

Gordana Petrović, Mimica Stefanović, Milica Rančić*,
Milenko Mirić, Ivana Gavrilović-Grmuša

Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet, Beograd, Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC: 633.872: [632.952+582.632.1]

doi: 10.5937/zasmat2001069P



Zastita Materijala 61 (1)

69 - 76 (2020)

Uticaj ekstraktiva kore bele jove na otpornost drveta bukve prema gljivama truležnicama

IZVOD

U ovom radu je ispitan uticaj tretmana drveta bukve (*Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca*) ekstraktivima kore drveta bele jove (*Alnus incana* (L.) Moench) na poboljšanje njegove prirodne otpornosti prema dve gljive truležnice: *Trametes versicolor* – izazivača bele truleži i *Coniophora puteana* – izazivača mrke truleži drveta, u laboratorijskim uslovima. Korišćena su 4 tipa ekstraktiva: etil-acetatni (A), etarski (B), etanolni (C) i vodeni (D), dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom (UZE) i pripremljeni u 3 koncentracije 0,5, 1,0 i 2,0 mg/ml u metanolu kao rastvaraču. Rezultati istraživanja pokazuju da je najveću antifungalnu efikasnost pokazao etil-acetatni ekstraktiv u koncentraciji 2,0 mg/ml. Ekstraktiv kore bele jove može predstavljati potencijalno ekološki prihvatljivo sredstvo u preventivnoj zaštiti drveta od truležnica uz sprovođenje daljih istraživanja.

Ključne reči: Ekstraktivi, *Alnus incana*, *Trametes versicolor*, *Coniophora puteana*, *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca*, prirodna otpornost, gubitak mase.

1. UVOD

S obzirom da predstavlja jedan od najkorišćenijih i najcenjenijih materijala u građevinarstvu i da se radi o obnovljivom i biorazgradivom prirodnom resursu, drvo će i u budućnosti biti jako važan materijal za ostvarenje ljudskih potreba.

Međutim, kao organski materijal, drvo predstavlja metu mnogim prirodnim destruktorkama koji utiču na njegovo kvalitativno i kvantitativno iskorišćenje, koristeći ga kao hranu i/ili kao stanište. Propadanje drveta u upotrebi najčešće je izazvano lignikolnim gljivama i ksilofagnim insektima. Možemo reći da su gljive truležnice najopasniji destruktorki, jer kada ustanovimo njihovo prisustvo u drvetu, obično se radi o odmaklim fazama truljenja i nemogućnosti suzbijanja njihovog napada. Zato je jako važno predupređiti njihov napad, odnosno preduzeti preventivne mere zaštite drveta.

Mnoge vrste drveta su bogate inhibitornim i ekstraktivnim materijama u samom svom hemijskom sastavu, kao što su tikovina, kesten, kedar,

mimoza i neke druge egzotične vrste, koje spadaju u grupu vrsta drveta sa velikom ili dobrom prirodnom otpornošću. Sa druge strane, postoje vrste drveta koje imaju slabu prirodnu otpornost, kao što je bukva. Bukva je najzastupljenija vrsta u Srbiji, ali zbog ove osobine ima manju primenu u drvnoj i građevinskoj industriji u odnosu na neke druge, otpornije domaće vrste.

Dugo su se u cilju poboljšanja kvaliteta i prirodne otpornosti drveta koristila hemijska sredstva čije su aktivne materije, kao što su jedinjenja hlora, žive, cinka, arsena, soli natrijuma, naftenati i slično, pokazala jako loš uticaj na životnu sredinu. Zbog toga se decenijama unazad radi veliki broj istraživanja kako bi se poboljšao kvalitet i prirodna trajnost drveta sredstvima i metodama koja će biti ekološki prihvatljiva. Najčešće je ispitivan metod termičke modifikacije, a njegova komercijalna primena je počela pre oko dvadeset godina [1]. Ovaj metod je poboljšao dimenzionalnu stabilnost drveta, ali ne i potpunu zaštitu od bioloških destruktorka [2-7]. Dobra otpornost prema truležnicama postignuta je tretiranjem drveta furfural-alkoholom [8], kao i impregnacijom zagrejanog drveta tečnim anhidridom sirćetne kiseline [9]. Sve više pažnje se poklanja ispitivanju inhibitorne efikasnosti ekstraktiva izolovanih iz srčevine ili kore prirodno otpornih vrsta drveta. Ovi ekstraktivi su bogati

*Autor za korespondenciju: Milica Rančić

E-mail: milica.rancic@sfb.bg.ac.rs

Rad primljen: 22. 12. 2019.

Rad prihvaćen: 17. 01. 2020.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

polifenolima, terpenima, stilbenima ili alkaloidima, od kojih potiče njihovo antimikrobno dejstvo [10]. Rezultati brojnih istraživanja ukazuju na dobru antifungalnu aktivnost ekstraktiva, kao i na mogućnosti njihove primene u zaštiti drveta [11-16].

