

**Martina Kriletić**

**Antifungalni učinak gama zračenja na  
mikrobiotu celuloznih materijala**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju 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 mentorici, izv. prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, na predloženoj temi, stručnom vodstvu, susretljivosti i pruženom znanju koji su omogućili izradu i pisanje ovog rada, te svim članovima laboratorija Zavoda za mikrobiologiju na ugodnom radnom okruženju i pomoći koju su uvijek rado pružili. Ujedno se zahvaljujem dr. sc. Branki Mihaljević, voditeljici Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković, na ljubaznosti i suradnji prilikom izrade ovog rada.*

# SADRŽAJ

<b>1 UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine</b> .....	1
<b>1.2 Metode dezinfekcije predmeta kulturne baštine</b> .....	5
<b>1.3 Gama zračenje</b> .....	6
<b>1.3.1 Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine</b> .....	7
<b>2 OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	10
<b>3 MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>3.1 Ispitivanje sastava prirodne mikrobiote na platnu i papiru metodom razrjeđenja</b> ..	11
<b>3.2 Inokulacija platna i papira odabranim plijesnima</b> .....	12
<b>3.3 Zračenje uzoraka</b> .....	12
<b>4 REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	14
<b>5 ZAKLJUČCI</b> .....	18
<b>6 LITERATURA</b> .....	19
<b>7 SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	22
<b>7.1 Sažetak</b> .....	22
<b>7.2 Summary</b> .....	23
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1 UVOD

## 1.1 PLIJESNI KAO KONTAMINANTI PREDMETA KULTURNE BAŠTINE

Tisućama godina gljivice imaju značajnu ulogu u evoluciji društva i svjetske kulture. Od vremena Starih Egipćana, Kelta i Teuta kvasci se koriste u proizvodnji piva i peciva, iako tada čovjek nije bio svjestan mikrobioloških procesa. Prava revolucija u suvremenoj medicini, ali i čovječanstvu, bilo je otkriće antibiotika *penicilina*. 1928. godine znanstvenik Alexander Fleming primijetio je da zelena plijesan (*Penicillium chrysogenum*) ubija bakterije, a pritom ne ugrožava zdravlje ljudi i životinja. Danas se penicilin smatra najvećim spasiteljem života u suvremenoj medicini. Uz svijetlu, gljivice imaju i svoju "mračnu stranu": mikotoksini, patogenost, alergeni, kvarenje hrane, te biološka razgradnja materijala. Pojam biodegradacije kuća spominje se još u Bibliji kao bijela, crvena ili zelena "lepra" ili "korozija" na opekama, glini i drvu. Danas, kontaminacija gljivicama je rastući problem ne samo na kućama, zgradama i radnim prostorima, već su i umjetnine u muzejima, arheološka nalazišta, općenito svi predmeti kulturne baštine ozbiljno ugrožene gljivičnom kontaminacijom (Sterflinger, 2010).

Kulturna baština, materijalna i nematerijalna, svjedočanstvo je kulture, spoznaja i identiteta pojedinog naroda kroz vrijeme (Garg i sur., 1995). Ona može biti kolektivna, od značaja za cijelu zajednicu kao što su arheološka nalazišta, građevine, skulpture i spomenici, no i osobna, od značaja za pojedinca koja s vremenom postaje dio kolektivne baštine kao što su knjige, fotografije, slike, nakit, glazbeni instrumenti i drugi predmeti (Hasenay i sur., 2011). Zbog zuba vremena, predmeti kulturne baštine podložni su oštećenjima koja mogu biti uzrokovana mehaničkom degradacijom (trenje, vjetar, valovi itd.), kemijskom degradacijom (zagrijavanje, voda itd.) i biodeterioracijom (bakterije, gljivice, insekti). Biodeterioranti svojim djelovanjem utječu na promjenu izgleda (obezbojenje, obojene mrlje), gubitak čvrstoće, djelomičnu ili potpunu razgradnju materijala. Također, izazivaju kemijske promjene poput depolimerizacije, promjene stupnja oksidacije i molekulske strukture ([www.lib.irb.hr](http://www.lib.irb.hr)). Dokazano je da gljivice i bakterije ne uzrokuju samo estetsku destrukciju predmeta kulturne baštine, već se nastanjuju i prodiru u materijal uzrokujući gubitak materijala korozijom, enzimskom razgradnjom i mehaničkim oštećenjem (Sterflinger i Piñar, 2013). S gledišta biodeterioracije kulturnih dobara, gljivice se mogu podijeliti u dvije funkcionalne skupine:

1. oportunističke gljivice – gljivice koje uz dovoljnu vlažnost rastu na gotovo svim vrstama organskog materijala, ali ga enzimski ne razgrađuju;
2. patogene gljivice – gljivice koje su supstrat specifične, enzimski razgrađuju pojedine vrste materijala od kojih su građena umjetnička djela npr. celulolitičke gljivice razgrađuju papir (celulozu), a keratinolitičke kožu, kosu, perje (keratin).

Obje skupine mogu uzrokovati ozbiljnu deterioraciju, ali jedino pripadnici druge skupine uzrokuju raspadanje materijala (Sterflinger i Pinazi, 2012).

U zatvorenim prostorima poput muzeja, knjižnica ili arhiva gljivice imaju ključnu ulogu u destrukciji umjetnina (Sterflinger i Piñar, 2013). To su eukariotski mikroorganizmi unutar carstva gljiva (Fungi). Iako poput biljaka žive pričvršćene za hranjivu podlogu, gljive nemaju pigment klorofil, to jest ne vrše fotosintezu, već su kemoheterotrofi i poput bakterija apsorbiraju hranjive tvari. Kao razgrađivači u hranidbenom lancu važni su u procesu kruženja tvari. Razmnožavaju se sporama (spolne i nespolne) ili vegetativno (pupanje), ovisno o vrsti i uvjetima okoliša. Osim za razmnožavanje, spore služe za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i širenje vrste. Gljivične infekcije ili mikoze kod ljudi većinom su uzrokovane nespolnim sporama (Duraković i Redžepović, 2002).

