

Katja Kavkler¹, Andrej Demšar²

¹ Zavod za varstvo kulturne dediščine Slovenije, Restavratorski center, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za tekstilstvo, Ljubljana, Slovenija

Uporaba FTIR in ramanske spektroskopije pri kvalitativni analizi strukturnih sprememb celuloznih vlaken

Izvirni znanstveni članek

Poslano december 2011 • Sprejeto februar 2012

Izvlaček

Vlakna spadajo v skupino organskih materialov, zato so občutljiva na zunanje vplive, ki povzročajo spremembe v strukturi materialov. Posledica strukturnih sprememb vlaken so tudi spremembe njihovih lastnosti. Na zunanje vplive so zelo občutljiva celulozna naravna vlakna, ki so bila v preteklosti pogosto uporabljena v oblačilih, uporabnih in okrasnih predmetih. Strukturno vlaken lahko analiziramo z vibracijskimi spektroskopskimi metodami. Infrardeča in ramanska spektroskopija sta komplementarni metodi, s katerima lahko analiziramo nadmolekulske strukture vlaken (kristalnost in polimorfne oblike celuloze). V pričujoči raziskavi smo obe metodi uporabili za analizo starih in z glivami okuženih celuloznih tekstilij. Izkazalo se je, da smo z izbranimi metodama lahko analizirali nadmolekulske strukturne spremembe v okuženih vzorcih, ki so se kazale kot depolimerizacija celuloznih makromolekul, in spremembe urejenosti nadmolekulske strukture vlaken. Ugotovili smo, da aktivna okužba, ki traja daljši čas, povzroči večje spremembe nadmolekulske strukture vlaken.

Ključne besede: celulozna vlakna, infrardeča spektroskopija, ramanska spektroskopija, struktura vlaken

1 Uvod

Naravna celulozna vlakna so zaradi svoje zgradbe občutljiva na vplive iz okolice, med katere spadajo tako fizikalni in kemični kot tudi biološki vplivi. Pri vseh teh vplivih se spremeni struktura materiala. Še posebno so na zunanje vplive občutljivi zgodovinski materiali, ki so jim že dlje izpostavljeni in so se njihove lastnosti zato že dodobra spremenile. Spremenjene lastnosti starih vlaken med drugim pomembno vplivajo na izbiro konservatorskih in restavratorskih postopkov ter rokovanje z muzejskimi predmeti.

Celulozna vlakna so na zunanje vplive bolj občutljiva kot proteinska [1]. Zunanji vplivi, kot so spre-

minjanje temperature in relativne vlažnosti ter obsevanje z ultravijolično svetlobo v materialu, lahko povzročijo oksidacijo, hidrolizo, cepljenje polimernih verig in prekinjanje medmolekulskih vezi [2, 3], ki pogosto potekajo sočasno [4]. Naštete spremembe v strukturi spremenijo lastnosti vlaken. Med drugim lahko olajšajo razgradnjo materialov encimom, ki jih izločajo biološki organizmi [5, 6]. Biološki organizmi intenzivno spreminjajo materiale. Med najmočnejše biološke razkrojevalce tekstilnih materialov spadajo glive [2].

Vodilni avtor:
dr. Katja Kavkler
phone: +386 1 234 31 20
e-mail: katja.kavkler@rescen.si

Pričujoča raziskava je bila izvedena na celuloznih tekstilijah, okuženih z glivami, del teh tekstilij smo pred okužbo umetno starali. Analizo smo izvedli na bombažnih in lanenih tekstilijah. Bombažna (spadajo med semenska vlakna) in lanena (spadajo med stebelna vlakna) vlakna pogosto najdemo v oblačilih in predmetih kulturne dediščine. Analizirali smo strukturo sodobnih nepoškodovanih, umetno staranih, okuženih, z žarki gama obsevanih ter naravno staranih (muzejskih) okuženih in neokuženih tekstilij.

Za analizo strukture celuloznih vlaken smo uporabili spektroskopske metode – infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy) in ramansko spektroskopijo, ki sta komplementarni metodi za analizo strukture materialov. Pri ramanski spektroskopiji vzorec obsevamo z monokromatsko svetlobo (laser) različnih valovnih dolžin (od 229 nm do 1064 nm), spekter pa dobimo na podlagi neelastičnega sipanja svetlobe, odbite od vzorca [7]. Ramanska spektroskopija poda osnovne informacije o skoletnih vibracijah makromolekul, ki so intenzivno ramansko aktivne, saj so dvolomne, medtem ko so stranske skupine pogosto polarizabilne in zato aktivne v infrardečem spektru. Zaradi svojih lastnosti poda ramanska spektroskopija informacije o polimeru (vibracije β -1,4-D-glukočnih vezi med glukoznimi molekulami) [8, 9].

Z ramansko spektroskopijo analiziramo površino vzorca. Za izvedbo analiz uporabljamo mikroskop, zato lahko analiziramo tudi zelo majhne vzorce, kar je še posebno pomembno v konservatorstvu-restavratorstvu, kjer smemo zaradi ohranjanja integritete predmetov pogosto odvzeti le mikroskopsko majhne vzorce (nekaj vlaken) [10], ali pod objektiv postavimo celoten predmet, če je ta dovolj majhen. FTIR je vibracijska spektroskopska metoda, pri kateri vzorec obsevamo z infrardečo (IR) svetlobo. Infrardeč spekter dobimo, ko molekule absorbirajo zanje značilne frekvence infrardeče svetlobe v izbranem valovnem območju.

Spektroskopijo FTIR lahko uporabimo kot nedestruktivno oziroma mikrodestruktivno metodo. Ena od IR nedestruktivnih metod je spektroskopija FTIR ATR (Attenuated Total Reflectance – oslabljen popoln odboj) [11]. Mikrodestruktivna IR metoda pa je metoda z uporabo IR mikroskopa in diamantne celice. Pri zadostni količini vzorca je najprimernejša metoda izdelava t. i. KBr tabletk, v katere

vključimo zmet oz. zdrobljen vzorec. Medtem ko je FTIR ATR površinska metoda, sta drugi dve presevni, torej dobimo podatke o strukturi celotne debeline vlakna. Obe predstavljeni vibracijski spektroskopski metodi omogočata proučevanje razgradnje celuloze, saj sta občutljivi na strukturne spremembe v materialih [12]. Z njima lahko razločujemo med kristalino in amorfno celulozo, torej bolj urejeno in manj urejeno razporeditvijo makromolekul znotraj (mikro)fibrilnih struktur. Lahko razločujemo tudi različne polimorfne oblike celuloz [13, 14], tako na kvalitativni kot tudi na kvantitativni ravni [14].

Namen pričujoče raziskave je bil ugotoviti uporabnost izbranih spektroskopskih metod za analizo strukturnih sprememb v celuloznih vlaknih ter oceniti stopnjo poškodovanosti celuloznih vlaken po okužbi z glivami.

Na podlagi rezultatov analize smo ugotavljali, kakšne strukturne spremembe nastajajo v celuloznih vlaknih zaradi vpliva staranja oziroma okužbe. Za analizo smo pripravili laboratorijske vzorce, katerih del smo umetno postarali, in muzejske vzorce.

2 Materiali in metode

2.1 Materiali

Analizirali smo vzorce bombaža in lanu sodobne izdelave. Izbrali smo nebeljen in neškrobljen bombaž, tkan v vezavi platno (44 niti/cm \times 31 niti/cm), ter neobdelan lan v vezavi panama (20 niti/cm \times 14 niti/cm). Vsako tkanino smo razrezali na kose, velike 2,5 cm \times 5 cm.