Predmet ovog istraživanja je ispitivanje antifungalne efikasnosti tri različite koncentracije etil-acetatnih, etarskih, etanolnih i vodenih ekstraktiva kore bele jove (*Alnus incana* (L.) Moensch) dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom. *Alnus incana* (L.) Moensch, poznata pod nazivom bela jova, je listopadno drvo veoma rasprostranjeno u severnoj Evropi koje može služiti kao izvor tzv. „zelenih“ hemikalija, kao i biološki aktivnih jedinjenja. *Alnus incana* ili bela jova predstavlja vrstu jove koja je široko rasprostranjena na severnoj hemisferi. *Alnus incana* je brzorastuća vrsta, ne preterano zahtevna tako da dobro uspeva i na siromašnijem tlu [17].

Bela jova poseduje visok sadržaj ekstraktiva kore u poređenju sa drugim listopadnim vrstama, a koji se koriste u narodnoj medicini za lečenje bakterijskih i gljivičnih infekcija [18,19]. Najkarakterističnija osobina roda *Alnus* je visok sadržaj diarilheptanoida i njihovih glikozida u različitim morfološkim delovima drveta. Uprkos širokoj rasprostranjenosti bele jove, ne postoji veliki broj istraživanja posvećenih ovoj vrsti. Fokus ovog istraživanja je na činjenici da kora drveta bele jove (*Alnus incana*) sadrži visok sadržaj ekstraktiva u poređenju sa drugim listopadnim vrstama (5-23%). Osim toga, očigledno je da sadržaj ekstraktiva varira sa visinom drveta tako što se povećava sa visinom sa koje su uzeti uzorci kore [20].

Ekstraktivi su aplikovani potapanjem uzoraka drveta mezijske bukve, poznate kao prirodno neotporne vrste prema dejstvu truležnica [21]. Korišćene su gljive *Trametes versicolor*, izazivač bele i *Coniophora puteana*, izazivač mrke prizmatične truleži drveta kako bi se utvrdila antifungalna efikasnost ekstraktiva.

2. EKSPERIMENTALNI DEO

2.1. Ekstrahovanje ekstraktiva i priprema njihovih rastvora

U ovom radu korišćeni su ekstraktivi dobjeni iz kore bele jove (*Alnus incana* (L.) Moench), sa područja Kopaonika iz sliva Jošaničke reke u okviru šumskog gazdinstva Raška. Bela jova (*Alnus incana* (L.) Moench) kao domaća vrsta ima veliki potencijal kao sirovina za dobijanje prirodnih supstanci dragocenih za hemijsku i farmaceutsku „zelenu“ industriju, odnosno za proizvodnju hemijskih supstanci koje se dobijaju postupcima koji ne ugrožavaju životnu sredinu. Kora je osušena na vazduhu, usitnjena, samlevana pomoću mikromlina

čekićara, a nakon toga je određena vlaga i koeficijent suvoće uzoraka.

Ekstrakcija je vršena pomoću četiri rastvarača: vode, etanola, dietiletra i etil-acetata. Odmereno je po 5,0 g kore bele jove u balone od 100 ml i preliveno sa po 50 ml rastvarača. Nakon toga uspešno je obavljeno niz ekstrakcija pripremljenih uzoraka, u navedenim rastvaračima, na sobnoj temperaturi četiri puta u toku 24 časa u mraku, a zatim uz pomoć ultrazvučnog kupatila u poslednjem satu svake ekstrakcije. Posle svake pojedinačne ekstrakcije i filtriranja kroz filter papir, čvrsti ostatak prelivan je sa novih 50 ml odgovarajućeg rastvarača. Nakon završenih ekstrakcija, sakupljeni ekstrakti kore bele jove su upareni na rotacionom vakuum uparivaču u cilju dobijanja odgovarajućih ekstraktiva. Baloni sa ekstraktivima, koji su prethodno osušeni i izmereni, sušeni su u sušnici a zatim izmereni kako bi se odredila masa dobijenih ekstraktiva. Mase dobijenih ekstraktiva su se kretale u opsegu od 0,304 g (etar) do 1,438 g (etanol). Ekstraktivi su zatim rastvarani u metanolu kako bi se dobile odgovarajuće koncentracije kojima su se tretirali uzorci drveta bukve - *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca* (Mally/Czeczott.). Prema odgovarajućem proračunu napravljene su tri koncentracije ekstraktiva za svaki rastvarač: 2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml i 0,5 mg/ml.

2.2. Priprema uzoraka drveta bukve

Uzorci drveta su pripremljeni od drveta bukve – *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca* (Mally/Czeczott.) poreklom iz stabala sa planine Goč. Iz bukovih dasaka, u prosušenom stanju vlažnosti, izrezani su uzorci na dimenzije 20 (longitudinalno) x 20 (radijalno) x 5 (tangencijalno) mm i obeleženi.

Pripremljeno je ukupno 336 komada bukovih uzoraka, gore navedenih dimenzija. Svaka test serija je brojala po 12 uzoraka, odnosno po 12 bukovih uzoraka je tretirano određenim ekstraktivom, određene koncentracije i izlagano test gljivama (ukupno 4 ekstraktiva x 3 koncentracije x 2 test gljive x 12 drv.uzoraka = 288 kom). Na isti način je po 12 uzoraka tretiranih rastvaračem (pozitivna kontrola) izlagano dejstvu test gljiva i po 12 netretiranih uzoraka (negativna kontrola) izlagano dejstvu istih gljiva (ukupno = 288 (test) + 24 (kontrola 1) + 24 (kontrola 2) = 336 kom bukovih uzoraka). Svi uzorci su bili iz iste starosti drveta, kako bi za svaki ekstraktiv, svaku koncentraciju određenog ekstraktiva i svaku test gljivu imali iste uslove testiranja.

