

UDK: 630.841

# Mikroporazdelitev bakrovih pripravkov v razkrojenem impregniranem lesu

*Microdistribution of copper formulations in decayed impregnated wood*

avtorji **Miha HUMAR**, **Franc POHLEVEN** in **Marko PETRIČ**, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana. Tel: +386 (0)1 423 11 61, Fax: +386 (0)1 423 50 35, e-pošta: miha.humar@bf.uni-lj.si

**Za** učinkovito zaščito lesa je nujno, da aktivne učinkovine enakomerno prepojijo celično steno. Preučevali smo mikroporazdelitev bakrovih učinkovin v traheidah kasnega lesa smrekovine (*Picea abies*), impregnirane z dvema vodotopnima bakrovima pripravkoma. Mikroporazdelitev bakra v celičnih stenah lesa, zaščenega z bakrovim(II) sulfatom sovpada z mikroporazdelitvijo lignina v celični steni lesa. Po drugi strani je mikroporazdelitev bakra v traheidah smrekovine, impregnirane z vodno raztopino bakrovega(II) oktanoata in etanolamina, enakomernjša. V vseh slojih celične stene smo določili primerljivo vsebnost bakrovih učinkovin. Opazili smo, da so vse tri uporabljene glive razkrojevalke (*Antrodia vaillantii*, *Trametes versicolor* in *Gloeophyllum trabeum*) vplivale na mikroporazdelitev bakra v celični steni. Glive so translocirale Cu iz združene srednje lamele v celični lumen ali pa v predele z nižjo koncentracijo bakra. Oblika in način redistribucije Cu po celični steni traheide smrekovine je v veliki meri odvisna od količine izločene oksalne kisline.

In order to enable efficient protection of wood, it is of a significant importance to ensure even distribution of a preser-

vative in cell walls. Microdistribution of copper biocides in spruce latewood tracheids impregnated with two different copper based aqueous solution is described herein. Copper microdistribution in wood cells impregnated with aqueous solution of Cu(II) sulfate is similar as microdistribution of lignin. On the other hand, more even distribution was determined in spruce latewood cells impregnated with copper(II) octanoate-ethanolamine based solution. In all parts of tracheid walls similar copper contents were determined. It was clearly seen, that all wood decay fungi (*Antrodia vaillantii*, *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum*) used, influenced microdistribution of copper in impregnated wood. Fungi translocated copper from middle lamellae into cell lumen, or other parts with lower copper concentration. Mechanisms of redistribution are significantly affected by amount of oxalic acid extracted.

**Ključne besede:** bakrovi pripravki, vezava v les, zaščita lesa, mikroporazdelitev, lesne glive

**Key words:** copper based preservatives, fixation, wood preservation, microdistribution, wood decay fungi

## Uvod

Tretjina zaščenega lesa v Evropi je prepojena s pripravki na osnovi bakra. Klasična zaščitna sredstva na osnovi kromovih, bakrovih ter borovih ali arzenovih spojin vse bolj izpodrivajo novejša rešitve. Med najbolj obetajočimi novejšimi pripravki so sredstva, kjer kot fiksativ namesto kromovih spojin uporabljajo etanolamin. Na svetu in tudi v Sloveniji je v komercialni rabi na voljo kar nekaj pripravkov na tej osnovi; ACQ (CSI), Celcure AC (Osmose), Tanalith-E (Arch), Wolmanit CX-10 (Wolman), Kuproflorin (Regeneracija) (Humar in Pohleven, 2005).

