
Wczesna detekcja aktywności pleśni powodujących biodeteriorację obiektów na podłożu papierowym w oparciu o analizę mikrobiologicznych lotnych związków organicznych

Tomasz Sawoszczuk

notes 18_2016
konserwatorski

Summary: Tomasz Sawoszczuk, *Early Detection of Active Mould Biodeteriorating Paper-Based Objects by Means of Microbial Volatile Organic Compounds Analysis*

The goal of this work was to analyse the profile of Microbial Volatile Organic Compounds (MVOCs) emitted by mould growing on various paper samples in search for particular volatiles mentioned in the literature as indicators of active mould growth. The mould was cultivated on model samples of acidic paper and on paper made of cotton cellulose. Additionally the measurement was carried out for mould growing on a sample of genuine historical acidic paper and for a sheet of old print with an alteration which indicates the possible presence of mould. The volatiles were sampled with headspace – solid phase microextraction method and analysed with a gas chromatograph – mass spectrometer system. Qualitative and quantitative analyses of the chromatograms were carried out. The results show that the level of MVOCs emission during the studies was high enough to be detected and the highest amount of volatiles was emitted on the sixth day of incubation. However, the intensity of emission was changing in time. It was also found that all of the studied fungi emitted volatiles that had already been suggested to be useful in the detection of the

metabolic activity of moulds. Thus, the proposed methodology is promising for the detection of active mould growth on cellulosic objects *in situ* in libraries, archives, and museums.

— Jednym z największych wyzwań dla bibliotek, archiwów i muzeów jest ochrona zbiorów o podłożu papierowym przed procesami deterioracji¹. Obok temperatury, wilgotności, światła i zanieczyszczeń powietrza do grupy czynników fizykochemicznych powodujących degradację papieru należy zaliczyć również niskie pH papieru, charakterystyczne dla papierów maszynowych powstających od XIX wieku². Osobną grupę zagrożeń dla obiektów o podłożu papierowym stanowią czynniki biologiczne, a wśród nich mikroorganizmy, powodujące biodeteriorację obiektów³.

Metodą detekcji pleśni, która nie wymaga pobierania próby z powierzchni obiektu i umożliwia względnie szybkie wykrycie aktywnych form pleśni, jest badanie mikrobiologicznych lotnych związków organicznych (MLZO). Są to lotne produkty metabolizmu, wytwarzane przez pleśnie na każdym etapie ich

1 *Ageing and stabilisation of paper*, red. M. Strlič, J. Kolar, Ljubljana 2005; G. Walker, J. Greenfield, J. Fox, J. S. Simonoff, *The Yale Survey: A Large-Scale Study of Book Deterioration in the Yale University Library*, „College & Research Libraries” 1985, vol. 46, nr 2, s. 111–132, <http://cr.l.acrl.org/content/46/2/111.full.pdf+html> [dostęp: 30.09.2016].

2 Badania przeprowadzone między 2000 a 2005 rokiem w 5 największych bibliotekach krajowych, które objęły 6 mln egzemplarzy książek, wykazały, że aż 79,4% zbiorów stanowią woluminy, w których pH papieru wynosi poniżej 5; zob. W. Sobucki, *Stan zachowania księgozbiorów powstałych po 1800 roku* oraz W. Sobucki, A. Czajka, *Stan zachowania archiwaliów z XIX i XX wieku*, w: *Stan zachowania polskich zbiorów bibliotecznych i archiwalnych z XIX i XX wieku*, red. B. Drewniewska-Idziak, Warszawa 2006.

3 Y. P. Nyuksha, *The biodeterioration of papers and books*, w: *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, t.1: *Biodeterioration of Cultural Heritage*, red. K. L. Garg, N. Garg, K. G. Mukerji, Calcutta 1993, s. 1–88; M. Zotti, A. Ferroni, P. Calvini, *Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2008, vol. 62, nr 2, s. 186–194.

wzrostu⁴. Dodatkowo umożliwiają detekcję aktywnych form pleśni również w sytuacji, kiedy grzybnia rozwija się w strukturze obiektu, ponieważ jako związki lotne łatwo dyfundują przez jego struktury i są uwalniane na zewnątrz. MLZO pobierane są tuż z nad badanej powierzchni obiektu, dlatego można uznać, iż pobór prób jest bezkontaktowy.

Jedną z dwóch podstawowych metod, które stosuje się do poboru próbek MLZO, jest adsorpcja/absorpcja do rurek sorpcyjnych, wypełnionych odpowiednim sorbentem. Druga to sorpcja MLZO na tzw. włókno SPME (Solid Phase Microextraction – ekstrakcja do fazy stałej). Zaletą tej drugiej techniki jest fakt, iż włókno SPME jest niewielkich rozmiarów (ok. 1 cm) i umożliwia pobór prób z obiektu tuż z nad miejsca, w którym stwierdzono zmianę wskazującą na obecność pleśni. Dodatkową możliwością jest przyłożenie włókna wprost do powierzchni zmienionej. Jest to bezpieczne dla obiektu, gdyż włókno składa się wyłącznie z sorbentu. Próbkę związków lotnych pobrane wymienionymi powyżej technikami poddaje się następnie analizie w chromatografii gazowej lub chromatografii cieczowej.

Niektóre MLZO uważane są w literaturze za markery aktywności grzybów pleśniowych⁵, a ich detekcja pozwala potwierdzić obecność aktywnych grzybnii. Przy czym większość artykułów związanych z badaniami tych związków dotyczy analizy MLZO emitowanych przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych i konstrukcyjnych lub w pomieszczeniach silnie zanieczyszczonych mikrobiologicznie. Analizy te związane są głównie z oceną poziomu ryzyka dla zdrowia ludzi przebywających w pomieszczeniach z aktywnym wzrostem grzybów, w kontekście tzw. zespołu chorego budynku⁶.

4 K. Wilkins, K. Larsen, *Variation of volatile organic compound patterns of mold species from damp buildings*, „Chemosphere” 1995, vol. 31, nr 5, s. 3225–3236.

5 G. D. Bingley, J. Verran, L. J. Munro, C. E. Banks, *Identification of microbial volatile organic compounds (MVOCs) emitted from fungal isolates found on cinematographic film*, „Analytical Methods” 2012, vol. 4, s. 1265–1271.

6 K. Wilkins, E. M. Nielsen, P. Wolkoff, *Patterns in Volatile Organic Compounds in Dust from Moldy Buildings*, „Indoor Air” 1997, vol. 7, nr 2, s. 128–134.

Niewielu autorów zajmuje się badaniami MLZO emitowanymi przez pleśnie rosnące na obiektach historycznych⁷.

W 2015 roku w Pracowni Chemicznej Katedry Mikrobiologii Wydziału Towaroznawstwa Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie przeprowadzono badania możliwości detekcji aktywnych grzybów pleśniowych na obiektach o podłożu papierowym – na podstawie analizy tzw. markerowych MLZO, wykonanej przy zastosowaniu następujących technik: mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME), chromatografii gazowej (GC) oraz spektrometrii masowej (MS).

