



LES/WOOD

VSEBINA / CONTENTS

Letnik 68, številka 2 / Volume 68, Number 2

• Uvodnik	3
Editorial Jože Kropivšek	
• Application of confocal laser scanning microscopy in dendrochronology	5
Uporaba konfokalne laserske vrstične mikroskopije v dendrokronologiji Angela Balzano, Klemen Novak, Miha Humar, Katarina Čufar	
• Wood identification using non-destructive confocal laser scanning microscopy	19
Identifikacija lesa s pomočjo nedestruktivne konfokalne laserske mikroskopije Katarina Čufar, Angela Balzano, Luka Krže, Maks Merela	
• Drying characteristics of wood of invasive tree species growing in an urban environment	31
Določanje sušilnih karakteristik lesa invazivnih drevesnih vrst rastočih v urbanem okolju Denis Plavčak, Željko Gorišek, Aleš Straže, Maks Merela	
• Adhezija bakterij na lesne premaze	45
Adhesion of bacteria to wood coatings Klemen Bohinc, David Kekec, Marko Petrič	
• Stabilni hidrogeli iz nanofibrilirane celuloze	59
Stable hydrogels from nanofibrillated cellulose Jaka Levanič, Ida Poljanšek, Primož Oven	
• Optimization of accelerated solvent extraction (ASE) of silver fir wood (<i>Abies alba</i> Mill.)	69
Optimizacija pospešene ekstrakcije s topili (ASE) na primeru lesa bele jelke (<i>Abies alba</i> Mill.) Eli Keržič, Viljem Vek, Ida Poljanšek, Primož Oven	
Novice	
• 12. srečanje ALUMNI kluba Oddelka za lesarstvo	79
Katarina Čufar	
• AICO TRADE d.o.o. - podjetje s tradicijo in znanjem	80
Ivan Avbar	
• Druga skupna poletna šola Univerze v Ljubljani in Tehniške Univerze v Clausthalu	80
Sebastian Dahle, Marko Petrič	
• Prvi slovenski dan plazme / First Slovene Plasma Day	82
Sebastian Dahle, Marko Petrič	
• Dr. Angela Balzano prejemnica Baileyeve nagrade za leto 2019	84
Katarina Čufar	
• Prof. dr. Katarina Čufar prejela častno priznanje Fakultete za gozdarstvo in tehnologijo lesa Univerze Mendel v Brnu	85
Tina Drolc	
• Prof. dr. Miha Humar - prejemnik Zlate plakete Univerze v Ljubljani	86
Milan Šernek, Marko Petrič, Boštjan Lesar	
• Prof. dr. Romanu Kuniču v slovo	87
Franc Pohleven	
• Eli Keržič dobitnica fakultetne Prešernove nagrade za leto 2019	88
Viljem Vek	
• ABES – nova naprava za spremljanje dinamike graditve trdnosti lepilnega spoja na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete	89
Milan Šernek, Jaša Saražin	
• Udeležba sodelavk in sodelavcev Oddelka za lesarstvo na mednarodni konferenci ICWST 2019 v Zagrebu	90
Maks Merela, Daša Krapež Tomec	

Les/Wood

Izdajatelj/Publisher

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology
Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

Glavna urednica/Editor-in-chief

Katarina Čufar, Slovenija, e-pošta: katarina.cufar@bf.uni-lj.si

Odgovorni urednik/Managing editor

Jože Kropivšek, Slovenija, e-pošta: joze.kropivsek@bf.uni-lj.si

Tehnični urednik/Technical editor

Anton Zupančič, Slovenija, e-pošta: anton.zupancic@bf.uni-lj.si

Uredniški odbor/Editorial board

Christian Brischke, Nemčija / *Germany*
Dominika Gornik Bučar, Slovenija / *Slovenia*
Miha Humar, Slovenija / *Slovenia*
Leon Oblak, Slovenija / *Slovenia*
Primož Oven, Slovenija / *Slovenia*
Kevin T. Smith, ZDA / *USA*
Milan Šernek, Slovenija / *Slovenia*
Rupert Wimmer, Avstrija / *Austria*

Jezikovni pregled/Proofreading

Darja Vranjek (slovensko besedilo/*Slovene text*)
Paul Steed (angleško besedilo/*English text*)

Oblikovanje/Design

Andrej Bajt

Postavitev/Layout

DECOP d. o. o., Železniki

Tisk/Print

Tiskarna Roboplast d. o. o., Ljubljana
Natisnjeno v decembru 2019 v 100 izvodih./*Printed in December 2019 in 100 copies.*

ISSN 0024-1067 (tiskana verzija/*printed version*)

ISSN 2590-9932 (spletna verzija/*on-line version*)

<http://www.les-wood.si/>

Periodičnost/Frequency

Dve številki letno/*Two issues per year*

Les/Wood je referiran v mednarodnih bibliografskih zbirkah

Les/Wood is indexed in the international bibliographic databases

AGRIS, CAB Abstract, DOAJ

Avtorske pravice objavljenih člankov si pridržuje založnik Les/Wood
Copyright of the published articles is owned by the publisher Les/Wood

Izdajanje revije sofinancira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS)
The journal is co-financed by Slovenian Research Agency (ARRS)



LES/WOOD

UVODNIK / EDITORIAL

Odgovorni urednik / *Managing Editor*
Jože Kropivšek

Spoštovane bralke in bralci!

Na uredništvu revije LES/WOOD se zavedamo, da sta za uspeh vsake znanstvene revije pomembna dva pogoja: da objavlja visokokakovostne znanstvene članke, ki kažejo napredek stroke na temeljnih in mejnih področjih, in da ti dosežejo čim širšo množico bralcev in s tem razširjajo nova znanja. Če je izpolnjen prvi pogoj, je izpolnitev drugega lažja, saj z dobrimi članki revija postane bolj prepoznavna in jo išče več bralcev. Velja pa tudi obratno, da več bralcev iz stroke in znanosti ustvarja tudi večje polje potencialnih avtorjev novih znanstvenih objav. Oboje je torej med seboj povezano. Ključno vlogo pri izpolnjevanju teh dveh pogojev in promociji znanstvene revije igrajo tudi bibliografske baze. Revija namreč z vključitvijo v baze pridobiva ugled in prepoznavnost, hkrati pa se poveča dostopnost preko iskalnikov in branost, članki pa so bolj citirani. To spet privablja nove avtorje in jih spodbuja, da objavljajo vse boljše članke, kar pa zopet povečuje ugled revije. Z veseljem in ponosom se ob pričujoči številki revije oziramo na prehojeno pot in izpostavljamo nekaj prelomnic:

Revija LES/WOOD je že od leta 1997 vpisana v bazo CAB Abstracts (<https://www.cabi.org/publishing-products/cab-abstracts/>), ki je »vodilna bibliografska informacijska storitev v angleškem jeziku, ki uporabnikom omogoča dostop do literature s področja ved o življenju v več kot 480.000 člankih in poročilih«. Vključitev v to bazo je bila za razvoj revije ključna, saj jo to uvršča med pomembnejše revije na področju ved o življenju.

Danes je nujno, da je revija digitalizirana. Revija LES/WOOD je do leta 2012 izhajala le v tiskani obliki. Takoj po njeni oživitvi v letu 2017, smo poleg tiskane uvedli tudi elektronsko različico revije in jo ponudili bralkam in bralcem preko svetovnega sple-

ta. Najprej smo pridobili ISSN številko za elektronsko verzijo revije, vzporedno s tem pa smo vzpostavili tudi spletno stran revije (<http://www.les-wood.si>). Za večjo prepoznavnost je bila revija leta 2017 vključena v sistem »Digital Object Identifier« (DOI). Od takrat vsak članek prejme lastni digitalni predmetni identifikator DOI (Digital Object Identifier), založnik pa je član organizacije CrossRef.

Pred vpisom revije v mednarodne bibliografske zbirke so potrebne različne formalne, tehnične, vsebinske in oblikovne dopolnitve, saj različne bibliografske baze postavljajo jasne (minimalne) tehnične in vsebinske zahteve. Pri tem je pomembno predvsem redno izhajanje, jasna uredniška politika, prenova (in digitalizacija) uredniškega procesa in on-line objava člankov v berljivi obliki. Predvsem v zadnjem obdobju so pomembna tudi pravila etičnega delovanja in politika preprečevanja plagiatorstva ter jasna pravila o ravnanju z intelektualno lastnino, kar predvsem velja za elektronsko verzijo revije. V ta namen je bila spletna stran revije LES/WOOD v prvi polovici leta 2019 povsem posodobljena.

Naslednja pomembna prelomnica se je zgodila poleti 2019, ko je bila revija LES/WOOD vključena v bazo DOAJ (The Directory of Open Access Journals = Imenik revij odprtega dostopa). DOAJ je seznam revij z odprtim dostopom in je izhodišče za iskanje kakovostnega, strokovno pregledanega gradiva z odprtim dostopom. Vključitev v DOAJ povečuje prepoznavnost in enostavnost uporabe člankov, na ugledu in prepoznavnosti pa pridobiva tudi revija kot celota. Cilj baze DOAJ je zajeti in celovito predstaviti vse znanstvene revije z odprtim dostopom z jasno in kakovostno uredniško politiko, ki zagotavlja določeno vsebinsko raven člankov (<https://doaj.org/>).

Nadaljnji razvoj revije LES/WOOD bo šel v smeri indeksiranja v bazi Scopus, kar bo, upamo, povečalo

mednarodno prepoznavnost, razširilo krog bralcev in povečalo zanimanje avtorjev za objavljanje v naši reviji. V tem procesu je ključno sodelovanje, ustvarjalna izmenjava znanja, novih idej in pobud, kar nas bo vse sopotnike revije vodilo naprej k novim uspehom. Zato vas toplo vabim, da po svojih močeh prispevate k promociji revije in njenemu razvoju. Hvala za vašo podporo že vnaprej!

Dear readers!

At the editorial board of the journal LES/WOOD, we are aware that two conditions are important for the success of every scientific journal: that it publishes high-quality scientific articles that show the advancement of the profession in fundamental and frontier areas, and that they reach as wide range of readers as possible, and thus disseminate new knowledge. If the first condition is fulfilled, then fulfilment of the second is easier, because with good articles the journal becomes more recognizable and is sought by more readers. Conversely, more scientific and professional readers also create a larger pool of potential authors for new scientific publications. The two are therefore interconnected. Bibliographic databases also play a key role in fulfilling these two conditions and promoting the scientific journal. Namely, by joining the databases, the journal gains reputation and visibility, while increasing search engine accessibility and readability, and the articles it publishes are cited more. This again attracts new authors and encourages them to publish better articles, which in turn enhances the reputation of the journal. In this issue of LES/WOOD, it is with the pleasure and pride that we take a look at the path of the journal's development and highlight some turning points over the years:

Since 1997, LES/WOOD has been listed in the CAB Abstracts database (<https://www.cabi.org/publishing-products/cab-abstracts/>), which is "the leading English-language bibliographic information service providing access to the world's applied life sciences literature, giving users access to over 480,000 journal articles, conference papers and reports". Being involved in this database has been crucial to the development of the journal, as it makes it one of the most important publications in the life sciences.

Today, it is crucial that the journal is being digitized. Until 2012, LES/WOOD was published in printed form only. With its revival in 2017, in addition to

the printed version, we introduced an electronic version and offered it to readers via web services. The ISSN number for the electronic version of the journal was obtained, and at the same time a website was set up (<http://www.les-wood.si>). For greater visibility, the journal was incorporated into the Digital Object Identifier (DOI) system in 2017. Since then, each article in LES/WOOD has been signed with its own Digital Object Identifier (DOI) name, while the publisher has become a member of the CrossRef organization.

Different formal, technical, substantive and design amendments are required before the journal is published in international bibliographic databases, as different bibliographic databases set clear (minimum) technical and content requirements. Of particular importance is regular publication, a clear editorial policy, the redesign (and digitization) of the editorial process, and the online publication of articles in a readable form. Especially in recent years, ethical rules of operation, a plagiarism prevention policy and clear rules on the management of intellectual property are also important, which mainly apply to the electronic version of the journal. To this end, the website of LES/WOOD journal was completely updated in the first half of 2019.

The last important turning point happened during the summer of 2019 when LES/WOOD was included in the DOAJ database (the Directory of Open Access Journals). DOAJ is a white list of open access journals and aims to be the starting point for all information searches for quality, peer reviewed open access material. Being included in DOAJ also increases the visibility and ease of use of articles, and that of LES/WOOD as a whole. The DOAJ aims to be comprehensive and cover all open access scientific and scholarly journals that use a quality control system to guarantee the content that they publish meets high standards (<https://doaj.org/>).

Further development of LES/WOOD will move in the direction of indexing in the Scopus database, which will hopefully increase international visibility, widen the readership and increase the interest of authors in publishing in the journal. In this process, collaboration, the creative exchange of knowledge, new ideas and initiatives, are crucial, which will lead all the journal's contributors to new successes. Therefore, I warmly invite you to contribute to the promotion of the journal and its development. Thanks in advance for your support!



APPLICATION OF CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY IN DENDROCHRONOLOGY

UPORABA KONFOKALNE LASERSKE VRSTIČNE MIKROSKOPIJE V DENDROKRONOLOGIJ

Angela Balzano^{1*}, Klemen Novak¹, Miha Humar¹, Katarina Čufar¹

UDK 630*561.24:537.533.35
Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 11. 11. 2019
Accepted / Sprejeto: 6. 12. 2019

Abstract / Izvleček

Abstract: We used the Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus LEXT OLS5000 for non-destructive observation and image analysis of wood anatomy traits in growth layers of tree species from different climatic zones. In European beech (*Fagus sylvatica*), where tree rings can generally be recognised, we discuss the changes in tree-ring structure due to adverse effects (insect attacks). Growth layers in Mediterranean Aleppo pine (*Pinus halepensis*) from south-eastern Spain are not always annual and contain numerous intra-annual density fluctuations (IADFs). Ocote pine (*Pinus oocarpa*) growing at high elevation in Honduras showed growth layers with clear growth ring boundaries and IADFs. In both pines, CLSM allowed us to recognise and measure tracheid parameters to define density fluctuations. In tropical true mahogany (*Swietenia macrophylla*) from Venezuela and cedrela (*Cedrela odorata*) from Costa Rica, we studied the growth layers with variable dimensions of vessels demarcated by marginal axial parenchyma.

Keywords: confocal laser scanning microscopy (CLSM), wood anatomy, wood identification, image analysis, dendrochronology, tree-rings, growth ring boundaries

Izvleček: Konfokalni laserski vrstični mikroskop (CLSM) Olympus LEXT OLS5000 smo uporabili za nedestruktivno proučevanje anatomskih znakov v prirastnih plasteh dreves iz različnih podnebnih pasov. Pri bukvi (*Fagus sylvatica*), kjer je na splošno mogoče prepoznati branike, CLSM omogoča študij anatomskih posebnosti zaradi škodljivih učinkov (npr. napadov žuželk). Prirastne plasti sredozemskega alepskega bora (*Pinus halepensis*) v jugovzhodni Španiji ne nastajajo vedno v skladu s koledarskim letom, zaznamujejo jih namreč tudi številna nihanja gostote (IADFs) znotraj posameznih plasti. Bor *Pinus oocarpa*, ki raste na visoki nadmorski višini v Hondurasu, izkazuje jasno razmejene prirastne plasti in pojav IADFs. V obeh borih smo s pomočjo CLSM prepoznali in izmerili dimenzije traheid za boljše določanje IADF in za boljše razmejitev prirastnih plasti. V lesu srednjeameriškega mahagonija (*Swietenia macrophylla*) iz Venezuele in cedrele (*Cedrela odorata*) iz Kostarike smo analizirali prirastne plasti, ki imajo spremenljive dimenzije trahej in so razmejene z marginalnim aksialnim parenhimom.

Ključne besede: konfokalna laserska vrstična mikroskopija, anatomija lesa, identifikacija lesa, analiza slike, dendrochronologija, branike, prirastne plasti, meje med prirastnimi plastmi

1 INTRODUCTION

1 UVOD

Comparative and quantitative wood anatomy combined with dendrochronology may provide information regarding wood anatomy related to species, provenance, as well as the time and conditions in which the wood was formed.

Research into wood anatomy allows the analysis of anatomical traits, which can reflect import-

ant environmental signals (Verheyden et al., 2004; García-González & Fonti, 2006; Campelo et al., 2010). Wood quality also depends on wood anatomy, which varies between and within species, individual trees and even growth layers.

Dendrochronology, as the study of tree rings (growth layers), is based on cross-dating, which helps to assign every tree ring to the calendar year when it was formed. This principle can be applied in trees from temperate environments, where the tree rings are generally annual. They usually contain early- and late-wood, and are demarcated by tree-ring boundaries.

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology, Ljubljana, Slovenia

* e-mail: angela.balzano@bf.uni-lj.si

However, in Mediterranean and tropical environments it is often challenging to define tree rings and the boundaries between them, as their formation is not necessarily synchronised with calendar years (Cherubini et al., 2003; De Luis et al., 2011; Balzano et al., 2018, 2019a, b). Such growth layers typically contain numerous anomalies associated with intra-annual density fluctuations (IADFs) (Campelo et al., 2007; De Micco et al., 2016a) sometimes called false rings (e.g. Kaennel & Schweingruber, 1995).

To help with the identification of tree rings we often apply quantitative wood anatomy (QWA), which is based on the measurement of anatomical traits (for instance shape, dimensions and frequency of xylem elements, thickness of cell walls etc.) in relation to time (position in the growth layer). This is used to characterise the relationships between plant growth and various environmental factors.

Studying anatomical features requires time-consuming sample preparation for microscopy, i.e. the cutting of thin microscopic slides. Therefore, there is a search for methodologies which enable observation and analyses of microscopic structures without special specimen preparation (e.g., Fioravanti et al., 2016, 2017). One such method could be confocal microscopy, which has already been successfully applied in material and surface science, although to date there are few studies in the field of life sciences and wood anatomy or dendrochronology (e.g., Haag et al., 2018).

The objective of the present study is thus to evaluate the possibilities of applying a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus LEXT OLS5000 for different case studies in dendrochronology and quantitative wood anatomy, and to evaluate its suitability in replacing classical methods based on the time-consuming preparation of thin sections and light microscopy.

2 MATERIALS AND METHODS

2 MATERIAL IN METODE

2.1 MATERIAL

2.1 MATERIAL

We studied wood structure on cores (5 mm in diameter) collected from trees with an increment borer. The cores were smoothed by sanding (with sandpaper grits from 80 to 280) to observe

the cross-sections of the wood to identify the growth layers and observe their wood-anatomical characteristics.

The investigated species were:

- 1) temperate European beech (*Fagus sylvatica* L.) from a site in Croatia ca. 45.42°, Longitude: 16.28°, Altitude: ca. 100 m) (Lukić, 2018),
- 2) Mediterranean Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) from Alicante in southern Spain (Latitude: 38.40°, Longitude: -0.44°, Altitude: ca. 70 m),
- 3) ocote pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl.) from Siguatepeque in Honduras (Latitude: 14.60°, Longitude: -87.83°, Altitude: ca. 1100 m), from high elevation in the tropical zone, collected by Jean Pierre Veillon in 1970 (Luna-Lugo, & Marcano-Berti, 2011),
- 4) Tropical true mahogany (*Swietenia macrophylla* King) from Ticoporo in Venezuela (Latitude 8.15°, Longitude -70.84°, Altitude: ca. 200 m) collected by Jean Pierre Veillon in 1969 and
- 5) cedrela (*Cedrela odorata* L.) from Turrialba in Costa Rica (Latitude 9.90°, Longitude -83.69°, Altitude ca. 700 m) collected by Jean Pierre Veillon in 1966.

2.3 CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

2.3 KONFOKALNA LASERSKA VRSTIČNA MIKROSKOPIJA

The objects were observed with a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus LEXT OLS5000 (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japan) (Figure 1) with the following objectives: MPLFLN5x (numerical aperture 0.15, working distance 20 mm), MPLFLN10xLEXT (numerical aperture 0.3, working distance 10.4 mm), and LM-PLFLN20xLEXT (numerical aperture 0.45, working distance 6.5mm). The microscope is equipped with a 405 nm violet laser, which enables the best lateral resolution in range (0.12 µm), and allows the microscope to capture fine patterns and defects that conventional optical microscopes, white-light interferometers, or red laser-based microscopes are unable to detect.

First, we used optical systems for colour observation. The system acquired microscope colour images by illuminating the sample with the white light-emitting diode (LED) light source and imaging the reflected light with the complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) image sensor.

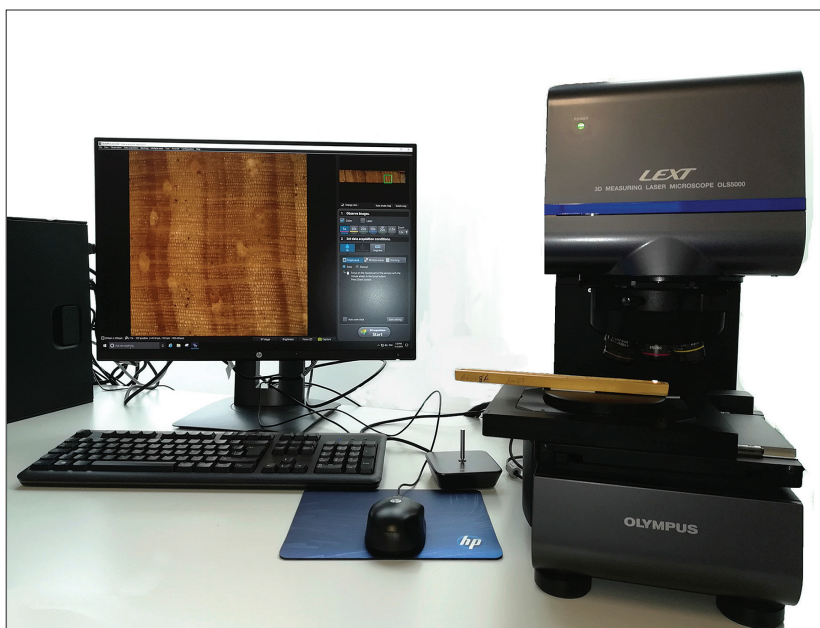


Figure 1. Workstation with a confocal laser scanning microscope LEXT OLS5000 3D (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japan) equipped with an optical system for colour observation, image stitching, and image analysis software OLS5000.

Slika 1. Delo s konfokalnim laserskim vrstičnim mikroskopom LEXT OLS5000 3D (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japonska), ki je opremljen z optičnim sistemom za opazovanje barvne slike, spajanje zajetih slik in programsko opremo za analizo slike OLS5000.

The objects were placed on the stage. By moving the stage, we used the system to create a panoramic macro map based on stitching images on the moving trace in real-time for an overview of the sample. Colour digital images obtained using the stitching function covered the entire length of the cores in order to identify the growth layers and perform tree-ring width measurements for dendrochronology. As the focal depth was relatively deep, we could use the colour images to observe some details or define the positions for detailed observations using the confocal laser scan.

High resolution laser confocal images were acquired at different focus positions to identify the minute structures and measure anatomical parameters. All the measurements were performed with the OLS5000 image analysis software.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 DENDROCHRONOLOGY – GROWTH LAYERS AND ANOMALIES IN WOOD

3.1 DENDROKRONOLOGIJA – PRIRASTNE PLASTI IN ANOMALIJE V LESU

The presented examples show the potential of use of LEXT OLS5000 3D in different wood species, *Fagus sylvatica*, *Pinus halepensis*, *Pinus oocarpa*, *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*, with different wood anatomies and structures of the growth layers addressed for different research purposes.

The stitched images of polished increment cores based on combining the live observations (Figure 2) with the analysis of an acquired image enabled us to study the growth layers and growth ring boundaries at different magnifications.



Figure 2. Stitched images of increment cores acquired with a 5x objective at the resolution of 96 dpi. From top to bottom: *Fagus sylvatica*, *Pinus halepensis*, *Pinus oocarpa*, *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*.
Slika 2. Spojene slike izvrтков lesa, pridobljene z objektivom 5x povečave pri ločljivosti 96 dpi. Od zgoraj navzdol: *Fagus sylvatica*, *Pinus halepensis*, *Pinus oocarpa*, *Swietenia macrophylla* in *Cedrela odorata*.

At higher magnifications and resolutions, we could observe structural variations in the wood and apply image analysis. The detailed results for different wood species are shown in the next chapters.

3.2 TREE-RING ANOMALIES IN EUROPEAN BEECH

3.2 ANOMALIJE BRANIK V LESU BUKVE

European beech (*Fagus sylvatica*), as a typical temperate species, normally contains clear growth rings formed due to interruption of cambium activity during the cold period of the year (e.g., Prislan et al., 2013a, b). The investigated cores of *Fagus sylvatica* from a site near Petrinja in Croatia contained tree rings with numerous anomalies. This caused difficulties to correctly perform tree-ring width measurement and cross-dating (Lukić, personal communication). In 2013 numerous beech trees suffered an attack of gipsy moth (*Lymantria dispar*), which typically attacks oaks. In 2013 it caused also defoliation of beech (Lukić, 2018), and consequently an extremely narrow tree ring was formed (Figure 3). On the pictures observed under the stereomi-

croscope and on those obtained by flat-bed scanner, the tools usually applied in dendrochronology, the 2013 ring appeared pale and sometimes could not be recognised (Figure 3a). At higher magnification and resolution of CLSM, the tree ring and its structure could be identified. The 2013 ring showed early- and latewood and clear growth ring boundary (Figure 3d). Another extremely narrow tree ring was formed in 1966 (Figure 3c). It contains earlywood and narrow latewood and a clear growth ring boundary, which could indicate that cambial production was possibly interrupted at the end of June (Prislan et al., 2013a). The same species also had some very wide tree rings with intra-annual density fluctuations, like the 1984 tree ring, which at lower magnifications were erroneously interpreted as tree rings (Figure 3a, b), whereas higher magnification showed no growth ring boundary (Figure 3e).

The questions raised can as a rule be solved by dendrochronological cross-dating, while the application of CLSM enables better interpretation of the anomaly.

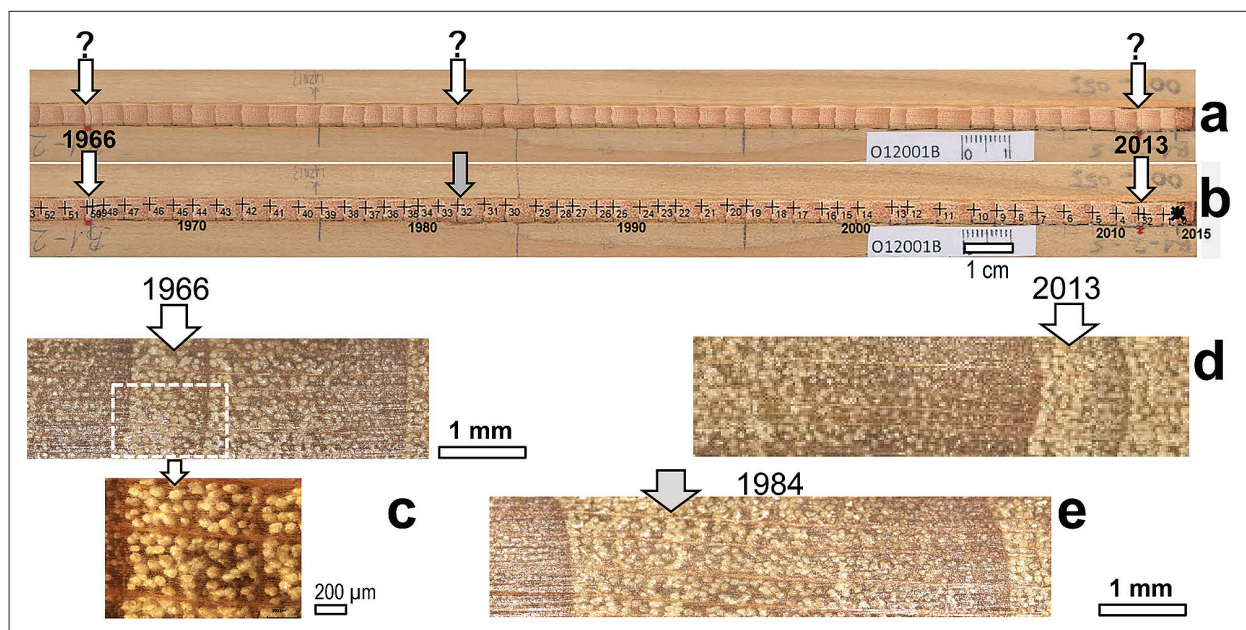


Figure 3. European beech (*Fagus sylvatica*): (a) a core scanned with a flat-bed scanner at 1200 dpi resolution with potentially very narrow rings (arrows), and (b) the same core after tree-ring width measurement in CooRecorder and with cross-dating; (c, d, e) detailed views of individual rings captured by CLSM with tree ring 1966 at two magnifications (c), tree ring 2013 (d) and intra-annual density fluctuation in the 1984 ring (e).

Slika 3. Bukev (*Fagus sylvatica*): (a) izvrtek posnet s skenerjem z ločljivostjo 1200 dpi, z označenimi potencialno zelo ozkimi branikami (puščice) in (b) isti izvrtek po merjenju širin branik s pomočjo programa CooRecorder in datiranju, (c, d, e) podrobna zgradba posameznih branik, posnetih s CLSM: branika 1966 pri dveh povečavah (c), branika 2013 (d) in gostotna variacija v braniki 1984 (e).

3.3 GROWTH RING ANOMALIES IN ALEPPO PINE 3.3 ANOMALIJE V PRIRASTNIH PLASTEH ALEPSKEGA BORA

Growth layers of Aleppo pine (*Pinus halepensis*) from Alicante in south-eastern Spain are often not annual and often contain numerous anomalies with intra-annual density fluctuations (IADFs) (Figure 4). They are characterised by latewood-like cells in earlywood (E-IADF), and earlywood like cells in different portions of latewood (L-IADF) (Figure 4). The species often have unclear growth ring bound-

aries (Figure 4b) which are a consequence of uninterrupted cambial production in winter (De Luis et al., 2007, 2011; De Micco et al., 2016a; Novak et al., 2016a; Balzano et al., 2018, 2019a, b), and lack of cambial dormancy in winter (Prislan et al., 2016). The species can also contain dark rings (Figure 4b), i.e. rings which contain only latewood (Novak et al., 2016a). Furthermore, the species contains numerous missing rings (Novak et al., 2011, 2016b). All these anomalies can only be detected with dendrochronological cross-dating.

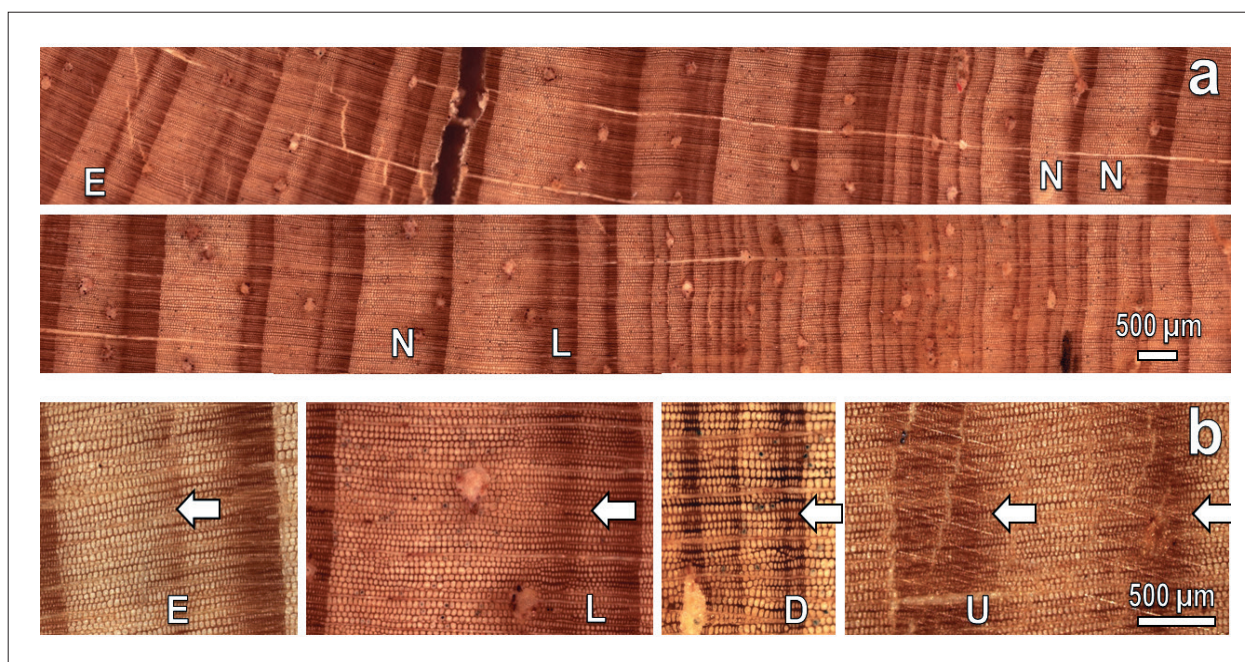


Figure 4. Mediterranean Aleppo pine (*Pinus halepensis*): (a) a core with “normal” rings (N) and a great variety of growth ring types and irregularities, and (b) a detailed view of growth rings containing E-IADF (latewood-like cells in earlywood) (E) and L-IADF (earlywood-like cells in latewood) (L); dark ring, composed of cells with latewood characteristics (D), and growth ring with unclear boundaries (U). Scale bars 500 μm.

Slika 4. Sredozemski alepski bor (*Pinus halepensis*): (a) pregled izvrtka, ki vsebuje »normalne« branike (N) in različne tipe anomalij v prirastnih plasteh ter (b) podrobni posnetki prirastnih plasti z gostotno variacijo tipa E-IADF (celice kasnega lesa v ranem lesu) (E) in L-IADF (celice ranega lesa v kasnem lesu) (L), temno braniko (D) in prirastno plastjo z nerazločnimi mejami (U). Merilne daljice 500 μm.

IADFs are usually first defined visually; however, their characteristics can be more precisely defined only by measuring the dimensions of tracheids or tracheid lumina, and the cell walls along the same radial in terms of tracheidogram (Vaganov, 1990). Such measurements are usually performed on thin cross-sections observed under a light microscope, after a time-consuming sample

preparation. The presented case study shows that it is possible to use CLSM and the associated image analysis system to obtain sufficient magnifications and resolutions, and thus to measure the tracheid parameters (Figure 5).

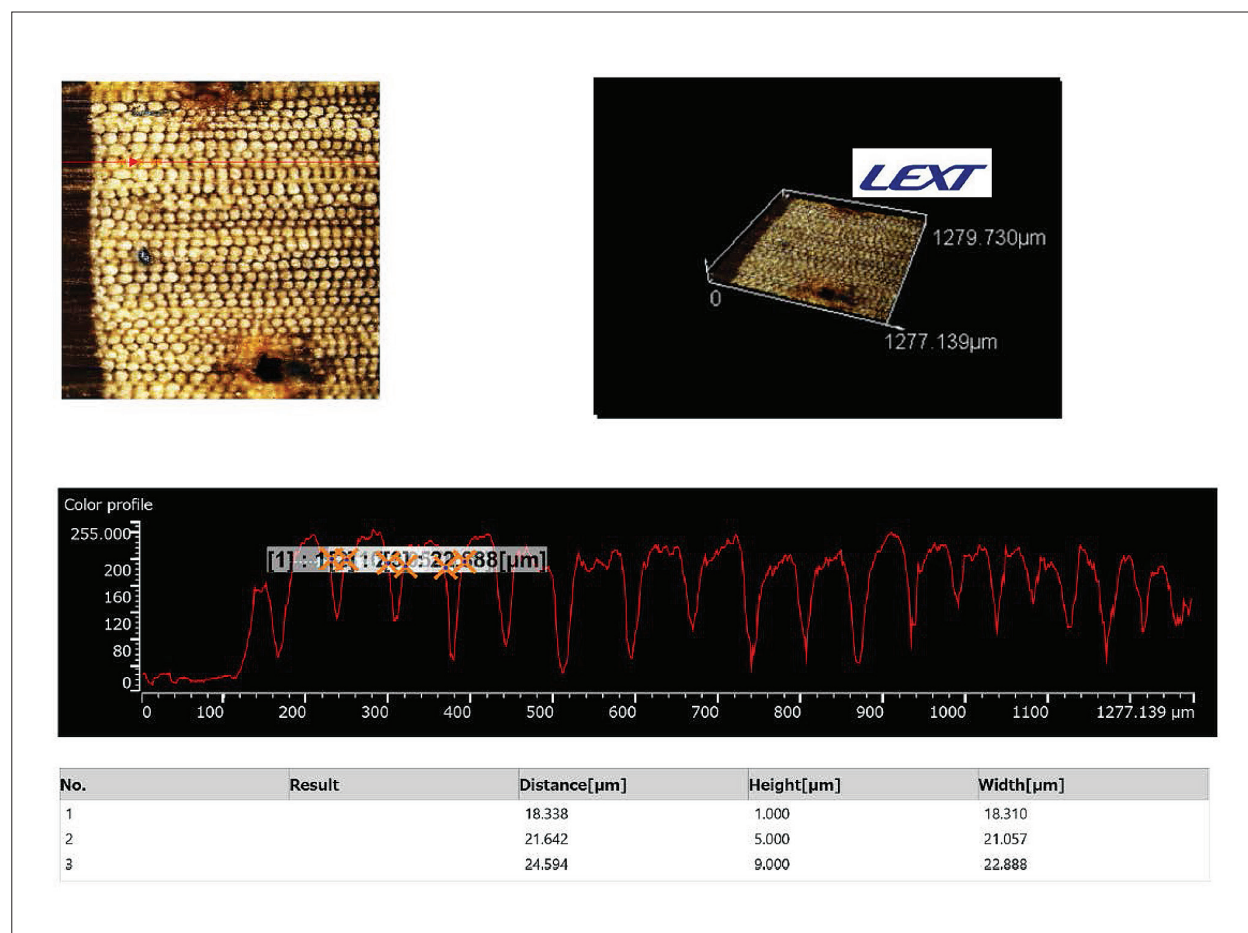


Figure 5. Wood of *Pinus halepensis* and measurement of cell wall thickness and dimensions of lumina (tracheids) of a radial row using Lext CLSM and image analysis software OLS5000. The laser system provides the intensity, colour and height of the image of the same object. Using the measurement option "profile" we can get the intensity, colour and height profiles in a chosen linear row and measure on it different parameters (here the diameter measurement of tracheids). The colour profile is also shown.

Slika 5. Les alepskega bora (*Pinus halepensis*): merjenje debelin celičnih sten in dimenzij lumnov (traheid) vzdolž radialnega niza traheid z uporabo CLSM Lext in programske opreme za analizo slike OLS5000. Laserski sistem zagotavlja intenzivnost, barvo in sliko po višini istega predmeta. Z možnostjo merjenja „profila“ lahko dobimo profile intenzitete, barve in višine v izbrani linearni vrstici in na njej izmerimo različne parametre (tukaj je prikazano merjenje premerov traheid). Prikazan je tudi barvni profil.

3.4 GROWTH LAYERS IN (*Pinus oocarpa*) FROM HONDURAS

3.4 PRIRASTNE PLASTI V BORU (*Pinus oocarpa*) IZ HONDURASA

Ocote pine (*Pinus oocarpa*), native to Central America, is poorly known in Europe. We inspected the wood structure of this species on cross-sections of the cores to evaluate the suitability for tree-ring analysis. Images at larger magnifications

showed that the species has tree rings with typical early- and latewood and clear tree-ring boundaries. Many rings contain E- or L- types of IADFs (Figure 6).

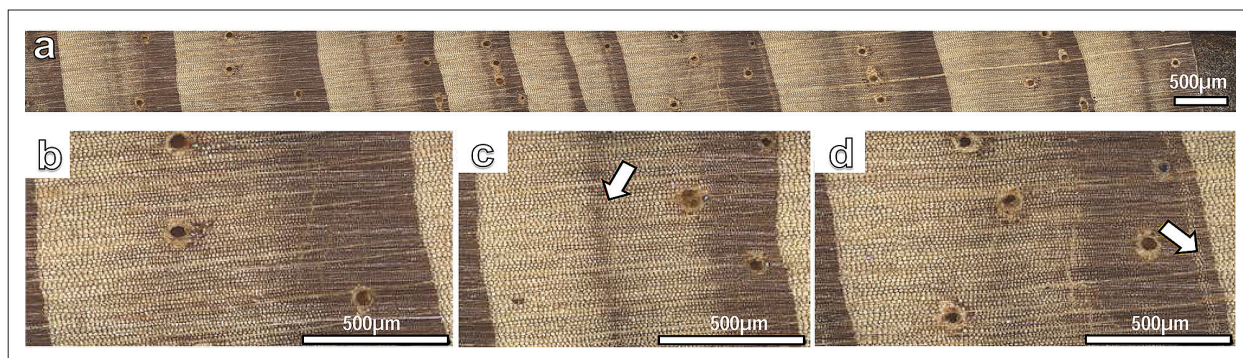


Figure 6. *Ocote pine* (*Pinus oocarpa*) from a high elevation site in Honduras: (a) overview of tree rings, (b) typical ring, (c) tree ring containing E-IADF (arrow), and (d) tree ring with L-IADF (arrow). Scale bars 500 μm .

Slika 6. Bor (*Pinus oocarpa*) z visokogorskega rastišča v Hondurasu: (a) pregled branik, (b) normalna branika, (c) branika, ki vsebuje gostotno variacijo tipa E-IADF (puščica) in (d) branika, ki vsebuje L-IADF (puščica). Merilne daljice 500 μm .

The first impression is that the structure of ocote pine tree rings is similar to that of tree rings of conifers (pines) growing in temperate environments. The investigated samples originated from the trees growing in Honduras, near Siguatepeque, ca. 1100 m above sea level, where the climate is characterised by three seasons: a wet and relatively cool season (between May and November) with sufficient rain to ensure vegetation, a colder interlude (November to February) with temperatures occasionally down to 8 °C, and a dry season (February to May), with temperatures of up to 32 °C (Wikipedia, 2019, El clima promedio en Siguatepeque, Honduras, 2019).

Although November to February temperatures are not very low, the clear growth ring boundaries could be a consequence of the interruption of cambial activity in winter. The change of seasons could explain the IADFs in the rings. Dendrochronological cross-dating supported by detailed anatomy studied with CLSM could help to explain the processes affecting IADF formation and interruption of cambial activity resulting in clear tree-ring boundaries.

3.5 GROWTH LAYERS IN TROPICAL TRUE MAHOGANY

3.5 PRIRASTNE PLASTI V TROPSKEM SREDNJEAMERIŠKEM MAHAGONIJU

True mahogany (*Swietenia macrophylla*) is a tropical hardwood species of the family Meliaceae that grows in Mexico, Central America, and tropical South America (except the Amazon basin). The species is also planted outside its natural range. It is listed in CITES, Annex II (Richter et al., 2017).

The wood of *Swietenia* contains heartwood which is brown to red-brown and can be differentiated from the sapwood. The air-dry density is 400–500–650 kg/m^3 (Richter & Dallwitz, 2000). The species is characterised by interlocked grain and ribbon figures. The wood is diffuse-porous, vessels are of medium size with a tangential diameter in the range of 90–160–255 μm . The vessels regularly contain dark reddish-brown deposits. The fibres are as a rule septate and have medium-thick cell walls. The rays are multiseriate, mainly 1–2–4(–5) cells wide. Rays, axial parenchyma and vessel elements are storied, although storied rays cannot be observed in all specimens. Axial parenchyma is mainly banded. The bands are marginal (or seemingly marginal), mainly 4–8 cells wide and present growth ring boundaries. The wood also contains paratracheal axial parenchyma which is scanty to vasicentric.

The material presented in this study originates from Ticoporo near Barinas in Venezuela, which is characterised by a tropical climate with dry seasons (average annual temperature 27.6 °C, average temperature variation between the hottest and the coldest month less than 3 °C, average annual rainfall ca. 2500 mm) (Pereyra et al., 2005). The wood contains marginal parenchyma demarcating growth layers. It was found that the optimal technique and magnification should be used to recognise the growth layers (Figure 7). The dimensions of the vessels varied in the radial direction, as shown by image analysis of the CLSM system. This could be of help with defining the growth layers.

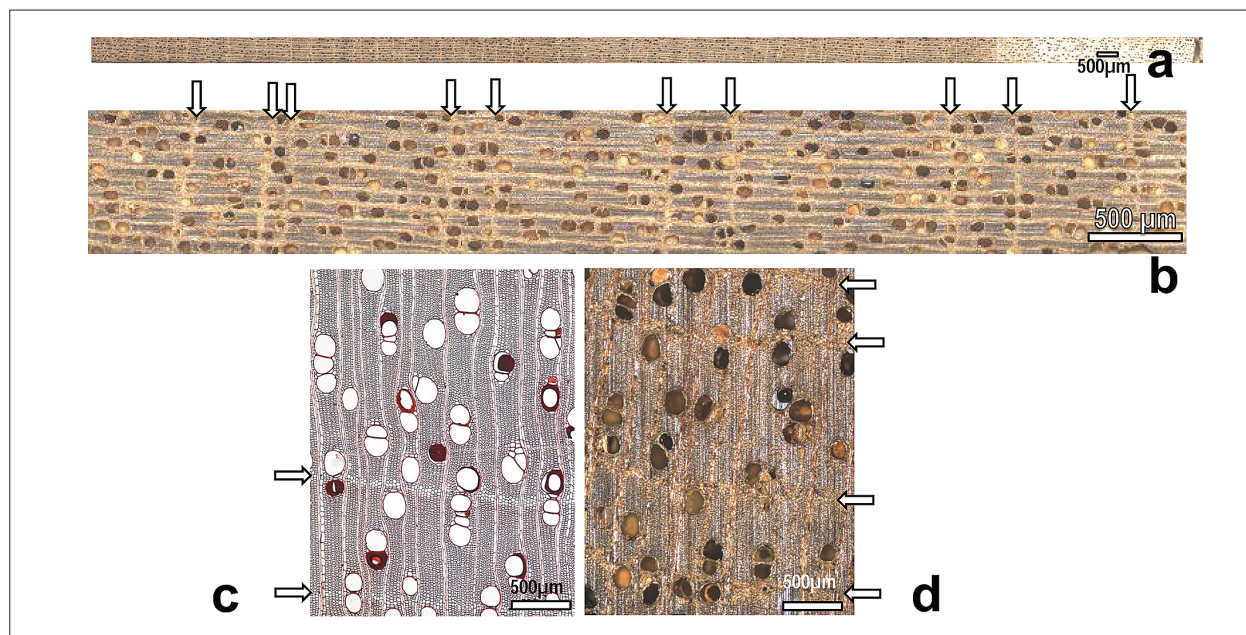


Figure 7. True mahogany *Swietenia macrophylla*: (a) stitched image of increment core acquired with CLSM with 5x objective at the resolution of 96 dpi, and (b) detail of the same image; (c) thin cross-section under the light microscope, and (d) wood at the same magnification observed with CLSM. Arrows show bands of marginal axial parenchyma. Scale bars 500 µm.