Velikost odvzetega vzorca z zgodovinskih predmetov je bila odvisna od lastnosti zgodovinskega predmeta – od nekaj vlaken do kosa tkanine v velikosti nekaj kvadratnih centimetrov. Vzorce smo odvezemali čim bližje z glivami okuženi površini zgodovinskega predmeta in pri tem pazili, da nismo spreminjali videza predmeta. V tabeli 1 je predstavljen seznam analiziranih zgodovinskih predmetov z oznakami.

Tabela 1: Seznam muzejskih vzorcev z oznakami in opisom predmeta

| Oznaka vzorca | Opis predmeta | Vir predmeta |
|---------------|--|--|
| MKS01 | kip Marije s tekstilnim oblačilom | Muzej krščanstva na Slovenskem, Stična (MKS) |
| NGS01 | slika na platnu Za klavirjem (Rihard Jakopič) | Narodna galerija (NG) |
| PMP01 | spodnje krilo | Pokrajinski muzej Ptuj Ormož (PMP) |
| PMP05 | usnjen pas s tekstilno podlogo | |
| RCS01 | slika na platnu, XIV. postaja križevega pota – originalno platno | Zavod za varstvo kulturne dediščine Slovenije, Restavratorski center (RCS) |
| RCS02 | slika na platnu Jezus ozdravi vodeničnega moža – originalno platno | |
| RCS05 | slika na platnu Sveti Frančišek – originalno platno | |
| RCS07 | slika na platnu Sv. Nikolaj – originalno platno | |
| RCS10 | slika na platnu Smrt Marije – podlepljeno platno | |

2.2 Priprava laboratorijskih vzorcev

2.2.1 Umetno staranje

Polovico vzorcev sodobnih tekstilij, našitih na papirju Whatman, smo umetno starali v komori Climatic chamber (Vötsch Climatic chamber, Type VC 0020). Vzorce smo starali pri 80 °C in pri 65-odstotni vlagi dvakrat, prvič 13 dni in drugič 12 dni.

2.2.2 Inokulacija z glivami in inkubacija

Nestarane in umetno starane vzorce smo inokulirali s šestimi vrstami gliv (*Aspergillus clavatus* (EXF-5895), *Cladosporium cladosporoides* (EXF-5883), *Fomes fomentarius* (EXF-5903), *Hypoxylon fragiforme* (EXF-5882), *Penicillium chrysogenum* (EXF-5913) in *P. corylophilum* (EXF-5897)). Glive, uporabljene za inokulacijo, smo izolirali z muzejskih predmetov v različnih slovenskih muzejih (tabela 2). Poševnike z razraščeni izbranimi glivami smo prelili s 5 ml fiziološke raztopine (9 % w/v NaCl) ter z mehanskim delovanjem s cepilno zanko odluščili spore in fragmente hif ter dolili vodo, tako da smo dobili skupaj 20 ml suspenzije. Po dva predhodno avtoklavirana preizkušanca vsakega vzorca smo položili v odprto manjšo petrijevko in ju inokulirali z 250 µl suspenzije. Manjšo petrijevko smo položili v vlažilno komoro (večja zaprta petrijevka), v katero smo položili s 500 µl sterilne destilirane vode navla-

žen steriliziran pivnik. Vzorce smo inkubirali v komori pri 25 °C. Po 12 dneh smo pivnike namočili z dodatnim 1 ml sterilne destilirane vode. Polovico vzorcev smo inkubirali osem tednov, drugo polovico pa 20 tednov. Ob koncu inkubacije smo vse vzorce avtoklavirali v pari 10 min pri 104 °C, pred tem pa preverili, da avtoklaviranje ne vpliva na strukturo vlaken laboratorijskih vzorcev.

2.2.3 Obsevanje z žarki gama

Avtoklaviranje za sterilizacijo muzejskih predmetov ni primerna metoda, saj bi vlaga in visoka temperatura lahko poškodovali strukturo ali spremenili vizualno podobo. Zato smo del laboratorijskih vzorcev sterilizirali z žarki gama, ki se ponekod že uporabljajo za sterilizacijo in dezinfekcijo predmetov kulturne dediščine [16]. Sterilizacijo z žarki gama smo izvedli na neavtoklaviranih vzorcih, tako nestaranih kot tudi staranih, ki so bili 20 tednov okuženi z glivami. Z žarki gama smo vzorce obsevali v Zagrebu, na Inštitutu Ruđer Bošković, kjer že imajo izkušnje z obsevanjem predmetov kulturne dediščine [16]. Obsevanje smo opravili v večnamenskem prostoru s panoramičnim virom gama ⁶⁰Co, v katerem je 24 palic, napolnjenih s ⁶⁰Co in zloženih v cilindrično obliko. Vzorce smo obsevali zaprte v plastičnih petrijevkah, po šest hkrati. Uporabili smo dve različni dozi – 5 kGy, ki je med

Tabela 2: Seznam oznak vzorcev in primer poimenovanja vzorca

| Vrsta tekstila | |
|-----------------------------|---|
| CO | Bombaž |
| LI | Lan |
| Pospešeno (umetno) staranje | |
| n | Nestaran |
| s | Staran |
| Okužba | |
| 5882 | Hypoxylon fragiforme |
| 5883 | Cladosporium cladosporoides |
| 5895 | Aspergillus clavatus |
| 5897 | Penicillium corylophilum |
| 5903 | Fomes fomentarius |
| 5913 | Penicillium chrysogenum |
| K | Kontrolni neokužen vzorec |
| N | Referenčni neokužen vzorec, ki ni bil inkubiran |
| Zaporedne oznake vzorcev | |
| _1 | Vzorec, inokuliran 8 tednov in avtoklaviran |
| _2 | Vzorec, inokuliran 20 tednov in avtoklaviran |
| _22 | Vzorec, inokuliran 20 tednov in obsevan z žarki gama doze 5 kGy |
| _21 | Vzorec, inokuliran 20 tednov in obsevan z žarki gama doze 10 kGy |
| Primer | |
| CO _n 5903_22 | bombaž, nestaran, okužen s Fomes fomentarius, inokuliran 20 tednov, obsevan z žarki gama z dozo 5 kGy |

najmanjšimi dozami, po literaturi [16] še dovolj učinkovitimi za dezinfekcijo, in 10 kGy, ki je med večjimi dozami, ki jih lahko še uporabimo, da se vlakna preveč ne poškodujejo [17][18]. Dozi 5 kGy je ustrežal čas 1360 s (22,67 min) in dozi 10 kGy 2710 s (45,17 min).

2.3 Metode za analizo strukture vzorcev

2.3.1 Ramanska spektroskopija

Ramanske spektre smo posneli na disperznem ramanskem spektrometru LabSpec HR 800 (Horiba Jobin-Yvon) z zračno hlajenim detektorjem CCD (*Charge Coupled Device*). Za analizo smo uporabili diodni laser v bližnjem infrardečem območju (NIR – *near infrared*) z valovno dolžino 785 nm. Vse vzorce smo posneli pod mikroskopom pri 10-kratni

povečavi, v valovnem območju od 100 cm⁻¹ do 2000 cm⁻¹, pri odprtini 1000 μm in uklonski mrežici 600 g/mm. Uporabili smo dva različna filtra: filter, ki prepušča polovico energije (D0'3), in takega, ki prepušča le četrtino energije (D0'6). Čas snemanja je variiral med 50 s in 300 s, čas dušenja (*drench quenching*) pa od nekaj minut do nekaj ur. Tako uporaba filtra kot tudi določitev časa snemanja in časa dušenja je bila odvisna od značilnosti vzorca in smo ju sproti prilagajali glede na dobljene spektre tako, da smo dobili čim manjšo luminiscenco in čim izrazitejše absorpcijske trakove. Vzorce za analizo smo položili na objektna stekla, oblečena z aluminijevo folijo. Analizirali smo neokužene in okužene celulozne vzorce. Z žarki gama obsevanih vzorcev zaradi močne luminiscence nismo analizirali z ramsko spektroskopijo.

