

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Jerneja MODIC

**FUNGICIDNO DELOVANJE POSAMEZNIH AKTIVNIH  
KOMPONENT V PRIPRAVKIH NA OSNOVI BAKRA IN  
ETANOLAMINA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**FUNGICIDAL PROPERTIES OF INDIVIDUAL ACTIVE INGREDIENTS IN  
COPPER-ETHANOLAMINE BASED PRESERVATIVE SOLUTIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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

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

Mentor: doc. dr. Miha Humar

Recenzent: prof. dr. Franc Pohleven

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Jerneja Modic

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 630\*844.41  
KG zaščita lesa/lesne glive/baker/etanolamin/razkroj/prirast  
AV MODIC, Jerneja  
SA HUMAR, Miha (mentor)/POHLEVEN, Franc (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo  
LI 2007  
IN FUNGICIDNO DELOVANJE POSAMEZNIH AKTIVNIH KOMONENT V  
PRIPRAVKIH NA OSNOVI BAKRA IN ETANOLAMINA  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP IX, 50 str., 7 pregl., 25 sl., 37 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Za zaščito lesa se zelo pogosto uporabljajo bakrove spojine. Slabost zaščitnih pripravkov na osnovi bakra je njihovo izpiranje ter pojav na baker tolerantnih sevov gliv. Za fiksacijo se bakrovim pripravkom v zadnjem času namesto kromovih spojin dodaja etanolamin ter oktanojska kislina. Bor in kvartarna amonijeve spojine pa imata vlogo sekundarnega fungicida in izboljšata odpornost proti tolerantnim glivam. V nalogi smo ugotavljali fungicidno delovanje posameznih sestavin novejših pripravkov na osnovi bakra, etanolamina, kvartarne amonijeve spojine, oktanojske kisline in bora. Zanimalo nas je ali med posameznimi sestavinami obstajajo sinergistične ali antagonistične fungicidne lastnosti. Interakcije med komponentami smo ugotavljali na smrekovih vzorcih po nestandardni mini blok metodi in z metodo presejalnega testa na hranilnem gojišču. Pri obeh testih smo uporabili 3 vrste gliv, in sicer: belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*), navadno tramovko (*Gloeophyllum trabeum*) in pisano ploskocevko (*Trametes versicolor*). Prišli smo do zaključkov, da med posameznimi sestavinami zaščitnega pripravka CuEOQ ni sinergističnih interakcij. Najnižja inhibitorna koncentracija najbolj učinkovite komponente zaščitnega pripravka določa tudi učinkovitost celotnega pripravka.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 630\*844.41  
CX wood preservation/wood fungi/copper/ethanolamine/decay/increase  
AU MODIC, Jerneja  
AA HUMAR, Miha (supervisor)/POHLEVEN, Franc (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology  
PY 2007  
TI FUNGICIDAL PROPERTIES OF INDIVIDUAL ACTIVE INGREDIENTS IN COPPER-ETHANOLAMINE BASED PRESERVATIVE SOLUTIONS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 50 p., 7 tab., 25 fig., 37 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Copper compounds are one of the most frequently used wood preservatives. Insufficient fixation and appearance of copper tolerant fungi are the most important weakness of these preservatives. Combination of ethanolamine and octanoic acid replaced chromium as copper fixative in preservative solutions. Boron and quaternary ammonium compounds serve as secondary fungicides against copper tolerant fungi. The purpose of our research was to elucidate fungicidal properties of all individual active ingredients: copper, ethanolamine, octanoic acid, quaternary ammonium compound and boron. The main goal was to estimate, whether there are any synergistic or antagonistic interactions among different ingredients of preservative solution CuEOQ. Interactions were studied using non-standard mini block procedure on spruce wood specimens, and by screening test method on nutrient medium. 3 wood decay fungi: *Antridia vaillantii*, *Gloeophyllum trabeum* and *Trametes versicolor* were used for these experiments. Our results showed no synergistic interactions among individual ingredients. The lowest inhibitory concentration defined the effectiveness of the preservative solution.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD IN POSTAVITEV PROBLEMA.....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ODPORNOST IN TRAJNOST LESA .....	3
2.2 GLIVE .....	5
2.3 ZAŠČITA LESA VČERAJ, DANES, JUTRI .....	7
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>10</b>
3.1 MATERIALI .....	10
<b>3.1.1 Zaščitni pripravki.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.2 Testne glive.....</b>	<b>11</b>
3.1.2.2 <i>Antrodia (Poria) vaillantii</i> .....	11
3.1.2.3 <i>Gloeophyllum trabeum</i> .....	12
3.1.2.4 <i>Trametes versicolor</i> .....	13
3.2 METODE .....	14
<b>3.2.1 Mini blok metoda.....</b>	<b>14</b>
3.2.1.1 Priprava raztopin, impregnacija in določanje navzema.....	14
3.2.1.2 Priprava in inokulacija hranilnega gojišča.....	16
3.2.1.3 Vstavljanje vzorčkov na okuženo hranilno gojišče .....	16
<b>3.2.2 Presejalni test.....</b>	<b>19</b>
3.2.2.1 Priprava raztopin .....	19
3.2.2.2 Priprava petrijevk in cepitev gliv .....	20
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>21</b>
4.1 MOKRI NAVZEM.....	21
4.2 ODPORNOST ZAŠČITENEGA LESAPROTI GLIVAM RAZKROJEVALKAM .....	23
<b>4.2.2 Vpliv bakrovega(II) sulfata (CuS) na vlažnost in izgubo mase.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.3 Vpliv etanolamina (EA) in etanolamina z dodatkom oktanojske kisline (EA + OK) na vlažnost in izgubo mase.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.4 Vpliv topbora (B) na vlažnost in izgubo mase .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.5 Vpliv kvartarne amonijeve spojine (QUAT) na vlažnost in izgubo mase ....</b>	<b>30</b>

<b>4.2.6</b>	<b>Vpliv zaščitnega sredstva CuEOQ na vlažnost in izgubo mase .....</b>	<b>31</b>
4.3	REZULTATI PRESEJALNEGA TESTA.....	33
<b>4.3.1</b>	<b>Vpliv bakrovega(II) sulfata (CuS) na rast gliv .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Vpliv etanolamina z dodatkom oktanojske kisline (EA + OK) na rast gliv.</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Vpliv topbora (B) na rast gliv.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Vpliv kvartarne amonijeve spojine (QUAT) na rast gliv.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Vpliv komercialnega zaščitnega sredstva CuEOQ na rast gliv.....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>47</b>
	<b>ZAHVALA .....</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Evropski razredi izpostavitve lesa glede na mesto uporabe .....	3
Preglednica 2: Evropski razredi izpostavitve lesa glede na povzročitelje.....	4
Preglednica 3: Sevi lesnih gliv, uporabljeni pri izvedbi poizkusov .....	11
Preglednica 4: Sestavine zaščitnega pripravka CuEOQ .....	14
Preglednica 5: Prikaz redčenja pripravkov .....	15
Preglednica 6: Koncentracije raztopin za presejalni test.....	19
Preglednica 7: Povprečni mokri navzem glede na zaščitno sredstvo in koncentracijo aktivnih učinkovin .....	21

## KAZALO SLIK

	Str:
Slika 1: Vzorci izpostavljeni lesnim glivam .....	17
Slika 2: Barvna raznolikost hranilnih gojišč glede na različne koncentracije zaščitnih pripravkov.....	20
Slika 3: Povprečni navzem smrekovih vzorcev posameznega zaščitnega pripravka v odvisnosti od koncentracije .....	23
Slika 4: Smrekovi vzorčki izpostavljeni miceliju testnih gliv po osmih tednih izpostavitve.....	23
Slika 5: Absolutno suhi smrekovi vzorčki po osmih tednih izpostavitve glivam v skladu z mini blok testom v primerjavi z neizpostavljenim vzorčkom (v sredini).....	24
Slika 6: Povprečna izguba mase in vlažnost kontrolnih smrekovih vzorcev.....	25
Slika 7: Primerjava kontrolnih smrekovih vzorcev po osmih tednih izpostavitve .....	25
Slika 8: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) bakrovega(II) sulfata na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev .....	27
Slika 9: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) etanolamina in oktanojske kisline z dodatkom etanolamina na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev .....	29
Slika 10: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) topbora na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev .....	30
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) kvartarne amonijeve spojine na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev .....	31
Slika 12: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) CuEOQ na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev .....	32
Slika 13: Kontrolni vzorci presejalnega testa na 13. dan.....	33
Slika 14: Kontrolni vzorci mini blok testa po osmih tednih izpostavitve.....	33
Slika 15: Povprečni prirast micelija glive <i>A. vaillantii</i> v odvisnosti od koncentracije CuS (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	34
Slika 16: Povprečni prirast micelija glive <i>G. trabeum</i> v odvisnosti od koncentracije CuS (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	35



Slika 17: Povprečni prirast micelija glive <i>T. versicolor</i> v odvisnosti od koncentracije CuS (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	36
Slika 18: Povprečni prirast micelija glive <i>G. trabeum</i> v odvisnosti od koncentracije EA + OK (preglednica 6) v hranilnem gojišču.....	37
Slika 19: Povprečni prirast micelija glive <i>T. versicolor</i> v odvisnosti od koncentracije EA + OK (preglednica 6) v hranilnem gojišču.....	38
Slika 20: Povprečni prirast micelija glive <i>A. vaillantii</i> v odvisnosti od koncentracije QUAT (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	39
Slika 21: Povprečni prirast micelija glive <i>G. trabeum</i> v odvisnosti od koncentracije QUAT (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	40
Slika 22: Povprečni prirast micelija glive <i>T. versicolor</i> v odvisnosti od koncentracije QUAT (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	40
Slika 23: Povprečni prirast micelija glive <i>A. vaillantii</i> v odvisnosti od koncentracije CuEOQ (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	42
Slika 24: Povprečni prirast micelija glive <i>G. trabeum</i> v odvisnosti od koncentracije CuEOQ (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	43
Slika 25: Povprečni prirast micelija glive <i>T. versicolor</i> v odvisnosti od koncentracije CuEOQ (preglednica 6) v hranilnem gojišču .....	43

## 1 UVOD IN POSTAVITEV PROBLEMA

V poplavi sintetičnih materialov les še vedno ostaja eden izmed ključnih gradbenih materialov. Njegova naravnost, toplina predvsem pa sposobnost obnavljanja in vsestranska uporabnost so ključnega pomena za njegovo uporabo. Na žalost noben naravni material ni večer, zato ga poizkušamo zaščititi pred abiotskimi (temperatura, vlaga, UV sevanje...) in biotskimi (glive, insekti, bakterije...) dejavniki. S tem omogočimo večjo odpornost in trajnost lesa ter razširimo spekter uporabe tako v gradbeništvu kot tudi v pohištveni industriji.

V Sloveniji prevladujejo manj odporne drevesne vrste (smreka, bukev...) zato je njihovo trajnost velikokrat potrebno izboljšati s kemično zaščito. Taka zaščita pa ni vedno najbolj ugodna za okolje, zato si okoljske organizacije in Uradi za kemikalije prizadevajo uzakoniti uporabo okolju prijaznih zaščitnih sredstev. Biocidne pripravke naj bi uporabljali le-tam, kjer je to nujno potrebno. Z vedno strožjimi zakoni (Direktiva o biocidih (BPD, 1998), REACH) silijo proizvajalce zaščitnih sredstev k razvoju novih postopkov in naravi čim manj škodljivih zaščitnih sredstev. Cilj proizvajalcev zaščitnih pripravkov je izdelati učinkovit in čimbolj selektivni zaščitni pripravek, ki bo okoljsko sprejemljiv in po koncu življenjske dobe povsem razgradljiv.

V osnovi delimo preventivno zaščito lesa na nekemično in kemično zaščito lesa, le-to pa bomo preučevali v tej nalogi. Z zaščito lesa so se ukvarjali že v obdobju antike, kar dokazuje, da je les skozi zgodovino ohranil svojo vrednost in da so mu že tedaj posvečali posebno pozornost.

S pojavom industrijske zaščite lesa v 19. stoletju (Kervina – Hamović, 1990) ter uporabo kerozotnega olja in vodotopnih organskih soli, lahko govorimo o novodobni zaščiti lesa. Bistvenega pomena v zgodovini zaščite lesa je Bucherjeva metoda impregnacije (1832), pri kateri je vodo v sveže posekani hlodovini (predvsem beljavi) zamenjal z vodno raztopino bakrovega(II) sulfata oziroma modro galico (Eaton, 1993). To zaščitno sredstvo ima veliko pomanjkljivost, slabo se fiksira v les in se iz njega izpira. Problem izpiranja so leta 1913 zmanjšali z uporabo kromovih(VI) spojin, ki se uporabljajo še danes. Zaradi njihove

kancerogenosti se uporaba zmanjšuje, s časom pa naj bi jo celo prepovedali (Zyskowski in Kamdem, 1989; Tang in Ruddick, 1994; Jiang in Ruddick, 1999; Zhang in Kamdem, 2000; Humar, 2000; Humar in sod., 2003). Zato potekajo intenzivne raziskave vezave bakrovih pripravkov v les s kromu alternativnimi spojinami.

Ena izmed možnosti je uporaba vodne raztopine amoniaka (Pohleven in sod., 1994; Dagarin in sod., 1996), vendar zaradi ostrega vonja, draženja sluznice in oči in spremenjenega videza lesa po obdelavi, ni prišla v veljavo. Amoniak so nadomestili z amini (Tang in Ruddick, 1994; Zhang in Kamdem, 2000), predvsem z etanolaminom, pa tudi trietanolaminom in dimcarbom. Le-ti so danes že sestavina številnih komercialnih pripravkov za zaščito lesa, kot na primer: Tanalith E, Impralit-KDS, Wolmatin CX10, Kuproflorin, ... Amini v osnovi izboljšajo vezavo, dodani sekundarni biocidi pa izboljšajo odpornost na baker tolerantnim glivam in insektom (Humar in sod., 2003). Interakcij aminov in bakrovih spojin z lesom v celoti še ne poznamo. Znano pa je, da le-ti z lesom reagirajo in da se njihovi pripravki vežejo tako na lignin, kot tudi na celulozo.

Na katedri za patologijo in zaščito lesa so v raziskovalni skupini uspešno razvili pripravek na osnovi bakra in etanolamina, kjer je vezava bakra v les skoraj primerljiva s pripravki na osnovi bakra in kroma. Ta rešitev je tudi zaščitena z mednarodnim patentom (Humar in Pohleven, 2006) in bo v kratkem naprodaj pod komercialnim imenom Silvanol-in. V diplomski nalogi smo raziskovali vpliv posameznih sestavin tega s patentom zaščenega pripravka na delovanje treh vrst lesnih gliv. Zanimalo nas je ali med posameznimi sestavinami prihaja do sinergističnih ali antagonističnih interakcij. Ta podatek je zelo pomemben za optimizacijo sestave pripravka pri proizvodnji zaščitnega pripravka.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ODPORNOST IN TRAJNOST LESA

Les, kot naravni material je podvržen propadanju. Ta proces je v naravi nujno potreben za ohranjanje naravnega ravnovesja. Do propadanja lahko pride zaradi biotskih in abiotskih dejavnikov. Med pomembne abiotske dejavnike prištevamo ogenj, saj uniči ogromne količine lesne mase in dejansko smo proti njem do neke meje nemočni. Kljub temu, da je biotske dejavnike lažje nadzorovati, nam še vedno precej nevšečnosti povzročajo glive. Lesne glive so glavni predstavnik biotskih dejavnikov razkroja na našem območju. Zavedamo se, da je razpad lesa nujno potreben za ravnovesje, vendar ga v praksi skušamo omejiti. Ta proces za gospodarstvo poteka bistveno prehitro in nam s tem povzroča precej težav, tako ekonomskih kot tudi tehničnih.

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

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

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

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

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

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

## 2.2 GLIVE

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

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

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

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

Med najhujše uničevalke lesa sodijo ravno glive rjave trohnobe. Najpogosteje jih najdemo na lesu iglavcev. Razkrajajo predvsem celulozo, medtem ko ostane lignin skoraj nepoškodovan. Okužbo prepoznamo po temnejši rjavi barvi in razpokah v obliki prizem, pri čemer les izgublja na masi ter mehanskih lastnostih. V laboratorijskih razmerah se v štirih mesecih zmanjša dinamična trdnost do 55 %, tlačna trdnost do 20 %, torzijska trdnost do 50 % (Seifert, 1968). V začetnih fazah razkroja se okužba širi po lumnih celic, s prodiranjem hif preko pikenj, strženovih trakov in aksialnega parenhima. Sčasoma razgradijo celične stene in si s tem same ustvarijo prehode (Eaton in Hale, 1993). Posledično lahko trdimo, da je prodor hif v celično steno bolj kemične, kot mehanske narave.

