

# Otpornost mikrobiote lanenog platna na gama zračenje

---

**Marjanović, Silvija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:708396>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Silvija Marjanović**

**Otpornost mikrobiote lanenog platna  
na gama zračenje**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na pruženom znanju, stručnom vodstvu, ukazanom povjerenju i savjetima pri izradi ovog rada. Hvala i svim ostalim zaposlenicima Zavoda za mikrobiologiju na pomoći, strpljenju i ugodnoj radnoj atmosferi. Također hvala dr. sc. Branki Mihaljević i dr. sc. Katarini Marušić s Instituta Ruđer Bošković na suradnji i ozračivanju uzoraka. Hvala mojoj obitelji i prijateljima, najviše roditeljima i zaručniku, na potpori koju su mi pružili u proteklim godinama studiranja.*

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Kulturna baština na platnu - uzroci biodeterioracije .....	1
1.2. Mehanizam biodeterioracije platna .....	5
1.3. Tehnike konzerviranja platna .....	6
1.4. Gama zračenje i primjena u očuvanju kulturne baštine na platnu .....	10
<b>2. Obrazloženje teme</b> .....	15
<b>3. Materijali i metode</b> .....	16
3.1. Ispitivanje sastava prirodne mikrobiote na platnu metodom razrjeđenja .....	16
3.2. Inokulacija platna odabranom vrstom plijesni .....	17
3.3. Zračenje uzoraka .....	17
3.4. Određivanje doze $D_{10}$ .....	18
<b>4. Rezultati i rasprava</b> .....	19
<b>5. Zaključak</b> .....	26
<b>6. Literatura</b> .....	27
<b>7. Sažetak/ Summary</b> .....	32
<b>8. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. Kulturna baština na platnu - uzroci biodeterioracije

Svjetska prirodna i kulturna baština, prirodna su i kulturna dobra međunarodno priznate, izvanredne i univerzalne vrijednosti koja su kao takva podvrgnuta i posebnomu režimu zaštite i očuvanja. Pojam kulturne baštine uveden je Konvencijom o zaštiti svjetske prirodne i kulturne baštine, koju su zemlje članice UNESCO-a prihvatile na 17. zasjedanju Opće konferencije te organizacije 1972. u Parizu ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Kulturna baština podrazumijeva nasljeđe koje smo dobili od generacija prije nas, našu povijest i identitet i kao takva poveznica je između prošlosti, sadašnjosti i budućnosti. U svojoj dugoj povijesti platno je kao materijal bilo podloga mnogim dragocjenim umjetničkim slikama i od njega su satkane raznovrsne narodne nošnje te su kao takvi predmeti od platna dio materijalne kulturne baštine vrijedne očuvanja za buduće naraštaje. Kao i svi drugi organski materijali, platno je podložno procesima razgradnje koje je nemoguće zaustaviti, ali uz znanstvene spoznaje možemo ih što više usporiti (Calvo i sur., 2017). Prvi korak u usporavanju deterioracije predmeta koji sadrže veliku kulturnu važnost, razumijevanje je uzroka koji vode do promjena na samim materijalima.

Čimbenici degradacije organskih predmeta kulturne baštine mogu se podijeliti na fizičke, kemijske i biološke. Obilje vode, ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja, temperatura i njene promjene, vjetar, svjetlo i mehanički stres čimbenici su fizičke ili mehaničke degradacije. Kisik i drugi plinovi te huminske kiseline iz tla odgovorni su za kemijsku degradaciju organskih predmeta. Čimbenici biodegradacije su gljivice, bakterije i insekti koji koriste organske materijale kao izvor hrane. Rijetko je za degradaciju zaslužna samo jedna grupa čimbenika već je ona posljedica njihovog sinergističkog djelovanja (IAEA, 2017). Naglasak diplomskog rada je na biodeterioraciji koju Allsopp (2011) definira kao svaku neželjenu promjenu na materijalu kao posljedice vitalne aktivnosti živih organizama. Iako su primjeri biodeterioracije zabilježeni već i u Bibliji, točnije u 14. poglavlju Levitskog zakonika gdje se spominje bolest na kućnim zidovima u obliku zelenkastih i crvenkastih udubina, njezina važnost je dugo vremena bila zanemarivana te se vjerovalo kako su fizički i kemijski procesi dominantni čimbenici degradacije. Zadnjih nekoliko desetljeća dogma se promijenila i danas je općenito prihvaćeno mišljenje kako biodeteriogeni uzrokuju ne samo estetsku destrukciju predmeta kulturne baštine, već prodiru i u unutrašnjost materijala izazivajući

njegovo propadanje zbog kiselinske korozije, enzimske razgradnje i mehaničkog napada (Sterflinger i Pinar, 2013). Učinak biodeterijogenta vidljiv je u obliku promjene izgleda obezbojenjem ili obojenjem, gubitkom mehaničke izdržljivosti materijala te djelomičnim ili potpunim raspadanjem ([www. h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)).

U unutrašnjim uvjetima, kao što su muzeji, najčešći biodeterijogenti na biljnim tkaninama su gljivice iz rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Memnoniella*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Stemphylium*, *Chaetomium* i *Mucor*. Bakterije postaju aktivne u uvjetima visoke vlažnosti koja je česta na mjestima gdje su arheološki tekstili pronađeni. Na takvim tekstilima pronađene su bakterije rodova *Cellvibrio*, *Microspora* i *Clostridium*. Insekti ne mogu koristiti biljni tekstil kao sklonište za razliku od drveta, ali mogu napadati materijale kada sadrže dodatna ljepljiva, škrob ili šećere. U umjerenim klimama i unutrašnjim uvjetima primijećeni su insekti iz porodica *Lepismatidae* i *Blattidae*, a u tropskim i subtropskim klimama iz porodica *Mastotermitidae*, *Hodotermitidae* i *Rhinotermitidae* (IAEA, 2017). Naglasak je na gljivicama kao glavnom uzročniku biodeterioracije predmeta napravljenih od platna.

Gljivice su eukariotski mikroorganizmi unutar carstva gljiva (Fungi). Gljive su kemoheterotrofi i poput bakterija apsorbiraju hranjive tvari. Razmnožavaju se sporama (spolne i nespolne) ili vegetativno (pupanje), ovisno o vrsti i uvjetima okoliša. Osim za razmnožavanje, spore služe za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i širenje vrste. Spore mogu preživjeti nepovoljne uvjete jer su oblik gljiva s niskim sadržajem vode i reverzibilno inaktiviranim metabolizmom (Duraković i Redžepović, 2002). Za sprečavanje biodeterioracije neophodno je uz kontrolu aktivnog rasta gljivica, otkloniti ili barem smanjiti broj njihovih spora (Michaelsen i sur., 2013). U carstvo gljiva ubrajamo jednostanične (npr. kvasci) i višestanične gljive (npr. plijesni). Neke gljive, ovisno o uvjetima, pokazuju dimorfizam, to jest pojavljuju se kao plijesni i kao kvasci (Duraković i Redžepović, 2002). Tijelo plijesni građeno je od vlaknastih stanica bez klorofila koje se nazivaju hife. One su odgovorne za njihov paučinast i pahuljast izgled. Isprepletene hife tvore micelij. Prema funkciji razlikujemo vegetativni ili bazalni micelij koji prodire u hranjivu podlogu i crpi hranu, te zračni ili fertilni micelij koji se uzdiže iznad podloge i nosi strukture za razmnožavanje (Mlinarić-Missoni i Babić-Važić, 2005). Za sprečavanje biodeterioracije neophodno je uz kontrolu aktivnog rasta gljivica koji uključuje hife, micelij ili plijesni, otkloniti ili barem smanjiti broj njihovih spora (Michaelsen i sur., 2013).

