

COMPARATIVE STUDY REGARDING THE RESISTANCE OF WET-WHITE AND WET-BLUE LEATHER TO THE GROWTH OF FUNGI

STUDIUL COMPARATIV PRIVIND REZISTENȚA PIEILOR WET-WHITE ȘI WET-BLUE LA CREȘTEREA MUCEGAIULUI

Corina CHIRILĂ*, Viorica DESELCU, Marian CRUDU

INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute Bucharest, 93 Ion Minulescu st., sector 3, RO-031215 Bucharest, e-mail: corina.chirila@icpi.ro

COMPARATIVE STUDY REGARDING THE RESISTANCE OF WET-WHITE AND WET-BLUE LEATHER TO THE GROWTH OF FUNGI

ABSTRACT. Both tanned and finished leather may be damaged by fungi from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium glaucum* and *Penicillium cyclopium*, and *Paecilomyces variotii* species which irreversibly damage leather through the enzymes (collagenases, lipases and proteases) they produce. Fungi grow quickly under high humidity conditions and temperatures ranging between 25 and 30°C. This paper presents a comparative study regarding the fungal resistance of wet-blue (chromium-tanned) leather, wet-white leather tanned with titanium-aluminium-based compounds and wet-white leather tanned with resorcinol-oxazolidine. The study was performed according to ASTM Standard D 4576 – 08(2013) - Test Method for Mold Growth Resistance of Wet Blue. Conclusions of this study about mould growth resistance are drawn from the results obtained for a period of 28 days. It has been concluded by this study that no leather type is completely resistant to fungal attack. Wet-blue leather is highly susceptible to fungal attack of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*; *Trichoderma viride* and *Mucor pusillus* species do not grow on chromium-tanned wet-blue leather. Wet-white leather tanned with Ti-Al is attacked by all types of fungi studied. Wet-white leather tanned with resorcinol-oxazolidine is attacked by *Aspergillus niger* and *Mucor pusillus*, but inhibit the growth of moulds from the *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma viride* species. This type of leather may also be damaged by moulds from the *Penicillium* genus.

KEY WORDS: wet blue, wet white, fungi resistance

STUDIUL COMPARATIV PRIVIND REZISTENȚA PIEILOR WET-WHITE ȘI WET-BLUE LA CREȘTEREA MUCEGAIULUI

REZUMAT. Atât pieile tăbăcite, cât și pieile finisate pot fi deteriorate de mucegaiuri din speciile *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium glaucum* și *Penicillium cyclopium* și *Paecilomyces variotii* care degradează în mod ireversibil pielea prin enzimele (colagenaze, lipaze și proteaze) pe care le produc. Mucegaiurile au o creștere rapidă în condiții de umiditate ridicată și temperaturi între 25 și 30°C. Prezenta lucrare prezintă un studiu comparativ privind rezistența la mucegaiuri a pieilor wet-blue (tăbăcite cu crom), a pieilor wet-white tăbăcite cu compuși pe bază de titan-aluminiu și a pieilor wet-white tăbăcite cu rezorcină-oxazolidină. Studiul a fost efectuat conform standardului ASTM D 4576-08 (2013) - Metodă de testare a rezistenței la mucegai a pieilor wet-blue. Concluziile acestui studiu s-au bazat pe rezultatele obținute pentru o perioadă de 28 de zile. În urma acestui studiu s-a ajuns la concluzia că niciun tip de piele nu este complet rezistent la atacul fungic. Pieile wet-blue sunt foarte sensibile la atacul mucegaiurilor *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*; speciile *Trichoderma viride* și *Mucor pusillus* nu se dezvoltă pe pieile wet-blue tăbăcite cu crom. Pieile wet-white tăbăcite cu Ti-Al sunt atacate de toate tipurile de fungi luate în studiu. Pieile wet-white tăbăcite cu rezorcină-oxazolidină sunt atacate de *Aspergillus niger* și *Mucor pusillus*, dar inhibă dezvoltarea mucegaiurilor din speciile *Aspergillus oryzae* și *Trichoderma viride*. Acest tip de piei poate fi deteriorat și de mucegaiuri din genul *Penicillium*.

CUVINTE CHEIE: wet blue, wet white, rezistență la mucegai

ÉTUDE COMPARATIVE SUR LA RÉSIDENCE DU CUIR WET-BLUE ET WET-WHITE À LA CROISSANCE DES MOISSURES

RÉSUMÉ. Les cuirs tannés et finis peuvent être endommagés par les moisissures des espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium cyclopium* et *Paecilomyces variotii* qui dégradent le cuir de manière irréversible par les enzymes (les collagénases, les lipases et les protéases) qu'elles produisent. Les moisissures ont une croissance rapide dans des conditions de forte humidité et des températures entre 25 et 30°C. Cet article présente une étude comparative sur la résistance à la moisissure du cuir wet-blue (tanné au chrome), du cuir wet-white tanné aux composés de titane et d'aluminium et du cuir wet-white tanné au résorcinol-oxazolidine. L'étude a été réalisée selon la norme ASTM D 4576-08 (2013) - Méthode d'essai de résistance à la moisissure du cuir wet-blue. Les conclusions de cette étude ont été basées sur des résultats obtenus pendant une période de 28 jours. Dans cette étude, on a conclu qu'aucun type de peau n'est complètement résistant à l'attaque des moisissures. Les cuirs wet-blue sont très sensibles aux attaques des moisissures *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*; les espèces de *Trichoderma viride* et *Mucor pusillus* ne croissent pas sur le cuir wet-blue tanné au chrome. Les cuirs tannés avec du Ti-Al à l'état wet-white sont attaqués par toutes les moisissures étudiées. Les cuirs tannés avec du résorcinol-oxazolidine à l'état wet-white sont attaqués par *Aspergillus niger* et *Mucor pusillus*, mais inhibent la croissance des espèces de moisissures *Aspergillus oryzae* et *Trichoderma viride*. Ce type de cuir peut être endommagé aussi par les moisissures du genre *Penicillium*.

MOTS CLÉS: wet blue, wet white, résistance à la moisissure

* Correspondence to: Corina CHIRILĂ, INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute Bucharest, 93 Ion Minulescu st., sector 3, RO-031215 Bucharest, e-mail: corina.chirila@icpi.ro

INTRODUCTION

Various types of finished leather are very susceptible to fungal attack. The biodeterioration of leather and leather goods includes undesirable and aggressive activities of fungi during leather manufacture, finishing, storage and in use. So, finished leather and leather goods, stored under varying environmental conditions in warehouses, frequently become mouldy. The relative humidity plays an important role.

