

# Ispitivanje osjetljivosti mikrobiote platna i papira na gama zračenje

---

Štrenja, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:573671>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-10-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Daria Štrenja**

**Ispitivanje osjetljivosti mikrobiote platna i papira  
na gama zračenje**

**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 mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na strpljenju i stručnom vodstvu, dr. sc. Branki Mihaljević na ljubaznosti i savjetima, te svojoj obitelji na ukazanom povjerenju i potpori.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. PLIJESNI KAO KONTAMINANTI PREDMETA KULTURNE BAŠTINE.....	1
1.2. GAMA ZRAČENJE.....	3
1.3. GAMA ZRAČENJE KAO METODA DEKONTAMINACIJE PREDMETA KULTURNE BAŠTINE .....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	7
3. MATERIJALI I METODE .....	8
3.1. ISPITIVANJE SASTAVA PRIRODNE MIKOBIOTE NA PAPIRU I LANENOM PLATNU METODOM RAZRIJEĐENJA.....	8
3.2. INOKULACIJA PLATNA I PAPIRA ODABRANIM VRSTAMA PLIJESNI .....	8
3.3. ZRAČENJE UZORAKA .....	9
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	10
5. ZAKLJUČCI.....	16
6. LITERATURA.....	17
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	20

## 1. UVOD

### 1.1. PLIJESNI KAO KONTAMINANTI PREDMETA KULTURNE BAŠTINE

Gljive su eukariotski jednostanični ili višestanični organizmi. Plijesni su višestanične gljive. Stanice plijesni su izdužene i čine cjevastu tvorevinu hifu. Rastom i grananjem hifa nastaje splet koji se naziva micelijem. Razlikujemo bazalni ili vegetativni micelij koji ulazi u hranjivu podlogu i crpi iz nje hranjive tvari i vodu, te zračni ili reproduktivni micelij, koji izlazi iz podloge i nosi plodne strukture pomoću kojih se plijesni razmnožavaju. Obje vrste micelija zajedno čine tijelo gljive ili talus (Mlinarić-Missoni i Babić-Važić, 2005). Gljive nemaju pigment klorofil, pa fotosintezom ne mogu samostalno stvarati hranu, zato za proizvodnju energije koriste gotove organske spojeve iz mrtvih ili živih organizama (Volner, 2008). Razmnožavaju se nespolno i spolno, ovisno o vrsti. Nespolnim razmnožavanjem gljiva nastaju konidije. Spolnim razmnožavanjem nastaju spore. Spore u povoljnim uvjetima života kliju i stvaraju micelij (Mlinarić-Missoni i Babić-Važić, 2005). Proizvodnja spora se često doživljava samo kao način distribucije, ali one su također važne za opstanak vrste. Omogućuju preživljavanje u obliku rezistentnih stanica koje mogu izdržati nepovoljne uvjete okoliša. Tada je njihov metabolizam inaktiviran ali reverzibilno (Michaelsen i sur., 2012). Plijesni mogu rasti pri rasponu pH 3-8, a optimalan pH je 5. Također, toleriraju široki temperaturni raspon. Neke vrste su psihrotolerantne pa mogu rasti na temperaturi oko 0°C i nižoj (npr. *Cladosporium* na prehrambenim proizvodima u hladnjaku), dok askospore nekih vrsta iz roda *Aspergillus* preživljavaju na temperaturi do 60°C. Pripadnici roda *Aspergillus* (npr. *A. flavus*, *A. niger*) su termotolerantne vrste koje mogu rasti pri nižim i višim temperaturama (8-45°C). Optimalna temperatura inkubacije za većinu plijesni pri uzgoju na hranjivim podlogama je 25°C, a za neke patogene vrste (npr. *A. fumigatus* i *Penicillium marnefei*) je 37°C. Svjetlost značajno utječe na tvorbu rasplodnih struktura, primjerice inkubacija na svjetlu odgađa razvoj rasplodnih struktura kod nekih vrsta iz roda *Aspergillus*. S druge strane, svjetlost igra važnu ulogu u disperziji konidija mnogih vrsta plijesni. Primjerice, vrste *Cladosporium* i *Alternaria* (uzročnici alergija dišnog sustava i patogeni na bilju) pozitivno su fototropni i broj njihovih konidija u zraku otvorenih prostora je u izravnoj korelaciji sa sunčevom svjetlošću. Plijesni proizvode pigmente ovisno o sastavu podloge što je uz morfologiju rasplodnih struktura važno svojstvo za njihovu identifikaciju. Raznolikost pigmenta susrećemo kod *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* vrsta. Plijesni, ovisno o

genetičkoj predispoziciji, uvjetima okoliša i sastavu supstrata, mogu proizvoditi niz specifičnih metabolita tzv. ekstroлита među koje spadaju i mikotoksini (Pitt i Hocking, 2013; Mlinarić-Missoni i Babić-Važić, 2005; Florian, 2003).

