

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Jernej MERKAČ

**DOLOČANJE VSEBNOSTI BAKRA V HRANILNEM MEDIJU IN
MICELIJU LESNIH GLIV Z EPR SPEKTROSKOPIO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COPPER DETERMINATION IN NUTRITIVE MEDIUM AND
MYCELIUM OF WOOD DECAY FUNGI WITH EPR SPECTROSCOPY**

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 smo pripravili kulture gliv in vzorce raztopin. Vzorce za EPR spektroskopijo in meritve smo izvajali v EPR centru na Odseku za fiziko trdne snovi na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Po odločitvi senata Oddelka za lesarstvo je bil za mentorja imenovan prof. dr. Franc Pohleven.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jernej Merkač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 630*844.41
KG baker/bakrov(II) sulfat/glive/EPR spektroskopija/*Trametes versicolor/Poria monticola/Antrodia vaillantii/Poria placenta*
AV MERKAČ, Jernej
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 DOLOČANJE VSEBNOSTI BAKRA V HRANILNEM MEDIJU IN MICELIJU LESNIH GLIV Z EPR SPEKTROSKOPIO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 61 str., 12 pregl. 19 sl., 5 pril., 49 ref.
IJ sl
JI sl/en
AI Zaščita lesa s kemičnimi sredstvi na osnovi bakra spada med najstarejše postopke zaščite lesa. V določenih predelih zahodne Evrope so sredi 90-tih let 20-ega stoletja začeli ugotavljati slabšo odpornost drogov zaščitenih s CCB solmi na določene vrste gliv, predvsem tistih iz rodu *Poria*. Ugotavljali smo, ali je mogoče z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) zaznati prisotnost bakra v vodnih raztopinah bakrovega(II) sulfata in bakrovega(I) klorida ter prisotnost bakra v hraničnem mediju in miceliju gliv skozi časovno obdobje 10-ih tednov. Na osnovi analiz smo ugotovili, da je EPR spektrometrija primerna za zaznavanje bakrovega sulfata v vodni raztopini, saj nastopa v obliki Cu(II), med tem ko bakrovega klorida, zaradi Cu(I), nismo mogli zaznati. Gojišče (PDA), v katerega smo dodali raztopino bakrovega sulfata, ni vplivalo na paramagnetne lastnosti bakrovega sulfata. Določili smo primerno koncentracijo bakrovega sulfata v gojišču (1×10^{-3} mol/L). Pri tej koncentraciji micelij uspešno prerašča podlago, baker pa tudi še zaznamo z EPR spektrometrom. Rezultati tedenskih meritev pri glivi *Poria placenta* kažejo na kemične spremembe bakra v miceliju, pod micelijem in v podlagi. Sklepamo, da prihaja do odlaganja bakrovih spojin na micelij oz. hifin ovoj, kjer prihaja do agregacije bakra. Spremembe se kažejo tudi pri *Trametes versicolor*. V miceliju lahko baker v prvih 6-ih tednih komaj zaznamo. V 7-mem tednu se pokaže zelo močan in spremenjen signal, ki priča o kemijski spremembi bakra in kaže na absorpcijo in spremembo bakra preko micelija v podlago. Pri glivi *Poria monticola* in obeh sevih glive *Antrodia vaillantii* nismo opazili bistvenih sprememb bakra. Domnevamo, da so glive spremenile baker v obliko, ki je z EPR-om ne moremo zaznati.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 630*844.41
CX copper/copper(II) sulfate/fungi/EPR spectroscopy/*Trametes versicolor/Poria monticola/Antrodia vaillantii/Poria placenta*
AU MERKAČ, Jernej
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)/HUMAR, Miha (reviewer)
PP SI-1000, Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology
PY 2007
TI COPPER DETERMINATION IN NUTRITIVE MEDIUM AND MYCELIUM OF WOOD DECAY FUNGI WITH EPR SPECTROSCOPY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 61 p., 12 tab., 19 fig., 5 ann., 49 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Wood preservation based on copper is one of the oldest wood protecting methods. In some parts of Western Europe, lower resistance of poles treated with CCB salts to certain fungi (order *Poria*) was discovered in the mid nineties of the past century. The main issue of the research was testing if EPR spectroscopy can be used for copper(II) sulfate and copper(I) chloride detection in aquatic solutions, and if changes and absorption of copper can be detected in fungus mycelium and PDA nutrient medium over a period of 10 weeks. EPR spectroscopy was discovered to be a suitable method for copper sulfate detecting in aquatic solutions because copper is in paramagnetic active Cu(II) form. On the other hand, copper chloride is in Cu(I) form, and has no paramagnetic centers. PDA nutrient medium, with added copper sulfate, did not affect copper sulfate paramagnetic characteristics. Suitable concentration of copper sulfate in PDA nutrient medium (1×10^3 mol/L) was determined. At this concentration mycelium still successfully overgrows the PDA medium and copper can be detected in both (mycelium and PDA nutrient medium). The result of weekly measurements indicates chemical changes of copper in mycelium, PDA medium close to mycelium and deeper in PDA medium at fungus *Poria placenta*. It was concluded that copper compounds were deposited and aggregated on hypha cover in mycelium. There were some changes at *Trametes versicolor* as well. Copper almost could not be detected in the mycelium for the first 6 weeks, then a strong and different signal was detected in the 7th week. Evidently, fungus can change copper's chemical form and absorb it through mycelium into a PDA nutrition medium. Substantial changes of copper in *Poria monticola* and both isolates of *Antrodia vaillantii* could not be detected with EPR spectroscopy. It is assumed that those fungi have changed copper into a form that cannot be detected with EPR spectroscopy.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key Words Documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli.....	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 VZROKI RAZKROJA LESA	2
2.1.1 Glive	2
2.1.2 Osnovne značilnosti gliv	3
2.1.2.1 Zgradba gliv	3
2.1.2.2 Celica gliv.....	4
2.1.2.3 Voda v hifah	5
2.1.3 Delitev lesnih gliv.....	6
2.1.3.1 Delitev glede na okolje pojava gliv:.....	6
2.1.3.2 Delitev gliv glede na spremembo barve okuženega lesa.....	8
2.1.4 Glive, ki smo jih uporabili pri poskusih	10
2.1.4.1 Pisana ploskocevka - <i>Trametes versicolor</i> .(L. ex Fr.) Pilat.....	10
2.1.4.2 Bele hišne gobe	11
2.2 VPLIV KOVIN NA GLIVE	12
2.2.1 Definicija in razvrstitev kovin	12
2.2.2 Fungicidno delovanje bakra	13
2.2.3 Odpornost in toleranca gliv na kovine.....	14
2.3 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA RESONANCA.....	17
2.3.1 EPR spektrometer.....	18
2.4 EPR SPEKTROSKOPIJA BAKROVIH PRIPRAVKOV IN Z NJIMI ZAŠČITENEGA LESA	20

3	MATERIAL IN METODE	22
3.1	MATERIAL	22
3.1.1	Aparature in instrumenti	22
3.1.2	Laboratorijski pripomočki.....	23
3.1.3	Potrošni material.....	23
3.1.4	Zaščita pri delu.....	23
3.1.5	Uporabljene kemikalije	24
3.1.6	Uporabljene glive	24
3.2	METODE.....	24
3.2.1	Priprava micelija za precepljanje.....	24
3.2.2	Priprava vodnih raztopin bakrovega sulfata in bakrovega klorida	25
3.2.3	Priprava PDA gojišča z dodanim bakrovim sulfatom in bakrovim kloridom.....	26
3.2.3.1	Priprava PDA gojišča	26
3.2.3.2	Priprava raztopin bakrovega sulfata in bakrovega klorida, ki jih bomo dodali v PDA gojišče	27
3.2.3.3	Priprava PDA gojišča z raztopinama bakrovega sulfata in bakrovega klorida ...	27
3.2.4	Meritve bakra v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida ter v PDA gojišču z EPR spektrometra	27
3.2.4.1	Izvedba merjenja in nastavitev pogojev merjenja	28
3.2.5	Določanje koncentracije bakrovega sulfata v PDA mediju	29
3.2.5.1	Priprava PDA gojišč z različnimi koncentracijami bakrovega sulfata	29
3.2.6	Meritve bakra v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida ter v PDA gojišču z EPR spektrometrom	30
3.2.6.1	Priprava PDA gojišč	30
3.2.6.2	Priprava vzorcev za merjenje z EPR spektrometrom	30
3.2.6.3	Priprava vzorcev micelija gliv za merjenje z EPR	31
3.2.7	Meritve bakra z EPR spektrometrom	32
3.2.8	Obdelava spektrov	32
4	REZULTATI	34
4.1	MERJENJE BAKRA V VODNIH RAZTOPINAH BAKROVEGA SULFATA IN BAKROVEGA KLORIDA Z EPR SPEKTROMETROM	34
4.2	VPLIV PDA GOJIŠČA NA PARAMAGNETNE CENTRE V BAKROVEM SULFATU	35
4.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE BAKROVEGA SULFATA V PDA PODLAGI ..	35
4.4	DOLOČANJE BAKRA Z EPR SPEKTROMETROM V MICELIJU GLIV	36

4.5	DOLOČANJE ABSORPCIJE IN ODDAJANJA BAKRA IZ MICELIJA GLIV.....	36
4.5.1	<i>Poria monticola</i> - bela hišna goba, ZIM L033	37
4.5.2	<i>Poria placenta</i> - bela hišna goba, ZIM L035.....	39
4.5.3	<i>Antrodia vaillantii</i> - bela hišna goba – izolat Pv, ZIM L036.....	42
4.5.4	<i>Antrodia vaillantii</i> - bela hišna goba izolat Pv2, ZIM L037.....	44
4.5.5	<i>Trametes versicolor</i> - pisana ploskocevka, ZIM L057	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA.....	51
5.2	SKLEPI	55
6	POVZETEK.....	57
7	VIRI	58
8	ZAHVALA	
9	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Vrednost EPR parametrov dveh vodnih raztopin bakrovega(II) sulfata z amoniakom ali z etanolaminom	20
Preglednica 2: Pogoji in nastavitev pri izvedbi meritev na EPR spektrometru Bruker ESP 300 E, ki so se pokazale kot optimalne in smo jih uporabljali pri nadaljnjih meritvah	28
Preglednica 3: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria monticola</i> v časovnem obdobju 10–ih tednov.	37
Preglednica 4: Sprememba hiper fine sklopitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria monticola</i> v časovnem obdobju 10–ih tednov.....	38
Preglednica 5: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria placenta</i> v časovnem obdobju 10–ih tednov.	40
Preglednica 6: Sprememba hiper fine sklopitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria placenta</i> v časovnem obdobju 10–ih tednov.....	41
Preglednica 7: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv v časovnem obdobju 10–ih tednov.	43
Preglednica 8: Sprememba hiper fine sklopitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv v časovnem obdobju 10–ih tednov.	44
Preglednica 9: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv2 v časovnem obdobju 10–ih tednov.	45
Preglednica 10: Sprememba hiper fine sklopitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv2 v časovnem obdobju 10–ih tednov.	46
Preglednica 11: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Trametes versicolor</i> v časovnem obdobju 10–ih tednov.	48
Preglednica 12: Sprememba hiper fine sklopitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Trametes versicolor</i> v časovnem obdobju 10 – ih tednov.	49

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: EPR spekter modrega prahu (bakrovega oksalata), nastalega na površini lesa impregniranega z bakrovim(II) sulfatom in nato naknadno prepojenega z raztopino oksalne kisline ($T = 293\text{ K}$) (Humar, 2002).....	17
Slika 2: Shema EPR spektrometra	19
Slika 3: Shema sestave vzorca za merjenje z EPR spektrometrom.....	28
Slika 4: Shematski prečni prerez petrijevke s preraščeno hranilno podlago	31
Slika 5: Priprava vzorca micelija v kapilari z lijam vratom	31
Slika 6: Merjenje hiper fine skloplitvene konstante a_0 in spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0	33
Slika 7: Spekter vodne raztopine bakrovega sulfata posnet z EPR spektrometrom.....	34
Slika 8: EPR spektri PDA hranilnega brez Cu, micelija ki je rasel na podlagi brez Cu ter spekter hranilnega medija s koncentracijo $1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ bakrovega sulfata. 35	35
Slika 9: Spekter bakrovega sulfata v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> po enem tednu preraščanja hranilne podlage s koncentracijo $1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ bakrovega sulfata. 36	36
Slika 10: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria monticola</i> v časovnem obdobju 10-ih tednov.	38
Slika 11: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria monticola</i> v časovnem obdobju 10-ih tednov. 39	39
Slika 12: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria placenta</i> v časovnem obdobju 10 - ih tednov.....	41
Slika 13: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Poria placenta</i> v časovnem obdobju 10-ih tednov . 42	42
Slika 14: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv v časovnem obdobju 10-ih tednov.....	43
Slika 15: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv v časovnem obdobju 10-ih tednov.	44
Slika 16: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv2 v časovnem obdobju 10-ih tednov.....	46
Slika 17: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Antrodia vaillantii</i> sev Pv2 v časovnem obdobju 10-ih tednov.	47
Slika 18: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Trametes versicolor</i> v časovnem obdobju 10-ih tednov.	49
Slika 19: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive <i>Trametes versicolor</i> v časovnem obdobju 10-ih tednov.	50

SEZNAM PRILOG

- Priloga 1 *Pori monticola* (pm), EPR spektri micelija, pod micelijem in podlage
- Priloga 2 *Pori placenta* (pp2), EPR spektri micelija, pod micelijem in podlage
- Priloga 3 *Antrodia vaillantii* (pv), EPR spektri micelija, pod micelijem in podlage
- Priloga 4 *Antrodia vaillantii* (pv2), EPR spektri micelija, pod micelijem in podlage
- Priloga 5 *Trametes versicolor* (tv5), EPR spektri micelija, pod micelijem in podlage

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Pm	gliva <i>Poria monticola</i> Murr., bela hišna goba,	ZIM L033
Pp2	gliva <i>Poria placenta</i> , bela hišna goba,	ZIM L035
Pv	gliva <i>Antrodia vaillantii</i> (DC. Fr.) Ryv., bela hišna goba,	ZIM L036
Pv2	gliva <i>Antrodia vaillantii</i> ((DC. Fr.) Ryv., bela hišna goba,	ZIM L037
Tv5	gliva <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.), pisana ploskocevka,	ZIM L057

1 UVOD

Zaščita lesa s kemičnimi sredstvi na osnovi spojin bakra spada med najstarejše postopke zaščite lesa predvsem zaradi zaviralnih učinkov na razvoj in rast gliv. Baker je v majhnih količinah potreben za rast gliv, saj deluje kot aktivator mnogih encimov in sodeluje pri sintezi proteinov. Višje koncentracije bakra so za glive toksične, zato kot aktivno komponento v mnogih fungicidih uporabljajo bakrove spojine.

Nekatere glive reagirajo na prisotnost bakra tako, da spremenijo pH rastne podlage. V glavnem je za vse preučevane glive značilno, da zaviralni učinek bakrovih spojin narašča s padanjem vrednosti pH lesa, kar vpliva tudi na izpirljivost. Prav tako je absorpcija bakra iz raztopine impregnacijskega sredstva na komponente lesa v veliki meri odvisna od pH vrednosti.

V določenih predelih zahodne Evrope so sredi devetdesetih let dvajsetega stoletja začeli ugotavljati slabšo odpornost drogov zaščitenih s CCB solmi na določene vrste gliv - predvsem belih hišnih gob iz rodu *Poria* (Schmidt, 1994).

Na žalost ta pojav ne spada le med zanimivosti, ampak povzroča tudi večjo gospodarsko škodo. Dogaja se, da drogovi zaščiteni s CCB solmi v stiku z zemljo strohnijo že v petnajstih letih, kar je za tovrstne izdelke občutno prehitro. Pri tem se poraja še nekaj vprašanj: zakaj se to dogaja le na določenih delih Evrope in ali so mogoče na teh območjih glive iz rodu *Poria* in še katere druge razvile sposobnost učinkovitejšega razstrupljanja bakra v zaščitenem lesu.

Tovrstna vprašanja so za pričujočo diplomsko nalogo občutno preširoka. Koncentrirali se bomo predvsem na osnovne raziskave – absorpcijo bakra. V prvem delu naloge na detekcijo dveh bakrovih spojin z EPR spektrometrom. V drugem bomo z isto metodo spremljali spremembe koncentracije bakra v miceliju in gojišču v času rasti in preraščanja hranične podlage.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VZROKI RAZKROJA LESA

Razgradnja lesa je naravni pojav. K temu, poleg žive narave, najbolj prispevajo fizikalni in kemični procesi v okolju kot so ogenj, vremenski vplivi (UV svetloba, temperaturne spremembe, vlaga, kisik v ozračju, mehanske sile, kemikalije...). Les je organski material in v svojih osnovnih kemičnih gradnikih predstavlja potencialno odličen vir hrane za živa bitja, kot so specializirane vrste bakterij, gliv in insektov. V našem podnebju so najpomembnejši razkrojevalci lesa nekatere vrste lesnih gliv.

2.1.1 Glive

Glove so obstajale na zemlji že veliko pred človekom in nas spremljajo na vsakem koraku. Najprej smo spoznali više razvite glove, ki tvorijo plodišča, imenovana gobe. Velik preskok v poznavanju glove se je zgodil v osemnajstem stoletju z odkritjem mikroskopa. Ta je omogočil vpogled v čisto nov svet, med drugi tudi v svet hif in trosov glove. Na začetku devetnajstega stoletja so že ugotovili, da neke glove, s kratko življenjsko dobo, povzročajo tudi rastlinske bolezni. Imenovali so jih mikroglove. Prav tako so spoznali, da mikroglove lahko okužijo tudi mrtev organski material.

Leta 1969 je Whittaker celične organizme razdelil na evkarionte in prokarionte. Evkarionte je razdelil na eno in večcelična živa bitja. Živali, rastline in glove so predstavniki večceličnih evkariontskih organizmov (Carlile in Watkinson, 1994). Glove lahko najdemo v vseh ekosistemih. Nahajajo se na kopnem, v vodi in v zraku (trosi). Po načinu prehranjevanja so paraziti na človeku, živalih in rastlinah, simbionti ter saprofiti (Eaton in Hale, 1993).

Z glivami se tudi danes zelo pogosto srečujemo v naravi in v industrijskih procesih. Prav tako kot je raznoliko njihovo delovanje, je raznolika tudi njihova morfološka zgradba, od preprostih enoceličnih kvasovk, do visoko razvitih prostotrosnic z že kar zapletenimi plodišči. Najpomembnejša vloga glove je: razgradnja organskega

materiala, sodelovanje pri oskrbi s hrano v simbiotskem odnosu z rastlinami in živalmi. Glive so pomembne pri industrijskem pridobivanju naslednjih ekonomsko pomembnih substanc: etanola, citronske in ocetne kisline, antibiotikov, polisaharidov, encimov in vitaminov (Gadd, 1993).

2.1.2 Osnovne značilnosti gliv

V klasični sistematiki so bile glive do začetka sedemdesetih let prejšnjega stoletja uvrščene v kraljestvo rastlin. Uvrščali so jih med nižje rastline. Vendar so po zgradbi in načinu metabolizma tako specifična živa bitja, da predstavljajo svoje kraljestvo. Od rastlin se razlikujejo po načinu prehrane, sestavi celične stene, imajo drugačen hormonski sistem in drugače reagirajo na svetlobo. (Cvetković, 1987).

Osnovne značilnosti kraljestva gliv bi lahko strnili v naslednjih točkah:

- v celičnih stenah imajo pretežno hitin in le nižje oblike gliv tudi celulozo,
- kot zaloge hrane imajo glikogen in ne škrob kot rastline,
- imajo heterotrofen način prehranjevanja (rastline avtotrofnega),
- presnavljajo lizotrofno. V podlago izločajo encime in ti razgradijo substrat v produkte, ki jih lahko glive vsrkajo,
- prehranjujejo se lahko na tri načine, kot paraziti, saprofiti ali simbionti.

2.1.2.1 Zgradba gliv

Glive so sestavljene iz dveh razločno ločenih delov:

- prehranjevalnega dela,
- razmnoževalnega dela.

Prehranjevalni del je sestavljen iz drobnih nitk ali hif, le te pa iz niza celic. Kljub temu, da so predeljene, med celicami poteka intenziven transport. Premer hif je pri posameznih vrstah gliv različen, nanj pa vplivajo še zunanji dejavniki. Najmanjši premer znašajo 3 - 4 µm, pri nekaterih glivah so pa opazili tudi debelejše od 30 µm (Carlile in Watkinson, 1994). Omeniti je potrebno, imajo hife terminalno rast, saj se celice delijo le v vršičku. Splet hif tvori micelij ali podgobje. Hife izločajo

ektoencime in z njimi razkrajajo substrat. Razgrajene produkte potem vsrkajo vase. Glavna naloga podgobja je razkroj lesa, črpanje vode in hrane ter širjenje na zdrav, neokužen substrat.

Ločimo glive s površinskim in notranjim podgobjem. Ko si podgobje zagotovi dovolj energije, začne tvoriti razmnoževalni del - plodišče ali karpofor.

Razmnoževalni del se razvije iz podgobja. Oblika, velikost in barva plodišč so zelo različna. Ločimo tudi eno in večletna trosišča. V trosovnicu nastanejo trosi, ki se ob dozoritvi odcepijo ter v glavnem sprostijo v ozračje in padejo na različne podlage. Trosi lesnih gliv morajo pasti na les in ga na ta način okužijo. Najpogosteje so naslednje oblike plodišč: klobuk, konzola, betičasto, gumbasto, pahljačasto, blazinasto, ploščato... les se okuži s trosi.

Za razvoj in obstoj gliv so zelo pomembni nekateri fizikalno kemični dejavniki, kot so: hrana, vlaga, temperatura, zrak, svetloba in pH. Vsi ti dejavniki v optimalnih pogojih vplivajo na intenzivno rast in razvoj gliv. Če eden izmed njih manjka, začne gliva hirati in kmalu tudi odmre. To spoznanje je pri naravnem zatiranju lesnih gliv zelo pomembno.

2.1.2.2 Celica gliv

Celica je osnovna gradbena in življenska enota vseh živih organizmov. Nekatere strukture v celici glive so podobne živalski, druge pa rastlinski celici. Celica je sestavljena iz dveh glavnih delov, iz celične stene z membrano in protoplazme.

Celična stena ima več nalog. Zgrajena je iz amorfnega matriksa in iz kompleksa mikrovlaken. Stena je iz več slojev različne sestave in gostote. Kemijsko gledano je celična stena zgrajena iz štirih glavnih sestavin: poliacetylglukozaminov, polisaharidov, proteinov in ostalega.

Poliacetilglukozaminom pripada hitin, polisaharidom pa celuloza. Glive, ki pripadajo skupinama *Ascomycotina* in *Basidiomycotina*, imajo v celičnih stenah večinoma hitin in glukan, nižje skupine (*Mastigomycotina*) pa celulozo. Vloga

celične stene je mehanska, celična membrana pa igra pomembno vlogo v fizioloških procesih absorpcije in ekskrecije (selektivni transport).

Protoplazma predstavlja večji del mase celice, sestavljene iz citoplazme in vakuole. V citoplazmi se nahajajo organeli kot so: jedro, ribosomi, endoplazmatični retikulum, mitohondriji, Golgijev aparat, vakuole... Osnovna funkcija mitohondrijev je celično dihanje, pri čemer se tvorijo energetsko bogate snovi. Število vakuol v protoplazmi je odvisno od vrste glive in starosti celice. S starostjo njihova velikost in število narašča. Poleg osmotske funkcije skrbijo še za akumulacijo rezervnih substanc. Velike rezerve polisaharidov (glikogen) se nahajajo tudi v citoplazmi. Jedro je največji celični organel. V jedru je večina dednih informacij. Preko jedra se usmerjajo vsa dogajanja v celici in odločno vpliva na njeno diferenciacijo.

2.1.2.3 Voda v hifah

Voda predstavlja največji delež glive: od 73,7 % pri bukovem ostrigarju (*Pleurotus ostreatus*) do 93,85 % pri *Amanita rubescens* (Hawker, 1950). V sporah je prisoten manjši delež vode kot v miceliju. Če hočejo glive rasti in si s tem povečevati volumen, morajo iz okolja črpati vodo s hrani. Zato morajo biti celične stene in plazmalema hife prepustne za vodo. To pomeni, da se voda iz hif lahko tudi izloča. Od razlike v vodnem potencialu v okolini pa je odvisno, ali voda potuje v celico ali iz celice. Popolna izguba vode pomeni izsušitev hife in odmrtje.

V miceliju se voda nahaja v dveh oblikah, kot vezana in kot prosta voda. Prosta voda med sušenjem izhlapi, vezana voda pa je kemično vezana na celično steno. Voda je nujno potrebna pri raznih procesih, njena količina pa je v največji meri odvisna od zunanjih dejavnikov. Voda je najboljše polarno topilo, ki služi kot transportno sredstvo za vodotopne molekule. Poleg tega se v vodnem miljeju odvija metabolizem. Pomembna je tudi za klitje trosov, saj prisotnost vode sproži mehanizem encimatskih procesov in vzklitje spore.

Pri nitastih glivah imamo linearo strukturo celic, skozi katere se pretaka voda. Hitrost pretoka zavisi od naslednjih dejavnikov: ozmotskega gradiента, viskoznosti

tekočine, oblike celice in gravitacije (če poteka transport vertikalno). Glice tvorijo linearno strukturo na dveh nivojih, na mikroskopskem (hife), nekatere vrste pa na makroskopskem nivoju tvorijo rizomorfe.