We are all familiar with the unpleasant situation where our leather shoes, belt, jacket or handbag becomes mouldy (Figure 1). At present, it is known that tanned and finished leather may be damaged by fungi from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium glaucum* and *Penicillium cyclopium*, and *Paecilomyces variotii* species, which irreversibly damage leather through the enzymes they produce (collagenases, lipases and proteases). Fungi grow rapidly under high humidity conditions and at temperatures ranging from 25 and 30°C.



INTRODUCERE

Diversele tipuri de piele sunt foarte sensibile la atacul fungic. Biodeteriorarea pielii și a produselor din piele cuprinde și activitatea indezirabilă și agresivă a mucegaiurilor în timpul fabricării, finisării, depozitării și utilizării pieilor. Astfel, pielea și produsele din piele, depozitate în diverse condiții ambientale în depozite, mucegăiesc în mod frecvent. Umiditatea relativă joacă un rol important.

Cu toții cunoaștem situația neplăcută în care pantofii, cureaua, geaca sau geanta noastră de piele mucegăiește (Figura 1). În momentul de față se cunoaște faptul că pieile tăbăcite și pieile finisate pot fi deteriorate de mucegaiuri din speciile *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium glaucum* și *Penicillium cyclopium* și *Paecilomyces variotii* care degradează în mod ireversibil pielea prin enzimele (colagenaze, lipaze și proteaze) pe care le produc. Mucegaiurile au o creștere rapidă în condiții de umiditate ridicată și temperaturi între 25 și 30°C.



Figure 1. Fungi infested leather goods [1, 2]
Figura 1. Produse din piele mucegăite [1, 2]

The most common fungi found on leather are *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* (Figure 2), moulds that, in addition to the destructive effect they have on leather objects, are also harmful for human health. *Aspergillus flavus* is dangerous because of the aflatoxin it produces, one of the most carcinogenic substances in the living world, while *Aspergillus niger*

Cele mai răspândite mucegaiuri întâlnite pe piei sunt *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus* (Figura 2), mucegaiuri care, pe lângă efectul distructiv pe care îl au asupra obiectelor din piele, sunt dăunătoare și pentru sănătatea omului. *Aspergillus flavus* este periculos prin aflatoxina pe care o produce, aceasta fiind una dintre cele mai cancerigene substanțe din lumea vie, în timp

may cause aspergillosis in immunocompromised patients.

ce *Aspergillus niger* poate produce aspergiloza la pacienții imuno-compromiși.

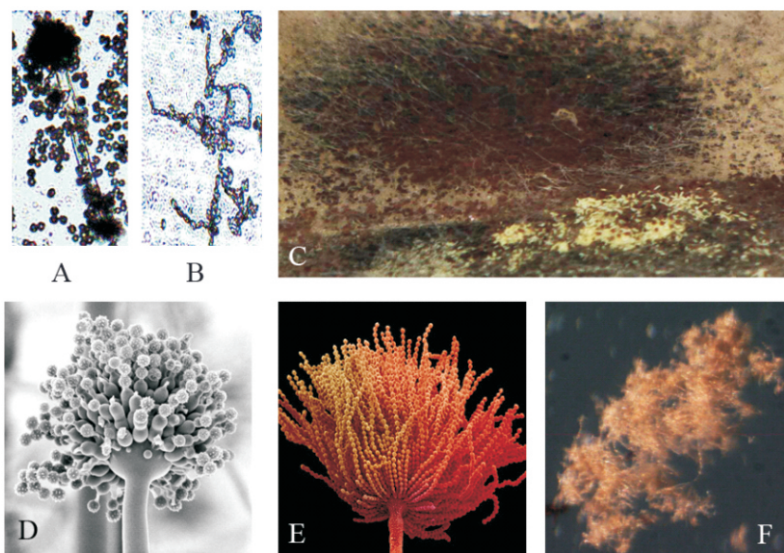


Figure 2. *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*: A - Microscopic appearance of *Aspergillus niger* spores; B - Microscopic appearance of *Aspergillus flavus* spores; C - *Aspergillus niger* and *flavus* colonies on a leather sample; D - *Aspergillus niger* fruiting body; E - *Aspergillus flavus* fruiting body; F - *Aspergillus flavus*, microscopic appearance

Figura 2. *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*: A - Aspectul microscopic al sporilor de *Aspergillus niger*; B - Aspectul microscopic al sporilor de *Aspergillus flavus*; C - Colonii de *Aspergillus niger* și *flavus* pe o probă de piele; D - Corp de fructificație *Aspergillus niger*; E - Corp de fructificație *Aspergillus flavus*; F - *Aspergillus flavus*, aspect microscopic

Aspergillus niger is a widespread mould in the environment which may develop on almost anything: coffee, various foods, textiles, wood, paper and leather goods, which is why this mould was used to test resistance of leather to fungi. Mould is invasive, developing quicker than *Penicillium* or other types of fungi, with the tendency of extending to the detriment of other species.

Aspergillus niger strain ATCC 6275 (Figure 3) was first isolated in a laboratory in The United States, from a leather sample. The strain is characterized by the presence of genes for carboxymethyl cellulase, citric acid, glucosidase, xylanase, lipases and resistance to copper.

Trichoderma viride (Figure 4) is a green coloured mould used in the antifungal treatment of soil and seeds due to its ability to inhibit growth of other fungi, but can also be pathogenic for certain plants, such as

Aspergillus niger este un mucegai foarte răspândit în mediul înconjurător, care se poate dezvolta pe aproape orice: cafea, diverse alimente, materiale textile, lemn, hârtie și obiecte confecționate din piele, motiv pentru care a fost folosit acest mucegai pentru testarea rezistenței fungice a pieilor. Mucegaiul are un caracter invaziv, dezvoltându-se mai repede decât *Penicillium* sau alte genuri de mucegai și având tendința de a se extinde în detrimentul altor specii.

Tulpina ATCC 6275 (Figura 3) de *Aspergillus niger* a fost izolată prima dată într-un laborator din Statele Unite ale Americii de pe o probă de piele. Tulpina este caracterizată prin prezența genelor pentru carboximetilcelulază, acid citric, glucosidază, xilanază, lipaze și rezistență la cupru.

Trichoderma viride (Figura 4) este un mucegai de culoare verde folosit în tratamentul antifungic al solului și al semințelor datorită capacității sale de a inhiba creșterea altor mucegaiuri, dar poate fi și patogen

onion. The mould produces cellulases and chitinases and develops on wood and parasitizing other fungi, which is why it damages mushrooms. This mould may also grow on tanned leather.

