

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Andrej KRECENBAHER

**VPLIV IZPIRANJA NA FUNGICIDNE LASTNOSTI
ODSLUŽENEGA ZAŠČITENEGA LESA**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2005

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Andrej KRECENBAHER

**VPLIV IZPIRANJA NA FUNGICIDNE LASTNOSTI
ODSLUŽENEGA ZAŠČITENEGA LESA**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

INFLUENCE OF LEACHING ON FUNGICIDAL PROPERTIES OF
IMPREGNATED WOOD REMOVED FROM THE SERVICE

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2005

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

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja diplomskega dela imenoval prof. dr. Franca Pohlevna, za somentorja asist. dr. Miho Humarja in za recenzenta prof. dr. Marka Petriča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andrej Krecenbaher

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
DK UDK 630*844.2
KG odpadni les/CCA/izpiranje/lesne glive
AV KRECENBAHER, Andrej
SA POHLEVEN, Franc (mentor)/HUMAR, Miha (somentor)/
PETRIČ, Marko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, C. VIII/34
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI 2005
IN VPLIV IZPIRANJA NA FUNGICIDNE LASTNOSTI
ODSLUŽENEGA ZAŠČITENEGA LESA
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 51 str., 18 pregl., 16 sl., 47 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Impregniran les po koncu uporabe postane poseben odpadek, saj vsebuje vrsto snovi, ki so okolju škodljive (As, Cr, Cu, B, PCP, lindan ...). Takšen les ne smemo prosto odlagati ali sežigati. Zato je nujno treba poiskati postopke s katerimi bi ga razstrupili. Ena od možnosti je bioremediacija lesa z na baker in arzen tolerantnimi izolati gliv. Ugotavljali smo vpliv predhodnega izpiranja na razkroj in izgubo mase vzorcev, izdelanih iz odsluženega zaščitenega lesa. Odslužen 50 let star telegrafski drog, zaščiten s CCA zaščitnim pripravkom, smo razžagali na vzorce dimenzij 3,0×1,0×0,5 cm. Poleg vzorcev iz zaščitenega zunanjšega sloja smo pripravili vzorce tudi iz nezaščitenne sredice droga in kontrolne iz nezaščitenega lesa jelovine. Pred izpostavitvijo glivam smo vzorce različno obdelali. Del vzorcev smo samo sterilizirali, desetina vzorcev je ostala nesterilna, ostale pa smo izpirali s hladno vodo, vročo vodo, 10 % vodno raztopino očetne kisline in 10 % vodno raztopino oksalne kisline. Vzorce smo izpostavili štirim vrstam gliv rjave trohnobe: navadni tramovki (*Gloeophyllum trabeum*), beli hišni gobi (*Antrodia vaillantii* in *Poria monticola*) in *Leucogyrophana pinastri*. Spremljali smo prerast gliv in po dveh mesecih izpostavitve določili izgubo mase. Ugotovili smo, da je bilo najbolj učinkovito izpiranje z 10 % raztopino oksalne kisline. Pri razkroju pa sta bili najbolj učinkoviti glivi *G. trabeum* in *P. monticola*. Največja izguba mase vzorcev je bila tudi pri vzorcih izpiranih z vročo vodo in izpostavitvi glivi *G. trabeum*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 630*844.2
CX waste wood/CCA/leaching/wood decay fungi
AU KRECENBAHER, Andrej
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)/HUMAR, Miha (co-advisor)/
PETRIČ, Marko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, C. VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science
and Technology
PY 2005
TI INFLUENCE OF LEACHING ON FUNGICIDAL PROPERTIES
OF IMPREGNATED WOOD REMOVED FROM THE SERVICE
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 51 p., 18 tab., 16 fig., 47 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Impregnated wood contains several environmentally hazardous compounds
(As, Cr, Cu, B, PCP, Lindan ...). At the end of its life, such a wood is
considered as special waste, thus it can not be disposed or ordinary burned.
Therefore, new solutions for remediation of the waste, impregnated wood
need to be developed. One of the possibilities is bioremediation using
copper and arsenic tolerant fungal strains. The thesis elucidates the
influence of initial leaching on abilities of wood decay fungi to overgrow
and decay specimens (3.0×1.0×0.5 cm) made of waste, impregnated wood.
To clarify this task, specimens made of 50 year old waste, CCA treated,
pole were cut. Apart from the specimens made of the outer, impregnated
layer, the specimens were also made of non-impregnated core and of fresh
fir wood as well. Prior to fungal exposure specimens were pre-treated using
different procedures. Part of the specimens was not sterilised while the
others were; one tenth of the specimens were leached with cold water,
boiled water, 10 % oxalic acid solution and 10 % acetic acid solution.
Specimens were afterwards exposed to the following 4 brown rot strains:
Gloeophyllum trabeum, *Antrodia vaillantii*, *Poria monticola* and
Leucogyrophana pinastri. Fungal growths over the specimens and mass
losses of the specimens after 2 months of exposure were measured.
Combination of leaching with oxalic acid solution, and exposure to *G.*
trabeum and *P. monticola* were found most effective. Considerable mass
losses were weighted at the specimens leached with hot water and exposed
to *G. trabeum* as well.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED LITERATURE	2
2.1 LES	2
2.1.1 Mikroskopska zgradba lesa	2
2.1.2 Naravna odpornost lesa	3
2.2 ZAŠČITA LESA	4
2.2.1 Kemična zaščita lesa	4
2.3 RAZGRADNJA LESA	8
2.3.1 Glive	8
2.4 VPLIV KOVIN NA GLIVE	18
2.4.1 Fungicidne lastnosti kovin	18
2.4.2 Uporaba tolerantnih gliv pri razstrupljanju zaščenega lesa	21
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 IZOLATI GLIV	24
3.1.1 <i>Antrodia vaillantii (Poria vaillantii) in Poria monticola</i>	24
3.1.2 Navadna tramovka – <i>Gloeophyllum trabeum</i>	25
3.1.3 <i>Yellow fungus – Leucogyrophana pinastri</i>	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Priprava izolatov gliv	26
3.2.2 Priprava testnih vzorcev	26
4 REZULTATI	30
4.1 KEMIJSKA ANALIZA LESA	30
4.2 VPLIV IZPIRANJA NA IZGUBO MASE VZORCEV	31
4.2.1 Neizpirani kontrolni vzorci	31
4.2.2 Neizpirani vzorci iz nezaščitene sredice droga	33
4.2.3 Neizpirani zaščiteni vzorci	35
4.2.4 Izpiranje s hladno vodo	37
4.2.5 Izpiranje z vročo vodo	39
4.2.6 Izpiranje z vodno raztopino oksalne kisline	41
4.2.7 Izpiranje z vodno raztopino očetne kisline	43

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	45
5.1	RAZPRAVA	45
5.2	SKLEPI	47
6	POVZETEK	48
7	VIRI	49
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Uporabljene glive pri poskusih	24
Preglednica 2: Ocene pri vizualnem ocenjevanju priraščanja micelija	29
Preglednica 3: Koncentracija nekaterih elementov v zaščitenem in nezaščitenem lesu	30
Preglednica 4: Vsebnost elementov v našem zaščitenem drogu	30
Preglednica 5: Povprečna preraščenost nesterilnih kontrolnih vzorcev	31
Preglednica 6: Povprečna preraščenost sterilnih kontrolnih vzorcev	31
Preglednica 7: Povprečna preraščenost nesterilnih vzorcev sredice droga	33
Preglednica 8: Povprečna preraščenost sterilnih vzorcev sredice droga	33
Preglednica 9: Povprečna preraščenost nesterilnih zaščitenih vzorcev	35
Preglednica 10: Povprečna preraščenost sterilnih zaščitenih vzorcev	35
Preglednica 11: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat s hladno vodo	37
Preglednica 12: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat s hladno vodo	37
Preglednica 13: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat z vročo vodo	39
Preglednica 14: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat z vročo vodo	39
Preglednica 15: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat z raztopino oksalne kisline	41
Preglednica 16: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat z raztopino oksalne kisline	41
Preglednica 17: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat z raztopino očetne kisline	43
Preglednica 18: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat z raztopino očetne kisline	43

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgradba celične stene olesenele celice	3
Slika 2: Mikroskopski posnetek konice hife glive <i>Aspergillus niger</i>	9
Slika 3: Prikaz izgube strukturnih komponent lesa smreke okuženega z glivo	14
Slika 4: Oksidativna razgradnja celuloze pri rjavi trohnobi	15
Slika 5: Rast micelija bele hišne gobe po vodni površini	16
Slika 6: Shema predlaganega procesa za detoksifikacijo zaščitenega lesa s CC, CCA in CCB zaščitnim sredstvom	22
Slika 7: Rastna komora za izpostavitvev lesa glivam	26
Slika 8: Primer petrijevok z okuženimi vzorci, ki jih je gliva preraščala	28
Slika 9: Izguba mase pri sterilnih in nesterilnih kontrolnih vzorcih	32
Slika 10: Izguba mase pri sterilnih in nesterilnih vzorcih sredice	34
Slika 11: Izguba mase pri sterilnih in nesterilnih zaščitenih vzorcih	36
Slika 12: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo izpranih s hladno vodo	38
Slika 13: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo izpranih z vročo vodo	40
Slika 14: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo izpranih z raztopino oksalne kisline	42
Slika 15: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo izpranih z raztopino očetne kisline	44
Slika 16: Izguba mase pri zaščitenih izpiranih in neizpiranih ter kontrolnih vzorcih	46

OKRAJŠAVE in SIMBOLI

PDA	Potato dextrose agar
Pv2	<i>Antrodia vaillantii</i> , bela hišna goba
Yf	<i>Leucogyrophana pinastri</i> , yellow fungus
Gt2	<i>Gloephyllum trabeum</i> , navadna tramovka
Pm2	<i>Poria monticola</i> , bela hišna goba
K	Neimpregniran kontrolni vzorec
S	Vzorec iz sredice droga
Vv	Vroča voda
Hv	Hladna voda
Ox	Oksalna kislina
Oc	Ocetna kislina

1 UVOD

Za ljudi imajo glive različen pomen. Nekomu so dober zaslužek, drugemu le stvar, ki jo je potrebno v gozdu brniti, tretjemu kulinarčna dobrot, četrtemu kot zdravilo rešijo življenje... Nam lesarjem pa glive predstavljajo predvsem problem pri ohranjanju lesa in lesnih izdelkov. Les predstavlja enega izmed zelo pomembnih materialov, zato se trudimo, da bi ga ohranili čim dlje kot je mogoče. Iz tega razloga se les zaščiti na razne načine. Eden izmed njih je zaščita z bakrovimi spojinami. Ker se bakrove soli iz lesa izpirajo, jih najpogosteje kombiniramo s kromovimi in arzenovimi snovmi, da izboljšamo vezavo in odpornost proti insektom. Življenjska doba tako zaščenega lesa je 25 do 50 let, odvisno od kvalitete in postopka zaščite. Po preteku te dobe se postavi vprašanje kaj storiti z impregniranim lesom. Zaradi visoke vsebnosti težkih kovin in arzena, prosto odlaganje in sežiganje ni dovoljeno. Ena od možnosti reševanja te problematike je bioremediacija s sevi gliv, ki so postali tolerantni na zaščitne pripravke.

Bakrove spojine se že dolgo uporabljajo kot zaščitna sredstva za les. Zato so nekateri izolati iz rodu *Antrodia* postali tolerantni na baker. Za proizvajalce zaščitnih sredstev to predstavlja velik problem. Za okoljevarstvenike in strokovnjake, ki se ukvarjajo z okoljem, pa predstavlja nove izzive in odpira možnost njihove uporabe pri ravnanju z odpadnim zaščitnim lesom. Na baker tolerantne izolate gliv bi lahko koristno uporabili pri detoksifikaciji (razstrupljanju) zaščenega odpadnega lesa.

V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv izpiranja odsluženega zaščenega lesa z različnimi reagenti na dovzetnost za razkroj z glivami rjave trohnobe. Vizualno smo ocenjevali priraščanje gliv na testnih vzorcih. Po dveh mesecih izpostavljenosti pa smo določili izgubo mase vzorcev. Na ta način smo ugotavljali kakšna predhodna priprava lesa je primerna za izboljšanje učinkovitost bioremediacije.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 LES

Les je zelo pomemben material in v svetu ima velik ekonomski pomen. V zgodovini človeštva je predstavljal enega izmed najpomembnejših obnovljivih materialov. Njegove izjemne lastnosti in naravna odpornost nekaterih vrst so človeku zagotavljale material za najrazličnejšo uporabo (kurjavo, orodja in orožja, pohištva, v gradbeništvu, izdelavo transportnih sredstev po kopnem, morju in celo po zraku...) (Eaton in Hale, 1993).

2.1.1 Mikroskopska zgradba lesa

2.1.1.1 Anatomija celične stene

Celična stena zagotavlja trdnostne lastnosti lesa. Razvoj celične stene spremljajo štiri faze: celična delitev, površinska rast, debelitev stene in lignifikacija. Sprva je celična stena izotropen gel, z vgrajevanjem celuloznih fibril pa postane anizotropna (Torelli, 1990).

Celična stena je sestavljena iz primarne in sekundarne stene. Obe steni sestojita iz pleteža celuloznih fibril. To velja za celice skoraj vseh lesnih vrst, razen za celice trakovnega parenhima nekaterih iglavcev (Eaton in Hale, 1993). Primarna stena sestoji iz ohlapnega pleteža celuloznih fibril. Sekundarna stena je sestavljena iz slojev S_1 , S_2 in S_3 . S_1 sloj je zelo tanek in ima menjajoč se Z- in S-heliks. Za njo je značilen velik fibrilni kot ($60^\circ - 80^\circ$). Najdebelejša je S_2 stena, ki zajema od 60 - 80 % vse sekundarne celične stene. Zračnost S_2 sloja je majhen fibrilni kot in ovijajnje mikrofibril v Z-heliksu. Stena S_3 je zelo tanka s S-heliksom in strmim fibrilnim kotom. Kemična sestava posameznih slojev se močno razlikuje. Slika 1 prikazuje srednjo lamelo, primarno in sekundarno steno s tremi sloji ter notranji bradavičasti sloj.