U carstvo gljiva ubrajamo jednostanične (npr. kvasci) i višestanične gljive (npr. plijesni). Neke gljive, ovisno o uvjetima, pokazuju dimorfizam, to jest pojavljuju se kao plijesni i kao kvasci (Duraković i Redžepović, 2002). Tijelo plijesni građeno je od vlaknastih stanica bez klorofila koje se nazivaju hife. One su odgovorne za njihov paučinast i pahuljast izgled. Isprepletene hife tvore micelij. Prema funkciji razlikujemo vegetativni ili bazalni micelij koji prodire u hranjivu podlogu i crpi hranu, te zračni ili fertilni micelij koji se uzdiže iznad podloge i nosi strukture za razmnožavanje (Mlinarić-Missoni i Babić-Važić, 2005). Na rast plijesni utječu brojni čimbenici poput: pH, temperature, aktiviteta vode, sastava supstrata, količine vlage, prisutnosti kisika. To su većinom aerobni organizmi, pa uglavnom rastu na površinama supstrata, dok su kvasci fakultativni anaerobi. Plijesni mogu rasti u okolišu s visokom koncentracijom šećera ili soli (halofili); na tvarima s niskim sadržajem vode i u rasponu pH vrijednosti od 3 do 8 (optimalna vrijednost je 5). To su većinom mezofilni organizmi što znači da rastu na temperaturama od 10°C do 35°C. Zahtijevaju mnogo manju koncentraciju dušika za svoj rast od bakterija, a lučenjem egzoenzima razgrađuju velike i složene ugljikohidrate kao što su npr. lignin i celuloza (Pitt i Hocking, 2009; Duraković i Redžepović, 2002).

Plijesni u zatvorene prostore poput muzeja, najčešće dospijevaju sporama iz zraka. Na njihov razvoj u muzejima uvelike utječe unutrašnja klima, količina dostupnih nutrijenata (iz atmosfere i samih materijala), zatim održavanje (intervali čišćenja), te svojstva zgrada samih muzeja, a posebno termalna izolacija i kondenzacija toplog unutrašnjeg zraka na hladnim zidovima zgrade. Loša ventilacija i nehomogena površinska temperatura stvaraju vodeno-kondenzacijska mjesta i lokalnu mikroklimu s većim udjelom vode što pogoduju razvoju plijesni. Unutrašnja klima određena je temperaturom i relativnom vlažnosti ( $R_v$ ), a to su ujedno i najvažniji faktori rasta gljivica (Sterflinger i Piñar, 2013; Sterflinger, 2010). Zbog postojanja mikroklimatskih uvjeta pogodnih za rast plijesni i u prostorima s vrlo niskom relativnom vlažnosti, zaključeno je da je aktivitet vode bolji pokazatelj razvoja plijesni od relativne vlažnosti (Lavin i sur., 2014; Sterflinger, 2010; Nielsen, 2003; Montegut i sur., 1991). Naime, aktivitet vode ( $a_w$ ) je fizikalno-kemijska veličina definirana kao omjer parcijalnog tlaka vodene pare u materijalu i tlaka zasićene pare čiste vode pod istim uvjetima, odnosno to je indikator sadržaja vode u supstratu za mikrobiološku aktivnost (Pitt i Hocking, 2009). S obzirom na aktivitet vode plijesni dijelimo na primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore (Grant i sur., 1989.):

1. Primarni kolonizatori (tzv. kserofili) – plijesni koje rastu pri  $a_w < 0,8$  (npr. *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, ostale *Aspergillus* vrste, kao i *Wallemia sebi* te *Paecilomyces variotii*);
2. Sekundarni kolonizatori – plijesni koje rastu pri vrijednosti  $a_w$  između 0,8 i 0,9 (različite vrste rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* i *Ulocladium*);
3. Tercijarni kolonizatori (tzv. hidrofilni) – plijesni koje rastu pri  $a_w > 0,9$  (*Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma* spp.) (Nielsen, 2003).

Higroskopni materijali, poput celuloze, potiču rast gljivica pri niskoj relativnoj vlažnosti, što znači da sadržaj vode u materijalu određuje biorazgradivost materijala. Također, pokazalo se da vanjska atmosfera i izvori organskih i anorganskih onečišćenja određuju unutrašnji aerosol, a time i mikrofloru muzeja (Sterflinger, 2010).

Povijesna djela načinjena su od svih vrsta organskih materijala, koja se ponovno koriste za autentičnu restauraciju ili konzervaciju umjetnina u posljednje vrijeme. Tako su u slikarstvu korišteni razni mineralni pigmenti koji su učvršćivani organskim vezivom poput žumanjka, kazeina, ulja lana, konopljike i maka ili različitih smola. Lanena platna često su premazivana ljepilom od zečje kože ili celuloze radi bolje impregnacije boja. Osim iz minerala (bakra, olova itd.), boje su dobivane iz biljnih (npr. indigo) i životinjskih materijala (npr. purpurna).

Zbog ogromne raznolikosti enzima koje luče, kao što su celulaze, glukanaze, laktaze, fenolaze, keratinaze, monooksigenaze i drugi, plijesni su sposobne razgraditi sav organski materijal (Sterflinger, 2010; [www.scribd.com](http://www.scribd.com)).

Najcjenjeniji dokumenti čovječanstva, knjige i svitci, načinjeni su od papira, papirusa i pergamenta. Tipični kolonizatori papirnih dokumenata su kserofilne gljivice roda *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Penicillium* i *Cladosporium*. Novija istraživanja uz gljivičnu aktivnost na papiru vezuju pojam „foxing“ odnosno pojavu smečkasto-crvenih mrlja na papiru i platnu (Sterflinger i Piñar, 2013; Sterflinger, 2010). Nadalje, metabolički produkti hidrolize molekule celuloze kao što su kiseline (oksalna, glukuronska itd.) i pigmenti (karotenoidi, antrakinoni itd.) mijenjaju svojstva papira, on postaje žut, gubi elastičnost i blijedi (Garg i sur, 1995). Do velikog broja infekcija dolazi kada voda u knjižnicama, arhivima ili muzejima odjednom postane dostupna kao npr. za vrijeme poplava. U tom slučaju, pojavljuju se plijesni kojima je za život potreban visok aktivitet vode. One svojim djelovanjem stvaraju obojene mrlje (npr. *Chaetomium* spp., *Monoascus* spp., *Epicoccum* spp.), neugodan miris (npr. *Trichoderma* spp.) i mikotoksine (npr. *Stachybotrys* spp.) (Sterflinger i Piñar, 2013).

