# Djelovanje gama zračenja na fungalne kolonizatore celuloznih materijala

**Šarić, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:919559

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

**Katarina Šarić**

# Djelovanje gama zračenja na fungalne kolonizatore celuloznih materijala

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na predmetu Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr.sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu i ukazanom strpljenjute dr. sc. Branki Mihaljević na suradnji i ozračivanju uzoraka. Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju na ljubaznosti i pomoći. Konačno, zahvaljujem se svojoj obitelji na potpori i povjerenju.

**SADRŽAJ**

1 UVOD ..... 1

1.1 Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine ..... 1

1.2 Gama zračenje ..... 6

1.3 Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine ..... 6

2 OBRAZLOŽENJE TEME ..... 9

3 MATERIJALI I METODE ..... 10

3.1 Ispitivanje sastava prirodne mikobiote na platnu i papiru metodom razrjeđenja ..... 10

3.2 Inokulacija platna i papira odabranim plijesnima ..... 11

3.3 Zračenje uzoraka ..... 11

4 REZULTATI I RASPRAVA ..... 13

5 ZAKLJUČAK ..... 20

6 LITERATURA ..... 21

7 SAŽETAK/ SUMMARY ..... 24

# 1 UVOD

## 1.1 Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine

Kulturna baština definira se kao pojam koji obuhvaća svu duhovnu i materijalnu produkciju pojedinca ili skupine. Ona govori o identitetu, povijesti i kulturi naroda. Vrijednost kulturne baštine je nemjerljiva, stoga je opravdan povećani interes za razvoj metoda koje se koriste u svrhu njezina očuvanja(Garg i sur., 1995). U predmete kulturne baštine svrstavaju se arheološka pronalazišta, pa i ona podvodna, građevine, ali i skulpture i spomenici, slike, zapisi i ostalo. Svi su ovi predmeti izloženi različitim okolišnim čimbenicima koji dovode do njihovog oštećenja i propadanja. Dugi niz godina je smatrano da su fizički i kemijski procesi glavni uzročnici tih nepovoljnih promjena, međutim, u zadnjih nekoliko desetljeća sve se veća važnost pridaje bakterijama i plijesnima kao glavnim uzročnicima propadanja (Sterflinger i Piñar, 2013).

Plijesni su pripadnicicarstva gljiva, široko rasprostranjeni u okolišu. Nalazi ih se u zraku, zemlji, vodi, životinjama i bijkama, ali i koži i sluznicama čovjeka, gdje su dio fiziološkog mikrobioma(Volner i sur., 2005.). Plijesni su višestanični organizmi izgrađeni od cjevastih stanca koje čine hife. Hife su nitaste strukture koje isprepletanjem tvore micelij. Plijesni mogu tvoriti spolne i nespolne spore čija je uloga razmnožavanje, širenje i zaštita vrste od štetnih okolišnih uvjeta. Naime, spore plijesni vrlo su otporne na uvjete pri kojima se uništavaju vegetativne stanice (Duraković, 1991).

Pokazalo se da bakterije i plijesni djeluju iznimno destruktivno na predmete kulturne baštine zbog svoje mogućnosti da prodiru duboko u materijal gdje dovode do korozije, enzimatske razgradnje i mehaničkog oštećenja, a naposlijetku i do potpunog gubitka materijala (Sterflinger i Piñar, 2013). Važno je napomenuti kako su plijesni uglavnom saprofitni organizmi te su zajedno s bakterijama izuzetno važne za razgradnju i kruženje organske tvari u prirodi (Duraković, 1991). Stoga ne iznenađuje njihovo nastanjivanje na predmetima kulturne baštine koji su izgrađeni, ili su dorađivani tvarima organskog podrijetla.

Kamene podloge npr. građevina, spomenika, zidova špilja i katakombi se zbog siromašnog sadržaja hranjivih tvari i izloženosti promjenjivoj okolini (promjene vlažnosti i direktno UV zračenje) (Sterflinger, 2010) na prvi pogled čine nepovoljnima za rast mikroorganizama.

Međutim, i one su u opasnosti od propadanja pod utjecajem plijesni. Plijesni nastanjuju građevinske materijale- beton, mort, mramor i druge, na njihovoj površini, ali i u porama bez obzira na klimatske uvjete(Sterflinger, 2010). Tako u umjerenim ili vlažnim klimatskim područjima prevladavaju plijesni koje se i inače mogu naći u zraku i koje u porama kamena formiraju micelije, dok se u sušim klimama bilježi porast samo onih plijesni koje mogu rasti u takvim ekstremnim uvjetima, kao što su crne plijesni. Upravo su crne plijesni poznate kao vrlo erozivne plijesni koje u kamenu, mramoru i granitu formiraju udubljenja promjera i do dva centimetra (Sterflinger i Piñar, 2013).

Još jedan važan oblik umjetničkih djela predstavljaju zidne slike koje ukrašavaju brojne crkve, kapelice, dvorce itd. Ove građevine predstavljaju poluzatvorenu, jedinstvenu i relativno stabilnu okolinu koja je zato povoljnija za razvoj mikroorganizama (Gorbushina i sur., 2004). Naime, brojnost različitih mikroorganizama, koji na površini zidnih slika stvaraju biofilm, podržava njihov međusoban rast. U takvim uvjetima, neke plijesnikoriste kao izvor hranjivih tvari isključivo stanične stijenke algi i cijanobakterija (Gorbushina i Peterson, 2000). Plijesni mogu preživljavati i zahvaljujući hranjivim tvarima nakupljenim u slojevima prašine, ali ikoristeći sastavne dijelova slika kao izvor ugljika što dovodi do propadanja materijala. Osim ovih oštećenja, hife plijesni prodirući u dublje slojeve naposlijetku dovode do nastanka pukotina, dakle dovode do fizičkog oštećenja (Garg i sur.., 1995).

Kako bi plijesni rasle moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti- prisutnost spora plijesni, izvor hranjivih tvari, dovoljna količina vlage, odgovarajuća temperatura za određenu vrstu plijesni i ograničeno strujanje zraka (Longin, 2015). Ljudi (posjetitelji ili zaposelnici muzeja, arhiva...) su česti prijenosnici spora različitih plijesni, iako spore mogu biti nošene i strujom zraka do predmeta (Sterflinger, 2010). U slikarstvu, ali i prilikom izrade ostalih umjetnina, koriste se brojni materijali organskog podrijetla (Gorbushina i Petersen, 2000; Sterflinger, 2010). Materijali biljnog i životinjskog porijekla se koriste čak i danas u procesu restauracije (Sterflinger, 2010), a kroz povijest su se umjetnička djela izrađivala gotovo isključivo uporabom prirodno dobivenih materijala. Boje su dobivane iz biljnih (indigo, broćevina...) i životinjskih materijala (purpurno crvena dobivena vađenjem sokova iz jedne vrste puževa, indijsko žuta dobivena od mokraće krava koje se hrane lišćem manga...) (Fressl, 1966). Veziva su vrlo važna u slikarskoj tehnologiji i ona najbolja i najčešće korištena bila su životinjskog porijekla. Tako su se vrlo često koristila veziva od žutanjka, bjelanjka ili cijelog jaja, poznata kao jajčane tempere, pa i škrob, mlijeko, tutkalo (koštano i kožno) poznato i kao životinjsko ljepilo koje je po sastavu zgusnuti kolagen dobiven kuhanjem i služi kao snažno

