

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Miran JENIŠEK

UPORABA ARGONA IN DUŠIKA ZA ZADUŠEVANJE LESNIH GLIV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**USE OF ARGON AND NITROGEN FOR ASPHYXIATION
OF WOOD DECAY FUNGI**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija lesarstva. Opravljeno je bilo na Katedri za patologijo in zaščito lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, kjer je bil izveden celoten eksperiment.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Miran JENIŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 630*844.4
KG glive/*Coniophora*/*Antrodia*/*Trametes*/lesene umetnine/zaščita/dušenje/
argon/dušik
AV JENIŠEK, Miran
SA POHLEVEN, Franc (mentor)/HUMAR, Miha (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI 2007
IN UPORABA ARGONA IN DUŠIKA ZA ZADUŠEVANJE LESNIH GLIV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 50 str., 2 pregl., 22 sl., 42 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Leseni kulturno-zgodovinski umetniški predmeti predstavljajo neprecenljivo vrednost, zato jih je treba ob napadu lesnih škodljivcev ustrezno zaščititi. Z neustrezno metodo oziroma kemičnim sredstvom lahko sam predmet bolj uničimo kot škodljivci sami. Za zaščito okolja in konservatorjev ter v izogib morebitnim poškodbam lesenih umetnin, zaradi kemičnega zatiranja škodljivcev, smo ugotavljali učinkovitost zadušitve gliv razkrojevalk lesa z argonom in dušikom. Določali smo sposobnost preživetja gliv razkrojevalk lesa: *Coniophora puteana*, *Antrodia vaillantii* in *Trametes versicolor*. Preživelost gliv smo merili s spremljanjem dihanja oziroma količino nastalega CO₂ in ponovno rastjo podgobja na PDA mediju. Kulture gliv so bile v hermetično zaprtih posodah izpostavljene nizki koncentraciji kisika (pod 10 ppm) od 1 – 5 tednov. Pri dušenju gliv na PDA mediju anoksične razmere niso vplivale na izgubo sposobnosti regeneracije glive *Trametes versicolor*, razraščene na PDA mediju. Pri glivi *Coniophora puteana* je vitalnost padala z daljšanjem anoksičnih razmer in po 16 tednih tretiranja se 80 % vcepkov ni regeneriralo. Po prvih 10 tednih se le 13 % vcepkov glive *Antrodia vaillantii* ni regeneriralo, po 16 tednih pa je delež neregeneriranih vcepkov narasel na 77 %. Pri tretiranju okužene bukovine v eksperimentalnih kozarcih, gliva *Trametes versicolor* ni izgubila viabilnosti, ne glede na uporabljen inertni plin in čas izpostavitve anoksičnim razmeram. Pri vzpostavljanju anoksičnih razmer z argonom je 1 od 3 izolatov glive *Antrodia vaillantii* odmrl že po 2 tednih, po 3 tednih pa so kulture micelija potrebovale daljši regeneracijski čas. Micelij glive *Antrodia vaillantii*, tretiran z dušikom, je pričel izgubljati viabilnost šele po 5 tednih, ko se 1 od 3 kultur ni regeneriralo, drugi 2 pa sta za regeneracijo potrebovali daljši čas. Micelij glive *Coniophora puteana* na vzorcih smreke še po 1 tednu (tudi po 2, 3 in 5 tednih) tretiranja z argonom ni obnovil rasti. Ugotovili smo, da je okužbo z glivo *Coniophora puteana* možno uspešno zatreti. Pri tretiranju z dušikom smo dobili slabše rezultate, saj se 1 od 3 izolatov glive *Coniophora puteana* po 3 tednih ni regeneriral, druga 2 pa sta za regeneracijo potrebovala daljši čas.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 630*844.4
CX fungi/*Coniophora*/*Antrodia*/*Trametes*/wooden artifacts/preservation/
asphyxiation/argon/nitrogen
AU JENIŠEK, Miran
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)/HUMAR, Miha (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and
Technology
PY 2007
TI USE OF ARGON AND NITROGEN FOR ASPHYXIATION OF WOOD DECAY
FUNGI
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 50 p., 2 tab., 22 fig., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Wooden objects of cultural and art historic heritage are priceless and should therefore, if
attacked by wooden pests, be conserved in a safe and effective manner. However, by using
unsuitable methods objects can often be exposed to greater damage than pests. We have
focused on the efficiency of asphyxiation on wood decay fungi with argon or nitrogen gas,
in order to protect the environment and conservators, and to avoid possible damage of
wooden arts. We examined the viability of wood decay fungi: *Coniophora puteana*,
Antrodia vaillantii and *Trametes versicolor*. The fungal survival was tested by respiration
measurement via CO₂ production and determination of hyphae growing on fresh PDA
medium. The fungal cultures were exposed to low oxygen concentration (below 10 ppm) for
1 – 5 weeks in hermetically sealed vessels. Anoxic treatment did not affect the ability of
regeneration of *Trametes versicolor* fungi on PDA medium. Fungus *Coniophora puteana*
with the prolongation of anoxic conditions decreased the viability and by 16th week of
treatment, 80 % of inocula did not regenerate. In 1st 10 weeks only 13 % of inocula of
Antrodia vaillantii fungi cultures did not regenerate. However, by 16th week the percentage
of unregenerated inocula increased to 77 %. *Trametes versicolor* cultures on samples of
beech-tree, exposed to anoxic treatment in hermetically sealed vessels, did not lose viability,
neither according to the type of inertive gas used nor according to the time of exposing to
anoxic treatment. One third of *Antrodia vaillantii* cultures died in 2nd week of anoxic
treatment with argon, while after 4th week, the time needed for regeneration increased.
Antrodia vaillantii cultures exposed to anoxic treatment with nitrogen gas started to lose
viability after 5th week of the treatment. In this time one third of them did not regenerate,
while the other 2 thirds needed more time for regeneration. *Coniophora puteana* cultures on
samples of spruce did not resume growth, neither within 1st week of treatment with argon
nor within 2, 3 or 5 weeks. It was found out that it is possible to suppress the infection with
Coniophora puteana successfully. Treatment with nitrogen gas didn't prove to be as
efficacious because one third of *Coniophora puteana* in 3 weeks' time did not regenerate,
while the other 2 thirds needed more time for regeneration.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 LES	2
2.2 NARAVNA ODPORNOST IN TRAJNOST LESA	2
2.3 KEMIČNA SESTAVA LESA	2
2.3.1 Celuloza	3
2.3.2 Hemiceluloza	3
2.3.3 Lignin	3
2.4 RAZKROJ LESA	4
2.5 RAZKROJ OLESENELE STENE CELICE	4
2.5.1 Encimi	4
2.6 GLIVE	5
2.6.1 Splošne značilnosti gliv	5
2.6.1.1 Zgradba gliv	6
2.6.1.2 Razmnoževanje gliv	7
2.6.2 Vpliv dejavnikov okolja na aktivnost gliv	8
2.6.2.1 Zrak	8
2.6.2.2 Vlažnost	9
2.6.2.3 Hranilne snovi	10
2.6.2.4 Temperatura	10
2.6.2.5 Svetloba	10
2.6.2.6 Vrednost pH	10
2.7 DELITEV GLIV GLEDE NA VRSTO TROHNOBE	11
2.7.1 Rjava ali destruktivna trohnoba	11
2.7.2 Bela ali korozivna trohnoba	12
2.7.3 Mehka trohnoba ali soft rot	13
2.8 ZAŠČITA LESA	13
2.8.1 Preventivna zaščita lesa	14
2.8.1.1 Naravna preventivna zaščita lesa	14
2.8.1.2 Kemična preventivna zaščita lesa	14
2.8.2 Represivna zaščita lesa	14
2.8.2.1 Zaplinjevanje	15
2.8.2.2 Zaduševanje	15
2.9 ZAŠČITA DRAGOCENIH LESENH PREDMETOV KULTURNE DEDIŠČINE Z ZADUŠEVANJEM	15
2.9.1 Ogroženost lesenih predmetov kulturne dediščine z insekti	15
2.9.1.1 Zaduševanje insektov	16

2.9.1.2	Zaduševanje gliv	17
2.9.2	Ogroženost lesenih predmetov kulturne dediščine z glivami	17
3	MATERIAL IN METODE	19
3.1	MATERIALI	19
3.1.1	Testne lesne glive	19
3.1.1.1	BELA HIŠNA GOBA – <i>Antrodia vaillantii</i>	20
3.1.1.2	PISANA PLOSKOCEVKA – <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilat	21
3.1.1.3	KLETNA GOBA - <i>Coniophora puteana</i> (Schum. Ex Fr.)	22
3.1.2	Vzorci lesa in plinotesni kozarci s pokrovom	22
3.1.3	Plin	23
3.1.4	Oprema za merjenje koncentracije O₂ in CO₂	23
3.2	METODE	24
3.2.1	Priprava hranilne podlage in gojišča	24
3.2.2	Priprava vzorcev lesa	26
3.3	IZPOSTAVITEV KULTUR MICELIJA ANOKSIČNIM RAZMERAM NA HRANILNI PODLAGI	27
3.4	DUŠENJE OKUŽENIH VZORCEV LESA IN VIZUALNO UGOTAVLJANJE VIABILNOSTI GLIV	29
4	REZULTATI	32
4.1	TRETIRANJE NA HRANILNEM GOJIŠČU PDA	32
4.1.1	Regeneracija kultur gliv po prvem tednu dušenja	32
4.1.2	Regeneracija kultur gliv po drugem tednu dušenja	33
4.1.3	Regeneracija kultur gliv po tretjem tednu dušenja	33
4.1.4	Regeneracija kultur gliv po četrtem tednu dušenja	33
4.1.5	Regeneracija kultur gliv po desetem in šestnajstem tednu dušenja	36
4.2	TRETIRANJE OKUŽENEGA LESA V EKSPERIMENTALNIH KOZARCIH	37
4.2.1	<i>Trametes versicolor</i>	38
4.2.2	<i>Antrodia vaillantii</i>	39
4.2.3	<i>Coniophora puteana</i>	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	46
6	POVZETEK	47
7	VIRI	48
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Poimenovanje gliv glede na temperaturo, pri kateri rastejo	10
Preglednica 2: Vrste gliv, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu	19

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz polimera celuloze	3
Slika 2: Shematski prikaz sestave celične stene hife glive <i>Neurospora crassa</i>	7
Slika 3: Oksidativna razgradnja celuloze pri rjavi trohnobi	12
Slika 4: <i>Antrodia vaillantii</i>	20
Slika 5: <i>Trametes versicolor</i>	21
Slika 6: Plinotesni eksperimentalni kozarec, povezan z napravo za merjenje koncentracij O ₂ in CO ₂	23
Slika 7: Avtoklav za sterilizacijo	25
Slika 8: Sterilna komora – laminarij	26
Slika 9: Kozarec z vzorcem lesa in razraščnim micelijem	27
Slika 10: Skica odvzemnih mest vcepkov iz tretiranih kultur micelija za preizkus viabilnosti	28
Slika 11: Steklen kozarec s plinotesnimi ventili	30
Slika 12: Dušenje okuženih vzorcev lesa v steklenen kozarcu z inertnim plinom	31
Slika 13: Enourna produkcija CO ₂ in čas regeneracije kultur glive <i>Antrodia vaillantii</i> po štirih tednih dušenja z argonom ali dušikom	34
Slika 14: Enourna produkcija CO ₂ in čas regeneracije kultur glive <i>Coniophora puteana</i> po štirih tednih dušenja z argonom ali dušikom	35
Slika 15: Vpliv dolžine izpostavitve kultur micelija gliv <i>Coniophora puteana</i> in <i>Antrodia vaillantii</i> anoksičnim razmeram na zadušitev vcepkov, odvzetih iz teh kultur	37
Slika 16: Vzorci lesa okuženi z glivo <i>Antrodia vaillantii</i> dušeni z argonom; v četrtem kozarcu je kontrolni vzorec	38
Slika 17: Vzorci lesa okuženi z glivo <i>Trametes versicolor</i> ; v prvem kozarcu dušeni z argonom, v drugem z dušikom, v tretjem kozarcu je kontrolni vzorec	39
Slika 18: Regeneracija kultur micelija glive <i>Antrodia vaillantii</i> na okuženih koščkih lesa, tretiranih v eksperimentalnih kozarcih z argonom in dušikom	40
Slika 19: Vzorci lesa okuženi z glivo <i>Antrodia vaillantii</i> dušeni z argonom; v tretjem kozarcu je kontrolni vzorec	40
Slika 20: Regeneracija kultur micelija glive <i>Coniophora puteana</i> na okuženih koščkih lesa, tretiranih v eksperimentalnih kozarcih z argonom in dušikom	41
Slika 21: Vzorci lesa okuženi z glivo <i>Coniophora puteana</i> dušeni z argonom; v prvem kozarcu je kontrolni vzorec	42
Slika 22: Vzorci lesa okuženi z glivo <i>Coniophora puteana</i> dušeni z dušikom; v tretjem kozarcu je kontrolni vzorec	42

1 UVOD

Objekti kulturne in zgodovinske dediščine so neprecenljive vrednosti. Zaradi tega naj bi bili ob eventualnem napadu škodljivcev (insektov, gliv) konservirani-zaščiteni na varen in učinkovit način. Kot alternativni ukrepi represivne zaščite lesenih kulturno-zgodovinskih predmetov so se do nedavnega posluževali izsuševanja, segrevanja, obsevanja z röntgenskimi žarki, zamrzovanja, uporabe kemičnih sredstev in zaplinjevanja s strupenimi plini (cianid, ogljikov disulfid, metilbromid in žveplov fluorid). Vendar so ti ukrepi za zaščito lesnih umetnin manj primerni, saj pogosto s takšnimi ukrepi povzročimo na predmetih še večjo škodo kot pa škodljivci. Zato številnih od naštetih tehnik ne moremo uporabiti, če želimo ohraniti prvotno stanje in videz predmeta, še posebej pa njegovo kulturno-zgodovinsko in znanstveno vrednost. Tretiranje okuženih predmetov s kemikalijami ali kakršnimkoli sevanjem je tudi drago in predstavlja potencialno nevarnost za okolje in konservatorje (Pinniger, 1994).

V zadnjih nekaj letih so, zaradi naštetih vzrokov, nekatere navedene kemikalije prepovedane za uporabo. V prizadevanjih ustrezne zaščite kulturno-zgodovinskih predmetov so vsa raziskovanja osredotočena v iskanje in razvijanje ustreznih manj škodljivih sredstev in metod za konservatorje, objekte ter okolje. Do sedaj se je pri zaščiti predmetov neprecenljive vrednosti pred insekti kot najboljše izkazalo zaduševanje z dušikom in argonom (Gilberg, 1991; Koestler, 1992, 1996, 2000, 2001; Stušek in sod., 2000).

V diplomskem delu smo se osredotočili na določevanje možnosti uporabe argona in dušika za zaduševanje lesnih gliv.

Ugotavljali smo sposobnost preživetja nekaterih gliv razkrojevalk lesa *Coniophora puteana*, *Antrodia vaillantii* in *Trametes versicolor*, razvitih na PDA mediju in razraščenih na vzorcih lesa bukve in smreke, po dušenju z argonom in dušikom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LES

Les je obnovljiv naravni material ter s skoraj neomejenim možnostim uporabe in številnim metodam oplemenitenja, tako s kemičnimi kot z mehanskimi sredstvi, potrebuje znanstveni pristop. Dobe, v kateri smo ga samo empirično obravnavali, je konec. Znanost o lesu in tehnologiji predelave lesa sta zelo pomembna v širokem polju uporabnih naravoslovnih znanostih (Kollmann, 1984).

2.2 NARAVNA ODPORNOST IN TRAJNOST LESA

Naravna odpornost lesa je lastnost lesa v naravnem zdravem stanju, torej takrat, ko nanj še niso vplivali razni škodljivci, oziroma ga še nismo kemično ali fizikalno obdelali.

Naravna odpornost je odvisna predvsem od kemičnih sestavin lesa, ki jih imenujemo ekstraktivne ali akcesorne sestavine in od anatomske zgradbe.

Ekstraktivne komponente lesa (škrob, sladkorji in beljakovine) pospešujejo napade škodljivcev. Smole, tanini, pigmenti, pektini, alkaloidi, glikozidi in fenoli pa zavirajo ali preprečujejo ogroženost s škodljivci.