Glice, ki okužijo les, lahko prodrejo v lumne celic preko celične stene mehansko ali pa s procesom kemične razgradnje. Z ustreznimi encimi hidrolizirajo in oksidirajo sestavine celične stene. V začetnih fazah razkroja prehajajo hife glic iz celice v celico preko pikenj, prevajalnih elementov in parenhima. Kasneje pa si z razgradnjo celične stene same ustvarijo prehode (Eaton in Hale, 1993).

Za biokemijske procese razkroja lesa je značilno, da se le ti začnejo, ko se rast glic na lesu upočasni in preide v stacionarno fazo. Istočasno se porabi dušik in rastni pogoji postanejo limitirajoči za hife. Takrat vstopi micelij v sekundarno fazo metabolizma in začne se razgradnja lignina.

2.1.3 Delitev lesnih glic

Lesne glice lahko delimo na podlagi več kriterijev. Gledano z našega stališča se zdita najpomembnejši naslednji razdelitvi:

- glede na okolje pojava glic,
- glede na spremembo barve lesa.

2.1.3.1 Delitev glede na okolje pojava glic:

Glice na drevesih v gozdu

Te vrste glic okužijo stoeče drevo preko ranjenih vej ali korenin. V beljavi se ne pojavljajo, kar je preveč vlažna. Omejene so le na razkroj neživega dela drevesa. Prilagojene so na pomanjkanje zraka. V to skupino glic spadajo: rdeča koreninska trohnoba, borov plutač, jelov koreničnik, prava štorovka, kresilna goba...

Glice na posekanem lesu (v gozdu ali na skladišču)

Večina glic, ki se pojavljajo na lesnih skladiščih, je les okužila že v gozdu, le majhen delež lesa se okuži tudi na skladiščih. Prav zaradi tega je zelo važno

sprotno spravilo lesa iz gozda. Na skladišču pa se les največkrat okuži zaradi nepravilnega skladiščenja. Na skladiščih se najpogosteje pojavijo naslednje glive: sivo rjava tramovka, pisana in kosmata ploskocevka, dlakava in škrlatno rdeča slojevka. Ne smemo pa pozabiti na piravost in glive modrivke. Piravost je specifična oblika bele trohnobe in je rezultat hkratnega delovanja več gliv.

Glive na lesu v stiku z zemljo

Veliko je lesnih izdelkov, ki so trajno v stiku z zemljo. Takšen les se nenehno vlaži in suši, kar razvoju nekaterih gliv zelo ustreza. In prav zaradi tega vlaženja in sušenja pogosto razpoka. Preko razpok pa glive lažje vdrejo v les. Čeprav je večina lesa, ki je v stalnem stiku z zemljo, impregniranega, kemična zaščita s časom oslabi in les se prej ali slej okuži. Velikokrat pa tudi vgradimo že okužen les. Les, ki je v stiku z zemljo, se običajno okuži z naslednjimi glivami: pisano, kosmato in grbasto ploskocevko, hrastovo gobo, luskasto nazobčenko, sivo rjavo tramovko... V to skupino pa uvrščamo tudi skupino gliv, ki povzroča mehko trohnobo.

Glive na gradbenem in stavbnem lesu

V objekte vgrajen les je dnevno izpostavljen sušenju in vlaženju. Če je stavbni les nezaščiten, se na njem največkrat pojavljajo naslednje glive: hojeva tramovka, luskasta nazobčenka in hrastova labirintnica. Velikokrat je vzrok trohnenja nestrokovno ravnanje s stavbnim lesom.

Hišne gobe

Hišne gobe že od nekdaj ljudem povzročajo velike težave. Okužbe z njimi so pogoste, posledice pa katastrofalne. Vzrok za okužbo je več, vsi pa imajo skupni imenovalec - vlažen les. Vlažnega lahko že vgradimo, ali pa se navlaži zaradi zamakanja in vlage v tleh. Kadar gradimo, ne smemo pozabiti na preventivne konstrukcijske rešitve in kemijsko zaščito lesa. V stavbah so najpogosteje prisotne: siva hišna goba, bela hišna goba in kletna goba.

2.1.3.2 Delitev gliv glede na spremembo barve okuženega lesa

Rjava ali destruktivna trohnoba

Zaradi intenzivne razgradnje celuloze, les v prvih fazah razkroja postaja vedno temnejši. Nato razpoka in se v končni fazi zdrobi v rjav prah. Rjava trohnoba je pogostejša pri iglavcih kot listavcih. Od 105 raziskanih gob rjave trohnobe jih 61 okuži iglavce, 15 oboje in le 29 zgolj listavce. Najpogostejše povzročiteljice rjave trohnobe so hišne gobe, poleg njih pa še: navadna tramovka, hrastova labirintnica in brezova goba.

Glive rjave trohnobe spadajo med najpogostejše in najbolj uničevalne razkrojevalce lesa. V procesu razkroja močno poslabšajo mehanske lastnosti lesa, še posebej natezno trdnost. Razgrajujejo celulozo in hemicelulozo, med tem ko ostane lignin skoraj nerazkrojen. Strohneli les potemni, razpoka in razpade.

Pri depolimerizaciji celuloze zaradi delovanja gliv rjave trohnobe je najverjetneje vpletен neencimski oksidativni proces. Molekule encimov, kot so celulaze in peroksidaze, so prevelike, da bi lahko prodrlle v celično steno. Vanjo lahko prodrejo samo mnogo manjše molekule, kot so npr. hidroksilni radikali, ki jo zrahljajo in naredijo dostopno za encime. Za razlagu delovanja gliv rjave trohnobe je največkrat citiran Fentonov sistem, čeprav mnogih, s poskusi dobljenih rezultatov, ta teorija ne more pojasniti. Še vedno tudi ni znano, ali depolimerizacijo celuloze povzroči oksidacija ali je oksidacija rezultat naknadne depolimerizacijske modifikacije ali pa sta oksidacija in depolimerizacija združeni (Tavzes, 2003).

Za mehanizme razkroja lesa z glivami rjave trohnobe vse prevečkrat posplošeno interpretirajo podatke raziskav ene same vrste glive. Glive rjave trohnobe se med seboj zelo razlikujejo in mnoge splošno sprejete razlage niso zadostne za pojasnjevanje delovanja vseh gliv rjave trohnobe (Green III in Highley, 1997).

Bela ali korozivna trohnoba

V nasprotju z rjavo trohnobo postaja pri beli trohnobi les svetlejši, saj glive razkrajajo lignin in šele kasneje celulozo. V kasnejših fazah se les začne tudi vlaknasto cepiti. Zanimivo je, da navadna bela trohnoba prodira od znotraj navzven, tako da okužbe dolgo ne opazimo. V skupino gliv, ki povzročajo belo trohnobo spadajo: pisana, grbasta in kosmata ploskocevka, dlakava in škrlatno rdeča slojevka, pahljačica, ostrigar, štorovke... Te glive so pogosteje pri listavcih. Od 250 proučevanih gliv bele trohnobe listavce okuži 187 gliv, oboje 18 in samo 45 gliv le iglavce.

Glive bele trohnobe so sposobne razkrajati vse glavne komponente lesa – celulozo, hemiceluloze kot tudi lignin. Zaradi oksidativnega razkroja lignina, postane les na razkrojenih mestih svetlejši. Od tod tudi ime »bela trohnoba«. Poznamo dve vrsti bele trohnobe (Liese, 1970). Prvo imenujemo simultana, drugo pa selektivna. Pri simultanem razkroju glive hkrati razgrajujejo lignin, celulozo in hemiceluloze. Značilnost selektivnega tipa razkroja je, da v začetnih fazah razkroja glive najprej razkrojijo lignin in hemiceluloze (Liese, 1970; Eaton in Hale, 1993).

Za razkroj lignina do enostavnih organskih molekul je potrebno veliko število različnih ektoencimov. Najpomembnejši so: lignin peroksidaze, lakaza, in mangan peroksidaza. Nekatere glive izločajo vse te encime, druge le dva. Zelo malo gliv izloča le enega (Kirk in Shimada, 1985). Poleg navedenih encimov imajo v začetnih fazah razkroja lesa pomembno vlogo tudi nizkomolekularne substance. Molekule encimov so namreč prevelike, da bi lahko prodrle skozi lignucelulozni matriks (Kirk in Cullen, 1998). Nizko molekularne substance naj bi stimulirale nastanek prostih radikalov. Proces razkroja naj bi bil tudi v tem primeru zelo podoben razkroju s Fentonovo reakcijo, le da v reakcijo vstopa na mesto železa tudi baker. Vendar pa vsi vzroki za tako učinkoviti selektivno delignifikacijo lesa z glivami bele trohnobe še niso pojasnjeni (Messner in sod., 1997).

Modrenje lesa

modrivke povzročajo barvne spremembe v beljavi iglavcev in listavcev, najpogosteje v beljavi smreke, bora, topola, javorja in breze. Modrenje se pojavi na posekanem lesu ali na že močno oslabelem stoječem drevesu. Les se okuži le, če trosi padejo direktno na beljavo. Zanimivo je, da nekatere vrste lesnih insektov aktivno okužijo les z modrivkami. Hife gliv modrivk se po lesu širijo in hranijo le s parenhimskimi celicami. Znanih je okoli 400 vrst gliv modrivk. Modrivke se hranijo s topnimi snovmi (škrob, sladkorji), zato bistveno ne slabijo mehanskih lastnosti lesa. Pogosto pa s svojim delovanjem pripravijo les drugim glivam.

Plesni

Plesni se pojavljajo na različnih materialih, tudi na lesu. Na površini povzročajo intenzivna obarvanja različnih barv. Na srečo ta površinska obarvanja ne predstavljajo velike ekonomske škode in ne vplivajo na mehanske lastnosti lesa. Na končnih in umetniških izdelkih pa je škoda občutna ali celo neprecenljiva.

2.1.4 Glive, ki smo jih uporabili pri poskusih

Po podatkih, ki smo jih imeli, največ preglavic zaradi razkroja izdelkov iz kemično zaščitenega lesa, povzročajo nekatere glive oz. sevi gliv iz skupine belih hišnih gob, ki so razvile toleranco na bakrove pripravke (Schmidt, 1994). Bele hišne gobe so povzročiteljice rjave trohnobe, pri poskusih smo uporabili tri vrste oz. štiri različne seve. Za primerjavo smo uporabili še Pisano ploskocevko, saj je zelo pogosta uničevalka lesa na skladiščih in spada med povzročitelje bele trohnobe.

2.1.4.1 Pisana ploskocevka - *Trametes versicolor* .(L. ex Fr.) Pilat

Pisana ploskocevka sodi med najbolj razširjene saprofitske glive pri nas in po svetu. Zasledimo jo predvsem na listavcih (hrast, kostanj, bukev), redkeje se pojavlja na iglavcih. Je pogost spremljevalec lesa na lesnih skladiščih in le redko okuži stoječa drevesa, razen če so ta poškodovana. Najdemo jo tudi na štorih, jamskem lesu, pragovih, ograjah...

Trošnjaki pisane ploskocevke so različnih barv in oblik. Najpogostejši so konzolasti, enoletni, kožasti in le redko so debelejši od enega milimetra. Trošnjaki so koncentrični, v pasovih, obarvani od bele, rumene, do rjave, rdečkaste, nekateri so celo črni. Z zgornje strani so drobno dlakavi. Trosovica je bela ali rumenkasta z zelo majhnimi porami.

Optimalna temperatura za razvoj pisane ploskocevke je 30 °C. Gliva je zelo odporna proti dolgotrajni suši, saj lahko brez škode dalj časa prenaša visoke temperature. Pri temperaturi nad 38 °C se njena rast ustavi.

Pisana ploskocevka povzroča značilno belo vlknasto trohnobo listavcev saj razkraja lignin. Zlasti na bukovini povzroča hiter razkroj lesa in kmalu okuži celoto lesno maso. Začetek okužbe prepoznamo po belih pegah na lesu, v poznejših fazah pa postane les popolnoma bel in lahek. Pri našem poskusu je micelij na dan prerasel do 10 mm podlage (Benko in sod., 1987).

2.1.4.2 Bele hišne gobe

V poskusih smo uporabljali tri vrste belih hišnih gob, ki so si morfološko zelo podobne: *Poria monticola*, *Poria placenta* in *Antrodia vaillantii* (slednja se v literaturi pojavlja tudi pod imenom *Poria vaillantii*).

Bele hišne gobe so precej razširjene v Evropi. Pojavljajo se kot razkrojevalke lesa v stavbah in na lesu ki je v stiku z zemljo (hlodovina v gozdu). Najraje razkrajajo zelo vlažen les iglavcev, še posebno, če se na njem nabira vlaga v obliki kapljic.

Na okuženem lesu se na spodnji strani pojavi površinsko belo podgobje, ki ohrani barvo, tudi ko se goba postara. Podgobje glive se razširja kot ledene rože na oknih pozimi. Iz podgobja se razvijejo beli rizomorfi, ki so lahko zelo debeli (do 4 mm). Le ti ostanejo prožni, tudi ko goba odmre. Trošnjaki prirastejo na površino lesa kot debela blazinasta prevleka. Mladi so beli, ko pa se postarajo, postanejo slaminato rumeni do opečnato rdeči. Trosovica ima značilne kotaste cevčice nepravilnih oblik, velike do 5 mm. S prostim očesom so videti kot mnogokotne pore.

Optimalni pogoji za razvoj belih hišnih gob je 27 °C, vlažnost lesa 40 %. V laboratorijskih razmerah lahko micelij v petrijevkah preraste tudi do 12,5 mm podlage dnevno. Bele hišne gobe izredno dobro prenaša sušna obdobja. Še po petih letih suše so sposobne znova oživeti in nadaljevati z razkrajanjem lesa (Benko in sod., 1987).

Bele hišne gobe povzročajo rjavo destruktivno trohnobo. Okužen les zelo hitro izgublja upogibno trdnost. Zanimivo je, da se udarna žilavost močno zmanjša že takrat, ko komaj zaznamo izgubo mase lesa. Veliko škode povzročajo predvsem na tehničnem lesu (Benko in sod., 1987).

2.2 VPLIV KOVIN NA GLIVE

Odnos med kovinami in glivami je za rast gliv zelo pomemben, ker so bile nekatere kovine temelj večini fungicidnih sredstev za zaščito naravnih in umetnih materialov (Horsfall, 1956). Torej so bili tudi osnova sredstvom, ki se uporabljajo za zaščito lesa. Na začetku raziskav so v večini ocenjevali toksičnost kovin, pozneje pa so podrobnejše poskušali razjasniti biološke, genetske in fiziološke vzroke strupenosti (Ashida, 1965; Gadd, 1993). Zaradi naraščanja onesnaženosti naravnega okolja s težkimi kovinami, radionuklidi in nekovinami so bile takšne raziskave še posebej zanimive, ker marsikdaj le glive lahko uspevajo na tako onesnaženih področjih. Raziskave so se osredotočile v dve smeri. Ene so zajele užitne gobe in mikorizne glive na onesnaženih območjih, druge pa so se osredotočile na razstrupitev območij, ki so bila onesnažena s kovinami in radionuklidi.

2.2.1 Definicija in razvrstitev kovin

Kovinske elemente lahko razvrstimo po različnih kriterijih. Eden izmed možnih načinov je delitev kovinskih elementov na (Gadd, 1993):

- bistvene elemente za rast gliv: K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Co in Ni,
- nebistvene elemente za rast gliv: Rb, Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg in Pb.

Kovinski elementi na rast gliv vplivajo posredno in neposredno. Medtem ko je nekaj kovinskih elementov bistvenih za rast, ostali nimajo življenjskega pomena. Vendar pa vsi navedeni kovinski elementi reagirajo s celicami gliv in se vanje tudi odlagajo (Gadd, 1993). Večina kovin, bistvenih in nebistvenih za rast gliv, postane strupenih nad določeno koncentracijo. Ta koncentracija je odvisna od vrste glive, vrste kovine in vplivov okolja. Čeprav sta toksičnost in kopičenje največkrat povezani s kovinami, ki niso bistvene za rast gliv, ne smemo spregledati tudi bistvenih kovin. Toksičnost se pogosto doseže pri nižjih koncentracijah, kot pri nebistvenih kovinah. Dober primer za to je kalcij, ki je nujno potreben pri diferenciaciji celic, a v večjih koncentracijah povzroča nalaganje fosfatov na celične stene. Podoben primer je baker, ki je nujno potreben za rast, a že pri nekoliko višji koncentraciji postane toksičen (Carlile in Watkinson, 1994).

Kovine lahko delimo na toksične in netoksične za glice. Ta delitev je rahlo tvegana, saj na toksičnost vpliva toliko različnih faktorjev, da je stroga razmejitve zelo težka. Živi organizmi imajo na voljo določene mehanizme, ki potencialno toksične kovine spremeni v netoksične. Ta proces lahko poteka v povezavi z normalnim metabolizmom ali pa neodvisno od njega. Pri tem so vplivi okolja zelo pomembni. Problem predstavlja dejstvo, da ta delitev ne zajema nekovin, ki z glivami reagirajo kot kovine in so morebiti celo fungicidno aktivne.

Med kovinami imajo posebno mesto težke kovine. Ta skupina zajema 65 kovin. Večina težkih kovin je biološko aktivnih. Obstaja pa še skupina, ki jo sestavljajo kovine, na katere je vezana organska molekula z vsaj eno ogljikovo vezjo (organokovinske spojine). Tudi ta skupina reagira z glivami. Organokovinske spojine lahko delujejo fungicidno ali pa se pojavljajo kot metabolni produkt gliv (Gadd, 1993).

2.2.2 Fungicidno delovanje bakra

Baker je eden izmed sedmih esencialnih elementov, ki so v sledovih nujno potrebni za rast gliv in rastlin. Višje koncentracije bakra pa delujejo fungicidno (Gupta, 1979). Fungicidno delovanje bakrovih spojin je v primerjavi z delovanjem

organских fungicidov zelo nespecifično. Kljub dolgotrajni in množični uporabi bakrovih pripravkov v fungicidne namene, njihovo delovanje na glice še ni v celoti pojasnjeno (Richardson, 1997). Znano je, da mora biti aktivna bakrova komponenta za fungicidne namene raztopljena v vodnem okolju. Še neraztopljene bakrove spojine pa delujejo kot rezervoar, iz katerega se po potrebi sprošča baker v bioaktivni obliki.

Strupene kovine v celicah organizmov povzročijo hude poškodbe, ki so rezultat direktnih učinkov. Z oksidacijo funkcionalnih skupin blokirajo ali deaktivirajo delovanje encimov (Lukens, 1971), reagirajo z nekaterimi drugimi pomembnimi kovinami, tako da jih odstranijo ali nadomestijo iz mitohondrijev ter vakuol (Gadd, 1993) in negativno vplivajo na permeabilnost membrane celic (Hughes, 1999). Zaradi tako raznolikih interakcij med toksičnimi kovinami in živimi organizmi (tudi glivami), je lahko prizadeta prav vsaka stopnja rasti, diferenciacije in metabolizma. Stopnja okvare je odvisna od organizma, oblike bakrove spojine in njene koncentracije ter različnih fizikalno kemijskih vplivov. Tudi simptomi delovanja so zelo različni in odvisni od že navedenih dejavnikov. Pri večini zastrupitev se najprej poškodujejo celične membrane, skoznje zato lahko vdrejo snovi iz okolice, torej tudi ostali strupeni elementi (Cooney in sod., 1989).

Pri posrednem vplivu pa baker povzroči nastanek prostih radikalov, ki lahko sprožijo verižno reakcijo depolimerizacije organskih makromolekul. Ker prosti radikali nastajajo tudi pri normalnem metabolizmu, glice preprečijo depolimerizacijo s tvorbo zaščitnih encimov, ki so učinkoviti oksidanti. Ti encimi ponavadi vsebujejo naslednje kovine: Mn, Fe, Zn ali Cu (Greco in sod., 1990). Encimi so učinkoviti do določene koncentracije prostih radikalov, če je le teh preveč svoje funkcije ne zmorejo več uspešno opravljati.

2.2.3 Odpornost in toleranca gliv na kovine

Toleranco na neko škodljivo snov razumemo kot sposobnost organizma, da zaradi svojih specifičnih mehanizmov, s katerimi zmanjša toksičnost te snovi, npr. kovine,

zmore preživeti na močno kontaminiranem gojišču (Gadd, 1993). O razširjanju tolerantnih organizmov obstajata dve teoriji. Po prvi so tolerantni organizmi del naravnega okolja. Tudi poskusi vzgojitve tolerantnih sevov iz netolerantnih naj ne bi bili uspešni. Zvišane koncentracije bakra in ostalih težkih kovin v zemlji, kot posledica onesnaženja, navadno ne povzročijo nastanka tolerantnih organizmov. Vodijo pa do zmanjšanja raznolikosti, preživijo le najbolj odporni in se bolj širijo kot bi se sicer (Woodward in De Groot, 1999). Po drugi teoriji pa bi prisotnost pravšnje koncentracije bakra oziroma druge kovine v podlagi lahko povzročila razvoj tolerantnejših organizmov (Jellison in sod., 1997).

Toleranca posameznih vrst gliv na baker je že dolgo znana (Hirt, 1949; Zabel, 1954; Da Costa, 1959). Kljub temu pa je mehanizem tolerance še vedno nepojasnjen (Tsunoda in sod., 1997; Pohleven in sod., 1999). Toleranca gliv na baker močno varira tako med posameznimi vrstami kot med posameznimi izolati (Zabel, 1954; Da Costa, 1959).

Nizke koncentracije bakra v substratu pri nekaterih izolatih manj tolerantnih gliv bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*) lahko pospešijo njihovo rast, pri bolj tolerantnih glivah pa tega niso opazili (Collet, 1992). Woodward in de Groot (1999) priporočata, da toleranca posamezne vrste ali seva zavisi tudi od sestave pripravka, s katerim bomo les ščitili. Velik vpliv na strupenost bakra na glive ima tudi pH rastišča. Baker je za glive manj strupen pri kislih vrednostih podlage (pH 2), kot pri nevtralnih vrednostih (Starkey, 1973).

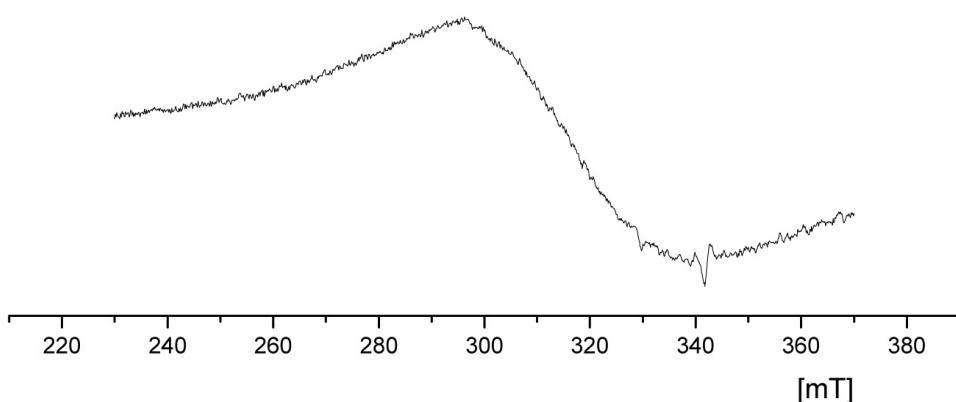
Načeloma so glive bele trohnobe manj tolerantne na zvišane koncentracije bakra kot glive rjave trohnobe (Tsunoda in sod., 1997). To dejstvo dobro sovpada s podatki o izločanju oksalne kisline, kar kaže na pomembno vlogo te kisline pri mehanizmu tolerance. Takao (1965) navaja, da glive bele trohnobe izločajo manj oksalne kisline kot glive rjave trohnobe. Največja toleranca je bila opažena pri povzročiteljicah rjave trohnobe iz rodov *Poria* in *Antrodia* in temu rodu sorodnih vrstah (Schmidt in sod., 1981).

Sutter in sodelavci (1983) so pokazali, da nekateri sevi bele hišne gobe deaktivirajo baker v lesu. Iz lesa so v treh do osmih tednih odstranile v povprečju 75 % celotnega barka. V eksperimentu s *Porio monticolo* na hranielnem gojišču pa Pohlevnu in sodelavcem (1999) transporta bakra ni uspelo dokazati. To nakazuje, da moramo biti pri interpretaciji rezultatov, s katerimi skušamo pojasniti toleranco, previdni, saj se gliva oziroma izolat odziva drugače, če raste na lesu kot na hranielnem gojišču (Sutter in sod., 1983). Gliva mora pri razkroju lesne mase uporabiti več zapletenih mehanizmov, za razliko od hranielnega gojišča, kjer zlahka pride do hranielnih snovi (glukoze). Na trdnem hranielnem gojišču (mediju) ji je brez depolimerizacije polioz dostopen sladkor. Pri preraščanju zaščitenega lesa so se glive izkazale kot manj tolerantne v primerjavi s hranielnim gojiščem z dodanim bakrom (Rodney in sod., 1998), saj imajo na umetni hranielnini podlagi boljše pogoje za rast, torej tudi večjo zmožnost, da kljubujejo strupenemu učinku bakra.