Na temelju biodeterioracijskog potencijala gljivice na predmetima kulturne baštine možemo podijeliti u dvije glavne skupine. Prva su oportunističke gljivice koje rastu na svim materijalima uz dostupnu vlagu i te gljivice nisu u stanju enzimski razgraditi materijal. Druga skupina su tzv. “materijalni patogeni” koji su supstratno specifični i sposobni specifično razgrađivati materijal različitim enzimima. (Meier i Petersen, 2006). Allsopp (2011) je ustanovio kako je godišnji gubitak nehranidbenih materijala u svijetu zbog gljivica vrijedan 40 milijardi američkih dolara.

Za rast gljivica neophodna je vlaga, a ovisno o minimalnom potrebnom aktivitetu vode dijelimo ih na primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore. Aktivitet vode ( $a_w$ ) definiran je kao omjer parcijalnog tlaka vodene pare na površini proizvoda i parcijalnog tlaka vodene pare čiste vode pri istoj temperaturi. Pomoću vrijednosti  $a_w$  može se procijeniti koliki dio slobodne vode stoji na raspolaganju odvijanju metabolizma prisutnih mikroorganizama (WHO, 2009). Primarni kolonizatori rastu na predmetima kojima je aktivitet vode manji ili jednak 0.80, dok sekundarni kolonizatori trebaju aktivitet vode 0.80-0.90. Tercijarni kolonizatori za rast trebaju najviše vlage, aktivitet vode na predmetima povoljnim za njihovu germinaciju i početak micelijarnog rasta treba biti veći od 0.90 (Grant i sur., 1989). Primjer primarnih kolonizatora su rodovi *Aspergillus* i *Penicillium*, sekundarnih *Cladosporium* i *Mucor*, a tercijarnih *Fusarium*. Za rast primarnih i sekundarnih kolonizatora dovoljna je povećana vlažnost zraka i površinska kondenzacija, ali tercijarni kolonizatori zahtijevaju veće kondenzacijske probleme kao što su npr. loša ventilacija zraka ili oštećenja vodom zbog poplave ili prokišnjanja (WHO, 2009).

Rast gljivica na predmetima kulturne baštine može uzrokovati zdravstvene probleme kod ljudi koji predmete koriste ili se nalaze u njihovoj okoline. Mnoge vrste, uključujući *Cladosporium spp.* mogu uzrokovati alergije, dok neke vrste poput *Aspergillus spp.* i *Penicillium spp.* proizvode mikotoksine koji mogu uzrokovati oportunističke infekcije kod ljudi (Sterflinger i Pinzari, 2012, Kaarakainen i sur., 2009).

Kolonizacija predmeta kulturne baštine mikroorganizmima ovisi o točnom sastavu predmeta koji je rijetko napravljen od samo jednog materijala. Najčešći platneni predmet kulturne baštine slikarsko je platno, a umjetničke slike spoj su mnogobrojnih biološki razgradivih komponenata koji utječu na biodeterioraciju. Osim slikarskog platna, slike sadrže boje, pigmente, ljepila, lakove, emulgatore, ugušćivače i druge dodatke. Šećeri, gume i ostali polisaharidi, proteini, ulja i voskovi, organske su molekule koje mnogi mikroorganizmi mogu

koristiti za svoj rast. U slikarstvu su bili korišteni žumanjak, žuč pa čak i urin (Ciferri, 1999). Pigmenti organskog podrijetla često su bili bazirani na žumanjku i odličan su izvor različitih nutrijenata, a pronađeni su osobito na slikama iz srednjeg vijeka (Giuffrida i sur., 2018)

Proučavajući biološku degradaciju umjetničkih slika, Ciferri (1999) je uočio sinergističko djelovanje gljivica i bakterija. Za istraživanje su korištene imitacije umjetničke slike napravljene od lanenog platna, životinjskog lijepila, krede, olovne bijele boje i ulja sjemenki lana. Pokazalo se kako su za preživljavanje i poticanje rasta bakterije *Bacillus pumilus* potrebne aktivne kulture gljivica. Izolirana vrsta gljivice *Aspergillus niger*, za razliku od izoliranih bakterija, posjeduje celulolitičku i proteolitičku aktivnost te stimulira rast bakterija opskrbljujući ih produktima hidrolize makromolekula, poput celuloze i peptida, koje su prisutne na slikama (Ciferri, 1999).

Istražujući uzročnike biodegradacije slike na platnu iz 17. stoljeća, talijanskog umjetnika Carla Bononija, Caselli i sur. (2018) izolirali su gljivice rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* i *Alternaria*. Različite vrste izolirane su ovisno o boji slike na mjestu uzorkovanja. Gljivice iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* izolirane su s tamno-smeđih i crvenih područja slike, a *Cladosporium* sa svjetlijih područja, žute i ružičaste boje. *Alternaria spp.* izolirana je samo iz područja slike koji su bili u doticaju s podom bazilike u kojoj je slika bila čuvana. Povećana relativna vlažnost zraka, veća od 65%, te kapilarna vlaga povoljno je utjecala na rast te vrste na donjim dijelovima slike. Biodegradacija složenog predmeta poput umjetničke slike ne ovisi samo o materijalu podloge već i o sastavu svih njenih slojeva te o mikrokolišu (Caselli i sur., 2018).



## 1.2. Mehanizam biodeterioracije platna

Platno, točnije laneno platno, materijal je organskog biljnog podrijetla u čijem sastavu prevladava ugljik. Najvažniji kemijski spoj u lanenom platnu je polisaharid celuloza (IAEA, 2017). Celuloza je linearni biopolimer velike molekularne mase koji se sastoji od jedinica beta-D-glukopiranoze povezanih beta-(1,4) glikozidnim vezama. Dva kraja polimera su drugačija. Na lijevom kraju (na C4 poziciji prstenaste strukture) nalazi se nereducirajuća alkoholna hidroksilna grupa, dok je na desnom kraju (na C1 poziciji prstenaste strukture) reducirajuća alkoholna hidroksilna grupa. Ta je grupa zapravo hemiacetal (IAEA, 2017). Uzrok raspadanja organskih materijala primarno se događa zbog kidanja veza strukturnih biopolimera. Beta-(1,4) glikozidne veze osjetljiv su dio polimernog lanca gdje se događa razgradnja (IAEA, 2017). Lan sadrži približno 80% celuloze, dok pamuk sadrži otprilike 95% celuloze, a drvo oko 45% (IAEA, 2017).

Materijali čija je glavna sastavnica celuloza međusobno se razlikuju u udjelu kristalnih i amorfnih regija celuloznog lanca što utječe na njihovu otpornost biodeterioraciji (Daniels, 1966). Vlakna celuloznih materijala kao što su lan, pamuk i juta, napravljena su od dugih linearnih lanaca polimera gdje su makromolekule poravnate sa središnjom dugom osi. Što je veća molekularna simetričnost i dužina linearnog lanca, veća je mogućnost za stvaranje kristalnih regija, a time je vlakno jače (IAEA, 2017). Ako materijal sadrži veći udio amorfnih regija lakše se razgrađuje zbog dostupnosti malim molekulama što uzrokuje povećanu higroskopsnost i reaktivnost (Daniels, 1966). U prisutnosti povećane količine vlage, vlakna nabubre i postaju privlačno mjesto gljivicama (Fellers i sur., 1989). Razliku u otpornosti materijala nosi i čvrstoća kojom su vlakna isprepletena u materijalu. Rjeđe isprepletena vlakna su manje otporna od gušće isprepletenih jer zadržavaju više nečistoća i bioloških zagađivača što stvara povoljne uvjete za biodeteriogene (Menier, 1988). Što vlakno sadrži više neceluloznih sastavnica poput lignina, otpornije je na degradaciju (Gutarowska i sur., 2017). Suprotno od toga, što je veći udio pektina ili hemiceluloze, veća je mogućnost mikrobiološke kolonizacije (Szostak-Kotowa, 2004).

