

**Petra Bulić**

**Antifungalni učinak gama zračenja na mikrobiotu  
platna i papira**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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

*Zahvaljujem se izv. prof. dr.sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu, pruženom znanju, suradnji i povjerenju koji su mi bili iskazani tokom ovog istraživanja, te cjelokupnom osoblju laboratorija Zavoda za mikrobiologiju na gostoprimstvu. Hvala dr. sc. Branki Mihaljević na suradnji i ozračivanju uzoraka.*

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Plijesni kao kontaminanti kulturne baštine.....	1
1.2	$\gamma$ -zračenje .....	5
1.3	Primjena $\gamma$ -zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine .....	8
1.4	Usporedba tri konzervacijska tretmana .....	9
2	OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3	MATERIJALI I METODE .....	14
3.1	Ispitivanje sastava prirodne mikrobiote na platnu i papiru metodom razrjeđenja .....	14
3.2	Inokulacija papira i platna odabranim vrstama pijesni .....	15
3.3	Zračenje uzoraka.....	15
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	17
5	ZAKLJUČAK .....	23
6	LITERATURA.....	24
7	SAŽETAK/SUMMARY .....	30

# 1 UVOD

## 1.1 Plijesni kao kontaminanti kulturne baštine

U muzejima, privatnim kolekcijama kao i knjižnicama, plijesni imaju veliku ulogu u biodeterioraciji. Biodeterioracija je svaka nepoželjna promjena u materijalu nastala vitalnim aktivnostima organizama (Hueck, 1965). Bakterije, arheje, gljive, lišajevi i kukci nametnici predstavljaju trajni problem u konzervaciji kulturne baštine upravo zbog njihovog biodeterioracijskog potencijala. Navedeno vrijedi za sve tipove povijesnih artefakata kao i djela moderne umjetnosti (Sterflinger i Pinar, 2013). Do biodegradacije osobito dolazi nakon prirodnih katastrofa i vremenskih nepogoda, npr. poplava, ali i nekih ljudskih aktivnosti (npr. ratnih sukoba), u kojima se remete uvjeti sigurnog čuvanja baštinskih predmeta. U takvim okolnostima, kada dolazi do izmještanja predmeta većih razmjera, i kontakta nezaraženih i zaraženih predmeta, nerijetko dolazi do naglog razvoja nametnika koji istovremeno ugrožavaju brojne predmete i cijele zbirke, a čija množina onda otežava organizirano spašavanje (Katušim-Ražem i sur., 2013).

Kulturna baština građena je od gotovo svih prirodnih materijala dostupnih čovjeku, opus seže od vrlo jednostavnih monokomponentih umjetnina do kompleksnih struktura građenih od različitih materijala. Najjednostavnija podjela svakako bi bila ona na anorganske i organske materijale. U anorganske ubrajamo kamen, staklo i metal, a u organske drvo, papir, tekstil, pergament, kožu, vunu, svilu i slično.

Na kamenu izloženom okolišu plijesni predstavljaju jedan od važnijih biodeterioracijskih čimbenika upravo zbog svog erozivnog djelovanja (Sterflinger, 2010). Obično proces započne sinergičnim utjecajem vanjskih čimbenika, kiše, vjetra, sunca, smrzavanja/odmrzavanja, koji vodi do prelaska glatke, čiste površine kamena u grubu i poroznu. Tom pripomažu i kemolitoautotrofne bakterije koje dobivaju energiju oksidiranjem anorganskih spojeva iz atmosfere primjerice sumporov dioksid (*Thiobacillus* spp.) i amonijak (*Nitrosomonas* spp.), njihov krajnji metabolički produkt su anorganske kiseline (Tiano, 2016). Ovisno o fizikalnim karakteristikama materijala, plijesni mogu penetrirati u kamen te formirati rupe veličine čak i do 2 cm u dijametru i dubini kamena. Ovaj fenomen naziva se *engl.* „bio-pitting“ (Sterflinger i Pinar, 2013). Raznolikost vrsta plijesni na kamenu slična je raznolikosti spora u zraku. *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium* i *Phoma* su najvažnije vrste

(Sterflinger i Prillinger, 2001). U umjerenim i vlažnim klimama dominiraju plijesni, dok su u suhom okolišu klimatski uvjeti ekstremni za većinu plijesni te dominiraju crni kvasici (Sterflinger, 2005). Crni kvasci su jedni od najotpornijih eukariotskih organizama na Zemlji. Oni uglavnom naseljavaju ogoljene stijene u toplim i hladnim pustinjama svih krajeva Zemlje posebice one karakterizirane ekstremnim prelaskom iz vlažnih uvjeta u duge periode suše i ekstremnih temperaturnih razlika (Zakharova i sur., 2012). Crni kvasci *Hortaea*, *Sarcinomyces*, *Coniosporium*, *Capnobotryella*, *Exophiala*, *Knufia* and *Trimmatostroma* formiraju male crne kolonije zbog izrazite melanizacije staničnih zidove, na površini i unutar kamena, i često u asocijaciji s lišajevima dovode do mehaničke i kemijske erozije (Sterflinger, 2005).

Materijali načinjeni od ugljikohidratnih polimera češće su supstrat gljivama, dok su oni proteinske strukture, kao primjerice pergament (građen uglavnom od kolagena) i koža, češće supstrat bakterijama koje posjeduju proteolitičku aktivnost. Neki od rodova izoliranih s pergamenta su *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Virgibacillus* i *Micromonospora* (Kraková i sur., 2012). Veličina bakterija omogućava im da penetriraju među polimerna vlakna, što vodi do njihovog nakupljanja u podlozi i posljedično kolonizacije. Izlučivanje primarnih i sekundarnih metabolita kao što su kolagenaze, celulolitičnimienzimii organskekiselinevodi do smanjenja pH, što onda dalje promovira napad drugih mikroorganizama (Tiano, 2016). Na taj način podloge mogu postati pogodnije za fungalni napad, kao npr. pergament. Osim produkcije mikotoksina i pigmentiranih metabolita, fungalna kontaminacija je problematična i zbog njihovih morfoloških karakteristika kao što je penetracijski kapacitet hifa, činjenice da se mogu hraniti sa gotovo svim supstratima, te njihovog metaboličke aktivnosti koja vodi do otpuštanja sekrecijskih enzima (Szczepanowska i Cavaliere, 2000).

Za fungalne stanice možemo reći da su totipotentne jer cijeli organizam može biti razvijen ne samo iz spora, već i iz fragmenta hifa (Singh, 2006). Na rast gljivica utječe više faktora a neki od njih su: aktivitet vode podloge, temperatura, pH, tlak kisika i ugljikovog dioksida, svjetlost, dostupnost nutritivnih supstrata. Aktivitet vode je fizikalno-kemijska veličina koja predstavlja omjer parcijalnog tlaka vodene pare testnog materijala i tlaka vodene pare čiste vode pri istim uvjetima. Ona zapravo pokazuje dostupnost vode u hrani potrebne za razvoj plijesni (Pitt i Hocking, 2009). Koja će vrsta rasti na danoj podlozi, uvelike ovisi o aktivitetu vode ( $a_w$ ) podloge, pa ih s obzirom na njihove potrebe za vodom možemo podijeliti u primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore (Grant i sur., 1989). Primarni kolonizatori su

plijesni koje rastu pri  $a_w < 0,8$  (*Penicillium chrysogenum* te *Aspergillus versicolor*, ali i druge *Aspergillus* vrste, *Eurotium* spp., *Wallemia sebi* te *Paecilomyces variotii*). 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 su plijesni koje rastu pri  $a_w > 0,9$  (*Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp) (WHO2009; Nielsen, 2003). Što se tiče pH kao parametra, plijesni mogu rasti u rasponu pH od 3 do 8 (uz izuzetak nekih vrsta koje izlaze iz tog područja), optimum je 5, a kvasci mogu rasti i na pH od 1,5. Većina plijesni su mezofili što znači da rastu na temperaturama od 10 °C do 35 °C. Nadalje plijesnima je potreban kisik za rast jer su one aerobi. Za rast plijesni bitnija je dostupnost kisika u supstratu u kojem plijesan raste, nego parcijalni tlak kisika. Nekim plijesnima smeta povećana koncentracija ugljikovog dioksida (Pitt i Hocking, 2009). *Saccharomyces* vrste, *Zygosaccharomyces* vrste i ostali fermentivni kvasci mogu rasti i u odsutnosti kisika. Plijesni za svoj rast trebaju izvor ugljika i dušika. Fungalni metabolizam je najbolje prilagođen na supstrate s visokim udjelom ugljikohidrata. Relativno su indiferentni prema izvoru dušika te mogu koristiti nitrate, amonijeve ione i organske izvore dušika. Neke vrste imaju limitiran rast ukoliko i ugljik i dušik moraju osigurati iz aminokiselina i proteina (Pitt i Hocking, 2009).