vezivo za drvo i platno (Fressl, 1966; Pavela-Vrančič i Matijević, 2010). Umjetnička djela ukrašavana su kožnim predmetima, tekstilom, glinom, korištena su ljepila izrađena od zečje kože i celuloze a zlatni ukrasi ljepili su se za drvenu podlogu ljepilima baziranim na lanenenom i terpentinskom ulju (Sterflinger, 2010). Sposobnost plijesni da izlučuju brojne enzime- celulaze, fenolaze, keratinaze, monooksigenaze i mnoge druge omogućuje im razgradnju svih ovih materijala (Sterflinger, 2010). Dakle, može se zaključiti da predmeti kulturne baštine predstavljaju znatan izvor nutrijenata i povoljna su podloga za rast plijesni. Stoga, vrlo je važno osigurati da ostali okolišni čimbenici u mjestima pohrane predmeta kulturne baštine ne podržavaju njihov rast. U muzejima, galerijama, arhivima i knjižnicama ključna je kontrola dva okolišna čimbenika- relativne vlažnosti i temperature, iako su vrlo važni uvjeti i prisutnost sunčeve svjetlosti, prisutnost anorganskih i organskih onečišćenja, ali i svojstva same podloge (Lavin i sur., 2014). Sterflinger (2010) i Nielsen (2003) zaključuju da je čak i u prostorima u kojima je zabilježena vrlo niska relativna vlažnost (koja pogoduje samo kserofilnim plijesnima) zbog postojanja lokalnih razlika u ventilaciji i temperaturi površina, dolazi do stvaranja mikroklimatskih uvjeta pogodnih za rast plijesni. Stoga je zaključeno da je aktivitet vode, $a_w$, bolja veličina za predviđanje rasta plijesni od relativne vlažnosti(Lavin i sur., 2014; Montegut i sur., 1991; Nielsen, 2003; Sterflinger, 2010). Aktivitet vode- $a_w$ je fizikalno- kemijska veličina koja pokazuje koliki je sadržaj vode fizički vezan u samom materijalu i pokazatelj je količine vode koja je mikroorganizmu zaista na raspolaganju (Duraković, 1991). Definira se kao omjer parcijalnog tlaka vodene pare u materijalu i tlaka zasićene pare čiste vode pod istim uvjetima te za čistu destiliranu vodu iznosi 1(Pitt i Hocking, 2009). Plijesni se dijele s obzirom na $a_w$ u tri skupine- primarne kolonizatore koji rastu pri $a_w < 0,8$ (kserofilne vrste), sekundarne kolonizatore koji rastu pri $a_w$ između 0,8 i 0,9 i tercijarne kolonizatore koji rastu pri $a_w > 0,9$ (hidrofilne vrste). U primarne kolonizatore se prije svega svrstavaju vrste *Penicillium chrysogenum* te *Aspergillus versicolor*, ali i vrste *A. fumigatus, A. niger, Eurotium* spp., dok su sekundarni kolonizatori različite vrste rodova *Alternaria, Cladosporium, Phoma* i *Ulocladium*, a tercijarni *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., *Epicoccum* spp., *Stachybotrys chartarum*(Nielsen, 2003; WHO, 2009). Iako je važno održavati relativnu vlažnost ispod 55%, bitno je imati na umu mikroklimatske uvjete koji se stvaraju u pojedinim dijelovima prostorije te kontrolirati strujanje zraka i promjene temperature koje se svakodnevno događaju (Sterflinger, 2010). Još jedan razlog zašto su upravo relativna vlažnost i aktivitet vode ključni faktori koji se u prostorima pohrane predmeta kulturne baštine moraju strogo kontrolirati je što su podloge umjetničkih djela higroskopni materijali. Primjerice, celuloza, gradivni element papira i

platna, je linearni polimer u kojem su molekule glukoze povezane β(1,4)- glikozidnom vezom (Montegut i sur., 1991; Pavela-Vrančič i Matijević, 2010). Celuloza je netopljiva u vodi, ali zbog velikog broja –OH skupina ima veliki afinitet za vodu te veže vodu iz atmosfere do postizanja ravnoteže- sadržaj vode kod 50% relativne vlažnosti je 6%, a kod 100% vlažnosti je 22% (Pavela-Vrančič i Matijević, 2010). Neke vrste roda *Aspergillus* i *Penicillium* imaju sposobnost rasta na podlozi sa sadržajem vlage već od otprilike 7-8%, koji je prisutan u nekim vrstama papira već pri relativnoj vlažnosti od 62-65% (Lavin i sur., 2014; Longin, 2015). Osim dovoljno vlage plijesnima su za rast potrebeni elementi u tragovima kao što su željezo, cink, bakar, magnan, ponekad i kalcij, a većinu ovih elemenata osigurava upravo celuloza (Longin, 2015).

Plijesni koje su najčešće izolirane s papirne građe, ali i slikarskih platna su vrste rodova *Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Paecilomyces* i *Chrysosporum*(Sterflinger i Piñar, 2013; Vukojević i Grbić, 2010). Mnoge vrste ovih rodova imaju sposobnost izlučivanja celulaze- enzima koji razgrađuje celulozu do manjih topljivih jedinica koje plijesni koriste kao hranu, ali i omogućuje prodiranje hifa u dublje slojeve materijala (Garg i sur., 1995; Montegut i sur., 1991). Osim izlučivanjem celulaze, plijesni papir i platno oštećuju i na druge načine. „Foxing“ je fenomen koji se očituje pojavom smećkasto- crvenih mrlja na papiru i platnu. Iako priroda ovog fenomena nije u potpunosti razjašnjena, novija istraživanja upućuju da su mrlje rezultat aktivnosti plijesni te su brojne vrste plijesni izolirane s tzv. foxing mrlja (Lavin i sur., 2014; Longin, 2015). Produkti ekstenzivnog metabolizma plijesni su kiseline kao što su limunska, oksalna, glukuronska i druge koje potiču razgradnju glikozidne veze u građi celuloze zbog čega papir postaje žut, krt i gubi elastičnost, a niži pH papira pogoduje sekundarnom rastu plijesni (Garg i sur., 1995; Pavela-Vrančič i Matijević, 2010). Osim kiselina, plijesni izlučuju obojene metaboličke produkte. Radi se o organskim pigmentima kao što su antrakinoni, karotenoidi i drugi, koji dovode do pojave različito obojenih mrlja. Kada nastanu, ove mrlje su praktički neuklonjive (Garg i sur., 1995). Do obojenja papira može doći i zbog prisustva pigmenta u miceliju, a prodiranjem micelija u vlakna papira dobiva se dojam potpune obojenosti. Neke vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* mogu uzrokovati i blijeđenje tinte djelovanjem enzima tanaze koji katalizira hidrolizu galotanata iz tinte (Longin, 2015).

Vrlo je važno istaknuti kako plijesni u muzejima, arhivima, knjižnicama mogu utjecati i ugroziti ljudsko zdravlje, a najugroženiji su dakako zaposelnici ovih institucija. Većina vrsta koje su izolirane s predmeta kulturne baštine su česti alergeni, a neki su potencijalni

proizvođači mikotoksina. *Cladosporium* i *Penicillium* vrste poznati su kao uzročnici astme, dok su članovi roda *Aspergillus* uzročnici bolesti poznatih kao aspregiloze i mogu znatno ugroziti imunokompromitirane bolesnike. Mnoge od ovih plijesni povezuju se i sa „sindromom bolesne zgrade" (Vukojević i Grbić, 2010).