Slika 1: Zgradba celične stene olesenele celice (Zabel in Morrell, 1992)

Glavne kemične komponente olesenele celične stene se delijo na organske in mineralne snovi. Organske snovi se nato delijo na skeletne in ekstraktivne snovi. Med skeletne snovi spadajo celuloza, hemiceluloza in lignin. Celuloza (amorfna in kristalinična) predstavlja 40 do 60 %, hemiceluloza 25 do 35 %, medtem ko lignin predstavlja od 20 do 30 % celotne mase celične stene. Med ekstraktivne snovi uvrščamo snovi, ki služijo kot hranilne snovi (škrob, sladkorje, beljakovine), inhibitorne snovi (smole, tanine, barve, pektine, glikozide, fenole, alkaloidi) in privlačne snovi (eterična olja).

2.1.2 Naravna odpornost lesa

Naravna odpornost lesa je lastnost, ki jo ima les v naravnem zdravem stanju, torej takrat, ko nanj še niso vplivali razni škodljivi dejavniki. Od naravne odpornosti je odvisna trajnost lesa in s tem tudi uporabnost lesa. Odpornost lesa je odvisna od kemičnih sestavin (ekstraktivne snovi) in anatomske zgradbe (gostote lesa).

Ekstraktivne snovi kot so škrob, sladkorji in beljakovine povečujejo dovzetnost na škodljivce. Smole, tanini, barvila, pektini, alkaloidi, glikozidi in fenoli delujejo preprečevalno in varujejo les pred škodljivci. Med zelo odporne vrste prištevamo hrast (*Quercus sp.*), tiso (*Taxus baccata*), kostanj (*Castanea sativa*), robinijo (*Robinia pseudoacacia*), duglazijo (*Pseudotsuga sp.*), evropski macesen (*Larix decidua*), eksotične drevesne vrste... Med slabo odporne lesove prištevamo naslednje vrste: javor (*Acer sp.*), hruška (*Pyrus sp.*), evropska bukev (*Fagus sylvatica*), navadna breza (*Betula pendula*), jelša (*Alnus sp.*), topol (*Populus sp.*).

2.2 ZAŠČITA LESA

Zaščita lesa je veda, ki je tesno povezana s patologijo lesa, biologijo, kemijo, fiziko ter z nekaterimi gospodarskimi panogami kot so: lesarstvo, elektrogospodarstvo, gradbeništvo, kmetijstvo, rudarstvo in druge. Zaščita lesa obravnava naravna, kemična zaščitna sredstva in kemične postopke zaščite lesa, vse iz razloga, da podaljšamo trajnost lesa.

Zaščito lesa kot znanstveno vedo poznamo šele dve stoletji. Začetke zaščite lesa bi lahko našli pri Egipčanih in Kitajcih. Tem so sledile vse civilizacije. V novejši zgodovini je potrebno omeniti postopek potapljanja lesa v živosrebrno raztopino, ki ga je leta 1832 uvedel Kyan. Leta 1836 je Moll patentiral uporabo katranskega olja. Med najpomembnejše postopke zaščite uvrščamo Bethell-ov postopek impregniranja lesa s katranskim oljem pod pritiskom leta 1838 in Boucherie-jev postopek za zaščito svežega lesa. Leta 1850 so uvedli za takratne čase najzanesljivejše zaščitno sredstvo - kreozotno olje, ki so ga pridobivali s suho destilacijo premoga. Pomembno je še leto 1907, ko je Wolman patentiral zaščitno sredstvo "multi sol" na osnovi več komponent in leto 1933, ko je Kamesan razvil kompozicijo CCA (krom, baker, arzen) soli (Richardson, 1993).

2.2.1 Kemična zaščita lesa

Kemična zaščita lesa pomeni vnašanje najrazličnejših kemičnih sredstev v les z namenom, da bi bila trajnost lesa čim daljša. Preventivno zaščitno sredstvo uporabljamo z namenom, da bi les čim dlje zaščitili pred okužbami. Kemično zaščito lesa lahko razčlenimo na (Kervina – Hamović, 1990):

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

Zaradi varstva okolja imajo nekemijski ukrepi zaščite lesa prednost pred kemijskimi. Če je uporabljamo kemično zaščito, naj je bo čim manj in le tam, kjer brez nje ne moremo uspešno zavarovati lesa.

2.2.1.1 Zaščitna sredstva za les

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

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

2.2.1.1.1 Klasična kemična zaščitna sredstva

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

- bakrov sulfat
- zaščitna sredstva na osnovi kroma,
- kovinske naftenate.

Bakrov sulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$): To zaščitno sredstvo je v uporabi že od leta 1742. Sprva se je uporabljal kot lesni balzam, sedaj se uporablja kot samostojen fungicid ali pa v kombinaciji z drugimi solmi (kromove, arzenove, borove...). Vpliva na encimatske procese gliv. Nekateri izolati gliv so nanj odporni, predvsem iz rodu *Antrodia*.

Zaščitna sredstva na osnovi kroma: V to skupino spadajo sredstva iz sistemov baker - krom - arzen (CCA), baker - krom - bor (CCB), baker - krom - fosfor (CCP), baker - krom - fluor - bor (CCFB)... V navedenih kompozicijah služi krom kot fiksirno sredstvo biocidnih substanc v les. Krom je v obliki šestvalentnih ionov, ki so močno kancerogeni. V stiku z lesom se kromovi šestvalentni ioni reducirajo v netoksično trivalentno obliko. Zaradi prisotnosti kroma je fiksacija zaščitnega sredstva v les zelo dobra in trenutno zanj še ni primernega nadomestila. Pri delu z zaščitnimi sredstvi (pripravi le teh in vnašanju v les) je, zaradi njihove toksičnosti, potrebno biti zelo previden. Ko je sredstvo fiksirano v les, je praktično nenevarno. Vendar se zopet pojavi problem, ko les razpade. Takrat krom zopet lahko preide v šestvalentno obliko (Pohleven in Petrič, 1992; Zabel in Morell, 1992; Eaton in Hale, 1993).

Baker v sredstvu deluje fungicidno, arzen pa insekticidno. CCA je eno izmed najpogosteje uporabljenih zaščitnih sredstev. Uporablja se predvsem za drogove, železniške pragove. Je poceni, po zaščiti je površina lesa primerna za različne premaze in zaščitno sredstvo se ne izpira iz lesa. Življenjsko dobo tako zaščitnega lesa ocenjujejo na okoli 25 let (Yang in Illman, 1999).

Kovinski naftenati: Najpogosteje se uporabljajo cinkov naftenat (je brezbarven), bakrov naftenat (les obarva zeleno) in železov naftenat (les obarva rjavo). Naftenati delujejo kot fungicidi, uporabljajo jih tudi za protitemitsko zaščito. So vodoodbojni in spadajo med manj toksične snovi. Njihova slaba stran je, da ne učinkujejo insekticidno, obarvajo les in so nekompatibilni z nekaterimi površinskimi premazi (Pohleven in Petrič, 1992).

2.2.1.1.2 Novejša kemična zaščitna sredstva

Težišče raziskav je usmerjeno k razvoju novih zaščitnih sredstev, ki so okoljsko primernejša. Večina novejših aktivnih komponent za zaščito lesa je organskih. Novejših anorganskih komponent se skoraj ne razvija več. Razvoj novega, okoljsko primerneza zaščitnega sredstva, je dolgotrajen proces in lahko traja tudi več kot 10 let. Za novejše pripravke je zelo zaželeno, da so topni v vodi. Alternativa okoljsko vprašljivim topilom so naravna topila, kot so terpentinsko olje in alkoholi.

Piretroidi so sintetični analogi piretrinov, ki jih v cvetni glavici akumulira rastlina Bolhač (*Tanacetum cinerariifolium*). Naravni piretrini so mešanica šestih estrov krizantemske in piretrinske kisline. Tako naravni piretrini, kot tudi sintetični piretroidi so zelo učinkoviti insekticidi za širok spekter žuželk. Poleg zaščite lesa, se uporabljajo tudi v kmetijstvu, hortikulturi in veterini. Naravni piretrini so manj strupeni za sesalce, a so žal tudi manj stabilni. Njihovo pridobivanje je bistveno dražje, kot sinteza piretroidov. Ena od zelo obetavnih možnosti cenejšega pridobivanja piretrinov je uporaba rastlinskih tkivnih kultur Bolhača. Žal so te raziskave še v začetnih fazah, do takrat pa bomo morali uporabljati sintetične biocide.

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

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

Fungicidno delovanje alkilamonijevih spojin (AAC) je poznano že od leta 1965, vendar se zaradi cenejših in učinkovitejših anorganskih zaščitnih sredstev, uporaba AAC spojin ni uveljavila. AAC spojine delimo v dve skupini. V prvo spadajo primarni, sekundarni in terciarni amini, v drugo pa kvarternarne. Zaradi prepovedi uporabe kromovih soli za zaščito lesa, so AAC soli začeli dodajati bakrovim pripravkom. Bakrove spojine (bakrov karbonat ali bakrov hidroksid) reagirajo z AAC spojinami in se na ta način vežejo v les. Ta kombinacija se večinoma uporablja za zaščito konstrukcijskega lesa (ostrešja, drogovi, ograje). Največja prednost te kombinacije pa je dejstvo, da lahko tako zaščiten les uporabljamo tudi za zaščito lesa v stiku z zemljo. AAC spojine se dandanes veliko

uporabljajo za zaščito lesa: ker imajo širok spekter delovanja (fungicid, baktericid, termiticid, algicid), poleg tega jih lahko kombiniramo z anorganskimi aktivnimi komponentami ter zaradi nizke toksičnosti za sesalce.

2.2.1.1.3 Kotlovni postopki impregnacije

So postopki v velikih jeklenih hermetično zaprtih kotlih. Princip vseh je kombinacija vakuuma in tlaka, v določeni višini in trajanju. S temi postopki dosežemo globinsko impregnacijo.

BETHELLOV postopek (postopek polnih celic) poteka tako da vzpostavimo v kotlu, ki je napolnjen s suhim lesom vakuum, ki izčrpa zrak iz celic lesa, nato ob vzdrževanju vakuuma potiskamo v kotel impregnacijsko sredstvo, ki ga potem, ko je kotel poln, tlačijo tako dolgo, dokler ga je les še zmožen vpijati. Sledi prekinitev tlaka, prečrpavanje sredstva in kratkotrajna vzpostavitev vakuuma, da se les nekoliko osuši. Ga uporabljamo pri drevesnih vrstah, ki težko vpijajo, na primer naša smreka.

RUPINGOV postopek (postopek praznih celic) ali ekonomični (rupingov) postopek poteka tako, da vzpostavimo v kotlu, napolnjenim s suhim lesom, tlak, ki stisne zrak v celicah lesa, nato ob povečanem tlaku potiskajo v kotel impregnacijsko sredstvo. Ko se črpalka ustavi, tlak v kotlu pade in predhodno ustvarjeni tlak v celicah lesa iztisne iz lesa sredstvo tako, da ostanejo celične stene oblite s sredstvom, notranjost celic pa je prazna. Po prečrpavanju sredstva sledi kratkotrajni vakuum, da se les nekoliko osuši. Višino in trajanje tlaka in vakuuma naravnajo glede na les, ki ga impregnirajo, in na kemično sredstvo. Po tem postopku impregniramo v Sloveniji železniške pragove s kreozotnim oljem ki ga zaradi optimalne viskoznosti predhodno segrejemo na 100 – 120°C.

Dvojni RUPINGOV postopek zajema celotni Rupingov postopek dvakrat. S tem dosežemo povečano penetracijo sredstva. Uporabljamo ga zlasti za impregnacijo bukovih pragov s kreozotnim oljem. To impregnacijo lahko opravljamo tudi s štiri faznim postopkom.

Modificirani LOWRYEV postopek praznih celic je podoben Rupingovemu postopku, le da ni začetnega nadtlaka zraka. Zato pa je potreben višji končni vakuum. Pri tem postopku sta retencija in penetracija kemičnega sredstva manjši, po postopku pa je les bolj suh kot pri rupingovem postopku.

Postopek dvojnega vakuuma uporabljajo zlasti za zaščito stavbnega pohištva(okenski okvirji, lesene obloga in podobno) in gradbenega lesa z organskimi sredstvi. Pri tem postopku vzpostavijo v kotlu, ki je napolnjen z lesom, delni vakuum, ki traja nekaj časa, potem pa les zalijejo s sredstvom. Nato vakuum izenačijo z okoliškim tlakom, ki pritiska sredstvo na les. Temu sledi večji vakuum od prvotnega, ki delno izprazni celice lesa in nato ponovno izenačitev z okoliškim tlakom. To potegne sredstvo v les tako, da je po postopku površina lesa delno suha in pripravljena na nadaljnjo obdelavo.

2.3 RAZGRADNJA LESA

Les je stalno podvržen razkrajanju. Razgradnjo povzročajo abiotični in biotični dejavniki.

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

Biotični so dejavniki žive narave, kamor prištevamo insekte, bakterije, glive... Insekti in glive uporabljajo les v svoji prehrani in mu s tem spreminjajo mehanske in kemijske lastnosti.