Vlakna prirodnog podrijetla, kao što je platno, podložna su djelovanju celulolitičkih enzima koje stvaraju gljivice i bakterije. Tri su tipa hidrolitičkih enzima potrebna za potpunu konverziju celuloze u šećer glukoze: egzoglukanaze, endoglukanaze i beta-glukozidaze. Egzoglukanaze kidaju lanac celuloze, a ovisno krenu li od reducirajućeg ili nereducirajućeg kraja nastaje celobioza ili glukoza (EC 3.2.1.91 za enzime na nereducirajućem kraju i EC

3.2.1.176 za one na reducirajućem kraju). Endoglukonaze (EC 3.2.1.4) nasumično kidaju unutarnje glikozidne veze u amorfnim regijama celuloze stvarajući oligosaharide različitih duljina. Beta-glukozidaze (EC 3.2.1.21) pretvaraju kratke oligosaharide, kao što su celotrioza i celobioza, u glukozu (Giuffrida i sur., 2018). Endoglukanaze su ključne komponente u procesu razgradnje jer povećavaju broj reducirajućih i nereducirajućih krajeva, uključujući krajeve lanaca i oligosaharide. Nužan korak prije same razgradnje otvaranje je fibrilarnog matriksa koje povećava pristup enzima glikozidnim vezama unutar šećernog polimera (Calvo i sur., 2017). Također, nedavna istraživanja pokazuju da neke gljivice mogu razgrađivati celulozu oksidativnim enzimima kao što su polisaharidne monooksigenaze (Calvo i sur., 2017). Cragg (2015) objašnjava i neenzimsku razgradnju celuloze kroz kinon-redoks ciklus i Fentonovu reakciju gdje oksidansi slobodni hidroksilni radikali nastali od glikopeptida nasumično napadaju supstrat. Općenito govoreći, bakterije poput rodova *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Bacillus*, *Arthobacter*, *Sporocytophaga*, *Microbispora*, *Pseudomonas*, *Nocardia* i *Streptomyces*, djeluju na vlakna od površine prema unutrašnjosti. Suprotno tome, većina gljivica, uključujući rodove *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Thricoderma*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aureobasidium* i *Cladosporium*, ili njihove spore, prodiru direktno u unutrašnjost vlakna gdje stvaraju micelij koji je odgovoran za sekreciju ekstracelularnih celulolitičkih enzima (Szostak-Kotowa, 2004). Konačan učinak je depolimerizacija celuloze koja smanjuje jačinu vlakna (Giuffrida i sur., 2018).

### 1.3. Tehnike konzerviranja platna

Predmeti kulturne baštine trebaju se dezinficirati kako bi se smanjio rizik od ubrzane deterioracije predmeta zbog kontaminacije mikroorganizmima i insektima te da korištenje takvih predmeta ne bi uzrokovalo negativne zdravstvene posljedice za ljudsku okolinu.

Metode konzerviranja i dezinficiranja kulturne baštine posuđene su iz grana medicine i poljoprivrede, gdje postoji potreba za tretiranjem velikih količina hrane i medicinskih predmeta. Tehnike i oprema koje se koriste za sterilizaciju ili dezinfekciju u medicini i poljoprivredi, lako se mogu prilagoditi za konzerviranje kulturne baštine.

Tehnike dezinfekcije mogu se podijeliti na konvencionalne i radijacijske. Konvencionalne tehnike dijele se na mehaničke, fizikalne i kemijske. U mehaničke

konvencionalne tehnike dezinfekcije ubrajaju se suho čišćenje, dok su fumigacija plinovima i korištenje tekućih biocida kemijske tehnike.

Suho površinsko čišćenje predmeta kontaminiranih plijesnima nekad se pogrešno smatralo dovoljnim za njihovu dezinfekciju ako su kasnije bili čuvani u zadovoljavajućim uvjetima okoline, npr. temperatura 18 °C i relativna vlažnost zraka 45-50%. Kasnije je primijećeno da takvo suho čišćenje odstranjuje plijesan samo s površine predmeta, dok ona može još uvijek preživjeti u unutrašnjosti. Iako niža razina vlažnosti zraka može usporiti rast plijesni, ona ga neće zaustaviti. Uz prisustvo plijesni, druge se reakcije deterioracije mogu nastaviti, a uz promjenu uvjeta okoline plijesan ubrzo može postati aktivna kako u unutrašnjosti predmeta, tako i na njegovoj površini (IAEA, 2017). Iako suho čišćenje ne može biti dovoljno za dezinfekciju već kontaminiranih predmeta nikako ne treba zanemariti njegovu ulogu u prevenciji bioloških oštećenja kulturne baštine. Uz kontrolu klimatskih uvjeta u kojima se predmeti nalaze i pojačano opsežno praćenje metoda dezinfekcije, često čišćenje je najvažniji čimbenik prevencije propadanja predmeta kulturne baštine. Važnost običnog čišćenja prašine je još uvijek zanemarena čak i uz sveprihvaćeno znanje da slojevi prašine na predmetima sadržavaju velik broj spora plijesni i bakterija kao i da predstavljaju izvor hrane za te mikroorganizme. Fizikalne tehnike poput termalne obrade i liofilizacije, zbog svojih nuspojava nisu odgovarajuće tehnike za konzerviranje većine predmeta kulturne baštine, a tako i platnenih predmeta (Sterflinger i Pinar, 2013).

Izbor odgovarajućeg biocida u kemijskim tehnikama dezinfekcije ograničen je direktivom Europske unije o biocidnim proizvodima. Broj kemijskih vrsta biocida je velik i uključuje alkohole, aldehide, fenole, kiseline, kiselinske estere, amide, karbamate, dibenzamidine, piridine, azole, heterociklične spojeve, aktivirane halogene spojeve, površinski aktivne tvari, organometalne spojeve i oksidirajuća sredstva. Uz veliku raznolikost spojeva, broj prikladnih biocida za konzerviranje kulturne baštine je uvelike ograničen jer je samo malom broju spojeva ispitana kompatibilnost s povijesnim materijalima, osobito s pigmentima u bojama. Također vrlo je mali broj studija o dugotrajnim posljedicama biocida na moguće promjene u bojama ili degradaciji predmeta. Biocidi koji se najčešće koriste u restauriranju i konzerviranju kulturne baštine su spojevi koji otpuštaju formaldehid, kvaterni amonijevi spojevi duljine lanca 14-16 ugljikovih atoma, izotiazolinon i etilni alkohol (Sterflinger i Pinar, 2013).

Plinovi najčešće korišteni u postupku fumigacije su etilni oksid ((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O) i metilni bromid (CH<sub>3</sub>Br) (IAEA, 2017). Djelovanje etilnog oksida temelji se na alkilaciji nukleinskih kiselina i funkcionalnih proteina što zaustavlja stanični metabolizam i mogućnost reprodukcije (Mendes i sur., 2007). Mana ove tehnike je slaba predvidljivost difuzije plinova, čak i kada su koncentracija plina, temperatura i kontaktno vrijeme točno kontrolirani. Uz problem pouzdanosti tehnike, učinkovitost je ograničena zbog otežanog prodiranja plina u predmet. Također, veliki problem predstavlja toksičnost plinova kako za okoliš tako i za ljude. Dokazano je da je etilni oksid karcinogen, izrazito zapaljiv i eksplozivan, a pokazana je i mogućnost njegovog postupnog otpuštanja iz fumigiranih predmeta i posljedična kontaminacija zraka u unutrašnjim prostorijama (IAEA, 2017). Etilni oksid je danas zbog svoje toksičnosti u mnogim zemljama zabranjen, (Sterflinger i Pinar, 2013), a ako se koristi to mora biti u odobrenoj aparaturi koja uključuje komoru za detoksifikaciju. Metilni bromid uništava ozonski omotač, i također je zabranjen u nekim zemljama. Paradiklorobenzen je blagi fumigant koji se učinkovito koristi kao fungicid, ali je rizičan za zdravlje kada se udiše (IAEA, 2017). Vrijeme izloženosti materijala u procesu fumigacije ovisi i o prirodi dezinfekcije pa tako plijesni zahtijevaju dva puta veću izloženost nego insekti (Strassberg, 1978).

