Utjecaj gama zračenja na sastav mikobiote slikarskog platna

Ivin, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:276335

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Marijana Ivin

Utjecaj gama zračenja na sastav mikobiote slikarskog platna

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Povrh svega, zahvaljujem se mentorici prof. dr.sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu, ukazanom strpljenju i pruženom znanju koji su omogućili izradu i pisanje diplomskog rada kao i dr. sc. Branki Mihaljević, voditeljici Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković na suradnji prilikom zračenja uzoraka. Također, uvelike se zahvaljujem ostalim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju koji su mi nesebično pomagali u izvedbi diplomskog rada i koji su mi svakodnevni boravak u laboratoriju učinili zanimljivijim. Konačno jedno veliko hvala ide mojoj obitelji na ukazanom povjerenju i potpori kao i mojim prijateljima koji su me podržavali tijekom cijelog studiranja i cijeli proces učinili lakšim.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine 1
1.2 Metode dekontaminacije predmeta kulturne baštine 6
1.3 Gama zračenje 8
1.3.1 Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine 9
2 OBRAZLOŽENJE TEME 13
3 MATERIJALI I METODE 14
3.1 Ispitavanje sastava prirodne mikobiote na lanenom platnu metodom razrjeđenja 14
3.2 Priprema uzoraka za zračenje 15
3.3 Zračenje uzoraka 15
4 REZULTATI I RASPRAVA 16
5 ZAKLJUČCI 31
6 LITERATURA 32
7 SAŽETAK/SUMMARY 35
Temeljna dokumentacijska kartica 37
Basic documentation card 38

1 UVOD

1.1 Plijesni kao kontaminanti predmeta kulturne baštine

Pojam kulturne baštine definiran je sveukupnim tvorbama ili pojavama u materijalnom i duhovnom životu svakog naroda i čovječanstva u cjelini, kao nasljeđe koje preci ostavljaju svojim potomcima. On obuhvaća predana nam dostignuća u jeziku i književnosti, graditeljstvu i likovnim umjetnostima, uključujući narodnu umjetnost, u glazbi, kazalištu, filmu, znanosti i u drugim područjima koja zajedno čine ukupnost kulture (Šošić, 2014). S obzirom da se radi o kulturnim manifestacijama koje je ljudski rod naslijedio od svojih predaka, razumljiva je potrebitost očuvanja ovakvog blaga kako bi ga u njegovom punom sjaju, naraštaji koji će tek doći, jednako mogli doživjeti. Uslijed dugogodišnjeg postojanja, predmeti kulturne baštine sve su podložniji kako mehaničkoj, tako i kemijskoj degradaciji, a također i biodeterioraciji od strane živih organizama poput bakterija, gljivica te insekata. Premda se zapisi o postojanju biodeterioracije mogu pronaći još u Bibliji gdje su opisani slučajevi crvenih i zelenih „leproza" unutar kuća, još su se do nedavno glavnim krivcem propadanja materijalnog blaga smatrali fizički i kemijski procesi. Zadnjih se nekoliko desetljeća velika važnost ipak usmjerila prema bakterijama i gljivicama kao glavnim uzročnicima estetskog uništavanja predmeta kulturne baštine. Kako mikroorganizmi vrlo jednostavno nastanjuju te prodiru unutar materijala od kojih su predmeti kulturne baštine sačinjeni, svojim metabolizmom uzrokuju kiselinsku koroziju, enzimatsku razgradnju i mehanički napad, što rezultira njihovom degradacijom (Sterflinger i Piñar, 2013)

Plijesni su eukariotski organizmi, pripadnici carstva gljiva. Ubikvitarni su mikroorganizmi te ih pronalazimo u zraku, zemlji, vodi, biljkama i životinjama, a također i koži te sluznicama čovjeka gdje čine dio mikrobiote (Volner i sur., 2005). Oni su višestanični organizmi građeni od mikroskopski sitnih razgranatih hifa koje čine gustu mrežu, micelij. Prema njegovoj funkciji, razlikujemo vegetativni ili bazalni micelij koji prodire u hranjivu podlogu i crpi hranu, odnosno zračni ili fertilni micelij koji se uzdiže iznad podloge i nosi strukture za razmnožavanje. Tijekom rasta i razmnožavanja plijesni produciraju mnoge izvanstanične enzime potrebne za razgradnju složenih makromolekula čije produkte koriste kao izvor hranjivih tvari za svoj metabolizam. Osim primarnih metabolita potrebnih za rast stanica plijesni, neke od njih produciraju i sekundarne metabolite, antibiotike i mikotoksine. Nadalje,

plijesni mogu stvarati spolne i nespolne spore čija je uloga razmnožavanje, širenje, a također i zaštita vrste od štetnih okolišnih uvjeta (Mlinarić-Missoni i Kalenić, 2013).

Premda se na prvi pogled oni ne čine idealnim supstratima za rast mikroorganizama, fenomen biodeterioracije može se uvelike opaziti na površini kamena i ostalih građevinskih materijala poput betona, žbuke, stakla i metala koji se koriste u arhitekturi. S obzirom na klimatske uvjete, u područjima s umjerenom ili vlažnom klimom prevladavaju plijesni roda *Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Aureobasidium* i *Phoma* dok u područjima s ekstremnom sušnom klimom prevladavaju crne plijesni. Upravo su te crne plijesni kojima pripadaju rodovi *Hortaea, Sarcinomyces, Coniosporium, Capnobotryella, Exophiala, Knufia* i *Trimmatostroma* poznate kao vrlo erozivne vrste koje u kamenu, mramoru i vapnencu formiraju udubljenja promjera i do dva centimetra (Sterflinger i Piñar, 2013).

Osim građevina, od velike su važnosti murali koji ukrašavaju zidove brojnih crkvi, kapelica i dvoraca, građevina koje svojom konstrukcijom stvaraju jedinstvenu poluzatvorenu i stabilnu okolinu za razvoj mikroorganizama (Gorbushina i sur., 2004). Takvi uvjeti pogoduju rastu velikog broja različitih mikroorganizama koji stvarajući biofilm podržavaju međusoban rast. Plijesni u takvim uvjetima preživljavaju zahvaljujući hranjivim tvarima nakupljenim u slojevima prašine, ali također i korištenjem sastavnih dijelova slika kao izvor ugljika što postepeno dovodi do propadanja materijala. Osim navedenog, uslijed prodiranja hifa plijesni u materijale na koncu dolazi i do fizičkog oštećenja materijala. Kroz povijest su se u slikarstvu, ali i prilikom izrade ostalih umjetnina, koristili brojni materijali organskog podrijetla dok se neki od njih još uvijek koriste prilikom restauracije (Gorbushina i Petersen, 2000; Sterflinger, 2010). Tijekom ukrašavanja umjetnina kožnim predmetima, tekstilom i glinom, korištena su ljepila izrađena od zečje kože i celuloze, dok su se zlatni ukrasi za podlogu lijepili ljepilima baziranim na lanenom i terpentinskom ulju (Sterflinger, 2010). Knjige i svitci načinjeni od papira, papirusa i pergamenta, također nisu pošteđeni oštećenja. Tipični kolonizatori papirnih dokumenata u knjižnicama su spororastuće askomicete, a također gljivice rodova *Aspergillus, Paecilomyces, Chrysosporium, Penicillium* i *Cladosporium*. Novija istraživanja uz gljivičnu aktivnost na papiru i platnu povezuju pojavu smećkasto-crvenih mrlja, odnosno pojam „foxing“(engl.)(Sterflinger i Piñar, 2013). Nadalje, metabolički produkti hidrolize molekule celuloze poput kiselina (oksalna, glukuronska itd.) i pigmenata (karotenoidi, antrakinoni itd.) dovode do promjene svojstava papira, on postaje žut, gubi elastičnost i blijedi (Garg i sur., 1995). Do velikog porasta broja plijesni u knjižnicama, arhivima ili muzejima dolazi kad voda

odjednom postane dostupna kao npr. za vrijeme poplava. U tom slučaju, pojavljuju se plijesni kojima je za život potreban visok aktivitet vode ($a_w > 0,9$). One svojim djelovanjem stvaraju obojene mrlje (npr. *Chaetomium* spp., *Monoascus* spp., *Epicoccum* spp.), neugodan miris (npr. *Trichoderma* spp.) ili mikotoksine (npr. *Stachybotrys* spp.) (Sterflinger i Piñar, 2013). S obzirom na povoljnost rasta plijesni na predmetima kulturne baštine uslijed enormnog izvora nutrijenata, shvaćamo važnost manipulacije ostalim okolišnim čimbenicima na mjestima skladištenja kako bismo ipak smanjili njihov rast.

Plijesni u zatvorene prostore poput muzeja, galerija, arhiva i knjižnica, najčešće dospijevaju sporama iz zraka. Na njihov razvoj u takvim prostorima utječe unutrašnja klima, količina dostupnih nutrijenata bilo iz atmosfere ili samih materijala, održavanje prostora poput učestalosti čišćenja te svojstva prostora kao takvih, ponajviše njihova termalna izolacija i kondenzacija toplog unutrašnjeg zraka na hladnim zidovima zgrade. Unutrašnja je klima određena temperaturom i relativnom vlažnosti koji su uz prisutnost sunčeve svjetlosti, anorganskih i organskih onečišćenja, vrlo važni uvjeti za rast plijesni (Lavin i sur., 2014). Prema zaključku Sterflinger (2010) i Nielsena (2003) čak i u prostorima u kojima je zabilježena vrlo niska relativna vlažnost, uslijed loše ventilacije kako i nejednolike temperature, dolazi do stvaranja lokalne mikroklime s većim udjelom vode što pogoduje razvoju samih plijesni. Stoga je zaključeno da je aktivitet vode, a_w, bolja veličina za procjenu rasta plijesni od relativne vlažnosti (Lavin i sur., 2014; Sterflinger, 2010; Nielsen, 2003; Montegut i sur., 1991). Aktivitet vode, a_w, je fizikalno-kemijska veličina koja kvantificira vezu između vlage u supstratu i mogućnosti rasta mikroorganizma u takvom supstratu. Definirana je omjerom parcijalnog tlaka vodene pare u materijalu i tlaka zasićene pare čiste vode pod istim uvjetima te za čistu destiliranu vodu iznosi 1 (Pitt i Hocking, 2009). S obzirom na vrijednosti a_w, plijesni se dijele u tri skupine:
Primarne kolonizatore koji rastu pri $a_w < 0,80$ (kserofilne vrste) , sekundarne kolonizatore koji rastu pri a_w između 0,80 i 0,90 i tercijarne kolonizatore koji rastu pri $a_w > 0,9$ (hidrofilne vrste) (Tablica 1. Količina vlage potrebna za rast mikroorganizama; WHO, 2009)

