

Otpornost plijesni *Cladosporium sphaerospermum* na gama zračenje

Simović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:259302>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ana Simović

**Otpornost plijesni *Cladosporium
sphaerospermum* na gama zračenje**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom
fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na uloženom trudu i vremenu, stručnom vodstvu i prenesenom znanju. Također, hvala dr. sc. Branki Mihaljević i dr. sc. Katarini Marušić s Instituta Ruđer Bošković na suradnji i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Zahvaljujem i kolegici i prijateljici Mariji Matijević što je sa mnom podijelila ovo iskustvo.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine.....	1
1.2. Biodeterioracija, metode konzervacije i dekontaminacije papira.....	3
1.3. Gama zračenje i primjena	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Mikrobiološka obrada uzoraka papira metodom razrjeđenja	9
3.2. Inokulacija papira odabranom vrstom plijesni	10
3.3. Zračenje uzoraka.....	10
3.4. Određivanje doze D_{10}	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
5. ZAKLJUČAK	20
6. LITERATURA.....	21
7. SAŽETAK/SUMMARY	24
7.1. SAŽETAK.....	24
7.2. SUMMARY.....	25
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine

Predmeti kulturne baštine su arheološka pronalazišta, građevine, skulpture, spomenici, slike, zapisi i dokumenti (Sterflinger i Piñar, 2013). Značajni dokazi intelektualnih i kulturnih dostignuća čovječanstva sadržani su u dokumentima. Postoje u mnogim oblicima, od papirusa preko papira do modernih magnetskih i optičkih medija. Ti dokumenti većinom su sačinjeni od organskih materijala koji sadrže polimere u rasponu od celuloze do sintetičkih smola. Kao i ostali predmeti napravljeni ljudskom rukom, podložni su fizikalnim, kemijskim i biološkim oštećenjima. Ključni elementi koje treba uzeti u obzir su stanje konzervacije i okolišni i klimatski čimbenici kao što su temperatura i vlažnost. Najozbiljnija i najznačajnija oštećenja primijećena su na knjižničkim i arhivskim materijalima. Manje je poznato da su i moderni mediji, uključujući i magnetske diskove također podložni biodeterioraciji. Zaštita arhivskog i knjižničkog materijala u najširem smislu uključuje one funkcije i aktivnosti koje omogućavaju siguran i odgovarajući okoliš za produljenje životnog vijeka dokumenata koliko god je to moguće. Presudno je izbjeći ili limitirati rast mikroorganizama (Cappitelli i Sorlini, 2005).

Objekti kulturne baštine heterogena su staništa različitih bakterija i gljivica. Premda se ta staništa smatraju oligotropnima, mogu biti kolonizirana različitim grupacijama mikroorganizama. Predmeti kulturne baštine od tekstila, papira, drva pa čak i kamena, dobra su podloga za njihov rast. Taj proces prolazi neprimjetno dok ne dođe do stvaranja biofilma, diskoloracije ili slabljenja fizikalnog integriteta materijala (Pyzik i sur., 2021). Knjižnice i arhivi pružaju pogodne uvjete za rast mikroorganizama. Primjerice, tropske zemlje, kao Brazil, s frekventnim pojavama visokih vlažnosti i temperatura, stvaraju okolišne uvjete povoljne za razvoj mikroba. Ta situacija predstavlja rizik za ljudsko zdravlje zbog plijesni kao kontaminanata knjiga i dokumenata. Osim toga uzrokuje i propadanje tih rijetkih i antičkih dokumenata. Knjižnice i muzeji odgovorni su za čuvanje našeg naslijeđa. Izazov je sačuvati milijune knjiga tiskanih na fragilnom papiru proizvedenom procesima iz 19. stoljeća (da Silva i sur., 2006). Papir, kao i ostali predmeti kulturne baštine, vremenom degradira, ali konzervacija usporava proces deterioracije (Cappitelli i sur., 2010). Stručnjaci zaduženi za arhivsku i knjižničku građu bave se prvenstveno starenjem i konzervacijom papira. Papirna vlakna sastoje se većim dijelom od celuloze (glavni izvor energije za mikroorganizme), hemiceluloze i lignina, ali papir sadrži i aditive kao što su škrob, minerali i sintetički polimeri.

Iz toga proizlazi da je papir multikomponentni materijal i zbog kompleksne i raznolike prirode rezultati istraživanja u kemiji papira mogu biti teški za interpretaciju. Deterioracija papira prouzročena je mnogim čimbenicima kao što su hidroliza, oksidansi, svjetlost, zagađenje zraka i prisutnost mikroorganizama. Ključnu ulogu imaju podrijetlo celuloznih materija, kao i procedure izrade i skladištenja papira, aditivi i uvjeti čuvanja. Kemijske promjene koje se događaju unutar papira su multiparametarni procesi (Area i Cheradame, 2011).

Raznolikost plijesni u muzejskim prostorima vrlo je slična rasprostranjenosti u hrani i općenito unutarnjim prostorima. Najznačajnije plijesni pronađene u muzejima su vrste iz rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acermanium*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Eurotium*, *Phoma*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* i kvasci roda *Rhodotorula* s velikim afinitetom prema osmotskim okruženjima (Sterflinger i Pinzari, 2012). Najčešće izolirane plijesni pronađene na starim knjigama su *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. i *Fusarium* spp. (Glevitzky i sur., 2021). S biodeterioracijske točke gledišta potencijal plijesni na objektima kulturne baštine možemo podijeliti u dvije glavne skupine: (1) oportunističke plijesni koje rastu na svim materijalima uz dostupnu vlagu. Te gljivice nisu u stanju enzimski degradirati materijal i koristiti ga kao glavni izvor energije. (2) patogene plijesni koje su supstratno specifične i sposobne degradirati materijal kao na primjer celulozitične gljivice na papiru i keratinolitičke na koži, kosi i perju (Meier i Peterson, 2006; Blyskal, 2009). Obje skupine mogu izazvati ozbiljnu deterioraciju, ali jedino patogene plijesni uništavaju materijal (Sterflinger and Pinzari, 2012).

Plijesni se šire okolišem u obliku spora i konidija i lako se prenose vjetrom i strujanjem zraka. Spore su ubikvitarne i zbog toga su predmeti konstantno izloženi gljivičnoj infekciji u unutarnjim i vanjskim prostorima (Kaarakainen i sur., 2009). Postoji mogućnost kontaminacije papira i u procesu proizvodnje, ali ipak većina plijesni dolazi iz prašine (Florian, 2002). Spore plijesni mogu prenositi i neki insekti koji su česti stanovnici knjižnica (Sterflinger i Pinzari, 2012).

Na rast plijesni utječu brojni čimbenici kao što su pH, temperatura, aktivitet vode (a_w), sastav supstrata, količina vlage i prisutnost kisika. Plijesni su aerobni organizmi i rastu uglavnom na površinama supstrata. 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 (optimalno 5). Mezofilni su organizmi što znači da rastu na temperaturama od 10 °C do 35 °C. Za svoj rast

trebaju izvor ugljika i dušika (Pitt i Hocking, 2009). Aktivitet vode glavni je čimbenik i razlog zbog kojeg su u muzejima plijesni dominantni u usporedbi s bakterijama (Sterflinger i Pinzari, 2012). To je fizikalno-kemijska veličina koja pokazuje koliki je sadržaj vode fizički vezan u samom materijalu i pokazatelj je količine vode koja je mikroorganizmu na raspolaganju (Duraković i Redžepović, 2002). 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). S obzirom na a_w , plijesni se dijele na primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore (Grant i sur., 1989). Primarni kolonizatori (kserofilni) su plijesni koje rastu pri $a_w < 0.8$ (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, ostale *Aspergillus* vrste, *Wallemia sebi* i *Paecilomyces variotti*). Sekundarni kolonizatori su plijesni koje rastu pri vrijednosti a_w između 0.8 i 0.9 (različite vrste rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma* i *Ulocladium*). Tercijarni kolonizatori (hidrofilni) su plijesni koje rastu pri $a_w > 0.9$ (*Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma* spp.) (Nielsen, 2003).