Prav zaradi razlike v kemični sestavi, je beljava, ki vsebuje škrob, sladkorje in beljakovine veliko manj naravno odporna kot jedrovina, ki vsebuje smole, fenolne spojine, alkaloide in druge podobno delujoče snovi. Jedrovina vsebuje malo hranilnih snovi.

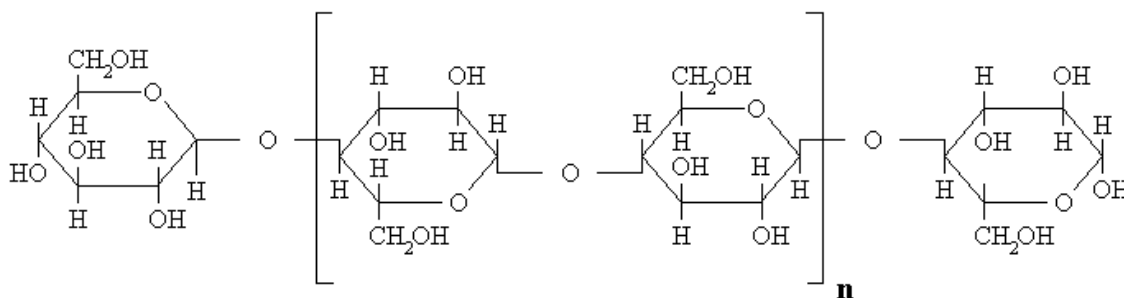
Od naravne odpornosti je odvisna njegova trajnost, od trajnosti pa njegova uporabnost in delno tudi vrednost. Trajnost lesa je čas, v katerem les oziroma lesni izdelek ohrani vse svoje naravne lastnosti (trdnost, barvo, elastičnost...). Trajnost lesa je odvisna od naravne odpornosti in mesta ter načina uporabe.

2.3 KEMIČNA SESTAVA LESA

Glavne kemične in strukturne komponente olesenele celične stene so celuloza, hemiceluloza in lignin. Celuloza (amorfna in kristalinična) predstavlja 40 do 60 %, hemiceluloza (heksozani manan in galaktan, pentozani araban in ksilan, pentozaheksonani arabogalaktan in ksiloglukan) 25 do 35 %, medtem ko je lignina 20 do 30 % celotne mase lesa (Fengel in Wegener, 1989).

2.3.1 Celuloza

Celuloza predstavlja glavno komponento v oleseneli celični steni. Sestavljena je iz β -D-glukopiranoznih enot, povezanih z $\beta(1-4)$ -glukozidnimi vezmi ki tvorijo celulozno verigo. Del celulozne molekule je sestavljen iz dveh celuloznih enot (enota celobioze 1,3 nm) povezanih z $\beta(1-4)$ -glukozidno vezjo (Eaton in Hale, 1993) (slika 1).



Slika 1: Prikaz polimera celuloze (Eaton in Hale, 1993)

2.3.2 Hemiceluloza

Količina hemiceluloze v lesu variira tako med listavci in iglavci kot tudi med drevesnimi vrstami (iglavci 24 do 30 %, listavci 27 do 40 %). Hemiceluloze (polioze) so heterogeni polisaharidi. Podobno kot celuloza predstavlja oporni material v celični steni, predvsem pa povezuje verige celuloze z ligninsko komponento (matriks). Hemiceluloze se v kislem mediju relativno lahko hidrolizirajo v monomerne komponente kot so D-glukoza, D-ramnoza, D-ksiloza, L-arabinoza, manjše količine L-ramnoze ter D-glukuronska kislina, 4-O-metil-D-glukuronska kislina in galakturonska kislina. Pri večini hemiceluloz znaša stopnja polimerizacije komaj 200 sladkornih enot.

Hemiceluloza se od celuloze razlikuje po tem, da ima za stranske skupine sladkorje, sladkorne kisline in acetilne estre. Posledica teh stranskih skupin je nekrystaliničnost ali slaba kristaliničnost hemiceluloze. Hemiceluloze razmeroma zlahka hidrolizirajo v osnovne monomere. Ugotovljeno je bilo, da hemiceluloza, v povezavi s celulozo, vpliva na organizacijo lignina (Kirk in Cullen, 1998).

2.3.3 Lignin

Lignin je polimer aromatskega značaja, ki z ogljikovimi hidrati celične stene tvori oleseneli del rastline. Lignin poveča mehanske lastnosti lesa, oziroma les šele z lignifikacijo pridobi značilno trdnost in izgled (Zabel in Morrell, 1992).

Lignin je kompleksen tridimenzionalen polimer, sestavljen iz fenilpropanskih enot, ki so združene s C–C in C–O–C vezmi. Lignin je popolnoma amorfen in služi kot material, ki obdaja mikrofibrile celuloze. V času lignifikacije se odloži v medcelične prostore, potem ko sta se že odložila celuloza in hemiceluloza.

2.4 RAZKROJ LESA

Razkroj lesa povzročajo abiotični in biotični dejavniki.

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

Biotični so dejavniki žive narave, kamor prištevamo predvsem insekte, bakterije in glive. Glive uničujejo les z ektoencimi ter neencimskimi procesi, insekti pa ga mehansko zdrobijo in nato v telesu prebavijo.

Značilnost delovanja lesnih škodljivcev je njihova specializacija na določene sestavine posameznih drevesnih vrst, na posamezna stanja (vlažnost) lesa kot tudi na stopnjo razkroja. Ko je les razkrojen do določene stopnje, preneha delovanje nekaterih škodljivcev. Tedaj so ustvarjeni pogoji za delovanje drugih škodljivcev. Zaradi tega se les razkroji šele, ko je do konca mineraliziran.

2.5 RAZKROJ OLESENELE STENE CELICE

Organizmi, ki okužijo celico, lahko prodrejo v celico preko pikenj ali pa z razgradnjo celične stene. Glive s pomočjo ustreznih encimov hidrolizirajo ali oksidirajo snovi celične stene. Hife prodirajo iz celice v celico, v začetni fazi razkroja preko pikenj, prevajalnih elementov in parenhima, kasneje pa si z razgradnjo celične stene same ustvarjajo prehode (Eaton in Hale, 1993). Proces razgradnje je močno povezan z izločanjem encimov, ki so sposobni razgraditi substance lesa v takšno obliko, da jih podgobje lahko vsrka v hife in porabi pri presnovi.

2.5.1 Encimi

Encimi so funkcionalne beljakovine. V organizmu so navzoči kot katalizatorji presnove. Pospešujejo posamezne reakcije ali pa nasploh omogočajo procese razgradnje.

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 - so encimi, ki vplivajo na tvorbo dvojne vezi ($C=C$, $C=O$, $C=N$),
- izomeraze - katalizirajo spremembo izomerne molekule,
- ligaze - so encimi, ki tvorijo novo vez ob sočasni porabi ATP, kot vira energije.

Hife oziroma celice so ob dotiku s substratom sposobne zaznati posamezne substance in ustrezno tem snovem aktivirati encime, ki so jih sposobni razkrojiti. Takšne encime imenujemo induktivni encimi.

Nekatere glive pa proizvedejo adaptivne encime. To so encimi, ki se sintetizirajo ob dotiku s snovjo, za katero pa gliva še nima ustreznega encima.

Glede na mesto delovanja, encime delimo na:

- ekstracelularne encime ali ektoencime (delujejo zunaj celice, kjer razgrajujejo netopne substance v topne),
- intracelularne encime ali endoencime (delujejo znotraj celice in regulirajo procese presnove v celici).

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).

2.6 GLIVE

2.6.1 Splošne značilnosti gliv

Glive so heterotrofni organizmi, kar pomeni, da pridobivajo energijo na lizeotrofni način iz organskih snovi. Prehranjujejo se lahko na simbiotne, saprofitske ali parazitske načine. V podlago izločajo ektoencime, s katerimi razgrajujejo substrat, razgrajene produkte pa nato vsrkajo v hife. V zgodnji fazi okužbe lesa se lesne glive večinoma prehranjujejo s preprostimi ogljikovimi hidrati kot so sladkorji in

ostale sestavine parenhimskih celic. Glive prevzemajo snovi iz okolja preko celične membrane ter jih transportirajo do metabolno aktivnih mest znotraj celice.

2.6.1.1 Zgradba gliv

Glive uvrščamo med najenostavnejše evkarionte. So enocelični ali večcelični organizmi, katerih vegetativno telo je lahko zelo reducirano, nemicelijsko, okroglasto ali nitasto. Micelij je lahko septiran ali neseptiran, eno- ali večjedrn, homo- ali heterokariotski, haploiden ali diploiden.

Ločimo površinsko in notranje podgobje. Površinsko podgobje se veliko bolj razrašča in tudi njegove hife so debelejše, kot pri notranjem podgobju. Vegetativne hife so lahko mehurjaste, najbolj pogosto so nitaste in razvejane. Imajo karakteristično apikalno rast, stranske hife pa izraščajo iz starejših delov.

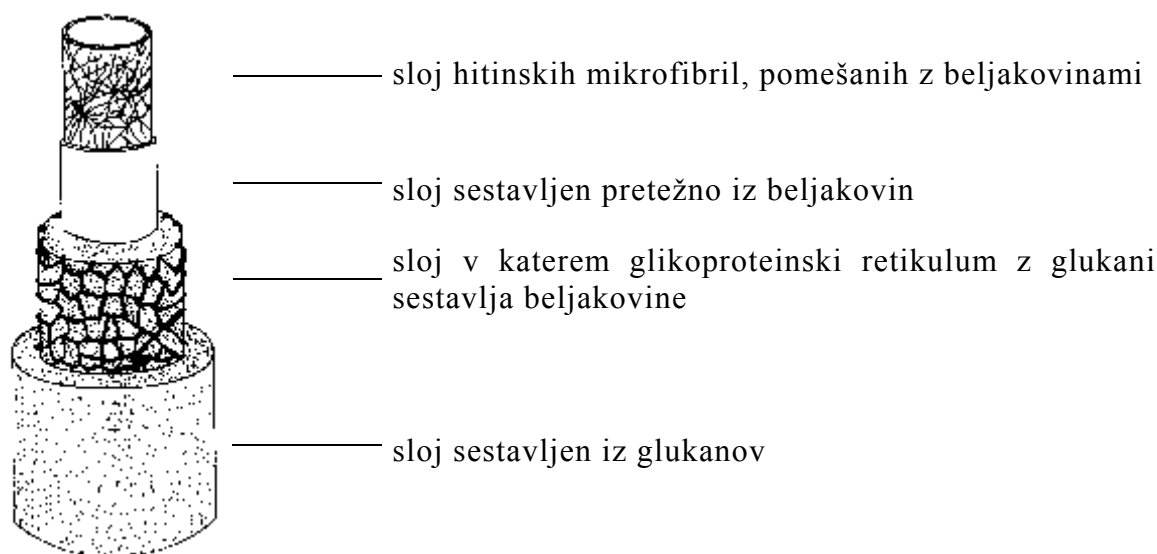
Tako kot pri vseh organizmih, je tudi pri glivah celica osnovni gradnik. Celica glive ima tipično evkariontsko zgradbo. Sestavljene so iz celične membrane, protoplasta (citoplazma in organeli) in celične stene. Celična membrana obdaja citoplazmo, v kateri se nahajajo celični organeli, ki regulirajo sprejemanje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

V celici glive najdemo podobne strukture kot pri živalski in rastlinski celici, vendar se od njih in drugih razlikuje. Bistvena razlika pri glivah je vsebnost hitina v zgradbi celične stene. Hitin zasledimo edino še pri členonožcih.

Hife višjih gliv (*Ascomycotina*, *Basidiomycotina* in *Deuteromycotina*) so septirane. Večina sept pri višjih glivah je perforiranih in omogoča prehod snovi vzdolž ene celice v drugo. Septe dajejo oporo hifi. Neseptirane hife so brez prečnih sten (pojavljajo se le, če je hifa poškodovana) in imajo obliko cevi. Značilne so za nižje glive (glive sluzavke *Myxomycota*, *Zygomycotina* in *Mastigomycotina*) (Zabel in Morrell, 1992).

Premier hif je zelo različen. Tudi znotraj posamezne vrste lahko pride do razlik zaradi različnih vplivov okolja in njihovega položaja v koloniji. Premier hif pri določeni vrsti je lahko od 3 do 4 μm , pri drugi pa vse do 30 μm (Carlile in Watkinson, 1994).

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 pododdelku *Zygomycotina* pa hitozan. Celična stena razreda *Oomycetes* je sestavljena iz celuloze (Gunde-Cimerman, 1996) (slika 2).



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

Glive so sestavljene iz dveh jasno ločenih delov: iz prehranjevalnega ali podgobja in razmnoževalnega dela ali trosnjaka.

Preplet večjega skupka hif imenujemo micelij ali podgobje. Podgobje izloča ektoencime. Ti razgradijo substrat v razgradne produkte, ki jih gliva nato črpa za svojo prehrano. Podgobje tvori rizomorfe, ki služijo 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. karpos-plod, phoros-nositi).

2.6.1.2 Razmnoževanje gliv

Razmnoževanje pri glivah poteka na spolni in nespolni način. Glive se razmnožujejo s sporami, ki imajo dve glavni nalogi: razširitev na novo področje in preživetje. Do razmnoževanja s sporami pride le takrat, kadar so izpolnjeni pogoji za sporulacijo. Glive lahko proizvajajo več vrst spor. 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.

Pri spolnem razmnoževanju dobimo naslednje vrste spor:

- zigospore,
- askospore,
- basidiospore.

Pri določenih vrstah lahko ob spolnem poteka tudi nespolno razmnoževanje, ki ga 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,
- hlamidospore.

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 hife propadejo.

2.6.2 Vpliv dejavnikov okolja na aktivnost gliv

Za razvoj in nemoteno rast gliv so zelo pomembni nekateri dejavniki kot so: zrak, vlažnost, hranilne snovi, temperatura, svetloba, pH... Vsi ti dejavniki morajo biti čimbolj optimalni za normalen razvoj gliv, drugače pride do slabše rasti, hiranja in gliva lahko celo odmre. Spoznanja o vplivu dejavnikov okolja lahko zelo pripomorejo pri biološkem zatiranju gliv.

2.6.2.1 Zrak

Količina zraka, ki ga glive potrebujejo za rast, je odvisna od gostote lesa (odvisno od vsebnosti vode v lesu) in od hitrosti, s katero se kisik širi po celicah.

Glede na potrebo po kisiku lahko glive razdelimo na:

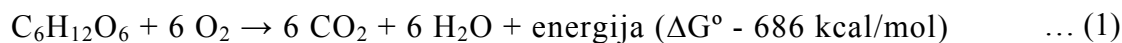
- obligatne aerobe (glive, ki za svoje dihanje nujno potrebujejo kisik),
- fakultativne anaerobe (glive, ki lahko energijo pridobijo z dihanjem kisika ali s fermentacijo) in
- obligatne anaerobe (glive, ki pridobijo energijo le s fermentacijo).

Večina gliv spada med obligatne aerobe.

Zrak je mešanica plinov. Sestavlja ga 78 % dušika (N_2), 21 % kisika (O_2), 0,03 % ogljikovega dioksida (CO_2) in 0,07 % ostalih plinov.

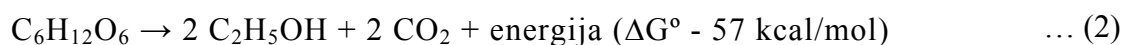
Glive potrebujejo kisik (O_2) za številne matabolične reakcije, vključno s pridobivanjem energije ali za sintezo. Organizmi lahko dobijo energijo z dihanjem. Pri dihanju služi kisik kot reaktant, ki sprejema protone in elektrone. Omeniti je potrebno, da pri dihanju sladkorji (glukoza) popolnoma oksidirajo in s tem se sprosti velika kemična energija v obliki ATP.

Enačba dihanja (Zabel in Morrell, 1992) (enačba 1):



Nekatere glive, predvsem plesni, pa so sposobne pridobivati energijo direktno iz spojin s procesom fermentacije. To se zgodi, kadar so količine kisika zelo nizke, ali ko kisika sploh ni. V tem primeru so sladkorji le delno presnovljeni in nastane vmesni produkt alkohol. Z dihanjem se pridobi več energije kot s fermentacijo oziroma alkoholnim vrenjem.