Tablica 1. Količina vlage potrebna za rast mikroorganizama

Količina vlage	**Kategorija mikroorganizma**
Visoka (a_w > 0.9)	Tercijarni kolonizatori *Alternaria alternata* *Aspergillus fumigatus* *Epicoccum* spp. *Exophiala* spp. *Fusarium moniliforme* *Mucor plumbeus* *Phoma herbarum* *Phialophora* spp. *Rhizopus* spp. *Stachybotrys chartarum* (*S.atra*) *Trichoderma* spp. *Ulocladium consortiale* *Rhodotorula* spp. *Sporobolomyces* spp. aktinobakterije (ili aktinomicete)
Srednje visoka (a_w, 0.80 - 0.90)	Sekundarni kolonizatori *Aspergillus flavus* *Aspergillus versicolor* *Cladosporium cladosporioides* *Cladosporium herbarum* *Cladosporium sphaerospermum* *Mucor circinelloides* *Rhizopus oryzae*
Niska (a_w < 0.80)	Primarni kolonizatori *Alernaria citri* *Aspergillus* (*Eurotium*) *amstelodami* *Aspergillus candidus* *Aspergillus (Eurotium*) *glaucus* *Aspergillus niger* *Aspergillus penicilioides* *Aspergillus* (*Eurotium) repens* *Aspergillus restrictus* *Aspergillus versicolor* *Paecilomyces variotii* *Penicillium aurantiogriseum* *Penicillium brevicompactum* *Penicillium chrysogenum* *Penicillium commune* *Penicillium expansum* *Penicillium griseofulvum* *Wallemia sebi*

Osim utjecaja na strukturu i izgled predmeta i građevina kulturne baštine, produkcijom mikotoksina plijesni nepovoljno utječu i na zdravlje ljudi u njihovoj neposrednoj blizini.

Mikotoksini su nehlapljivi organski spojevi, produkti sekundarnog metabolizma gljivica rodova *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* i *Stachybotrys*. Najbolje proučeni mikotoksini su aflatoksini, ohratoksini, ergotski alkaloidi, trihoteceni, zearalenoni i fumonizini koji kod ljudi uzrokuju mikotoksikoze uslijed ingestije, inhalacije u dišni sustav ili izravnim kontaktom s kožom (Tablica 2. Mikotoksikoze, uzročni mikotoksini i vrste plijesni koje ih stvaraju te kliničke prezentacije u ljudi; Mlinarić-Missoni, 2013). Najtoksičniji među njima je aflatoksin B_1 (AFB_1), produkt vrsta *A.flavus* i *A.parasiticus* karakteriziran snažnom hepatotoksičnošću (citotoksično i imunosupresivno djelovanje), visokim mutagenim i karcinogenim djelovanjem (International Agency for Research on Cancer, 1993). Mehanizam karcinogeneze uključuje aktivaciju proto-onkogena i mutaciju tumor-supresorskog gena p53. Danas je potvrđena povezanost aflatoksikoze s razvojem karcinoma jetre, kao i povećani rizik za razvoj hepatocelularnog raka u osoba inficiranih virusom hepatitisa B. Plijesni vrste *Fusarium* istovremeno produciraju fumonizine, zearalenone i fusarinske kiseline. Fumonizini u ljudi mogu uzrokovati ezofagealni karcinom i defekt neuralne cijevi dok su zearalenoni povezani s hiperestrogenim sindromom (Mlinarić-Missoni, 2013; Aquino, 2011). Dok je većina mikotoksina imunotoksična, trihoteceni u niskim dozama mogu imati imunostimulacijski učinak (WHO, 2009). Osim mikotoksina, određene plijesni produciraju i fungalne alergene, glikopeptide enzimatskog djelovanja. Moguće ih je pronaći u sporama, hifama i fungalnim fragmentima, a u najvećoj količini tijekom germinacije i rasta micelija. Vrste rodova *Cladosporium, Alternaria* i *Aspergillus* produciraju različite alergene povezane s alergijskim reakcijama u respiratornom sustavu, poput astme. Najznačajniji alergeni su: Cla h I (*Cladosporium herbarum*), Alt a I i Alt a II (*Alternaria alternata*), Asp f I i Asp f III (*Aspergillus fumigatus*). Određene plijesni produciraju i hlapljive metabolite, slične uobičajenim industrijskim kemikalijama poput alkohola, aldehida, ketona, terpena, estera, aromatskih spojeva, amina i spojeva koji sadrže sumpor (WHO, 2009).

Tablica 2. Mikotoksikoze, uzročni mikotoksini i vrste plijesni koje ih stvaraju te kliničke prezentacije u ljudi

Mikotoksikoza	**Mikotoksin**	**Vrsta plijesni**	**Klinička prezentacija**
Akutna aflatoksikoza	Aflatoksin B1	*Aspergillus flavus, A.parasiticus*	Akutni hepatitis
Kronična aflatoksikoza	Aflatoksin B1	*Aspergillus flavus, A.parasiticus*	Karcinom jetre
Balkanska endemska nefropatija	Ohratoksin A	*Aspergillus* spp. , *Penicillium* spp.	Kronički nefritis, tumori bubrega
Ergotizam	Ergotaminski alkaloidi	*Claviceps purpurea*	Gangrena ruku i nogu
Ergotizam	Klavinski alkaloidi	*Claviceps fusiformis*	Neurološki simptomi: konvulzije, halucinacije
Bolest crvene plijesni	Trihoteceni	*Fusarium* spp.	Povraćanje, krvarenje iz probavnog trakta
Alimentarna toksična aleukija	Trihoteceni - T2	*Fusarium* spp.	Krvarenje iz probavnog trakta
Stahibotriomikoza	Trihoteceni - T2	*Stachybothrys* spp.	Dermatitis, iritacija dišnog trakta, umor

1.2 Metode dekontaminacije predmeta kulturne baštine

Budući da su plijesni najdominantniji organizmi odgovorni u biodeterioraciji predmeta kulturne baštine, pronalazak najučinkovitijih postupaka u smanjivanju njihovog broja velik je izazov za restauratore, kustose i znanstvenike. Za očuvanje predmeta kulturne baštine od velike je važnosti ne samo kontrolirati aktivnost rastućih gljivica, već i ukloniti ili smanjiti broj spora, progenitora budućeg rasta gljivica, struktura koje služe u preživljavanju teških uvjeta. U stanju mirovanja, spore imaju niski sadržaj vode te je njihov metabolizam inaktivan, ali reverzibilan, u iščekanju boljih uvjeta rasta. Stoga bi konzervacijski postupci trebali većinski biti okrenuti prema uništavanju spora, s obzirom da je vegetativne oblike mnogo jednostavnije kontrolirati održavanjem propisanih konzervacijskih uvjeta (Michalesen i sur., 2013).

Metode zaštite od biodeterioracije uključuju preventivne postupke, odnosno održavanje temperature i aktiviteta vode pri vrijednostima koje će onemogućiti rast plijesni, kao i provođenje kurativnih, interventnih metoda nakon izbijanja infekcije, pri kojima se u obzir valja uzeti stanje u kojem se materijal nalazi, vrstu nametnika te najmanji mogući utjecaj na okoliš (www.lib.irb.hr). Konzervacijske metode korištene u zaštiti predmeta kulturne baštine

dijelimo na kemijske i fizikalne. Premda postoji široka paleta biocidnih spojeva, tek je mali broj onih koji su svojim djelovanjem kompatibilni s materijalima povijesnih predmeta i ne dovode do oštećenja istih. Najčešće korišteni su biocidi koji otpuštaju formaldehid, kvaterni amonijevi spojevi dužine lanaca od 14-16 ugljikovih atoma, izotiazolin, koji se pokazao također i preventivnim na papirnim predmetima te etanol čiji se fungitoksičan učinak može vidjet uslijed kontakta od 2-3 minute. Fumigacija etilen oksidom u svrsi dekontaminacije predmeta kulturne baštine provodi se još od 1933. godine. Dodavanjem alkilnih skupina DNA, RNA ili proteinima, etilen oksid prevenira stanični metabolizam i mogućnost reprodukcije, što dovodi do inaktivacije mikroorganizama. Međutim u mnogim je zemljama njegova upotreba zabranjena uslijed visoke toksičnosti i štetnosti za okoliš, niske penetrabilnosti unutar materijala, a također i povećane osjetljivosti obrađenog materijala od novog napada za razliku od netretiranog. Fumigacija metil bromidom te sulfuril fluoridom također je zabranjena (Michaelsen i sur., 2013; Sterflinger i Pinar, 2013; Nunes i sur., 2013; www.h-r-z.hr). Osim kompatibilnosti s materijalima koji se obrađuju, veliki je izazov u odabiru biocida s obzirom na miješane kulture mikroorganizama prisutnih u samom materijalu koji različito odgovaraju na njihovu primjenu. Opisani su slučajevi razvoja mnogo rezistentnijih sojeva gljivica nakon ponovljene primjene kvaternih amonijevih spojeva u dekontaminaciji zidnih slika u špilji Sv. Pavla u Turskoj. Također, u špiljama Lascaux u Francuskoj gdje su primjenjivani antibiotici poput penicilina, streptomicina i kanamicina, različiti spojevi na bazi benzalkonij klorida i izotiazolin, došlo je do pojave bijelih mrlja uzrokovanih porastom *Fusarium solani*, rasta rezistentnog *Pseudomonas fluorescens*, a također i do pojave melaniziranih gljivica poput *Ochroconis lascauxensis*, *O.anomala* i *Exophiala castellanii* (Sterflinger i Pinar, 2013.). U fizikalne metode ubrajaju se radijacijski postupak, tretman UV zrakama, ultrazvukom i strujom (Michelsen i sur., 2013; Sterflinger i Piñar, 2013; www.lib.irb.hr). Michaelsen i suradnici u konzervaciji papira navode i metodu sušenja smrzavanjem (eng. freeze-drying) kod koje se voda smrzne, a potom sublimacijom ukloni. Sublimacija omogućava uklanjane vode bez isparavajuće sile vode koja može dovesti do dimenzijskih promjena. Nadalje, sušenje smrzavanjem uz dehidraciju može uništiti hidrirane konidije i germinativne konidije što sprječava daljni rast micelija gljivica. Međutim, ukoliko sadržaj vlage unutar odmrznutog materijala ostane visok, preostale suhe konidije mogu se ponovno aktivirati. Smrzavanje također može povećati poroznost i debljinu organskog materijala i učiniti ga higroskopnijim. Premda se navedena metoda ne smatra dezinfekcijskom metodom, sušenje smrzavanjem je najučinkovitija metoda poznata po kemijskoj, fizikalnoj i biološkoj stabilizaciji vodom oštećenog materijala, pogotovo kad se u

obzir uzimaju velike količine materijala koje je potrebno sanirati u što kraćem vremenu (Michaelsen i sur., 2013). Trandafir i suradnici (2014) čak smatraju da nije potrebno, a ni praktično u potpunosti ukloniti spore plijesni jer i ukoliko se ono postigne, rezultat bio bio tek privremen jer će nove spore nošene zrakom neprekidno padati na obrađene predmete. U ovom je radu korištena fizikalna metoda dekontaminacije materijala primjenom ionizirajućeg gama zračenja.