Slika 7. Pravi mahagoni *Swietenia macrophylla*: (a) spojena slika posnetkov prečnega prereza lesa iz izvrtka, pridobljena s CLSM, objektiv 5x povečave pri ločljivosti 96 dpi, in (b) podrobnosti iste slike; (c) prečni prerez tanke rezine pod svetlobnim mikroskopom in (d) les pri isti povečavi, posnet s CLSM. Puščice kažejo pasove marginalnega aksialnega parenhima. Merilne daljice 500 µm.

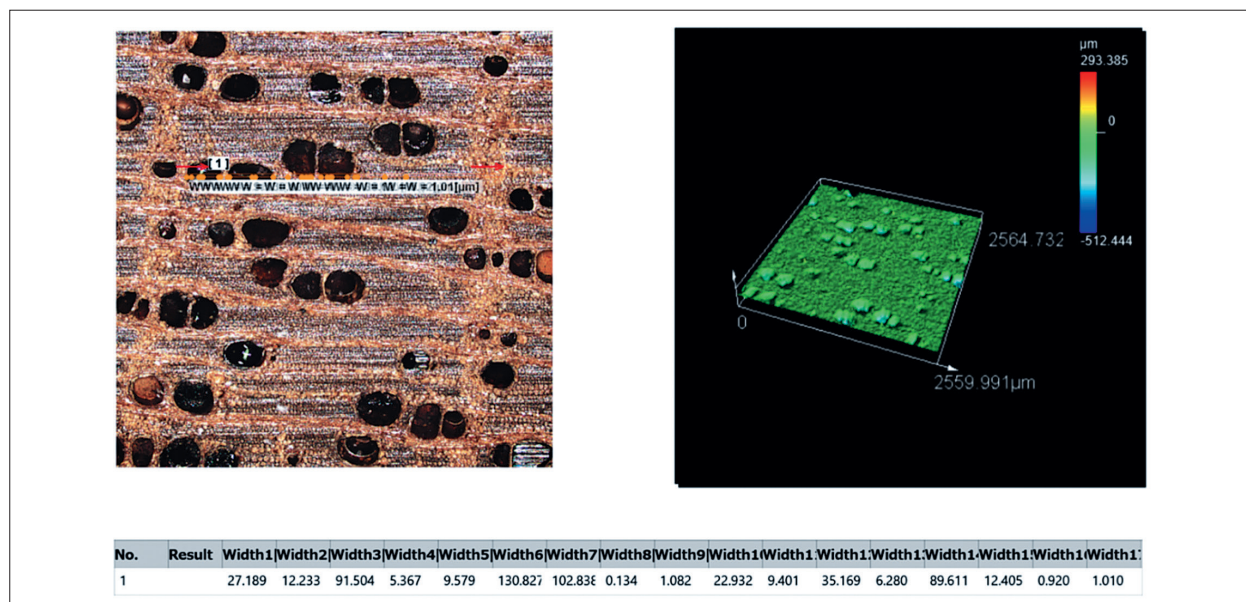


Figure 8. Measurement of vessel lumen diameter and area in *Swietenia macrophylla* in a linear row. Here are shown the colour profile and height profile obtained with a confocal laser scan.

Slika 8. Merjenje premerov in površine lumnov trahej v lesu mahagonija *Swietenia macrophylla*. Tu sta prikazana barvni profil in profil po višini objekta, pridobljena s konfokalnim laserskim skeniranjem.

Several studies have shown that dendrochronological methods might be possible for *Swietenia macrophylla* as the growth increments in the adult xylem are marked by terminal parenchyma bands and are annual (Dünisch et al., 2002, 2003). The same studies in *Swietenia macrophylla* in Brazil also showed that besides annual rings there are also non-annual increment zones, and false rings may occur. Furthermore, cambium showed dormant phases during the dry period in Brazil. Studies also indicated that the seasonal pattern of cambial growth of *Swietenia* and tropical tree species in general has to be analysed separately on each site before tree-ring chronologies can be established (Dünisch et al., 2002, 2003).

3.6 GROWTH LAYERS IN TROPICAL CEDRELA

3.6 PRIRASTNE PLASTI V TROPSKI CEDRELI

Cedrela, or Central American cedar (*Cedrela odorata*), is a hardwood from the Meliaceae family. The wood of *Cedrela* resembles that of *Swi-*

etenia (from the same family) and is of similar colour and density. The identification keys list only a few wood anatomical differences between the two taxa. *Cedrela* is generally semi-ring porous, has larger vessels, does not have storied structures and has a pleasant aromatic odour, whereas *Swietenia* is diffuse-porous, has medium-sized pores, storied structures and is odourless (Richter & Dallwitz, 2000).

The geographic distribution of *Cedrela* is Mexico and Central America, the Caribbean, and tropical South America. *Cedrela odorata* is on the CITES list of protected species, Appendix III (Richter et al., 2017).

Cedrela generally has distinct growth rings demarcated by marginal (or seemingly marginal) axial parenchyma bands, which are usually more than three cells wide (Richter & Dallwitz, 2000).

Detailed studies proved that also *cedrela* has growth layers which can be studied by dendrochronological methods (Dünisch et al., 2002, 2003). It was shown that the formation of increment zones

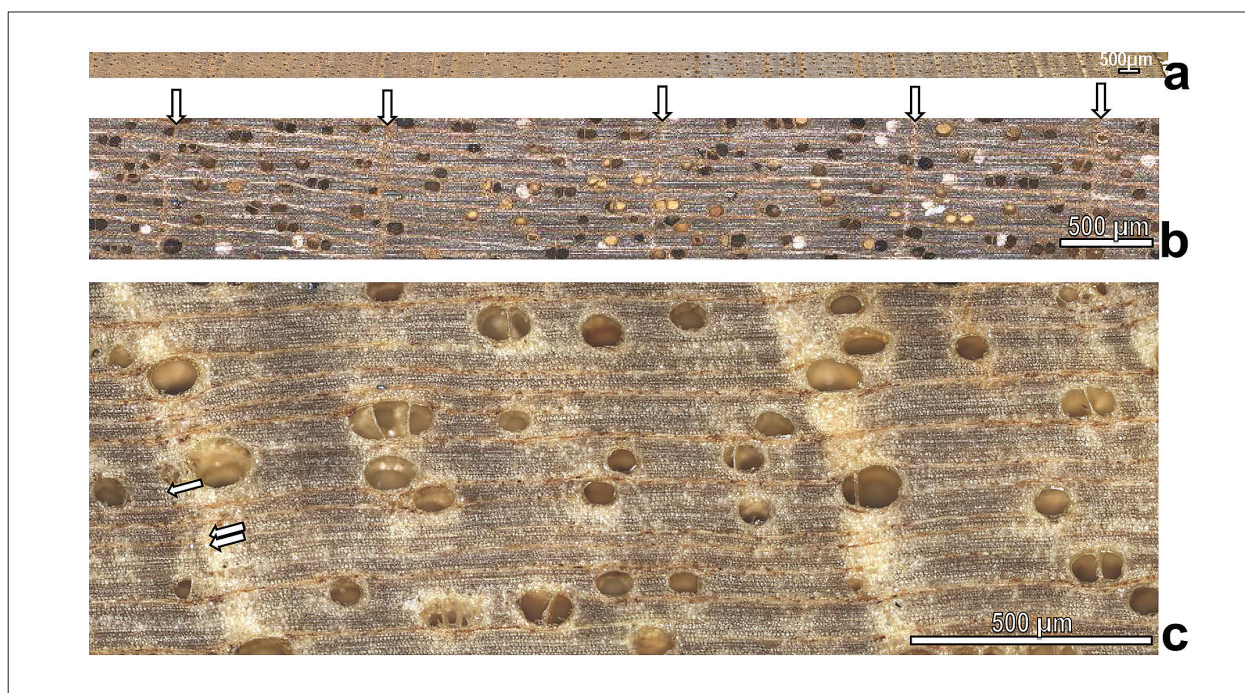


Figure 9. *Cedrela* (*Cedrela odorata*): (a) stitched image of increment core acquired with CLSM with 5x objective at the resolution of 96 dpi, and (b) details of the same image, arrows show growth ring boundaries; (c) detailed view of wood structure with bands of marginal axial parenchyma (double arrow) and fibres (arrow). Scale bars 500 µm. Slika 9. *Cedrela* (*Cedrela odorata*): (a) spojena slika posnetkov prečnega prereza lesa izvrtka, pridobljenih s CLSM, objektiv 5x povečave pri ločljivosti 96 dpi, in (b) podrobnosti iste slike, kjer puščice kažejo meje med prirastnimi plastmi; (c) prečni prerez lesa pri večji povečavi, kjer dvojna puščica kaže pas marginalnega aksialnega parenhima, enojna puščica pa vlakna. Merilne daljice 500 µm.

in cedrela was annual, and that annual growth increments are indicated by alternating fibre and vessel bands embedded in paratracheal parenchyma (Dünisch et al., 2002). Like in *Swietenia*, the cambium showed dormant phases during the dry period in Brazil (Dünisch et al., 2002, 2003).

The material presented in this study are the cores from trees from Turrialba in Costa Rica, at an altitude of ca. 700 m. We had an impression that the growth layers are less distinct than in *Swietenia* (Figure 9). Surface preparation of the cores was a possible reason that we could not find the alternating fibre and vessel bands embedded in paratracheal parenchyma reported by Dünisch and co-workers (2002).

In addition, less clear growth layers could be a consequence of climatic conditions in the area around Turrialba, which is characterised by significant rainfall, abundant even in the driest period. In Turrialba, the average annual temperature is 22.9 °C, and the average total annual rainfall is 2854 mm (Climate Turrialba, 2019).

4 CONCLUSIONS

4 ZAKLJUČKI

The case studies on cross-sections on wood of temperate European beech (*Fagus sylvatica*) from Croatia, Mediterranean Aleppo pine (*Pinus halepensis*) from Spain, ocote pine (*Pinus oocarpa*) from Honduras, as well as tropical true mahogany (*Swietenia macrophylla*) from Venezuela and cedrela (*Cedrela odorata*) from Costa Rica showed the potential of using a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus LEXT OLS5000.

The optical system makes it possible to obtain colour images, while the option to create panoramic macro maps enables stitching of images, and therefore we can observe large portions of wood (i.e. the entire core). As the focal depth is relatively deep, it is possible to enlarge the colour images and observe small details as well as to define the positions for detailed observations using the confocal laser scanning mode. This all builds a system which enables non-destructive observation of detailed wood anatomy. Furthermore, the image analysis software OLS5000 enables the measurement of cell parameters.

Other advantages of CLSM are the possibility to work at ambient conditions on polished cross-sections under different magnifications, the ability to control the depth of field and collect serial optical sections from thick specimens.

The observation of the such details can significantly improve the recognition of growth layers and the boundaries between them, as well as help to study growth anomalies. This can vastly enhance the quality of dendrochronological studies.

The study presented here, which to the best of our knowledge is one of the first to apply this technique in the field of wood science comprehensively, helped us to evaluate the potential and the advantages of CLSM in comparison with classical wood anatomy and dendrochronology techniques.

5 SUMMARY

5 POVZETEK

Primerjalna in kvantitativna anatomija lesa v kombinaciji z dendrokronologijo lahko poda informacije o zgradbi lesa, ki so povezane z genetiko, zemljepisnim območjem, pa tudi s časom in razmerami, v katerih je les nastal. Raziskave anatomije lesa omogočajo analizo anatomskih znakov, ki lahko odražajo pomembne okoljske signale (Verheyden et al., 2004; García-González & Fonti, 2006; Campelo et al., 2010). Za proučevanje anatomskih znakov je običajno potrebna priprava in uporaba tankih mikroskopskih rezin za svetlobno mikroskopijo, kar pa je zelo zamudno. Zaradi tega iščemo metodologije, ki omogočajo opazovanje in analize mikroskopskih struktur brez posebne priprave vzorcev.

Cilj te študije je oceniti možnosti uporabe konfokalne laserske vrstične mikroskopije (CLSM) za različne študije v dendrokronologiji in oceniti primernost CLSM za nadomeščanje klasičnih metod, ki temeljijo na zamudni pripravi mikroskopskih rezin in svetlobni mikroskopiji.

Zgradbo lesa smo proučevali na izvrtkih premera 5 mm, odvzetih iz dreves s prirastoslovnim svedrom. Prečne površine na izvrtkih smo gladko zbrusili. V lesu različnih vrst iz različnih okolij smo proučevali prirastne plasti (branike), meje med njimi (letnice) (Torelli, 1990) in druge lesno-anatomske posebnosti.

Raziskali smo les naslednjih vrst: 1) navadna bukev (*Fagus sylvatica* L.) z rastišča na Hrvaškem

z zmerno klimo (Lukić, 2018); 2) sredozemski alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.) z rastišča v Alicanteju na jugovzhodu Španije; 3) bor (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl) z rastišča z visoko nadmorsko višino v tropskem pasu v bližini kraja Siguatepeque v Hondurasu (Luna-Lugo, Marcano-Berti, 2011); 4) pravi mahagoni (*Swietenia macrophylla* King.) z območja Ticoporo v Venezueli s tropskim podnebjem in 5) cedrela (*Cedrela odorata* L.) iz kraja Turrialba v Kostariki s tropskim podnebjem.

Vse vzorce lesa smo opazovali s konfokalnim laserskim vrstičnim mikroskopom Olympus LEXT OLS5000 (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japonska) (slika 1) z objektivni MPLFLN5x (numerična apertura 0,15, delovna razdalja 20 mm), MPLFLN10xLEXT (numerična apertura 0,3, delovna razdalja 10,4 mm) in MPLAPON20xLEXT (numerična apertura 0,6, delovna razdalja 1 mm).

Na osnovi posameznih slik, ki smo jih opazovali v živo, smo pripravili sestavljene slike celotnih izvirkov (slika 2), na katerih smo s programom za analizo slike lahko proučevali prirastne plasti in meje med njimi ter druge anatomske posebnosti pri različnih povečavah.

Raziskani izvrtki bukve (*Fagus sylvatica*) so vsebovali branike s številnimi anomalijami, ki so povzročile težave pri pravilnem merjenju širin branik in sinhroniziranju zaporedij širin branik. Leta 2013 so na proučenih drevesih zabeležili škode zaradi metulja gobarja (*Lymantria dispar*), ki sicer obžira hrastove liste (Lukić, 2018). Poškodbe listov bukve so imele za posledico nastanek izredno ozke branike v letu 2013 (slika 3). Branika 2013 je bila svetla (zaradi odsotnosti ali zelo ozkega pasu kasnega lesa) in je na mnogih vzorcih ni bilo mogoče prepoznati s pomočjo tehnik, ki jih običajno uporabljamo v dendrokronologiji (slika 3a). Pri večjih povečavah in ločljivosti je CLSM omogočil opazovanje anatomske zgradbe branike (slika 3d). Leta 1966 je tudi nastala zelo ozka branika (slika 3c), ki je vsebovala rani les in nekoliko kasnega lesa z jasno letnico, kar bi glede na dosedanje raziskave delovanja kambija pri bukvi (Prislan et al., 2013a) lahko pomenilo, da se je nastajanje lesa končalo že konec junija. Bukev je imela tudi nekaj zelo širokih branik z medletnimi nihanji gostote (IADF), kot na primer branika iz leta 1984. Te variacije smo pri manjših povečavah s stereo lupo pogosto napačno interpretirali kot branike (slika 3a, b), medtem ko so večje povečave s CLSM pokazale, da gre samo za gosto-

tne variacije (slika 3e). Prirastne plasti alepskega bora (*Pinus halepensis*) vsebujejo številne gostotne variacije (IADF), ki jih je starejša literatura poimenovala lažne branike (slika 4a, b), zato je na splošno težko ugotoviti, kaj je branika in ali je nastala znotraj istega koledarskega leta (De Luis et al., 2011; Novak et al., 2016a; Balzano et al., 2018, 2019). Vrsta ima pogosto nejasne meje med prirastnimi plastmi (slika 4b), ki so posledica neprekinjenega delovanja kambija tudi pozimi (Prislan et al., 2016). Pojavljajo se tudi »temne branike«, ki predstavljajo prirastne plasti, ki v osnovi vsebujejo le kasni les (Novak et al., 2016a) (slika 4c). Predstavljena študija kaže, da je mogoče uporabiti CLMS in pripadajoči sistem za analizo slike, za opazovanje lesa pri veliki povečavi in ločljivosti ter za merjenje dimenzij celic in celičnih sten (slika 5). Slednje omogoča izdelavo traheidograma (Vaganov, 1990), kar pripomore k prepoznavanju gostotnih variacij in rastnih anomalij.

Na posnetkih prečnih prereзов lesa bora (*Pinus oocarpa*) iz Hondurasa, z rastišča na visoki nadmorski višini 1100 m, ki se sicer nahaja v tropskem pasu, smo ob večjih povečavah lahko videli različne prirastne plasti. Te so imele zgradbo, tipično za branike lesnih vrst iz zmerne podnebja, ki vsebujejo rani in kasni les ter jasne letnice. Številne prirastne plasti vsebujejo tudi tipične gostotne variacije tipa E- in L-IADF (slika 6). Slednje so verjetno posledica menjave treh letnih časov na območju Siguatepeque v Hondurasu, z zelo različnimi temperaturami in padavinami. Dendrokronološko sinhroniziranje, podprto s podrobno analizo anatomske zgradbe s pomočjo CLSM, bi lahko pomagalo razložiti procese, ki vplivajo na nastajanje IADF in na prekinitev aktivnosti kambija, kar ima za posledico jasne meje med prirastnimi plastmi.

Predstavljamo tudi dendrokronološki potencial pravega mahagonija (*Swietenia macrophylla*) (Torelli, 1997, 2006), ki v našem primeru izvira iz tropskega območja v Venezueli. Prirastne plasti pri tem mahagoniju razmejujejo jasni pasovi marginalnega aksialnega parenhima. Posnetki s CLSM kažejo, da je za prepoznavanje prirastnih plasti treba izbrati optimalno (in ne nujno največjo) povečavo (slika 7). Slike kažejo, da premeri trahej od začetka do zaključka plasti upadajo in da jih je mogoče izmeriti s sistemom za analizo slike. Tudi spremljanje dimenzij trahej je v pomoč pri določanju prirastnih plasti.

Les cedrele (*Cedrela odorata*), iz družine Meliaceae, kamor spadajo tudi mahagoniji (Torelli,

1999), ima na splošno razločne prirastne plasti, razmejene s pasovi marginalnega aksialnega parenhima, ki so na splošno široki več kot tri celice (Richter & Dallwitz, 2000). Pri opazovanju lesa cedrele z rastišča v Kostariki smo imeli vtis, da so prirastne plasti manj izrazite kot pri proučevanem mahagoniju (slika 9). Površinska obdelava lesa, ki ima sicer nizko gostoto, je morda razlog, da nismo mogli jasno prepoznati izmenjave pasov vlaken in aksialnega parenhima, o katerih poročajo Dünisch in sodelavci (2002, 2003). Omenjeni raziskovalci so med drugim ugotovili tudi, da so prirastne plasti pri cedreli iz Brazilije bolj pravilne kot pri mahagoniju in da jih bolj upravičeno lahko imenujemo letne prirastne plasti (branike).

Predstavljene študije na primerih različnih lesnih vrst iz različnih okolij kažejo, da ima CLSM velik potencial in da omogoča preučevanje anatomske zgradbe lesa v povezavi s klasičnimi dendrokronološkimi tehnikami. Pri tem se izognemo zamudni pripravi mikroskopskih preparatov za svetlobno mikroskopijo, ki jih potrebujemo za klasičen pristop v anatomiji lesa. Naši rezultati so pokazali, da si od CSML lahko obetamo nadgradnjo dendrokronoloških študij rastnih anomalij v odvisnosti od časa.

Predstavljena študija je po naših podatkih ena prvih, ki predstavlja možnosti uporabe konfokalne laserske vrstične mikroskopije na področju anatomije lesa in dendrokronologije.

ACKNOWLEDGEMENTS

ZAHVALE

The study was supported by the Slovenian Research Agency (ARRS), program P4-0015 and Spanish Ministry of Economy project CGL2015-69985-R (CLIMED). The work of Klemen Novak was supported by contract no. C3330-19-952011 for co-financing the operation of the "Researchers-2.1-UL-BF-952011", by the Ministry of Education, Science and Sport of the Republic of Slovenia and EU European Regional Development Fund. The samples from South America were obtained in collaboration with Dr. Miguel F. Acevedo, and Dr. Giorgio Silvio Tonella Tognola, the samples from Croatia are part of doctoral work of Ivan Lukić. We thank Jože Planinšič and Luka Krže, for their support with the work in the laboratory. We are grateful to Paul Steed for English language editing.

REFERENCES

VIRI

- Balzano, A., De Micco, V., Merela, M., & Čufar, K. (2019a). Tree-rings in Mediterranean pines – can we ascribe them to calendar years? *Les/Wood*, 68 (1), 5-14.
- Balzano, A., Battipaglia, G., & De Micco, V. (2019b). Wood-trait analysis to understand climatic factors triggering intra-annual density-fluctuations in co-occurring Mediterranean trees. *IAWA Journal*, 1, 1-18.
- Balzano, A., Čufar, K., Battipaglia, G., Merela, M., Prislán, P., Aronne, G., & De Micco, V. (2018). Xylogenesis reveals the genesis and ecological signal of IADFs in *Pinus pinea* L. and *Arbutus unedo* L. *Annals of botany*, 121(6), 1231-1242.
- Campelo, F., Nabais, C., Gutiérrez, E., Freitas, H., & García-González, I. (2010). Vessel features of *Quercus ilex* L. growing under Mediterranean climate have a better climatic signal than tree-ring width. *Trees*, 24(3), 463-470. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0414-0>.
- Campelo, F., Nabais, C., Freitas, H., & Gutiérrez, E. (2007). Climatic significance of tree-ring width and intra-annual density fluctuations in *Pinus pinea* from a dry Mediterranean area in Portugal. *Annals of Forest Science*, 64(2), 229-238.
- Cherubini, P., Gartner, B. L., Tognetti, R., Braeker, O. U., Schoch, W., & Innes, J. L. (2003). Identification, measurement and interpretation of tree rings in woody species from Mediterranean climates. *Biological Reviews*, 78(1), 119-148.
- De Luis, M., Gričar, J., Čufar, K., & Raventos, J. (2007). Seasonal dynamics of wood formation in *Pinus halepensis* from dry and semi-arid ecosystems in Spain. *IAWA Journal* 28, 389–404.
- De Luis, M., Novak, K., Raventós, J., Gričar, J., Prislán, P., & Čufar, K. (2011). Climate factors promoting intra-annual density fluctuations in Aleppo pine (*Pinus halepensis*) from semiarid sites. *Dendrochronologia*, 29(3), 163-169.
- De Micco, V., Campelo, F., De Luis, M., Bräuning, A., Grabner, M., Battipaglia, G., & Cherubini, P. (2016a). Intra-annual density fluctuations in tree rings: how, when, where, and why? *IAWA Journal*, 37(2), 232-259.
- De Micco, V., Balzano, A., Čufar, K., Aronne, G., Gričar, J., Merela, M., & Battipaglia, G. (2016b). Timing of false ring formation in *Pinus halepensis* and *Arbutus unedo* in Southern Italy: outlook from an analysis of xylogenesis and tree-ring chronologies. *Frontiers in plant science*, 7, 705.
- De Micco, V., Carrer, M., Rathgeber, C. B. K., Camarero, J. J., Voltas, J., Cherubini, P., & Battipaglia, G. (2019). From xylogenesis to tree rings: wood traits to investigate tree-response to environmental changes. *IAWA Journal* 40(2): in press. DOI: <https://doi.org/10.1163/22941932-40190246>.
- Dünisch, O., Bauch, J., & Gasparotto, L. (2002). Cambial growth dynamics and formation of increment zones in the xylem of *Swietenia macrophylla* King., *Carapa guianensis* Aubl., and *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). *IAWA Journal* 23:101–119.
- Dünisch, O., Montóia, V., & Bauch, J. (2003). Dendroecological investigations on *Swietenia macrophylla* King and *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in the central Amazon. *Trees*, 17, 244-250.

- Fioravanti, M., Giulio, G., & Signorini, G. (2016). A non-invasive approach to identifying wood species in historical musical instruments. *Journal of Cultural Heritage*, 27 (supplement), S70-S77.
- Fioravanti, M., Giulio, G., Signorini, G., Rossi Rognoni, G., Sodini, N., Tromba, G., & Zanini, F. (2017). Non-invasive wood identification of historical musical bows. *IAWA Journal*, 38 (3), 285–296.
- García-González, I., & Fonti, P. (2006). Selecting earlywood vessels to maximize their environmental signal. *Tree physiology*, 26(10), 1289-1296.
- Kaennel, M., & Schweingruber, F. H. (1995). Multilingual glossary of dendrochronology: Terms and definitions in English, German, French, Spanish, Italian, Portuguese and Russian. Paul Haupt.
- Haag, V., Kirsch, S., Koch, G., Zemke, V., & Richter, H. G. (2018). Non-destructive investigation of historical Instruments based on 3D-reflected-light microscopy and high resolution μ -X-ray CT. In: Pérez, M. A., Marconi, E. (eds.). *Wooden musical instruments different forms of knowledge: book of end of Wood Musick COST Action FP1302*. Paris: Cité de la musique - Philharmonie de Paris, 143-151.
- Luna-Lugo, A., & Marcano-Berti, L. (2011). Bosques de Venezuela: un Homenaje a Jean Pierre Veillon, *BIOLLANIA* 10, 1-3.
- Lukić, I. (2018). Redefiniranje značaja gubara (*Lymantria dispar*L.) kao šumskoga štetnika u republici Hrvatskoj. Doctoral dissertation, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 155 p.
- Novak, K., De Luis, M., Čufar, K., & Raventós, J. (2011). Frequency and variability of missing tree rings along the stems of *Pinus halepensis* and *Pinus pinea* from a semiarid site in SE Spain. *Journal of Arid Environments* 75: 494-498.
- Novak, K., De Luis, M., Gričar, J., Prislán, P., Merela, M., Smith, K. T., & Čufar, K. (2016a). Missing and dark rings associated with drought in *Pinus halepensis*, *IAWA Journal*, 37 (2): 260-274.
- Novak, K., De Luis, M., Saz, M. A., Longares, L. A., Serrano-Notivoli, R., Raventós, J., Čufar, K., Gričar, J., Di Filippo, A., Piovesan, G., Rathgeber, C. B. K., Papadopoulos, A., & Smith, K. T. (2016b). Missing rings in *Pinus halepensis* – the missing link to relate the tree-ring record to extreme climatic events. *Frontiers in Plant Science*, Volume 7, Article 727, DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00727>.
- Pereyra, J., Vargas, F., Ochoa, G., Oballos, J., & Alvarado, C. (2005). Caracterización de tierras de la unidad experimental, reserva forestal de Ticoporo, Barinas, Venezuela, con fines de ordenamiento. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30 (4), 221-227.
- Prislán, P., Gričar, J., de Luis, M., Smith, K. T., & Čufar, K. (2013a). Phenological variation in xylem and phloem formation in *Fagus sylvatica* from two contrasting sites. *Agricultural and Forest Meteorology*, 180, 142-151.
- Prislán, P., Čufar, K., Koch, G., Schmitt, U., & Gričar, J. (2013b). Review of cellular and subcellular changes in the cambium. *IAWA Journal*, 34 (4), 391-407.
- Prislán, P., Gričar, J., Novak, K., Martínez Del Castillo, E., de Luis, M., Schmitt, U., Koch, G., Štrus, J., Mrak, P., Tušek Žnidarič, M., & Čufar, K. (2016). Cambial rhythm of *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* from different environments indicate tree adaptation to local conditions. *Frontiers Plant Sciences*, Volume 7, Article 1923, DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01923>.
- Richter, H. G., & Dallwitz, M. J. (2000 onwards). Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, Portuguese and Spanish. Version: May 2000.
- Richter, H. G., Gembruch, K., & Koch, G. (2017). CITES Wood ID –Innovative medium for education, information and identification of CITES protected trade timbers. BN German Federal Agency for Nature Conservation and Thünen Institute, Germany, computer program, version in English 2017.
- Torelli, N. (1990). Les & skorja - wood & bark, slovar strokovnih izrazov. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, 71 p.
- Torelli, N. (1997). Mahagoni (I. del), njegova nomenklatura in zgodovina rabe. *Les*, 49 (11), 345-348.
- Torelli, N. (1999). Cedre (*Cedrus* spp.), cedri (*Cedrela* spp.) in "cedre". *Les* 51 (6), 169-172.
- Torelli, N. (2006). Mahagoni (*Swietenia* spp.) - naravna in kulturna zgodovina. *Gozdarski vestnik*, 64 (5-6), 246-252.
- Vaganov, E. (1990). The tracheidogram method in tree-ring analysis and its application, in *Methods of Dendrochronology: Applications in the Environmental Sciences*, eds E. Cook and L. Kairiukstis (Dordrecht: Kluwer Academic), 63–76.
- Verheyden, A., Kairo, J. G., Beeckman, H., & Koedam, N. (2004). Growth rings, growth ring formation and age determination in the mangrove *Rhizophora mucronata*. *Annals of botany*, 94(1), 59-66.
- Wikipedia, Siguatepeque, URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Siguatepeque> [15. 10. 2019].
- El clima promedio en Siguatepeque Honduras. URL: <https://es.weatherpark.com/y/13702/Clima-promedio-en-Siguatepeque-Honduras-durante-todo-el-a%C3%B1o#Secciones-Sources> [15. 10. 2019].
- Climate Turrialba. URL: <https://en.climate-data.org/north-america/costa-rica/cartago/turrialba-28663/> [15. 10. 2019].

WOOD IDENTIFICATION USING NON-DESTRUCTIVE CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

IDENTIFIKACIJA LESA S POMOČJO NEDESTRUKTIVNE KONFOKALNE LASERSKE MIKROSKOPIJE

Katarina Čufar^{1*}, Angela Balzano¹, Luka Krže¹, Maks Merela¹

UDK 630*811:543.456

Original scientific article / *Izvirni znanstveni članek*

Received / *Prispelo*: 6. 11. 2019

Accepted / *Sprejeto*: 28. 11. 2019

Abstract / *Izvleček*

Abstract: Exact wood identification is usually based on observation of wood features under the microscope. For this, we have to take a sample of the wood from the object and cut thin slides, possibly of all three anatomical sections. Such destructive sampling is often not possible on valuable historical objects, and therefore there is a need for non-destructive approaches. The objective of the study is to present the potential of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) using an Olympus LEXT OLS5000 for the identification of wood. We present work on an example of a gothic sculpture, "St. George Defeating the Dragon". Conventional sampling and microscopical wood identification showed that St. George is made of Norway spruce (*Picea abies*), and the dragon of poplar (*Populus sp.*) or willow (*Salix sp.*). We present crucial features needed for the identification of these species and the limitations with identification if the samples are too small. Finally, we demonstrate the possibility of wood identification of the abovementioned species using CLSM on wood samples without special preparation of the surfaces. CLSM enabled us to observe all the features needed for wood identification.

Keywords: confocal laser scanning microscopy (CLSM), wood anatomy, wood identification, *Picea abies*, *Populus sp.*, *Salix sp.*

Izvleček: Natančna identifikacija lesa običajno temelji na opazovanju anatomskih znakov pod mikroskopom. Za to moramo odvzeti vzorec lesa in narezati tanke preparate, po možnosti vseh treh anatomskih prerezov. Takšno destruktivno vzorčenje na dragocenih zgodovinskih predmetih pogosto ni sprejemljivo, zato iščemo nedestruktivne pristope. Cilj te študije je predstaviti možnosti identifikacije lesa s pomočjo konfokalnega laserskega mikroskopa (CLSM) Olympus LEXT OLS5000. Identifikacijo predstavljamo na primeru gotskega kipa svetega Jurija z zmajem. Konvencionalno vzorčenje in mikroskopska identifikacija lesa sta pokazala, da je sveti Jurij narejen iz lesa navadne smreke (*Picea abies*), zmaj pa iz lesa topola (*Populus sp.*) ali vrbe (*Salix sp.*). Predstavljamo ključne značilnosti, potrebne za identifikacijo naštetih vrst, in omejitve identifikacije, če so vzorci premajhni. Na koncu pokažemo možnost identifikacije lesa zgoraj omenjenih vrst s CLSM na vzorcih lesa brez posebne priprave površine. CLSM nam je omogočil opazovanje vseh anatomskih znakov, potrebnih za identifikacijo lesa.

Ključne besede: konfokalna laserska vrstična mikroskopija (CLSM), anatomija lesa, identifikacija lesa, *Picea abies*, *Populus sp.*, *Salix sp.*

1 INTRODUCTION

1 UVOD

Art objects made of wood represent an important part of our cultural heritage. For their optimal conservation, restoration, and valuation, it is important to know from which wood and how they were made. For wood identification, we can apply traditional macroscopic and microscopic methods (Čufar & Zupančič, 2000).

Macroscopic identification is more or less non-destructive and is mainly based on features which can be observed with the naked eye or simple magnification lens (e.g., Wagenführ, 1999; Richter et al., 2002; Ruffinatto et al., 2019). Such a methodology has its limitations, however, as the number of wood characteristics which can be recorded is relatively small, and some of them, like colour and odour, change or even disappear with ageing. The use of macroscopic identification keys may sometimes lead to subjective decisions or even wrong identification (Haag et al., 2018).

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology, Ljubljana, Slovenia

* e-mail: katarina.cufar@bf.uni-lj.si

Microscopic wood identification is more reliable, especially in the case of aged or painted wooden objects. However, this method is not non-destructive, as we need to collect an oriented piece of wood from the object and cut thin cross, radial and tangential sections. When the sections are made, identification is based on observation of wood features under the microscope.

For identification of softwoods and hardwoods, we dispose with numerous identification keys. If we know the origin of the wood, for instance Europe, we can use dichotomous microscopic keys and illustrated descriptions of the species (e.g., Grosser, 1977; Schweingruber, 1978, 1990; Wagenführ, 1996, 1999; Schoch et al., 2004; Čufar & Zupančič, 2009; Signorini et al., 2014; Ruffinatto et al., 2017).

More universal are multiple entry keys that enable identification based on searching for the presence or absence of wood features. The International Association of Wood Anatomists (IAWA) organised committees to define the lists of microscopic features for hardwood (IAWA committee, 1989) and softwood (IAWA committee, 2004) identification. The lists enabled the development of widely used computer added identification tools like the publicly available InsideWood (InsideWood, 2004 onwards) which is also an indispensable resource of information on hardwood anatomy (Wheeler, 2011). There are also identification keys supported by the DELTA/INTKEY program package (Richter & Trockenbrodt, 1995) for microscopic identification of commercial hardwoods (Richter & Dallwitz, 2000), microscopic identification of softwoods (Richter, personal communication) and CITESwoodID for identification of CITES protected trade timbers (Richter et al., 2005).

Exact wood identification is therefore based on observation of wood features on microscopic sections under the microscope. The sections are cut from samples taken from the objects. With regard to valuable historical objects, such destructive sampling is usually not possible, and thus there is a need for less destructive or if possible non-destructive approaches.

The recent development of non-destructive methods has helped to study valuable (historical) objects, where destructive sampling of wood specimens is not possible. Such methods have been, for example, used to study the wood of historical musical instruments (Fioravanti et al., 2016; Haag et al., 2018), bows of historical stringed instruments

(Fioravanti et al., 2017) and wood species of historic gala berlines (Giulio, et. al., 2019). Different pieces of equipment have been used for this, like the portable digital microscopes Dino-lite pro AD413T and AM4113ZT4 (Fioravanti et al., 2016), Dino-lite and synchrotron light X-ray CT in phase-contrast mode (Fioravanti et al., 2017), or digitised image microscope analysis systems Cell[^]F[®], Olympus and KEYENCE[®] VHX-5000 (Haag et al., 2018).

In the present study, we present the possibility to use a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus LEXT OLS5000 for wood identification on the example of a gothic statue of St. George from Ptuj, Slovenia. We compared wood identification based on light microscopy of sections obtained from tiny wood samples taken from the statue, on conventional (large) sections from the slide collection, and wood identification using CLSM on the samples of the same wood species without special surface preparation.

2 MATERIALS AND METHODS

2 MATERIAL IN METODE

2.1 MATERIAL

2.1 MATERIAL

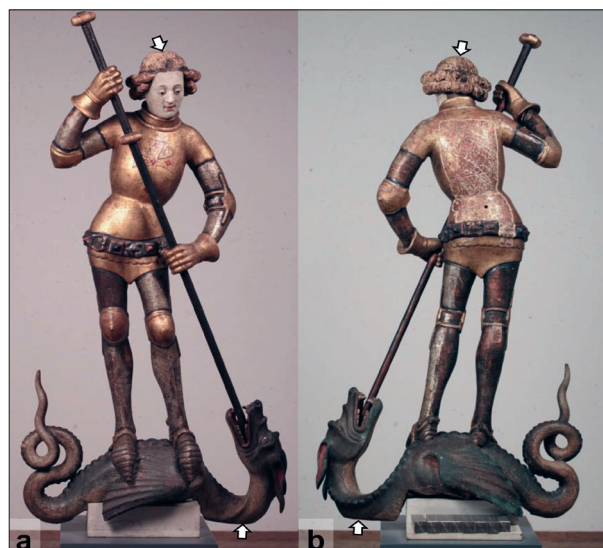


Figure 1. Gothic statue of St. George defeating the dragon. Arrows show the locations where small samples of wood were taken for microscopic wood identification.

Slika 1. Gotski kip svetega Jurija z zmajem. Puščice prikazujejo mesto na glavi svetnika in mesto na spodnji strani zmaja, kjer sta bila odvzeta majhna vzorca lesa za mikroskopsko identifikacijo lesa.

The main church in Ptuj holds the statute of the patron saint St. George defeating a dragon (Figure 1), presumably made between 1370-1380 AD (Vnuk, 2013, 2019).

The statue was presented at the exhibition “A knight, a lady and a dragon – the heritage of medieval warriors” in the National Museum of Slovenia in Ljubljana from December 2012 until February 2014 (Vnuk, 2013). After the exhibition it was possible to study the statue to identify the wood it is made of.

2.2 SAMPLE PREPARATION, LIGHT MICROSCOPY, AND WOOD IDENTIFICATION

2.2 PRIPRAVA VZORCEV, SVETLOBNA MIKROSKOPIJA IN IDENTIFIKACIJA LESA

We examined the statue in the restoration workshop. Together with the restorers, we defined the sites where the tiny samples of the wood could be taken for research. We took two samples of minimal dimensions, one from the head of St. George and one from the dragon (Figure 1).

The sample taken from the head of the statue of St. George was an oriented splinter (ca. 3 × 3 × 7 mm) taken from a location where the head was previously damaged. The splinter was further oriented and fixed into a holder of the Leica SM

2000 R slide microtome (Figure 2a), where we cut 20 µm thick slices of cross and tangential sections, as the amount of wood collected was not sufficient to obtain the radial section as well. The slices were stained with safranin and astra blue, dehydrated and embedded in Euparal (Čufar & Zupančič, 2000; Prislán et al., 2009). Thus, permanent slides (Figure 2b) were prepared.

From the dragon, we cut three shavings using a scalpel and obtained thin slices of approximate size 7 × 9 × 0.3 mm, which were immediately put on a glass slide and embedded into glycerol without staining. The slices only contained the cross-section of the wood.

All slides were observed with a Nikon Eclipse E 800 light microscope. Micrography was performed with a Nikon DS-fi1 digital camera and NIS Elements Br 3.0 software. Microscopic identification of wood was performed with keys for the microscopic identification of softwoods and hardwoods (Grosser, 1977; Richter & Dallwitz, 2000; Schoch et al., 2004).

For wood identification, we also observed the reference material, the slides of the same species from the slide collection of the Department of Wood Science and Technology, for comparison.

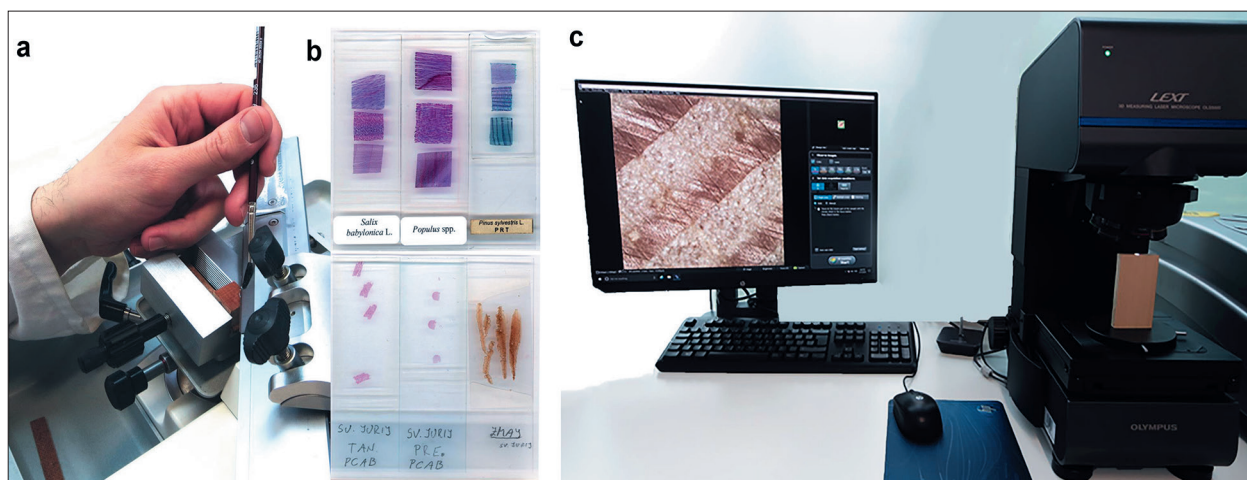


Figure 2. Laboratory work: (a) cutting of thin sections with a sliding microtome, (b) slides from the statue and from the collection prepared for light microscopy, (c) confocal laser scanning microscope LEXT OLS5000 3D (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japan) equipped with an optical system for colour observation with an oriented sample of wood from the collection.

Slika 2. Delo v laboratoriju: (a) rezanje tankih preparatov z drsnim mikrotomom, (b) preparati iz kipa in iz zbirke, pripravljeni za opazovanje pod svetlobnim mikroskopom in (c) konfokalni laserski mikroskop LEXT OLS5000 3D (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japonska), opremljen z optičnim sistemom za opazovanje barvne slike z orientiranim vzorcem lesa iz zbirke.

2.3 CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY 2.3 KONFOKALNA LASERSKA MIKROSKOPIJA

We took samples from the wood collection of the Department of Wood Science and Technology to check if the features crucial for the identification of wood from the statue could be observed with Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (Figure 2c). The wood was observed with a CLSM Olympus LEXT OLS5000 (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japan) with the following objectives: MPLFLN5x (numerical aperture 0.15, working distance 20 mm), MPLFLN10xLEXT (numerical aperture 0.3, working distance 10.4 mm), and MPLAPON20xLEXT (numerical aperture 0.6, working distance 1 mm).

We used the optical system for colour observation. The system acquired microscope colour images by illuminating the sample with the white light-emitting diode (LED) light source and imaging the reflected light with the complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) image sensor.

The wood objects without special surface preparation were placed on the stage. Moving the stage, we selected the position for imaging. As the focal depth of the colour images was relatively deep, we could enlarge the colour images to observe the detailed wood anatomy features or to define the positions for detailed observations using the polarised light.

3 RESULTS AND DISCUSSION 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Due to the small dimensions of the wood sample taken from the head of the statue, the obtained cross-section only contained part of one tree-ring with earlywood and some tracheids indicating a gradual transition to latewood (Figure 3a). The section contained no axial resin canals. However, the tangential section contained radial resin canals with thick-walled epithelial cells (Figure 3b). Assuming that the wood of the sculpture possibly originated from the local forests (Slovenia and its surroundings), the features lead us to the conclusion that the wood is Norway spruce (*Picea abies*).

In the optimal case the structure of Norway spruce should be observed on all three anatomical sections (transversal, tangential, radial) to observe the key features of *Picea abies* including the gradual transition from early to latewood, axial and radial resin canals with thick-walled epithelial cells, heterocellular rays with radial tracheids and ray parenchyma cells containing piceoid cross-field pits, as well as the presence of multiseriate rays with radial resin canals and the predominating uniseriate rays (Figure 4).

Observation with CLSM on a parallel sample of *Picea abies* wood showed that the abovementioned key features can be observed on the wood surface without time-consuming sample preparation (Figure 5).

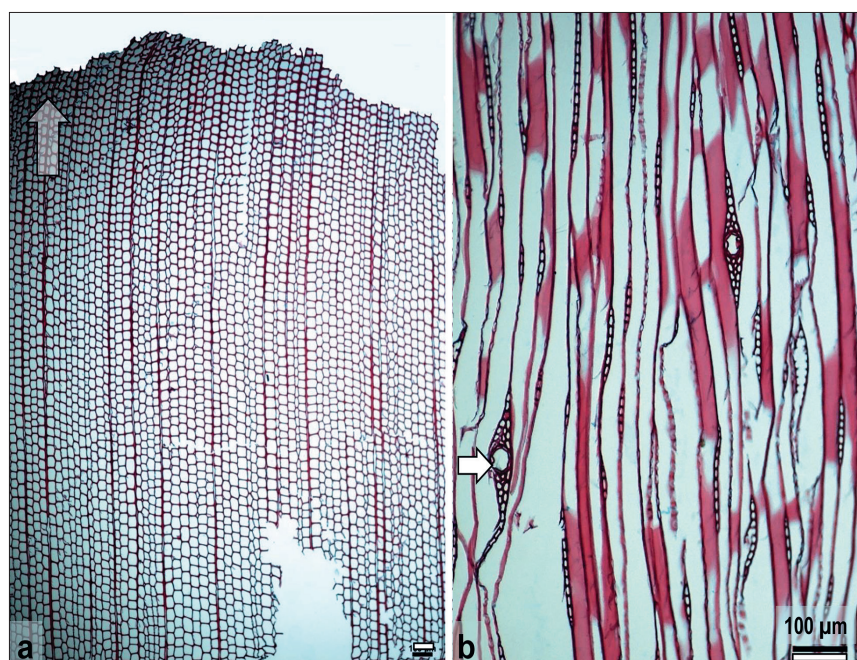


Figure 3. Sections obtained from a wooden splinter of the St. George statue with the (a) cross-section and (b) tangential section indicating the wood of Norway spruce (*Picea abies*). Light microscopy – bright field, safranin, and astra blue staining. Scale bars – 100 μm .