Med glivnim razkrojem zaščitenega lesa bakrovi ioni v lesu reagirajo z oksalno kislino in pri tem nastane v vodi netopen bakrov oksalat. Glive s transformacijo bakrovih aktivnih komponent v netopen bakrov oksalat povzročijo, da ta postane zanje neškodljiv (Sutter in sod., 1983; Richardson, 1997 Pohleven in sod., 1999). S poskusi so dokazali, da glive lahko uspevajo na podlagi, ki vsebuje velike količine bakrovega oksalata (Sutter in sod., 1983). Pri tolerantnih izolatih, ki so rasli preko kontrolnih vzorcev, so na hifah dokazali kalcijev oksalat. Zato lahko domnevamo, da je tvorba bakrovega oksalata v lesu, zaščitenem z bakrovimi pripravki, zelo podobna tvorbi kalcijevega oksalata v nezaščitenem lesu (Stephan in sod., 1996). Zakisanje lesa, zaščitenega s kromovimi in bakrovimi pripravki in izpostavljenega razkroju s tolerantnimi glivami, je v veliki meri odvisno od tolerantnosti uporabljenega seva. Izolati, ki so že v začetnih fazah razkroja uspešno zakisali les, so se izkazali za tolerantne, vendar se intenziteta zakisanja ni pokazala kot edini splošni pogoj za tolerantnost. Izločanje oksalne kisline je potreben, a ne zadosten pogoj (Stephan in sod., 1996).

S pretvorbo bakra v bakrov oksalat (slika 1) lahko pojasnimo pomemben del mehanizma tolerance gliv na baker, ne pa celovitega pojava. Določeno vlogo pri

tem igrata verjetno tudi absorpcija bakra v celice gliv (Pohleven in sod., 1999). Pri različnih sevih gliv so bili opaženi različni deleži bakra v celičnih protoplastih (Sutter in sod., 1983), precej bakra pa so našli tudi na hifah gliv v okolini z bakrovimi pripravki zaščitenega lesa (Tsunoda in sod., 1997).



Slika 1: EPR spekter modrega prahu (bakrovega oksalata), nastalega na površini lesa impregniranega z bakrovim(II) sulfatom in nato naknadno prepojenega z raztopino oksalne kisline ($T = 293\text{ K}$) (Humar, 2002).

Na tolerantnost gliv vpliva tudi prisotnost izvenceličnega sluzastega materiala (ECMM) oziroma tako imenovanega ščita (Vesentini in sod., 2004) ki ga izločajo različni organizmi, med drugim tudi glive, bakterije in alge ter ima precej raznovrstnih funkcij. Vesentinijeve raziskave (2004) radialne rasti nekaterih vrst lesnih gob z in brez ECMM kažejo, da le – ta dodatno ščiti hife pred strupenimi učinki bakra. Del bakrovih ionov se veže na polisaharide in komponente z manjšo molekulsko maso, ki sestavljajo ECMM in s tem zmanjšuje prehod bakrovih ionov v hife.

2.3 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA RESONANCA

Z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) lahko proučujemo snovi, katerih molekule vsebujejo enega ali več prostih nesparjenih elektronov, ki imajo magnetni moment. Ta del molekule imenujemo paramagnetni center, za molekulo pa pravimo, da je paramagnetna. V magnetnem polju prosti elektroni interagirajo s

tem poljem. Zaradi tega se njihovo osnovno energetsko stanje razcepi v več energijskih nivojev. Če tako snov, ki je v magnetnem polju, obsevamo z elektromagnetnim valovanjem, prehajajo elektroni iz enega energijskega nivoja na drugega. Resonančni pogoj je izpolnjen, ko je energija zunanjega magnetnega polja enaka energijski razliki med posameznimi energijskimi nivoji. Pri tem se energija absorbira, kar zaznamo z absorpcijskimi črtami v EPR spektru (Šentjurc in Štalec, 1976; Placket, 1987).

$$h \times \nu = g \times \beta \times B \quad \dots (1)$$

$g = (h \times \nu) / (\beta \times B)$ Spektroskopski cepitveni tenzor

β - Bohrov magneton, ki je konstanta za elektron

B - gostota magnetnega polja

h - Planckova konstanta

ν - frekvenca elektromagnetnega valovanja

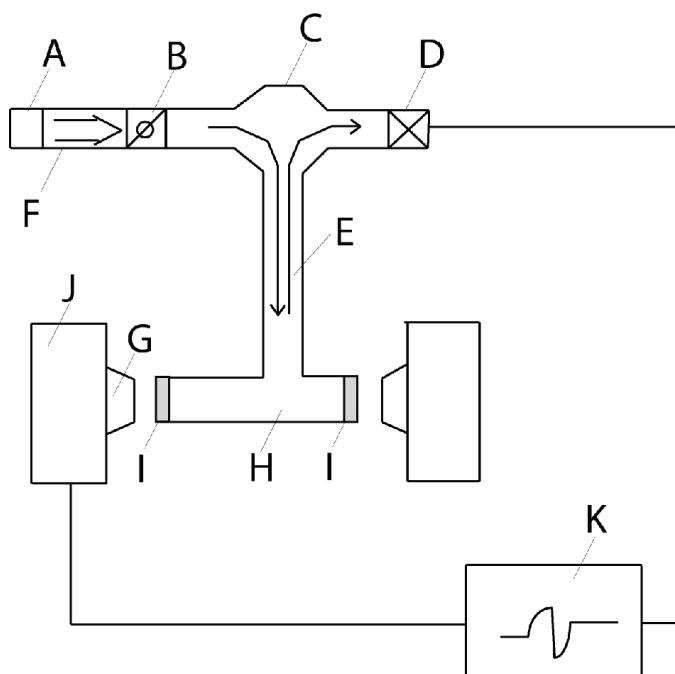
g - spektroskopski cepitveni tenzor

Spektroskopski cepitveni tenzor opisuje interakcijo med magnetnim momentom elektronov in zunanjim magnetnim poljem. Pri običajnih izvedbah EPR spektrometrov je resonančni pogoj izpolnjen, ko je frekvenca v območju mikrovalovnih frekvenc (velikostni razred 10 GHz). V mnogih paramagnetičnih centrih imajo jedra, okoli katerih krožijo prosti elektroni, svoj oziroma jedrski spin. Posledica tega je orbitalni magnetizem. Zaradi interakcije magnetnega momenta jedra se energijski nivoji elektronov še dodatno razcepijo, kar se pokaže s tako imenovanim tenzorjem hiperfine sklopite A. Tenzorja A in g sta odvisna od orientacije paramagnetičnih centrov glede na magnetno polje, njune glavne vrednosti pa so karakteristične za posamezno snov (Šentjurc in Štalec, 1976).

2.3.1 EPR spektrometer

Tipičen EPR spektrometer je shematsko prikazan na sliki 2. Vzorec je vstavljen v rezonator med dvema magnetoma, ki ustvarjata magnetno polje z določeno

gostoto. Gostota magnetnega polja se med meritvijo spreminja glede na razpon območja, v katerem meritev poteka. Resonator je povezan z izvornikom mikrovalov in detektorjem, ki sprejema signale iz resonatorja. Frekvenca mikrovalov je konstantna. Detektor pa sprejema signale iz resonatorja. Z atenuatorjem spremojamo moč mikrovalov v resonatorju. (Plackett in sod., 1987).



Slika 2: Shema EPR spektrometra

- A) izvornik mikrovalov
- B) ojačevalnik
- C) cirkulator
- D) kristalni detektor
- E) mikrovalovni vodnik
- F) izolator
- G) tuljave magnetnega polja
- H) rezonator
- I) modulacijske tuljave
- J) magnet
- K) izris EPR signala

Spekter, ki ga dobimo, predstavlja prvi odvod absorpcijske krivulje. To poveča občutljivost aparature in omogoča natančnejšo določitev gostote magnetnega polja, pri katerem se elektromagnetni valovi absorbirajo. Iz intenzitete absorpcijskih črt lahko določamo koncentracijo paramagnetičnih centrov v vzorcu (Šentjurc in Štalec, 1976).

2.4 EPR SPEKTROSKOPIJA BAKROVIH PRIPRAVKOV IN Z NJIMI ZAŠČITENEGA LESA

EPR spektroskopija ni uporabna le za preučevanje nezaščitenega lesa, temveč tudi za raziskave bakrovih biocidov in z njimi zaščitenega lesa.

Iz EPR spektrov raztopin bakrovih spojin, v kombinaciji z rezultati nekaterih drugih analitskih metod, lahko sklepamo kakšna je okolica bakra v raztopini. Zhang in Kamden (2000) predlagata, da je baker v vodni raztopini etanolamina koordiniran z dvema molekulama etanolamina. Na baker sta vezana dva dušikova in dva kisikova atoma. Baker raztopljen v amoniakalni raztopini pa naj bi bil obkrožen s štirimi molekulami amoniaka (Xie in sod., 1995). Zamenjava dveh vezi Cu-N v amoniakalnem pripravku z vezema Cu-O v etanolaminskem pripravku se kaže v spremembi vrednosti g_0 in a_0 (preglednica 1).

Preglednica 1: Vrednost EPR parametrov dveh vodnih raztopin bakrovega(II) sulfata z amoniakom ali z etanolaminom

Vodna raztopina	g_0	a_0	C_{Cu}	Vir
Cu / amoniak	2,2124	7,4 mT	2,2 mol/L	Pohleven in sod. 1994
Cu / etanolamin	2,107	8,6 mT	2,6 mol/L	Huges 1999

Pohleven in sodelavci (1994) so skušali ugotoviti, ali bakrov(II) oktanoat v raztopini amoniaka ostane v obliki Cu(II) oktanoata ali ta razpade in raztopina vsebuje tetraaminbakrove(II) ione ($Cu(NH_3)_4^{2+}$). Iz spektrov EPR raztopin, posnetih pri sobni temperaturi, niso mogli opaziti razlik, na spektrih raztopin posnetih pri nižjih temperaturah (130 K) pa so opazne bistvene razlike. Na podlagi teh dveh spektrov je torej mogoče domnevati, da je okolica Cu(II) v obeh raztopinah različna. To

dejstvo je pomembno, saj bi imel sistem bakrov(II) oktanoat – amoniak lahko drugačne fungicidne lastnosti kot tetraaminbakrovi(II) ioni (Pohleven in sod., 1994).

Metoda EPR se je doslej pri proučevanju z bakrovimi pripravki zaščitenega lesa uporabljala v številne namene: za študij reakcij bakrovih pripravkov z lesom oziroma z njegovimi komponentami (Placket in sod., 1987; Ajiboye in Brown, 1990; Pohleven in sod., 1994; Zhang in Kamdem, 2000), za preučevanje izpranega lesa (Hughes in sod., 1994), za opazovanje posledic UV obsevanja (Schmid in sod., 2000) ter za opazovanje sprememb na zaščitenem lesu zaradi delovanje gliv (Obadič, 1999), kakor tudi za raziskovanje interakcij bakrovih zaščitnih pripravkov z lesom in z lesnimi glivami (Humar, 2002).

Humar (2002) poroča, da na lesu impregniranem z vodno raztopino bakrovega sulfata in izpostavljenem delovanju glive *Antrodia vaillantii* z EPR spektrometrom bakra(II) že po dveh tednih niso mogli več zaznati. Z elementarno analizo pa je dokazal, da v vzorcih baker ostaja ter ga gliva ni translokirala iz lesa. Gliva je torej baker spremenila v tako obliko, ki je z EPR spektrometrom pri običajnih pogojih ni mogoče zaznati.

3 MATERIAL IN METODE

Diplomska naloga je sestavljena iz dveh delov.

V prvem delu smo ugotavljali:

- ali je s spektrometrom EPR mogoče zaznati baker v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida ter v gojišču iz krompirjevega glukoznega agarja (PDA) z dodatkom teh dveh kemikalij,
- kakšne koncentracije bakrovega sulfata in bakrovega klorida so primerne za pripravo PDA gojišča, da ne bo prevelikega zaviralnega učinka na rast gliv, hkrati pa bo koncentracija bakra v gojišču dovolj velika, da ga bomo lahko zaznali z EPR spektrometrom,
- ali je koncentracija bakra, ki ga bo navzel micelij gliv dovolj velika, da ga bomo lahko zaznali z EPR spektrometrom.

V drugem delu diplomske naloge nas je zanimalo:

- kako različne glive skozi daljše časovno obdobje sprejemajo baker in ali ga oddajajo,
- kako se spreminja vsebnost bakra globlje v PDA gojišču in tik pod micelijem glede na daljše časovno obdobje.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Aparature in instrumenti

- avtoklav Sutjeska
- laminarij Iskra IBK-1 V2
- rastna komora LTH, T = 25 +/- 1°C, RH = 70 %
- hladilnih LTH
- elektronska tehnicka Sartorius AC 210P
- EPR spektrometer BRUKER ESP – 300E
- digestorij
- Naprava za skeniranje HP Scanjet 2400

3.1.2 Laboratorijski pripomočki

- 10 mL čaša
- 100 mL čaša
- 100 mL merilna bučka z zamaškom
- 100 mL merilni valj
- 250 mm merilni valj
- 1000 mL merilni valj
- 2,5 L lonec
- 1 mL avtomatska pipeta
- spatula
- ladjica za zatehtanje
- 50 mL epruvete
- steklena palčka
- keramična terilnica
- špiritni gorilnik
- stojala za epruvete

3.1.3 Potrošni material

- aluminijasta folija
- ovojni papir
- laboratorijska PVC folija
- papirnate brisače
- steklene kapilare
- steklene kapilare z lijastim nastavkom

3.1.4 Zaščita pri delu

- laboratorijske rokavice
- zaščitna halja

3.1.5 Uporabljene kemikalije

- bakrov sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$)
- bakrov klorid ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
- destilirana voda
- alkohol za čiščenje
- krompirjev dekstrozni agar (PDA - Potato dextrose agar) v prahu

3.1.6 Uporabljene glice

- *Trametes versicolor* (L. ex Fr.), pisana ploskocevka, (Tv5), ZIM L057
- *Poria monticola* Murr., bela hišna goba, (Pm), ZIM L033
- *Antrodia vaillantii* (DC. ex Fr.) Sacc., bela hišna goba, (Pv), ZIM L036
- *Antrodia vaillantii* (DC. ex Fr.) Sacc., bela hišna goba, (Pv2), ZIM L037
- *Poria placenta*, bela hišna goba, (Pp2), ZIM L035

Vse glice so iz banke gliv na Katedri za patologijo in zaščito lesa, BF, Ljubljana (Raspor in sod., 1995)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava micelija za precepljanje

Najprej smo morali pripraviti in aktivirati osnovno kulturo micelija vseh petih gliv. Vse glice smo cepili iz zbirke oz. banke gliv Katedre za patologijo in zaščito lesa na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (Raspor in sod., 1995).

Za gojišče smo uporabili krompirjev glukozni agar (PDA) v prahu, ki smo pripravili po recepturi: 39 g PDA na liter vode

Za vsak sev smo pripravili tri epruvete z gojiščem. Po cepitvi smo jih temeljito zaprli, označili in postavili v rastno komoro, kjer so pri temperaturi 25°C ($+/- 1^{\circ}\text{C}$) in 70 % relativni zračni vlagi preraščale en teden.

Po enem tednu smo za vsak sev izbrali epruveto v kateri je micelij najbolje prerasel ter ga precepili v po tri petrijevke z 20 mL PDA substrata. Tako pripravljen micelij nam je služil za nadaljnje raziskave.

3.2.2 Priprava vodnih raztopin bakrovega sulfata in bakrovega klorida

Najprej smo morali ugotoviti ali sta vodni raztopini bakrovega sulfata in bakrovega klorida paramagnetno aktivni in da jih bomo lahko zaznali in merili z EPR spektrometrom.

Za vsako kemikalijo smo pripravili po dve vodni raztopini v koncentracijah:

- 1×10^{-3} mol/L
- 5×10^{-4} mol/L

Za vsako kemikalijo smo pripravili še vzorec vodne raztopine v PDA gojišču s koncentracijo:

- 1×10^{-3} mol/L

Vodne raztopine smo pripravili v steklenih 100 mL meritnih bučkah z zamaškom.

Za pripravo raztopin smo izračunali potrebno maso kemikalije po formuli:

Enačbe:

$$\begin{array}{ll} c = n/V & \text{Molarnost ali množinska koncentracija} \\ n = m/M & \text{Množina snovi} \\ c = m/(M \times V) \Rightarrow m = c \times M \times V & \dots(2) \end{array}$$

Legenda:

c = molarnost (mol/L)

n = množina snovi (mol)

M = molska masa (g/mol)

m = masa (g)

V = volumen (L)

Priprava raztopin:

Potrebno količino bakrovega sulfata oz. bakrovega klorida smo na tehtalni ladjici zatehtali na elektronski tehtnici in vsakega ločeno vsuli v svojo 100 mL meritno bučko. Dodali smo destilirano vodo do polovice bučke in jo stresali, tako da se je vsebina raztopila. Na to smo destilirano vodo dolili do označbe na vratu bučke, premešali in jo zaprli s steklenim zamaškom.

3.2.3 Priprava PDA gojišča z dodanim bakrovim sulfatom in bakrovim kloridom

Končna koncentracija posamezne kemikalije v PDA substratu je znašala 1×10^{-3} mol/L. Priprava gojišča je nekoliko zahtevnejša. V vsako petrijevko smo dodali 18 mL v avtoklavu steliriziranega PDA substrata in vanj, dokler je bil še tekoč, dodali 2 mL vodne raztopine bakrovega sulfata oz. bakrovega klorida. Pri tem smo morali še posebej paziti, da je bila koncentracija PDA in posamezne kemikalije prava (Enačba 3).

3.2.3.1 Priprava PDA gojišča

PDA gojišče smo pripravili z višjo koncentracijo, ki smo jo izračunali po formuli.

$$\gamma = m_2/V_r \quad \dots(3)$$

$$\gamma_1 = m_{21}/V_{r1}$$

$$\gamma_2 = m_{22}/V_{r2} ; \quad m_{21} = m_{22} ; \quad V_{r2} = 0,9 \times V_{r1}$$

$$\gamma_2 = m_{21}/(0,9 \times V_{r1})$$

Legenda:

γ = masna koncentracija (g/L)

m_2 = masa topljenca (g)

V_r = prostornina raztopine (L)

3.2.3.2 Priprava raztopin bakrovega sulfata in bakrovega klorida, ki jih bomo dodali v PDA gojišče

Predhodno smo pripravili raztopini bakrovega sulfata in bakrovega klorida v 10 krat višji koncentraciji, kot bo v gojišču. Raztopini nismo razkužili v avtoklavu. Povečan tlak in temperatura v avtoklavu bi lahko vplivala na kemijske in paramagnetne lastnosti obeh raztopin ter popačili rezultate.

Izračun količine vsake kemikalije za posamezno raztopino je potekal po Enačbi 3

Končna koncentracija v gojišču: 1×10^{-3} mol/L

Koncentracija raztopine: 1×10^{-2} mol/L

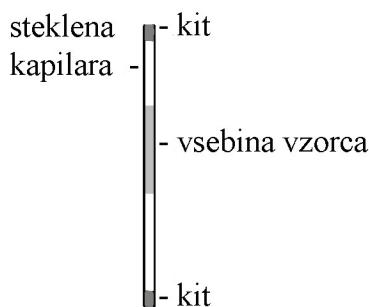
3.2.3.3 Priprava PDA gojišča z raztopinama bakrovega sulfata in bakrovega klorida

Epruvete s po 18 mL steriliziranega in še tekočega PDA gojišča smo vzeli iz avtoklava, prav tako tudi prazne petrijevke. V laminariju smo prelili PDA substrat v petrijevke in s pipeto dodali po 2 mL pripravljene vodne raztopine bakrovega sulfata oziroma bakrovega klorida. Petrijevke smo ustrezno označili.

3.2.4 Meritve bakra v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida ter v PDA gojišču z EPR spektrometra

Meritve smo izvajali v EPR centru na Inštitutu Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi v Ljubljani na EPR spektrometu Bruker ESP – 300 E.

Vse vzorce smo pripravili v steklenih kapilarah. Le-te so narejene iz kremenčevega stekla, ki so ga predhodno očistili paramagnetnih nečistoč. V kapilare različnih oblik lahko damo tekoče vzorce, trske, hranično gojišče ali micelij. V našem primeru smo kapilare napolnili z raztopinami in hraničnim gojiščem in jih z obeh strani zaprli s kitom, da vzorec ne bi iztekel (Slika 3). V prvi fazи nas je zanimalo, ali bo detekcija bakra v raztopinah in gojiščih bakrovega sulfata oz. bakrovega klorida sploh mogoča.



Slika 3: Shema sestave vzorca za merjenje z EPR spektrometrom

3.2.4.1 Izvedba merjenja in nastavitev pogojev merjenja

Pred in med meritvami smo določili in korigirali pogoje, pri katerih bodo meritve potekale (Preglednica 2). Vsaka paramagnetna snov ima svoje karakteristike merjenja v določenem območju poljske gostote. Obseg magnetne poljske gostote je v pogojih določen z njeno sredino (Center field) in območjem meritve (Sweep width).

Kapilaro z vzorcem smo vstavili v resonator ter jo izpostavili mikrovalovom. Karakteristične lastnosti mikrovalov določamo s frekvenco in močjo. S časom (Sweep time) smo določili dolžino meritve in s tem natančnost merjenja. Z ojačitvijo signala iz resonatorja smo dobili optimalno sliko EPR spektra. Pomembna je tudi temperatura merjenja. V našem primeru smo vse meritve opravili pri normalni sobni temperaturi.

Preglednica 2: Pogoji in nastavitev pri izvedbi meritve na EPR spektrometu Bruker ESP 300 E, ki so se pokazale kot optimalne in smo jih uporabljali pri nadalnjih meritvah

Nastavitev	Vrednosti
Field set	330 mT
Scan time	6 min
Time constant	2,5 s
Modulation amplitude	0,4 mT
Modulation frequency	100 kHz
Receiver gain	$2,0 \times 10^6$
Microwave power	20 mW
Temperatura	25 °C

3.2.5 Določanje koncentracije bakrovega sulfata v PDA mediju

V naslednji fazi poskusa smo določili koncentracijo bakrovega sulfata, ki ga bomo dodali v PDA medij. Koncentracija je pomembna zaradi preraščanja gliv. Le-ta ne sme zavirati rasti gliv, da bomo dobili dovolj micelija za meritve. Po drugi strani pa smo želeli imeti v podlagi čim višjo koncentracijo bakrovega sulfata, saj bomo z EPR spektrometrom tako lažje opazovali prisotnost bakra.

Za vseh pet sojev gliv smo naredili preizkus in določili optimalno koncentracijo bakrovega sulfata v gojišču. Odločili smo se za test pri naslednjih koncentracijah:

- 1×10^{-3} mol/L
- 5×10^{-4} mol/L
- 5×10^{-4} mol/L

3.2.5.1 Priprava PDA gojišč z različnimi koncentracijami bakrovega sulfata

PDA gojišče smo pripravili podobno kot v predhodnem primeru (18 mL PDA gojišča + 2 mL raztopine). Za vsako glivo smo pripravili po tri vzorce za vsako koncentracijo. Skupno smo torej potrebovali 45 petrijevk.

Vodne raztopine bakrovega sulfata smo pripravili v 100 mL steklenih bučkah z zamaškom. Uporabili smo sterilizirano destilirano vodo in bakrov sulfat. Vodne raztopine bakrovega sulfata so imele 10 krat višjo koncentracijo kot je bila končna koncentracija v PDA gojišču. Količino snovi smo preračunali po Enačbi 3.

Vzorce smo pripravili v laminariju. V vsako petrijevko smo iz epruvet prelili steriliziran PDA agar in mu dodali po 2 mL vodne raztopine bakrovega sulfata.

Petrijevke s pripravljenou podlago smo ločili po koncentracijah in pustili v sterilnih pogojih v laminariju, da se je agar ohladil in strdil.

Za precepljanje vzorcev smo uporabili aktivirane kulture micelija gliv *Trametes versicolor* (Tv5), *Poria monticola* (Pm), *Antrodia vaillantii* (Pv in Pv2) in *Poria placenta* (Pp2). Pripravljene vzorce smo označili in preložili v rastno komoro, kjer smo jih inkubirali teden dni.

3.2.6 Merjenje bakrovega sulfata v miceliju gliv in v podlagi vzorcev

Z zbranimi podatki in predhodnimi poizkusi smo pripravili serijo vzorcev s katerimi smo tedensko spremljali navzem bakra v miceliju gliv ter njegovo oddajanje v podlagi tik pod preraščenim micelijem. Poskus je potekal 10 tednov.

3.2.6.1 Priprava PDA gojišč

Za vsako vrsto gliv smo potrebovali en vzorec tedensko, poskus je trajal 10 tednov. Skupno smo potrebovali 50 petrijevk z vzorci. Za vsak primer, če bi se pojavila okužba, smo za vsako glivo pripravili še dodatna dva vzorca (skupno 12). Pripravili smo tudi dva kontrolna vzorca brez bakrovega sulfata. Skupaj smo pripravili 62 petrijevk z vzorci. V vsako petrijevko smo dali po 18 mL PDA medija in 2 mL vodne raztopine bakrovega sulfata. V dva kontrolna vzorca smo v 18 mL PDA medija dodali še 2 mL destilirane vode.

Na ohlajene in pripravljene petrijevke s hranielnim medijem smo cepili posamezne seve gliv in jih označili. Na oba kontrolna vzorca nismo precepili gliv. Vse petrijevke smo označili in postavili v rastno komoro.

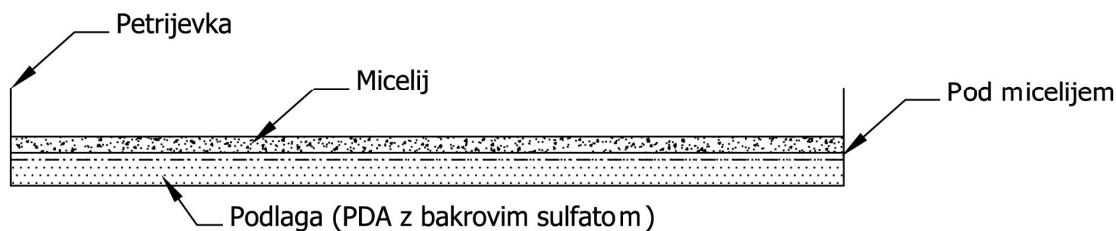
Vsak teden smo za pripravo vzorcev uporabili po eno serijo preraščenih petrijevk.