1.3 Gama zračenje

Zračenje ili radijacija je pojava prijenosa energije pomoću energetskih čestica ili energetskih valova kroz materiju. Zračenje se može podijeliti na ionizirajuće i neionizirajuće zračenje. Ionizirajuće zračenje je pojava prijenosa energije u obliku fotona ili masenih čestica koje ima dovoljno energije da u međudjelovanju s kemijskom tvari ionizira tu tvar.

Ovisno o omjeru neutrona i protona u jezgri, izotop određenog elementa može biti stabilan ili nestabilan. Ukoliko energija vezanja nije dovoljno jaka u održavanju stabilnosti jezgre, atom postaje nestabilan. Atomi s nestabilnim jezgrama podložni su konstantnoj promjeni uslijed neravnoteže energije unutar same jezgre. Tijekom vremena, jezgre nestabilnih atoma spontano se raspadaju ili transformiraju u procesu znanom kao radioaktivni raspad. Nuklidi koji podliježu radioaktivnom raspadu nazivaju se radionuklidima, a materijal koji sadrži mjerljivu količinu jednog ili više radionuklida je radioaktivni materijal. Kad se atom podvrgne radioaktivnom raspadu, on emitira jednu ili više oblika zračenja sa količinom energije dovoljnom za ionizaciju atoma s kojima stupa u interakciju (www.nde-ed.org).

Učinci zračenja na mikroorganizme ovise o valnoj duljini, brzini zračenja, vremenu izloženosti zračenju, ali također i o karakteristikama samih mikroorganizama te materijalu kojeg se ozračuje. Energija gama zračenja koja se primjenjuje u radijacijskoj obradi predmeta kulturne baštine ne pobuđuje jezgre atoma ozračenog objekta, što znači da ne dolazi do generiranja sekundarne radioaktivnosti. Biocidni učinak gama zračenja na staničnoj razini temeljen je na direktnoj ionizaciji DNA molekule mikroorganizma i indirektnom učinku putem radiolize vode. Radiolizom vode dolazi do produkcije vrlo reaktivnih slobodnih radikala poput hidroksil radikala (OH•) koji interferiraju s molekulom DNA mikroorganizma, uzrokujući njezino oštećenje (Aquino, 2011; www.h-r-z.hr; www.lib.irb.hr).

Najvažniji parametar radijacijskog postupka je apsorbirana doza zračenja, a njezin odabir ovisi o početnoj razini biološke kontaminacije, radioosjetljivosti kontaminacijske flore i prihvatljivom faktoru redukcije nametnika. Apsorbirana je doza definirana energijom zračenja apsorbiranoj po jedinici mase, a mjerna jedinica joj je grej (Gy). Brzina apsorbirane doze određena je omjerom povećanja apsorbirane doze i vremena u kojem je to povećanje nastalo pa je mjerna jedinica grej u sekundi (Gy/s). Brzina apsorbirane doze ovisi o jačini polja, definirana je brojem raspada u vremenu (aktivnost izvora), a smanjuje se s kvadratom udaljenosti od izvora. U laboratoriju za radijacijsku obradu bira se najmanja doza koja neće izazvati nepoželjne učinke po zdravlje ljudi, ali će osigurati kvalitetnu konzervaciju (www.h-r-z.hr; www.lib.irb.hr).

Gama zračenje svoju je primjenu započelo još 1960.-ih godina, a danas se koristi u terapiji tumora (Gamma-knife), u zdravstvenoj dijagnostici te prilikom sterilizacije kozmetičkih, farmaceutskih, medicinskih te prehrambenih proizvoda. U ove svrhe, najčešće je korišten radionuklid kobalt-60, čije je poluvrijeme života 5,27 godina (International Atomic Energy Agency, 2011).

U tablici 3 prikazane su letalne doze zračenja na pojedine organizme (Aquino, 2011).

Tablica 3. Letalne doze ionizirajućeg zračenja

Organizmi	**Doze (kGy)**
Ljudi	0,0056-0,0075
Insekti	22-93
Virusi	10-40
Kvasci	4-11
Plijesni	1,3-11
Escherichia coli	1,0-2,3
Salmonella spp.	3,7-4,8
Bacillus subtilis (spore)	12-18
Clostridium botulinum (A) (spore)	19-37
Staphylococcus aureus	1,4-7

1.3.1 Primjena gama zračenja u očuvanju predmeta kulturne baštine

Gama zračenje kao metoda interventne konzervacije učinkovita je u mikrobiološkoj dekontaminaciji predmeta kulturne baštine, a zbog svojih prednosti u usporedbi s drugim

konzervacijskim metodama, favorit je u ovoj svrsi već dugi niz godina: visoko je pouzdana metoda, relativno brza i ekonomična s obzirom da se veći broj predmeta istovremeno može tretirati; učinkovitost zračenja proporcionalna je apsorbiranoj dozi koja je lako mjerljiva i koja se lako kontrolira; ne selektivna je pa djeluje na sve štetne organizme u svim fazama njihova razvoja te osigurava odličan biocidni učinak uslijed dobre penetrabilnosti unutar tretiranog materijala; na ozračenim predmetima nema zaostale radioaktivnosti pa nema ni opasnosti za restauratore, kustose, posjetitelje, a ni za okoliš. Međutim, interakcija gama zračenja s bilo kojom tvari organskog podrijetla može rezultirati promjenom u izgledu i strukturi iste. Kako su učinci kumulativni, a promjene proporcionalne dozi zračenja, prilikom ponavljanja zračenja potrebno je ove učinke uzeti u obzir (Ponta, 2008; www.h-r-z.hr).

Osjetljivi celulozni materijali odličan su supstrat za rast gljivica koje korištenjem istog kao izvora hrane, a i otpuštanjem metabolita dovode do smanjenja stupnja polimerizacije te gubitka mehaničkih svojstava. S obzirom na stanje takvih materijala potrebno je odabrati odgovarajuću dozu zračenja koja će ujedno ukloniti kontaminante, ali i s druge strane ne uzrokovati dodatnu degradaciju. Dovoljne doze zračenja za uništavanje većine kontaminanata kreću se od 8 do 9 kGy, dok bi za potpuno uništenje plijesni doza odgovarala 18 kGy, međutim tolika bi količina zračenja mogla uzrokovati mehaničke, fizičke i kemijeske promjene u svojstvima celuloze (www.h-r-z.hr). Da Silva i suradnici za dekontaminaciju knjiga koristili su dozu zračenja od 16 kGy, koja se ispostavila učinkovitom te napominju da doza od 20 kGy nije ni potrebna pa čak ni u uklanjanju izrazito rezistentne plijesni *Cladosporium* spp. Također navode da primjena manjih brzina zračenja, odnosno duža izloženost zračenju uzrokuje indirektna oštećenja materijala jer je vrijeme zračenja dovoljno za odvijanje oksidativne razgradnje polimerne strukture celuloze.

U izradi slikarskih djela u povijesti često se koristio kukuruzni škrob kao jedan od veziva koji unutar svoje strukture sadrži određene molekule koje se uslijed ozračivanja takvih uzoraka ponašaju poput zaštitnih faktora, tzv. scavengera, odnosno čistača. Njihova uloga je zaštita spora gljivica na način da su one reagirale sa slobodnim radikalima. Aziz je opisao postojanje korelacije između radiorezistencije spora vrste *Aspergillus flavus* i postotka (20%) ukupnih lipida unutar micelija plijesni. Nadalje, plijesni tijekom svoga rasta produciraju veliki broj metabolita: alkohole, kiseline, polisaharide i steroide, a tako i kompleksnije metabolite poput ergotinina te antibiotika, a također i intracelularne komponente poput pigmenata, aminokiselina, proteina te masnih kiselina. Svi navedeni spojevi zaslužni su za radiorezistenciju plijesni. Bitno je napomenuti da crni pigment, melanin, odlično pridonosi

radiorezistenciji, kao što je ispitano na primjeru plijesni *Alternaria* spp. unutar čijeg micelija je ukoncentriran i koja se pokazala rezistentnom prilikom korištenja doze od 5 kGy. Ispitivanjem uzoraka zemlje prikupljenih u blizini radioizotopom kontaminiranog područja oko reaktora broj 4 u Černobilu, kao predominantna vrsta plijesni bila je *Alternaria alternata* koja se danas koristi kao model u genetičkim studijama rezistencije naspram gama zračenja. Zračenjem uzoraka guarane kontaminiranih plijesnima, doza zračenja od 5 kGy dovela je do uništenja 85% kontaminanata, ali 20% plijesni roda *Cladosporium* i *Rhizopus*, kao i 10% plijesni roda *Penicillium*, regeneriralo se iz tretiranih uzoraka. Doza zračenja od 10 kGy dovela je do potpune dekontaminacije uzoraka (Aquino, 2011).

Prisutnost vode u uzorku ima važnu ulogu u destrukciji aflatoksina djelovanjem grama zračenja jer radioliza molekule vode dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji napadenjem AFB_1 na području terminalnog furanskog prstena, smanjuju njegovu biološku aktivnost. Mutagena aktivnost AFB_1 u vodenoj otopini (5 g μL^{-1} vode) smanjena je za 34%, 44%, 74% i 100% nakon izlaganja gama zračenju u dozama od 2,5; 5; 10 i 20 kGy. Dodatkom 1 mL 5% vodikovog peroksida u vodenu otopinu AFB_1 (50 $\mu g\ mL^{-1}$) rezultiralo je 37-100% uništenju toksina već pri dozi od 2 kGy (Rustom, 1997). Za razliku od aflatoksina, fumonizini iz plijesni *Fusarium verticillioides* su mnogo rezistentniji. Doze zračenja korištene u ovom pokusu iznosile su 5 i 10 kGy, dok je redukcija fumonizina time bila 21% odnosno 62,5%. Doza zračenja od 10 kGy pri uvjetima Aw između vrijednosti 0.83 i 0.86 nije bila učinkovita u potpunoj eliminaciji fumonizina. Razlog tomu je visoka termička i svjetlosna stabilnost ovih toksina. Značajno smanjenje koncentracije fumonizina očekuje se tek primjenom temperatura viših od 218°C tijekom 15 minuta (Ferreira-Castro, 2007; Castelo i sur., 1998; International Agency for Research on Cancer, 1993; Scott, 1993).