Spomenici kulture na otvorenom, poput kiparskih djela i građevina, izgrađenih od kamena, nisu izuzeti od mikrobne kontaminacije i biodeterioracije. Sastav njihove mikroflore ovisi o klimatskim uvjetima pojedinog područja. U vlažnim područjima dominiraju plijesni (*Altenaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp. itd.), dok u sušnim i polusušnim područjima poput Mediterana dominiraju crne plijesni. (*Hortea* spp., *Sarcinomyces* spp., *Coniosporium* spp.). Crne plijesni obitavaju unutar mramora, vapnenca i granita gdje formiraju crne kolonije i uzrokuju kemijsku i mehaničku eroziju. Zbog jake crne melanizacije kolonija, kamen je često prekriven crnim točkicama ili slojem. To prodiranje gljivica u kamen i formiranje lezija naziva se fenomen točkastog korodiranja (eng. „bio-pitting“). Zahvaljujući debeloj i melaniziranoj staničnoj stjenci, crne plijesni su otporne na različite biocide i antimikrobne tretmane. Još jedan bitan faktor u degradaciji građevina je sol koja može kristalizirati u različite hidrate zauzimajući određeni prostor i stvarajući pritisak koji naposljetku vodi do oštećenja i destrukcije pa i sve do pucanja i odvajanja zida. Uz to, pogoduje rastu halofilnih plijesni od kojih mnoge sadrže karotenoidne pigmente koji dovode do pojave roskastih mrlja na zidnim površinama (Sterflinger i Piñar, 2013; Sterflinger, 2010).

## 1.2 METODE DEZINFEKCIJE PREDMETA KULTURNE BAŠTINE

Za očuvanje predmeta kulturne baštine presudno je ne samo kontrolirati aktivnost rastućih gljivica, već smanjiti količinu ili potpuno ukloniti spore koje se akumuliraju u prašini metodama dezinfekcije. Spore u stanju mirovanja imaju niski sadržaj vode, a njihov metabolizam je inaktivan i reverzibilan što omogućuje gljivicama preživljavanje u ekstremnim uvjetima. Kada nastupe povoljni uvjeti dolazi do aktivacije spora i vegetativnog rasta plijesni. Stoga bi konzervacijski postupak trebao biti usmjeren na spore jer je vegetativne hife relativno lako kontrolirati održavanjem propisanih konzervacijskih uvjeta (Michaelsen i sur.,2013).

Dezinfekcijske metode uklanjanja biodeterioranata dijele se na kemijske i fizikalne metode. Kemijski tretmani uključuju različite tekuće i plinovite biocide, ali njihova primjena je ograničena radi ljudske sigurnosti. Neki od najčešće korištenih su biocidi koji otpuštaju formaldehid, kvaterni amonijevi spojevi, etanol i etilenoksid. Etilenoksid je plin koji alkilira DNA, RNA i proteine inaktivira metabolizam i mogućnost razmnožavanja mikroorganizama. Zbog iznimne toksičnosti i kancerogenog djelovanja, njegova primjena je zabranjena u nekim zemljama. Također, otkriveno je da je materijal tretiran etilenoksidom skloniji rekontaminaciji. Naime, smatra se da etilen-glikol, koji nastaje kao nusprodukt u fumigaciji, potiče aktivaciju spora koje kontaminiraju objekt u daljnjem skladištenju. U fizikalne metode ubrajaju se tretman UV zrakama, ultrazvukom i strujom, te radijacijski postupak (Michelsen i sur, 2013; Sterflinger i Piñar, 2013; [www.lib.irb.hr](http://www.lib.irb.hr)). Iako se ne može smatrati dezinfekcijskom metodom, liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je važna metoda konzervacije. Ona uključuje direktni prijelaz vode iz čvrstoga u plinovito stanje, pri čemu se preskače vodena faza koja može dovesti do promjena u dimenzijama materijala. Efekt dehidracije pri liofilizaciji može uništiti hidrirane konidije, sprječiti njihovu germinaciju i zaustaviti rast micelija i bakterija. Nedostatak ove metode je taj što smrzavanje može dovesti do povećanja poroznosti organskih materijala i učiniti ih higroskopnijima. Međutim, liofilizacija i dalje ostaje najučinkovitija metoda po pitanju kemijske, fizikalne i biološke stabilizacije vodom oštećenog materijala, pogotovo ako je riječ o većim količinama koje moraju biti sanirane u kratkom periodu (Michelsen i sur., 2013). U ovom radu korišten je radijacijski postupak primjenom gama zračenja.



### 1.3 GAMA ZRAČENJE

Zračenje ili radijacija je pojava prijenosa energije elektromagnetskim valovima, bez posredstva materije i na daljinu. Radijacija ima dvojnju prirodu: korpuskularnu i valnu, koje su povezane s njenim nastankom ([www.fsb.unizg.hr/termovel/Zracenje.htm](http://www.fsb.unizg.hr/termovel/Zracenje.htm)). Po količini energije koju posjeduju, zračenja dijelimo na: ionizirajuća, koja imaju dovoljnu količinu energije za ionizaciju atoma prolaskom kroz materiju i neionizirajuća zračenja. U ionizirajuća zračenja ubrajamo kozmičko, gama i rendgensko elektromagnetsko zračenje te sva korpuskularna zračenja ([web.zpr.fer.hr/ergonomija/2003/klemencic/index.html](http://web.zpr.fer.hr/ergonomija/2003/klemencic/index.html)).

