

Djelovanje gama zračenja na mikrobiotu papira

Sinčić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:962260>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Sinčić

Djelovanje gama zračenja na mikrobiotu papira

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na pruženom znanju, stručnom vodstvu, ukazanom povjerenju i savjetima pri izradi ovog rada, hvala i svim ostalim zaposlenicima Zavoda za mikrobiologiju na pomoći, strpljenju i ugodnoj radnoj atmosferi. Također hvala dr. sc. Branki Mihaljević i dr. sc. Katarini Marušić s Instituta Ruđer Bošković na suradnji i ozračivanju uzoraka.

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 Kulturna baština na papiru: uzroci biodeterioracije	1
1.2 Mehanizam biodeterioracije papira	2
1.3. Tehnike konzerviranja papira	4
1.4. Gama zračenje i primjena	5
2 OBRAZLOŽENJE TEME	10
3 MATERIJALI I METODE	11
3.1 Ispitivanje sastava prirodne mikrobiote na papiru metodom razrjeđenja	11
3.2 Inokulacija papira odabranom vrstom plijesni	12
3.3 Zračenje uzoraka	12
4 REZULTATI I RASPRAVA	14
5 ZAKLJUČAK	20
6 LITERATURA	21
7 SAŽETAK/SUMMARY	27
8 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1 UVOD

Kulturna baština na papiru: uzroci biodeterioracije

Tijekom duge povijesti papira, papirnatu su zapisi nositelji znanja i iskustva, stoga su nam knjige i dokumenti dragocjeni izvor različitih povijesnih, kulturnih, znanstvenih i ostalih informacija. Organski materijali podložni su razgradnji različitim fizikalnim, kemijskim, ali i biološkim procesima. To je proces koji je nemoguće zaustaviti, ali znanstvene spoznaje ga mogu pokušati usporiti. Za knjigu ili dokument možemo reći da podliježu procesu biodeterioracije kad dođe do promjene fizikalnih, kemijskih, mehaničkih ili estetskih svojstava kao posljedica djelovanja živih organizama. (Calvo i sur., 2016). Veliki je dio svjetske kulturne baštine stoljećima zapisivan na različitim oblicima papira i zbog toga je podložan biodeterioraciji organskih komponenti djelovanjem gljivica (Michaelsen i sur., 2006, 2009) i manjim dijelom bakterija (Michaelsen i sur., 2010) što rezultira i strukturnom i estetskom štetom. Iako bakterije mogu uzrokovati propadanje papira, uvjeti u kojima se čuvaju papirnatu zapisi podložniji su rastu gljivica budući da zahtijevaju manje vlage za razvoj (Sequeira i sur. 2012). Kada gledamo biodeterioracijski potencijal gljivica na objektima kulturne baštine možemo ih podijeliti u dvije glavne skupine. Prva su oportunističke gljivice koje rastu na svim materijalima uz dostupnu vlagu i te gljivice nisu u stanju enzimski degradirati materijal. Druga su skupina tzv. "materijalni patogeni" koji su supstratno specifični i sposobni specifično degradirati materijal različitim enzimima. (Meier i Petersen, 2006). Tipične gljivične infekcije papira uzrokovane su vrstama razreda Ascomycetes kao i kserofilnim (rastu u materijalima s niskim vodenim aktivitetom) gljivicama roda *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Penicillium* i *Cladosporium* (Pinzari i Montanari 2011). Te gljivice koloniziraju papir ili prodiranjem u mikrofibrilni matriks ili rastom na površini. (Szczepanowska i Cavaliere 2012). Navedene kserofilne vrste mogu rasti već pri aktivitetu vode većem od 0.6 dok aktivitet vode od 0.8 omogućava rast velikog broja vrsta. Relativna vlažnost od 55% smatra se donjom granicom za rast gljivica pa se u prostorima pohrane vlaga pokušava držati ispod te vrijednosti. (Sterflinger i Pinzari, 2012). Uz vlagu, rast mikroorganizama i nametnika potiču brojni faktori kao što su temperatura, pretrpana skladišta, naslage prašine i slaba cirkulacija zraka. Kontroliranje navedenih uvjeta pomaže u suzbijanju njihovog razmnožavanja. (Calvo i sur., 2016). Međutim nastanak klimatskih mirko-niša uzrokovan temperaturnim gradijentima i protokom zraka komplicira održavanje prikladnih

uvjeta. Nastanak takvih mikroklimatskih uvjeta unutar skućenih polica ili zamatanjem knjiga u plastične folije gdje nema izmjene zraka i isparavanja su najčešći razlozi kontaminacije plijesnima (Sterflinger i Pinzari, 2012). Gljivične spore su sve prisutne i svi materijali su stalno izloženi gljivičnoj kontaminaciji u svim unutarnjim i vanjskim prostorima. (Kaarakainen i sur., 2009). Iako je moguća kontaminacija papira u procesu proizvodnje, većina gljivičnih vrsta dolazi iz prašine (Florian, 2002). Prijenos spora i konidija uglavnom se događa zrakom. U rijedim slučajevima spore mogu prenositi i neki insekti koji su česti stanovnici knjižnica kao što su grinje i insekti iz reda Psocoptera (Sterflinger i Pinzari, 2012).

Kontaminacija kulturne baštine gljivicama osim što uzrokuje propadanje materijala problematična je i zbog toga što utječe na kvalitetu zraka u arhivima i knjižnicama (Valentin, 2010). Gljivice u knjižnicama, muzejima i prostorima za pohranu mogu ozbiljno ugroziti zdravlje restauratora, muzejskog osoblja i posjetioca zbog njihovog alergijskog potencijala, produkcije mikotoksina i sposobnosti da uzrokuju oportunističke infekcije kod ljudi. (Sterflinger i Pinzari, 2012). Zbog toga rukovanje s plijesnima ili kontaminiranim papirom može predstavljati ozbiljni zdravstveni rizik budući da su mnoge vrste patogene i toksične čak i kada su mrtve (Pinheiro i sur., 2011). Osim toga, mogu kod ljudi uzrokovati alergije i respiratorne probleme. Npr. spore roda *Cladosporium*, koje su nađene u zraku nekih institucija gdje se pohranjuju i čuvaju dokumenti, potencijalni su uzrok respiratornih alergijskih reakcija (Lacey, 1996).

1.2. Mehanizam biodeterioracije papira

Papir se sastoji od relativno nasumične mreže pretežito celuloznih vlakana. Ta vlaknasta struktura daje papiru ne samo snagu nego i ugodan osjećaj. Celuloza je linearni polimer velike molekularne mase koji se sastoji od β -D glukopiranoznih jedinica povezanih β -(1,4) glikozidnim vezama. Dva kraja polimera su drugačija. S lijeve strane (na poziciji C4 prstenaste strukture) je nereducirajuća alkoholna hidroksilna grupa dok je na desnom kraju (na C1 poziciji prstenaste strukture) prisutna reducirajuća alkoholna hidroksilna grupa. Ta je grupa zapravo hemiacetal (IAEA, 2017). Kada se dvije molekule glukoze spajaju da formiraju dio celuloznog lanca jedna se mora rotirati za 180° formirajući disaharid celobiozu. Celuloza ima snažnu tendenciju formiranja kristalnih regija, međutim amorfne regije celuloze su više higroskopske i reaktivnije od kristalnih zato što su dostupnije malim molekulama (Daniels, 1996). Nativna celuloza sadrži više kristaliničnih regija, dok celuloza u papiru zbog fizičke i kemijske obrade u procesu proizvodnje