3.2.6.2 Priprava vzorcev za merjenje z EPR spektrometrom

Vzorce smo pripravljali na Inštitutu Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi. Kot osnova za vzorce sta nam služili dve vrsti kapilar.

Za vsak sev gliv smo potrebovali eno petrijevko s preraščenim micelijem na teden in za vsak sev smo pripravili po tri vzorce (Slika 4):

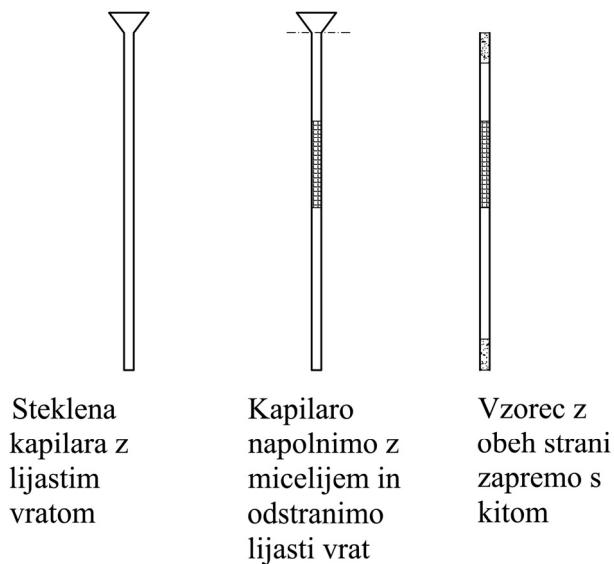
- micelij,
- hranielno podlago tik pod preraslim micelijem,
- hranielno podlago.



Slika 4: Shematski prečni prerez petrijevke s preraščeno hranično podlago

3.2.6.3 Priprava vzorcev micelija gliv za merjenje z EPR

S špatulo smo previdno posneli micelij s površine hranične podlage. Micelij smo osušili v papirnatih brisačih in s tem čim bolj odstranili morebitne ostanke podlage. Nato smo ga v terilnici strli v kašnato obliko. Tako pripravljeno vsebino smo s pomočjo tanke steklene palčke vnesli v kapilaro z lijastim vratom. Kapilaro smo stehtali pred in po vnosu micelija. Nato smo z nožem za rezanje stekla odrezali lij s kapilare in jo z obeh strani zaprli s kitom (Slika 5).



Slika 5: Priprava vzorca micelija v kapilari z lijastim vratom

Priprava vzorca podlage tik pod preraslim micelijem

S špatulo smo previdno posneli podlago tik pod micelijem in jo s pomočjo steklene palčke vnesli v kapilara z lijastim vratom. Kapilare smo stehtali pred in po pripravi vzorca.

Priprava vzorca hranične podlage PDA

Vzorce PDA smo pripravili v navadnih ravnih kapilarah. Kapilare smo stehtali pred in po vnosu podlage.

3.2.7 Meritve bakra z EPR spektrometrom

Parametre in pogoje smo določili že v predhodnih merjenjih (Preglednica 2).

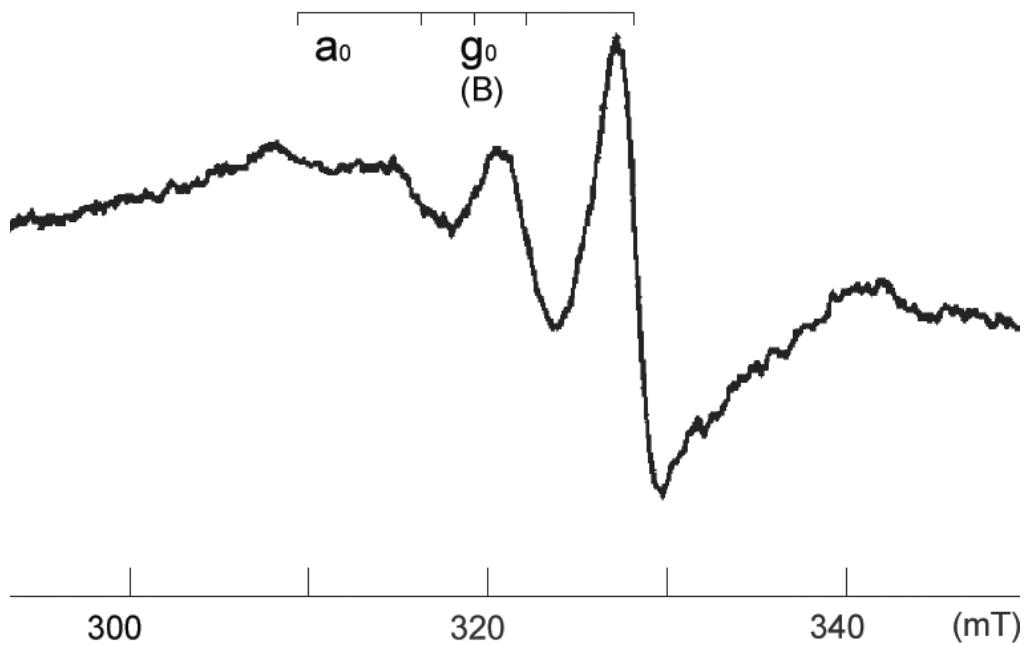
Pred meritvami smo se zavedali, da ne bo mogli natančno določiti koncentracije bakra v vzorcih saj ni bilo mogoče homogenizirati micelija do te mere, da bi lahko trdili, da vsi vzorci vsebujejo enako količino suhe snovi. Poleg tega pa tudi sam EPR spektrometer ne omogoča bolj natančnih meritev. Kapilare v spektrometer namreč ne moremo vpeti tako, da bi lahko natančno določili območje na vzorcu, ki bo dejansko v tistem delu rezonatorja, kjer bo meritev potekala. Področje merjenja je namreč zelo ozko. Zato kljub temu, da bi bil vzorec homogeniziran, ne bi mogli z gotovostjo trditi, koliko vsebine vzorca je bilo dejansko v območju, kjer merjenje poteka.

Kljub dejству, da meritev nismo mogli natančno kvantitativno podpreti s podatki o koncentraciji bakra, pa smo lahko na osnovi oblike krivulje ocenili, ali prihaja do povečevanja ali zmanjševanja količine bakra v vzorcih.

3.2.8 Obdelava spektrov

Obdelava spektrov je potekala ročno. Vse spektre smo izpisali na papir formata A4. Nastavitev tiskanja so bile enake pri vseh spektrihi. Spektre smo poskenirali in slike obdelali s programom Photoshop. V programu AutoCAD-u smo izmerili širino hiper fine sklopitvene konstante a_0 in srednjo vrednost gostote magnetnega polja

B, iz katere smo izračunali spektroskopski cepitveni tenzor g_0 (slika 6). Vrednosti so vpisane v preglednicah pri posameznih glivah.



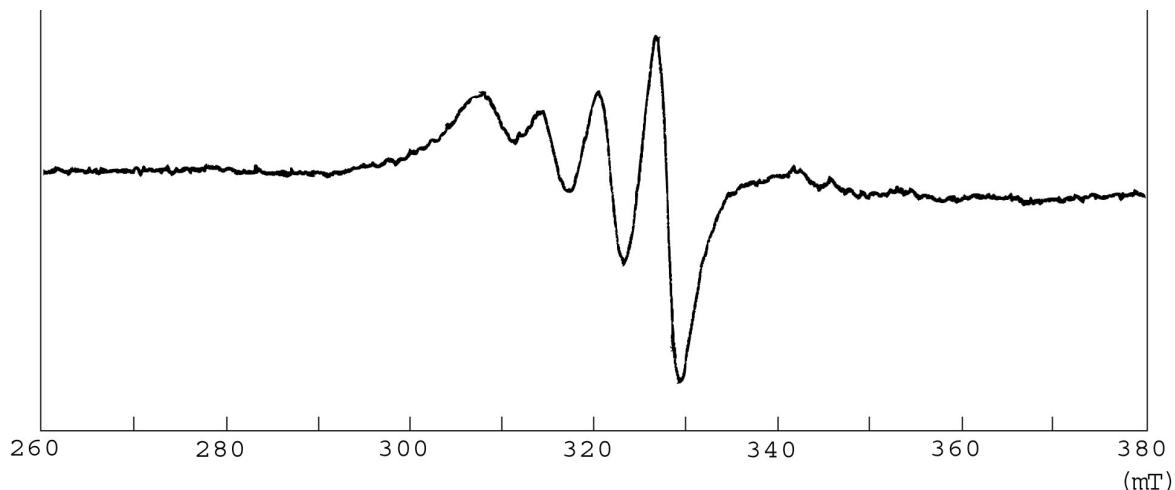
Slika 6: Merjenje hiper fine sklopitvene konstante a_0 in spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0

4 REZULTATI

4.1 MERJENJE BAKRA V VODNIH RAZTOPINAH BAKROVEGA SULFATA IN BAKROVEGA KLORIDA Z EPR SPEKTROMETROM

V začetku je bilo potrebno ugotoviti, ali je mogoče z EPR spektrometrom zaznati prisotnost bakra v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida. Po nepopolnih podatkih, ki smo jih imeli pred pričetkom dela, naj bi bilo z EPR spektrometrom mogoče zaznati baker v vodni raztopinah bakrovega sulfata, nismo pa bili prepričani ali ga lahko zaznamo tudi v vodnih raztopinah bakrovega klorida.

Rezultati merjenja so potrdili, da je s to metodo mogoče zaznati baker v vodnih raztopinah bakrovega sulfata (slika 7), saj baker nastopa v obliki Cu(II), med tem ko ga v vodnih raztopinah bakrovega klorida nismo mogli zaznati, saj nastopa v obliki Cu(I), ki nima paramagnetnih lastnosti in ga zato z EPR spektroskopijo ne moremo zaznati.

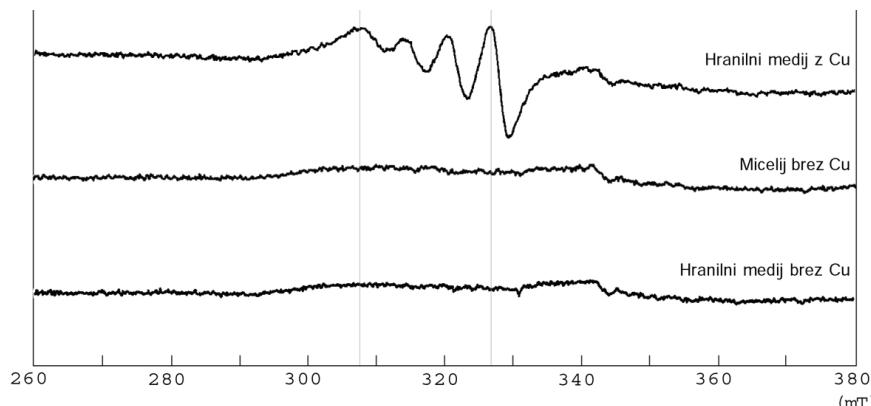


Slika 7: Spekter vodne raztopine bakrovega sulfata posnet z EPR spektrometrom

4.2 VPLIV PDA GOJŠČA NA PARAMAGNETNE CENTRE V BAKROVEM SULFATU

Vzopredno smo preverili ali PDA gojišče, v katerega dodamo vodno raztopino bakrovega sulfata, morebiti vpliva na paramagnetne lastnosti bakrovega sulfata. S tem bi morebiti lahko povzročili, da baker iz oblike Cu(II) preide v Cu(I) in ga z EPR spektrometrom ne bi mogli slediti.

Ugotovili smo, da PDA gojišče v katerega dodamo raztopino bakrovega sulfata, ne vpliva na obliko bakrovega sulfata in ga lahko določamo z EPR spektrometrom. PDA gojišče je primerno za nadaljnje raziskave z EPR spektrometrom. Poleg tega smo opravili tudi meritve kontrolnih vzorcev PDA medija brez bakrovega sulfata ter vzorca micelija gliv, ki je preraščala na PDA hranilni podlagi brez dodanega bakrovega sulfata. V obeh primerih smo dobili značilno obliko spektra brez izraženih vrhov (slika 8).



Slika 8: EPR spektri PDA hranilnega brez Cu, micelija ki je rasel na podlagi brez Cu ter spekter hranilnega medija s koncentracijo 1×10^{-3} mol/L bakrovega sulfata.

4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE BAKROVEGA SULFATA V PDA PODLAGI

Z različnimi koncentracijami vodnih raztopin bakrovega sulfata v PDA hranilni podlagi smo ugotovili, da koncentracija 1×10^{-3} mol/L bakrovega sulfata povzroča manjše zaviranje rasti in se je izkazala za najbolj primera za nadaljnje poskuse. Pri tej koncentraciji je rast micelija le malo počasnejša, obenem pa je koncentracija bakra v miceliju zadosti velika, da ga bomo lahko zaznali z EPR spektrometrom.

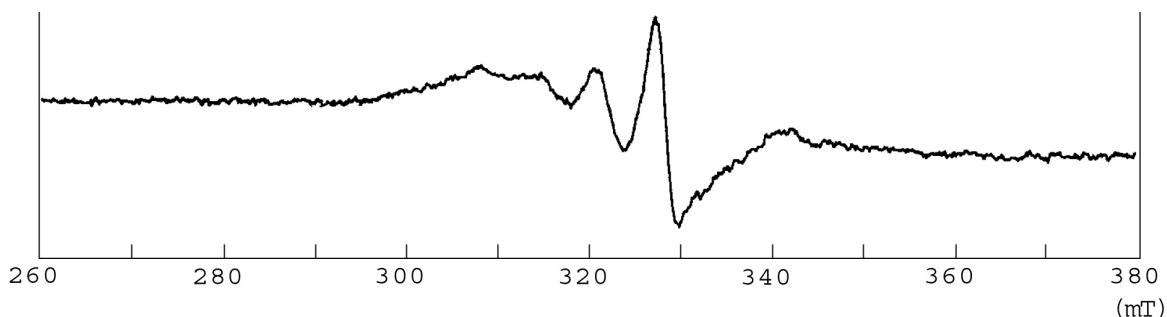
Pri koncentraciji raztopine bakrovega sulfata 5×10^{-4} mol/L nismo ugotovili opaznega zaviralnega učinka na rast micelija. Koncentracija 5×10^{-3} mol/L je znatno zmanjšala rast in zaradi prevelike inhibicije rasti ta koncentracija bakrovega sulfata ni primerna za raziskave.

Vzorce s koncentracijo 1×10^{-3} mol/L bakrovega sulfata smo uporabili za prve meritve na EPR spektrometru. Rezultati so potrdili domnevo, da bomo na ta način lahko opazovali kako micelij različnih vrst gliv sprejema baker.

4.4 DOLOČANJE BAKRA Z EPR SPEKTROMETROM V MICELIJU GLIV

Za določanje vsebnosti bakra v kulti micelija in v hranični podlagi smo morali predhodno ugotoviti ali bomo lahko zaznali baker v vzorcih micelijev, preraslih na mediju z dodanim bakrom

Meritve vzorcev micelija z EPR spektrometrom so pokazale, da je prisotnost bakra v miceliju možno zaznati in je tovrstna metoda primerna za nadaljnje meritve (slika 9). Spektri vseh meritev so prikazani v prilogah od 1 do 5.



Slika 9: Spekter bakrovega sulfata v miceliju glive *Antrodia vaillantii* po enem tednu preraščanja hranične podlage s koncentracijo 1×10^{-3} mol/L bakrovega sulfata.

4.5 DOLOČANJE ABSORPCIJE IN ODDAJANJA BAKRA IZ MICELIJA GLIV

Glavni poskus je trajal 10 tednov. Meritve smo izvajali enkrat krat tedensko. Pri posameznih glivah smo ugotovili naslednje rezultate.

4.5.1 *Poria monticola* - bela hišna goba, ZIM L033

Iz vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 (Preglednica 3, Slika 10), ki se v vseh vzorcih gibljejo med 2,157 in 2,159 lahko sklepamo, da ne prihaja do sprememb oblike bakra v miceliju ali hraničnem mediju. Podobne rezultate dobimo tudi pri primerjavi vrednosti hiper fine sklopitvene konstante a_0 , kjer vrednosti prav tako nihajo v območju med 17,9 in 18,7 in iz njih ne moremo izluščiti trenda o spremembi razporeditve bakra (Preglednica 4, Slika 11).

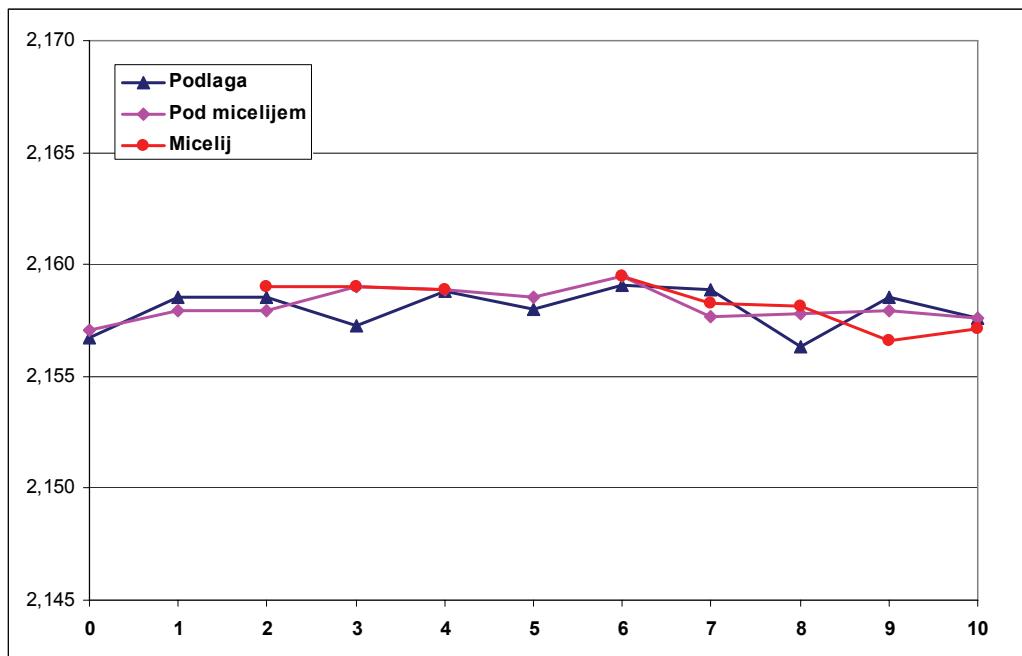
Zanimiva je tudi primerjava jakosti spektrov v miceliju, pod micelijem in v podlagi v 10 tedenskem obdobju. Iz spektrov micelija *Poria monticola* (Priloga 1) bi lahko sklepali, da po začetnem obdobju rasti, ko še ne zaznamo bakra, gliva preide v fazo, ko je z manjšimi nihanji prisotnost bakra dobro vidna in je v šestem tednu najmočneje zaznavna ter do desetega tedna skoraj enakomerno pojenuje.

Iz spektrov meritve podlage tik pod micelijem dobimo zanimivo sliko, ko je v prvem tednu meritve prisotnost bakra najmočneje zaznavna. V preostalih tednih je z manjšimi odstopanjemi dokaj enakomerna.

Spektri vzorcev podlage prav tako ne kažejo večjih odstopanj. Iz meritve vzorca v desetem tednu bi lahko sklepali, da glede na nekoliko šibkejši signal vsebnost bakra v podlagi nekoliko pada, vendar tega ne moremo potrditi s primerjavo signala vzorca v miceliju in pod micelijem (Priloga 1, Preglednica 3 in 4, Sliki 10 in 11).

Preglednica 3: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria monticola* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

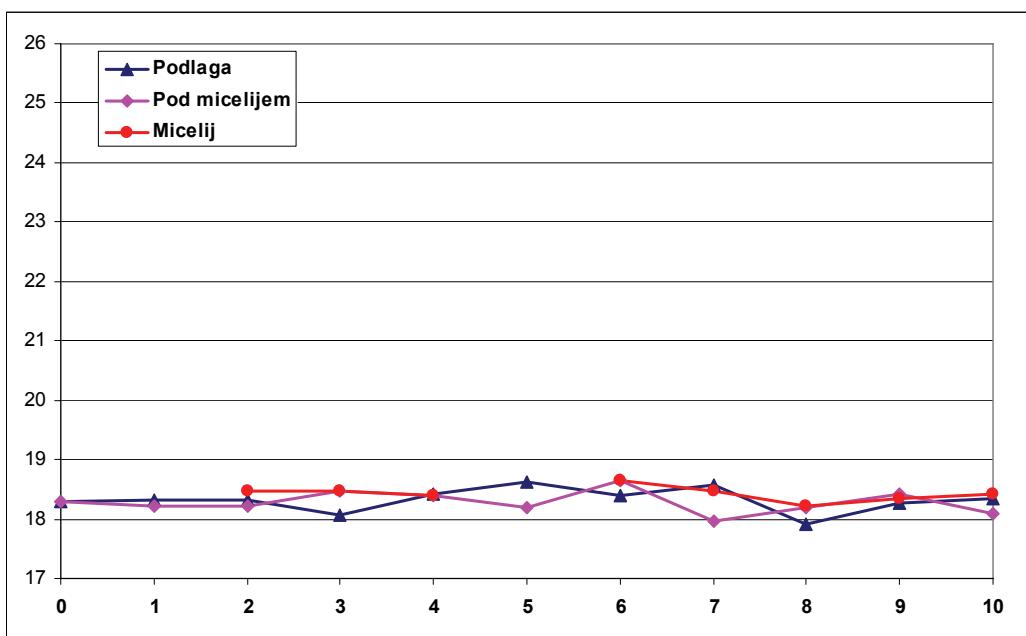
Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
0. teden	2,157	2,157	/
1. teden	2,159	2,158	/
2. teden	2,159	2,158	2,159
3. teden	2,157	2,159	2,159
4. teden	2,159	2,159	2,159
5. teden	2,158	2,159	/
6. teden	2,159	2,159	2,159
7. teden	2,159	2,158	2,158
8. teden	2,156	2,158	2,158
9. teden	2,159	2,158	2,157
10. teden	2,158	2,158	2,157



Slika 10: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria monticola* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Preglednica 4: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria monticola* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
	a_0 (mT)	a_0 (mT)	a_0 (mT)
0. teden	18,3	18,3	/
1. teden	18,3	18,2	/
2. teden	18,3	18,2	18,5
3. teden	18,1	18,5	18,5
4. teden	18,4	18,4	18,4
5. teden	18,6	18,2	/
6. teden	18,4	18,7	18,7
7. teden	18,6	18,0	18,5
8. teden	17,9	18,2	18,2
9. teden	18,3	18,4	18,3
10. teden	18,3	18,1	18,4



Slika 11: Spremembra hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria monticola* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

4.5.2 *Poria placenta* - bela hišna goba, ZIM L035

Pri rezultatih obdelave spektrov glive *Poria placenta* (Pp2) lahko opazimo precej bolj dinamične spremembe vsebnosti zaznane oblike bakra v miceliju. Medtem ko v vzorcih pod micelijem in v podlagi vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 ostajajo v zelo izenačenih mejah med 2,155 in 2,158 so v miceliju zelo velika nihanja (Preglednica 5, Slika 12). Velikost g_0 v miceliju v prvih šestih tednih ne odstopa od mej, ki smo jih dobili pod micelijem in v podlagi, v nekaterih obdobjih bakra celo ne zaznamo. Bistvena sprememba se zgodi v 8. tednu, ko g_0 pade na vrednost 2,137 ob tem pa je lepo viden še dodaten signal (Priloga 2), ki ga lahko pripišemo prostim radikalom (Humar, 2002). V naslednjih dveh tednih se ohrani trend padanja g_0 ter v desetem tednu doseže vrednost 2,135.

Podobna slika se ponovi pri meritvah hiperfine skloplitvene konstante a_0 , ko v 8. tednu iz podobnega nihanja, kot je v podlagi in pod micelijem, naraste do vrednosti 22,8 in v naslednjih dveh tednih ostaja zelo blizu te vrednosti (Preglednica 6, Slika 13).

Iz pregleda oblike spektrov dobimo prav tako zelo dinamično sliko (Priloga 2).