Naravni zakoni v osnovi poskrbijo, da vlada v naravi ravnovesje in tako je tudi pri glivah. Medtem ko glive rjave trohnobe razkrajajo celulozo, so glive bele korozivne trohnobe specializirane za razkroj lignina, čeprav jim ustrezajo tudi ostale komponente lesa (sladkorji, proteini). Bela trohnoba je značilna za les listavcev, vendar lahko razkrajata tudi les iglavcev. Trohnoba je dobila ime po barvi okuženega lesa, ki je v največji meri posledica delovanja encima peroksidaza. Ta s pomočjo peroksida razgrajujejo lignin, pri čemer les, zaradi oksidativne razgradnje, postaja vse svetlejši. Specifično belo trohnobo ali piravost pa prepoznamo tudi po temnih črtah. Te ločujejo različne stopnje razkroja lesa oziroma barierne cone. Tak les je vlaknast, se lamelno cepi, oslabijo pa mu tudi mehanske lastnosti. V laboratorijskih razmerah se v štirih mesecih razkroja zmanjša dinamična trdnost do 35 %, tlačna trdnost do 10 % in torzijska trdnost do 18 % (Seifert, 1968).

### 2.3 ZAŠČITA LESA VČERAJ, DANES, JUTRI

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

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

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

Leta 1838 je Bethell razvil metodo globinske impregnacije lesa s katero se začenja doba industrijske zaščite. S tem je omogočil zaščito železniških pragov in drogov s kreozotnim oljem, ter tako pospešil gradnjo železniške in električne infrastrukture. Bethellovim raziskavam je sledil Boucherie, ki je patentiral zaščito lesa z bakrovim(II) sulfatom, le-ta pa je osrednje zaščitno sredstvo še danes.



Na začetku 20. stoletja so večino raziskav na področju zaščite lesa namenjali razvoju vodotopnih pripravkov na osnovi floridov, kromatov, nitrofenolov in arzenatov. Prelomnico v razvoju zaščitnih pripravkov predstavlja Bruningovo odkritje (1913), da kromove spojine bistveno izboljšajo vezavo aktivnih komponent in omilijo korozijo materialov med obdelavo zaščenega lesa. To odkritje je predstavljalo razcvet uporabe zaščitnih pripravkov. Prvi tak zaščitni pripravek je patentiral (1926) Gilbert Gunn, na osnovi bakrovega(II) sulfata in natrijevega dikromata. To zaščitno sredstvo pa ni bilo odporno proti termitom in tolerantnim izolatom gliv (Humar in Pohleven, 2005). Leta 1933 ga je izboljšal Sonti Kamesan z odkritjem, da krom poleg bakra, fiksira tudi arzenove spojine. Razvil je vodotopni pripravek na osnovi kromovih, bakrovih in arzenovih spojin oziroma CCA (Humar, 2004). Osnovna sestava tega pripravka se uporablja v nekaterih državah še danes. V začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so, zaradi okoljevarstvenih in zdravstvenih razlogov, pričeli z iskanjem alternativnih sredstev zdravju škodljivima kromu in arzenu. Arzenove spojine niso bile dodane samo pripravkom na osnovi bakra in kroma temveč tudi na osnovi bakra in amoniaka. Tak pripravek z imenom Chemonite je leta 1940 patentiral Gordon. Zaradi pritiska javnosti, so sčasoma pričeli arzen opuščati. Danes so, med najbolj razširjenimi alternativami arzenu, na voljo borove spojine (CCB).

Med novejšje kombinacije v bakrovih pripravkih uvrščamo amine, kot alternativo neustreznemu amoniaku. Bakrove učinkovine se najpogosteje kombinirajo z etanolaminom ali trietanolaminom. Za izboljšanje insekticidnih lastnosti in kot sekundarni fungicid, se jim dodaja bor ter kvartarne amonijeve spojine (Humar 2005). Na žalost se tudi bor iz lesa precej izpira. Raziskave so pokazale podobno učinkovitost (insekticid in primarni fungicid) v pripravkih na osnovi bakrovih spojin, amina in azolov. Nikakor ne moremo mimo dejstva, da so moderna zaščitna sredstva bistveno manj učinkovita kot CCA in CCB, zato moramo les prepojit z večjo količino pripravka (načeloma šestkrat več kot CCA), pri tem pa prihaja do izpiranja večjih količin težkih kovin. Dejansko je vprašljiva smotrnost in upravičenost impregnacije s takimi zaščitnimi pripravki. Tako bodo verjetno v prihodnosti, zaradi finančnih, ekoloških in fungicidnih lastnosti, pripravki še vedno vsebovali baker. Vsekakor pa bo potrebna obilica raziskav na področju alternative kromovih spojin za izboljšanje fiksacije bakra v les.

Klasična zaščitna sredstva na osnovi kromovih, bakrovih ter borovih ali arzenovih spojin vse bolj nadomeščajo nove rešitve. Med najbolj ustreznimi novejšimi pripravki so tista, kjer se kot fiksator namesto kromovih spojin uporabljajo etanolamin. Na trgu je že na voljo kar nekaj pripravkov na tej osnovi; ACQ (CSI), Tanalith – E (Arch), Kuproflorin (Regeneracija) (Humar in Pohleven, 2005).

Bakrove učinkovine se bodo v zaščiti lesa uporabljale tudi prihodnosti. Po vsej verjetnosti jih bomo uporabljali toliko časa, dokler ne bomo razvili cenovno dostopnejše in okolju prijaznejše alternative.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

Za testiranje fungicidnega delovanja posameznih aktivnih komponent v pripravku smo izvedli dva nestandardna testa in sicer presejalni ter mini blok test. Z izbranimi metodama smo testirali učinkovitost zaščitnega pripravka in vseh pet sestavnih komponent.

Pri izvedbi obeh testov smo uporabili sledečo opremo:

- Laboratorijsko steklovino (epruvete, petrijevke, čaše, bučke, merilne valje...)
- Pipeta, proizvajalca BIOHIT
- Špiritni gorilnik
- Eksikator
- Aluminijsko folijo
- Elektronsko tehtnico, proizvajalca Sartorius
- Vakuumsko tlačno komoro, proizvajalca Kambič
- Avtoklav, proizvajalca Sutjeska
- Brezprašno komoro, proizvajalca ISKRA
- Sušilnik, proizvajalca Kambič
- Rastni komori, proizvajalcev LTH in Kambič

##### 3.1.1 Zaščitni pripravki

Kot pove že naslov naloge, nas je zanimalo fungicidno delovanje posameznih sestavnih komponent v pripravku na osnovi bakra in etanolamina. Za testiranje smo uporabili zaščitni pripravek CuEOQ, ki je komercialno dostopen pod imenom Silvanol-In. Sestavljen je iz bakrovega(II) sulfata, etanolamina, kvartarne amonijeve spojine, oktanojske kisline ter borove spojine. Za vsak test smo pripravili različne koncentracije posameznih raztopin in z njimi impregnirali smrekove vzorčke oziroma smo aktivne učinkovine dodali v hranilno gojišče.

Vse kemikalije, razen Topbora (proizvajalec Silkem), je proizvedlo podjetje MERCK, hranilno gojišče pa je proizvod podjetja Difco.

### 3.1.2 Testne glive

Uporabili smo seve treh različnih vrst gliv (preglednica 3), in sicer povzročiteljice bele (*Trametes versicolor*) in rjave trohnobe (*Antrodia vaillantii*, *Gloeophyllum trabeum*). Izolate kultur gliv za testiranje smo dobili iz trajne zbirke gliv na Katedri za patologijo in zaščito lesa, Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti. Čeprav vemo, da v naravi glive bele trohnobe redkeje uspevajo na lesu iglavcev, smo s *Trametes versicolor* vseeno okužili smrekovino. V sterilnih laboratorijskih pogojih pisana ploskocevka namreč nima konkurence, tako da lahko razkrajata tudi les iglavcev (Humar, 2002).

Preglednica 3: Sevi lesnih gliv, uporabljeni pri izvedbi poizkusov

Latinsko ime	Slovensko ime	Okrajšava	Poreklo
<i>Antrodia vaillantii</i>	Bela hišna goba	Pv <sub>2</sub>	BF (ZIM L037)*
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Navadna tramovka	Gt <sub>2</sub>	BF (ZIM L017)*
<i>Trametes versicolor</i>	Pisana ploskocevka	Tv	BF (ZIM L057)*

\* Raspor in sod., 1995

#### 3.1.2.2 *Antrodia (Poria) vaillantii*

*Antrodia vaillantii* (Pv<sub>2</sub>) ali belo hišno gobo najdemo predvsem v severni in srednji Evropi. Okužuje vlažen les iglavcev, čeprav jo občasno najdemo tudi na lesu listavcev. Povzroča rjavo destruktivno trohno, zato les hitro izgublja trdnost. Po nekaterih virih se udarna žilavost močno zmanjša že takrat, ko komaj zaznamo izgubo mase. Posledično povzroča ogromno škodo na tehničnem lesu. Kot posledica hitre depolimerizacije so lomi kratki in vlaknati, pride pa tudi do pojava nenormalnega longitudinalnega krčenja lesnih vlaken in zmanjšane natezne trdnosti. Pojavlja se kot razkrojevalka vgrajenega lesa in lesa, ki je v stiku z zemljo (drogovi, stebri v rudnikih...) in celo na stoječih drevesih. Najdemo jo tudi v prostorih, kjer prihaja do občasnega navlaževanja (kopalnica), sopare (kuhinja) in talne vode (kleti). Bistvenega pomena je dejstvo, da ne okužuje zračno suhega lesa.

Na okuženi hlodovini se na spodnji strani pojavi bogato izoblikovano belo površinsko podgobje. Podgobje se širi v obliki ledenih rož na oknih. Iz podgobja se razvijejo beli rizomorfi, ki so lahko debeli do 4 mm. Rizomorfi ostanejo beli in prožni tudi ko goba ostari. Z rizomorfi goba prodira skozi stene. Trosnjaki so plutasti, različno veliki ter na les priraščajo kot blazinice. Na površini je trosovnica obrnjena navzgor. Barva trosnjakov se s starostjo spreminja; mladi so beli, starejši pa so rumenkasti. Trosovnico sestavljajo cevčice nepravilnih oblik. Trosi so elipsasto ovalni ali cilindrični.

Optimalni pogoji za rast bele hišna gobe so pri temperaturi 27 °C in 40 % lesni vlažnosti. Pri takih pogojih lahko dnevni prirast gobe znaša do 12,5 mm. Posebno ji prija vlaga, ki prodira v les v obliki vodnih kapljic oziroma kondenza. V osnovi bela hišna goba zelo dobro prenaša izsušitev. Po nekaterih virih naj bi gliva celo po petih letih sušnega obdobja zopet pričela z rastjo, vendar samo če vlažnost lesa ponovno doseže 40 % (Unger in sod., 2001).

Zanimivo je tudi dejstvo, da je gliva tolerantna na baker. Dejstvo potrjujejo opažanja v evropskih državah, saj gliva okuži in razkrajja, s pripravki CCA ali CCB impregniran les, ki se uporablja v stiku z zemljo.

### 3.1.2.3 *Gloeophyllum trabeum*

*Gloeophyllum trabeum* (Gt<sub>2</sub>) ali navadna tramovka okužuje les iglavcev (smreka, bor) kot tudi listavcev (bukev, robinja). Po svetu je precej razširjena, saj jo poznajo v Evropi, Avstraliji, Afriki in Ameriki. Tako kot *Antrodia vaillanti* tudi, navadna tramovka povzroča rjavo prizmatično trohnobo in je s tem nevarna razkrojevalka gradbenega in stavbenega lesa. Zanimivost lesa, okuženega z navadno tramovko, je barva jedrovine v končni fazi razkroja, saj se pogosto le-ta obarva rdeče. Okužuje predvsem lesene konstrukcije (ostrešja, mostovi, okenski okvirji, podboji, zunanje talne obloge...). Pojavi pa se tudi na lesu, ki je v stiku z zemljo (drogovi, pragovi, v rudnikih, na ograjah...)

Gliva ima tanek klobuk, ki je sprva temno rumen s starostjo pa v večini primerov potemni do temno rjave barve. Značilnost glive je podgobje, saj ima le-ta obliko himenofor oziroma predstavlja nekakšen prehod iz luknjic v lističe. Razpored luknjic in lističev je nepravilen, prav tako pa tudi njihova oblika. Trosi so brezbarvni in cilindrične oblike.

Optimalni pogoji za razvoj glive so temperatura 35 °C in vlažnost med 30 in 50 %. Tudi pri tej glivi naj bi podgobje in trosi v suhem stanju ohranili kalivost za več kot leto dni.

#### 3.1.2.4 *Trametes versicolor*

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

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

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

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Mini blok metoda

Za mini blok test smo pripravili 500 nepoškodovanih smrekovih vzorčkov brez vidnih mehanskih poškodb, madežev, grč, smolnih kanalov... Dimenzije vzorcev niso standardizirane. Mi smo uporabili vzorce dimenzij  $0,5 \times 1,0 \times 3,0$  cm. Metoda testiranja je podobna standardi metodi SIST EN 113 (1996). Pred impregnacijo je bilo potrebno vzorčke prebrati, obrusiti in oštevilčiti.

Vzorci so bili impregnirani v vakuumsko tlačni komori po postopku polnih celic. Uporabili smo pripravek CuEOQ in vodne raztopine posameznih sestavin pripravka različnih koncentracij. Impregnirane vzorčke smo po kondicioniranju in sterilizaciji za osem tednov izpostavili delovanju testnih gliv ter po koncu testa, z gravimetrično metodo, določili izgubo mase.

#### 3.2.1.1 Priprava raztopin, impregnacija in določanje navzema

Pripravili smo zaščitni pripravek CuEOQ ter pet raztopin iz petih glavnih sestavin pripravka (preglednica 4). Vsako posamezno raztopino smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali določeno količino posamezne kemikalije in nato dolili destilirano vodo do zelene skupne mase (500 g). S pomočjo magnetnega mešala smo nato poskrbeli, da so se sestavine dobro raztopile in zmešale z destilirano vodo.

Preglednica 4: Sestavine zaščitnega pripravka CuEOQ

Sestavina	Kemijska formula	Oznaka	Količina [g]
Bakrov(II) sulfat	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	CuS*	9,82
Etanolamin	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	EA	14,425
Kvartarna amonijeve spojine	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{CINR}$	QUAT	2,5
Oktanojska kislina	$\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13} \times 4\text{H}_2\text{O}$	OK**	2,025
Topbor	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$	B	7,675
Destilirana voda	$\text{H}_2\text{O}$	/	dolijemo do 500 g

\* bakrovemu(II) sulfatu smo dodali kapljico žveplene kisline zaradi boljšega mešanja

\*\* oktanojski kislini smo dodali etanolamin (14,425 g), ker se sama po sebi ne topi v vodi

Iz izhodiščnih pripravkov smo z redčenjem pridobili še pripravke nižjih koncentracij. Postopek redčenja je razviden v preglednici 5.

Vzorčke smo impregnirali z različnimi koncentracijami (preglednica 5) in sicer tako, da smo po 15 vzorčkov impregnirali z isto koncentracijo istega zaščitnega sredstva, zadnjih 50 vzorčkov pa je ostalo neimpregniranih in so služili za kontrolo učinkovitosti delovanja gliv. Za impregnacijo smo po 15 vzorčkov vstavljali v steklene kozarce, jih obtežili in prelili z vodnimi raztopinami. Kozarce z vzorci smo postavili v vakuumsko tlačno komoro, kjer smo jih za 20 minut izpostavili podtlaku 0,7 bara. V kolikor bi uporabili višji podtlak, bi lahko prišlo do vretja zaščitnega pripravka. Po 20 minutah smo pritisk v komori izenačili z zunanjim in vzorčke pustili namakati v raztopini še 2 uri, da se dobro napojijo. Kondicioniranje vzorcev je potekalo tri tedne. Vzorčki so se sušili na zraku pri sobni temperaturi, prvi teden v zaprtih, drugi teden v polzaprtih in tretji teden v odprtih komorah. V tem času je potekel proces fiksacije.

