



Záverečná správa projektu za rok 2013

Doba riešenia	júl 2013 – január 2014
Registračné číslo projektu	
Dátum prijatia správy na VVČ (vyplní IPA)	

Názov projektu	Zmena štruktúry a nanomechanických vlastností dreva v dôsledku rozkladu celulózoformnými hubami.
-----------------------	--

Vedúci projektu

Priezvisko, meno, tituly: Kučerová Veronika, Ing., PhD.	Potvrdzujem správnosť údajov v správe
Telefónne číslo a e-mail: 045/5206251, veronika.kucerova@tuzvo.sk Dátum a podpis vedúceho projektu:

Spoluriešitelia

Pavol Hlaváč, Ing. PhD



Výsledky riešenia projektu

a.) spôsob, metódy a priebeh riešenia

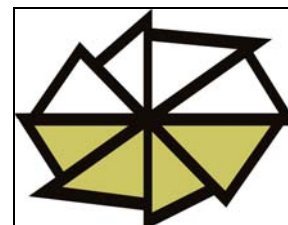
Vzorky dreva boli odobraté z jedle bielej (*Abies alba*) napadnutej drevokaznou hubou *Fomitopsis pinicola*. Lokalita odberu boli lesy VŠLP, konkrétne smrekové porasty v lokalite Ostrá Lúka nad. výška približne 400 m n. m.. Bol nájdený ležiaci strom, na ktorom sa vyskytovali plodnice danej huby, čo umožnilo identifikáciu žiadaného patogéna. Okrem toho však boli prítomné aj rizomorfy *Armillarie*, čo svedčí aj o jej prítomnosti. Zo stromu bol odobratý kotúč o hrúbke cca. 10 cm, na ktorom sa nachádzali rôzne štádiá rozkladu dreva (obr. 1).



Obr. 1.: Rôzne štádiá rozkladu dreva na odobratom kotúči a vyznačenie približného miesta odberu vzoriek.

Z jednotlivých štádií boli odobrané vzorky približne o rozmeroch 2 x 2 x 4 mm. Nakoľko na strome sa vyskytovali aj miesta bez viditeľného napadnutia hubou, pevné kompaktné drevo, neodoberali sme vzorky z iných stromov, kvôli vylúčeniu vplyvu genetickej variability. Jedna sada vzoriek bola zaliata do SPURR živice pre účely atómovej silovej mikroskopie (AFM) a druhá bola odovzdaná do špecializovaného pracoviska pre skenovací elektrónovú mikroskopiu (SEM).

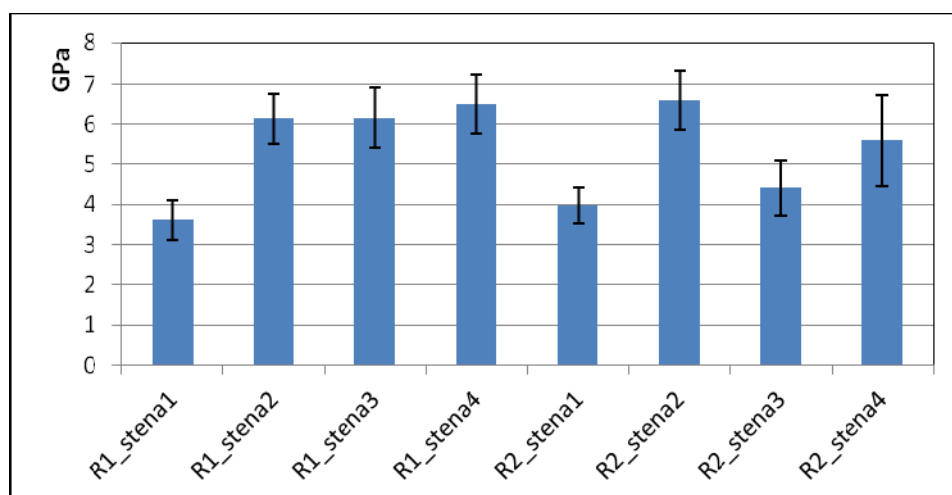
Vzorky pre AFM boli následne narezané na rotačnom mikrotóme pomocou skleneného a diamantového noža, aby bola zabezpečená maximálna hladkosť povrchu rezu. Robili sa iba priečne rezy, nakoľko tieto rezy sú z hľadiska meraní AFM najvhodnejšie. Merania na AFM boli robené na mikroskope Nanoscope 8 pomocou stredne tvrdého hrotu RTESPA $k = 37 \text{ N/m}$, pri sile 40 nN. Priemer hrotu bol $R = 16,01 - 26,89 \text{ nm}$. Na vzorkách rozkladu 1. a 2. štádia rozkladu (R1 a R2) sa merali štyri bunkové steny v S2 vrstve, na vzorkách R3 a R4 S2 vrstva chýbala, a stredná lamela bola príliš narušená pre AFM merania. Získané dáta boli spracované v programe MatLab. U vzoriek pre SEM boli robené priečne aj pozdĺžne rezy, pre identifikáciu štádia rozkladu. Vzorky boli potom pokovené a pozorované mikroskopom Tescan 5130.