Kod korištenja tekućina za dezinfekciju predmeta organskog podrijetla, uključujući i platna, kontaktno vrijeme mora biti kratko i očekivani biocidni učinak mora biti ograničen na površinu predmeta jer svaka tekućina koja je u dugotrajnom kontaktu s takvim predmetom izaziva njegova oštećenja. Etanolni alkohol i izopropilni alkohol su fungicidi i baktericidi koji djeluju izrazito brzo (IAEA, 2017). Kontaktno vrijeme alkohola da djeluje kao fungicid je 2 do 3 minute (Sterflinger i Pinar, 2013). Bakterijske spore ostaju otporne na te alkohole. Sporocid je zato formaldehid, uz to što je baktericid i fungicid, ali je nažalost i kancerogen. Moguće je njegovo otpuštanje iz tretiranih predmeta, a dugotrajna izloženost izaziva respiratorne probleme nalik astmi te reakcije kožne iritacije (IAEA, 2017).

Problem korištenja biocida može biti i razvoj mikroorganizama rezistentnih na biocid koji potencijalno mogu predstavljati veću opasnost za kulturnu baštinu. To se može dogoditi kada predmet sadrži više različitih vrsta mikroorganizama koji su različito osjetljivi na primijenjeni kemijski spoj što uzrokuje selektivni pritisak i razvoj rezistentnije vrste (Sterflinger i Pinar, 2013). Craig (1986) objašnjava da su tretirani materijali podložniji napadu mikroorganizama zbog narušene prirodne ravnoteže koja uzrokuje veću podložnost kolonizaciji materijala s bilo kojim organizmom s kojim dođe u kontakt. Florian (2002) ističe

da bi to mogla biti posljedica taloženja etilen glikola koji povećava higroskopnost materijala zbog čega se ostvaruju uvjeti za aktivaciju već prisutnih konidija.

Radijacijska tehnika gama zračenja bit će objašnjena u poglavlju 1.4.

#### 1.4. Gama zračenje i primjena u očuvanju kulturne baštine na platnu

Zračenje je pojava prijenosa energije u obliku fotona (kvanti elektromagnetskog zračenja) ili masenih čestica, a zračenje koje ima dovoljno energije da u međudjelovanju s tvari ionizira tu tvar naziva se ionizirajućim zračenjem. Ionizirajuće zračenje posljedica je promjene stanja materije u mikrosvijetu. To su promjene u energiji ili u sastavu atoma ili atomske jezgre, pri čemu se emitiraju fotoni ili druge čestice. U međudjelovanju s tvari dolazi do izmjene energije i izmjene strukture ozračene tvari. Elektromagnetsko ionizirajuće zračenje obuhvaća rendgensko zračenje i gama zračenje, iako ionizaciju nekih tvari može uzrokovati i ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje. Rendgensko zračenje čine elektromagnetski valovi kratkih valnih duljina, od  $10^{-10}$  do  $10^{-13}$  m, a naziva se još X-zračenjem.

Gama zračenje,  $\gamma$ -zračenje, čine elektromagnetski valovi valnih duljina kraćih od  $10^{-13}$  m. Osim valnom duljinom, gama zračenje često se opisuje i energijom fotona tog zračenja. Gama zračenje nastaje energijskim prijelazima nestabilnih atomskih jezgri radioaktivnih tvari, anihilacijom čestica i usporavanjem vrlo brzih nabijenih čestica. Kod  $\gamma$ -raspada jezgra mijenja svoje stanje iz energijski pobuđenog stanja u stanje s nižom energijom emitirajući kvant elektromagnetskog zračenja, foton, dok se broj protona i neutrona u jezgri ne mijenja.

Međudjelovanje elektromagnetskog zračenja i tvari događa se na tri načina: fotoelektričnim efektom, Comptonovim efektom i tvorbom parova elektron-pozitron. Fotoelektrični efekt pojava je kada foton, čija je energija veća od energije vezanja elektrona u atomu, predaje svu energiju elektronu, čime elektron napušta atom. Comptonov efekt pojava je pri kojoj foton predaje samo dio svoje energije elektronu, a preostali dio nosi tzv. sekundarni foton, dok je tvorba para elektron-pozitron pojava koja nastaje samo ako je energija fotona jednaka ili veća od dvostrukog energijskog ekvivalenta elektrona. Prodre li takav foton do jezgre atoma, u njenoj blizini pretvori se u dvije čestice, elektron i pozitron, a višak energije odlazi na kinetičke energije stvorenog para. Nakon vrlo kratkog vremena, nastali se pozitron spaja s nekim od elektrona iz okoline i pri tom nestaju obje čestice i nastaju dva fotona suprotnih smjerova gibanja. Vjerojatnost pojavljivanja jedne od navedenih pojava ovisi o energiji upadnog fotona. Pri niskim energijama događa se uglavnom fotoelektrični efekt, pri višim energijama fotona prevladava Comptonov efekt, a pri energijama većim od oko 5 MeV prevladava tvorba parova (Dželalija, 2006).

Gama ( $\gamma$ ) zrake su zapravo snopovi fotona. Foton je kvant energije, odnosno "energetski paket", bez mase mirovanja. Frekvencija i valna dužina  $\gamma$ -zrake u funkciji energije su određene Planckovim zakonom, jednažba:

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

gdje je  $h$  Planckova konstanta  $c$  brzina svjetlosti i  $\lambda$  valna dužina  $\gamma$ -zrake (Feretić, 2011).

Za kvantifikaciju fizikalnih, kemijskih i bioloških promjena nastalih ionizirajućim zračenjem koriste se dva parametra: apsorbirana doza i brzina apsorbirane doze. Apsorbirana doza ( $D$ ) je količina energije apsorbirana po jedinici mase ozračenog materijala (IAEA, 2017). To je dozimetrijska veličina koja opisuje povećanje unutrašnje energije u tvari izloženoj ionizirajućem zračenju ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). SI jedinica apsorbirane doze je grej (Gy), a 1 Gy odgovara  $1 \text{ J kg}^{-1}$ . Često je korištena i veća jedinica kilogrej (kGy) (IAEA, 2017). Budući da jednake doze zračenja izazivaju različite efekte ovisno o izvoru zračenja i svojstvima biološke mete uvedena je jedinica sivert (Sv) koja izražava ekvivalentnu dozu (Reisz i sur., 2014). Ekvivalentna doza ( $H$ ), dozimetrijska je veličina koja opisuje biološki učinak određenog ionizirajućeg zračenja u određenom tkivu, a definirana je kao umnožak apsorbirane doze i modifikacijskih faktora ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Brzina apsorbirane doze ( $D'$ ), apsorbirana je doza po jedinici vremena, a SI jedinica je  $\text{Gy s}^{-1}$  (IAEA, 2017). Ona ovisi o jačini polja zračenja koja ovisi o aktivnosti izvora to jest broju raspada u vremenu. Jačina polja smanjuje se s kvadraturom udaljenosti od izvora zračenja. ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)).

Energija gama zračenja koje se primjenjuju u radijacijskoj obradi ne pobuđuje jezgre atoma ozračenog predmeta te se ne generira sekundarna radioaktivnost ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)). Ozračeni materijali ne zadržavaju radioaktivnost i nema opasnosti od zračenja za ljude koji njima rukuju (IAEA, 2017).