Pripremljeni i obeleženi uzorci bukovine su osušeni do apsolutno suvog stanja vlažnosti, na temperaturi $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ u laboratorijskoj sušnici. Nakon sušenja je izmerena masa (m_0) bukovih uzoraka na tehničkoj vagi, sa tačnošću od 0,01 g.

Sušenje i merenje uzoraka obavljeno je u Laboratoriji za svojstva i hidrotermičku obradu drveta Šumarskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

2.3. Priprema kultura test gljiva

Izolat gljive *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Quel. je dobijen od prof. dr Dragana Karadžića, (Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet), a izolat gljive *Coniophora puteana* (Schumm ex Fr. J Karst.) (No ID 2007-165/108) dobijen je od prof. dr H. Solheim-a (Norveški Institut za bioekonomiju, Norveška).

Prethodno pripremljena, sterilisana i ohlađena malc ekstrakt agar (MEA) hranljiva podloga inokulisana je gljivama *Trametes versicolor* i *Coniophora puteana* u aseptičnim uslovima u Laboratoriji za fitopatologiju Šumarskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Inokulumu gljiva su uzimani iz rastuće zone micelije 10 dana starih kultura. Zatim su Petri posude sa inokulumima gljiva postavljene u standardne uslove temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) i vlažnosti vazduha ($70 \pm 5\%$) do potpunog prekrivanja hranljive podloge kulturama test gljiva.

2.4. Tretiranje uzoraka bukovine rastvorima ekstraktiva

Uzorci bukovine su nakon sušenja i merenja mase u apsolutno suvom stanju vlažnosti tretirani rastvorima ekstraktiva određene koncentracije metodom potapanja. Potapanje je trajalo 28 časova, koliko je, na osnovu probnog testiranja, potrebno da bi bukovi uzorci datih dimenzija dostigli konstantnu masu. Odmah nakon tretmana, sa površine bukovich uzoraka je lagano obrisan višak rastvora, a zatim izmerena masa (m_1) na tehničkoj vagi, sa tačnošću od 0,01 g. Na osnovu razlike u masi tretiranih uzoraka (m_1) i mase uzoraka u apsolutno suvom stanju vlažnosti (m_0) dobili smo povećanje odnosno dobitak mase bukovich drveta (DM), izraženo u procentima, nakon tretmana rastvorima ekstraktiva određene koncentracije, prema sledećoj formuli:

$$DM = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 [\%]$$

DM – dobitak mase bukovich drveta nakon potapanja u rastvore ekstraktiva [%]

m_0 – masa uzoraka u apsolutno suvom stanju pre potapanja [g]

m_1 – masa uzoraka nakon tretmana rastvorom ekstraktiva [g]

Posle tretmana potapanjem i merenja mase odmah nakon tretmana, bukovi uzorci su kondicionirani u uslovima sobne temperature i vlage vazduha do konstantne mase (m_2). Na osnovu razlike u masi nakon kondicioniranja (m_2) i mase u apsolutno suvom stanju (m_0) određena je vlažnost

bukovich uzoraka u trenutku postavljanja na razvijene kulture test gljiva prema sledećoj formuli:

$$U = \frac{m_2 - m_0}{m_0} \times 100 [\%]$$

U – vlažnost bukovich drveta nakon kondicioniranja [%]

m_0 – masa uzoraka u apsolutno suvom stanju pre potapanja [g]

m_2 – masa uzoraka nakon kondicioniranja [g]

2.5. Testiranje otpornosti tretiranih i netretiranih bukovich uzoraka na test gljive

Bukovi uzorci, tretirani rastvorima ekstraktiva određenih koncentracija, kao i kontrolni odnosno tretirani rastvaračem (K1) i kontrolni netretirani (K2), vazdušno suvi, su u aseptičnim uslovima izlagani dejstvu test gljiva.

Na prethodno razvijene micelije test gljiva u Petri posudama, postavljeno je po 4 sterilisane PVC rešetkaste podloge, a zatim preko njih po 4 bukova uzorka, koji su takođe prethodno površinski sterilisani plamenom. Svaka Petri posuda je oplepljena para-filmom kako bi se smanjio rizik od spontanog zagađenja patogenima. Testirano je po 12 uzoraka za svaki rastvor ekstraktiva u sve tri koncentracije za svaku test gljivu i po 12 uzoraka za pozitivnu i negativnu kontrolu za svaku test gljivu. Test i kontrolni uzorci su zatim izlagani 6 nedelja dejstvu test gljiva u standardnim uslovima temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) i vlažnosti vazduha ($70 \pm 5\%$). Nakon ekspozicije test gljivama, sa površine uzoraka je četkicom, lagano skinuta micelija i uzorci su sušeni u sušnici do apsolutno suvog stanja vlažnosti. Zatim je izmerena masa (m_3) apsolutno suvih tretiranih i kontrolnih bukovich uzoraka, sa tačnošću 0,01 g.