Slika 3. Prerezi lesa vzorca iz glave kipa svetega Jurija s (a) prečnim prerezom in (b) tangencialnim prerezom, ki nakazuje les navadne smreke (*Picea abies*). Svetlobni mikroskop - svetlo polje, obarvanje safranin in astra modro. Merilne daljice - 100 μm .

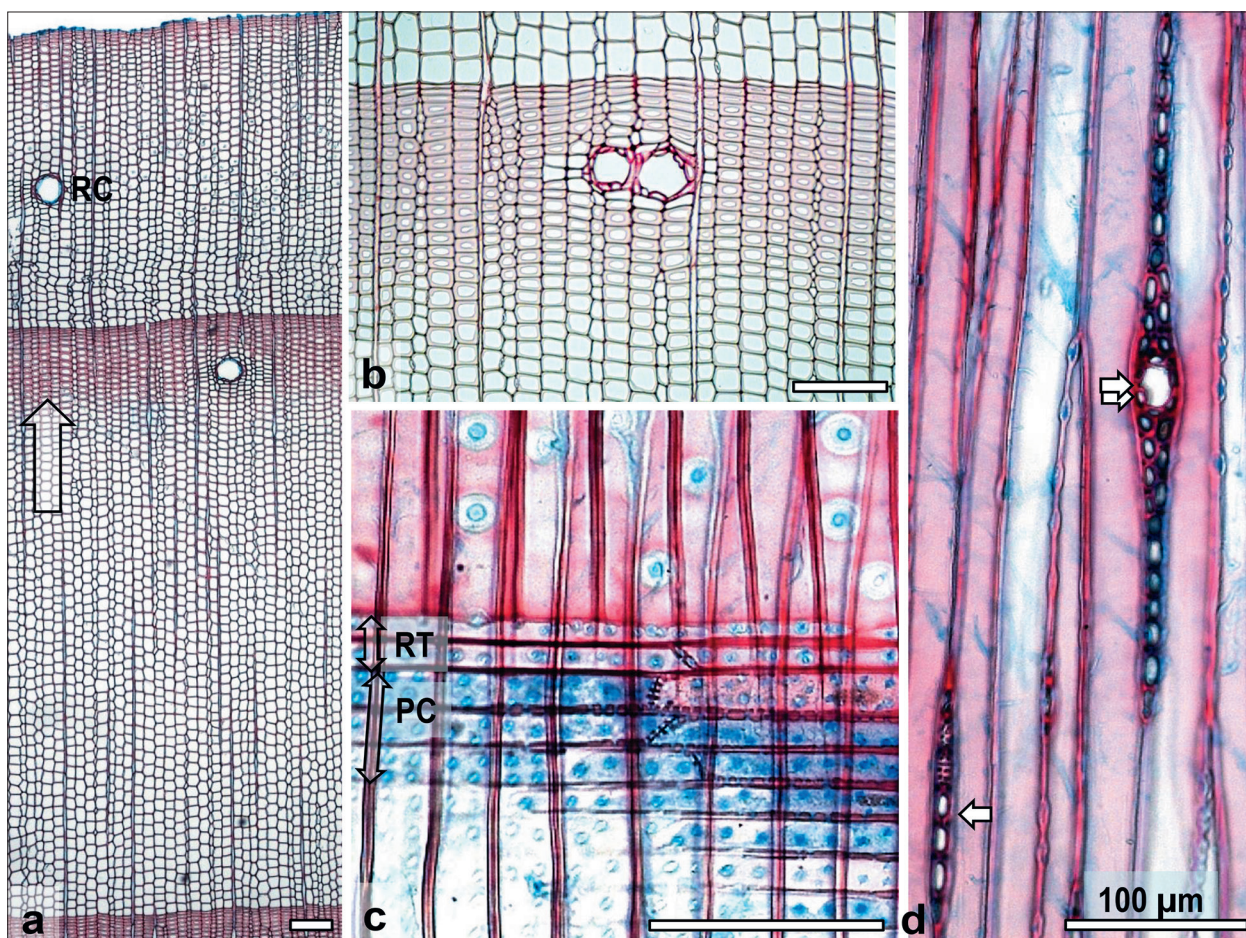


Figure 4. Norway spruce (*Picea abies*) wood from the collection of the Department of Wood Science and Technology, light microscopy – bright field, safranin and astra blue staining: (a) cross-section with gradual transition from early to latewood (arrow) and axial resin canals (RC), (b) cross-section with axial resin canals with thick-walled epithelial cells, (c) radial section with heterocellular ray composed of radial tracheids (RT) and parenchyma cells (PC) with piceoid cross-field pits, (d) tangential section with a multiseriate ray containing radial resin canal RC (double arrow) and an uniseriate ray (arrow). All scale bars – 100 μm .

Slika 4. Prerezi lesa navadne smreke (*Picea abies*) iz zbirke preparatov Oddelka za lesarstvo. Svetlobni mikroskop - svetlo polje, obarvanje safranin in astra modro: a) prečni prerez, branika s postopnim prehodom iz ranega v kasni les (puščica) in aksialnimi smolnimi kanali (RC), (b) prečni prerez z aksialnimi smolnimi kanali z debelostenimi epitelnimi celicami, (c) radialni prerez s heterocelularnim trakom, ki vsebuje radialne traheide (RT) in trakovne parenhimske celice (PC) s piceoidnimi piknjami v križnih poljih, (d) tangencialni prerez z večrednim trakom, ki vsebuje radialni smolni kanal RC (dvojna puščica) in enoredni trak (puščica). Vse merilne daljice - 100 μm .

The shavings from the dragon only contained cross-sections. We could observe that the wood is a diffuse-porous hardwood with small diameter vessels and uniseriate rays (Figure 6). These features are typical of willows (*Salix* sp.) (Figure 7) and poplars (*Populus* sp.) (Figure 9). The two species have similar wood anatomy and can be differentiated based on the type of the rays visible on the radial section, which we did not have. The rays in *Salix* are

heterogeneous (Figure 7 b, c) whereas in *Populus* they are homogenous (Figure 9 b, c).

CLSM images of *Populus* and *Salix* structure on parallel samples enabled us to see the anatomical features of both species (Figures 8 and 9), especially the upright cells defining heterocellular rays seen on the radial surface (Figure 8 b, c). They are crucial for the identification of *Salix* and its differentiation from *Populus*.

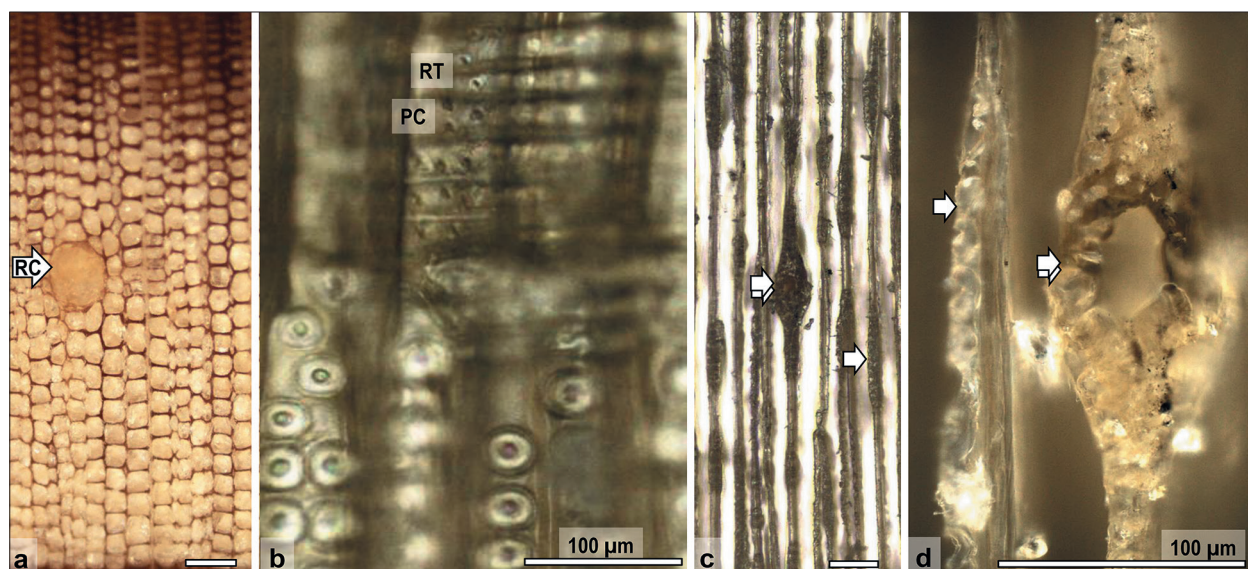


Figure 5. Norway spruce (*Picea abies*), sample of wood from the collection, Confocal Laser Scanning Microscopy: (a) cross-section with gradual transition from early to latewood and axial resin canal (RC), (b) radial section with heterocellular ray with radial tracheids (RT) and parenchyma cells (PC) containing piceoid cross-field pits, (c, d) tangential section with a multiseriate ray containing radial resin canal RC (double arrow) and an uniseriate ray (arrow). All scale bars – 100 μm .

Slika 5. Les navadne smreke (*Picea abies*) iz zbirke Oddelka za lesarstvo. Konfokalni laserski mikroskop: (a) prečni prerez, branika s postopnim prehodom iz ranega v kasni les in aksialnim smolnim kanalom (RC), (b) radialni prerez s hetero celularnim trakom, ki vsebuje radialne traheide (RT) in trakovne parenhimske celice (PC) s piceoidnimi piknjami v križnih poljih, (c, d) tangencialni prerez z večrednim trakom, ki vsebuje radialni smolni kanal RC (dvojna puščica) in enoredni trak (puščica). Vse merilne daljice - 100 μm .

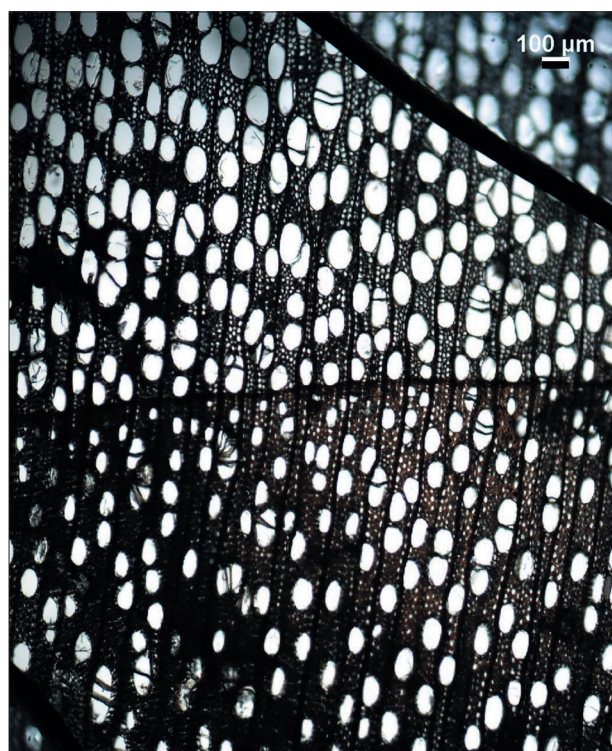


Figure 6. Shaving taken from the dragon – unstained cross-section under a light microscope. Scale bar – 100 μm .

Slika 6. Ostružek s spodnjega dela zmaja – neobarvan prečni prerez pod svetlobnim mikroskopom. Merilna daljica - 100 μm .

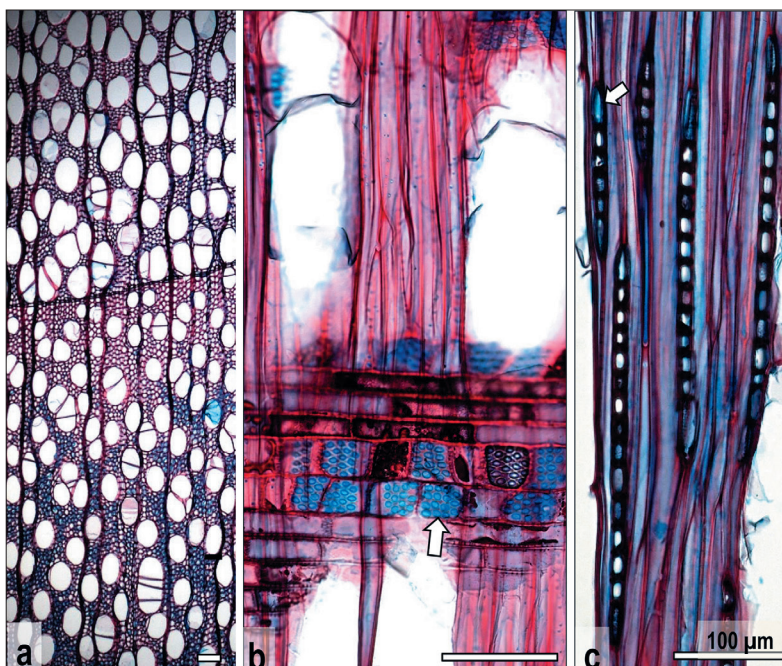


Figure 7. Willow (*Salix alba*) wood from the slide collection, light microscopy – bright field, safranin and astra blue staining: (a) cross-section –diffuse-porous wood with uniseriate rays, (b) radial section – heterogenous ray consisting of procumbent and upright cells (arrow), (c) tangential section – uniseriate rays with procumbent and upright cells (arrow). All scale bars – 100 μm .

Slika 7. Les bele vrbe (*Salix alba*) iz zbirke preparatov, svetlobna mikroskopija – svetlo polje, obarvanje, safranin in astra modro: (a) prečni prerez – difuzno porozen les z enorednimi trakovi, (b) radialni prerez – heterogeni trak, sestavljen iz ležečih in pokončnih celic (puščica), (c) tangencialni prerez – enoredni trakovi sestavljeni iz ležečih in pokončnih celic (puščica). Vse merilne daljice – 100 μm .

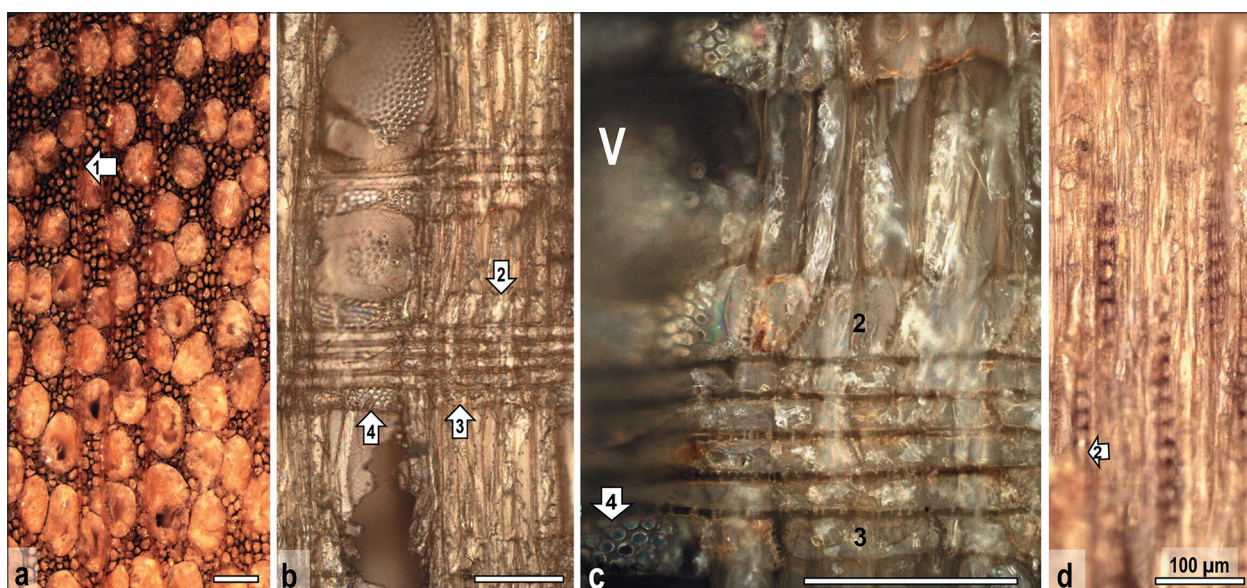


Figure 8. Willow (*Salix sp.*), confocal laser scanning microscope: (a) cross-section – diffuse-porous wood with uniseriate rays (arrow), (b, c) radial section – heterogenous ray with procumbent (3) and upright cells (2), vessel (V), and large vessel-ray pits (4), (d) tangential section – uniseriate ray, with upright marginal cells (arrow) indicate the heterogeneous ray. All scale bars – 100 μm .

Slika 8. Les vrbe (*Salix sp.*) iz zbirke lesa, konfokalni laserski mikroskop: (a) prečni prerez - difuzno porozen les z enorednimi trakovi, (b, c) radialni prerez - heterogeni trak, sestavljen iz ležečih (3) in pokončnih celic (2) in traheje (V), ter velike piknje med trakom in trahejo (4) (c) tangencialni prerez – enoredni trakovi sestavljeni iz ležečih in pokončnih celic (puščica) nakazujejo heterogeno trakovno tkivo. Vse merilne daljice – 100 μm .

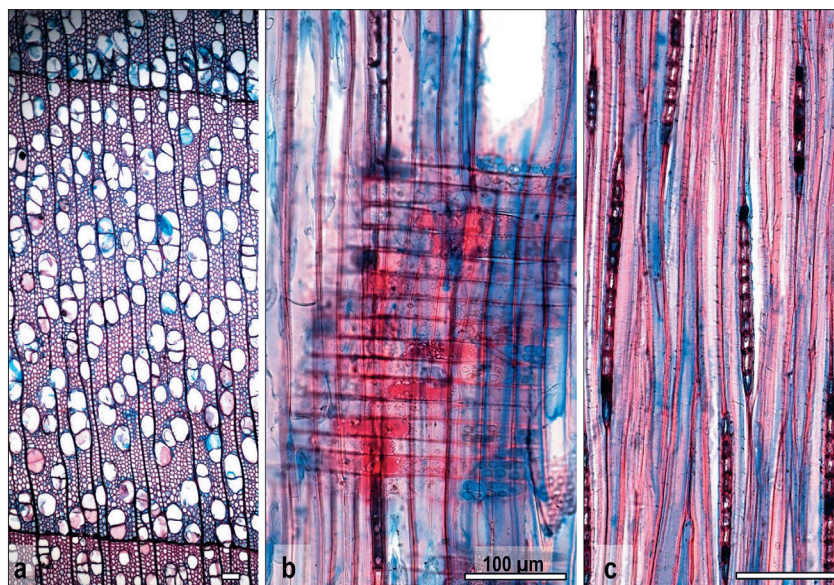


Figure 9. Poplar (*Populus nigra*) wood from the slide collection, light microscopy – bright field, safranin and astra blue staining: (a) cross-section – diffuse-porous wood with uniseriate rays, (b) radial section – homogenous ray consisting of procumbent cells, (c) tangential section – uniseriate homogenous rays. All scale bars – 100 μm .

Slika 9. Les črnega topola (*Populus nigra*) iz zbirke preparatov, svetlobna mikroskopija – svetlo polje, obarvanje, safranin in astra modro: (a) prečni prerez - difuzno porozen les z enorednimi trakovi, (b) radialni prerez – homogeni trak, sestavljen iz ležečih celic, (c) tangencialni prerez – enoredni homogeni trakovi. Vse merilne daljice – 100 μm .

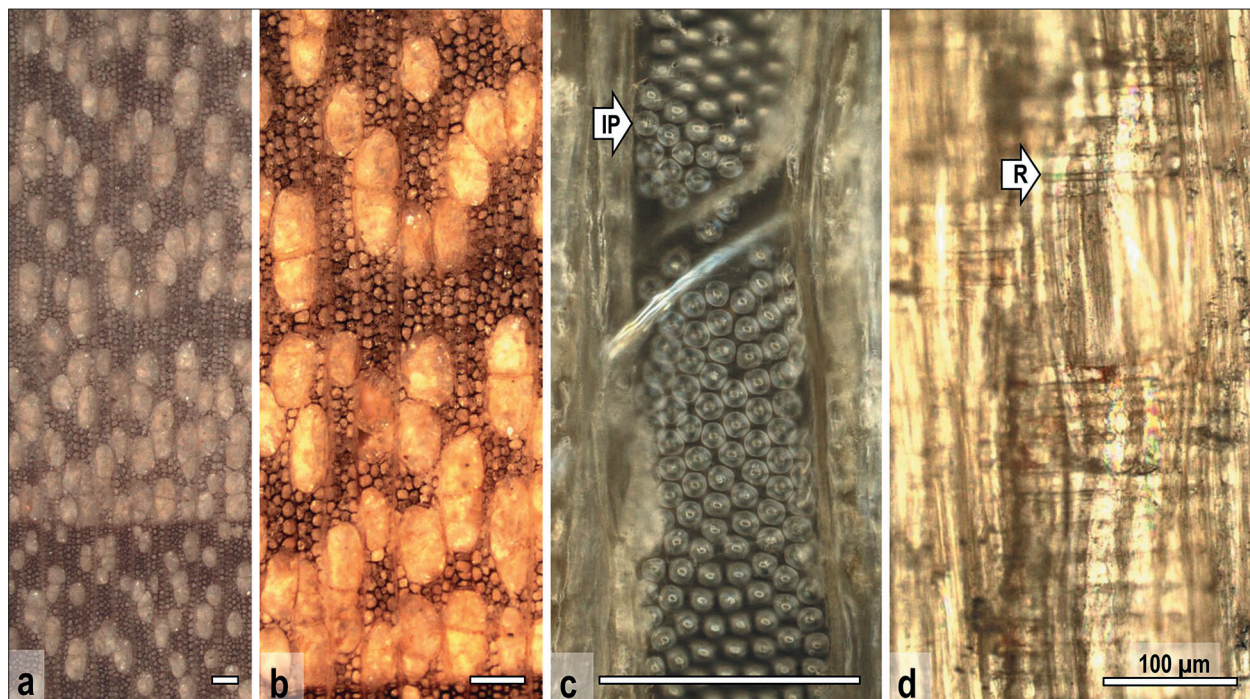


Figure 10. Poplar (*Populus sp.*), confocal laser scanning microscope: (a, b) cross-sections – diffuse-porous wood with uniseriate rays, (c) radial section – vessel elements with typical alternate intervacular pits (IP), (d) radial section – homogenous rays (R) consisting of procumbent cells. All scale bars – 100 μm .

Slika 10. Les topola (*Populus sp.*) iz zbirke lesa, konfokalni laserski mikroskop: (a, b) prečni prerez – difuzno porozen les z enorednimi trakovi, (c) radialni prerez – traheja z izmeničnimi intervaskularnimi piknjami (IP), (d) radialni prerez – homogeni trakovi, sestavljeni iz ležečih celic. Vse merilne daljice – 100 μm .

4 CONCLUSIONS

4 ZAKLJUČKI

The use of a confocal laser scanning microscope made it possible to identify the species *Picea abies*, *Populus nigra* and *Salix alba* based on microscopic wood anatomy features. The key features necessary to identify the mentioned central European species could be observed on oriented wood samples without special preparation of the surfaces. The CLSM methodology would possibly be applicable to identify the wood of the statue of St. George defeating the dragon in a non-destructive way if the working distance of the microscope would allow observing the features directly on the object.

5 SUMMARY

5 POVZETEK

Leseni umetniški predmeti so pomemben del naše kulturne dediščine. Za njihovo optimalno konserviranje, restavriranje in vrednotenje je pomembno vedeti, iz katerega lesa in kako so bili izdelani. Za prepoznavanje vrste lesa lahko uporabimo tradicionalne makroskopske in mikroskopske metode (Čufar & Zupančič, 2000; Čufar, 2006; Čufar & Merela, 2014).

Makroskopska identifikacija lesa je bolj ali manj nedestruktivna, saj temelji predvsem na lastnostih posameznih vrst, ki jih je mogoče videti s prostim očesom ali z lupo (npr. Wagenführ, 1999; Richter et al., 2002; Ruffinatto et al., 2019). Ta metodologija ima svoje omejitve, saj je število znakov za makroskopsko identifikacijo lesa razmeroma majhno, nekateri znaki, kot sta na primer barva in vonj, pa se s starostjo spremenijo ali celo izginejo. Zato lahko uporaba makroskopskih identifikacijskih ključev privede do subjektivnih odločitev ali celo napačne identifikacije (Haag et al., 2018).

Mikroskopska identifikacija lesa je bolj zanesljiva, zlasti pri lesenih predmetih kulturne dediščine. Ta metoda je žal destruktivna, saj zahteva odvzem usmerjenega kosa lesa iz predmeta, iz katerega narežemo tanke prečne, radialne in tangencialne rezine za opazovanje pod mikroskopom.

Za prepoznavanje lesa iglavcev in listavcev so na voljo številni identifikacijski ključi. Če les izvira iz srednje Evrope, lahko uporabimo dihonomne mikroskopske ključe in s slikami opremljene opise les-

nih vrst (npr. Grosser, 1977; Schweingruber, 1978, 1990; Wagenführ, 1996, 1999; Schoch et al., 2004; Signorini et al., 2014; Ruffinatto et al., 2017).

Bolj vsestranski so večvhodni ključi, ki temeljijo na prepoznavanju anatomskih znakov v lesu. Mednarodno združenje lesnih anatomov (IAWA) je organiziralo odbore za pripravo seznamov mikroskopskih znakov listavcev (IAWA Committee, 1989) in iglavcev (IAWA Committee, 2004). Seznami so omogočili razvoj računalniško podprtih orodij za identifikacijo lesa kot na primer javno dostopni portal InsideWood (InsideWood, 2004 naprej), ki je tudi nepogrešljiv vir za identifikacijo in zbirko podatkov o anatomiji listavcev (Wheeler, 2011).

Veliko se uporabljajo tudi računalniški ključi za identifikacijo lesa, ki jih podpira programski paket DELTA / INTKEY (Richter & Trockenbrodt, 1995). V uporabi so ključi za mikroskopsko identifikacijo listavcev (Richter & Dallwitz, 2000), mikroskopsko identifikacijo iglavcev (Richter, osebna komunikacija) in CITESwoodID za identifikacijo lesa zaščitene vrst s seznama CITES (Richter et al., 2005).

Omenjeno destruktivno vzorčenje lesa na dragocenih zgodovinskih predmetih običajno ni mogoče, zato laboratoriji razvijajo uporabo nedestruktivnih metod, ki so jih na primer uporabili za proučevanje lesa zgodovinskih glasbenih instrumentov (Fioravanti et al., 2016; Haag et al., 2018), lokov godal (Fioravanti et al., 2017) in razkošnih kočij (Giulio et al., 2019). Za to so uporabili različno opremo, kot so prenosni digitalni mikroskopi Dino-lite pro AD413T in AM4113ZT4 (Fioravanti et al., 2016), Dino-lite in sinhrotronski rentgenski CT (Fioravanti et al., 2017) ali sisteme za zajem in analizo slike Cell[^]F[®], Olympus in KEYENCE[®] VHX-5000 (Haag et al., 2018).

V tej študiji predstavljamo možnost uporabe konfokalnega laserskega skenirnega mikroskopa Olympus LEXT OLS5000 (Olympus Corporation Tokyo 163-0914, Japonska) (Balzano et al., 2019) za identifikacijo lesa na primeru gotskega kipa svetege Jurija s Ptuja v Sloveniji (slika 1). Primerjali smo identifikacijo lesa na podlagi svetlobne mikroskopije rezin iz vzorcev, odvzetih iz kipa, nato na običajnih preparatih iz zbirke Oddelka za lesarstvo in nato še identifikacijo lesa z uporabo CLSM na vzorcih lesnih vrst, iz katerih je izdelan kip (slike 5, 8 in 10).

Natančna identifikacija lesa običajno temelji na opazovanju anatomskih znakov s pomočjo mikrosko-

pa. Za tak način moramo odvzeti vzorec lesa in narezati tanke preparate, po možnosti vseh treh anatomskih prerezov, prečnega, radialnega in tangencialnega. Sledi pregled s svetlobnim mikroskopom, določitev anatomskih znakov in identifikacija lesa.

Po pregledu kipa in posvetu z restavratorji smo sklepali, da sta sveti Jurij in zmaj verjetno izdelana iz različnih lesnih vrst. Skupaj z restavratorji smo poiskali mesta, kjer bi bilo mogoče les natančno pregledati ali po potrebi na čim manj invaziven način odvzeti vzorce lesa za raziskave. Ker zaradi polihromacije nismo mogli videti lesno anatomskih znakov, potrebnih za določitev lesne vrste, smo odvezli dva vzorca minimalnih dimenzij, enega na glavi svetega Jurija, enega pa na zčaju (slika 1).

Iz glave smo na mestu manjše predhodne poškodbe odvzeti vzorec v obliki orientirane trske (dimenzije 3 x 3 x 7 mm), ki smo ga v laboratoriju dodatno orientirali, poravnali in vpeli v drsni mikrotom Leica SM 2000 R (slika 2a) ter odrezali rezine debeline 20 µm prečnega in tangencialnega prereza. Rezine smo obarvali z barvili safranin in astra modro, jih dehidrirali in vklopili v vklopni medij (Euparal 3C-129; Chroma) (Čufar & Zupančič, 2000).

Iz zčaja smo v restavratorski delavnici s skalpelom odrezali ostružke oz. tanke rezine približne velikosti 7 x 9 x 0,3 mm, ki smo jih takoj po odvzemu neobarvane položili na objektno steklo in vklopili v glicerol. Odvezti material oz. rezine so zajemale samo prečni prerez lesa.

Tako smo pripravili preparate (slika 2b) za opazovanje s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E 800. Mikrografija je bila opravljena z digitalno kamero Nikon DS-fi1 in programsko opremo NIS Elements Br 3.0. Mikroskopsko identifikacijo lesa smo opravili s pomočjo standardnih identifikacijskih ključev (Čufar, 2006; Čufar & Merela, 2014; Schoch et al., 2004; Signorini et al., 2014).

Trska lesa iz glave kipa svetega Jurija je bila dovolj velika, da smo izdelali prečni in tangencialni prerez lesa (slika 3). Prečni prerez je zajel del široke branike, ki je vsebovala samo rani les s tipičnim postopnim prehodom iz ranega v kasni les (slika 3a), na tangencialnem prerezu pa so bili jasno vidni radialni smolni kanali z debelostenimi epitelnimi celicami (slika 3b).

Kljub temu, da na prečnem prerezu nismo videli aksialnih smolnih kanalov in lesa ni bilo do-

volj, da bi odrezali radialni prerez ter potrdili prisotnost heterogenega trakovnega tkiva in majhnih piceoidnih pikenj v križnem polju, smo na podlagi radialnih smolnih kanalov lahko ugotovili, da je kip svetega Jurija narejen iz lesa navadne smreke (*Picea abies*).

Vse ključne mikroskopske znake lesa smo poiskali in prikazali na preparatih lesa smreke iz zbirke preparatov Oddelka za lesarstvo (slika 4). V naslednjem koraku smo vse ključne znake za identifikacijo te lesne vrste poiskali na orientiranih vzorcih lesa smreke iz zbirke lesa Oddelka za lesarstvo in jih preiskali s konfokalnim laserskim mikroskopom. Posneli smo znake kot so: postopni prehod iz ranega v kasni les, aksialne in radialne smolne kanale z debelostenimi epitelnimi celicami, radialni prerez s heterocelularnim trakom, ki vsebuje radialne traheide in trakovne parenhimske celice s piceoidnimi pikenjami v križnih poljih (slika 5).

Ostružek lesa, ki smo ga odvzeli iz zčaja, je vseboval samo prečni prerez, na katerem smo lahko videli, da je les difuzno porozen listavec z majhnimi trahejami in da ima enoredne trakove (slika 6). Našteti znaki so značilni za les vrbe (*Salix* sp.) (slika 7) ali topola (*Populus* sp.) (slika 9). Obe vrsti imata podobno anatomijo lesa in ju je mogoče razlikovati po trakovih, ki so pri vrbi heterogeni (slika 7 b, c), pri topolu pa so homogeni (slika 9 b, c). Omenjenega znaka na prečnem prerezu ni mogoče videti.

Na CLSM posnetkih lesa vrbe in topola iz zbirke Oddelka za lesarstvo smo lahko videli vse znake, potrebne za določitev topola in vrbe in za razlikovanje vrbe in topola (sliki 8 in 10). Pri tem sta bila ključna radialna prereza. Pri vrbi smo na radialnem prerezu lahko videli heterogeni trak (slika 8 b, c), sestavljen iz ležečih in pokončnih celic, pri topolu pa homogeni trak, sestavljen samo iz ležečih celic (slika 10 d).

Konfokalni laserski vrstični mikroskop je omogočil prepoznavanje vseh ključnih znakov za mikroskopsko identifikacijo lesa vrst *Picea abies*, *Populus nigra* in *Salix alba*. Znake smo lahko posneli na orientiranih vzorcih lesa brez posebne priprave površin. Metodologija CLSM bi bila najverjetneje uporabna tudi za identifikacijo lesa direktno na kipu, če bi delovna razdalja mikroskopa omogočala, da bi kip postavili pod mikroskop.

ACKNOWLEDGEMENTS

ZAHVALE

The study was supported by the Slovenian Research Agency (ARRS), program P4-0015. We are grateful to Paul Steed for English language editing.

REFERENCES

VIRI

- Balzano, A., De Micco, V., Merela, M., & Čufar, K. (2019). Tree-rings in Mediterranean pines—can we ascribe them to calendar years? *Les/Wood*, 68(1), 5-14.
- Čufar, K., & Zupančič, M. (2000). Determinacija lesa predmetov kulturne dediščine = Wood identification in objects of cultural heritage. *RES., Dela, Papers 4/1999*, 48-52.
- Čufar, K. (2006). Anatomija lesa. Univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, 185 p.
- Čufar, K., & Zupančič, M. (2009). Wood anatomy: instructions for laboratory work. Ljubljana: Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology, 98 p.
- Čufar, K., & Merela, M. (2014). Anatomija lesa - navodila za vaje. 2. dopolnjena izd. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, 98 p.
- Fioravanti, M., Giulio, G., & Signorini, G. (2016). A non-invasive approach to identifying wood species in historical musical instruments. *Journal of Cultural Heritage*, 27 (supplement), S70-S77.
- Fioravanti, M., Giulio, G., Signorini, G., Rossi Rognoni, G., Sodini, N., Tromba, G., & Zanini, F. (2017). Non-invasive wood identification of historical musical bows. *IAWA Journal*, 38 (3), 285-296.
- Giulio, G., Signorini, G., Navarro, F., & Fioravanti, M. (2019). The wood species of the historic gala berlines of the Palazzo Pitti in Florence. *Journal of Cultural Heritage*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.07.016>.
- Grosser, D. (1977). *Hölzer Mitteleuropas*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 208 p.
- Haag, V., Kirsch, S., Koch, G., Zemke, V., & Richter, H. G. (2018). Non-destructive investigation of historical Instruments based on 3D-reflected-light microscopy and high resolution μ -X-ray CT. In: Pérez, M. A., Marconi, E. (eds.). *Wooden musical instruments different forms of knowledge: book of end of Wood Musick COST Action FP1302*. Paris: Cité de la musique - Philharmonie de Paris, 143-151.
- IAWA Committee (1989). Wheeler, E. A., Baas, P., Gasson, P. E. (eds.): IAWA List of microscopic features for hardwood identification. *IAWA Bulletin n.s.*, 10 (3), 226-332.
- IAWA Committee (2004). Richter, H.G., D. Grosser, I. Heinz & Gasson, P.E. (eds.): IAWA list of microscopic features for softwood identification. *IAWA Journal* 25 (1), 1-70.
- InsideWood (2004 onwards). URL: <http://insidewood.lib.ncsu.edu> [16.4.2018].
- Prislan, P., Merela, M., Zupančič, M., Krže, L., & Čufar, K. (2009). Uporaba izbranih svetlobno mikroskopskih tehnik za raziskave lesa in skorje. *Les*, 61 (5), 222-229.
- Richter, H. G., & Trockenbrodt, M. (1995). Computer gestützte Holzartenbestimmung unter Einsatz des DELTA/INTKEY-Programmpaketes. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 53 (4), 215-219.
- Richter, H. G., Oelker, M., & Krämer, G. (2002): macroHOLZdata – Computer-gestützte makroskopische Holzartenbestimmung sowie Informationen zu Eigenschaften und Verwendung von Nutzhölzern. CD-ROM, Holzfachschule Bad Wildungen, Selbstverlag.
- Richter, H. G., & Dallwitz, M. J. (2000 onwards). Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval.' In English, French, German, Portuguese and Spanish. Version: May 2000.
- Richter, H. G., Gembruch, K., & Koch, G. (2005). CITESwoodID—Innovative medium for education, information and identification of CITES protected trade timbers. CD-ROM. Federal Agency for Nature Conservation (BfN) and Federal Research Centre for Forestry and Forest Products (BFH), self-published.
- Ruffinatto, F., Cremonini, C., & Zanuttini, R. (2017). *Atlante dei principali legni presenti in Italia*. Torino, 102 p.
- Ruffinatto, F., Castro, G., Cremonini, C., Crivellaro, A., & Zanuttini, R. (2019). A new atlas and macroscopic wood identification software package for Italian timber species. *IAWA Journal*, 1-19.
- Schoch, W., Schweingruber, F. H., Kienast, F. (2004). *Wood anatomy of central European Species*. URL: <http://www.woodanatomy.ch>
- Schweingruber, F. H. (1978). *Microscopic Wood Anatomy*, Swiss Federal Institute of Forestry Research, Birmensdorf, 226 p.
- Schweingruber, F. H. (1990). *Anatomy of European Woods*, WSL/FNP, Paul Haupt, Bern, Stuttgart, 800 p.
- Signorini, G., Giulio, G., & Fioravanti, M. (2014). *Il Legno nei Beni Culturali – guida alla determinazione delle specie legnose*. 344 p.
- Vnuk, B. (2013). Kip sv. Jurija, V: Vitez, dama in zmaj: Dediščina srednjeveških bojevnikov na Slovenskem 2 = The statue of St. George, In: A knight, a lady and a dragon – the heritage of medieval warriors, Catalogue (Lazar, T., Nabergoj, T., & Bitenc, P., eds.). Narodni muzej Slovenije, Ljubljana, 10-11.
- Vnuk, B. (2019). Srednjeveški kip svetega Jurija iz ptujske mestne župnijske cerkve. In: Sveti Jurij – zavetnik Ptuja svetniški, viteški in ljudski lik sv. Jurija, plemenitega ptujskega zavetnika (Vnuk, B., ed.). Pokrajinski muzej Ptuj – Ormož, Ptuj, 29-59.
- Wagenführ, R. (1996). *Holzatlas*. Leipzig, Fachbuchverlag: 688 p.
- Wagenführ, R. (1999). *Anatomie des Holzes*. Stuttgart, DRW Verlag: 188 p.
- Wheeler, E. A. (2011). InsideWood – A Web resource for hard wood anatomy. *IAWA Journal*, 32 (2), 199-211.

DRYING CHARACTERISTICS OF WOOD OF INVASIVE TREE SPECIES GROWING IN AN URBAN ENVIRONMENT

DOLOČANJE SUŠILNIH KARAKTERISTIK LESA INVAZIVNIH DREVESNIH VRST RASTOČIH V URBANEM OKOLJU

Denis Plavčak^{1*}, Željko Gorišek¹, Aleš Straže¹, Maks Merela¹

UDK 630*847.8:812.23

Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 21. 11. 2019

Accepted / Sprejeto: 2. 12. 2019

Abstract / Izvleček

Abstract: Non-native tree species are increasingly growing in urban environments, where they are exposed to cultivation and pruning measures, and in many cases their growth becomes uncontrolled, even invasive. In such cases the structure of the wood is more heterogeneous, with more tyloses, discolorations and decay, and higher moisture content. The drying of such wood is more demanding and cannot rely on the standard drying schedules. Therefore, the drying kinetics of the boards (thickness 22 mm, 28 mm and 46 mm) of three wood species (black locust – *Robinia pseudoacacia*; box elder – *Acer negundo* and horse chestnut – *Aesculus hippocastanum*) were analysed at 20 °C and 40 °C. Additionally, the drying quality was assessed by determining the moisture content gradient, drying stresses and presence of typical drying defects. In the drying tests the moisture content gradients were relatively low in all species, so no high drying stresses were generated. Due to the expected high risk of collapse, careful drying of green maple was needed, to prevent board twisting when a pronounced number of knots and greater fibre deviation occurred. Half-drying times indicated the longer drying of thicker black locust boards, and very careful drying of box elder. We confirmed the usability of the half-drying time to compare the drying kinetics of different wood species and assortments.

Keywords: invasive wood species, wood, permeability, diffusivity, drying rate, drying quality

Izvleček: V vrtovih in parkih se zaradi oblik in privlačnega videza vse pogosteje razširjajo neavtohtone drevesne vrste, ki so podrejene posebnim gojitvenim in obrezovalnim ukrepom. Pogosto lahko postane njihova širitev nekontrolirana, celo invazivna. V primeru takih dreves je struktura lesa bolj heterogena, les je bolj verjetno otiljen, diskoloriran in okužen ter ima višjo vlažnost. Sušenje takšnega lesa je težavnejše in ne omogoča uporabe standardnih sušilnih programov. Raziskali smo kinetiko sušenja treh lesnih vrst (robinije – *Robinia pseudoacacia*; ameriškega javorja – *Acer negundo* in divjega kostanja – *Aesculus hippocastanum*). Sušili smo deske debelin 22 mm, 28 mm in 46 mm pri 20 °C in 40 °C. Ob tem smo spremljali kakovost sušenja. Ocenjevali smo vlažnostni gradient, sušilne napetosti in pojav značilnih napak pri sušenju. Pri sušilnih preizkušnjah so bili vlažnostni gradienti pri vseh lesnih vrstah razmeroma nizki, zato nismo zabeležili visokih sušilnih napetosti. Raziskave so pokazale, da je zaradi ugotovljene nevarnosti kolapsa potrebno previdno sušenje lesa svežega ameriškega javorja, da se prepreči krivljenje desk, zlasti ob prisotnosti številnih grč in večjem odstopanju poteka lesnih vlaken. Polovični časi sušenja so nakazovali daljše sušenje debelejših preizkušancev robinije in zelo previdno sušenje javorja. Potrdili smo uporabnost kinetike polovičnega časa sušenja različnih vrst in debelin lesa.

Ključne besede: invazivne lesne vrste, les, permeabilnost, difuzivnost, hitrost sušenja, kakovost sušenja

1 INTRODUCTION

1 UVOD

Their attractive appearance, great adaptability and flexibility to growth conditions, and variations of tree shapes are the reasons that more and more tree species are spreading from their natural environments to non-native habitats. They are most

commonly found in parks, gardens and urban environments. In gardens and parks, trees are subjected to specific cultivation and pruning measures, and in many cases their growth becomes uncontrolled. Therefore, we consider them invasive species.

As these trees do not grow in forest stands they have the characteristics of freestanding trees, as also often found in urban areas. The features are evident in the crown length, which extends from the top to the ground of the tree, the trunk is of conical in shape, the branches and knots are present through-

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology, Ljubljana, Slovenia

* e-mail: denis.plavcak@bf.uni-lj.si

out the entire tree height (Zobel & Buijtenen, 1989; Ramagea et al., 2017). In addition, the trunk contains a greater proportion of juvenile wood, the amount of sapwood is larger and the growth rings are wider. Due to the characteristic growth conditions and human activity affecting tree growth, the structure of the wood is usually very heterogeneous and deviates from that which is typical for forest trees in a closed stand; the proportion of juvenile wood is higher; the response of living trees to external injuries is accompanied by compartmentalization processes with an emerging amount of discoloured wood (Torelli, 1974), and there are more knots and fibre deviations (Dinwoodie, 2000).

Frequent human interventions to form the tree shape and greater exposure to a wide variety of mechanical damage mean that wood tissues respond more intensively with abiotic, physiological and biochemical reactions (Racz et al., 1961; Nečesany, 1969; Koch et al., 2000; Koch et al., 2003). In areas around tree wounds, mostly phenolic substances are accumulated in the lumens of parenchymal cells. In less-filled lumens, free water is replaced by air, which causes oxidation processes, condensation, and polymerization of the accumulated substances in parenchyma cells (Nečesany, 1966; Torelli, 1984). The resulting products are less soluble, while enzymes could induce oxidative coloration, i.e. discoloured wood (Bossard, 1965, 1967; Kučera, 1971; Bauch, 1984). The formation and development of staining is also determined by the ratio of free water to gases in the lumens, which affect the vitality of parenchyma cells (Bossard, 1965; Sachsee, 1965).

The response of trees to frequent mechanical damage is manifested by an atypical distribution of moisture content, not only by the sporadic occurrence of wet pockets in the radial direction, but also by greater variation in moisture content along the tree axis. The drastic increase of tyloses, pit aspiration, more biologically infected wood and lighter wood with poor mechanical properties makes drying of this wood very demanding (Gorišek et al., 2008; Gorišek & Straže, 2009), so we cannot rely on the standard drying schedules (Plavčak et al., 2018).

Sapwood, which is involved in water transport, has a high amount of water, which is highly dependent on the leaf surface and water requirements of the tree (Tyree & Zimmermann, 2002). The ratio

of leaf area to sapwood area also depends on the availability of water in the soil, the average relative air humidity, the age of the tree, the vitality of the tree, the amount of ions and nutrients in the soil, and the height of the tree (Wullschlegler et al., 1998). With tree growth the capillary flow moves more and more toward the periphery of the trunk, and therefore the core loses its transport function which results in the loss of free water; however, the moisture content still remains above the fibre saturation point (FSP). The discoloured wood is often associated with increased moisture content and biological infection (Torelli, 1974).