Mnoge vrste plijesni imaju sposobnost izlučivanja celulaze. To je enzim koji razgrađuje celulozu do manjih topljivih jedinica koje plijesni koriste kao hranu, ali i omogućuje prodiranje hifa u dublje slojeve materijala (Adamo i sur., 2003; Garg i sur., 1995; Montegut i sur., 1991). Osim izlučivanja celulaze, plijesni oštećuju papir i na druge načine. Poznat je fenomen „foxing“. To su blijede, smečkaste difuzne točkice koje se pojavljuju na papiru i drugim površinama. Uključuju mrlje širokog raspona boja, oblika i veličina i mogu biti klasificirane prema svojim vizualnim karakteristikama i analizom sastava (Mina, 2019). „Foxing“ predstavlja ozbiljan problem u konzervaciji papira budući da mrlje mogu migrirati po stranicama uzrokujući nepopravljivu štetu, koja u konačnici ugrožava legitimitet dokumenta (Nitiu i sur., 2020).

1.2. Biodeterioracija, metode konzervacije i dekontaminacije papira

Učinkovitost zaštite i konzervacije predmeta kulturne baštine ovise o odgovarajućoj razini sigurnosti, kontroli okoliša, upravljanju, brizi i tretmanu okruženja u smislu zaštite objekta od fizikalnih i kemijskih štetnih djelovanja. Preventivne mjere zaštite objekata kulturne baštine igraju ključnu ulogu budući da omogućavaju kontinuiranu kontrolu stanja objekata. Atmosfera normalno sadrži, osim plinovitih polutanata, različite čestice biološkog podrijetla kao što su peludna zrna, virusi, bakterije i spore plijesni koji su odgovorni za biodeterioraciju materijala (Ruga i sur., 2019). Biodeterioracija je svaka nepoželjna promjena u materijalu nastala vitalnim aktivnostima organizama (Hueck HJ, 1965).

Kontrola klime, frekventno čišćenje, te monitoring predmeta kulturne baštine i okoliša najvažnije su mjere prevencije (Sterflinger i Pinzari, 2012). Metoda „preventivne konzervacije“ predstavlja skup mjera u situacijama pojave potencijalnog rizika. Prioritet moraju biti preventivne intervencije dobivene analizom uvjeta okoliša (temperatura, relativna vlažnost) na mjestima gdje su predmeti kulturne baštine i analizom kvalitete zraka s kemijskog i biološkog stajališta (Ruga i sur., 2019).

Kako bi se sačuvali predmeti kulturne baštine važno je kontrolirati aktivno rastuće plijesni, ali je također bitno smanjiti broj prisutnih spora koje mogu dugo preživjeti u slojevima prašine čekajući povoljne uvjete za rast (Sterflinger i Pinar, 2013). Spore u stanju mirovanja imaju nizak 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. Konzervacijski postupak trebao bi biti usmjeren na spore jer je vegetativne hife relativno lako kontrolirati održavanjem propisanih konzervacijskih uvjeta (Michaelsen i sur., 2013).

Jedan od novijih pristupa u konzervaciji papirnih predmeta kulturne baštine opisan je u istraživanju Schmitza i sur. (2019). Taj pristup pretpostavlja korištenje ionskih otopina. U tom se procesu celulozna vlakna solubiliziraju u otopini iona i dimetilsulfoksida. Nakon toga se površina papira tretira tom otopinom. Ostaci otapala se inkorporiraju u papirnati materijal tijekom ovog postupka. Ova metoda ima veliki potencijal u smanjivanju ekološki štetnih procesa u kemijskoj industriji. Zanimljivo je da klasa ionskih otapala korištenih za ojačavanje papira (1-butil-3-metilimidazol-acetat kao najznačajniji) ima sličnu strukturu kao poznati antifungalni lijekovi klotrimazol i mikonazol. Autori naglašavaju potrebu dodatnih istraživanja ove metode (Schmitz i sur., 2019).

Metode dekontaminacije dijele se na kemijske, fizikalne i biološke. U nastavku su navedene neke od tih metoda, kao i njihove prednosti i nedostaci. U kemijske metode ubrajaju se tradicionalni kemijski biocidi i nanočestice. Prednosti tih metoda su ekonomičnost, jednostavnost i djelotvornost na širokom spektru mikroorganizama. Nedostaci su toksični efekti kako za korisnike, tako i za okoliš. Nadalje, dugotrajna učinkovitost vrlo je niska i učestalo korištenje može prouzročiti oštećenja tretiranih predmeta. Fizikalne metode dijele se na mehaničko uklanjanje, UV-C zračenje, gama zračenje, lasersko zračenje, toplinski šok, mikrovalove i suhi led. Mehaničko uklanjanje je efikasno na dobro očuvanim površinama i ne zahtijeva korištenje toksičnih sastojaka. Nedostatak je niska dugotrajna učinkovitost i

moгуćnost oštećenja materijala višestrukim korištenjem. Nadalje, može doći do prodora bioloških kontaminanata dublje u materijal i do zagađenja okoliša. Prednost UV-C zračenja je da ne generira toksične elemente i štetne kemikalije u okoliš, te je jednostavno za korištenje. Nedostaci su slabo prodiranje u dubinu materijala i neselektivnost prema specifičnim biodeteriogensima. Prednosti i nedostaci gama zračenja bit će prikazani u sljedećem poglavlju. Lasersko zračenje je kontrolabilno, selektivno i ekološki prihvatljivo. Rezultati se postižu vrlo brzo i ne uzrokuje nikakve štetne posljedice za ljude. S druge strane, zahtijeva specijalizirano stručno osoblje i uzrokuje visoke troškove. Toplinski šok, mikrovalovi i suhi led daju vrlo brze rezultate uz strogo lokaliziranu primjenu. Ne koriste ni ne proizvode toksične elemente. Oprema za ove metode vrlo je komplicirana za transport i zahtijeva velike izvore energije, zbog čega je vrlo skupa. Biološke metode dijele se na biocidne postupke komponentama prirodnog podrijetla i ostale biološke metode. Te metode su sigurne za ljude i povoljne za okoliš. Generalno su jednostavne za upotrebu i učinkovite na širokom spektru mikroorganizama. Nedostaci su vrlo malo dostupnih proizvoda na tržištu i malo podataka zasnovanih na istraživanjima (Cappitelli i sur., 2020).

1.3. Gama zračenje i primjena

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 radioaktivni su (Jakobović, 1991). Gama zračenje čine elektromagnetski valovi duljina kraćih od 10^{-13} metara. Nastaje energijskim prijelazima nestabilnih atomskih jezgri radioaktivnih tvari, anihilacijom čestica i usporavanjem vrlo nabijenih čestica (Dželalija, 2006).

Sterilizacija gama zračenjem predstavlja učinkovit način čuvanja starih knjiga, arhivskih dokumenata i papirnih predmeta kulturne baštine od oštećenja prouzročenih plijesnima. Uz to osigurava dugovječnost muzeja i knjižnica i zdrav okoliš za zaposlenike i posjetitelje (da Silva i sur., 2006). Sterilizacija se definira kao bilo koji proces koji učinkovito ubija ili eliminira sve mikroorganizme kao što su gljivice, bakterije, virusi i spore. Postoji mnogo različitih načina sterilizacije ovisno o cilju i materijalu (Aquino, 2012).