sadrži više amorfnih regija što uz uklanjanje lignina (koji štiti od napada mikroorganizama) čini papir izrazito podložan napadima mikroorganizama (Gallo i sur., 1998). Plijesni uzrokuju ireverzibilnu promjene na supstratima od celuloze. Hranjivi matriks za plijesni u celuloznim materijalima je uglavnom amorfna regija koja sadrži polisaharide kao što je hemiceluloza. U prisutnosti povećane količine vlage, vlakna nabubre i postaju atraktivnija za plijesni (IAEA, 2017). Raspadanje celuloze posljedica je sekrecije ekstracelularnih enzima koji hidroliziraju celulozu u male molekule topljive u vodi koje onda gljivice mogu iskoristiti, ali i izlučenih organskih kiselina kao nusprodukata metabolizma što sve dovodi do gubitka mehaničke snage papire (Valentin, 2007). Enzimski sistemi koje gljivice koriste kako bi depolimerizirale celulozu uključuju tri glavna tipa ekstracelularnih hidrolaza: endoglukanaze (EC 3.2.1.4) egzoglukanaze uključujući celodekstrinaze (EC 3.2.1.74) i celobiohidrolaze (EC 3.2.1.91) za enzime na nereducirajućem kraju i EC 3.2.1.176 za one na reducirajućem kraju i beta-glukozidaze (EC 3.2.1.21). Endoglukanaze su ključne komponente u procesu razgradnje budući da povećavaju broj reducirajućih i nereducirajućih krajeva (uključujući krajeve lanaca i oligosaharide). Međutim korak prije same razgradnje, amorfogeneza, nužna je za otvaranje fibrilarnog matriksa i povećava pristup enzima glikozidnim vezama unutar šećernog polimera. Nedavna istraživanja pokazuju da neke gljivice mogu razgrađivati celulozu oksidativnim enzimima kao što su polisaharidne monooksigenaze (ILI-ILI LPMO (litična PMO) i celobioze dehidrogenaze (CDHs) (Calvo i sur., 2016). Celuloza se može razgrađivati i neenzimskim mehanizmima. Kinon redoks ciklus i Fentonova reakcija zasnovana na glikopeptidima proizvode oksidanse kao što su slobodni hidroksilni radikali koji nasumično napadaju supstrat (Cragg, 2015). Također može doći do raspada ostalih materijala prisutnih na papiru kao što su različita punila i premazi, koji mogu biti bogati proteinima i šećerima (Pinzari i sur., 2006). Nadalje, stvaranje kalcijevog oksalata uzrokovano djelovanjem gljivica može dovesti do zamjene alkalnog kalcijevog karbonata normalno prisutnog u papiru, a taloženje tih kristala između celuloznih vlakana može biti uzrok mehaničke i kemijske štete na papiru (Pinzari i sur., 2010). Osim strukturnih promjena često dolazi i do promjena u boji papira ili nastanka pigmentacijskih mrlja. Te promjene mogu biti posljedica fizikalno-kemijskih transformacija komponenata papira npr. lignina i aromatskih tvari ili interakcije celuloze sa tragovima metala koje uzrokuju štetne efekte na papiru (Ardelean i Melniciuc-Puica, 2013). Pojava mrlja uzrokovanih aktivnošću gljivica može biti posljedica de novo sinteze gljivičnih pigmenata ili Maillardove reakcije s nusproduktima gljivičnog

metabolizma. Potonje je slučaj kod organskih kiselina, oligosaharida i ostalih produkata razgradnje celuloze koji kemijski reagiraju s tvarima koje sadrže dušik i ostalim dodatnim tvarima u papiru pod određenim uvjetima. Pigmenti koje gljivice sintetiziraju imaju različite funkcionalne uloge kao što su protektivna u uvjetima stresa (što uključuje foto-oksidaciju), zaštitna uloga (uključujući antimikrobnu aktivnost) ili kao posredni, enzim povezani kofaktori (Calvo i sur., 2016). Za neke promjene boje poput tzv. „foxing“ fenomena koji se očituje malim izoliranim crveno-smeđim mrljama još je uvijek kontroverzno jesu li posljedica djelovanja mikroorganizama ili fizikalno-kemijskih faktora (Gallo i Pasquariello, 1989).

1.3. Tehnike konzerviranja papira

Dezinfekciju predmeta kulturne baštine provodimo kako bismo smanjili rizik za ljudsko zdravlje osobe koja će doći u kontakt s njim i kako bi smo spriječili ubrzano propadanje predmeta (Price, 1996). Odabir prikladne tehnike za uklanjanje plijesni s papirnatih artefakata prilično je zahtjevan. Konzervacijske mjere i restauracijski tretmani uključuju mehaničke, kemijske i fizikalne metode koje zahtjevaju razmatranje efekata i na sami objekt i na moguće opasne posljedice za ljudsko zdravlje (Trandafir i sur., 2014). Vegetativne hife moguće je reducirati fizičkim uklanjanjem kao i kontrolom klimatskih uvjeta u skladištima (temperatura, relativna vlažnost i aktivnost vode). Ono na što bi trebali biti usmjereni konzervacijski tretmani su spore (Nitterus, 2000). Spore su oblik gljiva s niskim sadržajem vode i reverzibilno inaktiviranim metabolizmom koji im omogućuje preživljavanje nepovoljnih uvjeta što ih čini otpornijima i na različite tretmane (Deacon, 2005). U suzbijanju gljivica primjenjuju se različiti pristupi od ograničavanja pristupa vodi do upotrebe kemijskih susptanci u tekućem ili plinovitom obliku preko nekih fizikalnih metoda koje uključuju ekstremne promjene temperature, zračenje ili struju. (Sequeira i sur., 2012). Dakle mogućnosti su brojne, ali u praksi se najčešće koriste etilen oksid i gama zračenje budući da su te metode industrijski standardizirane za upotrebu (Calvo i sur., 2016).

Etilen oksid zapaljiv je plin bez boje čija upotreba u dezinfekciji tekstila i papira u muzejima započinje 30ih godina prošlog stoljeća. (Ballard i Baer, 1986). Djelovanje se temelji na alkilaciji nukleinskih kiselina i funkcionalnih proteina što zaustavlja stanični metabolizam i mogućnost reprodukcije. (Mendes i sur., 2007). Etilen oksid snažno prodire u materijal, može se koristiti pri sobnoj temperaturi i u obliku plina, a pokazuje i veliku efikasnost u eliminaciji velikog broja

mikroorganizama zbog čega je njegova upotreba u knjižnicama i muzejima vrlo česta (Ballard i Bear, 1986). Uvjeti fumigacije kao što su temperatura, upotreba komora s normalnim i povišenim tlakom i vrijeme izloženosti materijala variraju od institucije do institucije (Craig, 1986). Također Strassberg (1978) navodi da vrijeme izloženosti ovisi o mješavini upotrijebljenih plinova i prirodi dezinfekcije pa tako plijesni zahtijevaju dva puta veću izloženost nego insekti. Međutim pokazalo se da je etilen oksid kao i njegovi derivati (etilen glikol i etilen klorhidrin) iznimno toksičan (Mendes i sur., 2007) odnosno izloženost predstavlja kancerogenu, mutagenu, genotoksičnu, reproduktivnu opasnost za ljudsko zdravlje (Ballard i Bear, 1986). Upotreba etilen oksida zbog navedenih je razloga Rotterdamskom konvencijom strogo ograničena ili zabranjena u mnogim zemljama. Ukoliko ga se ipak koristi važna je adekvatna ventilacija kako bi u što većoj mjerio uklonio i etilen oksid i njegove rezidue (Mendes i sur., 2007). Nadalje, pokazalo se da fumigacija utječe i na fizikalna i kemijska svojstva papira (Valentin i sur., 1990). Istraživanja su pokazala da dolazi do smanjenja izdržljivosti presavijanja, smanjenja stupnja polimerizacije, požutljivanja papira (Flieger, 1965) i blagog smanjenja pH (Ponce-Jimenez i sur., 2002). Osim toga tretirani materijali podložniji su napadu mikroorganizama što Craig (1986) objašnjava narušavanjem prirodne ravnoteže zbog čega je tretirani materijal podložan kolonizaciji s bilo kojim organizmom s kojim dođe u kontakt. Dok Florian (2002) ističe da bi to moglo biti posljedica taloženja etilen glikola koji materijal čini higroskopskim zbog čega se ostvaruju uvjeti za aktivaciju već prisutnih konidija.