Plijesni mogu hidrolizirati razne polimere, uključujući celulozu, kao rezultat učinkovitih degradacijskih enzima. Naseljavaju materijale kao što su papir, platno, drvo, tekstil i sl. jer je upravo celuloza glavni nutrijent za mnoge plijesni (Fotakis i sur., 2007; da Silva i sur., 2006). Zbog saprofitskog načina života predstavljaju opasnost za kulturnu baštinu iz nekoliko razloga: 1) uzrokuju diskoloraciju što je posljedica djelovanja kiselina i ostalih nusprodukata nastalih tijekom hidrolize celuloze ili drugih nutrijenata ili pak diskoloracija potječe od pigmentata prisutnih u strukturi plijesni (Bertalan i sur., 1994); 2) njihov prodor u materijal rezultira njegovim gubitkom uslijed kiselinske korozije i enzimske razgradnje (Sterflinger i Pinar, 2013; Fotakis i sur., 2007). Sam materijal na kojem rastu također igra važnu ulogu, jer različite podloge drugačije zadržavaju vodu, a o udjelu vode ovisi rast plijesni (Florian, 2002). Platno i papir su materijali u čijem sastavu prevladava celuloza. Da bi se zaštitili od djelovanja kemikalija ili pak da se spriječi razlijevanje boje, moraju se impregnirati. Jedno od češćih impregnacijskih sredstava je tutkalo, protein dobiven iz kolagena, najčešće životinjskog porijekla. Tutkalo također predstavlja izvor nutrijenata za plijesan. Učinci teške gljivične razgradnje platna i papira lako se mogu vidjeti. Materijal postaje mekši, često su područja propadanja ili stanjivanja jasno vidljiva. U manje teškim slučajevima gubitak se vidi samo na svjetlosti ili je dokazan putem drugačijih karakteristika vlaženja (Bertalan i sur., 1994).

Učinci temperature i relativne vlage zajedno igraju ključnu ulogu u rastu plijesni.

Relativna vlažnost je mjera postotka vodene pare prisutne u zraku u odnosu na maksimalnu količinu vodene pare koju zrak može imati na toj određenoj temperaturi i atmosferskom tlaku. Ravnotežni sadržaj vlage (EMC, equilibrium moisture content) je točka u kojoj materijal više ne prima niti gubi vodu. Dostiže se pri ravnotežnoj relativnoj vlažnosti (ERH, equilibrium relative humidity), odnosno ravnoteži između vodene pare u zraku i količini vode u materijalu. Na to izravno utječe temperatura. Ukoliko relativna vlažnost ostaje konstantna, a temperatura zraka se smanjuje, voda se pomiče u adsorbentni materijal. Isto tako, ako se povećava temperatura zraka, voda se kreće iz materijala, koji se pritom suši, dok se ne postigne ravnoteža s vodenom parom u zraku. Ako se pak smanji relativna vlažnost zraka, materijal će gubiti vodu dok se ne postigne nova ravnoteža (Florian, 2000). Ravnotežna relativna vlažnost izražena kao decimalan broj je numerički jednaka aktivitetu vode ( $a_w$ ). Aktivitet vode je omjer parcijalnog tlaka vodene pare u materijalu i tlaka zasićene pare čiste

vode pod istim uvjetima (Pitt i Hocking, 2013). Kreće se od 1 do 0, gdje se  $a_w=1$  odnosi na čistu vodu (Florian, 2003). Ako se ERH zraka kontrolira na pogodan način, npr. putem zasićene otopine soli, u ravnoteži će  $a_w$  biti brojčano jednak generiranom ERH. Na ovaj način,  $a_w$  u materijalu se može eksperimentalno kontrolirati, a time i utjecati na sposobnost plijesni za rast (Sterflinger i Pinar, 2013).

S obzirom na  $a_w$  potreban za rast plijesni, razlikujemo tri skupine kolonizatora, primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni kolonizatori (tzv. kserofili) rastu pri vrijednostima  $a_w$  između 0,6 i 0,8; to su relativno suhi uvjeti. Primjeri takvih kolonizatora su plijesni iz roda *Penicillium*, nekoliko vrsti iz roda *Aspergillus* te *Wallemia* spp. Sekundarni kolonizatori za rast trebaju  $a_w$  u rasponu od 0,8 do 0,9, a tu se ubrajaju vrste iz roda *Cladosporium* i neke vrste iz rodova *Mucor* i *Rhizopus*. Tercijarni pak kolonizatori (tzv. hidrofilni) rastu u uvjetima kada je  $a_w > 0,9$ . Takvi uvjeti su prisutni nakon poplava i sličnih katastrofa. Primjeri rodova su *Alternaria*, *Trichoderma*, *Ulocladium* i *Satchybotrys* (Nielsen, 2003).

Još jedan čimbenik utječe na rast plijesni. Radi se o točki rosišta. Ako u nekom trenutku u okolišu (primjerice u muzeju) dođe do dramatičnog pada temperature ili naglog porasta dostupne vode u zraku, zbog čega postaje zasićen (apsolutna vlažnost), višak vode se kondenzira na površinama koje ne mogu uravnotežiti te brze promjene. Dramatičan pad temperature može se pojaviti u zraku koji prolazi preko hladnih površina kao npr. hladnog zida ili poda. Kondenziranu vodu plijesni iskorištavaju za rast (Florian, 2003).

Loša ventilacija u zatvorenim sustavima i nehomogena površinska temperatura mogu uzrokovati kondenzaciju vode i lokalne mikroklima sa više dostupne vode nego u ostatku prostora (Sterflinger i Pinar, 2013). Kretanje zraka je izuzetno važno u uklanjanju mnogih mikrookoliša (Florian, 2003).

## 1.2. GAMA ZRAČENJE

Svaki atom se sastoji od jezgre sastavljene od protona i neutrona te elektrona koji se nalaze u orbiti oko jezgre. Izotopi su varijante određenog atoma. Svi izotopi jednog atoma imaju isti broj protona, a razlikuju se u broju neutrona. Izotop je stabilan kada ima uravnotežen broj protona i neutrona. Radioizotop je nestabilni izotop atoma koji prolazi kroz spontani raspad. Prilikom raspada (primjerice  $\alpha$  ili  $\beta$  radioaktivni raspad) energija se emitira u obliku čestica, a  $\gamma$  zračenje se odvija kada postoji ostatna energija u jezgri radioizotopa nakon raspada, koja će se osloboditi u obliku fotona, odnosno elektromagnetskog zračenja. Tijekom procesa

raspadanja, izotop postaje sve manje radioaktivan tijekom vremena, da bi na kraju postao stabilan (Canadian Nuclear Safety Commission, 2012).