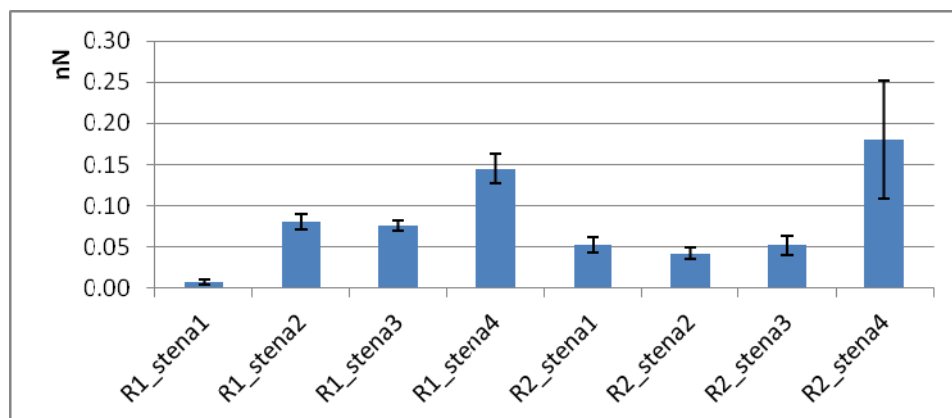
Výsledky riešenia projektu (pokračovanie)

b.) dosiahnuté výsledky a porovnanie s cieľmi projektu

Namerané hodnoty modulu pružnosti a adhézie zobrazuje obr. 2 a 3. Vzhľadom na to, že aj v štádiu rozkladu 1 boli na SEM pozorované hýfy huby, nemožno túto vzorku brať ako referenčnú a zrejme aj táto skutočnosť spôsobila štatisticky nepreukazné rozdiely medzi hodnotami modulu pružnosti a adhézie medzi štádiom rozkladu 1 a 2.



Obr. 2.: Namerané hodnoty modulu pružnosti (priemer ± smerodajná odchýlka). R1 – rozklad 1. štádia, R2 – rozklad 2. štádia.



Obr. 3.: Namerané hodnoty adhézie (priemer ± smerodajná odchýlka). R1 – rozklad 1. štádia, R2 – rozklad 2. štádia.