Badania zrealizowano dla wybranych gatunków grzybów pleśniowych, najczęściej wykrywanych w pomieszczeniach, w których przechowywane są zbiory o podłożu papierowym. Pleśnie posiano na modelowe próbki kwaśnego papieru oraz próbki z celulozą bawełnianą. Chromatogramy uzyskane dla MLZO poddano analizie ilościowej i jakościowej w celu zidentyfikowania związków lotnych, będących markerami aktywności pleśni. W dodatkowym eksperymencie wybrany gatunek pleśni posiano na naturalnie postarzony papier kwaśny, po czym przeprowadzono analizę MLZO emitowanych przez tę pleśń – dla oceny możliwości zastosowania pomiarów SPME – GC – MS do detekcji aktywności grzybów rozwijających się na rzeczywistych obiektach o podłożu papierowym.

W celu ostatecznej weryfikacji uzyskanych wyników badań przeprowadzono również analizę lotnych związków organicznych emitowanych z powierzchni karty starodruku, na której stwierdzono wyraźną zmianę mikrobiologiczną wskazującą na obecność pleśni, aby dokonać identyfikacji MLZO, będących markerami aktywności. Badania te przeprowadzono w miejscu przechowywania starodruku, w archiwum kościelnym. Wynik badania miał

⁷ G. D. Bingley, J. Verran, L. J. Munro, C. E. Banks, op. cit.; O. Canhoto, F. Pinzari, C. Fanelli, N. Mangan, *Application of electronic nose technology for the detection of fungal contamination in library paper*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2004, vol. 54, s. 303–309.

dostarczyć odpowiedzi na pytania: czy obserwowane przebarwienie to aktywna pleśń oraz czy metoda ta może być zastosowana do detekcji aktywnej pleśni na obiekcie o podłożu papierowym w przypadku, kiedy pomiary wykonywane są *in situ*, w bibliotece lub archiwum, nie zaś w warunkach laboratoryjnych.

Materiały i metody

Odczynniki chemiczne i podłoża mikrobiologiczne

Wszystkie odczynniki chemiczne zastosowane jako substancje odniesienia posiadały czystość wzorców chemicznych (Avantor Performance Materials, Polska). Podłoża mikrobiologiczne zakupiono jako gotowe preparaty przygotowane na zamówienie (BTL, Polska). Przy doborze podłoży mikrobiologicznych założono, iż żadne z nich nie będzie zawierało źródła organicznego węgla, azotu i siarki, tak aby jedynym źródłem substancji odżywczych dla pleśni były modelowe próbki papieru umieszczone na powierzchni podłoża. Taki dobór podłoży pozwolił potwierdzić aktywność celulolityczną wybranych grzybów. Ponadto, z bardzo dużym prawdopodobieństwem można uznać, że lotne związki organiczne emitowane przez pleśnie pochodzą przede wszystkim z metabolicznego rozkładu modelowego papieru umieszczonego na podłożu, nie zaś z rozkładu składników podłoża. Do przeprowadzenia badań wybrano zmodyfikowaną wersję podłoża Czapek – Dox (CzD, BTL, Polska)⁸. Modyfikacja polegała na tym, iż nie zawierało ono sacharozy, która standardowo występuje w składzie tego podłoża, jak również żadnego innego źródła organicznego węgla, azotu i siarki. W celu potwierdzenia braku właściwości odżywczych samych podłoży, przygotowanych w opisany powyżej sposób, wybrane do badań gatunki grzybów posiano bezpośrednio na podłoża, bez umieszczenia na nich próbek papieru. Nie obserwowano wzrostu mikroorganizmów nawet przy inkubacji wydłużonej do 14 dni.

⁸ M. Zotti, A. Ferroni, P. Calvini, op. cit.

Modelowe próbki papierów

Modelowymi próbkami papieru, jakie zastosowano w badaniach MLZO, były:

- bibuła filtracyjna Whatman (Sigma-Aldrich, Polska), gramatura $100 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, 100% celulozy bawełnianej, grubość $200 \mu\text{m}$, zawartość pyłów do 0,008%,
- NOVO Test Paper 2 (KLUG-CONSERVATION, Immenstadt, Niemcy), gramatura $70 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, 100% bielonej masy celulozowej drzewnej, 12-15% kaolinu, zaklejany w masie tradycyjnie, czyli klejem żywicznym z dodatkiem siarczanu glinu, pH papieru 4,5; nie zawiera wybielaczy optycznych.

Przed eksperymentem wszystkie próbki poddano dezynfekcji metodą cieplną suchą, w szalkach Petriego, ogrzewając je przez 2 godziny w suszarce w temperaturze $160 \text{ }^\circ\text{C}$. Procedurę powtórzono dwa razy. Taki sposób przygotowania próbek powoduje degradację papieru, co pozwala przypuszczać, iż posiadają one, przynajmniej w pewnym stopniu, właściwości zbliżone do naturalnie postarzonego papieru historycznego. Degradacja próbek „NOVO Test Paper 2” została potwierdzona przez oznaczenie liczby podwójnych zgięć (DF) w aparacie MIT (TINIUS-OLSEN)⁹, która wskutek ogrzewania spadła z 13 ± 3 do 1 ± 0 . W przypadku bibuły Whatman liczba podwójnych zgięć praktycznie nie uległa zmianie; przed ogrzewaniem wynosiła 55 ± 3 , a po ogrzewaniu 60 ± 4 , a więc różnica była w granicach błędów. Brak wyraźnego wpływu ogrzewania na właściwości bibuły Whatman należy tłumaczyć bardzo dobrą jakością tego papieru wzorcowego.

Efektywność sterylizacji oceniano, przeprowadzając inkubację losowo wybranych próbek na agarze ziemniaczanym (Potato Dextrose Agar - PDA, BTL, Polska) w $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Nie obserwowano wzrostu mikroorganizmów nawet przy inkubacji wydłużonej do 14 dni.

Jałowe próbki modelowych papierów, pocięte przed dezynfekcją na kawałki o powierzchni 4 cm^2 , umieszczono na powierzchni jałowych podłoży mikrobiologicznych. Podłoża, o objętości 5 ml, przygotowano w postaci skosu wewnątrz dwudziestomililitrowych fiolek, przeznaczonych do poboru próbek metodą *headspace*, czyli „znad próbki”.

⁹ Pomiar wykonano w warunkach standardowych ($T = 23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{RH} = 50\% \pm 2\%$), przy standardowym obciążeniu próbek wynoszącym 1 kgf.

Próbki papierów historycznych

W celu uwiarygodnienia wyników pomiarów uzyskanych dla próbek papierów modelowych wykonano również badania MLZO emitowanych przez pleśń rosnącą na próbce rzeczywistego papieru historycznego. Próbka została pobrana z książki wydrukowanej w 1965 roku. Był to papier drukowy o gramaturze $70 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, wyprodukowany z bielonej celulozowej masy drzewnej, zawierał 15–17% kaolinu, zaklejony był żywicą kalafoniową z dodatkiem siarczanu glinu. PH papieru wynosiło 4,8. Próbki po umieszczeniu w szalkach Petriego zostały wysterylizowane w ten sam sposób, co próbki papieru modelowego, a następnie kondycjonowane w $23 \text{ }^\circ\text{C}$ i 50% RH.