Eden izmed zelo pomembnih dejavnikov, ki vplivajo na učinkovitost zaščitnih sredstev za les, je enakomerna porazdelitev biocidov na makro- in mikronivoju (Richardson, 1997). To je še posebej pomembno pri glivah, ki povzročajo mehko trohnobo. Mikroporazdelitvi bakrovih zaščitnih pripravkov po celični steni je bilo posvečeno že veliko raziskav. Njihov poudarek je bil na mikroporazdelitvi kovinskih ionov v lesu različnih vrst, zaščenem s CCA ali CCB vodotopnimi pripravki (Greaves, 1974; Dickinson, 1974; Yamamoto in Matsuoka, 1989;

Ani in Salmah, 1995; Newman in Murphy, 1996). Rezultati nakazujejo, da je mikroporazdelitev zaščitnega sredstva v veliki meri odvisna od vrste lesa ter od tipa celic (rani/kasni les, parenhimske celice/traheje/vlakna). Nekateri avtorji (Peters in Parameswaran, 1980; Daniel in Nilsson, 1987) poročajo, da je v združeni srednji lameli največji delež bakra. Predpostavljajo, da vsebnost bakra narašča z deležem lignina v celični steni. Pri preučevanju lesa, impregniranega z bakrovim naftonom v lak bencinu ter lesa, impregniranega z amoniakalnimi raztopinami bakrovega (II) oktanoata je do podobnih sklepov prišel tudi Petrič s sodelavci (2000). Največji delež bakra so opazili v celičnem kotu ter v združeni srednji lameli kasnega lesa, ki vsebuje največ lignina (Fengel in Wegener, 1989; Tišler in Humar, 1999; Gričar in Čufar, 2004). V združeni srednji lameli in celičnih kotih celic ranega lesa so opazili manjše koncentracije bakra, saj je v celičnih stenah ranega lesa delež lignina nižji.

V literaturi nismo zasledili še nobenih podatkov, kako glive vplivajo na mikroporazdelitev bakrovih učinkovin med razkrojem impregniranega lesa. Znano je, da tolerantni glivni izolati bakrove učinkovine v impregniranem lesu pretvorijo v bakrov oksalat (Humar in Pohleven, 2003). Po drugi strani pa še ne vemo, ali glive pri tem baker translocirajo v celične lumne ali bakrove učinkovine ostanejo v steni celice. To vprašanje je zanimivo iz dveh razlogov. Če dobro poznamo mehanizem razkroja zaščitnega lesa, lahko razvijemo učinkovitejša zaščitna sredstva za les. Če pa bi potrdili, da tolerantni glivni izolati translocirajo baker iz celične stene, bi ta mehanizem lahko učinkovito uporabili za mikoremediacijo odpadnega zaščitnega lesa (Humar in Pohleven, 2003).

## Materiali in metode

Vzorci ( $1,5 \times 2,5 \times 5,0$  cm) smo izdelali iz beljave smrekovine (*Picea abies* Karst). Absolutno suhe vzorce smo impregnirali po standardnem postopku z vakuumom (SIST EN 113 1989). Uporabili smo dva pripravka na osnovi bakra, in sicer bakrov(II) sulfat (CuS) in bakrov(II) oktanoat z etanolaminom (CuE). Koncentracija bakra v pripravku je bila v obeh primerih 0,75 %. Impregnirane vzorce smo nato štiri tedne sušili na zraku, in sicer: prvi teden v zaprtih, drugi in tretji v polzaprtih in četrti teden v odprtih komorah. Na ta način smo zagotovili ustrezno vezavo.

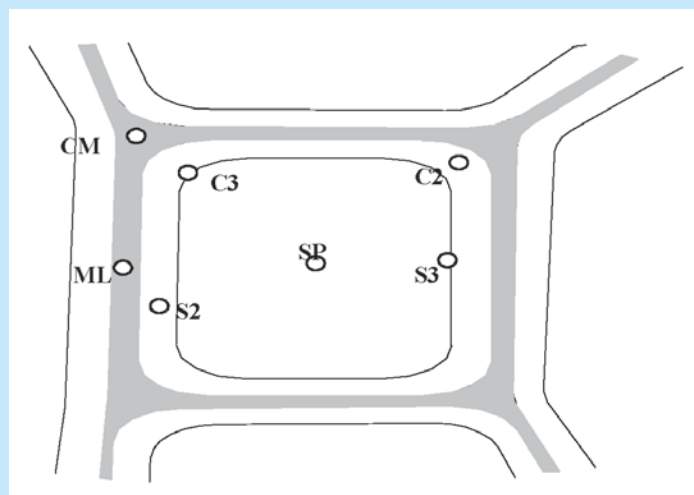
Sterilizirane vzorce smo vstavili v gojitvene kozarce, kjer je bilo hranilno gojišče preraslo z micelijem gliv pisana ploskocevka, tramovka in bela hišna goba (preglednica 1). Vstavili smo jih na plastično mrežico in s tem preprečili stik vzorcev z gojiščem. Po 16 tednih smo jih izolirali in pripravili za nadaljnje raziskave. Poleg izpostavljenih vzorcev smo analizirali tudi glivam neizpostavljen zaščiten in nezaščiten les.