Gama zračenje je postupak sterilizacije koji direktno oštećuje stanice DNA ionizacijom uzrokujući mutacije i uništavanje stanica. Isto tako zračenje neizravno oštećuje DNA na način da dovodi do radiolize intracelularne tekućine i stvaranja reaktivnih kisikovih atoma,

slobodnih radikala i peroksida uzrokujući jednostruke i dvostruke lomove DNA (Farkas, 2006; McNamara i sur., 2003). Bitna prednost gama zračenja je sigurnost. Ne predstavlja opasnost za operatera. Na zračenim predmetima ne zaostaju radioaktivni rezidui pa predmeti ne predstavljaju rizik za restauratore, posjetitelje i okolinu. Dobra moć penetracije omogućuje prodiranje u sve slojeve predmeta. Učinkovitost je proporcionalna korištenoj dozi, a to je parametar koji se lako kontrolira i određuje. Zbog stabilnog radijacijskog polja metoda je pouzdana. Tretman se izvodi u kratkom vremenu pa je moguće istovremeno ozračiti velik broj predmeta, a samim time su troškovi prihvatljivi (Cappitelli i sur., 2020; Ponta, 2008). Najveći nedostatak gama zračenja je što njegova interakcija s bilo kojom tvari može uzrokovati promjenu njezinih kemijskih i fizikalnih svojstava (Ponta, 2008). Time može doći do značajnijih oštećenja papira u vidu kemijske modifikacije, tj. depolimerizacije celuloze i lignina (Kortei i sur., 2015; Magaudo, 2004; Adamo i sur., 1998). Primjena je moguća samo na predmetima ograničene veličine (Cappitelli i sur., 2020).

Najvažniji parametar prilikom ozračivanja je apsorbirana doza zračenja. Potrebna doza zavisi od razine početne kontaminacije, radioosjetljivosti kontaminirajuće flore i željenog faktora redukcije nametnika. Dok se za radijacijsku sterilizaciju primjenjuje doza od 25 kGy, za kontrolu gljivica obično dostaje 2 – 10 kGy, a doza od 0,5 kGy učinkovito uništava insekte u svim fazama razvoja (Brower i Tilton, 1985). Prilikom ozračivanja predmeta sastavljenih od osjetljivih prirodnih polimera, npr. papira, tekstila i kože, dozu treba podesiti tako da i najmanja doza, učinkovita protiv čimbenika biorazgradnje, istovremeno bude manja od doze koja bi izazvala degradaciju materijala (Katušin-Ražem i sur., 2013).

Otpornost mikroorganizama na zračenje mjeri se vrijednošću D_{10} , decimalnom redukcijском dozom. Definira se kao doza zračenja potrebna da inaktivira 90 % populacije, odnosno da se populacija smanji za 1 log.

Mnogi čimbenici utječu na otpornost mikroorganizama prema gama zračenju oblikujući krivulju preživljavanja. Najznačajniji čimbenici su:

- a. Veličina i struktura DNA u stanici mikroorganizma.
- b. Komponente u stanici povezane s DNA, kao što su peptidi, nukleoproteini, RNA, lipidi, lipoproteini i metalni ioni.
- c. Kisik, čije prisustvo za vrijeme zračenja povećava smrtnost mikroorganizama. U potpuno anaerobnim uvjetima vrijednost D_{10} povećava se 2,5-4,7 puta u odnosu na aerobne uvjete.

- d. Udio vode: mikroorganizmi su najotporniji prema zračenju u potpuno suhim uvjetima. Uzrok tome je nedostatak ili mali broj slobodnih radikala formiranih iz molekula vode pri zračenju i time je razina indirektnog utjecaja na DNA malena ili je nema.
- e. Temperatura: pri temperaturama višim od 45 °C sinergijski se povećava fungicidni efekt ionizirajućeg zračenja. Vegetativni mikroorganizmi značajno su otporniji prema zračenju na vrlo niskim temperaturama. To je povezano sa smanjenjem aktiviteta vode pri niskim temperaturama. Pri uvjetima smrzavanja difuzija radikala vrlo je ograničena.
- f. Medij: Sastav medija u kojem se mikroorganizmi nalaze igra značajnu ulogu u mikrobiološkim efektima. Vrijednosti D_{10} određenih mikroba vrlo se razlikuju u različitim medijima.
- g. Uvjeti nakon zračenja. Mikroorganizmi koji prežive zračenje bit će vjerojatno osjetljiviji na uvjete okoliša (temperatura, pH, nutrijenti, inhibitori) od neozračenih stanica (Aquino, 2012).

Postoji mogućnost da neki pigmenti sintetizirani u plijesnima igraju ulogu u otpornosti prema ionizirajućem zračenju. Kod plijesni koje sintetiziraju pigmente kao što su melanin i karotenoidi uočene su više D_{10} vrijednosti. Melanin je kompleksan polimer različitih svojstava koji mnogi organizmi enzimski proizvode iz jednostavnih prekursora. Svojstvo melanina je da apsorbira sve vrste elektromagnetskog zračenja. Dokaz te tvrdnje su pronalasci melaniziranih organizama u visokoozračenim područjima kao što su oštećeni reaktori u Černobilu, svemirske postaje i planine na Antarktici (Dadachova i Casadevall, 2008).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrste iz roda *Cladosporium* česti su kolonizatori papirnih dokumenata i slika te uzrokuju njihovo propadanje zbog mogućnosti da prodru duboko u materijal što dovodi do enzimske degradacije i posljedično mehaničke razgradnje. Taj je proces potrebno kontrolirati i usporiti, a kao najučinkovitija metoda pokazalo se gama zračenje. Međutim, ukoliko se neadekvatno primijeni, može imati negativan učinak na svojstva materijala. Iz tog je razloga potrebno provesti ispitivanja te utvrditi odgovarajuću dozu i brzinu doze zračenja koja će dovesti do redukcije plijesni i njihovih spora, a pritom ne uzrokovati ubrzano starenje i mehaničko oštećenje materijala.

Specifični cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj gama zračenja u dozama od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s na inhibiciju rasta vrste *Cladosporium sphaerospermum*, namjerno inokulirane na papir, neposredno nakon zračenja. Vrsta *C. sphaerospermum* izabrana je kao test-plijesan jer se u do sada dostupnim istraživanjima pokazala otpornom na relativno visoke doze gama zračenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Mikrobiološka obrada uzoraka papira metodom razrjeđenja

Kvadratići papira dimenzija 3,5 cm x 3,5 cm ostavljeni su da se homogeniziraju u sterilnoj plastičnoj vrećici. Nakon nekoliko dana izvagano je desetak kvadratića i određena je srednja vrijednost mase jednog papira koja je iznosila 0,15 g. Korišteni papir je Verge beskiselisni trajni papir, gramature 120 g/m², dimenzija 70 cm x 100 cm.

Priređeni kvadratići papira stavljeni su u sterilne polipropilenske konusne epruvete (tzv. falkonice) te je dodano 2 ml sterilne vode s 0,05 % Tween 80 (sterilni 5 % štok u vodi) i homogenizirano vorteksiranjem. Na taj je način dobiveno razrjeđenje 10⁻¹. Razrjeđenja od 10⁻² do 10⁻⁴ dobivena su miješanjem 100 µL prethodnog s 900 µL vode s Tweenom. Iz svakog priređenog razrjeđenja na površinu sterilne hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici nanosi se 100 µL uzorka i sterilnim staklenim štapićem (tzv. L-štapić) razmaže po površini podloge. Svi su uzorci priređeni u duplikatu. Kao hranjiva podloga korišten je MALT ekstrakt agar proizvođača Sigma-Aldrich, pripremljen suspendiranjem 50 g praha u 1 L destilirane vode, zatim kuhanjem do otapanja. Tako priređena podloga autoklavira se prema uvjetima sterilizacije za mikrobiološke podloge; temperatura 121 °C, tlak 1,2 bar, 15 minuta. Inkubacija uzoraka provodi se pet do sedam dana na 25 °C. Nakon perioda inkubacije na pločama se izbroje porasle kolonije, pri čemu se za brojanje ne uzimaju u obzir razrjeđenja koja sadrže više od 150 kolonija.

Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g) računa se prema 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 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 papira odabranom vrstom plijesni

Vrsta *Cladosporium sphaerospermum* inokulirana je na MEA podlogu i nakon deset dana inkubacije na 25 °C iz poraslih sporulirajućih kultura priređene su suspenzije plijesni u peptonskoj vodi. Suspenzija je pripremljena u komori za rad pod UV svjetlom i uz plamenik. 100 µL suspenzije stavljeno je u kivetu te je dodavana voda sa Tweenom. Kiveta je stavljena u denzitometar i kada je optička gustoća iznosila 1 dobila se koncentracija inokuluma od 1×10^6 CFU/g.

Komadići papira stavljeni su u sterilne polipropilenske konusne epruvete (15 ml) te sterilizirani autoklaviranjem (121 °C, 1,2 bar, 15 minuta). Dio uzoraka podijeljen je u četiri kontrolne skupine po tri uzorka. Prva skupina odmah je nasadena na podlogu kao kontrola autoklaviranja. Druga skupina inokulirana je suspenzijom konidija *C. sphaerospermum* 1×10^2 CFU/g i nasadena kao kontrola inokuluma. Treća skupina podvrgnuta je inkubaciji 5-7 dana na 25 °C uz relativnu vlažnost 70-80 %. Četvrta skupina inokulirana je suspenzijom konidija *C. sphaerospermum* 1×10^2 CFU/g te stavljena na inkubaciju u istim uvjetima. Nakon inkubacije treća i četvrta skupina nasadene su kao kontrola inkubacije u vlažnom. Ostatak uzoraka, predviđen za zračenje, podijeljen je u dvije skupine. Prva, inokulirana suspenzijom konidija *C. sphaerospermum* 1×10^2 CFU/g i druga, neinokulirana. Obje skupine stavljene su na inkubaciju u ranije navedenim uvjetima. Nakon inkubacije, uzorci su zračeni u dozama od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s u duplikatu za svaku dozu i brzinu. Uzorci su nasadeni odmah nakon zračenja, a rezultati očitani nakon inkubacije od 5-7 dana.

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 provodi se 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 mjerenja široko 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.

Pripremljeni uzorci ozračeni su dozama od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s. Sva su mjerenja napravljena u duplikatu, a rezultati vijabilnosti plijesni nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g kako je opisano u poglavlju 3.1.

3.4. Određivanje doze D₁₀

Kako je već opisano u uvodnom dijelu, D₁₀, decimalna redukcijska doza definira se kao doza zračenja potrebna da inaktivira 90 % populacije, odnosno da se populacija smanji za 1 log. Vrijednost D₁₀ može se iščitati iz krivulje preživljavanja kao recipročna vrijednost nagiba krivulje. D₁₀ se računa iz sljedeće formule:

$$D_{10} = D / \log(X_0 - X)$$

gdje je D apsorbirana doza, X₀ početni broj organizama, X broj preživjelih organizama (Marušić i sur., 2020; Aquino, 2012).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prije početka provođenja pokusa provedena su kontrolna ispitivanja neozračenih uzoraka. Uzorci su autoklavirani i podijeljeni u četiri skupine. Prva skupina odmah je nasadena na podlogu kao kontrola autoklaviranja. Druga skupina inokulirana je suspenzijom konidija *C. sphaerospermum* 1×10^2 CFU/g i nasadena kao kontrola inokuluma. Treća skupina podvrgnuta je inkubaciji 5-7 dana na 25 °C uz relativnu vlažnost 70-80 %. Četvrta skupina inokulirana je suspenzijom konidija *C. sphaerospermum* 1×10^2 CFU/g te stavljena na inkubaciju u istim uvjetima. Nakon inkubacije treća i četvrta skupina nasadene su kao kontrola inkubacije u vlažnom.

Rezultati ispitivanja prikazani su u **Tablici 1**. Kod neinokuliranih uzoraka porast plijesni nije uočen. Početna koncentracija kod inokuliranih uzoraka iznosila je 3×10^2 CFU/g, a 7 dana nakon inkubacije porasla je 1000 puta u odnosu na početnu.

Tablica 1. Rezultati mikološke analize papira kontrolnih ispitivanja neozračenih uzoraka.

Opis	CFU/g	Mikobiota
Kontrola autoklaviranja	0	–
Kontrola inokuluma	$3,2 \times 10^2$	<i>Cladosporium</i>
Kontrola neozračeni (inkubirani + <i>Cladosporium</i>)	$4,9 \times 10^5$	<i>Cladosporium</i>
Kontrola neozračeni (inkubirani neinokulirani)	0	–

Prethodno autoklavirani uzorci papira, inokulirani su suspenzijom konidija *C. sphaerospermum*, inkubirani u vlažnim uvjetima te ozračivani različitim dozama i brzinama doza zračenja.

U **Tablicama 2.-6.** prikazani su rezultati mikološke analize papira neposredno nakon zračenja. Budući da je vrsta *C. sphaerospermum* relativno otporna, redukcija plijesni gama zračenjem ovisi i o primjenjenoj dozi i o brzini doze zračenja (Marušić i sur., 2020).

Primjena doze od 2 kGy pokazala se nedovoljnom za redukciju plijesni pri svim brzinama doze. Zabilježen je porast preživjelih plijesni u koncentraciji reda veličine 10^3 do 10^4 CFU/g. Doza od 5 kGy pokazala je potpuni antifungalni učinak samo pri najvećoj brzini od 6,7 Gy/s. Pri zračenju većom brzinom doze uzorak apsorbira jednaku energiju, ali u kraćem vremenu. Veća brzina uzrokuje nagla uzastopna oštećenja DNA i ostalih staničnih struktura, stanice nisu u mogućnosti popraviti oštećeni materijal i ne uspijevaju preživjeti. Može se zaključiti da je bolji antifungalni učinak dobiven većom brzinom doze. Doza od 10 kGy učinkovita je pri brzinama od 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s. Porast bijele plijesni kod nekih uzoraka zračenih s 10 kGy zanemaruje se jer je voda s Tweenom, korištena za razrijeđivanje, kontaminirana istom. Kao što je vidljivo u **Tablici 5.**, nakon zračenja dozom od 15 kGy, na nekim uzorcima uočen je porast bijelih plijesni, kvasaca i *Penicilliuma*. To su vrste koje čine prirodnu mikrobiotu papira koji se nalazi u knjižnicama i arhivima (Pinzari i Montanari, 2011). Preživjele su autoklaviranje i zračenje. Budući da na tim uzorcima nije porasla kladosporija, može se zaključiti da su vrste prirodne mikrobiote ograničile njezin rast. Čak ni najveća primijenjena doza zračenja od 20 kGy, nije uzrokovala potpunu redukciju plijesni pri svim brzinama. Kladosporija uspijeva preživjeti pri manjim brzinama; 0,04 Gy/s i 0,1 Gy/s u koncentracijama od 10^3 , odnosno 10^2 CFU/g.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je vrsta *C. sphaerospermum* vrlo otporna na gama zračenje. Mnogi čimbenici utječu na tu otpornost, kao što je prisutnost spora, sadržaj vlage, temperatura, sastav medija i ostali. No, specifično je prisustvo melanina u staničnoj stijenci koji ima svojstvo apsorpcije ionizirajućeg zračenja i služi plijesnima kao zaštita. Pretpostavljeni mehanizam radioprotekcije melanina je reakcija visokoenergetskih elektrona koji nastaju nizom kaskadnih reakcija i slobodnih radikala što onemogućuje prodiranje štetnog učinka prema ostalim staničnim strukturama (Dadachova i sur., 2007). Budući da je kladosporija preživjela zračenje u svim dozama pri najmanjim brzinama, može se zaključiti da je uzrok preživljavanja bila povećana produkcija melanina kao odgovor na ekstremne uvjete te dovoljno dug vremenski period potreban da se oporavi i popravi nastala oštećenja uzrokovana zračenjem.