1.4. Gama zračenje i primjena

Zračenje je pojava prijenosa energije u obliku fotona (kvanti elektromagnetskog zračenja) ili masenih čestica, a zračenje koje ima dovoljno energije da u međudjelovanju s tvari ionizira tu tvar naziva se ionizirajućim zračenjem. (Dželalija, 2006). Ionizirajuće zračenje koje se koristi u industrijskim procesima sastoji se od elektromagnetskih valova kao što su gama i rendgenske zrake ili nabijene čestice kao što su ubrzani elektroni. (IAEA, 2017). Gama(γ) zrake su snopovi fotona. Foton je kvant energije, odnosno "energetski paket", bez mase mirovanja. Frekvencija i valna dužina γ -zrake u funkciji energije su određene Planck-ovim zakonom, jednačba:

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda$$

gdje je h Planck-ova konstanta c brzina svjetlosti i λ valna dužina γ -zrake (Feretić, 2011). Gama zračenje čine elektromagnetski valovi valnih duljina kraćih od 10^{-13} m. Nastaje energijskim

prijelazima nestabilnih atomskih jezgri radioaktivnih tvari, anihilacijom čestica i usporavanjem vrlo brzih nabijenih čestica (Dželalija, 2006). Interakcija γ -zraka s materijom se odvija putem tri nuklearne reakcije: fotoelektrični efekt, Comptonovo raspršenje i stvaranje parova (Feretić, 2011).

Kako bismo kvantificirali učinke gama zračenja koristimo dva parametra. Apsorbirana doza, D odnosno energija koju je primio ozračeni medij, SI jedinica Gy ($= \text{J kg}^{-1}$) i brzina doze, $D' = D/t$, SI jedinica Gys^{-1} . Brzina doze D' , ovisi o jačini polja zračenja koja ovisi o aktivnosti izvora to jest broju raspada u vremenu. Jačina polja smanjuje se s kvadratom udaljenosti od izvora zračenja (www.h-r-z.hr). Budući da jednake doze zračenja izazivaju različite efekte ovisno o izvoru zračenja i svojstvima biološke mete uvedena je jedinica Sv koja izražava ekvivalentnu dozu (Reisz i sur., 2014).

Letalne strukturne promjene uključuju lom lanca DNA, rupturu stanične membrane ili mehaničko oštećenje stanične stijenke (Lado i Yousef, 2002). Tijekom zračenja dolazi do oštećenja DNA koje može biti posljedica direktnog djelovanja zračenja ili indirektno preko oksidativnih radikala nastalih radiolizom stanične vode (Farkas, 2006). Oštećenja DNA uključuju delecijske promjene dušičnih baza i šećera, dimerizaciju, jednostruke i dvostruke lomove DNA (Lyngdoh i Schaefer, 2009). Kada je izložena zračenju molekula vode se ionizira i ekscitira te prolazi kroz niz reakcija koje izazivaju njezino raspadanje na izuzetno reaktivne produkte. Najprije nastaje pozitivno nabijeni vodeni radikal H_2O^+ i negativni slobodni solavativirani elektron (e^-). Na kraju procesa nizom rekombinacija nastaju sljedeće reaktivne specije: e^-_{aq} , H^+ , $\text{HO}^\cdot$, $\text{HO}_2^\cdot$, OH^- , H_3O^+ i H_2O_2 . (Le Caer, 2011). Reaktivne specije napadaju i lome organske molekule prisutne u stanici. Na primjer hidroksilni radikal izbija atome vodika iz šećera i dušičnih baza u molekuli DNA (Stepanik i sur., 2007). Razlike u osjetljivosti mikroorganizama na djelovanje zračenja ovise o kemijskoj i fizikalnoj složenosti te o sposobnosti popravka oštećenja. (Farkas, 2006). Načelno se osjetljivost povećava prema složenosti organizma stoga su virusi najmanje osjetljivi, a insekti i paraziti najviše. Također spore (bakterija i gljiva) i ciste (protozoa i parazita), oblici koji su u stabilnom stanju mirovanja, izuzetno su otporne na zračenje s obzirom da sadrže malo DNA. Nadalje, postoji mogućnost da nepotpuno inaktivirani mikroorganizmi razviju mutacije koje mogu dovesti do povećane virulencije i patogenosti ili otpornosti na zračenje. Takvi su slučajevi

zabilježeni kada su organizmi bili izloženi ponavljajućim zračenjima. Zbog toga treba odrediti doze zračenja koje u potpunosti inaktiviraju mikroorganizme (Shea, 2000.)

Jedna od pretpostavki gljivične otpornosti na ionizirajuće zračenje produkcija je pigmenta melanina. Melanin je kompleksan polimer s različitim svojstvima koji mnogi organizmi proizvode enzimski iz relativno jednostavnih prekursora. Dadachova i sur., (2008) ustvrdili su da su radioprotektivna svojstva melanina posljedica sposobnosti da gasi slobodne radikale nastale zračenjem i na taj način spriječi oštećenja DNA te da sudjeluje u trasdukciji energije što čak može dovesti do poboljšanog rasta nekih melaniziranih gljivica nakon izloženosti zračenju, a za zaštitna svojstva ovise i o sfernom prostornom rasporedu čestica melanina.

Ustanoviti prikladnu dozu prilično je zahtjevno. U obzir treba uzeti brojne faktore: prirodu samog objekta, biološko opterećenje i radiosenzitivnost mikrobiološke zajednice. Važno je uzeti u obzir i neke fizikalne faktore kao što su sadržaj vode ili temperaturu jer i oni utječu na radiosenzitivnost mikroorganizama (Trandafir i sur., 2014). Kada se procjenjuje efekt zračenja na uništavanje mikroorganizama najčešće se koristi vrijednost D10 odnosno decimalna redukcijska doza (Thornley, 1963). To je doza potrebna da inaktivira 90% populacije to jest da se populacija smanji za 1log. Može se iščitati iz krivulje preživljavanja kao recipročna vrijednost nagiba krivulje ili iz sljedeće jednadžbe:

$$D10 = D / \log (X_0 - X)$$

gdje je D apsorbirana doza, X_0 početni broj organizama, X broj preživjelih organizama (Trandafir i sur., 2014). Biološko opterećenje obično se označava s CFU (colony forming units).

Gama zračenje primjenjuje se za sterilizaciju u medicini, farmaciji i agronomiji, a svoju primjenu u konzervaciji objekata kulturne baštine započinje 60ih godina prošlog stoljeća (Sequira i sur., 2012). To je fizikalna metoda koja ne ostavlja rezidue na papiru, visoko je penetrabilna, ne zagađuje okoliš te se u kratkom vremenu mogu obraditi veliki volumeni materijala (Calvo i sur., 2016). Dobiva se najčešće od Co60, radioizotopa koji kontinuirano emitira gama zrake (Sequira i sur., 2012). Rekalibracija se treba provoditi svaki mjesec zbog kontinuiranog raspada i pratećeg gubitka u radioaktivnosti (Prado 2005). Provodi se u zatvorenom, dobro zaštićenom i osiguranom prostoru pod strogim uvjetima sigurnosti (IAEA, 2017). Literarni podaci za učinkovite doze zračenja različiti su budući da ista ovisi o mnogim parametrima, od početne

razine kontaminacije, radiosenzitivnosti mikroorganizama i željenog efekta redukcije. Tako se na primjer za sterilizaciju medicinske opreme koriste doze od 25 kGy, za kontrolu gljivica 2-10 kGy (Katušin-Ražem i sur., 2013) dok se za ozračivanje hrane prema preporukama doze do 10 kGy smatraju sigurnima (Calado i sur., 2014). Neka od prvih ispitivanja o letalnim dozama za gljivice provodila je Flores (1976) te zaključila da je za sve gljivične vrste potrebna doza od 18 kGy pri brzini od 5 kGy h⁻¹. Dok Butterfield (1987.) preporučuje dozu od 10k Gy pri brzini od 156 Gy h⁻¹. Tomazello i sur., (1995) ispitivali su letalne doze za gljivične spore na papiru u rasponu od 2-20 kGy te zaključili da čak i pri najvišim dozama još postoje vijabilne stanice. Uz to su istraživali utjecaj predtretmana zračenju na njegovu učinkovitost. Pokazalo se da se ukoliko zračenju prethodi sušenje spore su rezistentnije nego kada su prije zračenje izložene povišenoj temperaturi i povećanoj vlazi. Pretpostavlja se da su potonji uvjeti aktivirali perzistirajuće spore te da su zbog toga bile podložnije djelovanju zračenja. Međutim uvjeti povišene temperature i vlage pogoduju rezistenciji bakterija koje koegizistiraju s gljivicama pa se navedeni tretman ne preporuča.