Utjecaj veličine inokuluma na produkciju toksina ispitivan je na primjeru vrsta *Aspergillus parasiticus* i *A. flavus*. Medij inokuliran većim brojem spora plijesni koje produciraju aflatoksine pokazao je niže koncentracije aflatoksina od medija inokuliranog manjim brojem spora istih plijesni. Pokazano je kako je produkcija toksina suprimirana kad broj inokuliranih spora po jedinici volumena dosegne određen broj. Jednak je ishod uočen redukcijom kompetitivne flore bilo fumigacijom ili zračenjem, gdje je došlo do pojačanog stvaranja mikotoksina plijesni koje su opstale (Borsa i sur., 1992; Odamtten i sur., 1987; Sharma i sur., 1980). Applegate i Chipley (1976) proveli su istraživanje na plijesni *Aspergillus ochraceus* koju su podvrgnuli gama zračenju koristeći doze od 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 i 1.5 kGy što je rezultiralo povećanom produkcijom ohratoksina A iz ozračenih spora u odnosu na spore koje

nisu podvrgnute zračenju. Povećana i ubrzana produkcija ohratoksina A najviše je uočena kod spora koje su ozračene nižim dozama (0.1, 0.25 i 0.5kGy). Zbog mogućeg preživljavanja određenih spora, potrebno je primijeniti dovoljnu dozu zračenja koja će biti učinkovita u potpunom uklanjanju plijesni. U mnogim je studijama navedeno kako su doze zračenja iznad 10 kGy dovoljne za potpuno uklanjane, premda točan odabir doze ovisi i o uvjetima samog supstrata (sastav, temperatura, a_w). Također, uzorke je potrebno ponovno testirati 7-10 dana nakon ozračivanja kako bi se ustanovilo da nije došlo do stvaranja mikotoksina, što ukazuje na regeneraciju plijesni (Aquino, 2011).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Plijesni su ubikvitarni mikroorganizmi što znači da ih se može pronaći svugdje, u zraku, tlu pa tako i na predmetima kulturne baštine. Budući da su ti predmeti većinski građeni od materijala organskog podrijetla, kao takvi predstavljaju povoljnu podlogu za rast plijesni, što se ponajviše može primijetiti pri uvjetima veće vlažnosti, npr. tijekom nepravilnog skladištenja ili u ekstremnim uvjetima poput poplava. U takvim uvjetima povoljnim za njihov rast, plijesni se vrlo brzo množe te ukoliko se dekontaminacija ne provede na vrijeme, uvelike pridonose propadanju materijala s jedne strane, a s druge proizvodnjom mikotoksina nepovoljno utječu na ljudsko zdravlje.

Gama zračenje je danas jedna od najčešće korištenih metoda dekontaminacije predmeta kulturne baštine. Svojim djelovanjem učinkovito uklanja aktivno rastuće plijesni kao i njihove spore, čime se sprječava njihov ponovni rast. Međutim, za uspješnost postupka potrebno je odabrati dozu zračenja koja će učinkovito ukloniti kontaminante, ali ne dovesti i do promjene u strukturi materijala što bi dodatno doprinjelo njegovom propadanju.

Ciljevi rada uključuju:

1. Proučiti utjecaj gama zračenja kod doza od 2, 7, 20 i 50 kGy pri brzinama zračenja od 0,1 i 9,8 Gy s^{-1} na mikobiotu uzoraka platna.
2. Proučiti utjecaj gama zračenja kod istih doza i brzina zračenja na mikobiotu uzoraka platna koja su prethodno zračenju bila podvrgnuta vlažnoj inkubaciji.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitavanje sastava prirodne mikobiote na lanenom platnu metodom razrjeđenja

Pripremljeni su komadići lanenog platna, dimenzija 3,5 x 3,5 cm, spremljeni u plastičnoj vrećici kako bi se homogenizirali. Vaganjem deset kvadratića platna odredila se prosječna masa koja je iznosila 0,39 g. U sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu (tzv. falkonicu) stave se priređeni kvadratići platna i 4 mL peptonske vode što predstavlja razrjeđenje 10^{-1}. Uzorci se miješanjem pomoću Vortex mješalice homogeniziraju te se pomoću peptonske vode priređuju razrjeđenja u serijalnom nizu od 10^{-1} do 10^{-4}. Iz svakog se priređenog razrijeđenja na površinu sterilne hranjive podloge (Malt ekstrakt agar - MEA) u Petrijevoj zdjelici nanese 100 μL uzorka, a potom sterilnim staklenim štapićem (tzv. L- štapić) razmaže po površini MEA podloge. Uzorci se potom inkubiraju 7 dana na temperaturi od 25°C. Na opisani su način obrađena tri kvadratića platna uzeta sa različitih dijelova ukupne površine.

Nakon perioda inkubacije na pločama se izbroje porasle kolonije pri čemu se u obzir uzimaju isključivo ona razrjeđenja koja sadrže porast manji od 150 kolonija.

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

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

$\sum$C - 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 Priprema uzoraka za zračenje

Uzorci su raspodijeljeni po Petrijevim pločama na način da je svaka sadržavala po tri kvadratića lanenog platna. U svrhu određivanja prirodne točkaste kontaminacije lanenog platna, pripremljeni su uzorci podijeljeni u dvije skupine:

1. Skupina uzoraka: Uzorci koji se ozračuju odmah, bez prethodne inkubacije, a potom nasađuju 0., 7., 14. i 28. dan
2. Skupina uzoraka: Uzorci koji se inkubiraju tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C uz 75% Rv, nakon čega ozračuju, a potom nasađuju 0., 7., 14. i 28.

3.3 Zračenje uzoraka

Zračenje uzoraka provodilo se na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) na panoramskom uređaju sa ^{60}Co izvorom gama zračenja. Obrada različitih materijala koristeći gama zračenje u LRKD provodi se godinama poštujući nacionalni pravilnik (Narodne novine br. 046/1994) te međunarodne propise ISO standarda (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.

Uređaj za ozračivanje u LRKD-u je panoramskog tipa; izvor zračenja se nalazi u prostoriji kad se obavlja ozračivanje, a sklanja se u sigurni položaj kad je potrebno ući u prostoriju za ozračivanje ili kad se uređaj ne koristi. Izvor zračenja ima oblik valjkastog kaveza čije rešetke tvore šipke ^{60}Co. Topografija polja zračenja izmjerena je pomoću etanol - klorbenzenskog dozimetrijskog sustava (Ražem i sur., 1984) u svrhu provjere ispravnosti isporuke preporučenih doza materijalu izloženom zračenju. Temperatura komore za ozračivanje iznosila je oko 18°C.

Pripremljeni uzorci ozračivani su dozama od 2, 7, 20 i 50 kGy, od kojih se dio uzoraka zračio brzinom 0,1 Gy/s, a ostali brzinom 9,8 Gy/s. Rezultati vijabilnosti plijesni prije i nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g, kako je opisano u poglavlju 3.1.

4 REZULTATI I RASPRAVA

U tablici 1 prikazani su rezultati prirodne mikobiote neozračenih uzoraka platna. Kvalitativno gledajući primjećuje se porast različitih vrsta gljivica s dominantnim porastom *Penicillium* spp. Uzorci nemaju potpuno isti sastav mikobiote, kao niti koncentraciju gljivica što pokazuje nehomogenu distribuciju i zastupljenost pojedinih vrsta na platnu, tj. upućuje na tzv. točkastu kontaminaciju.

Tablica 1. Prikaz mikobiote neozračenih uzoraka

Uzorak 1		Uzorak 2	
Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
439,4	*Penicillium* spp. - 100 % Bijela plijesan - 67 % Kvasac - 67 % Ostalo - 33 %	715,2	*Penicillium* spp. - 100 % Bijela plijesan - 33 % Kvasac - 100 %

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablice 2, 3, 4 i 5 prikazuju porast plijesni na uzorcima platna ozračenim dozama 2, 7, 20 i 50 kGy pri brzinama zračenja od 0,1 i 9,8 Gy s^{-1}, nasađenim 0., 7., 14. i 28. dan od tretiranja gama zrakama. Na gotovo svim uzorcima uočen je porast *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., bijele plijesni, kvasaca te ostalih neidentificiranih plijesni (ostale plijesni). Na određenim uzorcima vidljiv je porast vrsta rodova *Wallemia* spp. (tablica 2), *Aspergillus* spp. (tablica 3) te *Aspergillus* iz sekcije *Nigri* (tablica 4).

Tablica 2. Prikaz mikobiote uzoraka ozračenih dozom zračenja 2 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

2kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
0.	2172,7	*Penicillium* spp. - 100% Bijela plijesan - 67 % Kvasac - 100%	939,4	*Penicillium* spp .- 33 % *Cladosporium* spp. - 100 % Bijela plijesan - 67 % Kvasac - 100 % Ostalo - 33 %
7.	333,3	*Penicillium* spp. - 67% Bijela plijesan - 100% Kvasac - 33%	306,1	*Penicillium* spp. - 67 % Bijela plijesan - 67 % Ostalo - 67%
14.	454,55	Bijela plijesan - 67% *Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 100% Ostalo - 67%	66,7	Kvasac - 33% Ostalo - 33%
28.	121,21	Bijela plijesan - 33% *Cladosporium* spp. - 67% *Wallemia* spp. - 33% Ostalo - 33%	60,6	*Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 33%

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablica 3. Prikaz mikobiote uzoraka ozračenih dozom zračenja 7 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

7kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
		Penicillium spp. - 100% *Cladosporium* spp. - 67%		*Penicillium* spp. - 33% *Aspergillus* spp. - 33%

0.	2606,1	Kvasac - 100%	6909,1	*Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 100% Ostalo - 33%
7.	575,8	*Penicillium* spp. - 33% Bijela plijesan - 100% *Cladosporium* spp. - 33% Ostalo - 67%	151,5	*Penicillium* spp. - 33% Bijela plijesan - 33% *Cladosporium* spp. - 33% Ostalo - 33%
14.	666,7	*Penicillium* spp. - 67% Bijela plijesan - 100% *Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 100% Ostalo - 33%	66,7	Bijela plijesan - 67%
28.	100	*Penicillium* spp. - 33% *Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 33%	60,2	*Aspergillus* spp. - 33% *Cladosporium* spp. - 33%

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablica 4. Prikaz mikobiote uzoraka ozračenih dozom zračenja 20 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

20kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
0.	333,33	*Aspergillus* sek. *Nigri* - 33% *Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 33%	500	*Penicillium* spp. - 67% *Cladosporium* spp. - 33% Bijela plijesan - 33% Kvasac - 33% Ostalo - 67%
7.	200	Bijela plijesan - 67% *Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 67%	166,7	Bijela plijesan - 67% Ostalo - 67%
14.	300	*Penicillium* spp. - 33% Bijela plijesan - 67% Kvasac - 33% Ostalo - 33%	33,3	*Cladosporium* spp. - 33%
28.	333,33	*Aspergillus* sek. *Nigri* - 33% Bijela plijesan - 100%	66,7	Kvasac - 33%

		Cladosporium spp. - 67% Ostalo - 33%		

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablica 5. Prikaz mikobiote uzoraka ozračenih dozom zračenja 50 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

