, v letu 2006 pa so v EU močno omejili tudi uporabo kromovih spojin v zaščiti lesa.

Med novejšje kombinacije v bakrovih pripravkih uvrščamo amine, kot alternativo neustreznemu amoniaku. Bakrove učinkovine se najpogosteje kombinirajo z etanolaminom ali trietanolaminom. Za izboljšanje insekticidnih lastnosti in kot sekundarni fungicid, se jim dodaja bor ter kvartarne amonijeve spojine (Humar, 2005). Na žalost se tudi bor iz lesa precej izpira. Raziskave so pokazale podobno učinkovitost (insekticid in primarni fungicid) v pripravkih na osnovi bakrovih spojin, amina in azolov. Nikakor ne moremo mimo dejstva, da so moderna zaščitna sredstva bistveno manj učinkovita kot CCA in CCB, zato moramo les prepojit z večjo količino pripravka (načeloma šestkrat več kot CCA), pri tem pa prihaja do izpiranja večjih količin težkih kovin. Dejansko je vprašljiva smotnost in upravičenost impregnacije s takimi zaščitnimi pripravki. Tako bodo verjetno v prihodnosti, zaradi finančnih, ekoloških in fungicidnih lastnosti, pripravki še vedno vsebovali bakrove spojine. Bakrove učinkovine se bodo v zaščiti lesa uporabljale tudi v prihodnosti. Po vsej verjetnosti jih bomo uporabljali toliko časa, dokler ne bomo razvili cenovno dostopnejše in okolju prijaznejše alternative.

Zaščita lesa je veda, ki je tesno povezana z lesno patologijo, lesno entomologijo, biologijo, kemijo, fiziko ter z nekaterimi gospodarskimi panogami kot so: lesarstvo, elektrogospodarstvo, gradbeništvo, kmetijstvo, rudarstvo in drugo. Zaščita lesa se ukvarja s preučevanjem razgradnje lesa in preučuje učinkovite ukrepe za povečanje njegove trajnosti.

Zaščito lesa kot znanstveno vedo poznamo šele dve stoletji. To pa ne pomeni, da se ljudje z zaščito lesa niso ukvarjali že prej. Začetke zaščite lesa bi lahko našli pri Egipčanih in Kitajcih. Tem so sledile vse civilizacije.

2.2.2 Kemična zaščita lesa

Kemična zaščita lesa pomeni vnašanje najrazličnejših kemičnih sredstev v les z namenom, da bi ga zaščitili pred lesnimi škodljivci. Preventivno zaščitno sredstvo uporabljamo z namenom, da bi les čim dlje zaščitili pred okužbami. Uporabljamo ga pred napadom škodljivcev. Represivno zaščitno sredstvo uporabljamo za uničenje škodljivcev, ki so že napadli les. Kemično zaščito lesa lahko razčlenimo na (Kervina – Hamović, 1990):

- preventivno kemično zaščito lesa (v les vnašamo zaščitna sredstva, ko je le ta nepoškodovan in še ni v uporabi),
- naknadno kemično zaščito lesa (pomeni ponovno zaščito zdravega lesa),
- represivno kemično zaščito (zaščitna sredstva vnašamo v les, ki je že napaden z lesnimi škodljivci).

Zaradi varstva okolja imajo nekemijski ukrepi zaščite lesa prednost pred kemijskimi. Če je zaščita s kemičnimi sredstvi nujno potrebna, naj jo bo čim manj in le tam, kjer brez nje ne moremo uspešno zavarovati lesa.

2.3 VPLIV KOVIN NA GLIVE

Raziskave o medsebojnem vplivu gliv in kovin so že zelo dolgo časa aktualna znanstvena tema. Kovine predstavljajo osnovno komponento večine sredstev, ki se uporabljajo za zatiranje gliv. Znanstveniki so pri kovinah najprej opazili fungicidne lastnosti. V današnjih časih pa prehajajo v ospredje študije tolerantnosti oziroma rezistentnosti gliv na določene kovine.

2.3.1 Razvrstitev in fungicidne lastnosti kovin

Kovine so posredno in neposredno vključene v rast gliv in njihov metabolizem. Nekatere kovine so za glive bolj pomembne (Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni) druge manj (Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg, Pb). Vendar se prav vse na nek način vključujejo v metabolizem celic. Toksičnost kovin se lahko kaže na različne načine. Kovine ali kovinski ioni lahko prizadenejo glivo v vseh stopnjah glivnega razvoja. Toksičnost kovin se kaže predvsem v blokiranju encimov, motenju transporta hranljivih snovi, odstranitvi in/ali zamenjavi pomembnih kovin, negativno vplivajo na membrane (Humar s sod., 1998).

Nad določeno koncentracijo delujejo vse pomembne in nepomembne kovine na glive toksično. Toksičnost je odvisna od vrste kovine in organizma ter od dejavnikov okolja. Toksičnost je navadno povezana s kovinami, ki so manj pomembne za rast gliv. Vendar ne smemo spregledati toksičnosti pomembnih kovin, kot je na primer kalcij, ki je nujno potreben za rast gliv, vendar pri prevelikih koncentracijah povzroča odlaganje fosfatov na celične stene (Gadd, 1993).

Fungicidna lastnost je odvisna od več dejavnikov: vrsta kovine, vrsta glive ter koncentracije posameznih kovin. Kovine najpogosteje učinkujejo na glive preko procesov s prostimi radikali, ki sprožijo verižno reakcijo depolimerizacije makromolekul. Prosti radikali nastopajo tudi pri normalnih metabolnih procesih. Aerobni organizmi zaradi tega vsebujejo zaščitne encime, ki preprečujejo depolimerizacijo. Ti encimi vsebujejo Mn, Fe, Cu ali Zn, ki uničijo proste radikale, nastale med metabolnimi procesi (Gadd, 1993).

2.3.1.1 Dejavniki, ki vplivajo na toksičnost kovin

Naravno okolje ali hranilno gojišče s svojimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi vpliva na toksičnost kovin. Take lastnosti so: pH rastišča, oksidativno-reduktivni potencial, prisotnost ostalih ionov (anionov in kationov) in prisotnost topnih organskih snovi.

pH vpliva na toksičnost kovin ter na fizikalne in metabolne lastnosti celice. Povečanje pH vrednosti se odraža v tvorjenju in obarjanju kovinskih hidroksidov in oksidov. Vrednost pH, pri kateri se tvorijo kovinski oksidi in hidroksidi, se med kovinami razlikuje.

Oksidativno-reduktivni potencial (E_h) vpliva na toksičnost kovin. Od E_h je odvisno, v kakšni obliki bo kovina. Na primer: krom se lahko pojavlja kot Cr(VI) ali kot Cr(III). Kromov Cr(VI) ion je veliko bolj toksičen za glive in ostale organizme, kot Cr(III).

Anorganski ioni vplivajo na toksičnost z ustvarjanjem anorganskih kompleksov. Na primer: povečanje števila Cl⁻ anionov zmanjšuje toksičnost Cd za različne organizme in glive.

Minerali gline lahko adsorbirajo kovinske katione in s tem zmanjšajo njihovo potencialno toksičnost.

Netopne organske snovi v okolju ali v ravnem gojišču zmanjšujejo toksičnost kovine.

2.3.1.2 Baker kot pomemben element za zaščito pred glivami

Baker je eden izmed sedmih mikroelementov, ki so pomembni za pravilno delovanje višjih rastlin (Pohleven s sod., 1999). Je dokaj pogosto udeležen element v zemeljski skorji. Je prehodni element s tremi oksidacijskimi števili: (Cu⁰, Cu(I) in Cu(II)). Oblika, v kateri bo element nastopal in njegova biološka dostopnost je odvisna od mnogih faktorjev kot so: pH, redoks potencial, vrste tal in sedimentov, trdota vode in prisotnosti organizmov (Flemming in Trevors, 1989).

Baker je zelo pomemben za številne metabolne procese prokariotov in evkariotov. Poznanih je vsaj trideset encimov v katerih nastopa atom bakra. Veliko bakrovih spojin je zaradi svoje dobre topnosti lahko dostopnih biološkim organizmom. Nekateri ostali elementi so biološko nedosegljivi, ker so redki ali so slabo topni.

Za sesalce je baker relativno malo toksičen, medtem ko je v razmeroma majhnih koncentracijah zelo toksičen za ribe ter nižje organizme, kot so bakterije, alge in tudi glive (Pohleven s sod., 1999).

Toksične lastnosti bakrovih spojin so ljudje poznali že več stoletji. Uporabljali so jih kot preprečevalno sredstvo pri bakterijskih okužbah rastlin in kot algicid (Humar s sod., 1998). pH substrata ima velik vpliv na toksičnost bakra. Baker bo pri nižjih vrednostih manj toksičen kot pri višjih (Humar in Pohleven, 2000).

Zadnja desetletja se je poraba bakra zelo povečala. Leta 1968 je svetovna poraba bakra znašala $5,9 \times 10^6$ ton, leta 1985 že $8,3 \times 10^6$ ton (Flemming in Trevors, 1989). V nekdanji vzhodni Nemčiji se je za zaščito lesa na leto porabilo 1000 ton kromovih in 600 ton bakrovih spojin (Stephan s sod. 1996). Razlogov za tako masovno porabo bakra kot zaščitnega sredstva je več (Pohleven s sod., 1999):

- bakrove spojine so za človeka relativno netoksične,
- zadovoljivo deluje proti škodljivcem,
- njihova uporaba še ustreza strogim naravovarstvenim predpisom,
- je sorazmerno poceni.

2.3.1.3 Tolerantnost gliv na baker

Težke kovine v zemlji delujejo kot stresni faktor, ki zavira fiziološke procese, ali celo popolnoma ustavi rast organizmov, kot so rastline in glive. Nekateri organizmi so se nanje prilagodili in dosežejo odpornost na težke kovine ali tolerantnost. Opazili so, da so se zelene alge sposobne prilagoditi, kar pa ne bi mogli trditi za višje rastline (Wu in Lin, 1990) in glive.

Gadd (1993) je tolerantnost označil kot sposobnost organizma, da preživi zaradi svojih biokemičnih in fizioloških lastnosti ali genetskih prilagoditev, v naravnem okolju ali v laboratorijskih pogojih, ne glede na prisotnost toksičnih kovin.

Dejstvo je, da določeni organizmi uspejo preživeti tudi v onesnaženih ekosistemih. Odpornost nekaterih organizmov na baker je znana že kar precej časa (Collet, 1992, Humar in Pohleven, 2000, Humar s sod., 2000,), vendar je mehanizem tolerance še vedno nepojasnjen (Sutter s sod., 1983; Tsunoda s sod., 1997; Humar in Pohleven, 2000,). Znanstveniki poročajo, da so mnoge vrste gliv iz skupine prostotrošnic pokazale odpornost na baker in bakrove soli (Collet, 1992). Omeniti velja tudi razliko v tolerantnosti na baker in bakrove spojine med glivami bele in rjave trohnobe. Glive rjave trohnobe izkazujejo večjo tolerantnost kot glive bele trohnobe. Vzroke za to, bi lahko iskali v večji količini izločene oksalne kisline. Izpostavili bi lahko rod hišnih gob - *Antrodia* (prej *Poria*) (Tsunoda s sod., 1997) in rod *Serpula* (De Groot in Woodward, 1999). Glive iz teh rodov so se izkazale za izredno odporne (De Groot in Woodward, 1998). Znanstveniki poročajo, da se razlike v tolerantnosti gliv ne pojavljajo le pri različnih vrstah gliv, temveč tudi med različnimi sevi (izolati) neke vrste (Collet, 1992; Tsunoda s sod., 1997; De Groot in Woodward, 1999). Collet (1992) poroča o razlikah v tolerantnosti med različnimi sevi gliv *Postia placenta* in *Antrodia xantha*.

2.3.1.3.1 Možni vzroki za tolerantnost gliv na baker

Tolerantnost nekaterih gliv na baker je poznana že dolgo časa Collet (1992) poroča o tolerantnosti glive *Antrodia vaillantii* na baker pri 0,32 mol/L koncentraciji bakra v PDA. Izolirani so bili številni tolerantni sevi gliv iz zaščitenega lesa. Tolerantnost gliv pa se ne pojavlja le na baker, temveč tudi na bolj kompleksne zmesi z bakrovimi spojinami kot sta CCA in CCB (Sutter s sod., 1983). Najpogosteje se kot tolerantne glive omenjajo povzročiteljice rjave trohnobe iz rodu *Antrodia*.

Zelo zanimivo je, da so nekateri izolati glive *Antrodia vaillantii* zelo tolerantni na bakrove spojine, medtem ko so nekateri izrazito netolerantni in se njihova rast zaustavi že pri zelo nizkih koncentracijah bakra.

Tolerantnost gliv je v veliki meri odvisna od morfoloških značilnosti posamezne vrste, njihovega prilagajanja na kovine, genetskih sprememb ter od vrste in sestave pripravka, ki ga uporabljamo za zaščito lesa (Humar in Pohleven, 2000). Na toksičnost bakra vplivajo mnogi kemični in biološki učinki kot so: pH, E_h , temperatura, vlaga, slanost in prisotnost ostalih kovinskih ionov. Izmed vseh naštetih sta najbolj pomembna pH in E_h (Flemming in Trevors, 1989). Illman in Highley (1996) sta v svojih raziskavah ugotovila, da nižanje pH substrata (s 6 na 2) povzroči večjo tolerantnost gliv na baker pri glivah povzročiteljicah rjave trohnobe.

Oksalna kislina igra verjetno zelo pomembno vlogo pri tolerantnosti gliv na bakrove spojine (Akamatsu s sod., 1994). Dokazano je namreč, da številne glive rjave trohnobe izločajo konstantno količino oksalne kisline in s tem zakisajo substrat (Takao, 1965; Micales, 1995). Znano je tudi, da oksalna kislina reagira z bakrom, kar povzroči nastanek v vodi netopnega bakrovega oksalata (Collet, 1992; Illman in Highley, 1996; De Groot in Woodward, 1999). Baker deluje fungicidno le, če je topen. S tem, ko glive spremenijo baker v bakrov oksalat, slednji postane za njih netoksičen (Humar in Pohleven, 2000). Številne raziskave so potrdile, da glive uspevajo na substratu, v katerem se nahaja bakrov oksalat (Sutter s sod., 1983).

Humar s sodelavci (2000) je s pomočjo elektronske paramagnetne resonance (EPR) opazoval transformacijo bakra v bakrov oksalat. Poroča, da v lesu, ki je bil predhodno zaščiten z bakrovim sulfatom, po izpostavitvi glivi *Antrodia vaillanti*, bakra v lesu ni več mogoče zaznati z EPR signalom. Enak signal se pojavi, če les zaščitimo z bakrovim sulfatom in ga nato obdelamo z oksalno kislino. Na podlagi teh raziskav navaja, da transformacija bakra v bakrov oksalat poteče v zgodnjih fazah okužbe lesa.