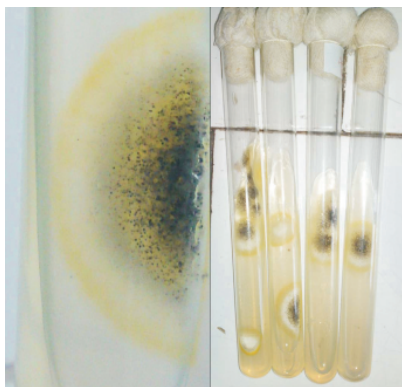


Figure 3. *Aspergillus niger* cultures, strain ATCC 6275
 Figura 3. Culturi de *Aspergillus niger*, tulpina ATCC 6275



Figure 4. *Trichoderma viride*
 Figura 4. *Trichoderma viride*

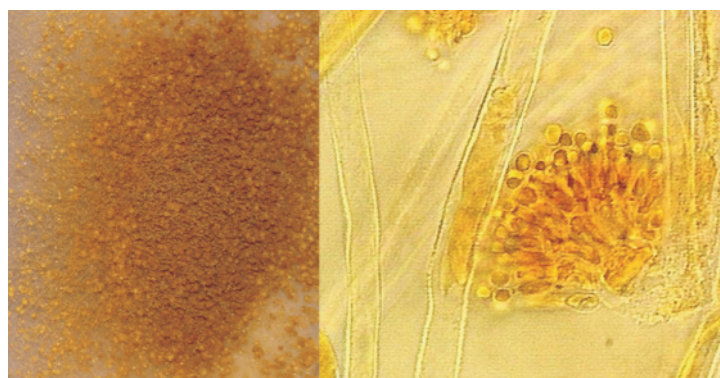


Figure 5. *Aspergillus oryzae*, colony and microscopic appearance
 Figura 5. *Aspergillus oryzae*, colonie și aspect microscopic

Aspergillus oryzae (Figure 5) is characterized by the presence of orange globular conidia, and it is used in Asian cuisine for soybean fermentation. The mould produces amylases and carboxypeptidases. Unlike *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* has not been identified on leather so far, but the possibility of its development on chromium-free tanned leather samples was taken into account.

pentru anumite plante, din care amintim ceapa. Mucegaiul produce celuloze și chitinaze și se dezvoltă atât pe lemn, cât și parazitând alți fungi și, din acest motiv, este dăunător pentru ciupercile de crescătorie. Acest mucegai poate crește și pe pieile tăbăcite.

Aspergillus oryzae (Figura 5) este un mucegai caracterizat prin prezența conidiilor globulare de culoare portocalie, folosit în bucătăria asiatică pentru fermentarea boabelor de soia. Mucegaiul produce amilaze și carboxipeptidaze. Spre deosebire de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* nu a fost identificat până acum pe piei, dar s-a urmărit posibilitatea de a se dezvolta pe probele de piele tăbăcită fără crom.

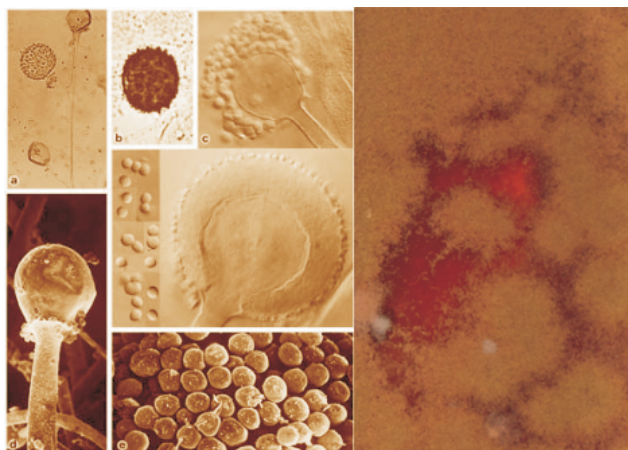


Figure 6. *Mucor pusillus*, microscopic and macroscopic appearance
 Figura 6. *Mucor pusillus*, aspect microscopic și macroscopic

Mucor pusillus (Figure 6) develops in soils and decomposes organic matter of vegetable origin. No growth of this mould has been yet reported on tanned leather, but this study aimed at discovering whether fungi can damage wet-blue and wet-white tanned leather through the proteases they produce.

At present, chrome tanning is the most widely used technique for leather tannage, accounting for more than 90% of leathers tanned worldwide. However, chrome tannage involves serious environmental risks resulting from the possible oxidation of chromium to a hexavalent state, although tanners are aware of the carcinogenic effect, in accordance with the International Agency for Research on Cancer (IARC) [3]. For this reason, the market has shown a growing demand for “ecological” products, especially regarding the development of tanning processes using alternative tanning agents different from chromium.

Alternative free of chrome (FOC) tanning technologies include the use of tanning agents based of titanium-aluminum or organic compounds like oxazolidine, which in combination with other retanning agents of vegetable or synthetic origin, allow for obtaining quality leathers that may be used by footwear and upholstery industries.

Wet-blue refers to partially processed leathers that have been tanned with chromium but not dyed, dried or fat-liquored yet. Wet-white refers to partially processed leathers that have been tanned with

Mucor pusillus (Figura 6) se dezvoltă în soluri și descompune materia organică de origine vegetală. Până acum nu s-au raportat creșteri ale acestui mucegai pe piei tăbăcite, dar prin prezentul studiu s-a urmărit dacă fungii pot deteriora pieile tăbăcite wet-blue și wet-white prin proteazele pe care le produc.

În prezent, tăbăcirea în crom este cel mai frecvent utilizată tehnică pentru tăbăcirea pieilor, reprezentând peste 90% din pieile tăbăcite la nivel global. Cu toate acestea, tăbăcirea în crom implică riscuri grave de mediu ca urmare a posibilei oxidări a cromului în stare hexavalentă, deși tăbăcarii sunt conștienți de efectul cancerigen, potrivit Agenției Internaționale pentru Cercetarea Cancerului (IARC) [3]. Din acest motiv, piața a cunoscut o cerere din ce în ce mai mare de produse „ecologice”, mai ales în ceea ce privește dezvoltarea unor procese de tăbăcire care utilizează agenți tananți alternativi, diferiți de cei pe bază de crom.

Tehnologiile de tăbăcire alternative fără crom (free-of-chrome, FOC) cuprind utilizarea unor agenți tananți pe bază de titan-aluminiu sau compuși organici precum oxazolidina, care, în combinație cu alți agenți de retăbăcire de origine vegetală sau sintetică, permite obținerea unor piei de calitate care pot fi utilizate în industriile de fabricare a încălțămintei și de tapițerie.