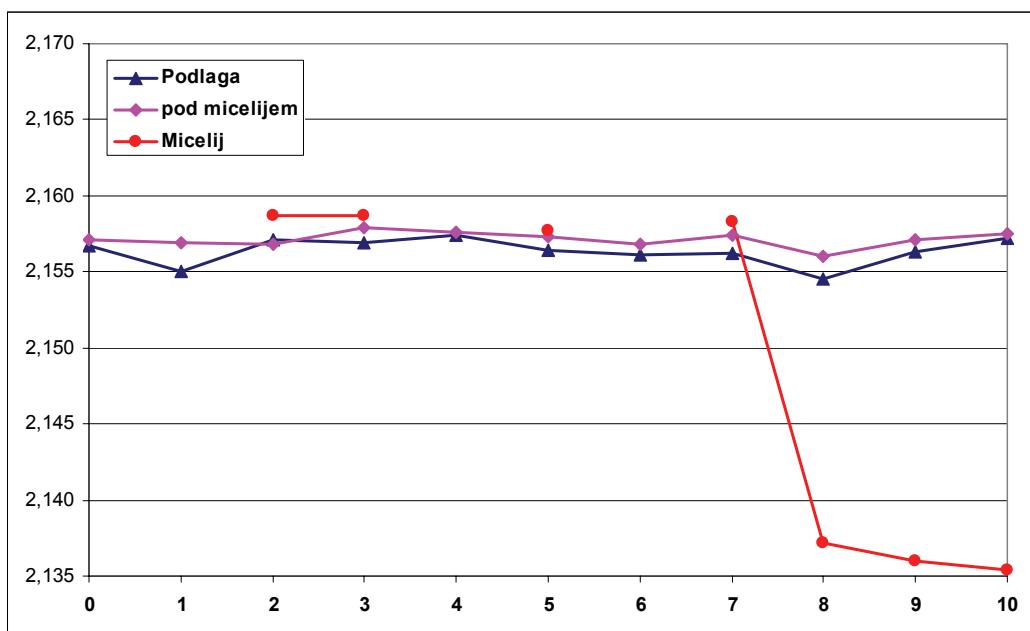
Iz obdelave spektrov vzorcev micelija dobimo rezultate, ko baker precej dobro zaznamo ali pa ga sploh ne ugotovimo. Do prve večje spremembe pride v sedmem tednu, ko se poleg štirih vrhov, ki so značilni za vodne raztopine bakra(II), pojavi še manjši, peti vrh. Le ta v osmem in ostalih dveh tednih precej naraste in postane močno viden. Izgleda tudi, kot da se vrhova dva in tri v osmem tednu združita v en vrh poleg tega se pojavijo še nazobčani vrhovi, ki jih pripisujemo prostim radikalom. To lahko delno pojasnimo z domnevo, da baker počasi prehaja v drugo kemično obliko. Le ta je vidna v enakem meritvenem območju, zato prihaja do seštevanja obeh spektrov. Po vsej verjetnosti prihaja do odlaganja bakrovih spojin na micelij oziroma hifin ovoj, kjer prihaja do agregacije bakra, kar se odraža v novem signalu, značilnem za bakrov(II) sulfat (Humar, 2002). Po vsej verjetnosti ta signal ne priprada bakrovemu oksalatu, saj je bakrov oksalt bistveno manj paramagnetno aktivен in ga v tako nizkih koncentracijah s spektroskopijo EPR ne moremo zaznati.

Pod micelijem zaznamo manjše nihanje jakosti spektrov skozi celotno obdobje desetih tednov. V šestem tednu se prvič pojavi oblika, ki bi jo lahko imenovali peti vrh, vendar v naslednjih tednih ne postane tako jasno vidna kot v miceliju.

V podlagi v osmem tednu prav tako zaznamo zametke novega vrha, vendar so še bolj zbrisani kot pod micelijem (Preglednice 5 in 6, Slike 12 in 13).

Preglednica 5: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria placenta* v časovnem obdobju 10–ih tednov.

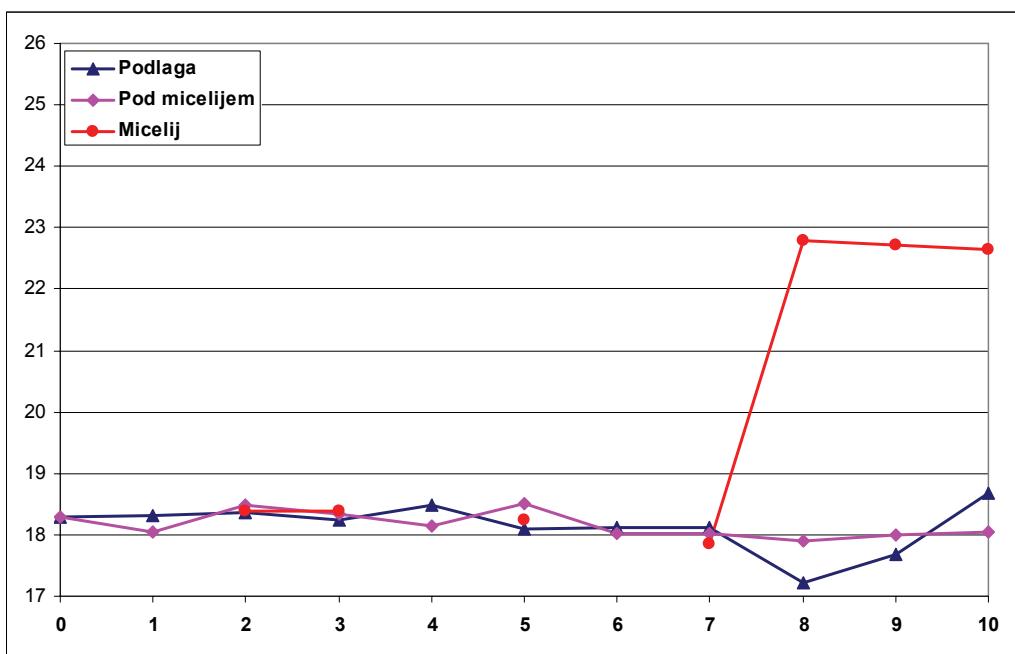
Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
0. teden	2,157	2,157	/
1. teden	2,155	2,157	/
2. teden	2,157	2,157	2,159
3. teden	2,157	2,158	2,159
4. teden	2,157	2,158	/
5. teden	2,156	2,157	2,158
6. teden	2,156	2,157	/
7. teden	2,156	2,157	2,158
8. teden	2,155	2,156	2,137
9. teden	2,156	2,157	2,136
10. teden	2,157	2,157	2,135



Slika 12: Spremembra g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria placenta* v časovnem obdobju 10 -ih tednov.

Preglednica 6: Spremembra hiper fine sklopitevne konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria placenta* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
	a_0 (mT)	a_0 (mT)	a_0 (mT)
0. teden	18,3	18,3	/
1. teden	18,3	18,1	/
2. teden	18,4	18,5	18,4
3. teden	18,2	18,3	18,4
4. teden	18,5	18,2	/
5. teden	18,1	18,5	18,2
6. teden	18,1	18,0	/
7. teden	18,1	18,0	17,8
8. teden	17,2	17,9	22,8
9. teden	17,7	18,0	22,7
10. teden	18,7	18,0	22,6



Slika 13: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Poria placenta* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

4.5.3 *Antrodia vaillantii* - bela hišna goba – izolat Pv, ZIM L036

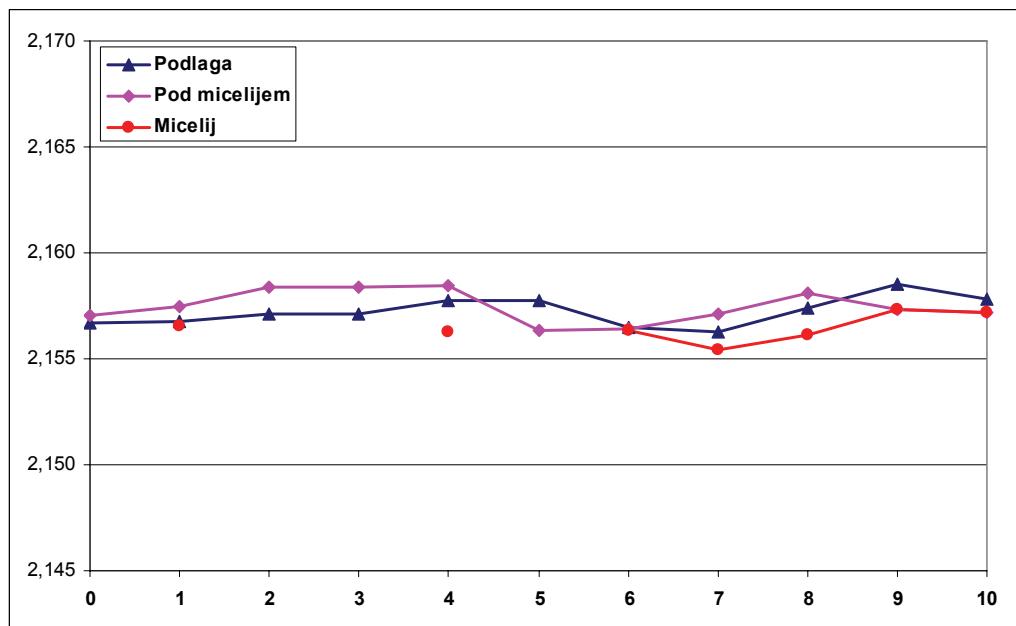
Pri glivi *Antrodia vaillantii* (Pv) so vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 pri vzorcih micelija, pod micelijem in podlagi v mejah 2,156 do 2,159, kar ne kaže na kemične spremembe bakra (Preglednica 7, Slika 14).

Podobni so tudi rezultati hiper fine skloplitvene konstante a_0 , ki pri vseh treh vrstah vzorcev prav tako ostaja v mejah med 17,8 do 18,9 mT (Preglednica 8, Slika 15).

Pri pregledu spektrov glive *Antrodia vaillantii* izolat Pv (Priloga 3) je zanimiv zelo močan spekter v prvem tednu in dejstvo, da v naslednjih dveh tednih bakra ne zaznamo. Prav tako ga ne zaznamo v petem tednu. Nato signali tri tedne zaporedoma naraščajo in v devetem in desetem tednu izgubljajo na intenzivnosti. Pod micelijem iz oblike spektrov ne zaznamo večjih sprememb. Tudi v vzorcih podlage ni zaznati večjih sprememb spektrov.

Preglednica 7: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv v časovnem obdobju 10-ih tednov.

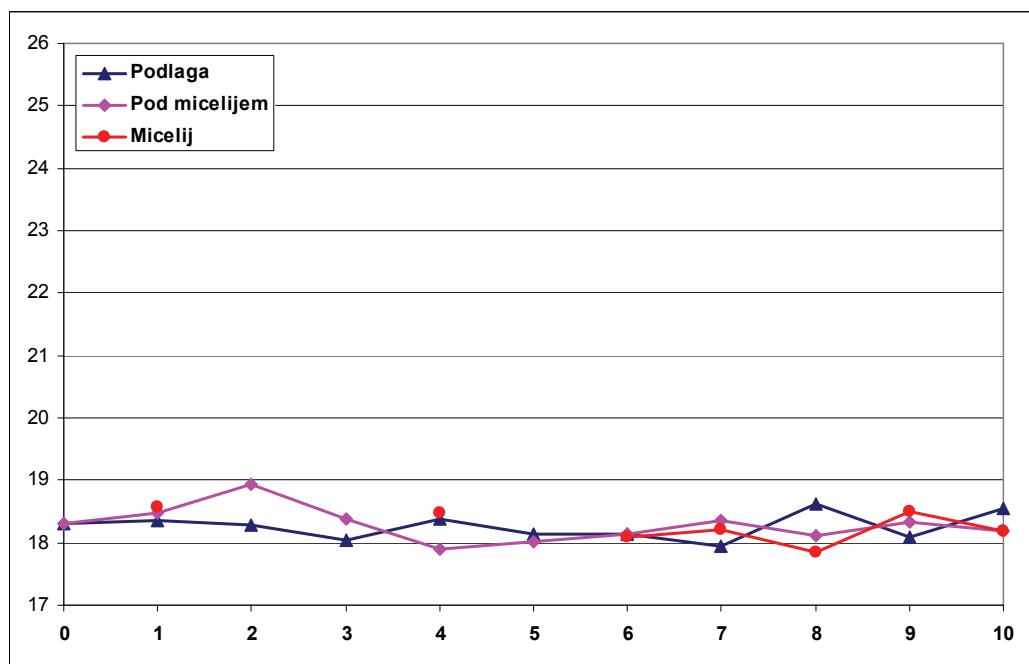
Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
0. teden	2,157	2,157	/
1. teden	2,157	2,157	2,157
2. teden	2,157	2,158	/
3. teden	2,157	2,158	/
4. teden	2,158	2,158	2,156
5. teden	2,158	2,156	/
6. teden	2,156	2,156	2,156
7. teden	2,156	2,157	2,155
8. teden	2,157	2,158	2,156
9. teden	2,159	2,157	2,157
10. teden	2,158	2,157	2,157



Slika 14: Spremembra g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Preglednica 8: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
	a_0 (mT)	a_0 (mT)	a_0 (mT)
0. teden	2,157	2,157	/
1. teden	18,4	18,5	18,6
2. teden	18,3	18,9	/
3. teden	18,1	18,4	/
4. teden	18,4	17,9	18,5
5. teden	18,1	18,0	/
6. teden	18,1	18,1	18,1
7. teden	17,9	18,4	18,2
8. teden	18,6	18,1	17,8
9. teden	18,1	18,3	18,5
10. teden	18,5	18,2	18,2



Slika 15: Sprememba hiper fine skloplitvene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv v časovnem obdobju 10-ih tednov.

4.5.4 *Antrodia vaillantii* - bela hišna goba izolat Pv2, ZIM L037

Pri sevu *Antrodia vaillantii* (Pv2) vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 v miceliju, pod micelijem in v podlagi ne kažejo bistvenih sprememb. V podlagi in pod micelijem se pojavijo v območju od 2,154 do 2,159. Pri miceliju sicer v

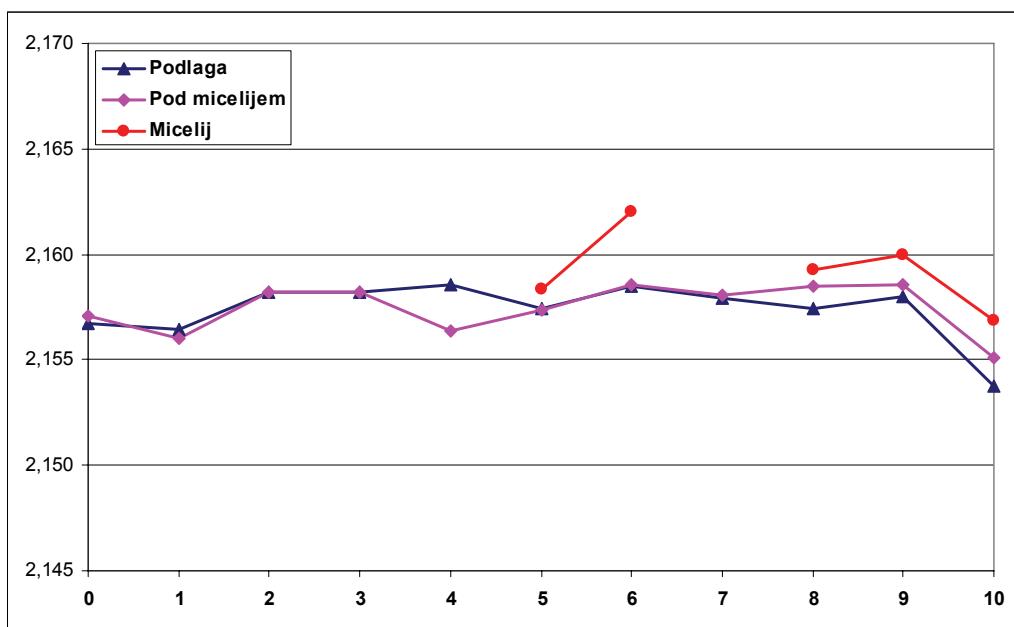
šestem tednu nekoliko naraste do vrednosti 2,162 vendar to ne kaže na kakšne bistvene spremembe (Preglednica 9, Slika 16).

Rezultati hiper fine sklopitvene konstante a_0 v miceliju sicer nakazujejo na spremembe v šestem tednu vendar le - te niso tako močne, da bi lahko iz njih potegnili kakšne zaključke. Pod micelijem in v podlagi prav tako ni bistvenih sprememb (Preglednica 10, Slika 17).

Pregled spektrov *Antrodia vaillantii* sev Pv2 (Priloga 4). V prvih štirih tednih v miceliju nismo zaznali bakra, se pa močno pojavi peti in šesti teden. Od osmega do desetega tedna jakost signalov še narašča. Pod micelijem večjih sprememb v jakosti spektrov ni. V podlagi prav tako ne zaznamo večjih sprememb jakosti signala.

Preglednica 9: Spremembe g^0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv2 v časovnem obdobju 10-ih tednov.

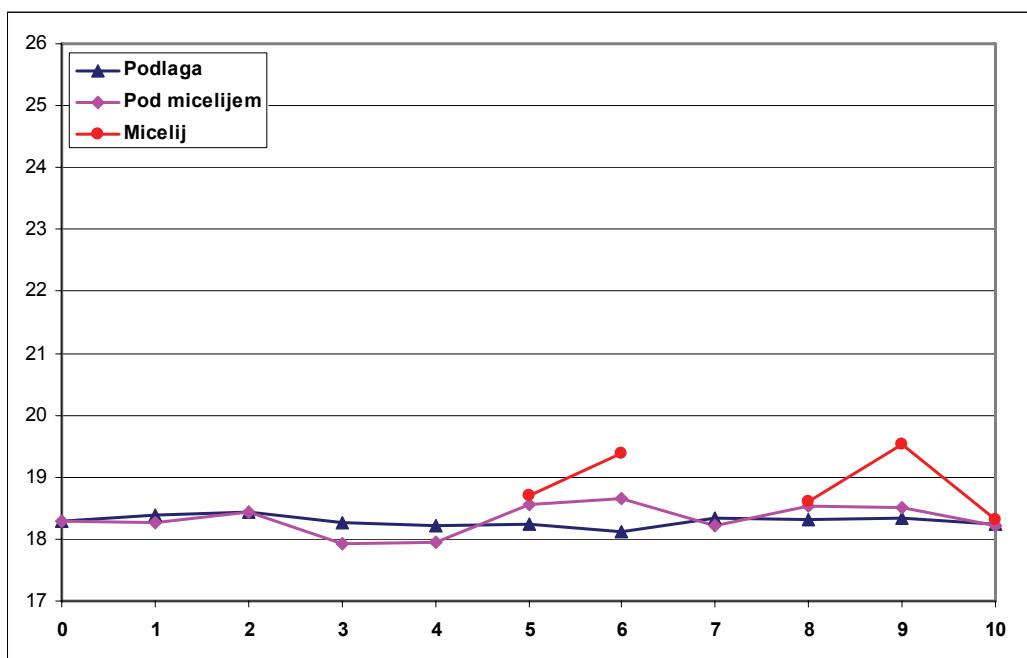
Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
0. teden	2,157	2,157	/
1. teden	2,156	2,156	/
2. teden	2,158	2,158	/
3. teden	2,158	2,158	/
4. teden	2,159	2,156	/
5. teden	2,157	2,157	2,158
6. teden	2,159	2,159	2,162
7. teden	2,158	2,158	/
8. teden	2,157	2,158	2,159
9. teden	2,158	2,159	2,160
10. teden	2,154	2,155	2,157



Slika 16: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv2 v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Preglednica 10: Sprememba hiper fine sklopotvne konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv2 v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
	a_0 (mT)	a_0 (mT)	a_0 (mT)
0. teden	18,7	18,7	/
1. teden	18,4	18,3	/
2. teden	18,4	18,4	/
3. teden	18,3	17,9	/
4. teden	18,2	17,9	/
5. teden	18,2	18,5	18,7
6. teden	18,1	18,7	19,4
7. teden	18,3	18,2	/
8. teden	18,3	18,5	18,6
9. teden	18,3	18,5	19,5
10. teden	18,2	18,2	18,3



Slika 17: Sprememba hiper fine sklopitevne konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Antrodia vaillantii* sev Pv2 v časovnem obdobju 10-ih tednov.

4.5.5 *Trametes versicolor* - pisana ploskocevka, ZIM L055

Pri pisani ploskocevki vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 kažejo drugačno sliko kot pri vzorcih iz rodu *Poria* (Preglednica 11, Slika 18). Pojavljajo se v večjem razponu in so drugače razpršene. V miceliju v prvih šestih tednih skoraj nismo zaznali sledov bakra. V sedmem tednu se nenadoma pojavi zelo močan signal z zamikom g_0 pri vrednosti 2,128, ki v nadaljnjih tednih le nekoliko naraste.

Zanimiva je tudi primerjava sprememb spektroskopskega cepitvenega tenzorja pod micelijem in v podlagi. Sprememba je v obeh primerih podobna, le da je globlje v podlagi vidna šest tednov kasneje.

Vrednosti g_0 se v vseh treh primerih s časom ustalijo pri približno enakih vrednostih okoli 2,135 (Preglednica 11, Slika 18).

Podobna slika je tudi pri spremembah hiper fine sklopitevene konstante a_0 . Tudi v tem primeru se sprememba najhitreje pokaže tik pod micelijem in šest tednov kasneje še globlje v podlagi (Preglednica 12, Slika 19).

Pregled spektrov *Trametes versicolor* (Priloga 5):

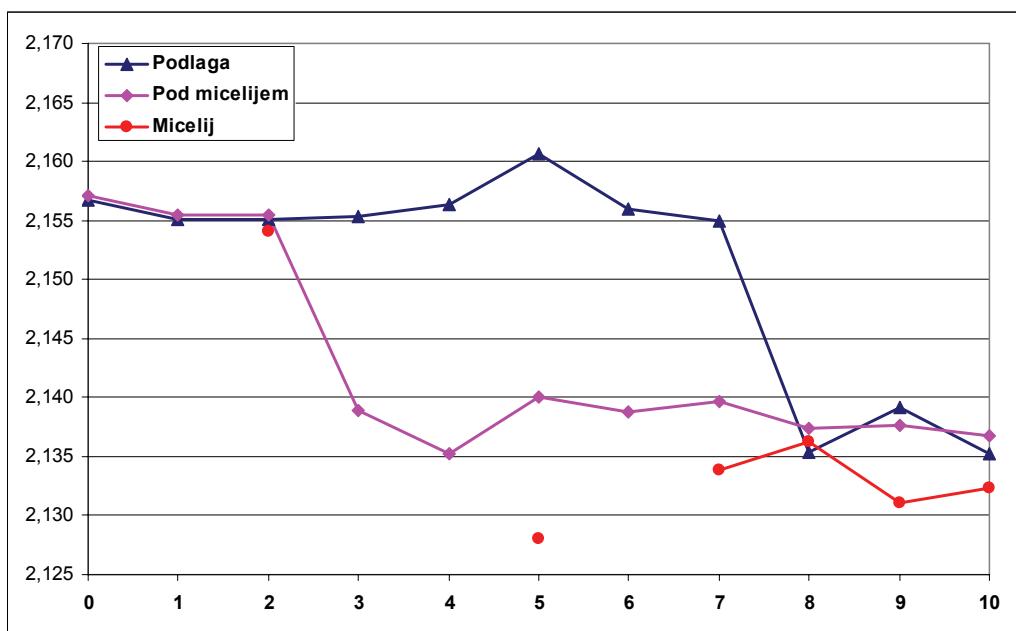
V miceliju lahko baker v prvih šestih tednih komaj zaznamo. Nato se pojavi zelo močan signal, ki kaže na to, da so se pri bakru pojavile določene spremembe. To se iz oblik spektrov še posebej izraža v zadnjih treh tednih. Zato lahko sklepamo, da gliva vpliva na spremembo bakra.

Pod micelijem je signal že v prvem tednu šibkejši, kot je bil pri hišnih gobah, ter ga v drugem tednu sploh ne zaznamo. Spektri v tretjem tednu in kasneje kažejo, da je moralo priti do spremembe oblike bakra.

V podlagi se zgodi podobna sprememba kot pod micelijem, le da šest tednov kasneje. Iz tega bi lahko sklepal, da poteka transport bakra v globino podlage nekoliko počasneje (Preglednica 11 in 12, Sliki 18 in 19).

Preglednica 11: Spremembe g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Trametes versicolor* v časovnem obdobju 10–ih tednov.

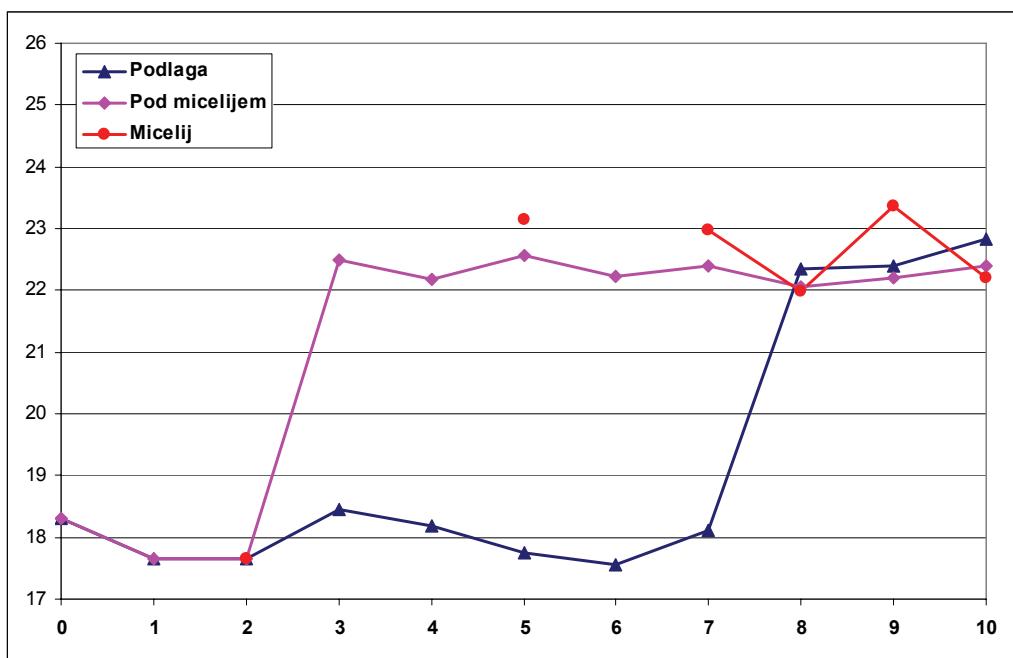
Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
0. teden	2,157	2,157	/
1. teden	2,155	2,155	/
2. teden	2,155	2,155	2,154
3. teden	2,155	2,139	/
4. teden	2,156	2,135	/
5. teden	2,161	2,140	2,128
6. teden	2,156	2,139	/
7. teden	2,155	2,140	2,134
8. teden	2,135	2,137	2,136
9. teden	2,139	2,138	2,131
10. teden	2,135	2,137	2,132



Slika 18: Sprememba g_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Trametes versicolor* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Preglednica 12: Sprememba hiper fine sklopitevne konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Trametes versicolor* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

Čas	Podlaga	Pod micelijem	Micelij
	a_0 (mT)	a_0 (mT)	a_0 (mT)
0. teden	18,3	18,3	/
1. teden	17,6	17,7	/
2. teden	17,6	17,7	17,7
3. teden	18,4	22,5	/
4. teden	18,2	22,2	/
5. teden	17,7	22,6	23,1
6. teden	17,6	22,2	/
7. teden	18,1	22,4	23,0
8. teden	22,4	22,1	22,0
9. teden	22,4	22,2	23,4
10. teden	22,8	22,4	22,2



Slika 19: Sprememba hiper fine sklopitevene konstante a_0 v podlagi, v podlagi pod micelijem in v miceliju glive *Trametes versicolor* v časovnem obdobju 10-ih tednov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo v prvi fazi raziskave ugotavljali, ali je mogoče z EPR spektrometrom zaznati prisotnost bakra v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida. V drugem delu, pa smo z EPR spektroskopijo skozi daljše časovno obdobje ugotavljali prisotnost in paramagnetne lastnosti bakrovih spojin v hranielnem mediju in miceliju gliv.