2.3.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR)

Spektre laboratorijsko pripravljenih vzorcev smo z metodo FTIR ATR posneli na spektrometru FTIR Spectrum 100 (PerkinElmer) v območju 4000 cm^{-1} do 675 cm^{-1} . Vsak dobljeni spekter je povprečje 32 spektrov, posnetih pri ločljivosti 4 cm^{-1} . Pritisk na tkanino v preiskani točki je bil odvisen od lastnosti tkanine, vedno pa je bil največji, ki ga je vzorec še dopuščal. Vsak kos tkanine smo preiskali v petih različno intenzivno okuženih točkah na obeh ploskvah tkanine.

Analizo FTIR muzejskih vzorcev smo zaradi majhne količine vzorca izvedli z mikroskopom Spectrum Spotlight 200 (PerkinElmer), povezanim s spektrometrom FTIR Spektrum 100 (PerkinElmer). Nekaj vlaken posameznega vzorca smo stisnili med dve ploskvi diamantne celice, nato pa stisnjena vlakna preiskali v odprti diamantni celici, da smo tako povečali energijo, ki prehaja skozi celico. Tako se območje pri nizkih valovnih številih ni zmanjšalo in ni nastal šum [19]. Vsako posamezno vlakno smo preiskali na območju, velikem 20 μm x 20 μm . Spektre smo posneli v območju valovnih števil od 4000 cm^{-1} do 600 cm^{-1} pri ločljivosti 4 cm^{-1} . Vsak dobljeni spekter je povprečje 64 spektrov.

3 Rezultati z razpravo

Neokužene, okužene ter okužene in obsevane laboratorijske vzorce ter muzejske vzorce smo analizirali z obema spektroskopskima metodama. Pri ramanskih spektrih, predvsem lanenih vlaken, delno pa tudi intenzivneje okuženih bombažnih vlaken, je nastala luminiscenca, ki je poslabšala kakovost spektrov z nastankom izrazitega brezobličnega ozadja, tako da so bili občasno vidni le najintenzivnejši absorpcijski trakovi. Luminiscenca je lahko posledica prisotnosti nečistoč (manj verjetno), glavni ali produktov razgradnje vlaken na površini tekstilij [20]. Intenziteto luminiscenčnega ozadja smo zmanjšali z dušenjem (*drench quenching*), pri čemer smo vzorec pustili daljši čas (nekaj minut do nekaj ur) obsevan z laserskim žarkom, ki smo mu s filtrom zmanjšali energijo. Pri tem naj bi prišlo do fotorazgradnje artefaktov [21]. S to metodo se je izboljšala kakovost spektrov in nekateri manj intenzivni absorpcijski trakovi so postali vidni.

Pri analizah sprememb strukture smo opazovali obliko FTIR in ramanskih spektrov, pozicije vrhov in njihovo intenziteto glede na lokalno bazno linijo. Pozicije vrhov absorpcijskih trakov za ramanske spektre so navedene v tabeli 3, za infrardeče spektre pa v tabeli 4.

Tabela 3: Lega trakov, vrste vibracij za trakove celuloze v ramanskih spektrih skupaj z viri, ki opisujejo navedene trakove

| Ramanski premik [cm^{-1}] | Vrsta vibracije | Vir |
|--------------------------------------|--|------|
| 1380 | CH_2 upogibanje in skeletne vibracije | [8] |
| 1335 | vibracije CH_2 | [20] |
| 1120 | simetrično nihanje glikozidnih vezi | [9] |
| 1096 | asimetrično nihanje glikozidnih vezi | [22] |
| 1057 | vibracije CO sekundarnih alkoholov | [20] |
| 1034 | vibracije CO primarnih alkoholov | [20] |
| 520 | CCC nihanje obroča in glikozidne vezi | [10] |
| 458 | CCC in CCO vibracije glukoznih obročev | [10] |
| 435 | CCC in CCO vibracije glukoznih obročev | [10] |
| 380 | CCC vibracije glukoznega obroča | [9] |
| 345 | nihanje CCC vezi v glukoznih obročih | [9] |

Tabela 4: Lega in vrsta vibracije za trakove celuloze v spektrih FTIR skupaj z viri, ki opisujejo navedene trakove

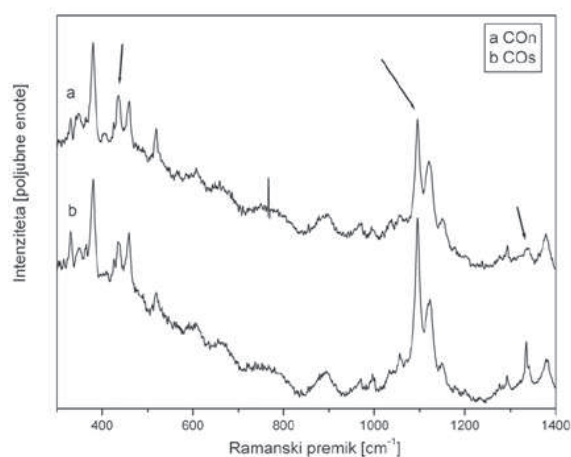
| Valovno število [cm^{-1}] | Vrsta vibracije | Vir |
|--------------------------------------|--|------|
| 2900 | vezi CH in CH_2 alifatskih metilenskih skupin | [11] |
| 1710-1745 | nihanje karbonilnih vezi | [12] |
| 1698 | vibracije skupin $-\text{CHO}$ | [23] |
| 1510 | lignin | [12] |
| 1430 | vibracije CH_2 ; upogibanje HCH in OCH v ravnini; vibracije medmolekulskih vodikovih vezi | [14] |
| 1372 | vibracije COH in HCC celuloze in hemiceluloz | [3] |
| 1335 | vibracije OH in CH_2 | [11] |
| 1316 | vibracije COH in HCC | [3] |
| 1280 | vibracije CH in OH | [14] |
| 1160 | antisimetrične vibracije vezi COC | [14] |
| 1111 | asimetrične vibracije glikozidnih obročev | [14] |
| 900 | vibracije COC glikozidnih vezi | [14] |

3.1 Bombaž

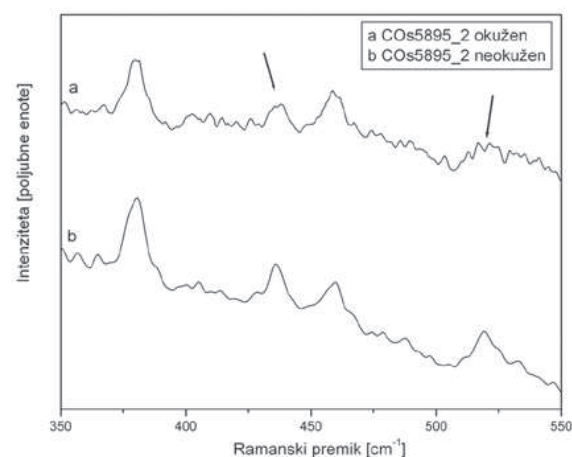
Pri umetnem staranju se je struktura bombaža spremenila, kar smo v ramanskih spektrih opazili kot znižanje absorpcijskega traku pri 435 cm^{-1} ter zvišanje absorpcijskih trakov pri 1096 cm^{-1} in 1335 cm^{-1} (slika 1). Te spremembe so posledica zmanjšanja kristalnosti, razgradnje skeletne strukture ali povečanja deleža OH vezi [9, 10, 22]. Nastale so pri hidrolizi in oksidaciji ter prekinjanju medmolekul-

skih povezav, ki sta jih sprožili povišana temperatura in vlažnost v komori za umetno staranje. Podobne spremembe kot pri umetnem staranju so nastale tudi v nestaranih vzorcih, okuženih z glivami. Sklepamo, da so glive podobno vplivale na strukturo celuloze kot povišana temperatura in relativna vlažnost pri umetnem staranju.