Kako bi se sačuvali predmeti kulturne baštine važna je kontrola aktivno rastućih plijesni, ali je također bitno smanjiti broj prisutnih spora koje mogu dugo preživjeti u slojevima prašine čekajući povoljne uvjete za rast (Sterflinger i Piñar, 2013). Za dezinfekciju predmeta kulturne baštine dostupan je ograničen broj kemijskih i fizikalnih procesa. U kemijske postupke dezinfekcije ubrajaju se različiti tekući i plinoviti biocidi. Zbog ograničenih podataka o dugotrajnom utjecaju i kompatibilnosti biocida sa sastavnicama umjetničkih djela samo se ograničen broj upotrebljava u procesima restauracije, unatoč popriličnom broju dostupnih vrsta. Neki od najčešće upotrebljavanih su biocidi koji otpuštaju formaldehid, kvarterni amonijevi spojevi, izotiazolinon i etanol koji također djeluje toksično na plijesni ukoliko se ostavi u kontaktu s površinom nekoliko minuta (Sterflinger i Piñar, 2013). Još jedno kemijsko sredstvo sterilizacije je etilenoksid, plin koji alkilirajući DNA, RNA i proteine sprječava razmnožavanje mikroorganizama i zaustavlja njihov metabolizam. Najveći nedostatak etilenoksida je njegova toksičnost i karcinogenost te dugotrajnost postupka zbog obaveznog otplinjavanja (Michaelsen i sur., 2013). Osim ovih kemijskih koriste se i fizikalne metode od kojih je najvažnije gama zračenje opisano u nastavku teksta. Liofilizacija ili sušenje u vakuumu zamrzavanjem je metoda koja se ne može svrstati u metode sterilizacije, ali je važna metoda konzervacije, posebno u uvjetima u kojima je potrebno hitno odstraniti veliku količinu vlage iz materijala (uslijed poplava i sličnih prirodnih neprilika) (Michaelsen i sur., 2013; Kozjak, 2010). Ubrzo nakon močenja, dokumenti i knjige zamrzavaju se i drže u zamrzivaču na otprilike -30ºC čime se onemogućavaju bilo kakve fizičke, kemijske ili biološke promjene na njima. Tako zamrznuto gradivo može godinama čekati odgovarajuće uvjete i mogućnosti za restauriranje. Voda se iz materijala odstranjuje sublimacijom i ukoliko se pravilno koristi, ova metoda rezultira minimalnim oštećenjem materijala (Kozjak, 2010). Nedostatak metode je što smrzavanje povećava poroznost organskih materijala što ih može učiniti još higroskopnijima (Michaelsen i sur., 2013). Bitno je naglasiti kako je podcijenjena važnost jednostavnih fizičkih preventivnih metoda kao što je redovito čišćenja predmeta i kontrola okolišnih parametara, a koje gotovo u potpunosti mogu spriječiti aktivni rast plijesni (Sterflinger i Piñar, 2013). Također, mikolozi svojim znanjem i savjetovanjem znatno mogu pomoći kustosima muzeja i ostalim osobama odgovornim za čuvanje predmeta kulturne

baštine (Sterflinger, 2010). Takva suradnja bi se trebala omogućiti u što većem broju muzeja i arhiva kako bi zajedničko znanje omogućilo što kvalitetnije očuvanje ovih vrlo vrijednih predmeta.

## 1.2 Gama zračenje

Zračenje ili radijacija je pojava prijenosa energije u obliku fotona (elektromagnetsko zračenje) ili čestica (korpuskularno zračenje). Radionuklidi ili radioizotopi su nestabilni izotopi koji prilikom raspada emitiraju ionizirajuće zračenje u obliku brzih čestica (alfa, beta raspad) ili fotona visokih energija (gama raspad), odnosno, kažemo da su radioaktivni. Alfa zračenje roj je α- čestica, tj. ioniziranih atomskih jezgri helija (sastoje se od dva protona i dva neutrona), a β- zračenje roj elektrona ili pozitrona koji postižu velike brzine. Gama zračenje čine elektromagnetski valovi valnih duljina kraćih od $10^{-13}$ m. Prema porijeklu radionuklida razlikujemo prirodnu radioaktivnost (emitiranje iz radionuklida koji postoje u prirodi ili prirodno nastaju) i umjetnu radioaktivnost (emitiranje iz umjetno stvorenih radionuklida i njihovih nestabilnih potomaka). U prirodi postoji otprilike 60 nestabilnih nuklida, a čovjek ih je posljednih desetljeća umjetnim putem stvorio više od 2 000 (Jakobović, 1991).
Mnogi radioizotopi našli su bitno mjesto u industriji, ali i medicini gdje se koriste u svrhu dijagnosticiranja i liječenja bolesti, ali i sterilizaciji medicinskih predmeta. Kobalt- 60 ($^{60}$Co) je jedan od upotrebljavanih izvora u medicini, prehrambenoj industriji i drugim tehnologijama. S obzirom na porast broja institucija i postrojenja koja koriste energiju kobalta- 60 za različite gospodarstvene svrhe, ali i druge izvore zračenja, posebno je važno osigurati pravilno zbrinjavanje radioaktivnog otpada. Izvor kobalta može se upotrebljavati desetak godina, nakon čega ga treba nadopuniti. Izotop kobalta-60 imapoluživot od 5,7 godina (International Atomic Energy Agency, 2011).

## 1.3 Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine

Gama zračenje, kao što je već rečeno, učinkovita je metoda sterilizacije odnosno mikrobiološke dekontaminacijekoja je zbog mnogo razloga pogodna za uklanjanje brojnih mikroorganizama s predmeta kulturne baštine. Zračenje ionizacijom direktno oštećuje staničnu DNA uzrokujući brojne mutacije što naposlijetku dovodi do smrti stanice. Također, zračenje i neizravno oštećuje DNA tako što dovodi do radiolize intracelularne tekućine i

stvaranja reaktivnih kisikovih atoma, slobodnih radikala i peroksida (da Silva i sur., 2006). Prednosti gama zračenja su brojne: tretman ne predstavlja opasnost za operatera jer se provodi u odvojenoj i dobro zaštićenoj prostoriji; na zračenim predmetima ne zaostaju radioaktivni rezidui pa predmeti ne predstavljaju rizik za restauratore, kuratore, posjetitelje i okolinu; dobra moć penetracije omogućuje prodiranje u sve slojeve predmeta; učinkovitost je proporcionalna korištenoj dozi, parametru koji se lako kontrolira i određuje; stabilnost radijacijksog polja osigurava pouzdanost metode; moguće je istovremeno ozračiti veliki broj predmeta; tretman se u industrijskim postrojenjima izvodi u kratkom vremenu, a i troškovi metode su prihvatljivi (Ponta, 2008). Istovremeno, najveći nedostatak gama zračenja je što njegova interakcija s bilo kojom tvari može uzrokovati promjenu njezinih kemijskih i fizičkih svojstava. Promjene su proporcionalne dozi zračenja, a učinci su kumulativni pa se ponavljani tretmani moraju razmotriti s velikim oprezom (Ponta, 2008). Zračenje papira i platna dovodi do oštećenja polimerne strukture celuloze što se očituje kao ubrzano starenje papira koji poprimi žutu boju i postaje krt i lomljiv (Michaelsen i sur., 2013; Sterflinger i Piñar, 2013). Autori se slažu da se većina plijesni može uspješno ukloniti dozom od 10 kGy, dok je već 500 Gy dovoljno za uklanjanje ličinki kukaca (Manea i sur., 2012). Nadalje, nekoliko je istraživanja potvrdilo da doza od 10 kGy ne dovodi do značajnog oštećenja npr. papira (da Silva i sur., 2006; Gonzalez i sur., 2002) kao i ostalih tipičnih i starenih materijala (Pucić i sur., 2014). Gonzales i suradnici (2002) su uzorke, zračene dozom 10 kGy, i nezračene kontrole podvrgnuli istom procesu ubrzanog starenja te nisu zabilježili značajne razlike u svojstvima ozračenih papira i neozračenih kontrola. Nadalje, istraživan je i utjecaj gama zračenja na pigmente i boje (Marušić i sur., 2015). Ozračivanje dovodi do promjena u pigmentima koji se koriste u izradi slikarskih djela, međutim, teško je odrediti dolazi li do promjena zbog samih pigmenata ili zbog nečistoća koje su u njima sadržane(Negut i sur., 2012). Budući da je oštećenje materijala gama zračenjem proporcionalno korištenoj dozi, potrebno je odrediti koje doze i brzine su najpovoljnije za različite vrste predmeta i plijesni. Da Silva i suradnici (2006) uspješno su dozom od 16 kGy uklonili plijesni sa uzoraka kontaminiranih knjiga. Autori zaključuju da nema potrebe za korištenjem viših doza od 20 kGy čak ni za uklanjanje otpornijih plijesni kao što su *Cladosporium spp*. koje su prisustvom melanina u miceliju zaštićeni od ekstremnijih uvjeta. Također, navode da manje brzine zračenja (2,8 Gy/h), odnosno duža izloženost zračenju uzrokuje veću indirektnu štetu jer je vrijeme zračenja dovoljno za odvijanje oksidativne razgradnje polimerne strukture celuloze. U svom istraživanju su da Silva i suradnici (2006) dokumente nakon zračenja ostavili dva mjeseca u prirodnim uvjetima. Porast plijesni je na dokumentima zračenim dozama 3 i 10