Ionizirajuće zračenje djeluje na žive organizme izravnom interakcijom s dijelovima stanice kao što je DNA te neizravno nastankom slobodnih radikala procesom vodene radiolize. U inaktivaciji mikroorganizama najznačajniji je neizravan proces (IAEA, 2017). Kada je izložena zračenju molekula vode se ionizira i ekscitira te prolazi kroz niz reakcija koje izazivaju njezino raspadanje na izuzetno reaktivne produkte. Najprije nastaje pozitivno nabijeni vodeni radikal  $\text{H}_2\text{O}^+$  i negativni slobodni solvatirani elektron ( $e^-$ ). Na kraju procesa nizom rekombinacija nastaju sljedeće reaktivne specije:  $\text{H}^\cdot$ ,  $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Le Caer, 2011). Reaktivne specije napadaju i lome organske molekule prisutne u stanici. Na primjer hidroksilni radikal izbija atome vodika iz šećera i dušičnih baza u molekuli DNA

(Stepanik i sur., 2007). Slobodni radikali odgovorni su za 90% oštećenja DNA gama zračenjem. Općenito je prihvaćeno da je DNA u kromosomima glavna meta ionizirajućeg zračenja jer njezino oštećenje uzrokuje inhibiciju diobe stanice. Što je kompliciranija organska molekula, potrebna je manja energija zračenja za njenu deterioraciju. Iz pokusa na živim organizmima ustvrđeno je da što je organizam evoluiraniji, osjetljiviji je na zračenje (IAEA, 2007).

U tablici 1 prikazane su letalne doze zračenja za pojedine organizme (Aquino, 2011).

Tablica 1. 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
<i>Esherichia coli</i>	1,0 - 2,3
<i>Salmonella spp.</i>	3,7 - 4,8
<i>Bacillus subtilis</i> (spore)	12 – 18
<i>Clostridium botulinum</i> (spore)	19 – 37
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,4 – 7

Spore bakterija i gljiva, te ciste protozoa i parazita, izuzetno su otporne na zračenje jer sadrže malo DNA. Treba uzeti u obzir i postojanje mogućnosti da nepotpuno inaktivirani mikroorganizmi razviju mutacije koje mogu dovesti do povećane virulencije i patogenosti ili otpornosti na zračenje. Takvi su slučajevi zabilježeni kada su organizmi bili izloženi ponavljajućim zračenjima. Zbog toga je važno odrediti doze zračenja koje u potpunosti inaktiviraju mikroorganizme (Shea, 2000). Za procjenu efekta zračenja na uništavanje mikroorganizama najčešće se koristi vrijednost  $D_{10}$  odnosno decimalna redukcijaska doza (Thornley, 1963). To je doza potrebna za inaktivaciju 90% populacije, odnosno za smanjenje populacije mikroorganizama za 1 log. Može se očitati iz krivulje preživljavanja kao recipročna vrijednost nagiba krivulje ili iz jednadžbe:

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

gdje je D apsorbirana doza,  $X_0$  početni broj organizama, a X broj preživjelih organizama (Trandafir i sur., 2014).



U Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju (LRKD) na Institutu Ruđera Boškovića korištene doze zračenja su 0,5 – 2,0 kGy za kontrolu insekata, 5 – 10 kGy za kontrolu gljivica te 5 – 20 kGy za kontrolu bakterija, što odgovara dozama prihvaćenim u profesionalnoj literaturi (IAEA, 2017). Doza od 25 kGy minimalna je za medicinsku sterilizaciju ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)).

Gama zračenje je čista i sigurna alternativa za obradu biodeterioriranih predmeta. Visoki kapacitet prodiranja zračenja i mogućnost za primjenu na mnogobrojnim različitim materijalima, čini ovu opciju atraktivnom alternativom u prezervaciji umjetnina, konzervaciji i dekontaminaciji (Adamo i sur., 2001). Najvažnije je izabrati najmanju dozu koja ne proizvodi neželjene efekte, a osigurava konzervaciju ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)).

Što je duže vrijeme zračenja i viša doza zračenja, povećava se mogućnost da kisik iz zraka reagira sa slobodnim radikalima nastalim u procesu zračenja materijala (Iordache i sur., 2012). Da Silva i sur. (2006) navode da primjena manjih brzina zračenja, odnosno duža izloženost zračenju uzrokuje indirektna oštećenja materijala jer je vrijeme zračenja dovoljno za odvijanje oksidativne razgradnje celuloznih materijala polimerne strukture.

Utjecaj zračenja na vlakna platna može se odrediti proučavanjem otpora na istezanje; smanjena čvrstoća i elastičnost vlakna pokazatelj je skraćivanja prosječne duljine lanca polimera celuloze ili pucanja lanca. Uz kidanje lanca celuloze, gama zračenje uzrokuje umrežavanje, oksidacijske reakcije, formiranje karbonilnih i karboksilnih skupina te degradaciju većine prirodnih polimera (IAEA, 2017; [www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)). Pokazalo se da se kemijske promjene u lancu celuloze događaju tek uz zračenje dozama većim od 10 kGy, a uz porast doze raste i broj depolimerizacija i nastanka karbonilnih i karboksilnih skupina (IAEA, 2017). Ako se uspoređuju vlakna biljnog i životinjskog podrijetla, biljna celulozna vlakna poput lana ili pamuka, osjetljivija su na zračenje od životinjskih proteinskih vlakna poput vune ili svile koji su radiostabilni te se mogu tretirati velikim dozama bez promjena u strukturi vlakna ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)). Sintetska viskozna vlakna su najosjetljivija na zračenje, ali su i najotpornija na napad gljivica i bakterija ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr); IAEA, 2017).

Kod zračenja predmeta kulturne baštine potrebno je uzeti u obzir osjetljivost svih dijelova, uključujući i pigmente te ostale dodatke. Brojne studije potvrdile su zanemarivost promjena kod različitih pigmenata koje se mogu primijetiti samo instrumentalno te su nevidljive ljudskom oku, uz postojanje nekih iznimki kao što su kreda te mramorno bijeli

pigment. Uočene promjene pigmenata bile su značajnije u odsustvu lakova, a povećanu radioosjetljivost pokazali su dodaci ulje sjemenki lana te arapska guma ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)).

Prednosti radijacijskog postupka za materijal platno su visoka pouzdanost, laka kontrola apsorbirane doze, mogućnost dezinfekcije velikih predmeta u ambalaži bez raspakiravanja, bez vidljivih ili mjerljivih promjena, istovremeno djelujući na sve štetne organizme u svim fazama njihova razvoja. Postupak je relativno brz i veći broj predmeta se može tretirati istovremeno te se provodi na odabranoj, u pravilu sobnoj temperaturi. Ozračeni predmeti ne postaju radioaktivni i ne postoji opasnost za restauratore, kustose, posjetitelje i okoliš. Mane su što ne pruža zaštitu od rekontaminacije, učinci na materijal su ireverzibilni i potrebno je prevesti predmete do laboratorija za ozračivanje jer je uređaj neprenosiv ([www.h-r-z.hr](http://www.h-r-z.hr)).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Gljivične kontaminacije platna, posebno slikarskog platna, mogu predstavljati problem u muzejima i galerijama, ali njihov najveći utjecaj dolazi do izražaja u uvjetima prirodnih nepogoda poput poplave kada je onemogućeno čuvanje kulturne baštine u sigurnim i kontroliranim uvjetima. Predmeti kulturne baštine mogu biti posebno ugroženi i u ratnim vremenima kada otežano održavanje i čuvanje pogoduje rastu i razvoju gljivičnih kultura. U takvim situacijama važno je što brže reagirati i uspostaviti kontrolu rasta gljivica i njihovih spora kako bi se usporilo propadanje platna.