Analiza rezultatov vseh meritev pokaže, da so izrazitejšje spremembe strukture vlaken nastale v vzorcih,



Slika 1: Ramanska spektra (a) referenčnega nestarane in (b) staranega bombažnega vzorca. Oznaceni so trakovi (z leve) pri 435 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} in 1335 cm^{-1} .

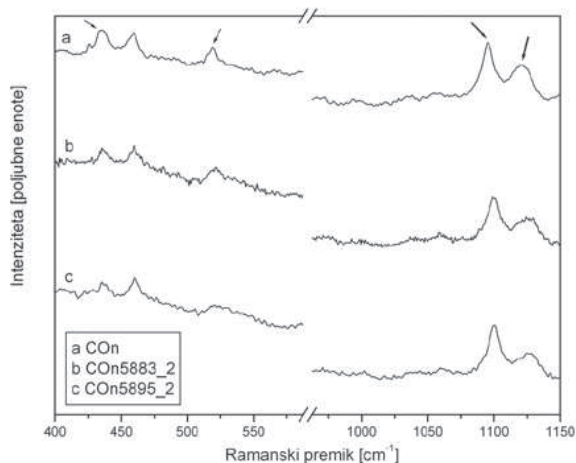


Slika 2: Ramanska spektra (a) okuženega in (b) neokuženega mesta staranega vzorca, okuženega z *A. clavatus* v območju od 350 cm^{-1} do 550 cm^{-1} . Oznacena sta trakova (z leve) 435 cm^{-1} in 520 cm^{-1} , katerih intenziteta se je pri biorazgradnji zmanjšala.

ki so bili inkubirani daljši čas (20 tednov). Čeprav naj bi umetno staranje olajšalo prodiranje encimov v notranjost vlaken [5, 6], pa po osmih tednih okužbe v staranih vzorcih, okuženih s *H. fragiforme*, *P. chrysogenum* in *P. corylophilum*, nismo opazili sprememb pri vibracijah funkcionalnih skupin, ki bi bile vidne na spektrih FTIR. Spremenile so se le skeletne vibracije, aktivne v ramanskih spektrih, kar kaže predvsem na spremembe na medmolekulski urejenosti vlaken. Okužba z glivami je delovala lokalno, kajti spremembe strukture so bile izrazitejšje v neposredni bližini hif, kot je razvidno iz ramanskih spektrov staranih vzorcev, okuženih z *A. clavatus*, kjer se je v bolj poškodovani točki zmanjšala intenziteta absorpcijskega traku pri 345 cm^{-1} (slika 2).

Glavna procesa, ki sta potekla v bombažnih vlaknih, sta bila depolimerizacija in zmanjšanje urejenosti nadmolekulske strukture. Razgradnja skeletne verige (depolimerizacija) je opazna kot znižanje absorpcijskih trakov v ramanskih spektrih pri 520 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} in 1380 cm^{-1} (za določitev vrste vibracije gl. tabelo 3). Najintenzivnejše znižanje stopnje polimerizacije smo glede na obliko ramanskih spektrov opazili v staranih in nestaranih vzorcih, okuženih s *C. cladosporoides*, ter v nestaranih vzorcih, okuženih z *A. clavatus* (slika 3).

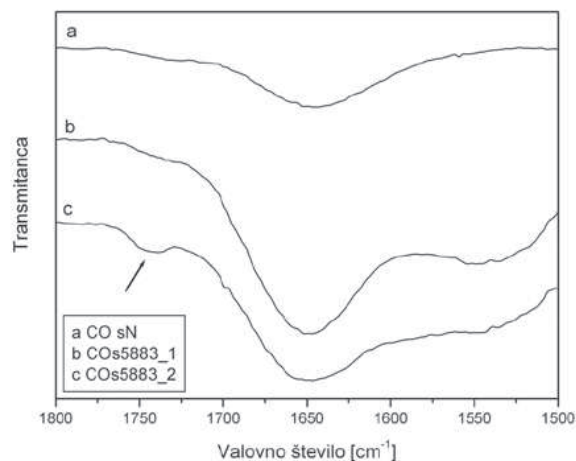
Urejenost strukture se je izrazito poslabšala tudi pri vzorcih, okuženih s *Hypoxylon fragiforme* in *Penicillium corylophilum*, zaradi česar se je zmanjšal absorpcijski trak pri 435 cm^{-1} (podobno kot pri bolj



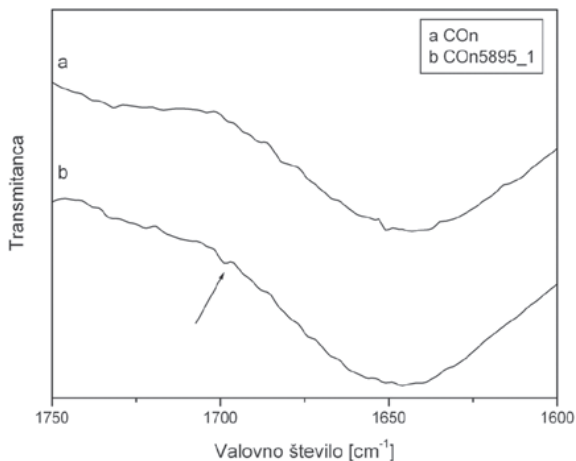
Slika 3: Ramanski spektri (a) referenčnega nestaranelega vzorca, (b) nestaranelega vzorca, okuženega s *C. cladosporoides*, in (c) nestaranelega vzorca, okuženega z *A. clavatus*. Označeni so absorpcijski trakovi pri 435 cm^{-1} , 520 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} in 1120 cm^{-1} .

degradiranem vzorcu, okuženem z *A. clavatus* (slika 2)). Pri primerjavi ramanskih spektrov staranih neokuženih vzorcev in nestaranih vzorcev, okuženih s *P. corylophilum*, smo ugotovili, da nekatere glive po krajšem času okužbe povzročijo enake spremembe skeletne strukture kot proces staranja.

Da je prišlo do depolimerizacije, je razvidno tudi iz spektrov vzorcev FTIR, okuženih s *C. cladosporoides*, kjer je nastal absorpcijski trak za vibracije karbonilnih vezi (slika 4), ki so nastale na koncih

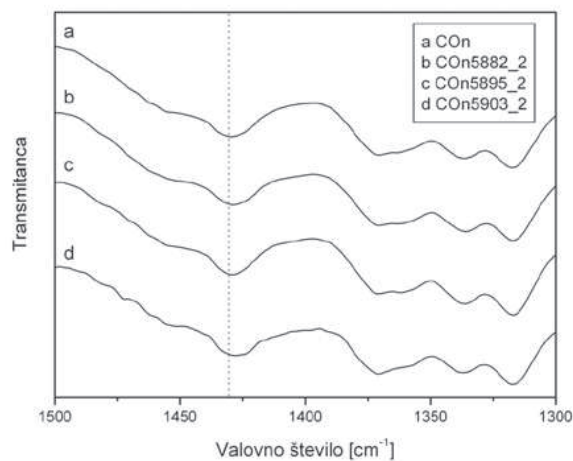


Slika 4: Spektri FTIR ATR v območju karbonilnega traku v (a) referenčnem vzorcu ter v staranih vzorcih, okuženih s *C. cladosporoides*, po (b) osmih in (c) 20 tednih okužbe ter po obsevanju z žarki gama doz (d) 5 kGy in (e) 10 kGy .