Stephanova s sodelavci (1995) poročajo, da se iz lesa, ki je bil zaščiten z CCA in okužen s tolerantno glivo izpere 90 % kroma, 80 % arzena in le 7 % bakra. Večina bakra zreagira z oksalno kislino in se pretvori v slabo topen bakrov oksalat. V naslednji fazi se lahko les obdela z vodno raztopino amonijaka, ki pretvori netopen bakrov oksalat v topno stanje (Leithoff in Peek, 1998). Deleži izpiranja se pri zaščitnem sredstvu CCB niso razlikovali od deležev izpiranja pri zaščitnem sredstvu CCA.

Zanimivo je, da so glive bele trohnobe manj odporne na povečane koncentracije bakra kot glive rjave trohnobe. Ta pojav bi verjetno lahko razložili z akumulacijo bakra v micelij glive. Glive bele trohnobe kopičijo v miceliju precejšnje količine bakra, medtem ko glive rjave trohnobe s selektivnim sprejemanjem določenih mineralov, dosežejo manjše

kopičenje bakra (Pohleven s sod., 1999). Ta pojav bi lahko pojasnili z dejstvom, da glive bele trohnobe izločajo manj oksalne kisline.

Možna razlaga tolerantnosti gliv na kovine bi lahko bila tudi navzem in transport bakra po miceliju glive. Vendar je Pohleven in sodelavci (1999) dokazal, da glive rjave trohnobe niso sposobne navzema in aktivnega transporta bakra po miceliju glive. V nasprotju s to tezo pa so ugotovili, da glive ki povzročajo belo trohno, vsebujejo večje količine bakra v miceliju.

Tolerantnost nekaterih sevov gliv bi lahko pojasnili s pretvorbo bakra v bakrov oksalat, vendar to zagotovo ni edini mehanizem.

2.4 UPORABA TOLERANTNIH GLIV V BIOTEHNOLOŠKIH PROCESIH

V svetu narašča skrb o odstranitvi že odsluženega zaščitenega lesa. V razvitih evropskih državah predstavlja odslužen zaščiten les poseben odpad, ki zaradi tehničnih problemov in naravovarstvenih predpisov ni bil vključen v industrijsko reciklažo lesa (Yang in Illman, 1999).

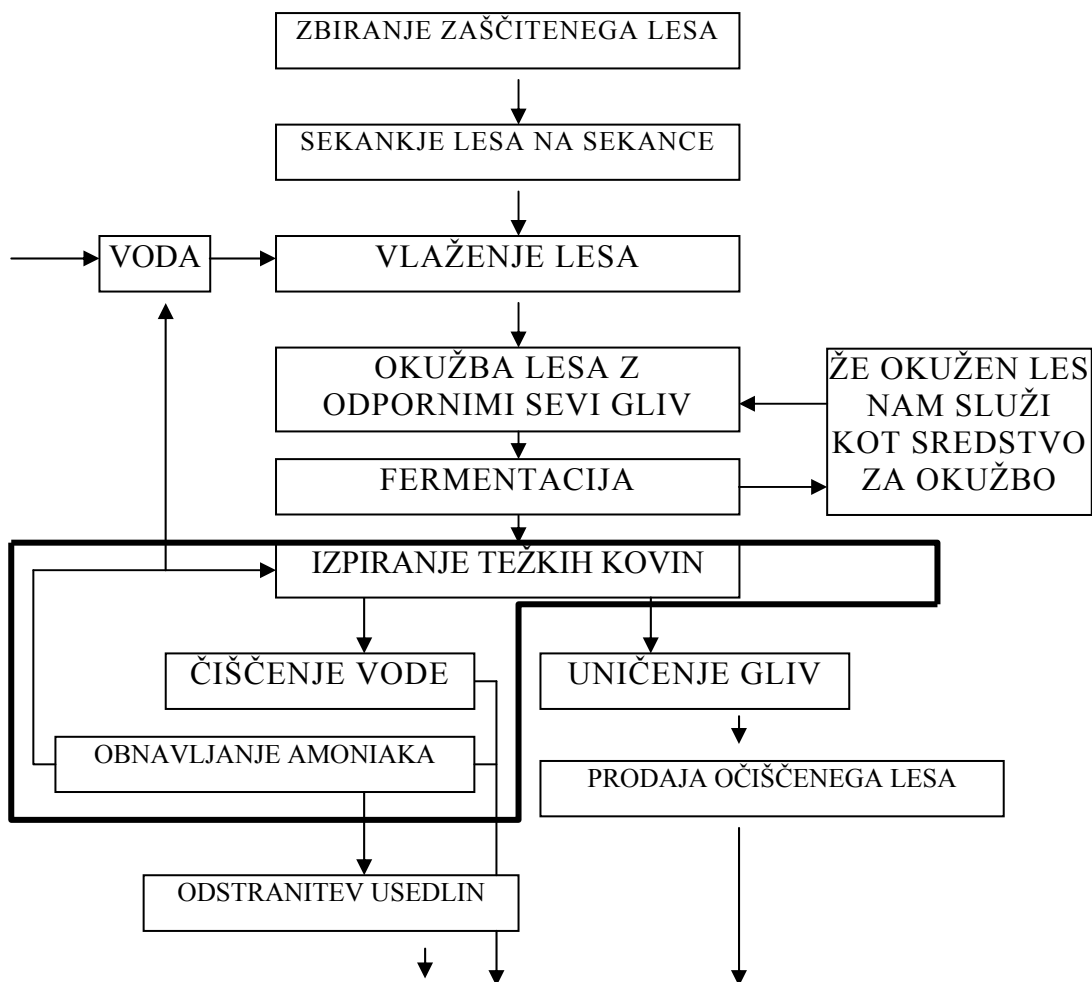
Raziskave so pokazale, da bo do leta 2015 količina odpadne zaščitenih hlodovine narastla na 130.000 m³. Inštalirana moč posebne sežigalne naprave za to količino bi znašala 20 MW. Izračuni so pokazali, da bi bila lahko reciklaža zaščitenega lesa tudi ekonomsko opravičljiva (Syrjanen, 1999).

Pojav tolerantnosti nekaterih gliv bi lahko koristno uporabili za razstrupljanje že zaščitenega odsluženega lesa. Odsluženega zaščitenega lesa se ne sme uporabljati za kurjavo ali odlagati na deponije. Pri običajnem sežiganju se v ozračje sproščajo škodljive snovi v obliki dimnih plinov in pepela. To velja predvsem za zaščiten les, ki je zaščiten s CCA solmi. Pri sežiganju lesa baker in krom ostaneta v pepelu, medtem ko se večina arzena (60 - 90 %) izloči v dimne pline.

2.4.1 Možnosti uporabe tolerantnih sevov gliv v praksi

V preteklih letih se je v literaturi pojavilo nekaj člankov o biološkem čiščenju zaščitenega lesa. Ti procesi so bili narejeni za odstranjevanje organskih in anorganskih zaščitnih sredstev. Dejstvo je, da so vsa poročila in rezultati teh poskusov temeljili le na laboratorijskih raziskavah. Vprašanje je, kako bi se te metode obnesle v praksi (Leithoff in Peek, 1998).

Leithoff in Peek (1998) sta predlagala naslednji model za razstrupljanje zaščitenega lesa. Uporabila sta les zaščiten s CC in CCB zaščitnima sredstvoma. Za biotehnološki postopek razstrupljanja pa sta uporabila glivi *Antrodia vaillantii* in *Tyromyces placenta* (slika 6).



Slika 6: Shema predlaganega procesa za detoksifikacijo zaščitenega lesa s CC, CCA in CCB zaščitnim sredstvom (Leithoff in Peek, 1998)

Pri svojem poskusu sta ugotovila, da sta glavna problema v postopku bioremediacije zagotavljanje ustrezne vlažnosti in nesterilni pogoji. Pri neustrezni vlažnosti je gliva slabo rastla ali celo prenehala z rastjo. Postopek bioremediacije je potekal v nesterilnem okolju. Zato so se poleg gliv na odpadnem lesu pojavile še kulture bakterij, ki pa so v celoti inhibirale rast gliv.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Glive, odporne na bakrove biocide, so zanimive zaradi dveh znanstvenih vidikov. Prvič če bomo natančno spoznali njihove mehanizme tolerantnosti bomo lahko razvijali bolj učinkovita zaščitna sredstva. Drugi razlog pa je, da bi bilo mogoče glive odporne na baker uporabljati pri biorecikliranju lesa prepojenega z bakrovimi pripravki z uporabo pri postopkih bioremediacije in biokonverzacije.

Biotehnološki proces kot je bioremediacija ali biokonverzacija z CCA prepojenega lesa v splošnem potrebuje cenen hranilni vir. V tem eksperimentu se bo uporabljal relativno poceni in takoj uporabna koruzna omakalna vodica (CSL).

Glive, kot ostali organizmi potrebujejo osnovne količine dušika za sintezo proteinov in ostalih celičnih sestavin. (Zabel and Morrell, 1992). V diplomski nalogi želimo osvetliti, kako prisotnost z dušikom bogate snovi vpliva na rast in razkrojne sposobnosti gliv odpornih na baker in prav tako gliv občutljivih na baker v odnosu z lesom prepojenim z bakrovimi pripravki.

Prav tako je vpliv dušika na rast in razvoj gliv pomemben tudi z vidika zaščite lesa, saj nekaj najnovejših pripravkov vsebuje tudi amine (Cao and Kamdem, 2004)

Diplomsko delo je potekalo v treh delih:

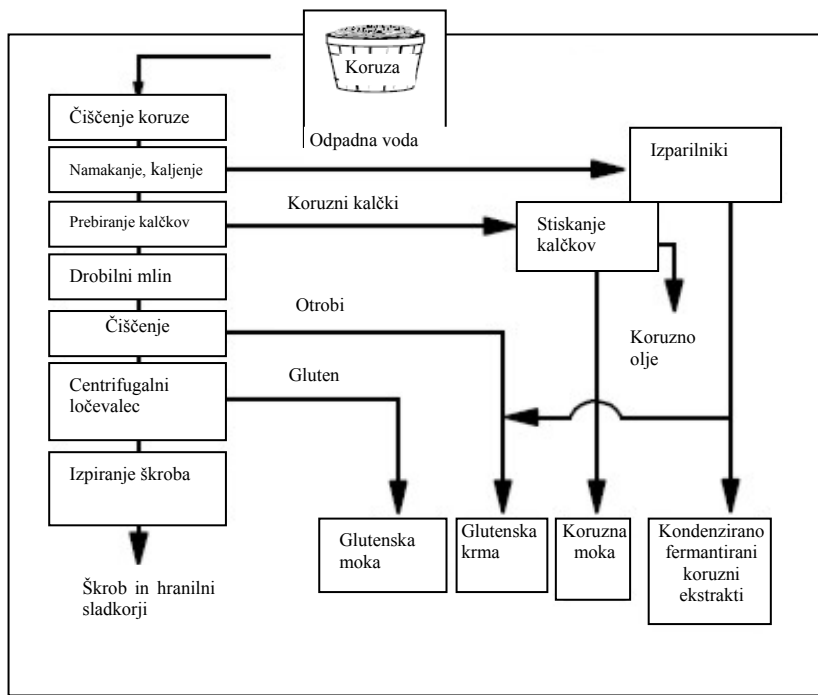
- priprava kulture za cepitev,
- določanje vpliva CSL na fungitoksičnost bakrovih spojin s testom na hranilni podlagi
- določanje vpliva CSL na odpornost impregniranega lesa na glive v skladu z mini-blok metodo

Pri poskusih smo uporabili naslednje laboratorijske pripomočke: analitsko tehtnico, epruvete, stojalo za epruvete, petrijevke, čaše, merilni valj, stekleno palčko, pipeto, spatulo, 25 mL bučke, špiritni gorilnik, eksikator, folijo, papir, avtoklav, laminarij, sušilnik, digestorij, rastno komoro, magnetni mešalnik, magnet. Za izvedbo poskusov smo potrebovali koruzno omakalno vodico (CSL), krompirjev dekstrozni agar (PDA, Difco), zaščitni pripravek Silvanol G (na osnovi CCB), destilirano vodo. Za osebno zaščito smo uporabljali zaščitno haljo in rokavice.

3.1.1 Koruzna omakalna vodica (CSL)

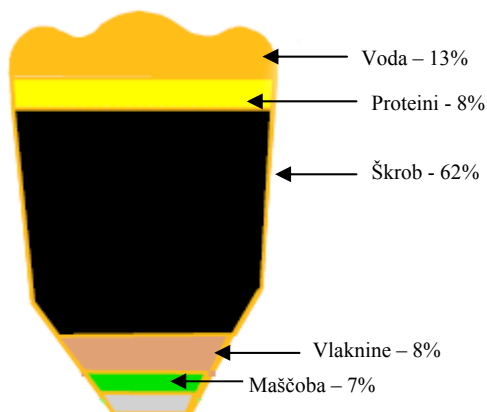
Koruzna omakalna vodica (CSL) je poceni in stranski proizvod industrije za predelavo koruze. Je koncentrat različnih, delno fermentiranih koruznih raztopin (slika 7):

CSL je stranski proizvod mokrega mletja koruze.

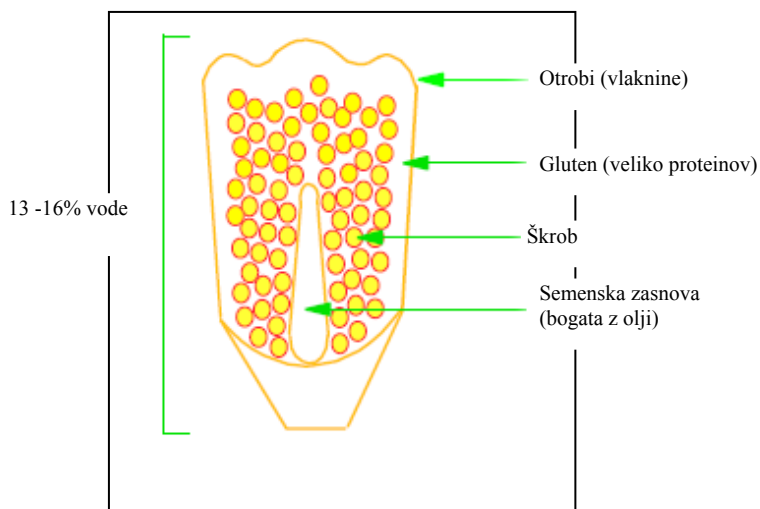


Slika 7: Proces predelave koruznih zrn

CSL se uporablja v več biotehnoloških procesih (Akhtar et.,1997). CSL je koncentrat raznih koruznih raztopin, bogat s proteini in peptidi (20 – 25 %), amino kislinami, mlečna kislina (7 – 9 %), minerali, vitamini in drugimi rastnimi hormoni. Vrednost pH koruzne omakalne vodice je okoli 4. Vsebuje 50 do 60 % trdnih delcev. Približno 90 % dušika v CSL-ju je v obliki amino spojin, 95 % ga je prisotnega v peptidih in 5 % v prostih amino kislinah. Celotna koncentracija dušika v CSL-ju je odvisna od serije. V povprečju pa niha med 3 in 5 %.



