

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Petra KARABEGOVIĆ

**VPLIV HRANIL NA PRERAŠČANJE LESNIH
VZORCEV Z GLIVAMI RJAVE TROHNOBE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Petra KARABEGOVIĆ

**VPLIV HRANIL NA PRERAŠČANJE LESNIH VZORCEV Z
GLIVAMI RJAVE TROHNOBE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF NUTRIENTS ON BROWN ROT FUNGAL
OVERGROWTH OF WOOD SPECIMENS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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 doc. dr. Miha Humarja in za recenzenta prof. dr. Franca Pohlevna.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Karabegović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 630*844.2
KG	respiracija/toleranca na baker/preraščanje/CCB/koruzna omakalna vodica/glukoza/bioremedacija/odpadni zaščiten les/zaščitna sredstva/glive razkrojevalke/bor
AV	KARABEGOVIĆ, Petra
SA	HUMAR, Miha (mentor)/POHLEVEN, Franc (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, Cesta VIII/34
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI	2006
IN	VPLIV HRANIL NA PRERAŠČANJE LESNIH VZORCEV Z GLIVAMI RJAVE TROHNOBE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 43 str., 5 pregl., 12 sl., 43 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	V svetu predstavlja odslužen zaščiteni les zaradi stroge okoljske zakonodaje vse večji problem. Sežig ali odlaganje odpadnega zaščenega lesa nista sprejemljivi rešitvi. Veliko obetavnejša je mikoremediacija odpadnega zaščenega lesa z na baker tolerantnimi sevi lesnih gliv. Da bi raziskali preraščanje zaščenega lesa, smo uporabili dva tolerantna (<i>Antrodia vaillantii</i> in <i>Leucogyrophana pinastri</i>) in dva na baker občutljiva (<i>Poria monticola</i> in <i>Gleophyllum trabeum</i>) seva gliv rjave trohnobe. Vzorce smo izdelali iz smrekovine (<i>Picea abies</i>), polovico smo jih impregnirali s 5% raztopino CCB, drugo pa pustili nezaščiten. Vzorce smo izpostavili glivam v skladu s standardom SIST EN 113 in s spremljanjem respiracije ocenili preraščenost vzorcev. Najprej smo proučevali v kolikšnem času lesne glive prerastejo smrekove vzorce, zatem pa kontrolne in zaščiten vzorce omočili še v različna hranila (glukoza in/ali koruzna omakalna vodica) ter ugotavljali vpliv le-teh na rast gliv. Rezultati so pokazali, da tolerantni sevi hitreje preraščajo zaščiten vzorce kot netolerantni. Omakanje v hranila v večini primerov pospeši razkroj impregniranega lesa, kar dokazujejo meritve CO ₂ in izgube mase.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 630*844.2
CX respiration/copper tolerance/overgrow/CCB/corn steep
liquor/glucose/bioremediation/treated wood waste/preservatives/wood
decay fungi/boron
AU KARABEGOVIĆ, Petra
AA HUMAR, Miha (supervisor)/POHLEVEN, Franc(reviwer)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, Cesta VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood
Science and Technology
PY 2006
TI INFLUENCE OF NUTRIENTS ON BROWN ROT FUNGAL
OVERGROWTH OF WOOD SPECIMENS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 43 p., 5 tab., 12 fig., 43 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the world, there is an increasing problem regarding impregnated wood wastes, due to severe environmental legislation. Combustion and landfilling are not acceptable solutions for this issue at al. Mycoremediation of impregnated wood wastes, using copper tolerant wood decay fungi, is one of the most promising solution. In order to elucidate fungal overgrowth of impregnated wood, two copper tolerant (*Antrodia vaillantii* and *Leucogyrophana pinastri*) and two copper sensitive (*Poria monticola* and *Gloeophyllum trabeum*) brown rot fungal strains were used. Samples were made from Norway spruce (*Picea abies*); one half of them was impregnated with 5% CCB solution, the other half was not. According to the EN 113 procedure the specimens were exposed to wood decay fungi. After the exposure they were isolated and fungal overgrowth was estimated via respiration measurements. Influence of time exposure on fungal overgrowth was investigated first, then control wood samples and the impregnated ones were immersed into nutrient solution (glucose and/or corn steep liquor), and afterwards the influence of nutrients on fungal growth was analyzed. The results show that tolerant fungal strains colonize CCB impregnated wood faster than the sensitive ones. By measurements of CO₂ and of mass losses it was proved that immersing of the samples in general improve the fungal growth.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE in SIMBOLI.....	IX
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 RAZKROJ LESA.....	3
2.1.1 Trohnoba	3
2.1.2 Vloga oksalne kisline pri razkroju lesa.....	5
2.2 ZAŠČITA LESA.....	8
2.2.1 Kemična zaščita lesa	8
2.2.1.1. Zaščitna sredstva za les.....	9
2.3 INTERAKCIJE GLIV Z BAKROVIMI PRIPRAVKI.....	13
2.3.1 Vpliv kovin na glive	13
2.3.2 Baker	13
2.3.3 Tolerantnost.....	14
2.3.4 Razstrupljanje ali mikoremediacija odsluženega zaščitenega lesa.....	15
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 PRIPRAVA VZORCEV.....	18
3.1.1 Zaščita vzorcev	18
3.1.2 Izpiranje.....	19
3.2 PRIPRAVA HRANILNIH GOJIŠČ	19
3.3 UPORABLJENE VRSTE GLIV	20
3.4 IZPOSTAVITEV GLIVAM	22
3.5 MERJENJE RESPIRACIJE.....	22
3.6 IZGUBA MASE	24
3.7 UPORABLJENE APARATURE.....	24
3.8 UPORABLJENE KEMIČALIJE.....	25
4 REZULTATI in RAZPRAVA	26

4.1	NAVZEM CCB IMPREGNACIJSKEGA SREDSTVA	26
4.2	VPLIV TRAJANJA IZPOSTAVITVE GLIVAM NA TVORBO OGLJIKOVEGA DIOKSIDA	26
4.3	VPLIV TRAJANJA IZPOSTAVITVE GLIVAM NA IZGUBO MASE.	29
4.4	VPLIV HRANIL NA PRERAŠČANJE LESNIH VZORCEV Z GLIVAMI RJAVE TROHNOBE	32
4.5	VPLIV HRANIL NA IZGUBO MASE.....	35
5	SKLEPI.....	38
5.1	SKLEPI	38
6	POVZETEK	39
7	VIRI.....	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni izolati gliv rjave trohnobe (Raspor in sod., 1995)	22
Preglednica 2: Povprečna količina izdihanega ogljikovega dioksida v odvisnosti od časa izpostavitve lesnim glivam	27
Preglednica 3: Izguba mase lesnih vzorcev v odvisnosti od časa izpostavitve lesnim glivam	30
Preglednica 4: Vpliv hranil na tvorbo CO ₂ pri vzorcih izpostavljenih glivam za štiri tedne	33
Preglednica 5: Vpliv hranil na izgubo mase pri smrekovih vzorcih izpostavljenih lesnim glivam za štiri tedne	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema predlaganega procesa razstrupljanja odpadnega s CCA in CCB pripravki zaščitenega lesa s pomočjo gliv tolerantnih na baker (Leithoff in Peek, 1998)	16
Slika 2: Shema vstavljanja vzorcev na preraščeno kulturo micelija gliv.....	18
Slika 3: Eksperimentalni kozarec za merjenje koncentracije CO ₂	23
Slika 4: Celoten sistem za merjenje respiracije (računalnik, zračna črpalka in eksperimentalni kozarec).....	23
Slika 5: Merilna skala	24
Slika 6: Vpliv časa izpostavitve na produkcijo CO ₂ pri kontrolnih (K) in impregniranih (I) vzorcih	28
Slika 7: Vpliv časa izpostavitve na izgubo mase kontrolnih vzorcev.....	31
Slika 8: Vpliv časa izpostavitve na izgubo mase impregniranih vzorcev izpostavljenih lesnim glivam.....	31
Slika 9: Vpliv hranil na tvorbo CO ₂ pri nezaščitenih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne.....	33
Slika 10: Vpliv hranil na tvorbo CO ₂ pri zaščitenih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne.....	34
Slika 11: Vpliv hranil na izgubo mase pri kontrolnih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne.....	36
Slika 12: Vpliv hranil na izgubo mase pri zaščitenih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne.....	37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Pv2	Gliva <i>Antrodia vaillantii</i> , bela hišna goba
Yf2	Gliva <i>Leucogyrophana pinastri</i> , »yellow fungus«
Gt2	Gliva <i>Gloeophyllum trabeum</i> , navadna tramovka
Pm2	Gliva <i>Poria monticola</i> , bela hišna goba
CCB	Impregnacijsko sredstvo na osnovi bakrovih (34% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), kromovih (37,7% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) in borovih (28,7% H_3BO_3) spojin.
K	Nezaščiten oz. kontrolni vzorec
I	Impregniran oz. zaščiten vzorec
CSL	Koruzna omakalna vodica (corn steep liquor)
G	Glukoza

1 UVOD

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

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

Danes se v svetu, poleg krezotnega olja, največ uporabljajo kombinacijo anorganskih aktivnih komponent, ki jih je že leta 1913 odkril Bruning. Ugotovil je, da se topne bakrove soli z dodajanjem kromovih spojin vežejo v les in se iz njega ne izpirajo. Kasneje je indijski raziskovalec Sonti Kamesan odkril, da krom ne fiksira le bakrovih spojin, temveč tudi arzenove. Ameriško združenje za zaščito lesa (AWPA) je to zmes po glavnih sestavinah poimenovalo CCA. V zadnjih letih dvajsetega stoletja so zaradi strupenosti arzenove spojine v teh pripravkih nadomestili z borovimi in pripravke poimenovali CCB. Ti pripravki lesu podaljšajo trajnost v stiku z zemljo tudi do 50 let (Kervina – Hamović, 1990).

Leta 1988 naj bi se v svetu porabilo približno 100 000 ton takšnih pripravkov (Collett, 1992). Samo v ZDA letno zaščitijo 212×10^6 m³ lesa s pripravki CCA ali CCB (Cole in Clausen, 1996). Tudi močno okoljsko osveščena Nemčija za zaščito lesa porabi več kot 1000 ton kromovih spojin in 600 ton bakrovih spojin letno (Stephan in sod., 1996). To so ogromne količine, ki predstavljajo veliko nevarnost za okolje, če ne bomo kmalu našli ustrezne rešitve za ta problem.

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

Cilj naloge je bil raziskati uspešnost rasti tolerantnih in netolerantnih izolatov gliv na s CCB impregniranih in neimpregniranih vzorcih ter na vzorcih, ki smo jih pred izpostavitvijo glivam še dodatno obogatili s hranili (glukozo in/ali koruzno omakalno vodico-CSL). Uspešnost rasti glive in razkroja lesa smo ugotavljali z merjenjem količine izdihanega CO₂ ter gravimetrično izgubo mase.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZKROJ LESA

Les, kot organski material, zaradi delovanja različnih dejavnikov razpada v anorgansko snov. Vsi ti dejavniki so v naravi nujno potrebni, ker bi se brez njihovega delovanja organska snov kopičila in onemogočala rast rastlin, ki za svojo rast potrebujejo prostor in hranila.

Razkroj lesa povzročajo biotični in abiotični faktorji. Med prve spadajo dejavniki žive narave, kot so glive in insekti, drugo pa so neživi dejavniki, pri katerih imamo najpogosteje v mislih vremenske in kemične vplive. Na splošno je najhujši destruktor lesa ogenj, medtem ko so v našem podnebnem pasu najopaznejše razkrojevalke lesa ravno glive (Kervina – Hamović, 1990).

2.1.1 Trohnoba

Glive razkrojevalke povzročajo v lesu številne kemične in fizikalne spremembe, zaradi česar les izgublja naravne lastnosti. Te spremembe se najprej kažejo v spremembi barve lesa, v končni fazi pa ta pojav imenujemo trohnoba. Hitrost in intenziteta razkroja sta odvisni predvsem od vrste glive ali gliv, ki so okužile les, od vrste lesa (naravna odpornost), od vlažnosti in številnih drugih dejavnikov.

Lesne glive potrebujejo za rast in preživetje določene optimalne pogoje, kot so: hrana, vlaga, temperatura, zrak, svetloba, pH.