Fungalna degradacija kulturne baštine vodi do različitih oštećenja ovisno o vrsti, supstratu te uvjetima. Oštećenja mogu bit uzrokovana mehaničnim stresom, metaboličnom aktivnošću, posebice produkcijom kiselina i razgradnih enzima, te pigmentirajućim metabolitima. Jedan od fenomena koji znanstvenici prepisuju plijesnima, dok drugi smatraju da su uzrok kemijski faktori kao oksidacija željeza, zove se *engl.*, „foxing“, a odlikuje se malim, izoliranim, crveno-smeđim hrđavim mrljama. Većina plijesni povezanih s degradacijom slika na papiru i ulja na platnu posjeduju celulolitičku aktivnost koja vodi do razgradnje celuloznih vlakana podloge ili pak uzrokuju razgradnju lijepila, narušavanje uljnih veziva, otapanje boje. (Sterflinger i Piňar, 2013). Većina infekcija uzrokovana je sporama iz zraka, a velik broj spora akumulira se i u slojevima prašine (Kaarakainen i sur., 2009). Loša ventilacija zraka te nehomogena temperaturna površina mogu dovesti do kondenzacije vode te tako producirati mikroklimatske uvjete sa većom vlažnošću od ostatka okoliša i na taj način omogućiti razvoj plijesni i u nepovoljnim uvjetima (Sterflinger i Pinar, 2013). Tipične fungalne infekcije papira uzrokovane su kserofilnim vrstama (rastu u uvjetima niske aktivnosti vode  $a_w = 0.70-0.85$ ) roda *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Penicillium* i *Cladosporium* (Pinzari and Montanari, 2011). U slučaju poplava razvijaju se plijesni koje zahtijevaju visoku aktivnost

vode. One često dovode do nastanka obojenih mrlja (*Chaetomium* spp., *Monoascus* spp., i *Epicoccum* spp.), neugodnih mirisa (*Trichoderma* spp.) i mikotoksina (*Stachybotrys* spp.) (Sterflinger i Piñar, 2013). Upravo otpornost spora omogućuje plijesnima preživljavanje u nepovoljnim uvjetima s obzirom da ih je puno teže inaktivirati nego hife, vegetativni oblik plijesni. Spore u mirovanju imaju niski sadržaj vode i njihov je metabolizam inaktiviran, ali u povoljnim uvjetima može doći do aktivacije spora (Florian, 1993). Zbog toga bi konzervacijski tretmani trebali biti usmjerni na spore s obzirom da je vegetativne hife relativno lako kontrolirati fizičkim uklanjanjem te održavanjem prikladnih klimatskih uvjeta, temperature, relativne vlažnosti i aktiviteta vode (Nitterus, 2000).

Saniranje rasta plijesni u objektima gdje je pohranjena kulturna baština trebalo bi uključivati sljedeće aspekte: uklanjanje kontaminiranih objekata, čišćenje zračnog prostora, kontrola klimatskih uvjeta (temperature i vlažnosti) te konzervacijske mjere i restauracijski tretmani fungalnih infekcija. U obzir treba uzeti i zdravlje čovjeka. Boravak u prostorijama s visokom koncentracijom aerogenih čestica plijesni predstavljaju opasnost za zdravlje jer kod imunokompromitiranih osoba plijesni mogu uzrokovati oportunističke infekcije, kod preosjetljivih osoba mogu izazvati primjerice alergije i astmu, a ukoliko su producenti mikotoksina mogu dovesti do mikotoksikoza. Također neki konzervacijski tretmani, osim učinka na sami objekat, mogu djelovati i nepovoljno za zdravlje čovjeka (Trandafir i sur., 2014).

Tretmani u restauraciji i konzervaciji mogu se podjeliti na mehaničke, kemijske i fizikalne, a mogu biti usmjereni na mikrobe (bakterije, arheje i gljive), lišajeve i insekte. Mehaničke metode uključuju fizičko odstranjivanje uzročnika degradacije i nisu dovoljno učinkovite. Kemijski tretmani uključuju tekuće biocide i fumigaciju plinovima. Izbor je limitiran regulativom Europske unije: The Biocidal Product Regulation (BPR, Regulation (EU) 528/2012), te dodatno kompatibilnošću agensa sa umjetninama. Najčešće korišteni biocidi u restauraciji su: formaldehid, kvaterne amonijeve soli, izotiazolinon te etanol (Sterflinger i Piñar, 2013). U većini slučajeva umjetnine su inficirane mješavinom mikroorganizama različite osjetljivosti na biocide, te primjena kemijskih biocida može dovesti do selektivne dezinfekcije ili još gore do produkcije još rezistentnijih mikroorganizama kao što je bio slučaj sa Lascaux špiljom s paleolitskim zidnim slikama te slučaj špilje sv. Pavla u Ephesusu u Turskoj. Fumigacija etilen oksidom je zabranjena u većini zemalja zbog svoje toksičnosti, iako vjerojatno predstavlja najučinkovitiji tretman za velike količine knjiga inficirane plijesnima (Sterflinger i Piñar, 2013). Fizikalne metode uključuju ultraljubičaste

zrake, gama zrake, liofilizaciju te sterilizaciju suhom i vlažnom toplinom (Tiano, 2016). Gama zračenje predstavlja efikasan tretmant protiv insekata, plijesni i njihovih spora, međutim ukoliko se neadekvatno primjeni može imati negativan efekt na materijale. U slučajevima pak jake ugroženosti mnogobrojnih predmeta u zbirnama gljivicama i plijesnima uzrokovane povećanom vlagom uslijed većih nepogoda (npr. poplave), radijacijska dezinfestacija se pokazala kao metoda najboljeg izbora (Katušim-Ražem i sur., 2013).

Jedan od glavnih problema pri tretiranju kontaminiranih umjetnina je nedostatak prikladnih metoda za praćenje kao i njihova standardizacija, posebice što se tiče kemijskih, mehaničkih i spektroskopskih svojstava materijala. Taksonomska analiza mikrobne zajednice često zahtjeva korištenje molekularnih metoda baziranih na DNA jer sve plijesni ne mogu, a još manje arheje i bakterije, biti kultivirane u laboratoriju (Michaelsen i sur., 2006). Testiranje mikrobiološke aktivnosti, prije i nakon tretiranja, se uglavnom provodi uzgojem kultura tj. metodom brojenja vijabilnih stanica iako su danas prisutne i druge metode kao analiza 18S rRNA. Međutim navedene metode cijenom i jednostavnošću nisu konkurentne.

Godinama je zanemarivana važnost živih organizama u deterioraciji materijala te je dominantna uloga pripisivana kemijskim i fizičkim procesima. Danas se pak smatra kako bakterije i gljive ne uzrokuju samo estetsku destrukciju kulturne baštine već naseljavaju i penetriraju u materijale što vodi do degradacije materije zahvaljujući kiseloj koroziji, enzimatskoj razgradnji te mehaničkom napadu (Sterflinger i Piñar, 2013). Godišnji novčani gubitci zbog napada plijesni na nehranidbene materijale procjenjuju se na 40 milijuna američkih dolara, međutim gubitak na razini kulturne i povijesne važnosti je neprocjenjiv (Allsopp, 2011). Dekontaminacija i prezervacija artefakata od prirodnih materijala kao papir, pergament, koža, tekstil i slično predstavlja konstantu borbu protiv opetovane kolonizacije sa bakterijama, gljivama i insektima.

Svakako nije nužno, a ni praktično uništiti 100% spora plijesni sa svih objekata. Čak i da je ovaj cilj postignut rezultat bi bio kratkotrajan jer nove spore konstantno dolaze u kontakt s objektima (Trandafir i sur., 2014).

## **1.2 Gama zračenje**

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). Neke atomske jezgre nisu stabilne



(radioizotopi imaju nestabilne jezgre), stoga tijekom određenog vremena dolazi do spontana raspada. Na raspad jezgre ne utječu vanjski čimbenici poput promjene tlaka, temperature, molekulske ili elektronske strukture, već pravilo po kojem se jezgra raspada dolazi kao svojstvo same jezgre. Nestabilne se jezgre raspadaju emitirajući neku malu sekundarnu česticu ili foton. Priroda spontanog raspada ovisi upravo o tome kakve je prirode ta čestica (Herak, 2001).

Razlikujemo tri tipa čestica tj. zračenja. Alfa zračenje je roj čestica koje se sastoje od dva protona i dva neutrona, tj. jezgre  $^4\text{He}$  (helij). Beta zračenje je svako zračenje koje se sastoji od elektrona ( $\beta^-$ ) ili pozitrona ( $\beta^+$ ). Treći tip raspada je emisija kvanta elektromagnetskog zračenja (fotona) odnosno gama čestica. Zračenje gama zrakama posljedica je prijelaza jezgre iz nekog pobuđenog stanja u osnovno stanje. Neovisno o tome kakve čestice jezgra emitira, vrijede iste zakonitosti radioaktivnog raspada. Ono se definira vremenom poluraspada tj. vremenom u kojem se koncentracija radioaktivne tvari smanji na polovicu svoje vrijednosti. Jedinica za brzinu raspada ili radioaktivnost se definira kaoj broj raspada po jedinici vremena i izražava se bekerelom (Bq) (Herak, 2001).