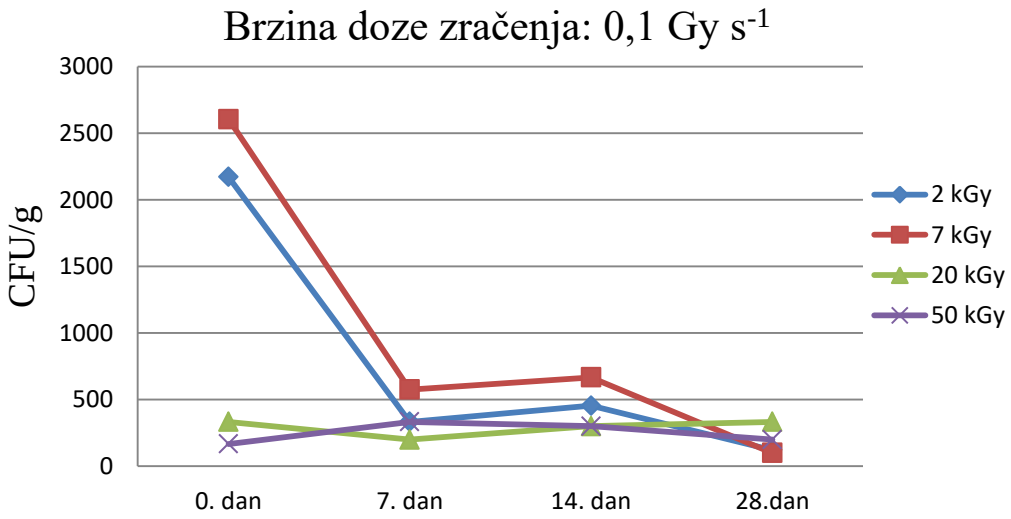
50kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
0.	166,7	*Penicillium* spp.- 33% Bijela plijesan - 33% *Cladosporium* spp. - 33% Ostalo - 33%	200	Bijela plijesan - 33% *Cladosporium* spp. - 33% Kvasac - 67%
7.	333,3	Kvasac - 100%	133,3	Bijela plijesan - 33% Ostalo - 33%
14.	300	*Penicillium* spp. -33% Bijela plijesan - 67% *Cladosporium* spp. - 67% Ostalo - 33%	66,7	Bijela plijesan - 67%
28.	200	Bijela plijesan - 33% *Cladosporium* spp.- 67%	0	/

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

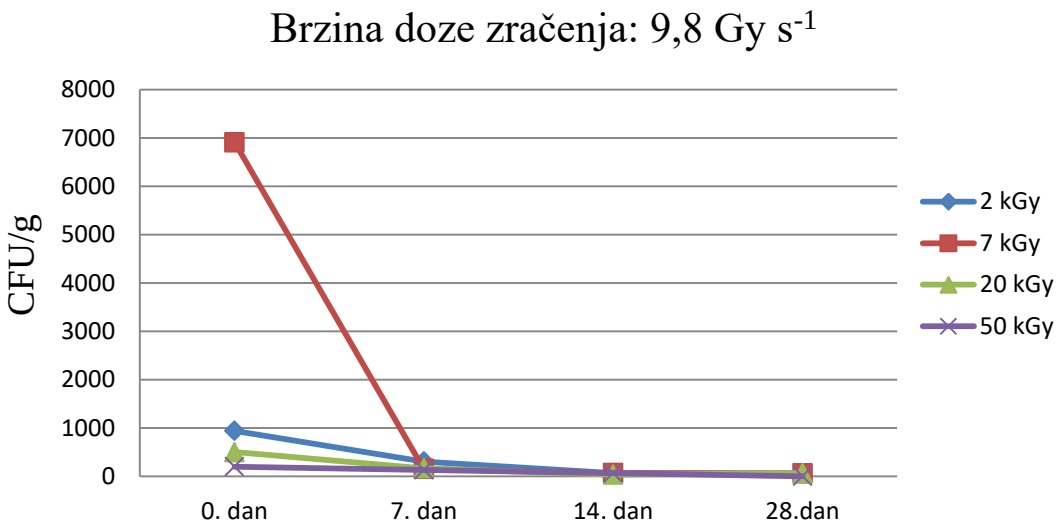
Grafovi 1 i 2 preglednije prikazuju promjenu broja plijesni po gramu materijala (CFU/g) ovisno o vremenu proteklom od dana ozračivanja uzoraka. Najveće promjene uočene su između 0. i 7. dana za doze zračenja od 2 kGy (zabilježen je pad koncentracije plijesni za 6,5 puta) i 7 kGy (zabilježen je pad koncentracije plijesni za 4,5 puta) pri brzini zračenja od 0,1 Gy s^{-1} (graf 1), te između 0. i 7. dana za dozu zračenja od 7 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, gdje je zabilježen pad koncentracije plijesni za čak 45,6 puta (graf 2). Pri obje brzine zračenja i dozama od 20 i 50 kGy primjećen je porast plijesni no znatno manji za razliku od

nižih doza, odnosno kontaminacija plijesni je ostala na razini manjoj od 400 CFU/g. Trend opadanja broja plijesni ovisno o vremenu pri višim dozama zračenja (20 i 50 kGy) nije bio velik. Uspoređujući s brojem plijesni u neozračenim uzorcima (tablica 1), red veličine je kod svih doza zračenja pri brzini zračenja od 0,1 Gy s^{-1} ostao 10^2, dok je kod svih doza pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1} pao na 10^1. S obzirom da je kod svih doza zračenja primjećen manji porast plijesni pri većoj brzini zračenja (9,8 Gy s^{-1}), bitno je naglasiti važnost brzine doze zračenja u učinkovitosti dekontaminacije uzoraka.

Na svim ozračenim uzorcima primjećen je porast plijesni, osim na uzorcima ozračenim dozom od 50 kGy i brzinom zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, nasađenim 28.dan od tretiranja gama zrakama, kao što je vidljivo u tablici 5, odnosno grafu 2.



Graf 1. Prikaz ovisnosti promjene CFU/g o vremenu pri brzini zračenja od 0,1 Gy s^{-1}



Graf 2. Prikaz ovisnosti promjene CFU/g o vremenu pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}

U tablici 6 prikazani su rezultati mikobiote neozračenih uzoraka platna nakon 7 dana inkubacije na 25°C pri Rv od 75%. U oba uzorka zabilježen je porast *Penicillium* spp. koji je kvantitavno mnogo veći od onog u uvijetima bez inkubacije (tablica 1). Razlog tome je podvrgavanje uzoraka vlažnoj inkubaciji koja je osigurala povoljne uvjete za brži i brojčano veći rast plijesni.

Tablica 6. Prikaz mikobiote neozračenih uzoraka, inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75%

Uzorak 1		Uzorak 2	
Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
768787,9	*Penicillium* spp. - 67 %	1367000	*Penicillium* spp. - 67 %

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablice 7, 8, 9 i 10 prikazuju porast plijesni na uzorcima platna podvrgnutih vlažnoj inkubaciji tijekom 7 dana, a potom ozračenim dozama 2, 7, 20 i 50 kGy pri brzinama zračenja od 0,1 i 9,8 Gy s^{-1}, nasađenim 0., 7., 14. i 28. dan od tretiranja gama zrakama. Kao što je već primijećeno na uzorcima platna koji nisu inkubirani prethodno ozračivanju, najučestaliji kontaminanti su *Penicillium* spp. bijela plijesan, kvasci te ostale plijesni. Zanimljivo je da je porast *Cladosporium* spp. na uzorcima prvog dijela eksperimenta bio jedan od najučestalijih, dok se na uzorcima iz drugog dijela eksperimenta pojavio tek na jednom uzorku platna (tablica 9). Mogući izostanak porasta ove plijesni je uslijed većeg porasta plijesni producenata mikotoksina koji su inhibirali njegov rast. Naime u uzorcima iz drugog dijela eksperimenta zabilježen je znatno učestaliji porast *Aspergillus* spp., kao i *Aspergillus* sekcije *Nigri* (tablice 7 i 9), *Aspergillus* sekcije *Circumdati* (tablica 7), *Aspergillus* sekcije *Versicolores* (tablica 9) te *Aspergillus fumigatus* (tablice 8 i 10), za razliku od uzoraka iz prvog dijela eksperimenta. Nadalje, na određenim je uzorcima uočen porast sluzavih kvasaca čija je pojava moguća uslijed primjene kontaminirane peptonske vode. Uspoređujući rezultate porasta plijesni na uzorcima iz prvog i drugog dijela eksperimenta za znatniji porast različitih plijesni kao i njihovog broja, zaslužna je vlažna inkubacija tijekom 7 dana koja je prethodila gama zračenju. Izostanak porasta plijesni 7. dana za dozu zračenja od 20 kGy, pri brzini od 0,1 Gy s^{-1}, moguće je pripisati fenomenu točkaste kontaminacije. Također, može se zamijetiti povećani porast, ali i otpornost na zračenje plijesni bijelog sterilnog micelija koju bi u budućim istraživanjima valjalo determinirati biološko-molekularnim metodama (PCR).

Tablica 7. Prikaz mikobiote uzoraka inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75% , a potom ozračenih dozom zračenja 2 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

2kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
0.	9757,6	*Penicillium* spp.- 67 % Bijela plijesan - 67 % Kvasac - 67 %	13333,1	*Penicillium* spp. - 100 %

7.	881,8	*Penicillium* spp. -100 % Kvasac - 100 %	21363,7	*Penicillium* spp. - 100 % *Aspergillus* sek. *Nigri* - 33 % Bijela plijesan - 67 % Kvasac - 100 %
14.	27424,2	*Penicillium* spp.- 67 % Bijela plijesan - 100 % Kvasac - 100%	566,7	*Penicillium* spp. - 67 % Bijela plijesan - 33 % *Aspergillus* sek. *Circumdati* - 33 % Kvasac - 33 % Ostalo - 33 %
28.	1848,5	*Penicillium* spp. - 67 % Kvasac, sluzavi - 67 % Kvasac - 33 %	6939,4	*Penicillium* spp. - 100 % Kvasac - 67 % Ostalo - 100 %

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablica 8. Prikaz mikobiote uzoraka inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75% , a potom ozračenih dozom zračenja 7 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

7kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
0.	100	Bijela plijesan - 33 % Ostalo - 33 %	545,5	Kvasac - 33 %
7.	33,3	*Aspergillus fumigatus* - 33 %	1060,6	*Penicillium* spp. - 67 % Bijela plijesan - 100 % Kvasac - 100 %
14.	284,8	*Penicillium* spp. - 33 % Bijela plijesan 67 % Kvasac - 67 %	242,3	*Penicillium* spp. - 33 % Kvasac - 33 % Ostalo - 33 %
28.	1363,6	*Penicillium* spp. - 33 % Kvasac, sluzavi - 100 % Kvasac - 33 %	121,2	*Penicillium* spp. - 33 % Bijela plijesan - 33 % Kvasac - 33 %