Preglednica 5: Prikaz redčenja pripravkov

Koncentracija	Mešalno razmerje (izhodiščni pripravek : voda) [mL]
VV	150 : 0
V	75 : 75
S	30 : 120
N	15 : 135
NN	7,5 : 142,5

Po impregnaciji smo vzorcem določili navzem. Navzem je količina zaščitnega pripravka, ki jo les vpije pri postopku impregnacije. Informativno smo določali mokri navzem, kjer izražamo celotno količino vpitega zaščitnega pripravka skupaj s topilom. Določali smo ga gravimetrično [...1] s pomočjo tehtanja vzorčkov pred in po impregnaciji.

$$r^{(V)} = \frac{m_2 - m_1}{V} [kg / m^3] \quad [...1]$$

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

$m_1$  → masa vzorca pred impregniranjem v kg

$m_2$  → masa vzorca po impregniranju v kg

$V$  → volumen ne impregniranega vzorca v  $m^3$



### 3.2.1.2 Priprava in inokulacija hranilnega gojišča

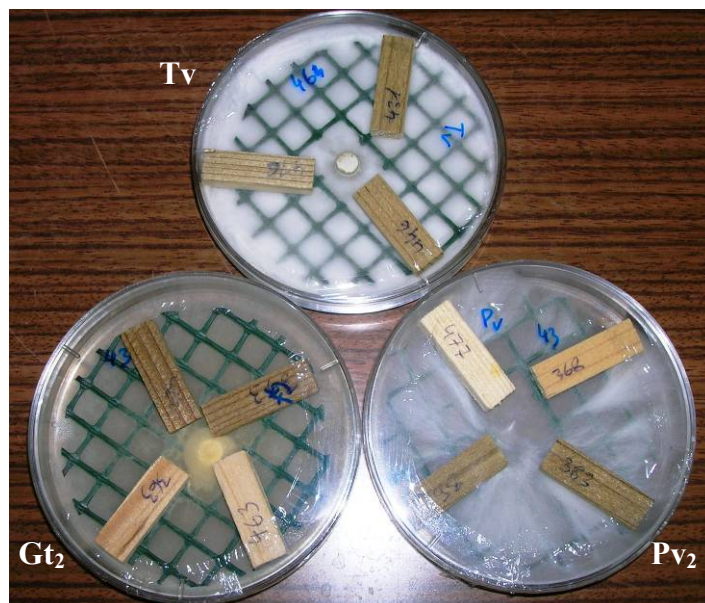
Za hranilno gojišče smo uporabili krompirjev glukozni agar v prahu. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (PDA, Difco laboratories, USA) in sicer tako, da smo 39 g prahu zmešali v 1000 mL destilirane vode. Pripravili smo hranilno gojišče za 150 petrijevok (15 mL/petrijevka), tako da smo skuhali količino 2500 mL gojišča. PDA se kuha podobno kot puding, pri čemer je potrebno paziti, da se hranilno gojišče med pripravo ne prismoji. Ko je gojišče zavrelo, smo ga prelili v posebne steklenice in jih avtoklavirali 40 minut pri 1,5 bar. Sterilno gojišče smo nato prestavili v lamianrij oziroma brezprašno komoro, kjer smo ga prelili v petrijevke.

Pred inokulacijo je bilo potrebno pripraviti in sterilizirati še plastične mrežice. Te mrežice preprečujejo direkten stik vzorcev s hranilno podlago. Na ta način preprečimo preveliko navlaževanje vzorcev. Petrijevke s hranilnim gojiščem smo inokulirali v brezprašni komori in sicer tako, da smo z luknjačem v preraslo gojišče urezali cepiče in jih nato s špatulo prenesli v vnaprej pripravljene petrijevke. Bistvenega pomena je bilo, da smo tako mrežice, kot tudi vse ostale potrebne pripomočke sproti razkuževali (alkohol, gorilnik) ter s tem preprečili okužbo. Za vsako od testnih gliv smo pripravili 51 petrijevok. Petrijevke z inokuliranim hranilnim gojiščem smo za deset dni postavili v rastno komoro z optimalnimi ravnimi pogoji (temperatura 25 °C, relativna zračna vlažnost 75 %).

### 3.2.1.3 Vstavljanje vzorčkov na okuženo hranilno gojišče

Vzorčke smo pred vstavljanjem na okuženo hranilno gojišče 24 ur sušili v sušilniku, zatem pa smo jim določili maso v absolutno suhem stanju. Pomembno je, da smo pred vstavljanjem s paro sterilizirali tako impregnirane, kot tudi neimpregnirane vzorce (1,5 bar, 20 min). Vstavljanje vzorcev v petrijevke s preraslim gojiščem je potekalo v laminariju in sicer po točno določenem zaporedju. Skupine 15-ih vzorčkov, impregniranih z isto koncentracijo, smo razdelili na tri dele in vsak del izpostavili točno določeni glivi. Prvih pet vzorčkov iz petnajsterice je vedno pripadalo glivi Gt<sub>2</sub>, drugih pet glivi Pv<sub>2</sub> in tretjih pet glivi Tv. V posamezno petrijevko nismo nikoli vstavili vzorcev, prepojenih z istim pripravkom ali isto koncentracijo. V posamezno petrijevko smo vstavili vzorčke prepojene s tremi različnimi koncentracijami in kontrolni neimpregniran vzorec. Taka razporeditev

nam je omogočala hkratno spremljanje rasti micelija na vzorčkih impregniranih z različnimi koncentracijami. Razporeditve vzorčkov v obliki zvezde (slika 1) pa je omejila medsebojni vpliv vzorcev. Tako pripravljene petrijevke, z okuženim hranilnim gojiščem in vstavljenimi vzorčki, smo nato za osem tednov postavili v rastno komoro (T = 25 °C; RH = 75 %).



Slika 1: Vzorci izpostavljeni lesnim glivam

Po osmih tednih smo petrijevke z vzorci vzeli iz rastne komore, podrli gojišča in očistili vzorčke. Vzorčke smo nato stehali in jih 24 ur sušili v sušilniku pri 105 °C. Absolutno suhe vzorce smo stehali na 0,001 g natančno. Iz dobljenih podatkov smo nato določili izgubo mase [...2] in vlažnost [...3].

$$m_{\text{izgub}} = \frac{m_3 - m_5}{m_3} [\%] \quad [\dots 2]$$

$m_{\text{izgub}}$  → izguba mase vzorca v %

$m_3$  → masa zračno suhega lesa po impregnaciji v g

$m_5$  → masa suhega okuženega lesa v g

$$u = \frac{m_4 - m_5}{m_5} [\%] \quad [\dots 3]$$

$u$  → vlažnost vzorca v %

$m_4$  → masa vlažnega okuženega lesa v g

$m_5$  → masa suhega okuženega lesa v g

### 3.2.2 Presejalni test

S presejalnim testom smo ocenili fungicidno delovanje posameznih sestavin zaščitnega pripravka CuEOQ na osnovi bakra in etanolamina. Za razliko od mini blok metode (poglavje 3.2.1.) smo v tem primeru zaščitno sredstvo v različnih koncentracijah vbrizgali v hranilno gojišče, ki smo ga kasneje inokulirali z izbranimi kulturami gliv.

#### 3.2.2.1 Priprava raztopin

Raztopine v različnih koncentracijah smo pripravili v steklenih bučkah. Hranilno gojišče za 207 epruвет, smo pripravili po navodilih proizvajalca (poglavje 3.2.1.2). V vsako epruветo smo odpipetirali 20 mL hranilnega gojišča ter 200  $\mu$ L izbranih vodnih raztopin tako, da smo dobili želeno koncentracijo aktivnih učinkovin v hranilnem gojišču (preglednica 6). Za vsako koncentracijo zaščitnega pripravka smo pripravili devet epruвет.

Preglednica 6: Koncentracije raztopin za presejalni test

Zaščitno sredstvo	Koncentracija	Oznaka
CuS*	0,064	VV
	0,032	V
	0,016	S
	0,008	N
B	0,05	VV
	0,025	V
	0,0125	S
	0,0063	N
QUAT	0,05	VV
	0,025	V
	0,0125	S
	0,0063	N
	0,0031	NN
EA + OK**	0,506	VV
	0,253	V
	0,1265	S
	0,0633	N
	0,0316	NN

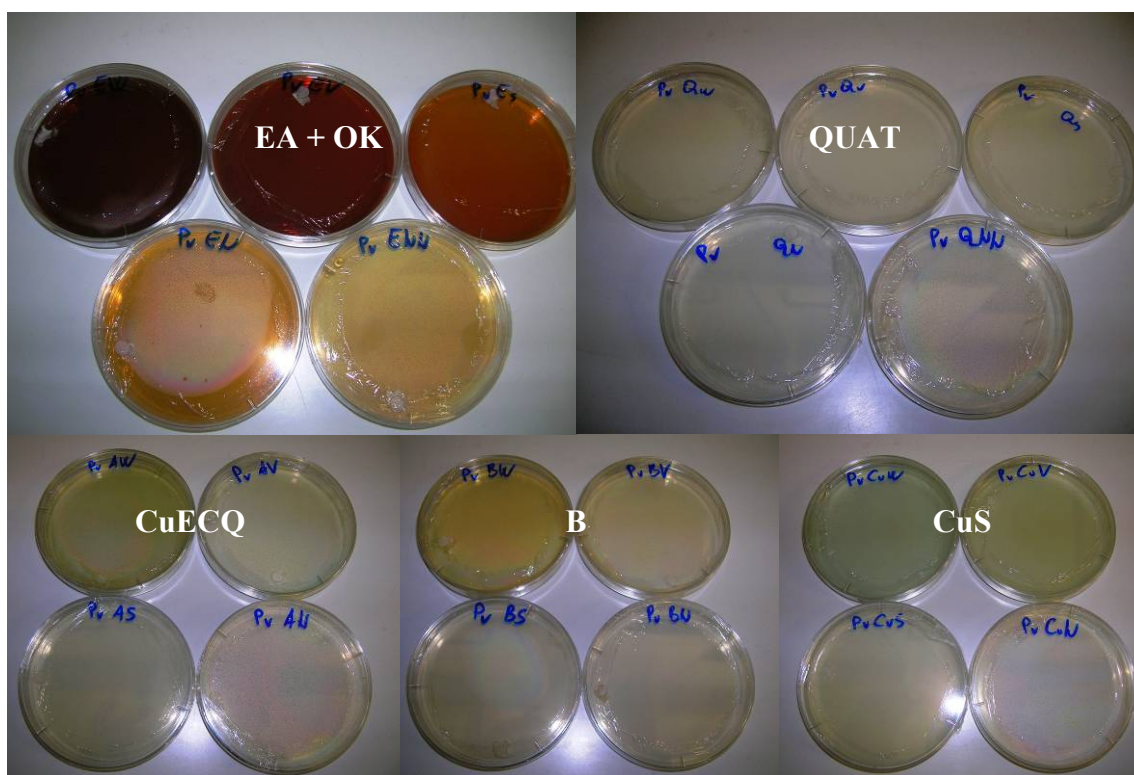
\* v raztopino bakrovega (II) sulfata smo dodali par kapljic H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, da smo zagotovili boljšo topnost v destilirani vodi.

\*\* na 7 g etanolamina smo dodali 1g oktanojske kisline, kajti oktanojska kislina ni vodotopna

### 3.2.2.2 Priprava petrijevok in cepitev gliv

Vsako epruveto s hranilnim gojiščem smo prekrili z aluminijasto folijo in jih 30 minut sterilizirali pri tlaku 1,5 bara. Po avtoklaviranju smo v laminariju prelili vsebino epruвет v sterilizirane petrijevke in počakali, da se je hranilno gojišče strdilo. Za vsako glivo smo pripravili 54 petrijevok z zaščitnimi pripravki ter po pet petrijevok brez zaščitnega sredstva, ki so služile kot kontrola.

Dodatek biocidov v hranilno gojišče je vplival na barvo petrijevok (slika 2). Hranilna gojišča z dodatkom bakrovega(II) sulfata se niso dovolj strdila, kar je kasneje povzročalo težave pri inokulaciji. Na teh gojiščih smo bili primorani spremljati prirast gliv bolj pazljivo, saj se je cepič ob prenašanju petrijevke premikal.



Slika 2: Barvna raznolikost hranilnih gojišč glede na različne koncentracije zaščitnih pripravkov

Inokulacija petrijevok z glivami je potekala po postopku opisanem v poglavju 3.2.1.2. Rast micelija smo nato spremljali 13 dni, in sicer 4., 5., 6., 8., 11. in 13. dan po inokulaciji in na koncu izračunali in grafično prikazali prirast.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 MOKRI NAVZEM

Mokri navzem (preglednica 7) smo vzorčkom določali po impregnaciji v vakuumski komori. Kljub temu, da smrekovina ni najbolj impregnebilen les (Richardson, 1993), je zaradi velike specifične površine vzorcev, navzem po pričakovanjih precej visok. Navzemi se gibljejo med 608 in 770 kg/m<sup>3</sup>. V povprečju so vzorci vpili 586 kg/m<sup>3</sup> zaščitnega pripravka, torej se je med impregnacijo masa vzorcev povečala za več kot 50 %.

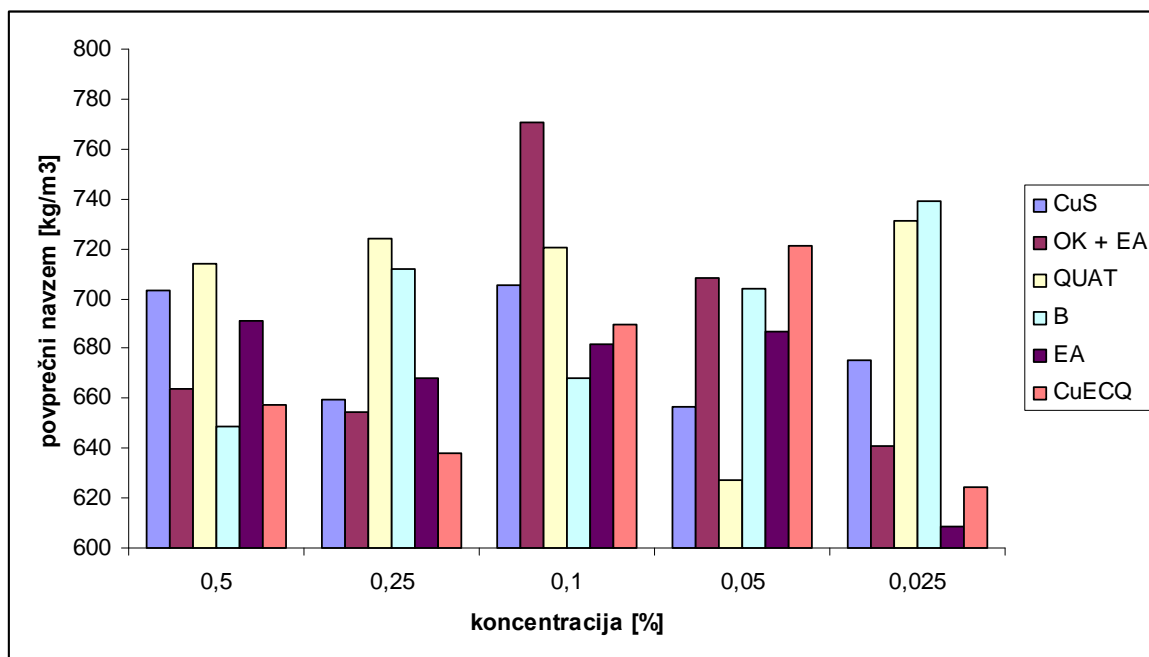
Preglednica 7: Povprečni mokri navzem glede na zaščitno sredstvo in koncentracijo aktivnih učinkovin

Zaščitno sredstvo	Koncentracija	Povprečni navzem [kg/m <sup>3</sup> ]
<b>CuS</b>	VV	703
	V	659
	S	706
	N	656
	NN	676
<b>EA + OK</b>	VV	664
	V	654
	S	770
	N	709
	NN	641
<b>QUAT</b>	VV	714
	V	724
	S	721
	N	627
	NN	731
<b>B</b>	VV	649
	V	712
	S	668
	N	704
	NN	739
<b>EA</b>	VV	691
	V	668
	S	682
	N	687
	NN	608
<b>CuEOQ</b>	VV	657
	V	638
	S	689
	N	721
	NN	624

Rezultati predstavljeni v preglednici 7 kažejo, da navzemi med različnimi pripravki nihajo in delno tudi med koncentracijami (slika 3) istega zaščitnega sredstva. Vendar ni opaziti enoznačnega vpliva koncentracije na navzem. Glede na podatke iz literature (Gorše, 2005; Jecl, 2005) smo pričakovali največje navzeme pri najvišji koncentraciji. Izkazalo pa se je, da smo najvišje navzeme določili pri srednji koncentraciji. Očitno je, da previsoka in prenizka koncentracija aktivnih učinkovin slabše vpliva na prodiranje v les. Delno pa na rezultate vplivajo tudi anatomske značilnosti vzorcev, saj je les izrazito nehomogen material.