Energija fotona je izravno proporcionalna s frekvencijom ( $\nu$ ) i obrnuto s valnom duljinom ( $\lambda$ ) prema Planckovoj jednadžbi:

$$E = h\nu = hc / \lambda \text{ (h je Planckova konstanta, a c je brzina svjetlosti)}$$

Fotonsko zračenje prodire duboko u tkiva, intenzitet zračenja se može smanjiti samo upotrebom barijernih materijala koji su vrlo gusti, kao što su olovo i čelik (Canadian Nuclear Safety Commission, 2012; International atomic energy agency, 2010; Jakobović, 1991).

Energija koja je apsorbirana promatra se kao apsorbirana doza, koja se mjeri u jedinici Gray (Gy). 1 Gy = 1 J/kg (Jakobović, 1991). Apsorbicija ovisi o debljini materijala. S povećanjem debljine materijala intenzitet zračenja eksponencijalno pada prema jednadžbi:

$I(x) = I_0 \cdot e^{-\mu x}$  gdje je  $I(x)$  intenzitet na promatranoj debljini  $x$ ,  $I_0$  = početni intenzitet na površini apsorbera,  $\mu = n \cdot \sigma$ , koeficijent apsorbcije mjeren u  $\text{cm}^{-1}$ ,  $n$  broj atoma po  $\text{cm}^3$  u materijalu,  $\sigma$  označava vjerojatnost apsorbcije (absorption cross section) u  $\text{cm}^2$ , a  $x$  je debljina materijala u cm (International atomic energy agency, 2010).

Razlikujemo neionizirajuće i ionizirajuće zračenje. Ionizirajuće zračenje je sposobno izbaciti elektrone iz njihovih orbita oko atoma, poremetiti elektron / protonsku ravnotežu i dati atomu pozitivni naboj. Neionizirajuće zračenje ima manje energije od ionizirajućeg, odnosno nema dovoljno energije za proizvesti ione (Canadian Nuclear Safety Commission, 2012).

Gama zračenje može određenim procesima izravno ionizirati atome, ali značajniji je neizravno ionizirajući učinak, putem kojeg uzrokuje ekscitacije i ionizacije u molekulama vode koje produciraju kratkoživuće  $\text{H}_2\text{O}^+$  radikal katione, elektrone ( $e_{\text{aq}}$ ) i ekscitirane molekule vode ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ). Radikal kationi i ekscitirane molekule vode su nestabilni i razgrađuju se u roku  $10^{-13}$  -  $10^{-15}$  s. Pritom formiraju  $\text{OH}\cdot$  i  $\text{H}\cdot$  radikale, koji, kao i  $e_{\text{aq}}$ , imaju visoku reaktivnost prema molekulama stanice, uzrokujući pucanje veza unutar DNA, oštećenje baza, oksidaciju lipida itd. (International atomic energy agency, 2010).

Otprilike jedna na milijun veza u DNA je uništena na svaki apsorbirani paket energije od 1 kGy ionizirajućeg zračenja, ali broj apoptoznih stanica je vrlo malen, zbog efikasnih mehanizama popravka DNA (Yousefi i Razdari, 2015; International atomic energy agency, 2010). Općenito se smatra da je zračenje nepovratno oštetilo stanice ako su one izgubile sposobnost reprodukcije, a ne ako su fizički preživjele u populaciji (Canadian Nuclear Safety Commission, 2012). Gama zračenje se primjenjuje u terapiji tumorskih oboljenja, zdravstvenoj dijagnostici, kao metoda sterilizacije farmaceutskih i medicinskih proizvoda i materijala općenito (Silindir i Ozer, 2009; Herak, 2001). Za ove svrhe među dozvoljenim



izvorima zračenja koriste se radionuklidi  $^{60}\text{Co}$  i  $^{137}\text{Cs}$  (Canadian Nuclear Safety Commission, 2012; International atomic energy agency, 2010).

### **1.3. GAMA ZRAČENJE KAO METODA DEKONTAMINACIJE PREDMETA KULTURNE BAŠTINE**

Kada su predmeti kulturne baštine izloženi u muzejima i sličnim ustanovama, kontrola uvjeta u takvom zatvorenom prostoru može pomoći u suzbijanju rasta plijesni (Nunes i sur., 2013). Zračni filteri koji zaustavljaju prolaz spora iz vanjskog okoliša u objekt nisu prikladni za većinu institucija. To nije samo zbog toga što su takvi sustavi skupi, nego i zato što se zrak kontaminira preko svakog člana osoblja ili posjetitelja. Osim toga, mnogi materijali su prije dolaska kontaminirani sporama (Bertalan i sur., 1994). Odgovarajući postupci za dekontaminaciju plijesni sa kulturne baštine uključuju mehaničke (četke, štapići, usisavanje uz filtere), kemijske (fungicidi) i fizikalne (liofilizacija, gama zračenje, laser) metode (Michaelson i sur., 2012; Florian, 2003; Szczepanowska i Moomaw, 1994).

Mehaničko čišćenje će ukloniti površinske strukture plijesni, no ne zna se u kojoj mjeri. Ipak, važno ga je provesti jer se smanjuje križna kontaminacija i zdravstveni rizik (Florian, 2003). Od kemikalija se koriste fungicidi kao što su etilen oksid ili sulfuril fluorid. Međutim, fungicidi se rijetko upotrebljavaju zbog svoje toksičnosti za ljude (Nunes i sur., 2013). Alkilirajuće djelovanje etilen oksida (EtO) naširoko je povezano sa njegovim karcinogenim potencijalom, što je dovelo do zabrane korištenja EtO u mnogim zemljama.