Permeability of the wood has an important role in drying and impregnation processes as it determines the ease of water flow through a porous structure (Walker, 2006). Considering Darcy's law (eq. 1), the volumetric flow rate is directly proportional to the applied pressure difference, while gas compressibility is also taken into account in gas flow (eq. 2) (Siau, 1971, 1984).

$$k = \frac{V}{t} \frac{\eta L}{A \Delta P} \quad (1)$$

$$k_g = \frac{V}{t} \frac{\eta L P}{A \Delta P P_a} \quad (2)$$

Designation:

- k, k_g coefficient of liquid or gas permeability [$\text{m}^3/\text{m Pa s}$],
- V/t volumetric flow [m^3/s],
- L length of the specimen in the flow direction [m],
- A cross section area of specimen [m^2],
- ΔP pressure difference [Pa],
- η dynamic viscosity [Pa s],
- P_a average pressure [Pa],
- P pressure at which the liquid flow is determined [Pa].

Despite several limiting factors, Darcy's law remains the dominant starting point for studying the capillary flow of free water in wood. The movement of free water is certainly not limited with the size of cell lumens. The passages through the pits in the cell wall have a significantly more important role. Moreover, the inhomogeneity and incompressibility of the fluid, as well as independence from the specimen length and certain other restrictions, have been taken into consideration (Bramhall, 1971; Siau, 1971; Kumar, 1981). During liquid flow the flux effectiveness may be affected by the

appearance of air bubbles, plugged pores by particles and/or the occurrence of the slip effect (Resh & Ecklund, 1964; Comstock, 1967; Sabastian et al., 1973; Petty, 1975; Kumar, 1981; Salin, 2008).

In sapwood the pits are relatively open so water can flow smoothly from one lumen to another. Secondary processes of heartwood formation and compartmentalization processes after tree wounding cause aspiration of boarded pits and the formation of tyloses. In this way many pits between adjacent lumens are closed (Hansmann et al., 2002). In such cases, the free flow of capillary water is rather difficult, so the transport of water in the wood is limited by a much less efficient diffusion flow, which is otherwise characteristic of the transfer of bound water.

The capillary flow of free water from the core to the surface must be closely related to the evaporation rate into the surroundings, and therefore the constant drying rate is established which can be found at carefully dried low density or highly permeable wood species. The surface of less permeable wood dries quickly below the FSP, so often a considerable amount of free water remains trapped in the core. Further transport of water takes place only with a less efficient diffusion flow (Avramidis, 2008).

In the drying practice, more attention is paid to the diffusion flow of bound water, which is much slower than the capillary flow. Optimization of this drying interval results in greater time- and energy savings. When wood dries under the FSP, many physical, mechanical and chemical properties change dramatically, which significantly affects its final quality.

Fick's second law of diffusion usually represents the starting point to study the flow of bound water based on the molecular flow under the influence of a concentration gradient (eq. 3) (Crank, 1964).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (3)$$

Designation:

D diffusion coefficient [m^2/s],

$\partial c/\partial t$ bound water flow, i.e. time derivative of concentration of bound water [kg/s],

$\partial^2 c/\partial x^2$ second derivative of bound water concentration [kg/m^2].

Much research energy has been expended with the aim to bring the solution of Fick's law as close to actual water flow as possible (Avramidis, 2008).

There have been also many arguments about the effect of different factors that the law doesn't take into account. The discussion is related to driving potential (Hunter, 1993; Bramhall, 1976), nonisothermal diffusion (Siau & Babiak, 1983; Siau & Jin, 1985; Siau et al., 1986; Avramidis et al., 1987b), influence of moisture content (Stamm, 1967; Skaar, 1988; Choong, 1963, 1965; Rosen, 1976; Avramidis & Siau, 1987a; Wadso, 1994; Siau, 1984), surface phenomena (Rosen, 1978; Avramidis & Siau, 1987b; Cai & Avramidis, 1993; Siau & Avramidis, 1996; Wadso 1994), sorption hysteresis or history of specimen (Comstock, 1963; Siau, 1984; Salin, 2010) and the thickness of specimens (Remond et al., 2005; Straže & Gorišek, 2009)

The aim of this study was to investigate the wood of three tree species, black locust, horse chestnut and box elder, to determine their relevant drying characteristics. In addition, we determined the distribution of water in green wood, the types of water transport in wood, and the permeability and diffusivity of wood, which are of particular importance to select optimal drying schedules.

2 MATERIAL AND METHODS

2 MATERIAL IN METODE

For this study we selected: black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) and box elder (*Acer negundo* L.), which are considered invasive alien species present in sufficient quantity for potential wood utilization. We chose this selection because these wood species have very different densities, initial moisture contents (MC) and distributions, the presence of sapwood and heartwood, as well as discolorations and infections in standing trees.

Material for the drying experiments was selected in a park and three trees of each species were collected for examination (Table 1). Then, central radial boards from sawn timber were selected. A part of each central board was cut in 5 to 10 mm thick strips on which mean distance from the pith, mass and volume in green and oven dry state were measured for subsequent determination of the radial density and moisture content profile (Figure 1).

Drying kinetics were investigated on elements of three thicknesses (22 mm, 28 mm and 46 mm), and the same width (80 mm) and length (600 mm). Six samples were randomly selected for each experiment (Figure 2).

Table 1. Number of growth rings and diameter of the studied trees at the sampling point of the specimens. Preglednica 1. Število branik in premeri proučenih vzorčnih dreves na lokaciji vzorčenja.

Wood species / Lesne vrste	No. of tree / Št. drevesa	No. of growth rings at the sampling / Št. branik na vzorcu	Diameter of tree / Premer drevesa [mm]
<i>Robinia pseudoacacia</i> Black locust / Robinija	RoPs	1	149
		2	198
		3	207
<i>Aesculus hippocastanum</i> Horse chestnut / Divji kostanj	AeHi	1	289
		2	289
		3	256
<i>Acer negundo</i> Box elder / Amerikanski javor	AcNe	1	229
		2	189
		3	230



Figure 1. Samples cut from the central board to determine the radial density and moisture content profile (from periphery through pith to periphery of the stem) of box elder, horse chestnut and black locust.

Slika 1. Preizkušanci iz centralne deske za določanje radialnega gostotnega in vlažnostnega profila (od periferije preko stržena do periferije debla) za amerikanski javor, divji kostanj in robinijo.



Figure 2. Experimental drying chamber with wood samples.

Slika 2. Eksperimentalna sušilna komora s preizkušanci.



Figure 3. Samples for determination of the moisture content gradient and drying stresses.

Slika 3. Vzorčenje za določanje vlažnostnega gradienta in sušilnih napetosti.

Drying was carried out in controlled condition at two temperatures (20 °C and 40 °C) with a constant drying gradient. Every 24 to 48 hours each sample was weighed and three times during the process the moisture content gradient and drying stresses were determined (Figure 3).

The drying kinetics were studied by constructing a drying curve, which was divided into a constant drying rate section and a diffusion drying part. The drying rate of green wood was determined from the initial slope of the drying curve. Linearity was assessed with regard to the moisture content where a constant drying rate prevailed.

Due to the highly demanding drying of discoloured wood of box elder, we compared the drying rate with the permeability of each category of wood, i.e. sapwood, discoloured wood and heartwood. The gas permeability was determined in all anatomical directions on oriented specimens with a cross-sectional area of 15 mm × 15 mm, the length of the specimens was 15 mm when measured in the longitudinal direction and 5 mm measured in the tangential or radial directions. The coefficient of gas permeability was calculated from the derivation of Darcy's law for gases (eq. 2).

The diffusivity of wood for bound water was determined from a non-stationary experiment and by the analytical solution of the Fick's second law (eq. 3) for mass transfer in a thin plate with constant transfer coefficients. By introducing the dimensionless mass change (eq. 4) and conditions of constant diffusion coefficient, homogeneous initial distribution of moisture content and symmetrical distribution of moisture content through the cross

section of the sample, the diffusivity is expressed with equation 5. Additionally, the diffusion coefficient can also be determined from the half-drying time (eq. 6).

$$E = \frac{m(t) - m_f}{m_i - m_f} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{Dt}{l^2}} \quad (4)$$

$$D = \frac{\pi l^2}{4} \left(\frac{dE}{d\sqrt{t}} \right)^2 \quad (5)$$

$$D = \frac{1}{\pi^2} \ln \frac{\pi^2}{16} \left(\frac{l^2}{t_{1/2}} \right) = 0.049 \left(\frac{l^2}{t_{1/2}} \right) \quad (6)$$

Designation:

- E dimensionless mass [],
- $m(t)$ mass at time t [g],
- m_i, m_f initial (i) and final (f) mass [g],
- D coefficient of diffusivity [m^2/s],
- t time [s],
- $t_{1/2}$ half drying time [s],
- l half thickness of the specimen [m].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

At the beginning of the drying process the sawn timber contained approximately the same amount of water as in the living tree. Relatively low moisture content was detected in the case of black locust (Figure 4), which was partly the result of a pre-dried stem at the time of tree felling. Regarding the definition of moisture content (MC), due to the high density of the black locust wood

the amount of mainly bound water was substantially higher than in the lighter woods. As expected, the MC of sapwood was about two times higher than that of the heartwood.

Low density horse chestnut proved to have high and relatively evenly distributed water across the entire cross section. As the horse chestnut does not form heartwood, sporadically arranged wet pockets occasionally appeared as a result of tree response to mechanical injury. Because of their slightly darker appearance, wet pockets could be noticed visually.

While in the horse chestnut stem we did not detect a high difference of MC between sapwood and discoloured wood, greater differences in MC could be observed in box elder (Figure 4). Different amounts of water are associated with the visual assessment of colour, and specifically distinct and attractive red discoloration areas had slightly lower MC content compared to the areas of intense brown shades in which the infection was already widespread, as reported in a previous study

(Plavčak, 2018). Unstained wood was characterized by a lower MC, which could be partly also ascribed rapid drying of very permeable sapwood without discolouration.

The drying rate, calculated from the slope of the drying curve in the first period, could serve as an indicator of the ease of drying of green wood. It is believed that a constant drying rate is achieved when free water is maintained at the surface. For all tree species studied, lower drying rates were determined in boards of greater thickness (Table 2). The constant rate of drying was reached only in the thinner elements, whereas in the thicker ones the drying rate decreased immediately from the beginning of the procedure. It is believed that in this context the moisture transport in the dried material was insufficient to keep the surface moisture content above the FSP (Youngman et al., 1999; Hukka & Oksanen, 1999; Tremblay et al., 2000; Perre & Karimi, 2002).

The slowest drying was determined in the black locust at both temperature levels (Table 2). Due to low initial moisture content, the constant

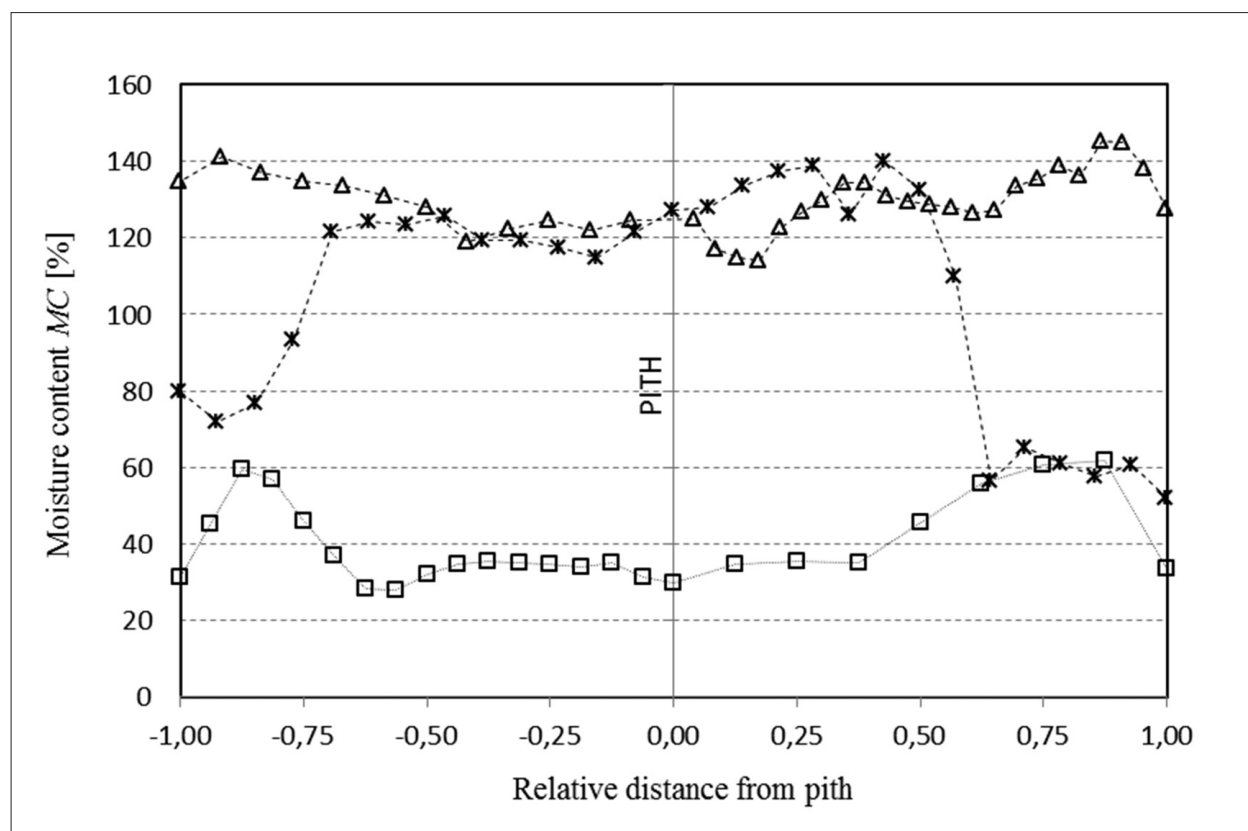


Figure 4. Radial moisture content distribution in the stems of (□) black locust, (Δ) horse chestnut and (×) box elder. Slika 4. Radialna porazdelitev vlažnosti v drevesu: (□) robinija, (Δ) divji kostanj in (×) ameriški javor.

drying rate period was very short, so the diffusion flow prevailed throughout most of the drying process. As expected, drying was faster at higher temperatures.

Drying of green horse chestnut and box elder wood was especially efficient at higher temperatures. Despite rapid drying, great care had to be taken when discoloured wood was present, as the high regular shrinkage of box elder wood in the discoloured region is often accompanied by collapse of the tissue (Merela et al., 2019). Collapse occurs

if the capillary tension, which is strongly dependent on wood permeability, exceeds the compression strength of wood. The comparison of gas permeability (eq. 4) (Gorišek & Straže, 2009) showed that the infected wood has the lowest conductivity, being 3.5 times less than sapwood and 1.3 times less than only discoloured wood (Table 3). The risk of collapse is more pronounced in infected wood because the biologically degraded cell walls cause greatly reduced strength. Due to its lower strength, drying of such wood at higher temperatures is more risky.

Table 2. The average value (bold) and standard deviation of the drying rate during the first drying period for black locust, box elder and horse chestnut for three thicknesses and at two temperature levels.

Preglednica 2. Povprečna vrednost (poudarjeno) in standardni odklon hitrosti sušenja v prvi fazi sušenja za robinijo, divji kostanj in ameriški javor pri treh debelinah in dveh temperaturah.

Thickness / Debelina [mm]	Drying rate within 1. period [%/day] / Sušenje v prvi fazi [%/dan]					
	T = 20 °C			T = 40 °C		
	Black locust / robinija	Horse chestnut / divji kostanj	Box elder / amerikanski javor	Black locust / robinija	Horse chestnut / divji kostanj	Box elder / amerikanski javor
22	0.62 0.055	1.31 0.042	1.36 0.047	1.41 0.440	5.94 1.805	6.51 1.581
28	0.47 0.042	1.69 0.311	1.43 0.172	0.69 0.180	4.92 0.992	9.04 2.214
46	0.34 0.065	1.05 0.151		0.54 0.299	4.70 1.929	

Table 3. Coefficients of gas permeability for sapwood, infected wood and discoloured wood of box elder.

Preglednica 3. Koefficient plinske permeabilnosti beljave, okuženega lesa in rdeče obarvanega diskoloriranega lesa ameriškega javorja.

	Sapwood / Beljava	Infected wood / Okužen les	Discoloured wood / Diskoloriran les
	Coefficient of permeability / Koefficient permeabilnosti k_g [m ³ /(m Pa s)]		
Average	1.59·10⁻⁷	4.53·10⁻⁸	5.53·10⁻⁸
St. deviation	7.24·10 ⁻⁸	1.49·10 ⁻⁸	1.41·10 ⁻⁸
c.v. [%]	45.5	32.9	25.5

Despite the fact that, especially in the case of lighter wood, the quantity of free water is much higher than the quantity of bound water, the time and also energy consumption primarily depend on the diffusion characteristics of wood and its ability to transport the bound water and water vapour.

Therefore, the coefficient of moisture diffusion is the most important factor affecting the drying rate.

In order to determine the diffusion characteristics, we placed wood specimens in a controlled climate chamber with constant temperature and relative humidity and monitored their change in weight

Table 4. The bound water diffusion coefficients for black locust, box elder and horse chestnut at two temperature levels.

Preglednica 4. Koeficient difuzivnosti vezane vode za les robinije, divjega kostanja in ameriškega javorja pri dveh temperaturah.

Thickness / Debelina [mm]	Diffusion coefficient / Difuzijski koeficient D [10 ⁻⁹ m ² /s]					
	Black locust / robinija		Horse chestnut / divji kostanj		Box elder / ameriški javor	
	T = 20 °C	T = 40 °C	T = 20 °C	T = 40 °C	T = 20 °C	T = 40 °C
46	0.39	0.43	0.83	0.96	0.42	0.99
28	0.73	0.83	1.84	2.03	0.85	1.98
22	2.84	2.73			3.51	5.24

change, and thus moisture content, as a function of time until equilibrium was achieved. From the drying curves (Figure 5) the coefficients of diffusivity and half-drying times were calculated for all tree species, thicknesses and temperature levels (eq. 5 and eq. 7).

The moisture transport in wood below the FSP is governed by more mechanisms, as follows: as bound water diffusion in the cell wall, as water vapour diffusion in the cell lumen as well as surface emission coefficient. Since bound water diffusion represents the greatest resistance, it also has a decisive effect on the apparent diffusion coefficient, so there is close correlation with the porosity or density of wood, as also confirmed by our measurements (Table 4). As expected, the denser black locust wood had the

lowest value of diffusivity, whereas the lighter horse chestnut and box elder performed better concerning the movement of bound water.

The bound-water diffusion coefficients were affected positively by the increase in temperature. The most pronounced influence of temperature was observed in box elder, while the effect was lower in the other two species. A higher coefficient of diffusivity was found for thinner elements, which could be attributed to stress relaxation.

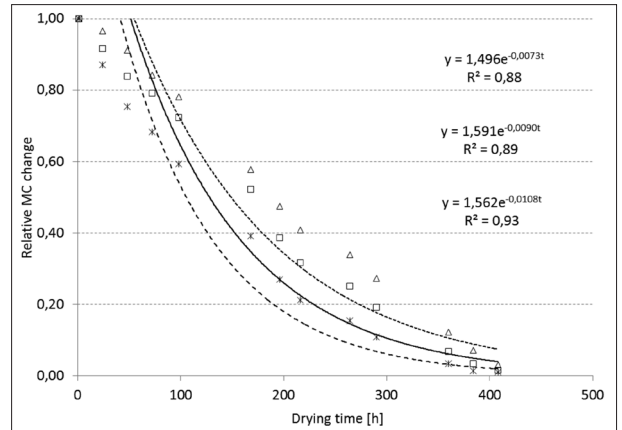
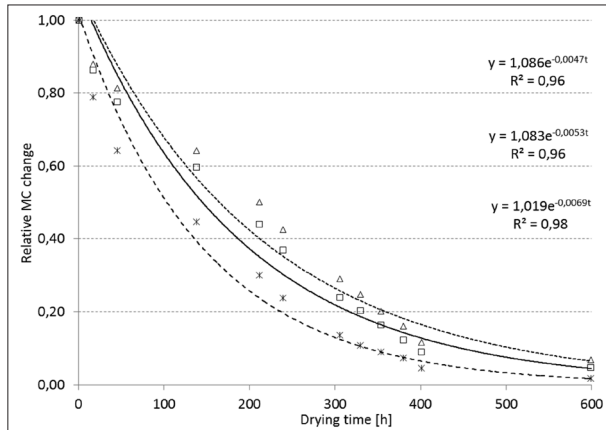
In terms of practical application, the expression of flow capability with half-drying time seems to be more useful (Table 5), and additionally supports the results given for the diffusion coefficient. We confirmed the reciprocal relationship between the two variables.

Table 5. The average value (bold) and standard deviation of half drying time for black locust, box elder and horse chestnut for three thicknesses at two temperature levels.

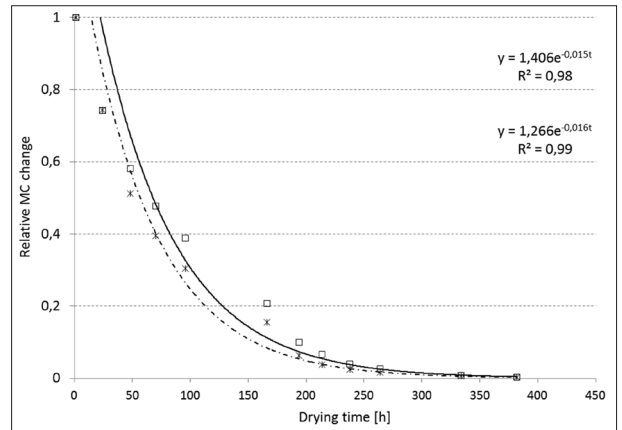
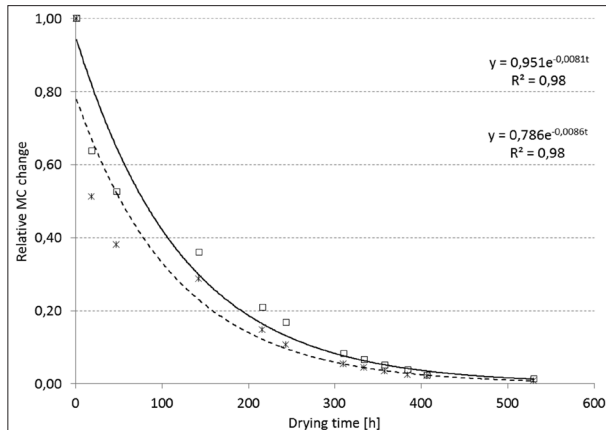
Preglednica 5. Povprečna vrednost (poudarjeno) in standardni odklon polovičnega časa sušenja robinije, divjega kostanja in ameriškega javorja pri treh debelinah in dveh temperaturah.

Thickness / Debelina [mm]	Half-drying time / Polovični čas sušenja t _{1/2} [h]					
	Black locust / robinija		Horse chestnut / divji kostanj		Box elder / ameriški javor	
	T = 20 °C	T = 40 °C	T = 20 °C	T = 40 °C	T = 20 °C	T = 40 °C
46	165 (10.6)	150 (9.1)	79 (9.2)	69 (8.4)	155 (10.9)	66 (8.2)
28	146 (10.7)	129 (8.8)	58 (6.9)	53 (7.2)	125 (11.9)	54 (6.1)
22	103 (9.6)	95 (9.1)			82 (9.1)	55 (6.2)

Black locust - *Robinia pseudoacacia*



Horse chestnut - *Aesculus hippocastanum*



Box elder - *Acer negundo*

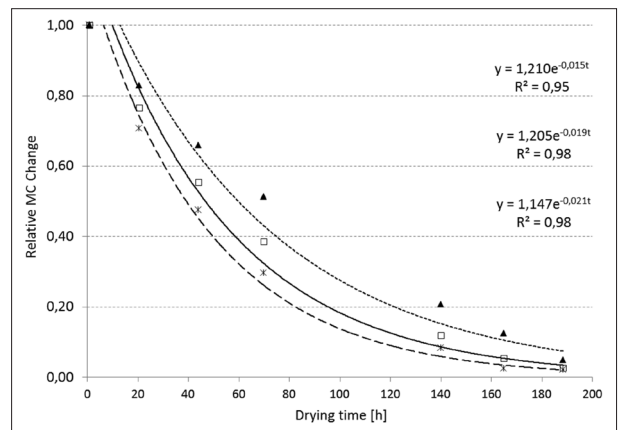
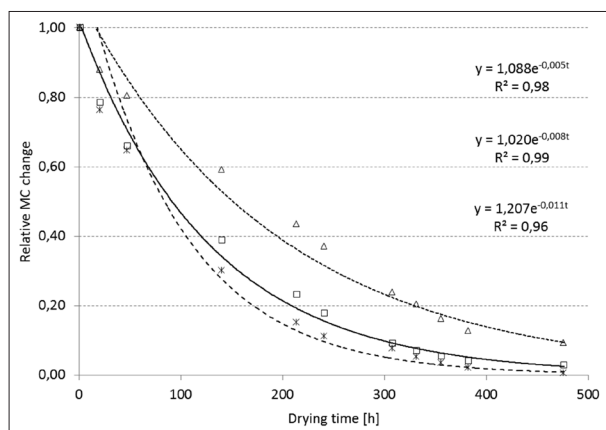


Figure 5. Drying curve of investigated wood species of three thicknesses (22 mm, 28 mm and 46 mm) at temperatures of 20 °C (left) and 40 °C (right).

Slika 5. Sušilna krivulja raziskanih lesnih vrst za tri debeline (22 mm, 28 mm in 46 mm) pri temperaturah 20 °C (levo) in 40 °C (desno).



Figure 6. Extreme collapse of infected tissue of box elder. Slika 6. Izrazito krčenje (kolaps) okuženega tkiva lesa ameriškega javorja.

Table 6. Moisture content gradient in black locust, box elder and horse chestnut for three thicknesses at two temperature levels.

Preglednica 6. Vlažnostni gradient v lesu robinije, divjega kostanja in ameriškega javorja pri treh debelinah in dveh temperaturah.

Thickness / Debelina [mm]	Black locust / robinija		Horse chestnut / divji kostanj		Box elder / ameriški javor	
	MC gradient / Vlažnostni gradient [%/cm]		MC gradient / Vlažnostni gradient [%/cm]		MC gradient / Vlažnostni gradient [%/cm]	
	T = 20 °C	T = 40 °C	T = 20 °C	T = 40 °C	T = 20 °C	T = 40 °C
46	0.19	0.91	0.88	1.23	0.27	0.88
28	1.27	0.41	0.23	0.49	0.41	2.77
22	2.61	0.97			1.54	4.19

The final control of the drying quality showed that, in accordance with the determined diffusion characteristics, the extent of moisture gradients (Table 6) and the generation of drying stresses can be predicted. The minor tensions in the black locust in particular are a reflection of its low shrinkage. Due to the tendency to collapse, careful drying of box elder is required above the FSP (Figure 6).

4 CONCLUSIONS 4 ZAKLJUČKI

In black locust, the radial distribution of moisture content in green logs had a pattern which is typical for species with heartwood. In box elder, the green moisture distribution varied significantly with randomly distributed areas of a very high level of moisture content, accompanied by discoloration and biological infection. Horse chestnut has relatively homogeneously distributed and high green moisture content.

The low bound-water diffusion coefficients and long half-drying times showed that black locust requires very slow and prolonged drying, as also

confirmed in practice (Merela et al., 2019). The diffusivity of horse chestnut and box elder proved to be moderate and therefore did not negatively affect the drying. However, the trapped free water in wet pockets (if present) should be considered.

Careful drying of discoloured wood of box elder is required above the FSP.

Considering the drying gradient and hardening after drying no special problems are expected when drying black locust, box elder and horse chestnut wood.

5 SUMMARY 5 POVZETEK

Raznovrstne oblike in privlačen videz so vzrok, da vse več drevesnih vrst razširjamo po neavtonomih rastiščih, kjer jih najpogosteje zasledimo v parkih, vrtovih in urbanem okolju. V takih okoljih so drevesa podrejena posebnim gojitvenim in obrezovalnim ukrepom, v več primerih pa njihovo razraščanje postane nekontrolirano in postanejo invazivne vrste. Zaradi značilnih rastnih pogojev in človeških posegov je zgradba lesa takih dreves zelo heterogena in odstopa od tiste, ki je značilna

za drevesa v naravnih sestojih: več je juvenilnega lesa, nastaja diskoloriran les zaradi odzivov dreves na poškodovanja. Več je vraslih grč in odklonov vlaken. Odziv dreves na pogosta poškodovanja se kaže v močnem otiljenju pri listavcih in v aspiraciji obokanih pikenj pri iglavcih. Posledica je lahko netipičen razpored vlažnosti, pojav mokrin in večja variabilnost vlažnosti po višini drevesa. Sušenje pogosto nekoliko redkejšega lesa s slabšimi mehanskimi lastnostmi in s pogostimi biološkimi okužbami je zelo težavno, zato se v sušilnem procesu ne moremo zanesti na standardne sušilne programe. Zaradi slabe permeabilnosti lesa teh vrst se pri sušenju pojavijo težave že v prvi fazi, več težav je tudi pri impregnaciji lesa.

Za raziskave smo izbrali tri drevesne vrste, ki bi jih zaradi razpoložljivih količin lesa lahko gospodarsko izkoriščali. To so: robinija - *Robinia pseudoacacia*; ameriški javor – *Acer negundo* in divji kostanj – *Aesculus hippocastanum*. Za vse vrste smo določili radialni razpored vlažnosti na vzorcih svežega lesa. Vzorce svežega lesa treh debelin (22 mm, 28 mm in 46 mm) smo sušili pri konstantni ostrini sušenja pri dveh temperaturah (20 °C in 40 °C). Za vsako lesno vrsto, debelino in temperaturo smo za sušenje izbrali šest preizkušancev. Kakovost sušenja smo vzporedno preverjali z določevanjem vlažnostnega gradienta, merjenjem sušilnih napetosti in zaznavanjem tipičnih sušilnih napak veženja, razpok, itd. (Slika 2).

Iz začetnega linearnega dela sušilne krivulje smo izračunali hitrost sušenja, iz relativne spremembe mase pa smo izračunali difuzijske koeficiente in polovične uravnovesne čase. Zaradi intenzivnih obarvanj in okužb smo pri javorju izmerili tudi prevodnost beljave, rdeče obarvanega diskoloriranega lesa in rjavega že okuženega lesa.

Radialni vlažnostni profil pri robiniji je bil sicer tipičen (Slika 4), z višjo vlažnostjo beljave in nižjo vlažnostjo jedrovine, vendar še vedno nad točko nasičenja celičnih sten. Nekoliko nižje vrednosti od pričakovanih pripisujemo temu, da so se po poseku debla že nekoliko osušila. Za divji kostanj je bila značilna visoka vlažnost po celotnem prečnem prerezu, javor pa je imel zelo neenakomerno razporejeno vlažnost z nekoliko višjimi vrednostmi v rdeče obarvanih in z visoko vlažnostjo v rjavo obarvanih območjih v deblu.

Ugotovili smo, da je hitrost sušenja v začetni fazi največja pri redkejšem lesu divjega kostanja in najmanjša pri robiniji, kjer se je zaradi nizke začetne

vlažnosti ta faza zelo hitro zaključila. Z dodatnimi merjenji permeabilnosti smo ugotovili, da je beljava zelo permeabilna, medtem ko sta bili obe obarvani področji zelo slabo permeabilni.

Slabo difuzivnost robinje potrjujejo tako nizki difuzijski koeficienti (Preglednica 4) kot tudi daljši polovični uravnovesni časi sušenja (Preglednica 5). Rezultati niso presenetljivi, saj je sposobnost lesa za prevajanje vezane vode odvisna od poroznosti oziroma gostote, saj robinijo uvrščamo v skupino gostejših lesnih vrst, ki je pogosto tudi intenzivno otiljena. Zaradi manjšega deleža beljave pri robiniji nismo mogli narediti ustreznih vzorcev in izvesti primerjave med beljavo in jedrovino. Da so izračunani difuzijski koeficienti pri debelejših sortimentih manjši, je potrjeno tudi v literaturi (Remond et al. 2005; Straže & Gorišek, 2009). Difuzijske karakteristike lesa divjega kostanja in javorja so bile podobne in v pričakovani korelaciji z gostoto.

Vlažnostni gradienti so bili pri vseh vrstah relativno nizki, zato tudi niso nastale velike sušilne napetosti in les ni razpokal. Zaradi velike nevarnosti kolapsa je nujno previdno sušenje sveže javorovine, zaradi večjega števila grč in večjih odklonov vlaken pa je pogostejše veženje. Polovično uravnovesni časi kažejo na dolgotrajnejše sušenje debelejših sortimentov robinije, zelo previdno pa je treba sušiti tudi javorovino.

ACKNOWLEDGEMENTS

ZAHVALE

This research was done within the project AP-PLAUSE (UIA02-228) co-financed by the European Regional Development Fund through the Urban Innovative Actions Initiative (www.ljubljana.si/en/applause/) and Program P4-0015, supported by the Slovenian Research Agency (ARRS). The authors would like to thank to Luka Krže and Jože Planinšič for their immense help with sample preparation.

REFERENCES

VIRI

- Avramidis, S. (2008). Bound water migration in wood. *Advances in the drying of wood*. Cost E 15. 26.
- Avramidis, S., & Siau, J. F. (1987a). Experiments in nonisothermal diffusion of moisture in wood. Part 3. *Wood Science and Technology*, 21(4), 329-334.

- Avramidis, S., & Siau, J. F. (1987b). An investigation of the external and internal resistance to moisture diffusion in wood. *Wood Science and Technology*, 21(3), 249-256.
- Bauch, J. (1984). Discolouration in the wood of living and cut trees. *IAWA Bulletin* (5), 92-98.
- Bosshard, H. (1967). Facultative formation of coloured heartwood. *Holz als Roh und Werkstoff*, 25(11), 409-416.
- Bosshard, H. H. (1965). Aspect of the aging process in cambium and xylem. *Holzforschung*, 19, 65-69.
- Bosshard, H. H. (1967). *Holzkunde. Band 2. Zur Biologie, Physik und Chemie des Holzes*. Basel und Stuttgart, Birkhäuser.
- Bramhall, G. (1971). The validity of Darcy's law in the axial penetration of wood. *Wood Science and Technology*, 5, 121-134.
- Bramhall, G. (1976). Fick's law and bound water diffusion. *Wood Science*, 8(3), 153-161.
- Cai, L., & Avramidis, S. (1993). A study on the separation of diffusion and surface emission coefficients in wood. *Drying Technology*, 15, 1457-1473.
- Choong, E. T. (1963). Movement of moisture through a softwood in the hygroscopic range. *Forest Products Journal*, 13(11), 489-498.
- Choong, E. T. (1965). Diffusion coefficient of softwoods by steady-state and theoretical methods. *Forest Products Journal*, 15(1), 21-27.
- Comstock, G. L. (1967). Longitudinal permeability of wood to gases and nonswelling liquids. *Forest Products Journal*, 18 (8), 20-23.
- Comstock, G.L. (1963). - Moisture diffusion coefficients in wood as calculated from adsorption, desorption and steady-state data. *Forest Products Journal*, 13(3), 97-103.
- Crank, J. (1964). *The Mathematics of Diffusion* (Clarendon, Oxford).
- Dinwoodie, J. M. (2000). *Timber: Its structure and behaviour*. New Fetter Lane. London. 257.
- Gorišek, Ž., & Straže, A. (2009). Kinetika sušenja prevodne beljave in rdečega srca bukovine (*Fagus sylvatica* L.). *Les*, 60 (7/8), 255 - 262.
- Gorišek, Ž., Straže, A., & Lapajne, I. (2008). Primerjava hitrosti in kakovost različnih tehnik sušenja bukovine (*Fagus sylvatica* L.) (Comparison of drying kinetics and quality of beechwood (*Fagus sylvatica* L.) dried by various techniques). *Les*, 60 (7/8), 268 - 274.
- Hansmann, C., Gindl, W., Wimmer, R., & Teichinger, A. (2002). Permeability of wood - a review. *Wood Research*, 47(4), 1-16.
- Hukka, A., & Oksanen, O. (1999). Convective mass transfer coefficient at wooden surface in jet drying of veneer. *Holzforschung*, 53, 204-208.
- Hunter, A. J. (1993) On movement of water through wood - The diffusion coefficient. *Wood Science and Technology*, 27(6), 401-408.
- Koch, G., Bauch, J., Puls, J., Schwab, E., & Welling, J. (2000). Vorbeugung gegen Verfärbungen von Rotbuche. *HolzZentralblatt*, 126 (6), 1 -3.
- Koch, G., Puls, J., & Bauch, J. (2003). Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung*, 57, 339345.
- Kučera, L. (1971). Wundgewebe in der Eibe (*Taxus baccata* L.). *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich*, 117, 445 - 28-33.
- Kumar, S. (1981). Some aspects of fluid flow through wood. Mechanism of flow. *Hlozforschung und Holzwertung*, 33 (2), 28-33.
- Merela, M., Humar, M., Kariž, M., Šega, B., Žigon, J., Fajdiga, G., Merhar, M., Vek, V., Poljanšek, I., Oven, P., Krapež, D., Vivod, B., Straže, A., Gorišek, Ž., Čufar, K., Krže, L., Petrič, M., Pavlič, M., Gornik Bučar, D., Šernek, M., Balzano, A., Vidic, D., Planinšič, J., & Rajh, D. (2019). WP4 Identification, collection and processing of IAPS: A.4.1 - Analysis of structure and relevant properties of selected IAPS: D 4.1.2 - Laboratory analysis of suitability for processing into wood product for 17 woody IAPS. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo.
- Načesany, V. (1966). Die Vitalität der Parenchymzellen als physiologische Grundlage der Kernholzbildung. *Holzforschung und Holzwertung*, 18(4), 61-65.
- Nečesany, V. (1969). Forstliche Aspekte bei der Entstehung des Falschkerns der Rotbuche. *Holz - Zentralblatt*, 95, 563-564.
- Perre, P., & Karimi, A. (2002). Fluid migration in two species of beech (*Fagus sylvatica* and *Fagus orientalis*): a percolation model able to account for macroscopic measurements and anatomical observations. *Maderas: Ciencia y Tecnologia*, 4, 50-68.
- Petty, J. A. (1975). Relation between immersion time and absorption of petroleum distillate in a vacuum-pressure process. *Holzforschung*, 29, 113-118.
- Plavčak, D., Gorišek, Ž., Straže, A., & Merela, M. (2018). Drying characteristics of sapwood, discoloured wood and infected wood of box elder (*Acer negundo* L.). 8th Hardwood conference. Sopron.
- Racz, J., Schulz, H. & Knigge, W. (1961). Untersuchungen über das Auftreten des Buchenrotkerns. *Forst- und Holzwirtschaft*, 16, 1-5.
- Ramagea, M. H., Burridgeb, H., Busse-Wicherc, M., Feredaya, G., Reynoldsd, T., Shaha, D. U., Wud G., Yuc, L., Fleminga, P., Densley-Tingleye, D., Allwoode, J., Dupreec, P., Lindenb, P. F., & Schermanea, O. (2017). The wood from the trees: The use of timber in construction. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 333-359.
- Remond, R., Perre, P., & Mougel, E. (2005). Using the concept of thin dry layer to explain the evolution of thickness, temperature and moisture content during convective drying of Norway spruce boards. *Drying Technology*, 23, 249271.
- Resh, H., & Ecklund, B. A. (1964). Permeability of wood. Exemplified by measurements on redwood. *Forest Product Journal*, 14, 199-206.
- Rosen, H. N. (1976). Exponential dependency of the moisture diffusion coefficient on moisture content. *Wood Science*, 8 (3), 174-179.
- Rosen, H. N. (1978). The influence of external resistance on moisture adsorption rates in wood. *Wood and Fiber*, 10 (3), 218-228.
- Sachsee, H. (1965). Untersuchungen über den Einflüsse der Ästung auf die Farbkern und Zugholzausbildung einiger Pappelsorten. *Holz als Roh und Werkstoff*, 23(11), 425 434.

Plavčak, D, Gorišek, Ž., Straže, A., & Merela, M.: Drying characteristics of wood of invasive tree species growing in an urban environment

- Salin, J. G. (2010). Problems and solutions in wood drying modelling: History and future. *Wood Material Science & Engineering*, 5, 123-134.
- Salin, J. G. (2008). Drying of liquid water in wood as influenced by the capillary fiber network. *Drying Technology*, 26, 56056.
- Sebastian, L. P., Siau, J. F., & Skaar C. (1973). Unsteady-state axial flow of gas in wood. *Wood Science*, 6 (2), 167-174.
- Siau, J. F. (1984). *Transport processes in wood*. Springer, Berlin.
- Siau, J. F. (1971). *Flow in Wood*. Syracuse Wood Science Series.
- Siau, J. F., & Avramidis, S. (1996). The surface emission coefficient for wood. *Wood and Fiber Science*, 28, 178185.
- Siau, J. F., & Babiak, M. (1983). Experiments on nonisothermal moisture in wood. *Wood and Fiber Science*, 15(1), 40-46.
- Siau, J. F., & Jin, Z. (1985). Nonisothermal moisture diffusion experiments analyzed by four alternative equations. *Wood Science and Technology*, 19(2), 151-157.
- Skaar, C. (1988). *Wood-water relations*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Stamm, A. J. (1967). Movement of fluids in wood – Part II. Diffusion. *Wood Science and Technology*, 1, 205-230.
- Straže, A., & Gorišek, Ž. (2009). Research on internal and external mass transfer at convective drying of European beechwood (*Fagus sylvatica* L.). Wood EDG conference.
- Torelli, N. (1974). Biološki vidiki ojedritve s poudarkom na fakultativno obarvani jedrovini (rdečem srcu) pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.). *Gozdarski vestnik*, 32(7/8), 253-281.
- Torelli, N. (1984). The ecology of wood as illustrated by beech (*Fagus sylvatica* L.). *IAWA Bulletin*, 5(2), 121-127.
- Tremblay, C., Cloutier, A., & Fortin, Y. (2000). Experimental determination of the convective heat and mass transfer coefficients for wood drying. *Wood Science and Technology*, 34, 253-276.
- Tyree, M. T., & Zimmermann, M. H. (2002). *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Wadso, L. (1994). Unsteady-state water-vapor adsorption in wood: An experimental study. *Wood and Fiber Science*, 26, 36-50.
- Walker, J. C. F. (2006). *Primary Wood Processing: Principles and Practice* 2nd edition. Springer.
- Wullschleger, S. D., Meinzer, F. C., & Vertessy, R. A. (1998). A review of whole-plant water use studies in tree. *Tree Physiol.*, 18(8-9), 499-512.
- Youngman, M. J., Kulasiri, G. D., Woodhead, I. M., & Buchan, G. D. (1999). Use of a combined constant rate and diffusion model to simulate kiln-drying of *Pinus radiata* timber. *Silva Fennica*, 33, 317-325.
- Zobel, B. J., & van Buijtenen, J. P. (1989). *Wood variation. Its causes and control*. Springer Series in Wood Science.

ADHEZIJA BAKTERIJ NA LESNE PREMASE

ADHESION OF BACTERIA TO WOOD COATINGS

 Klemen Bohinc^{1*}, David Kekec², Marko Petrič^{2**}

UDK 630*829.1:577:539.61

 Original scientific article / *Izvirni znanstveni članek*

 Received / *Prispelo*: 6. 11. 2019

 Accepted / *Sprejeto*: 28. 11. 2019

Izvleček / Abstract

Izveček: Bakterijska adhezija na površinah in pozneje nastanek biofilma predstavljata glavni vzrok kroničnih okužb z negativnim vplivom na zdravje ljudi. S tem izzivom se srečujemo tudi pri izbiri in izdelavi pohištva, kjer stremimo k razvoju izdelkov s takšnimi površinami, na katere naj se bakterije ali drugi mikroorganizmi praviloma ne bi oprijemali. Predmet naše raziskave je bil testirati izbrana premazna sredstva za les (laneno olje, vodna lazura, nitrocelulozni lak, nanopremaz) na adhezijo bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa*, kjer smo kot testno površino uporabili vezano bukovo ploščo. Topografijo testne površine in število oprijetih bakterij *P. aeruginosa* smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in na posnetkih SEM identificirali in prešteli bakterije. Rezultati nakazujejo, da se je največje število bakterij oprijelo na površini, premazani z lanenim oljem. Za potrditev in pridobitev relevantnih rezultatov bodo v prihodnosti potrebne obširnejše in bolj poglobljene študije.

Ključne besede: les, nanopremaz, laneno olje, nitrocelulozni lak, adhezija bakterij, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract: Bacterial adhesion to surfaces and subsequent biofilm formation are the main causes of chronic infections with a negative impact on human health, and this is a problem in the process of manufacturing furniture. This is an important issue, relevant also to the selection and production of furniture, where there is a focus on the development of products with antibacterial surfaces to which microorganisms do not adhere. The focus of our research was to test selected wood coatings (linseed oil, water-borne stain, nitrocellulose varnish, nano-coating) with regard to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, where we used a beech plywood as the test surface. The topography of the test surfaces and the number of adhered bacteria were observed on SEM micrographs. The results indicate that the maximum number of bacteria adhered to the surface coated with linseed oil. In the future, extensive and in-depth studies will be needed to confirm and obtain the required results.

Keywords: wood, nano-coating, linseed oil, acrylic stain, nitrocellulose lacquer, bacterial adhesion, *Pseudomonas aeruginosa*

1 UVOD

1 INTRODUCTION

Starajoča se populacija skupaj s pričakovanji po boljšem življenjskem standardu povečuje potrebe po izdelkih, ki bodo izboljšali kvaliteto življenja, zdravje in higienske razmere. Da bi starejšim ter osebam s posebnimi potrebami omogočili aktivno in kolikor je le mogoče samostojno življenje, narašča potreba po pohištvu z integriranimi bioaktivnimi funkcijami (De Jaeger, 2017). V to skupino sodi tudi pohištvo z antibakterijskimi površinami

(De Jaeger, 2017a). S tega vidika so gotovo zelo pomembne raziskave adhezije bakterij na različne površine, saj so bakterijske infekcije zelo pomemben izziv na področju javnega zdravja (Blackledge et al., 2013). Bakterijska adhezija na površine in pozneje nastanek biofilma sta glavna vzroka kroničnih okužb (Gu & Ren, 2014), ki negativno vplivajo na zdravje ljudi in povzročajo razne zdravstvene težave. Pogostokrat smo takšnim okužbam najbolj izpostavljeni v okoljih kot so bolnišnice, javne kuhinje, pisarne, šole in ne nazadnje stanovanjski prostori, kjer lahko bakterije kljub skrbi za čistočo tvorijo biofilme, bodisi na delovnih površinah, tleh, inventarju, pohištvu (Singh & Dawson, 2011; Bohinc et al., 2014; Alarfaj et al., 2016). Bakterijska adhezija je tako postala velik problem tako v različnih industrijskih panogah kot v zasebnih sta-

¹ Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena 5, 1000 Ljubljana

* e-pošta: klemen.bohinc@zf.uni-lj.si

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

** e-pošta: marko.petric@bf.uni-lj.si

novanjskih prostorih (Garrett et al., 2008; Myszka & Czaczyk, 2011; Bohinc et al., 2014).