kGy odgovarao porastu plijesni na kontrolama, dok je uzorak ozračen dozom 16 kGy i dalje bio sterilan. Ovakav rezultat objašnjen je činjenicom da je veća doza od 16 kGy dovela do strukturnih promjena papira koje su onemogućile rast plijesni čak i u pogodnim klimatskim uvjetima.

Manea i suradnici (2012) spektroskopskim su metodama proučavali utjecaj zračenja na drvene obojene predmete. Dobiveni su FTIR spektri uzoraka te su uspoređivani s literaturnim spektrima materijala korištenih u obradi drvenih predmeta- pigmenata, žutanjka i prašine. Uzorci su zračeni dozom od 11 kGy i dvjema brzinama doze. Usporedba spektara pokazuje veće strukturne promjene kada je korištena veća brzina doze, stoga autori preporučuje uporabu manjih brzina zračenja prilikom dezinfekcije.

Iako je učinkovitost gama zračenja u uklanjanju mikroorganizma, pa tako i plijesni i njihovih spora (Sterflinger i Piñar, 2013) neupitna i dalje postoji oprez kod uporabe ove metode u svrhu očuvanja predmeta kulturne baštine. Mogući razlog je nedovoljan broj studija s konzistentnim podacima koji upućuju naprimjenu određene doze i brzine doze zračenja za pojedinu vrstu materijala. Nedostatak studija, koji onemogućava njihovu usporedbu, je i korištenje različitih metoda za detekciju porasta plijesni. Michaelsen i sur. (2013) upućuju na superiornost molekularnih metoda nad klasičnim mikrobiološkim metodama identifikacije (kultivacija na hranjivim podlogama).

Unatoč zabilježenim uspjesima u očuvanju različitih predmeta kulturne baštine, kao što je mumija Ramzesa II. koja je sačuvana od napada plijesni i ličinki kukaca, gama zračenje u ovom području ostaje metoda rezervirana za posebne slučajeve kao što su hitna stanja, intervencije potrebne zbog složenosti strukture, kada se klasične metode ne mogu primijeniti ili kada su potrebne intervencije na velikim objektima(Ponta, 2008).

# 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Plijesni su mikroorganizmi koji su, između ostalog, rašireni i na predmetima kulturne baštine. Oni predstavljaju povoljnu podlogu za njihov rast, posebice u uvjetima veće vlažnosti koji se pojavljuju uslijed neispravnog skladištenja ili u eksterminim uvjetima kao što su poplave i druge prirodne nepogode.U takvim uvjetima plijesni ne samo da mogu dovesti do propadanja materijala, već zbog brojnosti i proizvodnje mikotoksina mogu ugroziti ljudsko zdravlje. Gama zračenje je metoda koja vrlo djelotvorno uklanja aktivno rastuće plijesni, ali i njihove spore čime se sprječava ponovni porast plijesni na podlogama. Međutim,ako se zračenje primjeni ne vodeći računa o vrsti plijesni i prirodi materijala koji se ozračuje, ono može naposlijetku dovesti do promjena u strukturi materijala koje će ubrzati njegovo starenje i propadanje.

Ne postoji dovoljan broj studija iz kojih bi se jednoznačno moglo zaključitikoju dozu i brzinu doze zračenja odabrati za različite vrste materijala i plijesni. Rezultati ovog rada pomoći će daljnjem razvoju korištenja gama zračenja za dekontaminaciju predmeta izrađenih od papira i lanenog platna obrađenog tutkalom, izabranih zbog učestale primjene u izradi umjetničkih djela.

Ciljevi rada uključuju:

1. Analizirati prirodnu mikobiotu papira i platna obrađenog tutkalom
2. Proučiti utjecajgama zračenja kod doze od 2 kGyidvije brzinedoze (0, 98 Gy/s i 9,8 Gy/s)na prirodnu mikobiotu ovih materijala, ali i na odabrane vrste plijesni kojima su uzorci namjerno kontaminirani. Odabrani su *Aspergillus jensenii* kao predstavnik primarnih kolonizatora, *Cladosporium sphaerospermum*, sekundarni kolonizator i *Trichoderma harzianum*, predstavnik tercijarnih kolonizatora.

# 3 MATERIJALI I METODE

## 3.1 Ispitivanje sastava prirodne mikobiote na platnu i papiru metodom razrjeđenja

Pripremljeni su komadići papira i platna obrađenog tutkalom, dimenzija 3,5 x 3,5 cm (Vergè beskiselinski trajni papir dimenzija 70 x 100 cm, gramature 100 g/m$^2$; laneno platno obrađeno tutkalom- zagrijanom otopinom kolagena izbubrenog u destiliranoj vodi). Vaganjem se odredi prosječna masa papira ($\overline{m} = 0{,}15\ g$) i platna ($\overline{m} = 0{,}39\ g$). U sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu (tzv. falkonicu) stave se priređeni kvadratići papira i platna i 3 mL (papir), odnosno 4 mL (platno) peptonske vode što predstavlja razrjeđenje $10^{-1}$. Uzorci se miješanjem homogeniziraju i priređuju se razrjeđenja u serijalnom nizu od $10^{-1}$ do $10^{-4}$. Iz svakog priređenog razrijeđenja na površinu sterilne hranjive podloge (Malt ekstrakt agar-MEA) u Petrijevoj zdjelici nanese se 100 µL uzorka i sterilnim staklenim štapićem (tzv. L-štapić) razmaže po površini MEA podloge. Uzorci se inkubiraju 5 do 7 dana na temperaturi od 25 ° C. Na opisani način obrađena su četiri kvadratića papira i platna uzeta sa različitih dijelova ukupne površine.

Nakon perioda inkubacije na pločama se broje porasle kolonije pri čemu se ne uzimaju u obzir razrjeđenja na kojima je porast veći od 150 kolonija.

Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g) se računa po formuli:

$$CFU/g = \frac{\Sigma C}{V(n1 + 0{,}1n2)d}$$

ΣC- zbroj kolonija plijesni izbrojenih na svim pločama

V- volumen inokuluma u mililitrima, stavljen na svaku hranjivu podlogu

n1- broj ploča zadržanih za brojanje kod prvog razrjeđenja

n2- broj ploča zadržanih za brojanje kod drugog razrjeđenja

d- razrjeđenje iz kojeg su dobiveni prvi brojevi

## 3.2 Inokulacija platna i papira odabranim plijesnima

Odabrani predstavnici primarnih- *Aspergillus jensenii*, sekundarnih- *Cladosporium spaherospermum*i tercijarnih kolonizatora- *Trichoderma harzianum* inokulirane su na MEA podlogu te su nakon 10 dana inkubacije na 25° C iz poraslih sporulirajućih kultura priređene suspenzije u peptonskoj vodi. Za određivanje koncentracije spora/ dijelova micelija u mililitru peptonske vode korišten je Bürker-Türk hemocitometar. Odabrane vrste plijesni priređene su u koncentraciji približno $5x10^4$/mL, odnosno inokuliarne su na kvadratiće papira i platna u koncentraciji približno $1\text{-}2x10^4$/g. Osim inokulacije svake plijesni zasebno, pripremila se i mješavina sva tri kolonizatora u omjeru 1:1:1. Uzorci se pripreme na način da svaka Petrijeva ploča sadrži papir ili platno u duplikatu i uz rub, tako da ne dodiruje uzorke papira i platna, smješten komadić vate. Vata se natopi s nekoliko mililitara sterilne vode što osigurava održavanje vlažnosti u sustavu. Uzorci se inkubiraju 7 dana na 25° C pri čemu se pomoću higrometra kontrolira vlažnost zraka od 75%.

Uzorci se odjeljuju u dvije skupine: oni koji se analiziraju metodom razrijeđenja neposredno nakon inkubacije i oni koji se istom metodom analiziraju 0., 7., 14. i 28. dan nakon ozračivanja.

## 3.3 Zračenje uzoraka

Uzorci su zračeni na Institutu Ruđer Bošković,u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju na panoramskom uređaju sa $^{60}$Co izvorom gama zračenja. Za dozimetrijsko mjerenje koristio se kemijski dozimetar na bazi etanol-klorobenzena (ECB) (Ražem i sur., 1984). Temperatura komore za ozračivanje je bila oko 18° C.Obrada materijala ionizirajućim zračenjem se provodi u skladu s nacionalnim pravilnikom (Narodne novine br. 046/1994) i međunarodnim propisima ISO standardom (International Organization for Standardisation), ISO 13485:2003, Medical devices –QMS-Requirements for regulatory purposes, slijedeći metodu ISO 11137-1: 2006, Sterilization of Health Care Products – Radiation. Dozimetrijska mjerenja provode se kako bi se pokazalo da su preporučene i određene doze zračenja ispravno predane materijalu izloženom zračenju prema unaprijed utvrđenim doznim mapama. Za dozimetrijska mjerenjaširoko je prihvaćen u radijacijskim tehnologijama i koristi se u svijetu sekundarni i rutinski kemijski ECB dozimetar (ISO/ASTM 51538). LRKD je jedini laboratorij u Hrvatskoj koji se bavi fundamentalnim istraživanjima u radijacijskoj kemiji i

dozimetriji i koji je razvio ovaj svjetski priznati standardni dozimetar za dozimetriju visokih doza.

Doza zračenja iznosila je 2 kGy,dio uzoraka zračilo se sa brzinom doze 0,1 Gy/s, a dio sa 9,8 Gy/s.

Nakon zračenja, uzorci su inkubirani na 25 °C te metodom razrijeđenja analizirani 0., 7., 14., i 28. dan nakon zračenja. Sva su mjerenja napravljena u duplikatu, a rezultati vijabilnosti plijesni prije i nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g, kako je opisano u poglavlju 3.1.

# 4 REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 1. Prikaz prirodne mikobiote platna i papira

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | |
|---|---|---|
| | PLATNO | PAPIR |
| *Alternaria* spp. | 1818,18 | 100 000 |
| *Aspergillus* spp. | 1000 | 2000 |
| *Cladosporium* spp. | 1409,09 | 2727,27 |
| *Fusarium* spp. | 1545,45 | 3022,73 |
| *Penicillium* spp. | 1818,18 | - |
| *Rhizopus* spp. | - | 1000 |
| Ostale plijesni | 1909,09 | 39318,18 |

Tablica 2. Porast prirodne mikobiote platna i papira nakon 7 dana inkubacije na 25°C pri Rv od 75%

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | |
|---|---|---|
| | PLATNO | PAPIR |
| *Alternaria* spp. | - | 6000 |
| *Aspergillus flavus* | 84000000 | - |
| *Aspergillus niger* | 10163636,37 | - |
| *Aspergillus* spp. | 30000 | - |
| *Cladosporium* spp. | 484000 | 6000 |
| *Fusarium* spp. | - | - |
| *Penicillium* spp. | 40268181,82 | 50500 |
| Kvasci | 87000000 | 500500 |

Tablice 1 i 2 prikazuju rezultate mikološke analize platna i papira nakon 7 dana inkubacije na 25° Cpri relativnoj vlažnosti, Rv= 75 %. Primijećen je porast različitih vrsta plijesni na platnu ipapiru prije i poslije inkubacije što dokazuje da ukupna površina papira i platnakorištena za pripremu uzoraka nije jednoliko nastanjena plijesnima, odnosno, radi se o tzv. točkastoj

kontaminaciji. Dakle, kvadratići papira i platna korišteni u eksperimentunisu homogeno kontaminirani istim vrstama ni brojem plijesni. To potvrđuje porastvrsta *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. čiji je broj od otpilike $10^3$ CFU/g zabilježen u uzorcima prije inkubacije, dok u uzorcima nakon sedmodnevne inkubacije, na 25°C pri 75% Rv,nisu detektirane. Nadalje, porast kvasaca nije zabilježen u uzorcima prije inkubacije, ali su oni u značajnom broju (>$10^4$ CFU/g) porasli na uzorcima koji su inkubirani.

Također, vidljivo je kako je porast plijesni prije sedmodnevne inkubacije, na 25°C pri 75% Rv, brojčano podjednak na platnu i papiru(~$10^3$, odnosno $10^4$ CFU/g) te da su sve plijesni podjednako rasprostranjene na platnu (~$10^3$CFU/g), dok na papiru prevladava*Alternaria* spp.($10^5$ CFU/g). Međutim, nakon inkubacije bilježi se znatno veći porast na uzorcima platna (~$10^6$ CFU/g) u usporedbi s rastom na papiru (~$10^4$ CFU/g). Mogući razlog ovog nepodudarnog rasta je taj što je platno prethodno obrađeno tutkalom, materijalom životinjskog porijekla kojeg plijesni u povoljnim uvjetima mogu koristiti kao izvor hranjivih tvari što dodatno podržava njihov rast.

Tablica 3. Porast inokuliranih plijesni na uzorcima platna i papira nakon 7 dana inkubacije na 25°C pri Rv od 75%

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | |
|---|---|---|
| | PLATNO | PAPIR |
| *Aspergillus jensenii* | 7500000 | 440909,1 |
| *Cladosporium sphaerospermum* | 81818,2 | 4545,5 |
| *Trichoderma harzianum* | 4077272,8 | 90909,1 |

Rezultati zabilježeni za porast vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, prikazani tablicom 3, također pokazuju veći porast plijesni na platnu, nego na uzorcima papira. Odstupanje od toga pokazuju rezultati dobiveni za *Cladosporium sphaerospermum*, međutim rast ove vrste možda je bio ograničen porastom brojnijih vrsta prirodne mikobiote.

Tablica 4. Porast prirodne mikobiote na **platnu** nakon gama zračenja dozom 2 kGy kod brzine doze od 0,1 i 9,8 Gy/s.