Od tri navedena tipa zračenja, gama zrake imaju najveću valnu duljinu, sukladno s tim najmanju frekvenciju i energiju. Upravo zbog toga gama zrake lako penetriraju kroz tkiva, pa tako i materijale, uz predaju relativno malo energije.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (metastabilni tehnecij) ima vrijeme poluraspada 6 sati te se iz navedenih se razloga koristi u zdravstvenoj dijagnostici, relativno brzo prelazi u osnovno stanje te emitira zrake energije 140 keV. Za razliku od njega  $^{60}\text{Co}$  (kobalt) ima vrijeme poluraspada 5,27 godina, a raspada se prvo beta raspadom do metastabilnog  $^{60}\text{Co}$ , koji onda emitira gama zračenje energije 1,17 i 1,33 MeV. Krajnji produkt je stabilni  $^{60}\text{Ni}$  (nikal) tako da ovim procesom ne dolazi do nastanka radioaktivnog produkta.  $^{60}\text{Co}$  dobiva se umjetnim putem bombardiranjem neradioaktivnog  $^{59}\text{Co}$  s neutronima u nuklearnom reaktoru. Izvor  $^{60}\text{Co}$  koristi se za liječenje tumora jer ima dovoljno veliku energiju da ciljano izazove oštećenja u biološki važnim molekulama i tako dovede do smrti stanice (Herak, 2001). Osim navedenog koristi se i u različitim primjenama u radijacijskoj tehnologiji kao npr. za sterilizaciju medicinskih predmeta, opreme i priboraza jednokratnu uporabu, farmaceutika, radijacijsku pasterizaciju hrane, dekontaminaciju kozmetike, dezinfekciju i dezinfestaciju kulturne baštine i slično.

Međudjelovanje gama zračenja i tvari događa se: fotoelektričnim efektom, Comptonovim efektom i tvorbom parova elektron-pozitron. Fotoelektrični efekt je pojava kada foton, čija je

energija veća od energije vezanja elektrona u atomu, predaje svu energiju elektronu, čime elektron napušta atom. Comptonov efekt je pojava pri kojoj foton predaje samo dio svoje energije elektronu, a preostali dio nosi tzv. sekundarni foton (Dželalija, 2006). Pritom nastaje Comptonov elektron, koji ima dovoljno kinetičke energije da može uzrokovati ekscitacije i ionizacije drugih atoma. Elektroni nastali ionizacijom uzrokovanom Comptonovim elektronom mogu dalje uzrokovati ionizacije, a sekundarni fotoni ima dovoljno energije ponovno uzrokovati Comptonov efekt, fotoelektrični efekt ili stvaranje parova elektrona i pozitrona (Diehl, 1990). Tvorba para elektron-pozitron je pojava koja nastaje samo ako je energija fotona jednaka ili veća od dvostrukog energijskog ekvivalenta elektrona. Prodre li takav foton do jezgre atoma, u njenoj blizini pretvori se u dvije čestice, elektron i pozitron. Višak energije odlazi na kinetičku energiju stvorenog para. Nakon vrlo kratkog vremena, nastali se pozitron spaja s nekim od elektrona iz okoline i pritom nestaju obje čestice i nastaju dva fotona suprotnih smjerova gibanja. Vjerojatnost pojavljivanja jedne od navedenih pojava ovisi o energiji upadnog fotona. Pri niskim energijama događa se uglavnom fotoelektrični efekt, pri višim energijama fotona prevladava Comptonov efekt, a pri energijama većim od oko 5 MeV prevladava tvorba parova (Dželalija, 2006).

Količina zračenja se izražava dozom. Postoje dvije važne kategorije doza. Prva je apsorbirana doza definirana kao energija zračenja apsorbirana po jedinici mase tijela (čovjeka ili drugih tijela). Jedinica apsorbirane doze je grey (Gy). Druga jedinica, biološka doza, ili ekvivalentna doza, izražava se sievertima (Sv). Ova doza uzima u obzir činjenicu da biološka oštećenja ne ovise samo o energiji zračenja, već i vrsti zračenja. Na primjer, čestica zračenja kao primjerice alfa čestica iste energije je razornija od elektrona. Ova se djelovanja opisuju tzv. faktorom kvalitete,  $Q$ , koji se uzima 1 za elektrone, X i gama zrake, a 20 za alfa čestice (Dželalija, 2006).

Gama zračenje može dovesti do direktne ionizacije biomolekula ili indirektno preko radiolize vode. Radioliza vode generira reaktivne kisikove specije (ROS): hidroksil radikal, ioniziranu vodu, kao i hidrogen radikal te hidratirane elektrone. Već 1 pikosekundu nakon zračenja nastaju sekundarni ROS vodikov peroksid i superoksid. Kemijske kaskade koje slijede stvaraju nove molekule koje oštećuju stanicu, jedne od bitnijih su reaktivne dušikove specije (RNS) (Reisz i sur., 2014). Gama zračenje inducira mutacije DNA te dovodi do jednolančanih i dvolančanih lomova DNA heliksa. Oštećenje proteinskih molekula ionizirajućim zračenjem uključuje deaminaciju, dekarboksilaciju (Diehl, 1990), redukciju disulfidnih veza, oksidaciju

sulfhidrilnih skupina, kidanje peptidnih veza i promjenu oksidacijskog stanja metalnog iona u metaloproteinima (Delincee, 1983).

Radijacijska oštećenja DNA mogu se popraviti na više načina:

- reakcijom radikala u blizini s DNA radikalom, to se događa unutar  $10^{-11}$  sekundi;
- kemijski poravak intracelularnim reducirajućim agensom, kao primjerice glutationom, unutar  $10^{-3}$  sekundi;
- enzimi koji popravljaju DNA unutar vremenskog raspona od 1 minute do nekoliko sati.

Ako kisik reagira sa DNA radikalom prije nego što se stigne popraviti, oštećenje postaje teže. (Hall, 2000). Stanična obrana od radikala nastalih zračenjem uključuje i enzime kao što su katalaze, glutation peroksidaza, te antioksidanse kao primjerice vitamin C, E, melatonin, lipoična kiselina i slično (Reisz, 2013).

Najotporniji na zračenje su virusi, bakterije, plijesni i tek onda insekti. Kvasci su otporni kao i radiotolerantni bakterijski sojevi (Liberty i sur. 2013). Spore (bakterija i gljiva) kao i ciste (protozoa i parazita) su dosta otpornije u odnosu na vegetativne stanice jer sadrže jako malo DNA i nalaze se u stabilnom odmarajućem stanju (Shea, 2000).

Ionizirajuće zračenje također može modificirati fizikalna i kemijska svojstva materijala. Promjene u strukturi, ovisne o dozi i uvjetima tretmana, mogu se dogoditi satima, danima ili mjesecima nakon zračenja materijala (Marušić i sur., 2015, Marušić i sur. 2016, Pucić i sur., 2014, Katušin-Ražem i sur. 2003).

### **1.3 Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine**

Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine datira još od 1960tih kad je Belyakova izvela prva testiranja radiotpornosti plijesni signifikantnih za ove materijale.

Radiosenzitivnost gljivica ovisi o karakteristikama vrste, formi (micelij ili spore), količini vode u sporama, ali i materijalu, starosti spora, karakteristikama materijala i kombiniranju radijacije s drugim tehnikama. Gljivice sa melaniziranim micelijem i sporama su radiorezistentnije od ostalih. Visoka količina vlage u materijalu može promovirati oporavak gljivica ukoliko inaktivacija nije kompletna (Calado i sur., 2014). Gama zračenje zahvaljujući ionizaciji i dubokoj penetraciji vodi do simultane i nediskriminirajuće devitalizacije svih živih organizama, međutim može imati neželjene posljedice na materijal. 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 (Katušim-Ražem i sur., 2013; Brower i Tilton, 1985). Kao što je navedeno doza zračenja ovisi o više parametara te tako u znanstvenim studijama nalazimo na različite podatke. Da Silva i sur. (2006) navode kako je 16 kGy bila minimalna doza za inaktivaciju različitih vrsta na kontaminiranim knjigama iz knjižnice u Brazilu uključujući i one rezistente kao *Cladosporium* spp. koji producira i akumulira tamne pigmente (melanin) u svom miceliju, te ga oni štite od ekstremnih uvjeta u okolišu.