Termenul wet-blue se referă la pieile parțial prelucrate care au fost tăbăcite cu crom, dar nu au fost încă vopsite, uscate sau unse. Termenul wet-white se referă la pieile parțial prelucrate care au fost tăbăcite cu

titanium and/or aluminium or resorcinol/oxazolidine, but not dyed, dried or fat-liquored yet.

This study aims at testing fungal resistance of wet blue leather (chromium-tanned) [4, 5] and of two types of wet white leather tanned with titanium-aluminium [2, 6-13], and with resorcinol-oxazolidine, respectively [14-19].

MATERIALS AND METHODS

Materials

Specimens of leather were obtained from tanning stage: wet-blue (chrome tanned), Ti-Al tanned wet-white [20] and resorcinol-oxazolidine tanned wet-white [14].

Biological material: 4 fungi strains were used: *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Trichoderma viride*, *Aspergillus oryzae* 153 and *Mucor pusillus*.

Culture medium: Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium was used.

Methods

Microbiological tests were performed according to ASTM standard D 4576-08 (2013) - Test Method for Mold Growth Resistance of Wet Blue. Four samples of each type of leather were inoculated with each of the 4 fungi strains and were incubated at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ for 28 days. Leather samples were evaluated after 7, 14, 21 and 28 days to determine fungi growth, ranking them from 0 to 4.

Leather samples were regularly checked every 7 days to see whether mould has grown on their surface. Fungal resistance was assessed by ranking samples from 0 to 4, depending on the fungal growth, as follows: mark 0 for leathers not covered by mould, mark 0.5 for growth on less than 12% of the sample surface, mark 1 for growth ranging between 12 and 25% of the surface, mark 2 if 50% of the sample surface is covered by fungi, mark 3 if mould grew on 75% of the sample surface and mark 4 if the sample is entirely covered by mould.

Chemical tests of wet-blue and wet-white leathers were performed according to EN ISO standards.

titan și/sau aluminiu sau rezorcină/oxazolidină, dar nu au fost încă vopsite, uscate sau unse.

Prezentul studiu are ca scop testarea rezistenței fungice a pieilor wet blue (tăbăcite cu crom) [4, 5] și a două tipuri de piei wet white tăbăcite cu titan-aluminiu [2, 6-13], respectiv cu rezorcină-oxazolidină [14-19].

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Probe de piei tăbăcite în diferite moduri: probe de piele wet-blue (tăbăcite cu crom), probe de piele wet-white tăbăcite cu agenți tananți pe bază de Ti-Al [20] și probe de piele wet-white tăbăcite organic cu rezorcină-oxazolidină [14].

Material biologic: S-au folosit 4 tulpini de mucegai: ATCC 6275 de *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus oryzae* 153 și *Mucor pusillus*.

Mediul de cultură: S-a folosit mediul de cultură pe bază de cartof Potato Dextrose Agar (PDA).

Metode

Testele microbiologice s-au efectuat conform ASTM standard D 4576-08 (2013) - Metoda de testare a rezistenței la mucegai a pieilor wet-blue. Câte 4 probe din fiecare tip de piele au fost inoculate cu fiecare din cele 4 tulpini de mucegai și au fost incubate la $28 \pm 1^\circ\text{C}$ pentru 28 de zile. Probele de piele au fost evaluate după 7, 14, 21 și 28 de zile privind creșterea mucegaiului, prin acordarea unor note de la 0 la 4.

S-au efectuat verificări regulate la intervale de 7 zile pentru a observa creșterea mucegaiului pe probele de piele. Evaluarea rezistenței la mucegai s-a efectuat prin acordarea unor note de la 0 la 4 în funcție de răspândirea mucegaiului, astfel: nota 0 pentru pieile neacoperite de mucegai, nota 0.5 pentru creșteri pe mai puțin de 12% din suprafața probei, nota 1 pentru creșteri între 12 și 25% din suprafață, nota 2 dacă 50% din suprafața probei este acoperită de mucegai, nota 3 dacă mucegaiul a crescut pe 75% din suprafața probei și nota 4 dacă proba este acoperită în întregime de mucegai.

Testele chimice ale pieilor wet-blue și wet-white s-au efectuat conform standardelor EN ISO în vigoare.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Wet-blue and wet-white leathers are excellent substrates for fungal growth: storage temperature, acid pH, presence of water, proteins and fats constitute the most important conditions for the development and growth for a lot of moulds, such as *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and *Trichoderma viride*. The fungal contamination appears as coloured stains on the leather, usually permanent.

Chemical characteristics of wet-blue and wet-white leather are shown in Table 1.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pielele wet-blue și wet-white sunt substraturi excelente pentru creșterea mucegaiului: temperatura de depozitare, pH acid, prezența apei, proteinele și grăsimile constituie cele mai importante condiții pentru dezvoltarea și creșterea mucegaiurilor precum cele din speciile *Penicillium*, *Aspergillus* și *Trichoderma viride*. Contaminarea cu mucegai are aspectul unor pete colorate pe piele și sunt, de regulă, permanente.

Caracteristicile chimice ale pieilor wet-blue și wet-white luate în studiu sunt prezentate în Tabelul 1.

Table 1: Wet-blue and wet-white leather characteristics
Tabelul 1: Caracteristicile pieilor wet-blue și wet-white

No. Nr. crt.	Characteristics Caracteristici	Wet-blue Wet-blue	Wet-white Ti-Al tanned Wet-white tăbăcită cu Ti-Al	Wet-white organic tanned Wet-white tăbăcită organic
1	Chrome oxide, % Oxid de crom, %	3.5	0	0
2	Ti/Al oxides, % Oxizi Ti/Al, %	0	3.12	0
3	Shrinkage temperature, °C Temperatura de contracție, °C	Over 100 Peste 100	75-78	70-74
4	Grease, % Substanțe grase, %	1.2	2.1	4.5
5	pH pH	3.5	3.6	4.3
6	Moisture, % Umiditate, %	59.0	66.33	55.0
7	Ash, % Cenușă, %	16.6	12.59	10.5
8	Total nitroge n, % Azot total, %	12.7	13.84	12.9
9	Digestibility, % Digestibilitate, %	51.9	61.3	65.5

Table 2 presents the appearance and assessment (marks) of leather samples after 7, 14, 21 and 28 days. According to the working standard, samples were evaluated ranking them from 0 to 4 depending on the growth of mould on the sample (Table 2). The following were found:

After 7 days *Aspergillus niger* grew on the entire surface of the organic tanned wet white leather

În Tabelul 2 sunt redade aspectul și evaluarea (notele) probelor de piele după 7, 14, 21 și 28 de zile. Conform standardului de lucru, probele au fost evaluate cu note de la 0 la 4, în funcție de gradul de creștere a mucegaiului pe probă (Tabel 2). S-au constatat următoarele:

După 7 zile, *Aspergillus niger* a crescut pe întreaga suprafață a probei de piele wet-white tăbăcită organic,

sample, on approximately 50% of the chromium-tanned wet-blue leather sample and on less than 25% of the Ti-Al-tanned leather sample.