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablica 9. Prikaz mikobiote uzoraka inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75% , a potom ozračenih dozom zračenja 20 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

20kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala (CFU/g)	Mikobiota
0.	242,4	*Penicillium* spp. - 33 % Bijela plijesan - 67 %	487,9	*Penicillium* spp. - 100 % Bijela plijesan - 67 % *Aspergillus* spp. 33 %
7.	0	/	454,5	*Penicillium* spp. - 33 % Bijela plijesan - 100 % *Aspergillus* sek. *Versicolores* - 33 % *Cladosporium* spp. - 33 % Kvasac - 33 % Ostalo - 100 %
14.	66,7	Bijela plijesan - 33 % Kvasac - 33 %	33,3	Bijela plijesan - 33 %
28.	272,7	*Penicillium* spp. - 67 % *Aspergillus* sek. *Nigri* - 33 % Kvasac, sluzavi - 100 % Kvasac - 33 %	66,7	*Penicillium* spp. - 33 % Bijela plijesan - 33 %

CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Tablica 10. Prikaz mikobiote uzoraka inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75% , a potomozračenih dozom zračenja 50 kGy, pri brzinama 0,1 Gys^{-1} i 9,8 Gys^{-1}

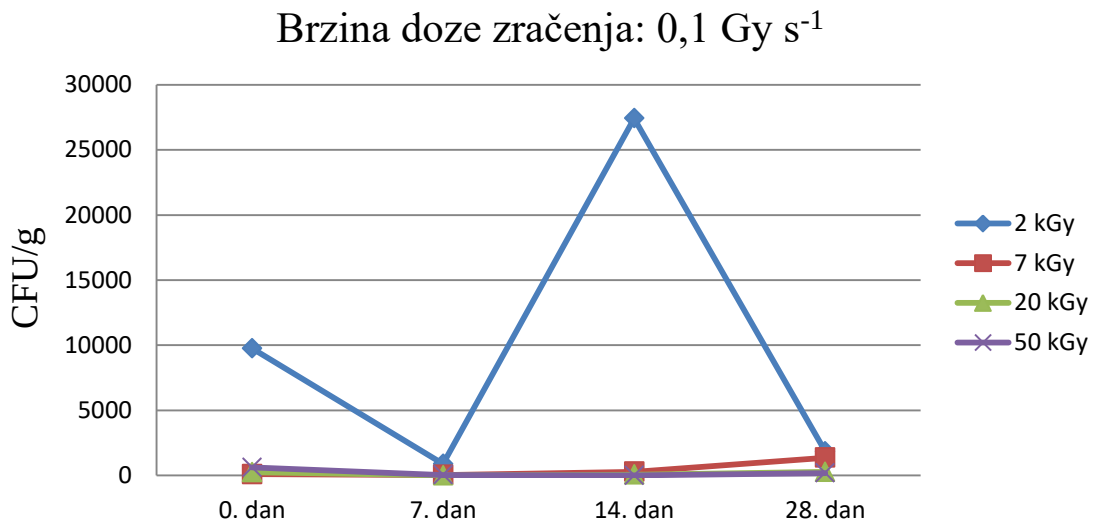
50kGy				
Brzina doze	0,1 Gy s^{-1}		9,8 Gy s^{-1}	
Dani	Broj plijesni po gramu materijala	Mikobiota	Broj plijesni po gramu materijala	Mikobiota

	(CFU/g)		(CFU/g)	
0.	618,2	*Penicillium* spp. - 100 % *Aspergillus* spp. - 33 % Bijela plijesan - 67 % Ostalo - 33 %	272,7	Bijela plijesan - 67 % Ostalo - 33 %
7.	33,3	*Penicillium* spp. - 33 %	184,8	Bijela plijesan - 100 % *Aspergillus fumigatus* - 33 % Kvasac - 33 %
14.	0	/	363,6	Bijela plijesan - 100 % Kvasac - 33 %
28.	181,8	Kvasac, sluzavi - 100 %	66,7	Bijela plijesan - 67 %

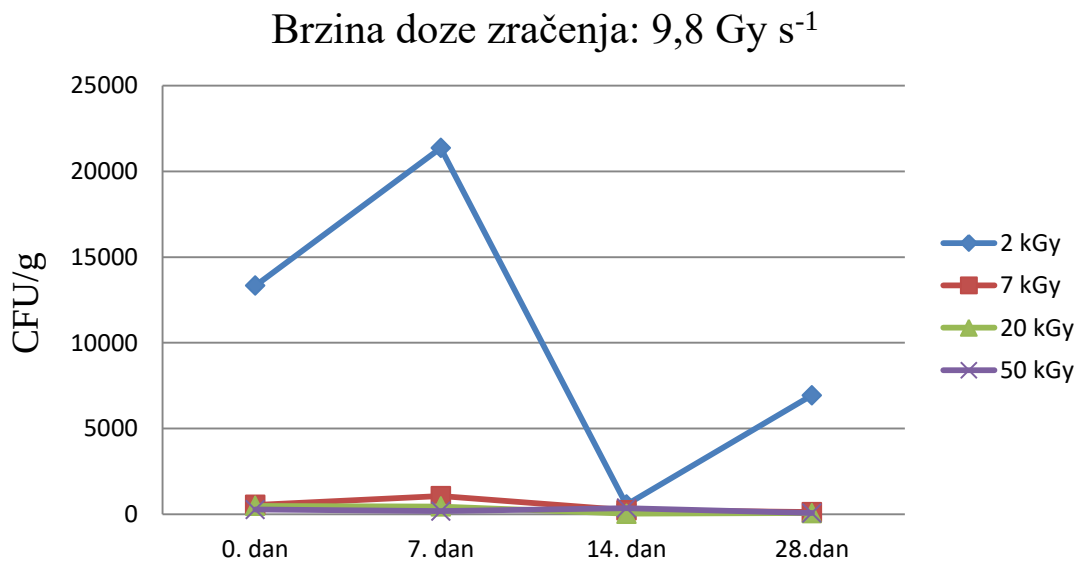
CFU/g - Srednja vrijednost izračunata iz tri nasađena uzorka platna

Grafovi 3 i 4 preglednije prikazuju promjenu broja plijesni po gramu materijala (CFU/g) ovisno o vremenu proteklom od dana ozračivanja uzoraka. Najveća je promjena zabilježena između 0. i 28. dana za dozu zračenja od 2 kGy pri obje brzine zračenja (grafovi 3 i 4). Za brzinu zračenja od 0,1 Gy s^{-1} primjećena je pad koncentracije plijesni za 11 puta (od 0. do 7. dana), zatim porast koncentracije za 31,1 put (od 7. do 14. dana), a potom opet pad koncentracije za 14,8 puta (od 14. do 28. dana). Za brzinu zračenja od 9,8 Gy s^{-1} primjećen je porast koncentracije plijesni za 1,6 puta (od 0. do 7. dan), zatim pad koncentracije za 37,7 puta (od 7. do 14. dana), nakon čega opet porast za 12 puta (od 14. do 28. dana). Ako uspoređujemo s brojem kontaminanata u neozračenim uzorcima (tablica 6) gdje je red veličine iznosio 10^5 odnosno 10^6, u ovim je uzorcima broj plijesni do 28. dana od zračenja smanjen na 10^3 (tablica 7). Slične no znatno manje promjene uočene su i za dozu zračenja od 7 kGy između 7. i 28. dana pri brzini zračenja od 0,1 Gy s^{-1} gdje je zabilježen porast koncentracije plijesni za 41 put (graf 3), te između 0. i 14. dana pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1} gdje je prvo zabilježen porast za 2 puta (od 0. do 7. dana), a potom pad za 4,4 puta (od 7. do 14. dana)(graf 4). Ako uspoređujemo s početnim brojem kontaminanata u neozračenim uzorcima (tablica 6), u ovim je uzorcima broj plijesni do 28. dana od zračenja smanjen na 10^3 (doza zračenja 0,1 Gy s^{-1}), odnosno na 10^2 (doza zračenja 9,8 Gy s^{-1}). Pri obje brzine zračenja i dozama od 20 i 50 kGy primjećen je porast plijesni no njihov je broj ostao na razini manjoj od 300 CFU/g, što je značajno manje u usporedbi s brojem plijesni na neozračenim uzorcima

prikazanim u tablici 1. Gledamo li red veličine, ono se s 10^5 odnosno 10^6 za ove uzorke smanjio na 10^2, odnosno 10^1 (tablice 9 i 10). Smanjen porast plijesni kod svih doza zračenja pri većoj brzini zračenja (9,8 Gy s^{-1}) zabilježen je i u drugom dijelu eksperimenta čime se potvrđuje važnost brzine zračenja u uspješnosti dekontaminacije predmeta. Nedosljednost u trendu opadanja broja plijesni što je prikazano u tablicama 7 i 8, moguća je uslijed pojave određenog stupnja rezistencije naspram gama zračenja.



Graf 3. Prikaz ovisnosti promjene CFU/g o vremenu uzoraka inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75% , a potom ozračenih brzinom zračenja od 0,1 Gy s^{-1}



Graf 4. Prikaz ovisnosti promjene CFU/g o vremenu uzoraka inkubiranih tijekom 7 dana na temperaturi od 25°C pri Rv od 75% , a potom ozračenih brzinom zračenja od 9,8 Gy s^{-1}

Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima iz dostupne literature, vidimo da su različite doze zračenja bile više ili manje uspješne u potpunom uklanjanju kontaminanata na celuloznim materijalima. Prema istraživanju da Silve i suradnika (2006) minimalna doza za uništavanje plijesni iznosila je 16 kGy. Na uzorcima knjiga koje su ispitivali, izolirane su vrste *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp, *Penicillium* spp i *Trichosporon* spp. Nakon primijenjenog zračenja, nije došlo do porasta plijesni. Ozračene knjige potom su čuvali u uvjetima mogućeg ponovnog napada plijesni, no porast nakon 2 mjeseca nije bio primjećen. Za razliku od njih, u istraživanju Tomazella i Wiendla (1995) *Penicillium* spp. su se pokazali rezistentnima pri dozi zračenja od 17,5 kGy, odnosno *Aspergillus* spp. i *Cladosporium cladosporioides* pri dozi zračenja od 20 kGy. Dok je u istraživanju Adama i suradnika (2001) doza od 5 kGy bila dovoljna za eliminaciju *Penicillium* spp. Učinak zračenja u uništavanju mikroorganizama općenito se izražava dozom decimalne redukcije D_{10} koja je opisana recipročnom vrijednošću nagiba eksponencijalnog dijela krivulje preživljavanja. Također, vrijednost D_{10} moguće je izračunati iz slijedeće jednadžbe (Trandafir i sur., 2014):