Največje povprečne navzeme smo izmerili pri vzorcih impregniranih z vodno raztopino kvartarne amonijeve spojine ( $703 \text{ kg/m}^3$ ), sledi ji raztopina topbora ( $694 \text{ kg/m}^3$ ), oktanojske kisline z etanolaminom ( $688 \text{ kg/m}^3$ ), bakrov(II) sulfat ( $680 \text{ kg/m}^3$ ), raztopina samega etanolamina ( $677 \text{ kg/m}^3$ ) in z najslabšim navzem še najbolj kompleksen pripravek CuEOQ ( $666 \text{ kg/m}^3$ ). Pri raztopini QUAT smo poleg najvišjega navzema določili najbolj enakomeren navzem, ne glede na uporabljen koncentracij. Najvišji navzem smo dosegli pri najnižji koncentraciji QUAT-a v raztopini. Podoben pojav smo opazili tudi pri vzorcih prepojenih z vodno raztopino topbora, s to razliko, da navzem te raztopine z nižanjem koncentracije raste. Pri vodni raztopini CuS smo ugotovili precej enakomeren navzem, ne glede na uporabljen koncentracijo. Preseneča pa nas dejstvo, da je zaščitni pripravek CuEOQ najslabše prodiral v smrekovino. Zanimivo je, da navzem tega pripravka pri nižjih koncentracijah raste. Nepojasnen pa je nizek navzem pri najnižji koncentraciji tega pripravka (preglednica 7, slika 3).

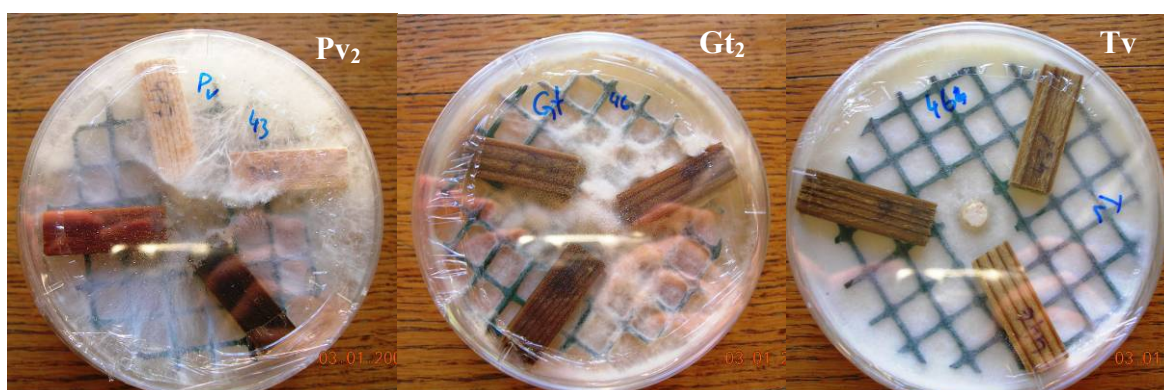
Iz literature je razvidno, da oktanojska kislina bistveno izboljša vezavo bakrovih pripravkov v les, negativno pa vpliva na navzem (Humar s sod., 2004). Po drugi strani naj bi etanolamin znižal površinsko napetost zaščitnih pripravkov. Zato smo pričakovali večje navzeme pripravkov na osnovi etanolamina (EA, EA + OK, CuEOQ) pri višjih koncentracijah. To naj bi bilo še bolj izrazito, predvsem pri iglavcih, kjer etanolamin raztopi smolo v smolnih kanalih in s tem poveča možnost penetracije pripravka v les po sproščenih smolnih kanalih. Glede na naše rezultate bi to trditev lahko ovrgli oziroma nekoliko popravili. Oktanojska kislina negativno vpliva na navzem pripravkov impregniranih z raztopinami višjih koncentracij, pri nižjih pa deluje pozitivno.



Slika 3: Povprečni navzem smrekovih vzorcev posameznega zaščitnega pripravka v odvisnosti od koncentracije

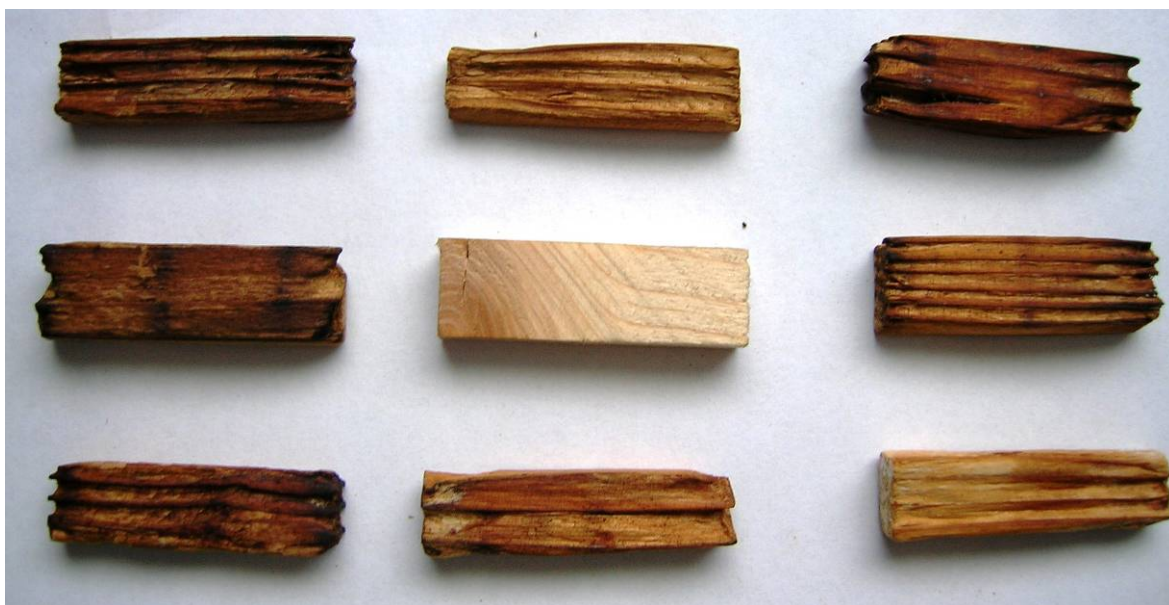
#### 4.2 ODPORNOST ZAŠČITENEGA LESA PROTI GLIVAM RAZKROJEVALKAM

Izgubo mase, zaradi delovanja testnih gliv, smo določali po nestandardni mini blok metodi. Po osmih tednih izpostavitve delovanju gliv smo gravimetrično določili vlažnost vzorcev in izgubo mase. Po pričakovanjih je bil najbolj agresiven sev bele hišne gobe ( $Pv_2$ ), malo manj sev navadne tramovke ( $Gt_2$ ), najslabši učinek pa je pokazala pisana ploskocevka ( $Tv$ ), saj je v osnovi razkrojevka lesa listavcev. Rezultat je razviden na sliki 4.



Slika 4: Smrekovi vzorčki izpostavljeni miceliju testnih gliv po osmih tednih izpostavitve

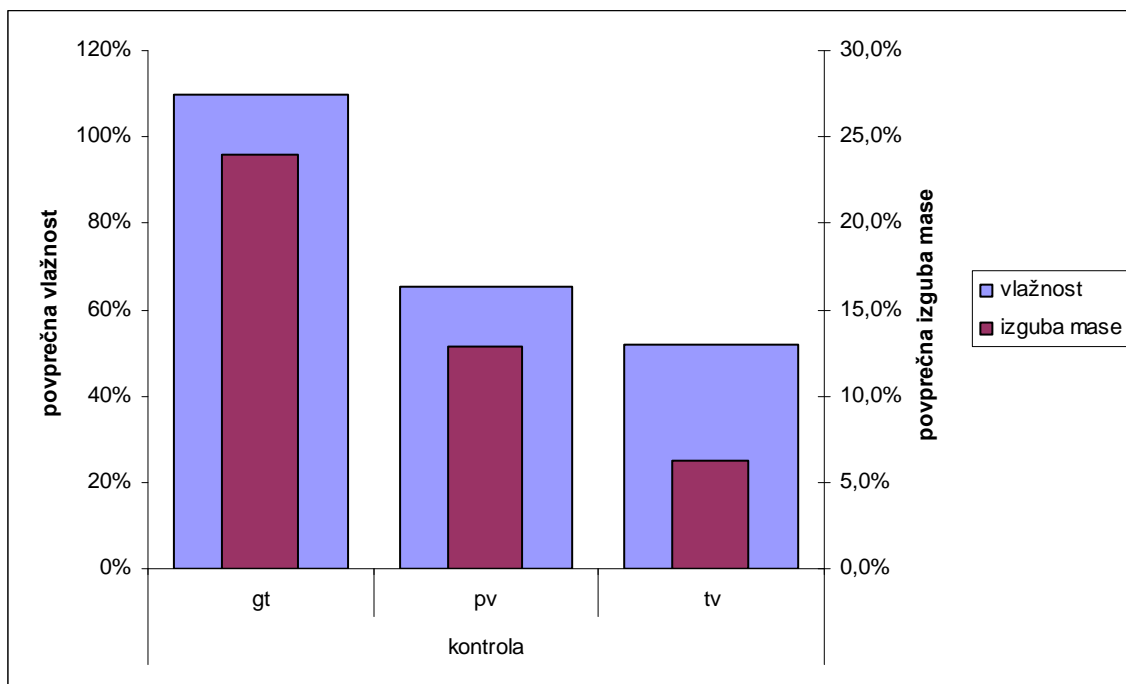




Slika 5: Absolutno suhi smrekovi vzorčki po osmih tednih izpostavitve glivam v skladu z mini blok testom v primerjavi z neizpostavljenim vzorčkom (v sredini).

Vzorčki na sliki 5 so bili izpostavljeni glivam rjave trohnobe. Predstavljeni so samo kot prikaz poškodovanosti v primerjavi z neizpostavljenim vzorčkom. Razločno je vidno rjavo obarvanje, dimenzijska deformacija, razgradnja ranega lesa v primerjavi s kasnim lesom in strukturnim razkrojem na čelih.

Kontrolni vzorci so pokazatelj aktivnosti lesnih gliv (sliki 6 in 7). Najbolj jih je razkrojila gliva  $Gt_2$  s 24 % povprečno izgubo mase in povprečno vlažnostjo 110 %. Sledi ji  $Pv_2$  z 12,9 % povprečnimi izgubami mase ter 65 % povprečne vlažnosti. Po pričakovanju pa je bila najmanj razkrojevalna gliva bele trohnobe  $Tv$  s povprečno izgubo mase 6,2 % in povprečno vlažnostjo vzorcev 52 %.



Slika 6: Povprečna izguba mase in vlažnost kontrolnih smrekovih vzorcev

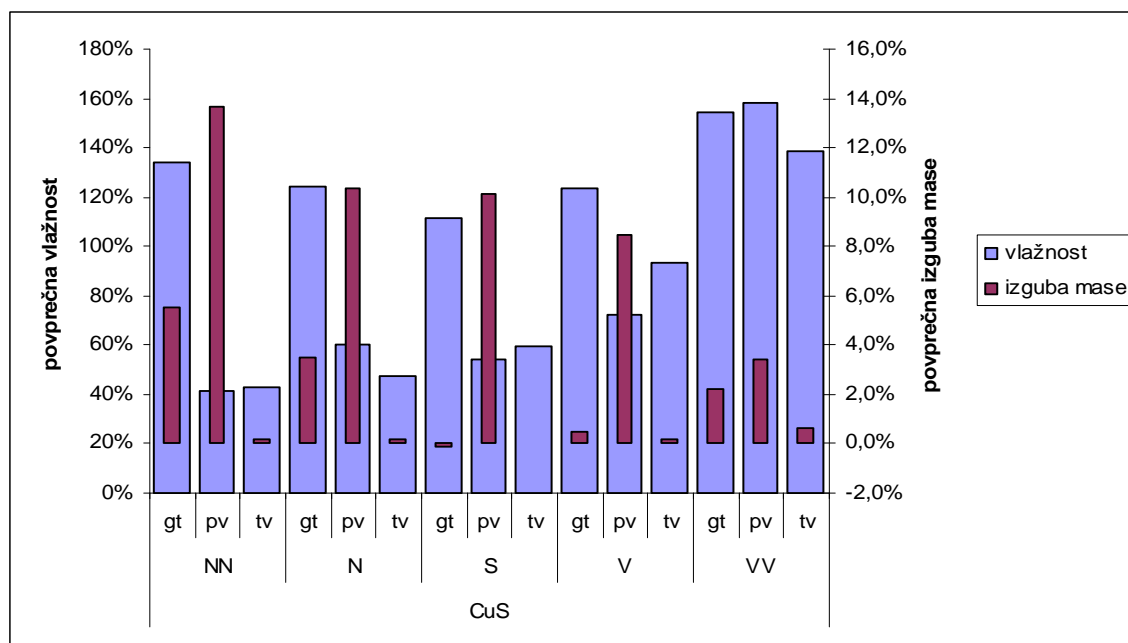


Slika 7: Primerjava kontrolnih smrekovih vzorcev po osmih tednih izpostavitve

#### 4.2.2 Vpliv bakrovega(II) sulfata (CuS) na vlažnost in izgubo mase

Povprečna vlažnost z bakrovim sulfatom zaščitene vzorcev je v večini primerov presegla vlažnost kontrolnih vzorcev. Vlažnost vzorcev je bila odvisna od koncentracije bakrovega pripravka, s katerim smo zaščitili les. Najbolj navlaženi so bili vzorci pri najvišji koncentraciji uporabljenega pripravka, ne glede na to kateri glivi so bili izpostavljeni. Najvišjo vlažnost smo določili pri vzorčkih, ki so bili razkrojeni s  $Gt_2$ , medtem ko je bila vlažnosti vzorcev okuženih s  $Pv_2$  in  $Tv$ , v povprečju, za polovico nižja (slika 8).

Izgube mase vzorcev zaščitene z bakrovim(II) sulfatom odražajo dobro znano fungicidno učinkovitost bakra na lesne glive. Gliva pisana ploskocevka ni razkrojila niti vzorcev prepojenih z najnižjo koncentracijo CuS, medtem ko tramovka ni razkrojila vzorcev zaščiteneh s srednjo koncentracijo. Bela hišna goba pa je razkrojila celo 3,5 % vzorcev prepojenih z najvišjo koncentracijo bakrovih učinkovin. Ta podatek jasno nakazuje, da so glive bele trohnobe zelo občutljive na bakrove biocide, po drugi strani pa jih glive rjave trohnobe bistveno lažje tolerirajo (Woodward in De Groot, 1999). Še posebej toleranten je ravno izolat bele hišne gobe, ki smo ga uporabili pri naših testiranjih. Za ta izolat je značilno, da izloča znatna količine oksalne kisline, ki reagira z bakrom v lesu. Pri tem nastane v vodi netopen in zato biološko neaktiven bakrov oksalat (Humar s sod., 2002).



Slika 8: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) bakrovega(II) sulfata na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev

Podatki o odpornosti lesa zaščitene z bakrovim sulfatom kažejo, da zaščita z bakrom ne predstavlja zadostne zaščite na baker tolerantnim izolatom bele hišne gobe, zato moramo bakru nujno dodati sekundarne biocide, ki izboljšajo kvaliteto zaščite. Poleg tega ne smemo pozabiti, da se bakrov(II) sulfat ne sme uporabljati kot samostojna učinkovina, tam kjer je les izpostavljen močenju, saj se v les ne veže oziroma se iz njega izpira (Pohleven s sod., 1994).

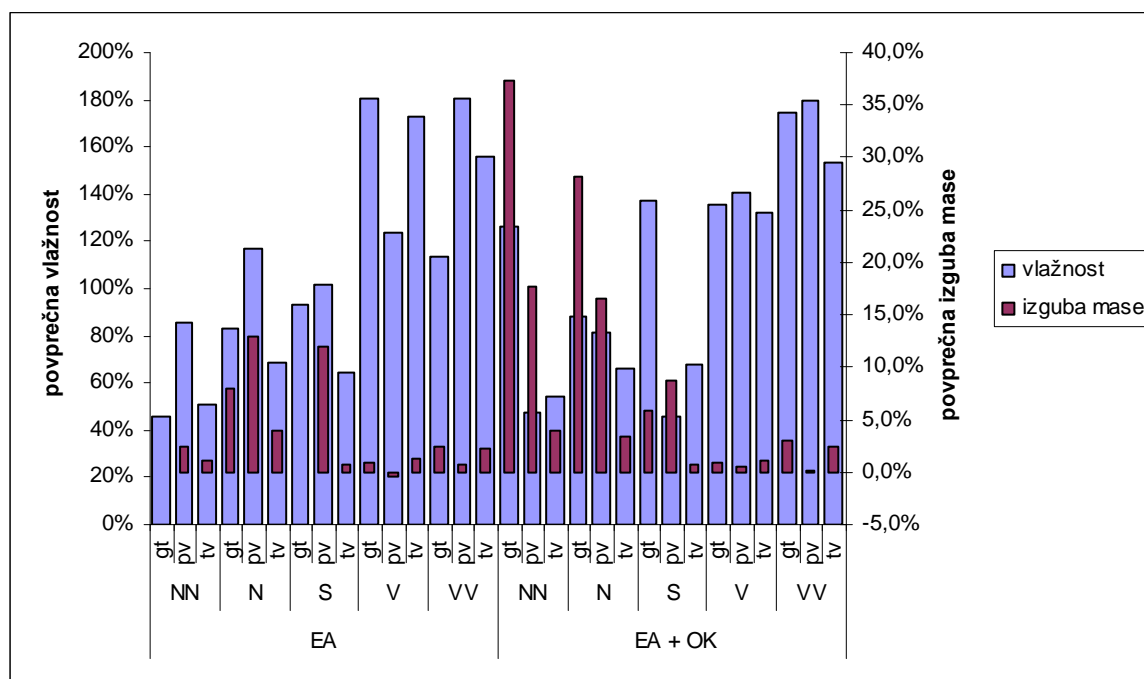
#### 4.2.3 Vpliv etanolamina (EA) in etanolamina z dodatkom oktanojske kisline (EA + OK) na vlažnost in izgubo mase

V povprečju so bili vzorci impregnirani z etanolaminom ali etanolaminom in oktanojsko kislino po izpostavitvi glivam bolj vlažni kot vzporedni kontrolni vzorci (slika 9). Vlažnost vzorcev je z naraščajočo koncentracijo etanolamina višala. Glavni vzrok temu je higroskopičnost etanolamina (Hughes, 1999). O podobnem učinku poročajo tudi Gorše (2005), Artiček (2004) in Cigler (2002).