Enačba fermentacije (Zabel in Morrell, 1992) (enačba 2):



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

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

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

2.6.2.2 Vlažnost

Voda je ob hrani eden najpomembnejših dejavnikov za razvoj gliv. Glive potrebujejo vodo za absorpcijo hranilnih snovi, za transport znotraj micelija ter kot topilo za procesne presnove. Vendar je pravšnja količina vode v lesu bistvenega pomena za sposobnost gliv, da okužijo les in za njihovo rast. Kadar je vlažnost lesa pod 20 % transport snovi ne more potekati, prav tako pa se pojavi plazmoliza, to je prehajanje vode iz hif v les. Les pod to vlažnostjo je varen pred okužbo. 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 naravno zaščitimo les.

2.6.2.3 Hranilne snovi

Večina gliv uporablja glukozo za glavni vir hrane. Poleg tega pa predstavlja glukosa glavno substanco v celičnem metabolizmu.

Kot heterotrofi, si morajo glive s prehrano zagotoviti:

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

2.6.2.4 Temperatura

Glive, kot tudi drugi mikroorganizmi, so zmožne preživeti pri določenih temperaturah. Glive se lahko razvijajo v širokem temperaturnem območju in sicer od nekaj stopinj nad ničlo do 30 do 50 °C.

Glive razvrščamo glede na temperaturo, pri kateri rastejo (preglednica 1):

Preglednica 1: Poimenovanje gliv glede na temperaturo, pri kateri rastejo

Temperatura	Poimenovanje glive
okoli 0 °C	Psihrotolerantne glive
do 20 °C	Psihrofilne glive
nad 20 °C	Termofilne glive
do 50 °C	Termotolerantne glive

2.6.2.5 Svetloba

Svetloba vpliva na rast in razvoj gliv. Vpliva na metabolizem gliv in regulira razvoj reproduktivnih struktur. Vpliv svetlobe je odvisen od intenzitete, dolžine trajanja, valovne dolžine svetlobe, neposrednosti sevanja...

2.6.2.6 Vrednost pH

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

2.7 DELITEV GLIV GLEDE NA VRSTO TROHNOBE

Trohnenje lesa povzročajo glive z izločanjem encimov v lesno maso. Encimi nato razkrojijo sestavine olesenele celične stene.

2.7.1 Rjava ali destruktivna trohnoba

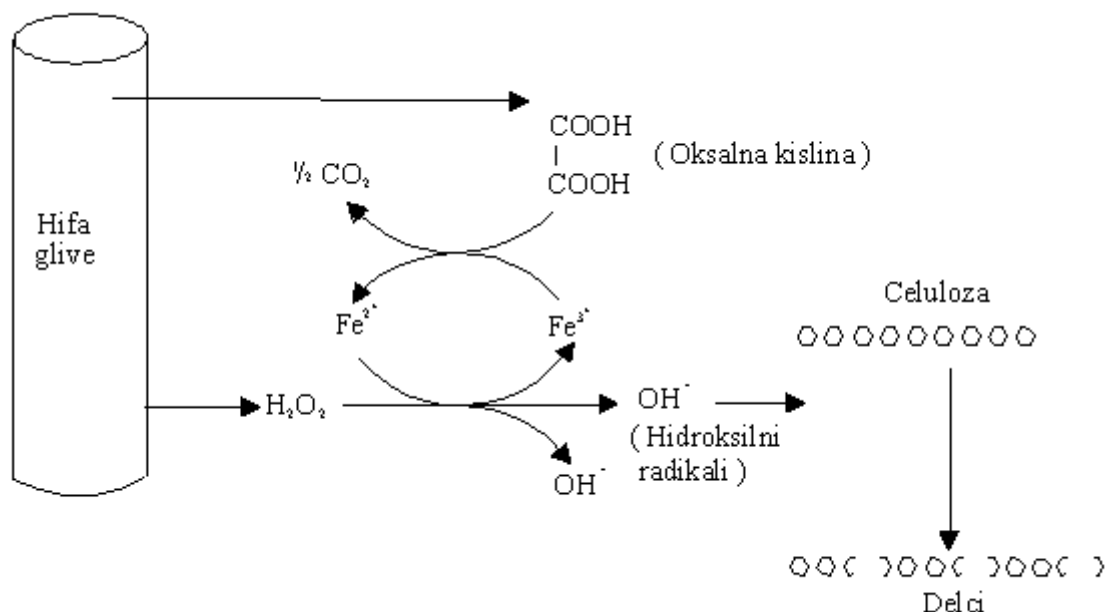
Glive, ki povzročajo rjavo trohnobo, označujemo kot glive prave razkrojevalke lesa in spadajo v pododdelek *Basidiomycotina*. Razgrajujejo celulozo in hemicelulozo, pogosteje iglavcev kot listavcev, medtem ko ostane lignin skoraj nerazkrojen. Les zaradi ostanka lignina postane rdečkasto do temno rjav, izgubi na trdnosti in se na koncu zdrobi v prah.

Mehanizmi, odgovorni za razkroj celuloze, še niso povsem raziskani (Shimada s sod., 1991). Znano pa je, da so tudi najmanjše molekule encima celulaže 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 in Pohleven, 2000). Domneva se, 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^-) in
- produkcija oksalne kisline.

Schmidt (1981) je ponudil možnost, da glive razkrajajo celulozo s fentonsko reakcijo (H_2O_2/Fe^{2+}), oksalno kislino in hidroksilnim radikalom (Micales, 1995) (slika 3).



Slika 3: Oksidativna razgradnja celuloze pri rjavi trohnobi (Eaton in Hale, 1993)

Najpogostejše glive, ki povzročajo rjavo trohnobo, so glive iz rodu bele hišne gobe (*Antrodia*), kletne gobe (*Coniophora puteana*), sive hišne gobe (*Serpula lacrymans*), luskaste nazobčanke (*Lentinus lepideus*), ter tramovki (*Gloeophyllum trabeum* in *Gloeophyllum saepiarium*) (Eaton in Hale, 1993; Humar in Pohleven, 2000).

2.7.2 Bela ali korozivna trohnoba

Glive bele trohnobe so sposobne razkrajati vse glavne komponente lesa, tako celulozo in hemicelulozo, predvsem pa lignin. Zaradi oksidativnega razkroja lignina je razkrojeni del lesa svetlejši, zato to vrsto razkroja imenujemo bela trohnoba.

Poznamo dve vrsti bele trohnobe. Prvo imenujemo simultana, drugo pa selektivna. Glive bele trohnobe lahko delimo na tiste, ki razgrajujejo lignin in polisaharidne sestavine lesne celične stene hkrati (neselektivne ali simultane delignifikatorke), in tiste, ki najprej razgradijo lignin in ga naredijo topnega, šele nato pa depolimerizirajo še hemicelulozo in celulozo (selektivne delignifikatorke) (Liese, 1970; Eaton in Hale, 1993; Bajpai in Bajpai, 1998; Kirk in Cullen, 1998; Messner in sod., 1998).

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 (*Stereum hirsutum*), škrlatnordeča slojevka (*Chondrostereum purpureum*), pahljačica (*Schizophyllum commune*), ostrigar (*Pleurotus sp.*), štorovka (*Armillariella mellea*)...

2.7.3 Mehka trohnoba ali soft rot

Izraz soft rot opisuje glive iz rodu *Ascomycotin* in *Deuteromycotin*, ki razkrajajo celulozo. Okužba se zgodi, kadar zaradi različnih dejavnikov (prevelike vlažnosti, premalo zraka), okužba bolj aktivnih in tekmovalnih gliv iz skupine *Basidiomycotin* ni mogoča (Eaton in Hale, 1993).

Površina napadenega lesa je mehka in izrazito črno 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*...

2.8 ZAŠČITA LESA

Zaščita lesa je interdisciplinarna veda, ki obravnava naravne postopke zaščite, kemijska sredstva in postopke kemijske zaščite v smislu podaljšanja trajnosti lesa in lesnih izdelkov.

Kemična zaščita lesa pomeni vnašanje najrazličnejših biocidov v les z namenom, da bi bila trajnost lesa daljša. Preventivno zaščitno sredstvo uporabljamo z namenom, da bi les zaščitili pred škodljivci.

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) in
- represivno kemično zaščito (zaščitna sredstva vnašamo v les, ki je že napaden z lesnimi škodljivci).

Zaradi varstva okolja imajo naravni (nekemijski) ukrepi zaščite lesa prednost pred kemijskimi. Če uporabljamo kemična zaščitna sredstva, naj jih bo čim manj in le tam, kjer brez njih ne moremo uspešno zavarovati lesa.

2.8.1 Preventivna zaščita lesa

Tudi pri ravnanju z lesom velja pravilo, da je okužbo bolje preprečevati kot zdraviti. Zato je potrebno preventivno zaščito lesa uporabljati povsod, kjer imamo opravka z lesom. Preventivno zaščito lesa razdelimo na naravno in kemično preventivno zaščito.

2.8.1.1 Naravna preventivna zaščita lesa

Pod naravno (nekemično) zaščito lesa pojmuje vse ukrepe, ki se jih uporablja, da bi zaščitili les pred škodljivci, brez uporabe kemičnih sredstev.

Splošni naravni preventivni zaščitni ukrepi, ki veljajo za vse lesne izdelke, so:

- čas sečnje,
- uporaba lesa, ki je odporen pred škodljivci,
- vgrajevanje zdravega in suhega lesa,
- vzdrževanje in higiena stavbe,
- pregled lesenih predmetov, ki jih vnašamo v stavbo in
- redna kontrola lesa znotraj stavb in lesa, ki je v uporabi zunaj.

2.8.1.2 Kemična preventivna zaščita lesa

Preventivna kemična zaščita lesa se izvaja z vnašanjem kemičnih snovi v les pred uporabo. Prednost preventivne kemične zaščite je, da že vnaprej preprečujemo škodo in zanesljivo podaljšujemo trajnost lesa, zato ima le-ta velik ekonomski pomen. Negativne strani pa so, da je preventivna zaščita relativno draga, ni znanega škodljivca, večkrat težko izvedljiva, njeno delovanje pa časovno omejeno.

Zadnje čase se, zaradi vse večje ekološke osveščenosti, uveljavlja delitev kemičnih zaščitnih sredstev na (Pohleven in Petrič, 1992):

- klasična kemična zaščitna sredstva,
- novejša kemična zaščitna sredstva,
- kemična sredstva v razvoju.

2.8.2 Represivna zaščita lesa

Slaba stran represivne zaščite lesa je, da je draga, težko izvedljiva, dobra pa, da je znan škodljivec. V zadnjem času je kemična zaščita nezaželena, zato so raziskave usmerjene v razvoj novih zaščitnih sredstev, učinkovitejših in primernejših za okolje. Še posebej pomembne so raziskave sredstev in metod za zaščito dragocenih lesenih predmetov kulturno-zgodovinske dediščine.

Metode represivne zaščite:

- impregnacija (premazovanje, potapljanje...),
- injiciranje z brizgalkami,
- injiciranje pod visokim pritiskom,
- kapsuliranje,
- fumigacija ali zaplinjevanje,
- zaduševanje.

2.8.2.1 Zaplinjevanje

Zaplinjevanje je pogosta metoda za nadzorovanje insektov na področju konzervatorstva. Fumigant je hlapen biocid - tvorijo se hlapi, ki uničujejo insekte in druge škodljivce. Vsi fumiganti so zelo reaktivni, aktivno ovirajo nekatere življenjske procese škodljivcev. Oviranje je lahko specifično za en proces, kot npr. dihanje ali presnova, ali nespecifično in prizadene več življenjskih procesov insekta. Toda reaktivna sposobnost fumiganta, da ubije škodljivca, ima slabo lastnost, da vpliva tudi na umetniški predmet in osebje, ki dela s predmetom, če ni previdno. Fumiganti so škodljivi ali celo smrtni za ljudi že v količinah, ki jih uporabljamo za nadzorovanje insektov. Prav tako so lahko škodljivi tudi za okolje (Koestler, 1993).

2.8.2.2 Zaduševanje

Za ohranitev kulturno-umetniških predmetov se je najbolje izkazala metoda zaduševanja. To je metoda s katero zrak v neprodušno zaprti posodi ali plastični ovojnici zamenjamo z anoksi plini. Anoksi plin je netoksičen, negorljiv in nereaktiven, ter deluje na osnovi zadušitve ne pa zastrupitve škodljivca.

2.9 ZAŠČITA DRAGOCENIH LESENIH PREDMETOV KULTURNE DEDIŠČINE Z ZADUŠEVANJEM

2.9.1 Ogroženost lesenih predmetov kulturne dediščine z insekti

V preteklosti so za preventivno in represivno zaščito lesenih predmetov uporabljali najrazličnejše naravne metode (dimljenje, premazovanje z rastlinskimi ekstrakti, namakanje v morski vodi...), v novejšem času pa konservatorji najpogosteje uporabljajo hlapne strupe za zaplinjevanje – fumigante (cianovodik, ogljikov disulfid, etilenoksid, metilbromid in fosfin). Ti so izjemno nevarni biocidi in lahko zaradi svoje agresivnosti celo poškodujejo umetnino, ki jo želimo konservirati (Pinniger, 1994). Zato so nekatera od teh sredstev v zadnjih letih prepovedana ali nezaželena ter jih je potrebno nadomestiti z okolju prijaznejšim načinom represivne zaščite.

V zadnjih desetih letih so raziskave pokazale, da je uporaba anoksi plinov učinkovita za zatiranje okužb z insekti v muzejih (Koestler s sod., 2000). Anoksi plini so plini, ki so predvsem inertni; to so helij, dušik in argon.

Razvili so postopek za zatiranje insektov z argonom ali dušikom (postopek zadušitve), ki ne ogroža umetnine, okolja in konservatorjev (Gilberg, 1991; Koestler, 1992; Koestler, 2001).

Dušik že desetletja uporabljajo za nadzorovanje insektov v žitnih silosih. Ker ni popolnoma inerten, ga lahko nekateri mikroorganizmi uporabljajo za svoj obstoj. Zato ni priporočljiva uporaba dušika za dolgotrajnejše shranjevanje. Argon uporabljajo v muzejih po vsem svetu za uničenje insektov, ker ne povzroča nobene škode na umetniških predmetih. Preučevali so tudi druge tehnike, ki jih uporabljajo v nekaterih muzejih, kot so uporaba CO₂, segrevanje, zmrzovanje in obsevanje. Pri vseh teh postopkih pa so predmeti izpostavljeni večjemu tveganju, kot pri anoksi postopku.

Ob upoštevanju vseh dejavnikov so ugotovili, da je postopek zaduševanja z uporabo argona najvarnejši postopek za zatiranje insektov v umetniških predmetih (Koestler in sod., 2000).

Učinkovitost postopka so preverili tako, da so pred dušenjem in po zadušitvi spremljali respiracijo (preživetje) insektov. S sistemom spektroskopije FTIR, posebej prirejenim za merjenje koncentracij CO₂ v zraku, so lahko odkrili prisotnost že enega samega organizma v desetlitrski posodi (Koestler in sod., 2000; Stušek in sod., 2000). Meritve respiracije so še posebno pomembne za preverjanje uspešnosti konserviranja umetnine, ne glede na metodo, ki jo je konservator uporabil (Koestler in sod., 2000).

Dolžina postopka je odvisna od vrste insektov, vrste napadenega materiala, gostote materiala in vsebnosti vlage. Primerjalne študije časa trajanja postopka za insekte v atmosferi argona v primerjavi z atmosfero dušika kažejo, da je pri enaki temperaturi in vlagi argon za 25 do 50 % hitrejši od dušika (Valentin in sod., 1992). Ugotovljeno je, da mora postopek z argonom trajati tri do štiri tedne (Koestler in sod., 2000).

2.9.1.1 Zaduševanje insektov

Zaduševanje ima štiri glavne faze (Koestler, 1992):

- izolacija predmeta pred okoljem z zrakom,
- zamenjava zraka z anoksi atmosfero (brez kisika),
- izpostavitve anoksi pogojem, da insekti odmrejo,
- odstranjevanje predmeta iz anoksi okolja.

Izolacija objekta je najpomembnejša med štirimi naštetimi stopnjami. Objekt je potrebno neprodušno izolirati, da zagotovimo ves čas zelo nizke koncentracije O₂, ki v primernem času uničijo insekte v vseh stanjih. V osnovi sta za to dve možnosti: lahko zgradimo komoro s trdimi stenami ali mehko plastično ovojnico. Komora s trdimi stenami je lahko učinkovita, kadar moramo zapliniti veliko število predmetov. V takem primeru morajo biti spoji in odprtine vrat neprodušni.