Slika 8: Sestava koruznega zrna



Slika 9: Sestavine ki sodelujejo pri mokrem mletju koruze

3.1.2 Uporabljene lesne glive

Za poiskus smo uporabili naslednje seve gliv rjave in bele trohnobe (preglednica 3):

Preglednica 3: Uporabljene lesne glive

Gliva	Oznaka	Poreklo	Tolerantnost na baker*	Trohnoba
<i>Antrodia vaillanti</i>	Pv2	BF (ZIM L037)**	1	Rjava
<i>Postia placenta</i>	Pm2	BAM 102	3,5	Rjava
<i>Leucogyrophana pinastri</i>	Yf	Buckinghamshire Chilterns University College UK	2	Rjava
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Gt2	BF (ZIM L017)**	5	Rjava
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	Hf	BF (ZIM L108)**	5	Bela
<i>Trametes versicolor</i>	Tv	BF (ZIM L057)**	5	Bela

Vir: Raspor in sod., 1995

V nadaljevanju so podrobnejši opisi gliv uporabljenih v tem poizkusu.

Beli hišni gobi *Poria vaillanti* in *Poria monticola*



Slika 10: Micelij bele hišne gobe

Vrste gliv iz rodu bela hišna goba najdemo predvsem v severni in srednji Evropi. Okužujejo vlažen les iglavcev, redkeje listavce. Pojavljajo se kot razkrojevalke vgrajenega lesa in lesa, ki je v stiku z zemljo (v rudnikih in skladiščih).

Na okuženem lesu se na spodnji strani pojavi belo podgobje. Podgobje se širi kot pozimi ledene rože na oknih. Iz podgobja se razvijejo beli rizomorfi, ki so lahko debeli do 4 mm. Rizomorfi ostanejo beli in prožni tudi, ko goba ostari. Z rizomorfi goba prodira skozi stene. Trosnjaki so različno veliki in priraščajo na les kot blazinice. Na vodoravni površini je trosovnica obrnjena navzgor. Barva trosnjakov se s starostjo spreminja. Mladi so beli, starejši so pri *Antrodia vaillantii* rumenkasti, pri *Poria monticola* pa slamnato rumeni do opečnato rdeči. Trosovnico sestavljajo cevčice nepravilnih oblik. Bazidij z ledvičastimi bazidiosporami se razvije na himeniju. Troso so pri *Poria monticola* cilindrični do elipsoidni, pri *Antrodia vaillantii* pa elipsasto ovalni ter malce večji.

Bela hišna goba raste najintenzivneje pri temperaturi 27 °C in okoli 40 % vlažnosti lesa. Pri optimalnih pogojih je lahko dnevni prirast gobe do 12,5 mm dnevno. Posebno ji prija vlaga, ki prodira v les v obliki vodnih kapljic. Zanimivo je, da lahko bela hišna goba zelo dobro prenaša izsušitev. Po nekaterih virih naj bi gliva še po petih letih sušnega obdobja zopet pričela z rastjo, vendar le, če je vlažnost lesa 40 %.

Bela hišna goba povzroča rjavo destruktivno trohnobo. Če se les okuži z belo hišno gobo, zelo hitro izgublja upogibno trdnost. Zanimivo je, da se udarna trdnost močno zmanjša že takrat, ko komaj zaznamo izgubo mase. Veliko škodo povzroča predvsem na tehničnem lesu. Bela hišna goba – *Antrodia vaillantii* predstavlja velik problem, saj v zadnjih letih v evropskih državah opažajo, da okuži in razkrajja tudi les, impregniran s CCA in CCB pripravki in se uporablja v stiku z zemljo. Naš izolat Pv₂ velja za bolj tolerantnega kot Pm₂.

Navadna tramovka – *Gloeophyllum trabeum*



Okužuje tako iglavce (smreka, bor) kot listavce (bukev, robinija, cipresa). Najdemo jo predvsem na ostrešjih, mostovih, okenskih okvirih, podbojih, lesu v savnah, na zunanjih talnih oblogah, včasih tudi na drogovih, pragovih, v rudikih, na balkonskih ograjah, ... (slika 11).

Slika 11: Trosišče navadna tramovke

Optimalna temperatura za razvoj glive je 35 °C, maksimalna pa celo nad 40 °C. Vitalni trosnjaki so v začetku temno rumene barve. Lamela in pore imajo nepravilno obliko in razpored. Trosi so brezbarvni in cilindrični. V suhem stanju ohranijo kalivost tudi več kot leto dni. Goba povzroča temnorjavo, prizmatično trohnobo, in je zelo pogosta in nevarna razkrojevalka gradbenega in stavbnega lesa.

Leucogyrophana pinastri (Yellow fungus)

Leucogyrophana pinastri je gliva, ki tudi povzroča rjavo trohnobo. Ime Yellow fungus je dobila po svoji živo rumeni barvi podgobja, po katerem je prepoznavna. Uporabljeni sev je toleranten na bakrove spojine. Izolat izhaja iz Kanade. Izoliran je bil iz lesa zaščitenega s CCA pripravkom.

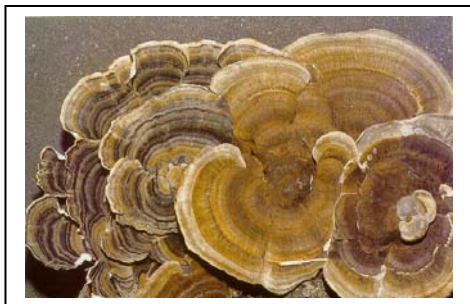


Gliva je po delovanju podobna sivi hišni gobi. Najpogosteje jo najdemo v starih stavbah, zunaj stavb je tako rekoč ni. Okužuje les iglavcev in listavcev. Razvija se lahko tudi na suhem lesu. Gliva *L. Pinastri* v Sloveniji še ni znana (slika 12).

Slika 12: Micelij glive *L. Pinastri* na zidu

Pisana ploskocevka - *Trametes versicolor*

Trametes versicolor (Tv) ali pisana ploskocevka sodi med najbolj razširjene glive in povzroča belo korozivno trohnobo in piravost. Okužuje predvsem les listavcev (bukev, hrast, kostanj), redkeje pa les iglavcev (bor, smreka). Najdemo jo na štorih, že odmrlih stoječih drevesih, hlodovini, drogovih, železniških pragovih... Pri manj odpornih vrstah okužuje tudi jedrovino, čeprav jo po večini najdemo predvsem v beljavi (slika 13).



Slika 13: Trosišče pisane ploskocevke

Klobuk je pahljačaste konzolne oblike in vseh mogočih barv (od tod tudi ime). Himenij je sprva bel, s starostjo pa postaja siv. Spore so brezbarvne in cilindrične oblike. Optimalni pogoji za rast te glive so pri temperaturi 30 °C in lesni vlažnosti okoli 45 %.

Gliva razkraja lignin in delno tudi celulozo. Okužbo prepoznamo po belih pegah na površini lesa, v zadnji fazi pa les postane bel in precej lahek. V gozdu povzroča veliko škodo, saj reciklira minerale in nitrata v lesu, le-ti pa so pomembni za rast novih rastlin.

Ogljena kroglica - *Hypoxylon fragiforme*

Ogljena kroglica je ena redkih vrst gliv, ki povroča belo trohnobo in spada med zaprtotrošnice. Je zelo pogost primarni saprofit bukve in drugih listavcev. Na lesu povzroča piravost, to je netipična bela mozaična trohnoba oz. temnenje lesa v pasovih, ki so med seboj ločeni s temnimi črtami. Trosnjaki iz stom so čvrsti in v obliki trdnih kroglic, premera 2 – 7 mm.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava hranilnega gojišča

Kot hranilni medij smo uporabili krompirjev glukozni agar (PDA - potato dextrose agar - DIFCO Laboratories). Hranilno gojišče smo pripravili po navodilu proizvajalca. V 0,1 litru destilirane vode smo raztopili 39 g PDA v prahu ter vse skupaj premešali. Ostalo količino destilirane vode (0,9 L) smo zavreli in vanjo stresli mešanico vode in PDA. Raztopino smo vseskozi mešali, saj se ne sme prijeti in prismoditi. Po 20 mL vročega, še nestrjenega hranilnega medija smo odmerili v epruvete. Pri tem smo si pomagali z avtomatsko pipeto. Epruvete smo zaprli z aluminijasto folijo in jih postavili v stojalo. Stojalo smo zavili v papir, ki je po avtoklaviranju preprečeval možnost okužbe pri prenosu iz avtoklava do brezprašne komore. Vsa v papir zavita stojala smo vložili v avtoklav (slika 14) in vsebino sterilizirali 30 minut pri temperaturi 121 °C. Takoj po avtoklaviranju smo epruvete prenesli v laminarij (slika 15) in PDA gojišče prelili v petrijevke.



Slika 14: Avtoklav (Foto: Aleš Malnarič)



Slika 15: Laminarij za sterilno delo
(Foto: Aleš Malnarič)

3.2.2 Priprava izhodiščnih kultur

Izolate gliv smo vzeli iz glivne banke, kjer so shranjeni v parafinu in so v stanju dormance. Pred uporabo smo izolate večkrat precepili in jih na ta način smo jih aktivirali. Med raziskavo smo jih še večkrat precepili in jih tako vzdrževali aktivne in vitalne.

Z izbrano kulturo gliv smo inokulirali sterilna hranilna gojišča v petrijevkah. Inokulacijo smo opravljali v laminariju pri sterilnih pogojih. Ves pribor smo sproti razkuževali z alkoholom in plamenom. Po opravljeni inokulaciji smo petrijevke postavili v rastno komoro (temperatura: 25 °C, relativna zračna vlažnost: 85 %) (slika 16). Po preteku enega do dveh tednov so glive dosegle primerno prerast, da smo jih lahko uporabili kot izhodiščno kulturo za nadaljne eksperimente.



Slika 16: Rastna komora (Foto: Aleš Malnarič)

3.2.3 Mešanje hranilnega gojišča s koruzno omakalno vodico

Pred izvedbo samega poiskusa smo opravili test strjevanja agarja z dodanim CSL. V še vroče sterilno hranilno gojišče smo dodali od 1 do 10 % steriliziranega CSL, vodno raztopino bakrovega(II) sulfata in preverili, ali se takšno hranilno gojišče strdi. Zaradi slabih izkušenj, smo to želeli preveriti pred izvedbo glavnega poiskusa.

3.2.4 Določanje odpornosti gliv na Cu s presejalnim testom na hranilni podlagi

Poskus na hranilni podlagi spada med presejalne teste. S tem testom smo v trdnem hranilnem gojišču hitro določili odpornost gliv na različne koncentracije bakra ob prisotnosti CSL.

Ves pribor, destilirano vodo in hranilni medij smo 30 minut avtoklavirali pri temperaturi 121° C. Kristalov bakrovega(II) sulfata pentahidrata nismo avtoklavirali, saj to, zaradi njegove toksičnosti, ni potrebno. Prav tako nismo sterilizirali pribora, ki je narejen iz plastike, saj bi se lahko na preveliki temperaturi uničil. Pribor, ki ga nismo avtoklavirali, smo v brezprašni komori sterilizirali pod UV lučjo in s kratkotrajnim obžiganjem s plamenom.

Vodne raztopine bakrovega(II) sulfata smo pripravili v laminariju. Zatehtano količino bakrovega(II) sulfata pentahidrata smo stresli v 25 mL bučko in dolili sterilizirano destilirano vodo. S pomočjo mešanja, segrevanja in dodatka žveplove(VI) kisline (največ do 0,3 mL) smo raztopili vse kristale.

Dobili smo bistro raztopino modre barve. Višja kot je bila koncentracija raztopine, bolj modre barve je bila raztopina.

Ustrezno zatehtano količino bakrovega(II) sulfata smo izračunali po naslednji formuli:

$$m = \frac{c \times V \times M}{w}$$

$$\left. \begin{array}{l} M(\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}) = 249,68 \text{ g/mol} \\ M(\text{Cu}) = 63,5 \text{ g/mol} \end{array} \right\} \rightarrow w = 63,5 \text{ g/mol} / 249,68 \text{ g/mol} = 0,25032$$

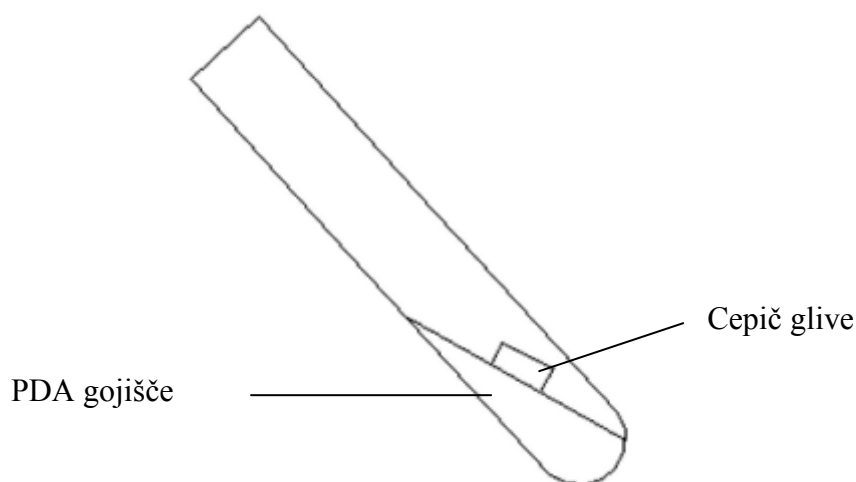
- c - koncentracija raztopine, ki jo dodamo v trdno hranilno gojišče [mol/L]
- V- volumen željene raztopine [mL]
- m - masa bakrovega sulfata [g]
- M - molska masa bakra [g/mol]
- w - masni delež

Pri pripravi najvišje koncentracije 0,025 mol/L, se bakrov(II) sulfat pentahidrat v destilirani vodi kljub dodani žveplove(VI) kislini in segrevanju ni več topil (preglednica 4). Koncentracijo 0,025 mol/L smo v hranilnem mediju dosegli tako, da smo v 10 mL PDA odpipetirali 0,25 mL raztopine s koncentracijo 0,01 mol/L. Na ta način smo zagotovili ustrezno koncentracijo.

Preglednica 4: Uporabljene koncentracije raztopin bakrovega sulfata za test na hranilni podlagi

Koncentracija bakra v hranilnem mediju (mol/l)	0,001	0,005	0,01	0,025
Koncentracija bakra v raztopini, ki smo jo dodali hranilnemu mediju (mol/L)	0,1	0,5	1	2,5
Količina pripravljene raztopine (mL)	25	25	25	25
Izračunana količina $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ [g] v vodni raztopini	0,2537	1,2684	2,5368	3,1710

Hranilni medij smo pripravili po enakem postopku, kot je že opisano v poglavju 3.2.1. Po končanem avtoklaviranju smo vsa stojala zložili v laminarij. V epruvete (10 mL) s še vročim hranilnim gojiščem, smo s pipeto vbrizgali po 0,1 mL ustrezne raztopine bakrovega(II) sulfata ter 0,1 mL ali 0,5 mL CSL, da smo na koncu dobili 1 ali 5 % koncentracijo CSL v hranilnem gojišču. V epruvete, ki so nam služile kot kontrole, bakrovega sulfata nismo dodali. Tako pripravljene epruvete smo čez noč pustili v brezprašni komori čez noč, da se je hranilni medij strdil. Položili smo jih na stojalo pod kotom 30°, saj smo s tem pridobili večjo površino za preraščanje in s tem boljše pogoje za opazovanje razrasti micelija (slika 17).