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

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

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

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

2.3.1 Glive

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

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

2.3.1.1 Zgradba gliv

Tako kot pri vseh organizmih je tudi pri glivah celica osnovni gradnik. Celice gliv so sestavljene iz celične membrane, protoplasta (citoplazma in organeli) in celične stene. Celična membrana obdaja citoplazmo v kateri se nahajajo celični organeli, ki regulirajo sprejemanje metabolizem celice. V citoplazmi se nahajajo organi (ribosomi, endoplazmatski retikulum, jedro, mitohondriji, vakuola... (slika 2)). Jedro vsebuje beljakovine in večje količine DNA, ki je nosilec genetskih informacij (Adamič, 1992).

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



Slika 2: Mikroskopski posnetek konice hife glive *Aspergillus niger*. Na sliki z $25000 \times$ povečavo je mogoče videti ribosome, mitohondrije, golgijev aparat in celično steno (Zabel in Morrell, 1992)

Hife višjih gliv (*Ascomycotina*, *Basidiomycotina* in *Deuteromycotina*) so septirane. Večina sept pri višjih glivah ima posebne odprtine, ki omogočajo transport snovi vzdolž hife. Septe dajejo oporo hifi. Neseptirane hife so brez prečnih sten (pojavljajo se le če je gliva poškodovana) in imajo obliko cevi. Značilne so za nižje glive (*Zigomycotina* in *Mastigomycotina*) (Zabel in Morrell, 1992).

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

Celične stene konic hif se razlikujejo od vzdolžnih sten in sept. Struktura celične stene je različna pri različnih skupinah gliv. Pri večini gliv je glavni gradnik

celične stene hitin, pri pododelku *Zygomycotina* pa hitozan. Celična stena razreda *Oomycetes* je sestavljena iz celuloze (Gunde-Cimerman, 1996).

Preplet večjega skupka hif imenujemo micelij ali podgobje. Hife izločajo ektoencime. Ti razgradijo substrat v razgradne produkte, ki jih gliva nato črpa za svojo energijo. Trosi služijo za razširitev glive na nova področja.

Na reproduktivnih hifah se razvije razmnoževalni del, ki ga pri višjih glivah imenujemo goba ali trosenjaki, na katerem nastajajo trosi.

2.3.1.2 Prehranjevanje gliv

Glive so heterotrofni organizmi. Glavni vir energije pridobijo iz organskih snovi. Prehranjujejo pa se lizotrofno. To pomeni, da v substrat sproščajo eksoencime, ki razgradijo substrat, presnovne produkte nato posrkajo v hife.

2.3.1.2.1 Ektoencimi (eksoencimi)

Encimi so biokatalizatorji, ki nastopajo v skoraj vseh kemičnih reakcijah, ki so povezane z živimi organizmi.

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

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

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

2.3.1.3 Dejavniki okolja, ki vplivajo na rast gliv

Za razvoj in nemoteno rast gliv so pomembni dejavniki: zrak, vlažnost, hranilne snovi, temperatura, svetloba, pH... Za rast in razvoj gliv je pomembno, da so dejavniki čim bolj optimalni. V nasprotnem primeru pride do hiranja in gliva lahko odmre. Spoznanja o teh dejavnikih lahko zelo pripomorejo pri biološkem zatiranju gliv.

2.3.1.3.1 Zrak

Zrak je mešanica plinov. Sestavlja ga 78 % dušika (N_2), 21 % kisika (O_2), 0,03 % (300 ppm) ogljikovega dioksida (CO_2) in 0,07 % ostalih plinov.

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

Glede na potrebo po kisiku lahko glive razdelimo na:

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

Večina gliv spada med obligatne aerobe.

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

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

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

2.3.1.3.2 Vlažnost - voda

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

Voda v lesu: V lesu je prisotna prosta in vezana voda. Prosta voda zapolnjuje celične lumne, medtem ko je vezana voda kemično vezana v celični steni olesenele lesne celice.

Pravšnja količina vode v lesu je bistvenega pomena, da glive lahko okužijo les in za njihovo rast. Kadar je vlažnost lesa pod 20 %, je les varen pred okužbo z glivami. Obstajajo tudi nekatere izjeme npr. glive iz vrste *Aspergillus*, ki lahko rastejo pri 15 % vlažnosti ter glivi *Peronospora destructor* in *Botrytis cinerea*, ki rastejo pri vlažnosti 17 % (Muntañola-Cvetković, 1987). Med lesnimi glivami je najbolj zanimiva siva hišna goba *Serpula lacrymans*, imenovana solzivka, ki lahko raste tudi na popolnoma suhem lesu, saj si vlago ustvarja sama z izločanjem tekočine na trosovnici. Druge hišne gobe, kot je bela hišna goba *Poria monticola*, prenesejo do 5 let sušnega obdobja, pri optimalnih pogojih pa začnejo spet rasti. Tudi prevelika količina vlage v lesu preprečuje okužbo lesa z glivami. Ta dva podatka sta zelo pomembna pri preventivnih ukrepih zaščite lesa, saj lahko na relativno poceni način učinkovito zaščitimo les.

2.3.1.3.3 Substrat (hrana)

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

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

2.3.1.3.4 Temperatura

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

2.3.1.3.5 Svetloba

Svetloba je potrebna za oblikovanje reproduktivnih organov in vpliva na metabolizem gliv. Učinek svetlobe je odvisen od intenzitete, trajanja, valovne dolžine svetlobe...

2.3.1.3.6 pH

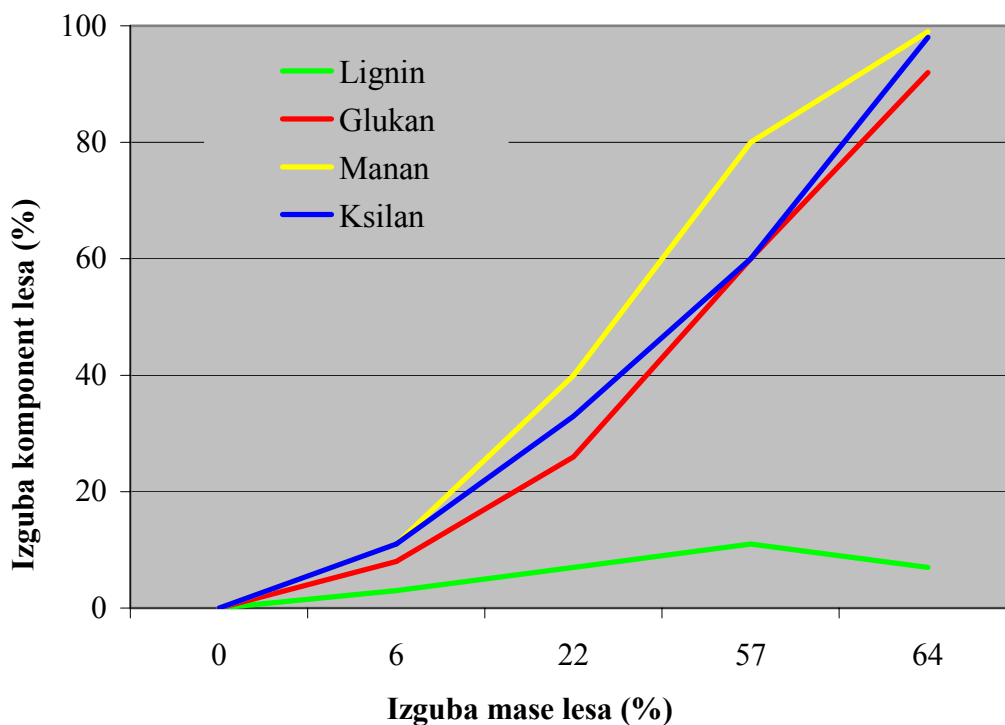
Optimalna vrednost pH (podlage) za rast gliv je okoli 4,5 do 5. Za večino lesnih gliv je značilno, da izločajo organske kisline (oksalno, jabolčno, citrsko) in si tako tudi same zakisajo podlago.

2.3.1.4 Delitev gliv glede na spremembo barve lesa, ki jo povzročajo prave razkrojevalke lesa

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

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

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

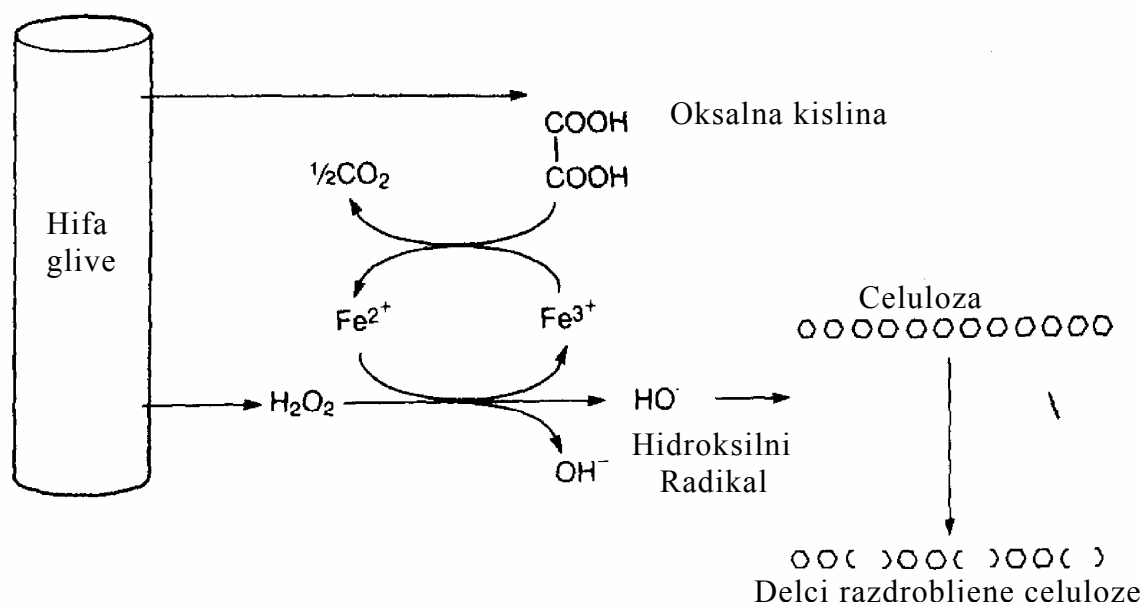


Slika 3: Izgube strukturnih komponent lesa smreke okuženega z glivo *Oligoporus placenta* (Kirk in Highley, 1973)

Mehanizmi, odgovorni za razkroj celuloze, še niso dobro poznani (Shimada in sod., 1991). Znano pa je, da so tudi najmanjše molekule encima celuloze prevelike, da bi lahko prodrle preko vrzeli v celični steni. Na podlagi teh dognanj se sklepa, da začetni razkroj celuloze ni encimatski (Blanchette, 1995; Humar in sod., 2000). Domneva se, da je povzročitelj depolimerizacije celuloze pri glivah rjave trohnobe močno reaktivna snov z majhno molekulsko maso (Micales, 1995). Raziskave o mehanizmu razkroja pri glivah rjave trohnobe so osredotočene na tri področja, ki se med seboj povezujejo (Green in sod., 1991):

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

Eaton in Hale (1993) sta ponudila možnost, da glive razkrajajo celulozo s fentonsko reakcijo (H_2O_2/Fe^{2+}) (slika 4).



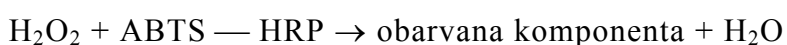
Slika 4: Oksidativna razgradnja celuloze pri rjavi trohnobi (Eaton in Hale, 1993).

Znano je, da les vsebuje zadostne količine železa. Da bi bila fentonska reakcija mogoča, mora biti prisotna tudi oksalna kislina. Fentonska reakcija poteče ob prisotnosti dvovalentne kovine, bakra, železa ali podobne kovine (predlagan je bil tudi mangan) (Ritschkoff in Viikari, 1991; Jordan in sod., 1996) povzroči nastanek hidroksilnega radikala (OH^\cdot) oz. podobnega reaktivnega radikala. Do sedaj še ni bila dokazana prisotnost vodikovega peroksida (H_2O_2) v okuženem lesu. Prisotnost hidroksilnega radikala so dokazali s številnimi metodami (Humar in sod., 2000). Številne študije so pokazale, da so razgradni produkti celuloze, ki je bila okužena z glivo rjave trohnobe, podobni tistim v celulozi, oksidirani z vodikovim peroksidom.

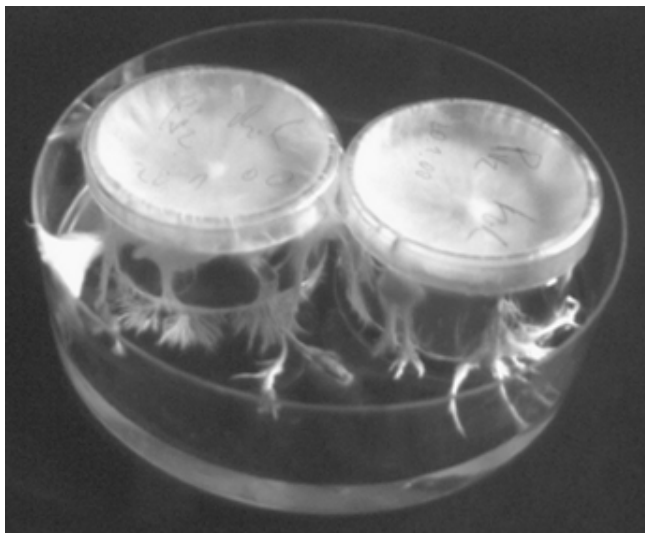
Razlog, da se vodikovega peroksida v lesu ne zazna, bi lahko bil (Ritschkoff in Viikari, 1991):

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

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



V proces razkroja celuloze je nedvomno vključena tudi oksalna kislina, ki je ena izmed najmočnejših organskih kislin ($pK_1 = 1,27$, $pK_2 = 4,26$) (Takao, 1965; Green in sod., 1991; Micales, 1995a; Humar in sod., 2000). Akamatsu in sodelavci (1994) so dokazali, da glive rjave trohnobe kopičijo večje količine oksalne kisline kot glive bele trohnobe. S tem, ko glive kopičijo velike količine oksalne kisline, povzročijo zakisanje podlage. Humar in sodelavci (2000) poročajo, da gliva bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*) v dveh tednih zakisa vodo z začetnih pH 7 na končno vrednost pH 2,5.