Sistem z mehкими ovojnicami lahko izvedemo iz večslojne plastike, ki jo je mogoče variti. Na tak način lahko zadostimo zahtevi za nizko prepuščanje kisika, da lahko dosežemo in vzdržujemo okolje z nizko vsebnostjo kisika. Ovojnico je enostavno transportirati na mesto, kjer so napadeni predmeti, ki jih zavarimo v ovojnico. Tak postopek zelo zmanjša ceno zaščite, ker predmeta ni treba zavarovati in prevažati v centre za konserviranje.

Lesene predmete lahko napadejo ksilofagni insekti (predvsem iz skupine *Coleoptera*) in jih z dolgotrajnim vrtanjem temeljito poškodujejo. Če je tak predmet že delno okužen z glivami, se verjetnost za napad insektov še poveča. Glive razkrojevalke lesa pa lesene predmete razgrajujejo hitreje in jih že v kratkem času lahko popolnoma uničijo (Pohleven, 2000).

2.9.1.2 Zaduševanje gliv

Zatiranje gliv z anoksi postopkom je za lesene umetniške in kulturno-zgodovinske predmete v razvojni fazi. Do sedaj je dokazano, da je za uničenje gliv potreben daljši čas kot za insekte (Koestler s sod., 2000).

2.9.2 Ogroženost lesenih predmetov kulturne dediščine z glivami

Podobno kot pri insektih, lahko tudi biocidi, ki uničujejo glive, prepogosto povzročijo poškodbo umetniškega oziroma kulturno-zgodovinskega predmeta. Klasični postopki konserviranja zato niso več sprejemljivi in je potrebno uporabiti rešitve, ki jih ponujajo nova biotehnološka dognanja razgradnje lesa na molekularni ravni.

Plesni in glive modrivke povzročajo le estetske poškodbe; plesni obarvajo površino lesa ali premaza, glive modrivke pa temno obarvajo tudi notranjost. Lesenih predmetov mehansko ne poškodujejo (Pohleven, 2000).

Glive prave razkrojevalke lesa lahko les popolnoma uničijo. Podgobje glive izloča v les encime, s katerimi razkraja glavni komponenti lesa – lignin in celulozo. Preventivno lahko lesene predmete kulturne dediščine zaščitimo tako, da zagotovimo takšne pogoje, da bodo predmeti ves čas suhi, saj je zračno suh les popolnoma varen pred okužbo s trosi vseh vrst lesnih gliv (Pohleven, 2000).

Zaustavitev okužbe lesa z glivami s postopkom zaduševanja je bolj zahtevno kot zatiranje insektov. V zračno suhem lesu je skoraj nemogoče, da bi na/v njem vzkile spore gliv. Če pa gliva predmet že intenzivno razkraja, uporaba enostavnih metod kot je sušenje, ne bo zadostovala za popolno uničenje nekaterih vrst gliv. Bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*) lahko preživi v stanju dormance pet let in več. Sušenje tudi ne bo ustavilo trohnenja lesa s sivo hišno gobo (*Serpula lacrymans*) (Pohleven, 2000). Ker so z uporabo postopkov za zatiranje insektov z argonom ali dušikom (postopek zadušitve) dokazali njihovo uspešnost, smo se odločili, da poskušamo podobno metodo razviti tudi za uničenje gliv v lesenih umetniških predmetih.

Za večino pravih razkrojevalk lesa (predvsem glive iz skupine *Basidiomycotina*, izjemoma iz skupine *Ascomycotina*) je značilno, da za oskrbo z energijo v procesu celičnega dihanja potrebujejo kisik (Zabel in Morrell, 1992). Kisik je prav tako neposreden reaktant encimov, ki katalizirajo oksidativno razgradnjo lignina (Reid, 1985; Kirk in Cullen, 1998). Kljub temu je še precej nejasnosti kako dolgo je potrebno izpostaviti glive razmeram brez kisika, da micelij glive odmre. Prav tako še ni ugotovljeno, kako nizka mora biti koncentracija kisika, da pomanjkanje kisika povzroči odmiranje in ne le dormanco hif. Zato so pričeli razvijati metode za kontinuirano spremljanje porabe kisika in tvorbe ogljikovega dioksida, s čimer bi lahko ugotovili prisotnost in aktivnost glive v okuženem lesu (Čepin, 1999; Ternifi, 1999).

Sposobnost gliv, da preživijo v okolju z znižano koncentracijo kisika in zvišano koncentracijo ogljikovega dioksida, je najbolje opisal Scheffer (1986). Dokazal je, da glive, ki v takih razmerah preživijo najdlje, v naravi običajno povzročajo trohnobo jedrovine lesa, ne pa trohnobe beljave ali lesnih izdelkov. Kulture podgobja nekaterih vrst gliv so v neprodušno zatesnjenih posodah, na trdnem hranilnem gojišču, preživele celo več kot dve leti. Res pa je, da so kulture nekaterih vrst gliv odmrle že po treh mesecih po zaprtju v testne epruvete, kulturi dveh vrst pa celo že po enem tednu.

3 MATERIAL IN METODE

Pri testiranju smo uporabili naslednje vrste gliv razkrojevalk lesa: *Coniophora puteana* (kletna goba), *Antrodia vaillantii* (bela hišna goba) in *Trametes versicolor* (pisana ploskocevka). Pri zaduševanju smo uporabili plin argon (99,98 % čistosti), dušik (99,999 % čistosti) ter sintetični zrak (20,5 % O₂ in 79,5 % N₂) (Messer, Slovenija).

3.1 MATERIALI

3.1.1 Testne lesne glive

Pri poskusu smo uporabili različne vrste in seve gliv razkrojevalk lesa, ki so skupaj z okrajšavami in tipom trohnobe navedene v preglednici (preglednica 2).

Preglednica 2: Vrste gliv, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu

Latinsko ime	Slovensko ime	Okrajšava	Depozitna oznaka	Trohnoba
<i>Antrodia vaillantii</i> (DC.: Fr) Ryv.	bela hišna goba	A.v.4	BAM, 1998	rjava
<i>Coniophora puteana</i> (Schum ex Fr.) Karst.	kletna goba	C.p.	*ZIM L008	rjava
<i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát	pisana ploskocevka	T.v.5	*ZIM L057	bela

*Raspor in sod.,1995

Gobe razkrojevalke lesa so iz glivne zbirke Katedre za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete (Univerza v Ljubljani).

Micelij je rasel na krompirjevem glukoznem agarju (PDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI) v navadnih poskusnih steklenih kozarcih (volumen 720 mL).

3.1.1.1 BELA HIŠNA GOBA – *Antrodia vaillantii*

Bela hišna goba je razširjena predvsem v severni in srednji Evropi. Okužuje vlažen les iglavcev, vendar tudi nekatere vrste listavcev. Pojavlja se kot razkrojevalka vgrajenega lesa in lesa, ki je v stiku z zemljo, oziroma povsod tam, kjer je les izpostavljen zelo vlažnim pogojem (kot na primer v rudnikih).

Na površini okuženega lesa tvori belo podgobje v obliki ledenih rož na oknih. Iz podgobja se razvijejo beli rizomorfi, ki so lahko debeli do 4 mm in 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 od bele do rumenkaste barve. Trosovnico sestavljajo cevčice nepravilnih oblik (slika 4). Bazidij z ledvičastimi bazidiosporami se razvije na himeniju. Trosi so elipsasto ovalni.



Slika 4: *Antrodia vaillantii* (Grosser, 1985)

Bela hišna goba raste najintenzivneje pri temperaturi 27 °C in okoli 40 % vlažnosti lesa. Pri optimalnih pogojih je lahko na hranilnem gojišču dnevni prirast gobe do 12,5 mm. Posebno ji prija vlaga, ki prodira v les v obliki vodnih kapljic. Bela hišna goba zelo dobro prenaša izsušitev. Po nekaterih virih naj bi gliva pričela z rastjo še po petih letih sušnega obdobja, vendar le, če vlažnost lesa ponovno doseže 40 %. 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 škode povzročajo predvsem na tehničnem lesu, ni pa redka tudi na kulturno-zgodovinskih predmetih iz lesa.

3.1.1.2 PISANA PLOSKOCEVKA – *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pilat

Gliva sodi med najbolj razširjene na svetu. Okužuje predvsem les listavcev (bukev, hrast, kostanj, robinija...), le redko pa uspeva na iglavcih (bor, smreka). Prav pogosto je na hlodovini. Najdemo jo tudi na štorih, jamskem lesu, pragovih, drogovih, ograjah itd. Stoječa drevesa okuži le, če so poškodovana.

Trosnjaki so različnih barv in oblik. So konzolaste oblike, z zgornje strani drobno dlakavi in obarvani izrazito v koncentričnih pasovih. Lahko so beli, rumeni, rdečkasti, sivkasti ali celo črni. Himenij je bel ali rumenkast in ima majhne pore (slika 5). Trosi so cilindrični in brezbarvni.



Slika 5: *Trametes versicolor* (Jahn, 1990)

Optimalna temperatura za rast micelija je 30 °C, maksimalna pa 38 °C. Gliva je torej odporna na višje temperature, pa tudi na dolgotrajno sušo.

Povzročča značilno belo korozivno trohnobo lesa listavcev. V začetku okužbe dobiva les bele pege, pozneje pa postane popolnoma bel in mehak. Gliva razgrajuje lignin in celulozo ter povzroča tudi piravost. Ni pogosta na kulturno-zgodovinskih predmetih, razen če so le-ti vgrajeni na prostem in v stiku z zemljo.

3.1.1.3 KLETNA GOBA - *Coniophora puteana* (Schum. Ex Fr.)

Kletna goba je najbolj razširjena v Evropi, najdemo pa jo tudi v Ameriki. Pojavlja se predvsem v zatohlih prostorih na zelo vlažnem lesu iglavcev, pa tudi listavcev. Na površini lesa tvori pajčevinasto razvejano belkasto podgobje, ki kasneje postane rumenkastorjavo in na koncu temno rjavo. Po hitrosti rasti podgobja je ne prekosi nobena druga hišna goba. Pri optimalnih pogojih je lahko na hranilnem gojišču dnevni prirast gobe do 13,5 mm.

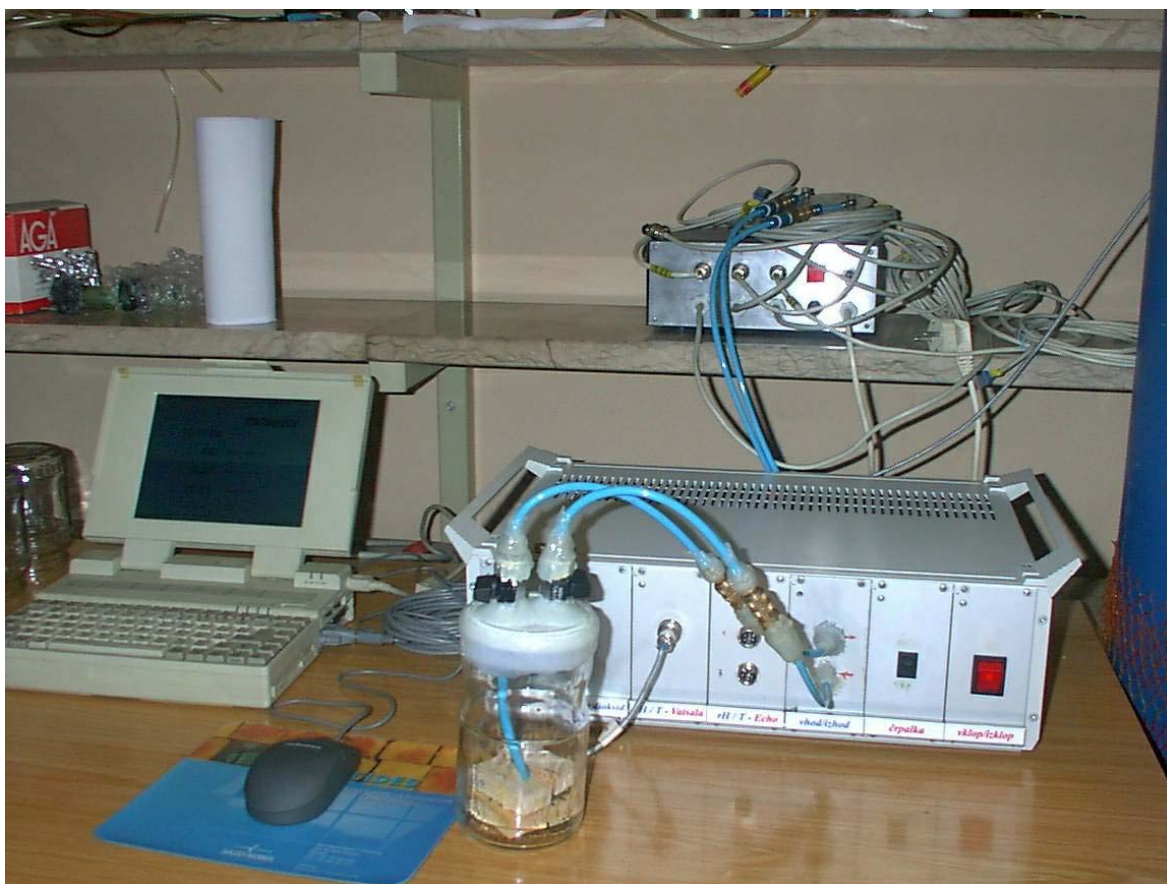
Trosnjaki se pojavijo zelo redko in so blazinaste oblike ter močno prirasli na podlago. Plodišče je rjave barve in ima na površini bradavičaste izrastke. Optimalni pogoji za razvoj so temperatura 23 °C do 24 °C, vlažnost lesa 50 % do 60 % in visoka zračna vlažnost. Je zelo občutljiva na sušenje. Če posušimo les pod 24 % vlažnosti, kletna goba propade in se več ne regenerira ob ponovnem stiku z vlago.

Povzroča rjavo destruktivno trohnobo. Že v začetku pride od spremembe barve okuženega lesa, ki dobiva rumeno-rjave proge in madeže. V zadnji fazi razkroja postane les temno rjav, skoraj črn.

3.1.2 Vzorci lesa in plinotesni kozarci s pokrovom

V eksperimentu so bili uporabljeni vzorci lesa po standardu SIST EN 113 (1989), dimenzije 1,5 × 2,5 × 5 cm (dolžinska smer), beljava smreke (*Picea abies*) in bukve (*Fagus sylvatica*) s čimbolj vzporednimi branikami.

Meritve dihanja ali dušenja kultur micelija gliv smo izvedli v sterilnih (autoklaviranih) steklenih kozarcih (prostornina 720 mL), ki smo jih zaprli s posebej prirejenimi pokrovčki. Na pokrovčke smo pritrdili plinotesne ventile (Metalwork, Italija), katere smo z napravo za merjenje koncentracij kisika in ogljikovega dioksida povezali s poliuretanskimi cevkami in spojkami (Rectus, Nemčija) (slika 6). Za izboljšanje tesnenja na vseh stikih in kontaktnih površinah smo uporabili silikonsko vakuumsko pasto (Silicon high vacuum grease medium, Merck, Nemčija).



Slika 6: Plinotesni eksperimentalni kozarec, povezan z napravo za merjenje koncentracij O_2 in CO_2 (Foto: Č. Tavzes)

3.1.3 Plin

Pri poskusu tretiranja kultur micelija z inertnimi plini smo uporabili argon (99,98 % čistost), dušik (99,999 % čistost) in sintetični zrak (20,5 % O_2 in 79,5 % N_2) (Messer Slovenija). Inertna plina (argon in dušik) smo uporabili za vzpostavljanje anoksičnih razmer znotraj vzorčnih kozarcev, sintetični zrak pa smo uporabili za izvedbo merjenja dihanja.