Vogali vzorcev so bili vklopljeni v epoksidno smolo (Spurr, 1969) in z ultra-

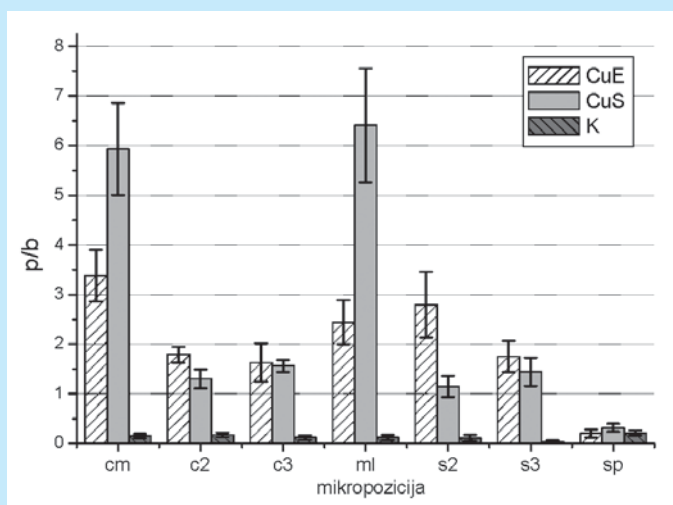
mikrotomom, narezani na  $0,5 \mu\text{m}$  debele rezine. Te rezine smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom TEM Philips 400, opremljenim z Link (Si)Li detektorjem in Link QX 200 analizatorjem. Pogoji analize so bili: pospeševalna napetost 80 kV, čas merjenja 200 s, 10.000-kratna povečava, območje merjenja 200 nm. Meritve so bile opravljene v pet do sedmih ponovitvah na sedmih mestih celične stene traheide kasnega lesa, kot je razvidno s slike 1. Dobljeni spektri so bili integrirani. Na podlagi razmerja med intenziteto vrhov  $\text{Cu}_{\text{ka}}$  in ozadja (p/b) smo izračunali relativno količino bakra v delu celične stene. Višje ko je bilo razmerje p/b, večja količina bakra je bila opazna na mestu meritve.

## Rezultati in razprava

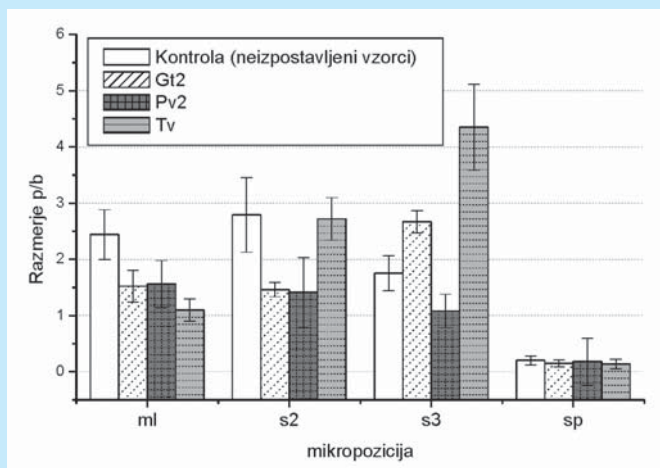
Iz mikroporazdelitve bakrovih ionov v glivam neizpostavljenem lesu (slika 2) vidimo, da se mikroporazdelitev bakra v celični steni lesa, impregniranega s CuS, razlikuje od mikroporazdelitve bakra v lesu, impregniranem s CuE. V lesu, zaščitenem s CuS, smo največ bakra zaznali v združeni srednji lameli (CML), še posebno na mestih, kjer se stikajo štiri celice (CM). Količina bakra v združeni srednji lameli je



□ Slika 1. Shematski prikaz mest v celični steni, na katerih smo opazovali mikroporazdelitve bakra.