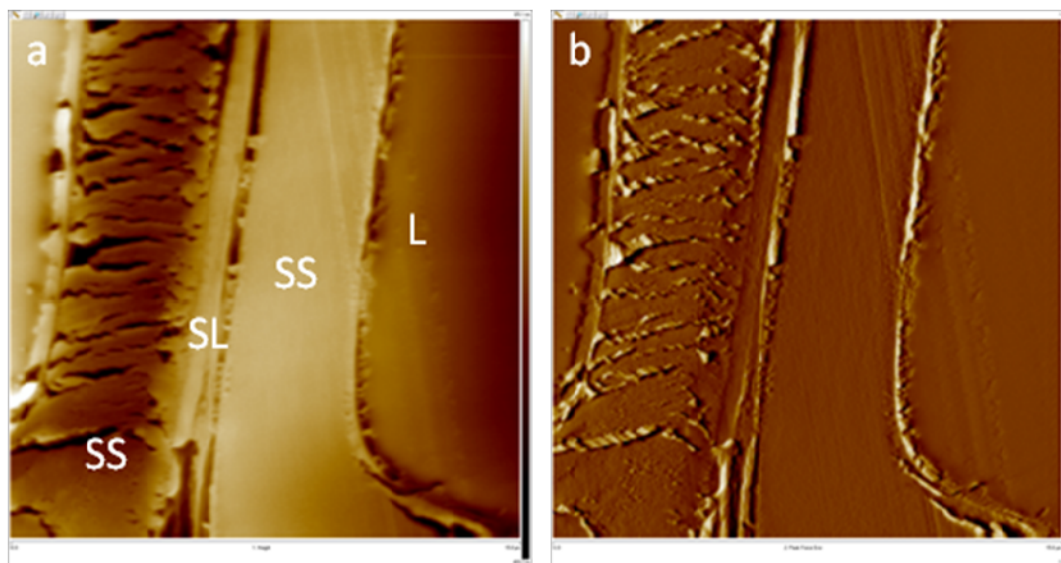
Pozoruhodná je vysoká hodnota adhézie pre stenu 4 v oboch štádiách rozkladu. Spoločné pre obe merania je použitie nového hrotu. Vo všeobecnosti by výmena hrotu toho istého typu a vlastností po dôslednej kalibrácii nemala mať vplyv na merania, túto skutočnosť však vzhľadom na získané výsledky bude treba podrobnejšie preveriť a urobiť dodatočné merania na porovnanie hrotov na tom istom materiáli. Dokumentácia z optickej kamery umožňuje zachytiť presné miesto merania a tým aj opakované merania daného miesta.



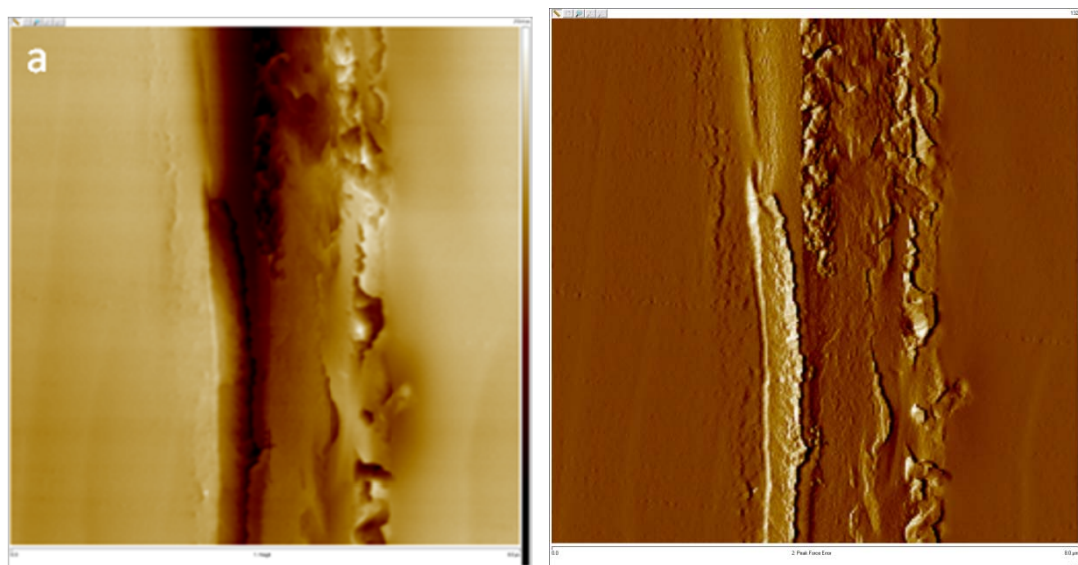
Výsledky riešenia projektu (pokračovanie)

Zatiaľ sa hypotéza znižovania modulusu pružnosti, v dôsledku odbúravania celulózy celulózoformnou hubou nepotvrdila. Takisto sme predpokladali zvyšovanie adhézie v dôsledku nárastu zastúpenia lignínu, čo sa tiež nepotvrdilo.