Gama zračenje može negativno utjecati na svojstva ozračenog materijala pa tako i papira. Svojstva papira mogu se podijeliti na mehanička svojstva (otpornost prema kidanju, otpornost prema istezanju papira, otpornost prema savijanju, te promjena dimenzija usljed djelovanja vlage i temperature tj. krutost papira), zatim optička svojstva papira (bjelina, svjetlina, opacitet, boja) i kemijska svojstva (pH, broj karbonilnih i karboksilnih skupina). Prilikom ozračivanja predmeta sastavljenih od osjetljivih prirodnih polimera, dozu treba podesiti tako da i najmanja doza, učinkovita protiv čimbenika biorazgradnje, istovremeno bude manja od doze koja bi izazvala degradaciju materijala. U praksi upotrijebljene dezinfekcijske doze za nužne slučajeve spašavanja do 10 kGy, ne izazivaju značajnije kemijske promjene u ozračenim papirnim materijalima (Katušim-Ražem i sur., 2013). Dio znanstvenika kontradiktornog je mišljenja da već doza od 5 kGy uzrokuje statistički značajne razlike u gotovo svim svojstvima papira (Adamo et al., 2001; Magaouda, 2004). Gonzalez i sur. (2002) pokazali su kako doza od 14,4 kGy nema negativan utjecaj na mehanička i optička svojstva papira međutim pri manjoj brzini zračenja dovodi do depolimerizacije celuloznih vlakana vjerojatno zbog toga što je radijacijsko vrijeme bilo dovoljno dugo da se dogodi oksidativna degradacija. Što je duži radijacijski period zbog manje brzine zračenja veća je mogućnost da će kisik reagirati i dovesti do kemijske modifikacije celuloze i tako dovesti do veće indirektno štete (Magaouda, 2004).

#### **1.4 Usporedba tri konzervacijska tretmana**

Michaelsen i sur. (2013) su u svojoj studiji pratili tri različite metode konzervacije, liofilizacija, fumigacija etilen oksidom i gama zračenje, kako bi procijenili kratkoročnu (nakon mjesec dana) i dugoročnu (nakon godinu dana) efektivnost inhibicije rasta plijesni na dva tipa papira. Koristili su 3 vrste plijesni koje posjeduju sposobnost hidrolize celuloze: *Chaetomium globosum*, *Trichoderma viride* i *Cladosporium cladosporioides*. Učinkovitost je procijenjena

na temelju vijabilnost i aktivnost fungalnih spora i micelija pomoću kultivacijskih i molekularnih metoda. Jedan od ciljeva studije bio je usporedit molekularne metode naspram kultivacijskih kao modele monitoringa konzervacijskih tretmana te evaluirati utjecaj tretmana na DNA integritet i koristiti rRNA analizu kao metodu determiniranja dugoročne vijabilnosti plijesni.

1. Liofilizacija uključuje direktni prelazak vode iz čvrstog u plinovito stanje bez popratnih evaporacijskih efekata vode te ne dolazi do narušavanja dimenzionalne stabilnosti. Dehidratacija kao posljedica liofilizacije može ubiti hidrirane konidije, spriječiti germinaciju konidija te zaustaviti rast micelija kao i bakterijskih stanica. Međutim ako vlažnost ostane visoka može doći do aktivacije odmarajućih suhih konidija. Ova metoda također dovodi do povećanja poroznosti i higroskopnosti organskog materijala. Iako se u suštini ne može smatrati dezinfekcijskim tretmanom, liofilizacija i dalje ostaje najefektivnija metoda kad je u pitanju fizikalna, kemijska i biološka stabilizacija vodom oštećenog materijala, posebice ukoliko se radi o većim količinama koje moraju biti sanirane u kratko vrijeme (Florian, 1993). Kako spore i hife u aktivnim fungalnim kolonijama sadrže znatnu količinu vode, većina njih trebala bi biti uništena na temperaturama ispod 0°C (Nitterus, 2000).

2. Etilen oksid se još od 1933. god. koristio za sterilizaciju objekata kulturne baštine. Etilen oksid ne zahtjeva energiju za aktivaciju, koristi se na sobnoj temperaturi i pokazuje visoku reaktivnost te dobro difundira u materijal što je potrebno za uništavanje mikroorganizama (Mendes i sur., 2007). Alkiliranjem DNA, RNA i proteina etilen oksid zaustavlja normalan rast i mogućnost razmnožavanja (Rutala and Weber, 1999). Upravo zbog svojstava alkilirajućeg agensa pripisuje mu se karcinogeni potencijal, što je i dokazano. (Bolt, 1996). Zbog toga je upotreba etilenoksida u svrhu konzervacije papira u većini zemalja zabranjena, uz to stoji i činjenica da je skup (Tradafir i sur., 2014). Valentin i sur. (1986) su u svojoj studiji pokazali kako je papir tretiran etilen oksidom podložniji fungalnom napadu nakon tretmana. Ovaj fenomen nije potpuno objašnjen, tvrdi se da etilen glikol, koji nastajekao koprodukt u fumigaciji, aktivira spore koje kontaminiraju objekt u budućnosti (Florian, 1993). Plinoviti etilen oksid se radiomimetik, što znači da slični ionizirajućem zračenju po svojoj sposobnosti da inducira iste krajnje biološke učinke, kao genetske mutacije, prvenstveno alkiliranjem i reagiranjem sa nukleofilnim centrima kao dušičnim i kisikovim atomima u DNA bazama (Bolt, 1996). Dolazi do dvostrukih lančanih lomova koji vode do fragmentacije DNA heliksa. Rakotonirainy i sur. (2003) su također u svojoj studiji o viabilnosti fungalnih spora na papiru

nakon tretmana etilen oksidom pokazali kako inhibira aktivnost spora te one postaju nekultivabilne i nevijabilne.

3. Gama zračenje kao sterilizirajući tretman ionizacijom uzrokuje direktno oštećuje DNA u stanicama inducirajući tako mutacije i ubijajući stanicu. Također ima indirektni učinak kao rezultat radiolize vode u stanici što vodi do tvorbereaktivnih kisikovih radikala (ROS), slobodnih radikala i peroksida uzrokujući jednolančane i dvolančane lomove (McNamara et al., 2003). U studiji je korištena doza gama zračenja od oko 5 kGy.

Rezultati dobiveni različitim strategijama bili su kontradiktorni. Kultivacijske tehnike pokazale su potpunu efikasnost gama zračenja i etilenoksida nakon mjesec, za razliku od liofilizacije, koja je uništila vrste *Trichoderma viride* i *Cladosporium cladosporioides*, a vrsta *Chaetomium globosum* je preživjela što autori objašnjavaju većom rezistentnošću askospora u odnosu na konidije druga dvije vrste. Međutim zanimljivo je kako nakon godinu dana nema podataka o rezultatima kultivacije tretiranih uzoraka već samo kontrola, a one pokazuju kako plijesni *Cladosporium cladosporioides* i *Trichoderma viride* više nisu kultivabilni, za razliku od *Chaetomium globosum* koja nije pokazala statističku razliku u odnosu na koncentraciju spora nakon mjesec dana. Mjesec dana nakon zračenja DGGE profil (denaturirajuća gradijent gel elektroforeza amplificirane DNA) je pokazao mnogo nespecifičnih linija, što govori u prilog fragmentaciji DNA gama zračenjem, međutim nakon godinu dana više nije bilo razlike između kontrola i gama zračenja, detektirana je specifična intaktna DNA za sve populacije. Rezultate treba tumačiti uzevši u obzir da je intaktna DNA detektirana (kao i RNA) i na kontrolama za sojeve koji više nisu bili kultivabilni. Egzistencija same ribosomalne DNA ne govori nužno u prilog vijabilnost jer rRNA geni mogu biti prisutni u okolišnoj DNA metabolički neaktivnih vrsta (Ostle i sur., 2003). RNA analiza nakon godinu dana pokazala je minimalan učinak gama zračenja i liofilizacije na vijabilnost spora u uzorcima sa jednom vrstom, međutim na papiru D inokuliranom mješavinom spora i podvrgnutom gama zračenju i liofilizaciji nije bilo RNA signala ili je bio jako slab. Samo je etilen oksid dao negativne rezultate DNA i RNA analize kratkoročno i dugoročno. Također je za naglasiti kako je na papiru D uočen slabiji rast plijesni, s još većim razlikama u rastu nakon godinu dana. Paper A je bio Whatman tip sastavljen od čiste celuloze, a papir D Mezzofino tip s visokim udjelom lignina. Superiornost etilen dioksida nad gama zračenjem objasnio je Chovanec i sur. (2001) kao kombinaciju razlika u prirodi oštećenja i distribucije po meti zahvaljujući sposobnosti etilenoksida da lakše difundira u jezgre stanice uzrokujući tako štetu na većoj razini.