Namen članka je zato v prvem delu osvetliti pomembnost poznavanja procesov adhezije bakterij na površine različnih materialov. V drugem delu članka pa podajamo rezultate preliminarne raziskave, s katero smo ugotavljali, ali lahko obstoječe uveljavljene metode za določanje bakterijske adhezije uporabimo tudi za les, površinsko obdelan z nekaterimi površinskimi premazi in ali je te metode potrebno prilagoditi tem specifičnim podlagam. Prav tako smo ugotavljali, kakšna je adhezija bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* na površino vezane bukove plošče in plošče, ki smo jo površinsko obdelali z nekaterimi izbranimi premazi. Zaradi majhnega števila preskušancev rezultatov nismo statistično ovrednotili, tako smo najprej želeli ugotoviti, ali obstajajo indikacije za morebitno različno dovzetnost različnih premazov za oprijem bakterij.

1.1 ADHEZIJA BAKTERIJ NA POVRŠINE RAZLIČNIH MATERIALOV

1.1 ADHESION OF BACTERIA ON SURFACES OF VARIOUS MATERIALS

Do kolonizacije bakterij in nastanka biofilmov na različnih površinah pride tako, da se bakterijske celice pritrdijo na površino, ki jim zagotavlja optimalne pogoje za razmnoževanje. Proces bakterijske adhezije je odvisen od fizikalnih in kemijskih interakcij med bakterijami in površino, na katero se bodo oprijele. Če bodo za določeno vrsto mikroorganizmov pogoji optimalni, bodo kolonizirali površino in tvorili biofilme. Kljub vsemu lahko adhezijo bakterij na različne površine z nadzorom in primerno izbiri površine tudi preprečimo (Bohinc et al., 2014).

Na adhezijo vplivajo najrazličnejše lastnosti površin kot so npr. površinski naboj, prosta površinska energija, hrapavost in topografija ali celo togost (Song et al., 2015). Avtorji ugotavljajo, da se v splošnem adhezija bakterij zmanjša, če so površine hidrofobne, hrapavost površine nanometrski ter prosta površinska energija čim manjša. V literaturi najdemo študije o oprijemu bakterij na najrazličnejše materiale, kot so npr. steklo (Bohinc et al., 2014; Oder et al., 2015), nerjavno jeklo (Fink et al., 2015; Bohinc et al., 2016), silicijev dioksid s plastmi polielektrolita (Kovačević et al., 2016), površine biomaterialov (Reid, 1997), ali npr. polietilen tereftalat (Gil-

lett et al., 2015). Številne študije so preučevale vpliv hrapavosti specifičnih površin na adhezijo bakterij. Bohinc et al. (2016) so raziskovali vpliv različnih hrapavosti ploščic nerjavnega jekla. Površino ploščic so spremenili s tridimenzionalnim poliranjem, krtačenjem, brušenjem in elektro poliranjem. Ploščice so prelili z bakterijsko kulturo in jih inkubirali pri 37 °C za 24 ur. Ugotovili so, da večja hrapavost površine signifikantno vpliva na adhezijo bakterij. Podobne rezultate beležijo pri raziskavi, izvedeni na steklenih površinah. Z večanjem hrapavosti steklene površine se adhezija bakterij povečuje (Bohinc et al., 2014). Na primeru nerjavnega jekla so Fink et al. (2015) proučevali vpliv toka tekočine in temperature za odstranitev bakterij z jeklenih nerjavčnih površin dveh različnih hrapavosti. Ugotovili so, da s turbulentnim tokom odstranijo značilno več bakterij kot z laminarnim tokom. Sredstvo, ki so ga uporabljali za izpiranje, je bil fosfatni pufer. Velik vpliv na odstranitev bakterij je imela tudi temperatura, kjer se je za najbolj učinkovito izkazala višja temperatura (37 °C). Prav tako so bila objavljena poročila o mikrobnih adheziji na različne premaze, polimerne filme, ipd. Kar nekaj let se nanaša na aplikacije v dentalni medicini (Pereira et al., 2011; Chau et al., 2014), veliko člankov pa je s področja premazov proti obraščanju morskih organizmov oz. antivegetativnih premazov (Dobretsov & Thomason, 2011; Xu et al., 2016). Po našem znanju je v literaturi manj poročil o adheziji bakterij na polimerne filme, ki so po svojih lastnostih podobni tistim, ki jih uporabljamo v obliki premazov za les. Tako so Bakker et al. (2003) raziskovali depozicijo treh morskih sevov bakterij z različno vodoodbojnostjo celičnih sten iz umetne morske vode na poliuretanske premaze različne površinske napetosti in modula elastičnosti. Z adhezijo bakterij na funkcionalizirane poliuretane so se ukvarjali Flemming et al. (1999). Med pomembnimi dejavniki za adhezijo se je pokazala tudi prisotnost adhezivnih proteinov. V drugi študiji (Teixeira et al., 2006) so raziskovali adhezijo bakterij na urea-uretanske kopolimerne filme z elastomernimi lastnostmi in pokazali, da običajen pojav povečanja stopnje adhezije bakterij z naraščajočo hrapavostjo ne velja v vseh primerih. Izkazalo se je, da pri tem materialu za adhezijo pomembno vlogo igrata tako topografija površine, kakor tudi ločitev vodoodbojne in hidrofilne faze elastomera. Podobne raziskave so bile izvedene tudi na filmih poli(metil metakrilat)-a

(Iguerb & Bertrand, 2008) in ostalih poli(metakrilat)-ov (Ibanescu et al., 2016).

Precej pozornosti je pritegnila adhezija mikrobov na les. Soumya et al. (2012) so raziskovali medfazno prosto površinsko energijo med mikrobnimi celicami in površinami lesa šestih različnih vrst (cedrovina, hrastovina, bukovina, jesenovina, borovina in tikovina) z namenom napovedi, kateri bakterijski sevi imajo večjo zmožnost oprijema na površine lesa. Ugotovili so, da o adheziji mikrobov na les ni mogoče podati splošnih sklepov in da je oprijem bakterij zelo specifičen, tako glede na vrsto bakterije kot tudi vrsto lesa. Ista skupina avtorjev (Soumya et al., 2012a) se je tudi sicer ukvarjala z adhezijo bakterij na cedrovino. Kandelbauer & Widsen (2009) sta obravnavala različne metode, ki so ali bi lahko bile na voljo za izboljšanje higienskih lastnosti lesnih materialov, ki so prekriti z melaminskimi prevlekami. Vendar se avtorja nista ukvarjala z mehanizmi adhezije, temveč predvsem z vprašanjem, kako povečati antibakterijske lastnosti takih površin.

Očitno je, da je oprijem bakterij na lesne premaze specifična tema, ki bi v prihodnosti morala biti obravnavana bolj temeljito.

1.2 ADHEZIJA BAKTERIJ IN TVORBA BIOFILMA

1.2 ADHESION OF BACTERIA AND FORMATION OF BIOFILM

Proces adhezije je osnovan na kemijskih in fizikalnih interakcijah med mikroorganizmi in kontaktno površino. Gre za tako imenovani prvi korak vezave mikroorganizmov na površino (Bohinc et al., 2014) ter kolonizacije in nastajanja biofilmov (Hori & Matsumoto, 2010). Med mikroorganizmi predstavljajo bakterije glavne gradnike biofilmov (Hori & Matsumoto, 2010). Proces oprijemanja bakterijskih celic na površino določajo različni dejavniki kot so: lastnosti površine in mikrotopografija, sestava površine, hrapavost, površinska napetost, hidrofobnost, bakterijski površinski naboj, velikost in lastnosti celice (giblјivost bakterij), masni transport, temperatura, pH, vlažnost ... (Palmer et al., 2007). Bistvenega pomena je fizikalno-kemijska lastnost bakterijske celice oz. lastnost njene celične stene. Pri tem je zelo pomemben polimer peptidoglikan, ki določa lastnosti celične stene. Glede na koncentracijo oz. prisotnost peptidoglikana v bakterijskih celičnih stenah razlikujemo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Zelo visoke koncentracije le-te

ga vsebuje celična stena po Gramu pozitivnih bakterij, v nasprotju s celičnimi stenami po Gramu negativnih bakterij. Značilnost celične stene po Gramu negativnih bakterij je kompleksnejša ovojnica, kjer je citoplazma omejena s tanko plastjo iz peptidoglikana, ki jo ločuje od zunanje celične membrane. Kakorkoli pa prisotnost peptidoglikana in ostalih makromolekul (teihoična kislina, lipoteihoična kislina, lipoproteini in lipopolisaharidi, encimi ter mikolna kislina), predstavljajo pomembne gradnike celičnih sten bakterij, saj so v večini polielektroliti, ki določajo površinski naboj celične stene. Na primer, če je površinski naboj celične stene negativen, naboj površine pa pozitiven, le-to neugodno vpliva na adhezijo, kar pogojuje elektrostatična odbojna sila, ki drži bakterijske celice na kratki razdalji v stran od površine. Elektrostatični odboj med celico in površino lahko bakterije premagajo s pomočjo molekularnih interakcij adhezinov (fimbriji, flagele ali lipopolisaharidi - LPS), ki so lokalizirani na celični steni (Hori & Matsumoto, 2010; Bohinc et al., 2014).

Temeljna faza bakterijske adhezije je v splošnem opisana z dvostopenjskim modelom kinetične vezave. Prva oz. začetna faza je opisana kot hitra in enostavna reverzibilna interakcija med površino bakterijske celice ter kontaktno površino. Na adhezijo bakterij imajo vpliv v glavnem Van der Waalsove sile, elektrostatske sile, hidrofobni učinki in kontaktne interakcije. V glavnem interakcijo proste energije pri procesu adhezije opredeljujeta dva minimuma. V fazi prvega minimuma so bakterije šibko in reverzibilno vezane na površino, kar predstavlja kemijske interakcije med bakterijami in površino na razdalji približno 10 nm. V drugi fazi potekajo interakcije med tako imenovanimi adhezijskimi beljakovinami na površini bakterijskih adhezinov (pili ali fimbriji) in vezavnimi molekulami na površini kontaktnega materiala na razdalji pod 1 nm. V tej fazi so bakterije močno in ireverzibilno adherirane (Bohinc et al., 2014).

Tvorba in nastajanje biofilma se začne, ko se bakterije oprimejo določene površine (Palmer et al., 2007; Tolker-Nielsen, 2014), kjer so prisotna hranila (Bohinc et al., 2014). Biofilme sestavljajo celice in zunajcelične polimerne snovi, ki so produkti bakterij (Garrett et al., 2008; Tolker-Nielsen, 2014). V naravi okoli 99 % mikroorganizmov tvori biofilm (Garrett et al., 2008) oz. tako imenovane mikrobne skupnosti, ki so združene v svojih zunajceličnih pro-

duktih (Tolker-Nielsen, 2014). Ena izmed ključnih lastnosti biofilmov je ta, da lahko bakterije v neugodnih razmerah preživijo (Garrett et al., 2008), ter da jih le-ti ščitijo pred protimikrobnimi vplivi (Garrett et al., 2008; Tolker-Nielsen, 2014). Večjo odpornost bakterij v biofilmih povezujejo s počasnejšo rastjo bakterij v globljih slojih biofilma in z matriksom biofilma, ki ga obdaja, ter tako s tem omejuje penetracijo škodljivih delcev v notranjost (Jefferson, 2004). Myszka & Czaczyk (2011) opredeljujeta formiranje biofilma kot petstopenjski proces. Prvo stopnjo procesa predstavlja vezava planktonskih mikroorganizmov na trdne površine, prvi stopnji sledi druga s pritrditvijo bakterij s proizvodnjem zunajceličnih polimerov. Pri tretji stopnji gre za zgodnji razvoj biofilma, medtem ko se pri četrti stopnji mikrobne skupnosti razvijejo v zrel biofilm. Zadnja, peta stopnja tega procesa pa je disperzija celic iz biofilma v okolico.

1.3 VPLIVI NA ADHEZIJO BAKTERIJ

1.3 INFLUENCES ON ADHESION OF BACTERIA

Za dobro razumevanje adhezije bakterij na materialne površine je potrebno poznati značilnosti površine. Med parametri omenimo najprej hrapavost površin, ki jo lahko izmerimo z mikroskopom na atomsko silo ali s profilometrom. Napravi delujeta na principu kontaktnega gibanja tipala po merjeni površini in shranjevanju premikov v pomnilnik podatkov. Iz izmerjenih premikov lahko izračunamo aritmetično srednjo hrapavost R_a ali hrapavost R_q . V večini primerov se na bolj hrapave površine adherira več bakterij kot na bolj gladke površine. Z naraščajočo hrapavostjo se namreč veča tudi razpoložljiva površina za bakterijsko adhezijo (Bohinc et al., 2014, Bohinc et al., 2016). Neregularnosti in defekti na površini dodatno povečajo stopnjo adhezije, saj se na ta način verjetnost za oprijem površine še poveča.

Drugi parameter je hidrofobnost. Le-to določimo z merjenjem mejnega kota. Na površino kane kapljico kapljevine in z goniometrom izmerimo kot med površino kapljevine in površino materialne površine. Bakterije s hidrofobnimi lastnostmi preferirajo interakcijo s hidrofobnimi površinami. Hidrofilne bakterije imajo preferenco, da se oprijejo hidrofilne površine. Poleg tega se hidrofobne bakterije bolje in močnejše oprimejo površine kot hidrofilne (Van Loosdrecht et al., 1987); stopnja

bakterijske adhezije je povezana z naraščanjem hidrofobnosti bakterijske površine.

Tretji parameter je naboj kontaktne površine in površine bakterij. Eksperimentalno določimo naboj iz pretočnega potenciala. Ob naelektreni površini v stiku z elektrolitsko raztopino nastane difuzna električna dvojna plast. vzdolž nabite materialne površine povzročimo tlačno razliko in vzpostavimo volumski tok mobilnega dela električne dvojne plasti. V raztopini nabitih ionov volumski tok povzroči prevladujoče kopičenje protiionov v smeri volumskega toka tekočine. Apliciramo električno polje, ki povzroči električni tok v smeri, nasprotni smeri volumskega toka tekočine. V ravnovesnem stanju sta oba tokova enaka; jakost električnega polja doseže ravnovesno vrednost. Iz jakosti določimo pretočni potencial. Iz potenciala lahko približno izračunamo površinsko gostoto naboja. V veliki večini primerov so bakterije negativno naelektrene. Naboj kontaktnih površin pa je močno odvisen od pH raztopine, ki je v kontaktu s samo površino. Zaradi elektrostatske sile pozitivno nabite materialne kontaktne površine delujejo s privlačno silo na negativno naelektrene bakterijske površine. Nasprotno negativne površine prispevajo odbojno komponento sile na negativno nabite bakterije (Kovačević et al., 2016).

2 MATERIAL AND METHODS

2 MATERIAL IN METODE

2.1 MATERIALI

2.1 MATERIALS

Kot podlago smo uporabili vezano bukovo ploščo debeline 4 mm. Uporabili smo pet ploščic dimenzij 100 mm × 100 mm. Adhezijo bakterij smo ugotavljali na nepremazanih površinah ter na površinah, obdelanih z naslednjimi premazi: laneno olje (proizvajalec Chemcolor d.o.o., Sevnica, Slovenija), nitrocelulozni oz. celulozno nitratni lak za les (proizvajalca Ilva, Milano, Italija), vodno lazuro Silvanol tankoslojni akrilni premaz za les na vodni osnovi (Silvaprodukt d.o.o., Ljubljana, Slovenija) in bezbarvno impregnacijsko sredstvo za doseganje vodoodbojnosti lesa nanopremaz Silles (Chemcolor d.o.o., Sevnica, Slovenija) na osnovi organofunkcionalnih fluoriranih silanov.

Za teste adhezije bakterij smo izbrali standardni bakterijski sev bakterije *Pseudomonas aeruginosa* iz zbirke ATCC 27853 (češka zbirka mikroorga-

nizmov, Brno, Češka republika), ki je bil izoliran iz krvne kulture. Vrsta *P. aeruginosa* spada v družino Pseudomonadaceae in rod *Pseudomonas*. V naravi bakterije iz rodu *Pseudomonas* najdemo v zemlji, vodi, zraku in živilih, bogatih z beljakovinami (Kapun Dolinar, 2001). *P. aeruginosa* je po Gramu negativen bacil, ki je izjemno prilagodljiv. Zaradi številnih različnih metabolnih (presnovnih) poti lahko preživi in se prilagodi v več različnih okoljih (Yahr & Parsek, 2006). Najbolj tem bakterijam ugaja vlažno okolje kot so na primer pitna voda, umivalniki, razpoke v tleh, raztopine za infuzijo. So odporne proti velikemu številu dezinfekcijskih sredstev, kar predstavlja velik problem zaradi težke odstranitve z okuženih mest. Zato se pogosto prenaša v bolnišnicah (Kapun Dolinar, 2001). Spada med oportunistične patogene, kar pomeni, da okuži organizem, kadar je njegov imunski sistem oslavljen. So koliformni nesporulirajoči bacili, ukrivljeno paličaste oblike, velikosti od 0,5 μm – 1,0 μm do 1,5 μm – 4,0 μm . Gibljejo se s pomočjo enega ali več polarnih bičkov (Madigan et al., 2006). Uporabili smo trdno hranilno gojišče proizvajalca Biolife, Italija, katerega izdelek je tudi uporabljeno tekoče gojišče oz. hranilni bujon brez glukoze.

2.2 ZASNOVA EKSPERIMENTALNEGA DELA

2.2 DESIGN OF THE EXPERIMENTAL WORK

Prvotno smo nameravali preveriti oprijem bakterij na nepremazane površine lesa in na površine, premazane s šestimi različnimi premazi. Le-te bi nanесли na kovinske ploščice in jih tako premazane izpostavili bakterijam. Kovinske podlage so v praksi primernejše za slikanje površine z elektronskim mikroskopom. Zaradi lažje primerjave pa bi površino še dodatno obarvali z barvilom kristal vijolični (barvanje po Gramu). Na ta način bi se bakterije značilno obarvale in na tako obdelani ter obarvani površini z bakterijami bi kasneje lahko natančno izmerili velikost površine, prekrivane z bakterijami. Vendar pa se je tak način izkazal za neprimerne. Nekateri od izbranih premaznih sistemov za les na kovinskih površinah (ploščicah) niso tvorili filma, premazana površina pa se je nagubala. Nagubanost površine bi naše delo zelo otežila, saj ne bi dobili primerljivih rezultatov s tistimi površinami, ki se niso nagubale. Zato smo se odločili samo za leseno podlago. Površin nismo obarvali zaradi prepustnosti premaznih sistemov in s tem zvezanega potencialnega obarvanja podlage.

2.3 PRIPRAVA VZORČNE POVRŠINE

2.3 SAMPLE SURFACE PREPARATION

Na štiri vzorčne ploščice smo nanесли po enega izmed štirih uporabljenih premaznih sredstev. Za kontrolo smo eno ploščico pustili brez premaznega sredstva. Vsak premazni sistem smo na posamezno vzorčno ploščico nanесли dvakrat. Po prvem nanosu smo premazano površino pustili stati 24 ur. Po 24 urah smo vzorce rahlo pobrusili (P240) ter ponovno nanесли isto premazno sredstvo na enako ploščico. Premazane površine vzorčnih ploščic smo po treh tednih od nanosa premaznega sredstva razrezali na manjše dimenzije (10 mm \times 10 mm). Te smo na straneh, ki so bile brez premaznega sredstva, zaščitili z epoksidnim premazom. Pripravljene vzorčne ploščice smo nato pritrdili v petrijevke. Sledila je sterilizacija. Petrijevke z vzorci smo postavili v laminarij, kjer smo jih obsevali z UV svetlobo. Vzorce so bili UV svetlobi izpostavljeni z obeh strani. Najprej smo za eno uro izpostavili premazano površino vzorčne ploščice, po eni uri obsevanja smo vzorce obrnili ter še eno uro obsevali drugo, nepremazano stran vzorca.

2.4 PRIPRAVA BAKTERIJSKE KULTURE IN IZPOSTAVITEV BAKTERIJAM

2.4 PREPARATION OF THE BACTERIAL CULTURE AND EXPOSURE TO BACTERIA

Priprava prekonočne bakterijske kulture in izpostavitve vzorcev bakterijam sta potekali v mikrobiološkem laboratoriju na Zdravstveni fakulteti v Ljubljani. Metodologija dela ter priprava sta bili povzeti po protokolu Kubota et al. (2008) in Bohinc et al. (2014), z nekaterimi modifikacijami. Sev bakterije smo prenesli na hranilno gojišče in ga inkubirali pri 37 °C za 24 ur. Po postopku inkubacije smo kolonijo testnega seva bakterije prenesli s trdnega hranilnega gojišča v hranilni bujon brez glukoze in ga dalje inkubirali za 24 ur pri 37 °C. Nato smo pripravili po pet paralelnih petrijevk za vsako skupino premaznih sredstev in eno za nepremazano površino. V vsako petrijevko smo namestili po tri vzorčne ploščice iz posamezne obravnavane skupine. Po eno petrijevko v paralelki posamezne skupine smo nalili s tekočim gojiščem z bakterijami, drugo petrijevko v paralelki pa smo nalili s tekočim gojiščem brez bakterij.

Vzorčne ploščice so bile izpostavljene bakterijam različno dolgo in sicer: spiranje takoj, ob času (t₀), inkubiranje pri 37 °C 10 ur pri aerobnih pogojih (t₁₀) in inkubiranje pri 37 °C 18 ur pri aerobnih

pogojih (t18). Po izpostavitvi vzorčnih ploščic bakterijam smo odvzete ploščice po (t0), (t10) in (t18) spirali s trikrat po 20 ml destilirane vode. Namen spiranja je bil odstranitev gojišča in neoprijetih bakterij ter preprečitev nadaljnega oprijema bakterijskih celic na testne površine. Po spiranju smo vzorce najprej osušili s sušilnikom za lase, da za nadaljnje preskuse ni bilo prisotne vlage. Ker pa ima les higroskopne lastnosti, so vzorčne ploščice med izpostavitvijo in spiranjem absorbirale dodatno vlago. Posledično se je pri lesenih ploščicah pojavil problem odvečne vlage v vzorcih in smo vzorce zato dodatno osušili v vakuumskem sušilniku.

2.5 ANALIZA ADHEZIJE BAKTERIJ NA POVRŠINI VZORCEV Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM (SEM)

2.5 ANALYSIS OF THE BACTERIAL ADHESION ON SURFACES OF THE SPECIMENS WITH A SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

Oprijem bakterij na testiranih premaznih sredstvih na leseni podlagi smo opazovali in pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) FEI Quanta 250 v laboratoriju Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Pred začetkom opazovanja smo na vzorce s standardno opremo (Quorum technologies Q150R) nanесли tanek sloj zlata. Snemanje je bilo izvedeno pri nizkem vakuumu (6×10^{-4} Pa), s pospeševalno napetostjo 5 kV. Razdalja med opazovano površino vzorca in elektronsko puško je bila približno 10 mm. Cilj opazovanja

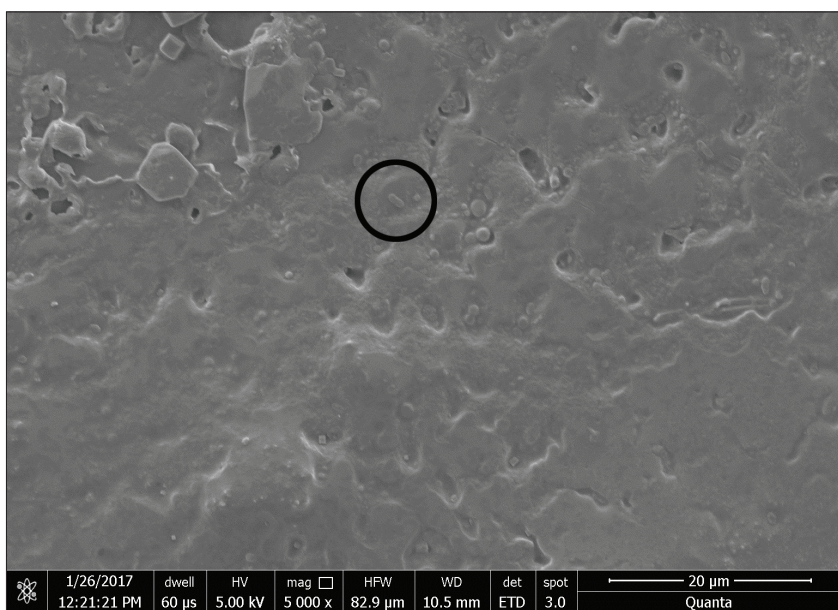
vzorcev s SEM je bil iskanje oblik, ki bi ustrezale bakterijam. Oblike, ki so predstavljale bakterije na površinah vzorcev, izpostavljenih 18 h, so popolnoma prekriale površino. Na vzorcih, katerih površina je bila izpostavljena 10 h, smo bakterije opazili le na določenih mestih, večinoma pa le na enem mestu. Za štetje bakterij smo izvedli kvantitativno analizo, kjer smo na posnetkih SEM obkroževali adherirane bakterije. Za analizo smo uporabili po en SEM posnetek za vsak posamezni sistem.

Zaradi nekoliko slabše kakovosti posnetkov SEM statistične analize podatkov ni bilo možno izvesti. Tako vrednosti, podane v preglednici 1, niso kazalniki, ki bi nam lahko potrdili, katera površina je bolj prijazna bakterijam. Na primer: na določeni površini, veliki $100 \mu\text{m}^2$, je bilo 100 oblik, ki so predstavljale bakterije. Celotna površina vzorca je merila $1.000.000 \mu\text{m}^2$, kjer smo le na določenih delih zasledili nekaj oblik bakterij, zato ni bilo mogoče ugotoviti, ali se na to površino bakterije bolj ali manj adherirajo.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3 RESULTS AND DISCUSSION

Kot že omenjeno smo površine vezane bukove plošče bakterijam izpostavljali v treh različnih časovnih intervalih, in sicer t0, t10 in t18 (v urah). Posnetki SEM so bili narejeni pri 5.000, 10.000, 15.000 in 20.000-kratnih povečavah. Na površinah, ki smo jih sprali takoj po izpostavitvi (t0), smo opazili le manjše število bakterij v planktonski obliki na do-



Slika 1. SEM posnetek lesene površine, premazane s premaznim sredstvom – vodna lazura, vzorec izpiran takoj po izpostavitvi *P. aeruginosa* (t0), 5.000-kratna povečava.

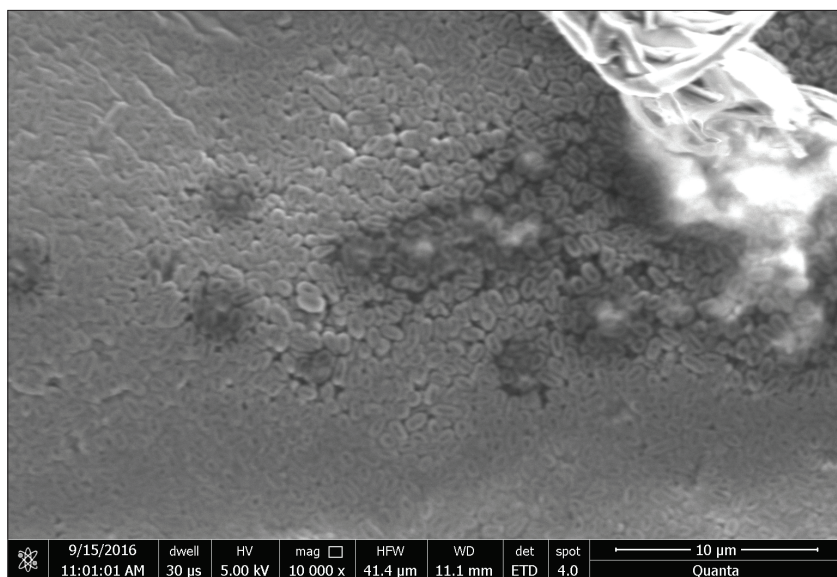
Figure 1. Scanning electron micrograph of a surface of laminated beech wood, finished with the waterborne stain, exposed to bacteria *P. aeruginosa*. (t0) and immediately washed; magnification: 5,000x.

ločenih segmentih premazane testne površine. Kot primer je na sliki 1 SEM posnetek lesene premazane površine z vodno lazuro pri 5.000-kratni povečavi. Predvidevamo, da je na premazani površini le ena bakterijska celica, ki smo jo označili s črnim krogom. To domnevo potrjuje tudi rastna krivulja, pri kateri v času t_0 bakterije še ne tvorijo adhezije posameznih bakterij in se pojavljajo le posamezno (Bohinc et al., 2014).

Po drugi strani pa so bakterije vzorce po 18 urah izpostavitve v celoti prerastle (slika 2, vzorec, premazan z lanenim oljem). Zato v nadaljevanju predstavljamo le rezultate, dobljene s preiskavami posnetkov SEM vzorcev, ki so bili izpostavljeni bakterijam

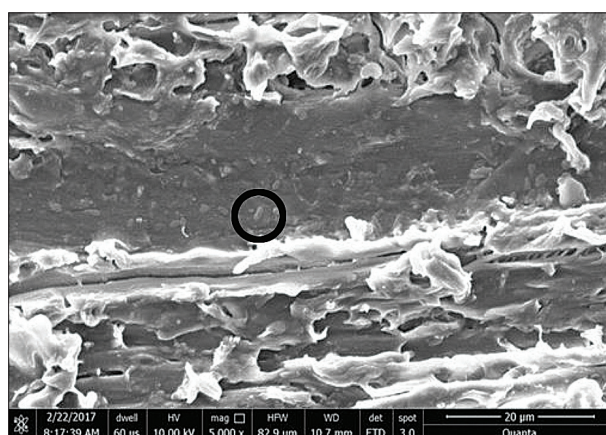
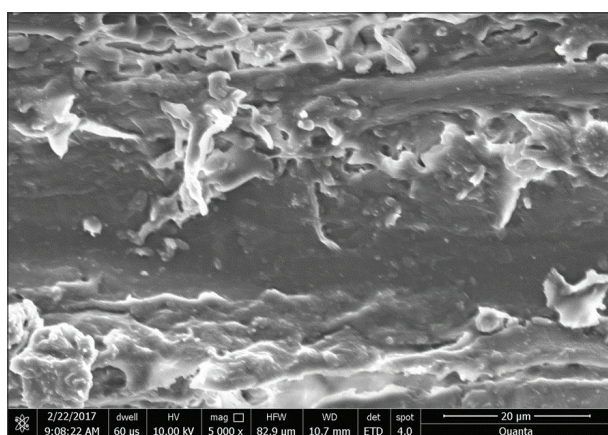
10 ur (t_{10}), in tistih, pri katerih tekoče gojišče ni vsebovalo bakterije *P. aeruginosa*, prav tako pri t_{10} .

Vzorec, ki ga nismo premazali z nobenim od izbranih premaznih sredstev za les, je služil za kontrolo. Podobno kot pri premazanih površinah tudi na površini brez premaznega sredstva, ki ni bila izpostavljena gojišču z dodanimi bakterijami, ni bilo opaziti bakterij ali oblik, podobnih bakterijam *P. aeruginosa* (slika 3a). Na površinah nepremazane ga vzorca, izpostavljenega bakterijam (t_{10}), pa smo opazili bakterije, ki smo jih obkrožili s črnim krožcem (slika 3b). Za primerjavo in natančno določitev smo posnetek povečali za 15.000-krat, kjer smo zaznali oblike, ki predstavljajo bakterije (slika 4).



Slika 2. SEM posnetek lesene površine, premazne z lanenim oljem, vzorec je bil izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t_{18}), 10.000-kratna povečava.

Figure 2. SEM micrograph of wood surface, finished with linseed oil, exposed to *P. aureginosa* (t_{18}), magnification: 10,000x



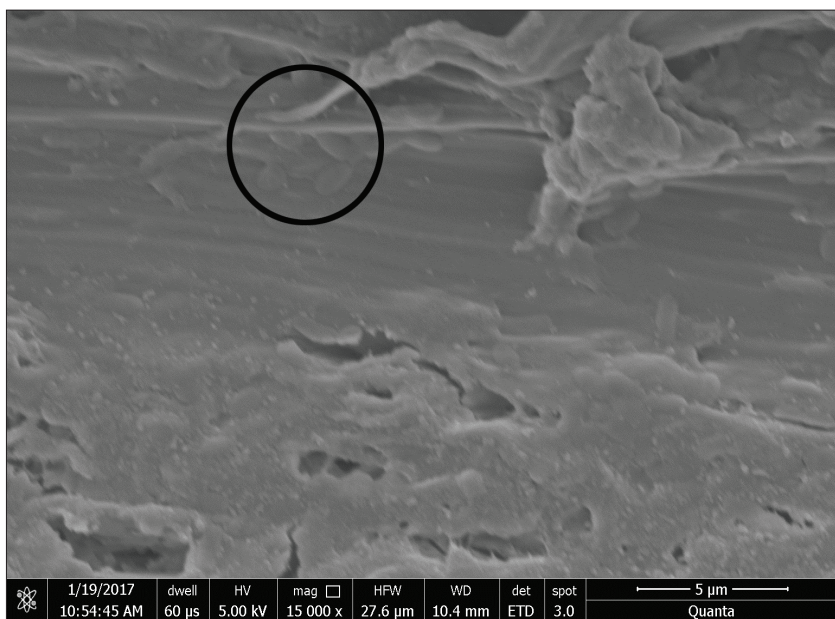
Slika 3. SEM posnetek površine brez premaznega sredstva, vzorec ni bil izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (a) in bakterijam izpostavljen vzorec (b), 5.000-kratna povečava.

Figure 3. SEM micrograph of the surface without a coating, not exposed to *P. aeruginosa* (a) and exposed to bacteria (b), magnification: 5,000x.

Na posnetku SEM (slika 5), kjer je bil vzorec, premazan z lanenim oljem, izpostavljen bakterijam (t10), lahko vidimo oblike, ki so značilne za bakterije *P. aeruginosa*. Lep primer bakterije je viden na sliki 6 pri 20.000-kratni povečavi.

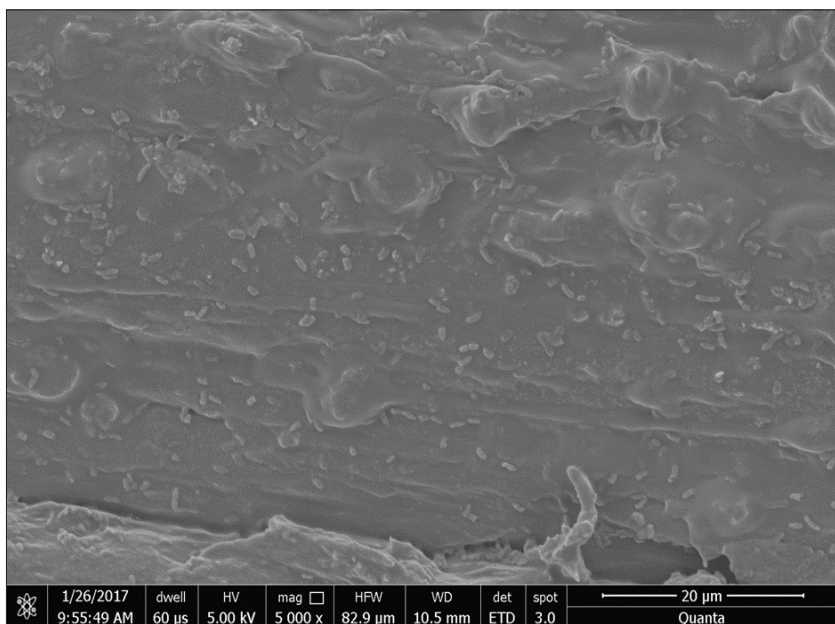
Na površini vzorca, premazanega z nitroceluloznim lakom, ki je bila 10 ur izpostavljena bakterijam, smo prav tako zasledili oblike, ki predstavljajo bakterije, razen tega pa še delce, ki jih nismo znali identificirati. Bakterije so označene s črnimi krožci, neidentificirani delci pa z rdečimi (slika 7). Na površini lesa, obdelanega z vodno lazuro, smo

tudi opazili oblike, ki niso značilne za bakterije (rdeči krožci (slika 8)), za katere predvidevamo, da so pigmentni delci. Na vzorcu, premazanem z vodno lazuro, ki je bil izpostavljen bakterijam, pa smo opazili tudi oblike, ki predstavljajo bakterije (slika 9). Nazadnje smo pregledali še površine, ki so bile premazane z nanopremazom. Primer površine vzorca, ki je bil v tekočem gojišču bakterijam izpostavljen 10 ur, je prikazan na sliki 10. Za natančno opredelitev smo isto površino posneli pri 20.000-kratni povečavi. Oblika, ki predstavlja bakterijo, ima velikost 1,6 μm (slika 11).



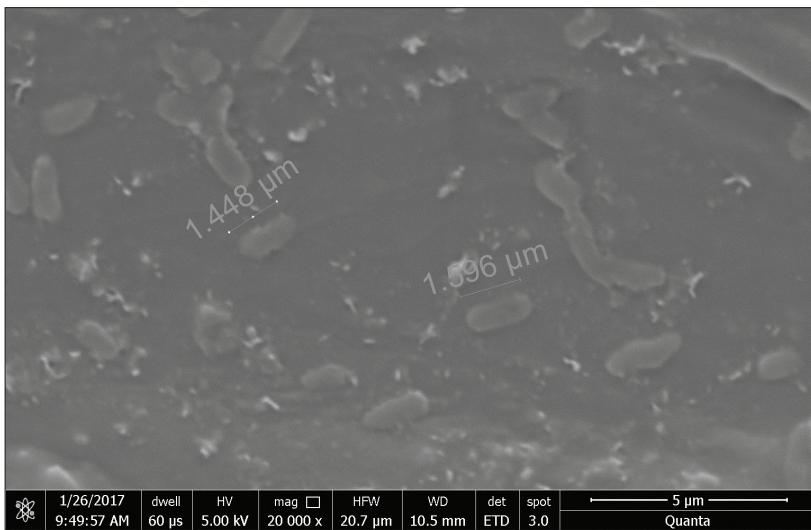
Slika 4. SEM posnetek površine brez premaznega sredstva, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 15.000-kratna povečava.

Figure 4. SEM micrograph of the surface without a coating, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 15,000x.



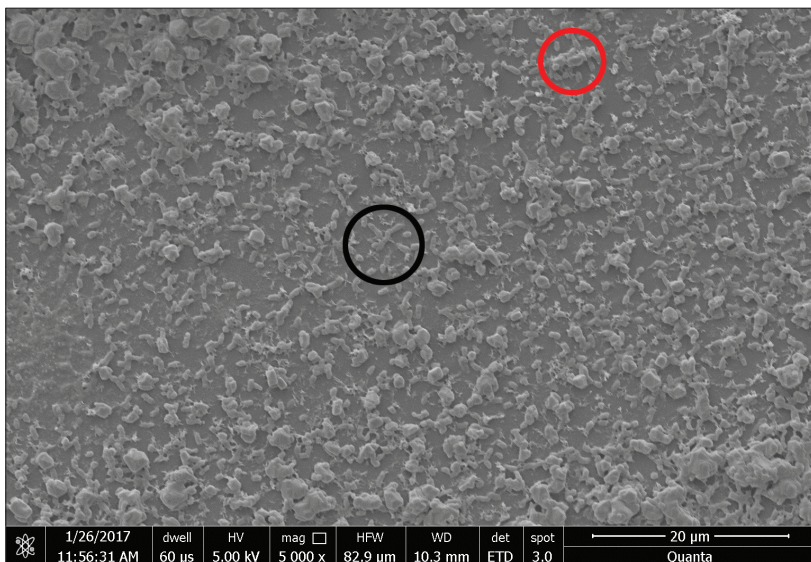
Slika 5. SEM posnetek površine, premazane z lanenim oljem, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 5. SEM micrograph of the surface with the linseed oil, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



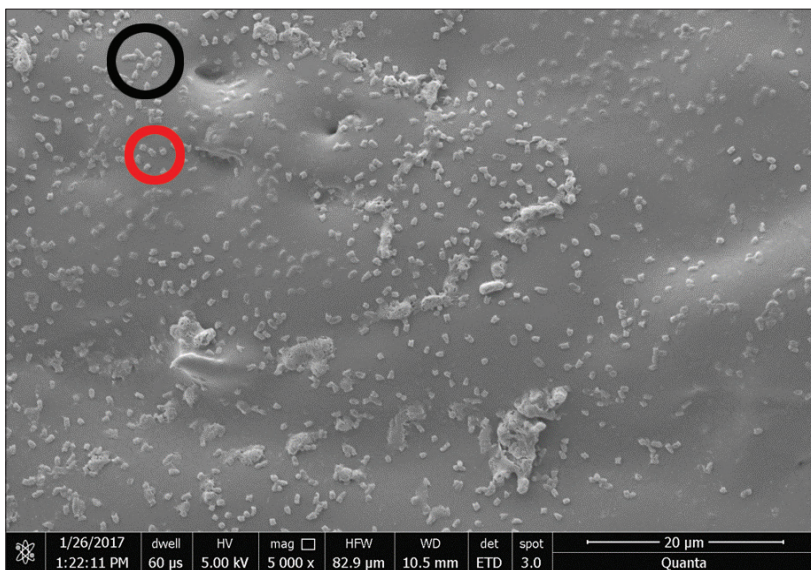
Slika 6. SEM posnetek površine, premazane z lanenim oljem, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 20.000-kratna povečava.

Figure 6. SEM micrograph of the surface with the linseed oil, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 20,000x.



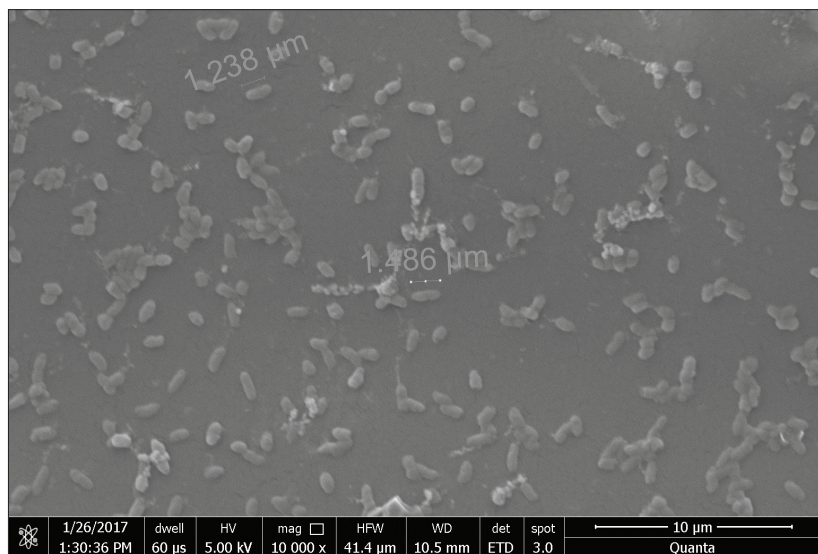
Slika 7. SEM posnetek površine vzorca z nitroceluloznim lakom, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 7. SEM micrograph of the surface with the cellulose nitrate lacquer, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



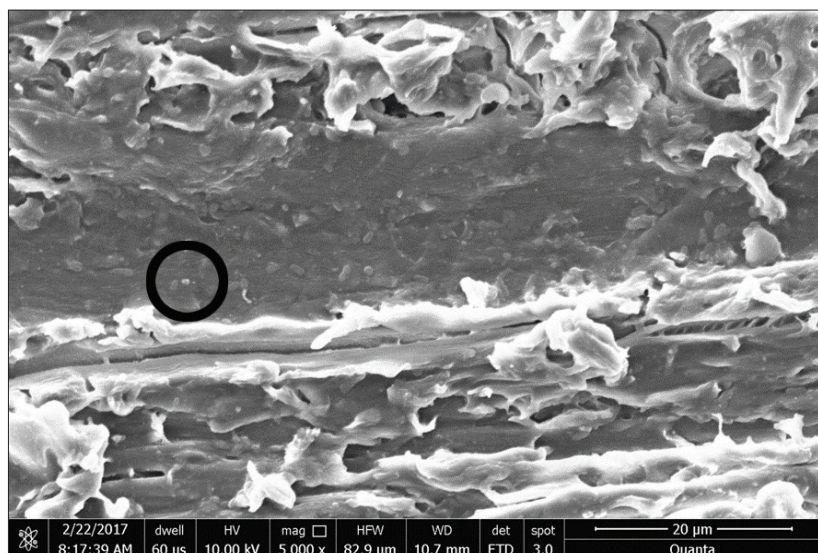
Slika 8. SEM posnetek površine vzorca, premazanega z vodno lazuro, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 8. SEM micrograph of the surface with the waterborne stain, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



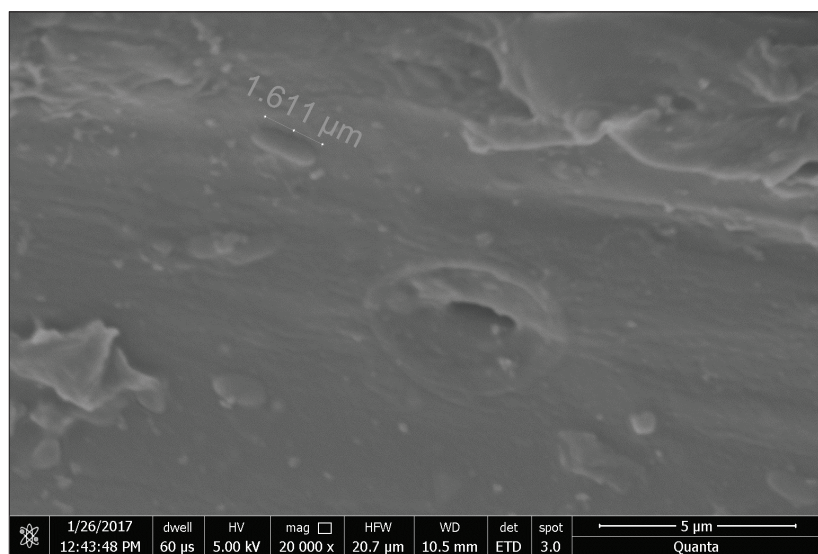
Slika 9. SEM posnetek površine vzorca, premazanega z vodno lazuro, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 10.000-kratna povečava.