**Slika 2.** Mikroporazdelitev bakra v celični steni traheide kasnega lesa smreke, impregniranega s CuS in CuE ( $c_{Cu} = 0,75 \%$ ). Mikropozicije v celični steni so označene na sliki 1.



**Slika 3.** Mikroporazdelitev (razmerje p/b) Cu v celičnih stenah traheid kasnega lesa smreke. Smrekovina je bila impregnirana s pripravkom CuE ( $c_{Cu} = 0,75 \%$ ) in za 16 tednov izpostavljena delovanju gliv razkrojevalk. Mikropozicije v celični steni so podrobneje označene na sliki 1.

1972; Gričar in Čufar, 2004) in ravno na tem delu smo opazili tudi največjo vsebnost bakra. V združeni srednji lameli traheid smreke je namreč približno 60 % lignina, po drugi strani pa je v sloju S2 delež lignina bistveno manjši (25 %). Poleg tega je gostota združene srednje lamele višja kot gostota sloja S2. V gostejših predelih celične stene je na voljo več funkcionalnih skupin, na katere se posledično veže tudi več bakrovih učinkovin.

Mikrodistribucija bakra v traheidah vzorcev, impregniranih s CuE, je veliko bolj enakomerna. V srednji lameli kot tudi v sloju S2 so primerljive količine bakra. Edino v CM smo opazili nekoliko višje vrednosti. Sistem CuE reagira tako z ligninskim sistemom kot tudi s hemicelulozami (Zhang in Kamdem, 2000). Nekateri avtorji pa poročajo celo o vodikovih vezeh med aminskimi skupinami in hidroksilnimi skupinami celuloze (Jiang and Ruddick, 1999). Med prodiranjem zaščitnega sredstva v celično steno pride do reakcij med vsemi glavnimi komponentami lesa. Posledica tega je enakomernjša razporeditev bakra po celotni celični steni (slika 2).

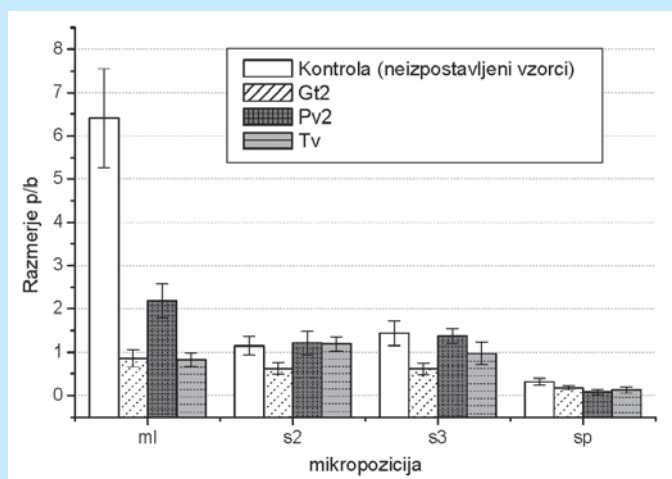
Po 16 tednih izpostavitve zaščitnega lesa glivam razkrojevalkam je znašala izguba mase impregniranih vzorcev med 1 % in 8 %. Kontrolni vzorci pa so izgubili med 28 in 49 % svoje mase (preglednica 2). Na okuženem impregniranem lesu smo pri mikroporazdelitvi Cu v celični steni opazili velike spremembe v primerjavi z zaščitnim in glivam neizpostavljenem lesu. Na mikroporazdelitev so značilno vplivali vsi trije uporabljeni izolati, tako na baker tolerantni kot tudi netolerantni.