Hrana: temeljna hrana večine lesnih gliv je celuloza, ki jo glive razgrajujejo s svojimi celulitičnimi, hidrolitičnimi in oksireduktivnimi encimi. Poleg celuloze se lesne glive prehranjujejo tudi z ligninom, hemicelulozo, aromatskimi snovmi,...

Vlaga: zadostna količina vlage v lesu in zraku je poleg hrane eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na kalitev trosov in razvoj gliv. Prenizka ali previsoka količina vlage v lesu preprečuje ali popolnoma onemogoči njihov razvoj. Glive se ne morejo razvijati in razmnoževati v zračno suhem lesu. Zato mora les vsebovati več kot 20%

vlage glede na suho težo lesne snovi. Pod to mejo vlažnosti je les varen pred okužbo z glivami ker se takrat pojavi plazmoliza (prehajanje vode iz hif v les), kar povzroči odmiranje gliv. Tudi prevelika količina vlage v lesu preprečuje razvoj gliv. Optimalna količina vlage v lesu za razvoj gliv je med 35% in 55%.

Zračna vlaga: pomembna je za vzkalitev spor (infekcijo) in za površinsko rast micelija. Optimalna znaša okrog 90%, za spore pa 92% do 95%.

Temperatura: glive se razvijajo v širokem temperaturnem območju in sicer od 3°C do 45°C. Za razvoj večine gliv je optimalna temperatura med 20°C in 30°C. Znano pa je, da večina gliv bolje prenaša nižje temperature kot višje.

Zrak: čeprav glive ne potrebujejo veliko kisika, ne poznamo vrst, ki bi se lahko razvijale v lesu brez tega elementa. Po mnenju nekaterih avtorjev je minimalna količina zraka v lesu, ki je še ugodna za razvoj gliv, 15% glede na prostornino por.

Svetloba: je pogoj za oblikovanje reproduktivnih struktur, vpliva pa tudi na metabolizem gliv. Znano je, da lesne glive najboljše uspevajo pri šibki svetlobi. Neposredna sončna svetloba jim škoduje.

pH: glive se bolje razvijajo v kislem kot v bazičnem okolju. Optimalna vrednost pH je med 4,5 in 5,5. Za večino lesnih gliv je znano, da proizvajajo različne kisline (oksalno, citronsko, jabolčno,...) in si tako same ustvarjajo optimalne razmere z zakisovanjem substrata.

Naravna odpornost je lastnost, ki jo ima les v naravnem, zdravem stanju, torej takrat, ko nanj še niso vplivali razni škodljivi dejavniki.

Največ naravno odpornih drevesnih vrst je v Afriki. Narava je poskrbela, da ga je največ prav tam, kjer je tudi največ lesnih škodljivcev in drugih škodljivih dejavnikov.

Naravna odpornost posamezne drevesne vrste ni absolutna lastnost. Ena drevesna vrsta je lahko odporna proti enim, ne pa proti drugim škodljivcem. Ta lastnost je različna tudi znotraj iste drevesne vrste. Čim večji je delež poznega lesa, tem odpornejši je.

Langendorf razvršča drevesne vrste po naravni odpornosti:

- **zelo odporne drevesne vrste** so: nekatere vrste hrasta, kostanj, tisa, macesen, limbo, robinija, duglazija
- **precej odporne drevesne vrste** so: bor, jelka, smreka, jesen, jablana
- **slabo odporne drevesne vrste** so: bukev, javor, hruška, topol, breza, jelša, lipa, vrba

Trajnost lesa je čas, v katerem les oziroma lesni izdelek zadrži vse svoje naravne lastnosti. Naravna odpornost in trajnost lesa imata velik pomen. Čim večja je naravna odpornost, čim daljša je njegova trajnost oz. uporabnost, tem večja je tudi njegova vrednost. Prav zaradi vprašanja trajnosti lesa se je razvila tudi posebna veja kemijske tehnologije, imenovana kemijska zaščita lesa.

Najzanesljivejši pokazatelj okužbe lesa z lesnimi glivami je sprememba njegove naravne barve. Če les postaja vedno svetlejši od svoje naravne barve, lahko sklepamo, da je okužen z glivami, ki povzročajo belo korozivno trohnobo. Razkrojno delovanje teh gliv je usmerjeno predvsem v razgradnjo lignina. V kolikor pa opazimo, da postaja les temnejši od svoje naravne barve, lahko sklepamo, da je okužen z glivami rjave destruktivne trohnobe. Glive, ki povzročajo to vrsto trohnobe, razkrajajo predvsem celulozo. Sčasoma razkroj tako napreduje, da začne les pokati v pravilne prizme, zaradi česar je dobila trohnoba tudi ime prizmatična. V končni fazi se tak les zdrobi v prah že pod pritiskom s prsti.

Glive, ki okužijo les, lahko prodrejo v lumne celice preko celičnih sten mehansko ali pa s procesom razgradnje. V začetnih fazah razkroja hife prodirajo iz celice v celico preko pikenj, prevajalnih elementov in parenhima. Kasneje pa si z razgradnjo celične stene same ustvarjajo prehode (Eaton in Hale, 1993). V splošnem velja, daje razkroj celične stene bolj kemičen, kot pa mehanski proces.

2.1.2 Vloga oksalne kisline pri razkroju lesa

Pri razkrajanju celuloze ima poleg vodikovega peroksida pomembno vlogo še oksalna

kislina, kar je prvi opisal Schmidt s sodelavci (1981). Oksalna kislina omogoči redukcijo Fe^{3+} v Fe^{2+} kar pospeši razgradnjo. Substanca z Fe(II) katalizira redoks reakcijo kisika, peroksida ter lignina in amorfnih delov celuloze. Hidroksilni radikal transformira celično steno (depolimerizira celulozo oz. zrahlja kristalno strukturo celične stene). Zrahljane dele nato hidrolizirajo encimi glive (Shimada in sod., 1991). Hidroksilni radikali so visoko reaktivni in z oksidacijo, z odvzemom vodikovega atoma ali z elektrofilno adicijo npr. na aromatski obroč hitro reagirajo z večino organskih molekul (Backa in sod., 1997).

Cowling in Brown (1969) sta spoznala, da so celo najmanjše molekule encima celuloze prevelike, da bi lahko prodrle preko vrzeli v celični steni. Predpostavila sta, da imajo pri rjavi trohnobi pomembno vlogo neencimatski oksidativni procesi. Predlagana je bila možnost, da glive razkrajajo celulozo s pomočjo Fentonovega reagenta ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$). Ta povzroči nastanek hidroksilnega radikala oz. podobnega oksidanta. Po drugi strani pa se pri višjih koncentracijah oksalne kisline v lesu razkroj celuloze s Fentonovo reakcijo lahko ustavi. Že 1 mM koncentracija oksalne kisline v lesu naj bi razgradnjo celuloze s Fentonovo reakcijo zaustavila, saj oksalna kislina kot močan reducent preprečuje proces oksidacije. Nekatere glive, kot na primer *Postia placenta*, *Antrodia vaillantii* in *Serpula incrassata*, kopičijo v lesu velike količine oksalne kisline (Schmidt in sod., 1981), kar je v nasprotju z opisano Fentonovo teorijo. Verjetno ima oksalna kislina pomembno vlogo v začetnih procesih razkroja lesa in je tako reaktivna, da deloma razgradi celulozo. Vendar pa glive zgolj z izločanjem oksalne kisline, ne morejo razgraditi kristaliničnih delov celuloze. Nadaljnji procesi razkroja so možni le z encimskimi reakcijami (Rayner in Boddy, 1995).

Takao (1965) je spremljal izločanje oksalne kisline pri glivah prostotrošnjicah. Na splošno jih je razvrstil v dve glavni skupini; glive rjave trohnobe, ki med rastjo izločajo velike količine oksalne kisline in glive bele trohnobe, ki izločajo oksalno kislino le, če rastejo na podlagi, bogati s kalcijevim karbonatom. Izjema med glivami rjave trohnobe je tramovka (*Gloeophyllum trabeum*). Zanj je značilno, da izloča malo oksalne kisline, vendar kljub temu izredno intenzivno razkrajajo les. Espejo in Agosin (1991) domnevata, da izloča druge snovi, s katerimi zakisa substrat. Za druge

glive rjave trohnobe pa je značilno, da z izločanjem oksalne kisline močno zakisajo lesno maso. Hitrost razkroja je vsaj pri nekaterih glivah, močno povezana z obilnostjo izločanja oksalne kisline.

Domnevamo, da oksalna kislina prehaja v celično steno do celuloznih fibril in jih depolimerizira. Shimada s sodelavci (1991) poroča, da oksalna kislina zmanjša viskoznost celuloze veliko bolj kot druge organske kisline. Oksalna kislina pa ne vpliva na kristaliničen del celuloze, zato dokončna razgradnja celuloze poteka encimsko (Leithoff in sod., 1995). Koncentracija oksalnih ionov v lesu naj bi bila približno konstantna. Ker pa se ob prisotnosti bakra oksalna kislina veže na bakrove ione, mora gliva povečati izločanje oksalne kisline. Leithoff s sodelavci (1995) poroča, da naj bi bakrovi ioni v zaščitenem lesu stimulirali izločanje oksalne kisline.

2.2 ZAŠČITA LESA

Zaščita lesa je interdisciplinarna biotehniška veda, ki je tesno povezana z lesno patologijo, entomologijo, biologijo, kemijo, fiziko, biotehnologijo ter z nekaterimi gospodarskimi panogami, kot so: lesarstvo, elektrogospodarstvo, gradbeništvo, kmetijstvo in druge. Zaščita lesa, kot veda, preučuje razgradnjo lesa in učinkovite ukrepe za povečanje njegove trajnosti (Kervina – Hamović, 1990).

Glive za okužbo in razkroj potrebujejo določene pogoje. Najboljša naravna zaščita je, da jim le-teh sploh ne zagotovimo. Če to ni mogoče, najdemo bodisi ustrezne konstrukcijske rešitve ali les zaščitimo s kemičnimi sredstvi. Kemično zaščito pred glivami uporabljamo samo za les, kjer navlaženja nismo uspeli preprečiti z drugimi konstrukcijskimi ukrepi.

Pomembno in nezanemarljivo je poudariti, da imajo zaradi varstva okolja, nekemijski ukrepi vedno prednost pred kemijskimi!

2.2.1 Kemična zaščita lesa

Kemična zaščita lesa pomeni vnašanje najrazličnejših kemičnih sredstev v les z namenom, da bi ga zaščitili pred škodljivci. Preventivna zaščitna sredstva uporabljamo pred pojavom škodljivcev, da bi les čim dlje zaščitili pred razkrojem. Represivna zaščitna sredstva uporabljamo za uničenje škodljivcev, ki že napadajo les.

Kemično zaščito lesa torej delimo na (Kervina – Hamović, 1990):

- preventivno kemično zaščito lesa (v les vnašamo zaščitna sredstva, ko je ta še nepoškodovan in še ni v uporabi),
- naknadno kemično zaščito lesa (ponovna zaščita zdravega impregniranega lesa)
- represivno kemično zaščito (zaščitna sredstva vnašamo v že napaden les z namenom uničenja prisotnih škodljivcev v lesu).

2.2.1.1. Zaščitna sredstva za les

Vse večja okoljska osveščenost ljudi danes pogojuje takšno delitev zaščitnih sredstev (Pohleven in Petrič, 1992):

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

Klasična kemična zaščitna sredstva

Med ta sredstva uvrščamo (Pohleven in Petrič, 1992):

- kreozotna olja
- bakrov(II) sulfat
- arzenove spojine (As_2O_3 , As_2O_5)
- zaščitna sredstva na osnovi kromovih spojin
- kovinske naftenate
- pentaklorofenol (PCP)
- lindan

Kreozotna olja: produkti pridobljeni z destilacijo premogovega katrana. Najpogosteje se uporabljajo za impregnacijo železniških pragov in drogov. Čeprav vsebujejo veliko okolju in človeku strupenih snovi (fenoli, antracen, piren, naftalen,...), so na srečo v vodi netopna in se praktično ne izpirajo iz lesa ter ga dobro varujejo pred vlago, pokanjem in škodljivci.

Bakrov sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): v uporabi že od leta 1742. Sprva v uporabi kot lesni balzam, danes kot samostojni fungicid ali v kombinaciji z drugimi solmi (kromove, arzenove, borove,...). Sevi nekaterih lesnih gliv so nanj postali odporni, predvsem vrste iz rodu *Antrodia*.