Slika 17: Epruveta, pripravljena za presejalni test

Za test na hranilni podlagi smo uporabili osnovne izolate gliv. Inokulirali smo jih na hranilno gojišče (PDA + CSL), ki smo mu dodali različne koncentracije zaščitnega sredstva (bakrov(II) sulfat pentahidrat - $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) ter različni koncentraciji CSL-ja (1 ali 5 % CSL).

Naslednji dan smo na strjeni hranilni medij vstavili cepič glive, ki je bil okrogle oblike s premerom 0,7 cm. Odvzeli smo ga s prej pripravljene osnovne kulture micelija. Inokulacijo smo opravljali pri sterilnih pogojih v brezprašni komori. Epruvete z inokuliranim hranilnim gojiščem, smo postavili v komoro pri temperaturi 25 °C in relativni zračni vlažnosti 85 %. Za vsako koncentracijo bakra in CSL smo pripravili pet epruvet ter pet epruvet, ki so služile kot kontrola.

3.2.5 Vizualno ocenjevanje rasti gliv na hranilnem mediju

Odpornost gliv na Cu smo določali na podlagi vizualne ocene priraščanja kulture micelija (preglednica 5). Med petimi kontrolnimi epruvetami smo izbrali tisto, ki je kazala povprečno rast in nam je služila za primerjavo. Prirast smo ocenili z ocenami od nič do pet. Ocena ena je pomenila, da micelij glive na testnem gojišču prirašča enako kot kontrola. Z oceno pet smo označili popolno inhibicijo rasti. Oceno nič smo uporabili, ko je gliva na gojišču z dodanimi kemikalijami rasla hitreje od gliv na kontrolnem gojišču, gojišču brez dodatkov. Z ocenjevanjem smo pričeli tretji dan po inokulaciji. Ocenjevali smo pet dni. Končna ocena je povprečje ocen vseh epruvet ene glive, zbranih v petih dneh.

Preglednica 5: Vizualne ocene priraščanja micelija gliv

Ocena priraščanja micelija	Opis
0	Micelij raste bolj kot kontrola
1	Raste enako kot kontrola-ni zaviranja rasti
2	Opazno je rahlo zaviranje rasti
3	Srednje zaviranje rasti
4	Močno zaviranje rasti
5	Popolna zaustavitev rasti - cepič ni obraščal

3.3 MINI BLOK METODA

Za mini blok test smo pripravili 300 smrekovih vzorčkov brez vidnih mehanskih poškodb, madežev, grč, smolnih kanalov... Dimenzije vzorcev niso standardizirane. Mi smo uporabili vzorce dimenzij $0,5 \times 1,0 \times 3,0$ cm. Metoda testiranja je podobna standardi metodi SIST EN 113 (1996). Pred impregnacijo je bilo potrebno vzorčke prebrati, obrusiti in oštevilčiti.

Vzorci so bili impregnirani v vakuumsko tlačni komori v skladu s postopkom polnih celic z 1 % ali 5 % raztopino CCB (Silvanol G, Slivaproduct). Ciljni suhi navzem zaščitnih pripravkov je bil 4 kg/m^3 za vzorce ki so bili impregnirani z 1 % CCB ter 19 kg/m^3 za vzorce impregnirane s 5 % raztopino CCB.

Po impregnaciji smo vzorcem določili navzem. Navzem je količina zaščitnega pripravka, ki jo les vpije pri postopku impregnacije. Določali smo ga gravimetrično [...1] s pomočjo tehtanja vzorčkov pred in po impregnaciji.

$$r^{(V)} = \frac{m_2 - m_1}{V} [\text{kg} / \text{m}^3]$$

[...1]

$r^{(V)}$ → celotni navzem zaščitnega pripravka v kg / m^3

m_1 → masa vzorca pred impregniranjem v kg

m_2 → masa vzorca po impregniranju v kg

V → volumen ne impregniranega vzorca v m^3

3.3.1 Vezava bakra ter prepojitev vzorcev s CSL

Po impregnaciji je bilo potrebno vzorce kondicionirati in s tem zagotoviti redukcijo kromovih učinkovin. V primeru nepopolne fiksacije, bi v lesu ostalo preč Cr(VI) ionov, ki so bistveno bolj strupeni, kot Cr(III) ioni in zato lahko zakrijejo toleranco gliv na baker. Prva dva tedna kondicioniranja so bili vzorci v zaprti komori, nato naslednji teden v pol zaprti in zadnji teden v odprti komori. Kondicionirani vzorci so bili tri dni pri na 75 °C z namenom dokončati vezavo aktivnih učinkovin v les. Sušene, kondicionirane vzorce smo nato 14 dni izpirali (umetno starali) v skladu s standardom EN 84 (ECS, 1994). S tem smo iz lesa izločili borove učinkovine in Cr(VI), ki bi lahko prekrila toleranco gliv na bakrove učinkovine. Dve tretjini suhih impregniranih vzorcev smo nato prepojili z 1 % ali 5 % raztopino CSL-ja. Prepojitev smo dosegli z vakuumiranjem. Pri tem je v les v povprečju prodrlo 270 kg/m³ vodne raztopine CSL. Po končanem postopku vakumiranja smo vzorce izpostavili sušenju za teden dni pred izpostavitvijo glivam. Tretjino vzorcev smo namesto z vodno raztopino CSL prepojili z destilirano vodo.

Vzorce ki smo kondicionirali ter sterilizirali smo izpostavili delovanju šestih različnih vrst gliv (preglednica 3) z uporabo mini blok metode (Pohleven s sod., 2000). Kulture gliv so priraščale na 3,9 % raztopini agarja (PDA, Difco).

3.3.2 Priprava in inokulacija hranilnega gojišča

Za hranilno gojišče smo uporabili krompirjev glukozni agar v prahu (3,9 % vsebina PDA). Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca kot je opisano v poglavju 3.2.1. Potrebovali smo hranilno gojišče za 100 petrijevke (15 mL/petrijevka), tako smo skuhalo količino 1600 mL gojišča. Ko je gojišče zavrelo, smo ga prelili v posebne steklenice in jih avtoklavirali 40 minut pri 1,5 bar. Sterilno gojišče smo nato predstavili v lamianrij oziroma brezprašno komoro, kjer smo ga prelili v plastične, sterilne petrijevke.

Pred inokulacijo je bilo potrebno pripraviti in sterilizirati še plastične mrežice. Te mrežice preprečujejo direkten stik vzorcev s hranilno podlago. Na ta način preprečimo preveliko navlaževanje vzorcev. Sterilne mrežice smo pred inokulacijo postavili na strjeno hranilno gojišče v petrijevkah.

Petrijevke s hranilnim gojiščem smo inokulirali v brezprašni komori in sicer tako, da smo z luknjačem v preraslo gojišče urezali cepiče in jih nato s špatulo prenesli v vnaprej pripravljene petrijevke. Bistvenega pomena je bilo, da smo tako mrežice, kot tudi vse ostale potrebne pripomočke sproti razkuževali (alkohol, gorilnik) ter s tem preprečili okužbo. Petrijevke z inokuliranim hranilnim gojiščem smo za deset dni postavili v rastno komoro z optimalnimi ravnimi pogoji (temperatura 25 °C, relativna zračna vlažnost 85 %).

3.3.3 Vstavljanje vzorčkov na okuženo hranilno gojišče

Vzorčke smo pred vstavljanjem na okuženo hranilno gojišče 24 ur sušili v sušilniku (103 ± 2 °C), zatem smo jim določili maso v absolutno suhem stanju. Pomembno je, da smo pred izpostavitvijo glivam s paro sterilizirali tako impregnirane, kot tudi neimpregnirane vzorce (1,5 bar, 20 min).

Sterilne vzorce smo izpostavili glivam v brezprašni komori in sicer po točno določenem zaporedju. V posamezno petrijevko nismo nikoli vstavili vzorcev, prepojenih z istim pripravkom in isto koncentracijo CSL. V posamezno petrijevko smo vstavili vzorčke prepojene s tremi različnimi koncentracijami in kontrolni neimpregniran vzorec. V tretjino petrijevok nismo izpostavili kontrolnih vzorcev. Taka razporeditev nam je omogočala večjo zanesljivost rezultatov. Razporeditve vzorčkov v obliki zvezde (slika 18) pa je omejila medsebojni vpliv vzorcev. Tako pripravljene petrijevke, smo nato za osem tednov postavili v rastno komoro (T = 25 °C; RH = 85 %).



Slika 18: Vzorci izpostavljeni glivi *T. versicolor*

3.3.4 Določanje izgube mase

Po osmih tednih smo petrijevke z vzorci vzeli iz rastne komore, podrli gojišča in očistili vzorčke. Vzorčke smo nato stehali in jih 24 ur sušili v sušilniku pri 103 °C. Absolutno težo suhih vzorcev smo stehali na 0,001 g natančno. Iz dobljenih podatkov smo določili izgubo mase po formuli [...2] in vlažnost [...3].

$$m_{\text{izgub}} = \frac{m_3 - m_5}{m_3} [\%]$$

[...2]

- m_{izgub} → izguba mase vzorca v %
 m_3 → masa zračno suhega lesa po impregnaciji v g
 m_5 → masa suhega okuženega lesa v g

$$u = \frac{m_4 - m_5}{m_5} [\%]$$

[...3]

- u → vlažnost vzorca v %
m₄ → masa vlažnega okuženega lesa v g
m₅ → masa suhega okuženega lesa v g

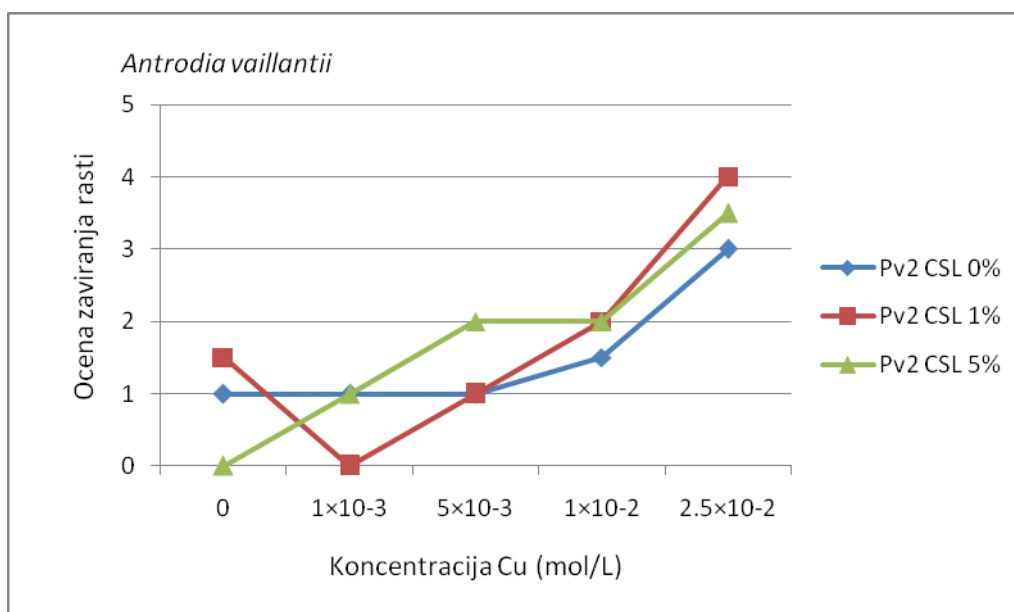
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRESEJALNI TEST

S presejalnim testom smo določili vpliv različnih koncentracij CSL-ja ter različnih koncentracij bakra na rast šestih preučevanih lesnih gliv. Pri različnih koncentracijah bakra ter CSL so izolati gliv izkazovali različno rast.

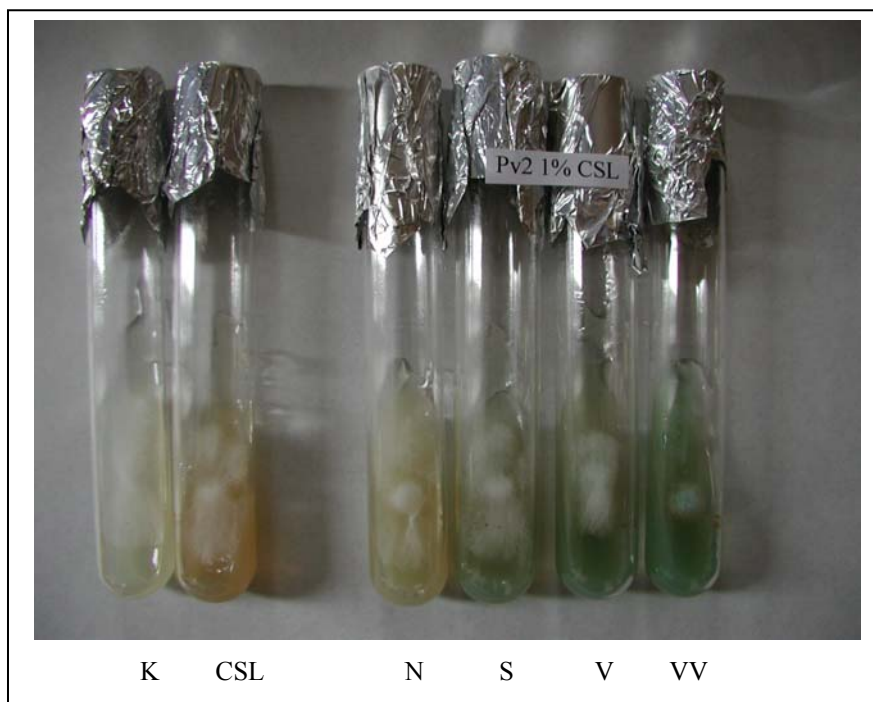
Izolat bele hišne gobe *A. vaillantii*, ki smo ga uporabili v tem eksperimentu (Pv2) je najtolerantnejši izolat na baker v zbirki industrijskih mikroorganizmov na Biotehniški fakulteti (Pohleven, 2002). To je razvidno tudi iz slike 19, kjer je prikazan vpliv različnih koncentracij Cu na rast glive *A. Vaillantii*.

Dodatek CSL-ja v hranilno gojišče, na ta tolerantni izolat ni imel izrazitega vpliva. Pri nižjih koncentracijah je CSL v nekaj primerih celo nekoliko spodbudil rast te glive (slika 20). Bistveno izrazitejši vpliv CSL-ja pa se je izrazil pri višjih koncentracijah, kjer je dodatek koruzne omakalne vodice celo zmanjšal tolerantnost tega izolata. To se najlepše vidi pri najvišji koncentraciji Cu v hranilnem gojišču, priraščanje glive *A. vaillantii* na gojšču brez dodanega CSL smo ovrednotili z oceno 3, med tem ko smo priraščanje istega izolata glive *A. vaillantii* na gojišču z 1 % koncentracijo CSL in $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L ocenili kot gojišče z močno zavrtjo rastjo (slika 19).