Gama zračenje je učinkovita i sigurna metoda dekontaminacije predmeta kulturne baštine, osobito kada je potrebno u kratkom vremenu tretirati velik broj predmeta. Važno je odrediti prikladnu dozu gama zračenja s obzirom na vrstu kontaminanata na predmetu, njihovu koncentraciju i materijal od koga je predmet izrađen. Zračenje premalom dozom neće riješiti problem biokontaminacije, a prevelika doza može uzrokovati degradaciju i propadanje materijala.

Cilj diplomskog rada je bio procijeniti dozu gama zračenja i brzinu doze potrebnu za redukciju gljivične kontaminacije lanenog platna.

Specifični ciljevi su bili:

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

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitivanje sastava prirodne mikrobiote lanenog platna metodom razrjeđenja

Laneno platno izrezano je na kvadrate dimenzija 3,5 cm x 3,5 cm i ostavljeno da se homogenizira u plastičnoj vrećici te je zatim izvagan. Prosječna masa komada platna iznosila je 0,39 g. Platno koje je korišteno je laneno platno obrađeno tutkalom, dobiveno zagrijavanjem otopine kolagena prethodno izubrenog u destiliranoj vodi. U sterilnu polipropilensku konusnu epruvetu, tzv. falkonicu, steriliziranom pincetom stavljeni su izrezani komadići platna te je dodano 4 ml peptonske vode. Uzorci su homogenizirani vorteksiranjem. Na ovaj način dobiveno je razrjeđenje  $10^{-1}$ . Pripremljena su razrjeđenja od  $10^{-2}$  do  $10^{-4}$  miješanjem 100  $\mu$ L prethodnog uzorka s 900  $\mu$ L peptonske vode. Iz svakog razrjeđenja nanijeto je 100  $\mu$ L suspenzije na površinu sterilne hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici. Suspenzija je ravnomjerno razmazana pomoću sterilnog staklenog L-štapića. Svi uzorci izrađeni su u duplikatu.

Hranjiva podloga bio je MALT ekstrakt agar proizvođača (Oxoid, Hampshire, UK) koji je pripremljen suspendiranjem 50 g praha u 1 litri destilirane vode i kuhanjem do otapanja. Podloga je autoklavirana prema uvjetima sterilizacije za mikrobiološke podloge, 121 °C, tlak 1,2 bar, 15 minuta.

Uzorci su inkubirani 5 do 7 dana na temperaturi 25 °C. Na pločama su izbrojane porasle kolonije pri čemu nisu u obzir uzeta ona razrjeđenja koja sadrže porast veći od 150 kolonija.

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

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

$\Sigma C$  – zbroj kolonija izbrojenih na svim pločama

V – volumen inokuluma u mililitrima stavljen na hranjivu podlogu

n1 – broj ploča zadržanih za brojanje kod prvog razrjeđenja

n2 – broj ploča zadržanih za brojanje kod drugog razrjeđenja

d – razrjeđenje iz kojeg su dobiveni prvi brojevi

### 3.2. Inokulacija lanenog platna odabranom vrstom plijesni

Odabrana vrsta plijesni *Cladosporium sphaerospermum* inokulirana je na MEA podlogu i nakon 10 dana inkubacije na 25 °C iz poraslih sporulirajućih kultura priređene su suspenzije plijesni u peptonskoj vodi. Suspenzija je pripremljena u komori za rad s plijesnima pod UV svjetlom, uz plamenik. 100 µL suspenzije stavljeno je u kivetu te je dodavana voda s Tweenom. Kiveta je stavljena u denzitometar te je praćena vrijednost optičke gustoće. Kada je optička gustoća iznosila 1, dobivena je koncentracija inokuluma  $1 \times 10^6$  CFU/g.

Komadići lanenog platna stavljani su u sterilne polipropilenske konusne epruvete od 15 mL i podijeljeni u dvije skupine. Prva je skupina predstavljala prirodnu kontaminaciju platna te je stavljena na inkubaciju 5 do 7 dana pri 25 °C i relativnoj vlažnosti zraka 70-80 %. Nakon inkubacije uzorak materijala je nasaden u duplikatu. Druga skupina prvo je sterilizirana u autoklavu na 121 °C, tlak 1,2 bar, 15 minuta, a zatim je inokulirana suspenzijom *Cladosporium sphaerospermum*  $1 \times 10^2$  CFU/g te je uzorak odmah bez inkubacije nasaden u duplikatu kao kontrola. Ostatak je stavljen na inkubaciju u već navedenim uvjetima. Nakon inkubacije obje su skupine uzoraka ozraćene dozama od 2 kGy, 7 kGy, 20 kGy i 50 kGy te brzinama od 0,1 Gy/s i 8.6 Gy/s u duplikatu za svaku dozu i brzinu. Uzorci koji su predviđeni za nasađivanje 14., 28. i 56. dan nakon zraćenja do tada su čuvani na sobnoj temperaturi bez izvora vlažnosti, dok su uzorci predviđeni za nasađivanje odmah nakon zraćenja bili naneseni na hranjive podloge.

### 3.3. Zraćenje uzoraka

Uzorci su zraćeni na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju na panoramskom uređaju sa  $^{60}\text{Co}$  izvorom gama zraćenja. Temperatura komore za ozraćivanje je bila oko 18 °C (Ražem i sur., 1984). Obrada materijala ionizirajućim zraćenjem se provedena je u skladu s nacionalnim pravilnikom (Narodne novine br. 046/1994) i međunarodnim propisima ISO standardom (International Organization for Standardisation), ISO 13485:2003, Medical devices –QMS-Requirements for regulatory purposes, slijedeći metodu ISO 11137-1: 2006, Sterilization of Health Care Products – Radiation. Uređaj za ozraćivanje u LRKD je panoramskog tipa što znači da se izvor zraćenja nalazi u prostoriji kada se obavlja ozraćivanje, a sklanja se u sigurni položaj kada je potrebno ući u prostoriju za ozraćivanje ili kada se uređaj ne koristi. Prostorija za ozraćivanje pravokutnog je oblika u kojoj ima mjesta za 4 do 6 m<sup>3</sup> materijala u svakoj šarži (IAEA, 2017). Provedena su

dozimetrijska mjerenja kako bi se dokazalo da su preporučene i određene doze zračenja ispravno predane materijalu izloženom zračenju prema unaprijed utvrđenim doznim mapama. Topografija polja zračenja izmjerena je pomoću sekundarnog i rutinskog kemijskog dozimetara na bazi etanolklorbenzena (ISO/ASTM 51538:2009) (Ražem i sur., 1984).

Pripremljeni uzorci ozračeni su dozama od 2 kGy, 7 kGy, 20 kGy i 50 kGy, te brzinama od 0,1 Gy/s i 8,6 Gy/s. Sva mjerenja napravljena su u duplikatu, a rezultati vijabilnosti plijesni prije i nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g, kako je opisano u poglavlju 3.1

#### 3.4. Određivanje doze $D_{10}$

$D_{10}$ , decimalna redukcijaska doza, definira se kao doza zračenja potrebna da inaktivira 90% mikrobne populacije, odnosno da se populacija smanji za 1log. Vrijednost  $D_{10}$  može se iščitati iz krivulje preživljavanja kao recipročna vrijednost nagiba krivulje.  $D_{10}$  se računa iz sljedeće formule:

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

gdje je  $D$  apsorbirana doza,  $X_0$  početni broj organizama,  $X$  broj preživjelih organizama (Aquino, 2012).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati preliminarnih pokusa mikološke analize lanenog platna prikazani su u Tablici 2. Prirodnu kontaminaciju čine plijesni, kvasci i sluzavi kvasci u koncentraciji od otprilike  $6 \times 10^2$  CFU/g. Rezultati su pokazali da je i autoklavirano platno podložno kontaminaciji plijesnima i kvascima, ali u nešto nižoj razini od prirodne kontaminacije.