Elektromagnetsko ili fotonsko zračenje nastaje uglavnom prijelazom elektrona s više na nižu energijsku razinu u elektronskom omotaču, promjenom smjera gibanja elektrona ili u procesima promjene stanja atomske jezgre, dok korpuskularno ili zračenje masenim česticama nastaje raspadom nestabilnih izotopa, radionuklida ili radioizotopa (Dželalija, 2006).

Gama zračenje je elektromagnetsko zračenje visoke frekvencije emitirano iz radioaktivne jezgre tijekom njenog raspada ([www.bib.irb.hr](http://www.bib.irb.hr)). Gama zrake ili gama čestice su snopovi fotona bez mase i električnog naboja, ali s vrlo visokom energijom. Zbog visoke energije putuju brzinom svjetlosti i mogu proći kroz mnogo vrsta materijala uključujući i ljudsko tijelo. One postoje samo dok imaju energiju, a kad ju potroše, bilo u zraku ili čvrstom materijalu, one prestaju postojati. Stoga, vrlo gusti materijali, poput olova, koriste se za zaštitu od gama zračenja ([web.zpr.fer.hr/ergonomija/2003/klemencic/index.html](http://web.zpr.fer.hr/ergonomija/2003/klemencic/index.html)).

Efekti zračenja na mikroorganizme ovise o valnoj duljini, brzini zračenja i vremenu izloženosti, ali i o karakteristikama samih mikroorganizama (vrsti, obliku, vodi u sporama itd.). Gama zračenje koje se koristi u očuvanju predmeta kulturne baštine ne izaziva sekundarnu radijaciju jezgara ozračenih atoma. Učinak gama zračenja na staničnoj razini zasniva se na direktnoj ionizaciji biomolekula i indirektnom efektu preko radiolize vode. Radiolizom stanične i izvanstanične vode nastaju vrlo reaktivni kisikovi spojevi (ROS): ioni kisika, slobodni radikali i peroksidi koji izazivaju stanje oksidacijskog stresa. Oba efekta vode do denaturacije DNA uzrokujući dvostruke lomove lanaca. Kao posljedica tih lomova nastaju dimeri pirimidinskih baza koji mogu uzrokovati deleciju staničnog genoma i gubitak esencijalne genetičke informacije, a naposljetku i smrt stanice. Razlog visoke rezistencije spora je niska količina vode u njihovoj protoplazmi i mali sadržaj molekula DNA (Nuno, 2013; Silindir i Özer, 2009; da Silva i sur., 2006; Shea, 2000).

Najvažniji parametar radijacijskog postupka je doza zračenja. Doza zračenja ovisi o početnoj razini biološkog zagađenja, radioosjetljivosti kontaminacijske flore i prihvatljivom faktoru redukcije nametnika. Apsorbirana doza definira se kao energija zračenja apsorbirana po jedinici mase, a mjerna jedinica je grey (Gy). Brzina apsorbirane doze je omjer povećanja apsorbirane doze i vremena u kojem je to povećanje nastalo, a mjerna jedinica je grey u sekundi (Gy/s). Brzina doze ovisi o jačini polja zračenja, a smanjuje se s kvadratom udaljenosti od izvora. U laboratoriju za radijacijsku obradu bira se najmanja doza koja ne izaziva neželjene efekte po zdravlje ljudi, a osigurava konzervaciju ([www.lib.irb.hr](http://www.lib.irb.hr); [www.bib.irb.hr](http://www.bib.irb.hr)).

Gama zračenje se primjenjuje u terapiji tumora, u zdravstvenoj dijagnostici, kao metoda sterilizacije kozmetičkih, farmaceutskih, medicinskih, te prehrambenih proizvoda. U te svrhe kao izvor zračenja najčešće se upotrebljava radionuklid kobalt-60 (International Atomic Energy Agency, 2011).

### **1.3.1 PRIMJENA GAMA ZRAČENJA U OČUVANJU PREDMETA KULTURNE BAŠTINE**

Očuvanjem predmeta kulturne baštine bavi se konzervacija odnosno restauracija. Naglasak je na prevenciji koja obuhvaća održavanje propisanih konzervacijskih uvjeta poput vlažnosti (40-60% Rv) i temperature (16-20°C). Ali, kako u našim uvjetima nedostaje sredstava za prevenciju, glavni oblik intervencije je restauracija ([www.hrz.hr](http://www.hrz.hr)).

Gama zračenje kao metoda interventne konzervacije se primjenjuje od 1960-ih. Prednosti gama zračenju usporedbi s drugim konzervacijskim metodama su: sigurno rukovanje ozračenim predmetima po završetku zračenja; visoka moć penetracije koja osigurava biocidni efekt i prodiranje u sve slojeve predmeta te mogućnost istovremenog ozračivanja velikog broja predmeta; neselektivnost zračenja jer djeluje na sve organizme u svim fazama njihova razvoja. Nadalje, na ozračenim predmetima ne zaostaju radioaktivni rezidui pa nema opasnosti za posjetitelje, restauratore, osoblje i okolinu. Učinkovitost zračenja je proporcionalna dozi zračenja koja se lako mjeri i kontrolira, a stabilnost radijacijskog polja osigurava pouzdanost metoda. S druge strane, interakcija gama zračenja s bilo kojom tvari može rezultirati promjenama u izgledu i strukturi te tvari. Učinci su kumulativni, a promjene

su proporcionalne dozi zračenja. Stoga je kod ponavljanja tretmana potreban veliki oprez (Ponto, 2008; [www.lib.irb.hr](http://www.lib.irb.hr)).

Ozračivanje predmeta načinjenih od osjetljivih polimera (npr. celuloza, keratin) provodi se s najmanjom dozom učinkovitim protiv biodeterioranta, a istovremeno manjom od doze koja bi izazvala degradaciju materijala. Dovoljna doza za uništavanje većine plijesni koje koloniziraju papir iznosi od 8 do 9 kGy, dok za potpuno uklanjanje plijesni potrebna je doza od 18 kGy. Međutim, takva doza uzrokuje promjene u mehaničkim, fizičkim i kemijskim svojstvima papira ([www.bib.irb.hr](http://www.bib.irb.hr)).