Ugotovili smo, da je EPR spektrometrija primerna za zaznavanje bakrovega sulfata v vodni raztopini. Bakrov sulfat nastopa v obliki Cu(II) in ima paramagnetne centre, medtem ko v bakrovem kloridu nastopa kot Cu(I) in nima paramagnetnih centrov, zato ga nismo mogli zaznati. Za nadaljnje analize smo uporabili le bakrov sulfat.

PDA gojišče, v katerega smo dodali raztopino bakrovega sulfata, ni vplivalo na paramagnetne lastnosti bakrovega sulfata. Baker je v PDA gojišču ostal v obliki Cu(II) in ga je bilo moč slediti z EPR metodo.

V drugi fazi diplomskega dela smo določili koncentracijo bakrovega sulfata, ki smo ga dodali v PDA medij. Koncentracija bakra je zaradi zaviralnega učinka, pomembna pri preraščanju gliv. Ugotoviti smo morali optimalno koncentracijo bakrovega sulfata v PDA mediju, pri kateri ga bomo lahko zaznali z EPR spektrometrom in ne bo pretirano zavirala rasti gliv. Pri nadalnjem delu smo se odločili za koncentracijo bakrovega sulfata 1×10^{-3} mol/L, ker je bila rast micelija le malce počasnejša, obenem pa je bilo možno meriti prisotnost bakra z EPR spektroskopijo. Prav tako smo tudi potrdili domnevo, da je možno opazovati sprejemanje bakra v micelij različnih vrst gliv.

Uporabljene glive so bile: *Trametes versicolor* - pisana ploskocevka (ZIM L057), *Poria monticola* - bela hišna goba (ZIM L033), *Antrodia vaillantii* - bela hišna goba,

sev Pv (ZIM L036), *Antrodia vaillantii* - bela hišna goba, sev Pv2 (ZIM L037) in *Poria placenta* - bela hišna goba (ZIM L035).

Iz vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 (Preglednica 3, Slika 10), ki se v vseh vzorcih *Porie monticola* gibljejo med 2,157 in 2,159 lahko sklepamo, da ne prihaja do sprememb oblike bakra v miceliju ali hraničnem mediju. Podobne rezultate dobimo tudi pri primerjavi vrednosti hiper fine sklopitvene konstante a_0 (Preglednica 4, Slika 11), kjer vrednosti prav tako nihajo v območju med 17,9 in 18,7 in iz podatkov ne moremo sklepati o spremembi bakra.

Iz spektrov micelija *Porie monticola* (Priloga 1) smo lahko sklepali, da po začetnem obdobju rasti, ko še ne zaznamo bakra, preide micelij v obdobje, ko je z manjšimi nihanji prisotnost bakra dobro vidna. V šestem tednu pa je najmočneje zaznavna ter do desetega tedna skoraj enakomerno pojenuje. Iz spektrov meritve podlage tik pod micelijem dobimo zanimivo sliko, ko je v prvem tednu meritve prisotnost bakra najmočneje zaznavna. V preostalih tednih je z manjšimi odstopanjami dokaj enakomerna.

Iz spektrov vzorcev *Porie monticola* v desetem tednu bi lahko sklepali, da glede na šibkejši signal, vsebnost bakra v podlagi malenkost pada, vendar tega ne moremo potrditi s primerjavo signala vzorca v miceliju in tik pod micelijem. Torej je vsebnost bakra v miceliju in v podlagi največja v začetku rasti, kasneje pa postopoma pada. Možno pa je tudi, da je gliva baker spremenila v obliko, ki je z EPR spektroskopijo ne moremo zaznati (Humar, 2002).

Iz spektrov meritve vzorcev micelija *Poria placenta* (Priloga 2) lahko razberemo, da baker v posameznem tednu ali precej dobro zaznamo ali pa ga sploh ne zaznamo. Do prve večje spremembe pride v sedmem tednu, ko se poleg štirih vrhov, ki so značilni za vodne raztopine bakra(II), pojavi še manjši, peti vrh. Le ta v osmem in ostalih tednih precej naraste in postane močno viden. Izgleda tudi, kot da se vrhova dva in tri v osmem tednu združita v en vrh poleg tega pa se pojavi še močan nazobčan signal, ki ga lahko pripisemo prostim radikalom. To lahko delno

pojasnimo z domnevo, da gliva baker spreminja v neko drugo obliko. Le ta je vidna v enakem meritvenem območju zato prihaja do seštevanja obeh spektrov.

Verjetno prihaja do odlaganja bakrovih spojin na micelij oz. glivin ovoj. Pri tem prihaja do agregacije bakra, kar se odraža v novem signalu, značnem za bakrov(II) sulfat (Humar 2002). Po vsej verjetnosti ta signal ne pripada bakrovemu oksalatu. Bakrov oksalat je namreč bistveno manj paramagnetno aktiven in ga v tako nizih koncentracijah z spektroskopijo EPR ne moremo zaznati.

Iz rezultatov spektroskopije EPR za glivo *Poria placenta* pa ne moramo trditi, da je bolj tolerantna, kot ostale glive iz rodu *Poria*, ki smo jih testirali. Še posebej, ker so spektri micelija dokaj podobni spektrom izmerjenim za glivo *Trametes versicolor*, ki velja za netolerantno na bakrov sulfat (Humar, 2002).

Pri glivi *Antrodia vaillantii*, sev Pv, so vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 pri vzorcih micelija, tik pod micelijem in v podlagi v mejah 2,156 do 2,159, kar ne kaže na kemične spremembe bakra. Podobni so tudi rezultati hiper fine skloplitvene konstante a_0 , ki so pri vseh treh vzorcih v mejah med 17,8 do 18,9 mT. Zelo močan spekter smo izmerili v prvem tednu in zanimivo je dejstvo, da v naslednjih dveh tednih in peti teden bakra sploh ne zaznamo (Priloga 3). Od šestega tedna jakost signala narašča in v devetem in desetem tednu izgublja na intenzivnosti. V podlagi tik pod micelijem pa iz oblike spektrov ne moremo zaznati večjih sprememb vrednosti bakra. Tudi v vzorcih podlage je spekter bakra ves čas poskusa podoben. Tudi tukaj dopuščamo možnost, da je gliva sposobna spremeniti baker v obliko Cu(I), ki je z EPR spektroskopijo ne moremo zaznati.

Pri drugem sevu *Antrodia vaillantii* (Pv2) vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 v miceliju, v podlagi tik pod micelijem in v podlagi prav tako ne kažejo bistvenih sprememb. Vrednosti v podlagi in tik pod micelijem ostajajo v območju od 2,154 do 2,159. Pri miceliju sicer v šestem tednu nekoliko naraste do vrednosti 2,162 vendar iz tega ne moremo zaključiti na pomembne razlike. Hiper fina skloplitvena konstanta a_0 v miceliju sicer nakazujejo povečanje signala v šestem

tednu vendar le-te niso tako izrazite, da bi lahko iz tega predpostavili kakršne koli zaključke. Tik pod micelijem in v podlagi prav tako ni bilo zaznati bistvenih razlik. Humar (2002) je ugotovil, da ima sev glive *Antrodia vaillantii* (Pv2) sposobnost spremeniti baker v obliko Cu(I), ki je ne moremo zaznati z EPR spektroskopijo. Poleg tega je po njegovih ugotovitvah ta sev toleranten na baker. Z našo raziskavo in rezultati EPR spektroskopije tega ne moremo potrditi niti zavrniti.

Vrednosti spektroskopskega cepitvenega tenzorja g_0 pri *Trametes versicolor* se razlikujejo glede na vrednosti pri vzorcih iz rodu *Poria*. V miceliju v prvih šestih tednih skoraj nismo zaznali sledov bakra, v sedmem tednu se nenadoma pojavi zelo močan signal z zamikom g_0 pri vrednosti 2,128, ki v nadalnjih tednih še nekoliko naraste. Zanimiva je tudi primerjava sprememb spektroskopskega cepitvenega tenzorja pod micelijem in v podlagi (Priloga 5, Preglednica 11 in Slika 18). Spremembra je v obeh primerih podobna, le da je globlje v podlagi vidna šest tednov kasneje. Vrednosti g_0 se v vseh treh primerih s časom ustalijo pri vrednosti okoli 2,135.

Podobne rezultate dobimo tudi pri spremembah hiper fine sklopitvene konstante a_0 . Oscilacije vrednosti so najprej zaznane v podlagi tik pod micelijem, šest tednov kasneje pa še globlje v podlagi (Preglednica 12, Slika 19).

Iz oblike spektrov lahko baker v prvih šestih tednih v miceliju komaj zaznamo. Nato se pojavi zelo močan signal, ki nakazuje na absorpcijo bakra v micelij. V zadnjih treh tednih pa so te spremembe že očitnejše.

Pod micelijem se že v prvih tednih pojavijo razlike. Zanimivo je, da je signal v začetku šibak kot pri hišnih gobah (Priloga 5) in ga v drugem tednu sploh ne zaznamo. Spektri v tretjem tednu in kasneje izkazujejo spremembe oblike bakra iz česar lahko sklepamo na preobrazbo bakra.

V podlagi se spremembu zamakne za šest tednov. Iz tega bi lahko sklepali, da:

- poteka transport bakra iz micelija v globino podlage nekoliko počasneje, ali pa
- gliva najprej spremeni baker na površini, kasneje pa tudi globlje v podlagi.

5.2 SKLEPI

Z EPR metodo je mogoče zaznati baker v vodnih raztopinah bakrovega sulfata saj le-ta nastopa v obliki Cu(II) in ima paramagnetne lastnosti

Z EPR metodo nismo mogli zaznati bakrovega klorida v vodnih raztopinah, saj nastopa v obliki Cu(I), ki nima paramagnetnih lastnosti.

PDA gojišče v katerega dodamo raztopino bakrovega sulfata, ne vpliva na obliko bakrovega sulfata in ga lahko določamo z EPR spektrometrom.

Z različnimi koncentracijami vodnih raztopin bakrovega sulfata v PDA hranilni podlagi smo ugotovili, da koncentracija 1×10^{-3} mol/L bakrovega sulfata povzroča manjše zaviranje rasti micelija gliv in se je izkazala za najbolj primero za nadaljnje poskuse.

Meritve vzorcev micelija z EPR spektrometrom so pokazale, da je prisotnost bakra v miceliju možno zaznati in je tovrstna metoda primerna za nadaljnje meritve

Gliva *Poria monticola* z manjšanjem jakosti signala bakra(II) v zadnjih tednih nakazuje, da je le-ta prešel v obliko, ki je z EPR spektrometrom ne moremo zaznati.

Gliva *Poria placenta* kaže na spremembo bakra, vendar še vedno v obliki Cu(II), ki je dobro vidna z EPR spektrometrom. Verjetno prihaja do odlaganja bakrovih spojin na micelj oz. glivin ovoj. Pri tem prihaja do agregacije bakra, kar se odraža v novem signalu, značlnem za bakrov(II) sulfat (Humar 2002). Po vsej verjetnosti ta signal ne pripada bakrovemu oksalatu, ki je bistveno manj paramagnetno aktivен in ga v tako nizih koncentracijah z spektroskopijo EPR ne moremo zaznati (Humar 2002).

Gliva *Antrodia vaillantii* kaže podobne rezultate kot *Poria monticola*.

Pri *Trametes versicolor* iz oblike spektrov micelija lahko baker v prvih šestih tednih komaj zaznamo. Nato se pojavi zelo močan signal, ki nakazuje na spremembo ter absorpcijo bakra v micelij in nekoliko počasnejši potek transporta bakra iz micelija v globino podlage. Možno pa je tudi, da gliva najprej spremeni baker na površini, kasneje pa tudi globlje v podlagi.

6 POVZETEK

V diplomskem delu smo ugotavljali, ali je mogoče z EPR spektrometrom zaznati prisotnost bakra v vodnih raztopinah bakrovega sulfata in bakrovega klorida ter prisotnost bakra v hranielnem mediju in miceliju gliv z EPR spektroskopijo skozi daljše časovno obdobje.

Na osnovi analiz smo ugotovili, da je EPR spektrometrija primerna za zaznavanje bakrovega sulfata v vodni raztopini. Bakrov sulfat nastopa v obliki Cu(II) in ima paramagnetne lastnosti, med tem ko v bakrovem kloridu nastopa kot Cu(I) in nima nesparjenega elektrona in ga z EPR nismo mogli zaznati. Tako smo lahko za nadaljnje raziskave uporabili Bakrov sulfat.

PDA gojišče, v katerega smo dodali raztopino bakrovega sulfata ni vplivalo na paramagnetne lastnosti bakrovega sulfata. Baker je v PDA gojišču ostal v obliki Cu(II) in ga je bilo moč meriti z EPR metodo.

Določili smo primerno koncentracijo bakrovega sulfata v gojišču (1×10^{-3} mol/L). Pri tej koncentraciji micelij uspešno prerašča podlago, baker pa pri tej koncentraciji tudi še zaznamo z EPR spektrometrom.

Rezultati tedenskih meritev (10 tednov zapored) kažejo določene spremembe bakra v miceliju, pod micelijem in v podlagi pri glivi *Poria placenta*. Na osnovi spremembe spektrov sklepamo, da prihaja do odlaganja bakrovih spojin na micelij oz. hifin ovoj, kjer prihaja do agregacije bakra.

Spremembe se prikažejo tudi pri *Trametes versicolor*. V miceliju lahko baker v prvih šestih tednih komaj zaznamo. V sedmem tednu se pokaže zelo močan in spremenjen signal, ki nakazuje na spremembo ter absorpcijo bakra v micelij in nekoliko počasnejši transporta bakra iz micelija v globino podlage. Možno pa je tudi, da gliva najprej spremeni baker na površini, kasneje pa tudi globlje v podlagi. Pri glivi *Poria monticola* in obeh sevih glive *Antrodia vaillantii* z EPR spektroskopijo nismo opazili bistvenih sprememb bakra. Glede na to, da v zadnjih tednih poskusa jakost signala micelija rahlo pada, domnevamo, da so glive spremenile baker v obliko, ki je z EPR-om ne moremo zaznati. O tem piše tudi Humar (2002).

7 VIRI

- Ajiboye S.I., Brown D.R. 1990. Electron spin resonance study of soluble copper(II)-cellulose complexes. *Journal of chemical society Faraday transition*, 86, 1: 65-68
- Ashida J. 1965. Adaptation of fungi to metal toxicants. *Annual Review of Phytopathology*: s. 153 – 174
- Autocad 13, računalniški program, Autodesk, 2000.
- Benko R., Kervina – Hamovič L. 1987. *Patologija lesa lesna fitopatologija*. Ljubljana, VTOZD za lesarstvo Biotehniške fakultete: 122 str
- Carlile M.J., Watkinson S.C. 1994. *The Fungi*. London, Academic press limited: 482 str
- Cooney J.J., De Rome L., Laurence O.S., Gadd G.M. 1989. Effects of organotins and organoleds on yeasts, *New Phytologist*, 61, 2: 214-237
- Cvetković M. 1987. *Opšta mikologija*. Beograd, Niro: 320 str
- 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: 554 str
- Gadd G. M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Pythologyst*, 64, 2: 25 - 60
- Greco M.A., Hrab D.I., Magner W., Kosman D.J. 1990. Cu, Zn super oksid dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 37, 5: 317-325
- Green III F., Highley T. L. 1997. Mechanism of brown - rot decay: Paradigm or paradox. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39, 3: 113 - 124
- Gupta U. 1979. *Copper in the environment. Part 1*. New York, John Wiley & Sons: 215 str
- Hawker L. E. 1950. *Physiology of fungi*. London, University of London Press: 184
- Hirt R. R. 1949. An isolate of *Poria xanta* on media containing copper. *Phytopathologyst*, 39, 1: 31 - 36
- Horsfall J. G. 1956. *Principles of fungal actions*. Waltham Massachusetts, Chronica Botanica Co.: 279 str
- Hughes A. S. 1999. Studies on the fixation mechanisms, distribution and biological performance of copper based timber preservatives. Ph. D. thesis. London, Imperial College of Science, Technology and Medicine: 313 str
- Hughes A.S., Murphy R.J., Gibson J.F., Cornfield J.A. 1994. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic analysis of copper based preservatives in *Pinus sylvestris*. *Holzforschung*, 48, 2: 91-98

- Humar M. 2002. Interakcije bakrovih zaščitnih pripravkov z lesom in z lesnimi glivami.
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za lesarstvo: 127 str
- 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
- Kirk T. K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white - rot fungi. V: Young A. (Ur) in Akhar M. (Ur), Environmental friendly technologies for the pulp and paper industry. New York, John Wiley & Sons: 273 - 292
- Kirk T. K., Shimada M. 1985. Lignin biodegradation: the micro organisms involved and physiology and biochemistry of degradation by white - rot fungi. V: Biosynthesis and Biodegradation of wood components. London, Academic Press: 233 - 245
- Liese W. 1970. Ultrastructure aspects of wood tissue disintegration. Annual Review of Phytopathology, 8, 4: 231 - 258
- Lukens R. J. 1971. Chemistry of fungicidal action. London, Chapman and Hall: 185 str
- Messner K., Srebotnik E., Fiechter A. 1997. Low Molecular Weight Compounds in Lignin Degradation. Special Issue, Journal of Biotechnology, 53: 91 - 92
- Obadič D., Petrič M., Pohleven F., Šentjurc M. 1999. The use of EPR for investigation of changes in preserved wood during microbiological decay process. V: Book of abstracts, 11th International Symposium Spectroscopy in Theory and Practice. Bled, 11-15 April 1999, Ljubljana Slovenian Chemical Society, Spectroscopic Section: 80
- Photoshop 6, računalniški program, Adobe, 2000.
- Placket D. V., Ainscough E.W., Brodie A. M. 1987. The examination of preservative treated radiata pine using electron spin resonance spectroscopy. International Research Group for Wood Preservation. IRG/WP 87 - 3423: 11 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: 9 str
- Pohleven F., Šentjurc M., Petrič M., Dagarin F. 1994. Investigation of ammoniacal copper (II) octanoate in aqueous solutions and its determination in impregnated wood. Holzforschung, 48, 5: 371 – 374

- 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
- Richardson H.W. 1997. Handbook of copper compounds and applications. New York, M. Dekker: 93 - 122
- Rodney C., De Groot R., Woodward B. 1998. *Wolpiforia cocos* - A potential agent for composting or bioprocessing Duglas - fir wood treated with copper - based preservatives. Material und organismen, 32, 4: 195 – 215
- Schmid S., Webster R.D., Evans P.D. 2000. The use of ESR spectroscopy to assess the photostabilising effects of wood preservatives. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 00-20186: 9 str
- 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
- Schmidt O. 1994. Holz- und Baumpilze. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 246 str
- Starkey R. L. 1973. Effects of pH on toxicity of copper to *Scytalidium sp.*, a copper tolerant fungus, and some other fungi. Journal of General Microbiology, 78, 4: 217 - 225
- Stephan I., Leithoff H., Peek R.D. 1996. Microbial conversion of wood treated with salt preservatives. Material und Organismen, 30, 4: 179-199
- Sutter H.P., Jones E.B.G., Wälchli O. 1983. The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.) Fr.. Material und Organismen, 18, 6: 241-262
- Šentjurc M., Štalec A. 1976. Uporaba elektronske paramagnetne rezonance v biologiji in medicini. Medicinski razgledi, 15: 25 - 279
- Takao S. 1965. Organic acid production by basidiomycetes, I. Screening of acid - producing strains. Applied Microbiology, 13, 12: 732 – 737
- Tavzes Č. 2003. Proučevanje encimskih in neencimskih procesov razgradnje lesa. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za lesarstvo: 138 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
- Vesentini D., Dickinson D. J., Murphy R. J. 2004. Sequestration of copper ions by the extracellular mucilaginous material (ECMM) of two wood rotting basidiomycetes. V: 35th Annual Meeting. Ljubljana Slovenia, IRG/WP 04-10533

- Whittaker R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163: 150-161
- Woodward B., De Groot R. 1999. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolated to copper in agar media. *Forest Products Journal*, 49, 3: 87 - 94
- Xie C., Ruddick J. R., Herring F. G. 1995. Fixation of ammoniacal copper preservatives: reaction of vanilin, a lignin model compound with ammoniacal copper sulphate solution. *Holzforschung*, 49, 5: 483 - 490
- Zabel R.A. 1954. Variations in preservative tolerance of wood - destroy fungi. *Forest product research society journal*, 4, 2: 166 - 169
- Zhang J., Kamden D.P. 2000. Interactions of copper-amine with southern pine: retention and migration. *Wood and Fibre Science*, 32, 4: 332 - 339

8 ZAHVALA

»Potrpljenje je božja mast...«

Zahvaljujem se vsem, ki so me spodbujali in mi pomagali pri in ob študiju in obdržali mirne živce. Še posebej pri dokončanju diplomske naloge.

Posebne zasluge imajo prof. dr. Franc Pohleven, doc. dr. Miha Humar in prof. dr. Marko Petrič z BF, oddelek za lesarstvo ter ekipa EPR centra na Inštitutu Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi v Ljubljani, še posebej dr. Marjeta Šentjurc in Marjana Nemec.

Zahvaljujem se tudi vsem profesorjem, asistentom in zaposlenim ter zunanjim sodelavcem na Oddelku za lesarstvo, nekdanjim sošolcem, prijateljem in domačim.

Nikoli ne bom pozabil citata iz govora ob podelitvi indeksov:

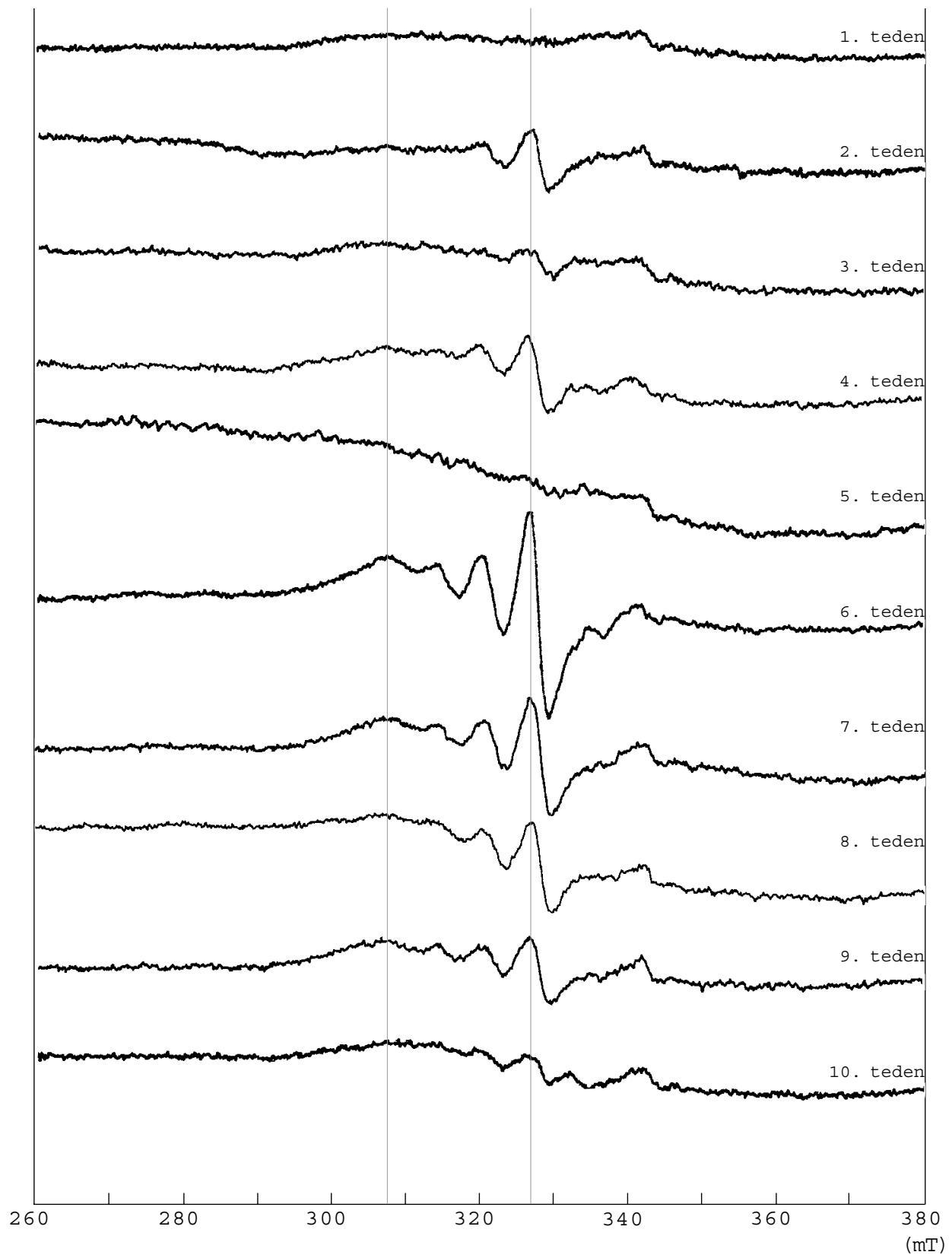
»Od zibelke do groba, najlepša je študentska doba...«

Res je... in zdaj sem vesel, da bo končno za mano.