Postupak liofilizacije prikladan je u situacijama kada treba brzo ukloniti veću količinu vode iz materijala (npr. uslijed poplave). Ova metoda je samo priprema za daljnju obradu jer je eksperimentalno utvrđeno kako liofilizacija nema dugoročni učinak. Sublimacijom se voda uklanja bez učinka sila isparavanja što može uzrokovati promjene dimenzija materijala, no treba imati na umu i da se posljedično može povećati poroznost i debljina materijala te materijal može postati i higroskopan (Michaelsen i sur., 2012). Upotreba lasera je korisna kada treba ukloniti pigmentirane mrlje, no ovaj postupak također može utjecati na integritet materijala (Szczepanowska i Moomaw, 1994).

Gama zračenje se kao metoda dekontaminacije koristi od ranih 1960-ih godina (Nunes i sur., 2013). Ono ima visoku moć prodornosti kroz duboki sloj materijala bez mogućnosti induciranja radioaktivnosti (da Silva i sur., 2006). U restauracijama i zaštiti umjetnina doze zračenja najčešće se kreću od 5 do 18 kGy (Marušić i sur., 2015).

Učinkovitost metode se može promatrati putem kultivacijskih tehnika čiji rezultati govore o potencijalnom kratkoročnom učinku i molekularnim metodama iz kojih se može zaključiti o sposobnosti dugoročnog negativnog učinka na rast plijesni. Pokazalo se da gama zračenje samo kratkoročno utječe na DNA fragmentaciju. Dugoročno je došlo do potpunog oporavka DNA preživjelih plijesni, no svakako da zračenje može smanjiti ili usporiti proces rasta. Isto tako, kada je RNA korištena kao pokazatelj dugoročne održivosti (jer metabolički aktivne plijesni prepisuju više mRNA), nisu zapaženi povoljniji učinci (Michaelsen i sur., 2012). Može se zaključiti kako je gama zračenje kao metoda dekontaminacije korisna za tretiranje velike količine materijala istovremeno i bez naknadne kemijske opasnosti, kao postupak za svođenje mikroorganizama na kontroliranu razinu. Učinkovitost ovisi samo o apsorbiranoj dozi, koja se može lako kontrolirati. Ipak, visoke doze zračenja mogu dovesti do depolimerizacije celuloze u materijalima kao što su papir i platno. Karakteristike starenja, kao što su niža izdržljivost i otpornost na trganje, povećano žutilo i opća krtost, su na tim materijalima bile zamijećene (Pucić i sur., 2014; Michaelsen i sur., 2012). Novija istraživanja, međutim, pokazuju da doze do 10 kGy ne utječu značajno na mehaničko-fizikalna svojstva celuloznih materijala, čak i nakon ubrzanog starenja kroz 12 dana (Trandafir i sur., 2014). No, tu mogućnost ipak ne treba zanemariti, već odabrati dozu koja je s jedne strane učinkovita, a s druge ne oštećuje materijal.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom na činjenicu da su plijesni prirodno prisutne u zraku zatvorenih prostora sasvim je očekivano da se nalaze i na predmetima kulturne baštine, posebice ako ti predmeti sadrže prirodne materijale kao što su npr. drvo, papir, platno ili koža. Plijesni na takvim materijalima predstavljaju problem onog trenutka kada se ti predmeti pohranjuju u uvjetima visoke relativne vlažnosti zraka, ili kada su izravno izloženi vodi npr. prilikom poplave. Tada koncentracija vijabilnih plijesni na materijalu višestruko poraste što dovodi do njegovog propadanja. Gama zračenje se pokazalo kao obećavajuća metoda u suzbijanju plijesni poraslih na predmetima kulturne baštine ali i u prevenciji njihovog rasta prilikom pohranjivanja predmeta u adekvatne zatvorene prostore. Međutim, nisu sve plijesni jednako osjetljive/otporne na gama zračenje, niti svi materijali jednako podnose takav tretman. Stoga je cilj izabrati dozu gama zračenja koja je učinkovita u dekontaminaciji plijesni s predmeta kulturne baštine, a koja pritom ne oštećuje materijal. S obzirom da su papir i laneno platno impregnirano tutkalom najčešća baza umjetničkih slika, a u literaturi ima malo podataka o sastavu mikrobiote koja kontaminira takve materijale, kao i o učinkovitosti primjene gama zračenja za njihovo uklanjanje, ti su materijali izabrani kao modeli u ovom istraživanju. Specifični ciljevi ovog rada uključuju:

- 1) Analizirati sastav prirodne mikrobiote koja se pojavljuje na papiru i lanenom platnu koje je impregnirano tutkalom;
- 2) Ispitati učinkovitost doze od 7 kGy, primijenjene kod brzine doze zračenja od 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s, u eliminaciji prirodne mikrobiote kao i namjerno inokuliranih plijesni koje su pripadnici primarnih (*Aspergillus jensenii*), sekundarnih (*Cladosporium spaherospermum*) i tercijarnih (*Trichoderma harzianum*) kolonizatora, a za koje je poznato da se nalaze u zraku zatvorenih prostora i rastu na celuloznim materijalima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. ISPITIVANJE SASTAVA PRIRODNE MIKROBIOTE NA PAPIRU I LANENOM PLATNU METODOM RAZRIJEĐENJA

Pripremljeni su komadići platna (laneno platno obrađeno tutkalom, dobiveno zagrijavanjem otopine kolagena prethodno izdubrenog u destiliranoj vodi) i papira (Verge beskiselinski trajni papir dimenzija 70x100, gramature 100 g/m<sup>2</sup>), dimenzija 3,5 x 3,5 cm. Prosječna masa platna iznosila je 0,39 g, a papira 0,15 g.