Pokazalo se da je doza od 16 kGy sasvim dovoljna za inaktivaciju gljivica iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* koje su inače rezistentne na zračenja do 20 kGy, uz minimalne strukturne promjene papira. Dva mjeseca nakon ozračivanja uzorak je bio sterilan, dok je porast plijesni na uzorcima ozračenim dozama 3 i 10 kGy odgovarao onome na kontrolama. Smatra se da su strukturne promjene uzrokovane zračenjem smanjile rekontaminaciju čak i u povoljnim mikroklimatskim uvjetima, te da je to razlog učinkovitosti doze od 16 kGy. Također, navode da što je duža izloženost zračenju s nižom brzinom (2,8 kGy), veća je mogućnost oksidacije kemijskih skupina u molekulama celuloze, a time i indirektna šteta (da Silva i sur., 2006).

Nedavno istraživanje pokazalo je da gama zračenje uzrokuje kratkotrajnu inhibiciju rasta plijesni. Naime, praćenjem stanja uzorka papira nakon godine dana od zračenja dozom od 5 kGy nisu utvrđena nikakva vidljiva oštećenja DNA, što znači da se preživjeli soj gljivica potpuno oporavio. Zaključeno je da se gama zračenje može koristiti za tretiranje velike količine papira bez kemijske štete, te da se može smatrati dekontaminacijskim tretmanom na kraće vrijeme, ali ne i sterilizacijskim postupkom (Michaelson i sur., 2013).

Osim štetnog učinka na mikrobiotu, gama zračenje može štetno djelovati i na ozračeni materijal. Proučavanjem učinka povećanja doza zračenja (0, 1, 2, 5, 10 kGy) pri istoj brzini zračenja (2,8 Gy/s) na ozračenom papiru, znanstvenici su došli do zaključka da je povećanje doze zračenja uzrokovalo redukciju stupnja polimerizacije celuloznih vlakana papira za 40-50%, što se očitovalo smanjenjem izdržljivosti i otpornosti papira na kidanje. Nadalje, zbog formacije konjugiranih kromofora, papir je požutio, a uočen je i sinergistički efekt ubrzanog

starenja i gama zračenja pri višim dozama u depolimerizaciji vlakana celuloze (Adamo i sur., 1998).

Gama zračenje je jednostavna, sigurna i relativno jeftina metoda, bez radioaktivnih rezidua i sekundarnih radijacija jezgara ozračenih atoma. S druge strane, ne pruža zaštitu od rekontaminacije, postoji mogućnost nepovratnih oštećenja ozračenog materijala i nemogućnost radijacije na mjestu gdje se nalazi objekt. Ipak, tretman radijacije je nezamjenjiv u hitnim stanjima poput poplava, kada su potrebne intervencije na velikim predmetima, kada je informacija na papiru važnija od samog papira ili u slučajevima velikih kontaminacija ([www.bib.irb.hr](http://www.bib.irb.hr)).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Plijesni su dio prirodnog okruženja i nalaze se svugdje; u zraku, tlu, zatvorenim prostorima, ali i na predmetima kulturne baštine. Predmeti kulturne baštine uglavnom su izgrađeni od materijala organskog podrijetla, i u uvjetima povećane vlažnosti postaju pogodna podloga za rast i razvoj plijesni. Jednom kad se pojave, u povoljnim mikroklimatskim uvjetima one se množe uzrokujući propadanje materijala. Osim biodegradacije umjetnina, svojim produktima (mikotoksini i spore) mogu ugroziti zdravlje ljudi.

Gama zračenje je često korištena metoda dezinfestacije predmeta kulturne baštine. Ona djelotvorno uništava aktivno rastuće plijesni i njihove spore, sprječavajući njihov ponovni porast. Međutim, prilikom zračenja potrebno je voditi računa o vrsti plijesni i prirodi materijala koji se ozračuje.

Ciljevi rada uključuju:

1. Analizu sastava prirodne mikrobiote papira i platna obrađenog tutkalom;
2. Ispitivanje utjecaja gama zračenja u dozi od 50 kGy, primijenjenoj u dvije brzine (0,98 Gy/s i 9,8 Gy/s), u eliminaciji prirodne mikrobiote kao i namjerno inokuliranih vrsta plijesni na papiru i platnu neposredno nakon zračenja, te 7., 14. i 28. dan nakon zračenja. Odabrane vrste su *Aspergillus jensenii* kao predstavnik primarnih kolonizatora, *Cladosporium spaherospermum* kao predstavnik sekundarnih kolonizatora i *Trichoderma harzianum* kao predstavnik tercijarnih kolonizatora.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 ISPITIVANJE SASTAVA PRIRODNE MIKROBIOTE NA PLATNU I PAPIRU METODOM RAZRJEĐENJA

Pripremljeni su komadići papira (Verge beskiselinski trajni papir dimenzija 70x100, gramature 100 g/m<sup>2</sup>), i platna (laneno platno obrađeno tutkalom, dobiveno zagrijavanjem otopine kolagena prethodno izdubrenog u destiliranoj vodi), dimenzija 3,5 x 3,5 cm. Vaganjem je određena prosječna masa papira ( $\bar{m} = 0,15 \text{ g}$ ) i platna ( $\bar{m} = 0,39 \text{ g}$ ). U sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu (tzv. falkonicu) stave se priređeni kvadratići papira i platna i 3 mL (papir), odnosno 4 mL (platno) peptonske vode. To predstavlja razrjeđenje 10<sup>-1</sup>. Uzorci se homogeniziraju vorteksiranjem i priređuju se razrjeđenja u serijalnom nizu od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-4</sup>. Iz svakog priređenog razrjeđenja 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:

$$CFU/g = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

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. Suspenzija je pripravljena u komori za rad s plijesnima prethodno steriliziranom UV germicidnom lampom. Za određivanje koncentracije spora/dijelova micelija u mililitru peptonske vode korišten je Bürker-Türk hemocitometar. Odabrane vrste plijesni priređene su u koncentraciji približno  $5 \times 10^4$ /mL, odnosno inokulirane su na kvadratiće papira i platna u koncentraciji približno  $1-2 \times 10^4$ /g. Osim inokulacije svake plijesni zasebno, pripravljena je i mješavina sva tri kolonizatora u omjeru 1:1:1. Uzorci su raspodijeljeni po Petrijevim pločama na način da je svaka sadržavala papir ili platno u duplikatu. Kako bi se unutar sustava održala optimalna vlažnost uz rub petrijevke, tako da ne dodiruje uzorke, postavljen je i komadić sterilizirane vate natopljen sterilnom vodom. Uzorci su inkubirani 7 dana na 25° C uz vlažnost zraka od 75%. Uzorci priređeni na opisani način podijeljeni su u dvije skupine:

- uzorci koji se analiziraju metodom razrjeđenja neposredno nakon inkubacije;
- uzorci 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  $^{60}\text{Co}$  izvorom gama zračenja (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 dozimetrijsko mjerenje koristi se sekundarni i rutinski kemijski dozimetar na bazi etanol-klorbenzena (ISO/ASTM 51538:2009). 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.

Pripremljeni uzorci ozračeni su dozom od 50 kGy, dio uzoraka ozračen je brzinom od 0,1 Gy/s, a drugi dio sa 9,8 Gy/s. 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

U tablicama 1 i 2 prikazani su rezultati mikološke analize native mikrobiote papira i platna prije i nakon 7 dana inkubacije na 25°C pri Rv od 75%.

Tablica 1. Prikaz prirodne mikrobiote platna i papira

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

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

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

Iz tablice 1 vidljivo je da je broj plijesni na papiru i platnu gotovo podjednak ( $\sim 10^3$ , odnosno  $10^4$  CFU/g), uz dominaciju vrste *Altenaria* spp. na papiru ( $10^5$  CFU/g).

Nakon sedmodnevne inkubacije u vlažnim uvjetima i na papiru, i na platnu primijećen je porast broja različitih vrsta plijesni. Naime, došlo je do pada broja kolonija *Altenaria* spp. i *Fusarium* spp., što se može pripisati prirodnoj selekciji, te do značajnog porast broja ( $>10^4$  CFU/g) kvasaca koji u uzorcima prije inkubacije nisu detektirani (tablica 2).

Iz navedenoga se može uočiti da se plijesni koje koloniziraju platno odnosno papir kvantitativno i kvalitativno razlikuju. Ta raznolikost pripisuje se tzv. točkastoj kontaminaciji. Stoga, niti jedan komadić papira odnosno platna upotrijebljen u eksperimentu ne sadrži isti broj niti iste vrste plijesni.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da inkubacija na  $25^\circ\text{C}$  u vlažnim uvjetima pogoduje rastu plijesni na papiru i platnu. Također, na platnu ( $\sim 10^6$  CFU/g) je zabilježen zamjetno veći porast plijesni u odnosu na onaj na papiru ( $\sim 10^4$  CFU/g), iz čega se može pretpostaviti da prethodna obrada platna tutkalom pogoduje rastu plijesni. Naime, tutkalo je organsko ljepilo animalnog porijekla koje plijesnima može poslužiti kao hranjiva podloga za njihov rast i razvoj.

Tablica 3. Porast inokuliranih plijesni na uzorcima platna i papira nakon 7 dana inkubacije na  $25^\circ\text{C}$  pri Rv od 75%

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

Prema rezultatima u tablici 3 vidljiv je porast vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, kao i veći porast plijesni na uzorcima platna, nego na uzorcima papira. To

potvrđuje pretpostavku da je platno vjerojatno zbog načina obrade pogodnija podloga za rast i razvoj plijesni od papira.

S druge strane, zabilježen je jako slab porast vrste *Cladosporium sphaerospermum*. Moguće je da su neke vrste prirodne mikrobiote spriječile rast vrste *Cladosporium sphaerospermum*.

Zračenje dozom od 50 kGy dovelo je do gotovo potpune dekontaminacije pripadajućih uzoraka, neovisno o brzini zračenja. Naime, nakon 7., 14. i 28. dana zabilježena je po jedna kolonija sterilnog bijelog micelija, ali nije bilo porasta ranije detektirane prirodne mikrobiote, kao ni namjerno inokuliranih primarnih, sekundarnih i tercijarnih kolonizatora. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Uzorci platna i papira nakon 0., 7., 14., i 28. dana od dana zračenja dozom od 50 kGy

Mikrobiota papira i platna	Koncentracija plijesni (CFU/g)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1Gy/s	9,8Gy/s	0,1Gy/s	9,8Gy/s	0,1Gy/s	9,8Gy/s	0,1Gy/s	9,8Gy/s
<i>Aspergillus jensenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Miješana kultura	-	-	-	-	-	-	-	-
Prirodna mikrobiota	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontaminacija (bijeli micelij)	-	-	+	+	+	+	+	+

Prema Europskoj farmakopeji 25 kGy je referentna doza sterilizacije gama zračenjem koja garantira SAL (Sterility Assurance Level) od  $10^{-6}$  m.o./ml. SAL je pojam koji definira sterilnost proizvoda odnosno odsustvo mikroba na tom proizvodu (Silindir i Özer, 2009).

Referentna doza terminalne sterilizacije je duplo manja od doze korištene u eksperimentu.

Kao metoda sterilizacije, gama zračenje uzrokuje direktnu štetu za staničnu DNA, inducira mutacije i ubija stanicu, uz to, djeluje i indirektno, tako što ozračivanjem stanice, stanična voda prelazi u aktivni kisik, radikale i perokside koji uzrokuju oksidacijski stres i dvostruke lomove lanaca DNA (da Silva i sur., 2006).