Na osnovu razlike u masi apsolutno suvih uzoraka drveta bukve nakon ekspozicije test gljivama i pre testa odnosno pre ekspozicije test gljivama, dobijen je procentualni gubitak mase drvenih uzoraka (GM) prema formuli:

$$GM = \frac{m_0 - m_3}{m_0} \times 100 [\%]$$

m_3 – masa apsolutno suvih bukovich uzoraka nakon ekspozicije test gljivama [g],

m_0 – masa apsolutno suvih bukovich uzoraka pre ekspozicije test gljivama i pre tretmana rastvorom ekstraktiva [g].

Rezultati su računati kao aritmetička sredina svake test serije. Za ocenu uticaja vrste i koncentracije ekstraktiva kore bele jove na gubitak mase (%) drveta mezijске bukve pod uticajem gljiva truležnica, korišćena je dvofaktorijalna analiza varijanse

(ANOVA) u programu STATISTICA 8 za svaku test gljivu posebno. Značajne razlike među varijablama određene su LSD Fisher post-hoc testom pri nivou $p \leq 0,05$.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. Gubitak mase kontrolnih uzoraka bukovog drveta i uzoraka tretiranih ekstraktivima

Za kontrolne uzorke, kako za tretirane rastvaračem metanolom (K1), tako i za netretirane (K2) zabeležen je približno isti gubitak mase za obe gljive posle 6 nedelja (Tabela 1), što odgovara rezultatima koje su dobili drugi autori [22-24]. Posle 6 nedelja delovanja gljive *Trametes versicolor*, gubitak mase bukovog drveta iznosio je 30,45 % za pozitivnu kontrolu i 31,14 % za netretirane odnosno negativnu kontrolu, dok je kod gljive *Coniophora puteana* iznosio 28,56% odnosno 29,58%.

Tabela 1. Gubitak mase (%) kod kontrolnih uzoraka i uzoraka bukovog drveta tretiranog etilacetatnim, etarskim, etanolnim i vodenim ekstraktivima iz kore *Alnus incana* različitih koncentracija izazvan dejstvom gljiva *Trametes versicolor* i *Coniophora puteana* nakon šest nedelja

Table 1. Weight loss (%) in control samples and beechwood samples treated with ethyl acetate, ether, ethanol and aqueous extractives of *Alnus incana* bark at different concentrations caused by the action of *Trametes versicolor* and *Coniophora puteana* after six weeks

Ekstraktiv	Koncentracija (mg/ml)	<i>T.versicolor</i> GM (%)	<i>C.puteana</i> GM (%)
Etil-acetat (A)	0,5	28.87 ± 1.12	27.23 ± 1.33
	1	19.40 ± 0.86	26.88 ± 1.21
	2	17.37 ± 0.75	21.69 ± 0.91
Etar (B)	0,5	25.17 ± 0.89	27.76 ± 0.84
	1	19.88 ± 0.63	17.76 ± 0.71
	2	19.24 ± 0.74	8.71 ± 0.66
Etanol (C)	0,5	29.31 ± 1.08	26.50 ± 0.80
	1	21.56 ± 0.60	21.25 ± 0.96
	2	20.26 ± 0.69	17.31 ± 0.57
Voda (D)	0,5	27.25 ± 1.03	28.13 ± 0.64
	1	20.35 ± 0.58	29.11 ± 0.63
	2	22.31 ± 0.85	29.78 ± 0.98
Kontrolna proba (K1)		30.45 ± 0.53	28.56 ± 0.95
Kontrolna proba (K2)		31.14 ± 0.91	29.58 ± 0.96

Tretman bukovog drveta metanolom (K1) ne utiče značajno na smanjenje gubitka mase bukovog drveta u odnosu na netretirano drvo (K2) pod uticajem kako gljive *Trametes versicolor*, tako i pod uticajem gljive *Coniophora puteana*.

Radi bolje preglednosti dobijenih rezultata ovog istraživanja, u Tabeli 1 prikazani su svi rezultati gubitka mase bukovog drveta tretiranog različitim tipovima ekstraktiva kore bele jove u 3 različite koncentracije pod dejstvom gljiva *Trametes versicolor* i *Coniophora puteana* nakon 6 nedelja.