Tablica 2. Porast broja kolonija na uzorcima ozračenim dozom od 2 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s.

Doza	Brzina	Inokulirani s <i>Cladosporium</i>		Bez inokuluma	
		CFU/g	Mikobiota	CFU/g	Mikobiota
2 kGy	0,04 Gy/s	1,6x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,1 Gy/s	5,6x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,2 Gy/s	1,8x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,4 Gy/s	1,1x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>	0	–
	6,7 Gy/s	1x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–

Tablica 3. Porast broja kolonija na uzorcima ozračenim dozom od 5 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s.

Doza	Brzina	Inokulirani s <i>Cladosporium</i>		Bez inokuluma	
		CFU/g	Mikobiota	CFU/g	Mikobiota
5 kGy	0,04 Gy/s	1,5x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,1 Gy/s	3,5x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,2 Gy/s	2,2x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,4 Gy/s	1,4x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	–
	6,7 Gy/s	0	<i>Cladosporium</i>	0	–

Tablica 4. Porast broja kolonija na uzorcima ozračenim dozom od 10 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s.

Doza	Brzina	Inokulirani s <i>Cladosporium</i>		Bez inokuluma	
		CFU/g	Mikobiota	CFU/g	Mikobiota
10 kGy	0,04 Gy/s	$4,1 \times 10^2$	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,1 Gy/s	$1,1 \times 10^3$	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,2 Gy/s	$1,7 \times 10^3$	<i>Cladosporium</i> , bijela plijesan*	0	–
	0,4 Gy/s	0	–	$3,2 \times 10^2$	bijela plijesan*
	6,7 Gy/s	0	–	0	–

* voda s Tweenom kontaminirana je bijelom plijesni

Tablica 5. Porast broja kolonija na uzorcima ozračenim dozom od 15 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s.

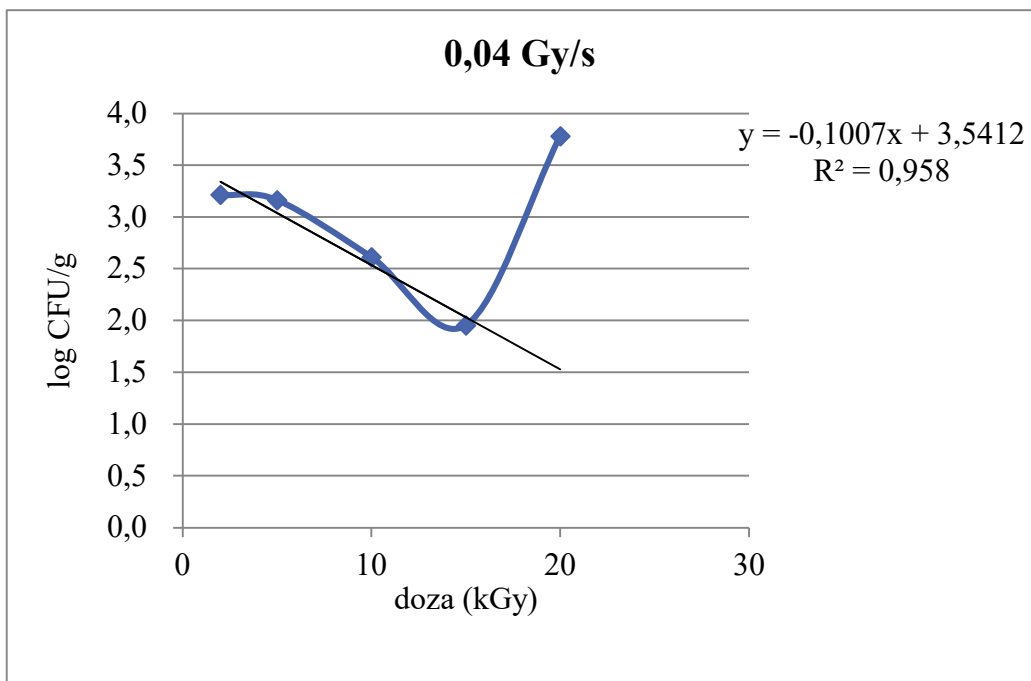
Doza	Brzina	Inokulirani s <i>Cladosporium</i>		Bez inokuluma	
		CFU/g	Mikobiota	CFU/g	Mikobiota
15 kGy	0,04 Gy/s	9×10^1	bijela plijesan	0	–
	0,1 Gy/s	2×10^3	<i>Cladosporium</i>	9×10^1	bijela plijesan
	0,2 Gy/s	$4,5 \times 10^1$	bijela plijesan	$1,8 \times 10^2$	<i>Penicillium</i>
	0,4 Gy/s	0	–	nebrojivo	kvasci
	6,7 Gy/s	0	–	0	–

Tablica 6. Porast broja kolonija na uzorcima ozračenim dozom od 20 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s.

Doza	Brzina	Inokulirani s <i>Cladosporium</i>		Bez inokuluma	
		CFU/g	Mikobiota	CFU/g	Mikobiota
20 kGy	0,04 Gy/s	6×10^3	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,1 Gy/s	$2,7 \times 10^2$	<i>Cladosporium</i>	0	–
	0,2 Gy/s	0	–	0	–
	0,4 Gy/s	0	–	9×10^1	bijela plijesan
	6,7 Gy/s	0	–	0	–

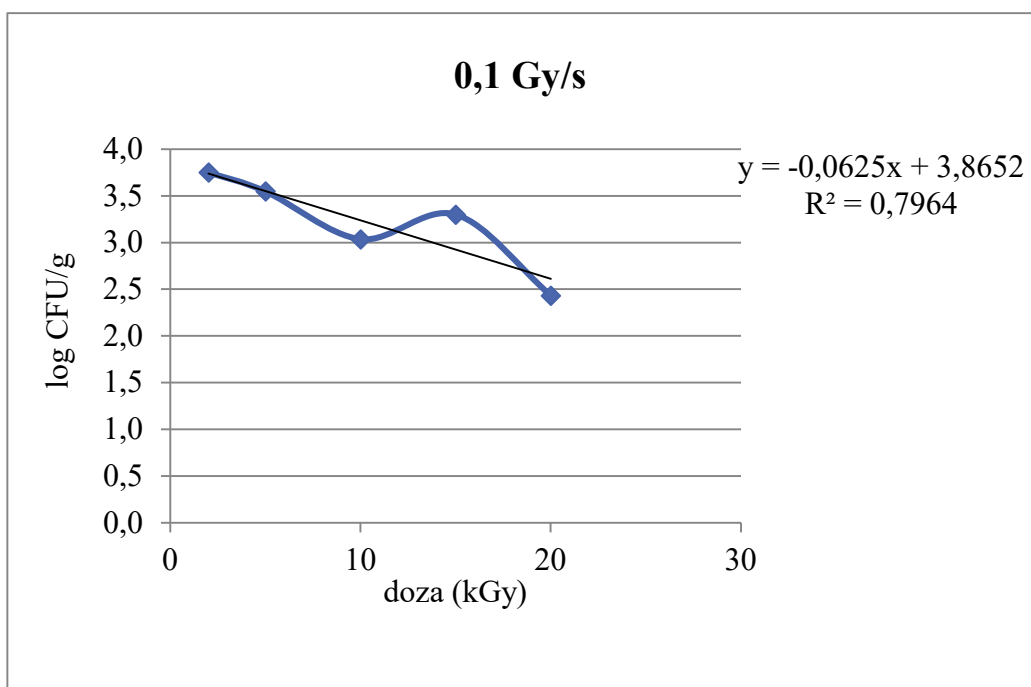
Za usporedbu otpornosti vrste *C. sphaerospermum* prema gama zračenju pri različitim brzinama doze zračenja koristi se decimalna redukcijska doza, D_{10} . Iščitava se iz krivulje ovisnosti promjene logaritma broja preživjelih plijesni o dozi zračenja pri svakoj brzini, kao recipročna vrijednost nagiba pravca dobivenog aproksimacijom točaka krivulje.