U tablici 3 prikazani su rezultati neozračenih kontrola. Prirodnu kontaminaciju platna čine kvasci i vrste *Penicillium spp.* Penicilije su jedne od gljivica koje kontaminiraju platno (IAEA, 2017). Gljivice su nehomogeno raspršene na papiru pokazujući točkastu kontaminaciju. Početna koncentracija iznosila je  $2 \times 10^3$  CFU/g, a nakon 7 dana inkubacije na 25 °C i 70 % Rv, koncentracije i prirodno prisutne mikrobiote i inokuliranih plijesni *Cladosporium* porasla je 100 puta u odnosu na početnu.

Tablica 2.

OPIS	CFU/g	VRSTE
Prirodna kontaminacija	$5,5 \times 10^2$	Plijesni, kvasci, sluzavi kvasci
Autoklavirano platno	$2,3 \times 10^2$	Plijesni, kvasci
Inokulacija s <i>Cladosporium</i> ( $10^4$ /g) i autoklaviranje	$1,4 \times 10^2$	Kvasci
Inokulacija s <i>Cladosporium</i> ( $10^4$ /g) inkubacija 4 dana 25 °C, autoklaviranje nakon inkubacije	0	-
Inokulacija s <i>Cladosporium</i> ( $10^4$ /g) inkubacija 4 dana 25 °C	$2,1 \times 10^6$	Plijesni

Tablica 3. Rezultati mikološke analize platna prirodne kontaminacije i inokuliranih plijesni *Cladosporium sphaerospermum* sa i bez inkubacije.

OPIS	CFU/g	VRSTE
Platno prirodna kontaminacija / bez inkubacije	$1,6 \times 10^3$	Kvasci, <i>Penicillium</i>
Platno prirodna kontaminacija / inkubacija 7 dana	$1,1 \times 10^5$	<i>Penicillium</i>
Autoklavirano platno / inokulacija s <i>Cladosporium</i> / bez inkubacije	$2,3 \times 10^2$	<i>Cladosporium</i>
Platno inokulacija s <i>Cladosporium</i> / inkubacija 7 dana	$5,5 \times 10^4$	<i>Cladosporium</i>

Antifungalni efekt gama zračenje na prirodno prisutnu mikrobiotu platna ovisan je o dozi i brzini doze. Niže doze od 2 i 7 kGy pri manjoj brzini od 0,1 Gy/s nisu učinkovite za dekontaminaciju prirodne mikrobiote platna. Iz tablica 3 i 4 vidljivo je da su se sve vrste koje su prvotno zabilježene, ponovno pojavile u koncentracijama od 600-180000 CFU/g. U tablici 4 vidimo da pri brzini 8,6 Gy/s i dozi zračenja 2 kGy, iako je došlo do oporavka bijele plijesni 56. dana od zračenja, to je u nižoj koncentraciji od prvotno prisutne (140 CFU/g). To nam govori kako se pri istoj dozi zračenja, veća brzina pokazala kao učinkovitija. Do istog zaključka o boljoj učinkovitosti veće brzine dovode nas i podaci iz tablice 4. Pri dozi od 7 kGy kod obje brzine zračenja došlo je do oporavka *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* i bijelih plijesni u nižoj koncentraciji od prvotno prisutne, a veća brzina uzrokovala je nižu koncentraciju. Visoke doze od 20 i 50 kGy primijenjene pri obje brzine inhibirale su oporavak većine gljivičnih vrsta osim *Fusarium spp.* i narančastih kvasaca. *Fusarium spp.* pojavili su se 14. dan nakon zračenja dozom od 50 kGy i brzinom 0,1 Gy/s u koncentraciji od 90 CFU/g, a narančasti kvasci 28. dan nakon zračenja istom dozom i brzinom, u koncentraciji od 300 CFU/g (Tablica 7). Veća brzina zračenja 8,6 Gy/s potpuno je inhibirala oporavak svih gljivičnih vrsta pri dozama zračenja 20 i 50 kGy (Tablica 6 i Tablica 7).

Porast na uzorcima platna inokuliranih vrstom *Cladosporium sphaerospermum* dozama 2, 7 i 20 kGy ne daju jednoznačne rezultate. Pri najmanjoj dozi zračenja od 2 kGy samo u jednom uzorku došlo je do oporavka kladospirije, 14. dana nakon zračenja brzinom doze 0,1 Gy/s, a i tada to je bilo u 120 puta nižoj koncentraciji od prvotno prisutne (Tablica



4). Pri jačoj dozi od 7 kGy također je u samo jednom uzorku došlo do oporavka, 14. dan nakon zračenja brzinom doze 0,1 Gy/s (Tablica 5). Brzina zračenja 8,6 Gy/s potpuno je inhibirala oporavak svih inokulirane vrste pri dozama zračenja 2 i 7 kGy (Tablica 4 i Tablica 5). Uz dozu zračenja od 20 kGy došlo je do oporavka kladosporije na dva uzorka, 28. dan nakon zračenja brzinom 0,1 Gy/s te neposredno nakon zračenja brzinom 8,6 Gy/s. Nakon manje brzine zračenja koncentracija je bila 6 puta niža, a nakon veće brzine 600 puta niža od prvotno prisutne (Tablica 6). Veća brzina zračenja bila je učinkovitija kod doza 2, 7 i 20 kGy. U nedavnoj studiji Shuryak i sur. (2017) objasnili su kako je ukupna apsorbirana doza za vrijeme zračenja velikim brzinama isporučena u prekratkom vremenu za dostatan popravak štete. Pokazali su kako ispitivane kulture kvasaca koje su zračene nižim brzinama doza duži vremenski period dijele antioksidativne enzime koji u visokim staničnim koncentracijama mogu savladati oksidativni stres te pridonijeti oporavku ozračenih kultura.

Uz kladosporije u nekim uzrocima nakon zračenja pri dozama od 2, 7 i 20 kGy nađeni su i kvasci, bijele plijesni, *Chrysosporium spp.* te *Fusarium spp.* (Tablica 4, Tablica 5, Tablica 6).

Najjača doza zračenja od 50 kGy pri obje brzine, potpuno je inhibirala oporavak svih gljivičnih vrsta, uključujući i *Cladosporium spp.* (Tablica 7).

Tablica 4. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na platnu nakon zračenja dozom od 2 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

Doza	2kGy							
Brzina	0,1 Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
<b>0.</b>	6,4x10 <sup>2</sup>	Kvasci	0	-	1,8x10 <sup>2</sup>	zeleno-bijele plijesni	2,2x10 <sup>4</sup>	Kvasci
<b>14.</b>	1,0x10 <sup>5</sup>	<i>Penicillium</i> , Kvasci	6,8x10 <sup>2</sup>	<i>Cladosporium</i>	3,4x10 <sup>3</sup>	<i>Aspergillus</i>	0	-
<b>28.</b>	6,5x10 <sup>3</sup>	Kvasci <i>Penicillium</i>	9,6x10 <sup>3</sup>	Kvasci	1,8x10 <sup>3</sup>	<i>Aspergillus</i>	0	-
<b>56.</b>	1,8x10 <sup>5</sup>	<i>Penicillium</i>	9,1x10 <sup>1</sup>	Bijela plijesan ( <i>Fusarium</i> ), <i>Chrysosporium</i>	1,4x10 <sup>2</sup>	Bijela plijesan ( <i>Fusarium</i> )	9,1x10 <sup>1</sup>	Bijela plijesan ( <i>Fusarium</i> )