Drvo bukve tretirano etil-acetatnim ekstraktivom (A) u koncentraciji 0.5 mg/ml nije pokazalo značajnu otpornost prema dejstvu gljiva *T.versicolor* i *C.puteana* u odnosu na kontrolne uzorke, odnosno gubitak mase (%) je skoro nepromenjen (Tabela 1). Nešto bolju otpornost prema dejstvu gljive *C.puteana* pokazalo je bukovo drvo tretirano istim ekstraktivom u koncentracijama 1.0 mg/ml odnosno 2.0 mg/ml, dok su ove koncentracije dale značajniju otpornost prema dejstvu gljive *T.versicolor* kada je gubitak mase iznosio 19,40% i 17,37 %. Takođe, gubitak mase bukovog drveta tretiranog etarskim ekstraktivom kore bele jove (B) u koncentraciji 0,5 mg/ml, nije bio značajno smanjen u odnosu na kontrolu u slučaju dejstva obe test gljive. Tretman bukovog drveta ekstraktivom B u koncentraciji 1,0 mg/ml je dao značajniji rezultat u inhibiranju rasta obe test gljive, dok u koncentraciji 2 mg/ml je, takođe, uticao na smanjenje gubitka mase (%) bukovog drveta pod dejstvom gljive *T.versicolor* u odnosu na kontrolu, ali ne značajno. Tretman bukovog drveta istom koncentracijom ovog ekstraktiva je imao najznačajniji uticaj na inhibiciju rasta gljive *C.puteana* kada je gubitak mase iznosio 8,71% u odnosu na gubitak mase pod dejstvom ove gljive kod kontrolnih uzoraka, kada je iznosio 28,56% i 29,58%. Tretman bukovog drveta etanolnim ekstraktivom kore bele jove (C) imao je sličan uticaj na otpornost ovog drveta prema test truležnicama (Tabela 1). U koncentraciji 0,5 mg/ml ovaj ekstraktiv nije značajno uticao na smanjenje gubitka mase (%) drveta pod dejstvom obe gljive u odnosu na kontrolu. Nešto bolji efekat dao je tretman bukovog drveta ekstraktivom D u koncentraciji 1,0 mg/ml prema obe test gljive i slično u koncentraciji 2,0 mg/ml prema gljivi *T.versicolor*, dok je značajniji uticaj u istoj koncentraciji imao prema inhibiranju rasta gljive *C.puteana* kada je gubitak mase iznosio 17,31% u odnosu na 29,58% gubitka kod kontrolne serije K2.

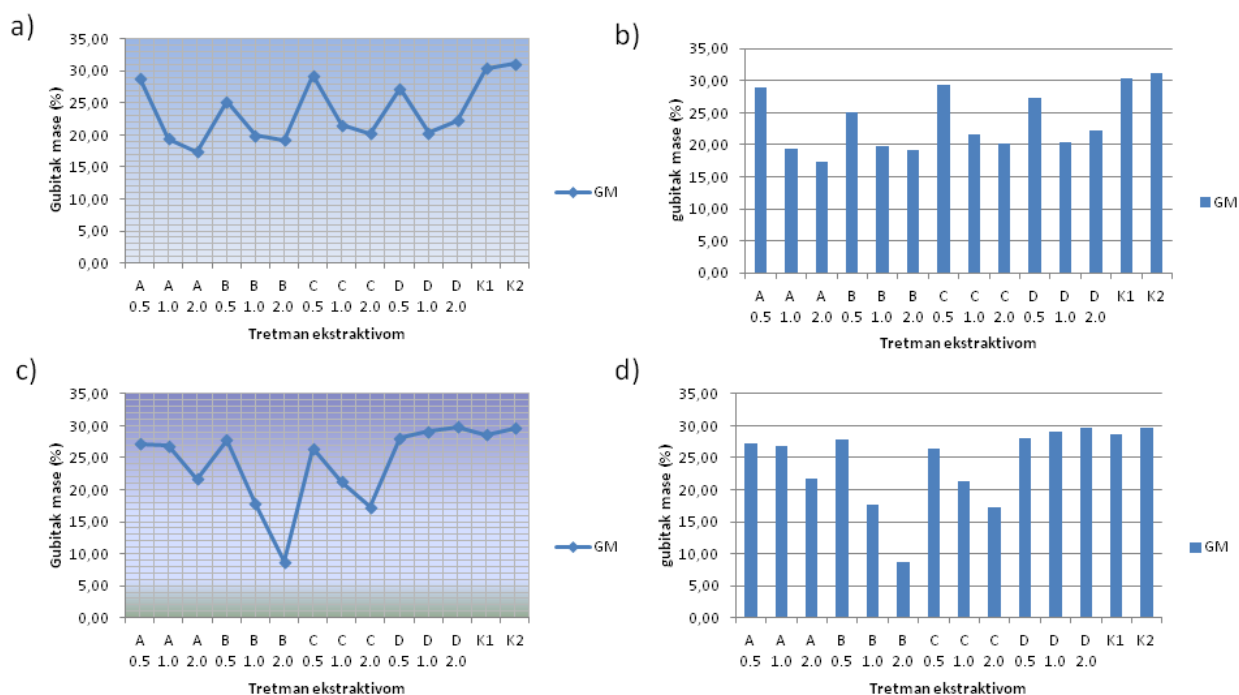
Kao što se vidi iz rezultata prikazanih u Tabeli 1, najmanji uticaj na inhibiciju rasta test gljiva truležnica, odnosno na smanjenje gubitka mase bukovog drveta pod njihovim dejstvom u odnosu na kontrolne grupe uzoraka, ali i u odnosu na ostale tipove ekstraktiva (A, B i C) u istim koncentracijama, imao je ekstraktiv kore bele jove dobijen vodenom ekstrakcijom (D). Nešto bolji uticaj dao je kod gljive *T.versicolor* u koncentraciji 1.0 mg/ml

kada je GM drveta iznosio 20,35% i u koncentraciji 2,0 mg/ml kada je GM bio 22,31 mg/ml.