3.1.4 Oprema za merjenje koncentracije O_2 in CO_2

Za merjenje koncentracije plinov v kozarcih, ki so služili kot komora za meritve, smo uporabili dve napravi. Eno nam je dobavil Art Care Intl. (New York, USA) za merjenje koncentracije O_2 v razponu od 0 do 2000 ppm (natančnost 2 %), ki koncentracijo določa s perfuzijskim senzorjem. Sestavljena je iz membranske črpalke, senzorja pretoka kisika in digitalnega ekrana. Drugo napravo je izdelal

ECHO d.o.o. iz Slovenije in je sestavljena iz membranske črpalke (pretok 0,5 L/min), elektrokemičnega senzorja za kisik in meri v razponu od 0 % do 25 % (natančnost 0,01 %), IR senzorja ogljikovega dioksida (0 do 3000 ppm, natančnost 5 ppm) in 16-bitnega A/D pretvornika za računalniško obdelavo podatkov. ECHO sistem je zaprt pretočni sistem, ki dovoljuje kontinuirano merjenje koncentracij O₂ in CO₂ v daljšem časovnem obdobju.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava hranilne podlage in gojišča

Kot hranilno podlago za preraščanje micelija smo uporabili krompirjev glukozni agar v obliki prahu (potato dextrose agar (PDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI), ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca. 39 g hranilnega medija smo raztopili v 200 mL hladne destilirane vode, ki smo jo prelili z 800 mL vrele destilirane vode. Vse skupaj smo mešali toliko časa, da je zavrelo. Mešanje medija je moralo potekati skrbno, da se ni prismodilo.

Pred sterilizacijo v avtoklavu (slika 7) smo še vroč, tekoč medij z avtomatskim pipetorjem razlili v steklene kozarce. V kozarce s prostornino 720 mL smo razlili po 30 oziroma 70 mL medija. Kozarci so morali biti čisti in suhi. Zaprli smo jih s pokrovčki, ki so imeli odprtino zamašeno z vato. Kozarce smo postavili v avtoklav za 45 minut. Pri temperaturi 121 °C oziroma tlaku 1,5 bara se je medij v avtoklavu steriliziral.



Slika 7: Avtoklav za sterilizacijo (Foto: M. Jenišek)

Po avtoklaviranju smo kozarce z medijem prenesli v sterilno komoro – laminarij (slika 8), kjer smo zagotovili sterilne pogoje z 99,9 % filtracijo zraka in sterilizacijskimi UV lučmi. Tu se je medij ohladil in strdil. Tako je bilo gojišče pripravljeno za cepljenje micelija. Med delom so morale biti UV luči v sterilni komori ugasnjene, da ni prišlo do poškodbe gliv in kože.



Slika 8: Sterilna komora – laminarij (Foto: M. Jenišek)

Micelij glive smo po 24 urah v sterilni komori cepili na medij v kozarcu. Po cepljenju smo postavili kozarce v rastno komoro s stalno temperaturo 25 °C (RH 75 %) in počakali teden dni, da se je micelij razrasel po celotni površini gojišča. Gobe so bile cepljene na agar PDA v eksperimentalnih kozarcih. Micelij je rasel v normalni atmosferi. Micelij je prerasel približno 3/4 hranljivega medija in tvoril vitalno in hitro rastoče podgobje. Del kultur je bil uporabljen za zadušitev, del pa za okužbo vzorcev lesa.

Vse cepitve, ponovne cepitve in zamenjave pokrovov smo opravili v sterilnih pogojih v sterilni komori.

3.2.2 Priprava vzorcev lesa

Uporabili smo lesne vzorce beljave bukve in smreke, dimenzij 5 × 2,5 × 1,5 cm, jih oštevilčili ter v 24 urah posušili pri temperaturi 103 °C in jim določili absolutno suho maso. Vzorce smo dali v petrijevke in zavili z aluminijasto folijo ter avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C oziroma tlaku 1,5 bara. Po avtoklaviranju smo vzorce lesa ohladili in jih v sterilni komori za osem tednov vstavili v kozarce na površino razraščene micelija (slika 9). Vzorce lesa bukve

smo vstavili na kulturo *Trametes versicolor*, vzorce lesa smreke pa na kulturi *Antrodia vaillantii* in *Coniophora puteana*.



Slika 9: Kozarec z vzorcem lesa in razraščnim micelijem (Foto: M. Jenišek)

Kozarce z vzorcem lesa smo potem postavili v rastno komoro s stalno temperaturo 25 °C, da je micelij imel optimalne pogoje za preraščanje vzorcev lesa. Po osmih tednih popolnoma prerasle vzorce smo previdno vzeli z rastišča in jih vstavili v prazne sterilizirane kozarce, ki so služili kot komora za meritve CO₂ in O₂ in jih zaprli s pokrovčki s plinotesnimi ventili. Tako so bili okuženi vzorci lesa pripravljeni za postopek zaplinjevanja.

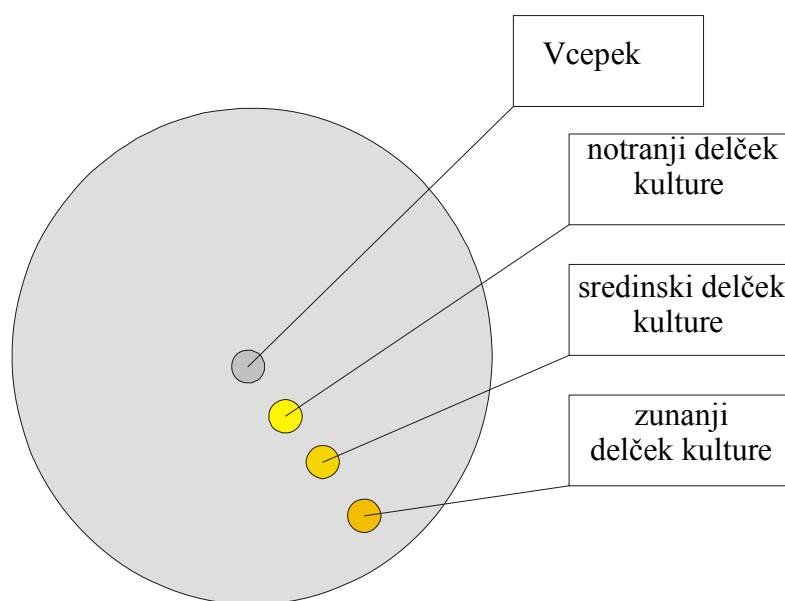
3.3 IZPOSTAVITEV KULTUR MICELIJA ANOKSIČNIM RAZMERAM NA HRANILNI PODLAGI

V steklene eksperimentalne kozarce smo nalili 70 mL hranilnega gojišča PDA in jih sterilizirali v avtoklavu. V sterilni komori smo na hranilna gojišča cepili kulture gliv *Antrodia vaillantii* in *Coniophora puteana*. Micelij je preraščal v normalni atmosferi v rastni komori (RH 75 %, T 25 °C) tako dolgo, da je prerasel 2/3 površine gojišča. Nato smo eksperimentalne kozarce zaprli s pokrovčki z ventili (slika 6), skozi katere smo prepihovali dušik ali argon, dokler koncentracija kisika v izhodni cevki ni padla pod 20 ppm.

Vitalnost kultur micelija smo preverjali v tedenskih presledkih. Ob vsakem preverjanju smo izmerili enourno produkcijo ogljikovega dioksida. Atmosfero v eksperimentalnih kozarcih, v katerih smo tretirali kulture gliv, smo prepihali s sintetičnim zrakom in tako odstranili ves CO₂, ki se je zaradi dihanja gliv v času

izpostavitve anoksičnim razmeram nakopičil v njej. Kulturam gliv smo s tem dodali tudi kisik za dihanje, da smo lažje določili, če so preživele izpostavitve anoksičnim razmeram. Merilni sistem ECHO (slika 6) smo prepihali z dušikom, da smo odstranili ves CO_2 . Nanj smo nato priključili eksperimentalne kozarce (slika 6) in pet minut merili koncentracije CO_2 (sistem izmeri vrednosti vsakih 10 s). Po prvi meritvi smo zaprli ventile na pokrovčkih, da se je gliva lahko opomogla. Po inkubacijski dobi ene ure smo ponovili petminutno meritev koncentracije CO_2 . Enourno produkcijo ogljikovega dioksida kultur gliv smo izračunali kot razliko povprečij vrednosti koncentracij prve in druge meritve.

Rezultat enournega dihanja smo primerjali s preživetjem tretiranih kultur micelija. Ob vsakokratnem preverjanju viabilnosti smo iz posameznega eksperimentalnega kozarca vzeli tri vcepke, jih precepili v epruvete s svežim trdnim gojiščem in inkubirali v rastni komori v razmerah normalne koncentracije kisika. Delčke micelija smo odvzeli iz različnih področij tretiranega podgobja (notranje, sredinsko in zunanje področje). Le-ti so predstavljali najstarejši, vmesni in najmlajši del glivnega tkiva (slika 10). Vsak dan smo opazovali ali so iz precepljenih delčkov pognale hife. Vpliv izpostavitve kultur micelija anoksičnim razmeram smo izrazili kot povečanje števila dni, ki so ga vcepki potrebovali za regeneracijo (vcepki kontrolnih, netretiranih gliv so pognali najkasneje v dveh dneh). Če se vcepek ni regeneriral v štiridesetih dneh, smo predpostavili, da je kultura iz katere smo vzeli cepiče, odmrla.



Slika 10: Skica odvzemnih mest vcepkov iz tretiranih kultur micelija za preizkus viabilnosti

Da bi določili najkrajši čas, ki je potreben, da začnejo kulture gliv odmirati zaradi pomanjkanja kisika, smo v prvem delu poskusa (prve štiri tedne) pripravili štiri poskusne skupine. Vsaka je vsebovala šest kozarcev s kulturami izbranih gliv

(*Antrodia vaillantii*, *Coniophora puteana* in *Trametes versicolor*). Tri kozarce smo prepihali z argonom, tri pa z dušikom. Izgubo viabilnosti kultur gliv iz prve skupine smo ugotavljali vsak teden po vzpostavitvi anoksičnih razmer, iz druge skupine drugi in četrti teden, iz tretje tretji, iz četrte pa četrti teden. S takim načinom preverjanja smo želeli ugotoviti tudi vpliv periodične menjave atmosfere s kisikom in brez kisika na preživetje gliv.

Ker se je izkazalo, da štirje tedni izpostavitve razmeram brez kisika niso dovolj, da bi na hranilnem gojišču popolnoma uničili kulture micelija katerekoli od izbranih vrst gliv, smo v drugem delu poskusa podaljšali čas izpostavitve. Deset eksperimentalnih kozarcev vsake od izbranih vrst gliv smo izbrali tako, da je bil delež odmrlih kultur enak deležu v celotni populaciji kultur gliv po štiritedenskem tretiranju z anoksičnimi razmerami. Anaerobne razmere smo vzpostavili v desetih kozarcih – v šestih z argonom in v štirih z dušikom.

Kozarce smo vsak teden ponovno prepihali z inertnima plinoma (preprečili morebitno onesnaženje atmosfer kozarcev s kisikom). S prepihanjem smo odstranili tudi CO₂, ki se je morda nakopičil z dihanjem glive v testnih posodah.

Viabilnost kultur micelija gliv smo ugotavljali le z opazovanjem regeneracije delčkov (še dvakrat) v intervalu šestih tednov (slika 10), 10. in 16. teden po pričetku dušenja.

3.4 DUŠENJE OKUŽENIH VZORCEV LESA IN VIZUALNO UGOTAVLJANJE VIABILNOSTI GLIV

Popolnoma prerasle vzorce lesa z micelijem smo pazljivo preložili v komore, za katere smo uporabili prazne sterilizirane steklene kozarce in jih zaprli s posebej prirejenimi pokrovčki s plinotesnimi ventili (slika 11). Vzorce lesa smo tako dušili z inertnima plinoma (argon ali dušik). Celoten poskus dušenja gliv na koščkih lesa je trajal pet tednov. Za določitev najkrajšega časa dušenja, v katerem začnejo kulture gliv odmirati zaradi izpostavitve anaerobnim pogojem, smo vzorce lesa razporedili v štiri eksperimentalne skupine.



Slika 11: Steklen kozarec s plinotesnimi ventili (Foto: M. Jenišek)

Vsaka skupina je vsebovala šest eksperimentalnih kozarcev. Tri od teh, so vsebovale po štiri vzorce lesa preraščene z micelijem gob *Coniophora puteana*, *Trametes versicolor* in *Antrodia vaillantii*, tretirane z argonom. Ostale tri pa so vsebovale po tri vzorce lesa preraščene z micelijem enakih gob in so bile tretirane z dušikom.

Okužene vzorce lesa smo v kozarcih dušili 20 minut z inertnim plinom. Postopek dušenja-prepihovanja je potekal po naslednjem postopku: eno poliuretansko cevko kozarca s plinotesnimi ventili smo povezali s plinsko jeklenko napolnjeno z argonom ali dušikom, drugo poliuretansko cevko smo pustili prosto. Odprli smo plinotesne ventile na kozarcu in nato še na plinski jeklenki, da sta argon ali dušik prepihal vzorce lesa oziroma, da je eden ali drugi plin napolnil atmosfero v kozarcu ter izrival kisik (slika 12).



Slika 12: Dušenje okuženih vzorcev lesa v steklenen kozarcu z inertnim plinom (Foto: M. Jenišek)

Po dušenju smo plinotesne ventile na pokrovčkih kozarcev zaprli, da smo ohranili anoksične razmere v kozarcih. Anaerobne razmere smo v kozarcih iz prve skupine vzdrževali en teden, nato smo jih prepihali s sintetičnim zrakom. Vzorce lesa v kozarcih iz ostalih skupin, katerih je proces dušenja trajal več časa, smo enkrat tedensko prepihovali z argonom ali dušikom.

Izgubo sposobnosti preživetja gliv iz prve skupine smo ugotavljali že prvi teden po vzpostavitvi anoksičnim razmeram, iz druge skupine drugi, iz tretje tretji teden in iz četrte pa peti teden. Želeli smo ugotoviti ali periodični ciklus med normalno in O₂ izčrpano atmosfero vpliva na preživetje gob.

Po izpostavitvi anaerobnim razmeram smo za preizkus vitalnosti lesne koščke prestavili v kozarce s svežim gojiščem PDA in jih inkubirali v rastni komori v razmerah normalne koncentracije kisika. Morebitno regeneracijo kultur micelija smo z vsakodnevnim opazovanjem spremljali najmanj štiri tedne. Vpliv izpostavitve kultur micelija anoksičnim razmeram smo izrazili kot povečanje števila dni, ki so ga tretirane kulture gliv na koščih lesa potrebovale za regeneracijo micelija (kontrolne kulture so pričele z odganjanjem hif najkasneje v dveh dneh). Če kultura micelija ni regenerirala v štirih tednih, smo smatrali, da je svojo viabilnost popolnoma izgubila in je propadla (odmrla).

4 REZULTATI

4.1 TRETIRANJE NA HRANILNEM GOJIŠČU PDA

Preživetje micelija smo določali z merjenjem dihanja oziroma z merjenjem koncentracije ogljikovega dioksida (v eni uri) in vizualnega opazovanja revitalizacije tretiranega micelija.

Če se hife treh različno starih vcepkov niso regenerirale v najmanj štiridesetih dnevih po precepitvi v kozarce s hranilno podlago in normalno koncentracijo kisika, smo sklepali, da je micelij glive odmrl. Vpliv izpostavitve micelija anoksičnim razmeram smo izrazili kot število dni, ki so ga vcepki potrebovali za regeneracijo (vcepki kontrolnih gliv so pogнали najkasneje v dveh dneh). Cepič vzet z mladega dela tretiranega micelija se je hitreje regeneriral in preživel kot cepič vzet iz starejšega micelija.

Micelij glive se zaradi vzpostavitve anoksičnih razmer močno spremeni. Sprememba micelija je bila v primerjavi z normalno (kontrolno) kulturo opazna ves čas. Kulture micelija gliv *Coniophora puteana* v aerobnih pogojih navadno močno potemnijo trdno hranilno gojišče, na katerem rastejo. Kontrolni vzorci *Antrodia vaillantii* so prerasli površino agarja in tvorili svetel puhast preplet micelija. Nasprotno so dušene kulture *Coniophora puteana* dobile svetlo rjavo barvo in niso potemnile površine hranljivega agarja. Kultura *Antrodia vaillantii* pa v pogojih brez kisika tvori redek micelij rahlo pritrjen na površino agarja.

Razen v zaostajanju rasti anaerobno tretiranih kultur, gliva *Trametes versicolor* ni pokazala nobene morfološke razlike v primerjavi s kontrolnimi vzorci.