W celu zweryfikowania możliwości zastosowania analizy MLZO do detekcji aktywnych grzybów pleśniowych na rzeczywistych obiektach o podłożu papierowym, przeprowadzono analizę lotnych związków organicznych emitowanych z powierzchni karty XVII-wiecznego starodruku, na której stwierdzono zmiany wskazujące na obecność pleśni. Obiekt przechowywany jest w archiwum klasztoru oo. Karmelitów na Piasku, w Krakowie. W przypadku, gdy pleśń jest aktywna wśród zidentyfikowanych związków powinny być obecne markery jej aktywności metabolicznej. Analiza składu włóknistego wskazała na dominację włókien bawełnianych w badanej karcie (około 70%), pH zmierzone na zaatakowanej karcie wynosiło 5,9.

Gatunki grzybów pleśniowych

Gatunki grzybów, które wybrano do badań, były już wcześniej izolowane z obiektów o podłożu celulozowym¹⁰: *Chaetomium globosum* IHEM:6552, *Aspergillus fumigatus* IHEM:1363, *Myrothecium verrucaria* IHEM:3070, *Stachybotrys chartarum* IHEM:1413, *Cladosporium herbarum* IHEM:5294, *Trichoderma*

¹⁰ B. Zyska, *Fungi Isolated from Library Materials: A Review of Literature*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 1997, vol. 40, nr 1, s. 43–51; S. Manente et al., *Chemical and biological characterization of paper: A case study using a proposed methodological approach*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2012, vol. 74, s. 99–108.

viride IHEM:3170, *Penicillium chrysogenum* IHEM:1331. Zostały one zakupione jako gatunki zidentyfikowane i certyfikowane w Belgian Coordinated Collection of Microorganisms (IHEM Culture Collection, Bruksela, Belgia). Wszystkie wymienione gatunki grzybów pleśniowych wykryto również w powietrzu magazynów Muzeum Narodowego w Krakowie¹¹. Dla każdego gatunku przygotowano *inoculum*, zbierając do 10 ml płynu fizjologicznego tygodniową grzybnię danej pleśni, wyhodowaną na agarze ziemniaczanym (PDA, BTL, Polska). Stężenie zarodników w zawiesinie wynosiło $3,2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$. 0,1 ml tak przygotowanej zawiesiny był odpipetowywany na modelowe próbki papierów, umieszczone na powierzchni podłoża przygotowanego w fiolkach. Następnie fiołki zamykano, wykorzystując zakrętki z otworem i uszczelką wykonaną z PTFE i Teflonu. Dzięki takiej konstrukcji zakrętki możliwe było pobieranie próbek fazy gazowej z wnętrza fiołek po przekłuciu uszczelki. Zestaw zaszczepionych próbek, przygotowanych w fiolkach, umieszczono w ciepłarkach. Hodowlę prowadzono w temperaturze 25 °C. W czasie pierwszych 24 godzin inkubacji fiołki nie były szczelnie zakręcone, tak aby nadmiar wody znajdującej się we wnętrzu odparował, dzięki czemu próbki były wilgotne, ale nieprzemoczone. Taka procedura może symulować w pewnym stopniu epizody występowania podwyższonych wartości wilgotności względnej w pomieszczeniach muzeów, bibliotek czy archiwów, które są zdarzeniem losowym, stwarzającym ryzyko rozwoju mikroorganizmów. MLZO emitowane przez pleśnie w trakcie ich wzrostu na próbkach były zatrzymywane w fiolkach. Próbki fazy gazowej z wnętrza fiołek pobierano techniką *headspace* na włókna SPME. Pobór próbek wykonywano po dwóch, sześciu, dziesięciu i trzynastu dniach prowadzenia hodowli. Jak ustalono, najwyższy poziom emisji MLZO jest mierzony między 5 a 7 dniem hodowli.

Dwie wysterylizowane i kondycjonowane próbki papieru historycznego pobrane z książki wydanej w 1965 roku umieszczono osobno w dwóch sterylnych

11 T. Sawoszczuk, J. Syguła-Cholewińska, J. Czop, *Analysis of microbial quality of air in selected facilities of the National Museum in Cracow*, Cracow 2015, <http://zasoby.kangur.uek.krakow.pl/djvu/index.php?kat=1000316177&col=ksiazki> [dostęp: 30.09.2016].

szalkach Petriego, a następnie zwilżono 0,1 ml jałowej wody tak, aby próbki były wilgotne, lecz nieprzemoczone. Następnie jedną z próbek zaszczerpiono zawiesiną zarodników *Penicillium chrysogenum*, przygotowaną w sposób opisany powyżej. Druga próbka pozostała jałowa jako próbka odniesienia. Próbki inkubowano w temperaturze 23 °C.

Badania dla powierzchni karty starodruku, na której stwierdzono zmiany wskazujące na obecność pleśni, wykonano w pomieszczeniu, w którym temperatura wynosiła 19,1 °C, a wilgotność względna 75,6%.

Tab. 1. Zestaw próbek przygotowanych do analizy MLZO

Gatunek pleśni	Rodzaj podłoża mikrobiologicznego	Typ próbki
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Chaetomium globosum</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Trichoderma viride</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Cladosporium herbarum</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Zmodyfikowane podłoże Czapek – Dox	bibuła Whatman NOVO Test Paper 2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	–	Próbka kwaśnego papieru z książki wydanej w 1965 r.
–	–	Karta starodruku ze zmianą wskazującą na obecność pleśni

Headspace – Solid Phase Microextractiron

SPME (Solid Phase Microextraction – mikroekstrakcja do fazy stałej) została wybrana jako metoda poboru próbek MLZO emitowanych przez grzyby pleśniowe. Procedura optymalizacji, jaką przeprowadzono dla metody *headspace-SPME* w zastosowaniu do analiz MLZO emitowanych przez grzyby pleśniowe rosnące na modelowych próbkach obiektów historycznych, pozwoliła udowodnić, że tzw. włókno kanapkowe, składające się z trzech różnych sorbentów (DVB/CAR/PDMS), najbardziej efektywnie sorbuje cały zakres związków lotnych emitowanych przez grzyby pleśniowe¹². Dlatego ten typ włókna wybrano do przeprowadzenia wszystkich analiz (Supelco, Labstore, Polska). Przed rozpoczęciem poboru próbek każde włókno SPME umieszczano na godzinę w porcie iniekcyjnym chromatografu gazowego (temp. 270 °C), w celu zdesorbowania wszystkich związków lotnych znajdujących się na powierzchni włókna (oczyszczanie włókna), zgodnie z instrukcją producenta. Pobór próbek fazy gazowej z wnętrza fiolek na włókna SPME prowadzono techniką *headspace* (tuż nad próbką). Po przebicciu uszczelki w zakrętku igłą, włókno wysuwano z igły na głębokość, przy której sorbenty znajdowały się tuż nad rozwiniętą grzybnią. Po zakończeniu sorpcji włókno wsuwano do igły, igłę wyciągano z fiołki i przenoszono do iniektora chromatografu gazowego. Następnie włókno wysuwano w iniektorze i rozpoczynano analizę MLZO zaadsorbowanych na włóknie. Pobór MLZO na włókno trwał 24 godziny. Temperatura w iniektorze chromatografu gazowego w czasie desorpcji MLZO wynosiła 250 °C. Desorpcję prowadzono przez 15 minut. Był to czas wystarczający do całkowitego zdesorbowania wszystkich związków z powierzchni włókna SPME, co zostało potwierdzone po wykonaniu ponownej desorpcji tego samego włókna. Nie występowało zjawisko przenoszenia analitów pomiędzy kolejnymi pomiarami. Analizy powtarzano trzy razy dla każdego zestawu: grzyb – próbka papieru – podłoże.