Slika 19: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata in CSL na rast glive *Antrodia vaillantii*

Nižji koncentraciji Cu (1×10^{-3} in 5×10^{-3} mol/L) nista imeli na rast glive nikakršnega vpliva. Prvi manjši znak zaviranja rasti opazimo pri 1×10^{-2} mol/L, med tem ko je bila rast glive pri najvišji koncentraciji ($2,5 \times 10^{-2}$ mol/L) močno zavrtja (slika 20).

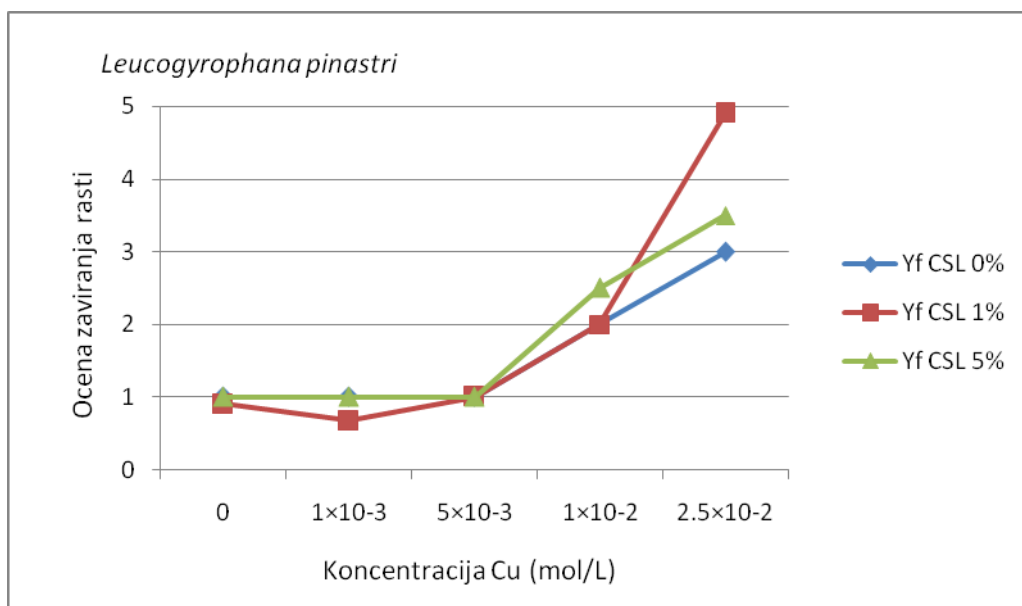


Slika 20: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata na rast glive *A. vaillantii* ob z dodatkom 1 % CSL

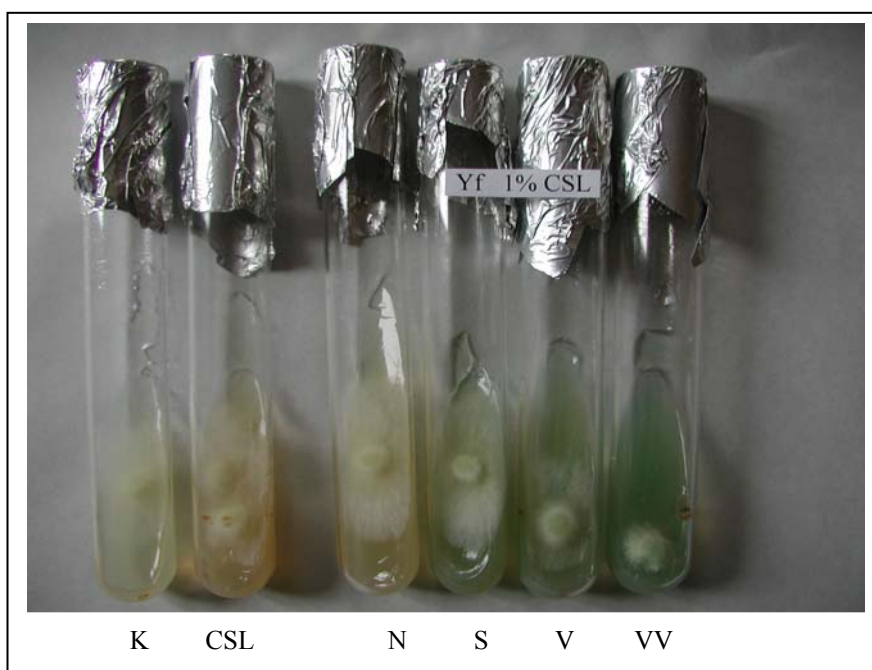
Podobno kot pri najbolj tolerantnem izolatu Pv2 glive *A. vaillantii* smo opazili tudi pri glivi *L. pinastri*. Nizke koncentracije Cu v hranilnem gojišču niso imele nikakršnega vpliva na rast tega izolata. Prve znake zaviranja opazimo pri koncentraciji Cu 1×10^{-2} mol/L, nekoliko izrazitejše zaviranje rasti pa pri koncentraciji $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L. Dodatek CSL je povečal občutljivost glive *L. pinastri* na Cu v hranilnem gojišču (sliki 21 in 22).

Ta vpliv je manj izrazit pri višji koncentraciji CSL (5 %) v hranilnem gojišču in nekoliko bolj pri nižji koncentraciji (1 %) (slika 21). Še posebej se povečana občutljivost glive *L. pinastri* na bakrove učinkovine odraža pri najvišji koncentraciji Cu v gojišču, kjer ob dodatku 1% CSL ta gliva ne raste več.

Ta rezultat nas je kar presenetil saj omejuje možnosti uporabe koruzne omakalne vodice v biotehnoških procesih razstrupljanja lesa. Do podobnih, vendar ne tako izrazitih rezultatov je prišla tudi Karabegovič (2005). Kljub obsežnim literaturnim podatkom, nam razlogov za negativni vpliv CSL na rast tolerantnih gliv ob prisotnosti Cu ni uspelo pojasniti.



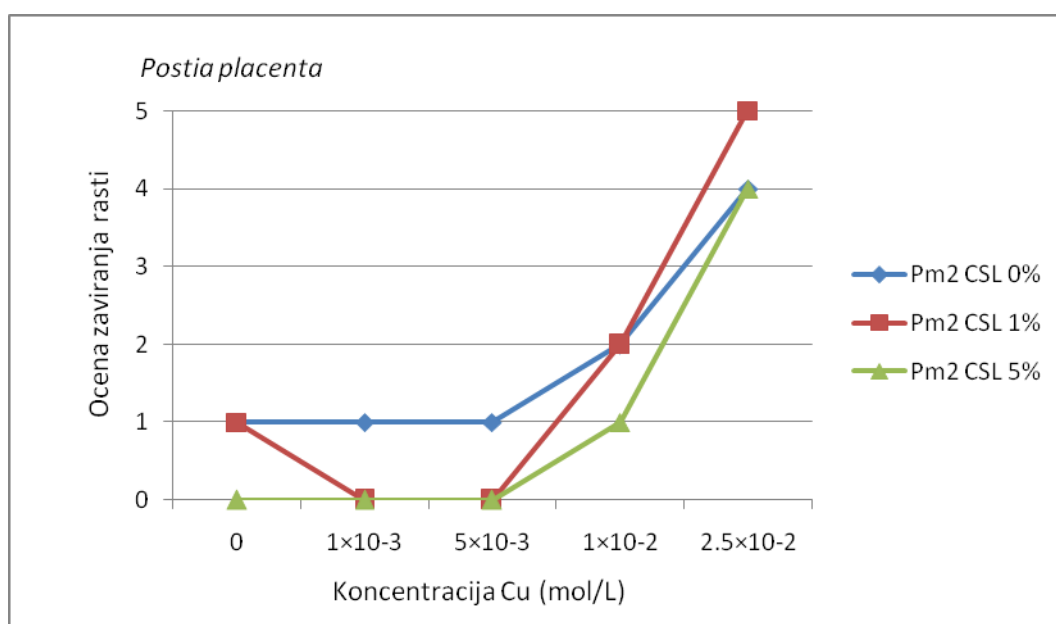
Slika 21: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata in CSL na rast glive *Leucogyrophana pinastri*



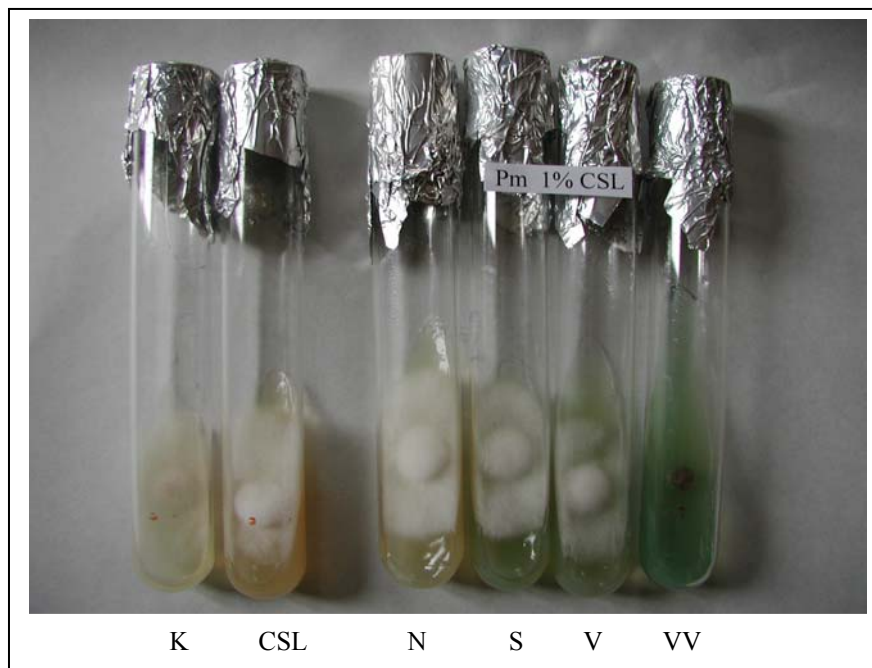
Slika 22: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata na rast glive *L. pinastri* ob prisotnosti 1 % CSL

Glivo *P. placenta* prištevamo k belim hišnim gobam. V primerjavi z izolatom Pv2 je ta gliva bolj dovzetna na baker, kar se dobro vidi tudi iz slike 24. Rast izolata Pm2 smo na hranilnem gojišču z najvišjo koncentracijo ocenili z 4, sorodni izolat Pv2 pa z oceno 3

Pri tem izolatu je nekoliko bolj kot pri izolatih *A. vaillantii* in *L. pinastri* prišlo do izraza, da CSL pri nižjih koncentracijah celo spodbuja rast te glive. Očitno izolatu *A. vaillantii* ustreza hranilno gojišče z višjo koncentracijo dušika, kot pa prej omenjenima glivama. Kakorkoli, dodatek CSL v gojišča z visoko koncentracijo Cu pa ne poveča tolerantnosti na Cu, temveč jo celo zmanjša podobno, kot smo poročali pri izolatih *A. vaillantii* in *L. pinastri*. Prisotnost nižje koncentracije CSL poslabša toleranco celo bolj kot višje koncentracije. Razlogov za poslabšanje rasti ob kombinaciji visoke koncentracije Cu in koruzne omakalne vodice pa ne znamo pojasniti (sliki 23 in 24).



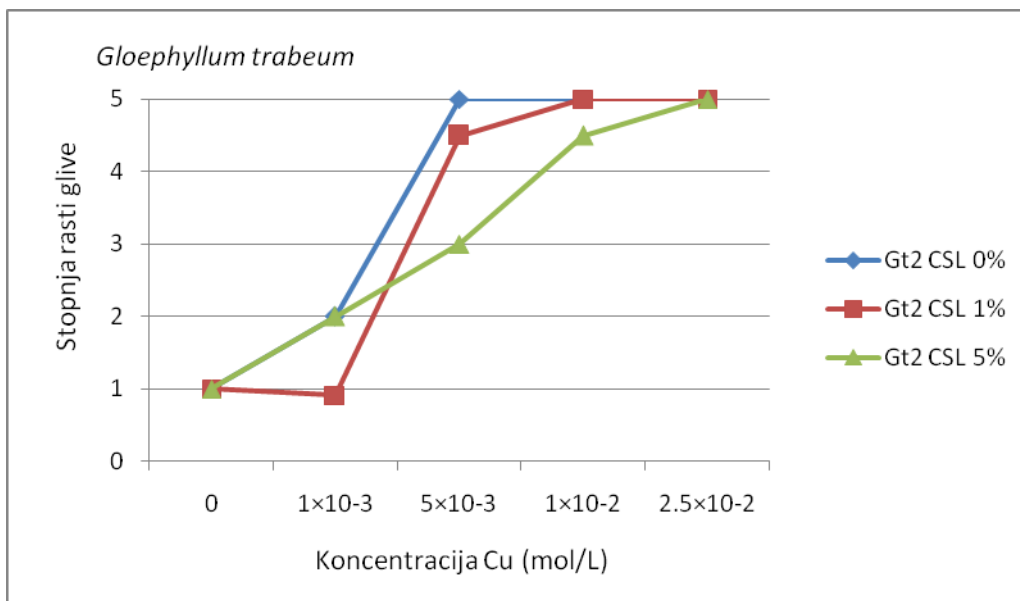
Slika 23: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata in CSL na rast glive *Postia placenta*



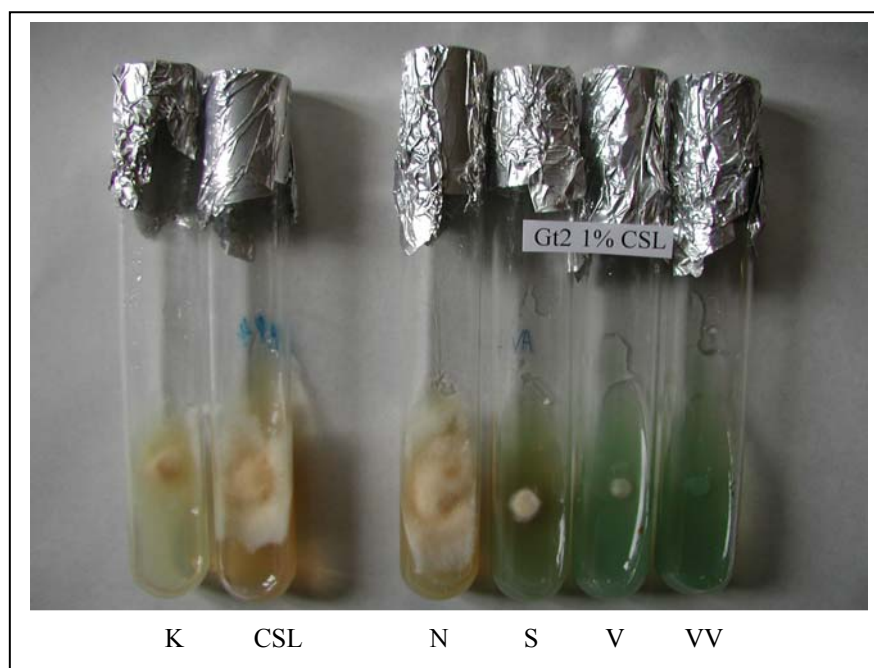
Slika 24: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata na rast glive *P. placenta* ob prisotnosti 1 % CSL

Gliva navadna tramovka spada med najpogostejše razkrojevalke lesa iglavcev. Znana je po tem, da njeno delovanje preprečijo že nizke koncentracije Cu. To se dobro vidi tudi iz slike 26. Glivo *G. trabeum* nekoliko zavre celo najnižja koncentracija Cu v hranilnem gojišču (1×10^{-3} mol/L), pri koncentraciji 5×10^{-3} mol/L pa ne raste več. V kolikor pogledamo vpliv te koncentracije na rast gliv *A. vaillantii*, *P. placenta* in *L. pinastri*, vidimo, da so vse te glive pri tej koncentraciji rasle brez kakršnikoli težav.