Figure 9. SEM micrograph of the surface with the waterborne stain, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 10,000x.



Slika 10. SEM posnetek površine na vzorcu z nanopremazom, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 10. SEM micrograph of the surface with the nano finish, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



Slika 11. SEM posnetek površine na vzorcu z nanopremazom, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 20.000-kratna povečava.

Figure 11. SEM micrograph of the surface with the nano finish, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 20,000x.

Preglednica 1. Število oprijetih bakterij na površinah, različnih obdelav

Table 1. The number of bacteria adhering to surfaces, different treatments

Vrsta obdelave površine	Št. posnetka SEM								Povprečje	Standardna deviacija
	1	2	3	4	5	6	7	8		
	Povečava									
	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x		
Brez obdelave	0	13	22	0	0				7	10
Nitrocelulozni lak	112	8	97	1	5	10	0		33	49
Laneno olje	256	59	187	31	50	155		32	110	89
Vodna lazura	58	103	0	6	59	0	11		34	40
Nanopremaz	13	0	5	9	0	0	0	0	3	5

3.1 ŠTEVILO PRITRJENIH BAKTERIJ

3.1 NUMBER OF ADHERED BACTERIA

V preglednici 1 je navedeno število bakterij, ki smo jih ugotovili na različnih posnetkih SEM oz. na površinah z različnimi obdelavami. Bakterije smo šteli na naključno izbranih površinah posameznih vzorcev, in sicer ročno, tako da smo bakterije na posnetkih SEM najprej identificirali in nato obkrožili. Za tak način smo se odločili, ker so bili posnetki SEM slabe kakovosti in zato ni bilo mogoče izvesti avtomatiziranega štetja bakterij z računalniško aplikacijo. Metodo obkroževanja smo izvedli na posnetkih SEM pri 5.000 kratni povečavi. Slike smo natisnili v visoki ločljivosti, saj so na tak način bakterije postale lažje opazne. V primerih, kjer je kvaliteta posnetkov omogočila avtomatsko prepoznavanje bakterij, pa smo bakterije prešteli s programom ImageJ.

Ugotovili smo, da so razlike v številu bakterij na posameznih posnetkih naključno izbranih površin različno obdelanih preskušancev zelo velike. Kljub temu pa so se nakazali trendi med dovtetnostjo različno obdelanih površin za oprijem bakterij. Indikacije so naslednje: na $4.6 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ smo v povprečju na slikah površin lesa brez obdelave opazili le nekaj bakterij (pribl. 7), na površinah, premazanih z nitroceluloznim lakom nekaj deset bakterij (pribl. 33), na oljenih površinah je bilo bakterij največ, v povprečju okrog 110, pri površinah z lazuro je bil rezultat podoben kot v primeru površin z nitroceluloznim lakom (okrog 34 bakterij) ter pri nanopremazu Silles približno enako kot pri neobdelanih površinah (nekaj opaženih bakterij na posnetek, povp. 3). Menimo, da se največja dovtetnost za oprijem bakterij nakazuje pri oljenih površinah, precej manj,

a še vedno relativno veliko, pa je bilo bakterij na površinah, premazanih z lazuro in z nitroceluloznim lakom. Antibakterijski potencial nanodelcev v premazih je bil v literaturi že omenjen (Nosrati et al., 2017) in podobno smo opazili v tudi v naši raziskavi, saj smo na površinah z nanopremazom zaznali zelo malo oprijetih bakterij.

4 SKLEPI

4 CONCLUSIONS

Adhezija bakterij na površine in pozneje nastanek biofilma sta glavna vzroka kroničnih okužb z negativnim vplivom na zdravje ljudi. Takšnim okužbam smo najbolj izpostavljeni v bolnišnicah, javnih kuhinjah, pisarnah, šolah in ne nazadnje tudi v bivalnih prostorih. Da bi možnost adhezije bakterij na površine čim bolj zmanjšali, je najprej potrebno dobro poznavanje mehanizmov adhezije in dejavnikov, ki vplivajo na oprijem bakterij. Proces adhezije temelji na fizikalnih in kemijskih interakcijah med mikroorganizmi in kontaktno površino. Oprijemanje bakterijskih celic je odvisno od lastnosti površin in mikrotopografije, sestave površine, hrupavosti, hidrofobnosti, bakterijskega površinskega naboja, velikosti in lastnosti celice (gibljivost bakterij ...), temperature, vrednosti pH in še številnih drugih dejavnikov.

Na podlagi preliminarnih rezultatov raziskav adhezije bakterij smo ugotovili, da lahko tudi les ali lesne kompozite uporabljamo kot testne površine za preučevanje adhezije bakterij, pod pogojem, da uveljavljene metode dela prilagodimo lastnostim lesa. Prav tako velja, da je adhezijo bakterij vrste *P. aeruginosa* možno proučevati tudi na površinah

običajnih premaznih sredstev za les. Čeprav dobljenih rezultatov nismo mogli statistično ovrednotiti, se nakazuje, da so za oprijem bakterij *P. aeruginosa* med preskušeni premazi najbolj dovzetne površine, obdelane z lanenim oljem. Najmanj adheriranih bakterij pa smo po 10-urni izpostavitvi bakterijam v tekočem hranilnem gojišču opazili na površinah, ki so bile premazane z nanopremazom ali pa sploh niso bile premazane.

5 POVZETEK

5 SUMMARY

Bacterial adhesion to surfaces and subsequent biofilm formation are the main causes of chronic infections with a negative impact on human health, and this is an important topic that should be considered in the process of furniture manufacturing, especially when it is intended for use in rooms for the elderly or in hospitals. There should be a focus on the application of products with antibacterial surfaces to which the microorganisms do not adhere.

The aim of our preliminary research was to test selected wood coatings (linseed oil, water-borne stain, nitrocellulose varnish, nano-coating) with regard to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. We used beech plywood as the test substrate. First, we wanted to find out if the existing methods for determination of bacterial adhesion on various materials can also be applied to wooden and coated wood surfaces. The test methodology followed that used in some other similar investigations, where the adhesion of bacteria to non-wooden surfaces was investigated.

The prepared samples were exposed to bacteria in a liquid nutrient medium for three different durations: they were washed immediately after exposure (0 hours, t₀), after 10 hours (t₁₀) and after 18 hours (t₁₈). After exposure, the topography of the test surfaces and number of adhered bacteria were observed on scanning electron microscopy (SEM) micrographs.

The results indicated that the maximum number of bacteria adhered to the surface coated with linseed oil. In the future, extensive and in-depth studies will be needed to confirm and obtain more conclusive results.

ZAHVALA

ACKNOWLEDGEMENT

Zahvaljujemo se za finančno podporo ARRS, z raziskovalnim programom P4-0015 "Les in lignocelulozni kompoziti". Za pripravo bakterijskih vzorcev se zahvaljujemo doc. dr. Karmen Godič Torkar.

LITERATURA

REFERENCES

- Alarfaj, A. A., Lee, H. H., Munusamy, M. A., Ling, Q. D., Kumar, S., Chang, Y., Chen, Y. M., Lin, H. R., Lu, Y. T., Wu, G. J., & Higuchi, A. (2016). Development of biomaterial surfaces with and without microbial nanosegments. *Journal of Polymer Engineering*, 36(1), 1–12, DOI: <https://doi.org/10.1515/polyeng-2015-0046>.
- Bakker, D. P., Huijs, F. M., de Vries, J., Klijnstra, J. W., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. (2003). Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 179-190, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00159-0).
- Blackledge, M. S., Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5), 699-706, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.07.004>.
- Bohinc, K., Dražič, G., Fink, R., Oder, M., Jevšnik, M., Nipič, D., Godič Torkar, K., & Raspor, P. (2014). Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International journal of adhesion and adhesives*, 50(1), 265-272, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2014.01.027>.
- Bohinc, K., Dražič, G., Abram, A., Jevšnik, M., Jeršek, B., Nipič, D., Kurinčič, M., & Raspor, P. (2016). Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 68(July 2016), 39–46, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.01.008>.
- Chau, N. P. T., Pandit, S., Jung, J. E., & Jeon, J. G. (2014). Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *Journal of Dentistry*, 42(6), 726-734, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.009>.
- De Jaeger, F. (2017). Forest Based Sector Technology Platform. Strategic Research and Innovation Agenda for 2020. Brussels: Filip de Jaeger, Gérant FTP.
- De Jaeger, F. (2017a). Forest Based Sector Technology Platform. Annex to the Strategic Research and Innovation Agenda for 2020. Research and Innovation Areas. Brussels: Filip de Jaeger, Gérant FTP.
- Dobretsov, S., & Thomason, J. T. (2011). The development of marine biofilms on two commercial non-biocidal coatings: a comparison between silicone and fluoropolymer technologies. *Industrial & Biofouling*, 7(8), 869-880, DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.607233>.

- Fink, R., Odera, M., Rangus, D., Raspor, P., & Bohinc, K. (2015). Microbial adhesion capacity. Influence of shear and temperature stress. *Int. Journal of Environmental Health Research*, 25(6), 656–669, DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2015.1007840>.
- Flemming, R. G., Proctor, R. A., & Cooper, S. L. (1999). Bacterial adhesion to functionalized polyurethanes. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 10(6), 679–697, DOI: <https://doi.org/10.1163/156856299x00874>.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
- Gillett, A., Waugh, D., Lawrence, J., Swainson, M., & Dixon, R. (2015). Influencing the Attachment of Bacteria Through Laser Surface Engineering. Presented at ICALEO, 34th International Congress on Applications of Lasers & Electro-Optics, Atlanta, GA, USA, paper M50319.
- Gu, H., & Ren, D. (2014). Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances. *Frontiers in Chemical Science and Engineering*, 8(1), 20–33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1412-3>.
- Hori, K., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 424–434, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>.
- Ibanescu, S. A., Nowakowska, J., Khanna, N., Landmann, R., & Klok, H. A. (2016). Effects of Grafting Density and Film Thickness on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) and Poly(poly(ethylene glycol)methacrylate) Brushes. *Macromolecular Bioscience*, 16(5), 676–685, DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.201500335>.
- Iguerbo, O., & Bertrand, P. (2008). Graft photopolymerization of polyethylene glycol monoacrylate (PEGA) on poly(methyl methacrylate) (PMMA) films to prevent BSA adsorption. *Surface and Interface Analysis*, 40(3-4), 386–390, DOI: <https://doi.org/10.1002/sia.2701>.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163–173, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>.
- Kandelbauer, A., & Widsten, P. (2009). Antibacterial melamine resin surfaces for woodbased furniture and flooring. *Progress in Organic Coatings*, 65(3), 305–313, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2008.12.003>.
- Kapun Dolinar, A. (2001). Mikrobiologija. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za šolstvo.
- Kovačević, D., Pratnekar, R., Godič Torkar, K., Salopek, J., Dražić, G., Abram, A., & Bohinc, K. (2016). Influence of polyelectrolyte multilayer properties on bacterial adhesion capacity. *Polymers*, 8(10), 345–1-345-12, DOI: <https://doi.org/10.3390/polym8100345>.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381–386, DOI: <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2006). *Brock Biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Myszka, K., & Czaczyk, K. (2011). Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 173–180, DOI: <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0018-4>.
- Nosrati, R., Olad, A., & Shakoobi, S. (2017). Preparation of an antibacterial, hydrophilic and photocatalytically active polyacrylic coating using TiO₂ nanoparticles sensitized by graphene oxide. *Materials Science and Engineering C*, 80(November), 642–651, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.004>.
- Oder, M., Kompore, B., Bohinc, K., & Godič Torkar, K. (2015). The impact of material surface roughness and temperature on the adhesion of *Legionella pneumophila* to contact surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(5), 469–479, DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.963035>.
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(9), 577–588, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>.
- Pereira, C. A., Eskelson, E., Cavalli, V., Liporoni, P. C. S., Jorge, A. O. C., & do Rego, M. A. (2011). *Streptococcus mutans* Biofilm Adhesion on Composite Resin Surfaces After Different Finishing and Polishing Techniques. *Operative Dentistry*, 36(3), 311–317, DOI: <https://doi.org/10.2341/10-285-L>.
- Reid, G. (1997). Microbial adhesion to biosurfaces. *Current Opinion in Colloid & Surface Science*, 2(5), 513–516, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(97\)80100-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(97)80100-8).
- Singh, A. P., & Dawson, B. S. W. (2011). Probing the Wood Coating Interface at High Resolution. In: Bucur, V. (ED.) *Delamination in Wood, Wood Products and Wood Based Composites* (145–155). Dordrecht: Springer.
- Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*, 94(8), DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>.
- Soumya, E., Ibensouda, K. S., Latrache, H., & Boutahari, S. (2012). Study of Microbial Adhesion on Some Wood Species: Theoretical Prediction. *Microbiology*, 80(1) 43–49, DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261711010152>.
- Soumya, E., Ibensouda, K. S., Latrache, H., Meftah, H., Tahri, N. J., & Hamadi, F. (2012a). Environmental Scanning Electron Microscopy characterization of the adhesion of conidia from *Penicillium expansum* to cedar wood substrata at different pH values. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 82(4) 1707–1713, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0980-3>.
- Teixeira, P., Trindade, A. C., Godinho, M. H., Azeredo, J., Oliveira, R., & Fonseca, J. G. (2006). *Staphylococcus epidermidis* adhesion on modified urea/urethane elastomers. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 17(1-2), 239–246, DOI: <https://doi.org/10.1163/156856206774879072>.
- Tolker-Nielsen, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS*, 122(138), 1–51, DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12335>.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., & Zehnder, A. J. (1987). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53(8), 1893–1897. PMID: PMC204020, PMID: 2444158.

Xu, G., Pranantyo, D., Xu, L., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2016). Antifouling, Antimicrobial, and Antibiocorrosion Multilayer Coatings Assembled by Layer-by-layer Deposition Involving Host–Guest Interaction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(41), 10906-10915, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02190>

Yahr, T. L., & Parsek, M. R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (ED.) *The Prokaryotes*. New York: Springer.

STABILNI HIDROGELI IZ NANOFIBRILIRANE CELULOZE

STABLE HYDROGELS FROM NANOFIBRILLATED CELLULOSE

Jaka Levanič^{1*}, Ida Poljanšek¹, Primož Oven^{1**}

UDK 630*813:544.773.432
 Pregledni znanstveni članek / [Review scientific article](#)

Prispelo / [Received](#): 16. 10. 2019
 Sprejeto / [Accepted](#): 27. 11. 2019

Izvleček / [Abstract](#)

Izvleček: Nanocelulozni hidrogeli so med najbolj perspektivnimi materiali z visoko dodano vrednostjo, ki jih je moč pridobiti iz celuloznih virov. V tem prispevku so predstavljeni postopki izdelave hidrogelov, ki temeljijo na nanocelulozi, ter njihova potencialna uporaba in varnostni vidik. V prihodnosti bodo namreč nanocelulozni materiali eni vodilnih produktov, ki bodo izhajali iz gozdno lesnega sektorja zaradi njihove visoke dodane vrednosti in potenciala za zamenjavo sintetičnih materialov.

Ključne besede: nanoceluloza, nanofibrilirana celuloza, nanocelulozni hidrogeli, hidrogeli, biomateriali, biopolimeri

Abstract: Nanocellulose hydrogels are amongst the most promising materials with a high added value that can be obtained from cellulose sources. In this manuscript we present different paths to obtaining nanocellulose based hydrogels as well as their use and safety. In the future, nanocellulosic materials will be one of the leading products that stems from the forestry and wood products sectors due to its high added value and potential to replace a number of synthetic materials.

Keywords: nanocellulose, nanofibrillated cellulose, nanocellulose hydrogels, hydrogels, biomaterials, biopolymers

1 UVOD

1 INTRODUCTION

Celuloza je najpogostejši naravni polimer na zemlji, z naravnim prirastom $7,5 \times 10^{10}$ ton (Habibi, 2014). Celuloza je osnovni gradnik vsake rastlinske celice, tudi celice lesa, kjer predstavlja strukturo, ki zagotavlja natezno trdnost tega biokompozita. Celulozna makromolekula je linearna homopolimerna veriga, sestavljena iz glukočnih enot, ki so med seboj povezane z beta glikozidnimi vezmi. Najmanjša ponavljajoča se enota celulozne verige je celobiozna enota (Fengel & Wegener, 1984). Stopnja polimerizacije celulozne verige je med 1000 in 15000, pri čemer pa velja poudariti, da je stopnja polimerizacije v veliki meri odvisna od izvora celuloze in tehnologije pridobivanja (Dufresne, 2013). Celuloza je naraven, obnovljiv, trajnosten in razgradljiv material, ki z izjemno širokim spektrom uporabnosti učinkovito konkurira materialom, ki so zasnovani na fosilnih surovinskih virih. To velja

tudi za nanocelulozo. Klasifikacija in lastnosti celuloznih nanomaterialov so v veliki meri pogojena s postopkom pridobivanja. Z mehansko fibrilacijo celulozne surovine lahko pridobimo celulozne nanofibrile (gibke nitaste strukture, premer 3 – 100 nm, dolžina $> 1 \mu\text{m}$) (Habibi, 2014) medtem ko močna kislinska hidroliza razgradi amorfná področja v celulozni strukturi, produkt, ki pri tem nastane, pa so celulozni nanokristali (togi paličasti delci, premer 3 – 5 nm, dolžina 100 – 200 nm) (Roman, 2015). Na lastnosti celuloznih nanomaterialov močno vplivajo tudi različni postopki predobdelave, ki olajšajo fibrilacijo med mehansko obdelavo celuloznih vlaken. Med postopke predobdelave sodijo; oksidacija z (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oksil oz. TEMPO oksidacija (Saito et al., 2007), karboksimetiliranje (Wågberg et al., 2008), delna encimatska hidroliza (Henriksson et al., 2007) in številne druge (Dufresne, 2013). Na površinsko kemijo celuloznih nanokristalov lahko vplivamo tudi z izbiro močne kisline, s katero prednostno hidroliziramo amorfná področja celuloze, npr. z žveplovo(VI) kislino (sulfatni ester), fosforjevo(V) kislino (fosfatni ester) ali klorovodikovo kislino (brez funkcionalne skupine, nestabilen koloid) (De France et al., 2017).

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

* e-pošta: jaka.levanic@bf.uni-lj.si

** e-pošta: primoz.oven@bf.uni-lj.si

Celulozne nanofibrile in celulozni nanokristali imajo zelo široko področje uporabe, saj obe vrsti nanoceluloze lahko vključujemo v različne polimerne matrice kot nano-ojačitev ali pa iz njih izdelujemo nove materiale, kamor sodijo tudi nanocelulozni hidrogeli. Hidrogeli so tridimenzionalne, hidrofilne polimerne strukture, ki so sposobne zadrževati veliko količino vode ali drugih bioloških kapljev (Caló & Khutoryanskiy, 2015). Hidrogele lahko klasificiramo glede na materiale, ki jih gradijo in po mehanizmu nastanka. Hidrogeli so lahko narejeni iz bioloških ali sintetičnih materialov, lahko pa so zasnovani na obeh vrstah gradnikov, kar označujemo z izrazom hibridni hidrogeli (Buwalda et al., 2017). Mehanizmi nastanka hidrogelov so različni, temeljijo lahko na fizikalnem premreženju z nekovalentnimi oziroma fizikalnimi interakcijami, kemičnem zamreženju s kovalentnimi vezmi ali kombinaciji obeh (Buwalda et al., 2017). Bio-osnovani hidrogeli so praviloma tudi biološko razgradljivi. (Caló & Khutoryanskiy, 2015). Polisaharidni hidrogeli, vključno z (nano) celuloznimi, so v zadnjem času deležni velike pozornosti zaradi široke dostopnosti, biorazgradljivosti, biokompatibilnosti in včasih tudi svoje bioaktivnosti (Jun Liu et al., 2016a). Aktualne raziskave na področju hidrogelov se osredotočajo na uporabo gradnikov, ki lahko zamrežujejo. Tu prednjačijo predvsem hidrogeli na osnovi alginatov, ki jih pridobivamo iz morskih alg. Alginati so zaradi svoje netoksičnosti, biokompatibilnosti in sposobnosti zamreženja z dodatkom dvovalentnih ionov (Ca^{2+}) zelo razširjeni na področju biomedicine (Lee & Mooney, 2012). Uveljavljeni naravni materiali, ki se uporabljajo za izdelavo hidrogelov, so še hialuronska kislina, kolagen, hitosan in fibrin (Antoine et al., 2014; Highley et al., 2016; Lee & Mooney, 2001; Xu et al., 2017).

Namen tega članka je pripraviti pregled najpogosteje uporabljenih postopkov izdelave tako imenovanih bio-osnovanih in hibridnih hidrogelov, kjer je osnovni gradnik nanoceluloza, ki izvira iz lesne biomase, v sklepnem delu razprave pa se bomo posvetili varnostnim vidikom in možnim uporabam hidrogelov. Nanoceluloza predstavlja trajnostno alternativo različnim sintetičnim materialom za proizvodnjo hidrogelov.

2 NARAVNI HIDROGELI 2 NATURAL HYDROGELS

2.1 BAKTERIJSKA CELULOZA 2.1 BACTERIAL CELLULOSE

V kategorijo naravnih hidrogelov lahko uvrstimo bakterijsko celulozo. Le-ta je kemijsko identična rastlinski celulozi, vendar ima drugačno morfologijo in je bistveno čistejša, saj ne vsebuje primesi v obliki hemiceluloz ali lignina (Esa et al., 2014). Nekatere vrste bakterij iz rodov *Gluconobacter* (*Acetobacter*), *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Sarcina*, *E. Coli* in *Salmonella* spp. so sposobne proizvodnje bakterijske celuloze ob prisotnosti vira ogljika, najpogosteje v obliki ostankov živilsko predelovalne industrije, ki vsebujejo visoke deleže ogljikovih hidratov in beljakovin (Esa et al., 2014; Lin et al., 2014). Bakterija, ki je industrijsko zanimiva, je *Gluconobacter xylinus* (ssp. *Acetobacter acetii*). *G. xylinus* je gram negativna, striktno aerobna bakterija, ki so jo prvič odkrili med proizvodnjo kisa, saj je na površini fermentacijske tekočine tvorila gelasto membrano iz celuloznih fibril z visoko vsebnostjo vode. Mehanizem nastanka bakterijskih celuloznih hidrogelov je dokaj enostaven, saj temelji na fizičnem prepletu dolgih fibril in nastanku vodikovih vezi med njimi. Bakterijska celuloza ima večji indeks kristaliničnosti (73,19 %) in vsled tega boljše mehanske lastnosti kot lesna celuloza (med 40 in 50 %) (Park et al., 2010), pri čemer je kristaliničnost slednje odvisna tudi od tehnologije pridobivanja in lesne vrste (Andersson et al., 2003). Bakterijsko celulozo lahko po čiščenju ostankov odmrlih bakterij že uporabimo kot oblogo pri opeklinah in drugih površinskih ranah, predvsem zaradi biokompatibilnosti in zagotavljanja ugodnih pogojev za celjenje ran (Sulaeva et al., 2015).

3 FIZIKALNI HIDROGELI IZ NANOFIBRILIRANE CELULOZE 3 PHYSICALLY GELLED HYDROGELS FROM NANOFIBRILLATED CELLULOSE

3.1 Z ALKALIJAMI INDUCIRANO ŽELIRANJE DISPERZIJE CELULOZNIH NANOFIBRIL 3.1 STRONG ALKALI INDUCED GELATION OF A CELLULOSE NANOFIBRIL DISPERSION

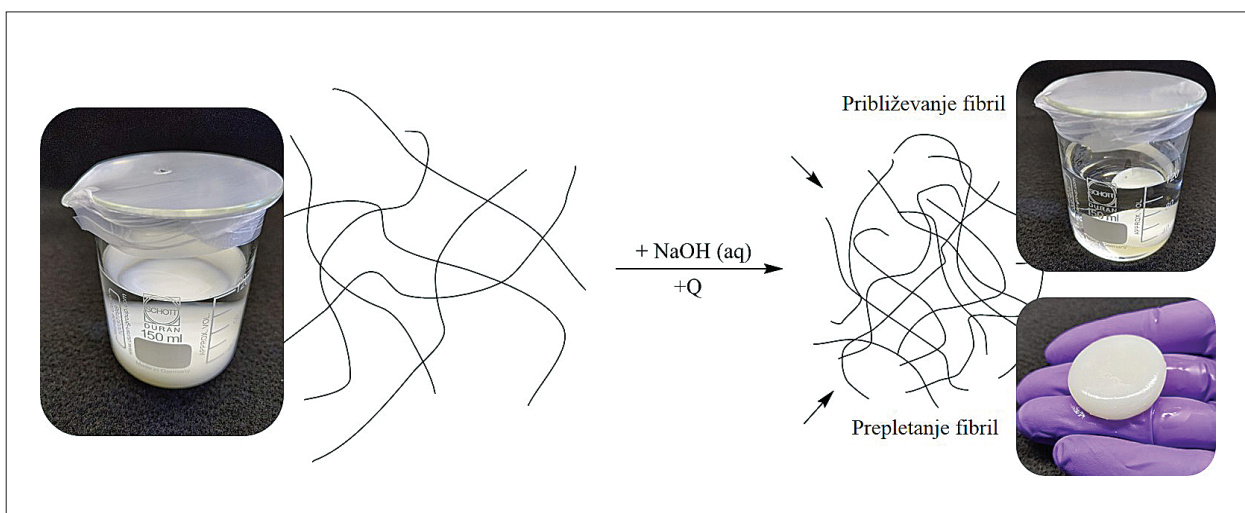
Prve hidrogele na osnovi celuloznih nanofibril, pridobljenih iz lesne celuloze, so razvili Abe in sod. z obdelavo disperzije celuloznih nanofibril s 15 ut.%

raztopino natrijevega hidroksida ter nevtralizacijo hidroksida z razredčeno očetno kislino (Abe & Yano, 2011). Mehanizem nastanka tovrstnih hidrogelov je kompleksen. V prvi fazi gre za individualno krčenje celulozних nanofibril pri koncentracijah NaOH pod 12 ut.%. S krčenjem fibril se hkrati povečuje prepletanost fibril in posledično tvorba stabilnega hidrogela. Pri koncentracijah nad 12 % so longitudinalni skrčki fibril še bistveno večji, zato hitreje pride do približevanja (koalescence) fibril, povečajo pa se tudi volumski skrčki hidrogela. To ima tudi pozitiven vpliv na mehanske lastnosti hidrogelov. Hkrati se z večanjem koncentracije NaOH prične spreminjati kristalna struktura celuloze, le-ta začne prehajati iz celuloze I v celulozo II. Kritična meja koncentracije NaOH je med 12 – 15 ut.%. Ob pretvorbi celuloze I v celulozo II pride do nastanka prepletene in neprekinjene fibrilarne strukture, kar dodatno prispeva k dobrim mehanskim lastnostim hidrogelov iz celuloze II (Abe & Yano, 2012). Tako nastali hidrogel je potrebno nevtralizirati s šibkimi kislinami (npr. očetna kislina), kar še dodatno izboljša mehanske lastnosti hidrogelov zaradi ireverzibilne koalescence celulozних nanofibril oz. nastanka vodikovih vezi. Nastanek tovrstnih hidrogelov je torej kombiniran proces, v katerem imajo ključno vlogo približevanje, prepletanje in krčenje nanofibril, nastanek vodikovih vezi med njimi ter pretvorba kristaliničnih območij iz celuloze I v celulozo II.

3.2 KOORDINACIJSKO PREMREŽENJE Z VEČVALENTNIMI KOVINSKIMI KATIONI

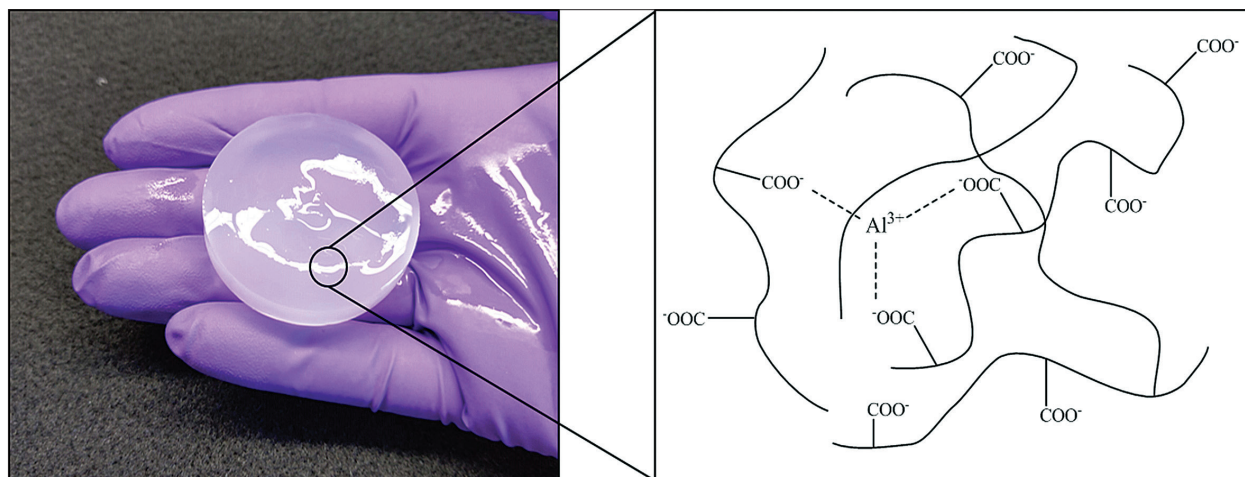
3.2 MULTIVALENT METAL CATION COORDINATED CROSSLINKING

Površinsko negativno nabita nanoceluloza tvori z eno ali večvalentnimi kationi stabilne hidrogelne. Kovinski kationi tvorijo kompleks s prisotnimi deprotoniranimi karboksilnimi skupinami na površini celulozних nanofibril. Ugotovili so, da lahko z uporabo različnih kationov vplivajo na mehanske lastnosti hidrogelov (Dong et al., 2013a). Hidrogeli, ki so jih kompleksirali s Ca^{2+} kationom, so imeli modul elastičnosti 3,39 kPa, hidrogeli kompleksirani z Fe^{3+} kationom, pa so imeli višji modul elastičnosti, kar 31,6 kPa (Dong et al., 2013a). Oba hidrogela sta bila pripravljena iz osnovne disperzije TEMPO modificiranih celulozних nanofibril, ki ima bolj viskozen karakter, elastični modul pa zgolj 0,0021 kPa (Dong et al., 2013a). Podobne hidrogelne so uspeli pripraviti tudi z uporabo površinsko nabitih celulozних nanokristalov (SO_4^{2-} skupine) (Chau et al., 2015). Mehanizem nastanka hidrogela iz celulozних nanokristalov je podoben kot v primeru celulozних nanofibril, vendar so potrebne višje koncentracije nanokristalov (> 4 ut.%). Zaradi negativnega naboja na površini celulozних nanokristalov se ob dodatku kovinskih kationov tvorijo stabilni hidrogeli. Kot v primeru površinsko nabitih celulozних nanofibril so mehanske lastnosti nastala



Slika 1. Nastanek hidrogela zaradi delovanja močne raztopine natrijevega hidroksida, ki povzroči približevanje in prepletanje celulozних nanofibril (Foto: J. Levanič).

Figure 1. Hydrogel formation due to the action of a concentrated sodium hydroxide solution, which induces coalescence and fibril interdigitation (Foto: J. Levanič).



Slika 2. Zaradi interakcije večvalentnega kationa (npr. Al^{3+}) s površinsko negativno nabito obliko nanofibrilirane celuloze nastane stabilen hidrogel (Foto: J. Levanič).

Figure 2. Interaction of a multivalent metal cation (Al^{3+} for example) with negatively surface charged nanofibrillated cellulose and the subsequent formation of a stable hydrogel (Foto: J. Levanič).

lih hidrogelov odvisne od uporabljenega kationa (Chau et al., 2015). Trdnost vezi med karboksilnim anionom in kovinskim kationom je močno odvisna od elektronske strukture kovinskega kationa ter njegove afinitete do karboksilatnega aniona (Dong et al., 2013a). Kationsko premreženi nanocelulozni hidrogeli so med bolj raziskanimi tipi hidrogelov za aplikacije na področju biomedicine, predvsem zaradi možnosti uporabe določenih kationov z biocidno aktivnostjo oz. zaradi njihove inertnosti in primernosti za stik s človeškimi tkivi (Basu et al., 2018; Rashad et al., 2017; Zander et al., 2014).

3.3 IZNIČENJE POVRŠINSKEGA NABOJA 3.3 SURFACE CHARGE NULLIFICATION

Eden najpreprostejših načinov za tvorbo nanocelulozних hidrogelov, ki je uporaben pri različnih vrstah nanofibrilirane celuloze z negativnim površinskim nabojem, je nižanje pH vrednosti disperznega medija. Površinski naboj (npr. pri karboksilatnem anionu) je pomemben za elektrostatsko stabilizacijo koloidnega sistema zaradi odboja med delci z istoimenskim nabojem. Ob dodatku H_3O^+ ionov izničimo površinski naboj in zmanjšamo stabilnost koloida. V primeru, ko so dispergirani delci z velikim nazivnim presečnim razmerjem, pride v disperziji do kolizije delcev, med katerimi se zaradi pomanjkanja istoimenskega naboja vzpostavi trajen kontakt na podlagi van der Waalsovih sil

in vodikovih vezi. Le-te prevladajo nad intenziteto elektrostatskih odbojnih sil, posledično pride do tvorbe nereverzibilnega steklastega stanja in do tako imenovanega koloidnega stekla oziroma »Volume spanning arrested state, VAS« (Nordenstrom et al., 2017).

4 KEMIJSKO PREMREŽENI NANOCELULOZNI HIDROGELI

4 CHEMICALLY CROSSLINKED NANOCELLULOSE HYDROGELS

4.1 KOVALENTNA VEZAVA CELULOZNIH NANOFIBRIL V POLIMERNI MATRICI

4.1 COVALENTLY BOUND CELLULOSE NANOFIBRILS IN A POLYMER MATRIX

Kovalentno premreženje nanoceluloze je pomemben vidik izdelave hidrogelov, še posebej v kombinaciji nanoceluloze z različnimi sintetičnimi polimernimi matricami. Pri snovanju takšnih hidrogelov se izkoriščajo najboljše lastnosti obeh komponent. Reaktivnost in kontrolirana struktura sintetičnih polimerov na eni strani ter velika afiniteta do vode in velik ojačitveni potencial nanoceluloze na drugi strani (Nair et al., 2014). Tako so Nair in sod. (2014) pripravili hibridni hidrogel iz kopolimera metil-vinil-etra in maleinske kisline ter poli(etilenglikola) (PMVEMA/PEG) z visokimi utežnimi deleži nanofibrilirane celuloze (NFC). Hidrogeli, ojačani s 75 % utežnim deležem NFC,

pridobljene iz listavcev, so imeli natezno trdnost 20,41 MPa. Hidrogeli, ojačani z enakim utežnim deležem NFC, ki pa je bila pridobljena iz iglavcev, so imeli bistveno višjo natezno trdnost in sicer 31,38 MPa.

4.2 ZAMREŽENJE CELULOZNIH NANOFIBRIL Z VEČFUNKCIONALNIMI AMINI

4.2 MULTIFUNCTIONAL AMINE CROSSLINKING OF CELLULOSE NANOFIBRILS

Med prvimi hidrogeli iz TEMPO modificirane nanoceluloze so bili poleg kationsko stabiliziranih tudi hidrogeli, pripravljeni s tvorbo Schiffovih baz. Te so tvorili z reakcijo med rezidualnimi aldehydnimi skupinami po TEMPO oksidaciji in večfunkcionalnimi amini, npr. z etilendiaminom in heksametilendiaminom (Syverud et al., 2014). Z izkoriščanjem nastanka Schiffovih baz na dialdehid celulozi (DAC) je možno pripraviti specifične hidrogelne z odzivom na določen dejavnik (temperaturo, pH, redoks pogoje ali obsevanje z UV svetlobo). Poleg tega je možno pripraviti tudi reverzibilne hidrogelne, kjer izkoriščajo tvorbo in razpad Schiffove baze med DAC in heksametilendiaminom s spreminjanjem vrednosti pH. Nastanek hidrogela se sproži s preprihovanjem disperzije DAC in heksametilendiamina z amonijakom, konverzijo hidrogela nazaj v tekočo disperzijo pa se sproži s preprihovanjem hidrogela s plinasto klorovodikovo kislino (Liu et al., 2017).

4.3 Z EPOKSIDI PREMREŽENI NANOCELULOZNI HIDROGELI

4.3 EPOXIDE CROSSLINKED NANOCELLULOSE HYDROGELS

Epoksidna funkcionalna skupina je izredno reaktivna in z lahkoto tvori kovalentne vezi z mnogimi drugimi funkcionalnimi skupinami, tudi z alkoholi ob prisotnosti baze. S tega vidika je možno uporabljati bifunkcionalne epoksidge za premreženje celulozних struktur. Eden od primerov je heterogena reakcija med 1,4-butandiol diglicidil etrom (BDDE) in nanofibrilirano celulozo. Pri tem pride do premreženja med tema dvema komponentama. Dodatek nanofibrilirane celuloze je izboljšal mehanske lastnosti 3D strukture (Xu et al., 2018). Reakcije z epoksidom je možno voditi tako v heterogeni kot homogeni fazi (oz. v celulozних raztopinah). Tako so uspeli pripraviti stabilne ce-

lulozne hidrogelne z raztapljanjem celuloze v vodni raztopini NaOH/urea z dodatkom BDDE. Končni cilj raziskave je bil sicer aerogel s kontrolirano poroznostjo, kjer pa je bila vmesna faza stabilen hidrogel, kateremu so sublimacijsko odstranili vodo (Liu et al., 2016c).

5 HIDROGELI S FIZIČNO UJETIMI CELULOZNIH NANOFIBRILAMI V POLIMERNI MATRICI

5 HYDROGELS WITH PHYSICALLY ENTRAPPED CELLULOSE NANOFIBRILS IN A POLYMER MATRIX

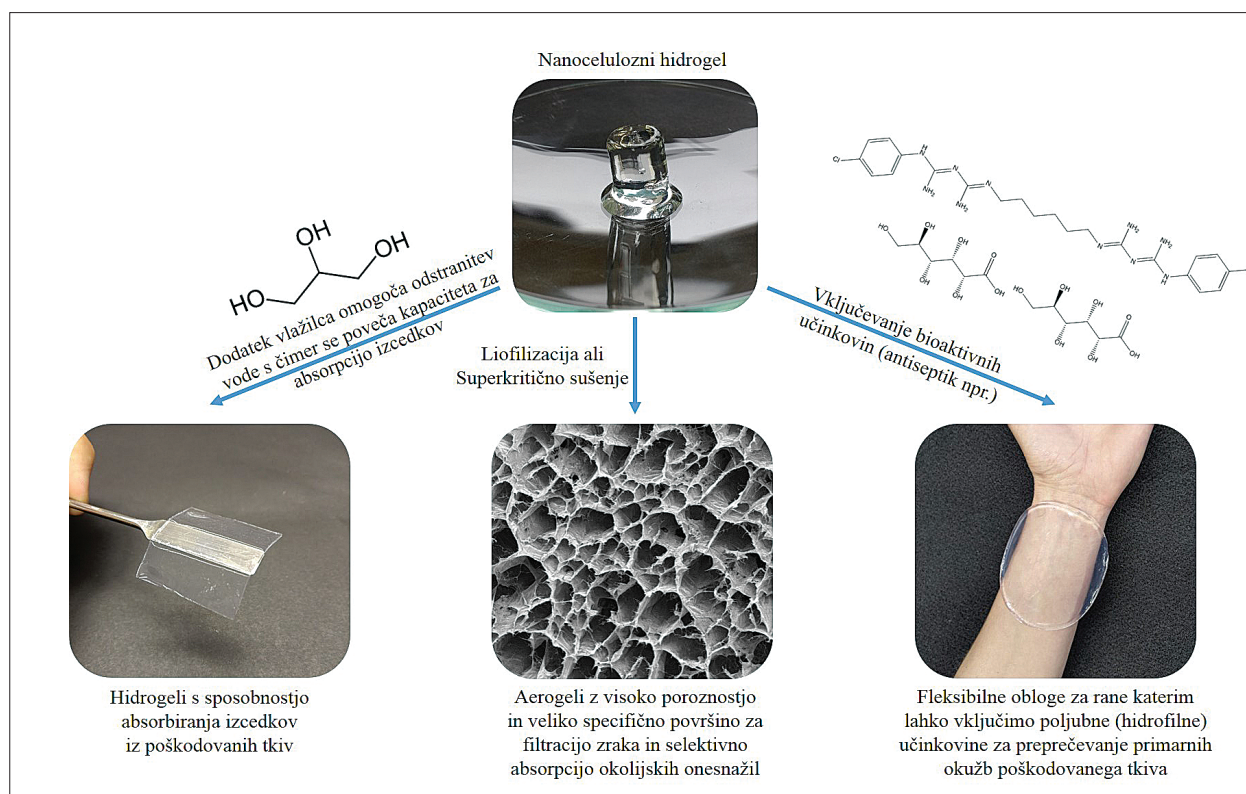
Veliko bolj pogosti kot kovalentno premreženi NFC hidrogeli so hidrogeli, kjer je NFC fizično ujeta v premreženo hidrofilno polimerno matrico. Za proizvodnjo tovrstnih hidrogelov je v osnovi omejitvele kompatibilnost polimerne matrice z nanofibrilirano celulozo. Raziskovalcem je uspelo pripraviti hidrogelne s premreženjem kolagena z glutaraldehydom in dodatkom celulozних nanofibril. Nanofibrilirana celuloza v tem primeru deluje kot dobra ojačitev, saj je bila pri 75 % utežnem deležu dodane nanofibrilirane celuloze dosežena največja natezna trdnost v mokrem stanju 77 MPa, raztezek pa 0,8 % (Mathew et al., 2011). Ista skupina je v drugi raziskavi nadomestila glutaraldehyd z genipinom zaradi bistveno manjše toksičnosti, rezultat so bili hidrogeli s slabšimi mehanskimi lastnostmi. Pri 75 % utežnem deležu dodane NFC je bila natezna trdnost 42 MPa in raztezek 19 %, vendar brez zadržkov glede njihove toksičnosti (Mathew et al., 2013). Med sintetičnimi hidrogeli prednjačijo hidrogeli iz poli(akrilamida), poli(akrilne kisline) in poli(metilenbisakrilamida), ki so zaradi svoje hidrofilne narave primerni za pripravo kompozitnih hidrogelov z nanofibrilirano celulozo. Tovrstni hidrogeli imajo lahko potencialno zelo visoke natezne trdnosti. Kompozitni hidrogel poli(akrilamida) in poli(akrilne kisline) sami po sebi ne dosežajo visoke natezne trdnosti (0,25 – 0,30 MPa), z dodatkom 10 % utežnega deleža celulozних nanofibril pa se natezna trdnost poveča na 2,7 MPa, prav tako se poveča raztezek pri pretrgu (32 % → 50 %) (Mahfoudhi & Boufi, 2016). Pomembna lastnost hidrogelov je tudi kapaciteta za zadrževanje vode, ki naj bi bila čim večja. Hidrogelne z lastnostmi superabsorberjev je moč pripraviti z dodatkom celulozних

nanofibril v kopolimerno matrico iz hitosana in poli(akrilne kisline). Z dodatkom 10 % utežnega deleža celuloznih nanofibril se je povečala kapaciteta zadrževanja vode iz 381 na 486 gramov vode na gram suhe snovi superabsorberja (Spagnol et al., 2012). Atraktivnost tovrstnih hidrogelov je sicer velika, vendar so problematični z vidika toksičnosti komponent v primeru, da so prisotni prosti monomeri. Možno je pripraviti tudi hidrokele z uporabo razvejanih in z amini zaključenih poli(etilenglikolov) (PEG-NH₂) in TEMPO modificirane celuloze (Yang et al., 2015). Do nastanka stabilnega hidrogela pride zaradi interakcije površinskih nabojev, pozitivnega na amski skupini poli(etilenglikola) ter negativnega karboksilatnega aniona TEMPO celuloze. Mehanske lastnosti hidrogela so odvisne predvsem od deleža TEMPO oksidiranih celuloznih nanofibril (TCNF). Hidrogel, ki so ga razvili iz 0,8 ut.% TCNF in 2 ut.% razvejanega PEG-NH₂, je imel vrednost elastičnega modula 300 Pa, s povečanjem deleža TCNF na 2 ut.% se je tudi elastični modul dvignil na 900 Pa (Yang et al., 2015).

6 POTENCIALNA UPORABA NANOCELULOZNIH HIDROGELOV

6 POTENTIAL USES OF NANOCELLULOSE HYDROGELS

Uporaba hidrogelov je zelo raznolika, od bolj preprostih aplikacij kot zadrževanja vode v kmetijstvu do visoko zahtevnih optičnih pripomočkov kot so kontaktne leče (Caló & Khutoryanskiy, 2015). Najbolj perspektivna uporaba nanoceluloznih hidrogelov pa so medicinske aplikacije. Medicinska uporaba sintetičnih hidrogelov, kot so npr. poli(akrilamid), poli(akrilna kislina) in drugi, ima že dolgo tradicijo. Med naravnimi hidrogeli so se uveljavili hidrogeli na osnovi želatine, alginske kisline in na primer, hialuronske kisline. Razvoj nanoceluloznih hidrogelov je trenutno še v povojih, saj je potrebno dodobra raziskati njihove dolgoročne učinke na zdravje ljudi. Med zelo verjetne potencialne uporabe nanoceluloznih hidrogelov štejemo strukture za dostavo zdravilnih učinkovin s kontroliranim sproščanjem (Paukkonen et al., 2017), strukture za proliferacijo humanih celic z namenom nadomeščanja



Slika 3. Potencialne uporabe hidrogelov za izdelke z visoko dodano vrednostjo (obloge za rane, filtracijski sistemi...) (Foto: J. Levanič).