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

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

Bela ali korozivna trohnoba Glive, ki povzročajo belo trohnobo, so sposobne razgradnje lignina. Zaradi tega les postaja vse svetlejši.

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

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

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

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

Modrenje: Glive modrivke povzročajo globinske barvne spremembe na iglavcih in listavcih. Najpogosteje okužijo beljavo smreke, bora, topola, breze, lipe... Trosi gliv modrivk se razvijejo le, če padejo direktno na beljavo. Tudi nekateri insekti zanesejo trose v drevo, predvsem podlubniki. Modrivke se hranijo s škrobom in sladkorji, zato ne oslabijo mehanskih lastnosti lesa. Vendar pomodrel les onemogoči vsestransko uporabo lesa.

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

2.4 VPLIV KOVIN NA GLIVE

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

2.4.1 Fungicidne lastnosti kovin

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

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

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

2.4.1.1 Abiotski dejavniki, ki vplivajo na toksičnost kovin

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

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

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

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

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

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

2.4.1.2 Baker kot pomemben element za zaščito pred glivami

Baker je eden izmed sedmih mikroelementov, ki so pomembni za pravilno delovanje višjih rastlin (Pohleven in sod., 1999). Je dokaj pogosto udeležen element v zemeljski skorji. Je prehodni element s tremi oksidacijskimi števili: (Cu(0), Cu(I) in Cu(II)). Oblika, v kateri bo element nastopal in njegova biološka dostopnost je odvisna od mnogih faktorjev kot so: pH, redoks potencial, vrste tal in sedimentov, trdota vode in prisotnosti organizmov (Flemming in Trevors, 1989).

Baker je zelo pomemben za številne metabolne procese prokariotov in evkariotov. Poznanih je vsaj trideset encimov v katerih nastopa. Veliko bakrovih spojin je zaradi svoje dobre topnosti lahko dostopnih biološkim organizmom. Nekateri drugi elementi so biološko nedosegljivi, ker so redki ali pa so slabo topni. Za sesalce je baker relativno malo toksičen, medtem ko je v razmeroma majhnih koncentracijah zelo toksičen za ribe ter nižje organizme, kot so bakterije, alge in tudi glive (Pohleven in sod., 1999).

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

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

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

2.4.1.3 Tolerantnost gliv na baker

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

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

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

2.4.1.3.1 Možni vzroki za tolerantnost gliv na baker

Tolerantnost gliv na baker je poznana že zelo dolgo časa. Collet (1992a) poroča o tolerantnosti glive *Antrodia vaillantii* na baker pri 0,32 mol/l koncentraciji bakra v hranilnem gojišču. Izolirani so bili številni tolerantni sevi gliv iz zaščitenege lesa. Tolerantnost gliv pa se ne pojavlja le na baker, temveč tudi na bolj kompleksne zmesi z bakrovimi spojinami kot sta CCA in CCB (Sutter in sod., 1983).

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

Oksalna kislina igra verjetno zelo pomembno vlogo pri tolerantnosti gliv na bakrove spojine (Akamatsu in sod., 1994). Dokazano je namreč, da številne glive rjave trohnobe izločajo konstantno količino oksalne kisline in s tem zakisajo

substrat (Takao, 1965; Micales, 1995). Znano je tudi, da oksalna kislina reagira z bakrom, kar povzroči nastanek v vodi netopnega bakrovega oksalata (Collet, 1992; Illman in Highley, 1996; De Groot in Woodward, 1999). Baker deluje fungicidno le, če je topen. S tem, ko glive spremenijo baker v bakrov oksalat, slednji postane za njih netoksičen (Humar in Pohleven, 2000). Številne raziskave so potrdile, da glive uspevajo na substratu, v katerem se nahaja bakrov oksalat (Sutter in sod., 1983).

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

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

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

2.4.2 Uporaba tolerantnih gliv pri razstrupljanju zaščitenega lesa

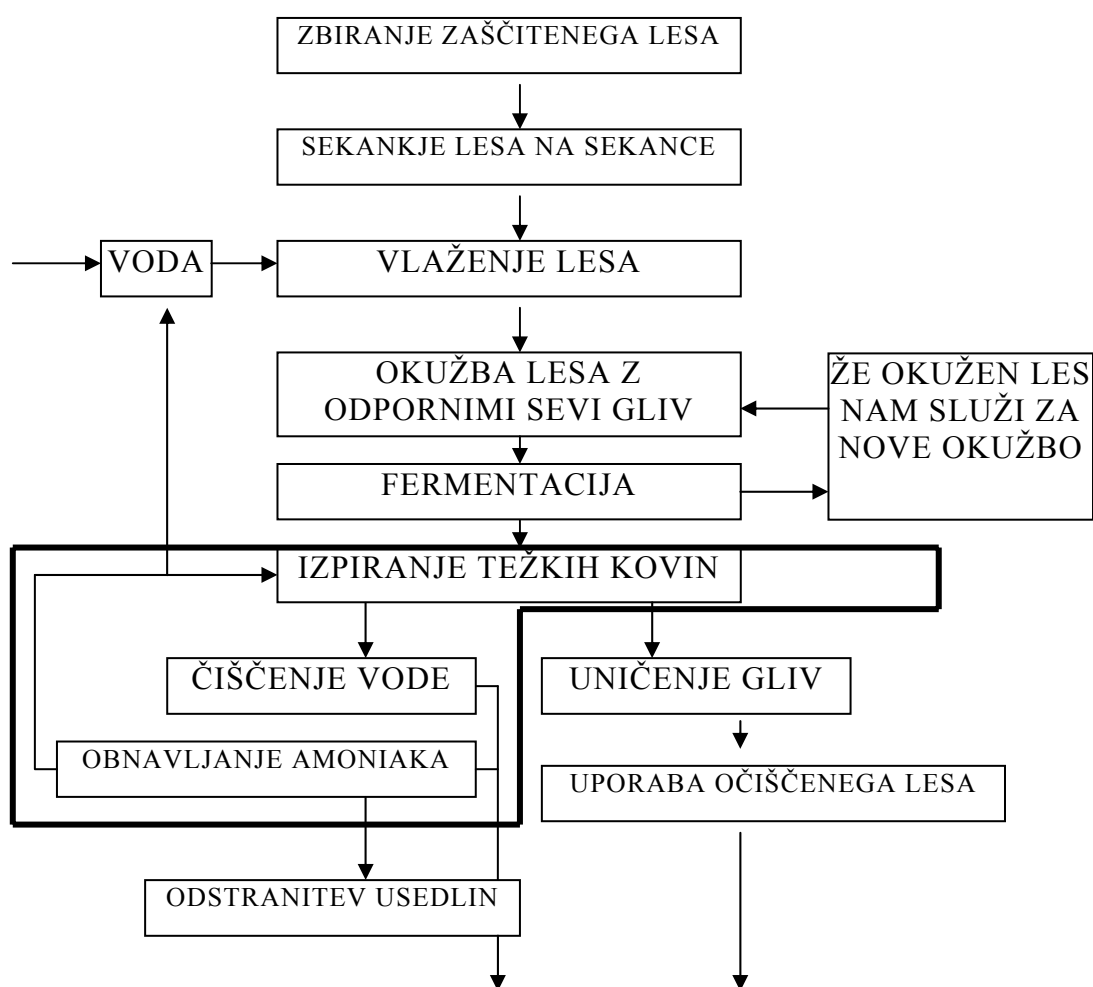
V svetu narašča skrb o odstranitvi že odsluženega zaščitenega lesa. V državah EU predstavlja odslužen zaščiten les poseben odpadek, ki zaradi tehničnih problemov in naravovarstvenih predpisov ni bil vključen v industrijsko reciklažo lesa (Yang in Illman, 1999).

Odsluženega zaščitenega lesa se ne sme uporabljati za kurjavo ali zakopavati v zemljo. Pri običajnem sežiganju se v ozračje sproščajo škodljive snovi v obliki izgorelih plinov in pepela. To velja predvsem za les, ki je zaščiten s CCA solmi. Pri sežiganju lesa baker in krom ostaneta v pepelu, medtem ko se večina arzena (60 - 90 %) izloči z dimom v zrak. Pojav tolerantnost nekaterih gliv bi lahko koristno uporabili za razstrupljanje odpadnega zaščitenega lesa.

Raziskave so pokazale, da bo do leta 2015 količina odpadne zaščitenega lesne mase narasla na 130000 m³. Inštalirana moč posebne sežigalne naprave za to količino bi znašala 20 MW. Izračuni so pokazali, da bi bila lahko reciklaža zaščitenega lesa tudi ekonomsko opravičljiva (Syrjanen, 1999).

2.4.2.1 Možnosti uporabe tolerantnih sevov gliv v praksi

V preteklih letih se je v literaturi pojavilo nekaj člankov o biološkem čiščenju zaščitenega lesa (bioremediaciji). Ti procesi so bili narejeni za odstranjevanje organskih in anorganskih zaščitnih sredstev. Dejstvo je, da so vse navedbe in rezultati teh poskusov temeljili le na laboratorijskih raziskavah. Vprašanje je, kako bi se te metode obnesle v praksi. Leithoff in Peek (1998) sta predlagala naslednji model za razstrupljanje zaščitenega lesa (slika 6). Uporabila sta les zaščiten s CC in CCB. Les sta okužila z glivama *Antrodia vaillantii* in *Tyromyces placenta*.



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

Z raziskavo sta ugotovila, da sta glavna problema zagotavljanje pravšnje vlažnosti in nesterilni pogoji. Pri neustrezni vlažnosti je gliva slabo rasla ali celo prenehala z rastjo. Okužba z bakterijami pa je, ob za njih ustreznih pogojih, zavrla rast gliv.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti odpornost nekaterih gliv na s CCA pripravki zaščenem odsluženem lesu. Pri poskusih smo uporabljali različne glive, vzorce pa smo predhodno izpirali z različnimi sredstvi.

3 MATERIALI IN METODE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje laboratorijske pripomočke: analitsko tehtnico Tehtnica Železniki, tip MN-530, 15 ml petrijevke, čaše, merilni valj, stekleno palčko, pipeto, špiritni gorilnik, eksikator, folijo, papir, rastno komoro (LTH), magnetni mešalnik, magnet. Za izvedbo poskusov smo potrebovali še očetno kislino (99,5% očetna kislina), oksalno kislino, krompirjev glukozni agar, destilirano vodo. Za osebno zaščito smo uporabljali zaščitno haljo in rokavice.

3.1 IZOLATI GLIV

Preglednica 1: Uporabljene glive pri poskusih:

Vrsta glive	Izolat	Poreklo	Tolerantnost na baker
<i>Antrodia vaillantii</i>	Pv2	BF (ZIM L037, Raspor in sod., 1995)	DA
<i>Poria monticola</i>	Pm2	BAM 102	NE
<i>Leucogyrophana pinastris</i>	Yf	Buckinghamshire Chilterns University College UK	DA
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Gt2	BF (ZIM L 017, Raspor in sod., 1995)	NE

3.1.1 *Antrodia vaillantii* (*Poria vaillantii*) in *Poria monticola* – beli hišni gobi

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

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

Bela hišna goba raste najintenzivneje pri temperaturi 27 °C in okoli 40 % vlažnosti lesa. Pri optimalnih pogojih je lahko na hranilnem gojišču dnevni prirast gobe do 12,5 mm dnevno. Posebno ji prija vlaga, ki prodira v les v obliki vodnih kapljic. Zanimivo je, da lahko bela hišna goba zelo dobro prenaša izsušitev. Po

nekaterih virih naj bi gliva še po petih letih sušnega obdobja zopet pričela z rastjo, vendar le, če vlažnost lesa zopet doseže 40 % (Unger, 2001).

Bela hišna goba povzroča rjavo destruktivno trohno. Če se les okuži z belo hišno gobo, zelo hitro izgublja upogibno trdnost. Zanimivo je, da se udarna trdnost močno zmanjša že takrat, ko komaj zaznamo izgubo mase. Veliko škode povzročajo predvsem na tehničnem lesu. Bela hišna goba – *Poria vaillantii* predstavlja velik problem, saj v zadnjih letih v evropskih državah opažajo, da okuži in razkraja tudi les, impregniran s pripravki CCA in CCB, ki se uporablja v stiku z zemljo.

3.1.2 Navadna tramovka – *Gloeophyllum trabeum*

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

Optimalna temperatura za razvoj glive je 35 °C, maksimalna pa nad 40 °C. Vitalni trosnjaki so v začetku temno rumene barve. Lamela in pore imajo nepravilno obliko in razpored. Trosi so brezbarvni in cilindrični, v suhem stanju ohranijo kalivost tudi več kot leto dni.

Goba povzroča temnorjavo prizmatično trohno, podobno drugim vrstam tramovk in je zelo pogosta in nevarna razkrojevalka gradbenega in stavbnega lesa.

3.1.3 *Yellow fungus* – *Leucogyrophana pinastri*

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

Po delovanju je podobna sivi hišni gobi. Najpogosteje jo najdemo v starih stavbah, zunaj stavb je tako rekoč ni. Okužuje les iglavcev in listavcev. Razvija se lahko tudi na suhem lesu. V okuženem lesu, ki ga osušimo, tudi po daljšem času ponovno oživi. *Yellow fungus* pri nas v Sloveniji še ni znana. Podatkov o prisotnosti v naravi pa še nimamo.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava izolatov gliv

Izolate uporabljenih gliv smo vzeli iz glivne banke, kjer so shranjeni na mediju, prelitim s parafinskim oljem in so v stanju dormance. Izolate smo med eksperimentom večkrat precepili. Na ta način smo jih aktivirali.