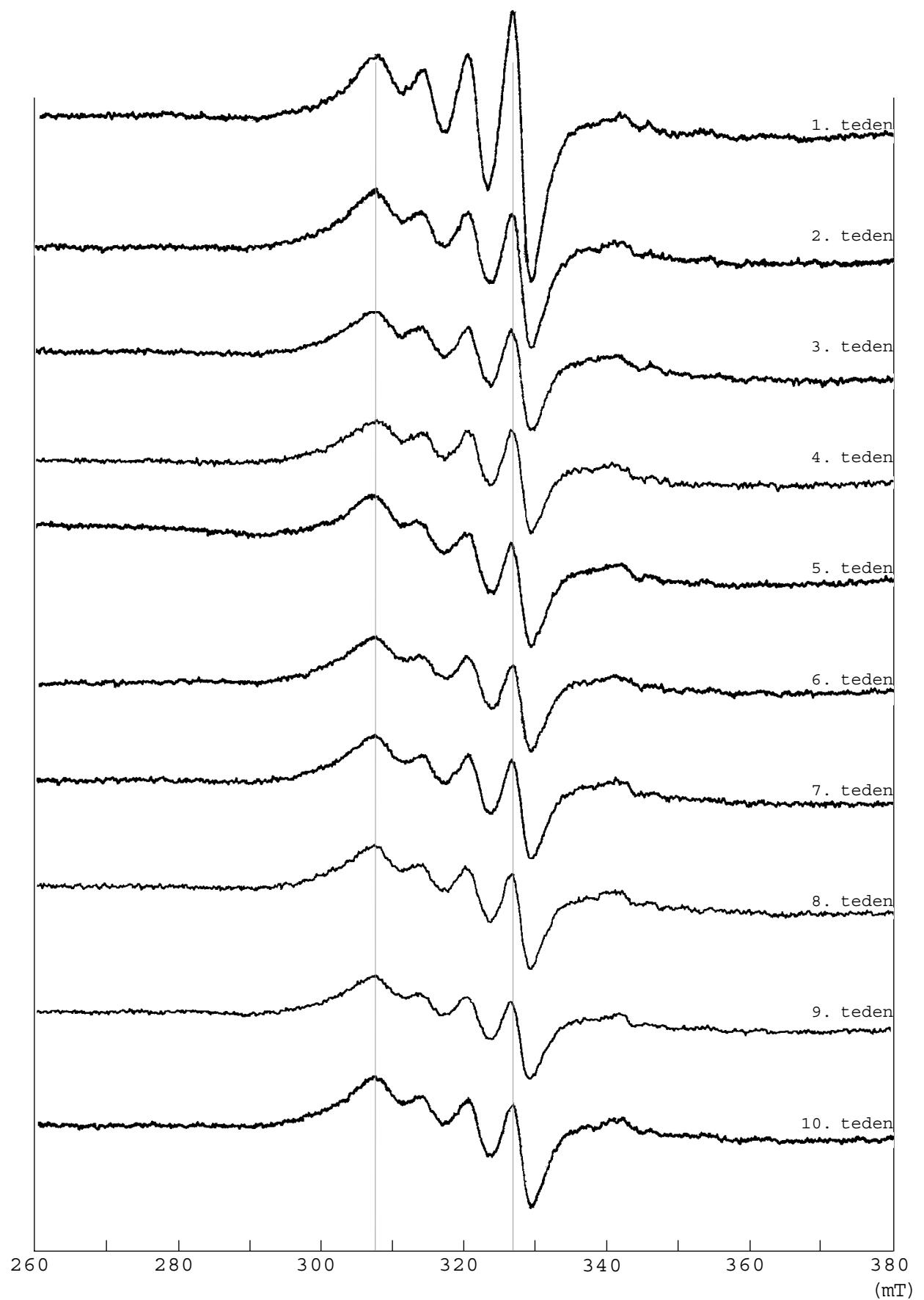
9 PRILOGE

Priloga 1: EPR spektri *Poria monticola* (pm)

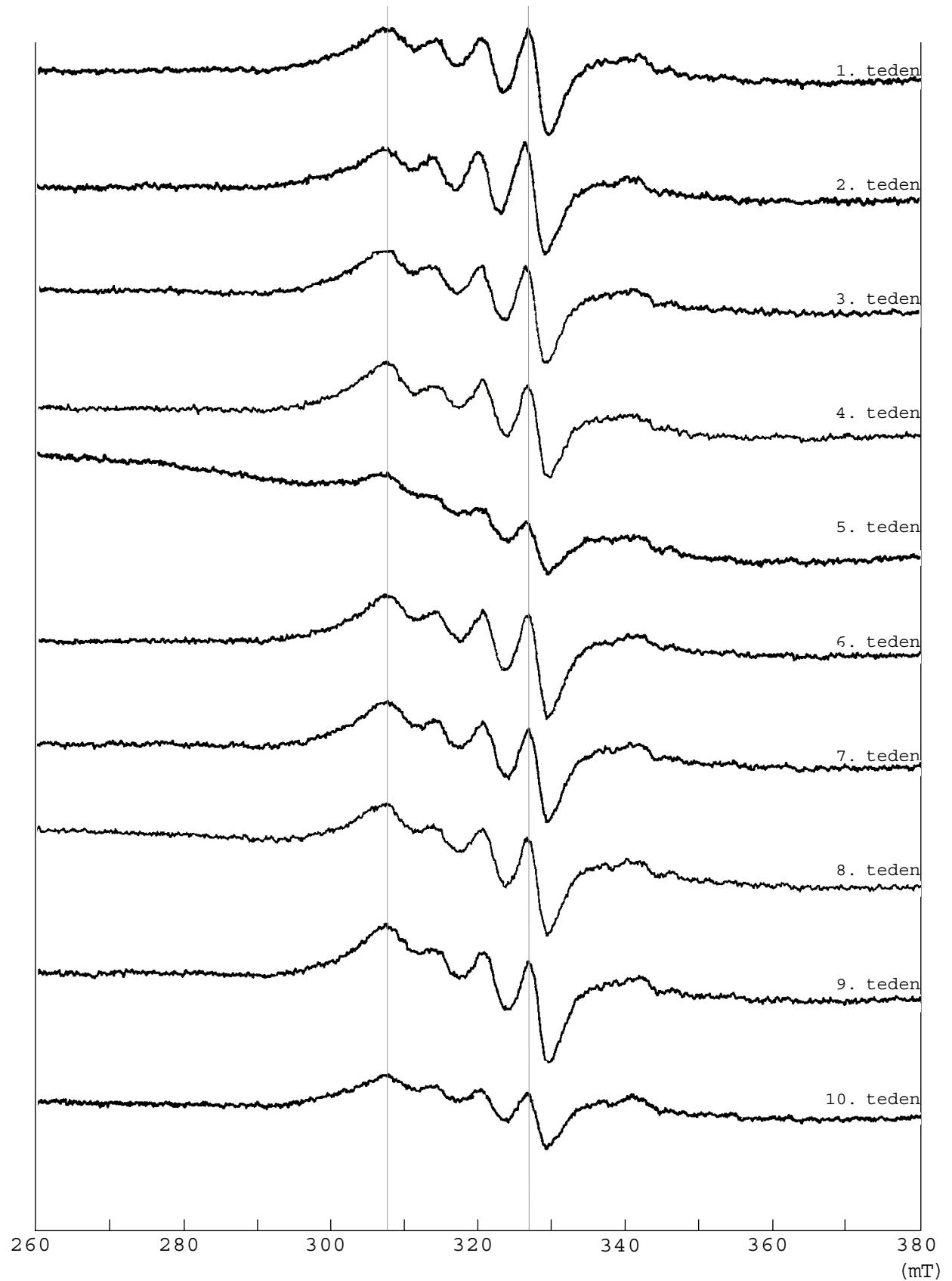
Poria monticola (pm) - micelij



***Poria monticola* (pm) - pod micelijem**

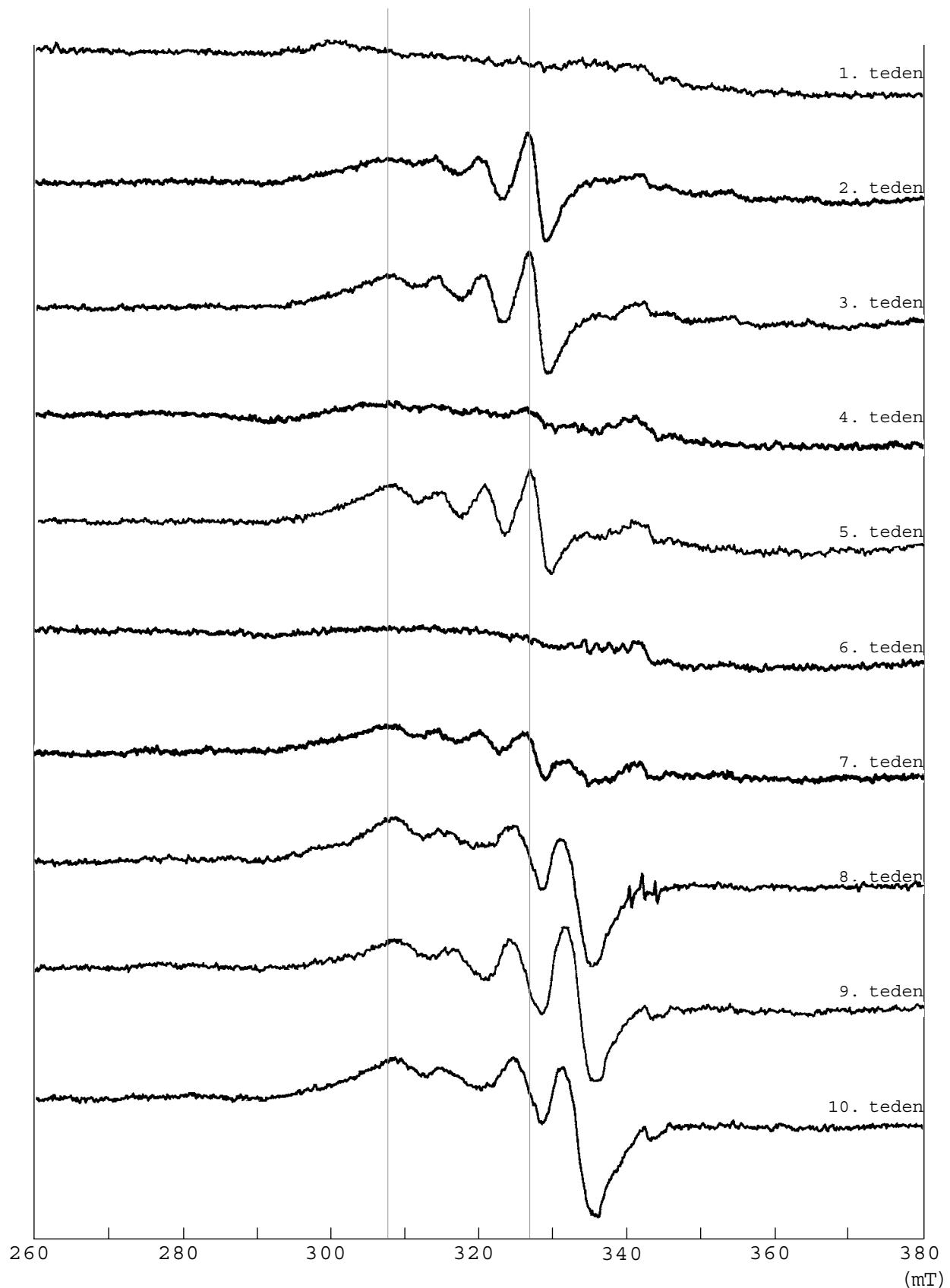


***Poria monticola* (pm) - podlaga**

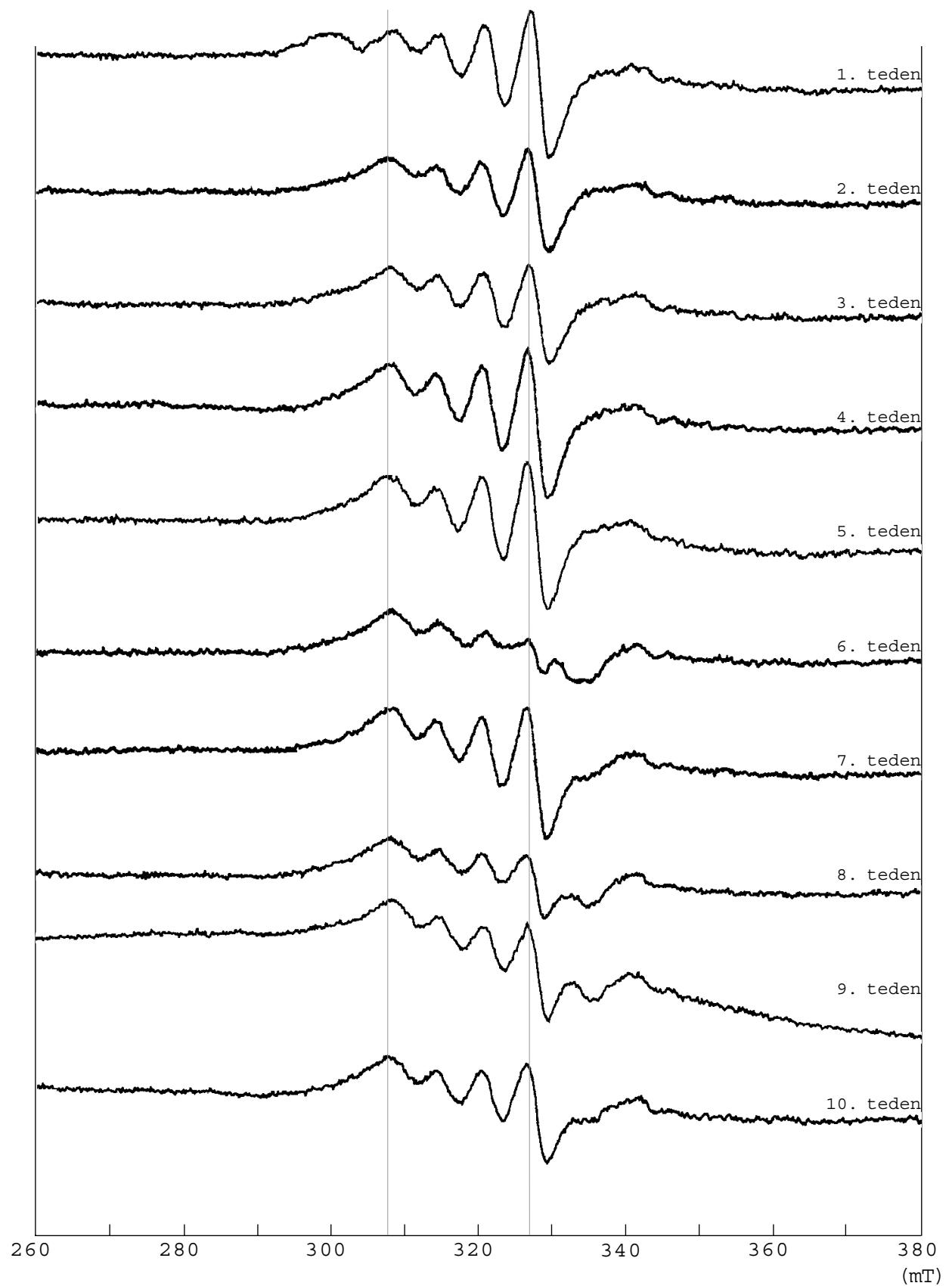


Priloga 2: EPR spektri *Poria placenta* (pp2)

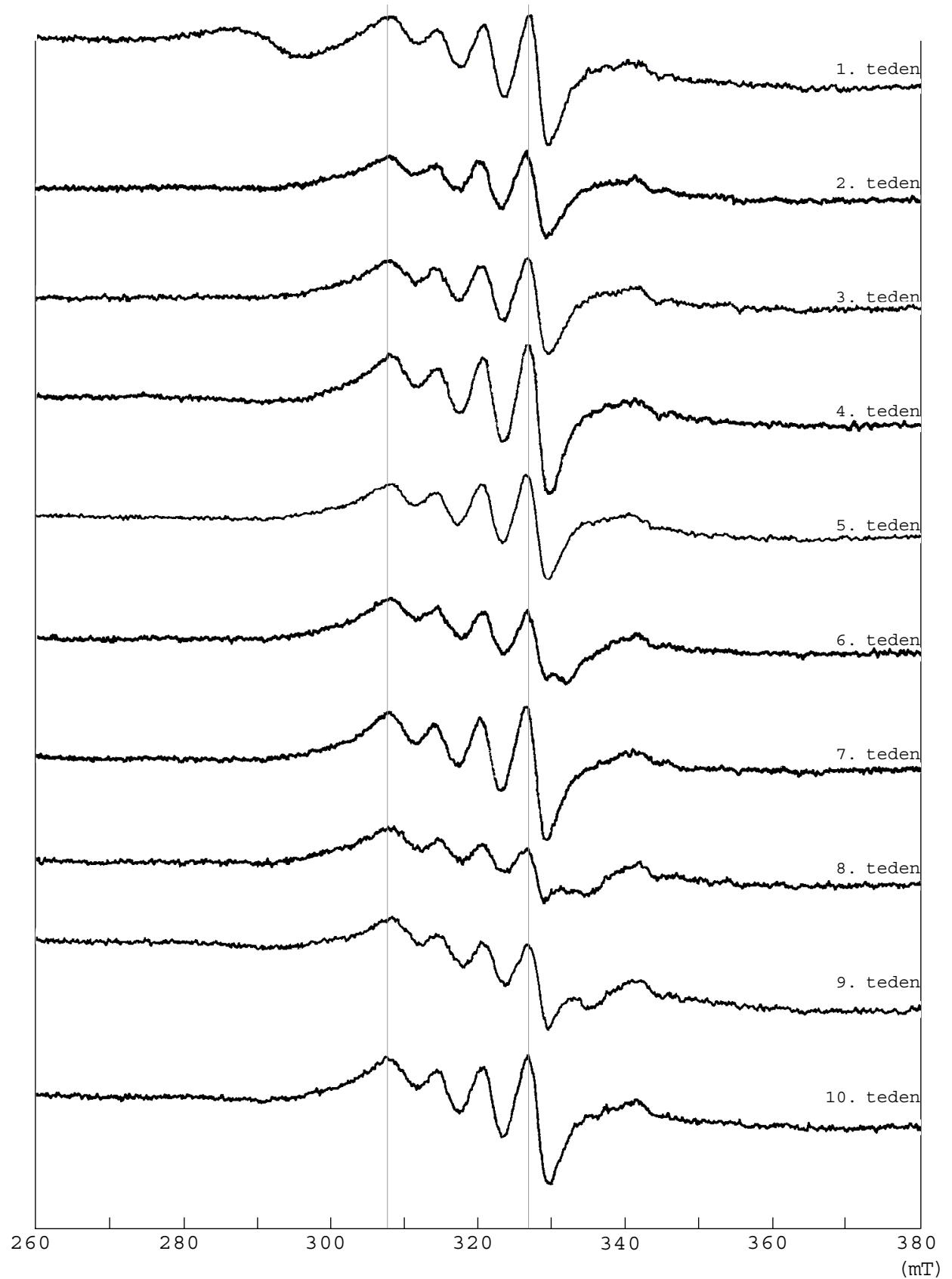
Poria placenta (pp2) - micelij



***Poria placenta* (pp2) - pod micelijem**

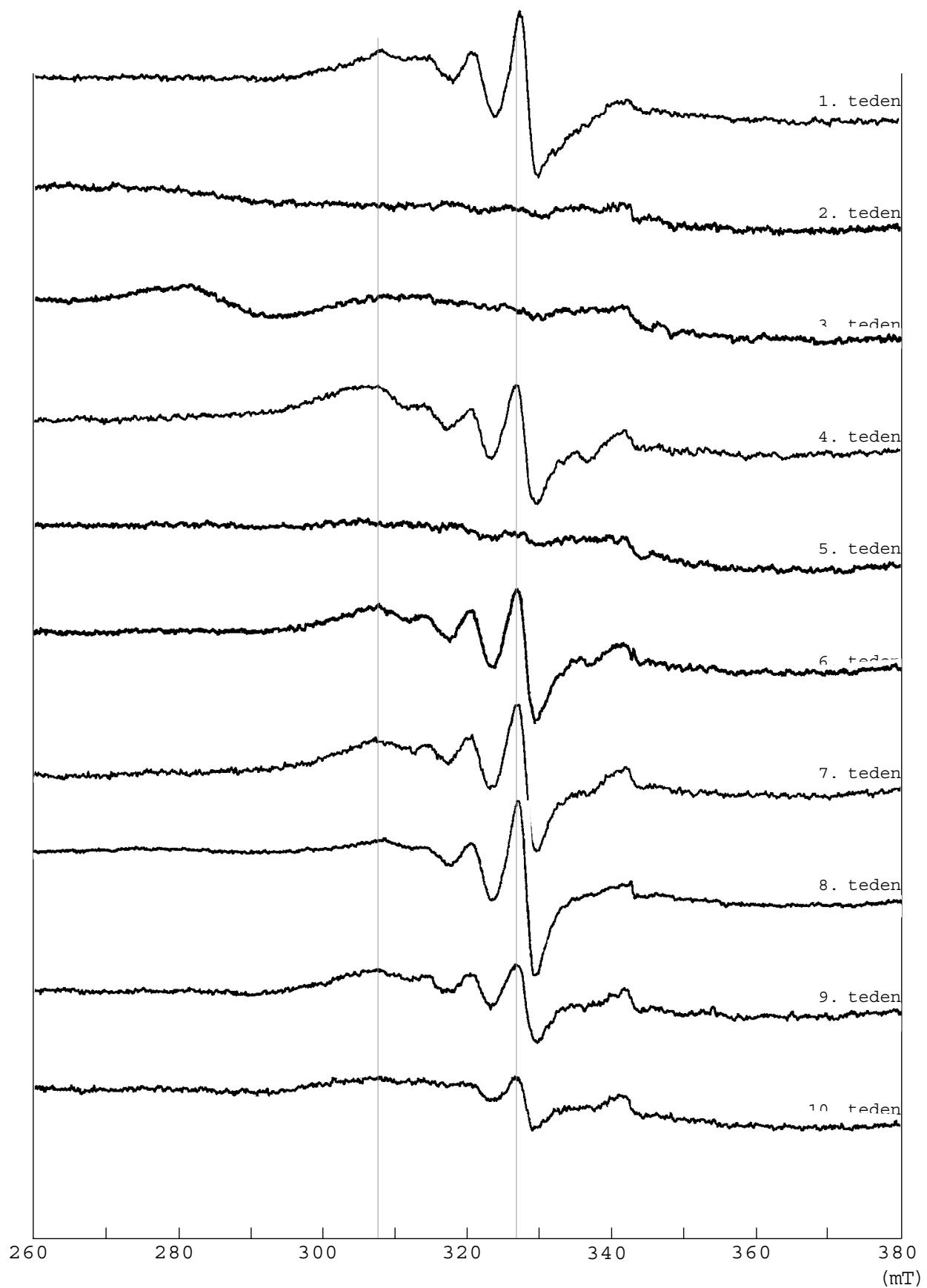


Poria placenta (pp2) - podlaga

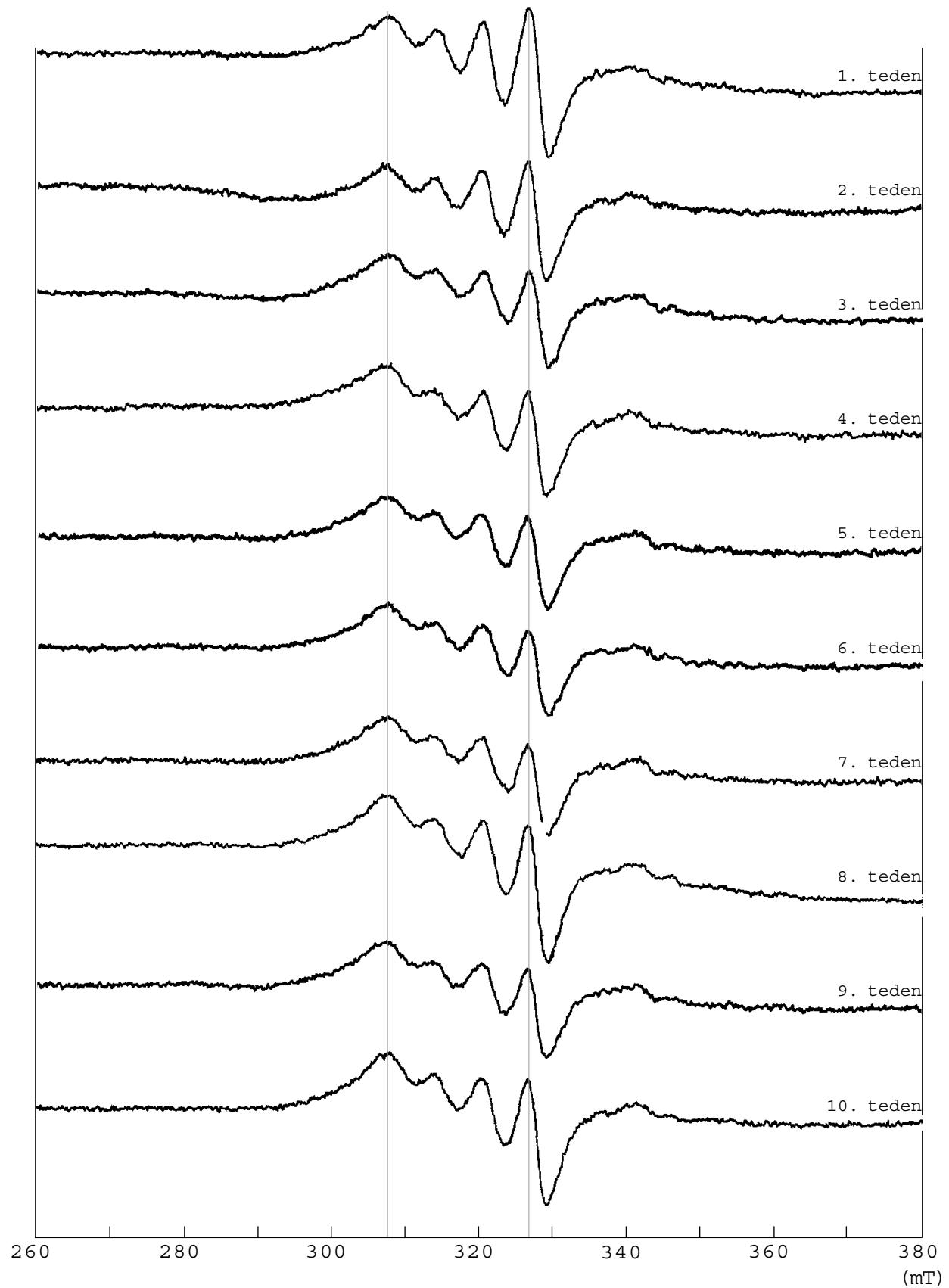


Priloga 3: EPR spektri *Antrodia vaillantii* (pv)