Istim mehanizmima kojima djeluje na žive organizme, zračenje djeluje i na ozračeni materijal. Prije primjene gama zraka potrebno je procijeniti efekte na kemijska, fizikalna, funkcionalna i estetska svojstva materijala. Mišljenja među znanstvenicima o dozama koje su učinkovite za dekontaminaciju, a da istovremeno ne utječu značajno na svojstva papira podijeljena su. Neka istraživanja tvrdila su da ozračeni papir pokazuje znakove ubrzanog starenja kao što su smanjena izdržljivost i otpornost, povećano žućenje i opća krhkost (Butterfield, 1987, Adamo i sur., 1998). Dok su neke novije studije pokazale da oštećenja u mehaničko-fizikalnim svojstvima i nisu toliko značajna (Adamo i sur., 2001; Gonzalez u sur., 2002). Sekundarni efekti ovise i o vrsti papira, Flores (1976). pokazala je da je papir s većim stupnjem celuloze osjetljiviji na zračenje od na primjer novinskog papira koji sadrži više lignina. Adamo i sur.,(2001) ispitivali su različite uvjete u kojima se provodi zračenje na raspadanje celuloze. Međutim nisu našli ni da atmosfera bogata dušikom ili vakuum kao ni zasićenje uzoraka vodom prije zračenja pridonose smanjenju destruktivskih efekata.

Jedan od problema ne samo kod gama zračenja nego i svih metoda koje se primjenjuju u dekonatminaciji kulturne baštine, nedostatak je prikladne metode za kontrolu učinaka (Sterflinger i Pinar, 2013). Metoda izbora najčešće je kultivacija i brojanje živih stanica, no postoje vrste koje nije moguće uzgojiti na hranjivim podlogama u laboratoriju tako da su molekularne metode

temeljene na DNA nužne za pravilnu procjenu mikrobioloških zajednica na uzrocima (Ettanauer i sur., 2012). Učinkovitost različitih tehnika tako ovisi i tehnici korištenoj u kontroli. Michealsen i sur., (2012) ispitivali su kratkotrajnu i dugotrajnu učinkovitost liofilizacije, fumigacije etilen oksidom i gama zračenja na redukciju plijesni s papira i dobili kontradiktorne rezultate kad su te tehnike uspoređivane kultivacijskim i molekularnim metodama. Tako su kultivacijske tehnike pokazale učinkovitost i gama zračenja i etilen oksida dok su molekularne tehnike, utvrdile da je dugoročno učinkovita samo fumigacija s etilen oksidom.

Antifungalna aktivnost gama zračenja ovisna je o dozi, vrsti i njezinom stadiju. Cilj primijenjenih tehnika nije potpuna sterilnost jer čak i kada bi se to postiglo rezultati bi bili privremeni, već redukcija mikroorganizama na određenu razinu kako bi se usporilo propadanje. Uz brojne tretmane i njihove prednosti ono što je najvažnije u konzervaciji papirnate baštine na papiru svakako su preventivne mjere koje uključuju kontrolu klimatskih uvjeta u prostorima pohrane i redovno čišćenje. Čišćenje je naročito podcijenjeno iako se zna da se u slojevima prašine nalaze brojne spore i bakterije te da im prašina služi kao izvor nutrijenata (Sterflinger i Pinar, 2013.)

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Gljivične kontaminacije papira i dokumenta predstavljaju veliki problem za knjižnice i arhive diljem svijeta. S obzirom na osjetljivost papira kao materijala potrebno je kontrolirati rast gljivica i njihovih spora kako bi se usporilo njegovo propadanje. Gama zračenje kao metoda dekontaminacije objekata kulturne baštine je učinkovito i sigurno. Međutim ponekada je izazovno odrediti prikladnu dozu s obzirom na bioraznolikost mikroorganizama prisutnih na objektu, njihovu koncentraciju i osjetljivost na zračenje kao i osjetljivost samog materijala s obzirom da i on podliježe utjecaju gama zraka.

Cilj ovog diplomskog rada je procijeniti doze gama zračenja kao i brzinu doze potrebnu za redukciju gljivične kontaminacije papira.

Specifični su ciljevi bili:

- a) ispitati sastav prirodne mikrobiote na papiru
- b) ispitati utjecaj doza gama zračenja od 2kGy, 7kGy, 20kGy i 50kGy u dvije brzine doze 0,1 Gy/s i 8,6 Gy/s na inhibiciju rasta plijesni prirodne mikrobiote i namjerno inokulirane vrste *Cladosporium spaherospermum* neposredno nakon zračenja te 14., 28., i 56. dan nakon zračenja.

3 MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitivanje sastava prirodne mikrobiote na papiru metodom razrjeđenja

Papir je izrezan na kvadrate dimenzija 3,5cm x 3,5cm i ostavljen da se homogenizira u plastičnoj vrećici, a potom izvagan. Prosječna je masa papira iznosila 0,15g. Korišteni papir je Verge beskiselinski trajni papir dimenzija 70 x 100cm, gramature 120g m⁻². U sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu (tzv. falkonicu) stave se pripremljeni komadići papira te se doda 2ml peptonske vode i homogenizira vorteksiranjem. Na taj način dobiveno je razrjeđenje od 10⁻¹. Razrjeđenja od 10⁻² do 10⁻⁴ priređuju se miješanjem 100μL prethodnog s 900μL peptonske vode. Iz svakog razrjeđenja nanese se 100μL suspenzije na površinu sterilne hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici i ravnomjerno razmaže sterilnim staklenim štapićem (tzv. L-štapićem). Svi su uzorci priređeni u duplikatu. Hranjiva je podloga MALT ekstrakt agar proizvođača Sigma-Aldrich. Pripravlja se suspendiranjem 50g praha u 1L destilirane vode i kuhanjem do otapanja. Tako priređena podloga se zatim autoklavira. Autoklaviranje se provodi prema uvjetima sterilizacije za mikrobiološke podloge, 121 °C, tlak 1,2 bar, 15 minuta. Inkubacija uzoraka provodi se na 25 °C 5 do 7 dana. Na pločama se izbroje porasle kolonije pri čemu se za brojanje uzimaju ona razrjeđenja koja sadrže manje od 150 kolonija.

Broj plijesni po gramu materijala CFU/g (colony forming units) računa se prema formuli:

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

ΣC – zbroj kolonija 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

Cladosporium spaherospermum inokuliran je na MEA podlogu i nakon 10 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 svijetlom i uz plamenik. 100µL suspenzije stavljeno je u kivetu te je dodavana voda sa Tweenom. Kiveta je stavljena u denzitometar te kada je optička gustoća iznosila 1 dobili smo koncentraciju inokuluma od 1×10^6 CFU/g.

Izrezani komadići papira stavljeni su u sterilne polipropilenske konusne epruvete (15mL) i podijeljeni u dvije skupine. Prva skupina predstavljala je prirodnu kontaminaciju papira i stavljena je na inkubaciju 5-7 dana pri 25 °C uz 70-80% Rv. Nakon inkubacije u duplikatu je nasaden uzorak materijala. Druga skupina epruveta s papirom najprije je sterilizirana u autoklavu (121 °C, 1,2bar, 15 minuta). Potom je inokulirana sa suspenzijom *Cladosporium spaherospermum* 1×10^2 CFU/g i odmah nasadena u duplikatu kao kontrola. Ostatak je stavljen na inkubaciju u gore navedenim uvjetima. Nakon inkubacije obje su skupine uzoraka ozračivane u dozama od 2kGy, 7kGy, 20kGy i 50kGy te brzinama od 0,1 Gy/s i 8,6 Gy/s u duplikatu za svaku dozu i brzinu. Uzorci predviđeni za nasađivanje odmah nakon zračenja nanесeni su na hranjive podloge, ostali predviđeni za nasađivanje 14., 28. i 56. nakon zračenja do tada su čuvani na sobnoj temperaturi bez izvora vlažnosti.