Priređeni kvadratići papira i platna stave se u sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu (tzv. falkonicu), u kojoj je 3 mL (papir), odnosno 4 mL (platno) peptonske vode pri čemu se dobije razrjeđenje 10<sup>-1</sup>. Uzorci se homogeniziraju i potom razrjeđuju u peptonskoj vodi u serijalnom nizu od početnog 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-4</sup>. Iz svakog priređenog razrjeđenja na površinu sterilne hranjive podloge (Malt ekstrakt agar-MEA) u Petrijevoj zdjelici nanese se 100 μL uzorka i sterilnim staklenim štapićem (tzv. L-štapić) razmaže po površini MEA podloge. Uzorci se inkubiraju 5 do 7 dana na 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 PLATNA I PAPIRA ODABRANIM VRSTAMA PLIJESNI

Primarni (*Aspergillus jensenii*), sekundarni (*Cladosporium spaherospermum*) 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. Kako bi se odredila koncentracija spora/dijelova micelija u mililitru peptonske vode korišten je Bürker-Türk hemocitometar. Odabrane vrste plijesni priređene su u koncentraciji približno  $5 \times 10^4$ /mL, odnosno inokulirane su na kvadratiće papira i platna u koncentraciji približno  $1-2 \times 10^4$ /g. Osim inokulacije svake plijesni zasebno, pripremila se i mješavina sva tri kolonizatora u omjeru 1:1:1.

Platno i papir raspodjele se po Petrijevim pločama na način da svaka ploča sadrži duplikat. Uz rub se stavi, pazeći da ne dodiruje materijal, i komadić sterilizirane vate, namočene sa nekoliko mL sterilne vode, kako bi se unutar sustava održala optimalna vlažnost. 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 podijeljeni 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**

Uzorci su zračeni na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju na panoramskom uređaju sa  $^{60}\text{Co}$  izvorom gama zračenja. U ovom laboratoriju obrada različitih materijala gama zračenjem se provodi godinama i u skladu s nacionalnim pravilnikom (Narodne novine br. 046/1994) i međunarodnim propisima ISO standarda (International Organization for Standardisation), ISO 13485:2003, Medical devices –QMS-Requirements for regulatory purposes, sljedeći metodu ISO 11137-1: 2006, Sterilization of Health Care Products – Radiation. Uz primjenu zračenja provode se i dozimetrijska mjerenja kako bi se provjerilo jesu li određene doze zračenja ispravno predane materijalu prema unaprijed utvrđenim doznim mapama. Za dozimetrijsko mjerenje koristio se kemijski dozimetar na bazi etanol-klorobenzena (Ražem i sur., 1984). Temperatura komore za ozračivanje je bila oko 18° C.

Doza zračenja iznosila je 7 kGy, dio uzoraka zračilo se brzinom od 0,1 Gy/s, a dio sa 9,8 Gy/s. Nakon zračenja, uzorci su inkubirani na 25°C te metodom razrijeđenja analizirani 0., 7., 14., i 28. dan nakon zračenja. Sva su mjerenja napravljena u duplikatu, a rezultati vijabilnosti plijesni prije i nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g, kako je opisano u poglavlju 3.1.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati mikološke analize platna i papira prije i nakon 7 dana inkubacije na 25°C pri 75% relativne vlažnosti (Rv) prikazani su u tablicama 1 i 2. Mikološka analiza uzoraka prije inkubacije pokazala je da su platno i papir prirodno opterećeni s  $\sim 10^3$ , odnosno  $\sim 10^4$  CFU/g plijesni, dok iz tih uzoraka nisu bili izolirani kvasci. Među plijesnima detektiranim na platnu sve su vrste bile podjednako zastupljene ( $\sim 10^3$  CFU/g). Na papiru su dominirale *Alternaria* spp. ( $10^4$  CFU/g) u odnosu na ostale detektirane plijesni ( $1-3 \times 10^3$  CFU/g). U uzorcima platna koji su 7 dana inkubirani na 25°C pri 75% Rv utvrđene su  $10^4$  puta veće koncentracije nekih plijesni (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.). Osim toga, na platnu i papiru su nakon inkubacije u vlažnim uvjetima porasli i kvasci ( $>10^4$  CFU/g) koji nisu utvrđeni prethodnom analizom, dok neke vrste (*Alternaria* spp., i *Fusarium* spp.) nisu izolirane iz inkubiranih uzoraka. Ovi rezultati pokazuju da su platno i papir neravnomjerno kontaminirani plijesnima i kvascima. Naime, radi se o tzv. točkastoj kontaminaciji, pri čemu svaki kvadratić platna i papira ne sadrži niti isti broj niti iste vrste plijesni. Uzimajući u obzir koncentraciju aspergila, kladosporija, penicilija i kvasaca utvrđenu na platnu nakon inkubacije, može se pretpostaviti da rastu plijesni pogoduje i tutkalo koje je animalnog porijekla i kojim je platno impregnirano. Inokulirane plijesni (tablica 3) također su u većoj koncentraciji narasle na platnu nego na papiru nakon 7-dnevne inkubacije; koncentracija *A. jensenii* i *T. harzianum* povećala se za  $\sim 10^2$  puta na platnu, odnosno za  $\sim 10$  puta na papiru.

Tablica 1. Sastav prirodne mikrobiote na platnu i papiru

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

Međutim, koncentracija *C. sphaerospermum* nije se značajno povećala na platnu, dok je na papiru koncentracija bila manja od početnog inokuluma. Moguće je da su neki od pripadnika prirodne mikrobiote suzbili rast *C. sphaerospermum*.