Slika 5: Spektre FTIR ATR (a) nestaranelega referenčnega vzorca in (b) nestaranelega vzorca, okuženega z *A. clavatus*. Puščica označuje absorpcijski trak pri 1698 cm^{-1} , ki je značilen za vibracije aldehidnih skupin.

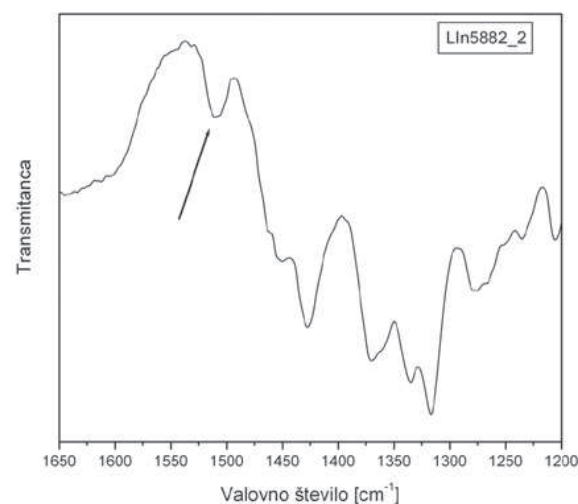
depolymeriziranih verig [12]. Hidroliza in oksidacija ogljikovih atomov glukopiranoznega obroča vodita v depolymerizacijo in nastanek karbonilnih skupin na prekinjenih koncih makromolekul, kjer vodi prva predvsem v nastanek aldehydskih skupin in druga v nastanek karbonilnih skupin [4]. Intenziteta karbonilnega traku na spektrih FTIR se je v večini vzorcev s podaljševanjem časa inkubacije povečala, kar je posledica povečanja števila prekinjenih celuloznih makromolekul. V staranem vzorcu, okuženem s *C. cladosporoides*, se je pozicija karbonilnega traku po 20 tednih inkubacije premaknila k višjim valovnim številom, kar je posledica povečanja števila vodikovih vezi zaradi hidrolitske razgradnje [4]. V vzorcu, okuženem z *A. clavatus*, je depolymerizacija povzročila nastanek aldehydskih skupin, ki so v spektru vidne kot absorpcijski trak pri 1698 cm^{-1} (slika 5) [23] (za določitev vrste vibracije gl. tabelo 4). Torej je gliva *A. clavatus* povzročila predvsem hidrolizo celuloze, medtem ko so bili vplivi drugih gliv tudi oksidativni. Zmanjšanje kristalnosti smo opazili tudi na podlagi razlik v spektrih FTIR nestaranih vzorcev, okuženih z *A. clavatus* in *C. cladosporoides*, kjer se je absorpcijski trak pri 1430 cm^{-1} kot posledica spremembe vibracij v območju atoma C_6 [24] pomaknil k nižjim valovnim številom (slika 6). Obsevanje z žarki gama ni povzročilo sprememb v strukturi bombažnih vlaken, ki bi bile vidne s FTIR oziroma ramansko spektroskopijo.



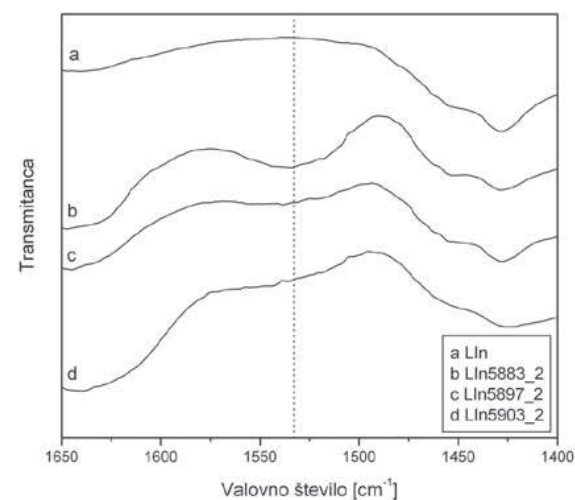
Slika 6: Spektri FTIR ATR (a) referenčnega vzorca, (b) nestarane vzorca, okužena 20 tednov s *H. fragiforme*, (c) nestarane vzorca, okužena 20 tednov z *A. clavatus*, in (d) nestarane vzorca, okužena 20 tednov s *F. fomentarius*. Označen je trak pri 1430 cm^{-1} , ki je v okuženih vzorcih pomaknjen k nižjim valovnim številom.

3.2 Lan

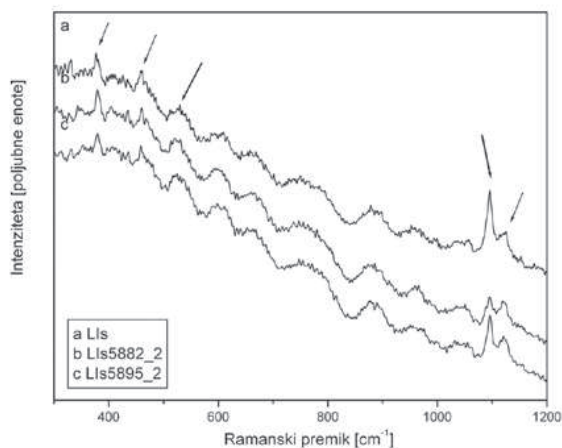
Na podlagi rezultatov analize FTIR ATR lanenih vlaken smo opazili absorpcijske trakove, značilne za vibracijo lignina (slika 7). Na intenzivne okuženih mestih smo opazili amidni II absorpcijski trak, ki je v analiziranih točkah lahko nastal zaradi prisotnosti gliv na površini vlaken kot posledica prisotnosti hitina v ovojnici hif ali proteinov v notranjosti hif [25, 26] (slika 8).



Slika 7: Spekter FTIR vzorca, okuženega s *H. fragiforme*, označen je absorpcijski trak v območju nihanja aromatskih spojin lignina



Slika 8: Spektri FTIR (a) referenčnega nestarane vzorca lanu, (b) nestarane vzorca lanu, okužena s *C. cladosporoides*, (c) nestarane vzorca lanu, okužena s *P. corylophilum*, in (d) nestarane vzorca lanu, okužena s *F. fomentarius*, v območju amidnih vibracij, ki kažejo na prisotnost gliv v analiziranem območju

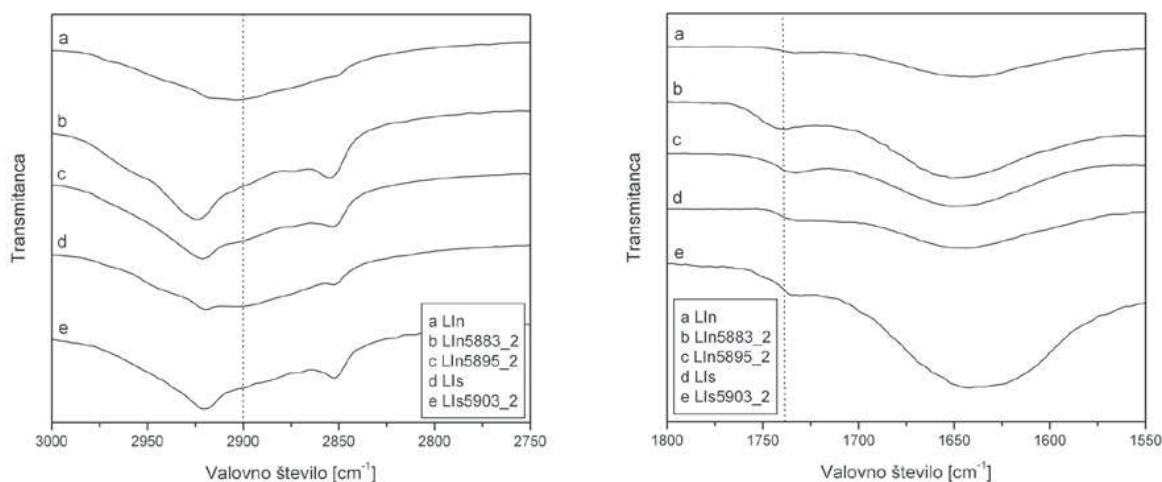


Slika 9: Ramanski spektri staranih lanenih vzorcev: (a) referenčni vzorec, (b) vzorec, okužen s *H. fragiforme*, in (c) vzorec, okužen s *A. clavatus*. Označeni so absorpcijski trakovi (z leve) pri 345 cm^{-1} , 435 cm^{-1} , 520 cm^{-1} ter 1096 cm^{-1} in 1122 cm^{-1}