Autori su zaključili da se gama zračenje može koristiti za tretiranje velikih količina papira simultano i bez kemijske opasnosti, ali se može smatrati samo dekontaminacijskim tretmanom, metodom uništavanja biodeterogenih organizama na kontrolabilnu razinu. Upravo je to posebno važno, da se biodeterioracijske plijesni reduciraju i održavaju na razini ispod opasnog praga i to se može postići gama zračenjem. Međutim liofilizacija predstavlja samo kratkotrajno zaustavljanje rasta plijesni prije nego papir podliježe daljnjem tretmanu. Samo etilen oksid vodi do sterilizacije, ali to ne znači da nakon tretmana neće doći do kontaminacije s obzirom da on ne zaostaje na materijalu te nema preventivni učinak (Michaelsen i sur., 2013).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Biodegradacija umjetnina predstavlja nezaustavljiv proces. Zajednica danas postaje sve svjesnija važnosti konzervacije kulturne baštine i njezinog očuvanja za mlade naraštaje. Plijesni imaju veliki utjecaj na biodegradaciju kulturne baštine upravo zbog njihove sposobnosti da se prilagode na različite uvjete. Rezistentnost spora omogućuje je plijesnima preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Spore plijesni prirodno se nalaze u zraku pa tako i u zatvorenim prostorima, također velik broj spora akumulira se u slojevima prašine. Nove spore konstantno dolaze u kontakt s objektima. Plijesni, posebice ako se radi o prirodnim materijalima, predstavljaju opasnost ako se ti objekti nađu u uvjetima visoke vlažnosti ili u izravnom kontaktu s vodom. Tada koncentracija vijabilnih plijesni na materijalu višestruko poraste što dovodi do njegovog propadanja.

Nažalost učinkovita metoda uklanjanja mikroorganizama koji sudjeluju u razgradnji, bez utjecaja na svojstva samog materijala, ne postoji, te je bitno pronaći optimalni tretman koji će smanjiti količinu mikroorganizama do prihvatljive razine, a istovremeno imati minimalne neželjene učinke na materijale. Gama zračenje se pokazalo kao jedna od najučinkovitijih najprihvatljivijih metoda dosada. Papir i platno predstavljaju najčešće podloge u slikarstvu. Kako bismo našli optimalnu dozu gama zračenja za materijale papir i platno, te što bolje razumjeli procese koji se odvijaju i koji mogu dovesti do neželjenih posljedica potrebno je ispitati utjecaj doza zračenja kao i brzine doza.

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- 1.) analizirati sastav prirodne mikrobiote koja se nalazi na papiru i lanenom platnu impregniranom tutkalom;
- 2.) ispitati utjecaj doze gama zračenja od 20 kGy, u dvije brzine doze, 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s, na inhibiciju rasta plijesni prirodne mikrobiote kao i namjerno inokuliranih uzoraka papira i platna u četiri vremenske točke, neposredno nakon zračenja, te 7., 14. i 28. dan nakon zračenja. Papir i platno inokulirani su sa sporama 3 različite vrste plijesni, koje se inače nalaze u zraku zatvorenih prostora i posjeduju celulolitičku aktivnost, od čega je jedna primarni (*Aspergillus jensenii*), sekundarni (*Cladosporium sphaerospermum*) i tercijarni kolonizator (*Trichoderma harzianum*).



### 3 MATERIJALI I METODE

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

Iz Hrvatskog restauratorskog zavoda dostavljeni su uzorci papira i platna koje je prethodno impregnirano tukalom (organsko lijepilo koje se dobiva iz životinjske kože). Papir i platno izrezani su na kvadrate dimenzija 3,5 x 3,5 cm, te izvagani. Prosječna masa platna iznosila je 0,39 g, a papira 0,15 g. Korišteni papir je Verge beskiselinški trajni papir dimenzija 70 x 100 cm, gramature 100g/m<sup>2</sup>. Korišteno platno je laneno platno obrađeno tutkalom (zagrijana otopina kolagena prethodno izubrenog u destiliranoj vodi). Priređeni kvadratići papira i platna stave se u sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu (tzv. falkonicu) pomoću prethodno sterilizirane pincete uz plamenik. Zatim se u falkonice otpipetira 3 mL peptonske vode za papir i 4 mL za platno te homogenizira vorteksiranjem.

Tako je dobiveno razrjeđenje 10<sup>-1</sup>. Ostala razrjeđenja od 10<sup>-2</sup> do 10<sup>-4</sup> su pripravljena miješanjem 100 µL prethodnog sa 900 µL peptonske vode. Iz svakog priređenog razrjeđenja 100 µL suspenzije ravnomjerno je nanešeno sterilnim staklenim štapićem (tzv. L-štapić) na površinu sterilne hranjive podloge Petrijevoj zdjelici. Kao hranjiva podloga korišten je MALT ekstrakt agar proizvođača Sigma-Aldrich, pripremljen suspendiranjem 50g praha u 1 L destilirane vode, zatim kuhanjem do otapanja. Podloga se autoklavira 15 min na 121°C. MEA (MALT ekstrakt agar) se preporuča za detekciju, izolaciju i brojanje kvasaca i plijesni. Uzorci se inkubiraju 5 do 7 dana na 25 °C. Na opisani način obrađena su po četiri kvadratića papira i platna. Nakon perioda inkubacije na pločama se izbroje porasle kolonije plijesni pri čemu se za brojenje uzimaju ona razrjeđenja koja sadrže manje od 150 kolonija.

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

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

ΣC- zbroj kolonija plijesni izbrojenih na svim pločama

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

n1- broj ploča zadržanih za brojanje kod prvog razrjeđenja

n2- broj ploča zadržanih za brojanje kod drugog razrjeđenja

d- razrjeđenje iz kojeg su dobiveni prvi brojevi

### 3.2 Inokulacija papira i platna odabranim vrstama plijesni

Primarni (*Aspergillus jensenii*), sekundarni (*Cladosporium sphaerospermum*) i tercijarni (*Trichoderma harzianum*) kolonizatori inokulirani su 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, sa UV svjetlom i uz plamenik. 20 µL suspenzije je stavljeno na Bürker-Türk hemocitometar, i prekriveno pokrovnim stakalcem. Pod povećanjem od 100x izbrojane su spore prema uputama za brojanje u Bürker-Türk komorici, te je izračunata koncentracija spora po mL peptonske vode.

Odabrane vrste plijesni razrijeđene su na koncentraciju od približno  $5 \times 10^4$ /mL, odnosno inokulirane su na kvadratiće papira i platna u koncentraciji približno  $1-2 \times 10^4$ /g. Osim inokulacije svake plijesni zasebno, pripremila se i mješavina sva tri kolonizatora u omjeru 1:1:1. Kako bi se održala prikladna vlažnost u petrijevkama pripremljeni su i sterilizirani komadići vate. Papiri i platna prenešeni su u petrijevke u duplikatu te tretirani suspenzijom spora. Uz rub petrijevke, pazeći da ne dodiruje materijal, stavljen je komadić sterilizirane vate namočen sa nekoliko mL sterilne vode. Uzorci se inkubiraju 7 dana na 25 °C pri čemu se pomoću higrometra kontrolira relativna vlažnost zraka od 75%.

Uzorci papira i platna priređeni na opisani način podjeljeni su u sljedeće skupine:

- Uzorci koji se metodom razrijeđenja analiziraju odmah nakon 7 dana inkubacije na 25°C,
- Uzorci koji se analiziraju 0. dan, 7. dan, 14. dan i 28. dan nakon gama zračenja.

### 3.3 Zračenje uzoraka

Ozračivanje uzoraka je izvršeno u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) Instituta Ruđer Bošković koristeći panoramski uređaj s izvorom gama zračenja kobalta-60. Pripremljeni uzorci ozračeni su dozom od 20 kGy kod brzine doze od 0,1 Gy/s, odnosno 9,8 Gy/s. Za dozimetrijsko mjerenje koristio se kemijski dozimetar na bazi etanol-klorobenzena (Ražem i sur., 1984). Temperature 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. ECB (etanol klorbenzen) dozimetar koristi se kao sekundarni i rutinski kemijski 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.Nakon zračenja,uzorci su inkubirani na 25 °C te metodom razrijeđenja analizirani 0, 7, 14, i 28 dan nakon zračenja. Sva su mjerenja napravljena u duplikatu, a rezultati vijabilnosti plijesni prije i nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g, kako je opisano u poglavlju 3.1..