Opazili smo, da je vpliv gliv razkrojevalk na mikroporazdelitev bakra v lesu odvisen od uporabljenega zaščitnega pripravka in vrste glive (sliki 3 in 4). Na mikroporazdelitev Cu imata

bila štirikrat višja kot v sloju S2 ali S3. Po drugi strani pa je porazdelitev bakra v traheidah smrekovine, impregnirane s CuE, enakomernjša. V sloju S2 je količina bakra, ki je primerljiva s koncentracijo v združeni srednji lameli. Le v sloju S3 smo izmerili nekoliko nižje vrednosti Cu (slika 2).

Za opisano razliko je možnih več razlogov. Znano je, da bakrov(II) sulfat s komponentami lesa kemično ne reagira, temveč se nanje le adsorbira (Coo-

per, 1998). Adsorpcija poteče preko izmenjave ionov med Cu(II) in rahlo kislim lesom (Dahlgren, 1972). Pri vrednostih pH impregniranega lesa takoj po impregnaciji ( $pH^{25} 4,5$ ) naj bi se na lignin absorbiralo več Cu kot na holoceluloze (Pizzi, 1982a, 1982b). Tako si lahko razložimo večjo pojavnost bakra v delih celične stene, ki je bogata z ligninom. Na primer, v srednji lameli, kjer se stikajo štiri celice (CM), je najvišja vsebnost lignina (Boutelje,



□ **Slika 4.** Mikroporazdelitev (razmerje p/b) bakra v celičnih stenah traheid smreke. Smrekovina je bila impregnirana s pripravkom CuS ( $c_{Cu} = 0,75\%$ ) in za 16 tednov izpostavljena delovanju gliv razkrojevalk. Mikropozicije v celični steni so podrobneje označene na sliki 1.

□ **Preglednica 1.** Uporabljene lesne glive. Toleranca gliv na baker je ocenjena na podlagi raziskav Pohlevna in sodelavcev (2002).

Lesna gliva	ZIM številka*	Toleranca na Cu	Tip trohnobe
Latinsko ime	Slovensko ime	Oznaka	
<i>Antrodia vaillantii</i>	Bela hišna goba	Pv2	ZIM L037 tolerantna
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Tramovka	Gt2	ZIM L018 netolerantna
<i>Trametes versicolor</i>	Pisana ploskocevka	Tv	ZIM L057 netolerantna

\*(Raspor *et. al.*, 1995)

□ **Preglednica 2.** Vlažnosti in izgube mas vzorcev po šestnajsttedenski izpostavitvi lesnim glivam

Lesna gliva	Zaščitni pripravek	Vlažnost (%)	Izguba mase (%)
<i>G. trabeum</i>	CuS	71	2
	CuE	77	6
	Kontrola	60	49
<i>A. vaillantii</i>	CuS	67	8
	CuE	120	3
	Kontrola	57	28
<i>T. versicolor</i>	CuS	55	1
	CuE	80	8
	Kontrola	56	28

zelo podoben vpliv glivi pisana ploskocevka (Tv) in tramovka (Gt). V vzorcih, zaščitnih s CuE, sta omenjeni glivi translocirali baker iz srednje lamele v sloj S3 (slika 3). Pri beli hišni gobi

(Pv2) se je zmanjševalo razmerje p/b tako v srednji lameli kot tudi v sloju S2. Količina bakra v sloju S3 se skoraj ni spremenila. Opisane spremembe bi lahko razložili na dva načina. Vse tri

glive so med razkrojem močno navlažile les (preglednica 2). Pri tako visoki vlažnosti so bili lumni celic zagotovo vsaj delno zapolnjeni z vodo in se je vsaj del bakrove komponente iz celične stene, impregnirane s CuE, raztopil in difundiral v tekočino v lumnih celic. Ko pa smo vzorce posušili, je voda iz lumnov izparela, baker pa je ostal in se naložil na notranjo plast celične stene. Tako bi lahko pojasnili prenos bakra iz ML v sloj S3, ki sta ga povzročili glivi *G. trabeum* in *T. versicolor*. Pri vzorcih, izpostavljenih glivi Pv2, se je zmanjšala vsebnost bakra v ML, po drugi strani pa nismo opazili zvišanih koncentracij Cu v sloju S3 kot pri glivah Gt in Tv. Možni razlog za ti razliki je verjetno difuzija bakra. Med izpostavitvijo glivam so se vzorci močno navlažili z vodno raztopino različnih organskih kislin (Humar *et al.*, 2001), zato se je mobilnost bakrovih spojin povečala. Verjetno je baker med 16 tedni izpostavitve difundiral iz vzorcev v hranilno gojišče (Pohleven *et al.*, 1999; Humar *et al.*, 2002).