Iz pravaca na **Grafovima 1.-5.** dobiveni su sljedeći podaci: D_{10} pri brzini od 0,04 Gy/s iznosi 9,9 kGy; pri brzini od 0,1 Gy/s iznosi 16 kGy; pri brzini od 0,2 Gy/s iznosi 4,77 kGy; pri brzini od 0,4 Gy/s iznosi 1,93 kGy; te pri brzini od 6,7 Gy/s iznosi 1 kGy. Iz dobivenih podataka vidljivo je odstupanje decimalne redukcijske doze pri brzini od 0,1 Gy/s od očekivanog. Potrebno je provesti dodatna ispitivanja otpornosti kladosporije pri nižim brzinama doze zračenja. No, treba uzeti u obzir moguće veće oštećenje celuloznih polimera papira pri takvim brzinama jer duže trajanje zračenja omogućuje dužu interakciju reaktivnih kisikovih spojeva s materijalom te posljedično veću štetu (Magauda, 2004). Također, bilo bi zanimljivo ispitati utjecaj inhibitora sinteze melanina pri istima.

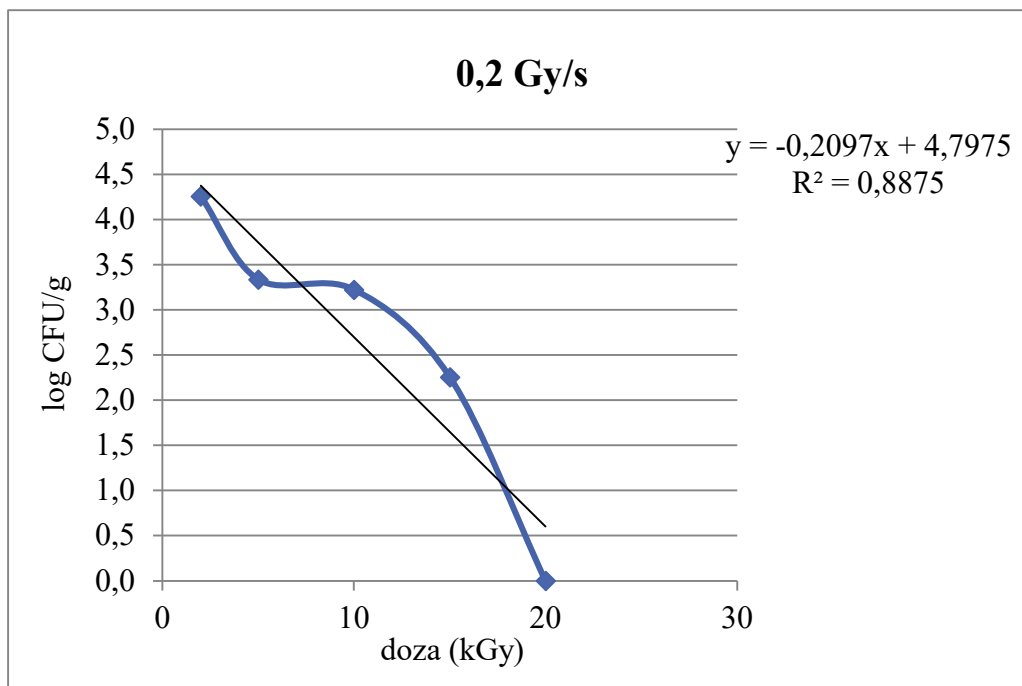


*budući da log CFU/g kod doze od 20 kGy ima veliko odstupanje, to je mjerenje izuzeto prilikom obrade rezultata.

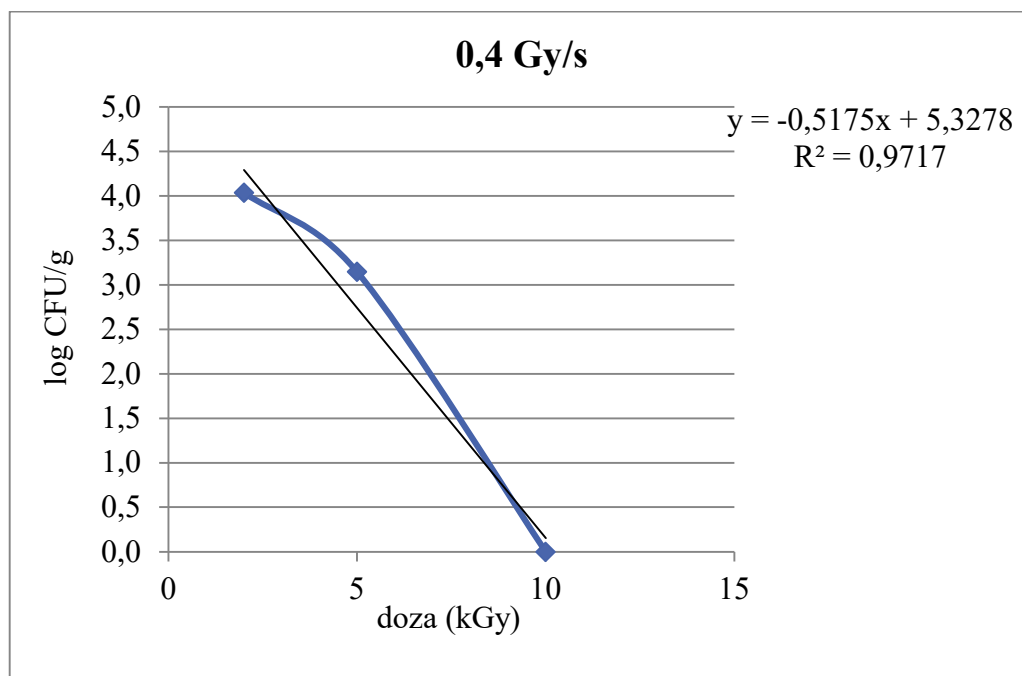
Graf 1. Prikaz ovisnosti promjene logaritma broja preživjelih plijesni o dozi zračenja pri brzini od 0,04 Gy/s.



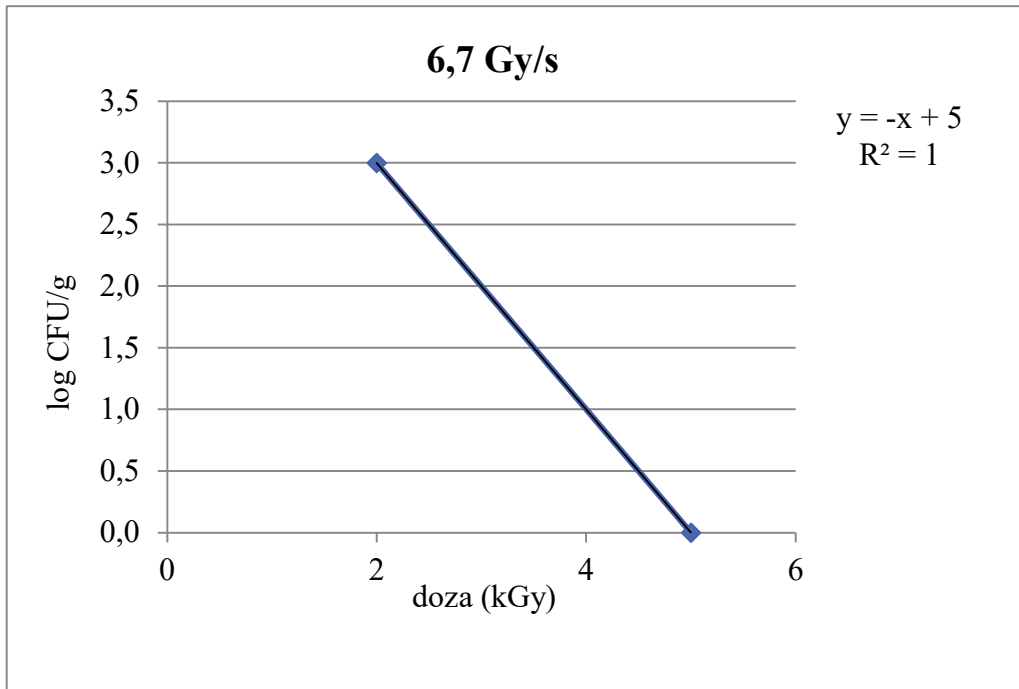
Graf 2. Prikaz ovisnosti promjene logaritma broja preživjelih plijesni o dozi zračenja pri brzini od 0,1 Gy/s.