Aspergillus oryzae grew on the surface of wet-blue leather sample and on the Ti-Al-tanned wet-white leather sample without damaging them. The organic tanned wet-white leather sample inhibited growth.

Trichoderma viride grew in the culture medium, but not on the wet-blue leather sample, while a spontaneous growth of *Aspergillus niger* appeared on its surface; approximately 10% of the Ti-Al-tanned wet-white leather sample is covered by *Trichoderma*, and the organic tanned wet-white leather sample almost completely inhibited mould growth.

Mucor pusillus only grew in the culture medium around the wet-white leather samples. The wet-blue leather sample completely inhibited mould growth, but was contaminated with *Aspergillus niger*.

After 14 days, *Aspergillus niger* grew on all 3 types of leather, the wet-blue sample showing a lower number of conidia on the surface, while *Aspergillus oryzae* covered the wet-blue and Ti-Al-tanned wet-white samples almost entirely, but its growth was further inhibited by the wet-white leather sample tanned with resorcinol-oxazolidine.

Trichoderma did not grow on the wet-blue leather sample and did not inhibit the growth of *Aspergillus niger* colony. The growth of *Trichoderma viride* colonies was inhibited by the leather sample tanned with resorcinol-oxazolidine, but a colony of *Aspergillus niger* spontaneously appeared on the sample. *Trichoderma viride* grew on 75% of the titanium-aluminium-tanned wet-white leather sample.

The chromium-tanned wet-blue sample completely inhibited the growth of *Mucor pusillus* colonies. The mould grew neither in the culture medium, nor on the surface of the wet-blue leather sample, but it was entirely covered by *Aspergillus niger*. Wet-white leather samples were entirely covered by *Mucor pusillus*. On the Ti-Al-tanned wet-white leather sample inoculated with *Mucor pusillus*, a colony of *Aspergillus flavus* also appeared. The colony is very invasive, quickly covering the entire surface of the sample.

pe aproximativ 50% din suprafața probei de piele wet-blue tăbăcită cu crom și pe mai puțin de 25% din suprafața probei de piele tăbăcită cu Ti-Al.

Aspergillus oryzae a crescut pe suprafața probei de piele wet-blue și pe suprafața probei de piele wet-white tăbăcită cu Ti-Al fără să le deterioreze. Proba de piele wet-white tăbăcită organic a inhibat creșterea.

Trichoderma viride a crescut în mediul de cultură, dar nu și pe proba de piele wet-blue, pe suprafața acesteia apărând o creștere spontană de *Aspergillus niger*, proba de piele wet-white tăbăcită cu Ti-Al este acoperită de *Trichoderma* pe aproximativ 10% din suprafață, iar proba de piele wet-white tăbăcită organic a inhibat aproape total creșterea mucegaiului.

Mucor pusillus nu a crescut decât în mediul de cultură din jurul probelor de piele wet-white. Proba de piele wet-blue a inhibat total creșterea mucegaiului, dar a fost contaminată cu *Aspergillus niger*.

După 14 zile, *Aspergillus niger* a crescut pe toate cele 3 tipuri de piele, proba de piele wet-blue prezentând un număr mai mic de conidii pe suprafață, în timp ce *Aspergillus oryzae* a acoperit aproape în întregime probele de piele wet-blue și wet-white tăbăcită cu titan-aluminiu, dar creșterea sa a fost în continuare inhibată de pielea wet-white tăbăcită cu rezorcină-oxazolidină.

Trichoderma nu a crescut pe proba de piele wet-blue și nici nu a inhibat creșterea coloniei de *Aspergillus niger*. Creșterea coloniilor de *Trichoderma viride* a fost inhibată de proba de piele tăbăcită organic cu rezorcină-oxazolidină, dar pe respectiva probă a apărut spontan o colonie de *Aspergillus niger*. *Trichoderma viride* a crescut pe 75% din suprafața probei de piele wet-white tăbăcită cu titan-aluminiu.

Pielea wet-blue tăbăcită cu crom a inhibat total creșterea coloniilor de *Mucor pusillus*. Mucegaiul nu a crescut nici în mediul de cultură, nici pe suprafața probei de piele wet-blue, dar aceasta a fost acoperită în întregime de *Aspergillus niger*. Pieile wet-white au fost acoperite în întregime de *Mucor pusillus*. Pe proba de piele wet-white tăbăcită cu Ti-Al însămnântată cu *Mucor pusillus* a apărut și o colonie de *Aspergillus flavus*. Colonia prezintă un caracter invaziv, acoperind în timp scurt întreaga suprafață a probei.

Table 2: Appearance and assessment of leather samples after 7, 14, 21 and 28 days
 Tabelul 2: Aspectul și evaluarea probelor de piele după 7, 14, 21 și 28 zile