Etanolamin se v baker-etanolaminske pripravke dodaja z namenom izboljšati vezavo le-teh v les. Pri tem v les vnašamo tudi dušik, ki lahko pospeši rast in razvoj gliv. Dušika je v lesu namreč zelo malo, zato je velikokrat omejujoč dejavnik pri razkroju lesa. Zato se pri lesu, impregniranim s pripravkom na osnovi etanolamina, vprašamo, kako le ta deluje na glive. Rezultati so nas presenetili, saj je bila izguba mas smrekovih vzorcev, prepojenih z vodno raztopino etanolamina najnižje uporabljene koncentracije manjša, kot izguba mas kontrolnih vzorcev. Tramovka je razkrojila le 7 %, bela hišna goba 12,5 % in pisna ploskocevka 1,2 % mase smrekovine prepojene s pripravkom z najnižjo uporabljeno koncentracijo etanolamina (slika 9). Kakorkoli, razkroj lesa je bil popolnoma ustavljen pri srednji koncentraciji (tramovka) oziroma visoki koncentraciji (bela hišna goba). Ti rezultati so zelo vzpodbudni, saj dokazujejo, da z etanolaminom ne poslabšujemo odpornosti lesa.

Bistveno drugače pa se je izkazala oktanojska kislina. Vzorci, ki smo jih impregnirali z vodno raztopino etanolamina in oktanojske kisline, so izgubili precej večji delež mase, kot vzorci prepojeni le z etanolaminom iste koncentracije, vzorci izpostavljeni tramovki (37,4 %) pa celo več mase kot kontrolni neimpregnirani vzorci (26,2 %). Oktanojska kislina je pospešila razkroj tudi pri srednji koncentraciji, pri visoki in najvišji pa je prevladal fungicidni vpliv etanolamina, zato pri impregniranih vzorcih nismo opazili znatne izgube mase.

Da nekatere karboksilne kisline pospešujejo glivne razkrojne procese nam je poznano (Green and Highley, 1997) pri višjih koncentracijah pa so na srečo prevladale fungicidne lastnosti oktanojske kisline (Pohleven s sod., 1994).



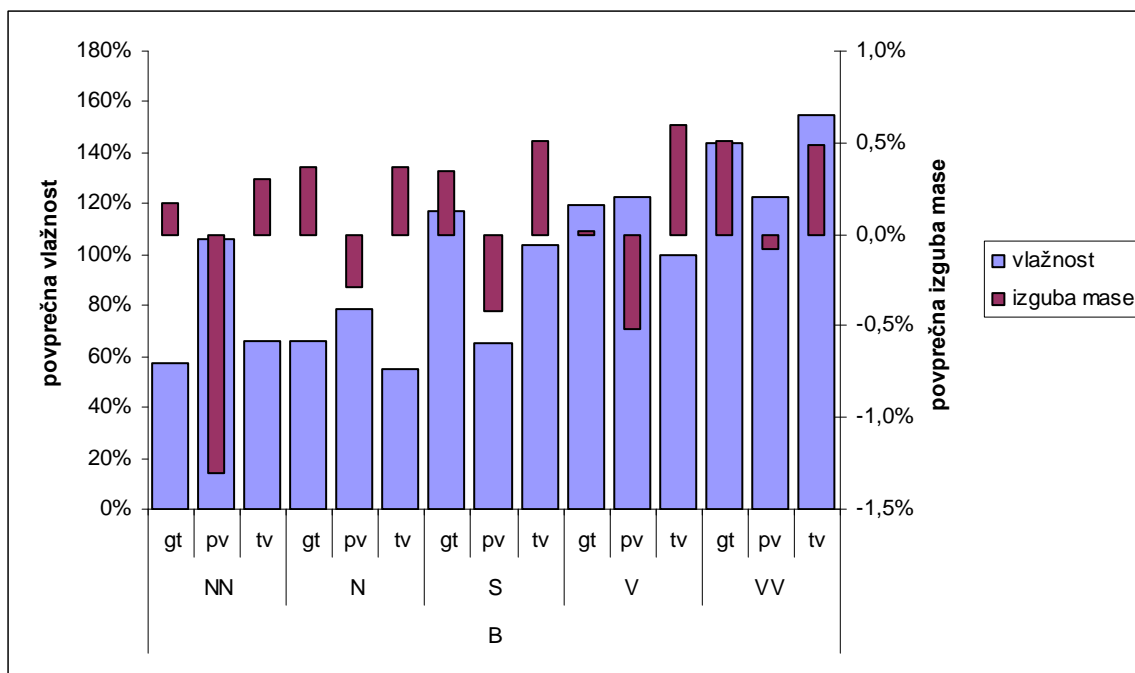
Slika 9: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) etanolamina in oktanojske kisline z dodatkom etanolamina na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev

#### 4.2.4 Vpliv topbora (B) na vlažnost in izgubo mase

Vzorčki impregnirani z borovimi spojinami, so dosegli najvišjo vlažnost pri izpostavitvi glivi Tv in to pri vzorcih, ki so bili impregnirani, z najvišjo koncentracijo pripravka (155 %) (slika 10). S padajočo koncentracijo bora v pripravku, upada tudi vlažnost izpostavljenega lesa. Minimalno vlažnost smo ugotovili pri vzorcih impregniranih s pripravkom najnižje koncentracije topbora (55 %). Najverjetneje je razlogov za povišano vlažnost več. Poglavitni vzrok so po vsej verjetnosti vrzeli v kristalih topbora ter dejstvo, da se topbor v lesu nahaja tudi v obliki drobnih kristalov. Med kristali so številne pore, kjer se pri vlažnostih nad 90 % kondenzira kapilarna voda (Mangel, 2000).

Izkazalo se je, da je topbor odličen fungicid. Tudi vzorci, zaščiteni z najnižjo koncentracijo topbora so bili popolnoma zaščiteni pred delovanjem lesnih gliv. Bor je uspešno zaščitil smrekovino tako pred delovanjem gliv bele, kot tudi rjave trohnobe. Ta podatek potrjuje, da bor deluje kot odličen sekundarni fungicid in ščiti les pred na baker tolerantnimi izolati lesnih gliv.

Ker pa se bor v les veže še slabše kot baker (Artiček, 2004), moramo v les poleg bora dodajati še druge sekundarne biocide, ki bodo ščitili les tudi, ko se bo del bora iz lesa izpral.



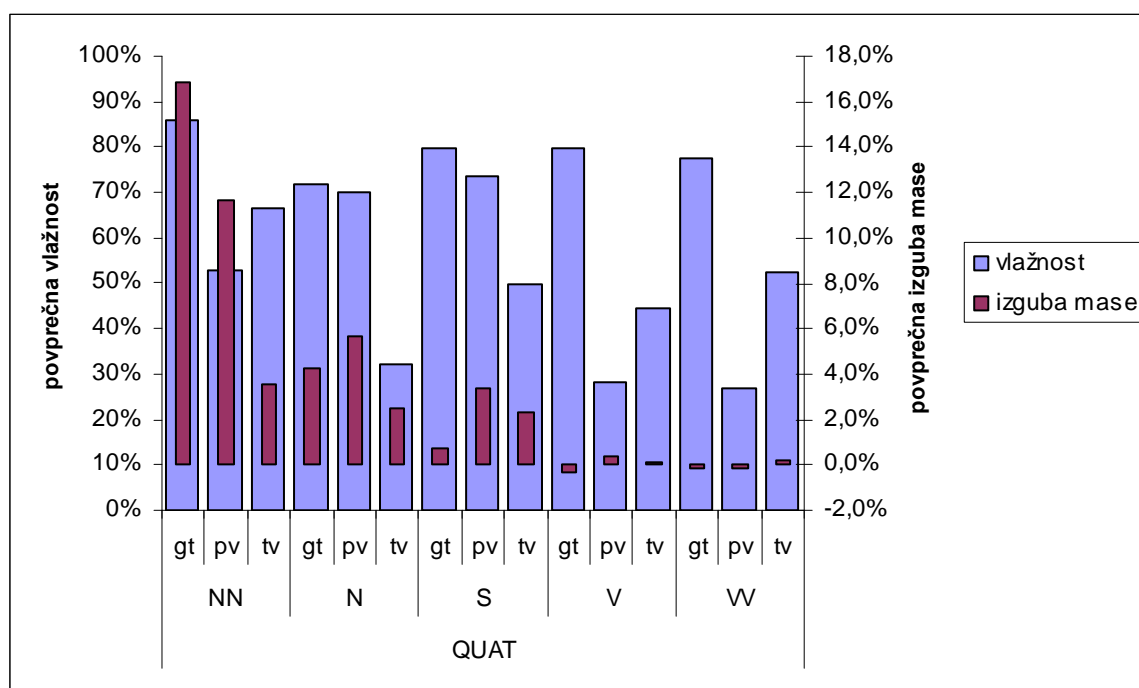
Slika 10: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) topbora na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev

#### 4.2.5 Vpliv kvartarne amonijeve spojine (QUAT) na vlažnost in izgubo mase

Tudi kvartarna amonijeva spojina vpliva na ravnovesno vlažnost impregniranega lesa. Ta vpliv je bistveno manj izrazit kot pri vzorcih zaščiteneh z borovimi solmi ali etanolaminom. Koncentracija aktivnih učinkovin nima bistvenega vpliva na vlažnost. Precej večji vpliv imajo glive. Najnižjo (27 %) vlažnost dosežejo vzorci okuženi s  $Pv_2$  pri 0,5 % koncentraciji, najvišjo pa vzorci izpostavljeni tramovki (slika 11).

Prav tako kot bor, tudi kvartarna amonijeva spojina uspešno preprečuje glivni razkroj lesa. Pred tramovko predstavlja zadovoljivo zaščito že srednja koncentracija, medtem ko je za ostali dve glivi potrebna višja koncentracija aktivnih učinkovin. Še posebej nas je presenetilo, da je ta spojina tako učinkovita na glivo bele trohnobe, saj bi pričakovali, da bo zaradi zgradbe kvartarne amonijeve spojine le ta nanj bolj odporna (Unger s sod.,

2001). Kakorkoli, učinkovitost kvartarne amonijeve spojine na lesne glive je zelo pomembna s praktičnega stališča, saj le-ti biocidi izboljšajo učinkovitost proti baker tolerantnim glivam, podobno kot borove spojine, po drugi strani pa se bistveno bolje vežejo v les.



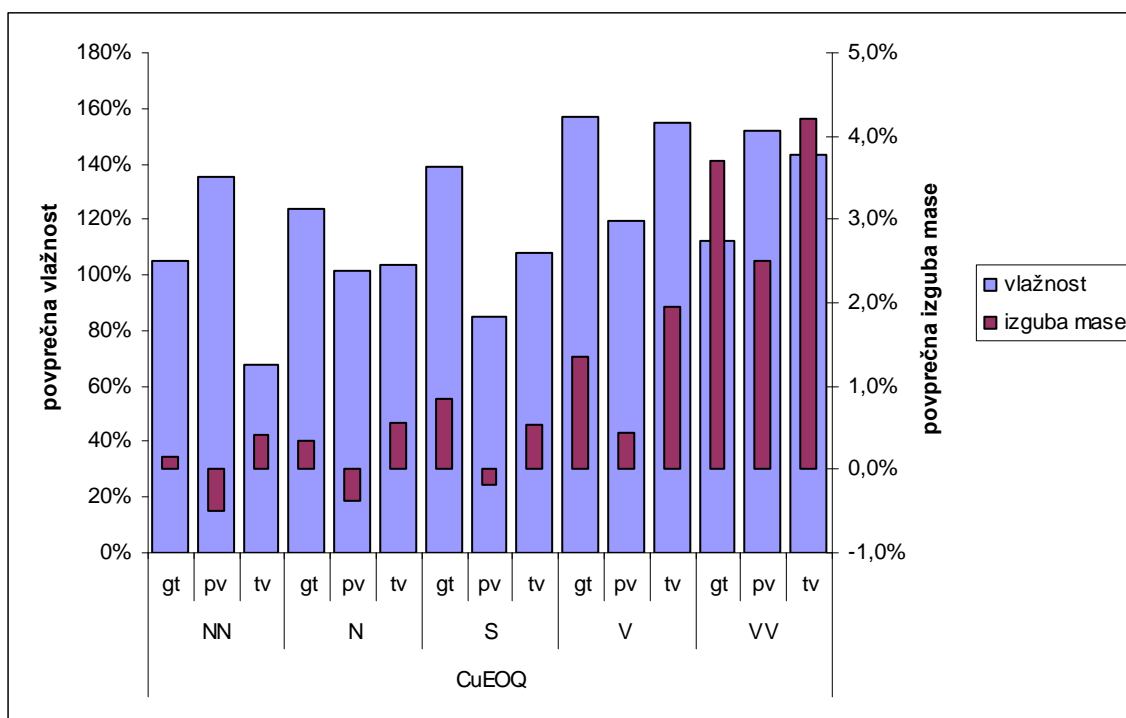
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) kvartarne amonijeve spojine na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev

#### 4.2.6 Vpliv zaščitnega sredstva CuEOQ na vlažnost in izgubo mase

Tudi vzorci, impregnirani s pripravkom CuEOQ, po izpostavitvi glivam so bili bolj vlažni kot kontrolni neimpregnirani vzorci. Vzroki za povišano vlažnost so opisani že v prejšnjih rezultatih. Glavna vzroka sta higroskopičnost etanolamina (Hughes, 1999) ter vrzeli v in med kristali topbora (Mangel, 2000). Tako visoka vlažnost pa je imela še en stranski učinek. Prišlo je do depolimerizacije lignina, zato se je iz lesa izpral tudi del fragmentov lignina, kar se odraža v izgubi mase vzorcev impregniranih z najvišjo koncentracijo zaščitnih pripravkov, ki pa ni posledica delovanja gliv, temveč etanolamina (Claus s sod., 2004).



Iz rezultatov na sliki 12 je razvidno, da so bili vsi vzorci, tudi tisti impregnirani s pripravkom najnižje koncentracije, učinkovito zaščiteni pred delovanjem lesnih gliv. Ta rezultat je zadovoljiv, saj nakazuje, da med posameznimi učinkovinami v pripravku ni prišlo do antagonističnih vplivov, ki bi poslabšali učinkovitost bicodinih komponent v CuEOQ. Očitno je, da aktivnost pripravka CuEOQ določa najbolj učinkovita sestavina pripravka. V našem primeru je to topbor, ki je sam dobro zaščitil les že pri najmanjši koncentraciji, kar se odraža tudi v celotnem pripravku, ki kaže učinkovitost tudi pri najnižji koncentraciji (sliki 10 in 12). Po drugi strani pa se pri tem postavlja vprašanje, kako je z učinkovitostjo sistema, ko se bor izpere iz lesa. Na podlagi predhodnih raziskav (Gorše, 2005) domnevamo, da bo zaradi preostalih učinkovin v lesu (bakra in kvartarne amonijeve spojine) pripravek CuEOQ tudi po izpiranju še vedno uspešno ščitil les.