¹² T. Sawoszczuk, J. Sygula-Cholewińska, J. M. Del Hoyo-Meléndez, *Optimization of headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: Application to historical objects*, „Journal of Chromatography A” 2015, vol. 1409, s. 30–45.

Taka sama procedura pomiarowa była stosowana w przypadku analizy tzw. próbek ślepych. Były to fiołki z podłożami i próbkami papierów modelowych, na które nie posiano zarodników grzybów. Otrzymano dzięki temu chromatogramy dla lotnych związków organicznych emitowanych z podłoży, próbek papieru, uszczelki i zakrętki, czyli tzw. emisja tła. Chromatogramy te były odejmowane w procesie analizy danych od chromatogramów uzyskanych dla próbek zaszczepionych pleśniami, aby być pewnym, że dalsza interpretacja wyników prowadzona była wyłącznie dla MLZO emitowanych przez grzyby rosnące na próbkach.

Do poboru MLZO emitowanych przez *Penicillium chrysogenum*, rosnące na próbce historycznego papieru kwaśnego, zastosowano również tzw. włókno kanapkowe. Włókno umieszczano w częściowo otwartej szalce Petriego, a następnie wysuwano je z igły tak, aby znajdowało się tuż nad próbką papieru (mniej niż 1 mm) z kulturą grzybową lub bez niej (w przypadku próbki odniesienia). MLZO sorbowano na włókno tylko przez 12 godzin. Po zakończeniu sorpcji włókno umieszczano w iniektorze chromatografu i rozpoczynano analizę chromatograficzną. Pomiarów powtórzono trzykrotnie. Należy zwrócić uwagę, iż w przypadku badania MLZO emitowanych przez *P. chrysogenum*, rosnące na rzeczywistej, historycznej próbce papieru, sorpcja związków lotnych prowadzona była w czasie krótszym niż dla próbek w fiołkach, w dodatku pobór prób odbywał się w układzie otwartym. Wyniki tego eksperymentu miały dostarczyć informacji, czy możliwe jest przeprowadzenie pomiarów MLZO emitowanych przez grzyby pleśniowe rozwijające się na rzeczywistych obiektach historycznych czy obiektach sztuki *in situ*, czyli na terenie muzeum, biblioteki bądź archiwum, w układzie otwartym, w którym stężenie MLZO w powietrzu z powodu działania zjawiska dyfuzji spada wraz ze wzrostem odległości od powierzchni pleśni.

W celu zbadania lotnych związków organicznych emitowanych z powierzchni karty starodruku, na której stwierdzono zmiany wskazujące na obecność pleśni, do zmienionej powierzchni przyłożono bezpośrednio włókno SPME i prowadzono sorpcję przez 4 godziny (sorbent włókna miał kontakt z badaną

powierzchnią). Drugie włókno SPME umieszczono obok obiektu, celem pomiaru tzw. emisji tła (emisja z papieru i związki lotne obecne w otoczeniu). Uzyskany w ten sposób chromatogram odejmowano w trakcie opracowywania wyników od chromatogramu zarejestrowanego dla próbki związków lotnych emitowanych z powierzchni karty, aby mieć pewność, że tylko te ostatnie są poddawane analizie na obecność markerowych MLZO.

Badania MLZO emitowanych przez grzyby rosnące na próbkach modelowych i próbce historycznej obejmowały zarówno analizę jakościową, jak i ilościową. Analiza ilościowa została wykonana po uzyskaniu krzywych kalibracyjnych¹³. Kalibrację przeprowadzono dla następujących substancji wzorcowych: alkohole (1-okten-3-ol, 3-oktanol) oraz ketony (1-okten-3-on, 3-oktanon, 2-heksanon, 2-heptanon). Granice wykrywalności i oznaczalności wymienionych substancji zostały wyznaczone na podstawie wartości odchylenia standardowego pola powierzchni pod pikami uzyskanymi dla poszczególnych stężeń i kąta nachylenia krzywych kalibracyjnych. Najwyższa granica oznaczalności została oznaczona dla heksanonu i wynosiła ona $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. Granice oznaczalności oznaczone dla pozostałych substancji wzorcowych mieściły się w przedziale 3,0 do $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. Granice wykrywalności i oznaczalności zostały wyznaczone w ten sam sposób również dla związków z grup terpenów i sesquiterpenów, w trakcie procedury kalibracji przeprowadzonej dla mieszaniny związków odorotwórczych ISO 17943 (Sigma-Aldrich, Polska). Granica oznaczalności wyznaczona dla jednego ze związków obecnych w badanej mieszaninie, dla którego rejestrowano najmniejsze piki w chromatogramach, tj. dla geosminy, wynosiła $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

Analiza chromatograficzna

Analiza MLZO prowadzona była w układzie: chromatograf gazowy (GC, Trace 1310) – kwadрупolowy spektrometr masowy (MS, ISQ), produkcji Thermo Scientific Inc. (USA). Iniektor wyposażony był w liner przeznaczony do desorpcji włókien SPME. Podczas desorpcji MLZO z włókna iniektor utrzymywano

¹³ Ibidem.

w trybie pracy splitless. Rozdział prowadzono w kolumnie kapilarnej Rxi-5MS (Restek, USA): 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm ID, grubość złoza 0,25 µm. Przepływ helu w trakcie rozdziału 1 ml/min. Program temperaturowy analizy był następujący: 35 °C utrzymywane przez 10 min, wzrost temperatury od 35 °C do 220 °C z prędkością 5 °C/min; 220 °C utrzymywane przez 5 min, wzrost temperatury od 220 °C do 250 °C z prędkością 10 °C/min; 250 °C utrzymywane przez 10 min. Parametry pracy spektrometru masowego: temperatura linii transferowej: 250 °C, jonizacja elektronami (EI) o energii 70 eV, zakres pomiarowy mas 33–450 m/z, pomiar całkowitego prądu jonowego (TIC). MLZO identyfikowane były na podstawie bibliotek widm masowych (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library) dostępnych w programie NIST MS Search, wersja 2.0. W przypadku, gdy dany związek lotny nie mógł być zidentyfikowany na podstawie biblioteki widm, do jego identyfikacji wykorzystywano substancje wzorcowe.

Wyniki i dyskusja

Wybór grzybów pleśniowych

Wszystkie wybrane do badań gatunki grzybów pleśniowych zostały opisane w literaturze jako gatunki celulolityczne, które izolowano z różnych podłoży papierowych¹⁴. Dodatkowo wszystkie wymienione gatunki wykryto w powietrzu pomieszczeń magazynowych Muzeum Narodowego w Krakowie¹⁵, a także innych muzeów¹⁶ czy bibliotek¹⁷.

14 B. Zyska, op. cit.; S. Manente et al., op. cit.; N. Mesquita et al., *Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2009, vol. 63, nr 5, s. 626–629; K.-E. L. Eriksson, R. Blanchette, P. Ander, *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, Heidelberg 1990, s. 89–180.