4.1.1 Regeneracija kultur gliv po prvem tednu dušenja

Po prvem tednu izpostavitve anoksičnim razmeram so se vcepki tretiranih kultur regenerirali že v dveh dneh po precepitvi, podobno kot kontrolni vcepki, ki so rasli v normalni atmosferi. Enourno merjenje proizvodnje CO₂ ni pokazalo značilnih razlik med kontrolnimi vzorci kultur gliv in vzorcev kultur tretiranimi s plini.

Ne glede na to ali smo kulture micelija gliv dušili z argonom ali z dušikom, so le-te tvorile podobno količino ogljikovega dioksida.

4.1.2 Regeneracija kultur gliv po drugem tednu dušenja

Po dveh tednih dušenja se je pokazalo, da potrebujejo nekateri vcepki več časa za obnovitev rasti. Pri glivah *Coniophora puteana* se enajst vcepkov od skupno šestintridesetih (30 %) sploh ni regeneriralo. Te kulture so v testnih kozarcih proizvedle tudi manj ogljikovega dioksida kot kulture v kontrolnih kozarcih. Vsi vcepki kultur *Antrodia vaillantii* in *Trametes versicolor* so preživel dvotedensko izpostavitvev anoksičnim razmeram in niso pokazali specifične razlike v proizvodnji količine ogljikovega dioksida.

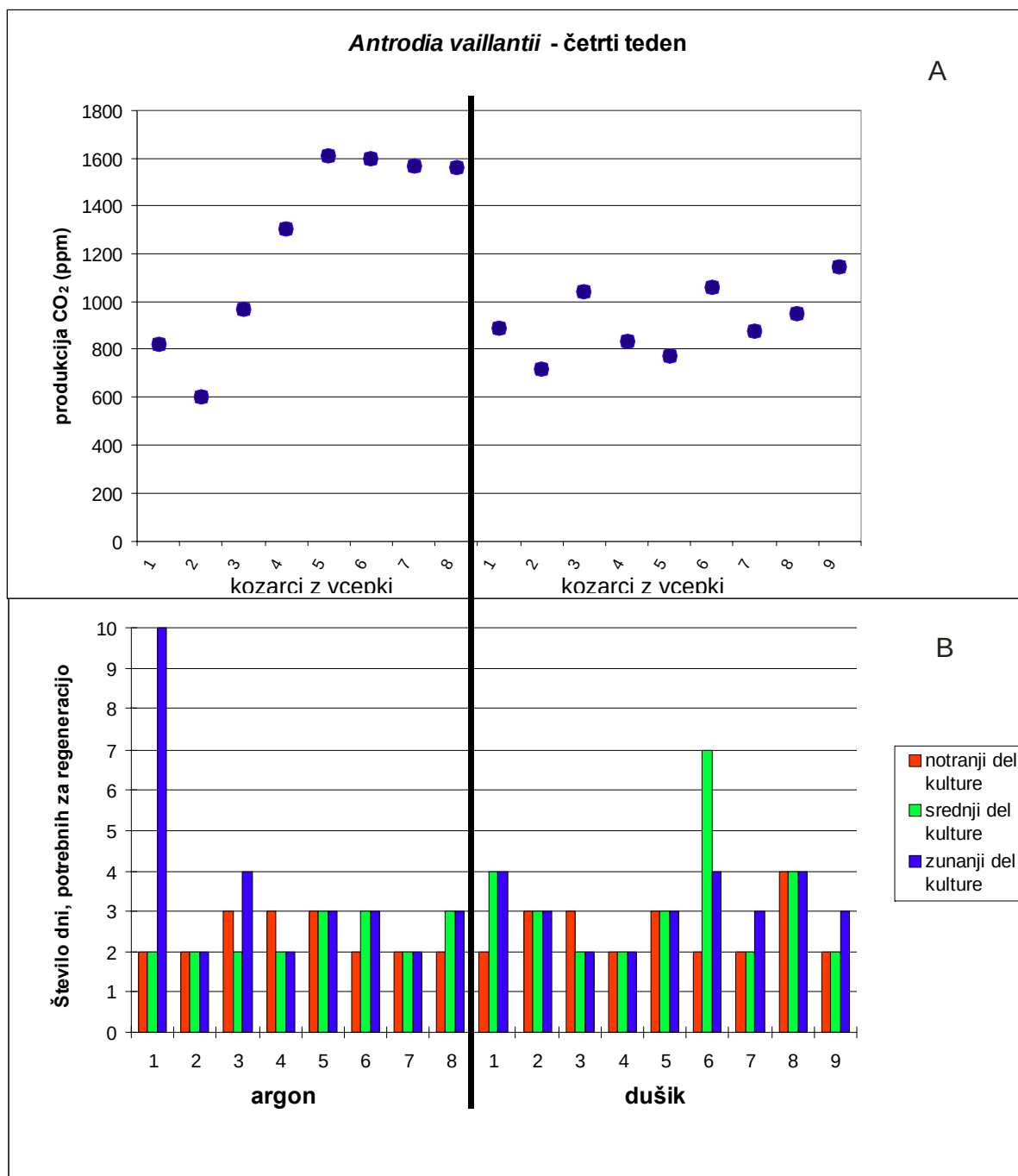
Izbira plina (argona ali dušika) za dušenje ni vplivala na podaljšanje regeneracije kultur micelija.

4.1.3 Regeneracija kultur gliv po tretjem tednu dušenja

Sposobnosti preživetja kultur micelija gliv po tritedenskem dušenju so bile primerljive z regeneracijo po dvotedenskem dušenju. Le nekaj vcepkov je potrebovalo daljši čas za regeneracijo. Vse kulture gliv *Trametes versicolor* in *Antrodia vaillantii* so preživele oziroma niso popolnoma izgubile sposobnosti preživetja. Samo 10 (28 %) vcepkov kulture gliv *Coniophora puteana* od 36 se ni regeneriralo.

4.1.4 Regeneracija kultur gliv po četrtem tednu dušenja

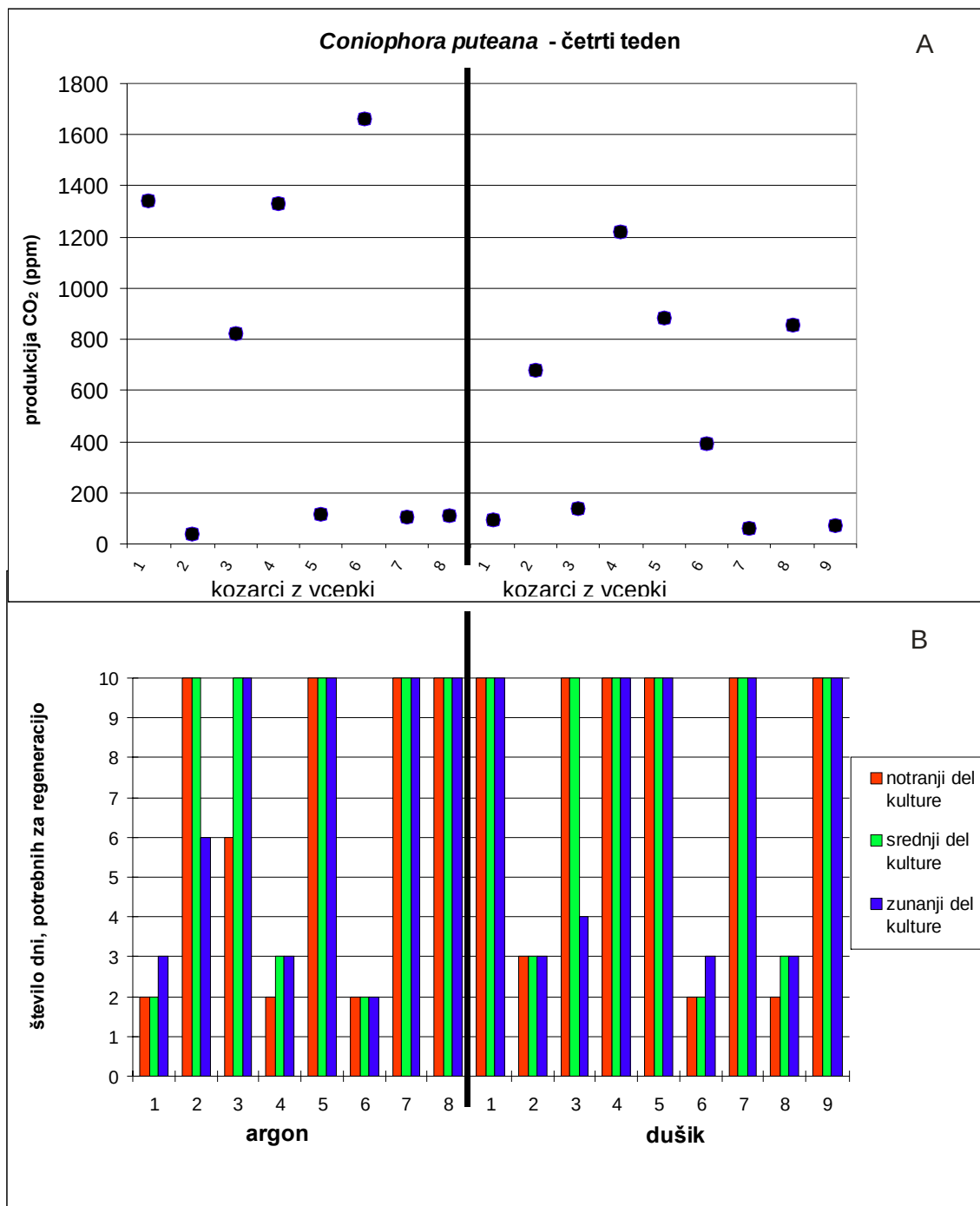
Pri glivi *Antrodia vaillantii* opazimo večjo proizvodnjo ogljikovega dioksida kot pri glivi *Coniophora puteana*. Skoraj polovica vcepkov kulture glive *Antrodia vaillantii* se je po dveh dneh regeneriralo, le en vcepek (2 %) sploh ni obnovil rasti. 25 od 51 vcepkov (49 %) je za regeneracijo potrebovalo več dni kot kontrolni vcepki. Opaziti je bilo tudi malenkostno razliko regeneracije kultur tretiranih z dušikom. Ugotavljanje regeneracije z merjenjem tvorbe ogljikovega dioksida kultur glive *Antrodia vaillantii* po štirih tednih dušenja je prikazano na zgornjem delu slike 13. Na spodnjem delu so prikazani dnevi, ki so jih potrebovali inokuli za obnovitev rasti. Če stolpec, ki ponazarja število dni, po katerih so hife vcepka ponovno pričele rasti, dosega vrh spodnjega dela diagrama, pomeni, da je ta vcepek odmrli, oziroma se ni regeneriral v najmanj štiridesetih dneh po prestavitvi v normalne rastne razmere (slika 13).



Slika 13: Enournna produkcija CO₂ (A) in čas regeneracije kultur glive *Antrodia vaillantii* po štirih tednih dušenja z argonom ali dušikom (B)

Po četrtem tednu dušenja opazimo pri glivi *Coniophora puteana* upad proizvodnje ogljikovega dioksida, kulture micelija potrebujejo daljši čas za regeneracijo ali pa se sploh ne regenerirajo. Preživetje kulture gliv *Coniophora puteana* je bilo zmerno prizadeto, saj 30 od 51 vcepkov (58,8 %) ni obnovilo rasti, še 12 (23,5 %) pa jih je za regeneracijo potrebovalo več kot dva dni. Pri dušenju z dušikom smo

opazili manjšo proizvodnjo ogljikovega dioksida kot pa v primerjavi z argonom, kar pomeni, da je dušik bolj vplival na zaviranje regeneracije micelija glive *Coniophora puteana*. Slika 14 v zgornjem delu prikazuje produkcijo CO₂ tretiranih kultur glive *Coniophora puteana*, v spodnjem delu pa čas potreben za regeneracijo inokulov, prestavljenih v normalne rastne razmere.



Slika 14: Enourna produkcija CO₂ (A) in čas regeneracije kultur glive *Coniophora puteana* po štirih tednih dušenja z argonom ali dušikom (B)

V glavnem pa niti pri kulturah glive *Antrodia vaillantii* niti pri kulturah glive *Coniophora puteana* nismo opazili očitne razlike v izgubi sposobnosti preživetja glede na uporabljeni plin (argon ali dušik), s katerim smo v eksperimentalnih kozarcih vzpostavili razmere nizke koncentracije kisika (sliki 13 in 14).

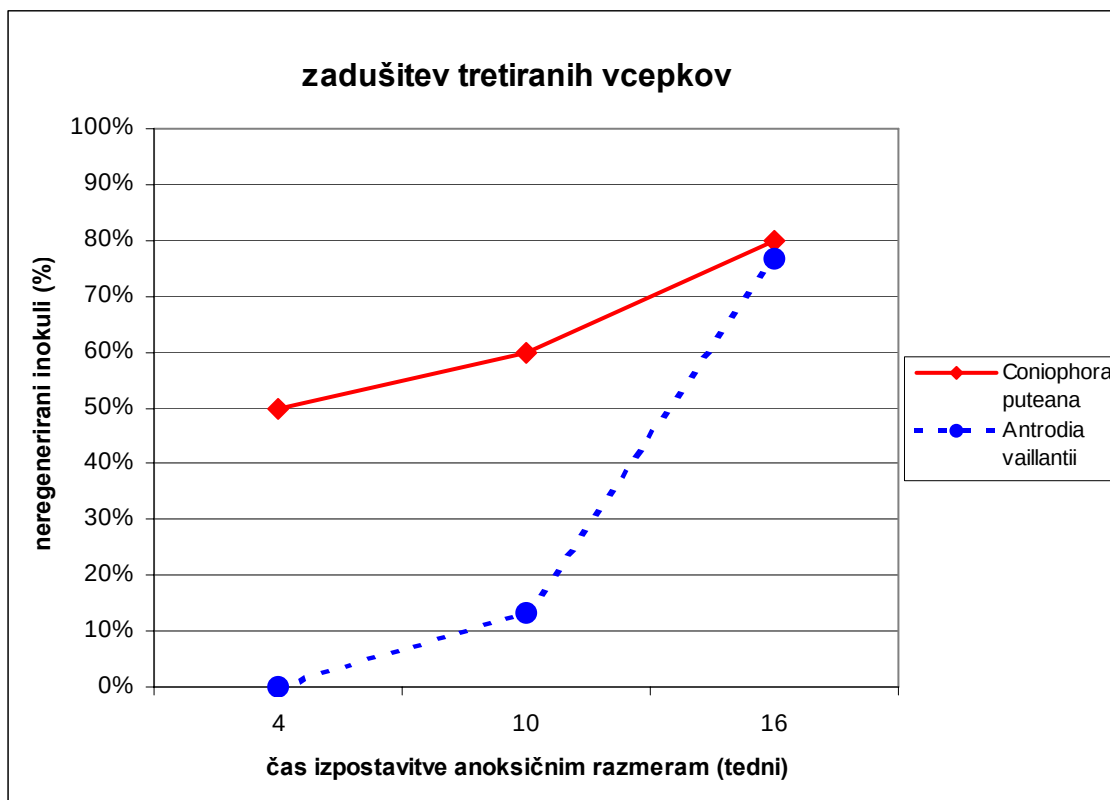
Micelij kulture *Trametes versicolor* po štirih tednih dušenja ni pokazal nobene izgube sposobnosti preživetja.

4.1.5 Regeneracija kultur gliv po desetem in šestnajstem tednu dušenja

V drugi fazi eksperimenta smo ugotavljali učinek dolgotrajnejše izpostavitve anoksičnim razmeram na preživetje micelija gliv. Uporabili smo le cepiče, ki po desetih in šestnajstih tednih niso pokazali sposobnosti regeneracije v normalnih rastnih razmerah. V tej fazi nismo merili enourne proizvodnje količine ogljikovega dioksida. Ker anoksične razmere v prvih štirih tednih niso vplivale na kulturo glive *Trametes versicolor*, tretiranja s to kulturo nismo nadaljevali.

Pri opazovanju dolgotrajne izpostavitve kultur gliv *Antrodia vaillantii* in *Coniophora puteana* nismo opazili očitnih razlik v izgubi sposobnosti preživetja glede na inertni plin (argon ali dušik), ki smo uporabili za dušenje micelija gliv. Zaradi tega smo, ne glede na uporabljen inertni plin, rezultate izrazili kot vpliv razmer nizke koncentracije kisika na sposobnost preživetja micelija.