1.3. Zračenje uzoraka

Uzorci su zračeni na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju na panoramskom uređaju sa ⁶⁰Co 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 etanolklorbenzena (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 dozama od 2kGy, 7kGy, 20kGy i 50 kGy, te brzinama od 0,1 Gy/s i 8,6 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

Rezultati preliminarnih pokusa mikološke analize papira prikazani su u Tablici 1. Prirodnu kontaminaciju činili su kvasci i *Cladosporium* spp. u koncentraciji od otprilike 2×10^2 CFU/g. Rezultati su pokazali da je i autoklaviran papir podložan kontaminaciji kvasaca, ali u nižoj razini od prirodne kontaminacije.

U tablici 2. prikazani su rezultati neozračenih kontrola. Prirodnu kontaminaciju papira čine vrste *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., bijeli miceliji i kvasci, navedene gljivice tipično nalazimo na papirnatim materijalima u knjižnicama i arhivima (Pinzari i Montanari, 2011.) Gljivice su nehomogeno raspršene na papiru pokazujući točkastu kontaminaciju. Početna koncentracija iznosila je 2×10^2 CFU/g, a nakon 7 dana inkubacije na 25 °C i 70% Rv koncentracije i prirodno prisutne mikrobiote i inokuliranih plijesni *Cladosporium* porasla je 10 do 100 puta u odnosu na početnu.

Tablica 1.

OPIS	CFU/g	VRSTE
Prirodna kontaminacija	$1,4 \times 10^2$	<i>Cladosporium</i> i kvasci
Autoklaviran papir	$4,5 \times 10^1$	Kvasci
Inokulacija s <i>Cladosporium</i> (10^4 /g) i autoklaviranje	$4,5 \times 10^1$	Kvasci
Inokulacija s <i>Cladosporium</i> (10^4 /g) inkubacija 5 dana 25 °C, autoklaviranje nakon inkubacije	0	<i>Cladosporium</i>
Inokulacija s <i>Cladosporium</i> (10^4 /g) inkubacija 5 dana 25 °C	$8,2 \times 10^5$	<i>Cladosporium</i> i kvasci
Inokulacija s <i>Penicillium</i> (10^4 /g) i autoklaviranje	0	-
Inokulacija s <i>Penicillium</i> (10^4 /g) inkubacija 5 dana 25 °C, autoklaviranje nakon inkubacije	0	<i>Penicillium</i> i kvasci
Inokulacija s <i>Penicillium</i> (10^4 /g) inkubacija 5 dana 25°C	$8,2 \times 10^4$	<i>Penicillium</i>

Tablica 2. Rezultati mikološke analize papira prirodne kontaminacije i inokuliranih plijesni *C. sphaerospermum* sa i bez inkubacije.

OPIS	CFU/g	VRSTE
Prirodna konataminacija/ bez inkubacije	1,8x10 ²	<i>Cladosporium</i> kvasci
Prirodna kontaminacija/ inkubacija 7 dana	3,8x10 ³	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>
Autoklaviran papir/inokluacija s s <i>Cladosporium</i> / bez inkubacije	1x10 ³	<i>Cladosporium</i>
Inokulirano s <i>Cladosporium</i> /inkubacija 7 dana	3,2x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>

Antifungalni efekt gama zračenje na prirodno prisutnu mikrobiotu papira ovisan je o dozi i brzini doze. Niže doze od 2 i 7 kGy pri manjoj brzini od 0,1 Gy/s nisu učinkovite za dekontaminaciju prirodne mikrobiote papira. Kao što je vidljivo iz tablice 3 i 4 sve vrste koje su prvotno zabilježene su se ponovno pojavile u koncentracijama od 100-2000 CFU/g. Ni veća brzina zračenje od 8,6 Gy/s kod doze 2 kGy nije učinkovita u redukciji gljivica budući da je došlo do oporavka prirodne mikrobiote do početne koncentracije (200 CFU/g) (Tablica 3). Kada gledamo tablicu 4. i utjecaj veće brzine pri dozi od 7 kGy pokazala se učinkovitija od iste primijenjene brzine pri dozi 2 kGy. Međutim došlo je do oporavka bijele plijesni 14. dana od zračenja i kvasaca 56. dan od zračenja, ali u nižoj koncentraciji od prvotno prisutne (40 CFU/g) . Visoke doze od 20 i 50 kGy primijenjene pri obje brzine inhibirale su oporavak većine gljivičnih vrsta osim bijele plijesni i kvasaca. Kvasci su zabilježeni 14. dan pri nižoj primijenjenoj brzini (200 CFU/g) kao što je vidljivo u tablici 6. Bijela plijesan se pojavila neposredno nakon zračenja u koncentraciji od 90 CFU/g.

Inokulirana vrsta *C. sphaerospermum* rezistentna je na dozu od 2 kGy pri obje brzine zračenja. Uz kladosporije u nekim uzrocima nakon zračenja pri toj dozi nađeni i kvasci i bijele plijesni (tablica 3). Ni više doze od 7, 20 i 50 kGy pri nižoj brzini nisu uspjele reducirati kladosporije. Koncentracija *C. sphaerospermum* kretala u vrijednostima početno prisutne (10³ CFU/g) ili nešto više (10⁴ CFU/g). Ipak navedene doze pri brzini od 8,6 Gy/s uglavnom su učinkovito inhibirale

oporavak kladosporija uz iznimku 14. dan pri dozi od 20 kGy, međutim koncentracija je bila gotovo 1000 puta niža od početne (nakon inkubacije u vlažnim uvjetima).

Tablica 3. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na papiru nakon zračenja dozom od 2 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

Doza	2kGy							
Brzina	0,1 Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
0.	4,1x10 ²	<i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i>	3,4x10 ⁴	<i>Cladosporium</i> , bijela plijesan	2,3x10 ²	bijele, zeleno- bijele, prazna središta	4,0x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>
14.	1,4x10 ²	Kvasci	2,8x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>	0	-	5,5x10 ³	<i>Cladosporium</i>
28.	2,0x10 ³	Kvasci*	5,1x10 ³	Kvasci <i>Cladosporium</i>	0	-	1,1x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>
56.	9,1x10 ¹	bijela plijesan	1,4x10 ²	<i>Cladosporium</i> , bijela plijesan	9,1x10 ¹	bijela plijesan	9,5x10 ²	<i>Cladosporium</i> bijela plijesan

*peptonska voda kontaminirana je s bijelom plijesni

Tablica 4. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na papiru nakon gama zračenja dozom od 7 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

Doza	7kGy							
Brzina	0,1Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
0.	0	-	2,7x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	-	4,6x10 ¹	bijela plijesan
14.	1,4x10 ³	<i>Alternaria</i>	2,6x10 ³	<i>Cladosporium</i>	4,6x10 ¹	bijela plijesan	0	-
28.	9,1x10 ²	<i>Fusarium</i>	8,2x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	-	0	-
56.	9,1x10 ²	bijela plijesan	2,8x10 ³	<i>Cladosporium</i>	4,6x10 ¹	kvasci	4,6x10 ¹	bijela plijesan

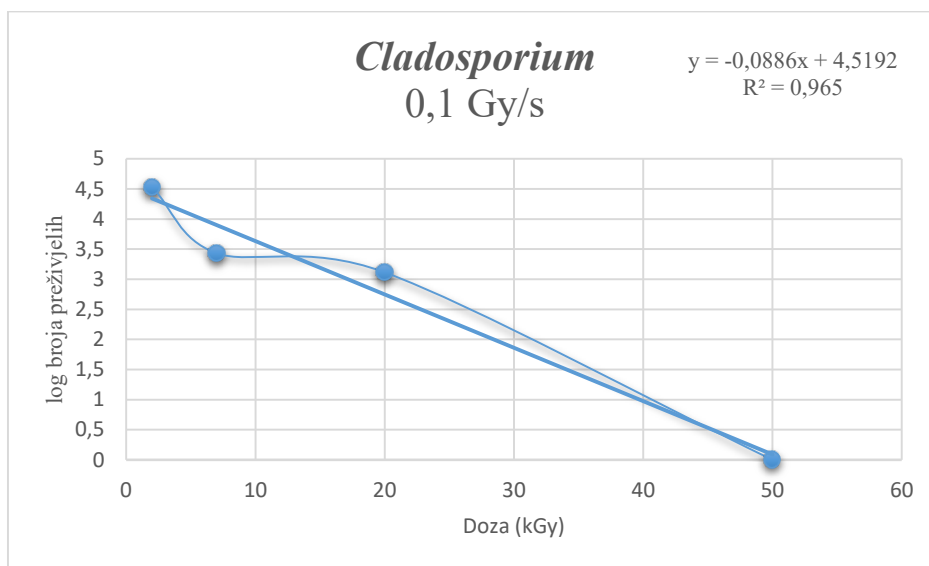
Tablica 5. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na papiru nakon gama zračenja dozom od 20 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