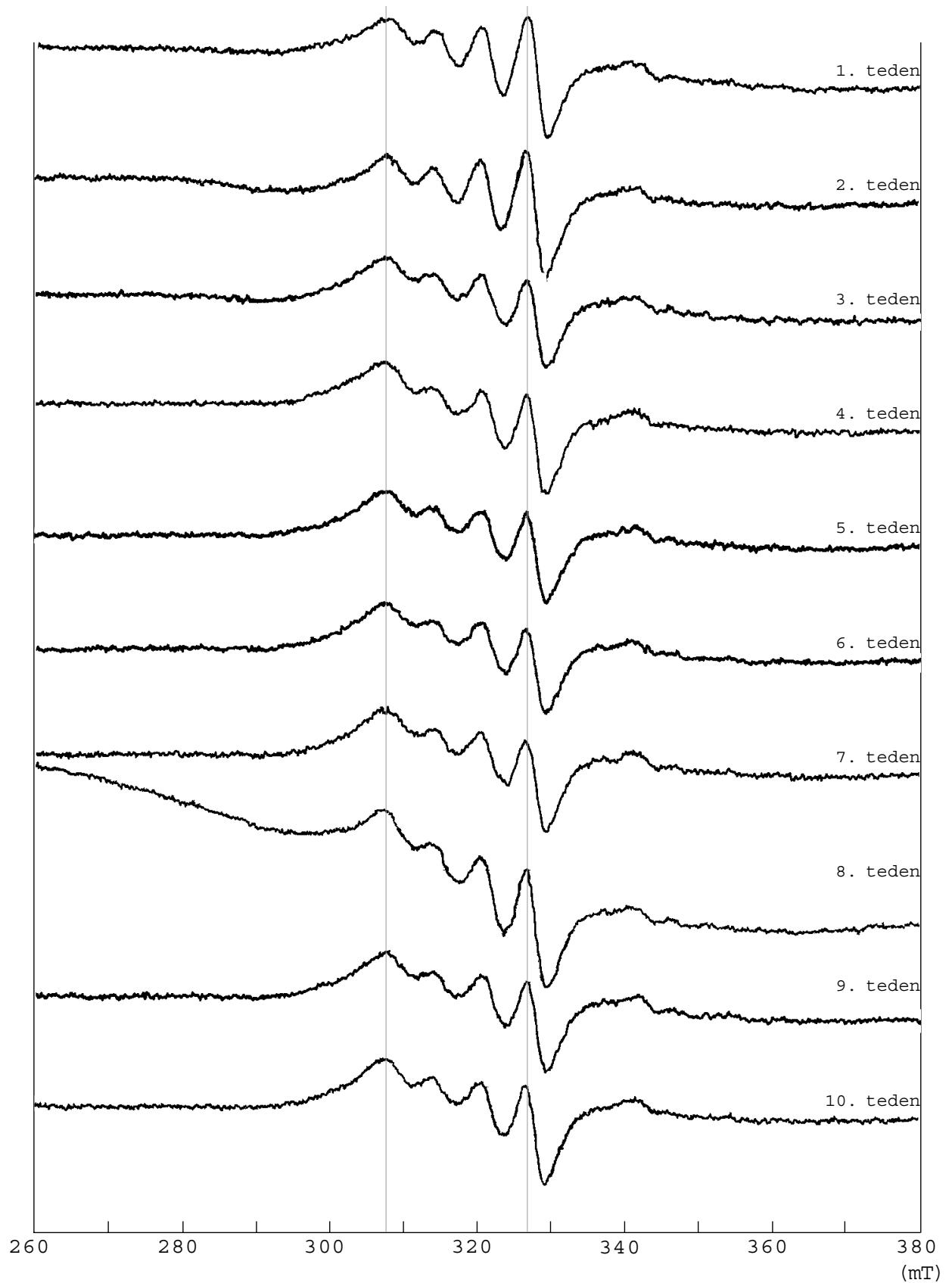
Antrodia vaillantii (pv) - micelij



***Antrodia vaillantii* (pv) - pod micelijem**

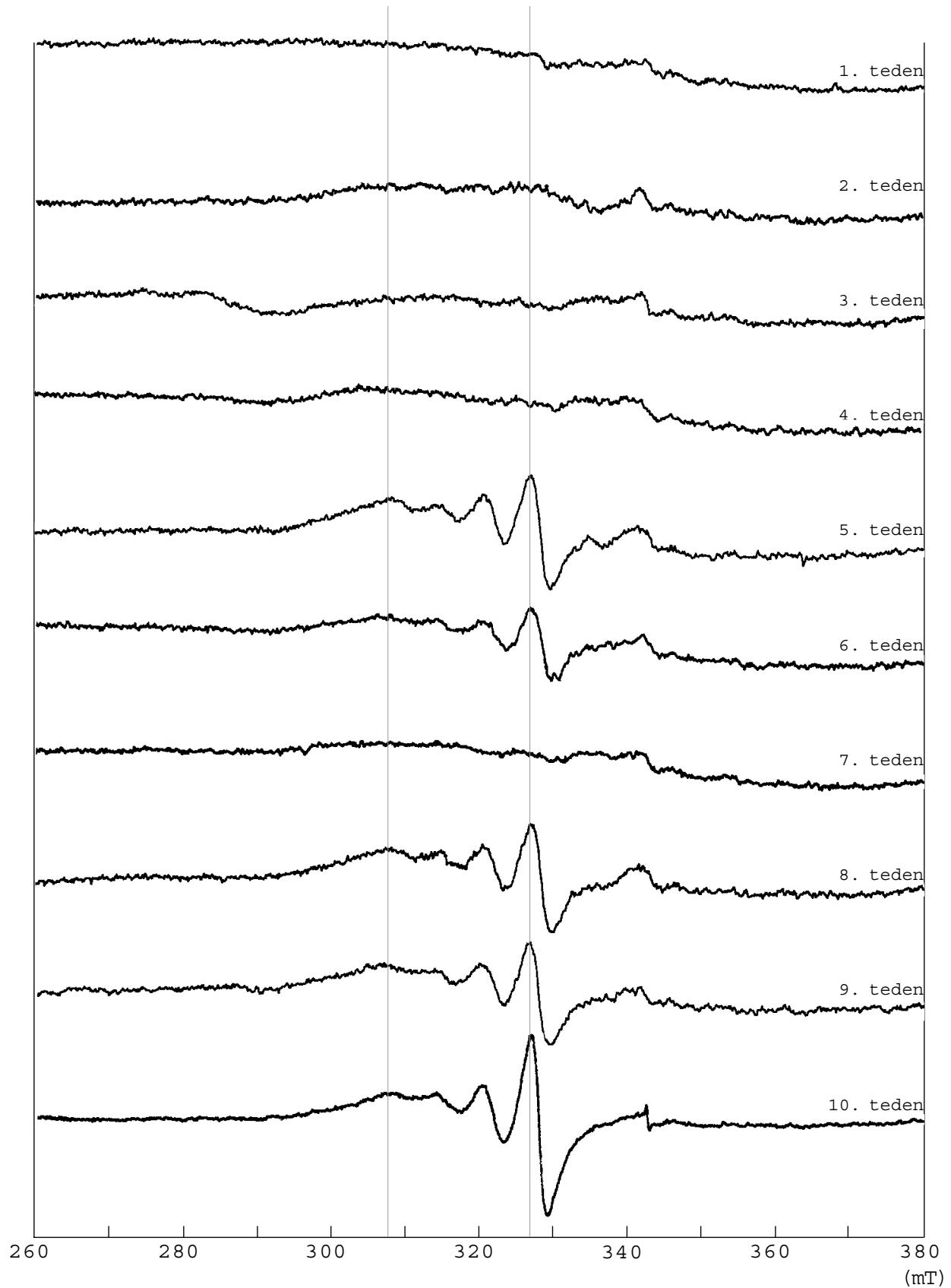


Antrodia vaillantii (pv) - podlaga

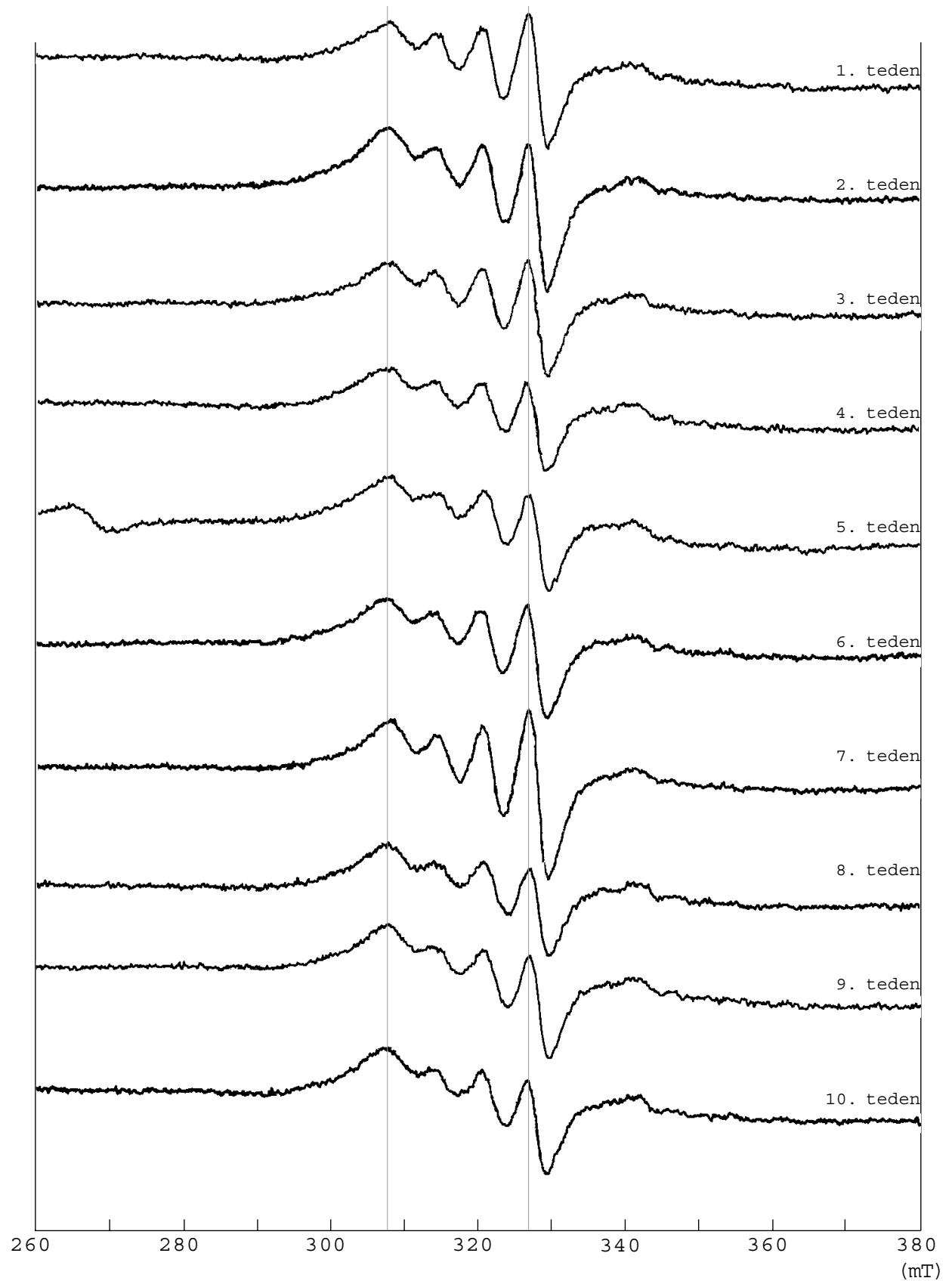


Priloga 4: EPR spektri *Antrodia vaillantii* (pv2)

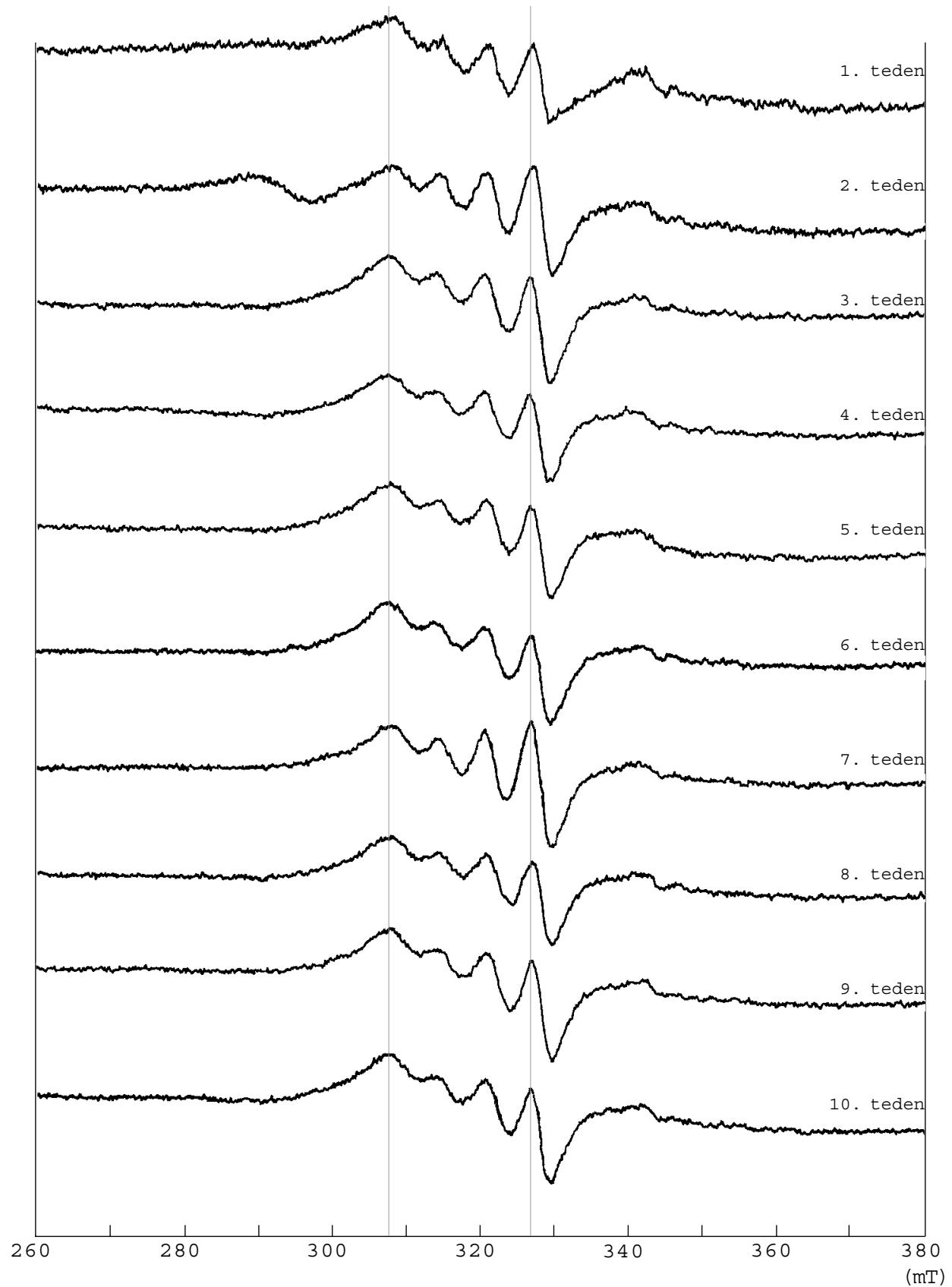
Antrodia vaillantii (pv2) - micelij



***Antrodia vaillantii* (pv2) - pod micelijem**

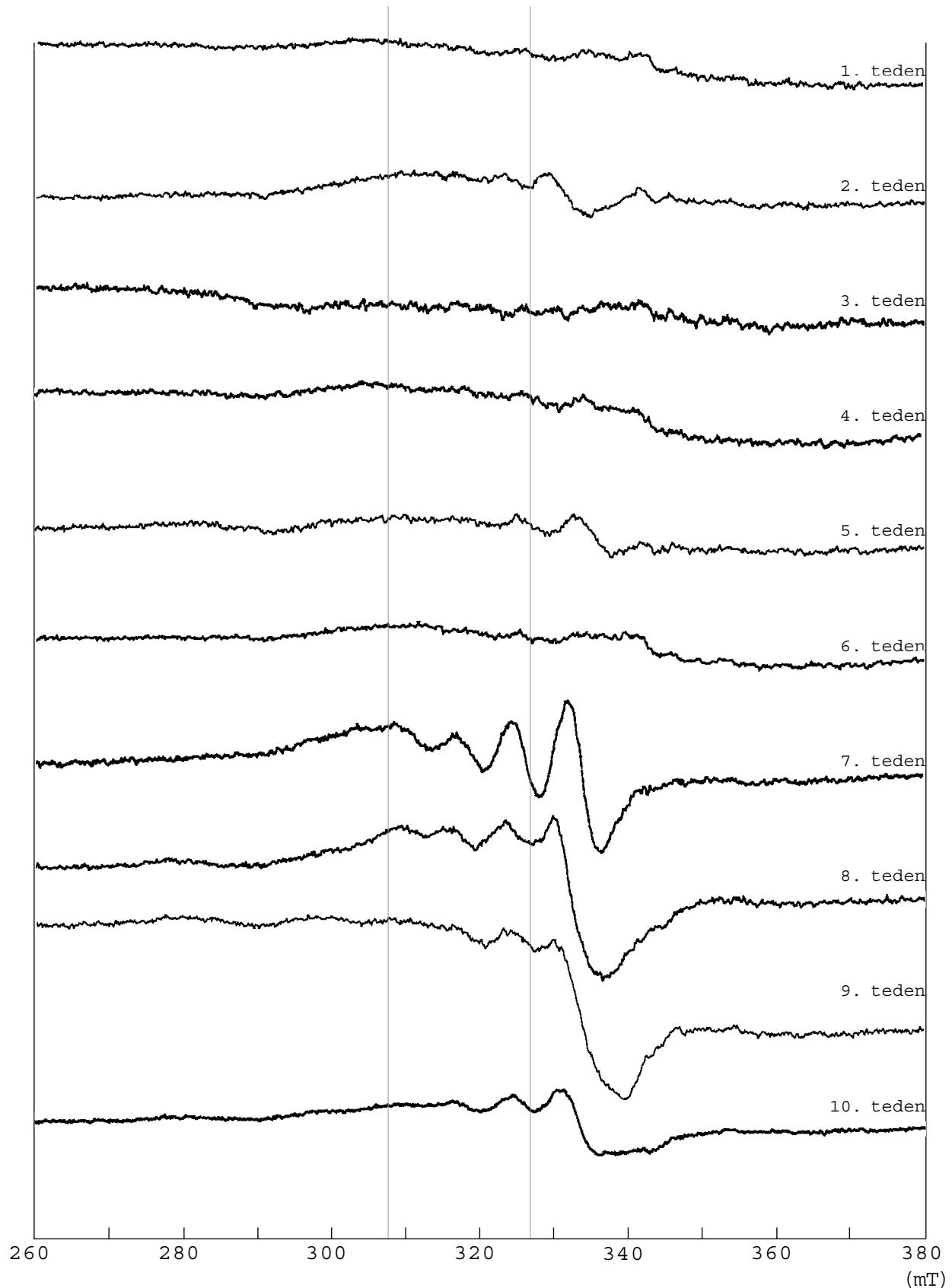


Antrodia vaillantii (pv2) - podlaga

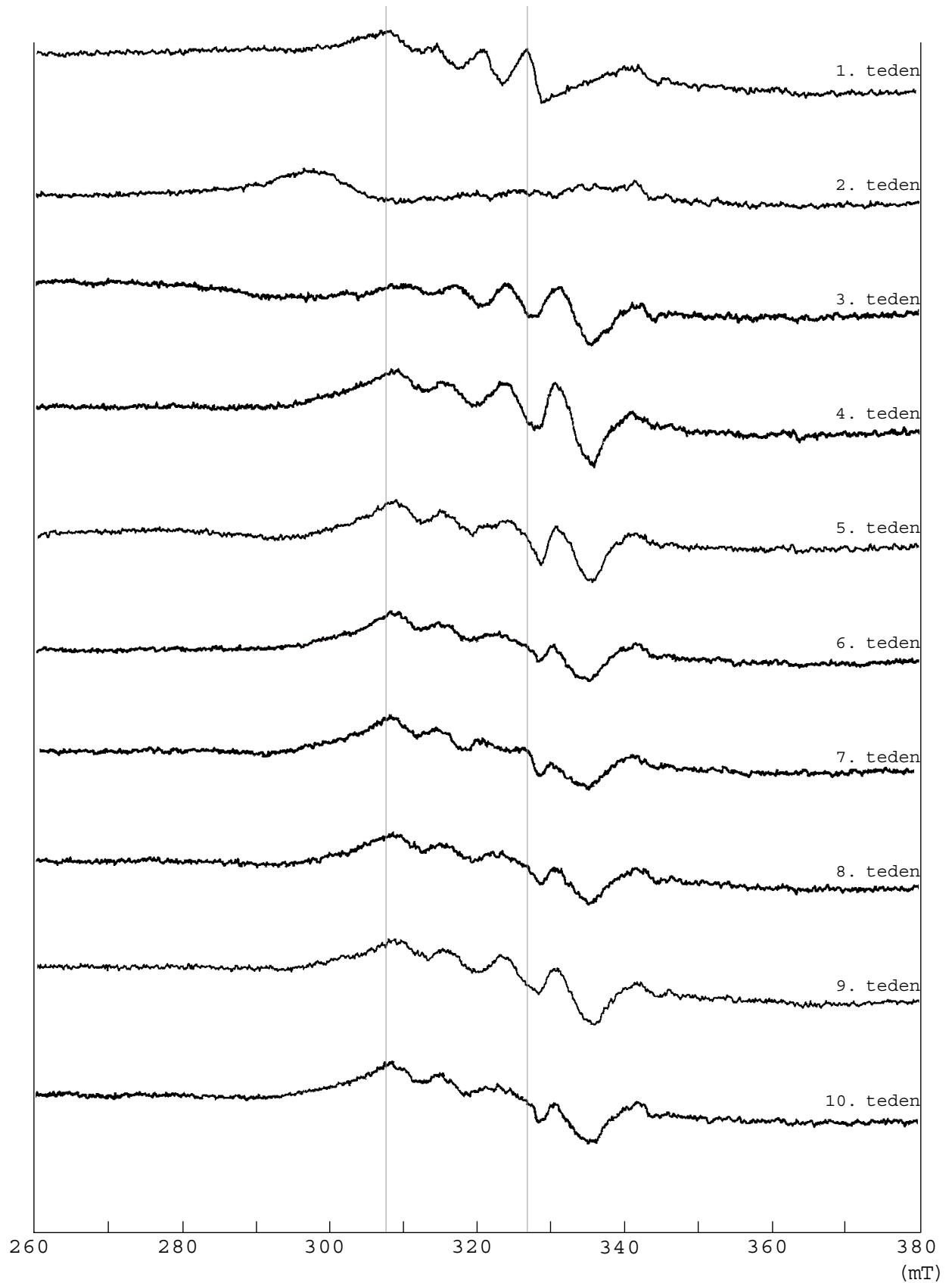


Priloga 5: EPR spektri *Trametes versicolor* (tv5)

Trametes versicolor (tv5) - micelij



***Trametes versicolor* (tv5) - pod micelijem**



***Trametes versicolor* (tv5) - podlaga**