Arzenove spojine (As_2O_3 , As_2O_5): zaščitno sredstvo je dobilo ime po glavnih sestavinah, bakrovem(II) sulfatu in arzenovem(V) oksidu. Ameriško združenje za zaščito lesa je to zmes imenovalo CCA. CCA je eno izmed najpogosteje uporabljenih zaščitnih sredstev. Uporablja se predvsem za zaščito stavbnega pohištva, ker je poceni in se ne izpira iz lesa, zaščitena površina pa je kompatibilna z različnimi drugimi premazi. Življenjska doba tako zaščitene lesa je višja od 25 let (Yang in Illman, 1999). V Sloveniji je uporaba CCA prepovedana že od leta 1987.

Zaščitna sredstva na osnovi kroma: sem spadajo sredstva iz sistemov baker – krom – arzen (CCA), baker – krom – bor (CCB), baker – krom – fosfor (CCP), baker – krom – fluor – bor (CCFB). V teh spojinah krom deluje kot fiksirno sredstvo biocidnih substanc v les. Krom nastopa v obliki šestvalentnih ionov, ki so močno kancerogeni. V stiku z lesom se kromovi ioni v 28-ih dneh reducirajo v netoksično trivalentno obliko. Zaradi prisotnosti kroma, je fiksacija zaščitnega sredstva v les zelo dobra in zanj trenutno še ni primerne nadomestila. Ko je sredstvo v les fiksirano, je praktično nenevarno. Problem se zopet pojavi, ko les razpade. Takrat lahko krom ponovno preide v šestvalentno obliko (Pohleven in Petrič, 1992; Zabel in Morell, 1992; Eaton in Hale, 1993). Baker v teh pripravkih deluje fungicidno, arzen pa insekticidno.

Kovinski naftenati: najpogosteje uporabljani so cinkov (brezbarven), bakrov (les obarva zeleno) in železov (les obarva rjavo) naftenat. Njihovo delovanje je opredeljeno kot fungicidno, uporabljajo pa se tudi kot protitermitska zaščita. So vodoodbojni in spadajo med manj toksične snovi. Njihova slabost je, da ne delujejo insekticidno (z izjemo termiticidnosti), les obarvajo in so nekompatibilni z nekaterimi površinskimi premazi (Pohleven in Petrič, 1992).

Pentaklorofenol: ali PCP, je kristalna sol, ki je topna v mineralnih oljih in organskih topilih. Je odličen fungicid in nekoliko slabši insekticid. Žal je njegova razpolovna doba dolgih 20 let, poleg tega pa je še škodljiv za človeka. Pri nas prepovedan od leta 1989.

Lindan: komercialno ime za gama – heksaklorocikloheksan. Insekticid in dober fiksator, vendar zaradi kancerogenosti, vpliva na plodnost in drugih negativnih lastnosti, je pri nas prepovedan od 1988.

Novejša kemična zaščitna sredstva

Med novejša kemična zaščitna sredstva uvrščamo (Pohleven in Petrič, 1992):

- piretrine in piretroide
- triazole
- izotioiazolone
- bakrov kompleks Cu – HDO
- alkilamonijeve spojine
- bakrov – oksikiniolat
- karbamati

Piretroidi: so sintetični analogi piretrinov, ki jih v cvetni glavici akumulira rastlina Bolhač (*Tanacetum cinerariifolium*). Naravni piretrini so mešanica šestih estrov krizantemske in piretrinske kisline. Tako naravni piretrini, kot tudi sintetični piretroidi so zelo učinkoviti insekticidi za širok spekter žuželk. Najpogosteje uporabljena sintetična piretroida sta Deltametrin [(S)- α -ciano-3-fenoksibenzil-(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciklopropan karboksilat) in Permetrin [3-fenoksibenzil-(1RS)-cis,trans-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat). Najdemo ju v večini insekticidov, ki jih uporabljamo tudi doma (Biokil, Pips, ...). Piretroidi so uspešno nadomestili prepovedan Lindan saj so učinkoviti že v manjših koncentracijah.

Triazoli: so odlični in že uveljavljeni fungicidi, ki jih skoraj dvajset let uporabljamo za zaščito oken in zunanjih vrat. Ti biocidi so zelo uspešno nadomestili prepovedan pentaklorofenol. V les dobro prodirajo in se iz njega ne izpirajo. Za zaščito lesa se najpogosteje uporabljata vodotopni propiconazol (1-[2-(2,4-diklorofenil)-4-propil-1,3-dioksolan-2-il-metil]-1H-1,2,4-triazol) ter v organskih topil topen tebuconazol (α -terc-butyl- α -(4-klorofeniletil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol). Obe učinkovini sta stabilni, zelo

pozitivna je tudi lastnost, da se ne izpirata iz lesa. Komercialno sta dostopni v kombinaciji z kakšnim insekticidom, najpogosteje s Permetrinom.

Izotiazoloni: so poznani pod komercialnim imenom Kathone CG. Najprej so jih uporabljali kot dodatek (konzervans) kozmetičnim pripravkom (kreme, ličila, ...), kasneje pa so ugotovili, da bi jih lahko uporabili tudi v zaščiti lesa. Ugotovili so, da imajo dobre fungicidne in baktericidne lastnosti, da so bio-razgradljivi, kar je še posebej pomembno za odpaden zaščiten les, ki ga umaknemo iz uporabe.

Bakrov kompleks Cu-HDO: je nadomestil CCB soli, saj kromovi ioni kot fiksativ niso potrebni.

Alkilamonijeve spojine: fungicidno delovanje alkilamonijevih spojin (AAC) je poznano že od leta 1965, vendar se zaradi cenejših in učinkovitejših anorganskih zaščitnih sredstev, uporaba AAC spojin ni uveljavila. AAC spojine delimo v dve skupini. V prvo spadajo primarni, sekundarni in terciarni amini, v drugo pa kvarternarne. Zaradi prepovedi uporabe kromovih soli za zaščito lesa, so AAC soli začeli dodajati vodotopnim bakrovim pripravkom. Bakrove spojine (bakrov karbonat ali bakrov hidroksid) reagirajo z AAC spojinami in se na ta način vežejo v les. Ta kombinacija se večinoma uporablja za zaščito konstrukcijskega lesa (ostrejšja, drogovi, ograje). Največja prednost te kombinacije pa je dejstvo, da lahko tako zaščiten les uporabljamo tudi za zaščito lesa v stiku z zemljo. AAC spojine se dandanes veliko uporabljajo za zaščito lesa: ker imajo širok spekter delovanja (fungicid, baktericid, termiticid, algicid), poleg tega jih lahko kombiniramo z anorganskimi aktivnimi komponentami.

Karbamati: uporabljajo se že od leta 1975. Najpomembnejša aktivna snov v tej skupini je IPBC (3-jodo-2-propilbutil karbamat). IPBC učinkovito preprečuje razvoj gliv ter plesni na zaščitenem lesu. V ta namen se uporablja od leta 1984. Danes se večinoma uporablja za zaščito stavbnega in vrtnega pohištva. IPBC je trenutno eden izmed okoljsko najprimernejših organskih fungicidov uporabljanih za zaščito lesa.

2.3 INTERAKCIJE GLIV Z BAKROVIMI PRIPRAVKI

2.3.1 Vpliv kovin na glive

Kovine so posredno in neposredno vključene v rast gliv in njihov metabolizem. Nekatere so bolj pomembne (Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni), druge manj (Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg, Pb). Vendar se prav vse na nek način vključujejo v metabolizem celic. Nad določeno koncentracijo delujejo vse pomembne in nepomembne kovine na glive strupeno. Toksičnost je odvisna od vrste kovine, njene koncentracije in organizma ter dejavnikov okolja.

Znanstveniki so pri kovinah najprej opazili fungicidne lastnosti. Zato tudi večina pripravkov za zaščito lesa pred glivami vsebuje kovine kot osnovno komponento. Kovine ali kovinski ioni lahko prizadenejo glivo v vseh stopnjah razvoja. Toksičnost kovin se kaže predvsem v blokiranju encimov, motenju transporta hranljivih snovi, odstranitvi in/ali zamenjavi pomembnih kovin ter negativnem vplivu na membrane (Gadd, 1993; Pohleven in sod., 1999). Danes so v ospredju študije tolerantnosti oziroma rezistence gliv na določene kovine.

2.3.2 Baker

Baker je eden izmed sedmih mikroelementov, ki so pomembni za pravilno delovanje rastlin in gliv (Pohleven in sod., 1999). Sodeluje v številnih metabolnih procesih prokariontov in evkariontov. Poznanih je vsaj trideset encimov, ki vsebujejo baker. Veliko bakrovih spojin je, zaradi dobre topnosti, lahko dostopnih biološkim organizmom. Mnogo drugih elementov je biološko nedosegljivih, ker so redki ali pa slabo topni.

Toksične lastnosti bakrovih spojin so ljudje poznali že pred več stoletji. Uporabljali so jih kot preprečevalno sredstvo pri bakterijskih okužbah rastlin in kot algicid (Humar in Pohleven, 2003). pH substrata ima velik vpliv na toksičnost bakra. Baker je pri nižjem pH manj strupen kot pri višjem (Humar in Pohleven, 2000). Za sesalce je baker relativno malo toksičen, medtem ko je v razmeroma nizkih koncentracijah zelo

strupen za ribe ter nižje organizme, kot so bakterije, alge in tudi glive (Pohleven in sod., 1999).

Nizke koncentracije bakra v substratu pri nekaterih izolatih manj tolerantnih gliv bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*) lahko celo pospešijo njihovo rast, pri bolj tolerantnih glivah pa tega niso opazili (Collet, 1992). Na splošno so glive bele trohnobe manj tolerantne na zvišane koncentracije bakra kot glive rjave trohnobe (Tsunoda in sod., 1997). To potrjujejo tudi podatki o količini izločene oksalne kisline, kar nakazuje na pomembnost te organske kisline pri mehanizmu tolerance. Takao (1965) navaja, da glive bele trohnobe izločajo manj oksalne kisline kot glive rjave trohnobe. Največja toleranca je bila ugotovljena pri vrstah gliv povzročiteljic rjave trohnobe, iz rodu *Antrodia* in temu rodu sorodnih vrstah (Schmidt in sod., 1981).

Lesne glive potrebujejo za razkroj lesne mase več zapletenih biokemičnih mehanizmov kot na hranilnem gojišču, kjer zlahka pridejo do hranilnih snovi (glukoze). Na krompirjevem glukoznem agarju jim je brez depolimerizacije polioz dostopen sladkor. Zato so se pri preraščanju zaščitene lesa glive izkazale kot manj tolerantne v primerjavi z uspevanjem na hranilnem gojišču z dodanim bakrom (Rodney in sod., 1998). Na hranilni podlagi imajo, zaradi boljših pogojev rasti, tudi večjo možnost zmanjšanja fungicidnega delovanja bakra. Zaradi tega moramo biti pri interpretaciji rezultatov tolerance previdni, saj se gliva oziroma izolat odziva drugače na lesu ali hranilnem gojišču (Sutter in sod., 1983).