Spremembe v mikroporazdelitvi bakra v vzorcih, zaščitnih s CuS, po izpostavitvi vsem trem testnim glivam na les, so zelo podobne. Vse so statistično značilno znižale vsebnost bakra v srednji lameli. Različno od sistema CuE, pa nismo opazili zvišanih koncentracij v sloju S3 (slika 4). Naša raziskava vprašanja, kam so glive alocirale bakrove učinkovine, ni pojasnila, zato bodo potrebne še dodatne raziskave.

Iz naših raziskav je razvidno (Humar *et al.*, 2003), da vse glive ne izkazujejo enake sposobnosti transporta bakra. Pri glivi Pv2 bi rezultate mikroporazdelitve pri delno razkrojenem lesu, zaščitnem s CuS, lahko pojasnili s transportom v micelij (Pohleven *et al.*, 1999). Na ta način pa ne moremo pojasniti prenosa bakra pri Gt2 in Tv. Menimo, da je v tem primeru lahko



vzrok za prenos tudi difuzija. Omenjeni glivi ne izločata oksalne kisline in Cu aktivna spojina ostane v topni obliki in je zato difuzija možna (Humar *et al.*, 2003). Pri beli hišni gobi pa je difuzija manj verjetna, saj ta gliva izloča veliko oksalne kisline in nastali bakrov oksalat ni topen v vodi, zato tudi difuzija ni mogoča. Gliva Pv2 je v tem primeru translocirala baker iz lesa z aktivnim transportom.

## Sklepi

Mikroporazdelitev bakra je pri lesu, impregniranem s pripravki na osnovi bakra in etanolamina, enakomernejša, kot je pri lesu, impregniranem le z vodno raztopino bakrovega sulfata. Glavni razlog za enakomernejšo mikroporazdelitev je dejstvo, da baker-etanolaminski kompleksi reagirajo tako z ligninom kot tudi celulozami, medtem ko se bakrov sulfat večinoma adsorbira le na lignin.

Izpostavitve impregviranih vzorcev lesnim glivam je močno vplivala na mikroporazdelitev bakra po celični steni. Pri vzorcih, impregviranih z vodno raztopino bakrovega sulfata, smo opazili večje spremembe zaradi delovanja gliv kot pri vzorcih, impregviranih s pripravkom na osnovi bakra in etanolamina.

## Zahvala

Prispevek je nastal ob finančni pomoči Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, v sklopu financiranja projekta: Razvoj anorganskih zaščitnih sredstev za les brez kromovih spojin L4-6209. Prav tako se želimo zahvaliti projektu COST E22 za odobritev kratkega znanstvenega obiska v Londonu. Hvaležni smo tudi kolegom dr. Richardu J. Murphyju, dr. Davidu J. Dickinsonu, in dr. Ianu Morisu z Imperial Collegea v Londonu za pomoč pri izvedbi raziskave. □