Tablica 2. Porast prirodne mikrobiote 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 dana 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 zračenja dozom od 7 kGy primijenjenom u dvije brzine (0,1 i 9,8 Gy/s). Iz ozračenih uzoraka platna kvasci su se oporavili već 0. dan nakon zračenja ( $\sim 10^3$ - $10^4$  CFU/g). Među plijesnima najotpornije su bile kladosporije koje su izolirane iz uzoraka obrađenih nakon 7 dana inkubacije nakon zračenja ( $\sim 10^3$  CFU/g). Njihova je koncentracija porasla do reda veličine  $10^6$  CFU/g u uzorcima koji su obrađeni 28. dan nakon zračenja. Alternarije su izolirane iz uzoraka koji su obrađeni 14. dan ( $\sim 10^4$  CFU/g), a njihova je koncentracija bila 10 puta veća u

uzorcima nasadenima nakon 28 dana inkubacije. Fuzarije ( $\sim 10^5$  CFU/g) i penicilije ( $\sim 10^4$  CFU/g) oporavile su se nakon 28 dana inkubacije. Kako je ranije pokazano (tablica 2), plijesni su na uzorcima papira narasle u manjoj koncentraciji nego li na platnu pa su koncentracije plijesni koje su preživjele zračenje također bile manje. Uzimajući u obzir otpornost plijesni i kvasaca na zračenje uzoraka platna i vrijeme oporavka nakon zračenja, mogu se uočiti neke sličnosti: 0. dan od zračenja iz uzoraka su izolirani kvasci ( $\sim 10^4$  CFU/g) ali i penicilije ( $\sim 10^3$  CFU/g); 7. dana su se oporavile kladosporije ( $\sim 10^3$  CFU/g), a 28. dan alternarije ( $10^2$  CFU/g) i fuzarije ( $\sim 10^3$  CFU/g). Teško je donijeti zaključak o učinku brzine doze na preživljenje prirodne mikrobiote jer su rezultati zračenja platna i papira proturječni. Naime, u većini slučajeva bolji antifungalni učinak je dobiven zračenjem većom brzinom doze, što se i očekuje jer veća brzina doze uzrokuje i veća nepopravljiva oštećenja stanica. Odstupanja od ovog očekivanog rezultata (kvasci, penicilije i ostale plijesni) mogla bi se objasniti fenomenom točkaste kontaminacije. U budućim pokusima trebalo bi napraviti što opširniji pregled pojavljivanja prirodne mikrobiote na platnu i papiru, prije i nakon inkubacije ( $25^\circ\text{C}$  i  $75\%$  Rv) kako bi se što bolje mogli protumačiti učinci doza zračenja i brzina doza na preživljenje pojedinih vrsta plijesni.

Tablica 4. Porast prirodne mikrobiote na platnu nakon  $\gamma$ -zračenja dozom 7 kGy kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Alternaria</i> spp.	-	-	-	-	38666,7	-	200000	-
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	8125	-	904584,4	-	1620000	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	450000	-
<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	10 000
Ostale plijesni	1000	-	100	-	200000	154,5	-	-
Kvasci	14000	150000*	700	-	-	60 000	-	23181,8
Ukupno	7500	150000*	5683,3	-	921077,9	333,3	1866666,7	125000



\* Na pločama je naraslo >150 kolonija

Tablica 5. Porast prirodne mikrobiote na papiru nakon gama zračenja dozom 7 kGy kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Alternaria</i> spp.	-	-	-	-	-	-	100	-
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	2500	-	-	-	14452,7	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	8714,3	-
<i>Penicillium</i> spp.	1000	-	-	-	-	-	-	-
Ostale plijesni	1000	1250	140	-	-	16 109,1	-	100
Kvasci	11333,3	150000	-	15000*	-	1500000	-	454,5
Ukupno	9250	1250 150000*	160	15000*	-	161109,1 1500000*	2064,9	218,2

\* Ploče sa >150 kolonija kvasaca

Tablica 6. Porast inokuliranih plijesni na platnu nakon gama zračenja dozom 7 kGy kod brzine doze od 0,1 odnosno 9,8 Gy/s

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Aspergillus jensenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	-	1400	-	6500	-	2250000	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Miješana kultura	-	-	2400*	-	550000*	-	1700000*	-

\* *C. sphaerospermum*

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

Plijesni	Koncentracija plijesni (CFU/g)							
	0. dan		7. dan		14. dan		28. dan	
	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s	0,1 Gy/s	9,8 Gy/s
<i>Aspergillus jensenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1000	-	150	-	-	-	1113,6	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Miješana kultura	-	-	-	-	-	-	8186,36*	-

\* *C. sphaerospermum*

Vrste *A. jensenii* i *T. harzianum* inokulirane na platno i papir nisu preživjele zračenje dozom od 7 kGy, neovisno o brzini doze. Kada se pak materijal zrači manjom brzinom, *C. sphaerospermum* uspijeva preživjeti i oporaviti se, što je u skladu s rezultatima dobivenim za kladosporije koje su bile dio prirodne mikrobiote platna i papira. Kroz promatrano vrijeme vidljivo je da je ovaj kolonizator zadržao reproduktivnu sposobnost s obzirom da broj plijesni do 28. dana eksponencijalno raste. *Cladosporium sphaerospermum* je plijesan koja u staničnoj stijenci sadrži pigment melanin, za čiju sintezu ne treba egzogene supstrate (Dadachova i sur., 2007). Istraživanje provedeno upravo na ovoj vrsti plijesni ukazuje na to da ionizacijsko zračenje uzrokuje ekscitaciju elektrona u molekuli melanina, još uvijek nedovoljno objašnjenim mehanizmom, a kojim djeluje radioprotektivno, tj. stanice se štiti od zračenja (Dadachova i sur., 2007). Doza zračenja u tom eksperimentu mnogo je manja od 7 kGy i općenito od prosječne fungicidne doze, pa se postavlja pitanje u kojem razmjeru je zračenje dovelo do radiolize vode i da li radioprotektivna uloga melanina ima značenje kada je plijesan suočena sa velikom dozom kao što je 7 kGy. No, činjenica da je *C.*

*spaherospermum* preživjela zračenje manjom brzinom nije zanemariva.