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati mikološke analize prirodne mikrobiote nativnih uzoraka platna i papira prikazani su u Tablici 1. Prema identificiranim vrstama vidljivo je da su platno i papir prirodno opterećeni sporama iz zraka što je bilo i za očekivati s obzirom da je najveći broj plijesni na kulturnoj baštini dolazi upravo iz zraka (Sterflinger i Pinar, 2013). Vrste rodova *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. i *Alternaria* spp., koji su uobičajeni u područjima s umjerenom klimom, dominiraju među aerogenim plijesnima u Hrvatskoj. Također mogu se naći i vrste roda *Aspergillus* (Despot i Šegvić-Klarić, 2014). Na platnu su sve vrste bile zastupljene u koncentracijama oko  $10^3$  CFU/g, dok je na papiru taj raspon bio širi, od  $10^3$  CFU/g do  $10^5$  CFU/g. Na papiru su prevladavale vrste *Alternaria*, za razliku od platna gdje su sve vrste bile jednako zasupljene. U Tablici 2 nalazi se prikaz vrsta plijesni identificiranih na uzorcima platna i papira nakon 7 dana inkubacije na  $25^\circ\text{C}$  i 75% Rv sa pripadajućim koncentracijama. Na uzorcima platna utvrđen je porast koncentracije za 4 reda veličine u slučaju *Aspergillus* spp. I *Penicillium* spp. te porast od 2 reda veličine za *Cladosporium* spp. Na papiru nije utvrđen značajan porast koncentracija u odnosu na rezultat dobiven prije inkubacije. Vrste *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. nisu izolirane iz inkubiranih uzoraka platna, dok iz uzorka papira nisu izolirane *Aspergillus* spp. i *Fusarium* spp, a izoliran je *Penicillium* spp. kojeg prethodno nije bilo. Na oba uzorka došlo je do rasta kvasaca i to u koncentracijama od  $10^4$  CFU/g na papiru i  $10^6$  CFU/g na platnu. Za zaključiti je da je period inkubacije u vlažnim uvjetima bio značajan za kvasce.

Ovi rezultati ukazuju i na raznolikost vrsta i koncentracija plijesni na uzorcima koji potječu od istog materijala tretiranog na isti način, uzrok su tzv. točkaste kontaminacije koja vode do razvoja nejednolikih mikrobioloških populacija. Iz rezultata je također vidljivo kako je platno bolja podloga za rast mikoorganizama zbog veće dostupnosti različitih supstrata vjerojatno zbog tutkala animalnog podrijetla kojim je impregnirano. Navedeno je uočeno i kod rasta inokuliranih plijesni *A. jensenii* i *T. harzianum* čija se koncentracija povećala za 10 puta na papiru, a na platnu 100 puta. S druge strane, vrsta *Cladosporium sphaerospermum* nije izolirana s papira nakon inkubacije. Moguće je da su neki od pripadnika prirodne mikrobiote inhibirali rast *C. sphaerospermum*. Također rod *Cladosporium* ostvario je najmanji porast koncentracije na platnu nakon inkubacije od 7 dana, čak za 100 puta manji nego *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp.

Tablica 1. Sastav prirodne mikrobiote nativnih uzorak platna i papira.

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)	
	PLATNO	PAPIR
<i>Alternaria</i> spp.	1818,18	100000
<i>Aspergillus</i> spp.	1000	2000
<i>Cladosporium</i> spp.	1409,09	2727,27
<i>Fusarium</i> spp.	1545,45	3022,73
<i>Penicillium</i> spp.	1818,18	-
<i>Rhizopus</i> spp.	-	1000
Ostale plijesni	1909,09	39318,18

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

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)	
	PLATNO	PAPIR
<i>Alternaria</i> spp.	-	6000
<i>Aspergillus</i> spp.	94193636	-
<i>Cladosporium</i> spp.	484000	6000
<i>Fusarium</i> spp.	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	40268181,82	50500
Kvasci	87000000	500500

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

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)	
	PLATNO	PAPIR
<i>Aspergillus jensenii</i>	7 500 000	440 909,1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	81 818,2	4545,5
<i>Trichoderma harzianum</i>	4 077 272,8	90 909,1

U Tablicama 4 i 5 prikazano je preživljenje prirodne mikrobiote na platnu i papiru nakon doze gama zračenja od 20 kGy, u dvije brzine, 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s. 0. i 7. dan nije bilo porasta prirodne mikrobiote. Tek 14. dan dolazi do porasta prirodne mikrobiote i to samo u uzorcima

ozračenim manjom brzinom doze. Na platnu su se prvi oporavili kvasci i *Penicillium* spp., a na papiru *Cladosporium* spp., svi u koncentraciji oko  $10^3$  CFU/g. 28. dan dolazi do porasta prirodne mikrobiote u uzorcima ozračenim s obje brzine doze. *Cladosporium* spp. je identificiran samo na uzorcima ozračenim manjom brzinom doze i to u koncentraciji oko  $10^4$  CFU/g na platnu i  $10^3$  CFU/g na papiru. *Alternaria* spp. je također izolirana samo iz uzoraka ozračenih manjom brzinom doze, na platnu je ostvarila porast u približno istoj koncentraciji kao *Cladosporium* spp., dok je na papiru porasla, ali u 100 puta nižoj koncentraciji. Iz navedenih rezultata opet je vidljivo kako je platno impregnirano tutkalom bolja podloga za rast mikroorganizama kao što je prikazao u Tablici 2. Porast kvasaca na papiru 28. dan utvrđen je na uzorcima zračenim s obje brzine doze, nešto veći porast zabilježen je pri manjoj brzini doze, njihova koncentracija bila je oko  $10^2$  CFU/g. Kao i na papiru, koncentracija kvasaca na platnu bila je oko  $10^2$  CFU/g s iznimkom da na platnu nije identificiran porast kvasaca pri manjoj brzini doze. Uzrok tomu je vjerojatno točkasta kontaminacija s obzirom da su kvasci nađeni na uzorku platna 14. dan, zračenim manjom brzinom doze. Osim navedenih vrsta na platnu su 28. dan porasle vrste *Aspergillus flavus* i *Fusarium* spp., a na papiru *Fusarium* spp. i *Penicillium* spp., i to samo na uzorcima ozračenim većom brzinom doze, u približnoj koncentraciji  $10^2$  CFU/g. Uzevši u obzir proteklo vrijeme nakon kojeg je došlo do oporavka određenih vrsta, i njihove koncentracije, možemo zaključiti kako je bolji antifungalni učinak dobiven zračenjem s većom brzinom doze. Pri zračenju s većom brzinom doze uzorak apsorbira jednaku energiju zračenja, ali u kraćem vremenu pa mikroorganizmi na uzorku imaju manje vremena za popravakoštećenja nastalih u stanici zbog zračenja.

Tablica 4. Porast prirodne mikrobiote na **platnu** nakon gama zračenja dozom 20 kGy i kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s.

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g $\pm$ SD)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Alternaria</i> spp.	-	-	-	-	-	-	10000	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	150
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	15000 *	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	625
<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-	1000	-	-	-

Kvasci	-	-	-	-	1000	-	-	150
Ostale plijesni	-	-	-	-	-	-	-	100
Ukupno	-	-	-	-	1000	-	13333,33	425

\* Na pločama je naraslo >150 kolonija

Tablica 5. Porast prirodne mikrobiote na **papiru** nakon gama zračenja dozom 20 kGy i kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s.

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g ± SD)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Alternaria</i> spp.	-	-	-	-	-	-	500	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	-	-	1500	-	1800	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	400
<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	100
Kvasci	-	-	-	-	-	-	600	100
Ostale plijesni	-	-	-	-	-	250	-	-
Ukupno	-	-	-	-	1500	250	1040	250

U Tablicama 6 i 7 prikazano je preživljenje inokuliranih plijesni na platnu i papiru nakon doze gama zračenja od 20 kGy, u dvije brzine, 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s. Rezultati mikrobiološke analize metodom razrjeđenja pokazala su kako plijesni *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum* nisu porasle nakon zračenja, neovisno o brzini doze i proteklom vremenu. Za razliku od njih vrsta *C. spaherospermum* uspijeva preživjeti i oporaviti se, no samo pri zračenju manjom brzinom doze. Porast kladosporija zabilježen je 14. dan na uzorcima platna i to u koncentraciji oko  $10^3$  CFU/g, te 28. dan u koncentraciji oko  $10^4$  CFU/g. Na uzorcima papira do porasta je došlo 28. dan u koncentraciji oko  $10^3$  CFU/g što opet implicira da je platno impregnirano tutkalom bolja podloga za rast mikroorganizama. Vrsta *C. Spaherospermum* preživjelaje i u mješanim kulturama na papiru i platnu, no u nižim koncentracijama, kao što je i očekivano s obzirom da je manji broj spora inokuliran na te uzorke.

Tablica 6. Porast inokuliranih plijesni na **platnu** nakon gama zračenja dozom 20 kGy i kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s.

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g ± SD)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Aspergillus jensenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	-	-	-	6100 (10550)	-	15000*	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Miješana kultura	-	-	-	-	4500 ** (2250)	-	2050 **	-

\* Na pločama je naraslo >150 kolonija

\*\* *C. sphaerospermum*

(10550)-ako se u račun uzme jedna ploča iz duplikata na kojoj je preživjelo >150 kolonija

(2250)-ako se u račun uzme jedna ploču iz duplikata na kojoj je 0, pa je n=2

Tablica 7. Porast inokuliranih plijesni na **papiru** nakon gama zračenja dozom 20 kGy i kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s.