2.3.3 Tolerantnost

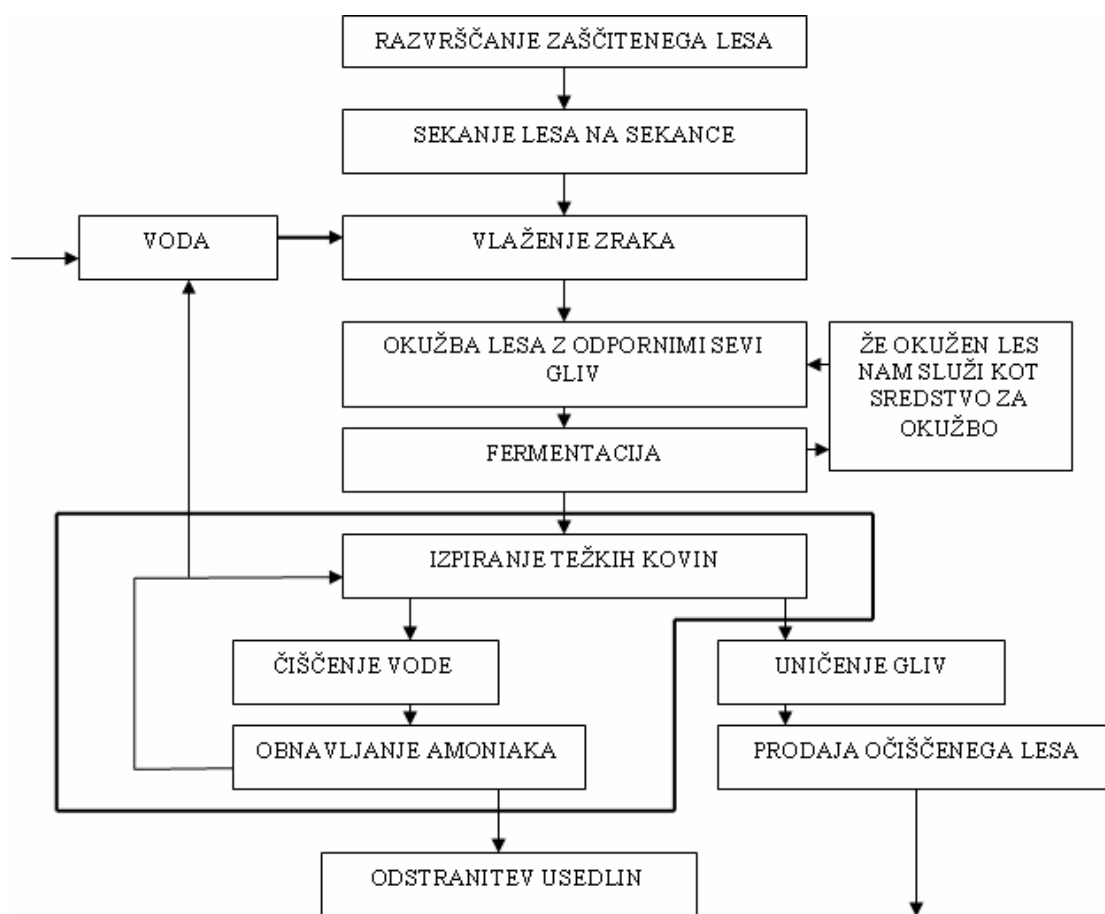
Gadd (1993) je tolerantnost označil kot sposobnost organizma, da preživi, zaradi svojih biokemičnih in fizioloških lastnosti ali genetskih prilagoditev, v naravnem okolju ali v laboratorijskih pogojih, ne glede na prisotnost toksične kovine. Obstaja več razlag resistance. Ena od možnih je, da so tolerantni organizmi del naravnega okolja. To pomeni, da zvišane koncentracije bakra in drugih težkih kovin v zemlji, kot posledica onesnaženja ali zaščite, ne povzročijo nastanka tolerantnih organizmov, vodijo pa do zmanjšanja raznolikosti (Woodward in De Groot, 1999). Druga razlaga pravi, da naj bi prisotnost višje koncentracije bakra ali kakšne druge kovine povzročila razvoj novih tolerantnejših organizmov (Jellison in sod., 1997). Glivna

toleranca na baker variira tako med posameznimi vrstami kot med posameznimi izolati iste vrste (Hirt, 1949; Da Costa, 1959).

2.3.4 Razstrupljanje ali mikoremediacija odsluženega zaščenega lesa

Odslužen zaščen les predstavlja v svetu vse večji problem, ker kot poseben odpadek ni vključen v industrijsko reciklažo (Yang in Illman, 1999).

V primeru mikoremediacije lahko tolerantnost gliv obrnemo sebi v prid in na biotehnološki način obvladujemo problem odpadnega zaščenega lesa. V literaturi je kar nekaj člankov na to temo, vendar je opaziti, da večina dognanj temelji le na laboratorijskih raziskavah in ne na praktični industrijski uporabi (Leithoff in Peek, 1998). Leithoff in Peek (1998) sta predlagala naslednji model razstrupljanja zaščenega lesa (slika 1). Uporabila sta odslužen les, ki je bil zaščiten s CC in CCB zaščitnima sredstvoma. Les sta okužila z glivama *Antrodia vaillantii* in *Tyromyces placenta*.



Slika 1: Shema predlaganega procesa razstrupljanja odpadnega s CCA in CCB pripravki zaščitenega lesa s pomočjo gliv tolerantnih na baker (Leithoff in Peek, 1998)

Poskus pokaže, da sta glavna problema zagotavljanje ustrezne vlažnosti in preprečevanje okužbe s konkurenčnimi organizmi. Neustrezna vlažnosti zavre ali celo ustavi glivno rast, lahko se pojavi tudi bakterijski antagonizem.

Možne uporabe tako prečiščenega lesa :

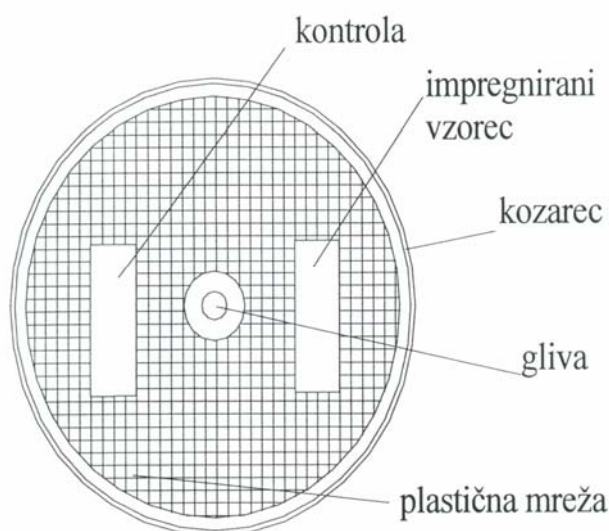
- papir (potrebno uporabiti glive bele trohnobe, da se ohrani celuloza)
- gradbene plošče iz dezintegriranega lesa (delna depolimerizacija lesa zniža mehanske lastnosti in les ne sme biti zdravju škodljiv)
- depolimerizacija lesa v enostavne sladkorje (vir hrane za bakterije, surovina v kemični industriji, fermentacija etanola)

Namen diplomske naloge je pospešiti postopek mikoremediacije odpadnega zaščitenega lesa z dodajanjem hranil. Ker bodo imele glive na voljo dodatna hranila, bodo lažje okužile in hitreje pričele z razkrojem odpadnega lesa. Poleg tega bo dobro preraščen les tudi bolj odporen proti antagonističnemu delovanju bakterij. Kot hranilo bomo uporabili koruzno omakalno vodico (CSL), ki je odpadek iz živilske industrije ter glukozo kot vir glivam enostavno dostopnih sladkorjev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA VZORCEV

Vzorci smo izdelali iz beljave smrekovine (*Picea abies* Karst.), po navodilih standarda SIST EN 113 (1996), velikosti $(50 \pm 0,5)$ mm \times $(25 \pm 0,5)$ mm \times $(15 \pm 0,5)$ mm in vlažnosti 12 do 15%. Vzorci so bili brez vidnih napak, grč in smolnih kanalov.



Slika 2: Shema vstavljanja vzorcev na preraščeno kulturo micelija gliv

3.1.1 Zaščita vzorcev

Vzorci smo zaščitili s 5% raztopino CCB (34% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 37,3% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 28,7% H_3BO_3) v vakuumsko/tlačni komori (izdelovalec Kambič), v skladu s standardom SIST EN 113 (1996). Vzorce smo zložili v kozarce tako, da so se medsebojno čim manj dotikali, jih prekrili s plastično mrežico in obtežili. Sledilo je prelitje z zaščitnim pripravkom. Obtežitev nam je služila, da vzorci niso splavali na površje. Kozarce z vzorci smo zložili v vakuumsko komoro in jih 20 minut vakumirali pri 93% vakuumu. Nato smo tlak v komori izenačili z zunanjim ter pustili vzorce še dve uri v raztopini pripravka. Po končani impregnaciji smo pripravek odlili, vzorce obrisali ter jih ponovno stehali in tako določili mokri navzem. Vzorce smo potem

štiri tedne kondicionirali v petrijevkah. Prvi teden v odprtih, naslednja dva v polzaprtih in zadnji teden v zaprtih petrijevkah. Tako smo želeli simulirati naravno sušenje in fiksacijo sredstva v les.

3.1.2 Izpiranje

Po štirih tednih smo vzorce zložili v sušilnik in jih 24 ur sušili pri temperaturi $103 \pm 2^\circ\text{C}$ ter tako zaključili fiksacijo. Po končanem sušenju smo vzorce ponovno zložili v čaše in jih izprali v skladu s standardom SIST EN 84 (ECS, 1994). Postopek je podoben impregnaciji, le da smo tu vzorce prekrili s plastično mrežico, jih obtežili in zalili z destilirano vodo. Čaše z vzorci smo postavili v vakuumsko komoro za 20 minut, ter vzpostavili 93% vakuum. Po preteku časa smo jih pustili v vodi še dve uri. Vodo smo nato odlili in jo zamenjali s svežo destilirano vodo, ki smo jo dnevno menjali še naslednjih 14 dni.

3.2 PRIPRAVA HRANILNIH GOJIŠČ

Hranilna gojišča za glive smo pripravili v steklenih kozarcih s pokrovčkom z volumnom 350 mL. V aluminijaste pokrovčke smo predhodno izvrtali luknje in jih zatesnili z vato. Odprtine so služile za dihanje, vata pa je preprečevala kontaminacijo gojišča.

Kot hranilni medij smo uporabili krompirjev glukozni agar (PDA – potato dextrose agar – DIFCO Laboratories). Priprava gojišča je sledila navodilom proizvajalca.

V 0,1 L destilirane vode smo raztopili 39 g PDA v prahu. Ostalo količino vode (0,9 L) smo zavreli in vanjo zlili mešanico destilirane vode in PDA. Raztopino je bilo potrebno vseskozi mešati, saj se sicer zelo hitro prime na posodo in prismodi. Steklene kozarce smo napolnili s 50 mL še vročega tekočega hranilnega gojišča. Kozarce smo nato zložili v avtoklav in jih sterilizirali 45 minut pri 121°C (1,5 bar). Poleg kozarcev smo v avtoklav vstavili tudi v papir zavite mrežice in testne lesene vzorce. Po avtoklaviranju smo vso opremo zložili v brezprašno komoro in počakali, da se je hranilni medij ohladil in strdil.

Naslednji dan smo inokulirali micelij izbranih vrst gliv. V kozarce s hranilno podlago smo približno na sredino dali cepič glive ($r = 0,5$ cm), nato še PVC mrežico (premer 80 mm). Kozarce smo nato zaprli in postavili v rastno komoro.

Vstavljanje PVC mrežic in izbranih glivnih izolatov smo izvajali v brezprašni komori pri sterilnih pogojih. Ves pribor smo sprti razkuževali z alkoholom in plamenom. Na pokrovice kozarcev smo napisali vrsto glive in kozarce postavili v rastno komoro s temperaturo 25° C in 85% relativno zračno vlažnostjo. Tako je imela gliva zagotovljene vse optimalne pogoje, da je pričela rasti in razkrojevati les.

3.3 UPORABLJENE VRSTE GLIV

Za izvedbo diplomske naloge smo uporabili sledeče seve gliv rjave trohnobe (Preglednica 1):

***Poria vaillantii* (*Anatrodia vaillantii*) in *Poria monticola* - beli hišni gobi**

Belo hišno gobo najdemo predvsem v severni in srednji Evropi. Okužuje vlažen les iglavcev, redkeje listavce. Pojavlja se kot razkrojevalka vgrajenega lesa in izdelkov, ki so v stiku z zemljo (v rudnikih).

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

Bela hišna goba raste najintenzivneje pri temperaturi 27° C in okoli 40 % vlažnosti lesa. Pri optimalnih pogojih je lahko dnevni prirast gobe do 12,5 mm dnevno.

Posebno ji prija vlaga, ki se nabira na lesu v obliki vodnih kapljic. Zanimivo je, da lahko bela hišna goba zelo dobro prenaša izsušitev. Po nekaterih virih naj bi gliva še

po petih letih sušnega obdobja zopet pričela z rastjo, vendar le, če vlažnost lesa zopet doseže 40 % (Unger in sod., 2001).