Graf 3. Prikaz ovisnosti promjene logaritma broja preživjelih plijesni o dozi zračenja pri brzini od 0,2 Gy/s.



Graf 4. Prikaz ovisnosti promjene logaritma broja preživjelih plijesni o dozi zračenja pri brzini od 0,4 Gy/s.



Graf 5. Prikaz ovisnosti promjene logaritma broja preživjelih plijesni o dozi zračenja pri brzini od 6,7 Gy/s.

5. ZAKLJUČAK

Papir je pogodan za rast plijesni vrste *C. sphaerospermum*. Dekontaminacija papira gama zračenjem ovisna je o primijenjenoj dozi i brzini doze zračenja.

- Kladosporija se pokazala visoko rezistentnom budući da je preživjela i najveće doze zračenja (20 kGy) pri nižim brzinama. Najmanja primijenjena doza, 2 kGy, nedovoljna je za redukciju plijesni pri svim brzinama.
- Povećanjem doze proporcionalno se smanjuje otpornost kladosporije prema zračenju i pri nižim brzinama. Decimalna redukcijska doza – D_{10} pri brzini od 0,04 Gy/s iznosi 9,9 kGy; pri brzini od 0,1 Gy/s iznosi 16 kGy; pri brzini od 0,2 Gy/s iznosi 4,77 kGy; pri brzini od 0,4 Gy/s iznosi 1,93 kGy; te pri brzini od 6,7 Gy/s iznosi 1 kGy.
- Ovaj rad ispitivao je utjecaj preživljavanja plijesni neposredno nakon zračenja. Potrebno je provesti ispitivanja mogućeg oporavka plijesni nekoliko mjeseci i godina nakon zračenja. Također, potrebno je proučiti moguće promjene kemijskih i fizikalnih svojstava papira budući da gama zračenje izravno uzrokuje degradaciju materijala.

6. LITERATURA

- Adamo M, Giovannotti M, Magaudda G, Plossi-Zappala M, Rocchetti F, Rossi G. Effect of gamma rays on pure cellulose paper as a model for the study of a treatment of „biological recovery“ of biodeteriorated books. *Restaurator*, 1998, 19, 41-59.
- Adamo M, Magaudda G, Nisini PT, Tronelli G. Susceptibility of cellulose to attack by cellulolytic microfungi after gamma irradiation and ageing. *Restaurator*, 2003, 24, 145-151.
- Area MC, Cheradame H. Paperaging and degradation: Recent findings and research methods. *Bioresources*, 2011, 6, 5307-5337.
- Aquino KAS. Sterilization by Gamma Irradiation. U: Gamma Radiation. Adrovic F, urednik, InTech, 2012, str. 171-179.
- Blyskal B. Fungi utilizing keratinous substrates. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2009, 63, 631-653.
- Brower JH, Tilton EW. The potencial of irradiation as a quarantine treatment for insects infesting stored-food commodities. U: Radiation Disinfestation of Food and Agricultural Products. Moy JH, urednik, Honolulu, University of Hawaii at Manoa, 1985, str. 75-86.
- Cappitelli F, Cattò C, Villa F. The control of cultural heritage microbial deterioration. *Microorganisms*, 2020, 8, 1542.
- Cappitelli F, Pasquariello G, Tarsitani G, Sorlini C. Scripta manent? Assessing microbial risk to paper heritage. *Trends Microbiol*, 2010, 18, 538–542.
- Cappitelli F, Sorlini C. From Papyrus to Compact Disc: The Microbial Deterioration of Documentary Heritage. *Crit Rev Microbiol*, 2005, 31, 1–10.
- 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 Biodegradation*, 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, 457, 1-13.
- Dadachova E, Casadevall A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11, 525–531.
- 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.

- Farkas J. Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17, 148-152.
- Florian ML. Fungal Facts. London, Archetype publications, 2002, str. 146.
- Garg KL, Jain KK, Mishra AK. Role of fungi in the deterioration of wall paintings. *Sci Total Environ*, 1995, 167, 255-271.
- Glevitzky M, Aleya L, Vică ML, Dumitrel G-A, Avram M, Tit DM, Popa M, Popa V-C, Behl T, Bungau S. Assessing the microbiological contamination along with environmental factors of old books in the 1490-founded Bistrița Monastery, Romania. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28, 8743–8757.
- Grant C, Hunter CA, Flanigan B, Bravery AF. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterior Biodegradation*, 1989, 25, 259-284.
- Hueck HJ. The biodeterioration of materials as part of hylobiology. *Mater Org*, 1965, 1, 5–34.
- Jakobović Z. Ionizirajuće zračenje i čovjek. Zagreb, Školska knjiga, 1991, str. 19-30.
- Kaarakainen P, Rintala H, Vepsäläinen A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Meklin T. Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci Total Environ*, 2009, 407, 4673–4680.
- Katušin-Ražem B, Jagić R, Braun M. Radijacijska metoda u spašavanju predmeta kulturne baštine u slučajevima ugroženosti širih razmjera. Zbornik radova Devetog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Zagreb, 2013, 78-83.
- Kortei NK, Odamtten GT, Obodai M, Appiah V, Wiafe-Kwagyan M. Evaluating the Effect of Gamma Irradiation and Steam Sterilization on the Survival and Growth of Composted Sawdust Fungi in Ghana. *Br Microbiol Res J*, 2015, 7, 180-192.
- Magaudda G. The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. *J Cult Herit*, 2004, 5, 113–118.
- Marušić K, Klarić MŠ, Sinčić L, Pucić I, Mihaljević B. Combined effects of gamma-irradiation, dose rate and mycobiota activity on cultural heritage – Study on model paper. *Radiat Phys Chem*, 2020, 170, 108641.
- McNamara NP, Black HIJ, Beresford NA, Parekh NR. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Appl Soil Ecol*, 2003, 24, 117–132.
- Meier C, Petersen K. Schimmelpilze Auf Papier-Ein Handbuch Fuer Restauratoren. Tönning, Germany, Der Andere Verlag, 2006, str. 198.
- Michaelsen A, Pinzari F, Barbabietola N, Piñar G. Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2013, 84, 333–341.