Pri štádiu rozkladu 3 a 4 na vzorke AFM už neboli prítomné sekundárne steny, ktoré by bolo možné merať. Pre porovnanie uvádzame na obr. 4. a 5. výstupy z AFM pre výšky a chybu (ktorá predstavuje topografiu povrchu) pre štádiá rozkladu 1 a 3.



Obr. 4.: Zobrazenie výstupu výška (a) a chyba (b) pre štádium rozkladu 1. Zreteľne je viditeľná sekundárna stena (SS), stredná lamela (SL) a lumen bunky (L) vyplnený živicom. Praskliny v ľavej stene sú spôsobené orientáciou vlákien celulózy a ich vytrhávaním pri reze. Veľkosť skenu $15 \times 15 \mu\text{m}$.



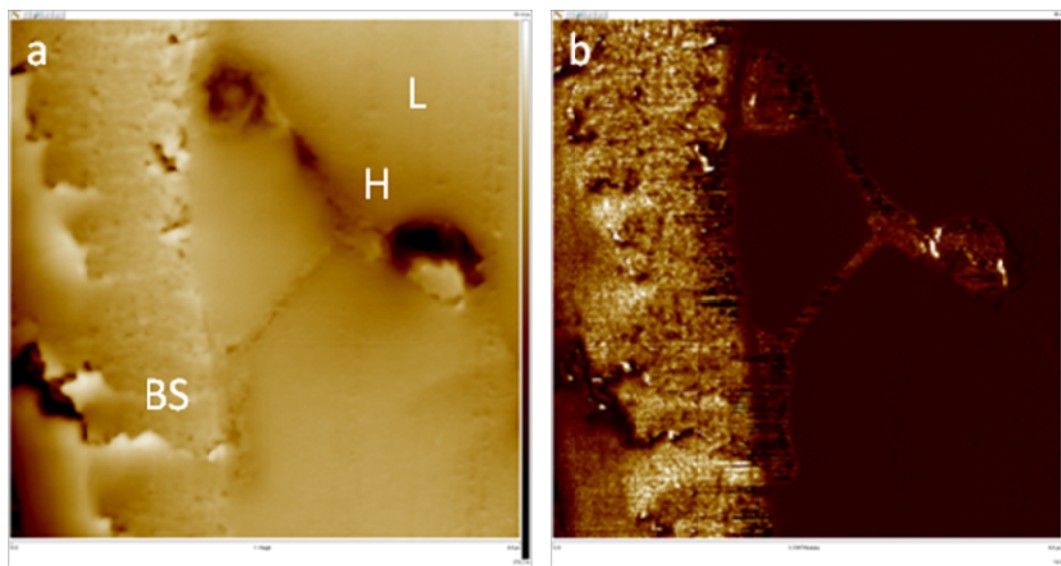
Obr. 5.: Zobrazenie výstupu výška (a) a chyba (b) pre štádium rozkladu 3. Ťažko identifikovateľný zvyšok bunkovej steny, zrejme iba stredná lamela. Veľkosť skenu $8 \times 8 \mu\text{m}$.

Ak nestačí predloha, použite kópiu tejto strany.