## literatura

- Ani S., Salmah S. 1995.** Preliminary study on relation of wood structure to copper/chromium/arsenic (CCA) distribution in Kempas (*Koompassia malaccensis*). The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 95-40005: 4
- Boutelje J.B. 1972.** Lignin content in Norway spruce, *Svensk Papperstid*, 72: 683 – 686
- Copper P.A. 1998.** Diffusion of copper in wood cell walls following vacuum treatment. *Wood and fibre science*, 30: 382-395
- Dahlgren S.E. 1972.** The course of fixation of Cu-Cr-As wood preservatives. *Annual British Wood Preservers Association year 1972*: 109-128
- Daniel G., Nilsson T. 1987.** Comparative studies on the distribution of lignin and CCA elements in birch using electron microscopic X-ray microanalysis. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 87-1328: 7
- Dickinson D.J. 1974.** The microdistribution of CCA in *Acer pseudoplatanus* and *Eucalyptus maculata*. *Material und organismen* 9: 21-33
- Fengel D., Wegener G. 1989.** *Wood; Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin, New York, Walter de Gruyter: 613
- Greaves H. 1974.** The microdistribution of copper-chrome-arsenic in preservative treated sapwood using X-ray microanalysis in scanning electron microscopy. *Holzforchung*, 28: 193-200
- Gričar J., Čufar K. 2004.** Uporaba transmissijske elektronske mikroskopije ter UV-mikrospektrometrije za določanje lignina v celični steni iglavcev. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 73: 89-104
- Humar M., Petrič M., Pohleven F. 2001.** Changes of pH of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *Holz als Roh- und Werkstoff* 59: 288-293.
- Humar M., Pohleven F., Kalan P., Amartey S. 2002.** Translokacija bakra iz zaščitenega lesa, izpostavljenega glivam razkrojevalkam lesa. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 67: 159-171
- Humar M., Pohleven F. 2005.** Bakrovi pripravki in zaščita lesa. *Les*, 57: 57-62
- Humar M., Pohleven F. 2003.** Razstrupljanje odpadnega s CCA ali CCB pripravki zaščitenega lesa z lesnimi glivami. *Les*, 55: 89-94
- Jiang X., Ruddick J.N.R. 1999.** A spectroscopic investigation of copper ethylenediamine fixation in wood. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 99-20160: 13
- Newman P.R., Murphy R.J. 1996.** Variation in biological performance of CCA caused by preservative application method. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 96-40072: 12
- Peters G.A., Parameswaran N. 1980.** Transmission electron microscopical localization of salt preservative components in wood cell walls. *Wood Science and Technology*, 14: 81-88
- Petrič M., Murphy R.J., Morris I. 2000.** Microdistribution of some copper and zinc containing waterborne and organic solvent wood preservatives in spruce wood cell walls. *Holzforchung*, 54: 23-26
- Pizzi A. 1982a.** The chemistry and kinetic behavior of Cu-Cr-As/B wood preservatives. II Fixation of the Cu/Cr system on wood. *Journal of Polymer Science. Chemistry ed.*, 20: 707-724
- Pizzi A. 1982b.** The chemistry and kinetic behavior of Cu-Cr-As/B wood preservatives. IV Fixation of CCA to wood. *Journal of Polymer Science. Chemistry ed.*, 20:739-764
- Pohleven, F., Humar, M., Amartey, S., Benedik, J. 2002.** Tolerance of Wood Decay Fungi to Commercial Copper Based Wood Preservatives. The International Research Group for Wood Preservation, IRG/WP 02-30291: 12
- Pohleven, F., Breznikar, S., Kalan, P., Petric, M. 1999.** Determination of absorption, accumulation and transport of copper in mycelium of some wood decay fungi. The International Research Group for Wood Preservation, IRG/WP 99-10323: 11
- Raspor P., Smole-Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F.V., Rogelj I. Hacin J. 1995.** ZIM: zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokulture; Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo: 98
- Richardson H.W. 1997.** *Handbook of copper compounds and applications*. New York, M. Dekker: 227
- SIST EN 113. 1989.** Zaščitna sredstva za les; Zaščitna sredstva za les – Določanje meje učinkovitosti proti glivam odprtrotosnicam; Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying basidiomycetes cultured an agar medium. 32
- Spurr A.R. 1969.** New resin for electron microscopy observation. *Journal of ultrastructure research*, 26: 31-43
- Tišler V., Humar M. 1999.** Lignin smrekovega lesa. *Les*, 51: 85-90
- Yamamoto K., Matsuoka S. 1989.** Comparative studies on the species effects of wood preservatives. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 89-3521: 8
- Zhang J., Kamdem D.P. 2000.** FTIR characterization of copper-ethanolamine-wood interactions for wood preservation. *Holzforchung*, 54: 119-122