Zanimiv pa je vpliv CSL na fungitoksičnost bakrovih učinkovin. Za razliko od tolerantnih izolatov CSL poveča odpornost glive na bakrov sulfat v hranilnem gojišču (sliki 25 in 26). Minimalna inhibitorna koncentracija se ob prisotnosti CSL v hranilnem gojišču dvigne na 1×10^{-2} mol/L pri 1 % koncentraciji CSL v gojišču in $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L pri 5 % koncentraciji CSL v gojišču. Ta rezultat je zanimiv tudi s praktičnega stališča. Očitno prisotnost dušika zmanjša učinkovitost Cu, kar bi lahko povzročalo težave tudi v praksi, saj ima večina novejših bakrovih pripravkov dodan etanolamin za izboljšanje vezave v les (Humar s sod., 2004).

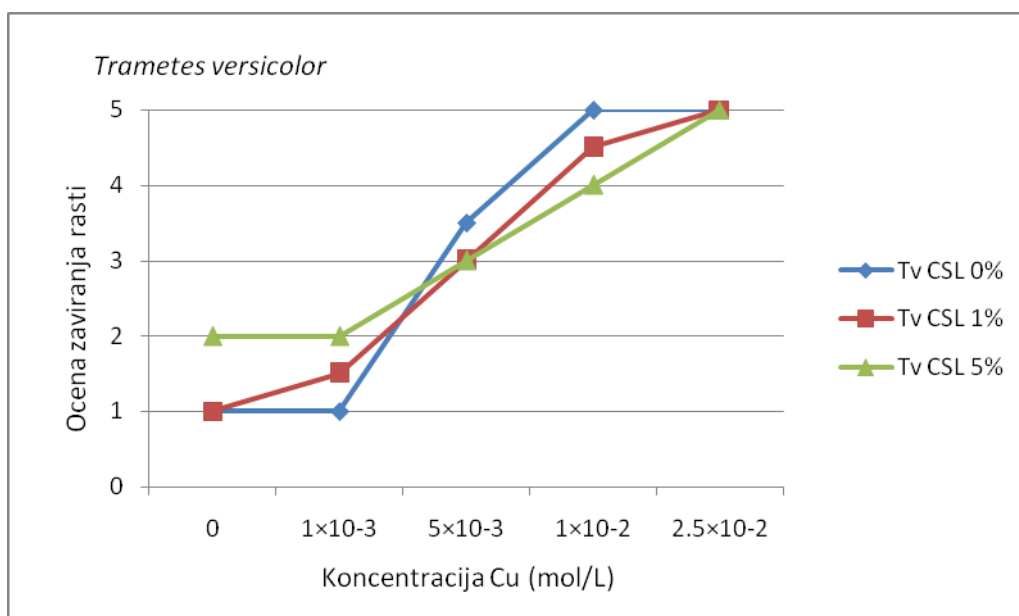


Slika 25: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata in CSL na rast glive *Gloeophyllum trabeum*

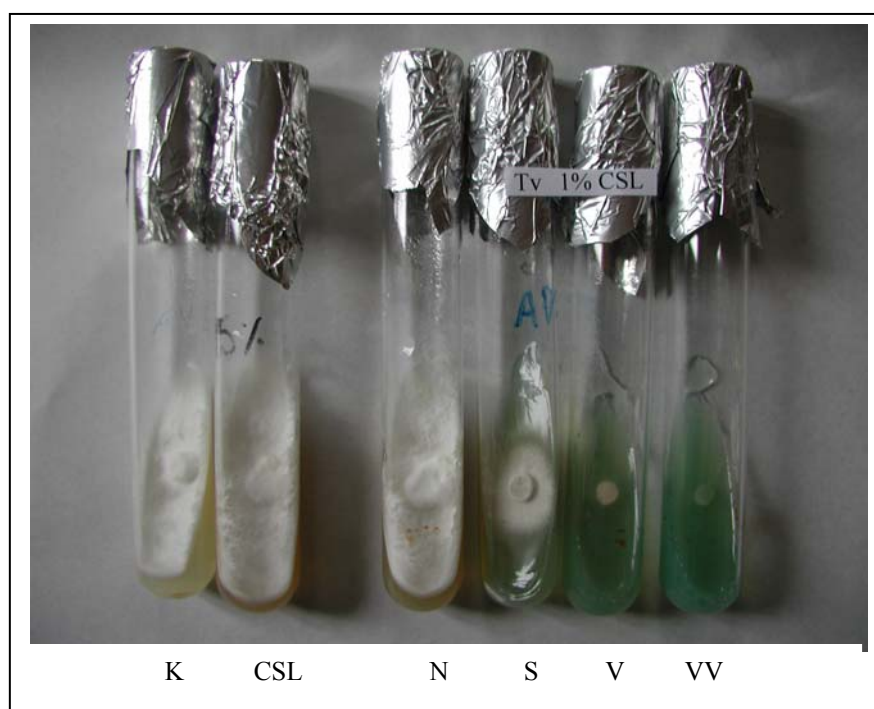


Slika 26: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata na rast glive *G. trabeum* ob prisotnosti 1 % CSL

Pisana ploskocevka (*Tv*) je tipična prestavnica gliv bele trohnobe. Ker ne izloča oksalne kisline je znana po tem da je občutljiva na bakrove pripravke (Amartey in sodel., 2003). To se odraža tudi iz naših podatkov. Gliva je na hranilnem gojišču z dodanim bakrom prenehala rasti pri koncentraciji 1×10^{-2} mol/L. Podobno kot pri na baker občutljivi glivi rjave trohnobe, *G. Trabeum* je tudi pri glivi *T. Versicolor* dodatek koruzne omakalne vodice povečal toleranco na bakrove učinkovine. Mejna inhibitorna koncentracija se je dvignila iz 1×10^{-2} mol/L na gojiščih brez dodanega CSL na $2,5 \times 10^{-2}$ mol/Č pri gojiščih z dodanim CSL (sliki 27 in 28).

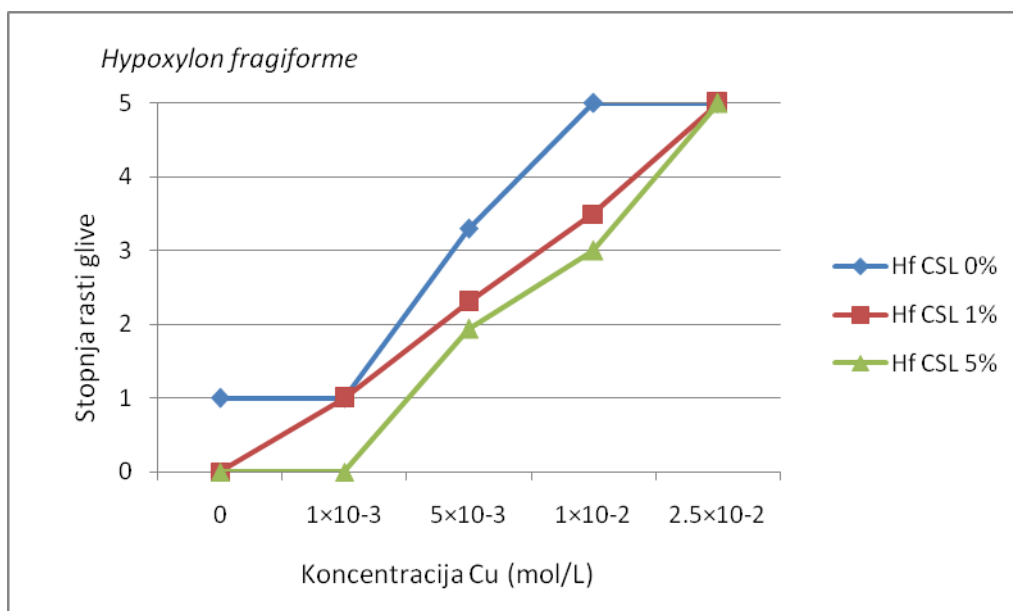


Slika 27: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata in CSL na rast glive *T. versicolor*



Slika 28: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata na rast glive *T. versicolor* ob prisotnosti 1 % CSL

Do podobnih rezultatov, kot pri pisani ploskocevki in navadni tramovki smo prišli tudi pri glivi bele trohnobe ogljeni kroglici. Pri glivi *H. fragiforme* smo določili celo enako minimalno inhibitorno koncentracijo kot pri glivi bele trohnobe *T. versicolor*. Podoben vpliv na rast je imel tudi CSL. Pri vseh koncentracijah Cu v gojišču je CSL zmanjšal občutljivost na Cu. To se odraža tudi v minimalni inhibitorni koncentraciji. Ob prisotnosti CSL v hranilnem gojišču se je pomaknila iz 1×10^{-2} mol/L na $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L, podobno kot smo opazili tudi pri pisani ploskocevki (sliki 29 in 30).



Slika 29: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata in CSL na rast glive *H. fragiforme*



Slika 30: Vpliv različnih koncentracij bakrovega(II) sulfata na rast glive *H. fragiforme* ob z dodatkom 1 % CSL

Dejstvo da CSL zmanjša občutljivost na bakrove učinkovine predvsem pri na baker občutljivih glivah je zanimivo iz dveh vidikov. Glede na opaženo dejstvo, da dodatek CSL poveča toleranco gliv bele trohnobe na baker, bi lahko v biotehnoloških procesih razstrupljanja lesa namesto tolerantnih izolatov, uporabili netolerantne, njihovo odpornost proti bakru pa bi izboljšali z uporabo koruzne omakalne vodice.

Drugo vprašanje, ki pa se postavlja pri analizi teh rezultatov, je nekoliko bolj zaskrbljujoče. V kolikor je glavni razlog za boljšo odpornost netolerantnih izolatov na Cu dušik, bi nam to lahko povzročalo velike težave pri uporabi z baker-etanolaminskimi pripravki lesa v praksi. Tako zaščiten les, ni bil namreč bolj dovzeten na glivni razkroj, kot les zaščiten s klasičnimi pripravki na osnovi bakrovih in kromovih spojin.

4.2 MINI BLOK TEST

Rezultati presejalnih testov, ki potekajov na hranilnem mediju, niso vedno primerljivi z rezultati, kjer glivam izpostavimo impregniran les, kaj šele s terenskimi testi. Zato smo poleg presejalnega testa raziskav v okviru diplomske naloge, glivam izpostavili tudi lesene vzorčke v skladu z mini blok metodo (Pohleven in sod., 2000). Glavna razlika med testoma je v tem, da morajo glive za razkroj lesa porabiti več energije ter uporabiti zapletene poti razkroja za kolonizacijo in preživetje na lesu. Pri testih na hranilnem gojišču pa so glivam vse hranilne snovi neposredno dostopne v podlagi.

Zanimalo nas je kako prisotnost CSL-ja v zaščitenem lesu vpliva na rast gliv ter predvsem na razkroj lesa. Eno pomembnejših vprašanj je, kako se je ob prepojitvi lesa s CSL-jem povečala vsebnost dušika. Dušika je v lesu relativno malo, glive pa ga potrebujejo za sintezo proteinov, hitina... (Rayner in Boddy, 1995). Vsebnost dušika v lesu je zaradi impregnacije s 5 % raztopino CSL-ja narasla iz 0,096 % na 0,325 % (Humar in Pohleven, 2005).

Izgube mas na neimpregniranih vzorcih so bile primerljive z prejšnjimi testiranjmi (Karabegović, 2006; Atelšek, 2007; Modic, 2007) ter smo dokazali, da so bile glive aktivne in da so rezultati veljavni. Najmanjšo izgubo mase smo po pričakovanju opazili pri smrekovih vzorcih izpostavljenih *L. pinastri*, ki je razkrojila le 17,3 % mase kontrolnih vzorcev. Podobno izgubo mase (18,4 %) smo opazili tudi pri vzorcih izpostavljenih *A. vaillantii*. Za ti dve glivi je značilno, da slabo razkrajata neimpregniran les, bistveno višje izgube mase pa ponavadi zabeležimo na impregniranem lesu, kar smo opazili tudi v naši diplomski nalogi. Številni strokovnjaki poročajo, da je v tem primeru očitno, da bakrove učinkovine v nizkih koncentracijah ne delujejo fungicidno temveč spodbujajo rast gliv (Zabel, 1954; Tsunoda in sodel., 1997). Največjo izgubo mase smo zabeležili pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni navadni tramovki (56,6 %). Za to glivo je značilno, da je v kratkem času sposobna razkrojiti velike količine lesa (Green in Highley, 1997).

Zanimivo je, da smo relativno visoko izgubo mase določili tudi pri smrekovini, ki smo jo izpostavili glivam bele trohnobe (*T. versicolor* in *H. fragiforme*). (preglednica 6, slika 31). Za glive bele trohnobe je namreč značilno, da v naravi pogosteje razkrajajo les listavcev, kot les iglavcev (Green in Highley, 1997).