Može se pretpostaviti da su takvi uvjeti pružili plijesni više vremena da se prilagodi novonastalom okruženju, što je možda uključivalo i pojačanu sintezu pigmenta melanina.

Neke studije ukazuju na to da su i vrste iz roda *Alternaria* zbog prisutnosti melanina otpornije na gama zračenje (Braghini i sur., 2009), a istraživanje provedeno na vrsti *Cryptococcus neoformans* pokazalo je da pod utjecajem melanina ovaj kvasac čak raste brže kada je izložen gama zračenju (Dadachova i sur., 2007).

## 5. ZAKLJUČCI

- Energija gama zračenja s dozom od 7 kGy dovoljna je za dekontaminaciju vrsti *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja.
- Ako se želi zaustaviti rast vrste *Cladosporium spaherospermum*, doza od 7 kGy također će biti dovoljna da se ošteti reproduksijski potencijal plijesni, no samo ako se primijeni većom brzinom.
- Među pripadnicima prirodne mikrobiote platna i papira najotporniji su kvasci i kladosporije koji su se oporavili neposredno nakon zračenja dozom od 7 kGy, odnosno 7. dan nakon zračenja.
- Ne može se izvesti dosljedan zaključak o fungicidnoj učinkovitosti doze od 7 kGy i brzina doze (0,1 i 9,8 Gy/s) na pripadnike prirodne mikrobiote platna i papira zbog postojanja fenomena točkaste kontaminacije ovih materijala.
- Platno, vjerojatno zbog načina obrade, pogoduje rastu plijesni.
- U nastavku istraživanja treba napraviti sistematična istraživanja o pojavljivanju prirodne mikrobiote na platnu i papiru, prije i nakon inkubacije (25°C i 75% Rv) kako bi se što bolje mogli protumačiti učinci doza zračenja i brzina doza na preživljenje pojedinih vrsta plijesni.
- Ovaj rad pokazuje potrebu interdisciplinarnog pristupa pri rješavanju problema dekontaminacije predmeta i objekata kulturne baštine primjenom gama zračenja s posebnim interesom na plijesni koje su najčešći kontaminanti i poznati po različitim svojstvima otpornosti kako na kemijska sredstva tako i na ionizirajuće zračenje.

## 6. LITERATURA

Bertalan S, Wood Lee M, Olcott Price L. Mold/fungi. U: Paper Conservation Catalog.

Bertalan S, urednica, San Francisco, AIC/BPG, 1994, str. 1-39.

Braghini R, Pozzi CR, Aquino S, Rocha LO, Correa B. Effects of  $\gamma$ -radiation on the fungus *Alternaria alternata* in artificially inoculated cereal samples. *Appl radiat isotopes*, 2009, 67, 1622–1628.

Canadian Nuclear Safety Commission. Introduction to radiation. Ottawa, Canadian Nuclear Safety Commission, 2012, str. 1-7, 15-19.

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

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.

Florian M-L. Water, heritage photographic materials and fungi. *Topics Photogr Preserv*, 2003, 10, 60-73.

Florian M-L. Fungal facts: solving fungal problems in heritage collections. London, Archetype Pub., 2002, str. 51.

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

Fotakis C, Anglos D, Zafiropulos V, Georgiou S, Tornari V. Lasers in the preservation of cultural heritage: principles and applications (series in optics and optoelectronics). Boca Raton, CRC Press, 2007, str. 303-304.

Herak J. Osnove kemijske fizike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u

Zagrebu, 2001, str. 78-80.

International Atomic Energy Agency. Radiation biology: a handbook for teachers and students. Vienna, International Atomic Energy Agency, 2010, str. 16, 18, 23-25.

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

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

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.

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

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

Nunes I, Mesquita N, Cabo Verde S, Carolino MM, Portugal A, Botelho ML. Bioburden assessment and gamma radiation inactivation patterns in parchment documents. *Radiat Phys Ch*, 2013, 88, 82-89.

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

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

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

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

Silindir M, Ozer AY. Sterilization methods and the comparison of e-beam sterilization with gamma radiation sterilization. *J Pharm Sci*, 2009, 34, 43–53.

Szczepanowska HM, Moomaw WR. Laser stain removal of fungus-induced stains from paper. *JAIC*, 1994, 33, 25-32.

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.

Yousefi MR, Razdari AM. Irradiation and its potential to food preservation. *Int J Adv Biol Biom Res*, 2015, 3 (1), 51-54.

Volner Z. Opća obilježja gljiva. U: Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom. Volner Z, Zagreb, Školska knjiga, 2008, str. 59.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

U ovom radu je ispitivana osjetljivost prirodne mikrobiote platna i papira te namjerno inokuliranih plijesni *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium spaherospermum* i *Trichoderma harzianum* na gama zračenje. Ove vrste su česti kolonizatori predmeta kulturne baštine koji uslijed toga propadaju. U eksperimentu se ograničilo na platno i papir kao materijale koji zbog organskog sastava (jedna od glavnih sastavnica je celuloza, izvrstan izvor nutrijenata za plijesan), lako podliježu kolonizaciji ovim mikroorganizmima. Primjenjena je doza zračenja od 7 kGy, kod dvije brzine doze; 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s. Učinci su se mjerili praćenjem rasta plijesni 0., 7., 14. i 28. dan od zračenja. Rezultati su pokazali kako je 7 kGy dovoljno da nepovratno ošteti inokulirane plijesni *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja. Kada se radi o *Cladosporium spaherospermum*, uočeno je da ova plijesan uspijeva preživjeti i razmnožavati se ako se zrači manjom brzinom doze, stoga, da bi dekontaminacija bila uspješna, nužno je dozu od 7 kGy primijeniti većom brzinom doze.