Struktura lanenih vlaken se je spremenila že po osmih tednih inkubacije v vseh nestaranih vzorcih, razen v vzorcih, okuženih s *P. corylophilum*, ter v staranih vzorcih, okuženih z *A. clavatus* in *H. fragiforme* (slika 9). Zaradi okužbe se je spremenila nadmolekulska struktura celuloze. Proces je bil omejen predvsem na neposredno okolico gliv. Sprememba nadmolekulske strukture je v ramanskih spektrih vidna kot zmanjšanje intenzitet trakov pri 345 cm^{-1} , 435 cm^{-1} , 520 cm^{-1} ter 1096 cm^{-1} in 1122 cm^{-1} . Po 20 tednih inkubacije se je dodatno spreminjala

skeletna struktura nestaranih vzorcev, okuženih s *H. Fragiforme*, in staranih vzorcev okuženih s *P. corylophilum*.

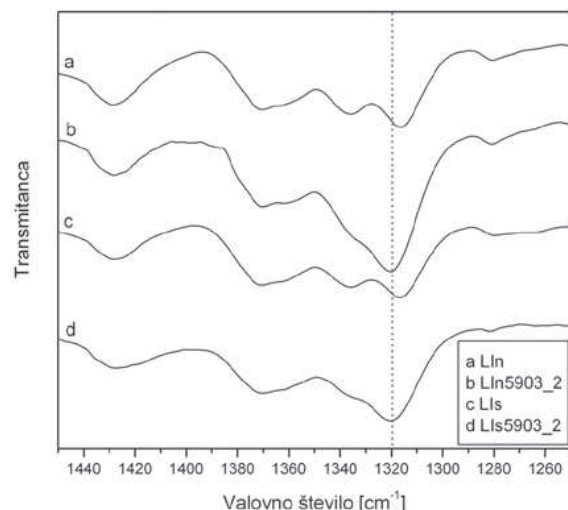
Zaradi depolimerizacije celuloznih makromolekul so tudi v lanenih vlaknih, podobno kot v bombažnih, nastale karbonilne skupine. Posledica njihovega nastanka je bil nastanek karbonilnega traku, vidnega v spektrih FTIR ATR (slika 10 desno). Absorpcijski trak, značilen za karbonilne vibracije, je nastal že na spektrih neokuženih staranih vzorcev. Sklepamo lahko, da je že samo staranje povzročilo depolimerizacijo celuloznih makromolekul. Zaradi povečanja števila vodikovih vezi se je karbonilni trak v staranih vzorcih, okuženih s *P. corylophilum*, zamaknil k 1750 cm^{-1} [4]. Intenziteta karbonilnega traku se je po obsevanju z žarki gama zmanjšala, izjema so starani vzorci, okuženi z *A. clavatus* in *P. chrysogenum*, kjer se je njena intenziteta povečala, kar pripisujemo nadaljevanju depolimerizacije. Hkrati z nastankom karbonilnega traku so se spremenili tudi absorpcijski trakovi v območju 2900 cm^{-1} , značilni za vibracije CH in CH_2 (slika 10 levo). Namesto enega traku pri 2900 cm^{-1} značilnega za vibracije CH_2 , sta nastala dva vrhova pri 2922 cm^{-1} in 2854 cm^{-1} , značilna za vibracije CH [27]. Sprememba je povezana z nastankom karbonilnega traku, torej z nastankom razgradnih produktov celuloze. Posledica zmanjševanja urejenosti strukture se v spektrih FTIR kaže kot združevanje absorpcijskih trakov pri 1335 cm^{-1} in 1318 cm^{-1} v enoten dokaj izrazit trak pri 1320 cm^{-1} , kar je posledica povečanega



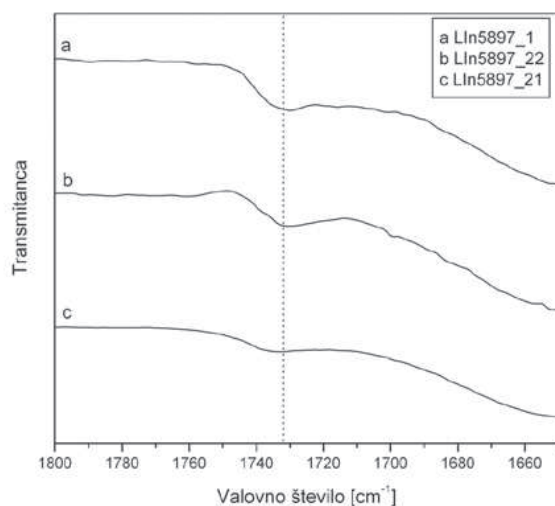
Slika 10: Spektri FTIR ATR (a) nestaranege neokuženega vzorca, (b) nestaranege vzorca, okuženega s *H. fragiforme*, (c) nestaranege vzorca, okuženega z *A. clavatus*, (d) staranege neokuženega vzorca in (e) staranege vzorca, okuženega s *F. fomentarius* v območju nihanja vezi CH (levo) in karbonilnih vezi (desno)

deleža OH-vezi po hidrolizi [24, 28]. To se je zgodilo v spektrih nestaranih in staranih vzorcev, okuženih s *F. fomentarius* (slika 11).

Sevanje gama je na strukturo lanenih vzorcev vplivalo bolj kot na strukturo bombažnih vzorcev. V



Slika 11: Spektri FTIR (a) neokuženega nestarane- ga vzorca, (b) nestarane- ga vzorca, okuženega s *F. fomentarius*, (c) neokuženega starane- ga vzorca ter (d) starane- ga vzorca, okuženega s *F. fomentarius*, kjer je v okuženih vzorcih vidno združevanje dveh absorpcijskih trakov v trak z vrhom pri 1320 cm^{-1} .



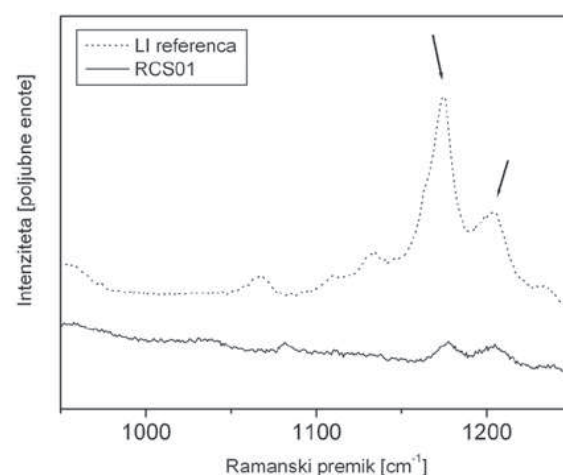
Slika 12: Spektri FTIR nestarane- ga lanene- ga vzorca, okuženega s *P. corylophilum*: (a) po 20 tednih okužbe, (b) po 20 tednih okužbe in obsevanju z žarki gama doze 5 kGy ter (c) po 20 tednih okužbe in obsevanju z žarki gama doze 10 kGy v območju nihanja karbonilnih vezi. V spektru (c) je viden zamik vrha karbonilnega traku k višjim valovnim številom.

nestaranih vlaknih se je intenziteta karbonilne- ga traku na spektrih FTIR zmanjšala. Zaradi spremembe strukture medmolekulskih povezav po obsevanju z žarki gama se je vrh karbonilnega traku v nestaranih vzorcih, okuženih s *P. corylophilum*, zamaknil k nižjim valovnim številom (slika 12), kar pomeni, da se je delež medmolekulskih povezav povečal. V nestaranih vzorcih, okuženih s *C. clado- sporoides*, pa se je vrh zamaknil k nižjim valovnim številom, saj se je zmanjšal delež medmolekulskih povezav.