15 T. Sawoszczuk, J. Syguła-Cholewińska, J. Czop, op. cit.

16 N. Mesquita et al., op. cit.

17 B. Zyska, op. cit.

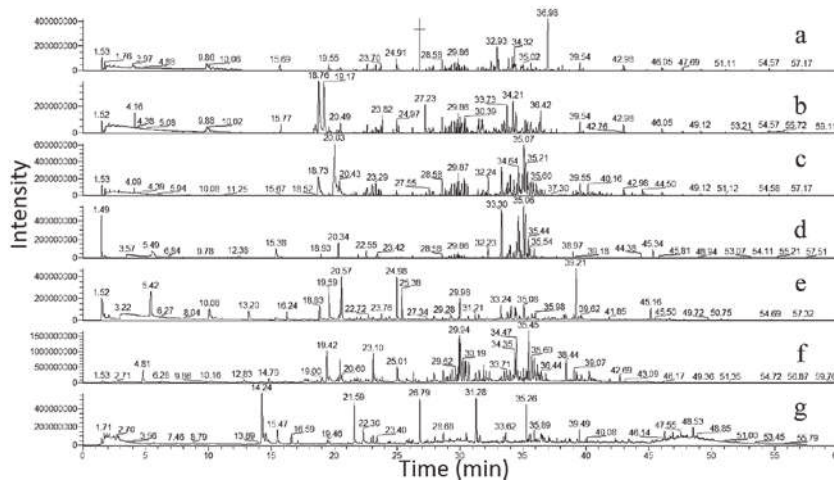
Analiza jakościowa i ilościowa chromatogramów

Szczegółowa analiza jakościowa chromatogramów, uzyskanych dla MLZO emitowanych przez grzyby pleśniowe rosnące na próbkach podłoży papierowych, została wykonana w programie AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, wersja 2.70, maj 13.2011). Widma masowe zarejestrowane pod chromatogramami poddano dekonwolucji, a następnie prowadzono identyfikację związków lotnych na podstawie bibliotek widm masowych (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library) dostępnych w programie NIST MS Search. Uzyskane wyniki wskazują, że każdy z badanych gatunków pleśni, posianych na próbki papieru, wytwarza więcej niż 140 lotnych związków organicznych (rys. 1 i 2). Związki te należą do różnych grup¹⁸: węglowodorów (heptan, izopren), węglowodorów aromatycznych (benzen, styren), alkoholi (1-okten-3-ol, 3-oktanol, 3-metyl-1-butanol), aldehydów, ketonów (1-oktanon, 1-okten-3-on, 3-oktanon), kwasów organicznych, eterów, estrów (octan butylu), terpenów (limonen), sesquiterpenów (humulen, nerolidol, bisabolen), związków organicznych zawierających siarkę i azot.

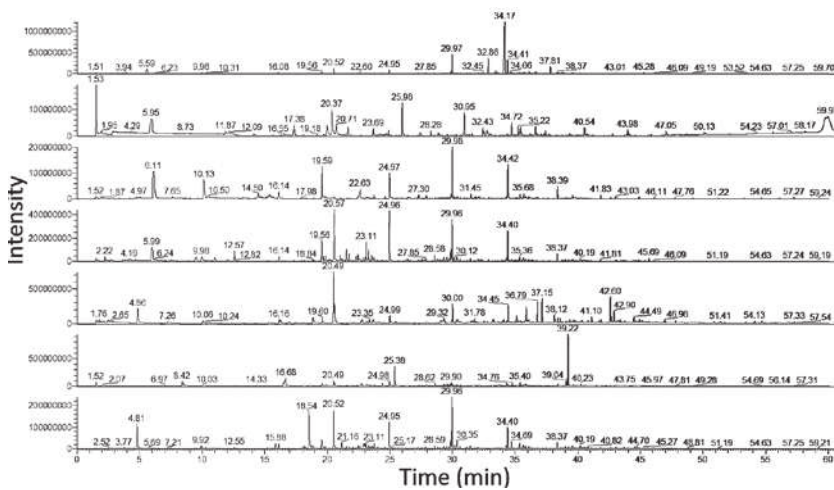
Analiza jakościowa obejmowała tylko związki, które zostały zidentyfikowane z prawdopodobieństwem większym niż 90%. W niektórych przypadkach, kiedy prawdopodobieństwo było mniejsze niż 90%, identyfikację potwierdzano prowadząc badania dla substancji wzorcowych. Było to szczególnie istotne w przypadku związków, które zostały już opisane w literaturze jako MLZO, będące markerami aktywności pleśni. Niektóre ze zidentyfikowanych związków organicznych były emitowane przez wszystkie gatunki pleśni, niezależnie od rodzaju materiału modelowego, który porastały. Natomiast profil emisji wszystkich MLZO rozpatrywany ogólnie dla konkretnego gatunku rosnącego na danym materiale modelowym jest indywidualną cechą tego gatunku. Jest to widoczne

¹⁸ K. Fiedler, E. Schütz, S. Geh, *Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials*, „International Journal of Hygiene and Environmental Health” 2001, vol. 204, nr 2, s. 111–121.

Rys. 1. Chromatogramy uzyskane dla MLZO emitowanych przez różne gatunki pleśni rosnące na modelowych próbkach papieru kwaśnego, NOVO Test Paper: a) *Aspergillus fumigatus*, b) *Chaetomium globosum*, c) *Myrothecium verrucaria*, d) *Stachybotrys chartarum*, e) *Trichoderma viride*, f) *Cladosporium herbarum*, g) *Penicillium chrysogenum* (szósty dzień inkubacji)



Rys. 2. Chromatogramy uzyskane dla MLZO emitowanych przez różne gatunki pleśni rosnące na modelowych próbkach celulozy bawełnianej, bibuła Whatman: a) *Aspergillus fumigatus*, b) *Chaetomium globosum*, c) *Myrothecium verrucaria*, d) *Stachybotrys chartarum*, e) *Trichoderma viride*, f) *Cladosporium herbarum*, g) *Penicillium chrysogenum* (szósty dzień inkubacji)



na rysunkach jako różnica w ilości i wysokości pików zarejestrowanych w poszczególnych chromatogramach.

W trakcie analizy chromatogramów szczególną uwagę zwrócono na niektóre alkohole: 1-okten-3-ol, 3-oktanol oraz ketony: 1-okten-3-on, 3-oktanon, 2-oktanon, ponieważ są one przedstawiane w literaturze jako markery aktywności grzybów pleśniowych. Związki te emitowane są przez pleśnie w dużych stężeniach i mogą być wykorzystane do wykrycia aktywności wielu gatunków grzybów. Zaliczane są one do tzw. kompleksu C₈. Analiza jakościowa chromatogramów była dlatego szczególnie poświęcona wyszukiwaniu tych związków. Dodatkowo, w literaturze zostało udowodnione, że czasami reakcje enzymatyczne przebiegają inną ścieżką i wówczas obok związków C₈ powstają heptanon i heksanon¹⁹. Inni autorzy wykazali również, że terpeny i sesquiterpeny, odpowiedzialne za specyficzny stęchły zapach, są dobrymi biomarkerami aktywności pleśni²⁰. Można zatem uznać, że wszystkie trzy wymienione grupy związków są biomarkerami, pozwalającymi odróżnić formy aktywne pleśni od form nieaktywnych.

Uwzględniając przedstawione powyżej argumenty, uznano, że najważniejszą częścią analizy jakościowej chromatogramów jest ustalenie, czy grzyby pleśniowe rozwijające się na materiałach modelowych imitujących obiekty historyczne oraz na rzeczywistej próbce historycznej emitują lotne związki organiczne należące do wszystkich trzech wspomnianych grup. Wyniki analizy jakościowej przedstawione zostały w tabelach 2 i 3.