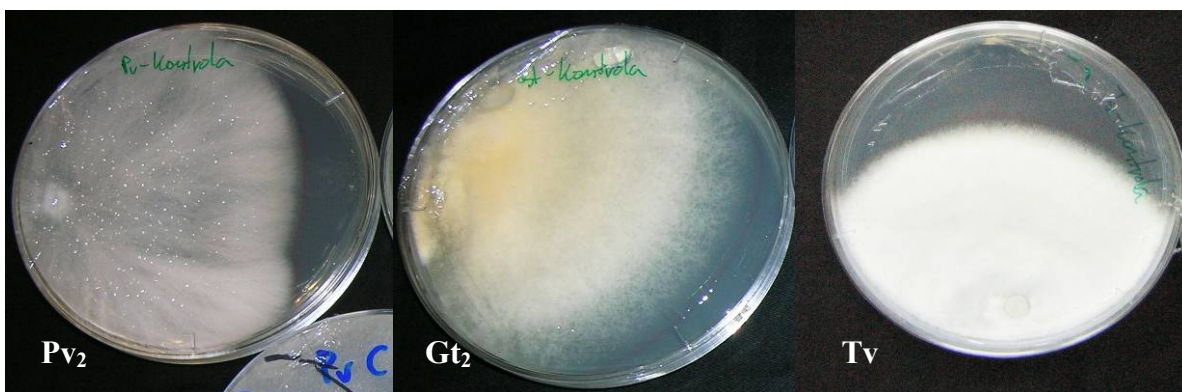


Slika 12: Vpliv različnih koncentracij (preglednica 5) CuEOQ na vlažnost in izgubo mase smrekovih vzorcev

#### 4.3 REZULTATI PRESEJALNEGA TESTA

Prve meritve smo izvajali četrty dan po cepitvi gliv na hranilno gojišče. Že po štirih dneh se je pokazalo, da glive najboljše uspevajo na hranilnih gojiščih z dodanim CuS sledili pa so jim pripravki CuEOQ, ne glede na vrsto testne glive.

Na kontrolnih gojiščih, brez dodanih biocidov (slika 13), je najhitreje rasla Gt<sub>2</sub>, ki je v trinajstih dneh zrastle na 6,84 cm, sledita ji Pv<sub>2</sub> s 5,35 cm in Tv s 4,83 cm. Čeprav ima Gt<sub>2</sub> v povprečju najintenzivnejši prirast na kontrolnih gojiščih, jo na hranilnih gojiščih z biocidi prekaša Pv<sub>2</sub> (slika 14).



Slika 13: Kontrolni vzorci presejalnega testa na 13. dan.

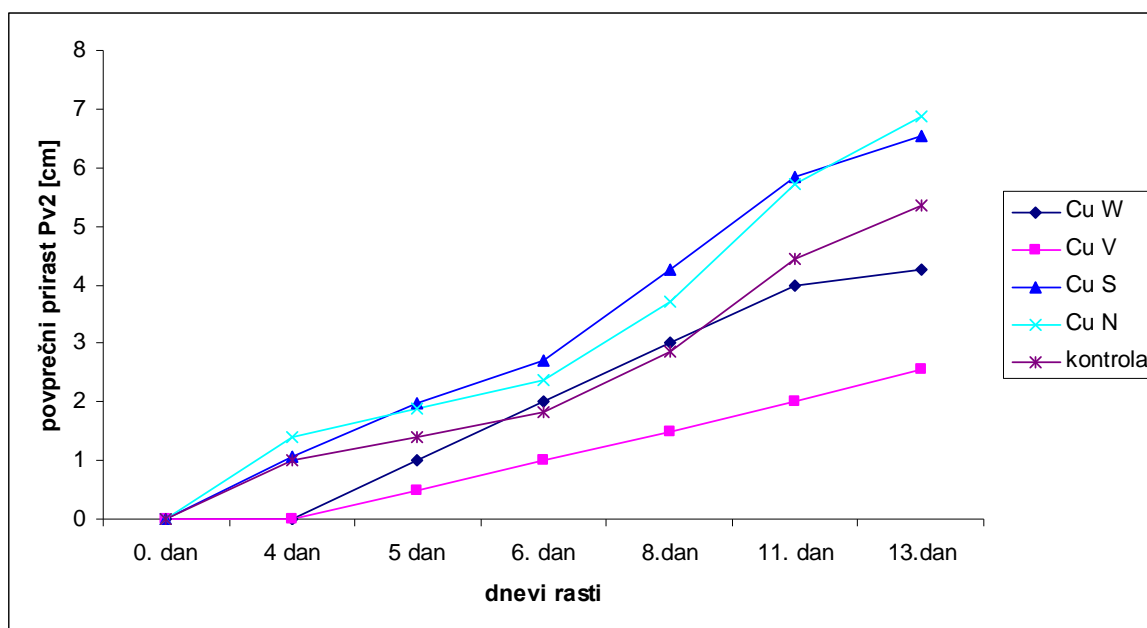


Slika 14: Kontrolni smrekovi vzorci mini blok testa po osmih tednih izpostavitve

### 4.3.1 Vpliv bakrovega(II) sulfata (CuS) na rast gliv

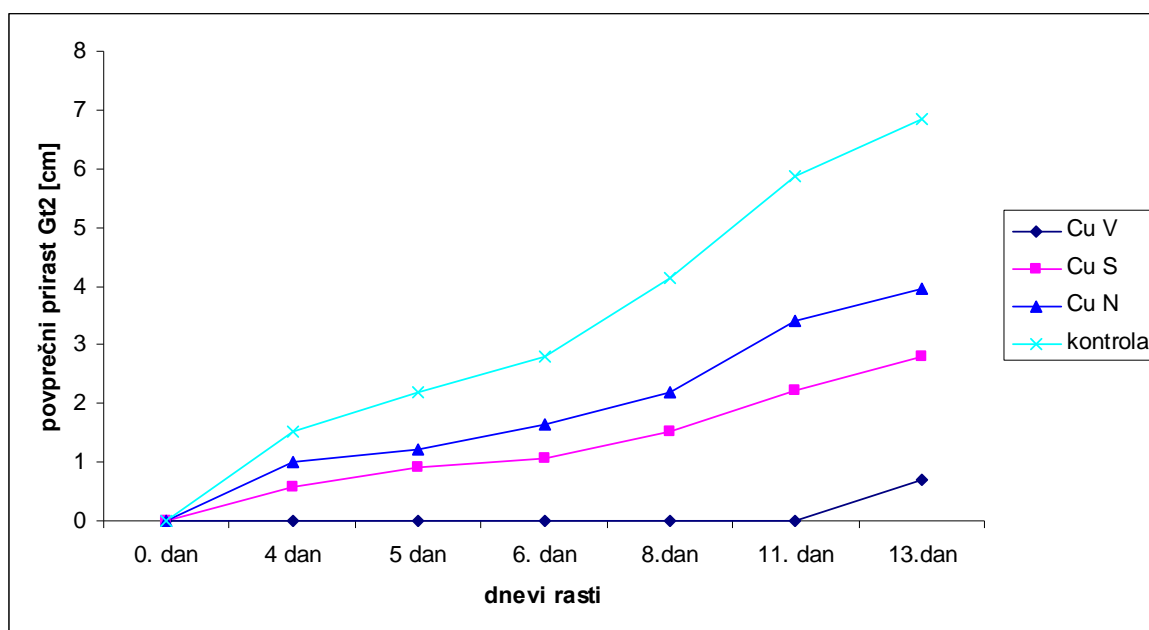
Ena izmed slabosti bakrovih zaščitnih pripravkov je vsekakor pojav na baker odpornih sevov gliv. Predhodne raziskave so pokazale, da so glive bele trohnobe manj tolerantne za višje koncentracije bakra, kot glive rjave trohnobe. Izmed treh testnih gliv je vsekakor najbolj tolerantna vrsta *Antrodia vaillantii* (Pv<sub>2</sub>) in posledično najmanj tolerantna *Trametes versicolor* (Tv), kot povzročiteljica bele trohnobe. Na žalost smo pri preizkusih imeli težave s strjevanjem hranilnega gojišča z dodanimi bakrovimi pripravki. Meritve prirasta po dnevih so bile, zaradi plavajočih cepičev, zelo zahtevne in variabilne. Vseeno pa smo potrdili toleranco glive *A. vaillantii* na bakrove pripravke.

Pv<sub>2</sub> je na gojišču z dodatkom CuS vsekakor potrdila svojo tolerantnost (slika 15), saj je tako pri nizki (6,88 cm) (v oklepajih je podan prirastek micelija v 13 dneh), kot tudi srednji (6,53 cm) koncentraciji rasla bistveno bolje od kontrole (5,35 cm). Poleg boljšega prirasta od kontrole je na hranilnem gojišču z dodanim bakrom uspevala pri vseh koncentracija bakra, celo pri najvišji. Svojo netolerantnost na baker je potrdil izolat Tv z najslabšim prirastom (4,35 cm) pri najnižji koncentraciji. Višje koncentracije pa so popolnoma zavrle njegov razvoj.

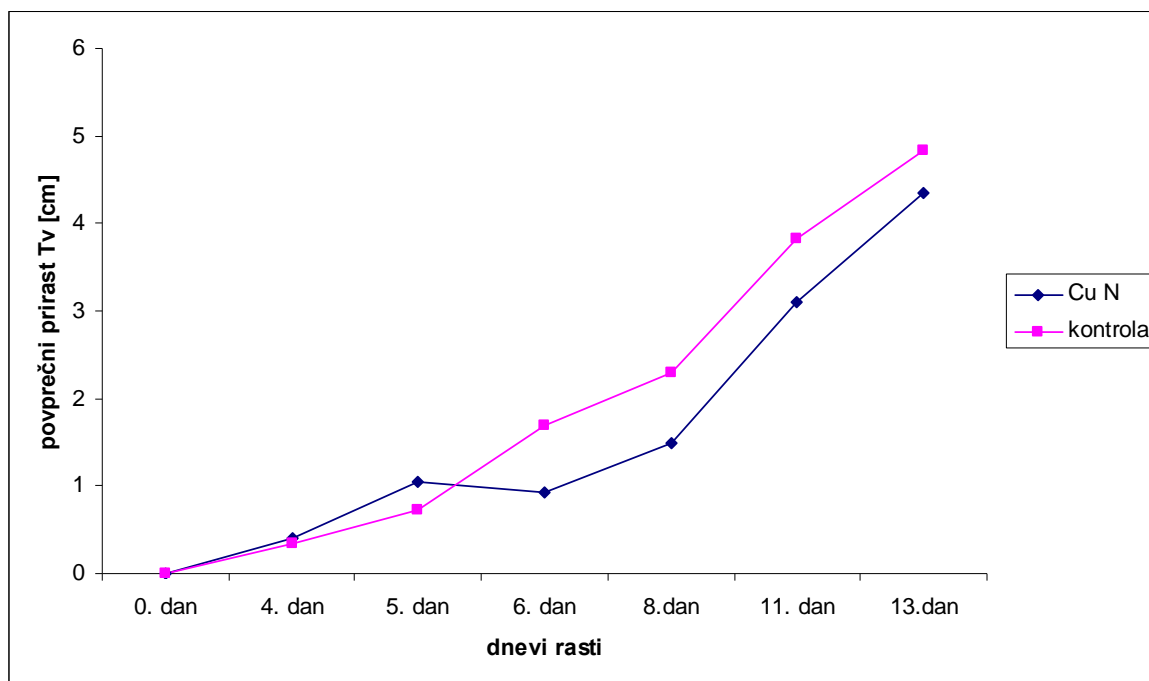


Slika 15: Povprečni prirast micelija glive *A. vaillantii* v odvisnosti od koncentracije CuS (preglednica 6) v hranilnem gojišču

Rast micelija *Gt<sub>2</sub>* je popolnoma zavrla najvišja koncentracija (VV) CuS v gojišču, pri višji koncentraciji (V) pa je bil prirast minimalen. Tudi pri nizki in srednji koncentraciji CuS v gojišču je bila rast upočasnjena (slika 16). Ti podatki nakazujejo, da *Gt<sub>2</sub>* lahko uspeva na višjih koncentracijah bakra v hranilnem gojišču, kot pa gliva bele trohnobe *Tv* (slika 17). Slednja je uspevala le na gojišču z nizko koncentracijo bakra, višje koncentracije tega biocida v hranilnem gojišču pa so popolnoma zaustavile njeno rast. Glavni vzrok za te razlike je povezan s količino izločene oksalne kisline. Glive rjave trohnobe je izločajo več kot glive bele trohnobe, kar se odraža tudi v odpornosti na bakrove pripravke (Tsunoda s sod., 1997).



Slika 16: Povprečni prirast micelija glive *G. trabeum* v odvisnosti od koncentracije CuS (preglednica 6) v hranilnem gojišču



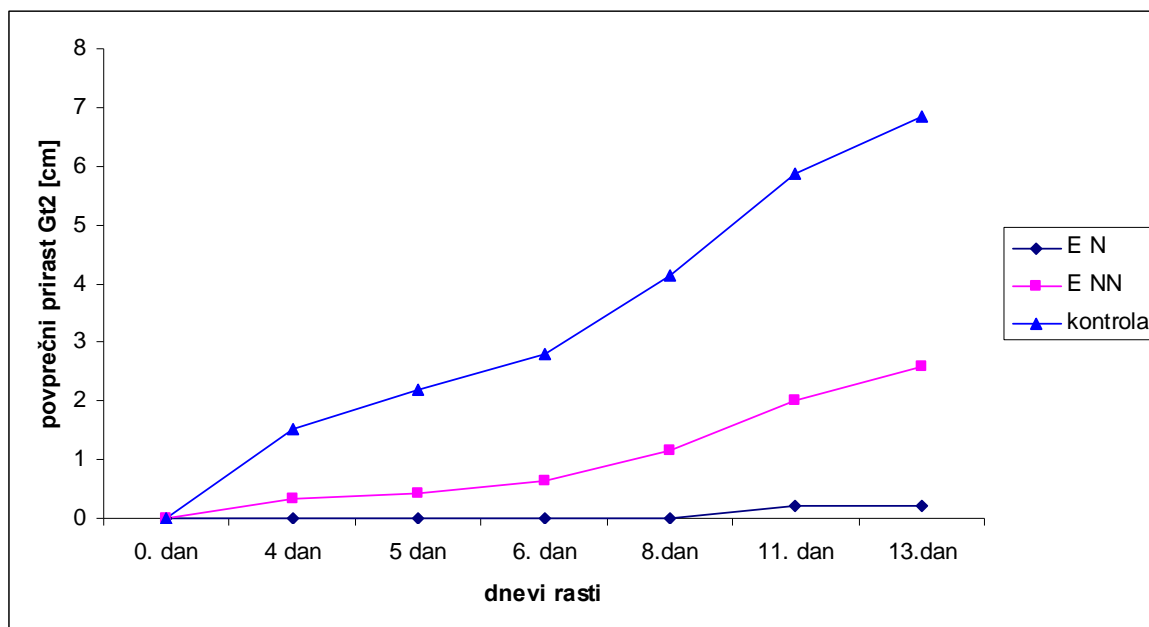
Slika 17: Povprečni prirast micelija glive *T. versicolor* v odvisnosti od koncentracije CuS (preglednica 6) v hranilnem gojišču

#### 4.3.2 Vpliv etanolamina z dodatkom oktanojske kisline (EA + OK) na rast gliv

Pri presejalnem testu smo, zaradi prostorskih in časovnih omejitev, testirali le vpliv kombinacije etanolamina in oktanojske kisline na rast micelija lesnih gliv. Čiste raztopine etanolamina nismo testirali.

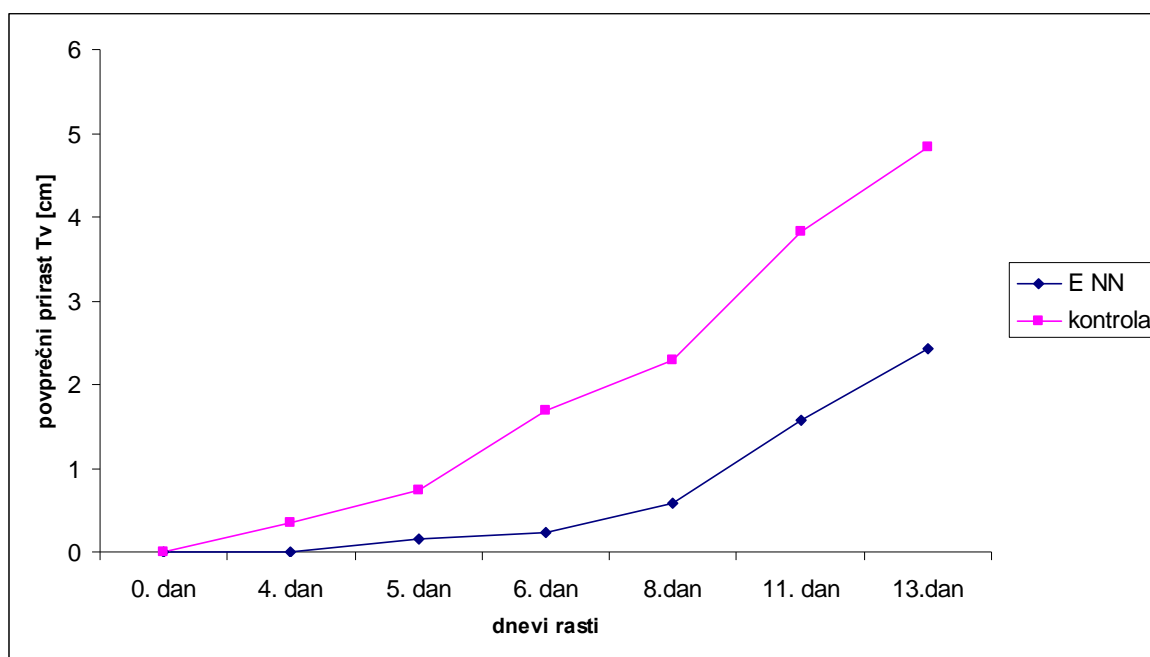
Etanolamin in oktanojska kislina sta imela, v hranilnem gojišču, velik inhibitorni učinek na rast lesnih gliv. Micelij *A. vaillantii* ni rasel pri nobeni izmed petih uporabljenih koncentracij, gliva *T. versicolor* (slika 19) pa samo pri najnižji koncentraciji. Najvišjo odpornost je izkazala tramovka, (*Gt*<sub>2</sub>) (slika 18), ki je v trinajstih dneh prirasla 2,58 cm pri najnižji koncentraciji EA + OK v gojišču. Nekoliko je gliva prirasla tudi pri nizki koncentraciji omenjenih učinkovin v PDA mediju. Dejstvo, da je etanolamin izkazal fungicidne lastnosti, nas je pozitivno presenetilo, saj to dodatno potrjuje, da dušik, ki ga v les vnesemo z etanolaminom ne pospešuje rasti gliv, temveč jo celo zavira. Poleg tega je presejalni test pokazal, da oktanojska kislina v hranilnem gojišču ne pospešuje rasti gliv, kot smo opazili pri mini blok testu. Ta podatek nas opozarja, da moramo biti pri

interpretaciji posameznih testov zelo previdni in ne smemo povleči dokončnih zaključkov na podlagi enega samega testa.