Osim štetnog učinka na mikrobiotu ozračenog materijala, gama zračenje može štetno djelovati i na ozračenom materijalu, u ovom slučaju na papir i platno. Zračenje inducira kemijske promjene u molekularnoj strukturi papira odnosno platna kao što su ionizacija i oksidacija kemijskih skupina, "crosslinking", te depolimerizacija molekula celuloze. Te mikroskopske promjene očituju se u promjenama mehaničkih (otpornost prema kidanju, otpornost prema istezanju papira, otpornost prema savijanju, te promjena dimenzija uslijed djelovanja vlage i temperature tj. krutost papira), optičkih (bjelina, svjetlina, opacitet, boja) i kemijskih (pH, broj karbonilnih i karboksilnih skupina) svojstava papira ([www.bib.irb.hr](http://www.bib.irb.hr)).

Problem kod visokih doza gama zračenja je taj što do izražaja dolaze nedostaci samog zračenja. Naime, nakon zračenja papir je poprimio žutu boju, postao krt i lomljiv (Michaelsen i sur., 2013; Sterflinger i Piñar, 2013). Iako depolimerizacija celuloznih vlakana smanjuje izdržljivost i otpornost papira odnosno platna ([www.bib.irb.hr](http://www.bib.irb.hr)), isto tako smanjuje rekontaminaciju ozračenih predmeta (da Silva i sur., 2006).

## 5 ZAKLJUČCI

- Platno impregnirano tutkalom pogodnije je od papira za rast plijesni
- Apsorpcijska doza gama zračenja od 50 kGy gotovo potpuno uništava sve vrste plijesni (prirodnu mikrobiotu i namjerno inokulirane primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore) na uzorcima papira i platna, neovisno o brzini doze zračenja, izuzev pojave po jedne kolonije sterilnog micelija nakon 7, 14 i 28. dana od zračenja
- U nastavku treba napraviti sistematična istraživanja o pojavljivanju prirodne mikrobiote 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 preživljavanje pojedinih vrsta plijesni.
- Stoga je u postupku zaštite predmeta kulturne baštine nužan interdisciplinarni znanstveni pristup koji pored mikrobiološke analize uključuje i utjecaj zračenja na organski materijal na molekularnoj razini.

## 6 LITERATURA

Adamo M, Giovanotti M, Magaudda G, Plossi M, Zappala M, Rocchetti F, Rossi G. Effect of gamma rays on pure cellulose paper. *Restaurator*, 1998, 19, 41-59.

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.

Duraković S, Redžepović S. Uvod u opću mikrobiologiju. Zagreb, KUGLER d.o.o., 2002, str. 343-352.

Dželalija M. Ionizirajuće zračenje u biosferi (interna skripta). Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2006, str. 6-7.

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

Grant C, Hunter CA, Flanigan B, Bravery AF. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterior Biodegradation*, 1989, 25, 259–284.

Hasenay D, Krtalić M, Šimunić Z. Obrazovanje studenata informatologije o čuvanju i zaštiti kulturne baštine. *Život i škola*, 25, 2011, 61–75.

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

Irradiation Method for the Protection of Croatian Cultural Heritage Objects, 2011., [http://www.hrz.hr/images/stories/strucni\\_skupovi/radijacija\\_zadar/3.\\_d.\\_razem\\_protection](http://www.hrz.hr/images/stories/strucni_skupovi/radijacija_zadar/3._d._razem_protection), pristupljeno 15.12.2016.

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

Material response as a criteria for approach to radiation treatment of cultural heritage objects, 2014., [http://bib.irb.hr/datoteka/755076.Pucic\\_I\\_1.pdf](http://bib.irb.hr/datoteka/755076.Pucic_I_1.pdf), pristupljeno 5.12.2016.

Mesquita N. Identification and control of fungal contamination in ancient heritage documents: a thesis. Universidade de Coimbra, 2013, 32-37.

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.

Mlinarić-Missoni E, Babić-Važić V. Oblik, građa i razmnožavanje gljiva. U: Medicinska bakteriologija i mikologija. Kalenić S, urednica, Zagreb, Merkur A.B.D., 2005, str. 405-421.

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

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

Pigmenti u slikarstvu, <https://www.scribd.com/document/22149681/Pigmenti-u-slikarstvu-Pigments-in-the-painting>, pristupljeno 5.12.2016.

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

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

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

Rizici pojave karcinoma uslijed izloženosti ionizirajućem zračenju, <http://web.zpr.fer.hr/ergonomija/2004/librenjak/index.htm>, pristupljeno 3.1.2017.

Shea KM. Technical report: irradiation of food. *Pediatrics*, 2000, 106, 1505-10.

Silindir M, Özer Yekta A. Sterilization Methods and the Comparison of E-beam Sterilization with Gamma Radiation Sterilization, *FABAD J Pharm Sci*, 2009, 34, 43-53.

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.

Sterflinger K, Pinzari F. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environ Microbiol*, 2012, 14, 559-566.

Zračnja, 2003., <http://web.zpr.fer.hr/ergonomija/2003/klemencic/index.html>, pristupljeno 3.1.2017.

Zračnje, 2015., <http://www.fsb.unizg.hr/termovel/Zracenje.htm>, pristupljeno 3.1.2017.

Zračnje, 2011., [http://lib.irb.hr/web/images/stories/pdf/Zracenje\\_ppt\\_final.pdf](http://lib.irb.hr/web/images/stories/pdf/Zracenje_ppt_final.pdf), pristupljeno 15.12.2016.



## 7 SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1 SAŽETAK

Plijesni imaju ključnu ulogu u destrukciji predmeta kulturne baštine. Međutim, ovu destruktivnu aktivnost učinkovito i sigurno zaustavlja gama zračenje.