Na podstawie danych przedstawionych w tabelach 2 i 3 można uznać, że wszystkie gatunki pleśni inkubowane zarówno na próbkach modelowego papieru kwaśnego, jak i na próbkach modelowego papieru z celulozą bawełnianą, emitowały związki lotne należące do kompleksu C₈. Co więcej, prawie

¹⁹ K. Wilkins, K. Larsen, M. Simkus, *Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media*, „Chemosphere” 2000, vol. 41, nr 3, s. 437–446.

²⁰ V. Polizzi et al., *Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of Aspergillus species*, „Fungal Biology” 2012, vol. 116, nr 9, s. 941–953.

Tab. 2. Wyniki identyfikacji lotnych biomarkerów oraz analizy ilościowej przeprowadzonych chromatogramów otrzymanych dla MLZO emitowanych przez wybrane gatunki pleśni porastające próbki modelowego papieru kwaśnego (NOVO Test Paper, 6 dzień inkubacji)

Gatunek	Emisja: 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-okten-3-on, 3-oktanon, 2-oktanon	Emisja: heksanon heptanon	Emisja: terpeny, sesquiterpeny	Całkowite stężenie markerowych MLZO [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$] ^a
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+++++	12 ± 1
<i>Chaetomium globosum</i>	+++		+++++	18 ± 2
<i>Myrothecium verrucaria</i>	++	+	++++	32 ± 1
<i>Stachybotrys chartarum</i>	++		+++++	18 ± 3
<i>Trichoderma viride</i>	+++	++	++++	17 ± 2
<i>Cladosporium herbarum</i>	++	+	++++	34 ± 1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+++	+	++++	27 ± 2

Liczba „+” wskazuje, jak wiele związków z danej grupy biomarkerów wymienionych w nagłówku tabeli było emitowanych przez pleśnie rosnące na próbkach.

^a Jest to suma średnich stężeń związków będących markerami aktywności pleśni, które zostały wymienione w nagłówku kolumny drugiej, trzeciej i czwartej. Odchylenie standardowe obliczono na podstawie wariancji.

we wszystkich zbadanych przypadkach grzyby emitowały również ketony sześciowęglowe i siedmiowęglowe. Wyjątek stanowiły tutaj *Stachybotrys chartarum* oraz *Chaetomium globosum* rosnące na próbce papieru kwaśnego, które nie emitowały żadnego ze wspomnianych ketonów. Wynika to z faktu, iż jak wspomniano powyżej, wytwarzanie ketonów sześci- i siedmiowęglowych przez grzyby pleśniowe zachodzi tylko w sytuacji, kiedy reakcje metaboliczne drugiego

Tab. 3. Wyniki identyfikacji lotnych biomarkerów oraz analizy ilościowej przeprowadzonych chromatogramów otrzymanych dla MLZO emitowanych przez wybrane gatunki pleśni porastające próbki modelowego papieru z celulozą bawełnianą (bibuła Whatman, 6 dzień inkubacji)

Gatunek	Emisja: 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-okten-3-on, 3-oktanon, 2-oktanon	Emisja: heksanon heptanon	Emisja: terpeny, sesquiterpeny	Całkowite stężenie markerowych MLZO [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$] ^a
<i>Aspergillus fumigatus</i>	++	+	+++++++	13 ± 1
<i>Chaetomium globosum</i>	+++++	++	++++	6 ± 1
<i>Myrothecium verrucaria</i>	+++	+	+++	4 ± 1
<i>Stachybotrys chartarum</i>	++	++	+++++	12 ± 3
<i>Trichoderma viride</i>	++	+	+++++++	21 ± 1
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	+	+++	11 ± 2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	++	+	+++	5 ± 1

Liczba „+” wskazuje, jak wiele związków z danej grupy biomarkerów wymienionych w nagłówku tabeli było emitowanych przez pleśnię rosnące na próbkach.

^a Jest to suma średnich stężeń związków będących markerami aktywności pleśni, które zostały wymienione w nagłówku kolumny drugiej, trzeciej i czwartej. Odchylenie standardowe obliczono na podstawie wariancji.

rzędu biegną alternatywną ścieżką, co nie zawsze ma miejsce²¹. Wszystkie badane gatunki emitowały terpeny i sesquiterpeny.

Analizując dane przedstawione w tabeli 2, można stwierdzić, iż największą liczbę związków uznawanych za biomarkery aktywności metabolicznej grzybów pleśniowych emitowały *A. fumigatus* oraz *S. chartarum*, rosnące na

²¹ K. Wilkins, K. Larsen, M. Simkus, op. cit.

kwaśnym papierze. Nieznacznie mniejszą liczbę biomarkerów emitowały pozostałe gatunki. Dane przedstawione w tabeli 3 wskazują z kolei, iż największą liczbę związków uznawanych za biomarkery aktywności metabolicznej grzybów pleśniowych emitowały *A. fumigatus*, *Ch. globosum* oraz *T. viride*, rosnące na próbkach celulozy bawełnianej. Nieznacznie mniejszą liczbę biomarkerów emitowały pozostałe gatunki. Natomiast najmniejszą liczbę markerów aktywności metabolicznej zidentyfikowano w przypadku *C. herbarum*.

Porównując wyniki zestawione w obu tabelach, można stwierdzić, iż badane gatunki grzybów pleśniowych emitowały większą liczbę markerów aktywności metabolicznej w przypadku wzrostu na modelowych próbkach papieru kwaśnego, w porównaniu do liczby markerów zidentyfikowanych dla grzybów rosnących na próbkach celulozy bawełnianej. Różnice te zostały wyjaśnione poniżej.

MLZO emitowane przez grzyby pleśniowe poddano również analizie ilościowej. Analizę przeprowadzono dla związków uznanych w literaturze za markery aktywności metabolicznej pleśni. Poziomy emisji markerowych MLZO zostały obliczone po przeprowadzeniu całkowania wszystkich pików w chromatogramach (Genesis Peak Integration, Xcalibur) otrzymanych dla wszystkich zestawów: pleśń – próbka. Powierzchnia pod pikami zarejestrowanymi dla markerowych związków lotnych została następnie przeliczona na stężenie wyrażone w $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, na podstawie ustalonych krzywych kalibracyjnych. Wyniki przedstawiono w tabelach 2 i 3.

Porównanie ilości markerowych MLZO emitowanych przez poszczególne gatunki pleśni rosnące na próbkach kwaśnego papieru (tab. 2) pozwala stwierdzić, iż najwyższy poziom emisji wyznaczono dla *C. herbarum* oraz *M. verrucaria*. Najniższe stężenie emitowanych MLZO stwierdzono dla *A. fumigatus*, natomiast pozostałe cztery gatunki emitowały MLZO na poziomie między 17 a $27 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. W przypadku hodowli grzybów pleśniowych na próbkach celulozy bawełnianej (tab. 3) najwyższy poziom emisji zmierzono dla gatunku *T. viride*. Stężenie markerowych MLZO emitowanych przez pozostałe sześć gatunków pleśni było niskie i nie przekraczało $13 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. Porównanie informacji o właściwościach celulolitycznych badanych gatunków grzybów przedstawionych w różnych pozycjach z literatury tematycznej pozwala stwierdzić, iż najbardziej aktywne celulolitycznie są: *Ch. globosum*, *A. fumigatus*, *M. verrucaria*, *S. chartarum*, *T. viride*²². Względnie niższa aktywność celulolityczna przypisywana jest *P. chrysogenum*.