Figure 3. Potential uses of hydrogels for high added value products (wound treatment, filtration systems...)

poškodovanih tkiv (Liu et al., 2016b; Rashad et al., 2017; Syverud et al., 2014; Xu et al., 2018; Zander et al., 2014) ter zdravljenje površinskih poškodb (Dong et al., 2013b; Liu et al., 2016b).

7 VARNOST NANOCELULOZNIH HIDROGELOV

7 SAFETY OF NANOCELLULOSE HYDROGELS

V biomedicini veljajo izjemno strogi pogoji za uporabo materialov, predvsem z vidika kratkoročne in dolgoročne varnosti ter potencialnih interakcij s tkivom ciljnega organizma. Toksičnost celulozних nanodelcev je odvisna od mnogih, še ne popolnoma razjasnenih dejavnikov in njihovih interakcij s celicami znotraj telesa. V primeru različnih velikostnih frakcij celulozних nanofibril je bilo ugotovljeno, da velikost celulozних nanofibril sama po sebi nima vpliva na rast in preživetje humanih epitelnih celic adenokarcinoma (HeLa 229 ATCC). Preživetje je odvisno od koncentracije celulozних nanofibril v disperziji. Slabše preživetje celic se je pojavilo pri disperzijah frakcije 20-40 nm s koncentracijo 0,24 mg/ml. Delež živih celic po 24 h je padel na 64 %, oziroma 16 % pod mejo, ki pomeni, da material ni toksičen za testirane organizme. Pri disperzijah s koncentracijami pod 0,24 mg/ml je bil delež živih celic po 24 h nad 80 % (Pitkänen et al., 2014). V eksperimentu s celicami hepato-holangiokarcinoma (HepG2 ATCC HB-8065) je bilo ugotovljeno, da hidrogeli iz celulozних nanofibril z utežnim deležem suhe snovi 1,7 % niso bili citotoksični za preiskovane celice. Mitohondrialna aktivnost celic je ostala identična aktivnosti kontrolnih celic. Razvoj celic znotraj hidrogela je bil ugoden, kar nakazuje na dobro biokompatibilnost nanofibrilirane celuloze s človeškimi tkivi (Bhattacharya et al., 2012). S spreminjanjem površinske kemije celulozних nanofibril, na primer s TEMPO oksidacijo ali karboksimetiliranjem, vplivamo tudi na biokompatibilnost in toksičnost materiala. Mišje fibroblaste (L929 ATCC) so vzgojili na podlagi iz karboksimetilirane in TEMPO oksidirane celuloze, oboje z negativnim površinskim nabojem. Izkazalo se je, da karboksimetilirana nanoceluloza ne predstavlja ugodnega medija za celično proliferacijo, rast celic je bila upočasnjena, odrasle celice so bile deformirane. Na drugi strani predstavlja TEMPO oksidirana celuloza ugoden me-

dij za proliferacijo fibroblastov, saj so odrasle celice imele karakteristično morfologijo, kar nakazuje na dobro kompatibilnost okolja s celicami (Rashad et al., 2017). Nekatere študije navajajo omejeno genotoksičnost nemodificirane nanofibrilirane celuloze. Genotoksičnost je bila opažena tako na 3T3 mišjih fibroblastih kot tudi na humanih limfocitih, vendar le s celuloznimi nanofibrilami premera med 200 in 100 nm, pri čemer se genotoksičnost zmanjša, če prihaja do agregacije nanofibril (de Lima et al., 2012). Koncentracije z najbolj negativnim vplivom na celice so bile 0,01 in 0,1 ut.%. TEMPO oksidirana celuloza je izkazovala genotoksične karakteristike na BEAS 2B mišjih fibroblastih v koncentracijah 950 µg/ml, med drugim tudi z znaki oksidativnega stresa na fibroblastih, vendar so bili znaki oksidativnega stresa sporadični in nezanesljivi (Hannukainen et al., 2012).

Varnostne karakteristike celulozних nanofibril so odvisne tudi od stanja, v katerem se nahajajo. Kadar so celulozne nanofibrile med proizvodnjo, transportom in večjim delom uporabe inkorporirane v nek tekoč medij (večinoma vodo) oziroma v materiale, iz katerih se ne sproščajo individualne fibrile (npr. hidrogeli, kompoziti, filmi, filamenti), je njihov vstop v telo močno omejen oziroma onemogočen. Aerosolizirane oblike celuloze lahko predstavljajo tveganje za vstop v organizem preko dihalnih poti. Problematične so lahko tudi različne površinske modifikacije, s katerimi na površino celulozних nanofibril uvajamo nove funkcionalne skupine.

8 POVZETEK

8 SUMMARY

Nanofibrillated cellulose as a material has attracted significant interest over the past few years, especially in the biomedical field where it can be used for the manufacture of highly hydrophilic materials that are capable of holding large amounts of water. These materials are also known as hydrogels. There is a number of ways these materials can be prepared from pure nanocellulose dispersions. They can be either prepared in a biological way with the use of microorganisms (bacterial cellulose) or more frequently by first preparing a nanocellulose dispersion and inducing gelation by physical or chemical means. The procedure depends on the surface chemistry of the cellulose nanofibrils. For

neat fibrils, with no surface modification, gelation is usually induced by strong alkali treatment. On the other hand, surface charged nanocelluloses do not respond well to strong alkali treatment but are regularly gelled with the use of multivalent metal cations or dilute mineral acids. Additionally, covalent crosslinking of cellulose nanofibrils is possible with the use of multifunctional amines or highly reactive functional groups such as epoxides. Furthermore, both kinds of cellulose, neat and surface modified, are incorporated into hydrophilic polymer matrices as a reinforcement material. The potential of nanocellulose hydrogels is great as they offer versatility and are, for the most part, benign in contact with human tissues. This makes them prime candidates for use in the biomedical field.

ZAHVALA

ACKNOWLEDGEMENT

Zahvaljujemo se Agenciji republike Slovenije za raziskovalno dejavnost (ARRS), programski skupini P4-0015 ter Slovenski znanstveni fundaciji za materialno ter finančno podporo raziskavam, ki potekajo na področju zasnove novih nanoceluloznih hidrogelov. Del raziskav je potekal tudi v okviru programa CelKrog - Izkoriščanje potenciala biomase za razvoj naprednih materialov in bio-osnovanih produktov (C3330-16-529004), ki se odvija v okviru Strategije pametne specializacije RS, prednostno področje Mreže za prehod v krožno gospodarstvo.

LITERATURA

REFERENCES

- Abe, K., & Yano, H. (2011). Formation of hydrogels from cellulose nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 733-737, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.028>.
- Abe, K., & Yano, H. (2012). Cellulose nanofiber-based hydrogels with high mechanical strength. *Cellulose*, 19(6), 1907-1912, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9784-3>.
- Andersson, S., Serimaa, R., Paakkari, T., Saranpää, P., & Pesonen, E. (2003). Crystallinity of wood and the size of cellulose crystallites in Norway spruce (*Picea abies*). *Journal of Wood Science*, 49(6), 531-537, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10086-003-0518-x>.
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2014). Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Eng Part B Rev*, 20(6), 683-696, DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0086>.
- Basu, A., Heitz, K., Stromme, M., Welch, K., & Ferraz, N. (2018). Ion-crosslinked wood-derived nanocellulose hydrogels with tunable antibacterial properties: Candidate materials for advanced wound care applications. *Carbohydr Polym*, 181, 345-350, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.085>.
- Bhattacharya, M., Malinen, M. M., Lauren, P., Lou, Y. R., Kuisma, S. W., Kanninen, L., . . . Yliperttula, M. (2012). Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *J Control Release*, 164(3), 291-298, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.039>.
- Buwalda, S. J., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2017). Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules*, 18(2), 316-330, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01604>.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.
- Chau, M., Sriskandha, S. E., Pichugin, D., Therien-Aubin, H., Nykypanchuk, D., Chauve, G., . . . Kumacheva, E. (2015). Ion-Mediated Gelation of Aqueous Suspensions of Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules*, 16(8), 2455-2462, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00701>.
- De France, K. J., Hoare, T., & Cranston, E. D. (2017). Review of Hydrogels and Aerogels Containing Nanocellulose. *Chemistry of Materials*, 29(11), 4609-4631, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00531>.
- de Lima, R., Oliveira Feitosa, L., Rodrigues Maruyama, C., Abreu Barga, M., Yamawaki, P. C., Vieira, I. J., . . . Fernandes Fraceto, L. (2012). Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. *Int J Nanomedicine*, 7, 3555-3565, DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S30596>.
- Dong, H., Snyder, J. F., Tran, D. T., & Leadore, J. L. (2013b). Hydrogel, aerogel and film of cellulose nanofibrils functionalized with silver nanoparticles. *Carbohydr Polym*, 95(2), 760-767, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.041>.
- Dong, H., Snyder, J. F., Williams, K. S., & Andzelm, J. W. (2013a). Cation-induced hydrogels of cellulose nanofibrils with tunable moduli. *Biomacromolecules*, 14(9), 3338-3345, DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400993f>.
- Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials Today*, 16(6), 220-227, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>.
- Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions: W. de Gruyter.
- Habibi, Y. (2014). Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chem Soc Rev*, 43(5), 1519-1542, DOI: <https://doi.org/10.1039/c3cs60204d>.

- Hannukainen, K.-S., Suhonen, S., Savolainen, K., & Norppa, H. (2012). Genotoxicity of nanofibrillated cellulose in vitro as measured by enzyme comet assay. *Toxicology Letters*, 211, S71, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.276>.
- Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L. A., & Lindström, T. (2007). An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European Polymer Journal*, 43(8), 3434-3441, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.05.038>.
- Highley, C. B., Prestwich, G. D., & Burdick, J. A. (2016). Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Curr Opin Biotechnol*, 40, 35-40, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.008>.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*, 101(7), 1869-1880, DOI: <https://doi.org/10.1021/cr000108x>.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 37(1), 106-126, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- Liu, H., Wang, A., Xu, X., Wang, M., Shang, S., Liu, S., & Song, J. (2016c). Porous aerogels prepared by crosslinking of cellulose with 1,4-butanediol diglycidyl ether in NaOH/urea solution. *RSC Advances*, 6(49), 42854-42862, DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ra07464b>.
- Liu, J., Cheng, F., Grenman, H., Spoljaric, S., Seppala, J., J. E. E., . . . Xu, C. (2016b). Development of nanocellulose scaffolds with tunable structures to support 3D cell culture. *Carbohydr Polym*, 148, 259-271, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.064>.
- Liu, J., Chinga-Carrasco, G., Cheng, F., Xu, W., Willför, S., Syverud, K., & Xu, C. (2016a). Hemicellulose-reinforced nanocellulose hydrogels for wound healing application. *Cellulose*, 23(5), 3129-3143, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1038-3>.
- Liu, P., Mai, C., & Zhang, K. (2017). Formation of Uniform Multi-Stimuli-Responsive and Multiblock Hydrogels from Dialdehyde Cellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 5313-5319, DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00646>.
- Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R., & Li, Z. (2014). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource Technology*, 151, 113-119, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.052>.
- Mahfoudhi, N., & Boufi, S. (2016). Poly (acrylic acid-co-acrylamide)/cellulose nanofibrils nanocomposite hydrogels: effects of CNFs content on the hydrogel properties. *Cellulose*, 23(6), 3691-3701, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1074-z>.
- Mathew, A. P., Oksman, K., Pierron, D., & Harmad, M.-F. (2011). Cross-linked fibrous composites based on cellulose nanofibers and collagen with in situ pH induced fibrillation. *Cellulose*, 19(1), 139-150, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9624-x>.
- Mathew, A. P., Oksman, K., Pierron, D., & Harmand, M.-F. (2013). Biocompatible Fibrous Networks of Cellulose Nanofibres and Collagen Crosslinked Using Genipin: Potential as Artificial Ligament/Tendons. *Macromolecular Bioscience*, 13(3), 289-298, DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.201200317>.
- Nair, S. S., Zhu, J. Y., Deng, Y., & Ragauskas, A. J. (2014). Hydrogels Prepared from Cross-Linked Nanofibrillated Cellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(4), 772-780, DOI: <https://doi.org/10.1021/sc400445t>.
- Nordenstrom, M., Fall, A., Nystrom, G., & Wagberg, L. (2017). Formation of Colloidal Nanocellulose Glasses and Gels. *Langmuir*, 33(38), 9772-9780, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01832>.
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 10-10, DOI: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>.
- Paukkonen, H., Kunnari, M., Laurén, P., Hakkarainen, T., Auvinen, V.-V., Oksanen, T., . . . Laaksonen, T. (2017). Nanofibrillar cellulose hydrogels and reconstructed hydrogels as matrices for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 269-280, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.002>.
- Pitkänen, M., Kangas, H., Laitinen, O., Sneck, A., Lahtinen, P., Peresin, M. S., & Niinimäki, J. (2014). Characteristics and safety of nano-sized cellulose fibrils. *Cellulose*, 21(6), 3871-3886, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0397-x>.
- Rashad, A., Mustafa, K., Heggset, E. B., & Syverud, K. (2017). Cyto-compatibility of Wood-Derived Cellulose Nanofibril Hydrogels with Different Surface Chemistry. *Biomacromolecules*, 18(4), 1238-1248, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01911>.
- Roman, M. (2015). Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review. *Industrial Biotechnology*, 11(1), 25-33, DOI: <https://doi.org/10.1089/ind.2014.0024>.
- Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., & Isogai, A. (2007). Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, 8(8), 2485-2491, DOI: <https://doi.org/10.1021/bm0703970>.
- Spagnol, C., Rodrigues, F. H. A., Pereira, A. G. B., Fajardo, A. R., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2012). Superabsorbent hydrogel composite made of cellulose nanofibrils and chitosan-graft-poly(acrylic acid). *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2038-2045, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.017>.
- Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T., & Potthast, A. (2015). Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1547-1571, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>.
- Syverud, K., Pettersen, S. R., Draget, K., & Chinga-Carrasco, G. (2014). Controlling the elastic modulus of cellulose nanofibril hydrogels—scaffolds with potential in tissue engineering. *Cellulose*, 22(1), 473-481, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0470-5>.
- Wågberg, L., Decher, G., Norgren, M., Lindström, T., Ankerfors, M., & Axnäs, K. (2008). The Build-Up of Polyelectrolyte Multilayers of Microfibrillated Cellulose and Cationic Polyelectrolytes. *Langmuir*, 24(3), 784-795, DOI: <https://doi.org/10.1021/la702481v>.

- Xu, C., Zhang Molino, B., Wang, X., Cheng, F., Xu, W., Molino, P., . . . Wallace, G. (2018). 3D printing of nanocellulose hydrogel scaffolds with tunable mechanical strength towards wound healing application. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(43), 7066-7075, DOI: <https://doi.org/10.1039/c8tb01757c>.
- Xu, Y., Han, J., & Lin, H. (2017). Fabrication and characterization of a self-crosslinking chitosan hydrogel under mild conditions without the use of strong bases. *Carbohydr Polym*, 156, 372-379, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.046>.
- Yang, J., Zhang, X., Ma, M., & Xu, F. (2015). Modulation of Assembly and Dynamics in Colloidal Hydrogels via Ionic Bridge from Cellulose Nanofibrils and Poly(ethylene glycol). *ACS Macro Letters*, 4(8), 829-833, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00422>.
- Zander, N. E., Dong, H., Steele, J., & Grant, J. T. (2014). Metal cation cross-linked nanocellulose hydrogels as tissue engineering substrates. *ACS Appl Mater Interfaces*, 6(21), 18502-18510, DOI: <https://doi.org/10.1021/am506007z>.

OPTIMIZATION OF ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE) OF SILVER FIR WOOD (ABIES ALBA MILL.)

OPTIMIZACIJA POSPEŠENE EKSTRAKCIJE S TOPILI (ASE) NA PRIMERU LESA BELE JELKE (ABIES ALBA MILL.)

Eli Keržič^{1*}, Viljem Vek¹, Ida Poljanšek¹, Primož Oven¹

UDK 630*813.2

Original scientific article / *Izvirni znanstveni članek*

Received / *Prispelo*: 29. 11. 2019

Accepted / *Sprejeto*: 17. 12. 2019

Abstract / *Izvleček*

Abstract: Qualitative and quantitative analysis of wood plant extractives depend on the efficiency of the extraction method used. The aim of this study was the application of the accelerated solvent extraction system ASE 350 to obtain hydrophilic extracts from silver fir wood (*Abies alba* Mill.) and optimization of the extraction protocol. Silver fir trees originated from Kočevska Reka. Dissected and milled samples of sapwood, heartwood and knots were extracted with the ASE 350 with water, ethanol (95 % aq), acetone (95 % aq) and ethyl acetate. The number of extraction cycles was determined. Analysis of extracts was done by UV/Vis spectrophotometry and HPLC. The most effective solvent for the extraction of phenolic components from heartwood was ethanol (95 % aq), in the case of sapwood water and acetone (95 % aq) in the case of knotwood. Only two 5-minute extraction cycles were required for sufficient extraction yield when using ASE 350 at 100 °C and 103.42 bar.

Keywords: accelerated solvent extraction (ASE), silver fir (*Abies alba*), hydrophilic extractives, UV/Vis, chromatography

Izvleček: Kvalitativna in kvantitativna analiza ekstraktivov iz lesa je v veliki meri odvisna od učinkovitosti uporabljene ekstrakcijske metode. Cilj te študije je bil uporabiti sistem za pospešeno ekstrakcijo ASE 350 za pridobivanje hidrofилnih ekstraktivov iz lesa bele jelke (*Abies alba* Mill.) ter optimizirati protokol ekstrakcije. Drevesa bele jelke so bila posekana v gozdovih Kočevske Reke. Izolirane in zmlete vzorce beljave, jedrovine in grč smo ekstrahirali z ASE 350 z vodo, etanolom (95 % aq), acetonom (95 % aq) in etil acetatom. Določili smo število ekstrakcijskih ciklov. Semi-kvantitativno analizo ekstraktov smo izvedli z UV/Vis spektrofotometrijo, kvalitativno analizo pa s HPLC. Najučinkovitejše topilo za ekstrakcijo fenolnih komponent iz jedrovine je bil etanol (95 % aq), v primeru beljave je bila to voda, pri grčah pa aceton (95 % aq). Za učinkovito ekstrakcijo z uporabo ASE 350 pri 100 °C in 103,42 bar sta bila potrebna le dva 5-minutna ekstrakcijska cikla.

Ključne besede: pospešena ekstrakcija s topili (ASE), bela jelka (*Abies alba*), hidrofилni ekstraktivi, UV/Vis, kromatografija

1 INTRODUCTION

1 UVOD

Wood is defined as the secondary xylem of woody plants, and in engineering terms as a polymer composite composed of structural components (95 % to 98 %) (Holmbom, 2011; Vek et al., 2019a). These include cellulose, lignin and hemicelluloses (Sjöström, 1993; Fengel and Wegener, 1989). In addition, wood tissues also contain smaller amounts of non-structural compounds called extractives (Sjöström, 1993; Fengel and Wegener, 1989). These are various low- or medium-molecular-weight substances found in cell lumina and intercellular

spaces (Oven et al., 2011). Some extractives are important from a physiological point of view as they play an important role in plant metabolism, like nonstructural carbohydrates, sterols and fatty acids (Taiz & Zeiger, 2002). The extractives that are considered as secondary metabolites contribute to the protection of plants against herbivorous animals and microorganisms (fungi), attract pollinators, and enable plant-to-plant competition and symbiosis between organisms (Taiz & Zeiger, 2002).

Extractives can be extracted from wood with water or organic solvents (Oven et al., 2011). Given the solvent in which they are soluble, extractives can be divided into lipophilic and hydrophilic (Vek et al., 2016). Hydrophilic extracts are compounds soluble in polar solvents. They include sugars, phenolic acids, flavonoids, stilbene, quinones, lignans and

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology, Ljubljana, Slovenia

* e-mail: eli.kerzic@bf.uni-lj.si

tannins (Willför et al., 2003a; Willför et al., 2004). However, lipophilic extracts are compounds soluble in non-polar organic solvents. The following groups of lipophilic extracts are present in trees: fatty acids, triacylglycerols, waxes, sterols and terpenoids (Vek et al., 2019a).

Various procedures are used for extraction from wood. The most frequently used methods are conventional Soxhlet extraction (Vek et al., 2018), ultrasound-assisted extraction (Santos et al., 2019), microwave-assisted extraction (Quiles-Carrillo et al., 2019), accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction (Feng et al., 2016). Accelerated solvent extraction (ASE), a technique patented by Dionex Corporation, has received increased attention due to its suitability for extracting various plant material. In this technique, the liquid phase is used at high pressure and temperature but below a critical point. High

pressure is required to keep the solvent in a liquid state, and the pressure rarely affects the extraction process. This approach is considered an effective way to increase automation, but it can also shorten the process time and reduce the amount of solvent required for extraction (Priego-Capote & Delgado de la Torre, 2013). ASE has a comparable extraction yield to that at the Soxhlet extraction, with less time and solvents being consumed (Vek et al., 2018). Another advantage of the ASE system is its connectivity to other steps of analytical processes, such as filtration, preconcentration, derivatization, chromatographic separation or detection. ASE can also be used to extract compounds that have low solubility in the selected solvent (e.g., water). Prior to extraction with ASE, solid samples such as wood must be ground and sieved to obtain a homogeneous fraction. The sample thus prepared is loaded into an extraction cell which is inserted

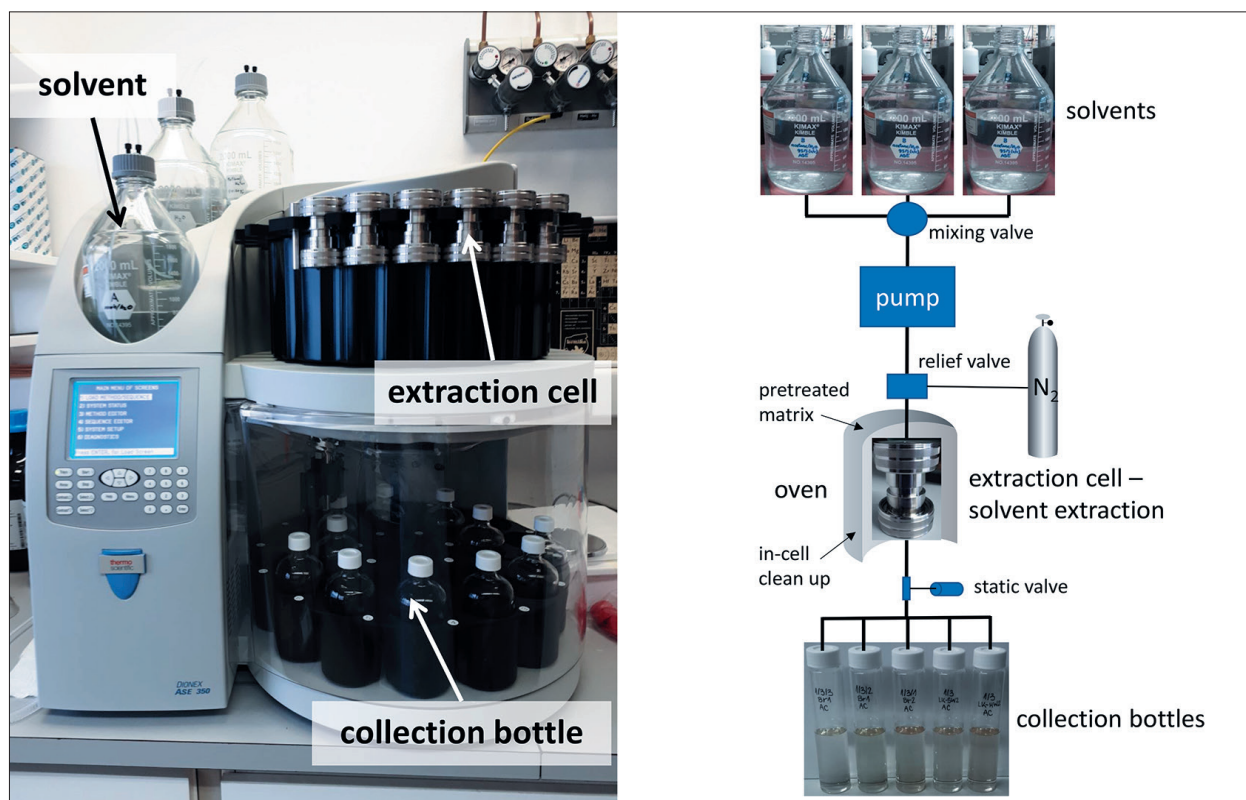


Figure 1. The device for accelerated solvent extraction, an ASE 350 (Thermo Scientific Dionex), in the laboratory of the Chair of the Chemistry of Wood and other Lignocellulosic Materials at the Department of Wood Science and Technology, Biotechnical Faculty, and a schematic diagram of the system (Thermo Scientific, 2013)

Slika 1. Naprava za pospešeno ekstrakcijo ASE 350 (Thermo Scientific Dionex) v laboratoriju Katedre za kemijo lesa in drugih lignoceluloznih materialov Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti in shematski prikaz sistema (Thermo Scientific, 2013)

into the ASE system. The extraction cell is restored to the selected temperature and then filled with the solvent, thereby increasing the pressure in the extraction cell. When the temperature and pressure are balanced then a static extraction cycle takes place and lasts for pre-set time. After static extraction is completed, the valve opens and the extract is poured into a collecting bottle. The extraction cell is washed with solvent or blown with inert gas (e.g. nitrogen) before and after extraction (Priego-Capote & Delgado de la Torre, 2013).

The aim of the study was optimization of extraction using an ASE 350 (Thermo Scientific Dionex) (Figure 1), which included selection of the best extraction solvent and examination of the number of extraction cycles needed to maximize extraction yield of different wood tissues of silver fir (*Abies alba* Mill.).

2 MATERIALS AND METHODS

2 MATERIALI IN METODE

2.1 CHEMICALS AND STANDARDS

2.1 KEMIKALIJE IN STANDARDI

All the solvents and reagents were of analytical grade. The extraction solvents (water, acetone, ethanol, and ethyl acetate) and solvents for chromatographic analysis were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The Folin-Ciocalteu phenol reagent (2 N), sodium carbonate (anhydrous) and gallic acid monohydrate (HPLC assay, $\geq 99\%$) were provided by Merck (Sigma Aldrich Chemie).

2.2 PLANT MATERIAL AND PREPARATION OF SAMPLES

2.2 RASTLINSKI MATERIAL IN PRIPRAVA VZORCEV

Three silver fir trees (*Abies alba* Mill.) originating from the forest of Kočevska Reka were included in the study. Tree felling was carried out in mid-December 2018. The sample discs were taken from the upper trunks.

The discs were planed, thereafter we marked the boundary between the sapwood and heartwood, counted the growth rings, measured their diameters, and marked the sampling points. Wood tissues from the trunk, knots and branches were sampled. Individual samples were dried at

40 °C for 24 hours and then disintegrated on a Retsch SM 2000 cutting mill using a sieve with 1 mm openings. The ground samples were stored in a dark and cool place until the beginning of the chemical analyzes. Before extraction, all samples were freeze-dried to an absolutely dry state for 24 h at - 85° C and 0.045 mbar.

2.3 EXTRACTION

2.3 EKSTRAKCIJA

Homogenized heartwood (HW), sapwood (SW), and knotwood (KW) samples from all sample discs were extracted at elevated temperature and pressure (100 °C and 103.42 bar) on an accelerated solvent extraction system, an ASE 350. We used different solvents: water, EtOH / H₂O (95/5, v/v), EtOAc, and Me₂CO / H₂O (95/5, v/v). After selecting the appropriate solvent, the samples were extracted with five extraction cycles (5 min per cycle). We captured the extracts from each cycle separately. The extracts were evaluated colorimetrically by using UV/Vis spectrophotometry.

2.4 SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS

2.4 SPEKTROFOTOMETRIČNA ANALIZA

Total phenols were measured according to the protocol already described in Vek et al. (2013, 2014), Scalbert et al. (1989) and Singleton and Rossi (1965). Diluted Folin-Ciocalteu phenol reagent (*aq*) and an aqueous solution of sodium carbonate (75 g/l) were added to each wood extract. After incubation of the reaction mixtures, the absorbance was measured at 765 nm with a UV/Vis spectrophotometer Lambda (Perkin-Elmer). The results were determined by the standard curve of gallic acid and expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of dried wood sample (mg GAE/g).

2.5 HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

2.5 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Chromatographic analysis was performed on a Thermo Scientific system for high performance liquid chromatography (Accela HPLC) equipped with a photodiode array detector (PDA). Separation of samples was done on a Thermo Accucore ODS column (4.6 id × 150 mm, 2.6 μm). Water (A) and methanol (B), both containing 0.1 % of formic

acid, served as a mobile phase. The flow rate of the mobile phase was set at 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$. The gradient used was 5–95 % of the solvent (B). Both the autosampler containing sample trays and the column oven were thermostated at 5 $^{\circ}\text{C}$ and 30 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Absorbance was measured at 275 nm and UV spectra were recorded from 200 nm to 400 nm. Peak identities were investigated by comparison of retention times and UV spectra of separated compounds with those of analytical standards. The chromatographic method was linear in the selected concentration range ($R^2 \geq 0.99$). The samples were measured in triplicate. The identification of phenolic compounds was done with the aid of external standards.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Chemical analysis included determination of total phenol content and identification of individual phenolic compounds (lignans, flavonoids and phenolic acids).

The aim of this study was to maximize the yields of the target compounds. Figure 2 shows the contents of total phenols in the aqueous (H_2O), ethanol ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$), ethyl acetate (EtOAc) and acetone ($\text{Me}_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$) extracts of heartwood (HW), sapwood (SW), and knotwood (KW) of silver fir (*A. alba*).

The extraction yields were different with the various solvents used for the different categories of wood. The most effective solvent for the extraction of phenolic components from heartwood was ethanol/water (95/5, v/v), while in the case of sapwood it was water and in that of knotwood it was acetone/water (95/5, v/v) (Figure 2). Ethyl acetate gave the lowest extraction yield in the case of all tissues. Acetone/water (95/5) was chosen as the most promising solvent for further sequential extractions, because the extraction yield of knotwood is the focus of the industrial partner who supported this investigation.

Further experimental work focused on examination of the number of extraction cycles needed to maximize the extraction yield. Figure 3 shows the contents of total phenols in the extracts obtained at five successive extraction cycles.

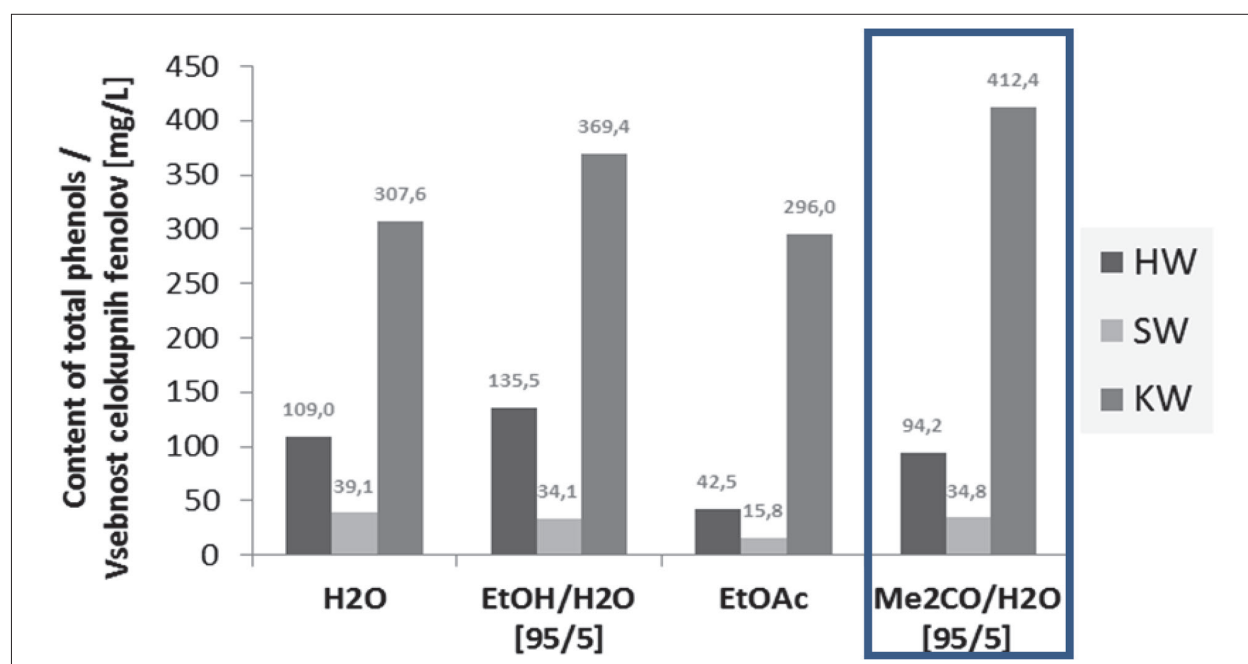


Figure 2. Content of total phenols in the aqueous (H_2O), ethanol ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$), ethyl acetate (EtOAc), and acetone ($\text{Me}_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$) extracts of heartwood (HW), sapwood (SW), and knotwood (KW) of silver fir (*A. alba*) (the frame indicates the most suitable solvent)

Slika 2. Vsebnost celokupnih fenolov v vodnih (H_2O), etanolnih ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$), etil acetatnih (EtOAc) in acetonskih ($\text{Me}_2\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$) ekstraktih jedrovine (HW), beljave (SW) in lesa grč (KW) bele jelke (*A. alba*) (z okvirjem je označeno najbolj primerno topilo)

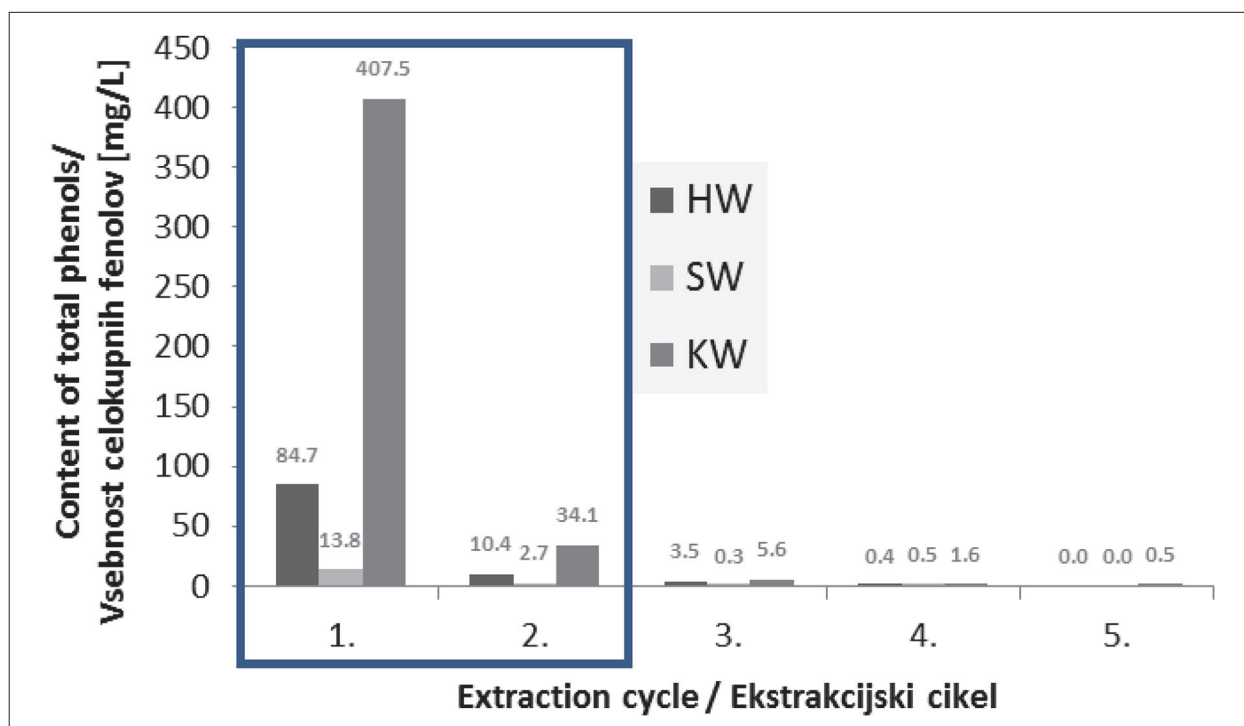


Figure 3. Content of total phenols in the acetone extracts of heartwood (HW), sapwood (SW) and knotwood (KW) of silver fir (*A. alba*) obtained in different successive extraction cycles (the frame indicates the appropriate number of cycles).

Slika 3. Vsebnost celokupnih fenolov v acetonskih ekstraktih jedrovine (HW), beljave (SW) in lesa grč (KW) bele jelke (*A. alba*), pridobljenih v različnih zaporednih ekstrakcijskih ciklih (z okvirjem je označeno primerno število ciklov).

Figure 3 reveals that the extraction yield decreased with each consecutive cycle. Most extracts were obtained from wood with the first extraction cycle (Vek et al., 2019b). The amount of total phenols in the extracts of knotwood was 407.5 mg/L after the first extraction cycle, 34.1 mg/L after the second, and less than 10 mg/L were obtained from the following cycles. In the extracts of heartwood and sapwood, the content of total phenols was already 10 mg/L or lower in the second extraction cycle. The results of this analysis show that only two extraction cycles are required for sufficient extraction yield, which corresponds to the protocol described by Willför et al. (2003b).

The chromatograms in Figure 4 show the compounds contained in the acetone extracts of living knots of silver fir (*A. alba*) after the first, second, third and fourth static extraction cycles in the ASE system.

The highest peaks represent the lignans, which are the dominant group of compounds in

the extracts of silver fir. They are also present in the extract of the second extraction cycle. In addition to lignans, live knots also contain phenolic acids and flavonoids, which are represented by lower peaks in the chromatogram, and are no longer extracted with the second cycle, with the exception of taxifolin. As the most polar compound, the flavonoid epicatechin ($t_r = 8.0$ min) was the first to elute, followed by phenolic acids homovanilic acid ($t_r = 8.1$ min) and coumaric acid ($t_r = 9.5$ min), flavonoid taxifolin ($t_r = 9.7$ min), ferulic acid ($t_r = 10.0$), lignans isolariciresinol (Iso-Lari, $t_r = 10.2$ min), lariciresinol ($t_r = 11.5$ min), secoisolariciresinol ($t_r = 11.7$ min), pinoresinol ($t_r = 12.6$ min), and matairesinol ($t_r = 12.9$ min), and finally the less polar flavonoid quercetin was eluted from the column ($t_r = 13.6$ min). Our results on composition of phenolic extractives of silver fir wood are in accordance with the data from the literature (Willför et al., 2004; Benkovic et al., 2017).

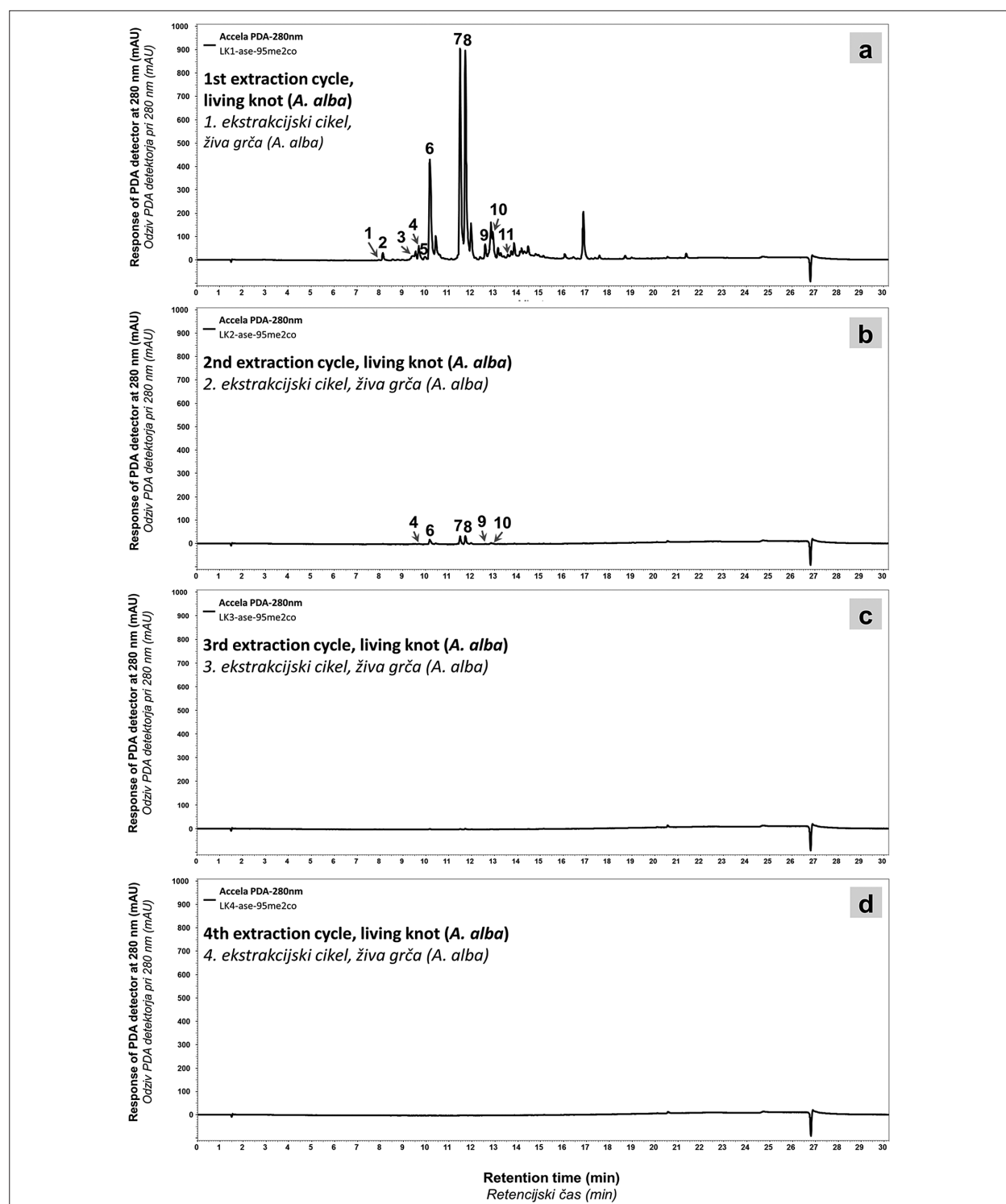


Figure 4. HPLC-PDA chromatograms of silver fir extracts (*A. alba*) taken at 280 nm. Acetone extracts of living knots after a) the first, b) second, c) third and d) fourth static extraction cycles in the ASE system (the numbers of marked compounds given in Table 1).

Slika 4. Kromatogrami HPLC-PDA ekstraktov bele jelke (*A. alba*), posneti pri 280 nm. Acetonski ekstrakt lesa žive grče po a) prvem, b) drugem c) tretjem in d) četrtem statičnem ekstrakcijskem ciklu v sistemu ASE (s številkami označene spojine so podane v preglednici 1).

Table 1. Identification of the marked peaks on the chromatogram
Preglednica 1. Identifikacija označenih vrhov na kromatogramu

Peak number / Št. vrha	Identified phenolic compound / Identificirana fenolna spojina	Compound type / Tip spojine	R _t of HPLC analysis / R _t HPLC-analize [min]
1.	Epicatechin / Epikatehin	Flavonoid / Flavonoid	7.96
2.	Homovanillic acid / Homovanilinska kislina	Phenolic acid / Fenolna kislina	8.14
3.	Coumaric acid / Kumarilna kislina	Phenolic acid / Fenolna kislina	9.46
4.	Taxifolin / Taksifolin	Flavonoid / Flavonoid	9.69
5.	Ferulic acid / Ferulna kislina	Phenolic acid / Fenolna kislina	9.99
6.	Isolariciresinol / Izolaricirezol	Lignan / Lignan	10.20
7.	Lariciresinol / Laricirezol	Lignan / Lignan	11.50
8.	Secoisolariciresinol / Sekoizolaricirezol	Lignan / Lignan	11.74
9.	Pinoresinol / Pinorezol	Lignan / Lignan	12.60
10.	Matairesinol / Matairezol	Lignan / Lignan	12.91
11.	Quercetin / Kvercetin	Flavonoid / Flavonoid	13.60

4 CONCLUSION

4 ZAKLJUČEK

The results of the analysis show that only two extraction cycles, each 5 min long, are required for sufficient extraction yield when using an accelerated solvent extraction system ASE 350 at T = 100 °C and P = 103.42 bar, to remove the majority of phenolic components present in a different wood tissues of silver fir tree (*A. alba*). Accelerated solvent extraction is considered an effective extraction method, one which essentially reduces the extraction time and consumption of solvents, while maximizing the extraction efficiency in comparison to traditional extraction methods. The extraction protocol established in this study will be further employed in extensive investigation of the hydrophilic extractives content in the wood and bark of silver fir from different growth sites, to meet the needs of our industrial partner.

5 SUMMARY

5 POVZETEK

Učinkovitost uporabljene ekstrakcijske metode v veliki meri vpliva na kvalitativno in kvantitativno analizo lesnih ekstraktivov. Pri ekstrakciji iz lesa se poslužujemo različnih ekstrakcijskih postopkov. Med najpogosteje uporabljene tehnike štejemo ekstrakcijo v Soxhletovem aparatu, ultrazvočno ekstrakcijo, ekstrakcijo z mikrovalovi, pospešeno

ekstrakcijo in superkritično ekstrakcijo. V pričujoči študiji smo uporabili eno od sodobnejših tehnik, s komercialnim poimenovanjem ASE (akronim za accelerated solvent extraction). Pospešena ekstrakcija ASE je (Singleton & Rossi 1965) metoda, pri kateri se uporablja tekoča faza pri visokem tlaku in temperaturi, vendar pod kritično točko. Visok tlak je potreben za ohranjanje topila v tekočem stanju, vendar ta le redko vpliva na postopek ekstrakcije. S tem pristopom lahko povečamo avtomatizacijo, skrajšamo čas postopka in zmanjšamo količino topila, potrebnega za ekstrakcijo.

Cilj študije je bil uporabiti sistem za pospešeno ekstrakcijo ASE 350 za pridobivanje hidrofilnih ekstraktivov iz različnih kategorij lesa bele jelke (*Abies alba* Mill.) ter optimizirati protokol ekstrakcije. V ta namen smo s sistemom za pospešeno ekstrakcijo ASE 350 izvedli ekstrakcije z različnimi topili in v več statičnih ekstrakcijskih ciklih ter izvedli analize posameznih ekstraktov.