U ovom radu istraživana je utjecaj gama zračenja na prirodnu mikrobiotu papira i platna, te na odabrane vrste inokuliranih kolonizatora (*Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* i *Trichoderma harzianum*). Uzorci su tretirani pomoću izvora u Laboratoriju za radijacijsku kemiju u dozimetriju (LRKD) Instituta Ruđer Bošković (IRB). Primijenjena je apsorpcijska doza od 50 kGy u dvije brzine zračenja (0,1 i 9,8 Gy/s). Mikrobiološka analiza ozračenih uzoraka provedena je 0., 7., 14. i 28. dan nakon zračenja.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da apsorpcijska doza od 50 kGy gotovo potpuno uništava sve vrste plijesni (prirodnu mikrobiotu, odnosno namjerno inokulirane primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore) i njihove spore na ozračenim uzorcima, bez obzira na brzinu zračenja i bez pojave recidiva. Izuzetak je porast po jedne kolonije sterilnog micelija nakon 7., 14. i 28. dana nakon zračenja. Ovakvi rezultati su očekivani s obzirom da je 25 kGy referentna doza sterilizacije zračenjem. Problem kod visokih doza gama zračenja je što do izražaja dolaze nedostaci samog zračenja. Naime, prema literaturnim podacima mijenjaju se kemijska, fizička i mehanička svojstva papira, što rezultira dodatnim oštećenjima ozračenih materijala.

Dakle, u postupku zaštite predmeta kulturne baštine nužan je interdisciplinarni znanstveni pristup u kojem se uz mikrobiološke analize mora proučavati utjecaj zračenja na organski materijal na molekularnoj razini.

## 7.2 SUMMARY

Fungi play a fundamental role in biodeterioration of cultural heritage. However, fungal growth is effectively and safely stopped by gamma radiation.

This research evaluated the effect of gamma radiation on natural mycobiota of paper and glue coated linen as well as on the selected species of inoculated fungal colonies (*Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Trichoderma harzianum*). Inoculated samples have been treated by the Laboratory for radiation chemistry and dosimetry of Ruđer Bošković Institute source. Dose of 50 kGy was applied at two dose rates (0,1 and 9,8 Gy/s). Microbiological analysis was made on 0th, 7th, 14th and 28th day after treatment.

The results have shown that dose of 50 kGy almost completely destroys all fungal colonies (naturally occurring mycobiota and artificially inoculated primary, secondary and tertiary colonizers) and their spores regardless of the applied dose rate, except appearance of one colony of sterile mycelia on 7th, 14th and 28th day upon irradiation. Considering that 25 kGy is defined as a reference dose of terminal sterilization, this outcome was expected. A downside of a high dose of gamma radiation is a change in chemical, physical and mechanical properties of the cellulose materials.

To conclude, an interdisciplinary scientific approach including microbial as well as molecular analysis of organic material after radiation should be used in order to conserve cultural heritage.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### ANTIFUNGALNI UČINAK GAMA ZRAČENJA NA MIKOBIOITU CELULOZNIH MATERIJALA

**Martina Kriletić**

#### SAŽETAK

Plijesni imaju ključnu ulogu u destrukciji predmeta kulturne baštine. Međutim, njihovu destruktivnu aktivnost učinkovito i sigurno zaustavlja gama zračenje.

U ovom radu istraživana je utjecaj gama zračenja na prirodnu mikrobiotu papira i platna, te na odabrane vrste inokuliranih kolonizatora (*Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* i *Trichoderma harzianum*). Uzorci su tretirani pomoću izvora u Laboratoriju za radijacijsku kemiju u dozimetriju (LRKD) Instituta Ruđer Bošković (IRB). Primijenjena je apsorpcijska doza od 50 kGy u dvije brzine zračenja (0,1 i 9,8 Gy/s). Mikrobiološka analiza ozračenih uzoraka provedena je 0., 7., 14. i 28. dan nakon zračenja. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da apsorpcijska doza od 50 kGy gotovo potpuno uništava sve vrste plijesni (prirodnu mikrobiotu, odnosno namjerno inokulirane primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore) i njihove spore na ozračenim uzorcima, bez obzira na brzinu zračenja i bez pojave recidiva. Izuzetak je porast po jedne kolonije sterilnog micelija nakon 7., 14. i 28. dana nakon zračenja. Ovakvi rezultati su očekivani s obzirom da je 25 kGy referentna doza sterilizacije zračenjem. Problem kod visokih doza gama zračenja je što do izražaja dolaze nedostaci samog zračenja. Naime, prema literaturnim podacima mijenjaju se kemijska, fizička i mehanička svojstva papira, što rezultira dodatnim oštećenjima ozračenih materijala. Dakle, u postupku zaštite predmeta kulturne baštine nužan je interdisciplinarni znanstveni pristup u kojem se uz mikrobiološke analize mora proučavati utjecaj zračenja na organski materijal na molekularnoj razini.

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

Rad sadrži: 23 stranica, 4 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kulturna baština, gama zračenje, plijesni

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Daniela Jakšić Despot**, *asistent-poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj, 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Microbiology  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# ANTIFUNGAL EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION ON MYCOBIOTA OF CELLULOSE MATERIALS

Martina Kriletić

## SUMMARY

Fungi play a fundamental role in biodeterioration of cultural heritage. However, fungal growth is effectively and safely stopped by gamma radiation.

This research evaluated the effect of gamma radiation on natural mycobiota of paper and glue coated linen as well as on the selected species of inoculated fungal colonies (*Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Trichoderma harzianum*). Inoculated samples have been treated by the Laboratory for radiation chemistry and dosimetry of Ruđer Bošković Institute source. Dose of 50 kGy was applied at two dose rates (0,1 and 9,8 Gy/s). Microbiological analysis was made on 0th, 7th, 14th and 28th day after treatment. The results have shown that dose of 50 kGy almost completely destroys all fungal colonies (naturally occurring mycobiota and artificially inoculated primary, secondary and tertiary colonizers) and their spores regardless of the applied dose rate, except appearance of one colony of sterile mycelia on 7th, 14th and 28th day upon irradiation. Considering that 25 kGy is defined as a reference dose of terminal sterilization, this outcome was expected. A downside of a high dose of gamma radiation is a change in chemical, physical and mechanical properties of the cellulose materials. To conclude, an interdisciplinary scientific approach including microbial as well as molecular analysis of organic material after radiation should be used in order to conserve cultural heritage.

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

Thesis includes: 23 pages, 4 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cultural heritage, gamma radiation, fungi

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  
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan, Ph.D. Associate Professor** / University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dr. sc. Daniela Jakšić Despot, Ph.D. Postdoctoral Researcher** / University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2017