Kulture micelija glive smo cepili v petrijevke na hranilno gojišče. Cepitev smo opravljali v brezprašni komori pri sterilnih pogojih. Ves pribor smo sproti razkuževali z alkoholom in plamenom. Po opravljeni inokulaciji smo petrijevke postavili v rastno komoro (temperatura 25 °C, relativna zračna vlažnost 70 %) (slika 7). Po preteku enega do dveh tednov so kulture gliv dosegle primerno prerast, smo jih lahko uporabili kot izhodiščno kulturo za cepitev.



Slika 7: Rastna komora za izpostavitve lesa glivm (Foto: Aleš Malnarič)

3.2.2 Priprava testnih vzorcev

Testne vzorce smo izdelali iz 50 let starega telegrafskega droga, zaščitenege s CCA zaščitnim pripravkom. Vzorce (3,0×1,0×0,5 cm) smo izdelali iz zaščitenege oboda in nezaščitene sredice, kontrolne vzorce pa iz sveže posekane jelovine. Eksperiment je potekal v skladu z MTB (mini blok metodo). Vzorce smo označili in v laboratorijskem sušilniku osušili. Sušili smo jih pri temperaturi 103±2 °C 24 ur. Suhe vzorce smo ohladili v eksikatorju in stehali na elektronski tehtnici, na štiri decimalke natančno.

3.2.2.1 Kemijska analiza lesa

Kemijsko analizo lesa se je izvedla z rentgensko fluorescentno spektroskopijo (XRF). Analizirali so izpirane in neizpirane iveri. Pred meritvami so iveri še dodatno pomleli. Meritve so opravljali na Inštitut Jožef Stefan, Oddelek za fiziko nizkih in srednjih energij.

3.2.2.2 Izpiranje vzorcev

Zaščitene vzorce smo izpirali s hladno vodo, vrelo vodo, 10 % raztopino očetne kisline in 10 % raztopino oksalne kisline. Desetine vzorcev nismo izpirali, ampak smo jih samo sterilizirali, desetina pa je ostala nesterilna. Polovico vzorcev smo enkrat izpirali, drugo polovico pa desetkrat. Vzorcev iz nezaščitene sredice in kontrolnih vzorcev nismo izpirali.

Izpiranje je potekalo po naslednjem postopku. Vzorce smo zložili v stekleno posodo, jih prekrili s plastično mrežico in obtežili s steklenimi utežmi, tako da vzorci niso mogli splavati na površino, ko smo jih prelili s tekočino.

Uporabili smo destilirano vodo. Pri izpiranju vzorcev z vročo vodo, smo destilirano vodo segreli do vrelišča. Vroč vodo smo hitro prelili preko vzorcev in pustili, da se je počasi ohladila. Naslednji dan smo postopek ponovili.

Za izpiranje z raztopino očetne kisline smo najprej pripravili 10 % raztopino očetne kisline. Dobro premešano raztopino smo prelili čez vzorce.

Pri izpiranju z raztopino oksalne kisline pripravili 10 % oksalno kislino. S pripravljeno raztopino smo prelili vzorce.

Polovico vzorcev »vzorci za enkratno izpiranje«, smo pustili 1 dan v reagentih. Pri vzorcih, ki smo jih desetkrat izpirali, pa smo naslednjih 10 dni vsak dan zamenjali sredstvo za izpiranje (hladna voda, vroča voda, 10 % raztopina očetne kisline, 10 % raztopina oksalne kisline).

3.2.2.3 Izpostavitve glivi

Izdelali smo 200 vzorcev iz impregniranega droga, 40 iz neimpregnirane sredice droga in 40 kontrolnih vzorcev iz jelovega lesa.

Za vsako glivo smo pripravili po 70 vzorcev (50 impregniranih vzorcev, 10 vzorcev iz nezaščitene sredice in 10 kontrolnih vzorcev). Iz vsake skupine (impregnirani, sredica droga in kontrole) smo po pet vzorcev zavili v papir, jih označili in sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C, drugih pet vzorcev pa nismo sterilizirali. Pri vzorcih iz impregniranega lesa smo vsaki glivi izpostavili po pet vzorcev, ki smo jih predhodno izpirali:

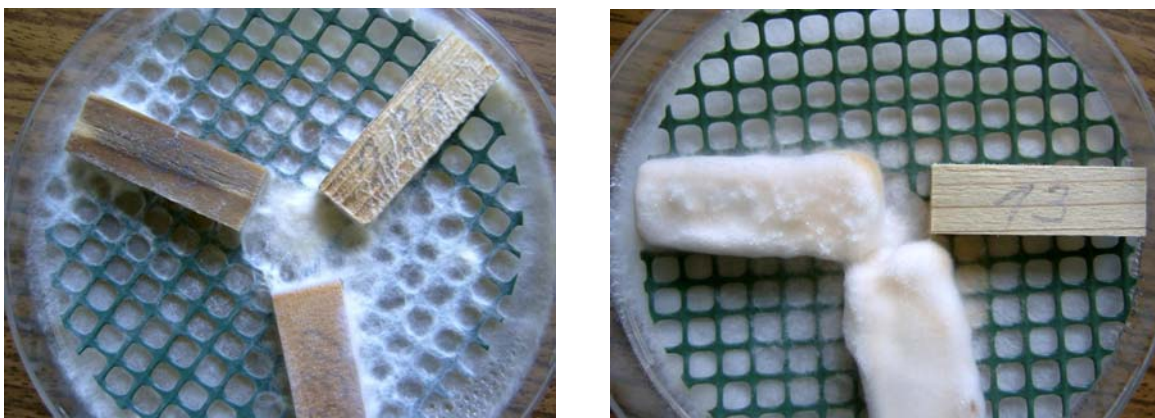
- enkrat s hladno vodo,
- desetkrat s hladno vodo,
- enkrat z vročo vodo,
- desetkrat z vročo vodo,
- enkrat z raztopino oksalne kisline,
- desetkrat z raztopino oksalne kisline,
- enkrat z raztopino očetne kisline
- desetkrat z raztopino očetne kisline

3.2.2.4 Priprava gojišča

Hranilna gojišča za testne glive smo pripravili v sterilnih plastičnih petrijavkah iz dehidriranega krompirjevega glukoznega agarja (PDA). V posebne steklenice smo zatehtali 39 g PDA in ga prelili s 1000 ml destilirane vode. Tako pripravljeno raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri tlaku 150 kPa. Po končanem avtoklaviranju smo hranilno gojišče takoj postavili v brezprašno komoro kjer smo v sterilnih pogojih v vsako petrijevko nalili 16 ml agarja ter pustili, da se je ohladil in strdil. Na strjeni hranilni medij smo cepili cepič glive, ki je bil okrogle oblike s premerom 0,5 cm. Odvzeli smo ga s prej pripravljene osnovne kulture micelija. Cepitev smo opravljali pri sterilnih pogojih v brezprašni komori. Ves pribor smo sproti razkuževali z alkoholom in nad plamenom. Tako pripravljena gojišča smo za 10 dni vstavili v rastno komoro ($T= 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\varphi= 85\text{ }\%$), da je gliva prerasla gojišče.







3.2.2.5 Vstavljanje vzorcev

V avtoklavu sterilizirane vzorce, smo v brezprašni komori vstavili v petrijevke z gojiščem in preraščeno kulturo micelija glive. Preden smo petrijevke odprli, smo jih ožgali. V petrijevke z določeno glivo smo vstavili po tri različne vzorce. Petrijevke smo zaprli in zavili s samolepilno folijo, nato pa smo jih za dva meseca postavili v rastno komoro ($T= 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\varphi= 85\text{ }\%$). Po 14 dneh in 42 dneh smo petrijevke z vzorci temeljito pregledali, fotografirali in vizualno ocenili poraščenost vzorca z micelijem (slika 8, preglednica 2).



Slika 8: Petrijevka z impregniranimi vzorci, ki jih je gliva preraščala

Preglednica 2: Ocene pri vizualnem ovrednotenju priraščanja micelija

Ocena preraščanja vzorcev	Opis	
0	Na vzorcu ni vidnih sledi micelija. Možno je, da je vzorec kljub temu preraščen z glivo	
1	Na vzorcu so majhne sledi micelija	
2	Viden micelij na vzorcu	
3	Dobro viden micelij na vzorcu	
4	Vzorec je delno preraščen z micelijem	
5	Vzorec je povsem preraščen z micelijem	

Po dveh mesecih smo vzorce vzeli iz petrijevok ter jih očistili. Vzorce smo takoj stehtali (m_2), nato pa postavili v sušilnik, kjer smo jih sušili pri $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Naslednji dan smo vzorce vzeli iz sušilnika ter jih ponovno stehtali (m_3). Iz dobljenih vrednosti smo izračunali izgubo mase.

$$\text{Izguba mase} = \frac{m_3 - m_1}{m_1} \times 100 \quad \dots (1)$$

m_1 ... masa absolutno suhих vzorcev pred okužbo

m_2 ... masa vzorcev po okužbi

m_3 ... masa absolutno suhих vzorcev po okužbi

4 REZULTATI

4.1 KEMIJSKA ANALIZA LESA

Kemijska analiza zaščitenege droga je pokazala, da les vsebuje velike količine kromovih, arzenovih, bakrovih in cinkovih spojin. Visoka vrednost cinka (218 ppm) nas je presenetila, saj je približno dvajsetkrat višja od za les normalnih vrednosti (Fengel in Wegner, 1989). Do kontaminacije vzorcev s cinkom je morda prišlo med mletjem oz. pripravo vzorcev (preglednica 3).

Presenetila nas je relativno nizka vsebnost bakrovih spojin. V lesu smo določili v povprečju 3,6 ppm Cu, kar je samo tri krat več kot v nezaščitenem lesu. V primejavi z bakrom smo v drogu izmerili bistveno višje koncentracije Cr in As, med 3573 ppm (Cr) in 1933 ppm (As). Na podlagi sestave zaščitnih pripravkov CCA smo pričakovali, da bodo tudi vsebnosti Cu v tem območju.

Preglednica 3: Koncentracija nekaterih elementov v zaščitenem in nezaščitenem lesu (Fengel in Wegener, 1989)

Element	S CCA zaščiten les	Nezaščiten les
	Koncentracija (ppm)	
Ca	1144,0	1000-100
Ti	19,0	100-10
Cr	3573,3	10-1
Fe	15,4	1000-100
Cu	3,6	1-0,1
Zn	218,7	100-10
As	1933,3	1-0,1
Pb	2,5	
Sr	4,6	100-10

Izpivali smo iveri, saj smo želeli doseči maksimalno možno izpiranje biocidov iz lesa. Izpiranje iz vzorcev bi bilo po vsej verjetnosti še manjše, saj je specifična površina iveri bistveno večja, kot površina vzorcev. Med izpiranjem se je iz iveri izpral le manjši delež biocidov, 14,7 % Cr soli in 14,1 % As spojin (preglednica 4).

Preglednica 4: Vsebnost elementov v zaščitenem drogu pred izpiranjem (CCA neizpran), izpran s hladno vodo (CCA izpran).

Vzorci	Koncentracija elementov (ppm)		
	Cr	Cu	As
CCA neizpran	3573,4	3,6	1933,4
CCA izpran	3086,6	6,6	1693,4

4.2 VPLIV IZPIRANJA NA IZGUBO MASE VZORCEV

V naslednjih preglednicah so rezultati vizualnega ocenjevanja priraščanja gliv in izgube mase, ki so povprečja petih vzorcev, ki smo jih uporabili za vsak test. Ocene so podane številčno, kot je opisano v preglednici 2. Poleg povprečja je podan tudi standardni odklon.

4.2.1 Neizpirani kontrolni vzorci

4.2.1.1 Preraščanje

Kot kontrolne vzorce smo uporabili nezaščiten vzorec jelovine. Polovico teh vzorcev smo sterilizirali, polovica pa je bila nesterilna.

V petrijavkah smo vizualno ocenjevali preraščenost vzorcev z micelijem.

Po pričakovanjih so glive najbolj in najhitreje prerasle vzorce, izdelane iz sveže jelovine. Rezultat je povprečje petih vzorcev (preglednica 5).

Preglednica 5: Povprečna preraščenost nesterilnih kontrolnih vzorcev. (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,6 (0,5)	3,8 (1,1)	2,8 (0,6)	3,6 (0,5)
46 dni	3,0 (0,4)	4,0 (1,2)	3,0 (0,4)	3,2 (0,3)
62 dni	4,4 (0,5)	4,0 (1,2)	3,2 (0,6)	3,2 (0,3)

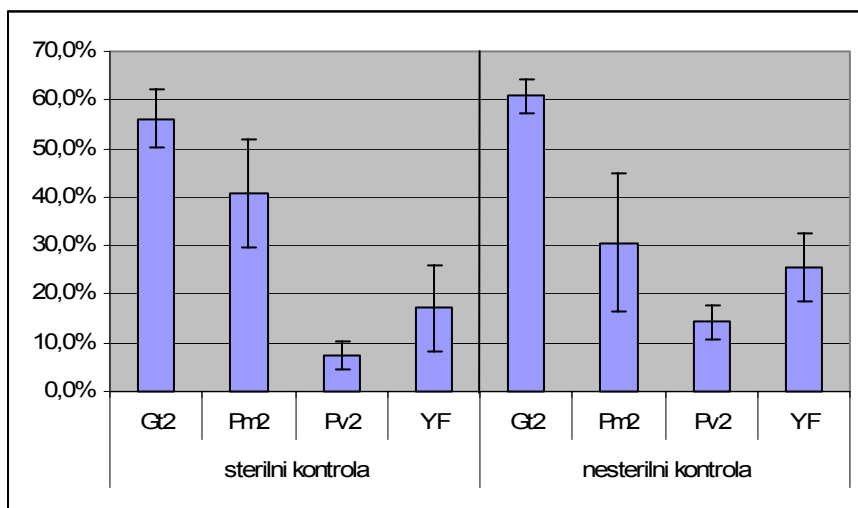
Sterilizacija je rahlo zavrla rast micelija. Verjetno se med steriliziranjem iz lesa izločijo hranilne snovi, ki pripomorejo k boljši rasti gliv (preglednica 6).