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

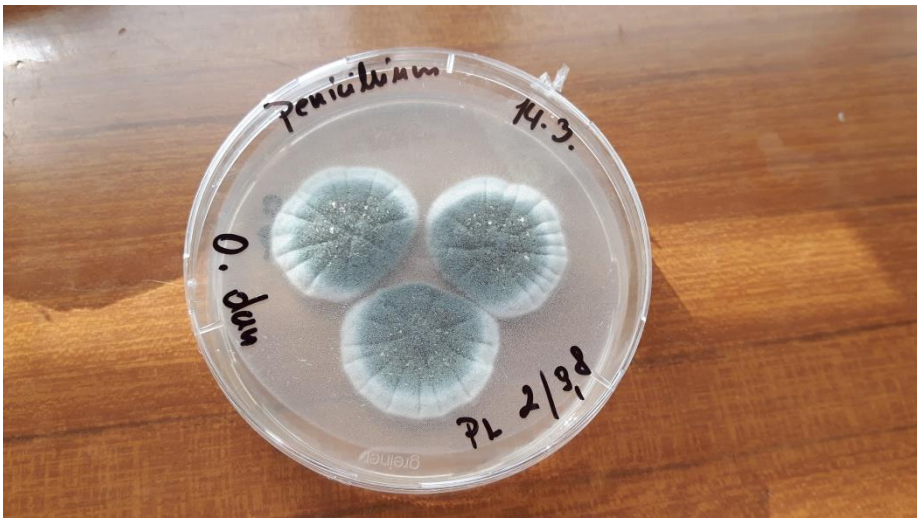
D = doza zračenja

X_0 = početan broj mikroorganizama

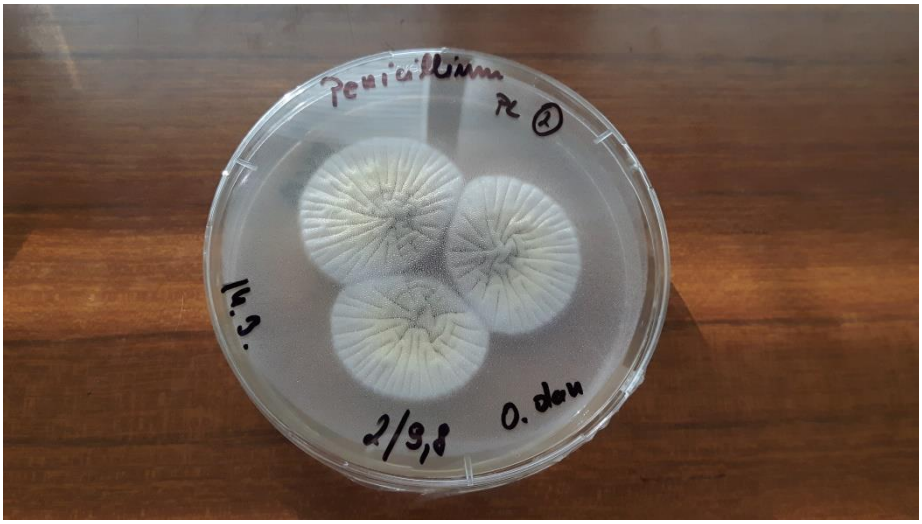
X = broj mikroorganizama koji su preživili zračenje

U ovom se diplomskom radu vrijednost D_{10} nije računala, ali se korištenje ovog podatka preporučava.

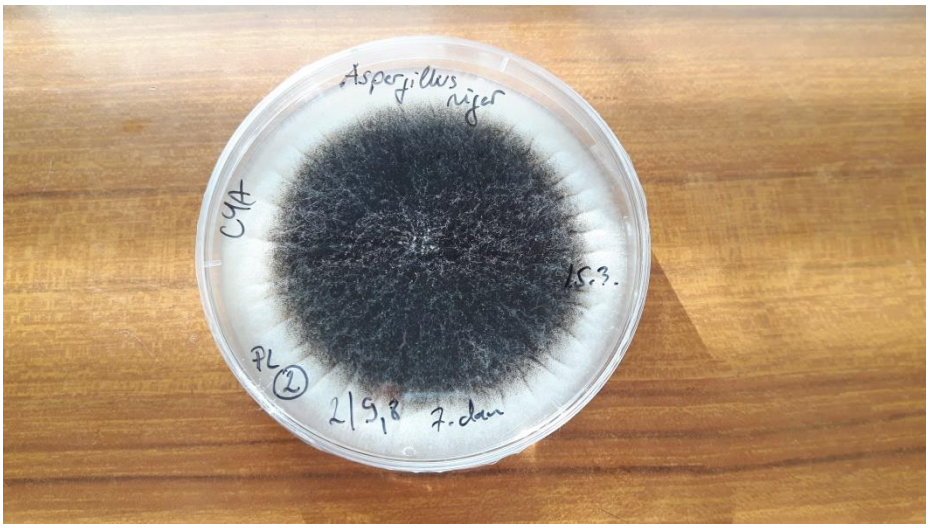
Uz rezistenciju plijesni *Cladosporium* spp. čak pri dozi zračenja od 50 kGy te *Aspergillus* iz sekcije *Nigri* pri dozi zračenja od 20 kGy vežemo postojanje pigmenta melanina unutar micelija. Nedavna su istraživanja zabilježila povećan rast melaniziranih plijesni u blizini reaktora u Černobilu. Takvu pojavu porasta plijesni u radioaktivnom okolišu povezali su s mogučnošću prilagodbe mikroorganizama gdje se za crpljenje energije koriste upravo melaninom. Zabilježen je porast određenih plijesni u području nuklearne katastrofe u Černobilu 1986 koje su rasle unutar i razgrađivale tzv.vruće čestice, odnosno komade grafita uništenog reaktora br. 4 kontaminirane različitim vrstama dugoživućih radionuklida. Takav afinitet plijesni naspram zračenja nazvali su radiotropizam. Također, zabilježen je i porast određenih mikroorganizama na površini Međunarodne svemirske postaje, od kojih najdominantniji *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. i *Saccharomyces* spp. gdje su se vrste prilagodile unatoč snažnom kozmičkom zračenju (Dadachova i Casadevall, 2008). S obzirom na ovakve rezultate, nije ni čudno da je porast plijesni, mada mnogo manji, zabilježen i kod visokih doza gama zračenja.



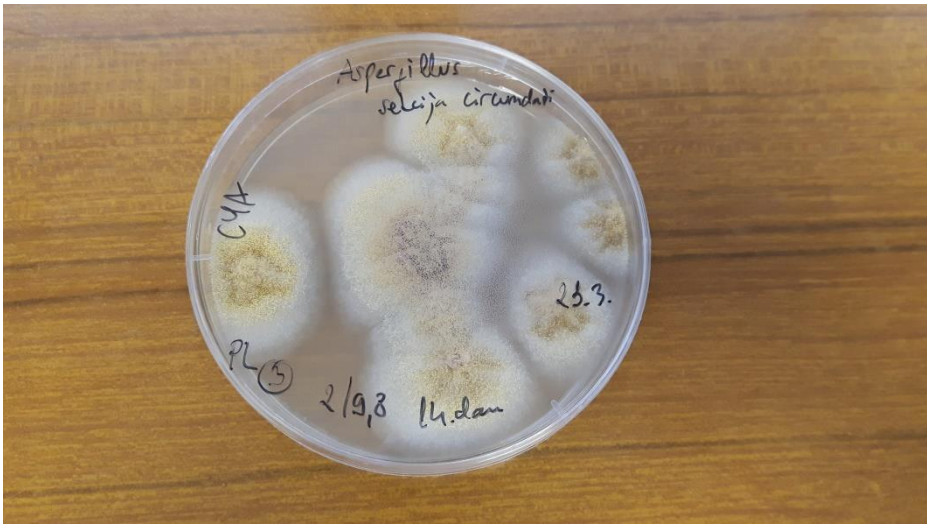
Slika 1. *Penicillium* spp. iz uzorka platna ozračenog dozom zračenja 2 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, nasađen 0.dan od zračenja



Slika 2. *Penicillium* spp. iz uzorka platna ozračenog dozom zračenja 2 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, nasađen 0.dan od zračenja



Slika 3. *Aspergillus* sekcija *Nigri* iz uzorka platna ozračenog dozom zračenja 2 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, nasađen 7.dan od zračenja



Slika 4. *Aspergillus* sekcija *Circumdati* iz uzorka platna ozračenog dozom zračenja 2 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, nasađen 14.dan od zračenja

5 ZAKLJUČCI

- Slikarsko platno zbog svog sastava prirodnog podrijetla predstavlja dobru podlogu za rast plijesni, pogotovo ukoliko se ono nepravilno skladišti. Dokaz tome je razlika u kvalitativnom i kvantitativnom porastu plijesni na uzorcima koji su potvrgnuti vlažnoj inkubaciji od onih koji takvim uvjetima nisu bili podvrgnuti.

  Doza zračenja od 50 kGy pri brzini zračenja od 0,1 Gy s^{-1}, 28.dan, pokazala se učinkovitom u dekontaminaciji uzoraka koji prethodno zračenju nisu bili podvrgnuti vlažnoj inkubaciji. Za sve ostale doze zračenja pri obje brzine (0,1 i 9,8 Gy s^{-1}) pokazan je trend opadanja broja plijesni po gramu materijala ovisno o vremenu.
- S obzirom na smanjenje koncentracije plijesni, posebice kod uzoraka inkubiranih u vlažnim uvijetima, te dostupnih podataka iz literature o neškodljivosti gama zračenja za celulozne materijale, doza od 7 kGy pri većoj brzni (9,8 Gy s^{-1}) mogla bi se smatrati najboljim izborom.
- Najrezistentnijim su se pokazale bijela plijesan i *Cladosporium* spp. za uzorke koji prethodno nisu bili inkubirani u vlažnim uvjetima, odnosno kvasci i bijela plijesan za uzorke podvrgnute vlažnoj inkubaciji prethodno zračenju.
- U budućem istraživanju treba determinirati bijelu plijesan i kvasce molekularno-biološkim metodama kako bi se postavili temelji za istraživanje njihove otpornosti na gama zračenje.
- Također bi bilo dobro proučiti moguće promjene u samom platnu djelovanjem gama zračenja što bi također moglo dovesti do stvaranja određenih molekula koje su doprinjele rezistenciji određenih vrsta.

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. *Restaurator*, 2001, 22, 107–131.

Applegate KL, Chipley JR. Production of Ochratoxin A by Aspergillus ochraceus NRRL-3174 before and after exposure to ^{60}Co Irradiation. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 349-353.

Aquino S. Gamma radiation against toxigenic fungi in food , medicinal and aromatic herbs. U: Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Mendez-Vilas A, urednik, Badajoz, Formatex Research Center, 2011, str. 272-281.