	20kGy							
Brzina	0,1 Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
0.	0	-	1,3x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	-	0	-
14.	0	-	6,6x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	-	4,6x10 ¹	<i>Cladosporium</i>
28.	0	-	1,9x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>	0	-	0	-
56.	0	-	4,4x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	-	0	-

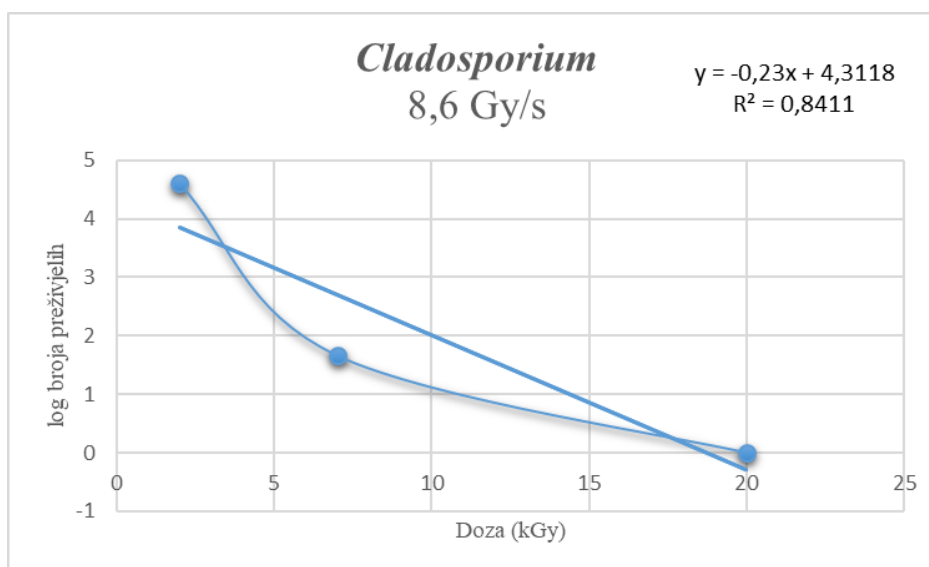
Tablica 6. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na papiru nakon gama zračenja dozom od 50 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

Doza	50kGy							
Brzina	0,1 Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
0.	0	-	0	-	9,1x10 ¹	bijela plijesan	0	-
14.	2,3x10 ²	Kvasci	1,4x10 ⁴	<i>Cladosporium</i>	0	-	0	-
28.	0	-	2,0x10 ³	<i>Cladosporium</i>	0	-	0	-
56.	0	-	2,0x10 ³	<i>Cladosporium</i>	9,1x10 ¹	bijela plijesan	0	-

D10 (decimalna redukcijska doza) odnosno doza potrebna da se inaktivira 90% broja plijesni to jest da se broj mikroorganizama smanji za 1log. Na slikama 1 i 2 prikazan je graf ovisnosti logaritma broja preživjelih plijesni i primijenjene doze neposredno nakon zračenja. Iz pravca dobivenog na grafu izračunate su D10 vrijednosti za obje primijenjene brzine 0,1 i 8,6 Gy/s. D10 je određen kao negativna recipročna vrijednost nagiba krivulje ($D10 = -1/a$, gdje je a nagib krivulje). Pri brzini od 0,1 Gy/s dobivena je D10 11,29 kGy dok je pri brzini 8,6 Gy/s vrijednost D10 iznosila je 4,35 kGy.



Slika 1. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih plijesni i doze zračenja u kGy za *C. sphaerospermum* pri brzini od 0,1 Gy/s.



Slika 2. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih plijesni i doze zračenja u kGy za *C. sphaerospermum* pri brzini od 8,6 Gy/s.

Vrijednost D10 određujemo kako bismo mogli uspoređivati različite mikroorganizme ili iste mikroorganizme pod različitim uvjetima. Budući da je nekada zahtjevno odrediti odgovarajuću dozu poznavanje vrijednosti D10 za neku vrstu pri određenim uvjetima može osigurati željenu

redukciju mikroorganizama. Ipak, u obzir osim redukcije mikroorganizama treba uzeti i stupanj degradacije artefakta kao i stupanj kontaminacije (Trandafir i sur., 2014).

Kao što se vidi iz rezultata najrezistentnijima na utjecaje zračenje pokazao se *C. sphaerospermum*. Uzroke rezistencije vrsta roda *Cladsporium* nalazimo u produkciji pigmenta melanina za kojeg se pretpostavlja da ima radioprotektivna svojstva. U prilog toj pretpostavki ide i činjenica da su neke melanizirane gljivice nađene na područjima ekstremno visoke radioaktivnosti kao što su reaktor u Černobilu, svemirska stanica i planine na Antartici (Dadachova i Casadevall, 2008). Kao što je već spomenuto Dadachova i sur., (2008) zaključili su da su radioprotektivna svojstva melanina posljedica njegovog kemijskog sastava, hvatanja slobodnih radikala kao i specifičnog prostornog rasporeda čestica melanina u stanici. Kod kvasaca i bijele plijesni potrebno je napraviti dodatna molekularno-biološka ispitivanja kako bi se dobio bolji uvid u mehanizam njihove otpornosti na visoke doze zračenja.

5 ZAKLJUČAK

Antifungalni učinak gama zračenja ovisan je o dozi i brzini doze. Najniža primijenjena doza od 2 kGy, ali pri većoj brzini učinkovito je reducirala većinu gljivica na gotovu istu razinu kao i ona koja je bila prije inkubacije, osim onih roda *Cladosporium*. Doze od 7, 20 i 50 kGy pri višoj su brzini bile učinkovite u suzbijanju i prirodno prisutne mikrobiote i inokulirane vrste *Cladosporium sphaerospermum*. Vrste roda *Cladosporium*, kvasci i bijela plijesan pokazali su se najrezistentijim gljivicama na gama zračenje pogotovo pri nižoj brzini zračenja. Iz rezultata pokusa određene su i D10 vrijednosti koje za nižu brzinu zračenja iznosi 11,29 kGy, dok za višu iznosi 4,35 kGy. Potrebno je provesti kemijsku analizu papira kako bi se dobio bolji uvid u utjecaj određenih doza i brzina zračenja na sastav papira. Za učinkovitu je primjenu gama zračenje u konzervaciji papirnatih objekata kulturne baštine potreban interdisciplinarni pristup.

6 LITERATURA

- Adamo M, Brizzi M, Magaudo G, Martinelli G, Plossi Zappala M, Rocchetti F, Savagnone F. Gamma radiation treatment of paper in different environmental conditions: chemical, physical and microbiological analysis. *Restaurator*, 2001, 22, 107-131.
- Adamo M, Giovanotti M, Magaudo G, Plossi Zappala M, Rocchetti F, Rossi G. Effect of gamma rays on pure cellulose paper as model for the study of the treatment of biological recovery of biodeteriorated books. *Restaurator*, 1998, 19, 41-59.
- Ardelean, E., & Melniciuc-Puica, N., Conservation of paper documents damaged by foxing, *Eur J Sci Theol*, 2013, 9 (2), 117-124.
- Ballard, MW, Baer, NS. Ethylene oxide fumigation: results and risk assessment. *Restaurator*, 1986, 7, 143-168.
- Butterfield, F. J. The Potential Long-term Effects of Gamma Radiation on Paper. *Stud Conserv*, 1987, 32, 181-191.
- Calado T, Venâncio A, Abrunhosa L. Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2014, 13, 1049-1061.
- Calvo AM., Docters A., Miranda MV., Saparrat MCN. The Use of Gamma Radiation for the Treatment of Cultural Heritage in the Argentine National Atomic Energy Commission: Past, Present, and Future. U: Applications of Radiation Chemistry in the Fields of Industry, Biotechnology and Environment. Topics in Current Chemistry Collections. Springer, Cham., 2017, str. 227-247.
- Cragg SM, Beckham, GT Bruce NC, Bugg TDH, Distel DL, Dupree P, Etxabe AG, Goodell BS, Jellison J, McGeehan JE, McQueen-Mason SJ Schnorr K, Walton PH, Watts JEM, Zimmer M. Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 29, 108-119
- Craig R. Alternative approaches to the treatment of mould - biodeterioration - an international problem. *Pap Conserv*, 1986, 10, 27-30