Preglednica 6: Povprečna preraščenost sterilnih kontrolnih vzorcev. (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,6 (0,7)	4,4 (1,0)	2,4 (0,5)	3,2 (0,3)
46 dni	3,4 (0,5)	4,6 (0,6)	2,6 (0,5)	3,2 (0,3)
62 dni	4,0 (0,4)	4,8 (0,3)	2,6 (0,5)	3,2 (0,3)

4.2.1.2 Izguba mase vzorcev

Najvišjo izgubo mase vzorcev je povzročila tramovka. Razkrojila je 60,8 % nesterilnih in 56,2 % sterilnih vzorcev. Izolat glive Pm2 je razkrojil 40 % sterilnih in 30 % nesterilnih vzorcev. Glivi Pv2 in Yf pa sta razkrojili bistveno manj vzorcev (slika 9).



Slika 9: Izguba mase pri sterilnih in nesterilnih kontrolnih vzorcih

4.2.2 Neizpirani vzorci iz nezaščitene sredice droga

Za primerjavo smo vzeli tudi nekaj vzorcev iz nezaščitene sredice odpadnega droga. Polovico teh vzorcev smo steralizirali, polovico pa smo pustili nesterilne. Ugotovili smo, da so vsi vzorci bili manj odporni proti glivam kot zaščiteni vzorci.

4.2.2.1 Preraščanje

Vzorci nezaščitene sredice so prerasle bolj kot zaščitene vzorce, vendar slabše kot neimpregnirane kontrolne vzorce. Najbolje sta vzorce prerasli glivi Gt2 in Pm2, slabše pa glivi Pv2 in Yf (preglednica 7).

Preglednica 7: Povprečna preraščenost nesteriliziranih vzorcev izdelanih iz sredice droga (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,0 (0,4)	2,6 (1,3)	2,4 (0,5)	1,6 (0,5)
46 dni	3,6 (0,5)	2,6 (1,4)	2,4 (0,5)	1,8 (0,3)
62 dni	4,6 (0,5)	3,8 (1,1)	2,4 (0,5)	1,8 (0,3)

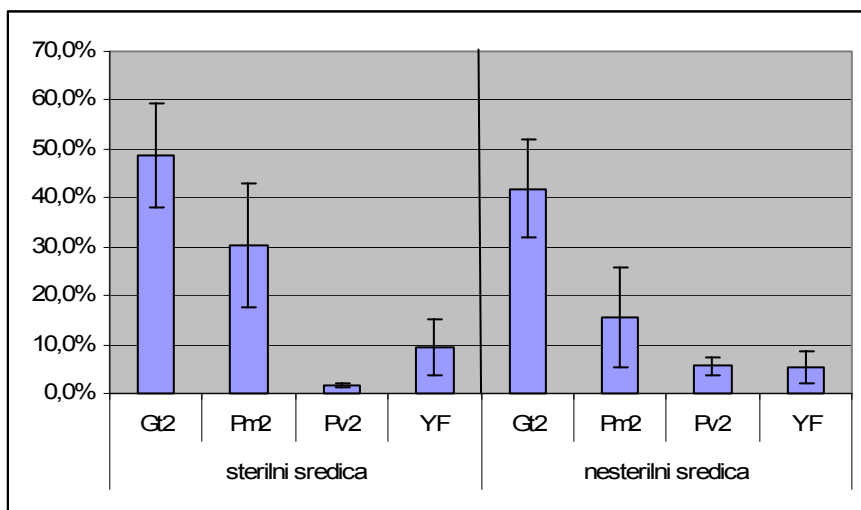
Sterilnost je nekoliko zavrla rast gliv Gt2, Pm2 in Pv2, izboljšala pa rast glive Yf (preglednica 8).

Preglednica 8: Povprečna preraščenost sterilnih vzorcev izdelanih iz sredice droga (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,4 (0,5)	2,6 (1,3)	1,2 (0,3)	1,6 (0,5)
46 dni	3,4 (0,5)	3,4 (1,9)	1,6 (0,5)	1,8 (0,6)
62 dni	4,0 (0,4)	3,6 (1,7)	1,8 (0,3)	2,2 (0,6)

4.2.2.2 Izguba mase vzorcev

Najbolj je les razkrojila tramovka. Izguba mase je bila 41,9 % pri nesterilnih in 48,7 % pri sterilnih vzorcih. Manjši razkroj je povzročila gliva Pm2 (30 % oz. 16 %). Najslabši razkroj pa smo ugotovili pri Pv2 in Yf, ki sta razkrojili 5,5 % oz. 5,6 % nesterilnih vzorcev. To dejstvo nas je presenetilo in nakazuje, da so biocidi difudirali tudi v sredico in vplivali na rast gliv (slika 9).



Slika 9: Izguba mase pri sterilnih in nesterilnih vzorcih sredice

4.2.3 Neizpirani zaščiteni vzorci

Del vzorcev iz odpadnega zaščitenega lesa nismo izpirali, tako da smo ugotovili, koliko je impregniran les po toliko letih sploh še odporen na glive. Polovico teh vzorcev smo steralizirali, polovico pa smo pustili nesterilne. Želeli smo osvetliti, če pri tem pride do kontaminacije z drugimi organizmi.

Rezultati priraščanja so v preglednici 10 in 11.

4.2.3.1 Preraščanje

Na nesterilnih vzorcih je najbolj intenzivno priraščala tramovka (Gt2), sledijo pa ji bela hišna goba (Pv2) ter Yf, najslabšo rast pa smo opazili pri glivi Pm2. Ugotovili smo, da ni prišlo do kontaminacije z drugimi organizmi, saj je micelij na vseh vzorcih preraščal les (preglednica 10).

Preglednica 10: Povprečna preraščenost nesterilnih zaščitenih vzorcev (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,4 (1,1)	0,6 (0,5)	1,8 (0,6)	1,0 (0,0)
46 dni	2,4 (1,1)	0,6 (0,5)	2,0 (0,4)	0,6 (0,5)
62 dni	3,0 (0,4)	0,6 (0,5)	2,2 (0,2)	0,6 (0,5)

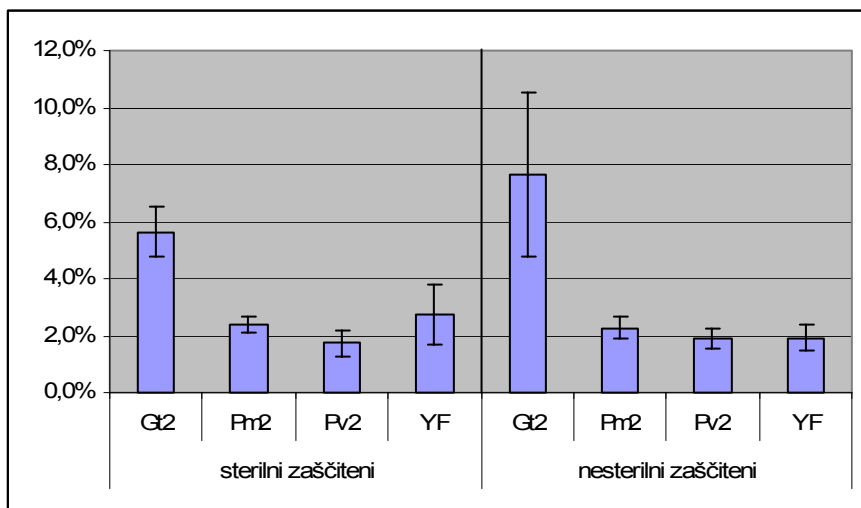
Na sterilnih vzorcih so glive preraščale hitreje, kot na nesterilnih. Edina izjema je gliva Pv2, katere rast je bila nekoliko upočasnjena (preglednica 11).

Preglednica 11: Povprečna preraščenost sterilnih zaščitenih vzorcev (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	1,8 (0,3)	0,4 (0,5)	1,4 (0,5)	1,4 (0,5)
46 dni	2,6 (0,9)	0,8 (0,6)	1,8 (0,3)	1,8 (0,6)
62 dni	3,0 (0,8)	1,2 (0,3)	1,8 (0,3)	2,2 (1,0)

4.2.3.2 Izguba mase vzorcev

Neizpirane vzorce je najbolj razkrojila tramovka (Gt2), najmanj pa gliva Pv2. Steriliziranje je nekoliko znižalo izgubo mase vzorcev, izpostavljenih glivi Gt2, je pa pozitivno vplivalo na glivo Yf (slika 11).



Slika 11: Izguba mase pri sterilnih in nesterilnih zaščenih vzorcih

4.2.4 Izpiranje s hladno vodo

4.2.4.1 Preraščanje

Preraščanje micelija po enkratnem izpiranju s hladno vodo je bilo najintenzivnejše pri glivi Gt2, najslabše pa pri glivi Pm2. Gliva Gt2 je vzorce delno prerasle že po 14 dneh, medtem ko gliva Pm2 vzorcev ni prerasla niti po dveh mesecih (preglednica 11).

Preglednica 11: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat s hladno vodo (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,2 (1,6)	0,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,4 (0,6)
46 dni	2,4 (1,7)	0,0 (0,0)	1,2 (0,5)	1,6 (0,6)
62 dni	3,2 (1,6)	0,0 (0,0)	1,2 (0,5)	1,8 (0,6)

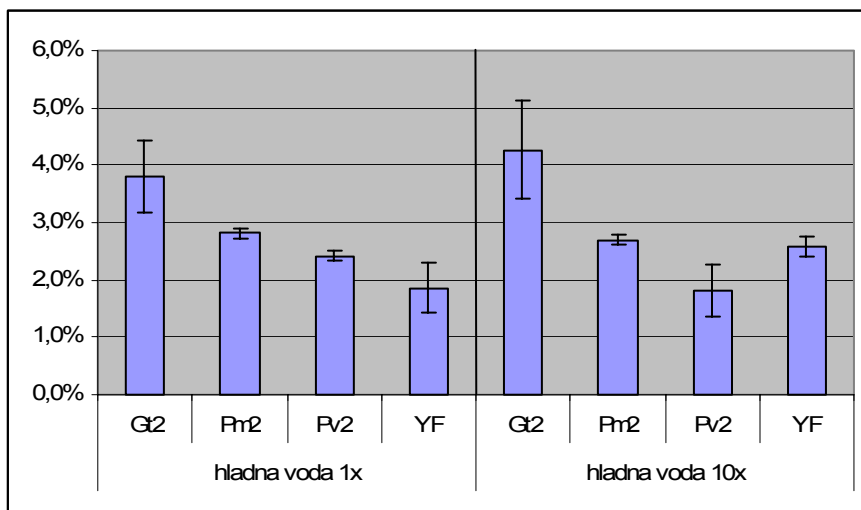
Desetkratno izpiranje se nekoliko razlikuje od enkratnega izpiranja. Gliva Pm2 ni rasla v nobenem primeru, po drugi strani pa je izpiranje rast glive Pv2 in Yf pospešilo, nekoliko pa je zavrlo rast glive Gt2 (preglednica 12).

Preglednica 12: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat s hladno vodo (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	1,2 (0,5)	0,0 (0,0)	1,4 (0,6)	2,0 (0,7)
46 dni	1,2 (0,5)	0,0 (0,0)	1,4 (0,6)	2,0 (0,7)
62 dni	1,4 (0,6)	0,0 (0,0)	1,4 (0,6)	2,0 (0,7)

4.2.4.2 Izguba mase vzorcev

Najbolj je vzorce razkrojila tramovka (Gt2), najmanj pa bela hišna goba (Pv2). Kljub temu, da nismo opazili intenzivne rasti pri vzorcih izpostavljenih glivi Pm2 (preglednica 11 in 12), je ta gliva razkrojila kar 2,7 oz. 2,8 % mase vzorcev (slika 12).



Slika 12: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo izpranih s hladno vodo

4.2.5 Izpiranje z vročo vodo

4.2.5.1 Preraščanje

Preraščanje micelija pri enkratnem izpiranju z vročo vodo je bilo najboljše pri glivi Gt2, najslabše pa pri glivi Pm2 (preglednica 13) – pri tej glivi ni bilo vidnih znakov rasti. Glive so rasle hitreje, kot pri vzorcih izpranih s hladno vodo (preglednica 13).