Borsa J, Chelak WS, Marquardt RR, Frohlich AA. Comparison of irradiation and chemical fumigation udes in grain disinfestations on production of ochratoxin A by Aspergillus alutaceus in treated barley. *JFood Protect*, 1992, 55, 990-994.

Castelo MM, Sumner SS, Bullerman LB. Stability of fumonisns in thermally processed corn products. *J Food Protect*, 1998, 61, 1030-1033.

Dadachova E, Casadevall A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(6), 525-531.

Da Silva M, Moraes AML, Nishikawa MM, Gatti MJA, Vallim de Alencar MA, Brandão LE, Nóbrega A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, 57, 163–167.

Ferreira-Castro FL, Aquino S, Greiner R, Ribeiro DHB, Reis TA, Correa B. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with Fusarium verticillioides. *Appl Radiat Isotopes*. 2007, 65, 927-933.

Gamma radiation, 2014., http://www.nde-ed.org, pristupljeno 20.05.2018.

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

Gorbushina AA, Heyrman J, Dornieden T, Gonzalez-Delvalle M, Krumbein WE, Laiz L, Petersen K, Saiz-Jimenez C, Swings J. Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int Biodeterior Biodegrad*, 2004, 53, 13–24.

Gorbushina AA, Petersen K. Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2000, 46, 277–284.

International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituens, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Scientific Publications*, 1993, 56, 19-23.

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

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

Michaelsen A, Pinzari F, Barbabietola N, Piñar G. Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2013, 84, 333–341.

Mlinarić-Missoni E. Mikotoksini i mikotoksikoze.U: Medicinska mikrobiologija. Kalenić S, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 568-569.

Mlinarić-Missoni E, Kalenić S. Uvod u mikologiju. Klasifikacija gljiva. Građa, metabolizam i razmnožavanje gljiva. U: Medicinska mikrobiologija. Kalenić S, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 511-517.

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

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

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

Odamtten GT, Appiah V, Langerak DI. Influence of inoculum size of Aspergillus flavus link on the production of aflatoxin B_1 in maize medium before and after exposure to combination treatment of heat and gamma radiation. *Int J Food Microbiol*, 1987, 4, 119-127.

Pitt JI, Hocking AD. The ecology of fungal food spoilage. U: Fungi and food spoilage. Pitt JI, Hocking AD, New York, 2009, Springer, str. 3-4.

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

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

Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chem*, 1997, 59, 57-67.

Scott PM. Fumonisins. *Int J Food Microbiol*, 1993, 18, 257-270.

Sharma A, Behere AG, Padwal Desai SR, Nadkarni GB. Influence of inoculum size of Aspergillus parasiticus spores on aflatoxin production. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 40, 989-993.

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

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

Šošić, TM. Pojam kulturne baštine – međunarodnopravni pogled. *Zbornik radova Pravnog fakulteta u Splitu*, 2014, 51(4), 833-860.

Tomazello MGC, Wiendl FM. The applicability of gamma radiation to the control of fungi in naturally contaminated paper. *Restaurator*, 1995, 16, 83–99.

Trandafir L, Zorila FL, Alexandru M, Ene M, Constantin M, Alistar A, Cutrubinis M, Iordache O, Stanculescu RI. Radioresistance of biodegradation fungi and its importance in establishing the decontamination dose. ICAMS V, Bucharest, 2014, 561-566.

Utjecaj gama zračenja na predmete kulturne baštine od organskih materijala, 2011., http://www.h-r-z.hr, pristupljeno 10.05.2018.

Volner Z, Batinić D, suradnici. Opća medicinska mikrobiologija i imunologija. Zagreb, Školska knjiga, 2005, str. 55-61.

World Health Organization Europe. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2009, str. 11-19.

Zračenje-terapija za kulturnu baštinu, 2011., http://www.lib.irb.hr, pristupljeno 10.05.2018.

7 SAŽETAK/SUMMARY

U ovom radu proučavan je utjecaj gama zračenja naspram plijesni, ubikvitarnih mikroorganizama te jednih od najčešćih kolonizatora i uzroka propadanja predmeta kulturne baštine. Prevencija kao i sprječavanje daljne degradacije ovih predmeta, s visokim stupnjem učinkovitosti i sigurnosti, može se provesti korištenjem gama zračenja. Uzorci platna korišteni u istraživanju podijeljeni u dvije skupine (uzorci ne podvrgnuti vlažnoj inkubaciji i uzorci podvrgnuti vlažnoj inkubaciji prethodno zračenju), izloženi su zračenju izvora u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) na Institutu Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu. Primijenjene su doze zračenja od 2, 7, 20 i 50 kGy pri dvjema brzinama zračenja (0,1 i 9,8 Gy s^{-1}), nakon čega je slijedilo praćenje oporavka plijesni 0., 7., 14. i 28. dan od zračenja. Najzastupljenijim kolonizatorima platna pokazale su se *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. te bijela plijesan i kvasci. Učinkovitije smanjenje koncentracije plijesni kod obje skupine uzoraka pri svim dozama zračenja zabilježeno je primjenom veće brzine zračenja (9,8 Gy s^{-1}). S obzirom na bolji antifungalni učinak, posebice kod uzoraka inkubiranih u vlažnim uvjetima te dostupnih podataka iz literature o neškodljivosti gama zračenja za celulozne materijale, apsorpcijska doza od 7 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, smatra se najboljim izborom. Najrezistentnijima su se pokazale *Cladosporium* spp. za čiju je otpornost zadužen pigment melanin prisutan unutar micelija plijesni te bijele plijesni i kvasci čije pronalaženje uzroka otpornosti leži u korištenju molekulsko-bioloških metoda u budućim ispitivanjima.

In this thesis the effect of gamma radiation on mould was studied. Mould is an ubiquitous microorganism and one of the most common coloniser and cause of deterioration of objects of cultural heritage and arts. Highly successful and safe prevention of further degradation of aforementioned objects can be done using gamma radiation. Painting canvas samples used in this research were divided in two groups and irradiated in the Radiation chemistry and dosimetry laboratory at Ruđer Bošković Institute in Zagreb. Radiation doses of 2, 7, 20 and 50 kGy we used at 2 different speeds (0,1 i 9,8 Gy s^{-1}) followed by monitoring of mould recovery at days 0., 7., 14. and 28. The most frequently found mould on canvases were those of genus *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. and white mould and yeast. Higher radiation speed (9,8 Gy s^{-1}) was shown to be more effective in reducing mould concentration in both groups and at all radiation doses. Absorption dose of 7 kGy at the speed

of 9,8 Gy s^{-1} was found to be the best choice, based on literature sources on safety of gamma radiation on cellulose materials and better antifungal effect, observed especially in samples incubated at a higher humidity. *Cladosporium* spp., white mould and yeast exhibited the highest resistance to radiation. *Cladosporium* spp. resistance can be attributed to pigment melanin found in its mycelium. Further research using molecular biology methods is needed to elucidate the mechanisms of white mould and yeast resistance.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ GAMA ZRAČENJA NA SASTAV MIKOBIOTE SLIKARSKOG PLATNA

Marijana Ivin

SAŽETAK

U ovom radu proučavan je utjecaj gama zračenja naspram plijesni, ubikvitarnih mikroorganizama te jednih od najčešćih kolonizatora i uzroka propadanja predmeta kulturne baštine. Prevencija kao i sprječavanje daljne degradacije ovih predmeta, s visokim stupnjem učinkovitosti i sigurnosti, može se provesti korištenjem gama zračenja. Uzorci platna korišteni u istraživanju podijeljeni u dvije skupine (uzorci ne podvrgnuti vlažnoj inkubaciji i uzorci podvrgnuti vlažnoj inkubaciji prethodno zračenju), izloženi su zračenju izvora u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) na Institutu Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu. Primijenjene su doze zračenja od 2, 7, 20 i 50 kGy pri dvjema brzinama zračenja (0,1 i 9,8 Gy s^{-1}), nakon čega je slijedilo praćenje oporavka plijesni 0., 7., 14. i 28. dan od zračenja. Najzastupljenijim kolonizatorima platna pokazale su se *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. te bijela plijesan i kvasci. Učinkovitije smanjenje koncentracije plijesni kod obje skupine uzoraka pri svim dozama zračenja zabilježeno je primjenom veće brzine zračenja (9,8 Gy s^{-1}). S obzirom na bolji antifungalni učinak, posebice kod uzoraka inkubiranih u vlažnim uvjetima te dostupnih podataka iz literature o neškodljivosti gama zračenja za celulozne materijale, apsorpcijska doza od 7 kGy pri brzini zračenja od 9,8 Gy s^{-1}, smatra se najboljim izborom. Najrezistentnijima su se pokazale *Cladosporium* spp. za čiju je otpornost zadužen pigment melanin prisutan unutar micelija plijesni te bijele plijesni i kvasci čije pronalaženje uzroka otpornosti leži u korištenju molekulsko-bioloških metoda u budućim ispitivanjima.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 8 grafičkih prikaza, 10 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kulturna baština, gama zračenje, plijesni

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Katarina Marušić, *znanstvena suradnica Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković, Zagreb.*
Dr.sc. Erim Bešić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko- Biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: 26. lipnja 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

GAMMA-IRRADIATION EFFECT ON MYCOBIOTA COMPOSITION OF THE PAINTING CANVAS

Marijana Ivin

SUMMARY

In this thesis the effect of gamma radiation on mould was studied. Mould is an ubiquitous microorganism and one of the most common coloniser and cause of deterioration of objects of cultural heritage and arts. Highly successful and safe prevention of further degradation of aforementioned objects can be done using gamma radiation. Painting canvas samples used in this research were divided in two groups and irradiated in the Radiation chemistry and dosimetry laboratory at Ruđer Bošković Institute in Zagreb. Radiation doses of 2, 7, 20 and 50 kGy we used at 2 different speeds (0,1 i 9,8 Gy s^{-1}) followed by monitoring of mould recovery at days 0., 7., 14. and 28. The most frequently found mould on canvases were those of genus *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. and white mould and yeast. Higher radiation speed (9,8 Gy s^{-1}) was shown to be more effective in reducing mould concentration in both groups and at all radiation doses. Absorption dose of 7 kGy at the speed of 9,8 Gy s^{-1} was found to be the best choice, based on literature sources on safety of gamma radiation on cellulose materials and better antifungal effect, observed especially in samples incubated at a higher humidity. *Cladosporium* spp., white mould and yeast exhibited the highest resistance to radiation. *Cladosporium* spp. resistance can be attributed to pigment melanin found in its mycelium. Further research using molecular biology methods is needed to elucidate the mechanisms of white mould and yeast resistance.

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

Thesis includes: 36 pages, 8 figures, 10 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cultural heritage, gamma irradiation, moulds

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

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.,** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Katarina Marušić, Ph.D., *Research Associate* , Radiation Chemistry and Dosimetry Laboratory at Ruđer Bošković Institute in Zagreb
Erim Bešić, Ph.D., *Assistant professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 26, 2018.