Po štirih tednih tretiranja z anoksično atmosfero so kulture micelija glive *Coniophora puteana* pričele zgubljati sposobnost preživetja. Delež vcepkov, ki niso bili sposobni obnoviti rasti, je postopoma naraščal in po šestnajstih tednih dosegel 80 % neregeneriranosti. Medtem, ko so se kulture glive *Antrodia vaillantii* v prvih tednih izkazale za bolj odporne (le 13 % cepiv se ni regeneriralo), je po šestnajstih tednih tretiranja njihov delež neregeneriranih vcepkov hitro narasel na 77 % (slika 15).



Slika 15: Vpliv dolžine izpostavitve kultur micelija gliv *Coniophora puteana* in *Antrodia vaillantii* anoksičnim razmeram na zadušitev vcepkov, odvzetih iz teh kultur

Nekaj meritev enourne produkcije CO₂ tretiranih kultur micelija gliv, ki smo jih vendarle opravili v drugem delu poskusa, je pokazalo podobno povezavo med preživetjem vcepkov, vzetih iz kultur in tvorbo CO₂ teh kultur, kot smo jo opazili v prvem delu poskusa (slika 14).

4.2 TRETIRANJE OKUŽENEGA LESA V EKSPERIMENTALNIH KOZARCIH

Po vzpostavitvi anoksičnih razmer so v eksperimentalnih kozarcih kulture micelija gliv prenehale rasti. Micelij se je obarval svetlo do temno rjavo, kar je bilo najbolj opaziti pri glivi *Antrodia vaillantii*, ki navadno tvori bujen bel micelij (slika 16).



Slika 16: Vzorci lesa okuženi z glivo *Antrodia vaillantii* dušeni z argonom; v četrtem kozarcu je kontrolni vzorec (Foto: M. Jenišek)

Vpliv anoksičnih razmer na umetno okuženih vzorcih lesa smo ugotavljali vizualno z opazovanjem preživetja dušenih kultur micelija. Zmanjšanje sposobnosti preživetja smo izrazili kot čas potreben za ponovno rast oziroma regeneracijo micelija na svežem hranilnem gojišču v normalnih zračnih razmerah. Če micelij gliv ni obnovil rasti po štirih tednih, smo sklepali, da je gliva odmrla.

4.2.1 *Trametes versicolor*

Najbolj trdovratne za dušenje oziroma najhitreje se je regeneriral micelij *Trametes versicolor*, vzet iz koščkov bukovine. Ne glede na vrsto uporabljenega plina (argon ali dušik) za dušenje, gliva ni izgubila sposobnosti preživetja, saj je obnovila rast prej kot v dveh dneh, ne glede na trajanje izpostavitve anoksičnim razmeram (slika 17).

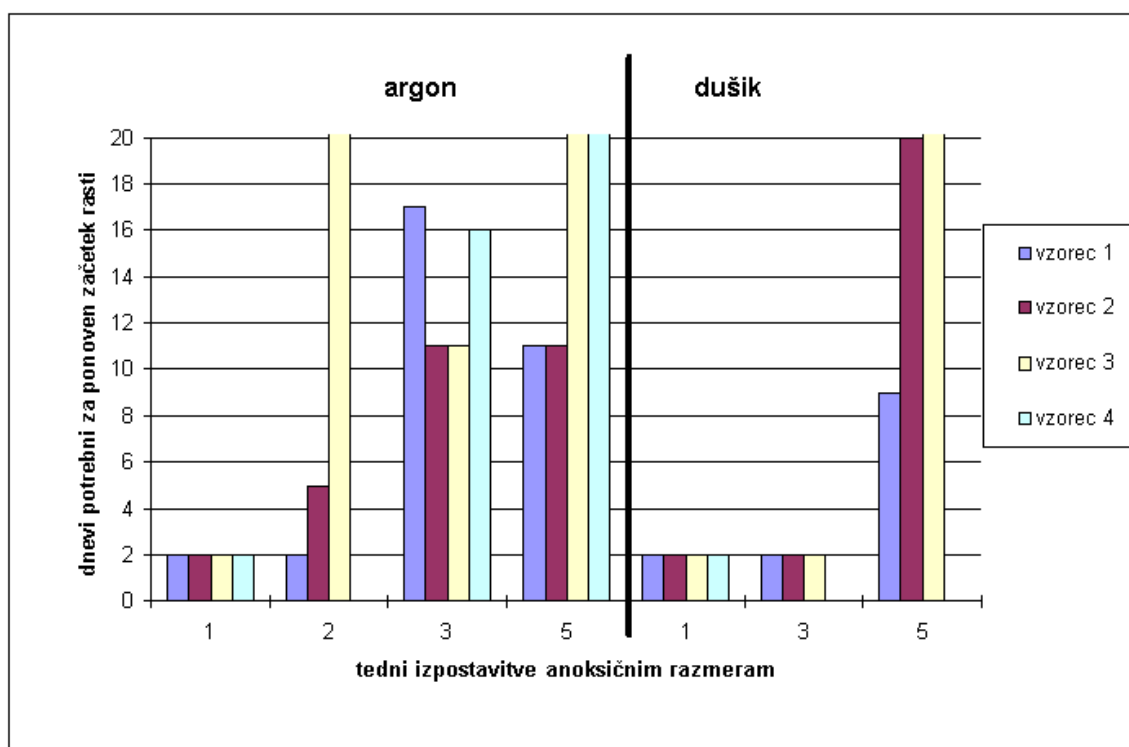


Slika 17: Vzorci lesa okuženi z glivo *Trametes versicolor*; v prvem kozarcu dušeni z argonom, v drugem z dušikom, v tretjem kozarcu je kontrolni vzorec (Foto: M. Jenišek)

4.2.2 *Antrodia vaillantii*

Okolje brez kisika je izraziteje vplivalo na micelij glive *Antrodia vaillantii*, saj je pri dušenju z argonom ena od treh kultur te glive odmrla že po dveh tednih. Micelij glive s podaljšanjem anoksičnih razmer postopoma izgublja sposobnost za preživetje, kar se dobro kaže pri vzorcih tretiranih pet tednov, saj jih je polovica (dve od štirih) odmrla, pri ostali polovici pa je bilo opaziti zelo upočasnjeno regeneracijo (slika 16 in slika 18 levo).

Kulture tretirane z dušikom pa so pričele izgubljati viabilnost šele po petih tednih, ko se ena od treh ni regenerirala, ostali dve pa sta za obnovitev rasti potrebovali devet oziroma dvajset dni (slika 18 desno in slika 19).



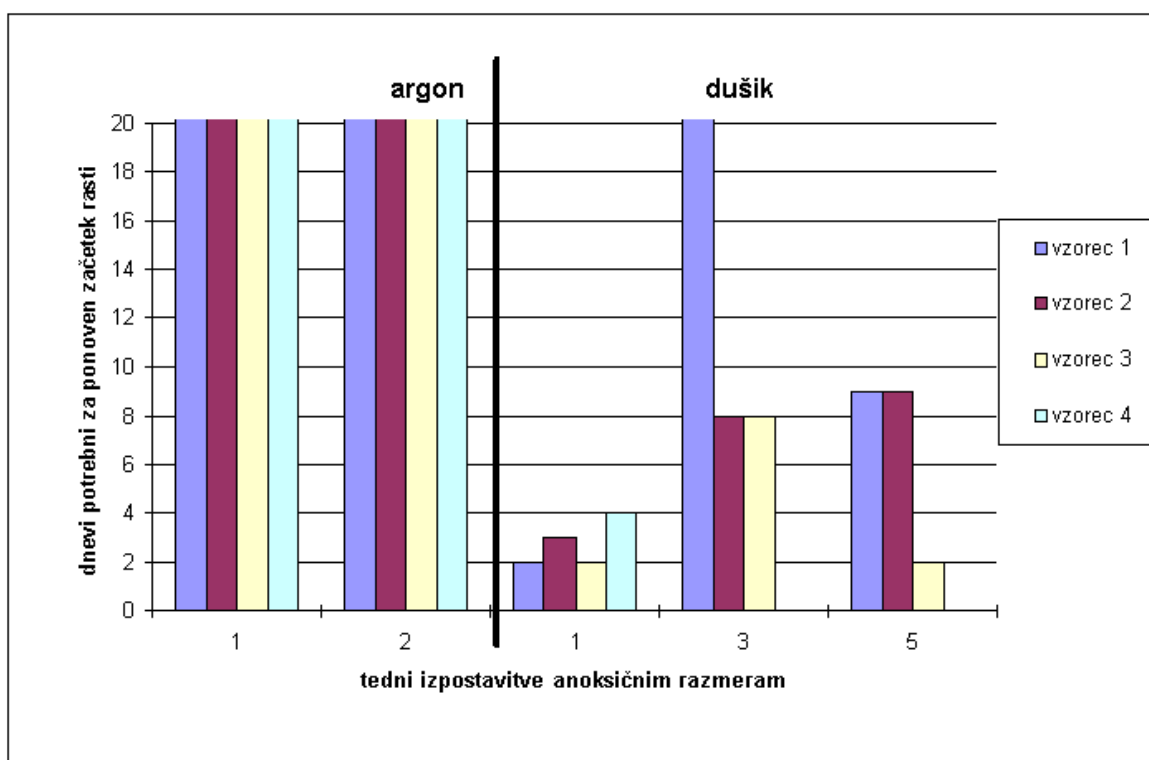
Slika 18: Regeneracija kultur micelija glive *Antrodia vaillantii* na okuženih koščkih lesa, tretiranih v eksperimentalnih kozarcih z argonom in dušikom



Slika 19: Vzorci lesa okuženi z glivo *Antrodia vaillantii* dušeni z argonom; v tretjem kozarcu je kontrolni vzorec (Foto: M. Jenišek)

4.2.3 *Coniophora puteana*

Od vseh treh vrst gliv je bil micelij glive *Coniophora puteana*, prerašen na vzorcih beljave smrekovine, najbolj prizadet. Le en teden po izpostavitvi anoksičnim pogojem so kulture micelija tretirane z argonom odmrle, saj štiri tedne po prenosu v normalne atmosferske razmere niso obnovile rasti. Enak rezultat je bil dosežen tudi po dvotedenski izpostavitvi argonu. Iz tega smo sklepali, da smo okužbo vzorcev lesa z glivo *Coniophora puteana* uspešno zatrli (slika 20 levo in slika 21). Tretiranje z dušikom, tudi po daljši izpostavitvi anoksičnim razmeram, se je izkazala za manj učinkovito. Kultura glive *Coniophora puteana* je začela izgubljati viabilnost po treh tednih izpostavitve anoksičnim razmeram, ko se ena od kultur ni regenerirala, ostali dve pa sta potrebovali za regeneracijo več kot dva dni. Po petih tednih izpostavitve dušiku smo opazili, da kulture potrebujejo daljši čas za regeneracijo (slika 20 desno in slika 22).



Slika 20: Regeneracija kultur micelija glive *Coniophora puteana* na okuženih koščkih lesa, tretiranih v eksperimentalnih kozarcih z argonom in dušikom



Slika 21: Vzorci lesa okuženi z glivo *Coniophora puteana* dušeni z argonom; v prvem kozarcu je kontrolni vzorec (Foto: M. Jenišek)



Slika 22: Vzorci lesa okuženi z glivo *Coniophora puteana* dušeni z dušikom; v tretjem kozarcu je kontrolni vzorec (Foto: M. Jenišek)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Do okužbe lesenih umetniških predmetov z glivami največkrat prihaja zaradi neprimerne ravnanja z umetninami. Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na okužbo in razvoj gliv na lesenih predmetih, je vlaga. Če je vlažnost lesa pod 20 %, je onemogočeno vzklitje spor gliv, s čimer preprečimo nastanek okužbe. Samo s sušenjem pa nam vselej ne uspe uničiti že aktivno rastočega micelija gliv. Bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*) lahko v mirujočem stanju preživi pet let dolgo sušno obdobje. Zato je potrebno pri zatiranju glivnih okužb lesa uporabiti bolj učinkovite ukrepe represivne zaščite (Pohleven, 2000).

Možni postopki za represivno zaščito pred lesnimi škodljivci so: izsuševanje, segrevanje, obsevanje z röntgenskimi žarki, zamrzovanje ali uporaba kemičnih sredstev. Vendar so ti ukrepi za zaščito lesenih umetnin, še posebej polikromirane lesne plastike, popolnoma neprimerni. Z njimi lahko, ne glede na učinkovito zatrtje škodljivcev, na predmetih povzročimo še večjo škodo kot pa škodljivci, predvsem pa bi lahko spremenili lesno substanco. Spremembe barv (kemična sredstva) ali razpoke v materialu (hitro izsuševanje, segrevanje, röntgenski žarki, zamrzovanje) sta le dve vrsti možnih stranskih učinkov agresivnih metod konserviranja lesenih umetnin. Zaradi navedenih razlogov navedenih tehnik ni priporočljivo uporabiti, če želimo ohraniti prvotno stanje in videz predmeta, še posebej pa njegovo kulturno-zgodovinsko in znanstveno vrednost (informacije o materialih uporabljenih za izdelavo predmeta, kemično sestavo veziv, barv...). Tretiranje okuženih predmetov z biocidi ali (kakršnimkoli) sevanjem je tudi drago in predstavlja potencialno nevarnost za okolje in konservatorje (Pinniger, 1994).

Metode dušenja lesenih škodljivcev z vzpostavljanjem anaerobnih razmer z inertnimi plini (argon ali dušik) so pričeli razvijati in uveljavljati za boljše ohranjanje umetniških predmetov. Umetnine so namreč pri zatiranju lesenih škodljivcev z raznimi kemičnimi sredstvi, tudi poškodovali. Tretiranje z argonom ali dušikom se je izkazalo kot učinkovito za zatiranje insektov z dušenjem (Gilberg, 1991; Koestler, 1992, 1993, 1996, 2001; Koestler in sod., 2000; Stušek in sod., 2000). Kljub temu, da je bilo zatiranje z uporabo argona bistveno hitrejše in bolj učinkovito, so konservatorji (zaradi cene plina) najpogosteje uporabljali dušik (Valentin in sod., 1992; Koestler, 1993, 1996).

Razvoj in optimizacija metod za odkrivanje okužbe lesenih objektov in postopkov dušenja za uničenje gliv bi pripomogla k bolj kvalitetni in za okolje ter konservatorje manj obremenjujoči skrbi za kulturno in umetniško dediščino. Zato smo želeli ugotoviti, če je dušenje in merjenje glivne respiracije zanesljiva metoda za ugotavljanje njihove prisotnosti v okuženih vzorcih lesa ter možnost njihovega uničenja v okuženih predmetih.

Scheffer (1986) je ugotovil, da lahko glive razkrojevalke lesa brez kisika preživijo zelo dolgo obdobje, nekatere tudi več kot dve leti. V dosedanjih poskusih so dopustili, da so bile glive v zaprtih posodah postopno izpostavljene nižanju kisika in tako imele možnost prilagoditi se na anaerobne razmere. V zaprtih posodah se je nakopičil tudi ogljikov dioksid, ki je zavrl rast gliv (Highley in sod., 1983) in tako zmanjšal porabo kisika opazovanih kultur. Možno je, da se glive lahko ob postopnem menjanju anoksičnih razmer s prilagoditvijo svojega metabolizma odzovejo na take pogoje.

Domnevali smo, da bi s hipno vzpostavitev zelo nizkih koncentracij kisika v testnih posodah preprečili prilagoditvene mehanizme gliv in tako skrajšali čas, potreben za njihovo uničenje. Želeli smo ugotoviti ali je izguba viabilnosti micelija izbranih gliv drugačna, če glive zadušujemo na trdnem hranilnem gojišču ali na lesenih vzorcih in če za vzpostavitev anoksičnih razmer uporabimo dušik ali argon. V naših poskusih smo dušili vrste gliv, ki pogosto in nevarno poškodujejo lesene umetnine in zgodovinske objekte (Pohleven, 2000). V anoksičnih razmerah preživijo lahko dolgo obdobje (Scheffer, 1986). Poskusi so potrdili, da so glive zmožne to obremenitev preživeti zelo dolgo.

Rezultati poskusa na trdnem hranilnem gojišču PDA so pokazali, da ni razlike v izgubi viabilnosti kultur glede na to, kateri plin (argon ali dušik) smo uporabili za dušenje. S prepihanjem smo odstranili kisik le iz atmosfere testnih kozarcev, verjetno pa ne iz hranilnega gojišča (kisik, raztopljen v vodi), zato izbira izpodrivnega plina ni vplivala na preživetje dušenih kultur gliv (sliki 13 in 14).