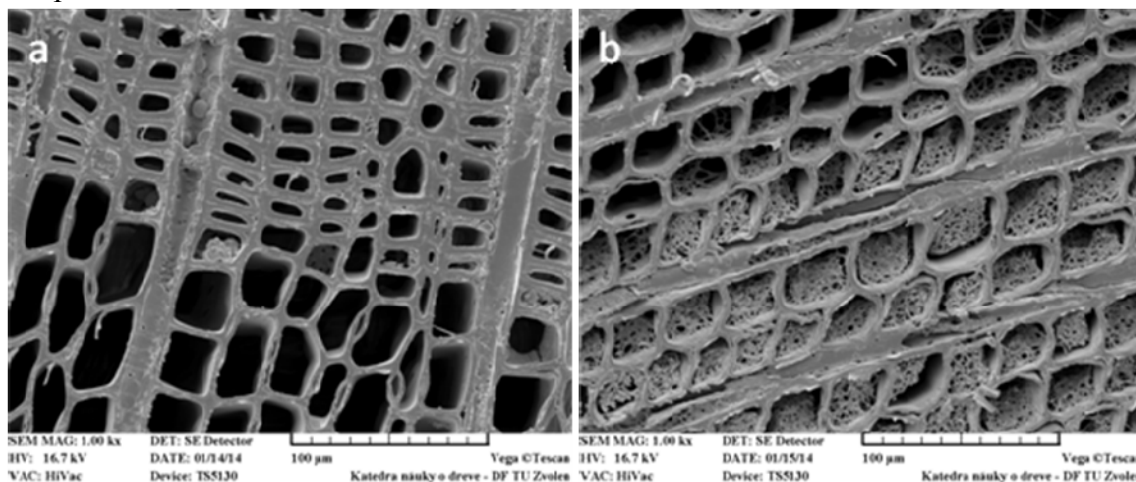
Výsledky riešenia projektu (pokračovanie)

Zaujímavým výsledkom, ktorý nebol pôvodne v cieľoch projektu ale ponúka ďalšie možnosti štúdia je zachytenie hýfy na AFM pri druhom štádiu rozkladu (obr. 6). Pri takto veľkom skene nie je možné urobiť presné merania nanomechanických vlastností ale detailnejšie snímky by mohli umožniť meranie zmien v mieste pripojenia hýfy na stenu a jeho okolí. Avšak už aj pri uvádzanom rozlíšení je možné pozorovať, že hýfy huby sú pevnejšie ako živica (svetlejšie) ale tmavšie ako bunková stena, čo značí, že bunková stena je pevnejšia.



Obr. 6.: Výstup z AFM pre výšku (a) a modulus pružnosti (b). BS – bunková stena, L – kumen, H – hýfa. Veľkosť skenu $6 \times 6 \mu\text{m}$.

Pre kvalitatívne zhodnotenie jednotlivých štádií rozkladu a porovnanie s meraniami AFM boli urobené aj snímky SEM zo zodpovedajúcich štádií. Na obr. 7. uvádzame priečny rez štádiom rozkladu 1 a 2. V štádiu rozkladu 2 bolo pozorované rozsiahle mycélium, vyplňajúce takmer všetky lumény jarného i letného dreva. Bunkové steny sa nachádzali v rôznom štádiu rozkladu od zachovalých, až po komplexne deštruované.