Bela hišna goba povzroča rjavo destruktivno trohnobo, in les zelo hitro izgublja upogibno trdnost. Zanimivo je, da se udarna trdnost močno zmanjša, ko komaj zaznamo sploh kakšno izgubo lesne mase. Veliko škode povzročajo predvsem na tehničnem lesu. Bela hišna goba - *Poria vaillantii* predstavlja velik problem, saj v zadnjih letih v evropskih državah ugotavljajo, da okuži in razkraja tudi les, v stiku z zemljo, impregniran s CCA in CCB pripravki. Izolat Pv2 velja za bolj tolerantnega na baker kot Pm2.

Navadna tramovka - *Gloeophyllum trabeum*

Okužuje iglavce (smreka, bor) in listavce (bukev, robinija, cipresa). Najdemo jo predvsem na lesnih konstrukcijah na ostrešjih, mostovih, okenskih okvirih, podbojih, v savnah, na zunanjih talnih oblogah, včasih tudi na drogovih, pragovih, v rudnikih, ograjah...

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

Yellow fungus — *Leucogyrophana pinastri*

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

Ta lesna goba je po delovanju podobna sivi hišni gobi. Najpogosteje jo najdemo v starih stavbah, zunaj stavb je skoraj ni. Okužuje les iglavcev in listavcev. Razvija se lahko tudi na suhem lesu. Na okuženem lesu, ki ga osušimo, lahko tudi po daljšem obdobju ponovno oživi. Yellow fungus pri nas v Sloveniji še ni znana. Podatkov o njeni prisotnosti na splošno v naravi pa nimamo.

Toleranca gliv na baker je ocenjena na podlagi raziskav Pohlevna in sodelavcev (2001 in 2002).

Preglednica 1: Uporabljeni izolati gliv rjave trohnobe (Raspor in sod., 1995)

Gliva	Oznaka	Poreklo	Tolerantnost na baker
<i>Antrodia vaillantii</i> (bela hišna goba)	Pv2	Univerza v Ljubljani ZIM L037	DA
<i>Poria monticola</i> (bela hišna goba)	Pm2	BAM 102, Germany	NE
<i>Leucogyrophana</i> <i>pinastris</i>	Yf2	Buckinghamshire Chilterns University College	DA
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (tramovka)	Gt2	Univerza v Ljubljani ZIM L017	NE

3.4 IZPOSTAVITEV GLIVAM

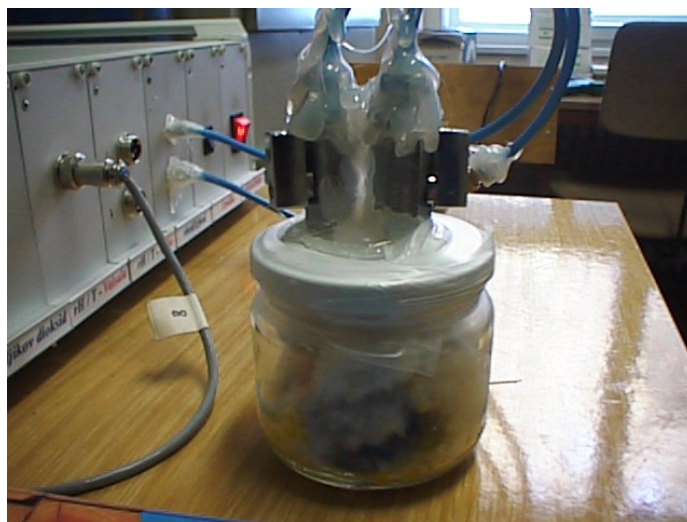
Ko je micelij glive po tednu dni prerasel hranilno gojišče, smo na vsako stran micelija dodali še po en zaščiten in en nezaščiten (kontrola) vzorec lesa. Sterilne lesne vzorce smo polagali na PVC mrežico in tako preprečili stik vzorcev z gojiščem. Vzorce smo v rastni komori (25°C, RH = 75%) izpostavili razkroju od 4 do 16 tednov. V določenih tedenskih presledkih (po 4, 6, 9, 12 in 16 tednih izpostavitve glivam) smo jih odstranili z gojišča in jih uporabili za nadaljnje raziskave (merjenje respiracije in izguba mase).

Del impregniranih in kontrolnih vzorcev smo pred izpostavitvijo lesnim glivam za tri do pet minut pomočili v 4% vodno raztopino glukoze in/ali 4% raztopino koruzne omakalne vodice. Hranilno obogateni vzorci so bili izpostavljeni glivam le štiri tedne.

3.5 MERJENJE RESPIRACIJE

Po določenem času izpostavitve smo z micelijem preraščene vzorce pazljivo izolirali in jih vstavili v prazen eksperimentalni kozarec za merjenje koncentracije ogljikovega dioksida. Kozarce smo zaprli s posebnimi pokrovčki z ventili, tesnjenje pa izboljšali z uporabo silikonske paste (Silicon high vacuum, Merck). V zaprtih kozarcih smo

najprej izmerili začetno, po eni uri pa še končno koncentracijo ogljikovega dioksida. Razlika med končno in začetno vrednostjo predstavlja količino izdihanega CO₂. Koncentracijo ogljikovega dioksida smo merili z infrardečim detektorjem (0 – 3000 ppm ± 5 ppm; ECHO d.o.o., Slovenija). Postopek merjenja CO₂ smo povzeli po Tavzes in sodelavcih (2002).



Slika 3: Eksperimentalni kozarec za merjenje koncentracije CO₂



Slika 4: Celoten sistem za merjenje respiracije (računalnik, zračna črpalka in eksperimentalni kozarec)



Slika 5: Merilna skala

3.6 IZGUBA MASE

Vsem vzorcem (zaščitenim in nezaščitenim) smo, pred izpostavitvijo glivam, določili absolutno suho maso. Po izpostavitvi smo najprej določili preraščenost vzorcev, nato smo jih osušili do konstantne mase in jih ponovno tehtali. Razlika končne in začetne mase (pred izpostavitvijo glivi) predstavlja izgubo mase.

3.7 UPORABLJENE APARATURE

Tehtnica :

Proizvajalec : TEHTNICA ŽELEZNIKI
Tip : MC1 ANALYTIC AC 210P

Sušilnik :

Proizvajalec : KAMBIČ (LABORATORIJSKA OPREMA)
Tip : SUŠILNIK STERILIZATOR

Vakuumska komora :

Proizvajalec : KAMBIČ
Tip : VAKUUMSKA TLAČNA KOMORA

Brezprašna komora :

Proizvajalec : ISKRA

Tip : IBK 1 V2 BREZPRAŠNA KOMORA

Rastna komora :

Proizvajalec : LTH

Tip : RASTNA KOMORA

Avtoklav :

Proizvajalec : SUTJESKA

Infrardeči detektor :

Proizvajalec : ECHO

3.8 UPORABLJENE KEMIKALIJE

Krompirjev glukozni agar (PDA) kot hranilno gojišče :

Proizvajalec : Becton, Dickinson and Company

Tip : Difco™ Potato Dextrose Agar

PH $5,6 \pm 0,2$

5% raztopina CCB za impregnacijo :

Proizvajalec : SILVAPRODUKT

Tip : SILVANOL G (34% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 37,7% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 28,7% H_3BO_3)

Hranila :

- glukoza KEMIKA ZAGREB
- CSL – corn steep liquor (koruzna omakalna vodica) SIGMA

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 NAVZEM CCB IMPREGNACIJSKEGA SREDSTVA

Navzem sredstva smo določili gravimetrično. Povprečni mokri navzem CCB impregnacijskega sredstva je bil 558 kg/m^3 , kar je skladno z rezultati drugih avtorjev (Humar s sod., 2002). Suh navzem je znašal približno $27,9 \text{ kg/m}^3$. Ta vrednost ustreza navzemu, ki ga priporočajo za zaščito telekomunikacijskih drogov v stiku z zemljo (Wilajtner, 2001).

4.2 VPLIV TRAJANJA IZPOSTAVITVE GLIVAM NA TVORBO OGLJIKOVEGA DIOKSIDA

Testne vzorce smo imeli izpostavljene glivam štiri, šest, devet, dvanajst in šestnajst tednov. Iz količine nadihanega ogljikovega dioksida v eni uri smo sklepali na preraščenost lesnih vzorcev. Po pričakovanju so bili kontrolni vzorci bolj preraščeni kot impregnirani, vendar so glive vse vzorce prej ali slej prerasle. Pri na baker občutljivih izolatih smo ugotovili, da preraščanje impregniranih vzorcev, na začetku izpostavitve, zaostaja za kontrolnimi vzorci, kasneje pa se ta razlika nekoliko zmanjša. Iz rezultatov je mogoče razbrati tudi to, da sta tolerantni glivi prerasli zaščitene vzorce skoraj tako intenzivno kot nezaščitene kontrolne vzorce. Prav tako smo opazili določene razlike v delovanju med tolerantnima (Pv2 in Yf2) in na baker občutljivima (Pm2 in Gt2) sevoma gliv.

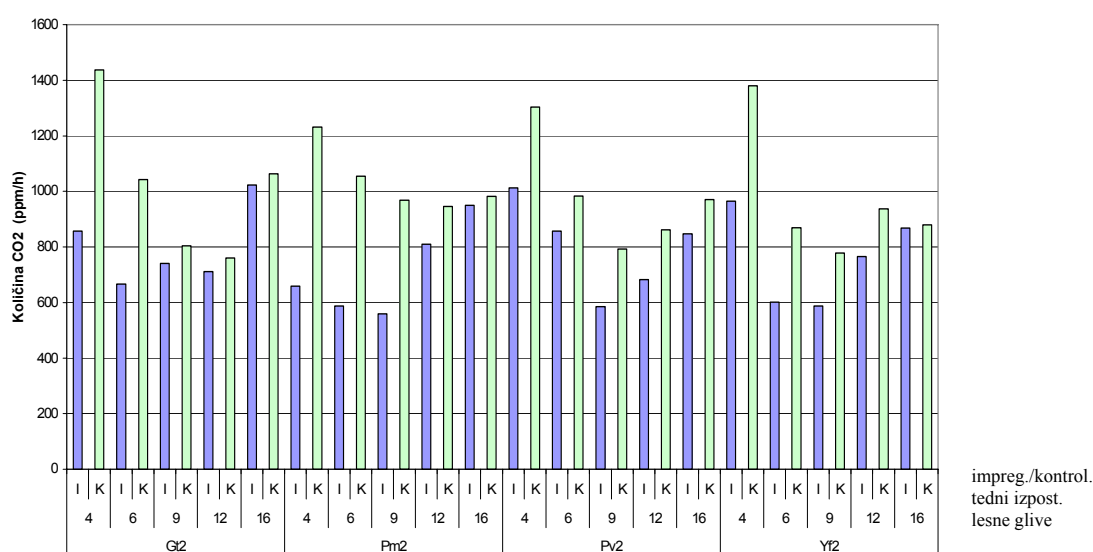
Pri glivah *Antrodia vaillantii* in *Leucogyrophana pinastri* smo opazili največjo produkcija CO_2 po štirih tednih izpostavitve. Na kontrolnih vzorcih smo določili, da so glive proizvedle $1303 \text{ ppm CO}_2/\text{h}$, pri impregniranih pa le nekoliko manj ($1012 \text{ ppm CO}_2/\text{h}$). Menimo, da hitro preraščanje impregniranih vzorcev, tolerantne glivne izolate že na daleč loči od netolerantnih gliv. Do devetega tedna aktivnost gliv upada, potem pa začne ponovno naraščati. Vrednosti CO_2 tudi po šestnajstih tednih ne presežejo tistih po štirih tednih izpostavitve. Primerljiv trend produkcije ogljikovega dioksida se pojavi pri impregniranih vzorcih in kontrolah.