Prirodna mikobiota obuhvaćala je vrste iz rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, kvasce i nekoliko drugih. Među njima, najotporniji prema zračenju bili su kvasci i vrste iz roda *Cladosporium*.

O fungicidnoj učinkovitosti doze od 7 kGy i brzine doze (0,1 i 9,8 Gy/s) na pripadnike prirodne mikrobiote platna i papira ne može se izvesti dosljedan zaključak zbog postojanja fenomena točkaste kontaminacije ovih materijala.



This study was aimed to investigate the sensitivity of natural mycobiota of linen and paper as well as inoculated colonizers *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium spaherospermum* and *Trichoderma harzianum* to gamma radiation. These types of molds are frequent colonizers of cultural heritage, which cause it's deterioration.

In the experiment we used linen and paper as model materials that contain organic compounds (one of the main components is cellulose, an excellent source of nutrients for molds) and therefore is easily colonized with these microorganisms. The dose of radiation was 7 kGy, and was applied in two different velocities; 0,1 Gy/s and 9,8 Gy/s.

Effects were measured by monitoring the growth of mold on 0th, 7th, 14th and 28th day of radiation.

The results showed that 7 kGy irreversibly damage *Aspergillus jensenii* and *Trichoderma harzianum*, regardless to dose ratio. When it comes to *Cladosporium spaherospermum*, it was observed that the mold manages to survive and reproduce if radiated at lower velocity, so it is necessary to apply the dose at higher velocity to achieve a successful decontamination. Natural mycobiota included the species of the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, yeasts and a few others. Among them, the most resistant to radiation were yeasts and species of the genus *Cladosporium*.

There is no consistent conclusion of the fungicidal effectiveness of 7 kGy and dose ratio (0,1 and 9,8 Gy/s) to the members of the natural mycobiota on linen and paper due to the hot-spot contamination phenomena on these materials.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI MIKOBIOTE PLATNA I PAPIRA NA GAMA ZRAČENJE

Daria Štrenja

#### SAŽETAK

U ovom radu je ispitivana osjetljivost prirodne mikrobiote platna i papira te namjerno inokuliranih plijesni *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium spaherospermum* i *Trichoderma harzianum* na gama zračenje. Ove vrste su česti kolonizatori predmeta kulturne baštine koji uslijed toga propadaju. U eksperimentu se ograničilo na platno i papir kao materijale koji zbog organskog sastava (jedna od glavnih sastavnica je celuloza, izvrstan izvor nutrijenata za plijesan), lako podliježu kolonizaciji ovim mikroorganizmima. Doza zračenja iznosila je 7 kGy, a bila je primijenjena kod dvije brzine doze; 0,1 Gy/s i 9,8 Gy/s. Učinci su se mjerili praćenjem rasta plijesni 0., 7., 14. i 28. dan od zračenja. Rezultati su pokazali kako je 7 kGy dovoljno da nepovratno ošteti inokulirane plijesni *Aspergillus jensenii* i *Trichoderma harzianum*, neovisno o brzini doze zračenja. Kada se radi o *Cladosporium spaherospermum*, uočeno je da ova plijesan uspijeva preživjeti i razmnožavati se ako se zrači manjom brzinom doze, stoga, da bi dekontaminacija bila uspješna, nužno je dozu od 7 kGy primijeniti većom brzinom doze. Prirodna mikobiota obuhvaćala je vrste iz rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, kvasce i nekoliko drugih. Među njima, najotporniji prema zračenju bili su kvasci i vrste iz roda *Cladosporium*. O fungicidnoj učinkovitosti doze od 7 kGy i brzine doze (0,1 i 9,8 Gy/s) na pripadnike prirodne mikrobiote platna i papira ne može se izvesti dosljedan zaključak zbog postojanja fenomena točkaste kontaminacije ovih materijala.

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

Rad sadrži: 21 stranicu, 7 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kulturna baština, gama zračenje, plijesni

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, izvanredna 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  
Department of microbiology  
Schrottova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### SUSCEPTIBILITY OF LINEN AND PAPER MYCOBIOTA TO GAMMA-IRRADIATION

**Daria Štrenja**

#### SUMMARY

This study was aimed to investigate the sensitivity of natural mycobiota of linen and paper as well as inoculated colonizers *Aspergillus jensenii*, *Cladosporium spaherospermum* and *Trichoderma harzianum* to gamma radiation. These types of molds are frequent colonizers of cultural heritage, which cause its deterioration. In the experiment we used linen and paper as model materials that contain organic compounds (one of the main components is cellulose, an excellent source of nutrients for molds) and therefore is easily colonized with these microorganisms. The dose of radiation was 7 kGy, and was applied in two different velocities; 0.1 Gy/s and 9.8 Gy/s. Effects were measured by monitoring the growth of mold on 0th, 7th, 14th and 28th day of radiation. The results showed that 7 kGy irreversibly damage *Aspergillus jensenii*, and *Trichoderma harzianum*, regardless of dose ratio. When it comes to *Cladosporium spaherospermum*, it was observed that the mold manages to survive and reproduce if radiated at lower velocity, so it is necessary to apply the dose at higher velocity to achieve a successful decontamination. Natural mycobiota included the species of the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, yeasts and a few others. Among them, the most resistant to radiation were yeasts and species of the genus *Cladosporium*. There is no consistent conclusion of the fungicidal effectiveness of 7 kGy and dose ratio (0.1 and 9.8 Gy/s) to the members of the natural mycobiota on linen and paper due to the hot-spot contamination phenomena on these materials.

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

Thesis includes: 21 pages, 7 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cultural heritage, gamma irradiation, moulds

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

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Branka Mihaljević, Ph.D.** Research Scientist, 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.