Dobijene rezultate istraživanja antifungalne efikasnosti ekstraktiva kore bele jove ne možemo porediti sa rezultatima drugih istraživanja, jer prema pregledu dostupne literature, do sada nije ispitivan uticaj ovog ekstraktiva prema truležnicama, kao ni prema patogenim gljivama. Ispitivan je uticaj benzene-etanolnog ekstraktiva kore crne jove (*Alnus glutinosa* L.) koncentracije 2% prema gljivama *T.versicolor* na drvetu *Fagus orientalis* L. i *C.puteana* na drvetu *Pinus sylvestris* L. [25]. Prema rezultatima njihovih istraživanja ekstraktiv kore crne

jove dao je mnogo bolju efikasnost protiv gljive *Trametes versicolor* na drvetu bukve, kada je gubitak mase iznosio 9,35%, dok je prema rezultatima naših istraživanja najmanji gubitak mase bukovog drveta od 17,37% kod iste gljive.

Na slici 1 prikazani su grafik a) i histogram b) koji pokazuju gubitak mase bukovog drveta tretiranog sa četiri tipa ekstraktiva kore bele jove u tri različite koncentracije, kao i kontrolnih grupa uzoraka pod dejstvom gljive *T.versicolor*, dok grafik 1c) i histogram 1d) pokazuju gubitak mase pod dejstvom gljive *C.puteana* nakon šest nedelja.



Slika 1. Gubitak mase tretiranih i netretiranih uzoraka bukovog drveta pod uticajem gljive *T.versicolor* a) i b) i gljive *Coniophora puteana* c) i d) nakon šest nedelja

Figure 1. Weight loss of treated and untreated beech wood samples under the influence of *T.versicolor* a) and b) and *Coniophora puteana* c) and d) after six weeks

Dobijeni rezultati istraživanja podvrgnuti su statističkoj obradi u programu STATISTIKA, Version 8. Dvofaktorijalna analiza varijanse (two-way ANOVA) za ispitivanje uticaja faktora "ekstraktiv" (četiri nivoa ovog faktora su četiri rastvarača korišćena za ekstrakciju kore bele jove A, B, C i D) i faktora "koncentracija" (tri nivoa ovog faktora su 0,5; 1,0 i 2,0 mg/ml na gubitak mase bukovog drveta nakon šest nedelja ekspozicije gljivama (GM zavisna promenljiva) ukazuje da su kod obe gljive značajna oba faktora, i ekstraktiv i koncentracija, kao i njihova interakcija, jer je vrednost $p \leq 0,05$.

Testiranje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti gubitka mase bukovog drveta pod uticajem svakog faktora utvrđeno je LSD Fisher post-hoc testom homogenih grupa koji je pokazao da je najmanji gubitak mase bukovog drveta pod uticajem gljive *T.versicolor* ukoliko je ono tretirano tipovima ekstraktiva B (etarski) i A (etil-acetatni) i da nema statistički značajne razlike između njihovih srednjih vrednosti. Najveći gubitak mase drveta je kod tretiranja drveta ekstraktivima D (vodeni) i C (etanolni) i kod njih ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti gubitka

mase. Značajne razlike srednjih vrednosti gubitka mase bukovog drveta postoje između homogene grupe 1 - ekstraktivi B i A (najmanji GM) i homogene grupe 2 - ekstraktivi D i C (najveći GM).

Post-hoc test za faktor "koncentracija" je pokazao da postoje statistički značajne razlike između srednjih vrednosti gubitka mase bukovog drveta pod uticajem gljive *T.versicolor* tretiranog ekstraktivima različitih koncentracija. Najmanji gubitak mase drveta je kod tretmana ekstraktivom koncentracije 2,0 mg/ml, dok je najveći kod koncentracije 0,5 mg/ml.

Takođe, postoje statistički značajne razlike između srednjih vrednosti gubitka mase kod interakcije faktora "ekstraktiv" i faktora "koncentracija". Najmanji gubitak mase je kod tretiranja drveta ekstraktivom A u koncentraciji 2 mg/ml. Ova homogena grupa se statistički razlikuje od homogene grupe 2 u kojoj su ekstraktiv B u koncentraciji 2 mg/ml, A i B u koncentraciji 1 mg/ml, gde je nešto veći gubitak mase drveta. U grupi 2 ne postoje značajne razlike srednjih vrednosti. Najveći gubitak mase drveta pod dejstvom *T.versicolor* je kod tretmana drveta bukve ekstraktivom C u koncentraciji 0,5 mg/ml i ekstraktivom A u istoj koncentraciji, a između njih ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima gubitka mase.

Iz ove statističke analize možemo zaključiti da je najbolji tretman bukovog drveta za preventivnu zaštitu od napada gljive, izazivača bele truleži, *Trametes versicolor*, tretman etil-acetatnim ekstraktivom kore bele jove (A) u koncentraciji 2,0 mg/ml.

Pod uticajem gljive *C.puteana* postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima gubitka mase između svih nivoa faktora "ekstraktiv". Najmanji gubitak mase pod dejstvom je kod tretiranja drveta ekstraktivom B (etarski), dok je najveći gubitak mase je kod tretmana ekstraktivom tipa D (vodeni).

Kod faktora "koncentracija" pod uticajem gljive *C.puteana* postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima gubitka mase između svih nivoa ovog faktora. Najmanji gubitak mase je kod tretmana bukovog drveta koncentracijom 2,0 mg/ml, nešto veći kod koncentracije 1,0 mg/ml i najveći gubitak mase kod tretmana koncentracijom ekstraktiva 0,5 mg/ml.