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g ± SD)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Aspergillus jensenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	-	-	-	-	-	2000	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Miješana kultura	-	-	-	-	-	-	100**	-

\*\* *C. Sphaerospermum*



Mogući uzrok preživljavanju vrste *Cladosporium sphaerospermum* pri manjoj brzini doze zračenja je povećana produkcija pigmenta melanina. Pri manjoj brzini doze zračenja plijesan je imala više vremena da se prilagodi novim uvjetima te smanji oštećenja inducirana gama zračenjem. Doza gama zračenja manja od letalne doze od 22,5 kGy povećala je proteolitičku aktivnost *Aspergillus* vrsta, *Alternaria* te *Penicillium*, izoliranih s mumije u Egipatskom muzeju, čak za 60% (Mahrous, 1988). Sakr i sur. (2013) ispitali utjecaj gama zračenja (5, 10, 15, 20, 25kGy) na vrste *Streptomyces* izolirane tempera slika u Egipatskim katakombama zaraženim vrstama *Streptomyces*. Također su dio uzorka tretirali i s inhibitorom sinteze melanina triciklazol (po IUPAC-u 8-metil-[1,2,4]-triazolo[3,4-b][1,3]benzotiazol) kako bi ispitali mogući sinergijski učinak. Moguće je da gama zračenje inducira proizvodnju pigmenta melanina kao obrambeni mehanizam te tako inače uzrokuje dodatan *engl.*, „foxing“ ozračenih kulturnih artefakata. Na vrstama *Streptomyces* izloženim nižoj dozi od letalne manifestirale su se morfološke promjene na sporama, a na miceliju jasno je izražena promjena boje u odnosu na kontrolu što upućuje na povećanu produkciju protektivnog pigmenta melanina zbog gama zračenja (Sakr i sur., 2013). Prije zračenja dio uzorka sa *Streptomyces* vrstama tretirali su triciklazolom, koji inače samo inhibira sintetski put melanina bez toksičnog utjecaja na *Streptomyces*. Pokazali su kako alkoholna otopina triciklazola u različitim koncentracijama (5, 7, 10 $\mu$ g/mL) inhibira produkciju melanina i smanjuje rezistentnost *Streptomyces* na gama zračenje. Isto je pokazano za crne gljive koje koloniziraju kamen (Diakumaku i sur., 1995). S vremenom se efikasnost triciklazola reducirala vjerojatno zahvaljujući detoksifikacijskom mehanizmu koji se stigao razviti u starijim *Streptomyces* kulturama. Iako je *Streptomyces* bakterija, a ne plijesan, moguće je da se gore navedeno može primijeniti i za *Cladosporium sphaerospermum*. Svakako bi bilo zanimljivo ispitati utjecaj nekog od inhibitora sinteze melanina na smanjenje radiorezistentnosti u vrste *Cladosporium sphaerospermum*. Također Dadachova i sur.(2007) pokazali su kako izloženost gama zračenju inducira rast melaniziranih gljiva *Cryptococcus neoformans*, *Wangiella dermatitidis* i *Cladosporium sphaerospermum*, međutim one su bile su izložene puno manjoj dozi zračenja od one koja se inače primjenjuje za dekontaminaciju umjetnina.

## 5 ZAKLJUČAK

- Energija gama zračenja s dozom od 20 kGy dovoljna je za dekontaminaciju vrsti *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja.
- Doza od 20 kGy primjenjena većom brzinom doze dovoljna je da se zaustavi rast vrste *Cladosporium sphaerospermum*.
- Najotpornijim na gama zračenje pokazali su se kvasci, *Cladosporium* spp. i *Penicillium* spp. koji su se oporavili 14. dan nakon zračenja dozom od 20 kGy manje brzine doze zračenja.
- Zbog fenomena točkaste kontaminacije ne može se izvesti zaključak o fungicidnoj učinkovitosti doze od 20 kGy, kao i utjecaja brzina doze zračenja (0,1 i 9,8 Gy/s) na pripadnike prirodne mikrobiote platna i papira iako većina rezultata upućuje na bolju učinkovitost veće brzine doze za redukciju ili eliminaciju plijesni.
- Platno impregnirano tutkalom bolja je podloga za rast mikroorganizama od papira.
- U nastavku istraživanja trebalo bi napraviti što opširniji pregled pojavljivanja prirodne mikrobiote na platnu i papiru, prije i nakon inkubacije (25°C i 75% Rv) kako bi se što bolje mogli protumačiti učinci doza i brzina doza zračenja na preživljenje pojedinih vrsta plijesni.
- Rezultati prikazani u ovom diplomskom radu pokazuju da je za djelotvornu primjenu ionizirajućeg zračenja u konzervaciji i zaštiti objekata i predmeta kulturne i umjetničke baštine nužan interdisciplinarni pristup uz provođenje odgovarajućih znanstvenih istraživanja.

## 6 LITERATURA

Adamo M, Brizzi M, Magaudda 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.

Allsopp D, Seal KJ, Gaylarde CC. Introduction to Biodeterioration. Cambridge, 2004, Cambridgeuniversity press, str. 1-10.

Belyakova LA. Gamma radiation as a means of disinfection of books against spores of mould fungi. *Mikrobiologiya*,1960,29, 762-765.

Bolt HM. Quantification of endogenous carcinogens. The ethylene oxide paradox. *Biochemical Pharmacology*, 1996, 52, 1-5.

Brower JH, Tilton EW. The potential of irradiation as a quarantine treatment for insects infesting stored-food commodities. Urednici: Moy JH. Radiation Disinfestation of Food and Agricultural Products. Honolulu, Hawaii,1985. University of Hawaii at Manoa. str.75-86.

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

Chovanec M, Cedervall B, Kolma A. DNA damage induced by gammaradiation in combination with ethylene oxide or propylene oxide in humanfibroblasts. *Chemico-Biological Interactions* , 2001,137, 259-268.

Da Silva M, Moraesb AML, Nishikawa MM, Gatti MJA, Vallim de Alencard MA, Brandao LE, Nobrega A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation.*Int Biodeter Biodegr*, 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.

Diakumaku E, Gourbushina A, Krumbein W, Panina L, Soukharjevski S. Black fungi in marble and limestones- an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monument. *The Science of the Total Environment*, 1995, 167, 295-304.

Dželalija M. Ionizirajuće zračenje u biosferi (interna skripta). Split, 2006, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, str. 6-7; 32-35.

Delincée H. Recent Advances in Food Irradiation. Urednici Elias PS, Cohen AJ. 1983; Elsevier Biomedical.

Diehl JF. Safety of Irradiated Foods, Marcel Dekker, 1995, New York, 173. -176.

Florian, ML. Conidial fungi (mould) activity on artifact materials - a newlook at prevention, control and eradication. ICOM. Committee for Conservation 19th Triennial Meeting. Washington, 1993, str. 868-874.

Florian, ML. Aseptic technique: a goal to strive for in collection recovery of moldy archival materials and artifacts. *Jr Amer Inst Cons*, 2000, 39, 107-115.

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

Hall, E. Radiobiology for Radiobiologist, 5th Edition. Philadelphia PA, SAD, 2000, Lippincott Williams and Walkins,

Herak J. Osnove kemijske fizike. Zagreb, 2001, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 74-80.

Hueck HJ. The biodeterioration of materials as part of hylobiology. *Mater Org*, 1965, 1(1), 5-34.

Jakobović Z. Ionizirajuće zračenje i čovjek. Zagreb, 1991, Školska knjiga, str. 33-57.

Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65(2), 209-18.

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.

Katuščin-Ražem B, Mihaljević, B. Microbial decontamination of cosmetic raw materials and personal care products by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 2003, 66(4), 309-316.

Katuščin-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. 77-83.

Kraková L, Chovanová K, Selim SA, Šimonovičová A, Puškarová A, Maková A, Pangallo D. A multiphasic approach for investigation of the microbial diversity and its biodegradative abilities in historical paper and parchment documents. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2012, 70, 117-125.

Liberty JT, Dickson DI, Achebe AE, Salihu MB. An Overview of the Principles and Effects of Irradiation on Food Processing and Preservation. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, 2013, 2321-3124.

Magaudda G. The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. *Journal of Cultural Heritage*, 2004, 5, 113-118.

Mahrous AM. Application of gamma radiation for the preservation of Ancient Egyptian cultural objects. M Sc Thesis, Women's College, Ain Shams University, 1988, p.20.

Marušić K., Šegvić Klarić M., Dumbović A., Mihaljević B. Protection of cultural heritage objects by ionizing radiation, Proceedings of the 10th Symposium of CRPA, Šibenik, Croatia, April 15-17, 2015.

Marušić K., Pucić I., Desnica V. Ornaments in radiation treatment of cultural heritage: Color and UV-vis spectral changes in irradiated naces. *Radiation physics and chemistry (1993)*. 124, 2016, 62-67.

McNamara NP, Black HIJ, Beresford NA, Parekh, NR. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology*, 2003, 24, 117-132.

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

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.

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

Nitterus, M. Fungi in archives and libraries. A literary survey. *Restaurator*, 2000, 21, 25-40.