Pri netolerantnih sevih *Gloeophyllum trabeum* in *Poria monticola* je opaziti nekoliko drugačen vzorec obnašanja. Po štirih in šestih tednih izpostavitve je razlika v količini izdihanega CO₂ med zaščitenim in nezaščitenim vzorcem kar dvakrat višja v prid nezaščitenim vzorcem. Najvišjo vrednost (1437 ppm) pri kontrolnih vzorcih je najti pri tramovki (Gt2), sledi pa ji bela hišna goba (Pm2). Tudi pri impregniranih vzorcih opazimo najvišjo vrednost (1023 ppm) pri vzorcih, ki jih je prerasla *Gloeophyllum trabeum*, vendar šele po šestnajstih tednih izpostavitve. Iz tega bi lahko sklepali, da netolerantne glive potrebujejo več časa za kolonizacijo zaščitenih vzorcev, pa še ta je samo površinska (Andoljšek, 2004). Intenzivnost gliv na kontrolnih vzorcih narašča do četrtega tedna kasneje pa upada do dvanajstega tedna izpostavitve, nakar se prične ponovno dvigati, podobno kot pri netolerantnih izolatih. Po šestnajstih tednih izpostavitve je opaziti, da je intenziteta trohnenja pri zaščitenih vzorcih višja kot po štirih tednih, pri kontrolnih vzorcih pa ne. Verjetno so glive po 16 tednih že razkrojile večino kontrolnih vzorcev, z razkrojem impregniranih pa so šele pričele, kar se odraža v višjih vrednostih nastalega ogljikovega dioksida (preglednica 2).

Preglednica 2: Povprečna količina izdihanega ogljikovega dioksida v odvisnosti od časa izpostavitve lesnim glivam

Gliva	Čas izpostavitve (tedni)	Povprečna količina izdihanega CO ₂ /h (ppm)	
		kontrolni v.	Impregnirani v.
Gt2	4	1437	857
	6	1043	666
	9	804	740
	12	760	711
	16	1063	1023
Pm2	4	1232	659
	6	1055	587
	9	969	559
	12	946	810
	16	982	949
Pv2	4	1303	1012
	6	983	856
	9	793	585
	12	862	682
	16	971	848
Yf2	4	1380	964
	6	870	601
	9	778	587
	12	937	766
	16	879	868

Na sliki 6 je še posebej dobro vidno, da je aktivnost lesnih gliv vedno višja pri nezaščitenih vzorcih kot pri impregniranih vzorcih, ne glede na to ali so vzorce preraščali tolerantni ali netolerantni izolati. Opazno je, da produkcija CO₂ proti devetemu tednu pri vseh glivah upada, potem začne ponovno rasti. Iz grafa je razvidna konstantna aktivnost tolerantnih izolatov tekom celotne izpostavitve. Poleg tega opazimo tudi razlike v koncentraciji CO₂ med zaščitenim in nezaščitenim vzorcem. Prav tako smo ugotovili, da se razlike v tvorbi CO₂ na zaščitenih in nezaščitenih vzorcih z daljšanjem časa izpostavitve glivam manjšajo (Slika 6).



Slika 6: Vpliv časa izpostavitve na produkcijo CO₂ pri kontrolnih (K) in impregniranih (I) vzorcih

Trajanje izpostavitve vzorcev lesnim glivam je zelo pomemben parameter pri vseh biotehnoških postopkih razstrupljanja odpadnega lesa. Potrebno je namreč natančno določiti mejo, do katere glive les samo razstrupljajo, ne pride pa še do izgube bistvenih komponent lesa. Znano je, da v začetnih fazah razkroja glive lesno maso le navlažijo in zakisajo, izgube mase pa do takrat še ni opaziti (Shortle, 1990). Tolerantne glive iz rodu *Antrodia* v začetnih fazah izločajo velike količine oksalne kisline, ki reagira s težkimi kovinami v lesu (Humar in sod, 2001). Ta faza je v procesu razstrupljanja najpomembnejša. Pri baker-tolerantnih glivah namreč oksalna kislina reagira z bakrom in ga spremeni v neaktivno obliko, ki nima več fungicidnega učinka. Po koncu te faze, se pojavi izguba lesne mase, zato moramo postopek nujno

prekiniti. Izjemno pomembno je, da ne podaljšujemo izpostavitve lesa glivam dlje kot je potrebno in na ta način ohranjamo lesno maso. Meritve respiracije lesnih gliv na prepraščenih vzorcih nakazujejo, da je kolonizacija impregniranih vzorcev večinoma končana po 4-ih do 6-ih tednih izpostavitve in zato ni smotno podaljševati časa izpostavitve.

4.3 VPLIV TRAJANJA IZPOSTAVITVE GLIVAM NA IZGUBO MASE

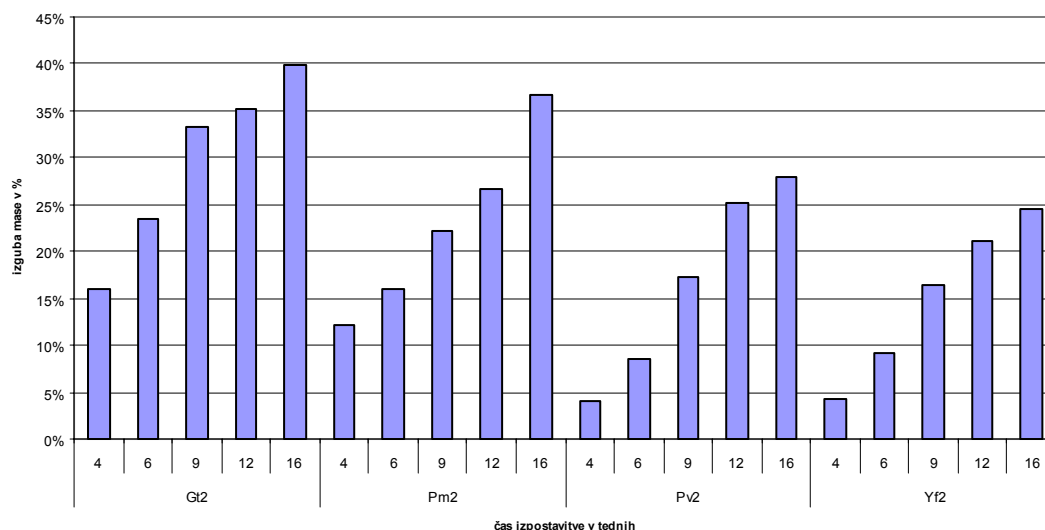
Izgube mas kontrolnih vzorcev so odvisne od trajanja izpostavitve lesnim glivam. Največjo izgubo mase smrekovih neimpregniranih vzorcev je pozročila tramovka (Gt2). Po 16 tednih razkroja smo namreč določili kar 40% izgubo mase. Podobno, le nekoliko nižjo izgubo mase smo opazili tudi pri glivi Pm2 (37%). Po drugi strani pa sta tolerantna glivna izolata *A. vaillantii* (Pv2) in *L. pinastri* (Yf2) v šestnajstih tednih razkrojila v povprečju za dobro tretjino manj lesne mase kot tramovka in bela hišna goba. Pv2 je v istem obdobju razkrojila le 28% lesne mase, Yf2 pa le 24% (preglednica 3). Podobne vrednosti smo zasledili tudi v literaturi (Bokan, 2004). Nižja izguba mase pri na baker tolerantnih glivah je pričakovana, saj je za ti dve glivi znano, da zelo hitro in učinkovito kolonizirata les, nimata pa tako učinkovitih mehanizmov za razgradnjo kristalinične celuloze kot Gt2.

Preglednica 3: Izguba mase lesnih vzorcev v odvisnosti od časa izpostavitve lesnim glivam

Gliva	Čas izpostavitve (tedni)	Izguba mase	
		kontrolni v.	impregnirani v.
Gt2	4	16%	2%
	6	23%	2%
	9	33%	2%
	12	35%	2%
	16	40%	0%
Pm2	4	12%	2%
	6	16%	2%
	9	22%	5%
	12	27%	2%
	16	37%	1%
Pv2	4	4%	2%
	6	8%	2%
	9	17%	2%
	12	25%	2%
	16	28%	4%
Yf2	4	4%	0%
	6	9%	2%
	9	16%	0%
	12	21%	2%
	16	24%	6%

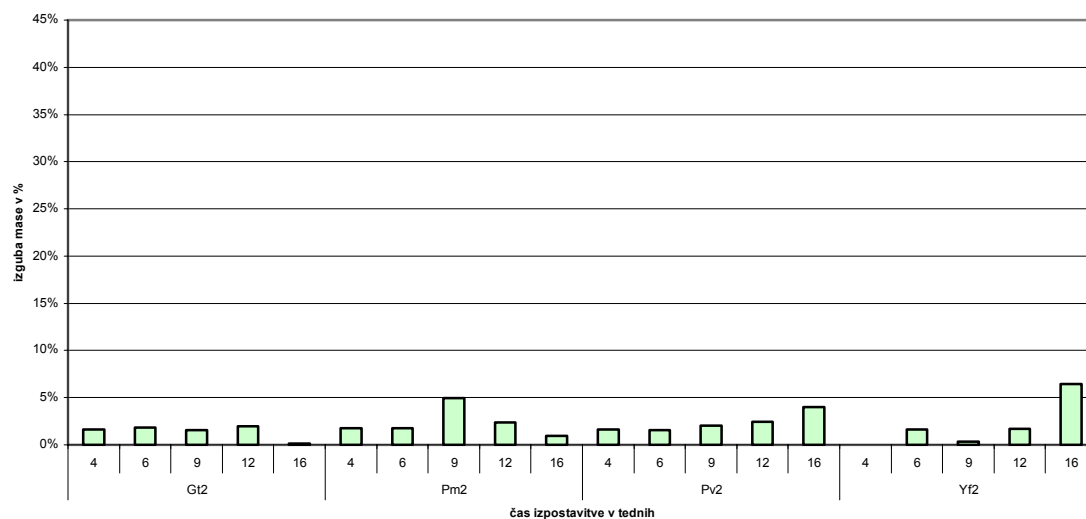
Očitno je, da izguba mase pri vseh glivah narašča skoraj linearno. Prav tako smo ugotovili, da se štiritedenska izpostavitve lesnim glivam odraža v znatni izgubi mase.

Nobeden izmed uporabljenih izolatov gliv pa ni razkrojil vzorcev, zaščitenih s pripravki CCB, kar so ugotovili že Pohleven in sodelavci (2001; 2002). Največjo izgubo mase smo opazili pri tolerantnem izolatu Yf2 (6%), sledila pa mu je gliva bela hišna goba (Pv2), kjer smo določili 4% izgubo mase. Najnižjo izgubo mase pa smo določili pri izolatu Gt2, kjer je gliva razkrojila manj kot 2% mase smrekovine. Zanimivo pa je, da je tramovka po šestnajstih tednih izpostavitve nadihala največ (1023 ppm CO₂/h), kljub nizki izgubi mase. Mogoče bi ta pojav lahko razložili s tem, da potrebuje ta netolerantni glivni izolat več časa za prilagoditev na toksično okolje. Poleg tega so hife Gt2 ostale večinoma le na površini vzorcev in niso prodrle v sredo vzorcev (Andoljšek, 2004). Zaradi tega ni prišlo do razkroja impregniranih vzorcev. Po drugi strani sta tolerantni glivi v celoti prerasli tudi impregnirane vzorce (Andoljšek, 2004), kar se odraža v konstantno naraščajoči izgubi mase.



Slika 7: Vpliv časa izpostavitve na izgubo mase kontrolnih vzorcev

Na sliki 8 lahko vidimo, da sta netolerantni glivi uspešnejši razkrojevalki nezaščitenih vzorcev kot tolerantna seva gliv. Najmanjše izgube lesne mase je povzročila gliva *L. pinastri* (Yf2). Pri vseh glivah je dobro vidno, da izguba mase z daljšanjem trajanja izpostavitve narašča.



Slika 8: Vpliv časa izpostavitve na izgubo mase impregniranih vzorcev izpostavljenih lesnim glivam

Rezultati izgube mase nakazujejo, da impregniranega lesa ne bi smeli izpostavljati glivam več kot 12 tednov. Kasneje glive prično z intenzivnejšim razkrajanjem impregniranega lesa.