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0. dan | | 7. dan | | 14. dan | | 28. dan | |
| | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s |
| *Alternaria* spp. | 4500 | 1000 | - | - | 200000 | 80863,64 | 5954,55 | 6606,06 |
| *Aspergillus flavus* | - | - | - | - | 34090,91 | - | 18515,15 | 6450000 |
| *Aspergillus fumigatus* | - | - | - | - | 20000 | - | - | - |
| *Aspergillus* spp. *(Nigri)* | - | - | - | - | 10000 | - | - | - |
| *Aspergillus* spp. | - | - | - | - | - | - | 100 000 | - |
| *Cladosporium* spp. | 7600 | 2166,67 | 210000 | - | 253636,37 | 830000 | 914727,27 | 1328863,64 |
| *Epicoccum* spp. | - | - | - | - | 1818,18 | - | - | - |
| *Fusarium* spp. | - | - | - | - | 151363,64 | 1750 | - | 39575,76 |
| *Mucor* spp. | - | - | - | - | - | - | 2000 | - |
| *Penicillium* spp. | - | - | - | - | - | 480 000 | 50181,82 | - |
| *Phoma* spp. | - | 6000 | - | - | - | - | - | - |
| *Stemphylium* spp. | - | - | - | - | - | 20 000 | - | - |
| Kvasci | 23000 | 17500 | 20000 | - | - | - | - | 233363,64 |
| Ostale plijesni | 1000 | 2000 | - | - | 5454,55 | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ukupno | 11571,43 | 8142,86 | 115000 | | 217636,36 | 97688,31 | 804712,12 | 2518863,64 |

Tablica 5. Porast prirodne mikobiote na **papiru** nakon gama zračenja dozom 2 kGy kod brzine doze od 0,1 i 9,8 Gy/s.

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0. dan | | 7. dan | | 14. dan | | 28. dan | |
| | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s |
| *Alternaria* spp. | 27500 | - | - | - | - | - | 100 | - |
| *Aspergillus flavus* | - | - | - | - | - | - | 246,97 | 10 000 |
| *Aspergillus* spp. | - | - | - | - | - | - | 645,45 | - |
| *Cladosporium* spp. | 1500 | - | 3545,46 | - | 390,91 | - | 17000 | 200 |
| *Penicillium* spp. | - | - | - | - | - | - | 100 | - |
| *Stemphylium* spp. | - | - | 10000 | - | - | - | - | - |
| kvasci | 1000 | - | - | - | 200 | 454,55 | - | 13454,55 |
| Ostale plijesni | 1000 | 1000 | - | - | 454,55 | - | 100 | - |
| Ukupno | 10166,67 | 1000 | 3590,91 | - | 478,79 | 454,55 | 3037,5 | 8201,82 |

Tablice 4 i 5 prikazuju podatke o porastu prirodne mikobiote na platnu i papiru nakon zračenja dozom 2 kGy u dvije brzine doze (0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s). Kvasci i vrste rodova *Cladosporium* i *Alternaria* su pokazali najveću otpornost prema zračenju te je njihov oporavak zabilježen već nulti dan nakon zračenja. Na platnu taj je porast značajan i podjednak za obje brzine doze - ~$10^3$ CFU/g za kladosporije i alternarije, tj. $10^4$ CFU/g za kvasce, dok je na papiru porast od oko $10^3$ CFU/g zabilježen samo nakon zračenja manjom brzinom doze.

Ovakvi podaci idu u prilog prethodnoj konstataciji da je platno povoljniji medij za rast, pa i oporavak plijesni od gama zračenja. Rezultati ukazuju na eksponencijalni rast nekih od zabilježenih vrsta- *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. (čiji se oporavak na platnu bilježi tek nakon 14. dana za veću brzinu), međutim, mnogi su rezultati nekonzistentni. Primjerice, porast vrsta *Epicoccum* spp., *Mucor* spp. i *Phoma* spp. na platnu je zabilježen samo jednom i to za različite brzine doze (nakon 14 dana i zračenja brzinom 0,1 Gy/s, 28. dan nakon zračenja brzinom 0,098 Gy/s, nulti dan nakon zračenja brzinom 9,8 Gy/s) što zapravo ne iznenađuje ako se uzme u obzir već objašnjena pojava točkaste kontaminacije. Naime, za pripremu tih uzoraka vjerojatno su korišteni oni dijelovi ukupne površine platna kontaminirani upravo ovim vrstama plijesni. Na porast pojedine vrste plijesni utječe i prisutnost ostalih vrsta koje mogu potisnuti njezin rast. Time se može objasniti zašto je porast kladosporija na papiru nakon zračenja brzinom doze 0,1 Gy/s nakon 0. i 7. dana u porastu (~$10^3$ CFU/g), nakon čega pada na ~$10^2$CFU/g i ponovno 28. dan eksponencijalno raste do ~$10^4$ CFU/g.Opravak plijesni je na uzorcima papira zabilježen tek 28. dan od zračenja većom brzinom doze, a kvasaca nakon 14. dana, dok su se zračenjem manjom brzinom doze neke vrste oporavile već nakon 0. dana. Bolji antifungalni učinak zračenja većom brzinomdoze je i za očekivati jer veća brzina doze uzrokuje nagla uzastopna oštećenja DNA i drugih staničnih struktura, ne dajući stanicama vremena za popravak oštećenog materijala. Unatoč ovome, pojedini rezultati porasta na platnu ne potvrđuju ovakve rezultate zbog čega se može zaključiti da je u budućim istraživanjima potrebno podrobnije upoznavanje prirodne mikobiote papira i platna prije i nakon sedmodnevne inkubacije na 25°C pri 75% Rv.

Tablica 6. Porast inokuliranih plijesni na **platnu** nakon zračenja gama zračenjem dozom 2 kGy kod brzine doze od 0,1 i 9,8 Gy/s.

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0. dan | | 7. dan | | 14. dan | | 28. dan | |
| | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s |
| *Aspergillus jensenii* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Cladosporium sphaerospermum* | 1500 | - | 1105000 | 3750 | - | 33590,91 | - | 1100000 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Trichoderma harzianum* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Miješana kultura** | 1500 | 1000 | 226363,64 | 10100 | 700000 | 701736,37 | - | 82272,73 |

* Zabilježen je porast *Cladosporium sphaerospermum*

Tablica 7. Porast inokuliranih plijesni na **papiru** nakon gama zračenja dozom 2 kGy kod brzine doze od 0,1 i 9,8 Gy/s.

| Plijesni | Koncentracija plijesni (CFU/g) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0. dan | | 7. dan | | 14. dan | | 28. dan | |
| | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s | 0,1 Gy/s | 9,8 Gy/s |
| *Aspergillus jensenii* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Cladosporium sphaerospermum* | 2500 | - | 5545,46 | 1800 | - | 700 | 111818,82 | 800 |
| *Trichoderma harzianum* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Miješana kultura** | - | - | 4818,18 | 3100 | 222954,55 | 1545,46 | 1550 | 1681,82 |

* Zabilježen je porast *Cladosporium sphaerospermum*

Tablicama 6 i 7 prikazan je porast inokuliranih plijesni 0., 7., 14., i 28. dan od zračenja dozom 2 kGy u dvije brzine doze (0,098 Gy/s i 9,8 Gy/s). Nije zabilježen porast vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum* te se može zaključiti kako su ove dvije vrste osjetljive na zračenje i u relativno niskoj dozi od 2 kGy. Za razliku od njih, *Cladosporium sphaerospermum* oporavlja se,kao i ostale kladosporije analizirane u sklopu prirodne mikobiote, već nulti dan nakon zračenja kako manjom tako i većom brzinom doze.