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

Pucić I., Kavkler K., Mihaljević B. Radiation treatment of aged model textile samples. Book of abstracts/Ristić, Goran (ur.). Niš : University of Niš, Faculty of Electronic Engineering, 2014. 171-171.

Rakotonirainy MS, Heraud C, Lavedrine B. Detection of viable fungalspores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*. 2003, 18, 113-121.

Reisz, JA, Bansal N. Qian J, Zhao W, Furdai 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.

Sakr AA, Ghaly MF, Ali MF. The use of gamma irradiation in the sterilization of *Streptomyces* colonizing the tempera paintings in ancient egyptian tombs. *International Journal of Conservation Science*, 2013, 4(3), 283-294

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

Singh H. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. New Jersey, 2006, John Wiley & Sons, Inc., str. 1-29.

Sterflinger K, Prillinger H. Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment. *Beč*, 2001, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 8, 275–286.

Sterflinger K. *Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification*. Urednici: Rosa C, Gabor P. *Yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts*, vol 1. New York, 2005, Springer, str. 505–518.

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

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

Szczepanowska H, Cavaliere AR. 2000. Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collections, Wye House, Easton, Maryland. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 200, 46(3), 245-249.

The Biocidal Product Regulation (BPR, Regulation (EU) 528/2012)

Tiano P. *Biodegradation of Cultural Heritage: Decay Mechanisms and Control Methods*. 2016, seminarski članak, New University of Lisbon, Department of Conservation and Restoration, 7-12.

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, 561-566.

Valentin N. Biodeterioration of library materials. Disinfection methods and new alternatives. *The Paper Conservator*. 1986, 10, 40-45.

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

Zakharova K, Tesei D, Marzban G, Dijksterhuis J, Wyatt T, Sterflinger K. Microcolonial fungi on rocks: a life in constant drought? *Mycopathologia*. 2013, 175 (5-6), 537-547.



## 7 SAŽETAK/SUMMARY

Plijesni imaju veliki utjecaj na biodegradaciju kulturne baštine upravo zbog njihove sposobnosti da se prilagode na različite uvjete, mogu uzrokovat propadanje različitih kulturnih artefakata (slike, tekstil, papir, pergament, koža). Godišnji novčani gubitci zbog napada plijesni na nehranidbene materijale procjenjuju se na 40 milijardameričkih dolara, međutim gubitak na razini kulturne i povijesne važnosti je neprocjenjiv. Gama zračenje se pokazalo kao jedna od najučinkovitijih i najprihvatljivijih metoda dekontaminacije materijala. Jedan od ciljeva ovog rada bio je analizirati prirodnu mikrobiotu na papiru i platnu. Drugi cilj bio je ispitati utjecaj gama zračenja na preživljenje prirodne mikrobiote i tri namjerno inokulirane vrste plijesni. Papir i platno su inokulirani sa sporama plijesni *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* i *Trichoderma harzianum*. Uzorci su ozračeni sa dozom gama zračenja od 20 kGy koristeći dvije brzine doze zračenja, 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s. Mikrobiološka analiza je provedena 0, 7, 14 i 28 dana nakon tretmana. Iz rezultata je vidljivo kako su kvasci, *Cladosporium* spp. i *Penicillium* spp. najotpornije vrste među prirodnom mikrobiotom. Energija gama zračenja s dozom od 20 kGy bila je dovoljna za dekontaminaciju vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja. Samo u uzorcima ozračenim većom brzinom doze zračenja nije došlo do porasta vrste *Cladosporium sphaerospermum* što upućuje na to da je za potpunu inaktivaciju *C.sphaerospermum* potrebna veća brzina doze zračenja. Potrebna je detaljnija analiza prirodne mikrobiote na papiru i platnu te utjecaja gama zračenja na istu.

Fungi have a great impact on the deterioration of the cultural heritage, due to their ability to adapt to different environmental conditions. They can cause decay of a broad variety of cultural heritage artifacts (paintings, textiles, paper, parchment, leather). Annual global expenses for fungal attacks on non-dietary materials is estimated around 40 billion American dollars, but cultural and historical loss is priceless. Gamma-irradiation has been proven as an effective treatment for decontamination of infected materials. This study was aimed to analyze cultivation of natural mycobiota on paper and glue-coated linen; and to evaluate the effect of gamma-irradiation on the survival of natural mycobiota and three different inoculated species. Paper and linen were contaminated with *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Trichoderma harzianum* spores. Materials were irradiated with a dose of 20 kGy, applied at two dose rates, 0,1 Gy/s and 9,8 Gy/s. Microbiological analysis was made on 0th, 7th, 14th and 28th day after treatment. The results showed that yeasts, *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. were the most radioresistant fungi among natural mycobiota. A irradiation dose of 20 kGy was sufficient to eliminate *Aspergillus jensenii* and *Trichoderma harzianum* at any dose rate, but *Cladosporium sphaerospermum* recovered on materials irradiated with a lower dose rate, so we can assume that *C. sphaerospermum* needs higher dose rate for its inactivation. Further study with more detailed analysis of natural mycobiota on paper and linen and effect of gamma-irradiation is needed.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za mikrobiologiju  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ANTIFUNGALNI UČINAK GAMA ZRAČENJA NA MIKOBIOITU PLATNA I PAPIRA

Petra Bulić

#### SAŽETAK

Plijesni imaju veliki utjecaj na biodegradaciju kulturne baštine upravo zbog njihove sposobnosti da se prilagode na različite uvjete, mogu uzrokovat propadanje različitih kulturnih artefakata (slike, tekstil, papir, pergament, koža). Godišnji novčani gubitci zbog napada plijesni na nehranidbene materijale procjenjuju se na 40 milijardi američkih dolara, međutim gubitak na razini kulturne i povijesne važnosti je neprocjenjiv. Gama zračenje se pokazalo kao jedna od najučinkovitijih i najprihvatljivijih metoda dekontaminacije materijala. Jedan od ciljeva ovog rada bio je analizirati prirodnu mikobiotu na papiru i platnu. Drugi cilj bio je ispitati utjecaj gama zračenja na preživljenje prirodne mikrobiote i tri namjerno inokulirane vrste plijesni. Papir i platno su inokulirani sa sporama plijesni *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* i *Trichoderma harzianum*. Uzorci su ozračeni sa dozom gama zračenja od 20 kGy koristeći dvije brzine doze zračenja, 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s. Mikrobiološka analiza je provedena 0, 7, 14 i 28 dana nakon tretmana. Iz rezultata je vidljivo kako su kvasci, *Cladosporium* spp. i *Penicillium* spp. najotpornije vrste među prirodnom mikobiotom. Energija gama zračenja s dozom od 20 kGy bila je dovoljna za dekontaminaciju vrsta *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja. Samo u uzorcima ozračenim većom brzinom doze zračenja nije došlo do porasta vrste *Cladosporium sphaerospermum* što upućuje na to da je za potpunu inaktivaciju *C. sphaerospermum* potrebna veća brzina doze zračenja. Potrebna je detaljnija analiza prirodne mikrobiote na papiru i platnu te utjecaja gama zračenja na istu.

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

Rad sadrži: 31 stranice, 7 tablica i 66 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: gama zračenje, plijesni, kulturna baština, papir, platno

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

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

Rad prihvaćen: srpanj, 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medicinal biochemistry  
Department of Microbiology  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ANTIFUNGAL EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION ON LINEN AND PAPER MYCOBIOTA

Petra Bulić

#### SUMMARY

Fungi have a great impact on the deterioration of the cultural heritage, due to their ability to adapt to different environmental conditions. They can cause decay of a broad variety of cultural heritage artifacts (paintings, textiles, paper, parchment, leather). Annual global expenses for fungal attacks on non-dietary materials is estimated around 40 billion American dollars, but cultural and historical loss is priceless. Gamma-irradiation has been proven as an effective treatment for decontamination of infected materials. This study was aimed to analyse cultivation of natural mycobiota on paper and glue-coated linen; and to evaluate effect of gamma-irradiation on the survival of natural mycobiota and three different inoculated species. Paper and linen were contaminated with *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Trichoderma harzianum* spores. Materials were irradiated with a dose of 20 kGy, applied at two dose rates, 0.1 Gy/s and 9.8 Gy/s. Microbiological analysis was made on 0th, 7th, 14th and 28th day after treatment. The results showed that yeasts, *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. were the most radioresistant fungi among natural mycobiota. A irradiation dose of 20 kGy was sufficient to eliminate *Aspergillus jensenii* and *Trichoderma harzianum* at any dose rate, but *Cladosporium sphaerospermum* recovered on materials irradiated with a lower dose rate, so we can assume that *C. sphaerospermum* needs higher dose rate for its inactivation. Further study with more detailed analysis of natural mycobiota on paper and linen and effect of gamma-irradiation is needed.

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

Thesis includes: 31 pages, 7 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: gamma-irradiation, molds, cultural heritage, paper, linen

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

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

The thesis was accepted: July, 2016.