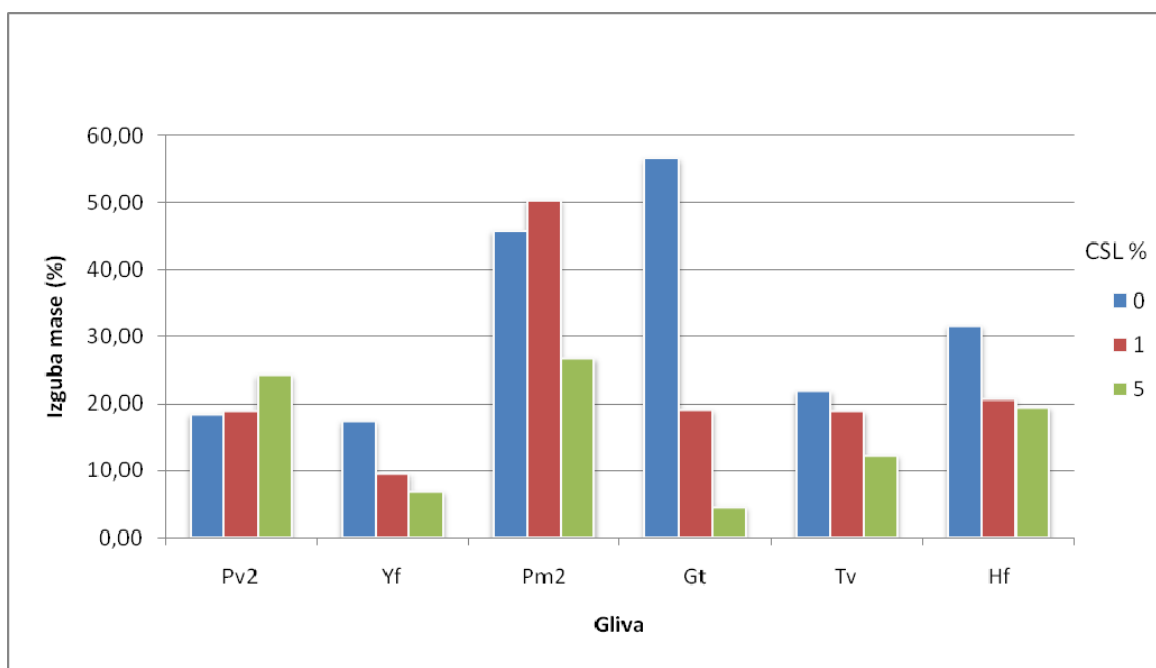
Neimpregnirani vzorci, ki so bili prepojeni s CSL-jem so bili bistveno manj razkrojeni kot vzorci, ki jih nismo obogatili s koruzno omakalno vodico, z izjemo glive *A. vaillantii*. Ta gliva je v osmih tednih razkrojila 18,4 % mase neimpregniranih s CSL ne prepojenih vzorcev, medtem ko je pri vzorcih impregniranih s 5 % CSL povzročila za petino višjo izgubo mase (24,3 %). Gliva *G. trabeum* je po 8 tednih razkrojila 56,6 % kontrolnih vzorcev brez kakršnih koli dodatkov, kar je več kot 12 krat višja izguba mase, kot pri vzorcih, ki so bili pred izpostavitvijo glivam dodatno prepojeni s 5 % vodno raztopino koruzne omakalne vodice (preglednica 6, slika 31). Ta rezultat je po eni strani pričakovan, saj je za glive rjave trohnobe znano, da za rast potrebujejo manj dušika kot glive bele trohnobe (Zabel in Morell, 1992). Po drugi strani pa ne znamo razložiti, zakaj je prisotnost CSL-ja negativno vplivala na rast in razkroj gliv bele trohnobe *T. versicolor* in *H. fragiforme* (preglednica 6).

Preglednica 6: Izgube mas neimpregniranih ter impregniranih vzorcev s CCB potopljenih v CSL. Standardni odkloni so podani v oklepajih.

CCB Konc. (%)	CSL konc (%)	Glive razkrojevalke					
		Pv2	Yf	Pm2	Gt	Tv	Hf
		Izguba mase (%)					
0	0	18,4 (3,4)	17,3 (3,5)	45,8 (4,0)	56,6 (5,4)	21,8 (4,2)	31,6 (5,8)
	1	18,5 (4,6)	9,4 (2,1)	50,4 (5,1)	19,0 (6,3)	18,8 (2,1)	20,7 (3,5)
	5	24,3 (3,0)	6,8 (2,4)	26,8 (4,4)	4,6 (3,9)	12,3 (2,1)	19,4 (3,4)
1	0	31,7 (3,0)	20,8 (3,2)	30,9 (6,8)	0,9 (0,2)	0,5 (0,1)	0,1 (0,3)
	1	29,1 (3,1)	17,4 (2,9)	34,7 (6,8)	0,5 (0,2)	0,5 (0,1)	0,2 (0,2)
	5	29,3 (2,9)	13,9 (1,8)	33,6 (2,6)	-1,1 (0,3)	2,1 (0,1)	4,1 (1,0)
5	0	5,5 (1,0)	2,9 (0,9)	-0,6 (1,0)	0,8 (0,2)	0,6 (0,2)	0,6 (0,2)
	1	1,1 (0,9)	1,5 (0,5)	-0,9 (0,4)	0,3 (0,0)	3,1 (0,3)	5,2 (2,1)
	5	1,0 (0,4)	1,1 (0,6)	-1,0 (0,4)	-1,7 (1,0)	1,6 (0,6)	1,9 (0,1)

4.2.1 Vpliv koruzne omakalne vodice na fungicidne lastnosti impregnirane in neimpregnirane smrekovine

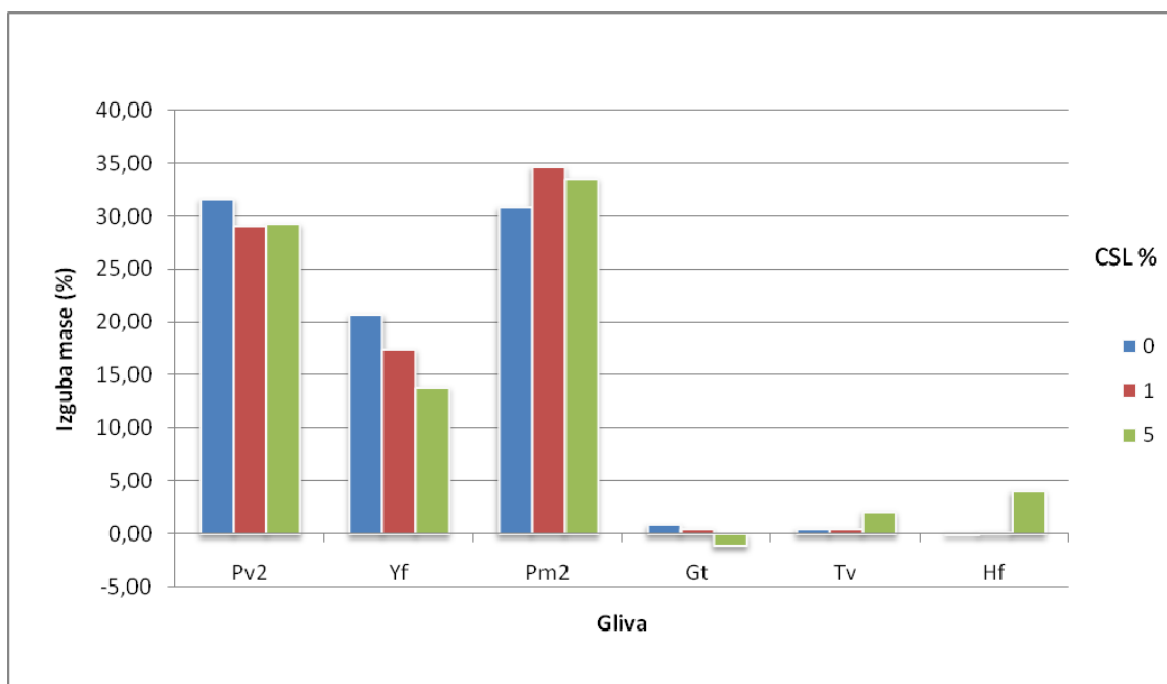
Na sliki 31 je lepo razviden vpliv prepojitve kontrolnih vzorcev s koruzno omakalno vodico. Iz slike se lepo vidi, da je dodatek CSL-ja vplival negativno na vse razkrojne procese z izjemo glive *A. vaillantii*.



Slika 31: Vpliv prepojitve lesa z različnimi koncentracijami koruzne omakalne vodice na razkroj neimpregnirane smrekovine izpostavljene glivam razkrojevalkam.

Iz izgub mas vzorcev impregniranih z 1 % vodno raztopino CCB se lepo odraža razlika med tolerantimi in netolerantimi glivami (slika 32). Največjo izgubo mase je povzročila najbolj tolerantna gliva *A. vaillantii*. Izguba mase impregniranih vzorcev (31,7 %) je celo višja od izgube mase kontrolnih, neimpregniranih vzorcev (18,4 %). Znatno izgubo mase so povzročile še glive *P. placenta* (30,9 %) in *L. pinastri* (20,8 %) (slika 32). Kakorkoli, na drugi strani smo opazili, da na baker občutljive glive (*G. trabeum*, *T. versicolor* in *H. fragiforme*) niso povzročile omembe vredne izgube. Mini blok postopek, podobno kot standardni SISTEN 113 (1996) postopek predpisuje, da so izgube mase nižje od 3 % zanemarljive.

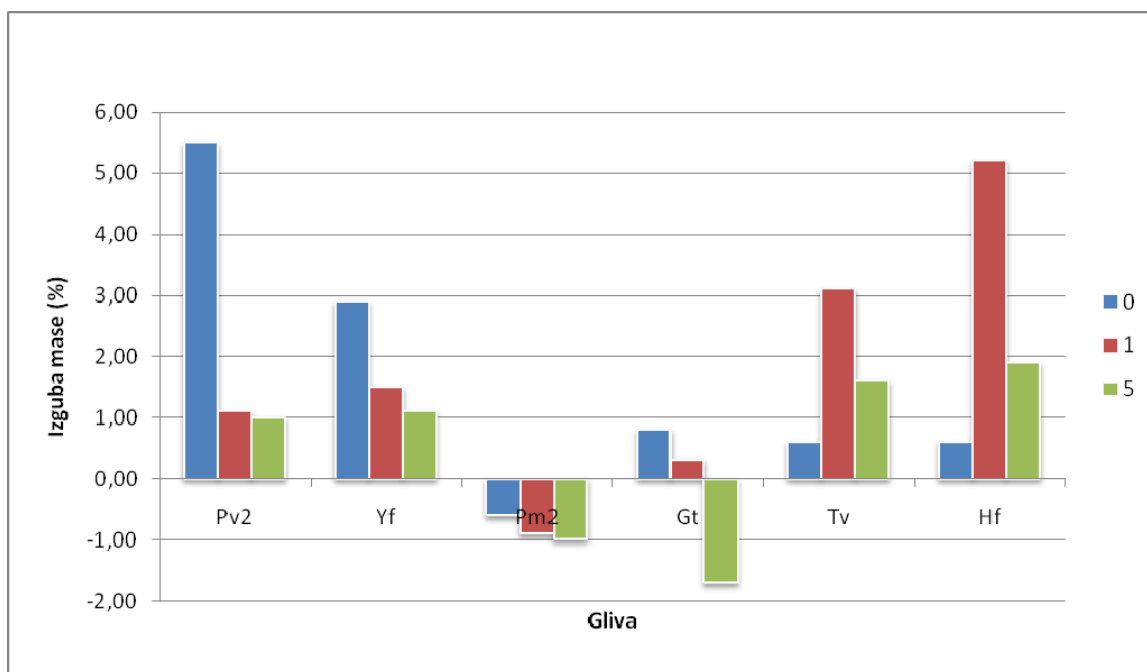
Prepojitev vzorcev z vodno raztopino koruzne omakalne vodice ni izboljšala delovanja najbolj tolerantnih izolatov *A. vaillantii* in *L. pinastri*. Nekoliko višje izgube mase smo opazili pri vzorcih izpostavljenih *P. placenti*. Ta gliva je razkrojila 30,9 % mase s CCB impregniranih vzorcev in kar 34,7 % mase impregniranih vzorcev, ki smo jih pred izpostavitvijo glivam prepojil z 1 % vodno raztopino CSL. Še bolj izrazit vpliv CSL-ja smo opazili pri glivah bele trohnobe (*T. versicolor* in *H. fragiforme*). Ti dve glivi, nista razkrajali vzorcev impregniranih z 1 % raztopino CCB. Ob dodatku 5 % raztopine CSL, pa se je izguba mase dvignila na 2,1 % pri glivi *T.versicolor* in 4,1 % pri glivi *H. fragiforme* (slika 32).



Slika 32: Izguba mase impregniranih vzorcev (1 % CCB) glede na prisotnost različnih koncentracij CSL

Iz izgub mase vzorcev prepojenih s 5 % raztopino CCB se najbolj odraža toleranca gliv na baker. Najvišjo izgubo mase je povzročila gliva *A. vaillantii* (5,5 %), sledi ji *L. pinastrii* (2,9 %), izguba mas vzorcev izpostavljenih ostalim glivam pa je bila zanemarljiva, v nekaterih primerih celo negativna. Do negativne izgube mase pride zaradi micelija na površini vzorcev, difuzije hranil iz gojišča v vzorce in eksperimentalnih napak.

Prepojitev impregniranih vzorcev z vodno raztopino koruzne omakalne vodice je imela v večini primerov negativen učinek na razkroj lesa, z izjemo gliv bele trohnobe. Dodatek, z dušikom bogate CSL je močno izboljšal možnosti teh gliv, da razkrajajo z bakrovimi pripravki impregnirane vzorce. To se še posebej vidi pri glivi *H. fragiforme*. Ogljena kroglica praktično ne more razkrajati smrekovine impregnirane s 5 % pripravkom CCB. V kolikor pa impregnirane vzorce pred izpostavitvijo glivam prepojimo še z koruzno omakalno vodico, izguba mase naraste na statistično značilnih 5 % (slika 33).



Slika 33: Izguba mase impregniranih vzorcev (5 % CCB) glede na prisotnost različnih koncentracij CSL

Rezultati testiranja na realnih vzorcih iz lesa so potrdili rezultate testiranja na hranilnem gojišču. Očitno je, da prisotnost CSL poslabša tolerantnih izolatov lesnih gliv na bakrove biocide. Po drugi strani pa dodatek CSL izboljša odpornost netolerantnih glivnih izolatov na baker, predvsem gliv bele trohnobe.

Razlogov za ta fenomen ne znamo v celoti pojasniti. Eden izmed razlogov bi bil lahko pH. Koruzna omakalna vodica je kislina vodna raztopina. Ob prepojitvi s CSL so verjetno znižane tudi vrednosti pH lesa. Pri tem je znano, da so bakrove učinkovine bistveno manj učinkovite pri kislinskih vrednostih pH, kot pa pri vrednostih okoli 5 (Humar s sodel., 2005).

Verjetnost, da pride med sestavinami CSL-ja in bakrovimi učinkovinami do novih spojin z drugačnimi fungicidnimi lastnostmi lahko izključimo, saj so (Humar in sodelavci, 2005) z elektronsko paramagnetno resonanco potrdili, da med sestavinami CSL in bakrom v lesu ne pride do nastanka novih spojin.

Razlog za povečano učinkovitost bakrovih soli na glive, ki so tolerantne na baker ter ob prisotnosti večjih koncentracij dušika lahko vidimo v spremembi izločanja oksalne kisline. Oksalna kislina ima pomembno vlogo pri toleranci gliv na baker (Humar s sodel., 2001; Jarosz-Wilkolazka in Gadd, 2003).

Akamatsu je s sodelavci (1994) primerjal količino nakopičene oksalne kisline 13 gliv rjave trohnobe ter 11 gliv bele trohnobe, ki so rastle na mediju z nizko ter visoko vsebnostjo dušika. Glive neobčutljive na baker so proizvedle veliko manj oksalne kisline v mediju z nizko prisotnostjo dušika, kot v mediju z visoko prisotnostjo. Ta rezultat morda pojasnjuje tudi povečano odpornost gliv bele trohnobe na baker v našem eksperimentu.

Gliva *T. versicolor*, ki povzroča belo trohno, proizvaja več oksalne kisline v mediju z večjo prisotnostjo dušika. *G. trabeum* (rjava trohnoba) pa je znana kot gliva, ki proizvede najmanj oksalne kisline, tako v mediju z visoko kot z nizko prisotnostjo dušika (Takao, 1965; Akamatsu s sodel., 1994). To pojasni tudi naše rezultate, saj je bila ravno ta gliva skoraj v vseh primerih glive, ki je izkazala najslabšo odpornost na bakrove spojine.