V drugem delu pa smo s kulturami gliv *Antrodia vaillantii*, *Coniophora puteana* in *Trametes versicolor* okužili koščke lesa, da bi ugotovili vpliv dušenja na odmiranje micelija preraščenega na vzorcih lesa. Argon je v primerjavi z dušikom skrajšal čas za izgubo vitalnosti tretiranih kultur, saj se izguba viabilnosti, merjena kot podaljšanje časa potrebnega za obnovitev rasti micelija tretiranih kultur, pojavi prej in bolj izrazito (sliki 18 in 20). Enako se je izkazalo pri zatiranju insektov (Valentin in sod., 1992; Koestler, 1993, 1996).

Razmere nizke koncentracije kisika zelo različno vplivajo na vrsto glive (Tavzes s sod., 2001). Pri kulturah glive *Trametes versicolor* v času trajanja eksperimenta nismo opazili bistvene izgube viabilnosti, ne glede na substrat, na katerem smo jih dušili (koščki lesa ali PDA), in ne glede na plin, ki smo ga uporabili za izpodrivanje kisika (dušik ali argon).

Zmanjšanje viabilnosti pri kulturah glive *Coniophora puteana* smo na hranilnem gojišču PDA opazili že po dveh tednih. Število prizadetih kultur je s podaljševanjem tretiranja enakomerno naraščalo in po šestnajstih tednih je delež neregeneriranih vcepkov znašal že 80 %. Medtem ko so bile kulture glive *Antrodia vaillantii* v prvih desetih tednih izpostavitve le nekoliko bolj odporne na anaerobne razmere, saj 77 % vcepkov le-teh po šestnajstih tednih dušenja ni obnovilo rasti micelija. Čeprav sta sposobnosti preživetja obeh vrst različni, je

njihova viabilnost po šestnajstih tednih izpostavitve razmeram nizke koncentracije kisika skoraj enaka.

Kulture micelija glive *Coniophora puteana*, gojene na koščkih lesa, so popolnoma izgubile viabilnost že po tednu izpostavitve anaerobnim razmeram v argonu. Če pa smo anaerobne razmere vzpostavili z dušikom, smo prvo zmanjšanje viabilnosti kultur opazili šele tretji teden izpostavitve. Tudi po petih tednih tretiranja z dušikom viabilnost kultur ni bila močno prizadeta. Boljša učinkovitost argona (v primerjavi z dušikom) je prišla še bolj do izraza pri anoksičnem tretiranju micelija *Antrodia vaillantii*, na vzorcih lesa. Čas, potreben za regeneracijo kultur, se je povečal s podaljševanjem časa izpostavitve anoksičnim razmeram. Pri uporabi dušika pa smo izgubo viabilnosti opazili šele po petih tednih tretiranja. Če smo kulture te glive tretirali z argonom, je bil čas za regeneracijo kultur tudi precej daljši.

V naših poskusih smo s prepihanjem z dušikom ali argonom hitro odstranili kisik iz atmosfere eksperimentalnih kozarcev (»šok terapija«). Sočasna in hitra odstranitev kisika in ogljikovega dioksida je bila po našem mnenju glavni dejavnik, ki je povzročil skrajšanje časa, za izgubo viabilnosti kultur micelija nekaterih vrst gliv. Periodično menjanje atmosfere s kisikom in brez kisika v prvih štirih tednih poskusa ni dodatno vplivalo na izgubo viabilnosti kultur gliv. Nasprotno menimo, da so si glive v normalni koncentraciji kisika opomogle in zaradi tega lažje vzdrževale viabilnost. Zato smo v drugem delu poskusa zmanjšali pogostnost preverjanj viabilnosti in podaljšali čas neprekinjene izpostavitve anaerobnim pogojem. Kljub temu nam v šestih tednih ni uspelo popolnoma zatreti tretiranih kultur micelija.

Ugotovili smo, da je bil čas dušenja, potreben za zmanjšanje ali celo popolno izgubo viabilnosti kultur gliv na lesu, bistveno krajši kot pri tistih, ki smo jih tretirali na gojiščih PDA. Ker je hranilni medij PDA vlažen substrat z lahko dostopnimi hranili, les pa je kompleksen heteropolimer, glivam ni potrebno tvoriti encimov, ki potrebujejo kisik za razgradnjo heterogenih in kompleksnih polimerov, kot je lignin (prihranek energije in kisika). Prav tako jim ni potrebno vložiti energije v depolimerizacijo polisaharidov, kot so celuloza in hemiceluloze, na voljo pa imajo tudi več vlage kot v lesu. Zato glive na umetnih hranilnih gojiščih lažje kljubujejo neugodnim ravnim razmeram (pomanjkanje kisika) kot na lesu.

Rezultati poskusov dušenja v eksperimentalnih kozarcih so jasno pokazali, da je izguba viabilnosti kultur gliv, gojenih na lesnih vzorcih, drugačna, ne glede na to ali za vzpostavitev anoksičnih razmer uporabimo dušik ali argon. Uporaba argona je povzročila bistveno hitrejšo in bolj učinkovito izgubo viabilnosti kultur. Z uporabo argona nam je v eksperimentalnih kozarcih uspelo celo popolnoma uničiti okužbo lesa s kletno gobo *Coniophora puteana*. Če smo uporabili dušik, se je podaljšal le čas, potreben za regeneracijo. Domnevamo, da se argon, ki ima višjo specifično težo kot kisik in dušik, useda na dno posode (kjer so bili tudi okuženi

koščki lesa), prodira v lumne prevodnih elementov lesa (traheje ali traheide) ter izrine preostali kisik proti vrhu neprodušno zaprte posode.

5.2 SKLEPI

Konserviranje je uspešno, če micelij kulture glive v lesenem predmetu odmore, predmet pa potem pravilno vzdržujemo in ga hranimo v suhih razmerah. Z našimi poskusi smo ugotovili čas izpostavitve anoksičnim razmeram, ki je potreben, da v lesu uničimo nekatere vrste gliv razkrojevalk lesa. Ti rezultati dokazujejo, da lahko z argonom bolj učinkovito kot z dušikom odpravimo okužbo lesenih umetnin z glivami rjave trohnobe, medtem, ko gliv povzročiteljic bele trohnobe nismo uspeli zatreti ne z dušikom in ne z argonom.

Na umetnem hranilnem gojišču kulture gliv obdržijo viabilnost dlje kot na koščkih lesa, saj jim ni potrebno tvoriti depolimerizacijskih encimov in depolimerizirati lesa. Pri zatiranju glivnih okužb lesa smo dobili boljše rezultate z argonom kot pa z dušikom. Zatiranje glivne okužbe lesa z vzpostavljanjem anoksičnih razmer z argonom je uporabna in zanesljiva metoda za neinvazivno in okolju primerno represivno zaščito lesenih predmetov kulturne dediščine. Odziv gliv na anaerobne razmere pa je odvisen od vrste glive. Zato je pred postopkom zaduševanja potrebno določiti vrsto glive s katero je predmet okužen. Le tako bo postopek dušenja zanesljiv.

6 POVZETEK

Leseni umetniški in kulturno-zgodovinski predmeti predstavljajo neprecenljivo vrednost. Le te je potrebno ob napadu škodljivcev (ksilofagnih insektov in gliv) ustrezno zaščititi. Vendar lahko neustrezna metoda oziroma kemično sredstvo predmet bolj uniči kot škodljivci sami. Zaradi zaščite okolja in konzervatorjev, pa tudi, da se izognemo morebitnim poškodbam lesenih umetnin, zaradi kemične degradacije, smo ugotavljali učinkovitost zadušitve gliv razkrojevalk lesa z argonom in dušikom. Prav tako nas je zanimalo, kako hipne anoksične razmere vplivajo na preživetje kultur micelija nekaterih vrst lesnih gliv.

Za večino pravih razkrojevalk lesa je značilno, da za oskrbo z energijo v procesu celičnega dihanja potrebujejo molekularni kisik (obligatni aerobi). Kljub temu so kulture nekaterih vrst gliv v neprodušno zatesnjenih posodah na umetnem trdnem hranilnem gojišču preživele celo več kot dve leti.

Ugotavljali smo sposobnost preživetja gliv razkrojevalk lesa: *Coniophora puteana*, *Antrodia vaillantii* in *Trametes versicolor*, preraslih na PDA mediju ali pa na vzorcih lesa bukve in smreke, po dušenju z inertnima plinoma z argonom ali dušikom. Z dihanjem in regeneracijo podgobja smo ugotavljali uspešnost dušenja. Kulture gob so bile v hermetično zaprtih posodah izpostavljene nizki koncentraciji kisika (pod 10 ppm) od enega do pet tednov. Pri dušenju gliv na PDA mediju, vrsta plina ni vplivala na uspešnost zadušitve.

Izkazalo se je, da je največ kultur gliv bolje preživel anaerobne razmere na hranilnem gojišču, kot na vzorcih lesa, saj jim ni bilo potrebno zagotavljati energije za depolimerizacijo substrata in za izgradnjo encimov, ki jih potrebujejo za razgradnjo tako kompleksnega polimera, kot je les. Ugotovili smo, da je za zatiranje okužb lesa z glivami argon bolj primeren kot dušik. Ker ima višjo specifično težo kot kisik, se usede na dno posod, v katerih izvajamo postopek. Argon tudi lažje prodre v notranjost lesenih predmetov ter iz lumnov olesenelih celic izpodrine kisik proti vrhu neprodušno zatesnjenih kozarcev.

7 VIRI

- Adamič J. 1992. Glive. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia d.o.o.: 53-70
- Bajpai P., Bajpai P.K. 1998. Biotechnology in the pulp and paper industry - a route to energy conversion. Surrey, Pira International: 119 str.
- Blanchette R.A. 1995. Degradation of the lignocellulosic complex in wood. Canadian Journal of Botany, 73, Supplement: S999-S1010
- Carlile M.J., Watkinson S.C. 1994. The Fungi. London, Academic press limited: 482 str.
- Čepin J. 1999. Spremljanje glivnega razkroja lesa z merjenjem porabe kisika, tvorbe CO₂ ter spremembe temperature. Diplomsko naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 70 str.
- Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. Wood: decay, pests and protection. London, Chapman & Hall: 546 str.
- EN 113. European Committee for Standardization Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying basidiomycetes cultured on agar medium. 1989: 14 str.
- Fengel D., Wegener G. 1989. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, New York, Walter de Gruyter: 58-258
- Gilberg M. 1991. The effects of low oxygen atmospheres on museum pests. Studies in Conservation, 36: 93-98
- 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
- Grosser, D. 1985. Pflanzliche und tierische bau - und werkhholz - schadlinge. Munchen, Institut fur Holzforschung der Universitat Munchen, 74 str.
- Gunde-Cimerman N. 1996. Nitaste glive. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia d.o.o.: 95-111
- Highley T. L., Bar-Lev S. S., Kirk T. K., Larsen M. J. 1983. Influence of O₂ and CO₂ on wood decay by heartrot and saprot fungi. Phytopathology, 73: 630-633
- Humar M., Pohleven F. 2000. Značilnosti razkroja lesa z rjavo trohnobo. Les, 52, 7-8: 229-234
- Jahn, H. 1990. Pilze an baumen: Saprophyten und Paraziten die an holz wachsen. Berlin- Hannover, Patzer verlag: 138-154
- Kervina-Hamović Lj. 1990. Zaščita lesa. Ljubljana, BF - Oddelek za lesarstvo: 126 str.
- 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. (eds.). New York, John Willey and sons, Inc.: 273-307

- Koestler R.J. 1992. Practical aspects of nitrogen and argon gas fumigation procedures for insect control in museum objects. V: Preprints of the Second International Conference on Biodeterioration of Cultural Property. Yokohama, Japan, Oct. 5-8, 1992. Tokio, National Research Institute for Cultural Properties: 96-98
- Koestler R.J. 1993. Insect eradication using controlled atmospheres, and FTIR measurement for insect activity. V: 10th Triennial Meeting, Vol. II. Washington D.C., ICOM: 882-886
- Koestler R.J. 1996. Anoxic treatment for insect control in panel paintings and frames with argon gas. V: American Institute of Conservation Paintings Specialty Group Postprints. Washington DC, American Institute of Conservation: 61-72
- Koestler R.J. 2001. Detecting and controlling insect infestation in fine art. V: Pacific Island 2000, Proceedings of the Fifth International Conference on Easter Island and the Pacific. Stevenson C. M., Lee G., Morin F.J. (eds.). Los Osos, Easter Island Foundation, Bearsville Press: 541-545
- Koestler R.J., Sardjono S., Koestler D.L. 2000. Detection of insect infestation in museum objects by carbon dioxide measurements using FTIR. International Biodeterioration and Biodegradation, 46, 4: 285-292
- Kollmann, F. F. P. / Cote, W. A. 1984. Principles of wood science and technology. Vol. I: solid wood. Berlin, Springer - Verlag, 159 str.
- Liese W. 1970. Ultrastructure aspects of woody tissue disintegration. Annual Review of Phytopathology, 8, 4: 231-258
- Messner K., Koller K., Wall M.B., Akhtar M., Scott G.M. 1998. Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young, R.A., Akhtar, M. John (eds.). New York, Wiley & Sons, Inc.: 385-419
- 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
- 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, inc.: 354 str.
- Pinniger D. 1994. Insect pests in museums. London, Archetype Publications Ltd.: 40-50
- Pohleven F. 2000. Ogroženost lesenih predmetov kulturne dediščine z glivami. V: RES - Les v restavatorstvu, publikacije Restavratorskega centra Republike Slovenije. Benko Mächtig, E. (ur.). Ljubljana, Restavratorski center Republike Slovenije: 22-30
- Pohleven F., Petrič M. 1992. Ekološke perspektive zaščite lesa pred škodljivci. Nova revija, 43, 3: 94-98

- Raspor P., Smole-Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F.V., Rogelj I., Hacin J. 1995. ZIM: zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo: 98 str.
- Reid I. D. 1985. Biological delignification of aspen wood by solid-state fermentation with the white-rot fungus *Merulius tremellosus*. Applied and Environmental Microbiology, 50: 133-139
- Scheffer T. C. 1986. O₂ requirements for growth and survival of wood-decaying and sapwood –staining fungi. Canadian Journal of Botany, 64: 1957-1963
- Schmidt CJ, Whitten BK, Nicholas D.D. 1981. A proposed role for oxalic acid in nonenzymatic wood decay by brown-rot fungi. Proceedings American Wood Preservation Association, 77: 157-164
- 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.
- Stušek P., Pohleven F., Čapl D. 2000. Detection of wood boring insects by measurement of oxygen consumption. International Biodeterioration and Biodegradation, 46, 4: 293-298
- Tavzes, Č., Pohleven, F., Koestler, R.J. 2001. Effect of anoxic conditions on wood-decay fungi treated with argon or nitrogen. Int. biodeterior. biodegrad., 47, 4: 225-231
- Ternifi M. 1999. Intenzivnost razkroja lesa s štorovko (*Armillaria melea* [Vahl: Fr.] Kummer) in smrekovo rdečo trohnobo (*Heterobasidion annosum* [Fr.] Bref.). Diplomaska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo: 113 str.
- Valentin N., Alguero M., de Huas M.C. 1992. Evaluation of disinfection techniques for the conservation of polychrome sculpture in Iberian museums, V: Conservation of the Iberian and Latin American Cultural Heritage. New York, International Institute for Conservation: 165-167
- Wainwright M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. Chichester, John Wiley and Sons Ltd: 195 str.
- Zabel R.A., Morrell J.J. 1992. Wood microbiology-decay and its prevention. New York, Academic Press: 476 str.

ZAHVALA

Posebna zahvala gre red. prof. dr. Francu Pohleven, ki mi je kot mentor pri nastajanju diplomskega dela stal ob strani, mi vedno znal svetovati in mi pokazati pravilno pot pri nadaljevanju dela.

Prav tako pa bi se rad zahvalil dr. Črtomirju Tavzes za pomoč in napotke pri izvedbi poskusov ter recenzentu doc. dr. Mihi Humar.

Nikdar pa se ne bom mogel dovolj zahvaliti staršem, ki so me vedno in me še sedaj podpirajo, vodijo in mi znajo vedno prav svetovati.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so mi na kakršen koli način pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Miran JENIŠEK

**UPORABA ARGONA IN DUŠIKA
ZA ZADUŠEVANJE LESNIH GLIV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007