Preglednica 13: Povprečna preraščenost vzorcev enkrat izpranih z vročo vodo (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	4,2 (0,3)	0,0 (0,0)	1,4 (0,8)	1,2 (0,3)
46 dni	4,2 (0,3)	0,0 (0,0)	1,4 (0,8)	1,2 (0,3)
62 dni	4,2 (0,3)	0,0 (0,0)	1,6 (0,8)	1,2 (0,3)

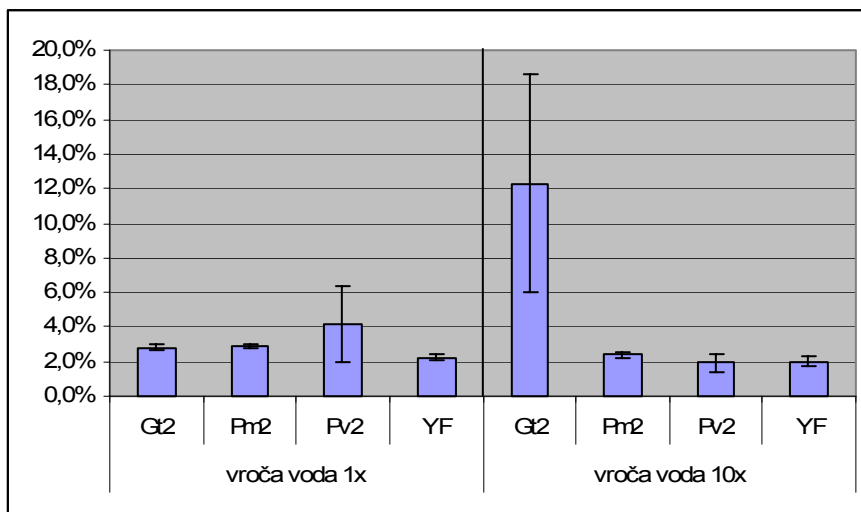
Preraščanje micelija pri desetkratnem izpiranju z vročo vodo je bilo najboljše pri glivi Gt2, najslabše pa pri glivi Pm2. Daljše izpiranje z vročo vodo je poslabšalo intenziteto rasti glive Gt2, pospešilo pa rast vseh ostalih gliv. Znake rasti smo opazili celo pri glivi Pm2 (preglednica 14).

Preglednica 14: Povprečna preraščenost vzorcev desetkrat izpranih z vročo vodo (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	3,2 (0,6)	0,6 (0,5)	2,4 (0,5)	2,6 (0,7)
46 dni	3,2 (0,6)	0,6 (0,5)	2,4 (0,5)	2,6 (0,7)
62 dni	3,2 (0,6)	0,6 (0,5)	2,6 (0,7)	2,6 (0,7)

4.2.5.2 Izguba mase vzorcev

Pri desetkratnem izpiranju z vročo vodo je bila največja izguba mase dosežena pri vzorcih izpostavljenih glivi Gt2, najmanjšo izgubo mase pa je povzročila gliva Pv2. Razlika med enkratnim in desetkratnim izpiranjem je v tem primeru bistveno večja kot pri izpiranju s hladno vodo. Vroča voda je tudi bistveno poslabšala fungicidne lastnosti lesa (slika 13).



Slika 13: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo glivam izpranih z vročo vodo

4.2.6 Izpiranje z vodno raztopino oksalne kisline

Uporabljali smo 10 % vodno raztopino oksalne kisline. Z raztopino oksalne kisline smo vzorce izpirali enkrat in desetkrat.

4.2.6.1 Preraščanje

Izpiranje z raztopino oksalne kisline je nekoliko poslabšalo rast glive Gt2, v primerjavi z vodo ali vročo vodo. Ta rezultat je razumljiv, saj je gliva znana, da ne izloča raztopino oksalne kisline in zato jo je očitno prisotnost kisline zavrla (Takao, 1965). Po drugi strani pa je izpiranje z raztopino oksalne kisline močno povešalo prirast gliv Pv2, Pm2 in Yf, kot je razvidno iz preglednice 15, kot tudi iz preglednice 16.

Preglednica 15: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat z raztopino oksalne kisline (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	1,2 (0,3)	0,0 (0,0)	1,2 (0,3)	1,2 (0,9)
46 dni	2,0 (0,3)	0,0 (0,0)	2,6 (0,5)	1,6 (1,0)
62 dni	2,0 (0,4)	0,0 (0,0)	2,6 (0,5)	1,6 (1,1)

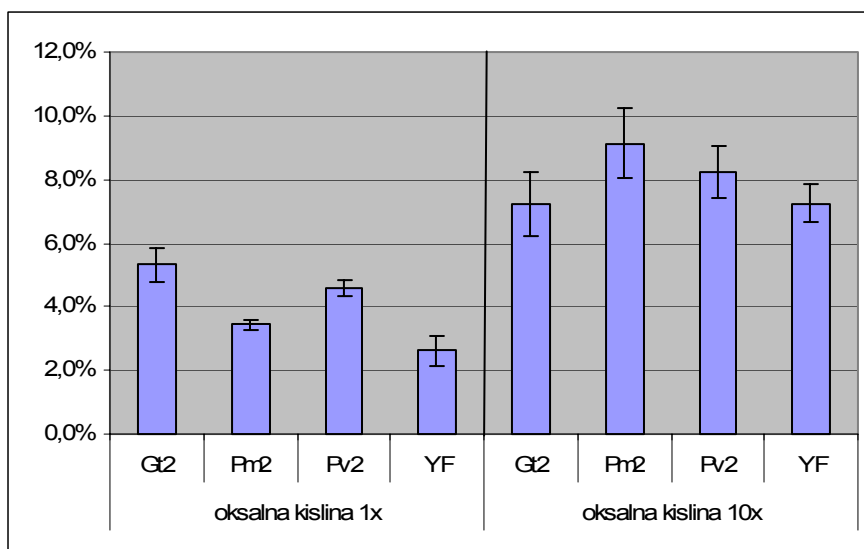
Med oksalno kislino in bakrovimi ter arzenovimi ioni je očitno prišlo do takšnih spojin, ki so se izprale iz lesa, kar se odraža tudi pri večji izgubi mase (slika 14)

Preglednica 16: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat z raztopino oksalne kisline (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	1,4 (0,5)	1,2 (0,3)	2,4 (0,5)	3,0 (1,0)
46 dni	2,0 (0,4)	1,2 (0,3)	2,6 (0,5)	3,4 (1,0)
62 dni	3,4 (0,5)	1,6 (0,7)	3,4 (0,5)	3,4 (1,1)

4.2.6.2 Izguba mase vzorcev

Pri vzorcih, ki so bili kratkotrajno izpirani, smo določili večje izgube mase, kot pri vzorcih, ki so bili desetkrat izpirani. Verjetno je prevelika kislost že sama po sebi zavrla razkroj. Prevelika vsebnost oksalne kisline verjetno zavre prirast gliv. Enkratno izpiranje vzorcev je najbolj pospešilo rast z glivami, ki še same izločajo raztopino oksalne kisline (Pv2, Yf, Pm2). Pozitivno je vplivalo tudi na Gt2, ki te kisline ne izloča (slika 14).



Slika 14: Izguba mase vzorcev pred izpostavitvijo glivam izpranih z raztopino oksalne kisline

4.2.7 Izpiranje z vodno raztopino očetne kisline

Uporabljali smo 10 % raztopino očetne kisline. Podobno, kot v drugih primerih smo vzorce izpirali enkrat in desetkrat.

4.2.7.1 Preraščanje

Enkratno izpiranje z raztopino očetne kisline je bistveno zavrlo rast gliv. Tudi v tem primeru gliva Pm2 ni rasla, po drugi strani pa je tramovka rasla najintenzivnejše (preglednica 17).

Preglednica 17: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih enkrat z raztopino očetne kisline (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,8 (0,3)	0,0 (0,0)	1,6 (0,5)	1,0 (0,0)
46 dni	2,8 (0,3)	0,0 (0,0)	2,4 (0,5)	1,6 (0,5)
62 dni	2,8 (0,3)	0,0 (0,0)	2,4 (0,5)	1,8 (0,3)

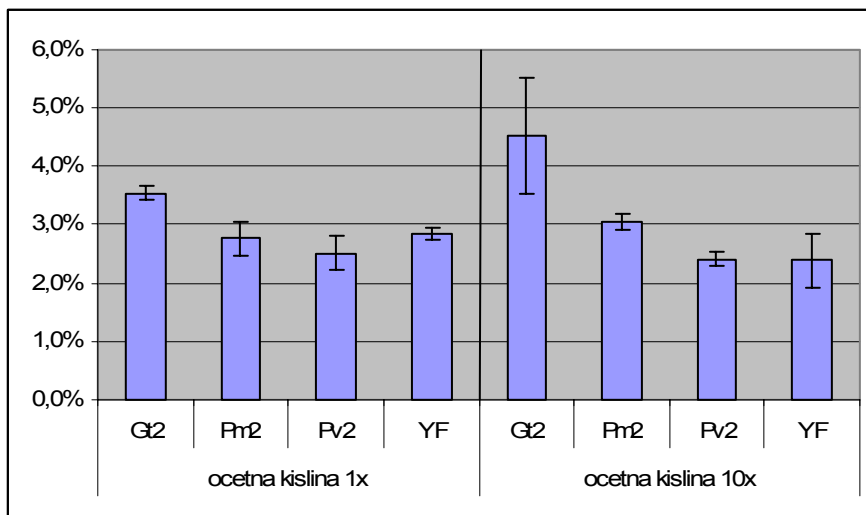
Desetkratno izpiranje je nekoliko poslabšalo rast tramovke (Gt2) in Pv2, bistveno pa je izboljšalo rast gliv Pm2 in Yf (preglednica 18).

Preglednica 18: Povprečna preraščenost vzorcev izpranih desetkrat z raztopino očetne kisline (V oklepaju je naveden standardni odklon).

Dnevi po cepitvi	Gliva			
	Gt2	Pm2	Pv2	Yf
14 dni	2,0 (0,4)	0,4 (0,5)	1,6 (0,5)	1,2 (0,3)
46 dni	2,2 (0,3)	0,6 (0,7)	1,8 (0,3)	2,0 (0,0)
62 dni	2,4 (0,5)	1,2 (0,3)	1,8 (0,3)	2,0 (0,0)

4.2.7.2 Izguba mase vzorcev

Izgube mase po izpiranju z raztopino očetne kisline so manjše od izgube mase z raztopino oksalne kisline izpiranih vzorcev, vendar večje od kontrolnih neizpiranih vzorcev in vzorcev, ki so bili izpirani le z vodo (slika 19).



Slika 15: Izguba mase vzorcev izpiranih z raztopino očetne kisline

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Baker je v majhnih količinah nujno potreben za rast gliv, vendar že pri nekoliko višjih koncentracijah nanje deluje toksično. Zaradi te lastnosti se bakrove spojine že zelo dolgo uporabljajo kot sredstvo za zaščito lesa in rastlin (Pohleven in sod., 1999). V zadnjem času se vse bolj pojavlja odpornost izlatov gliv na baker in bakrove spojine. Zelo pogosto se omenja belo hišno gobo (*Antrodia sp.*), pri kateri se pojavijo na baker in bakrove spojine odporni izolati (De Groot in Woodward, 1998). Ti izolati predstavljajo veliko grožnjo zaščitenem lesu, po drugi strani pa bi lahko te glive uporabili za razstrupljanje odpadnega zaščitenega lesa (Leithoff in Peek, 1998)

V diplomski nalogi smo opazovali vpliv izpiranja s hladno vodo, vročo vodo, 10 % raztopino oksalne in 10 % raztopino očetne kisline na odpornost zaščitenega odpadnega lesa proti štirim vrstam gliv rjave trohnobe: navadni tramovki (*Gloeophyllum trabeum*), beli hišni gobi (*Antrodia vaillantii* in *Poria monticola*) in *Leucogyrophana pinastri*.

Kot surovino smo uporabili star impregniran drog iz katerega se je v 50 letih uporabe izprala večina bakrovih učinkovin. V lesu jih ostalo le še 3,6 ppm Cu (preglednica 4). Izpiranje bakrovih spojin iz lesa je pričakovano (Hughes, 1999), vendar nas je rezultat kljub temu presenetil, saj se je izpral skoraj ves baker. Po drugi strani pa je v lesu ostalo 3573 ppm kromovih in 1933 ppm arzenovih spojin (preglednica 4).

Kljub temu, da je bil drog že 50 let v uporabi, nas je zanimalo kako bi z dodatnim izpiranjem še zmanjšali količino preostalih biocidov v lesu. S tem ko smo iz droga izdelali vzorce, smo mu močno povečali specifično površino in na ta način tudi izpirljivost.

Preraščenost vzorcev z micelijem glive smo opazovali po 14, 46 in 62 dneh. Že pri ocenjevanju preraslosti vzorcev smo videli da so glive najbolj uspevale na vzorcih izpiranih z raztopino oksalne kisline (preglednica 15 in preglednica 16), kar se je na koncu odrazilo tudi v največji izgubi mase.

Peraščenost vzorcev je bila bolj odvisna od glive kot od vrste izpiranja. Pri vseh vzorcih je bila najbolj aktivna tramovka (*G. trabeum*), ki je najhitreje in najbolj močno prerasla vzorce. Najmanj očitna je bila aktivnost bele hišne gobe (*Poria monticola*), ki v večini primerov izpiranih vzorcev sploh ni vidno prerasla, razen vzorcev izpiranih z vročo vodo.