- Mina L. Foxy underpants: or the use of chelators and enzymes to reduce foxing stains on early nineteenth century men's linen underpants. *J Am Inst Conserv*, 2019, 59, 3-17.
- 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 moulds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103-117.
- Nitiu DS, Mallo AC, Saparrat MCN. Fungal melanins that deteriorate paper cultural heritage: An overview. *Mycologia*, 2020, 112, 859-870.
- Pitt JI, Hocking AD. The ecology of fungal food spoilage. U: Fungi and food spoilage. Pitt JI, Hocking AD, urednici, New York, Springer, 2009, str. 3-11.
- Pinzari F, Montanari M. Mould growth on library materials stored in compactus-type shelving units. U: Sick Building Syndrome in Public Buildings and Workplaces. Abdul-Wahab Al-Sulaiman SA, urednik, Berlin, Springer, 2011, str. 193-206.
- Ponta CC. Irradiation Conservation of Cultural Heritage. *Nucl Phys News*, 2008, 18, 22-24.
- Pyzik A, Ciuchcinski K, Dziurzynski M, Dziewit L. The bad and the good-microorganisms in cultural heritage environments-an update on biodeterioration and biotreatment approaches. *Materials*, 2021, 14, 177.
- Ražem D, Anđelić L, Dvornik I. In High-dose Dosimetry; Proc. IAEA Symp., Vienna, 1984.
- Ruga L, Orlandi F, Fornaciari M. Preventive conservation of cultural heritage: Biodeteriogens control by aerobiological monitoring. *Sensors*, 2019, 19.
- Schmitz K, Wagner S, Reppke M, Maier CL, Windeisen-Holzhauser E, Benz JP. Preserving cultural heritage: Analyzing the antifungal potential of ionic liquids tested in paper restoration. *PloS one*, 2019, 14, e0219650.
- 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.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Predmeti kulturne baštine na papiru predstavljaju značajan dio kulturne baštine pohranjen u knjižnicama i muzejima. Pogodni su za rast i razvoj mikroorganizama koji uzrokuju fizikalna, kemijska i biološka oštećenja. Plijesan *Cladosporium sphaerospermum* čest je kolonizator papirnih dokumenata i slika te uzrokuje njihovo propadanje zbog mogućnosti da prodre duboko u materijal gdje dovodi do enzimske degradacije i posljedično mehaničke razgradnje. Postoje različite metode dekontaminacije predmeta od papira. Kao najučinkovitija i najprihvatljivija metoda pokazalo se gama zračenje. U ovom radu ispitan je utjecaj gama zračenja u dozama od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s na inhibiciju rasta vrste *Cladosporium sphaerospermum* neposredno nakon zračenja. Kladosporija se pokazala visoko rezistentnom budući da je preživjela i najveće doze zračenja (20 kGy) pri nižim brzinama. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem doze proporcionalno smanjuje otpornost kladosporije prema zračenju i pri nižim brzinama. Decimalna redukcijska doza – D_{10} pri brzini od 0,04 Gy/s iznosi 9,9 kGy; pri brzini od 0,1 Gy/s iznosi 16 kGy; pri brzini od 0,2 Gy/s iznosi 4,77 kGy; pri brzini od 0,4 Gy/s iznosi 1,93 kGy; te pri brzini od 6,7 Gy/s iznosi 1 kGy. Potrebno je provesti ispitivanja mogućeg oporavka plijesni nekoliko mjeseci i godina nakon zračenja. Također, potrebno je proučiti moguće promjene kemijskih i fizikalnih svojstava papira budući da gama zračenje izravno uzrokuje degradaciju materijala.

7.2. SUMMARY

Paper-based materials represent major part of cultural heritage kept in libraries and museums. They are suitable for growth and development of microorganisms and they cause physical, chemical and biological damages. *Cladosporium sphaerospermum* often colonises paper-based documents and paintings and causes their destruction due to the ability of penetration deep into material that leads to enzymatic degradation and mechanical decomposition. There are various decontamination methods of paper-based documents. Gamma irradiation is the most efficient and acceptable method. The paper analyzes effects of gamma irradiation in radiation doses of 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy and 20 kGy at dose rates of 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s and 6,7 Gy/s on *Cladosporium sphaerospermum* immediately after irradiation. *Cladosporium sphaerospermum* is highly resistant to gamma irradiation because it survived highest doses (20 kGy) at lower dose rates. The results have shown that the increase of applied doses proportionally reduces resistance to irradiation at lower dose rates. Decimal reduction dose – D_{10} at dose rate of 0,04 Gy/s is 9,9 kGy; at dose rate of 0,1 Gy/s is 16 kGy; at dose rate 0,2 Gy/s is 4,77 kGy; at dose rate 0,4 Gy/s is 1,93 kGy; at dose rate 6,7 Gy/s is 1 kGy. Further testing of possible recovery of moulds several months and years after the irradiation is required. Additionally, new studies of possible changes in chemical and physical properties of paper are needed, because gamma irradiation directly causes material degradation.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

OTPORNOST PLIJESNI *CLADOSPORIUM SPHAEROSPERMUM* NA GAMA ZRAČENJE

Ana Simović

SAŽETAK

Predmeti kulturne baštine na papiru predstavljaju značajan dio kulturne baštine pohranjen u knjižnicama i muzejima. Pogodni su za rast i razvoj mikroorganizama koji uzrokuju fizikalna, kemijska i biološka oštećenja. Plijesan *Cladosporium sphaerospermum* čest je kolonizator papirnih dokumenata i slika te uzrokuje njihovo propadanje zbog mogućnosti da proдре duboko u materijal gdje dovodi do enzimske degradacije i posljedično mehaničke razgradnje. Postoje različite metode dekontaminacije predmeta od papira. Kao najučinkovitija i najprihvatljivija metoda pokazalo se gama zračenje. U ovom radu ispitan je utjecaj gama zračenja u dozama od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy pri brzinama od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s na inhibiciju rasta vrste *Cladosporium sphaerospermum* neposredno nakon zračenja. Kladosporija se pokazala visoko rezistentnom budući da je preživjela i najveće doze zračenja (20 kGy) pri nižim brzinama. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem doze proporcionalno smanjuje otpornost kladosporije prema zračenju i pri nižim brzinama. Decimalna redukcijaska doza – D₁₀ pri brzini od 0,04 Gy/s iznosi 9,9 kGy; pri brzini od 0,1 Gy/s iznosi 16 kGy; pri brzini od 0,2 Gy/s iznosi 4,77 kGy; pri brzini od 0,4 Gy/s iznosi 1,93 kGy; te pri brzini od 6,7 Gy/s iznosi 1 kGy. Potrebno je provesti ispitivanja mogućeg oporavka plijesni nekoliko mjeseci i godina nakon zračenja. Također, potrebno je proučiti moguće promjene kemijskih i fizikalnih svojstava papira budući da gama zračenje izravno uzrokuje degradaciju materijala.

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

Rad sadrži: 25 stranica, 5 grafičkih prikaza, 6 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Cladosporium sphaerospermum*, gama zračenje, plijesni, decimalna redukcijaska doza

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Katarina Marušić, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu
Dr. sc. Ana-Marija Domijan, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Microbiology
Schrottova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

GAMMA IRRADIATION RESISTANCE OF *CLADOSPORIUM SPHAEROSPERMUM*

Ana Simović

SUMMARY

Paper-based materials represent major part of cultural heritage kept in libraries and museums. They are suitable for growth and development of microorganisms and they cause physical, chemical and biological damages. *Cladosporium sphaerospermum* often colonises paper-based documents and paintings and causes their destruction due to the ability of penetration deep into material that leads to enzymatic degradation and mechanical decomposition. There are various decontamination methods of paper-based documents. Gamma irradiation is the most efficient and acceptable method. The paper analyzes effects of gamma irradiation in radiation doses of 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy and 20 kGy at dose rates of 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s and 6,7 Gy/s on *Cladosporium sphaerospermum* immediately after irradiation. *Cladosporium sphaerospermum* is highly resistant to gamma irradiation because it survived highest doses (20 kGy) at lower dose rates. The results have shown that the increase of applied doses proportionally reduces resistance to irradiation at lower dose rates. Decimal reduction dose – D₁₀ at dose rate of 0,04 Gy/s is 9,9 kGy; at dose rate of 0,1 Gy/s is 16 kGy; at dose rate 0,2 Gy/s is 4,77 kGy; at dose rate 0,4 Gy/s is 1,93 kGy; at dose rate 6,7 Gy/s is 1 kGy. Further testing of possible recovery of moulds several months and years after the irradiation is required. Additionally, new studies of possible changes in chemical and physical properties of paper are needed, because gamma irradiation directly causes material degradation.

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

Thesis includes: 25 pages, 5 figures, 6 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Cladosporium sphaerospermum*, gamma irradiation, moulds, decimal reduction dose

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

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

The thesis was accepted: March 2021.