Mnogi prametri utječu na odgovor plijesni na γ- zračenje. Primjerice, poznato je da su miceliji osjetljviji od spora, dokna otpornost spora utječe dob, sadržaj vlage itd. Također, pokazalo se da su plijesni koje u staničnoj stijenci sadrže melanin (vrste roda *Alternaria, Cladosporium, Aspergillus*, kvasac *Cryptococcus*...) otpornije na utjecaje gama zračenja(Calado i sur..,

2014).Upravo su takve detektirane vrste alternarija i kladosporija, uključujući namjerno inokuliranu vrstu *Cladosporium sphaerospermum* i druge detektirane u sklopu prirodne mikobiote. Oporavak i reproduktivna sposobnost ovih vrsta su zadržani i nakon zračenja (njihov porast zabilježen je već 0. dan nakon zračenja brzinom 0,1 Gy/s u svim uzorcima, dok je na uzorcima platna, a ne i papira, zabilježen porast i nakon zračenja brzinom 9,8 Gy/s).Melanin je pigment koji plijesnima služi kao zaštita od okolišnih čimbenika, posebice od ionizirajućeg zračenja. Dadachova i suradnici (2007) proučavali su mehanizam kojim melanin štitiupravo vrstu *Cladosporium sphaerospermum* od utjecaja niskih dozagama zračenja. Autori zaključuju da u elektronima bogatim molekulama melanina nizom kaskadnih reakcija nastaju visoko energetski elektroni. Pretpostavlja se da ovi elektroni potomreagiraju saslobodnim radikalima prisutnim u strukturi melanina i na taj način onemogućuju prodiranje štetnog učinka prema ostalim staničnim strukturama (Dadachova i sur., 2007). Doza korištena u ovom istraživanju znatno je niža od prosječneopćeprihvaćene fungicidne doze (7-10 kGy) zbog čega se zaključci o radioprotektivnosti melanina ne mogu direktno primijeniti na ova istraživanja. Važno je napomenuti da su druge dvije vrste odabranih plijesni- *A. jensenii* i *T. harzianum*, koje su inače okarakterizirane propulzivnim rastom, u potpunosti eliminirane zračenjem dozom od 2 kGy koja je tipična doza za dezinsekciju ili dezinfestaciju i koja ne može biti dovoljna za redukciju ili eliminaciju plijesni.

# 5 ZAKLJUČAK

- Energija gama zračenja kod doze od 2 kGy dovoljna je za dekontaminaciju vrsta*Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja;
- Vrsta *Cladosporium sphaerospermum* pokazala se vrlo otpornom na djelovanje gama zračenja kod doze od 2 kGy te se njezin porast zabilježio već 0. dan nakon zračenja, neovisno o brzini doze zračenja;
- Platno se zbog obrade tutkalom pokazalo povoljnijom podlogom za razvoj kolonija plijesni. Na gama zračenje najotporniji pripadnici prirodne mikobiote su kvasci, alternarije i kladosporije; njihov je porast na platnu zabilježen već 0. dan nakon zračenja većom i manjom brzinom doze, dok je na papiru porast 0. dan zabilježen uporabom zračenja manjom brzinom doze;
- Unatoč tome što većina rezultata upućuje na veću antifungalnu djelotvornost veće brzine doze zračenja, pojava fenomena točkastih kontaminacija otežava donošenje konačnog zaključka o fungicidnoj učinkovitosti pojedinih brzina zračenja (0,1 i 9,8 Gy/s)
- U sljedećim istraživanjima treba napraviti sveobuhvatniji pregled pojavljivanja prirodne mikobiote na platnu i papiru, prije i nakon inkubacije (25°C i 75% Rv) kako bi se što bolje mogli protumačiti učinci doza zračenja i brzina doza na preživljenje pojedinih vrsta plijesni
- Rezultati prikazani u ovom diplomskom radu pokazuju da je unatoč maloj ali zato najčešće primjenjivanoj(dezinsekcijskoj) dozi zračenja od 2 kGy, gama zračenje još uvijek djelotvorna metoda za mikrobiološku dekontaminaciju predmeta kulturne i umjetničke baštine. Problem pojave i eliminacije plijesni još uvijek zaokuplja interes i pažnju restauratora koji zajedno sa znanstvenicima kroz sistematska znanstvena istraživanja mogu doći do najpovoljnije metodologije za očuvanje, konzervaciju i zaštitu umjetnina koristećisve prednosti ionizirajućeg zračenja.

# 6 LITERATURA


Calado T, Venâncio A, Abrunhosa L. Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* , 2014, 13, 1049–1061.

da Silva M, Moraes AML, Nishikawa MM, Gatti MJA, Vallim de Alencar MA, Brandão LE, Nóbrega A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, 57, 163–167.

Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, Casadevall A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One*, 2007, e457, 1-13.

Duraković S. Prehrambena Mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 1991, str. 71-84.

Fressl I. Slikarska Tehnologija. Zagreb, Radionice škole primijenjene umjetnosti, 1966, str. 160-164.

Garg KL, Jain KK, Mishra AK. Role of fungi in the deterioration of wall paintings. *Sci Total Environ*, 1995, 167, 255–271.

Gonzalez ME, Calvo AM, Kairiyama E. Gamma radiation for preservation of biologically damaged paper. *Radiat Phys Chem*, 2002, 63, 263–265.

Gorbushina AA, Heyrman J, Dornieden T, Gonzalez-Delvalle M, Krumbein WE, Laiz L, Petersen K, Saiz-Jimenez C, Swings J. Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int Biodeterior Biodegrad*, 2004, 53, 13–24.

Gorbushina AA, Petersen K. Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2000, 46, 277–284.

International Atomic Energy Agency. Gamma irradiators for radiation processing. Vienna, 2011.

Jakobović Z. Ionizirajuće zračenje i čovjek. Zagreb, Školska knjiga, 1991, str. 19-30.

Kozjak I. Spašavanje arhivskoga gradiva nakon katastrofa: nove mogućnosti Središnjeg laboratorija za konzervaciju i restauraciju hrvatskog državnog arhiva. *Arh. vjesn.*,2010,

53, 85-100.

Lavin P, Gómez de Saravia SG, Guiamet PS. An environmental assessment of biodeterioration in document repositories. *Biofouling*, 2014, 30, 561-569.

Longin A. Sistematika plijesni– potencijalnih štetočina na papiru. *Vjesnik bibliotekara Hrvatske*, 205, 58, 135–161.

Manea MM, Moise I V., Virgolici M, Negut CD, Barbu OH, Cutrubinis M, Fugaru V, Stanculescu IR, Ponta CC. Spectroscopic evaluation of painted layer structural changes induced by gamma radiation in experimental models. *Radiat Phys Chem*, 2012, 81, 160–167.

Marušić K., Šegvić Klarić M., Dumbović A., Mihaljević B. Protection of cultural heritage objects by ionizing radiation.CRPA, Šibenik, 2015, 50-55.

Michaelsen A, Pinzari F, Barbabietola N, Piñar G. Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2013, 84, 333–341.

Montegut D, Indictor N, Koestler RJ. Fungal deterioration of cellulosic textiles: a review. *Int Biodeterior*, 1991, 28, 209–226.

Negut C-D, Bercu V, Duliu O-G. Defects induced by gamma irradiation in historical pigments. *J Cult Herit*, 2012, 13, 397–403.

Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103–117.

Pitt JI, Hocking AD. The ecology of fungal food spoilage. U: Fungi and food spoilage. Pitt JI,Hocking AD, New York, Springer, 2009, str. 3-11.

Pavela-Vrančič M, Matijević J. Primijenjena organska kemija u konzervaciji i restauraciji. Split, Sveučilište u Splitu, 2010, str. 63-69.

Ponta CC. Irradiation Conservation of Cultural Heritage. *Nucl Phys News*, 2008, 18, 22–24.

Pucić I, Kavkler K, Mihaljević B. Radiation treatment of aged model textile samples. U: Book of abstracts. Ristić G, urednik, Niš, University of Niš, Faculty of Electronic Engineering, 2014, str. 171-171.