4.4 VPLIV HRANIL NA PRERAŠČANJE LESNIH VZORCEV Z GLIVAMI RJAVE TROHNOBE

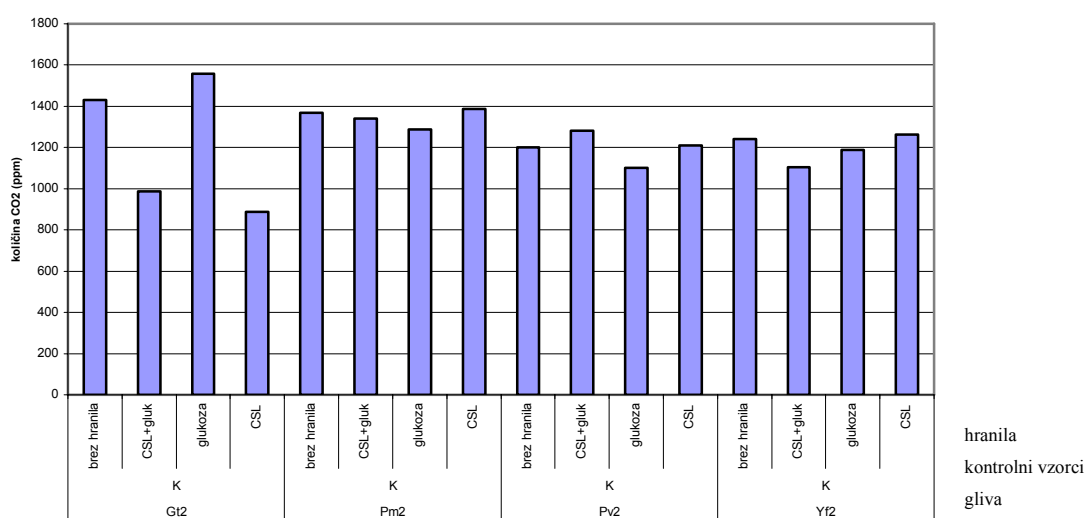
V prvem delu naših raziskav smo ugotovili, da je najbolj optimalen čas za mikoremediacijo odpadnega zaščitenega lesa do dvanajstih tednov, ko še ne pride do večje izgube mase lesa. V kolikor bi ta postopek želeli izvajati v industrijskem merilu, je tri mesece odločno predolgo. Zato želimo mikoremediacijo nekoliko pospešiti. Logično razmišljanje nas privede do spoznanja, da bi glive bolj rasle, če bi imele na razpolago več in lažje dosegljivih hranil. Eden od možnih virov hrane so s sladkorji (glukoza) in koruzno omakalno vodico (CSL) dobljeni iz odpadne vode živilske industrije. S tem bi rešili kar dva pereča problema. Živilska industrija bi porabila a stranski produkt in bi manj obremenjevala okolje, po drugi strani pa bi biotehnoška podjetja prišla do poceni hranil. Zaradi tega smo se odločili, da raziščemo vpliv glukoze in/ali koruzne omakalne vodice na preraščanje kontrolnih in impregniranih vzorcev z glivami rjave trohnobe.

Povprečna produkcija CO₂ pri kontrolnih vzorcih je kar za 23% višja kot pri impregniranih vzorcih. Podobno kot pri prejšnjem eksperimentu, smo tudi pri dodajanju hranil ugotovimo, da sta netolerantna seva učinkoviteje prerasla kontrolne vzorce kot tolerantna glivna izolata. Pri zaščitenih vzorcih pa je bilo ugotovljeno ravno nasprotno (preglednica 4).

Preglednica 4: Vpliv hranil na tvorbo CO₂ pri vzorcih izpostavljenih glivam za štiri tedne

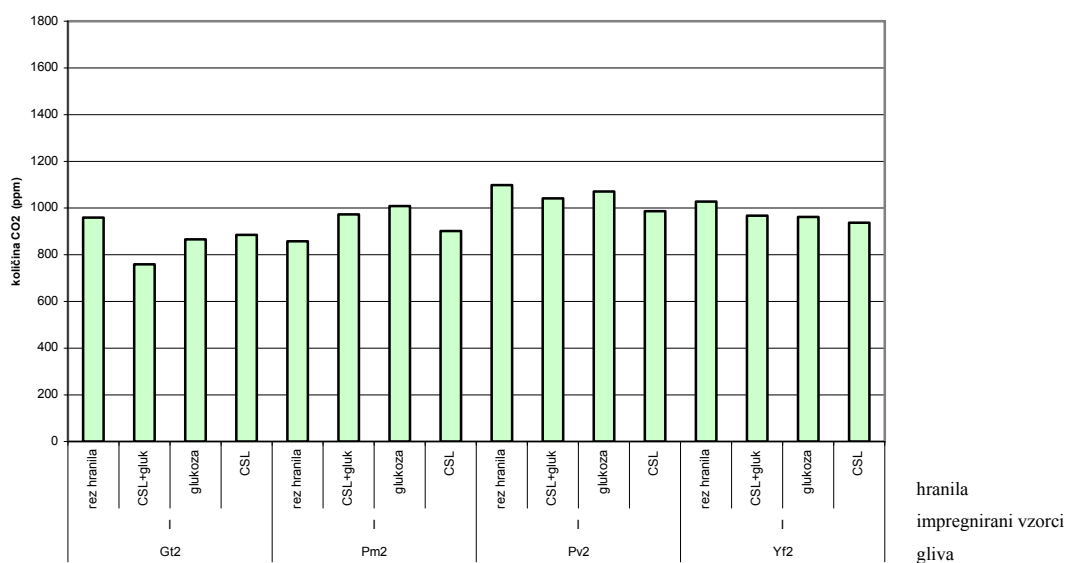
Gliva	Hranilo	Povprečna količina izdihanega CO ₂ /h (ppm)	
		kontrolni v.	impregnirani v.
Gt2	brez hranila	1430	959
	CSL+gluk	986	758
	glukoza	1559	866
	CSL	887	884
Pm2	brez hranila	1368	857
	CSL+gluk	1341	973
	glukoza	1288	1008
	CSL	1387	903
Pv2	brez hranila	1201	1098
	CSL+gluk	1282	1042
	glukoza	1103	1070
	CSL	1210	987
Yf2	brez hranila	1240	1028
	CSL+gluk	1104	967
	glukoza	1187	961
	CSL	1264	937

Hranila so na preraščanje kontrolnih vzorcev vplivala zelo različno (slika 9). Na glivi Pv2, Yf2 in Pm2 skoraj niso imela vpliva. Med posameznimi hranili ni bilo bistvene razlike. Po drugi strani pa smo opazili, da delujejo hranila na glivo Gt2 celo negativno. Pri vzorcih, ki so bili omočeni v CSL, smo določili bistveno nižjo tvorbo CO₂ kot pri vzorcih, ki niso bili obogateni s hranili ali so bili omočeni le v vodno raztopino glukoze. Verjetno je dodani dušik negativno vplival na rast glive Gt2 (Jarosz-Wilkolazka in Gadd, 2003).



Slika 9: Vpliv hranil na tvorbo CO₂ pri nezaščiteneh vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne

Dodajanje hranil impregviranim vzorcem ni bistveno izboljšalo kolonizacije. Pri impregviranih vzorcih izpostavljenih tolerantnim glivam smo opazili, da je dodajanje hranil celo negativno vplivalo na tvorbo CO₂. To verjetno pomeni, da je dodano hranilo gliva negirala z izločanjem organske kisline (oksalna kislina) in ga na nek način nevtralizirala. Po drugi strani smo največji vpliv zaradi dodajanja hranil opazili pri glivi Pm2. Najbolje je na rast vplivala glukoza, nato CSL in glukoza, najmanj pa CSL. Tudi pri tramovki smo opazili, da je gliva rasla slabše na s hranilom obogatenih kot neobogatenih vzorcih (slika 10).



Slika 10: Vpliv hranil na tvorbo CO₂ pri zaščitenih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne

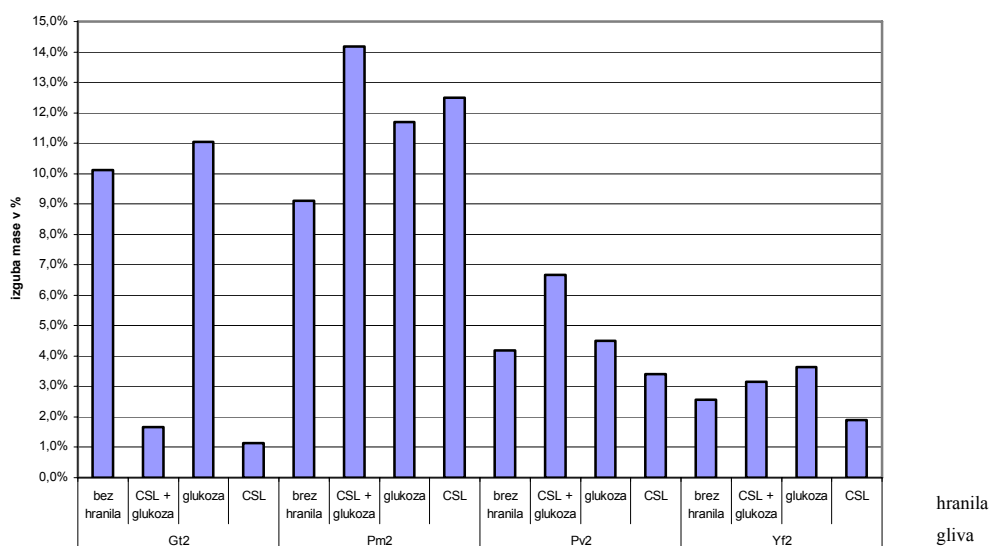
4.5 VPLIV HRANIL NA IZGUBO MASE

Na kontrolnih vzorcih smo po pričakovanju določili višje izgube mase kot pri impregniranih vzorcih. Izguba mase je v vseh primerih večja kot 1%, kar smo pričakovali, saj so kontrolni vzorci nezaščiteni, poleg tega pa še obogateni z različnimi hranili. Ponovno smo potrdili da na nezaščitenih vzorcih bolj uspevata netolerantna seva Gt2 in Pm2, kot tolerantna izolata Pv2 in Yf2. Iz slike 7 in preglednice 5 razberemo, da je tramovka (Gt2) največje izgube mase povzročila na vzorcih obogatenih z glukozo (11,1%), tem pa so sledili kontrolni vzorci (10,1%). Dodatek CSL je negativno vplival na rast te glive, saj je gliva razkrojila le 1,1% vzorcev omočenih v CSL. Po drugi strani smo opazili, da so vsa hranila spodbudila delovanje glive Pm2. Gliva je razkrojila 9,1% neomočenih vzorcev in kar 14,2% vzorcev, ki smo jih omočili v CSL in glukozo (preglednica 5). Kot smo že omenili, sta glivi Pv2 in Yf2 razkrojili bistveno manj kontrolnih vzorcev. Na glivo Pv2 je dodatek CSL in glukoze vplival pozitivno, po drugi strani pa je samo CSL vplival negativno. Negativen vpliv CSL-ja smo opazili tudi pri vzorcih izpostavljenih Yf2. Očitno omakanje vzorcev v raztopine z visokimi vsebnostmi dušika vpliva negativno. Glive so v naravi navajene razkrajati les, ki vsebuje malo dušika.

Preglednica 5: Vpliv hranil na izgubo mase pri smrekovih vzorcih izpostavljenih lesnim glivam za štiri tedne

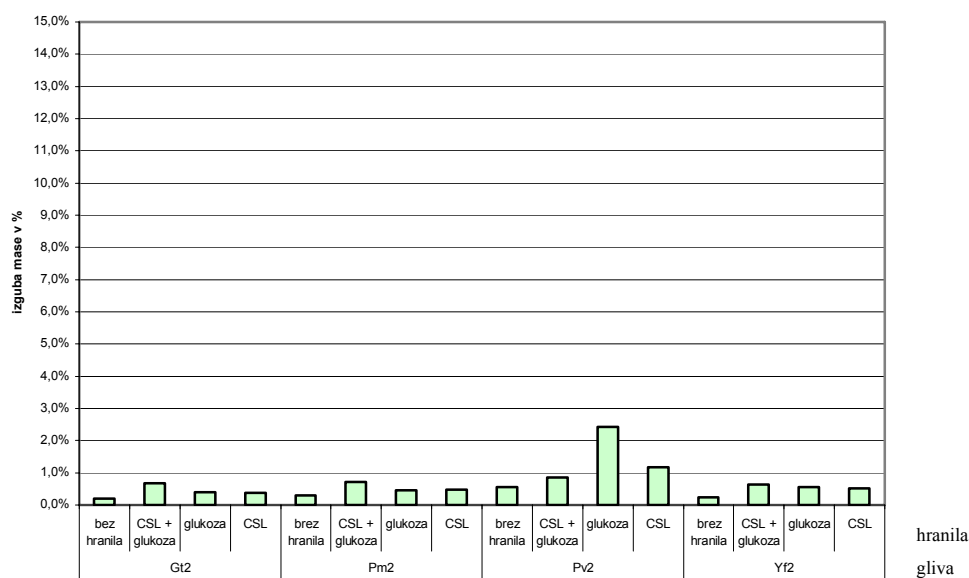
Gliva	Hranilo	Izguba mase	
		kontrolni v.	Impregnirani v.
Gt2	brez hranila	10.1%	0.2%
	CSL + glukoza	1.7%	0.7%
	glukoza	11.1%	0.4%
	CSL	1.1%	0.4%
Pm2	brez hranila	9.1%	0.3%
	CSL + glukoza	14.2%	0.7%
	glukoza	11.7%	0.5%
	CSL	12.5%	0.5%
Pv2	brez hranila	4.2%	0.6%
	CSL + glukoza	6.7%	0.9%
	glukoza	4.5%	2.4%
	CSL	3.4%	1.2%
Yf2	brez hranila	2.6%	0.2%
	CSL + glukoza	3.1%	0.6%
	glukoza	3.6%	0.6%
	CSL	1.9%	0.5%

Povprečna izguba mase impregniranih vzorcev znaša slabih 0,7%. To je zanemarljivo v primerjavi s kontrolnimi vzorci, kjer je povprečna izguba mase znašala 6,3%.