Slika 18: Povprečni prirast micelija glive *G. trabeum* v odvisnosti od koncentracije EA + OK (preglednica 6) v hranilnem gojišču

Možni razlog za zaviranje rasti micelija gliv na gojiščih z dodanim etanolaminom je tudi pH gojišča. Z dodatkom etanolamina v hranilno gojišče smo le tega napravili močno alkalnega. Možno je, da je pH previsok in za glivo neustrezen.



Slika 19: Povprečni prirast micelija glive *T. versicolor* v odvisnosti od koncentracije EA + OK (preglednica 6) v hranilnem gojišču

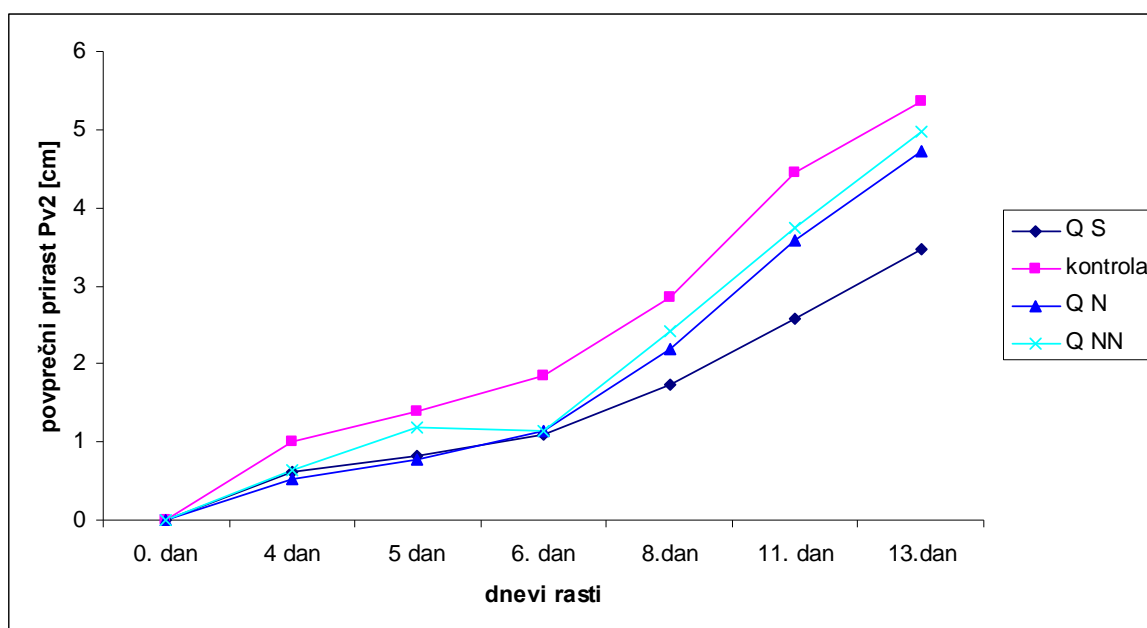
#### 4.3.3 Vpliv topbora (B) na rast gliv

Bor je tudi pri presejalnem testu izkazal odlične fungicidne lastnosti. Najmanj je bila, na gojišču z dodatkom topbora, zavirna rast glive *Gt<sub>2</sub>* (1,65 cm) in še ta samo pri nizki koncentraciji. Ostali dve glivi sta sicer rasli, vendar je bila njuna prirast precej slabša. Pri nekoliko višji koncentraciji (S) je bila rast vseh testiranih gliv popolnoma zavirna. Rezultati so primerljivi tudi z rezultati mini blok testa, kjer nobena izmed gliv ni uspevala na vzorcih impregniranih z borom.

#### 4.3.4 Vpliv kvartarne amonijeve spojine (QUAT) na rast gliv

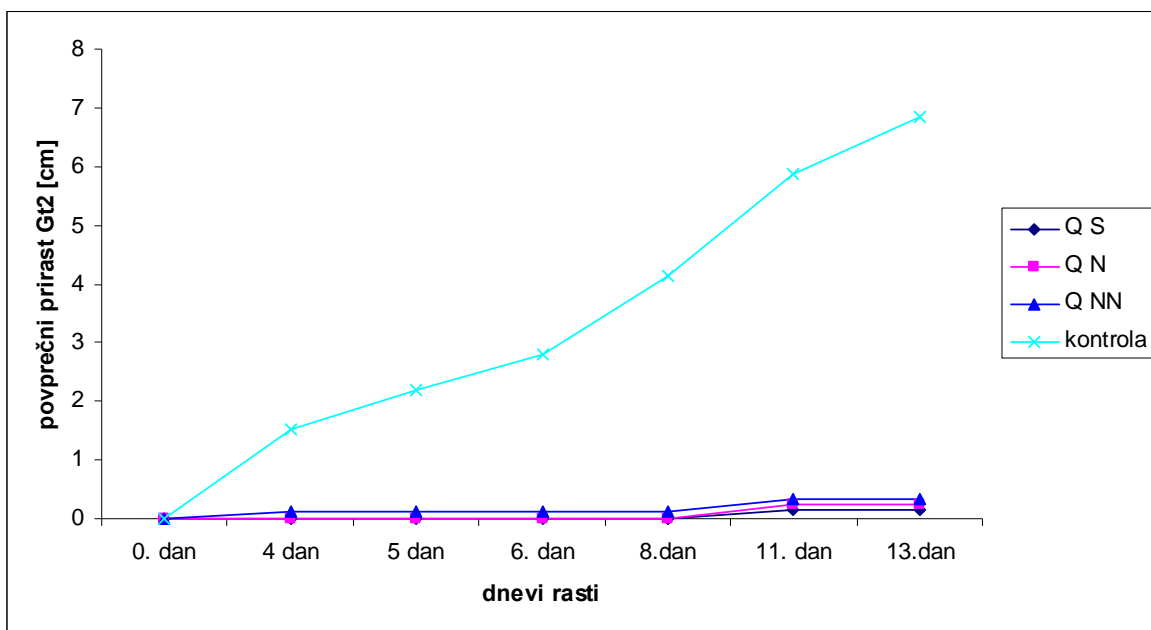
Pri tej spojini je zanimivo, da je nanjo do neke mere tolerantna gliva *T. versicolor* (Unger s sod., 2001), vendar naši rezultati te tolerance niso potrdili. Rast glive je bila zavirna celo na hranilnem gojišču z najnižjo koncentracijo kvartarne amonijeve spojine. Res pa je, da je bil to eden izmed biocidov, ki je rast pisane ploskocevke najmanj zavrl (slika 22).

Na kontrolnem gojišču je  $Gt_2$  rasla precej dobro pri srednji, nizki in najnižji koncentraciji, medtem ko je bil njen prirast pri visoki in najvišji koncentraciji popolnoma zavrt. V povprečju je gliva v trinajstih dneh prirasla manj kot 1 cm (slika 21). Še najbolj je na QUAT-u uspevala bela hišna goba. Najnižja koncentracija na glivo skoraj ni imela vpliva, rast pa je zavrla šele najvišja koncentracija. Kljub vsemu je imela QUAT na rast bele hišne gobe večji učinek, kot bakrove učinkovine pri isti koncentraciji (slika 20).

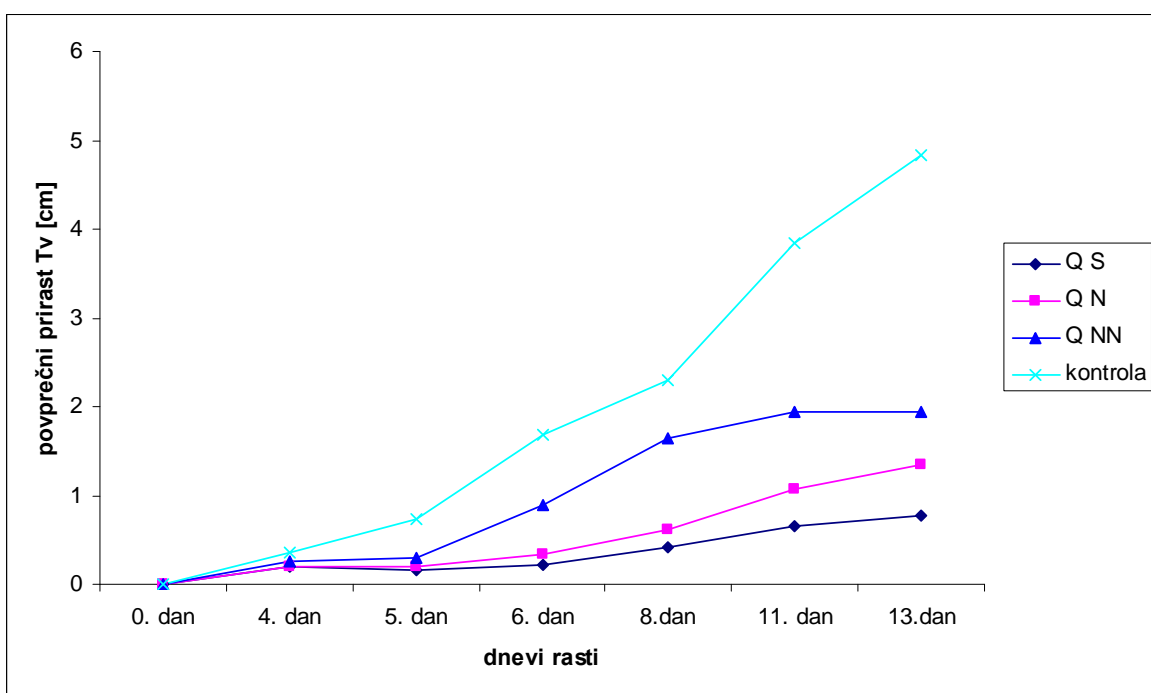


Slika 20: Povprečni prirast micelija glive *A. vaillantii* v odvisnosti od koncentracije QUAT (preglednica 6) v hranilnem gojišču





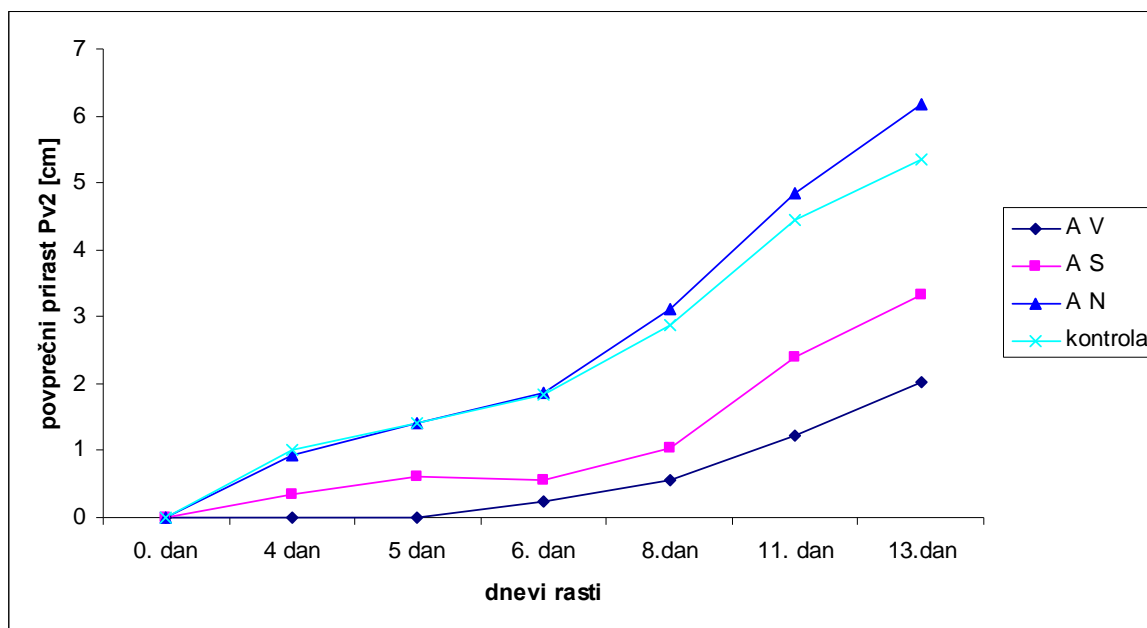
Slika 21: Povprečni prirast micelija glive *G. trabeum* v odvisnosti od koncentracije QUAT (preglednica 6) v hranilnem gojišču



Slika 22: Povprečni prirast micelija glive *T. versicolor* v odvisnosti od koncentracije QUAT (preglednica 6) v hranilnem gojišču

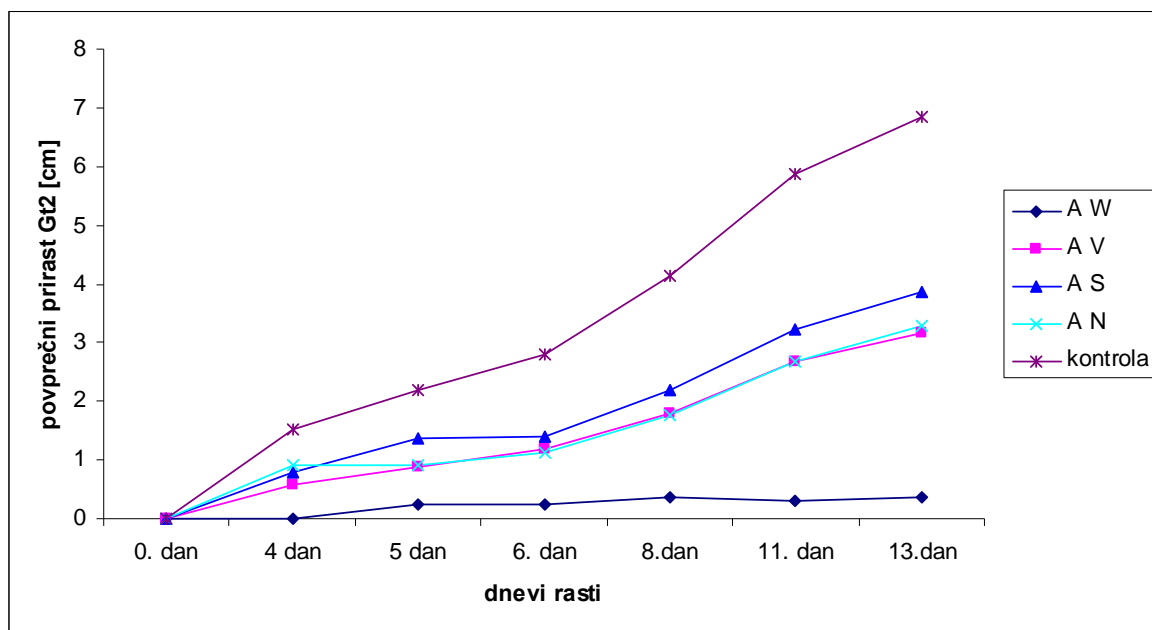
#### 4.3.5 Vpliv komercialnega zaščitnega sredstva CuEOQ na rast gliv

Pri interpretaciji rezultatov rasti gliv na hranilnem gojišču z dodanim pripravkom CuEOQ moramo biti zelo previdni. V hranilno gojišče smo dodali nekoliko manjše deleže aktivnih učinkovin, kot v gojišča v katera smo dodajali posamezne komponente, saj smo pričakovali sinergijske učinke posameznih komponent. Tako je koncentracija bakrovih učinkovin pri najnižji koncentraciji CuEOQ 0.0031 %, v hranilnem gojišču z najnižjo koncentracijo CuS pa 0.0080 %. Podobna razmerja so prisotna tudi pri drugih aktivnih učinkovinah (preglednica 6). CuEOQ je pri nizkih koncentracijah celo spodbudil rast gliv *Pv<sub>2</sub>* (slika 23) in *Tv* (slika 25). Za bakrove spojine je splošno znano dejstvo, da je baker v nizkih koncentracijah nujno potreben za razvoj gliv (Gupta, 1979). Očitno pa je, da pri tako nizki koncentraciji, nobena izmed učinkovin ni imela zaviralnega vpliva na rast teh dveh gliv. Po drugi strani pa se je izkazalo, da je tudi najnižja koncentracija zadosti visoka, da nekoliko inhibira rast glive *G. trabeum* (slika 24). Zanimivo pa je, da je najvišja koncentracija pripravka CuEOQ v celoti zaustavila rast gliv *A. vaillantii* in *T. versicolor*, pri glivi *G. trabeum* pa se je cepič nekoliko obrasel, vendar se micelij ni razvil. Dejstvo, da nizke koncentracije spodbujajo rast glive ni problematično, saj so te koncentracije bistveno nižje kot se uporabljajo v praksi.