Što se tiče interakcije faktora "ekstraktiv" i "koncentracija", post-hoc test homogenih grupa je pokazao da postoje statistički značajne razlike srednjih vrednosti gubitka mase drveta između homogenih grupa. Najmanji gubitak mase drveta pod dejstvom *C.puteana* je kada je drvo tretirano ekstraktivom B

(etarski) u koncentraciji 2,0 mg/ml i postoji statistički najznačajnija razlika u srednjoj vrednosti gubitka mase u odnosu na ostale homogene grupe odnosno interakcije nivoa navedena dva faktora. Najveći gubitak mase je kod tretmana ekstraktivom D (vodeni) u koncentracijama 1,0 i 2,0 mg/ml.

Statistička analiza nam je pokazala da je najznačajna preventivna zaštita drveta bukve od gljive *Coniophora puteana* tretiranje drveta etarskim ekstraktivom kore bele jove (B) koncentracije 2 mg/ml.

Fisher-ov LSD post-hoc test homogenih grupa je pokazao da je kod obe test gljive truležnice srednja vrednost gubitka mase najmanja pri tretmanu drveta ekstraktivom koncentracije 2 mg/ml, odnosno da se srednja vrednost gubitka mase drveta tretirana ekstraktivom ove koncentracije statistički razlikuje od srednjih vrednosti pri tretmanu ostalim koncentracijama. Razlika je u tome što je kod gljive *T.versicolor* najmanji gubitak mase ukoliko je drvo tretirano ekstraktivom A (etil-acetatni), a kod gljive *C.puteana* ekstraktivom tipa B (etarski).

Posmatrajući dobijene rezultate i njihovu statističku obradu, ekstraktiv kore bele jove je generalno pokazao bolji antifungalni efekat prema gljivi *Trametes versicolor*, naročito etarski i etil-acetatni, što se može smatrati povoljnim rezultatom s obzirom da je ova gljiva poznata po svojoj visokoj otpornosti prema fenolnim jedinjenjima [26].

4. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja za sve ispitivane tretmane za gljivu *Trametes versicolor* i gljivu *Coniophora puteana*, može se reći da je kontrolni uzorak (K2) pokazao najveći gubitak mase i to su bili očekivani rezultati, jer je kontrolna serija uzoraka podrazumevala uzorke koji nisu bili tretirani ni jednim preventivnim sredstvom.

Najmanji gubitak mase od 8,71% pod dejstvom gljive *Coniophora puteana* imalo je bukovno drvo tretirano etarskim ekstraktivom (B) kore bele jove u koncentraciji 2 mg/ml, dok je pod dejstvom gljive *Trametes versicolor* najmanji gubitak mase od 17,37% bio kod drveta tretiranog etil-acetatnim ekstraktivom (A) iste koncentracije.

Na osnovu dobijenih rezultata ovog istraživanja i njihove statističke analize, možemo reći da prirodni ekstraktiv kore bele jove može biti potencijalno sredstvo za preventivnu zaštitu drveta, ali bi trebalo ispitati i druge koncentracije ekstraktiva, prema drugim truležnicama i na drugim vrstama drveta. Naravno, trebalo bi uzeti u obzir i druge metode ekstrakcije i sadržaj aktivnih jedinjenja u ekstraktivima dobijenim različitim metodama.