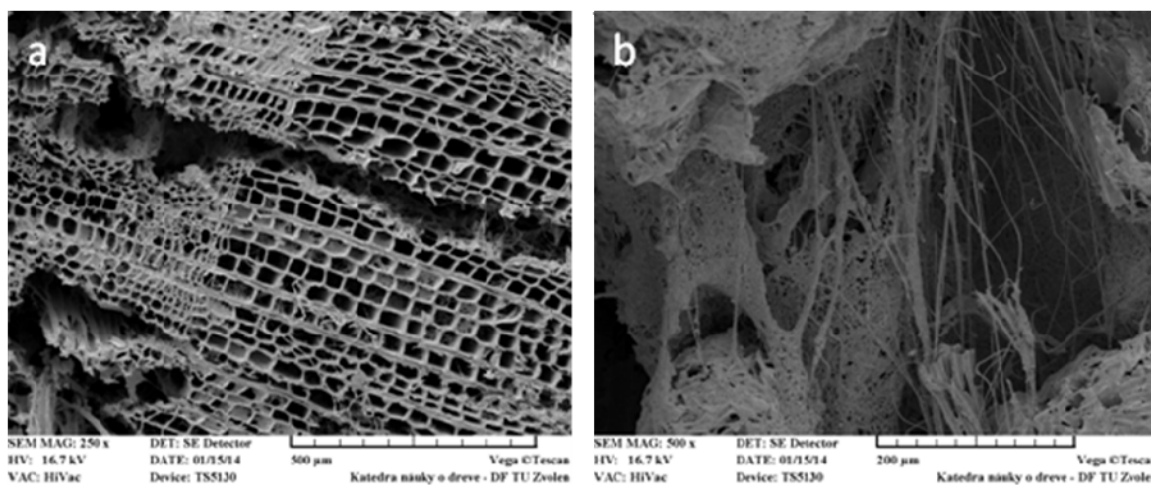


Obr. 7.: a) SEM fotografie štádia rozkladu 1. Viditeľná hranica ročného kruhu, zachované sekundárne steny letného dreva. b) Mycélium vyplňajúce lumény dreva v štádiu rozkladu 2.



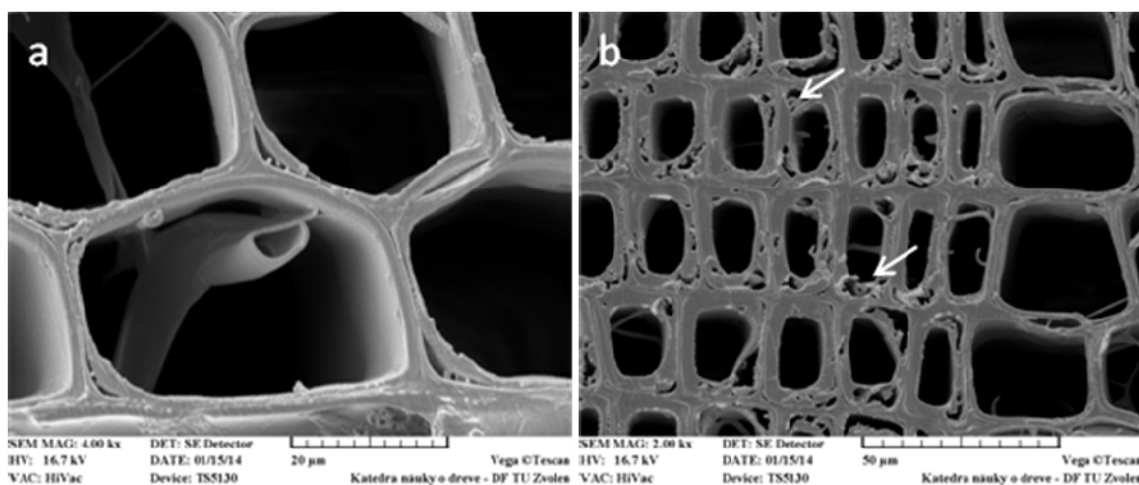
Výsledky riešenia projektu (pokračovanie)

Štádium rozkladu 3 sa vyznačovalo značnou deštrukciou bunkových stien (obr. 8), čo bolo pozorované aj na AFM (obr. 5). Avšak je nutné podotknúť, že na SEM boli pozorované aj oblasti s menším poškodením. Aj napriek umiesteniu vzoriek pre SEM a AFM blízko seba tieto predsa len nemusia presne korešpondovať, keďže rozklad dreva je značne heterogénny proces. Takisto bol na tejto vzorke pozorovaný aj iný typ mycélia (obr. 8b). Vzhľadom na to, že sa jedná o pilotnú štúdiu merania rozkladu dreva na AFM a materiál bol odoberaný voľne z prírody je veľmi pravdepodobné osídlenie kmeňa stromu rôznymi druhmi húb, čo potvrdzuje aj nález rizomorfy *Armilarie* na spodnej časti kmeňa.



Obr. 8.: a) Deštrukcia bunkových stien v štádiu rozkladu 3 na hranici ročného kruhu. b) Mycélium nachádzajúce sa v dreve v štádiu rozkladu 3.

Štádium rozkladu 4 tiež nebolo na AFM merané. SEM fotografie naznačujú prítomnosť hýf *Ophiostomy*, a takisto hýf celulózovornej huby, prepleťavajúce si sekundáranu bunkovú stenu (obr. 9.)