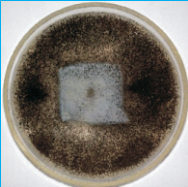
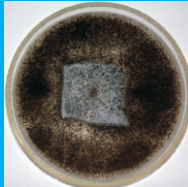
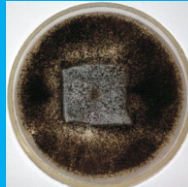
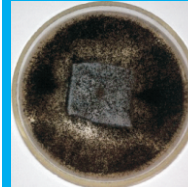
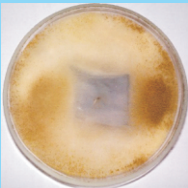
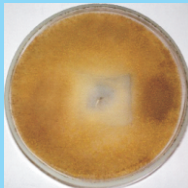
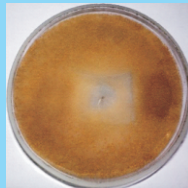
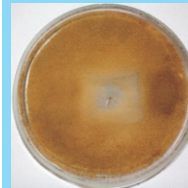
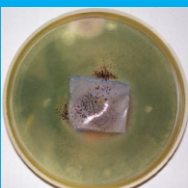
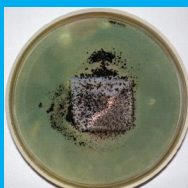
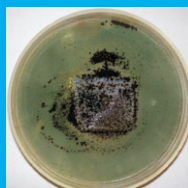
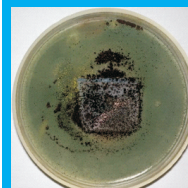
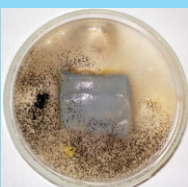
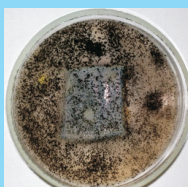
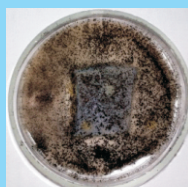
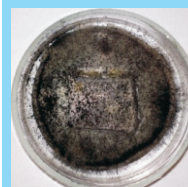
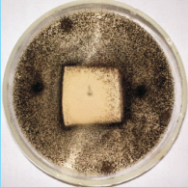
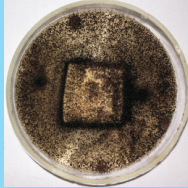
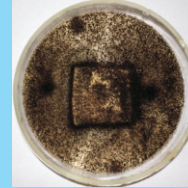
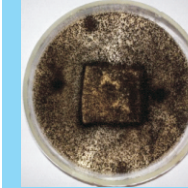
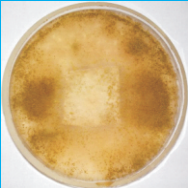
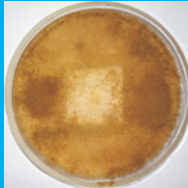
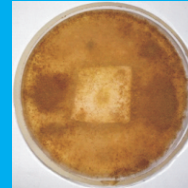
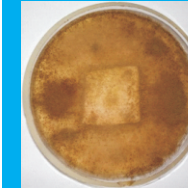
Fungus type <i>Tipul de mucegai</i>	7 days / mark 7 zile / nota	14 days / mark 14 zile / nota	21 days / mark 21 zile / nota	28 days / mark 28 zile / nota
Chromium-tanned wet-blue leather <i>Piele wet-blue tăbăcită cu crom</i>				
<i>Aspergillus Niger</i>	 1	 2	 3	 4
<i>Aspergillus oryzae</i>	 1	 3	 3	 4
<i>Trichoderma viride</i>	 0	 0	 0	 0
<i>Mucor pusillus</i>	 0	 0	 0	 0
Ti-Al-tanned wet-white leather <i>Piele wet-white tăbăcită cu Ti-Al</i>				
<i>Aspergillus Niger</i>	 0.5	 3	 4	 4
<i>Aspergillus oryzae</i>	 2	 2	 2	 3

Table 2: Continued
Tabelul 2: Continuare

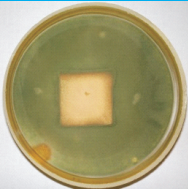
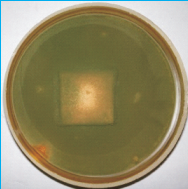
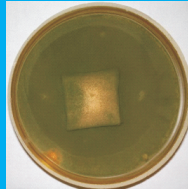
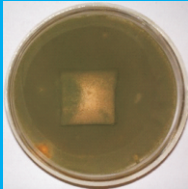
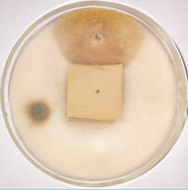
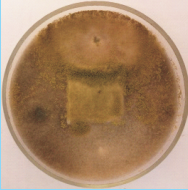
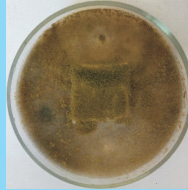
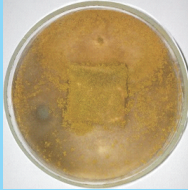
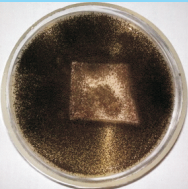
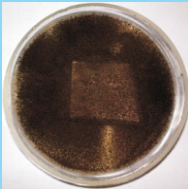
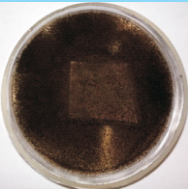
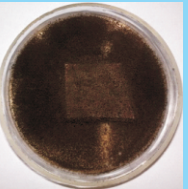
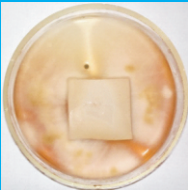
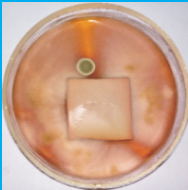
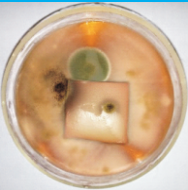

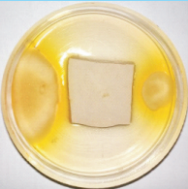
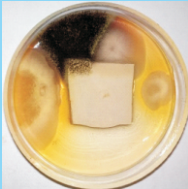
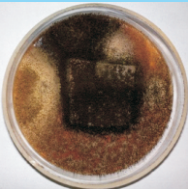
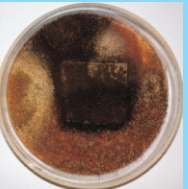
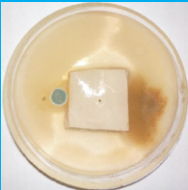
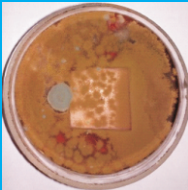
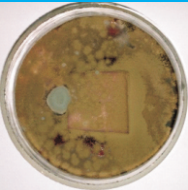
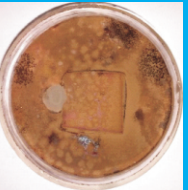
Fungus type <i>Tipul de mucegai</i>	7 days / mark 7 zile / nota	14 days / mark 14 zile / nota	21 days / mark 21 zile / nota	28 days / mark 28 zile / nota
Ti-Al-tanned wet-white leather <i>Piele wet-white tăbăcită cu Ti-Al</i>				
<i>Trichoderma viride</i>	 0.5	 2	 3	 3
<i>Mucor pusillus</i>	 0	 4	 4	 4
Organic tanned wet-white leather <i>Piele wet-white tăbăcită organic</i>				
<i>Aspergillus Niger</i>	 3	 4	 4	 4
<i>Aspergillus oryzae</i>	 0	 0	 0	 0
<i>Trichoderma viride</i>	 0	 0	 0	 0
<i>Mucor pusillus</i>	 0	 3	 4	 4



Figure 6. *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* moulds spontaneously grown on the wet-white leather sample tanned with resorcinol-oxazolidine after 21 days

Figura 6. Mucegaiuri din speciile *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus* crescute spontan pe proba de piele wet white tăbăcită cu rezorcină-oxazolidină după 21 de zile