5. LITERATURA

- [1] C.A.S. Hill (2006) Wood modification, Chemical Thermal and Other Processes, John Wiley & Sons Ltd., England.
- [2] A.O. Rapp, M.Sailer (2000) Heat treatment of wood in Germany – state of art, Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg, Germany.
- [3] S.Jämsä, P.Viitaniemi (2001) of the special seminar of COST Action E22, Antibes, France, Heat treatment of wood, Better durability without chemicals, Review on heat treatments of wood proceedings.
- [4] M.Vernois (2000) Heat treatment of wood in France- State of the art, Proceedings of the Träskydd-, värmebehandlat trä-, egenskaper och användningsområden, Stockholm, Sweden.
- [5] T.Syränen, S.Jämsä, P.Viitaniemi (2000) Heat treatment of wood in Finland- State of the art, In proceedings of the Träskydd-, värmebehandlat trä-, egenskaper och användningsområden, Stockholm, Sweden.
- [6] H.Militz, B.Tjeerdsma (2000) Heat treatment of wood by the Plato-process Proceedings of Seminar Helsinki, Stockholm, Oslo, "Production and development of heat treated wood in Europe".
- [7] D.Mayes, O.Oksanen (2002) Key properties of Thermowood, knjiga ThermoWood handbook: Finnforest, ThermoWood, p.11-32.
- [8] B.Esteves, N.Nunes, H.Pereira (2011) Properties of furfurylated wood (*Pinus pinaster*), European Journal of Wood and Wood Products, 69(4), 521-525.
- [9] W.Homan, B.Tjeerdsma, E.Beckers, A.Jorissen (2000) Structural and other properties of modified wood. Proceedings, World Conference on Timber Engineering, Whistler Resort, British Columbia, Canada.
- [10] L. Reinprecht (2010) Fungicides for Wood Protection - World Viewpoint and Evaluation/Testing in Slovakia, Fungicides, Odile Carisse (Ed.) InTech.
- [11] T.Chang, S.Y.Wang, C.L.Su, Y.C.Wu, Y.H.Kuo (1999) Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) Heartwood, *Holzforchung*, 53(5), 487-490.
- [12] O.Göktaş, P.Mammadov, P.Duru, M.E.Ozen, E.Colak, A.M (2007) Application of extracts from the poisonous plant, *Nerium Oleander* L., as a wood preservative, *African Journal of Biotechnology*, 17(6), 2000-2003.
- [13] P.K.Nagadesi, A.Arya (2016) Biocontrol of timber decaying fungi by botanical pesticides an ecofriendly technology, *World Scientific News*, 44, 206-223.
- [14] T.A.Nurudeen, J.K.Abiola, E.N.Ekpo, O.O.Olasupo, N.O.Haastrop, A.O.Okunrotifa (2012) Effects of plant extracts as preservative against wood decay fungus *Sclerotium rolfsii* (Sacc), *Journal of Forestry Research and Management*, 9, 73-82.
- [15] E.N.Quiroga, A.R.Sampietro, M.A.Vattuone (2001) Screening antifungal activities of selected medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology* 74, 89–96.
- [16] C.Tascioglu, M.Yalcin, S.Sen, C.Akay (2013) Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives, *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 23-28.
- [17] G.Telysheva, T.Dizhbite, O.Bikovens, J. Ponomenko, S.Janceva, J.Krasilnikova (2011) Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees, *Holzforchung*, 65(4), 623-629.
- [18] S.Sushil Chandra, S.Nitin, 1 and O. P. Sati (2011) Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*, *Pharmacognosy Review*, 5(10), 174–183.
- [19] T.Stević, K.Šavikin, G.Zdunić, T.Stanojković, Z. Juranić, T.Janković, N.Menković (2010) Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* extracts, *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 700-704.
- [20] S.Janceva, T.Dizhbite, G.Telisheva, U.Spulle, L.Klavinsh, M.Dzenis (2011) Tannins of deciduous trees bark as a potential source for obtaining ecologically safe wood adhesives, *Latvian State Institute of Wood Chemistry, Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference. Volume 1, Riga, Latvia, p.265-270.*
- [21] European standard EN (1994) Durability of wood and wood-based products. Natural durability of solid wood. Guide to natural durability and treatability of selected wood species of importance in Europe. CEN. European Committee for Standardization, p.350-352.
- [22] L.Podgorski, I.L.Bayon, I.Paulmier, J.D.Lanvin, V.Georges, D.Grenier, H.Baillères, J.Méot (2008) Bi-oleothermal treatment of wood at atmospheric pressure: resistance to fungi and insects, resistance to weathering and reaction to fire results, *The International Research Group On Wood Protection 39th Annual Meeting Istanbul, Turkey.*
- [23] O. Göktaş, M.E.Duru, E.Yeniocak ve Özen (2008) Determination of the colour stability of an environmentally friendly wood stain derived from laurel (*Laurus nobilis* L.) leaf extracts under UV exposure, *Forest Products Journal*, 58, 77-80.
- [24] L.Reinprecht (2007) Selected laboratory tests of boron efficacy against wood-damaging fungi. *ProLigno*, 3(3), 27-34.

- [25] Ö.Özgenç, S.Durmaz (2017) The protective effect of different tree bark Extractives against decay fungi, The IRG48 Scientific Conference on Wood Protection, Ghent, Belgium, IRG/WP 17-30707.
- [26] S.Amara, T.Perrot, D.Navarro, A.Deroy, A. Benkhelfallah, A.Chalak, M. Daou, D.Chevret, C. B.Faulds, J.G.Berrin, M.Morel-Rouhier, E.Gelhaye, E.Record (2018) Enzyme activities of two recombinant heme-including peroxidases TvDyP1 and TvVP2 identified from the secretome of *Trametes versicolor*, Applied and Environmental Microbiology, 84(8), 6-17.

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF GREY ALDER BARK EXTRACTIVES AGAINST WOOD ROTTING FUNGI

*The effect of the treatment of beech tree (*Fagus sylvatica* ssp. *Moesiaca*) with grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) bark extractives on the improvement of its natural resistance against two rot fungi: *Trametes versicolor*, causative agent of white rot and *Coniophora puteana*, the cause of the brown rot of the tree, is investigated in this paper in laboratory conditions. Four types of extractives were used: ethyl acetate (A), ether (B), ethanol (C) and aqueous (D), obtained by ultrasonic extraction (UZE) and prepared at three concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 mg/ml in methanol as a solvent. The results of the study show that the highest antifungal efficiency was obtained using ethyl acetate extract at a concentration of 2.0 mg/ml. Grey alder bark extract can be a potentially environmentally friendly tool in preventing the protection of deciduous wood along with further research.*

Keywords: *Extractives, *Alnus incana*, *Trametes versicolor*, *Coniophora puteana*, *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca*, natural resistance, weight loss.*

Scientific paper

Paper received: 22. 12. 2019.

Paper accepted: 17. 01. 2020.

Paper is available on the website: www.idk.org.rs/journal