Obr. 9.: a) Prerezaná hýfa, pravdepodobne rodu *Ophiostoma*. b) Hýfy v bunkových stenách letného dreva.

Cieľom štúdie bolo zmerať nanomechanické vlastnosti rôznych štádií rozkladu dreva, čo sa čiastočne podarilo splniť a boli porovnané so SEM snímkami prislúchajúcich štádií.



Výsledky riešenia projektu (pokračovanie)

c.) uplatnenie výsledkov a ich prínos v riešenej problematike

Uplatnenie získaných výsledkov je predovšetkým metodické. Bolo získaných niekoľko odporúčaní pre vylepšenie metodiky merania rozkladu dreva a lepšej korešpondencie medzi vzorkami AFM a SEM.

Odporúčania pre ďalšiu prácu:

- na jednom AFM skene mať zastúpenú živicu aj stenu pre priebežné monitorovanie obrusovania hrotu. Živica slúži ako referenčná časť so známymi a nemennými charakteristikami.
- použiť väčšiu živicu na výplň lumenov s cieľom zlepšenia možnosti softvérového rozlíšenia bunkovej steny od živice
- možnosť merať vlastnosti styčných plôch hýfy a bunkovej steny
- otestovať opakovateľnosť meraní s rôznymi hrotmi
- pri zarovnávaní vzoriek AFM diamantovým nožom odobrať rezy a použiť ich na SEM fotografie, čo umožní nájdenie a meranie najvhodnejších miest na AFM. Optická kamera na AFM totiž nemá dostatočné zväčšenie a rozlíšenie, slúži iba na orientáciu vo vzorke.
- použiť materiál naočkovaný čistými kultúrami.





Zoznam výstupov, ktoré vznikli na základe výsledkov projektu

- a) publikované výstupy
- b) zoznam výstupov odovzdaných do tlače v roku 2013
- c) iné výstupy

Publikačnú činnosť vykázať v súlade s Organizačnou smernicou č. 7/2013 o bibliografickej registrácii a kategorizácii publikačnej činnosti, umeleckej činnosti a ohlasov na TU vo Zvolene.

Z výsledkov projektu neboli zatiaľ žiadne výstupy. Cieľom je po rozšírení meraní a úprave metodiky publikovať krátky metodický článok v zahraničnom odbornom časopise.

✘ ✘ ✘ ✘ ✘

Ak nestačí predloha, použite kópiu tejto strany.

**Čerpanie bežných výdavkov spojených s riešením výskumného projektu:**

Cestovné náhrady	
Konferencie, sympóziá, semináre	
Sieťové odvetvia - Komunikácie	
Literatúra	117,64 eur
Vzorkový materiál	
Drobný hmotný majetok	
Materiál, pracovné nástroje	508,34 eur
Rutinná a štandardná údržba	
Mzdové náklady (max. 15 %)	
Dohody o vykonaní práce (max. 10 %)	
Spolu	625,98 eur

Rozpis čerpania pridelených finančných prostriedkov na riešenie projektu:**Literatúra**

Optical Imaging Techniques in Cell Biology 117,64 eur

Materiál

SPURR živica	214,8 eur
Etylalkohol 96%	18,86 eur
Glutaraldehyd	143,4 eur
Mikrotómové žiletky	132 eur
spolu	508,34 eur

Ak nestačí predloha, použite kópiu tejto strany.

IPA
TUZVO

Interná projektová agentúra TUZVO

Technická univerzita vo Zvolene
Referát vedeckovýskumnej činnosti
T.G. Masaryka 24, 960 53 Zvolen, Slovensko
tel:045/5206 416, <http://www.tuzvo.sk>



<p>Názov a adresa pracoviska:</p> <p>Technická Univerzita vo Zvolene Lesnícka Fakulta Katedra ochrany lesa a poľovníctva T. G. Masaryka 20, 960 53, Zvolen</p>	<p>Vyjadrenie fakulty, resp. org. súčasť TUZVO (prodekan pre VVČ, resp. ním poverený zástupca, riaditeľ org. súčasť)</p> <p>.....</p> <p>Dátum a podpis:</p>
--	--