- Dadachova E, Bryan RA, Howell RC, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, Casadevall A. Radioprotective properties of melanin are a function of its chemical composition, free stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008, 21, 192–199.
- Dadachova E, Casadevall A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(6), 525-531.
- Daniels VD. The Chemistry of paper conservation, *Chem. Soc. Rev.*, 1996, 25, 179-186
- Deacon J. Fungal Biology. Blackwell Publishers, 2005, Cambridge, Massachusetts.
- Dželalija M. Ionizirajuće zračenje u biosferi (interna skripta). Split, 2006, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, str. 6.
- Ettenauer J, Piñar G, Lopandic K, Spangl B, Ellersdorfer G, Voithl C, Sterflinger K. Microbes on building materials — evaluation of DNA extraction protocols as common basis for molecular analysis. *Sci Total Environ*, 2012, 439, 44–53.
- Farkas J. Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17, 148–52
- Feretić D. Uvod u nuklearnu energetiku (drugo dopunjeno izdanje), Školska knjiga, 2011., Zagreb, str. 66-67.
- Flieder, F. Action des différents produits fongicides et insecticides, utilisés en conservation sur la résistance physico-chimique des papiers. U: 5th Joint Meeting of the ICOM Committee for Museum Laboratories and of the Sub-Committee for the Care of Paintings, New York, ICOM, 1965, str. 1–46.
- Flores SCP. Gamma radiation as fungicide and its effects on paper. *J Am Inst Conserv*, 1976, 16, 15-44
- Florian ML. Fungal Facts. Archetype publications, London, 2002, str. 146.
- Gallo F, Pasquariello F. Foxing, ipotesi sull'origine biológica. *Boll Ist Cent per Patol Libro* 1989, 43, 136–176.b
- Gallo F, Valenti P, Coalizzi P, Pasquariello G, Scorrano, M, Sclocchi, MC, Maggi, O, Persiani, AM. Research on the viability of fungal spores in relation to different microclimates and different materials. In: Federici, C., Munafo, P.F. (Eds.), 1999, International Conference on Conservation

and Restoration of Archival and Library Materials, April 1996. GP Palumbo, Palermo, str. 213-230.

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

IAEA, Uses od ionizing radiation for tangible cultural heritage conservation, 2017; str 3, 30, 43, 68, 69.

Kaarakainen P, Rintala H, Vepsalainen A, Hyvarinene 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.

Lacey J. Spore dispersal-its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. *Mycol Res*, 1996, 100, 641-660.

Lado BH, Yousef AE. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microb Infect*, 2002, 4, 433–40.

Le Caër S. Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H₂ production under ionizing radiation. *Water*, 2011, 3, 253.

Lyngdoh RH, Shaefer HF, 2009. Elementary lesions in DNA subunits: electron, hydrogen atom, proton, and hydride transfers. *Acc Chem Res* 42, 563-572.

Meier C, Petersen, K. Schimmelpilze Auf Papier– Ein Handbuch Für Restauratoren. Tönning, Germany: Der Andere Verlag, 2006, str. 198.

Mendes G, Brandao TRS, Silva CLM. Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. *Am J Infect Control*, 2007, 35, 574-581.

Michaelsen A, Piñar G, Pinzari F. Molecular and Microscopical Investigation of the Microflora Inhabiting a Deteriorated Italian Manuscript Dated from the Thirteenth Century. *Microbial Ecology*. 2010, 60(1), 69-80.

- Michaelsen A, Pinzari F, Barbabietola N, Pinar G. Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi. *Int Biodeter Biodegr*, 2013, 84, 333-341.
- Michaelsen A, Pinzari F, Ripka K, Lubitz W, Piñar G. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *Intl Biodeter Biodegr*, 2006, 58, 33-141.
- Michaelsen, A, Piñar G, Montanari M, Pinzari F. Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: a case study. *Int Biodeter Biodegr*, 2009, 63, 161-168.
- Nitterus, M. Fungi in archives and libraries. A literary survey. *Restaurator*, 2000, 21, 25-40.
- Pinheiro AC, Macedo MF, Jurado V, Saiz-Jimenez C, Viegas C, Brandao J, Rosado L. Mould and yeast identification in archival settings: preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives. *Int Biodeter Biodegr*, 2011, 65, 619-627.
- Pinzari F, Cialei V, Barbabietola N. Measurement of the micro-aeroflora deteriorating potentialities in the indoor environments. *Preserv Sci*, 2010, 7, 29–34.
- 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, Springer Berlin, Elsevier, 2011, str. 193–206.
- Ponce-Jimenez M, Toral F, Fornue E. Antifungal protection and sizing of paper with chitosan salts and cellulose ethers. Part 1, physiacl effects. *J Am Inst Conservat*, 2002, 41, 243-254.
- Prado G. Gamma-irradiation effect (^{60}Co) in fungi frequency of peanut in natura and after storage. Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2005, Universidade Federal de Lavras.
- Price L O., Managing a Mold Invasion: Guidelines for Disaster Response, CCAHA Technical Series No. 1, Conservation Center for Art and Historic Artifacts, Philadelphia, PA, 1996.
- Reisz, JA, Bansal N. Qian J,Zhao W,Furdui CM. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules-Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal.*, 2014. 21(2), str.260–292.

- Sequeira S, Cabrita EJ, Macedo MF. Antifungals on paper conservation: An overview. *Int Biodeter Biodegr*, 2012, 74, 67-86.
- Shea KM. Technical report: irradiation of food. *Pediatrics*, 2000, 106, 1505–10.
- Stepanik T, Kost D, Nowicki T, Gaba D. Effects of electron beam irradiation on deoxynivalenol levels in distillers' dried grain and solubles and in production intermediates. *Food Addit Contam*, 2007, 24, 1001–6.
- Sterflinger K, Pinar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97, 9637–9646.
- Sterflinger K, Pinzari F, 2012. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environ Microbiol* 14(3), 559–566.
- Sterflinger K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biol Rev* 2010, 24, 47–55.
- Strassberg R. The Use of Fumigants in Archival Repositories. *Am Arch*, 1978, 41, 25-36.
- Szczepanowska H, Cavaliere AR. Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collections, Wye House, Easton, Maryland. *Int Biodeter Biodegr*, 2000, 46(3), 245-249.
- Thornley, M.J. Radiation Resistance among bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 1963, 26, 334-345
- Tomazello GC, Wiendl M, Maximilinao F. The applicability of gamma radiation to the control of fungi in naturally contaminated paper. *Restaurator*, 1965, 16, 93-99
- Trandafir L, Zorila FL, Alexandru M, Ene M, Constantin M, Alistar A, Cutrubinis M, Iordache O, Stanculescu RI. Radioresistance of biodegradation fungi and its importance in establishing the decontamination dose. ICAMS V, Bukurešt, 2014, str 561-566.
- Utjecaj gama zračenja na predmete kulturne baštine od organskih materijala, 2011., <http://www.h-r-z.hr>, pristupljeno 10.8.2018.
- Valentin N , Preusser F. Insect control by inert gases in museums, archives and libraries. *Restaurotr*, 1990, 11:22-33.

Valentin N. Microbial contamination in archives and museums: health hazards and preventive Strategies using air ventilation System In: Proceedings of the Experts Roundtable on Sustainable Climate Management Strategies, Spain, 2007, str 1-26.

Valentin N. Microorganisms in Museum Collections. Coalition, 2010, str 2-5.