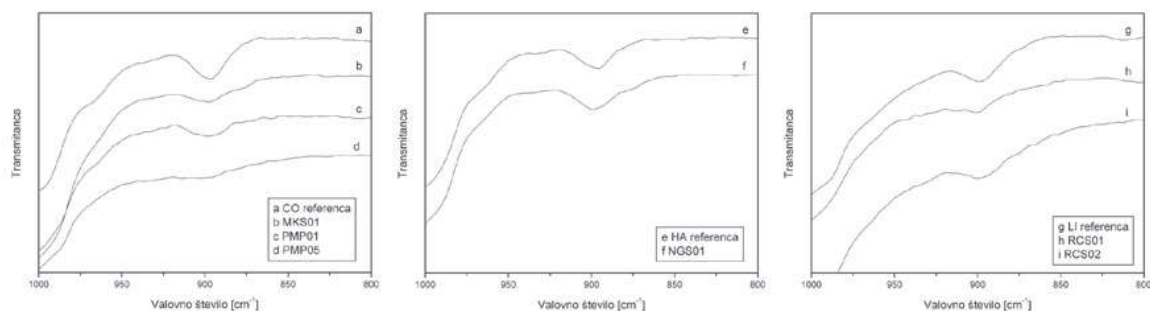
3.3 Vzorci iz muzejev

Pri ramanski analizi je bilo luminiscenčno ozadje vzorcev muzejskih predmetov intenzivnejše kot pri analizi laboratorijskih vzorcev. Predvidevamo, da je to posledica poškodovanosti vlaken in nečistoč na njihovi površini. Spektri bombaža, ki vsebuje manj neceluloznih komponent, so imeli manj izrazito luminiscenčno ozadje. Z metodo dušenja nam je uspelo v nekaterih spektrih luminiscenčno ozadje toliko znižati, da smo lahko analizirali najintenzivnejše absorpcijske trakove, predvsem trakova pri 1096 cm^{-1} in 1122 cm^{-1} . Pri vzorcu tkanine s slike RCS01 (tabela 1) sta bila oba trakova približno enako visoka (slika 13) [29]. To je posledica izrazite okužbe in posledične spremembe nadmolekulske strukture [11, 22], saj je bil hrbet slike vidno preraščen s slojem plesni.

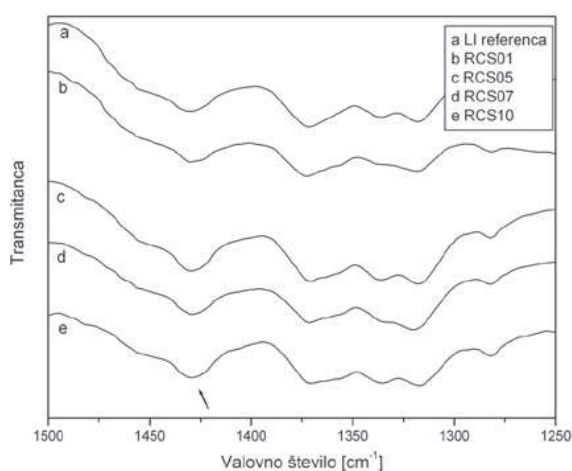
Spektri FTIR okuženih in tudi neokuženih zgodovinskih vzorcev so, drugače kot pri laboratorijskih



Slika 13: Ramanska spektra vzorca RCS01 (neprekinjena črta) in referenčnega vzorca (črtkana črta) lanu v območju nihanja glikozidnih obročev. Oznaka sta trakova (z leve) pri 1096 cm^{-1} in 1122 cm^{-1} .



Slika 14: Spektri FTIR, posneti z mikroskopom v diamantni celici v območju traku pri 900 cm^{-1} . Levo: (a) referenčnega vzorca bombaža, (b) MKS01, (c) PMP01 in (d) PMP05. Na sredini: (e) referenčnega vzorca konoplje in (f) NGS01. Desno: (g) referenčnega vzorca lanu, (h) RCS01 in (i) RCS02.



Slika 15: Spektri FTIR (a) referenčnega vzorca lanu ter vzorcev (b) RCS01, (c) RCS05, (d) RCS07 in (e) RCS10, posnetih z mikroskopom v diamantni celici v območju vibracij, značilnih za kristalino celulozo. Označen je absorpcijski trak pri 1430 cm^{-1} .

vzorcih, pokazali povečanje kristalnosti strukture, ki se je kazalo kot zmanjšanje intenzitete traku pri 900 cm^{-1} (slika 14). Sprememba je nastala tako pri bombažnih kot tudi pri lanenih in konopljinih vzorcih. V drugih vzorcih je znižanje traku pri 1430 cm^{-1} ter njegov zamik k nižjim valovnim številom (slika 15) pomenilo, da se je urejenost strukture zmanjšala. Pri muzejskih vzorcih nismo opazili neposredne povezave med okužbo in spremembo strukture [30]. Glive in drugi zunanji dejavniki, ki vplivajo na vlakna med staranjem, imajo podobne vplive, to je odvisno od pogojev, katerim so bili predmeti izpostavljeni.

4 Sklep

Na podlagi analize FTIR in ramanske analize z glivami okuženih bombažnih in lanenih tekstilij ugotavljamo, da sta metodi primerni za analizo strukturnih sprememb v celuloznih vlaknih. Metodi sta komplementarni in se dopolnjujeta, zato je uporaba obeh metod v okviru posamezne analize smiselna. Na podlagi rezultatov, dobljenih z izbranimi spektroskopskima metodama, smo ugotavljali, kakšen vpliv imajo umetno staranje in različne vrste gliv na molekulsko in nadmolekulsko strukturo celuloznih vlaken. Glive, ki spadajo med najintenzivnejše razkrojevalce organskih snovi, povzročijo že po relativno kratkem času delovanja spremembe strukture, tako na nadmolekulski ravni (skeletalne vibracije), kot tudi na molekularni ravni (vibracije funkcionalnih skupin). Spremembe strukture se pričnejo hitreje pri nestaranih vzorcih, medtem ko se pri staranih vzorcih proces začne pozneje, a je dolgoročno intenzivnejši. Zaradi vpliva gliv prihaja do depolimerizacije celuloznih makromolekul in v veliki meri do zmanjševanja urejenosti nadmolekulske strukture. S podaljševanjem časa aktivne okužbe nastajajo intenzivnejše spremembe. Spremembe strukture na nadmolekulski ravni povzroči tudi obsevanje z žarki gama, predvsem pri lanenih vlaknih. Po drugi strani pa manjša doza sevanja gama prekinja razgradnjo (sterilizacija).