Izpiranje z vročo vodo zelo pozitivno vpliva na rast glive *G. trabeum*, predvsem pri desetkratnem izpiranju (slika 13). Topnost aktivnih učinkovin se je pri višjih

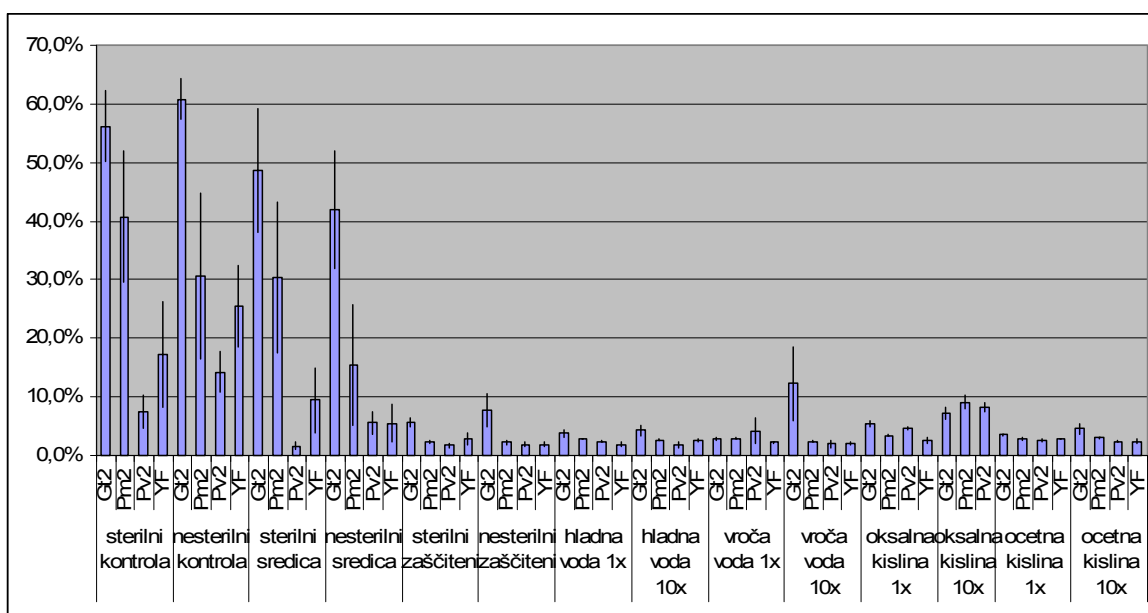
temperaturah očitno povečala, kar se odraža v intenzivnejši rasti gliv. Rast vseh gliv in izgubo mase je močno izboljšalo tudi izpiranje z 10 % raztopino oksalne kisline. Precejšna izguba mase je opazna že pri enkratnem izpiranju, še večja pa pri desetkratnem izpiranju (slika 14). Pri desetkratnem izpiranju z raztopino oksalne kisline je bila izguba mase vsaj 100 % večja kot pri izpiranju s katerikoli drugim sredstvom. Prepričani smo, da je prišlo do tvorbe oksalatov med sicer netopnimi kromovimi in arzenovimi spojinami v lesu in raztopino oksalne kisline. Kromovi oksalati in arzenovi oksalati pa so v vodi dobro topni in se zato tudi lažje izperejo iz lesa (Humar in sod., 2004).

Pri izpiranje s hladno vodo, vročo vodo ter raztopino očetne kisline se pojavijo manjše razlike. Najslabše se obnese izpiranje s hladno vodo, vendar je izguba mase precej večja kot pri neizpiranih vzorcih, z izjemo tramovke (*G. trebeum*).

Presenetilo nas je, da ni prišlo do večjih razlik pri neizpranih sterilnih in nesterilnih vzorcih,. Pri nesterilnih vzorcih smo določili celo nekoliko večje izgube mase kot pri steriliziranih (slika 11). Iz tega sklepamo, da ni prišlo do okužbe z drugimi mikroorganizmi pri nesterilnih vzorcih.

Zanimiv je izolat tramovke, ki je na neizpiranih sterilnih in nesterilnih vzorcih povzročila večjo izgubo mase kot pri izpiranih vzorcih s hladno vodo, vročo vodo in raztopino očetne kisline. Izpiranje z raztopino oksalne kisline je povzročilo večjo izgubo mase vzorcev.

Slika 16 prikazuje primerjavo izgube mase pri zaščitenih in nezaščitenih vzorcih. Pri izgubi mase zaščitenih vzorcev najbolj izstopa tramovka (*G. trebeum*), predvsem pri desetkratnem izpiranju z vročo vodo. Vse uporabljene vrste gliv pa so povzročile precejšno izgubo mase pri izpiranju z raztopino oksalne kisline.



Slika 16: Izguba mase pri zaščitenih izpiranih in neizpiranih ter kontrolnih vzorcih.

5.2 SKLEPI

Po 50 letih uporabe je koncentracija Cu v lesu že močno upadla. Večina bakrovih spojin se je iz lesa izprala. V drogu pa je ostalo relativno veliko kroma, arzena in cinka.

Z našimi raziskavami smo potrdili, da izpiranje odpadnega zaščitenega lesa z raztopino oksalne kisline in vročo vodo pozitivno vpliva na dovzetnost na okužbo z glivami in s tem hitrejšo preraščanje vzorcev z glivami rjave trohnobe.

Po izpiranju in dvomesečni izpostavitvi glivam so vzorci izgubili od 2 % - 12 % mase. Če bi vzorce izpostavljali dalj časa, bi bila izguba mase še višja.

Najvišjo izgubo mase smo dosegli pri vzorcih izpostavljenih tramovki (*G. trebeum*), najmanjše pa pri beli hišni gobi (*Antrodia vaillantii*).

Najvišjo izgubo mase smo dosegli pri izpiranju z raztopino oksalne kisline in vročo vodo. Večja izguba je bila pri vzorcih, ki smo jih desetkrat izpirali.

6 POVZETEK

Količina odpadnega zaščenega lesa se bo v prihodnje še povečevala. Tak les bo potrebno na nek način odstraniti ali vsaj zmanjšati njegovo toksičnost. V diplomskem delu smo poskušali določiti najprimernejši postopek bioremediacije, s katerim bi z izpiranjem in s pomočjo tolerantnih sevov gliv razstrupili odslužen zaščen les. Razstrupljen les pa bi lahko uporabili v različne namene.

Odslužen zaščen les smo razžagali na vzorce $3,0 \times 1,0 \times 0,5$ cm, kot predvideva mini blok metoda. Vzorce smo izpirali s hladno vodo, vročo vodo, 10 % raztopino očetne in 10 % raztopino oksalne kisline. Polovico vzorcev smo enkrat izpirali, polovico pa desetkrat. Desetino vzorcev nismo izpirali, ampak smo jih samo sterilizirali, desetino vzorcev pa smo pustili nesterilne. Po končanem izpiranju smo vzorce sterilizirali in osušili do absolutne suhosti. Suhe vzorce smo izpostavili štirim izolatom gliv rjave trohnobe: navadni tramovki (*Gloeophyllum trabeum*), beli hišni gobi (*Antrodia vaillantii* in *Poria monticola*) in *Leucogyrophana pinastri*. Priraščanje micelija smo opazovali dva meseca, po tem času pa smo vzorce ponovno osušili in izračunali izgubo mase vzorcev.

Ugotovili smo, da je bilo najbolj učinkovito izpiranje z 10 % raztopino oksalne kisline. Pri tem izpiranju pa sta bili najbolj učinkoviti glivi *G. trabeum* in *P. monticola*.

Po izpiranju in dvomesečni izpostavitvi glivam so vzorci izgubili od 2 % - 12 % mase.

Pri nesterilnih vzorcih ni prišlo do kontaminacije z mikroorganizmi, tako da steriliziranje vzorcev ni potrebno.

7 VIRI

1. Akamatsu Y., Takahashi M., Shimada M. 1994. Production of oxalic acid by wood-rotting *Basidiomycetes* grown on low and high nitrogen culture media. *Material und organismen*, 28, 3: 250-264
2. Blanchette R.A. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian journal of botany*, 73 (Suppl. 1 sect. E - H): 999 - 1010
3. Carlile M.J., Watkinson S.C. 1994. *The Fungi*. London, Academic press limited: 482 str.
4. Collet O. 1992. Variation in copper tolerance among isolates of the brown-rot fungi *Postia placenta* (Fr.) M. Lars. & Lomb. and *Antrodia xantha* (Fr.) Ryv. *Material und organismen*, 27, 4: 263 - 271
5. Collet O. 1992a. Comparative tolerance of the brown-rot fungus *Antrodia vaillanti* (DC.:Fr.) Ryv. isolates to copper. *Holzforschung*, 46, 4: 293 - 298
6. De Groot R.C., Woodward B. 1999. Using copper - tolerant fungi to biodegrade wood treated with copper - based preservatives. *International biodeterioration & biodegradation*, 44: 17 - 27
7. De Groot R.C., Woodward B. 1998. *Wolfiporia cocos* - a potential agent for composting or bioprocessing Douglas-fir wood treated with copper-based preservatives. *Forest products journal*, 32, 3: 195 - 215
8. Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. *Wood: decay, pests and protection*. London, Chapman & Hall: 546 str.
9. Flemming C.A., Trevors J.T. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, air and soil pollution*, 44: 143 - 158
10. Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25 - 60
11. Green III F., Larsen M.J., Winandy J.E., Highley T.L. 1991. Role of oxalic acid in incipient brown - rot decay. *Material und organismen*, 26, 3: 191 - 213
12. Gunde-Cimerman N. 1996. Nitaste glive. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia d.o.o.: 95 - 111
13. Hočevar S. 1975. *Hišne gobe*. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 58 str.
14. Humar M., Petrič M., Pohleven F., Kalan P. 1998. Uptake of copper by mycelium of wood fungi growing on copper S - substituted thioglycolate containing nutrient media. IRG/WP, Document 98 - 10291: 6 str.
15. Humar M., Petrič M., Pohleven F., Šentjerc M. 2000. Changes of EPR spektra of wood, impregnated with copper based preservatives, during exposure to *Antrodia vaillanti*. IRG/WP, Document 00 - 10355: 9 str.
16. Humar M., Pohleven F. 2000. Značilnosti razkroja lesa z rjavo trohnobo. *Les*, 52, 7-8: 229 - 234
17. Illman B.L., Highley T.L. 1996. Fungal degradation of wood treated with metal-based preservatives: 1 Fungal tolerance. IRG/WP 96-10163: 7 str.
18. Jordan C.R., Dashek W.V., Highley T.L. 1996. Detection and quantification of oxalic acid from the brown-rot fungus, *Postia placenta*. *Holzforschung*, 50, 4: 312 - 318

19. Kervina-Hamović Lj. 1990. Zaščita lesa. Ljubljana, BF - Oddelek za lesarstvo: 126 str.
20. Kirk T.K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young R.A., Akhtar M. (ur.). New York, John Willey and sons, Inc.: 273 - 307
21. Kirk T.K., Highley T.L. 1973. Quantitative changes in structural components of conifer wood by white- and brown-rot fungi. *Phytopathology*, 63: 1338 - 1342
22. Kirk T.K., Ilbach R., Mozuch M.D., Conner A.H., Highley T.L. 1991. Characteristic of cotton cellulose depolymerized by brown-rot fungus, by acid or by chemical oxidants. *Holzforschung*, 45, 4: 239 - 244
23. Leithoff H., Peek R-D. 1998. Biological detoxification processes. IRG/WP 98-50120: 13 str.
24. Micales J.A. 1995. Induction of oxalic acid by carbohydrate and nitrogen sources in the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Material und organismen*, 28, 3: 197 - 207
25. Micales J.A. 1995a. In vitro oxalic acid production by the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Material und organismen*, 29, 3: 159 - 176
26. Muntañola-Cvetković M. 1987. Opšta mikologija. Beograd, Knjižne novine: 320 str.
27. Peberdy J.F., Ferenczy L. 1985. Fungal protoplasts - applications in biochemistry and genetics. New York, Marcel Dekker, inc.: 354 str.
28. Petrović M. 1980. Zaštita drveta 2: trulež i obojenost drveta. Beograd, Naučna knjiga: 440 str.
29. Pohleven F., Breznikar Š., Kalan P., Petrič M. 1999. Determination of absorption, accumulation and transport of copper in mycelium of some wood decay fungi. IRG / WP 99 - 10323: 11 str.
30. Pohleven F., Petrič M. 1992. Ekološke perspektive zaštite lesa pred škodljivci. *Nova revija*, 43, 3: 94 - 98
31. Raija Toumainen, Fungi in Finland and in Sweden. (29.1.2000), http://home.swipnet.se/Raijas_Home/Sienet/en/sivut/Antrodia_serialis.htm, (6.3.2000)
32. Reid I.D. 1995. Biodegradation of lignin. *Canadian journal of botany*, 73 (suppl. 1): 1011 - 1018
33. Richardson B.A. 1993. Wood preservation. London, E & FN: 226 str.
34. Ritschkoff A., Viikari L. 1991. The production of extracellular hydrogen peroxide by brown-rot fungi. *Material und organismen*, 26, 2: 157-167
35. Shemakhanova N. M. 1960. Conditions for mycorrhiza formation of pines with *Boletus inteus* (Linn.) Fr. in pure culture. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya*: 240-255
36. Shimada M., Akanatsu Y., Ohta A., Takahashi M. 1991. Biochemical relationship between biodegradation of cellulose and formation of oxalic acid in brown-rot wood decay. IRG/WP, Document 91 - 1472: 12 str.
37. Syrjanen T. 1999. Recycling of impregnated timber. Part 1: crushing, combusting plants, amount, costs and logistics. IRG/WP 99 - 50131: 8 str.

38. Stephen I., Leithoff H., Peek R. 1996. Microbial conversion of wood treated with salt preservation. *Material und organismen*, 30, 3: 179 - 199
39. Sutter H.P., Jones E.B.G., Walchli O. 1983. The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.) Fr. *Material und organismen*, 18, 4: 241 - 262
40. Takao S. 1965. Organic acid production by *Basidiomycetes*. *Applied microbiology*, 13, 5: 732-737
41. Torelli N. 1990. Zgradba in lastnosti lesa. Interna skripta. Ljubljana, BF, Oddelek za lesarstvo: 215 str.
42. 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
43. Wainwright M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. Chichester, John Wiley and Sons Ltd: 195 str.
44. Wilkinson J.G. 1979. Industrial timber preservation. London, Associated business press: 351-378
45. Wu L., Lin S. 1990. Copper tolerance and copper uptake of *Lotus purshianus* (Benth.) Clem. & Clem. and its symbiotic *Rhizobium loti* derived from the copper mine waste population. *New phytologist*, 116: 531 - 539
46. Yang V.W., Illman B.L. 1999. Optimum growth conditions for the metal-tolerant wood decay fungus, *Meruliporia incrassata* TFFH 294. IRG/WP, Document 99 - 50142: 8 str.
47. Zabel R.A., Morrell J.J. 1992. Wood microbiology-decay and its prevention. New York, Academic press: 476 str.

ZAHVALA

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