Ražem D, Anđelić L, Dvornik I. *In High-dose Dosimetry*; Proc. IAEA Symp., Vienna, 1984.

Sterflinger K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biol Rev* 2010, 24, 47–55.

Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - Tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97, 9637–9646.

Volner Z, Batinić D, Suradnici. Opća medicinska mikrobiologija i imunologija. Zagreb, Školska knjiga, 2005, str. 55-61.

Vukojevi J, Grbi ML. Moulds on paintings in Serbian fine art museums. *African J Microbiol Res*, 2010, 4, 1453–1456.

World Health Organization Europe. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2009, str. 12.

# 7 SAŽETAK/ SUMMARY

U ovom radu istraživane su plijesni, ubikvitarni mikroorganizmi i jedni od najvažnijih uzroka propadanja predmeta kulturne baštine.Dekontaminacija ovih predmeta može se učinkovito i sigurno provesti gama zračenjem. Međutim, doza i brzina zračenja moraju biti pažljivo odabrane kako bi se polučio što bolji antifungalni učinak bez oštećivanja materijala. U radu je proučavan utjecaj gamazračenja na prirodnu mikobiotu papira i platna i na odabrane vrste inokuliranih kolonizatora (*Aspergillus jensenii, Cladosporium sphaerospermum* i *Trichoderma harzianum*). Uzorci su ozračeni dozom od 2 kGykod dvije brzine doze (0,1 i 9,8 Gy/s). Oporavak plijesni praćen je 0., 7., 14. i 28. dan nakon zračenja. Apsorpcijska doza gama zračenja u iznosu od 2 kGy dovoljna je za dekontaminaciju vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja. Vrsta *Cladosporium sphaerospermum* pokazala se vrlo otpornom na djelovanje gama zračenja u dozi od 2 kGy te se njezin porast zabilježio već 0. dan nakon zračenja, neovisno o brzini doze kojom je zračenje primijenjeno. Platno se zbog obrade tutkalom pokazalo povoljnijom podlogom od papira za razvoj kolonija plijesni.

Bolji antifungalni učinak zabilježen je, u većini slučajeva, primjenom zračenja većom brzinom doze (9,8 Gy/s), međutim, zabilježeni fenomen točkaste kontaminacije platna i papira donekle onemogućava donošenje jednoznačnog zaključka o učinkovitosti pojedinih brzina doza zračenja. Osim toga, neke vrste plijesni (kladosporije i alternarije) pokazale su veću radiorezistenciju od drugih.

This paper investigated moulds, ubiquitous microorganisms and one of the main causes of deterioration of the cultural heritage. Decontamination of cultural heritage can be carried out effectively and safely with gamma radiation. However, the dose and dose rate must be carefully selected in order to obtain the best antifungal effect without damaging the material. This study evaluated the effect of gamma radiation on natural mycobiota of paper and glue-coated linen as well as on selected fungal species including primary (*Aspergillus jensenii),* secondary*(Cladosporium sphaerospermum)*andtertiary *(Trichoderma harzianum*) colonizers. Inoculated samples were irradiated with the dose of2 kGy, applied at two rates (0.1 and 9.8 Gy / s). Dose of 2 kGy applied at both dose rates was effective against primary and tertiary

colonizers but not for secondary colonizer *C. spaherospermum* and linen mycobiota. Mould recovery is observed on 0th, 7th, 14th and 28th day after irradiation. In most cases better antifungal effect was noted when irradiation dose was applied at greater rate (9.8 Gy / s).However, „hot-spot“ contamination of linen and papermakes it difficult to draw unambiguous conclusion on the effectiveness of individual radiation doserate. In addition, some species of mould (Alteranria and Cladosporia)were found to be more radioresistant than others.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

# DJELOVANJE GAMA ZRAČENJA NA FUNGALNE KOLONIZATORE CELULOZNIH MATERIJALA

**Katarina Šarić**

## SAŽETAK

U ovom radu istraživane su plijesni, ubikvitarni mikroorganizmi i jedni od najvažnijih uzroka propadanja predmeta kulturne baštine. Dekontaminacija ovih predmeta može se učinkovito i sigurno provesti gama zračenjem. Međutim, doza i brzina zračenja moraju biti pažljivo odabrane kako bi se polučio što bolji antifungalni učinak bez oštećivanja materijala. U radu je proučavan utjecaj γ- zračenja na prirodnu mikobiotu papira i platna i na odabrane vrste inokuliranih kolonizatora (*Aspergillus jensenii, Cladosporium sphaerospermum* i *Trichoderma harzianum*). Uzorci s inokuliranim plijesnima ozračeni su dozom 2 kGy primijenjenom u dvije brzine (0,098 i 9,8 Gy/s). Oporavak plijesni praćen je 0., 7., 14. i 28. dan nakon zračenja. Apsorpcijska doza gama zračenja u iznosu od 2 kGy dovoljna je za dekontaminaciju vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini zračenja. Vrsta *Cladosporium sphaerospermum* pokazala se vrlo otpornom na djelovanje gama zračenja u dozi od 2 kGy te se njezin porast zabilježio već 0. dan nakon zračenja, neovisno o brzini kojom je zračenje primijenjeno. Platno se zbog obrade tutkalom pokazalo povoljnijom podlogom od papira za razvoj kolonija plijesni. Bolji antifungalni učinak zabilježen je, u većini slučajeva, primjenom zračenja većom brzinom (9,8 Gy/s), međutim, zabilježeni fenomen točkaste kontaminacije platna i papira donekle onemogućava donošenje jednoznačnog zaključka o učinkovitosti pojedinih brzina zračenja. Osim toga, neke vrste plijesni (kladosporije i alternarije) pokazale su veću radiorezistenciju od drugih.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 25 stranica, 7 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kulturna baština, gama zračenje, plijesni

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredna profesoricaSveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
**Dr. sc. Branka Mihaljević**, *viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.*
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredna profesoricaSveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Microbiology
Schrottova 39/I. st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# GAMMA-IRRADIATION EFFECT ON FUNGAL COLONIZERS OF CELLULOSE MATERIALS

**Katarina Šarić**

## SUMMARY

This paper investigated moulds, ubiquitous microorganisms and one of the main causes of deterioration of the cultural heritage. Decontamination of cultural heritage can be carried out effectively and safely with gamma radiation. However, the dose and dose rate must be carefully selected in order to obtain the best antifungal effect without damaging the material. This study evaluated the effect of gamma radiation on natural mycobiota of paper and glue-coated linen as well as on selected fungal species including primary (*Aspergillus jensenii), secondary (Cladosporium sphaerospermum)* andtertiary *(Trichoderma harzianum*) colonizers. Inoculated samples were irradiated with the dose of 2 kGy, applied at two rates (0.1 and 9.8 Gy / s). Dose of 2 kGy applied at both dose rates was effective against primary and tertiary colonizers but not for secondary colonizer *C. spaherospermum* and linen mycobiota. Mould recovery is observed on 0th, 7th, 14th and 28th day after irradiation. In most cases better antifungal effect was noted when irradiation dose was applied at greater rate (9.8 Gy / s). However, „hot-spot" contamination of linen and paper makes it difficult to draw unambiguous conclusion on the effectiveness of individual radiation dose rate. In addition, some species of mould (Alteranria and Cladosporia) were found to be more radioresistant than others.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 25 pages, 7 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cultural heritage, gamma irradiation, moulds

Mentor: **Maja Šegvić Klarić**, **Ph.D.,** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić**, **Ph.D.,** *Associate Professor,*University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
**Branka Mihaljević**, **Ph.D.**, *Research Scientist,* Ruđer Bošković Institute
**Ana- Marija Domijan, Ph.D.,** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2016.