V študijo so bila vključena drevesa bele jelke, ki so bila posekana v gozdovih Kočevske Reke. Vzorčne kolute smo odvzeli iz zgornjega dela dreves. V mizarški delavnici smo izolirali vzorce beljave, jedrovine in grč ter jih zmlleli na delce, velike 1 mm ali manj. Z namenom identifikacije najučinkovitejšega ekstrakcijskega topila smo zmlate vzorce ekstrahirali z ASE 350 pri 100 °C in 103,42 bar z vodo, etanolom / vodo (95/5), acetonom / vodo (95/5) in etil acetatom. Z zajemanjem ekstrakta vsakega

ekstrakcijskega cikla posebej in analizo le-teh smo nato določili število ekstrakcijskih ciklov. S tem smo optimizirali čas ekstrakcije in porabo topila. Semikvantitativno analizo ekstraktov smo izvedli z UV/Vis spektrofotometrijo, kvalitativno analizo pa s HPLC z uporabo zunanjih standardov.

Najučinkovitejše topilo za ekstrakcijo fenolnih komponent iz jedrovine je bil etanol / voda (95/5, v/v), v primeru beljave je bila to voda, pri grčah pa aceton / voda (95/5, v/v). Rezultati te analize so pokazali, da sta za učinkovito ekstrakcijo fenolnih spojin s pospešenim sistemom za ekstrakcijo ASE 350 pri $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $P = 103,42\text{ bar}$, potrebna le dva ekstrakcijska cikla, trajajoča po 5 minut. Spojine, ki smo jih identificirali v lesu bele jelke, so bile epikatehin, homovanilinska kislina, kumarilna kislina, taksifolin, ferulna kislina, izolaricirezinol, laricirezinol, sekoizolaricirezinol, pinorezinol, matairezinol in kvercetin. Prevladujoča skupina spojin so bili lignani izolaricirezinol, laricirezinol in sekoizolaricirezinol.

ACKNOWLEDGMENTS

ZAHVALA

The authors would like to thank to the programme group P4-0015 Wood and lignocellulosic composites for partial financial support of the research. The research and partial financing of ASE 350 was provided within the RDI project Cel. Cycle: "Potential of biomass for development of advanced materials and bio-based products", co-financed by the Republic of Slovenia, Ministry of Education, Science and Sport, and European Union through the European Regional Development Fund, 2016-2020. Financial support for purchasing of the ASE 350 and research was partially provided within the project APPLAUSE (UIA02-228) co-financed by the European Regional Development Fund through the Urban Innovative Actions Initiative (www.ljubljana.si/en/applause/). Special thanks goes to Ars Pharmae d.o.o. for purchasing the chromatographic standards of lignans, to Stefan Willför and Patrick Ecklund from Åbo Akademi University for donation of lignans, and to Mr. Aleš Marolt and the company Kočevski les d.o.o. for providing silver fir material.

LITERATURE

VIRI

- Benkovic, E. T., Zigon, D., Mihailovic, V., Petelinc, T., Jamnik, P., & Krefc, S. (2017). Identification, in vitro and in vivo Antioxidant Activity, and Gastrointestinal Stability of Lignans from Silver Fir (*Abies alba*) Wood Extract. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 37, 467-477.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1989). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Feng, Y., & Meier, D. (2016). Comparison of supercritical CO₂, liquid CO₂, and solvent extraction of chemicals from a commercial slow pyrolysis liquid of beech wood. *Biomass and Bioenergy*, 85, 346-354, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.12.027>.
- Holmbom, B. (2011). Extraction and utilisation of non-structural wood and bark components. In: *Biorefining of Forest Resources*, (February), 178-224.
- Oven, P., Vek, V., & Poljanšek, I. (2011). Flavonoidi lesa in drevesne skorje. *Les*, 63, (11/12), 412-417.
- Priego-Capote, F., & Delgado de la Torre, M. del P. (2013). Accelerated liquid extraction. In: *Rostagno, M. A., Prado, J. M.: Natural product extraction: Principles and applications*. Brazil, University of Campinas.
- Quiles-Carrillo, L., Mellinas, C., Garrigos, M. C., Balart, R., & Torres-Giner, S. (2019). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity from Carob Pods. *Food Analytical Methods*, 2480-2490, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01596-3>.
- Santos, K. A., Gonçalves, J. E., Cardozo-Filho, L., & da Silva, E. A. (2019). Pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction of α -bisabolol from candeia (*Eremanthus erythropappus*) wood. *Industrial Crops and Products*, 130, 428-435, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.013>.
- Scalbert, A., Monties, B., & Janin, G. (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1324-1329.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A., Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sjöström, E. (1983). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. New York, Academic Press, Inc.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland, Sinauer Associates.
- Thermo Scientific (2013). Accelerated Solvent Extraction, URL: <https://www.kobis.si/prodajni-program/priprava-vzorcev/ASE-150-350.pdf>.
- Vek, V., Oven, P., & Humar, M. (2013). Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77, 91-97.
- Vek, V., Oven, P., Ters, T., Poljanšek, I., & Hinterstoisser, B. (2014). Extractives of mechanically wounded wood and knots in beech. *Holzforchung*, pp. 529.

Keržič, E., Vek, V., Poljanšek, I., & Oven, P.: Optimization of accelerated solvent extraction (ASE) of silver fir wood (*Abies alba* Mill.)

Vek, V., Oven, P., & Poljanšek, I. (2016). Pregled lipofilnih i hidrofilnih ekstraktivnih tvari u tkivima obične bukve. *Drvena Industrija*, 67(1), 85–96, DOI: <https://doi.org/10.5552/drind.2016.1511>.

Vek, V., Oven, P., & Poljanšek, I. (2018). Comparison of two extraction and two chromatographic methods in analysis of beech wood extractives. *European Journal of Wood and Wood Products*, 76(1), 389–392, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00107-017-1216-5>.

Vek, V., Vivod, B., Poljanšek, I., & Oven, P. (2019a). Vsebnost ekstraktivov v skorji in lesu robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) Content of extractives in bark and wood of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Acta Silvae et Ligni*, 119, 13–25, DOI: <https://doi.org/10.20315/ASetL.119.2>

Vek, V., Poljanšek, I., & Oven, P. (2019b). Efficiency of three conventional methods for extraction of dihydrorobinetin and robinetin from wood of black locust. *European Journal of Wood and Wood Products*, 77, 891–901.

Willfor, S., Hemming, J., Reunanen, M., & Holmbom, B. (2003a). Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*, 57, 359–372.

12. srečanje ALUMNI kluba Oddelka za lesarstvo

Katarina Čufar

Tudi letos so se alumni in alumne Oddelka za lesarstvo zbrali na rednem letnem srečanju. Na 12. srečanju ALUMNI kluba, ki je potekalo 21. 11. 2019, se je zbralo nad 130 alumnov. Kot vsa leta doslej so tudi letos poskrbeli za prijetno, prijateljsko vzdušje.

Udeleženske in udeleženci srečanja so se začeli zbirati v popoldanskih urah. Sodelavke in sodelavci so jih popeljali po oddelku in jim v neformalnem pogovoru predstavili zanimivosti in novosti iz življenja in dela našega oddelka, ki so ga nekateri med njimi obiskali prvič po diplomi.

Sledil je uradni program, s kratkimi predstavitvami organizatorjev ter sponzorjev RENNER iz Italije in



Priprave na uradni del programa, ekipa sponzorjev iz podjetij RENNER iz Italije in AICO TRADE d.o.o. iz Slovenije (v prvi vrsti) je pripravljena

AICO TRADE d.o.o. iz Slovenije. Z nami so bili zastopniki obeh podjetij, ki sta skupaj sponzorirali dogodek. Prof. dr. Giovanni Ciafre (RENNER) in Ivan Avbar (AICO TRADE) sta predstavila dejavnost obeh podjetij.

Tudi letos so se zbrale in predstavile generacije, ki praznujejo okrogle obletnice diplomiranja. Spomine na študentske dni smo obujali z generacijami, ki so diplomirale pred 40, 30 in 10 leti. Zvone, Polona in Aleš so poskrbeli, da so se predstavniki njihovih generacij srečanja udeležili v posebno velikem številu.

Srečanja so se udeležili tudi tisti, ki so pred kratkim zaključili študij in študenti, veliko pa je bilo alumnov vseh drugih generacij. Po tradiciji so se srečanja udeležili tudi predstavniki najstarejše generacije diplomantov lesarstva, ki so naša najbolj zvesta skupina.

Zadnji del srečanja je bil namenjen neformalnemu druženju in mreženju.



Najpomembnejše je druženje



Po 40 letih spet na fakulteti

AICO TRADE d.o.o. - podjetje s tradicijo in znanjem

Ivan Avbar

AICO TRADE d.o.o. je na slovenskem tržišču od leta 2008 in je ekskluzivni dobavitelj barv in lakov proizvajalca RENNER iz Italije. Družinsko podjetje deluje že 26 let, v njem je 6 zaposlenih, glavna dejavnost je servisiranje, prodaja ter dostava površinskih materialov za les.

RENNER se nahaja v obrtni coni Minerbio blizu Bologne in se razprostira na 98 000 m² površin. Skupina RENNER je prisotna na 5 kontinentih, v 63 državah. Za prodajo in servisiranje skrbi 94 distributerjev. Večja skladišča z laboratoriji ima v Italiji, Franciji, Rusiji, Poljski, Indiji, Španiji, Veliki Britaniji in Bahrainu. Letna prodaja dosega 120 mio €, trenutno je zaposlenih 320 oseb. 70 % proizvodnje je namenjene izvozu, 30 % pa domačemu trgu.

Proizvodnja površinskih materialov za les na osnovi topil znaša 70 % celotne proizvodnje, na vodni osnovi pa 30 %. Vsakodnevno v laboratorijih razvijejo do 5 novih produktov, celotno število proizvodov na osnovi topil in vode pa znaša že 7200. Cilj razvoja je proizvodnja vodnih lakov zaradi zmanjšanja HOS-a, boljših pogojev za uporabnike, enostavnejša uporaba, različni novi efekti, lužila, barve in nova marketinška priložnost. Cilj podjetja je biti največji posamezni proizvajalec barv in lakov za les v Italiji in širše v Evropi.

AICO razpolaga na lokaciji obrtniške cone Cika-va v Novem mestu z 2000 m² pokritih površin. Skladišče se dopolnjuje vsakih 14 dni z novimi in sveži-



mi produkti. Od lakov ponujamo nitro lake, PU lake vseh vrst in kvalitet, akrilne lake, poliesterske lake, UV lake, epoksi, vodne lake za notranjost in zunanost, vse vrste razredčil. Srce podjetja je mešalnica, kjer izdelujemo pokrivne barve po RAL, NCS, CS in ostalih kartah.

Za to uporabljamo spektrofotometer in Corob napravo. Izdelujemo vse vrste lužil za različne uporabe na topilih in vodi. Imamo svoj lasten katalog, izdelek pa lahko prilagodimo tudi pričakovanjem in povpraševanju kupcev. Znamo izdelati tudi posebne specialne finiše za visoko kvalitetno pohištvo.

Poleg glavne dejavnosti imamo v programu tudi lepila za les, montažni material za RAL montažo, brusni in polirni material, tekoče in prašne barve za kovino, ponujamo prodajo sistemov za sublimacijo in linije za površinsko obdelavo lesa.

Po naročilu svoje proizvode dostavljamo z našimi vozili do končnih kupcev. ●

Druga skupna poletna šola Univerze v Ljubljani in Tehniške Univerze v Clausthalu

Sebastian Dahle, Marko Petrič

Septembra 2019 smo izvedli drugo skupno poletno šolo Univerze v Ljubljani (Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo) in Tehniške Univerze v Clausthalu v Nemčiji, na Univerzi v Clausthalu. Slovenski in nemški študentje so v okviru teme „Vmesne faze na bioloških - lignoceluloznih materialih“ dobili praktično nalogo, da samo v štirih dneh za-

snujejo in izdelajo funkcionalno vrtno pohištvo. Klop, ki so jo morali izdelati, je morala biti primerna za zunanjo uporabo ter trajnostna in taka, da bi bilo večino njenih sestavnih delov možno reciklirati. Z izzivom se je soočilo dvanajst ljubljanskih doktorskih in magistrskih študentov ter dva študenta z Univerze v Clausthalu.

Pri dogodku, ki smo ga organizirali sodelavci skupine za obdelavo površin na Katedri za lepljenje, lesne kompozite, obdelavo površin in konstruiranje, ter pri katerem je sodeloval tudi član Katedre za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa, je bila še posebej pomembna vloga Dr. Sebastiana Dahleja. Dr. Dahle je nekdanji sodelavec Centra za gradnjo materialov Clausthal in trenutno štipendist evropskega programa Marie Skłodowska Curie na Biotehniški fakulteti (Oddelek za lesarstvo) Univerze v Ljubljani.

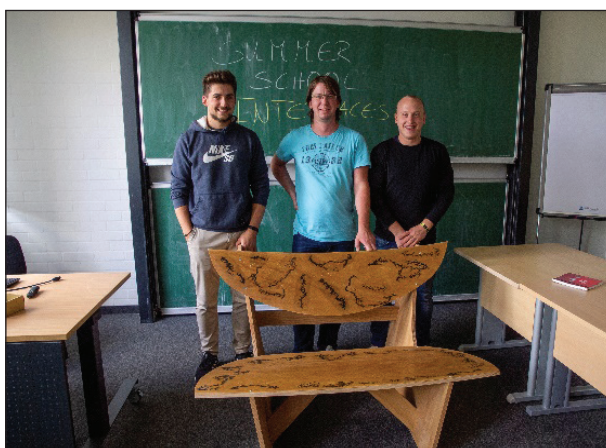
V tednu pred poletno šolo smo najprej izvedli video konferenco, ki je bila namenjena spoznavanju slovenskih in nemških študentov, teoretičnim predavanjem predavateljev iz Slovenije in Nemčije ter oblikovanju prvih zamisli in izmenjavi idej, tako da bi bilo delo v Nemčiji čim bolj učinkovito ter da bi študentje v kratkem času uspeli realizirati svoje projekte. To jim je tudi uspelo: „V samo dveh dneh gradnje so ustvarili odlične sedeže,“ je dejal dr. Leif Steuernagel z Inštituta za polimere in tehnologijo

polimerov na zaključni predstavitvi poletne šole v četrtek, 19.9.2019.

Na zaključni predstavitvi so projekte ocenili dr. Leif Steuernagel, prof. dr. Marko Petrič z Biotehniške fakultete v Ljubljani ter Michael Weinmann iz Centra za univerzitetno didaktiko TU Clausthal.



Ekскурzija v muzej rudnikov



Štiri mešane skupine s študenti iz Clausthala in Ljubljane predstavljajo rezultate svojega projektne delo

Prvi slovenski dan plazme First Slovene Plasma Day

Sebastian Dahle, Marko Petrič



V ponedeljek, 30. septembra 2019, je Biotehniška fakulteta organizirala Prvi slovenski dan plazme, skupaj s kolegi iz Centra odličnosti InnoRenew, Inštituta Jožef Stefan in Gospodarske zbornice Slovenije. Dogodek je potekal v prostorih novoustanovljenega centra za plazmo in Oddelka za lesarstvo.

Za Dan plazme je bilo izkazano veliko zanimanje s strani akademskih krogov in industrije, saj je privabil 88 udeležencev iz 10 različnih držav. Po uvodnih predavanjih so imeli udeleženci priložnost obiskati laboratorije in plazemske naprave pri gostitelju, pa tudi razstavo industrijskih dobaviteljev plazemske tehnologije.

Zbirka vtisov je na voljo v kratkem videoposnetku, ki ga je pripravil GZS: <https://www.youtube.com/watch?v=4a9kUy-WbG0>

Predstavitve uvodnih predavanj so na voljo na: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3483884>

Za nadaljnje pobude prosimo, da kontaktirate nas, naše razstavljalce in podpornike:

doc. dr. Sebastian Dahle
sebastian.dahle@bf.uni-lj.si
prof. dr. Marko Petrič
marko.petric@bf.uni-lj.si

Oddelek za lesarstvo
Biotehniška fakulteta
Univerza v Ljubljani

Rogač Plus d.o.o.

V podjetju Rogač Plus pri Mariboru so na voljo 3 enote plazmatreat in celotna ponudba naprav SITA in BTG za oceno površin in tekočin. Osebe podjetja Rogač je pripravljeno pomagati pri preizkusih vaših materialov ali najemu opreme. Imajo 22 let izkušenj s tehnologijo Plasmateat, 78 enot Plasmateat, ki delujejo v različnih industrijskih podjetjih na trgu, in veliko zadovoljnih industrijskih kupcev. www.rogacplus.si

Ulbrich Group

Skupina Ulbrich je mednarodna specialistka za distribucijo in sistemsko integracijo za avtomatizacijo tehnologije predhodne obdelave plazemskih površin.

www.ulbrich-group.com

PlasmaDis d.o.o.

Plasmadis je specializiran za plazemsko tehnologijo, s poudarkom na obdelavi materialov in plazemski diagnostiki. Ponujajo več plazemskih reaktorjev, od laboratorijskih do industrijskih, za preskuse materiala. V podjetju dela več visoko izobraženih ljudi z več kot 30-letnimi izkušnjami plazemskih tehnologij in inovativnih materialov.

<http://www.plasmadis.com/>

Nadir S.r.l.

Kot MSP, ki ga je leta 2008 ustanovila skupina raziskovalcev, ponujamo rešitve za uporabo plazme in polimerov. Njihova ponudba vključuje inovativne tehnologije atmosferske plazme za hladno, učinkovito in čisto obdelavo površin v plazmi, pa tudi prilagojene aktivne polimerne spojine ter hitro protipiranje.

www.nadir-tech.it

CEPLANT

Center za raziskave in razvoj CEPLANT za površinske modifikacije plazme in nanotehnologije v Brnu je mednarodno priznana raziskovalna infrastruktura in uveljavljen tehnološki center v okviru ključnih nastajajočih tehnologij EU.

<https://ceplant.cz/>

On Monday, September 30th 2019, the Biotechnical Faculty organized the First Slovene Plasma Day together with colleagues from the InnoRenew Center of Excellence, the Jožef Stefan Institute, and the Chamber of Commerce and Industry of Slovenia. The event was held on the premises of the newly established Plasma Center and the Department of Wood Science and Technology.

The Plasma Day was met with great interest from academia and industry, attracting 88 participants from 10 different countries. After introductory lectures on the topic, the participants had the chance to visit the laboratories and plasma devices at the host, as well as an exhibition of industrial suppliers of plasma technology.

A recollection of impressions is provided in a short video prepared by GZS: <https://www.youtube.com/watch?v=4a9kUy-WbG0>

The presentations of the lectures are available at: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3483884>

For further details, please don't hesitate to contact us or our exhibitors and supporters:

Assist. Prof. Sebastian Dahle

sebastian.dahle@bf.uni-lj.si

Prof. Marko Petrič

marko.petric@bf.uni-lj.si

Department of Wood Science and Technology

Biotechnical faculty

University of Ljubljana

Rogač Plus d.o.o.

At Rogač Plus, near Maribor, three Plasmatrete units and a complete range of SITA and BTG devices for the evaluation of surfaces and liquids are available. Rogač gladly helps with tests on your materials or can lease equipment. They have 22 years of experience with Plasmatrete technology, 78 Plasmatrete

units working in various industrial companies in the market, and many satisfied industrial customers.

www.rogacplus.si

Ulbrich Group

The Ulbrich Group is an international specialist on distribution and system integration for the automation of plasma surface pretreatment technology.

www.ulbrich-group.com

PlasmaDis d.o.o.

Plasmadis specializes in plasma technology with an emphasis on material treatment and plasma diagnostics. They offer several types of plasma reactors, from laboratory to industrial, for material treatment tests. The company employs a number of highly educated individuals with more than 30 years of experience in the field of plasma technologies and innovative materials.

<http://www.plasmadis.com/>

Nadir S.r.l.

As an SME established in 2008 by a group of researchers, we provide solutions for plasma and polymer applications. Our products include innovative atmospheric plasma technologies for cold, efficient and clean plasma surface treatments, and customized active polymers compounds for R&D and rapid prototyping.

www.nadir-tech.it

CEPLANT

The CEPLANT R&D Centre for Low-Cost Plasma and Nanotechnology Surface Modifications in Brno is an internationally renowned research infrastructure and an established technology centre within the EU's Key Emerging Technologies framework.

<https://ceplant.cz/>

Dr. Angela Balzano prejemnica Baileyeve nagrade za leto 2019

Katarina Čufar

Dr. Angela Balzano je prejela prestižno Baileyevo nagrado za leto 2019. Nagrado podeljuje mednarodno društvo lesnih anatomov IAWA (International Association of Wood Anatomists) in nosi ime po Irvingu Widmoru Baileyju (1884–1967), ki ga štejemo za enega najpomembnejših lesnih anatomov. Nagrado IAWA podeljuje od leta 2014. Vsako leto podelijo eno nagrado in to za najboljši znanstveni ali pregledni članek mlade raziskovalke ali raziskovalca, objavljen v reviji IAWA Journal.

Priznanje so ji podelili za članek

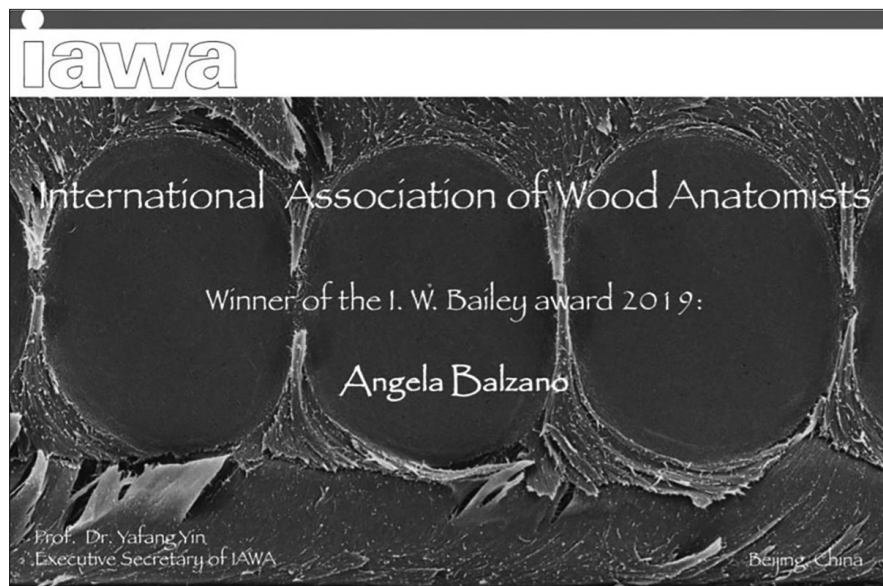
BALZANO, Angela, DE MICCO, Veronica, BATTIPAGLIA, Giovanna. 2019. Wood-trait analysis to understand climatic factors triggering intra-annual density-fluctuations in co-occurring Mediterranean trees. *IAWA journal* 40(2): 241-258, DOI: 10.1163/22941932-40190220.

ki pojasnjuje, kako lahko anatomske znake v lesu uporabimo za razumevanje učinka podnebnih dejavnikov. Študija proučuje les dveh sredozemskih drevesnih vrst, navadne jagodičnice (*Arbutus*

unedo) in pinijske (*Pinus pinea*) ter pojasni učinke padavin in temperature na nastanek gostotnih variacij v lesu. Pri dveh vrstah so prikazani različni plastični odzivi, pri čemer se *Arbutus unedo* bolj odziva na padavine, *Pinus pinea* pa predvsem na temperature.

Šestčlanski odbor urednikov časopisa IAWA Journal v sestavi Pieter Baas, Lloyd Donaldson, Elisabeth Robert, Uwe Schmitt, Elisabeth Wheeler in Michael C. Wiemann, je delo izbral za podelitev nagrade, v obrazložitvi pa poudaril, da bo ta študija izboljšala naše razumevanje nastajanja lesa pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov. Ocenjevalci so posebej pohvalili strokovno pot in bibliografijo dr. Angele Balzano, ki je doktorirala leta 2017. Doktorat je zagovarjala na Università degli Studi di Napoli Federico II v Neaplju v Italiji, pripravila pa ga je v sodelovanju z Oddelkom za lesarstvo Biotehniške fakultete, kjer od leta 2016 deluje kot raziskovalka.

Iskrene čestitke!



Prof. dr. Katarina Čufar prejela častno priznanje Fakultete za gozdarstvo in tehnologijo lesa Univerze Mendel v Brnu

Tina Drolc

V oktobru 2019 je Fakulteta za gozdarstvo in tehnologijo lesa Univerze Mendel v Brnu, Češkoslovaška, s svečano akademijo praznovala 100. obletnico ustanovitve. Na akademiji se je prof. dr. Libor Jankovsky, dekan fakultete, zahvalil raziskovalcem in pedagoškim sodelavcem za razvoj discipline (gozdarstva in lesarstva). Med prejemniki častnega priznanja je bila tudi prof. dr. Katarina Čufar, ki sodeluje z univerzo na področju lesarstva, v okviru Oddelka za znanost in tehnologijo lesa.

Fakulteta za gozdarstvo in lesarstvo Univerze Mendel v Brnu (FFWT MENDELU) je med večjimi univerzami na Češkem. Fakulteta je akademsko raziskovalna ustanova, katere osrednja področja delovanja sta gozd in les, vse od načrtovanja gozda do oblikovanja pohištva. Njihov cilj je izobraževati na vseh treh stopnjah študija in vzgojiti kadre, ki bodo spodbujali varovanje narave in jim hkrati omogočiti razvoj novega znanja z raziskavami, povezanimi z zemljo, gozdovi, lesom in interierjem. Fakulteta je del univerzitetnega kampusa v Brnu - Černá Pole. Pedagoško in raziskovalno delo, ki je organizirano v 13-ih oddelkih, izvaja 18 profesorjev, 42 izrednih profesorjev, 80 asistentov in 44 raziskovalnih sodelavcev. Število študentov na dodiplomskem, magistrskem in doktorskem študijskem programu je približno 1800, število doktorskih študentov na vseh doktorskih programih pa dosega 200.



Mendel University in Brno

100 years of MENDELU
years of STORIES

- MENDELU Faculty of AgriSciences
- MENDELU Faculty of Forestry and Wood Technology
- MENDELU Faculty of Business and Economics
- MENDELU Faculty of Horticulture
- MENDELU Faculty of Regional Development and International Studies
- MENDELU Institute of Lifelong Learning

Prof. dr. Miha Humar - prejemnik Zlate plakete Univerze v Ljubljani

Milan Šernek, Marko Petrič, Boštjan Lesar

Prejemniki Zlate plakete Univerze v Ljubljani v letu 2019 (foto: studio NORA, arhiv Univerze v Ljubljani)

Na Slavnostni seji senata Univerze v Ljubljani, ki je potekala v Zbornični dvorani natanko na stoti rojstni dan Univerze v Ljubljani, 3. 12. 2019, je njen rektor prof. dr. Igor Papič podelil najvišja priznanja Univerze v Ljubljani. Med prejemniki je bil tudi prof. dr. Miha Humar z Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete, ki je prejel Zlato plaketo Univerze v Ljubljani za izjemne znanstveno-raziskovalne dosežke, za zgledno pedagoško delo ter za zasluge pri krepitevi ugleda Univerze v Ljubljani.

Redni profesor dr. Miha Humar poučuje in raziskuje na področju lesnih škodljivcev in zaščite lesa ter proučuje vplive biotskih in abiotskih dejavnikov na življenjsko dobo lesa na prostem. Je vrhunski znanstvenik na področju lesarstva. Na področju

Biotehnika / gozdarstvo, lesarstvo in papirništvo je na prvem mestu med raziskovalci glede na upoštevano število točk po metodologiji ARRS / SICRIS. S svojimi raziskovalnimi dosežki in delom je popolnoma integriran v mednarodno skupnost in je kot vrhunski znanstvenik in strokovnjak priznan v svetovnem merilu. Je vodja več domačih in mednarodnih projektov ter vodja programske skupine Les in lignocelulozni kompoziti. Je urednik in član uredniških odborov različnih uglednih domačih in mednarodnih znanstvenih revij ter član organizacijskih odborov številnih mednarodnih konferenc. Odlično sodeluje z industrijo in podjetji ter je prejemnik Puhovega priznanja za posebne dosežke v lesarstvu. Dr. Humar je tudi močno vpet v vodstvene aktivnosti – trenutno opravlja funkcijo prodekana za kakovost in gospodarske zadeve, pred tem pa je bil dekan Biotehniške fakultete.



Prof. dr. Romanu Kuniču v slovo

Franc Pohleven



Prof. dr. Roman Kunič 1961-2019

Sredi julija nas je globoko presunila vest, da je nenadoma preminil dr. Roman Kunič, izredni profesor na Fakulteti za gradbeništvo in geodezijo (FGG), Univerze v Ljubljani, ki je veliko sodeloval z Oddelkom za lesarstvo Biotehniške fakultete.

Z Romanom sva se srečala v začetku leta 2015, ko smo v okviru razstave Čar lesa želeli v sodelovanju s FGG organizirati posvet na temo gradnje z lesom. Na FGG smo nekaj časa brezuspešno iskali človeka, ki bi bil pripravljen soorganizirati posvet in ko smo že skoraj obupali, sem v februarju 2015 srečal prof. Kuniča, ki je bil takoj pripravljen prevzeti organizacijo posveta v Cankarjevem domu (CD).

Z velikim navdušenjem je sodeloval pri pripravi posveta Les - gradivo v harmoniji z naravo, v sklopu katerega je imel zanimivo predavanje Okoljski vpliv toplotno izolacijskih materialov. Od takrat naprej pa vse do njegove prezgodnje smrti je s svojimi sodelavci ter študenti zelo aktivno in vneto sodeloval na pripravah in izvedbah razstav in posvetov Čar lesa. Z njegovo pomočjo smo tudi na FGG organizirali razstave Čar lesa. Še nekaj tednov pred smrtjo je letos v CD v okviru prireditve Čar lesa organiziral strokovni posvet Les v stavbarstvu ter imel zelo aktualno predavanje Okoljski vpliv naravnih materialov v gradbeništvu. Zelo rad je prihajal na Oddelek za lesarstvo Biotehniške fakultete UL in je z veseljem sodeloval z nekaterimi našimi profesorji, pa tudi študente gradbeništva je usmerjal k nam ter organiziral medfakultetno sodelovanje študentov gradbeništva, arhitekture in lesarstva, s ciljem mladim približati in uveljaviti les kot gradbeni material sedanjosti in prihodnosti.

Naj na kratko predstavim njegovo življenjsko pot, povzeto po nagovoru ob njegovem slovesu. Rodil se je v Beli krajini, kjer je obiskoval osnovno šolo. Kot prizadeven osnovnošolec je bil navdušen za matematiko in je prejel zlato Vegovo priznanje. Že kot fantiča ga je privlačilo gradbeništvo, saj je najbolj užival prav pri igri v peskovniku in pri gradnji domače hiše. Po končani OŠ se je vpisal na Srednjo gradbeno šolo v Ljubljani, nato pa na FGG, Univerze v Ljubljani. Po diplomi se je zaposlil v industriji, vendar je ohranil stik z matično fakulteto in je kot mladi raziskovalec na FGG vpisal magistrski znanstveni študij, nato pa je na FGG tudi doktoriral oz. opravil doktorat znanosti. Vzporedno s podiplomskim študijem na matični fakulteti je vpisal podiplomski študij menedžmenta, ki ga je zaključil na Clemson University v zvezni državi Južna Karolina, ZDA. Iz gospodarstva ga je pot pripeljala nazaj na FGG, kjer je postal izredni profesor in višji znanstveni sodelavec za področje Gradbeništvo in okoljsko inženirstvo ter predstojnik Katedre za stavbe in konstrukcijske elemente.

S svojim entuziazmom in vedrino je navduševal sogovornike. Bil je neumoren borec za zaščito okolja in človeka ter velik zagovornik in podpornik vseh aktivnosti, povezanih z večjo rabo lesa. Verjel je v les in pogosto nam je razlagal, da se bo človek moral vrniti nazaj k naravi. S svojim delovanjem in zavzetostjo tako na pedagoškem kot strokovnem in znanstvenem področju je bil velik ljubitelj ter promotor uporabe lesa, kar je še zlasti pomembno pri gradbenikih, ki so neposredni uporabniki lesa oziroma gradnje z lesom.

Ob njegovi prezgodnji smrti smo zgubili velikega podpornika na pomembnem področju gradnje z lesom. Dragi Roman, hvala ti za tvoj trud in požrtvovalnost ter veliko oporo, ki si nam jo nudil pri promociji rabe lesa. Upamo, da tvoje delo ni bilo zaman in verjamemo, da si med svojimi sodelavci ter študenti pustil globoko sled, da bodo nadaljevali tvoje plemenito poslanstvo ter šli po tvoji poti.

Eli Keržič dobitnica fakultetne Prešernove nagrade za leto 2019

Viljem Vek

V torek, 10. 12. 2019, je v Zbornični dvorani Univerze v Ljubljani potekala slavnostna podelitev Prešernovih nagrad Biotehniške fakultete. Na tem dogodku je Eli Keržič, magistrica inženirka lesarstva, za svoje magistrsko delo prejela fakultetno Prešernovo nagrado. Eli je magistrsko delo z naslovom »Ekstraktivi v lesu debel, grč in vej bele jelke ter njihov fungicidni potencial« izdelala pod mentorskim vodstvom doc. dr. Viljema Veka, recenzijo naloge pa je opravil prof. dr. Primož Oven.

Magistrsko delo je bilo zasnovano in opravljeno na Katedri za kemijo lesa in drugih lignoceluloznih materialov Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete. Glivne teste je Eli Keržič izvedla v laboratorijih Katedre za lesne škodljivce, zaščito in modifikacijo lesa. Material, ki je bil vključen v raziskavo, je bil posekan v kočevskih gozdovih, priskrbeli so ga zaposleni podjetja Ars Pharmae d.o.o. Pri vzorčenju debelnih kolutov in izolaciji lesnih tkiv je s svojim tehničnim oziroma strokovnim znanjem pomagal Drago Vidic s Katedre za mehanske obdelovalne tehnologije lesa.

Literaturni podatki o kvalitativni in kvantitativni sestavi ekstraktivov ter podatki o variabilnosti v vsebnosti ekstraktivov v lesnih tkivih debla in vej bele jelke (*Abies alba* Mill.) so izredno skopi. Eli je zato svojo raziskavo zasnovala na odraslih jelkah, iz katerih je izolirala vzorce lesa debla, grč in vej. Dezintegrirane vzorce lesa je nato ekstrahirala v sodobnem sistemu za pospešeno ekstrakcijo pri povišani temperaturi in tlaku. Ekstrakte je preiskala gravimetrično, spektrofotometrično in kromatografsko ter določila njihov fungicidni in antioksidativni potencial. Magistrska naloga vsebuje izvirne rezultate tako v metodološkem kot vsebinskem smislu. Eli je v prvem koraku določila optimalne ekstrakcijske pogoje, nato pa je natančno preiskala kemijsko sestavo ekstraktivov in njihovo količino v posameznih delih lesa debla in vej. Ugotovila je, da grče in veje vsebujejo največ hidrofilnih ekstraktivov, manj jedrovina, najmanj pa beljava. Največ fenolnih spojin je ekstrahirala iz delov grč, ki so bile vključene v beljavo, ter iz delov vej tik ob deblu. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti je dokazala, da so



prevladujoče fenolne spojine v grčah jelke lignani. Rezultati bioloških testov so pokazali, da izvlečki iz jelovine zmanjšajo glivni razkroj lesa in izkazujejo velik antioksidativni potencial. Zaščitno funkcijo fenolnih ekstraktivov v lesu je Eli pripisala njihovim bioaktivnim lastnostim, ob tem pa izpostavila, da je lahko tudi manj kakovosten les pomemben surovinski vir dragocenih naravnih učinkovin. Na koncu velja opozoriti, da je delo rezultat sodelovanja Biotehniške fakultete in gospodarskega subjekta.

Rezultati magistrske naloge so delno predstavljeni tudi v članku z naslovom OPTIMIZATION OF ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE) OF SILVER FIR WOOD (*ABIES ALBA* MILL.), objavljenem v tej številki revije Les/Wood. Članek je Elija prva objava v znanstveni reviji, za kar ji tudi čestitam.

Verjamemo, da bomo o raziskovalnem delu Eli Keržič še slišali, saj se je pred kratkim zaposlila kot mlada raziskovalka na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete.

ABES – nova naprava za spremljanje dinamike graditve trdnosti lepilnega spoja na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete

Milan Šernek, Jaša Saražin

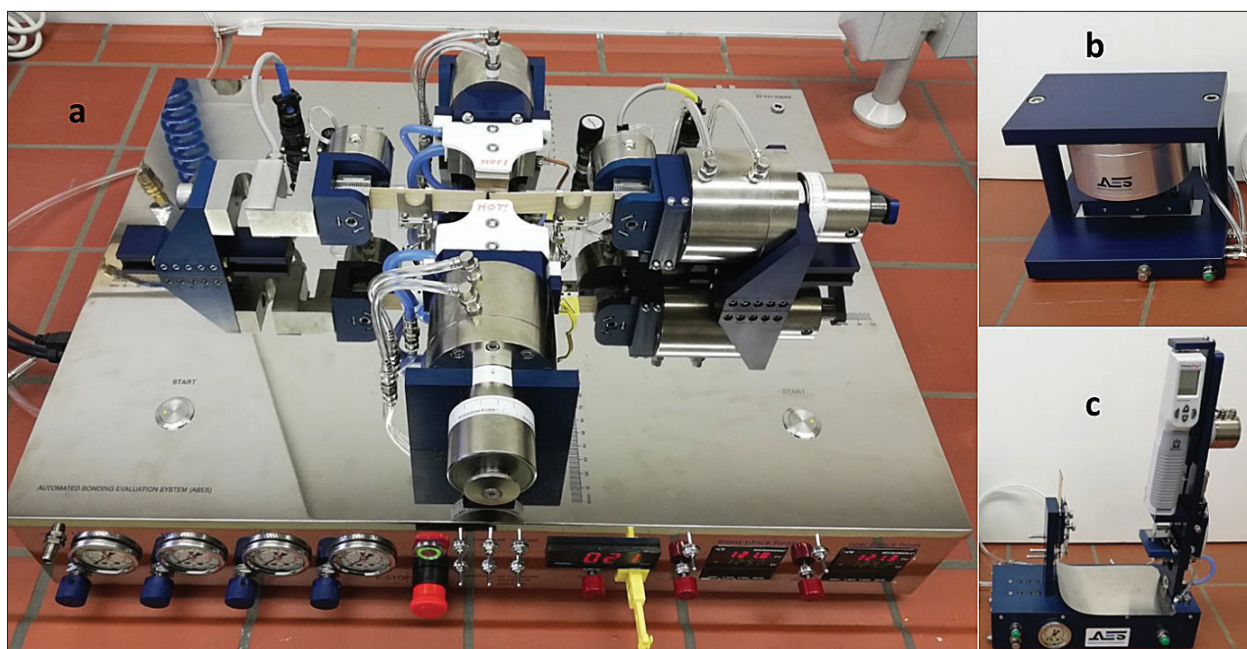
Temperatura, čas in tlak stiskanja so tisti parametri lepljenja, ki neposredno vplivajo na nastanek trdnega lepilnega spoja in s tem na mehanske lastnosti lepljencev in lesnih kompozitov, na njihovo kapaciteto proizvodnje ter posredno tudi na stroške proizvodnje. Poznavanje teh parametrov omogoča optimizacijo lastnosti proizvodov, minimiziranje stroškov in maksimiranje rezultatov proizvodnje.

V začetku meseca novembra 2019 smo na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete kupili novo napravo ABES, ki je visoko specializirana prav za proučevanje teh parametrov lepljenja lesa ali drugih materialov. Kratica ABES je okrajšava za Automated Bonding Evaluation System ali v slovenskem prevodu Sistem za avtomatizirano vrednotenje zlepljenosti. Osnovna različica te naprave je bila razvita in patentirana že pred tremi desetletji (Humphrey, 1990).

ABES je namizna naprava, krmiljena preko računalnika, ki je v osnovi namenjena raziskova-

nju kinetike utrjevanja lepil (slika 1). Omogoča vpogled v rast strižne trdnosti lepilnega spoja v času in pod natančno kontroliranimi pogoji. Poleg proučevanja vplivov natančno nastavljenega tlaka, temperature in časa stiskanja, lahko s pnevmatskim aplikatorjem natančno določamo tudi količino nanosa lepila. Seveda pa je možno ABES uporabiti tudi samostojno kot miniaturno programirano vročo stiskalnico, ki omogoča dvostopenjsko stiskanje, ali kot napravo za natezno testiranje preizkušancev. Poleg tega je na platformo ABES mogoče vključiti tudi druge dodatke, ki omogočajo nove aplikacije. Osnovne specifikacije dobavljene naprave so razvidne v preglednici 1.

Z izbiro standardnih preizkušancev (velikost preklopov 20 mm x 5 mm in debelina lepljencev od 0,6 mm do 0,8 mm), lahko dosežemo zelo hitro rast temperature samega lepilnega spoja in tako lahko spremljamo proces utrjevanja lepila praktično v izotermnih pogojih. Testiranje lepilnih spojev



a) Naprava ABES je v horizontalni smeri trgalni stroj, v vertikalni pa vroča stiskalnica. b) Rezalnik furnirja zagotavlja natančno izdelavo standardnih preizkušancev. c) Pnevmatični aplikator lepila skrbi za natančno količino nanosa lepila.

se odvija po predvidenem razporedu s strižnim lomljenjem preizkušancev ter beleženjem sile, ki je bila potrebna za lom. Pred samim testom loma je možno lepilni spoj tudi hipno ohladiti z zračnim hlajenjem. Testiranje lepilnih spojev ob enakih pogojih utrjevanja, po različnih časih lepljenja, omo-

goča vpogled v proces graditve strižne trdnosti spoja. Vpliv temperature na proces utrjevanja je jasno izražen, ko serijo poizkusov ponovimo pri različnih temperaturah. V nadaljevanju lahko serijo poizkusov ponovimo še ob različnih postopkih lepljenja.

Specifikacije dobavljene naprave ABES

Vroča stiskalnica	Površina stiskalnice	25x25 mm = 625 mm ²
	Maksimalna sila	900 N
	Maksimalna temperatura	265°C
	Dvostopenjsko stiskanje	Omogočeno
Trgalni stroj	Maksimalna sila	1200 N
	Razdalja med sredinami čeljusti	Cca 140 – 290 mm
	Dolžina / širina / odprtje čeljusti	25 mm / 25 mm / 9 mm
	Delovni hod	6 mm
Dve merilni celici: Standardna in (precizna)	Maksimalna sila	2500 N (125 N)
	Resolucija	± 1,5 N (± 0,2 N)
Hlajenje preizkušanca	Po vročem lepljenju	Zračno – do sobne temperature

Nakup ABES je delno sofinanciran iz sredstev ARRS (Paket 17) in sredstev MIZŠ v okviru projekta WooBAdh.

Udeležba sodelavk in sodelavcev Oddelka za lesarstvo na mednarodni konferenci ICWST 2019 v Zagrebu

Maks Merela, Daša Krapež Tomec

Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu je 12. in 13. decembra 2019 organiziral 30. mednarodno konferenco ICWST 2019 "IMPLEMENTATION OF WOOD SCIENCE IN WOODWORKING SECTOR" in svečanost ob 70. obletnici znanstvene revije Drvna industrija. Konferenca se je udeležilo 20 sodelavcev Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete, ki so predstavili svoje raziskovalne dosežke s predavanji in posterji. Pred-

stavljeni so bili dosežki s področij: površinske obdelave, obdelave površin s plazmo, lastnosti peletov, izrabe skorje, primerjalne mikroskopije in priprave vzorcev za mikroskopiranje, analize trga pohištva, zaščite lesa, termične modifikacije in akustičnih lastnosti lesa, sušenja lesa, razvoja lesenih talnih oblog, digitalnega razvoja v slovenski lesarski industriji ter raziskav na področju nanoceluloze.

Naslovi predavanj:

Comparison of visual and instrumental assessment of colour differences on finished wooden surfaces. Pavlič Matjaž, Petrič Marko

Invasive species as raw material for pellets production. Gornik Bučar Dominika, Gospodarič Bojan, Smolnikar Pavel, Stare Darja, Krajnc Nike, Prisljan Peter

Bark, what can we do with it, what is it good for. Medved Sergej, Jambreković Vladimir, Španić Nikola, Ščernjavič Roman, Barbu Marius, Tudor Eugenia Mariana, Antonović Alan

Confocal laser scanning microscopy to study variations in wood quality. Balzano Angela, Novak Klemen, Humar Miha, Čufar Katarina

Changes in customer preferences for wooden furniture in Slovenia from 2010 to 2019. Jošt Matej, Kaputa Vladislav, Nosáľová Martina, Pirc Barčič Andreja, Perić Ivana, Oblak Leon

Performance of model glulam beams after two years of outdoor exposure. Kržišnik Davor, Grbec Samo, Lesar Boštjan, Plavčak Denis, Šega Bogdan, Šernek Milan, Straže Aleš, Humar Miha

Development of optimal surface preparation for anatomy research of invasive wood species by scanning electron microscopy. Merela Maks, Thaler Nejc, Balzano Angela, Plavčak Denis

The influence of wood modification on the transfer function of the violin bridge. Merhar Miran, Humar Miha

Wood surface finishing of selected invasive tree species. Pavlič Matjaž, Žigon Jure, Petrič Marko

Characterisation and modelling of drying kinetics of thin ash and oak wood lamellas dried with infrared radiation and hot air. Straže Aleš, Klarić Miljenko, Budrović Zlatko, Pervan Stjepan

Enhanced abrasion resistance of coated particleboard treated with atmospheric plasma. Žigon Jure, Dahle Sebastian, Petrič Marko, Pavlič Matjaž

Posterji:

Impact of the European Union (26) imports on development of wood flooring production in the Western Balkans. Glavonjić Branko, Lazarević Aleksandra, Oblak Leon, Kalem Miljan, Sretenović Predrag

Digital development of the Slovenian wood industry. Kropivšek Jože, Grošelj Petra

Determining of the drying characteristics of invasive wood species growing in specific environments. Plavčak Denis, Gorišek Željko, Straže Aleš, Maks Merela

Production and applications of nanofibrillated cellulose. Poljanšek Ida, Žepič Vesna, Levanič Jaka, Vek Viljem, Oven Primož



Skupinska fotografija udeležencev konference z Oddelka za lesarstvo