Pomiary emisji MLZO wykonywano według ustalonych kroków czasowych, odpowiednio po 2, 6, 10 oraz 13 dniach od założenia hodowli. Wyniki analizy ilościowej przeprowadzonej dla chromatogramów uzyskanych dla poszczególnych gatunków pozwalają wykazać, iż najwyższy poziom emisji związków markerowych mierzony jest po sześciu dniach od rozpoczęcia inkubacji. Po tym czasie poziom emisji spada, co jest zgodne z danymi literaturowymi²³. Jednocześnie wyniki analizy jakościowej i ilościowej wykonanej dla chromatogramów uzyskanych w kolejnych krokach czasowych wskazują, że stężenie związków markerowych należących do poszczególnych trzech grup, wymienionych w nagłówkach tabel 2 i 3, ulega zmianie. Przy dłuższych czasach hodowli grzyby pleśniowe emitują niższe stężenia związków należących do tzw. kompleksu C₈, natomiast wzrasta wówczas emisja terpenów i sesquiterpenów.

Porównanie stężeń związków markerowych MLZO emitowanych przez poszczególne gatunki pleśni rosnących na próbkach papieru kwaśnego i próbkach z celulozą bawełnianą pozwala wykazać, iż niższe poziomy emisji markerów aktywności rejestrowano dla grzybów hodowanych na próbach celulozy bawełnianej, co jest widoczne nawet przy pobieżnym porównaniu wysokości i ilości pików przedstawionych na rysunkach 1 i 2. Różnice te wynikają z faktu, iż w próbkach papieru kwaśnego (drzewnego) poddanego przed eksperymentem

²² K.-E. L. Eriksson, R. Blanchette, P. Ander, op. cit.; B. Flannigan, J. D. Miller, *Microbial growth in indoor environments*, w: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*, red. B. Flannigan, R. A. Samson, J. D. Miller, Boca Raton 2011, s. 75.

²³ S. Schuchardt, H. Kruse, *Quantitative volatile metabolite profiling of common indoor fungi: relevancy for indoor air analysis*, „Journal of Basic Microbiology” 2009, vol. 49, nr 4, s. 350-362.

sterylizacji celuloza jest silnie zdegradowana (wykazano spadek liczby podwójnych zgięć do wartości 1), jej łańcuchy są znacznie skrócone i łatwo dostępne dla rozwijających się grzybów. Stąd są one bardziej aktywne metabolicznie na tych próbkach i wykazują wyższy poziom emisji markerowych MLZO.

Dodatkowo rozwojowi pleśni sprzyja obniżone pH papieru. Natomiast w przypadku próbek celulozy bawełnianej liczba podwójnych zgięć nieznacznie wzrosła w wyniku sterylizacji, co oznacza, że celuloza uległa sieciowaniu i wzrosła w niej liczba obszarów krystalicznych, trudno dostępnych dla strzępek rozwijającego się grzyba, dlatego ich metabolizm jest ograniczony i emisja markerów aktywności jest mniejsza.

Dane przedstawione w tabelach 2 i 3 pozwalają potwierdzić, że w przypadku każdego badanego układu: pleśń – próbka modelowa – podłoże, poziom emisji markerowych MLZO był mierzalny. Warto zwrócić jednak uwagę, że wyznaczone poziomy były relatywnie niskie. Może to wynikać z faktu, że grzyby były hodowane na podłożu, które nie zawierało łatwo dostępnych substratów pokarmowych, a jedynym źródłem węgla organicznego były modelowe próbki papierów naniesione na podłoże. Zmierzone poziomy emisji są niższe od poziomów opisanych w niektórych pozycjach literaturowych²⁴, przy czym zacytowani autorzy badali MLZO emitowane przez grzyby, które były posiane na podłoża zawierające pełen zestaw składników odżywczych (łącznie z cukrami i peptonem) lub na materiał umieszczony na pełnowartościowych podłożach. Różnice w poziomach emisji MLZO mierzonej dla grzybów pleśniowych rosnących na podłożach pełnowartościowych i ze zubożonym składem były już wcześniej udowodnione w literaturze.

Analiza wyników uzyskanych dla próbek papierów historycznych

Chromatogramy uzyskane dla MLZO emitowanych przez *P. chrysogenum* rosnące na historycznej próbce papieru oraz dla próbek związków lotnych, pobieranych z karty starodruku z widocznymi zmianami, również poddano pełnej

²⁴ Ibidem.

analizie jakościowej i ilościowej, stosując metodykę identyczną, jak dla eksperymentu w fiolkach. Wyniki uzyskane dla *P. chrysogenum* pozwoliły wykazać, iż w trakcie wzrostu na historycznej próbce kwaśnego papieru gatunek ten emitował: 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 3-oktanon oraz trzy związki lotne należące do grupy terpenów. Dodatkowo wyznaczony tu poziom emisji markerowych MLZO wynosił $17 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

W przypadku pomiarów wykonanych dla karty starodruku, na której stwierdzono zmianę wskazującą na obecność pleśni, na podstawie analizy ilościowej i jakościowej ustalono, iż wśród zidentyfikowanych lotnych związków organicznych znajdowały się: 1-okten-3-on, 3-oktanon oraz 2-heptanon. Analiza ilościowa wykazała, że 1-okten-3-on i 3-oktanon były emitowane na poziomie 0,8 i 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, a 2-heptanon był emitowany w stężeniu, które znajdowało się poniżej granicy oznaczalności wyznaczonej dla tego związku. Wykryto również jeden związek z grupy terpenów. Sumaryczna emisja MLZO wynosiła 13 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

Można zatem uznać, iż na podstawie analizy MLZO w obydwu przypadkach możliwe było wykrycie aktywnej metabolicznie pleśni. Dodatkowo – także w obydwu przypadkach – zmierzony poziom emisji markerowych MLZO był w większości przypadków powyżej granic oznaczalności wyznaczonych dla poszczególnych związków, mimo iż pomiary wykonano w warunkach ograniczonych w stosunku do pomiarów przeprowadzonych dla próbek modelowych, w układach zamkniętych (fiolkach). W eksperymencie z fiolkami sorpcję MLZO emitowanych przez grzyby hodowane na modelowych próbkach papierów prowadzono przez 24 godziny, w temperaturze 25 °C. Natomiast w pomiarach dla pleśni rosnącej na próbce kwaśnego papieru historycznego sorpcja MLZO odbywała się w układzie otwartym, czas sorpcji był skrócony do 12 godzin, a temperatura, w której przeprowadzano sorpcję, wynosiła tylko 23 °C (obniżenie lotności związków). Jeszcze bardziej ograniczoną procedurę pomiarową zastosowano przy pomiarze MLZO emitowanych przez pleśń obecną na karcie starodruku. W tym przypadku sorpcję prowadzono w układzie otwartym, przez 4 godziny, w temperaturze 19 °C. Pomimo tych ograniczeń, emisja większości markerowych MLZO była powyżej limitu detekcji.