Slika 34: Slika vzorcev izpostavljenih glivi *P. placenta*



Slika 35: Slika vzorcev izpostavljenih glivi *T. versicolor*

5 SKLEPI

Rezultate diplomske naloge lahko povzamemo v naslednjih sklepih:

- Nizke koncentracije Cu niso imele nikakršnega vpliva na rast sevov, ki so tolerantni na baker. Prve znake zaviranja opazimo šele pri visoki koncentraciji Cu (1×10^{-2} mol/L)
- Pri na baker tolerantih izolatih smo opazili, da CSL pri nižjih koncentracijah celo pospešuje rast teh gliv
- Koruzna omakalna vodica (CSL) negativno vpliva na delovanje glive *G. trabeum*. Verjetno smo s CSL v les vnesli preveč dušika, kar je negativno vplivalo na rast te lesne glive
- Dodatek CSL poveča toleranco gliv bele trohnobe na baker. Tako bi lahko v biotehnoloških procesih razstrupljanja lesa namesto tolerantnih izolatov uporabili netolerantne
- Med CSL in bakrom v lesu ne pride do nastanka novih spojin
- Sprememba izločanja oksalne kisline ob večjih koncentracijah dušika, verjetno povzroči večjo učinkovitost bakrovih soli na glive, ki so tolerantne na baker
- Dodatek ogljikovodikov, ki so prisotni v CSL v večini ne vpliva na rast gliv
- Menimo, da koruzna omakalna vodica ni ustrezen medij za uporabo v biotehnoloških procesih mikoremediacije odsluženega zaščitenega lesa z na baker tolerantnimi izolati rjave trohnobe.

6 POVZETEK

Količina odpadnega zaščitenega lesa bo v prihodnosti bistveno narasla, zaradi vedno večjega ozaveščenja ljudi ter posledično zahtev držav za pravilno skladiščenje toksičnih snovi. Odslužen impregniran les sam po sebi predstavlja velik strošek za skladiščenje zaradi voluminoznosti. Ta les bo potrebno na nek način odstraniti ali pa vsaj zmanjšati njegovo toksičnost. Uporabili bi lahko glive za okolju prijazno mikoremediacijo z bakrovimi pripravki zaščitenega odsluženega lesa.

Za učinkovit postopek bioremediacije potrebujemo cenen vir hranilnih snovi. Ena izmed rešitev, ki se že uporablja v številnih biotehnoloških procesih je koruzna omakalna vodica (Corn steep liquor). Namen diplomskega dela je bil, kako koruzna omakalna vodica vpliva na rast in razkroj z bakrovimi pripravki zaščitenega lesa z izbranimi izolati lesnih gliv.

Opravili smo dva preizkusa. Presejalni test, kjer smo CSL dodali v hranilno gojišče ter nato ocenili prirast treh tolerantnih in treh netolerantnih gliv rjave ter bele trohnobe. V drugem delu pa smo sterilizirane lesene vzorce, impregnirane s CCB pripravkom izpostavili istim izolatom gliv.

Prisotnost medija bogatega z dušikom, koruzna omakalna vodica, je povečala sposobnost rasti glivam, ki so občutljive na baker (bela ter rjava trohnoba) na vzorcih zaščitenih z bakrovimi solmi. Po drugi strani pa je prisotnost CSL znižala tolerantnost odpornih glivnih izolatov. Ti rezultati se odražajo tako iz izgub mase lesnih vzorčkov, kot tudi iz spremljanja rasti gliv na hranilnem gojišču.

Razlog za manjšo odpornost gliv na baker lahko pojasnimo s tem, da glive neobčutljive na baker proizvajajo manj oksalne kisline v prisotnosti večjih koncentracij dušika. Obratno, pa dodatek dušikovega hranila povzroča večje izločanje oksalne kisline pri glivah *T. versicolor* ter *H. fragiforme* in s tem povečal zmožnost rasti oz. preživetja na vzorcih zaščitenih z bakrovimi solmi.

7 VIRI

- Adamič J., 1992. Glive. V: Biotehnologija. Raspor P (Ed.). Ljubljana, Bia d.o.o.: 53-70
- Akamatsu, Y., takahashi, M., Shimada, M., 1994. Production of oxalic acid by wood-rotting basidiomycetes grown on low and high nitrogen culture media. *Material und Organismen* 28, 251-264
- Akhtar, M., Lentz, M.J., Blanchette, A., Kirk, T.K., 1997. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. *TAPPI Journal* 80, 161-164
- Amartey, M., Sam A., Humar, Pohleven, 2003. Recycling of CCA/CCB treated wood waste through bioremediation : a review. *Drev. výsk.*, vol. 48, no. 4, 1-12
- Atelšek J., 2007. Določanje minimalne koncentracije zaščitnega pripravka na osnovi bakra in etanolamina za zaščito lesa pred trohnenjem. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 37 str.
- Blanchette R.A., 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*, 73 (Suppl. 1 sect. E - H): 999-1010
- Cao, J.Z., Kamdem, P., 2004. Moisture adsorption characteristics of copper-ethanolamine (Cu-EA) treated Southern yellow pine (*Pinus* spp.). *Holzforshung* 58, 32-38
- Carlile M.J., Watkinson S.C., 1994. *The Fungi*. London, Academic Press limited: 482 str
- Clausen, C.A., Green, F., 2003. Oxalic acid overproduction by copper tolerant brown-rot basidiomycetes on southern yellow pine treated with copper-based preservatives. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51, 139-144.
- Collet O., 1992. Variation in copper tolerance among isolates of the brown-rot fungi *Postia placenta* (Fr.) M. Lars. & Lomb. and *Antrodia xantha* (Fr.) Ryv. *Material und Organismen*, 27, 4: 263-271
- De Groot R.C., Woodward B., 1998. *Wolfiporia cocos* - a potential agent for composting or bioprocessing Douglas-fir wood treated with copper-based preservatives. *Forest Products Journal*, 32, 3: 195-215
- De Groot R.C., Woodward B., 1999. Using copper - tolerant fungi to biodegrade wood treated with copper - based preservatives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44: 17-27
- Eaton R.A., Hale M.D.C., 1993. *Wood: decay, pests and protection*. London, Chapman & Hall: 546 str.

- Flemming C.A., Trevors J.T., 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, air and soil pollution*, 44: 143-158
- Gadd, G.M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* 124, 25-60
- Green F., Larsen M.J., Winandy J.E., Highley T.L. 1991. Role of oxalic acid in incipient brown - rot decay. *Material und organismen*, 26, 3: 191-213
- Green III F., Highley T.L. 1997. Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39, 3: 113-124
- Gunde-Cimerman N., 1996. Nitaste glive. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (Ed.). Ljubljana, Bia d.o.o.: 95-111
- Gupta U., 1979. Copper in the environment. Part 1. New York, John Wiley & Sons: 215 str.
- Hirt, P.R., 1949. An isolate of *Poria xantha* on media containing copper. *Phytopathologist* 39, 31-36.
- Haughes, A.s., Murphy, R.J., Gibson, J.F., Cornfield, J.A., 1994. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic analysis of copper based preservatives in *Pinus sylvestris*. *Holzforschung* 48, 91-98.
- Humar, M., Amartey, Sam A., Pohleven, F., 2006. Influence of corn steep liquor and glucose on colonization of control and CCB (Cu/Cr/B)-treated wood by brown rot fungi. *Waste manag. (Elmsford)*. vol. 26, no. 5, str. 459-465.
- Humar, M., Petrič M., Pohleven F., Šentjunc M., 2000. Changes of EPR spektra of wood, impregnated with copper based preservatives, during exposure to *Antrodia vaillantii*. IRG/WP, Document 00 - 10355: 9 str.
- Humar, M., Bokan, M., Kentjunc, M., Amartey, S., Kalan, P., Pohleven, F., 2004. Fungal ioremediation of copper, chromium and borontreated wood as studied by electron aramagnetic resonance. *International Biodeterioration and Biodegradation* 53, 25–32
- Humar, M., Petrič, M., Pohleven, F., 2001. Changes of pH of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *HRW* 59, 288–293
- Humar, M., 2002. Interakcija bakrovih zaščitnih pripravkov z lesom in lesnimi glivami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo

- Humar M., Petrič M., Pohleven F., Kalan P. 1998. Uptake of copper by mycelium of wood fungi growing on copper S - substituted thioglycolate containing nutrient media. IRG/WP, Document 98-10291: 6 str.
- Humar, M., Pohleven, F., 2005. Influence of a nitrogen supplement on the growth of wood decay fungi and decay of wood. *Int. biodeterior. biodegrad.* 56, 1, 34-39
- Humar, M., 2003. Biocidi za zaščito lesa. Ljubljana. Gospodarska zbornica Slovenije, <http://www.gzs.si/Nivo3.asp?ID=8575>
- Humar, M., 2004. Zaščita lesa danes – jutri. *Les* 56; 184 - 188
- Humar, M., Pohleven F., 2005. Bakrovi pripravki in zaščita lesa. *Les* 57: 57 - 62 str.
- Illman B.L., Highley T.L., 1996. Fungal degradation of wood treated with metal-based preservatives: 1 Fungal tolerance. IRG/WP 96-10163: 7 str.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Gadd, G.M., 2003. Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere* 52, 541–547.
- Jordan C.R., Dashek W.V., Highley T.L. 1996. Detection and quantification of oxalic acid from the brown-rot fungus, *Postia placenta*. *Holzforchung*, 50, 4: 312-318
- Kervina-Hamović Lj., 1990. Zaščita lesa. Ljubljana, BF - Oddelek za lesarstvo: 126 str.
- Kirk T.K., Highley T.L., 1973. Quantitative changes in structural components of conifer wood by white- and brown-rot fungi. *Phytopathology*, 63: 1338-1342
- Kirk T.K., Cullen D., 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young R.A., Akhtar M. (ur.). New York, John Willey and sons, Inc.: 273-307
- Kirk T.K., Ilbach R., Mozuch M.D., Conner A.H., Highley T.L., 1991. Characteristic of cotton cellulose depolymerized by brown-rot fungus, by acid or by chemical oxidants. *Holzforchung*, 45, 4: 239-244
- Leithoff H., Peek R-D., 1998. Biological detoxification processes. IRG/WP 98-50120: 13 str.
- Micales J.A., 1995. Induction of oxalic acid by carbohydrate and nitrogen sources in the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Material und organismen*, 28, 3: 197-207

- Modic J., 2007. Fungicidno delovanje posameznih aktivnih komponent v pripravkih na osnovi bakra in etanolamina. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 50 str.
- Muntañola-Cvetković M., 1987. Opšta mikologija. Beograd, Knjižne novine: 320 str.
- Peberdy J.F., Ferenczy L., 1985. Fungal protoplasts - applications in biochemistry and genetics. New York, Marcel Dekker: 354 str.
- Pohleven, F., Petrič M., Zupin J., 2000. Effect of mini-block test conditions on activity of *Coniophora puteana*. The International Research Group on Wood Preservation . IRG/ WP 0230291, 12pp.
- Pohleven, F., Humar, M., Amartey, S., Benedik, J., 2002. Tolerance of wood decay fungi to commercial copper based wood preservatives. The International Research Group for Wood Preservation, IRG/WP 02-30291, p. 12.
- Pohleven, F., 1998. The current status of use of wood preservatives in some European countries – summary of the answers to the questionnaire – the last correction in February 1998. Bruselj, COST E2: 2 str.
- Raspor P., Smole – Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F. V., Hacin J., 1995. ZIM: Zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo: 98 str.
- Rayner A.D.M., Boddy L., 1995. Fungal Decomposition of Wood. Its Biology And Ecology. New York, John Wiley & Sons, Chichester: 587 str.
- Reid I.D., 1995. Biodegradation of lignin. Canadian Journal of Botany, 73 (suppl. 1): 1011-1018
- Ritschkoff A., Viikari L., 1991. The production of extracellular hydrogen peroxide by brown-rot fungi. Material und organismen, 26, 2: 157-167
- Richardson H.W., 1997. Handbook of copper compounds and applications. New York, M. Dekker: 93-122
- Richardson B.A., 1993. Wood preservation. London, E & FN: 226 str.
- Seifert, K., 1968. Zur Systematik der Holz – fräulen Ihre Chemischen und Physikalischen Kennzeichen. HRW, 26 , 6: 208 - 215
- Schroeder, J.W., 1997. Corn gluten feed. Composition, storage, handling, feeding and value. NDSU extension service, North Dakota State University of Agriculture and Aplied Science. 4pp.
- Schmidt, O., 1994., Holz – Bauenpilze. Berlin, Springer – Verlag: 246 str.

- Shimada M., Akanatsu Y., Ohta A., Takahashi M., 1991. Biochemical relationship between biodegradation of cellulose and formation of oxalic acid in brown-rot wood decay. IRG/WP, Document 91 - 1472: 12 str.
- SIST EN 113., 1989. Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying *Basidiomycetes* cultured on agar medium. 14 str.
- SIST EN 1250., 1994. Wood preservatives – methods for measuring losses of active ingredients and other preservative ingredients from treated timber. Part 2: laboratory method for obtaining samples for analysis to measure losses by leaching into water or synthetic sea water. 16 str.
- Stephan I., Peek R.D., Nimz H., 1996. Detoxification of Salt impregnated wood by organic acids in a pulping process. *Holzforschung*, 50: 183-187
- Sutter H.P., Jones E.B.G., Walchli O., 1983. The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.) Fr. *Material und Organismen*, 18, 4: 241-262
- Syrjanen T., 1999. Recycling of impregnated timber. Part 1: crushing, combusting plants, amount, costs and logistics. IRG/WP 99 - 50131: 8 str.
- Takao, S., 1965. Organic acid production by basidiomycetes, I. Screening of acid-reducing strains. *Applied Microbiology* 13, 732–737.
- Tsunoda K., Nagashima K., Takahashi M., 1997. High tolerance of wood-destroying brown-rot fungi to copper-based fungicides. *Material und Organismen*, 31, 1: 31-44
- Zabel, R.A., Morrell J.J., 1992. *Wood Microbiology, Decay and its Prevention*. Academic Press, San Diego, 476pp.
- Zabel R.A., 1954. Variations in preservative tolerance of wood-destroying fungi. *Forest product research society journal*, 4, 2: 166-169
- Yang V.W., Illman B.L., 1999. Optimum growth conditions for the metal-tolerant wood decay fungus, *Meruliporia incrassata* TFFH 294. IRG/WP, Document 99 - 50142: 8 str.
- Wainwright M., 1992. *An introduction to fungal biotechnology*. Chichester, John Wiley and Sons Ltd: 195 str.
- Wu L., Lin S., 1990. Copper tolerance and copper uptake of *Lotus purshianus* (Benth.) Clem. & Clem. and its symbiotic *Rhizobium loti* derived from the copper mine waste population. *New phytologist*, 116: 531-539

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Mihi Humar za vodenje, strokovnost in potrpežljivost, recenzentu prof. dr. Francu Pohlevnu za odlična predavanja, katerim sem bil deležen pri njegovem predmetu. Staršem, ki so mi omogočili študij ter Nini za vso podporo.