Slika 11: Vpliv hranil na izgubo mase pri kontrolnih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne

Opozoriti pa velja na razliko med tolerantnima in na baker občutljivima sevoma, saj tolerantna Pv2 in Yf2 povzročita kar 47% večje masne izgube kot netolerantna Gt2 in Pm2. Največji doprinos temu ima predvsem gliva *Antrodia vaillantii*, ki je najbolj razkrojila impregnirane vzorce omočene v CSL ali glukozo (preglednica 5). Ostale glive impregniranih vzorcev skoraj ne razkrajajo, ne glede na to ali smo jim dodali hranila ali ne. Izguba mase je bila v vseh primerih nižja od 1%. Edino vzorci omočeni v CSL (1,2%) ali glukozo (2,4%) in izpostavljeni glivi Pv2 so izgubili več (Slika 12).



Slika 12: Vpliv hranil na izgubo mase pri zaščitenih vzorcih izpostavljenih delovanju gliv za štiri tedne

5 SKLEPI

5.1 SKLEPI

Iz raziskav diplomske naloge lahko povzamemo naslednje zaključke :

- Netolerantni sevi gliv rjave trohnobe hitreje prerastejo nezaščitene lesne vzorce kot tolerantni
- Tolerantni sevi bolj razkrojijo s pripravki CCB zaščitene les kot na baker občutljivi sevi
- Vse testirane glive so bolj rasle na izpiranih kot neizpiranih vzorcih
- Hranila (glukoza, koruzna omakalna vodica (CSL) in CSL+glukoza) izboljšajo glivno aktivnost, vendar ne v tolikšni meri kot smo predvidevali
- Na rast micelija tolerantnih sevov gliv rjave trohnobe najugodnejše vpliva glukoza
- Koruzna omakalna vodica (CSL) negativno vpliva na delovanje glive *G. trabeum*. Verjetno smo s CSL v les vnesli preveč dušika, kar je negativno vplivalo na rast te lesne glive.
- Menimo, da je optimalni čas izpostavitve z bakrovimi pripravki zaščitene lesa med štiri in šest tedni. V tem obdobju tolerantni izolati bistveno še ne zmanjšajo lesne mase.
- Uporaba koruzne omakalne vodice v biotehnoloških procesih razstrupljanja odsluženega zaščitene lesa se ni izkazala. Večji učinek je imela glukoza, ki pa je kot vir hranil za glive predraga.

6 POVZETEK

Številni strokovnjaki opozarjajo, da postaja odpadni zaščiten les vse večji problem. Nujno potrebno je najti okoljsko sprejemljiv način za reševanje te problematike. Uporaba gliv tolerantnih na baker, za razstrupljanje odpadnega lesa zaščitenega s CCA in CCB pripravki nakazuje zelo obetajoče možnosti. Namen raziskav je bil osvetliti kako dodajanje hranil (CSL, glukoza, CSL+glukoza) vpliva na rast lesnih gliv.

Vzorci dimenzij (1,5 × 2,5 × 5,0) cm smo izdelali iz beljave smrekovine (*Picea abies*). Polovico vzorcev smo impregnirali s CCB, drugo polovico pa pustili za kontrolne vzorce. Eksperiment smo izvedli v dveh delih. Najprej smo ugotavljali vpliv časa izpostavitve na produkcijo CO₂ in izgubo mase, v drugem delu pa smo kontrolne in zaščitene vzorce omočili v hranila in preučili vpliv teh hranil na produkcijo CO₂ in izgubo mase.

Izkazalo se je, da na kontrolnih vzorcih bolj uspevata netolerantna glivna izolata *Gloeophyllum trabeum* in *Poria monticola*, medtem ko na impregniranih vzorcih večjo količino CO₂ in izgubo mase pridelata tolerantna seva gliv rjave trohnobe *Antrodia vaillantii* in *Leucogyrophana pinastri*.

V drugem delu eksperimenta pa smo prišli do spoznanja, da hranila močno vplivajo na intenzivnost trohnenja. Na baker občutljiva glivna izolata najugodnejše vpliva kombinacija hranil koruzne omakalne vodice in glukoze, najslabše pa preraščata na neomočenih vzorcih. Tolerantna izolata pa sta najintenzivneje razkrajala vzorce, ki smo jih obogatili z glukozo, najslabše pa vzorce brez hranil.

7 VIRI

- Andoljšek U. 2004. Prodiranje hif v vzorce lesa zaščitene s CCB pripravki. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 38 str.
- Backa S., Jansbo K., Reitberger T. 1997. Detection of Hydroxyl Radicals by a Chemiluminescence Method - A Critical Review. *Holzforschung*, 51,6: 557-564
- Bokan M. 2004. Razstrupljanje lesa, zaščenega s sredstvi na osnovi bakra in kroma z lesnimi glivami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 67 str.
- Clausen C.A., Smith R.L. 1998. Removal of CCA from treated wood by oxalic acid extraction, steam explosion, and bacterial fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*, 20: 251-257
- Cole FA, Clausen CA. 1996. Bacterial Biodegradation of CCA-treated waste wood. The use of recycled wood and paper in building applications. *Proceedings*, 7286: 201-204
- Collet O. 1992. Comparative tolerance of the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* (DC.:Fr.) Ryv. isolates to copper. *Holzforschung*, 46, 4: 293-298
- Cowling E.B., Brown W. 1969. Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis. *Advance chemical series*, 95, 3: 152-187
- Da Costa E.W.B. 1959. Abnormal resistance of *Poria vaillantii* (D.C. ex Fr.) Cke. strains to copper-chrome-arsenate wood preservatives. *Nature*, 183, 7: 910-911
- Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. Wood - decay, pests and protection. London, Chapman and Hall: 250 str.
- Espejo E., Agosin E. 1991. Production and degradation of oxalic acid by brown-rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1980-1986
- Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 64, 2: 25-6
- Hirt R.R. 1949. An isolate of *Poria xantha* on media containing copper. *Phytopathologist*, 39, 1: 31-36

- Humar M., Pohleven F., 2000. Značilnosti razkroja lesa z rjavo trohnobo = Characteristics of wood decaying with brown rot fungi. *Les*, 52, 7/8: 229-234.
- Humar M., Petrič M., Pohleven F. 2001. Changes of pH of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *Holz als Roh – und Werkstoff*, 59, 288-293
- Humar M., Petrič M., Pohleven F., Šentjurs M., Kalan P. 2002. Changes of copper EPR spectra during exposure to wood rotting fungi. *Holzforschung*, 56: 229-238
- Humar M., Pohleven F. 2003. Razstrupljanje odpadnega s CCA in CCB pripravki zaščitenega lesa z lesnimi glivami. *Les*, 55, 4: 48–53
- Jarosz-Wilkolazka A., Gadd G.M. 2003. Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere*, 52, 541-547
- Jellison J., Connolly J., Goodell B., Doyle B., Illman B., Fekete F., Ostrfsky A. 1997. The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39, 3: 165-179
- Kervina–Hamović Lj. 1990. Zaščita lesa. Ljubljana, BF – Oddelek za lesarstvo: 126 str.
- Leithoff H., Peek R-D. 1998. Biological detoxification processes. IRG/WP 98-50120: 13 str.
- Pohleven F., Breznikar Š., Kalan P., Petrič M. 1999. Determination of absorption, accumulation and transport of copper in mycelium of some wood decay fungi. The International Research Group on Wood Preservation; IRG/WP 99–10323: 9str.
- Pohleven F., Humar M., Amartey S., Benedik J. 2002. Tolerance of wood decay fungi To commercial copper based wood preservatives. IRG/WP 02–30291: 12 str.
- Pohleven F., Malnarič A., Humar M., Tavzes Č. 2001. Copper Tolerance of various *Antrodia vaillantii* isolates. The International Research Group on Wood preservation; IRG/WP 01–10406; 8
- Pohleven, F., Petrič, M., 1992. Ekološke perspektive zaščite lesa pred škodljivci. *Nova proizvodnja*, 43, 3: 94-98.

- Rayner A.D.M., Boddy L. 1995. Fungal Decomposition of Wood. Its Biology And Ecology. New York, John Wiley & Sons: 587 str.
- 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.
- Ribeiro A.B., Mateus E.P., Ottosen L.M., Bech-Nielsen G. 2000. Electrodialytic removal of Cu, Cr, and as from chromated copper arsenate treated timber waste. Environmental science and technology, 34: 784-788
- Rodney C., De Groot R., Woodward B. 1998 *Wolfiporia cocos* – A potential agent for Composting or bioprocessing Douglas-fir wood treated with copper-based preservative. Material und Organismen, 32, 4:195-215
- Schmidt C.J., Whitten B.K., Nicholas D.D. 1981. A proposed role of oxalic acid in nonenzymatic wood decay by brown-rot fungi. Proceedings American Wood Preservation Association, 77: 157–164.
- Shimada M., Akamatsu Y., Ohta A., Takahashi M. 1991. Biochemical relationships Between biodegradation of cellulose and formation of oxalic acid in brown-rot wood decay. The International Research Group on Wood Preservation; IRG/WP 1472: 12 str.
- Shortle W.C.1990. Ionization of wood during previsual stages of wood decay. Biodeterioration research, 3: 333-348
- SIST EN 113. 1989. Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying *Basidiomycetes* cultured an agar medium. 14 str.
- SIST EN 84. 1994. Wood preservatives; Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing–Leaching procedure. 16 str.
- Stephan I., Peek R.D. 1992. Biological detoxification of wood treated with salt Preservatives. The international research group for wood preservation, IRG/WP 3717–92: 12 str.
- Stephan I., Peek R.D., Nimz H. 1996. Detoxification of Salt impregnated wood by organic acids in a pulping process. Holzforschung, 50: 183-187
- Sutter H.P., Jones E.B.g., Walchli O. 1983. The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.) Fr. Material und Organismen, 18, 6: 241–262

- Takao S. 1965. Organic acid production by *Basidiomycetes*. Applied microbiology, 13, 5: 732-737
- Tavzes Č. 2003. Proučevanje encimatskih in neencimatskih procesov razgradnje lesa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 169 str.
- Tsunoda K., Nagashima K., Takahashi M. 1997. High tolerance of wood-destroying brown-rot fungi to copper-based fungicides. Material und Organismen, 31, 1: 31-44
- Zabel R.A., Morell J.J. 1992. Wood Microbiology, Decay and its Prevention. San Diego, Academic press Inc.: 476 str.
- Woodward B., De Groot R. 1999. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolated to copper in agar media. Forest Products Journal, 49, 3: 87-94
- Wilajtner H. 2001: Current national approaches to defining retentions in use. COST E22 Environmental optimization of wood protection. Brussels
- Yang V.W., Illman B.L. 1999. Optimum growth conditions for the metal-tolerant wood decay fungus, *Meruliporia incrassata* Tffh 294. IRG/WP, Document 99-50142: 8 str

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Miha Humarju, recenzentu prof. dr. Francu Pohlevnu in vsem ostalim, ki so mi na kakršenkoli način pomagali pri študiju. Še posebej se zahvaljujem staršem in fantu za potrpežljivost in prijateljici Martini Senčar za pomoč pri računalniški dodelavi diplomskega dela.

POPRAVKI