Zahvale

Operacijo delno financira Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, 1. razvojne prioritete:

Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti, prednostne usmeritve 1.1.: Strokovnjaki in raziskovalci za konkurenčnost podjetij. Raziskava je delno potekala tudi v okviru dela programske skupine P2-0213, ki jo financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

Zahvaljujemo se ustanovam, ki so omogočile analizo predmetov (Restavratorski center Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije, Narodna galerija, Muzej krščanstva na Slovenskem in Pokrajinski muzej Ptuj).

5 Literatura

1. CANEVA, G., NEGRI, M. P. in SALVADORI, O. La biologia vegetale per i beni culturali. Vol. I, Biodeterioramento e conservazione. Firenze : Nardini Editore, 2005, 396 str.
2. SZOSTAK-KOTOWA, J. Biodeterioration of textiles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, vol. 53, pp. 165–170.
3. PRONIEWICZ, L. M., PALUSKIEWICZ, C., WESELUCHA-BIRCZYŃSKA, A., BERAŃSKI, A. in KONIECZNA, A. FTIR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose. *Journal of Molecular Structure*, 2001, vol. 596, pp. 163–169.
4. ŁOJEWSKA, J., LUBAŃSKA, A., MIŚKOWIEC, P., ŁOJEWSKI, T. in PRONIEWICZ, L. M. FTIR in situ transmission studies on the kinetics of paper degradation via hydrolytic and oxidative reaction paths. *Applied Physics A*, 2006, vol. 83, pp. 597–603.
5. ZOTTI, M., FERRONI, A. in CALVINI, P. Mycological and FTIR analysis of biotic foxing on paper substrates. *ITOG, 2010* [dostopno na daljavo] [citirano 8. 4. 2010]. Dostopno na svetovnem spletu: < www.itog-ve.org/contenuto/foxing/pagine/E_Cont03.htm>.
6. VALENTIN, N. Microbial contamination in museum collections : organic materials. V *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Uredil C. Saiz-Jimenez. Lisse : Balkema, 2003, str. 85–91.
7. BICCHIERI, M., NARDONE, M. in SOSO, A. Applications of Raman spectroscopy to library heritage. *Annali di Chimica*, 2001, vol. 91, pp. 693–700.
8. CAO, Y., SHEN, D., LU, Y. in HUANG, Y. A Raman-scattering study on the net orientation of biomacromolecules in the outer epidermal walls of mature wheat stems (*Triticum aestivum*). *Annals of Botany*, 2006, vol. 97, (6), pp. 1091–1094.
9. EDWARDS, H. G. M., FARWELL, D. W. in WEBSTER, D. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. *Spectrochimica Acta Part A*, 1997, vol. 53, pp. 2383–2392.
10. PETROU, M., EDWARDS, H. G. M., JANAWAY, R. C., THOMPSON, G. B. in WILSON, A. S. Fourier-transform Raman spectroscopic study of a Neolithic waterlogged wood assemblage. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, vol. 395, pp. 2131–2138.
11. CAO, Q., ZHU, S., PAN, N., ZHU, Y. in TU, H. Characterization of archaeological cotton (*G. herbaceum*) fibers from Yingpan. *Technical Briefs in Historic Archaeology*, 2009, vol. 4, pp. 18–28.
12. ŁOJEWSKA, J., MIŚKOWIEC, P., ŁOJEWSKI, T. in PRONIEWICZ, L. M. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation : In situ FTIR approach. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, vol. 88, pp. 512–520.
13. WILEY, J. H. *Raman spectra of celluloses : doctor's dissertation*. Appleton, 1986, 198 str.
14. OH, Y. S., YOO, D. I., SHIN, Y. in SEO, G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research*, 2005, vol. 340, pp. 417–428.
15. KATUŠIN-RAŽEM, B., RAŽEM, D. in BRAUN, M. Irradiation treatment for the protection and conservation of cultural heritage artefacts in Croatia. *Radiation Physics and Chemistry*, 2009, vol. 78, pp. 729–731.
16. HANUS, J. Gamma radiation for use in archives and libraries. *Abbey Newsletter* [dostopno na daljavo], 1985, vol. 9, no. 2 [citirano 12. 11. 2010]. Dostopno na svetovnem spletu: <<http://cool.conservation-us.org/byorg/abbey/an/an09/an09-2/an09-209.html>>.
17. BRATU, E., MOISE, I. V., CUTRUBINIS, M. in VIRGOLICI, M. Archives decontamination by gamma irradiation. *Nukleonika*, 2009, vol. 54, (2), pp. 77–84.
18. MAGAUDDA, G. The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. *Journal of Cultural Heritage*, 2004, vol. 5, pp. 113–118.

19. DERRICK, M. Evaluation of the state of degradation of dead sea scroll samples using FTIR spectroscopy. *The Book and Paper Group ANNUAL* [dostopno na daljavo], 1991, vol. 10 [citirano 17. 2. 2011]. Dostopno na svetovnem spletu: <<http://cool.conservation-us.org/coolac/sg/bpg/annual/v10/bp10-06.html>.
20. EDWARDS, H. G. M., ELLIS, E., FARWELL, D. W. in JANAWAY, R. C. Preliminary study of the application of fourier transform raman spectroscopy to the analysis of degraded archaeological linen textiles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1996, vol. 27, pp. 663–669.
21. AGARWAL, U. P. An overview of raman spectroscopy as applied to lignocellulosic materials. *V Advances in Lignocellulosics characterization*. Edited by D. S. Argyropoulos. Atlanta : Tappi, 1999, pp. 201–225.
22. EDWARDS, H. G. M., NIKHASSAN, N. F., FARWELL, D. W., GARSIDE, P. in WYETH, P. Raman spectroscopic analysis of a unique linen artefact : the HMS Victory Trafalger sail. *Journal of Raman spectroscopy*, 2006, vol. 37, pp. 1193–1200.
23. SAMANTA, A. K., SINGHEE, D., GAUTAM, B. in BISWAS, S. K. Thermal behaviour and structural features of chemically and bio-chemically modified jute substrate. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 2007, vol. 32, (3), pp. 355–365.
24. NELSON, M. in O'CONNOR, R. T. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *Journal of Applied Polymer Science*, 1964, vol. 8, (3), pp. 1325–1341.
25. TOMŠIČ, B., SIMONČIČ, B., VINCE, J., OREL, B., VILČNIK, A., FIR, M., ŠURCA VUK, A. in JOVANOVSKI, V. Uporaba ATR IR spektroskopije pri preučevanju strukturnih sprememb celuloznih vlaken = The use of ATR IR spectroscopy in the study of structural changes of the cellulose fibres. *Tekstilec*, 2007, let. 50, (1-3), str. 3–15.
26. CAPPITELLI, F., VICINI, S., PIAGGIO, P., ABBRUSCATO, P., PRINCI, E., CASADEVALL, A., NOSANCHUK, J. D. in ZANARDINI, E. Investigation of fungal deterioration of synthetic paint binders using vibrational spectroscopic techniques. *Macromolecular Bioscience*, 2005, vol. 5, pp. 49–57.
27. DECHANT, J. *Ultrarotspektroskopische Untersuchungen an Polymeren*. Berlin : Akademie Verlag, 1972.
28. TOMŠIČ, B., SIMONČIČ, B., OREL, B., VILČNIK, A. in SPREIZER, H. Biodegradability of cellulose fabric modified by imidazolidinone. *Carbohydrate polymers*, 2007, vol. 69, pp. 478–488.
29. KAVKLER, K. in DEMŠAR, A. Examination of cellulose textile fibres in historical objects by micro-Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 2011, vol. 78, pp. 740–746.
30. KAVKLER, K., GUNDE-CIMERMAN, N., ZALAR, P. in DEMŠAR, A. FTIR spectroscopy of biodegraded historical textiles. *Polymer Degradation and Stability*, 2011, vol. 96, pp. 574–580.