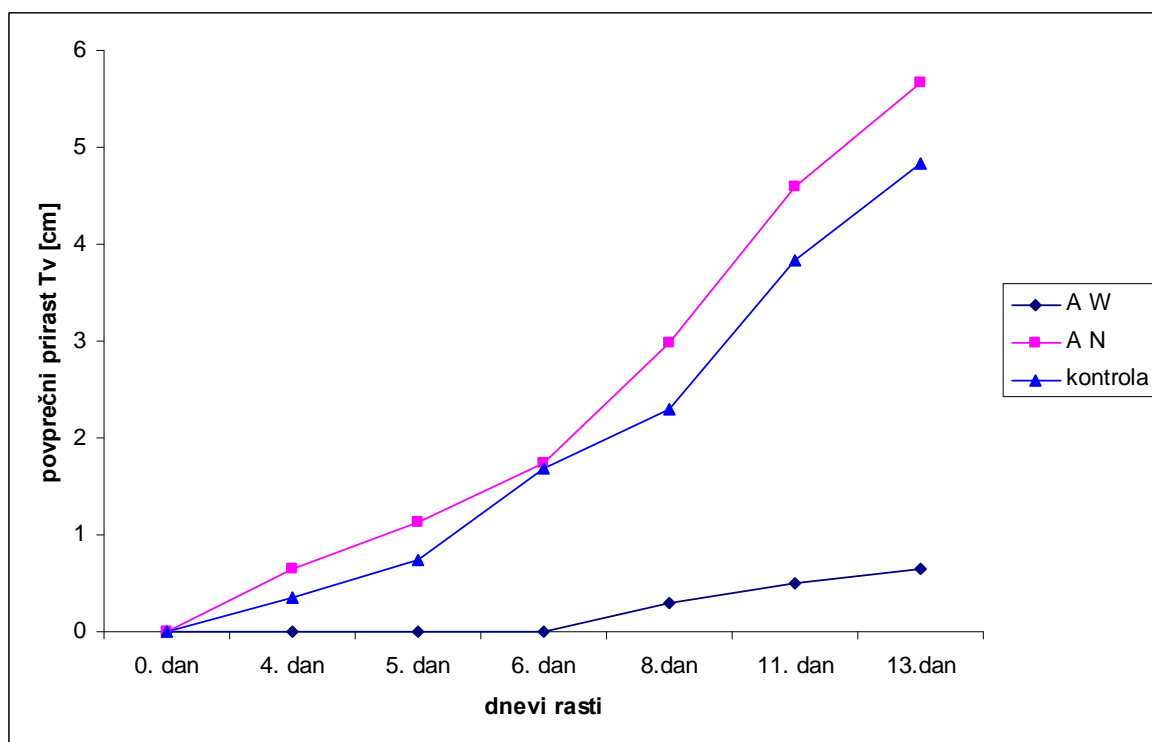


Slika 23: Povprečni prirast micelija glive *A. vaillantii* v odvisnosti od koncentracije CuEOQ (preglednica 6) v hranilnem gojišču

V kolikor primerjamo koncentracije posameznih sestavin, ki so inhibirale rast glive v hranilnem gojišču s tisto, ki je inhibirala rast na hranilnem gojišču z dodanim pripravkom CuEOQ, vidimo da najmanjša inhibitorna koncentracija najbolj učinkovite komponente zaščitnega pripravka CuEOQ določa tudi učinkovitost samega pripravka. Na primer, gliva *A. vaillantii* je prenehala z rastjo na hranilnem gojišču, ki je vseboval 0,025 % QUAT. Ravno ta koncentracija kvartarne amonijeve spojine v pripravku CuEOQ je določila tudi učinkovitost celotnega pripravka, kljub temu, da so bile koncentracije ostalih učinkovin tako nizke, da bi še lahko omogočale rast te glive.



Slika 24: Povprečni prirast micelija glive *G. trabeum* v odvisnosti od koncentracije CuEOQ (preglednica 6) v hranilnem gojišču



Slika 25: Povprečni prirast micelija glive *T. versicolor* v odvisnosti od koncentracije CuEOQ (preglednica 6) v hranilnem gojišču

## 5 SKLEPI

Na podlagi analize navzemov smo ugotovili, da so najboljše v les prodrli pripravki pri srednjih koncentracijah. Na splošno so les najboljše impregnirale vodne raztopine kvartarnih amonijevih spojin, najslabše pa pripravek CuEOQ.

Vzorci, impregnirani z vodno raztopino bakrovega(II) sulfata s koncentracijo 0,025 %, so bili dobro zaščiteni pred delovanjem glive *T. versicolor*. Za zaščito pred na baker tolerantni sev glive *A. vaillantii*, pa ni bila dovolj niti najvišja koncentracija pripravka. Podobne rezultate smo ugotovili tudi na hranilnem gojišču, kjer je micelij glive *A. vaillantii* rasel še na gojišču s koncentracijo bakra 0,064 %, medtem ko je glivi *G. trabeum* in *T. versicolor* inhibirala že koncentracija 0,032 % oziroma 0,008 % bakra v hranilnem gojišču.

Raztopina etanolamina srednje koncentracije (0,577 %) je popolnoma preprečila razkroj na vzorcih izpostavljenih *G. trabeum* in *T. versicolor*, medtem ko je bila za zaščito pred glivo *A. vaillantii* potrebna še enkrat višja koncentracija. Dodatek oktanojske kisline etanolaminu je pri nizkih koncentracijah pospešil razkroj vzorcev izpostavljenih glivi *G. trabeum*. Vendar pa ta vpliv pri višjih koncentracijah oktanojske kisline in etanolamina ni več opazen, oziroma je razkroj impregniranih vzorcev popolnoma zaustavljen. Etanolamin z dodatkom oktanojske kisline popolnoma inhibira rast *A. vaillantii* na hranilnem gojišču z najnižjo koncentracijo učinkovin, medtem ko sta *G. trabeum* in *T. versicolor* rasli pri 0,0633 % oziroma 0,0316 % koncentraciji etanolamina v hranilnem gojišču. Dodatek oktanojske kisline v hranilnem gojišču za razliko od impregniranih vzorcev ne pospešuje rasti gliv.

Vzorci, impregnirani z najnižjo koncentracijo bora (0,025 %), so že bili učinkovito zaščiteni pred vsemi testiranimi glivami. Rezultati presejalnega testa so pokazali, da je na bor še najbolj odporna tramovka, ki je le nekoliko rasla pri 0,0063 % koncentraciji bora v gojišču, medtem ko micelij *A. vaillantii* in *T. versicolor* pri isti koncentraciji ni več rasel.

Pripravek na osnovi kvartarne amonijeve spojine je les pred glivama *G. trabeum* in *T. versicolor* zaščitil že pri srednji koncentraciji (0,1 %). Zaustavitev rasti glive *A. vaillantii* pa smo ugotovili pri visoki koncentraciji (0,25 %). Na hranilnem gojišču je bila, za vse tri testirane glive, mejna koncentracija 0,0125 %.

Ugotovili smo, da med posameznimi sestavinami zaščitnega pripravka CuEOQ ne prihaja do sinergističnih interakcij, ki bi povečale fungicidno učinkovitost pripravka. Po drugi strani pa nobena izmed sestavin ne spodbuja rasti micelija gliv, pri koncentracijah, ki se uporabljajo v pripravkih. Na podlagi te raziskave lahko zaključimo, da najmanjša inhibitorna koncentracija najbolj učinkovite komponente (v našem primeru je to večinoma topbor) zaščitnega pripravka CuEOQ določa tudi učinkovitost samega pripravka.

## 6 POVZETEK

Pripravki na osnovi bakra so dobri fungicid, žal pa se brez uporabe fiksatorjev iz lesa izpirajo. Razlog je dejstvo, da bakrov(II) sulfat z lesom kemijsko ne reagira temveč se samo adsorbira. Problem izpiranja so rešili z dodajanjem kromovih spojin, ki pa so se izkazale kot zdravju in okolju škodljive. Trend je v razvoju in iskanju alternativ kromovim spojinam. Okolju prijazna alternativa je kombinacija etanolamina in oktanojske kisline.

V diplomski nalogi smo preverjali fungicidno delovanje pripravka na osnovi bakra in etanolamina ter njegovih posameznih komponent. Tako smo v skladu z nestandardno mini blok metodo in presejalnim testom ugotavljali sinergijo med bakrovim(II) sulfatom, borom, etanolaminom, oktanojsko kislino, kvartarno amonijevo spojino.

Izkazalo se je, da se je pripravek CuEOQ izkazal za učinkovitega na lesne glive. Med posameznimi sestavinami tega pripravka nismo ugotovili sinergističnih interakcij na zaviranje rasti micelija gliv. Po drugi strani pa posamezne sestavine niso pospeševale rasti lesnih gliv pri koncentracijah, ki jih uporabljamo v praksi. Pomembno je, da sekundarna fungicida, topbor in kvartarna amonijeve spojina, uspešno zaščitata les tudi pred izolati gliv, ki so tolerantne na baker. Glede na izkazane fungicidne lastnosti menimo, da bi ta pripravek lahko uporabili tudi v praksi.

## 7 VIRI

Artiček A. 2004. Fungicidne lastnosti in izpiranje bakra iz lesa zaščitene s pripravki na osnovi bakra in etanolamina. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za lesarstvo: 26 str.

Cigler M. 2002. Vpliv sestavine in priprave zaščitnih sredstev na osnovi bakra in etanolamina na izpiranje bakra iz lesa. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 42 str.

Claus I., Kordsachia O., Schröder N., Karstens T. 2004. Monoethanolamine (MEA) pulping of beech and spruce wood for production of dissolving pulp. *Holzforschung*, 58: 573 - 580

Dagarin F., Petrič M., Pohleven F., Šentjerc M., 1996. IRG/WP 96 – 30110: ERP investigations of interactions between ammoniacal Cu (II) Octanoate and wood. V: Section 3. Wood potecting chemicals. 27th Annual Meeting, Guadeloupe, 19 - 24 May 1996. Stockholm, IRG Secretariat: 11 str.

Eaton R. A., Hale M.D.C. 1993. Wood decay, pests and protection. London, Chapman and Hall: 250 str.

Gorše M. 2005. Vpliv alkilamonijevega klorida na vezavo in učinkovitost bakrovih pripravkov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 57 str.

Green III F., Highley T.L. 1997. Mechanism of brown rot decay: Paradigm or paradox. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39: 113 - 124.

Gupta U. 1979. Copper in the environment. Part 1. New York, John Wiley & Sons: 215 str.



Humar M. 2002. Interakcije bakrovih zaščitnih pripravkov z lesom in lesnimi glivami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 127 str.

Humar M. 2003. Biocidi za zaščito lesa. Ljubljana, Gospodarska zbornica Slovenije, <http://www.gzs.si/Nivo3.asp?ID=8575>

Humar M. 2004. Zaščita lesa danes – jutri. Les, 56: 184 - 188

Humar M., Pohleven F. 2005. Bakrovi pripravki in zaščita lesa. Les, 57: 57 - 62

Humar M., Pohleven F., 2006. Solution for wood preservation no. WO 2006 / 031207 A1. Genova: World intellectual property organization.

Humar M., Pohleven F., Kalan P., Amartey S. 2002. Translokacija bakra iz zaščenega lesa, izpostavljenega glivam razkrojevalkam lesa. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 67: 159 - 171

Humar M., Pohleven F., Petrič M. 2006. Mikroporazdelitev bakrovih pripravkov v razkrojenem impregniranem lesu. Les, 58: 228 - 232

Humar M., Pohleven F., Šentjerc M. 2003. Performance of waterborne Cu (II) Octanoate/Etolamine Wood. Holzforschung, 57, 2: 127 - 134

Jecl B. 2005. Fiksacija pripravkov na osnovi bakra, etanolamina, oktanojske kisline in bora v impregniranem lesu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 42 str.

Jiang X., Ruddick J.N.R. 1999. A spectroscopic investigation of copper ethylenediamine fixation in wood. International Research Group Wood Preservation Document no. IRG/WP/99-20160, pp 3 - 13

Kervina - Hamović Lj. 1987. Zaščita lesa. Ljubljana, BF, Oddelek za lesarstvo: Patologija lesa. Lesna fitopatologija. Ljubljana, VOD Biotehniška fakulteta, VTOZD za lesarstvo: 122 str.

Mangel A. 2000. Identifying physical and chemical phenomena with gravimetric water sorption analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 62: 529 - 537

Pohleven F. 2000. Ogroženost lesnih predmetov kulturne dediščine z glivami. Les v restavratorstvu: 25 - 30

Pohleven F. 1998. The current status of use of wood preservatives in some European countries – summary of the answers to the questionnaire – the last correction in February 1998. Bruselj, COST E2: 2 str.

Pohleven F., Šentjurs M., Dragarin F. 1994. Investigation of amonical copper (II) Octanoate in aqueous solution and it's determination in impregnated wood. *Holzforschung*, 48, 5: 371 - 374

Raspor P., Smole – Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F. V., Hacin J. 1995. ZIM: Zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, katedra za biotehnologijo: 98 str.

Richardson B. A. 1993. Wood Preservation. Second edition. London, Glasgow, E & FN Spon: 226 str.

Richardson H. W. 1997. Handbook of copper compounds and applications. New York, M. Dekker: 93 - 122

Schmidt C. J. 1994. Holz – Bauenpilze. Berlin, Springer – Verlag: 246 str.

Seifert K. 1968. Zur Systematik der Holz – fräulen Ihre Chemischen und Physikalischen Kennzeichen. Holz als Roh und Werkstoff, 26 , 6: 208 – 215

SIST EN 113. Determination of toxic values of wood preservatives against wood destroying Basidiomycetes cultured on an agar medium. 1995: 25 str.

SIST EN 335 – 1/2. Durability of wood and derived materials – definition of hazard classes of biological attack – part 1 and 2. 1992: 13 str.

Tang H., Ruddick J.N.R. 1994. Evaluating the potencial of Anime chemicals for use as Wood Protecting Agents. The International research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP, 94 – 30049: 1 - 12

Tsunoda K., Nagashima K., Takashashi M. 1997. High tolerance of wood – destroying brown - rot fungi to copper – based fungicides. Material und Organismen, 31, 1: 31 - 44

Unger A., Schniewind A.P., Unger W. 2001. Conservation of wood artifacts. Berlin, Springer: 165 - 265

Woodward B., De Groot R. 1999. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolated to copper in agar media. Forest Products Journal, 49, 3: 87 - 94

Zabel R. A. 1954. Variations in preservative tolerance of wood – detroying fungi. Forest product research society journal, 4, 2: 166 - 169

Zhang J., Kamdem D.P. 2000. FTIR characterization of copper – etanolamine – wood interactions for wood preservation. Holzforschung, 54, 2: 119 - 122

Zyskowski J., Kamdem D.P. 1989. Ultraviolet Spectrophotometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Characterization of Copper Naphenate. Wood and Fibre Science, 31, 4: 441 - 446

## **ZAHVALA**

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorju doc.dr. HUMAR Mihi za strokovno vodenje in vsestransko pomoč pri izvedbi poizkusov in sami izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi prof. dr. POHLEVEN Francu za opravljeno recenzijo ter vsem ostalim delavcem na Katedri za Patologijo in zaščito lesa, ki so kakorkoli pomagali pri realizaciji diplomske naloge.

Na koncu se zahvaljujem tudi vsem domačim, kolegom in sošolcem, ki so mi bili v času študija v oporo in so mi kakorkoli pomagali tekom študija in pri izvedbi diplomske naloge.