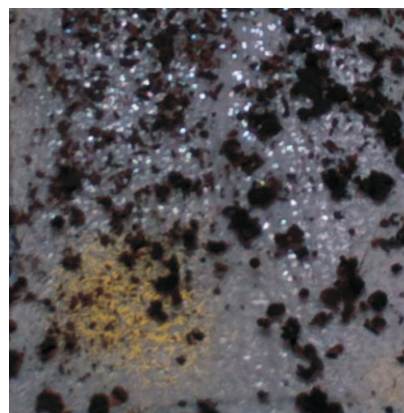


Figure 7. *Aspergillus flavus* colony spontaneously grown on the wet-blue leather sample initially inoculated with *Mucor pusillus*

Figura 7. Colonie de *Aspergillus flavus* crescută spontan pe proba de piele wet blue însămânțată inițial cu *Mucor pusillus*

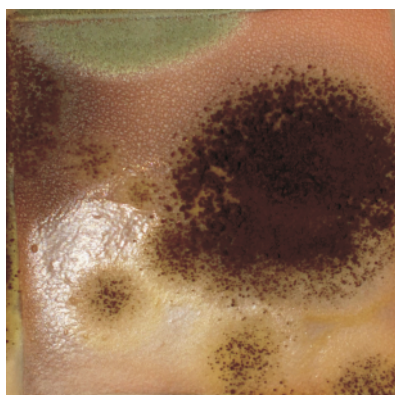


Figure 8. Appearance of the leather sample tabbed with resorcinol-oxazolidine and inoculated with *Aspergillus oryzae* after 28 days

Figura 8. Aspectul probei de piele tăbăcită cu rezorcină-oxazolidină și inoculată cu *Aspergillus oryzae* după 28 de zile

After 21 days, all leather samples inoculated with *Aspergillus niger* were entirely covered by mould; the situation of samples inoculated with *Aspergillus oryzae* remained unchanged except for the sample tanned with resorcinol-oxazolidine on which two *Aspergillus niger* colonies and one *Penicillium* colony appeared, while the appearance of samples inoculated with *Mucor pusillus* did not change much. The leather sample tanned with resorcinol-oxazolidine completely

După 21 de zile, toate probele de piele inoculate cu *Aspergillus niger* au fost acoperite în întregime de mucegai; situația probelor inoculate cu *Aspergillus oryzae* a rămas neschimbată, exceptând proba tăbăcită cu rezorcină-oxazolidină, pe care au apărut două colonii de *Aspergillus niger* și o colonie de *Penicillium*, iar aspectul probelor inoculate cu *Mucor pusillus* nu s-a schimbat prea mult. Proba de piele tăbăcită organic cu rezorcină-oxazolidină a inhibat total creșterea

inhibited the growth of *Trichoderma viride* colonies, but was entirely covered by *Aspergillus niger* and a colony of *Aspergillus flavus* also appeared (Figure 6). On the chromium-tanned wet-blue leather sample inoculated with *Trichoderma viride*, a colony of *Aspergillus flavus* appeared which also spread on the culture medium, its growth not being inhibited by *Trichoderma viride*. The appearance of the Ti-Al-tanned wet-white leather sample inoculated with *Trichoderma viride* did not change much. On the wet-blue sample initially inoculated with *Mucor pusillus*, a colony of *Aspergillus flavus* appeared (Figure 7).

After 28 days the appearance of samples inoculated with *Aspergillus niger* and *oryzae* did not change, except for the leather sample tanned with resorcinol-oxazolidine inoculated with *Aspergillus oryzae* (Figure 8) on the surface of which a *Penicillium* colony also grew, while *Aspergillus niger* colonies developed. The appearance of samples inoculated with *Trichoderma viride* and *Mucor pusillus* did not change much either.

CONCLUSIONS

Aspergillus niger and *Aspergillus flavus* are the most aggressive and invasive species, developing very rapidly, much quicker than *Trichoderma viride*, *Mucor pusillus* and moulds from the *Penicillium* genus, the latter having the slowest growth rate. Although it produces chitinases with antifungal effect, *Trichoderma viride* does not inhibit development of *Aspergillus niger* and *flavus* species.

It has been concluded by this study that no leather type is completely resistant to fungal attack.

Wet-blue leather is highly susceptible for fungal attack of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *Trichoderma viride* does not grow on chromium-tanned wet-blue leather samples, but they do not inhibit mould growth in the culture medium, as there are no inhibition areas around the sample. Chromium-tanned leather completely inhibits growth of mould from *Mucor pusillus* species.

Ti-Al-tanned wet-white leather is attacked by all types of fungi studied.

coloniilor de *Trichoderma viride*, dar a fost acoperită în întregime de *Aspergillus niger* și a apărut și o colonie de *Aspergillus flavus* (Figura 6). Pe proba de piele wet-blue tăbăcită cu crom inoculată cu *Trichoderma viride* a apărut și o colonie de *Aspergillus flavus*, care s-a dezvoltat și pe mediul de cultură, creșterea nefiind inhibată de *Trichoderma viride*. Aspectul probei de piele wet-white tăbăcită cu Ti-Al inoculată cu *Trichoderma viride* nu s-a schimbat prea mult. Pe proba de piele wet-blue însămânțată inițial cu *Mucor pusillus* a apărut o colonie de *Aspergillus flavus* (Figura 7).

După 28 de zile, aspectul probelor inoculate cu *Aspergillus niger* și *oryzae* nu s-a schimbat, exceptând proba de piele tăbăcită cu rezorcină-oxazolidină inoculată cu *Aspergillus oryzae* (Figura 8), pe suprafața căreia a crescut și o colonie de *Penicillium*, în timp ce coloniile de *Aspergillus niger* s-au mărit. Nici aspectul probelor inoculate cu *Trichoderma viride* și *Mucor pusillus* nu s-a schimbat prea mult.

CONCLUZII

Speciile *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus* sunt cele mai agresive și cele mai invazive, dezvoltându-se foarte repede, mult mai repede decât *Trichoderma viride*, *Mucor pusillus* și mucegaiurile din genul *Penicillium*, acestea din urmă având cea mai mică viteză de creștere. Deși produce chitinaze cu efect antifungic, *Trichoderma viride* nu inhibă dezvoltarea mucegaiurilor din speciile *Aspergillus niger* și *flavus*.

În urma acestui studiu s-a ajuns la concluzia că niciun tip de piele nu este complet rezistent la atacul fungic.