Podsumowanie

Poziom emisji MLZO – zmierzony zarówno w zamkniętych układach pomiarowych, dla próbek modelowych, jak i w układach otwartych, dla próbek rzeczywistych – jest niski, jednak we wszystkich omawianych przypadkach znajdował się powyżej granic oznaczalności wyznaczonych dla poszczególnych związków markerowych. Na podstawie uzyskanych danych można uznać, że wszystkie gatunki pleśni emitowały związki lotne należące do kompleksu C₆, niezależnie od rodzaju modelowej próbki papieru, na której były hodowane. W większości zbadanych przypadków grzyby emitowały również ketony sześciowęglowe i siedmiowęglowe, zarówno w trakcie hodowli na papierze kwaśnym, jak i na celulozie bawełnianej. Podobne wyniki uzyskano z pomiarów emisji terpenów i sesquiterpenów. Dodatkowo warto zaznaczyć, iż w przypadku pomiarów wykonanych w układach otwartych, dla pleśni rosnących na rzeczywistych historycznych podłożach papierowych, możliwe było wykrycie markerowych MLZO i ich analiza ilościowa, pomimo iż pomiar przeprowadzono w warunkach ograniczonych w porównaniu do analiz wykonanych dla pleśni hodowanych na modelowych próbkach papierów, w układach zamkniętych. Uzyskane wyniki pozwalają udowodnić, iż aktywność metaboliczną grzybów pleśniowych rozwijających się na obiektach historycznych z podłożem papierowym można potwierdzić na podstawie detekcji trzech wymienionych grup lotnych związków organicznych należących do MLZO.

Opracowana metodyka może być zastosowana w praktyce do kontroli i ochrony zbiorów. Pozwala ona wykryć aktywne formy pleśni, m.in w obiektach przekazywanych do bibliotek lub archiwów w formie darowizny, czy też w obiektach w czasie przeglądu zbiorów, w sytuacji, gdy na danym obiekcie zauważona zostanie zmiana bądź wykazuje on charakterystyczny zapach pleśni. Pozwoli to wydzielić obiekty, które mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla innych zbiorów. Warto dodać, że opisana metoda umożliwia wykrycie grzybów aktywnych metabolicznie również w początkowej fazie ich wzrostu. Wynika to z faktu, że pleśń emituje opisane biomarkery aktywności na każdym

etapie swojego rozwoju. Niewątpliwie metoda ta wymaga zastosowania specjalistycznego sprzętu pomiarowego do przeprowadzenia analizy, jednak sam pobór MLZO prowadzi się z użyciem włókna SPME, które ma niewielki rozmiar i może być łatwo transportowane między miejscem poboru próbki a laboratorium. Rzeczywisty czas oczekiwania na wyniki pomiarów wynosi poniżej 6 godzin.

Podziękowanie

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu „Badania biodeterioracji obiektów zabytkowych na podstawie analizy lotnych związków organicznych emitowanych przez grzyby pleśniowe”, który został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji DEC-2012/05/B/HS2/04094.

Bibliografia

- Ageing and stabilisation of paper*, red. Matija Strlič, Jana Kolar, Ljubljana 2005, www.science4heritage.org/papyrus/book_index.pdf.
- Bingley Gavin D., Verran Joanna, Munro Lindsey J., Banks Craig E., *Identification of microbial volatile organic compounds (MVOCs) emitted from isolates found on cinematographic film*, „Analytical Methods” 2012, vol. 4, s. 1265–1271.
- Canhoto Olinda, Pinzari Flavia, Fanelli Corrado, Magan Naresh, *Application of electronic nose technology for the detection of fungal contamination in library paper*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2004, vol. 54, s. 303–309.
- Eriksson Karl-Erik L., Blanchette Robert, Ander Paul, *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, Heidelberg 1990.
- Fiedler Klaus, Schütz Edgar, Geh Stefan, *Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials*, „International Journal of Hygiene and Environmental Health” 2001, vol. 204, nr 2, s. 111–121.
- Flannigan Brian, Miller David J., *Microbial growth in indoor environments*, w: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*, red. Brian Flannigan, Robert A. Samson, David J. Miller, Boca Raton 2011.
- Manente Sabrina et al., *Chemical and biological characterization of paper: A case study using a proposed methodological approach*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2012, vol. 74, s. 99–108.
- Mesquita Nuno et al., *Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2009, vol. 63, nr 5, s. 626–629.
- Nyuksha Yuliya P., *The biodeterioration of papers and books*, w: *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, t. 1: *Biodegradation of Cultural Heritage*, red. K. L. Garg, Neelima Garg, K. G. Mukerji, Calcutta 1993.
- Polizzi Viviana et al., *Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of Aspergillus species*, „Fungal Biology” 2012, vol. 116, nr 9, s. 941–953.

- Sawoszczuk Tomasz, Syguła-Cholewińska Justyna, Czop Janusz, *Analysis of microbial quality of air in selected facilities of the National Museum in Cracow*, Cracow 2015, [http://zasoby.kangur.uek.krakow.pl/djvu/index.php?kat=1000316177 &col=ksiazki](http://zasoby.kangur.uek.krakow.pl/djvu/index.php?kat=1000316177&col=ksiazki).
- Sawoszczuk Tomasz, Syguła-Cholewińska Justyna, Del Hoyo-Meléndez Julio M., *Optimization of headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: Application to historical objects*, „Journal of Chromatography A” 2015, vol. 1409, s. 30–45, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967315010274.
- Schuchardt Sven, Kruse Hermann, *Quantitative volatile metabolite profiling of common indoor fungi: relevancy for indoor air analysis*, „Journal of Basic Microbiology” 2009, vol. 49, nr 4, s. 350–362.
- Sobucki Władysław, *Stan zachowania księgozbiorów powstałych po 1980 roku*, w: *Stan zachowania polskich zbiorów bibliotecznych i archiwalnych z XIX i XX wieku*, red. Barbara Drewniewska-Idziak, Warszawa 2006.
- Sobucki Władysław, Czajka Anna, *Stan zachowania archiwaliów z XIX i XX wieku*, w: *Stan zachowania polskich zbiorów bibliotecznych i archiwalnych z XIX i XX wieku*, red. Barbara Drewniewska-Idziak, Warszawa 2006.
- Walker Gay, Greenfield Jane, Fox John, Simonoff Jeffrey S., *The Yale Survey: A Large-Scale Study of Book Deterioration in the Yale University Library*, „College & Research Libraries” 1985, vol. 46, nr 2, s. 111–132, <http://crl.acrl.org/content/46/2/111.full.pdf+html>.
- Wilkins Ken, Larsen Kjeld, *Variation of volatile organic compound patterns of mold species from damp buildings*, „Chemosphere” 1995, vol. 31, nr 5, s. 3225–3236.
- Wilkins Ken, Larsen Kjeld, Simkus Mirella, *Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media*, „Chemosphere” 2000, vol. 41, nr 3, s. 437–446.
- Wilkins Ken, Nielsen E. M., Wolkoff Peder, *Patterns in Volatile Organic Compounds in Dust from Moldy Buildings*, „Indoor Air” 1997, vol. 7, nr 2, s. 128–134.
- Zotti Mirca, Ferroni Alice, Calvini Paolo, *Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 2008, vol. 62, nr 2, s. 186–194, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830508000103.
- Zyska Bronisław, *Fungi Isolated from Library Materials: A Review of Literature*, „International Biodeterioration & Biodegradation” 1997, vol. 40, nr 1, s. 43–51.