7 SAŽETAK

Veliki dio kulturne baštine čine objekti od papirnatih materijala. Kao takvi izrazito su podložni kontaminaciji gljivicama koje svojim djelovanjem ubrzavaju njegovo propadanje. Jedna od najpogodnijih metoda za zaustavljanje destruktivnog djelovanja gljivica je gama zračenje. U ovom je radu ispitivan utjecaj gama zračenja na prirodnu mikrobiotu papira te utjecaj na inokuliranog sekundarnog kolonizatora, vrstu *Cladosporium sphaerospermum*. Uzorci su tretirani pomoću izvora u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) Instituta Ruđer Bošković (IRB). Primijenjene su apsorpcijske doze od 2, 7, 20 i 50 kGy u dvije brzine zračenja 0,1 Gy/s i 8,6 Gy/s. Mikrobiološka analiza ozračenih uzoraka provedena je neposredno nakon zračenja te 14., 28., i 56. dan nakon zračenja.

Učinak gama zračenje ovisan je o dozi i o brzini doze. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da najniža doza od 2 kGy nije učinkovita u redukciji plijesni ni pri nižoj ni pri višoj brzini doze. Dok su veće doze od 7, 20 i 50 kGy pri višoj brzini učinkovito reducirale i prirodnu mikrobiotu i inokuliranu vrstu *C. sphaerospermum*. To potvrđuje i izračunata vrijednost D10 (decimalna redukcijska doza), odnosno doza potrebna da se inaktivira 90% od početnog broja plijesni u uzorku, koja za *C. sphaerospermum* i brzinu zračenja 0,1 Gy/s iznosi 11,29 kGy, a za brzinu 8,6 kGy iznosi 4,35 kGy. Potrebno je dakle naći odgovarajuću dozu koja će reducirati mikroorganizme na prihvatljivu razinu, a istovremeno imati minimalni negativni učinak na kemijski sastav papira stoga su u tom području potrebna daljnja ispitivanja.

Za učinkovitu je primjenu gama zračenje u konzervaciji papirnatih objekata kulturne baštine potreban interdisciplinarni pristup.

SUMMARY

Major part of cultural heritage is made up of paper-based materials. As such, they are highly susceptible to fungal contamination, which causes paper to decay. One of the most convenient methods of stopping the destructive action of fungi is gamma irradiation. This paper was aimed to assess the influence of gamma irradiation on the naturally occurring mycobiota as well as artificially inoculated secondary colonizer *Cladosporium sphaerospermum*. Inoculated samples have been treated by the Laboratory for radiation chemistry and dosimetry of Ruđer Bošković Institute source. Doses of 2, 7, 20 and 50 kGy were applied at two dose rates of 0,1 and 8,6 Gy/s. Microbiological analysis of irradiated samples was conducted immediately after radiation and on 14, 28 and 56 days after radiation.

Fungicidal effect of gamma radiation was dose and dose rate-dependent. From the obtained results it is apparent that the lowest dose of 2 kGy is not effective in reducing mold at either lower or higher dose rates. While higher doses of 7, 20 and 50 kGy at higher dose rate effectively reduced the naturally occurring mycobiota as well as artificially inoculated secondary colonizer *C. sphaerospermum*. This is also confirmed by the calculated value D10 (decimal reduction dose), the dose required to inactivate 90% of the initial number of molds in the sample, which is 11.29 kGy for *C. sphaerospermum* and the rate of radiation 0.1 Gy/s, and for 8.6 kGy is 4.35 kGy. Thus, it is necessary to find an appropriate dose which will reduce the microorganisms to an acceptable level while at the same time will have a minimal negative effect on the chemical composition of the paper, so further testing in this area is required.

To conclude, for the efficient use of gamma irradiation in conservation of paper-based cultural heritage objects, an interdisciplinary approach is needed.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

DJELOVANJE GAMA ZRAČENJA NA MIKOBIIOTU PAPIRA

Lucija Sinčić

SAŽETAK

Veliki dio kulturne baštine čine objekti od papirnatih materijala. Kao takvi izrazito su podložni kontaminaciji gljivicama koje svojim djelovanjem ubrzavaju njegovo propadanje. Jedna od najpogodnijih metoda za zaustavljanje destruktivnog djelovanja gljivica je gama zračenje. U ovom je radu ispitivan utjecaj gama zračenja na prirodnu mikrobiotu papira te utjecaj na inokuliranog sekundarnog kolonizatora, vrstu *Cladosporium sphaerospermum*. Uzorci su tretirani pomoću izvora u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) Instituta Ruđer Bošković (IRB). Primijenjene su apsorpcijske doze od 2, 7, 20 i 50 kGy u dvije brzine zračenja 0,1 Gy/s i 8,6 Gy/s. Mikrobiološka analiza ozračenih uzoraka provedena je neposredno nakon zračenja te 14., 28., i 56. dan nakon zračenja.

Učinak gama zračenje ovisan je o dozi i o brzini doze. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da najniža doza od 2 kGy nije učinkovita u redukciji plijesni ni pri nižoj ni pri višoj brzini doze. Dok su veće doze od 7, 20 i 50 kGy pri višoj brzini učinkovito reducirale i prirodnu mikrobiotu i inokuliranu vrstu *C. sphaerospermum*. To potvrđuje i izračunata vrijednost D10 (decimalna redukcijska doza), odnosno doza potrebna da se inaktivira 90% od početnog broja plijesni u uzorku, koja za *C. sphaerospermum* i brzinu zračenja 0,1 Gy/s iznosi 11,29 kGy, a za brzinu 8,6 kGy iznosi 4,35 kGy. Potrebno je dakle naći odgovarajuću dozu koja će reducirati mikroorganizme na prihvatljivu razinu, a istovremeno imati minimalni negativni učinak na kemijski sastav papira stoga su u tom području potrebna daljnja ispitivanja. Za učinkovitu je primjenu gama zračenje u konzervaciji papirnatih objekata kulturne baštine potreban interdisciplinarni pristup.

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

Rad sadrži: 28 stranica, 2 grafičkih prikaza, 6 tablica i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kulturna baština, gama zračenje, papir, plijesni

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. Daniela Jakšić, poslijedoktorantica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Katarina Marušić, Laboratorij za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković, Zagreb

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Gamma-irradiation effect on mycobiota of paper materials

Lucija Sinčić

SUMMARY

Major part of cultural heritage is made up of paper-based materials. As such, they are highly susceptible to fungal contamination, which causes paper to decay. One of the most convenient methods of stopping the destructive action of fungi is gamma irradiation. This paper was aimed to assess the influence of gamma irradiation on the naturally occurring mycobiota as well as artificially inoculated secondary colonizer *Cladosporium sphaerospermum*. Inoculated samples have been treated by the Laboratory for radiation chemistry and dosimetry of Ruđer Bošković Institute source. Doses of 2, 7, 20 and 50 kGy were applied at two dose rates of 0,1 and 8,6 Gy/s. Microbiological analysis of irradiated samples was conducted immediately after radiation and on 14, 28 and 56 days after radiation. Fungicidal effect of gamma radiation was dose and dose rate-dependent. From the obtained results it is apparent that the lowest dose of 2 kGy is not effective in reducing mold at either lower or higher dose rates. While higher doses of 7, 20 and 50 kGy at higher dose rate effectively reduced the naturally occurring mycobiota as well as artificially inoculated secondary colonizer *C. sphaerospermum*. This is also confirmed by the calculated value D10 (decimal reduction dose), the dose required to inactivate 90% of the initial number of molds in the sample, which is 11.29 kGy for *C. sphaerospermum* and the rate of radiation 0.1 Gy/s, and for 8.6 kGy is 4.35 kGy. Thus, it is necessary to find an appropriate dose which will reduce the microorganisms to an acceptable level while at the same time will have a minimal negative effect on the chemical composition of the paper, so further testing in this area is required. To conclude, for the efficient use of gamma irradiation in conservation of paper-based cultural heritage objects, an interdisciplinary approach is needed.

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

Thesis includes: 28 pages, 2 figures, 6 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cultural heritage, gamma irradiation, paper, moulds

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
Daniela Jakšić, Ph.D., *Postdoktorand*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Katarina Marušić, Ph.D., Radiation Chemistry and Dosimetry Laboratory at Ruđer Bošković Institute in Zagreb

The thesis was accepted: September, 2018.