Pielele wet-blue sunt foarte sensibile la atacul mucegaiurilor *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*. *Trichoderma viride* nu se dezvoltă pe pieile wet-blue tăbăcite cu crom, dar acestea nu inhibă dezvoltarea mucegaiului în mediul de cultură, neexistând zone de inhibare în jurul probei. Pielele tăbăcite cu crom inhibă total dezvoltarea mucegaiurilor din specia *Mucor pusillus*.

Pielele wet-white tăbăcite cu Ti-Al atacate de toate tipurile de fungi luate în studiu.

Wet-white leather samples tanned with resorcinol-oxazolidine are attacked by *Aspergillus niger* and *Mucor pusillus*, but inhibit growth of moulds from *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma viride* species. This type of leather can also be damaged by mould from the *Penicillium* genus.

Acknowledgements

This work has been financed by the European Fund for Regional Development and the Romanian Government in the framework of Sectoral Operational Programme under the project INNOVA-LEATHER: «Innovative technologies for leather sector increasing technological competitiveness by RDI, quality of life and environmental protection» – contract POS CCE-AXA 2-O 2.1.2 nr. 242/20.09.2010 ID 638 COD SMIS – CSNR 12579.

Pielele wet-white tăbăcite cu rezorcină-oxazolidină sunt atacate de *Aspergillus niger* și *Mucor pusillus*, dar inhibă dezvoltarea mucegaiurilor din speciile *Aspergillus oryzae* și *Trichoderma viride*. Acest tip de piei poate fi deteriorat și de mucegaiuri din genul *Penicillium*.

Mulțumiri

Această lucrare a fost finanțată de către Fondul European de Dezvoltare Regională și de către Guvernul României în cadrul Programului Operațional Sectorial, prin proiectul INNOVA-LEATHER: «Tehnologii inovative pentru sectorul de pielărie care să asigure creșterea competitivității prin CDI, calității vieții și protecția mediului» – contract POS CCE-AXA 2-O 2.1.2 nr. 242/20.09.2010 ID 638 COD SMIS – CSNR 12579.

REFERENCES

1. www.lanxessleather.com
2. <http://www.leatherusa.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=1>
3. <http://www.iarc.fr/index.php>
4. Târlea, M.M., Mutlu, M.M., Macovescu, G., Radulescu, C.H., Adigüzel Zengin, A.C., Bitlisli, B.O., Başaran, B., Antifungal compounds for leather part II. Testing of antifungal activity on bovine leathers, *Revista de Pielarie Incaltaminte*, **2009**, 9, 4.
5. Padoan, K., IULTCS II EUROCONGRESS Istanbul, **2006**.
6. Crudu, M., Deselnicu, V., Ioannidis, I., Deselnicu, D.C., New tanning technologies based on valorization of industrial wastes, The 3rd International Conference on Industrial and Hazardous Waste Management CRETE 2012, Chania, Crete, **2012**.
7. Crudu, M., Deselnicu, V., Deselnicu, D.C., Albu, F.L., Valorization of titanium metal wastes as tanning agent used in leather industry, *Waste Manag*, **2014**, ISSN 0956-053X; <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.12.015>
8. M. Crudu, Deselnicu, V., Ioannidis, I., Crudu, A., New wet white tanning Agents and Technology, Proceedings of ICAMS 2012, 27-29 September **2012**, Bucharest, RO, 27-34.
9. Crudu, M., Sibiescu, S., Sutiman, D., Cailean, A., Ioanid, A., Boca, N., Crudu, A., New tanning coordination compounds of Ti(IV) and Zr(IV) Part I – Compounds of Ti(IV) and Zr(IV) with N-hydroxysuccinimide as ligand, *Revista de Pielarie Incaltaminte*, **2010**, 10, 1.
10. Kleban, M., Chrome-free Waterproof Leather, US Pat. Appl. No. 200601151738.
11. Adiguzel Zengin, A.C., Crudu, M., Maier, S.S., Deselnicu, V., Albu, L., Gulumser, G., Bitlisli, B.O., Basaran, B., Mutlu, M.M., Eco-leather: Chromium-free Leather Production Using Titanium, Oligomeric Melamine-Formaldehyde Resin, and Resorcinol Tanning Agents and the Properties of the Resulting Leathers, *Ekoloji*, **2012**, 21, 82, 17-25, doi: 10.5053/ekoloji.2011.823
12. Mutlu, M.M., Adiguzel Zengin, A.C., Crudu, M., Maier, S.S., Deselnicu, V., Albu, L., Gulumser, G., Bitlisli, B.O., Basaran, Tosun, C.C., Properties of Leathers Tanned with Ti-Al Based Tanning Materials Obtained From the Wastes of

- Metal Industry, Proceedings of ICAMS 2012, 27-29 September **2012**, Bucharest, RO, 147-152.
13. Hancock, R.A., Orszulik, S.T., Sykes, R.L., Tannage with Aluminum salts. Part 2. Chemical basis of the reactions with polyphenols, *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **1980**, 64, 2, 32.
 14. Deselnicu, V., Crudu, M., Ioannidis, I., Deselnicu, D.C., Innovative organic tanning for leather, International Scientific Conference "Innovative solutions for sustainable development of textiles and leather industry", Oradea, Romania, 2012, Annals of the University of Oradea fascicle of textiles, Leatherwork, Vol. XIII, **2012**, No. 1, 226-229, ISSN 1843–813X.
 15. Deselnicu, V., Crudu, M., Ioannidis, I., Deselnicu, D.C., Approaches to reducing heavy metal discharges in tannery effluent, The 3rd International Conference on Industrial and Hazardous Waste Management CRETE 2012, Chania, Crete, **2012**.
 16. Liu, Y. et al., An Environmentally Friendly Leather-Making Process Based on Silica Chemistry *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **2010**, 105.
 17. Platon, F., Deselnicu, V., Crudu, M., Albu, F.L., Patent RO 123001 B1, **2010**, Process for treating animal raw hides.
 18. Roig, M., Segarra, V., Bertazzo, M., Martinez, M.A., Ferrer, J., Raspi, C., Chrome-free leather, tanned with oxazolidine, Proceedings of XXXI IULTCS Congress, Valencia, **2011**.
 19. Deselnicu, V., Crudu, M., Albu, L., Deselnicu, D.C., Crudu, A.M., RO Patent appl. No. A00212/**2014**, Organic tanning for obtaining wet-white leather.
 20. Crudu, M., Deselnicu, V., Ioannidis, I., Deselnicu, D.C., Crudu, A.M., Patent RO 127529B1 - Tanning Composition and process for tanning bovine hides, **2013**.

Article received/Data primirii articolului: 23.05.2014

Accepted/Acceptat la data: 16.06.2014