Tablica 5. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na platnu nakon gama zračenja dozom od 7 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

Doza	7kGy							
Brzina	0,1Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
<b>0.</b>	0	-	0	-	4,6x10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i>	9,1x10 <sup>1</sup>	Bijela plijesan
<b>14.</b>	1,4x10 <sup>2</sup>	<i>Penicillium</i> , zeleno-sive plijesni	4,5x10 <sup>2</sup>	<i>Cladosporium</i> , zeleno-sive plijesni	9,1x10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>	0	-
<b>28.</b>	4,6x10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i>	4,6x10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i>	0	-	0	-
<b>56.</b>	2,3x10 <sup>2</sup>	Bijela plijesan	1,8x10 <sup>2</sup>	Bijela plijesan	9,1x10 <sup>1</sup>	Bijela plijesan ( <i>Fusarium</i> )	9,1x10 <sup>1</sup>	Bijela plijesan ( <i>Fusarium</i> )

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

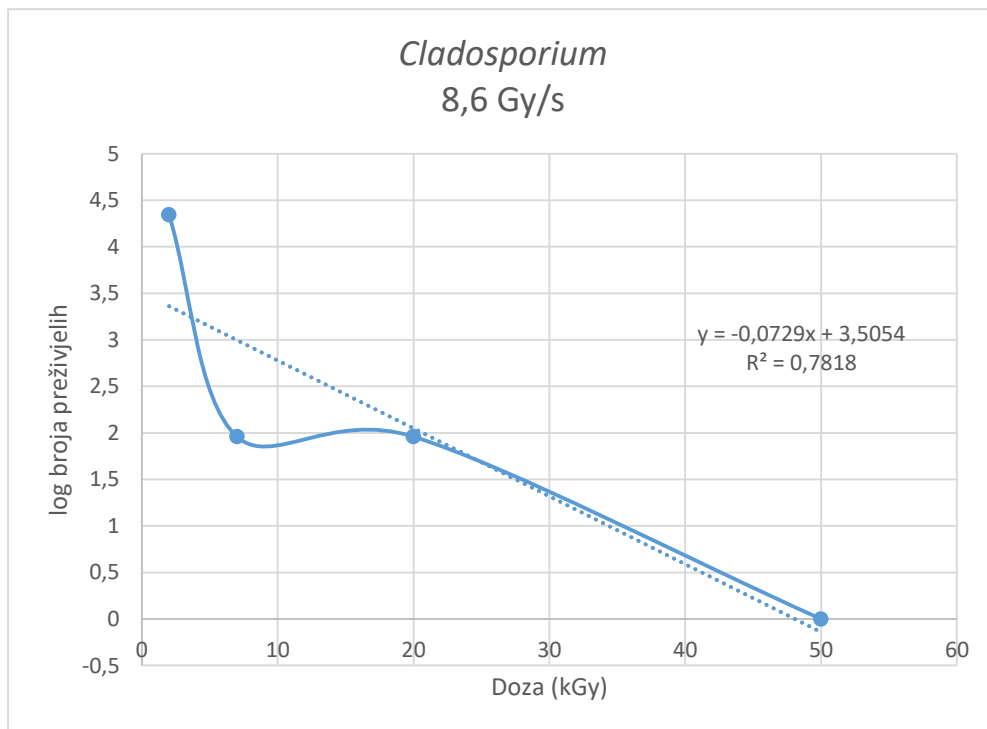
Doza	20kGy							
Brzina	0,1 Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
0.	0	-	0	-	0	-	9,1x10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i> , zeleno-bijele <i>Cladosporium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

Tablica 7. Porast prirodne mikrobiote i inokuliranih plijesni na platnu nakon gama zračenja dozom od 50 kGy i pri brzini doze od 0,1 odnosno 8,6 Gy/s.

Doza	50kGy							
Brzina	0,1 Gy/s				8,6 Gy/s			
Opis	Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>		Prirodna mikrobiota		Inokulirano s <i>C. sphaerospermum</i>	
	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste	CFU/g	Vrste
0.	0	-	0	-	0	-	0	-
14.	9,1x10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium</i>	0	-	0	-	0	-
28.	3,2x10 <sup>2</sup>	Narančasti kvasci	0	-	0	-	0	-
56.	0	-	0	-	0	-	0	-

$D_{10}$  (decimalna redukcijaska doza) odnosno doza potrebna da se inaktivira 90% broja plijesni to jest da se broj mikroorganizama smanji za 1 log. Na slici 1 prikazan je graf ovisnosti logaritma broja preživjelih plijesni i primijenjene doze neposredno nakon zračenja. Iz pravca dobivenog na grafu izračunata je  $D_{10}$  vrijednosti za primijenjenu brzinu 8,6 Gy/s.  $D_{10}$  je određen kao negativna recipročna vrijednost nagiba krivulje,  $D_{10} = -1/a$ , gdje je  $a$  nagib krivulje. Vrijednost  $D_{10}$  određuje se kako bi bilo moguće uspoređivanje različitih

mikroorganizama ili istih mikroorganizama pod različitim uvjetima. Zbog zahtjevnosti određivanja odgovarajuće doze gama zračenja u postupku dezinfekcije, poznavanje vrijednosti  $D_{10}$  za neku vrstu pri određenim uvjetima može osigurati željenu redukciju mikroorganizama. Ipak, u obzir osim redukcije mikroorganizama treba uzeti i stupanj degradacije materijala kao i stupanj kontaminacije (Trandafir i sur., 2014). Pri brzini od 8,6 Gy/s nulti dan zračenja, dobivena je  $D_{10}$  13,72 kGy, dok se pri brzini 0,1 Gy/s vrijednost  $D_{10}$  ne može izračunati jer neposredno nakon zračenja svim ispitivanim jačinama doza, nije bilo porasta *C. sphaerospermum* (Slika 1). Potrebno je provesti još eksperimenata o utjecaju gama zračenja na plijesan *C. sphaerospermum* kako bi mogli zaključiti jesu li rezultati našeg istraživanja bili samo iznimka jer je za očekivati bilo da veća brzina zračenja bolje dezinficira uzorke platna od manje brzine, dok se kod nas dogodila obrnuta situacija.



Slika 1. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih plijesni i doze zračenja u kGy za *C. sphaerospermum* pri brzini od 8,6 Gy/s.

Rezultati su pokazali da su gljivice najrezistentnije na zračenje *Fusarium spp.* i narančasti kvasci koji su preživjeli čak i najveće ispitivano zračenje od 50kGy. Nedavne studije (Shuryak i sur., 2019; Sharma i sur., 2017) pokazale su otpornost nekih vrsta gljivica i kvasaca poput *Cryptococcus spp.* i *Saccharomyces spp.*, na zračenje brzinama doza 50 kGy/h ili manjima. Otpornost na zračenje kvasaca čvrsto se podudara s unutarstaničnim sadržajem manganovih antioksidansa koji su dio antioksidantnih enzima poput superoksidne dismutaze. Mangan je važan za redukcijsko-oksidacijski prijenos metala u stanici. Za razliku od redukcijsko-oksidacijskih kruženja metala poput željeza i kroma koja stvaraju vrlo reaktivne hidroksilne radikale (HO•), reakcije mangana ne otpuštaju slobodne radikale. Skladištenje mangana u nekim vrstama moglo bi objasniti otpornost na zračenje. *Cladosporium spp.* pokazale su se rezistentne na zračenje od 20 kGy koje je još uvijek veće od uobičajenog zračenja korištenog za kontrolu gljivica (2 – 10 kGy) (IAEA, 2017). Mogući uzrok rezistencije vrsta roda *Cladosporium* je produkcija pigmenta melanina za kojeg se pretpostavlja da ima radioprotektivna svojstva. Tu pretpostavku podržava i činjenica da su neke melanizirane gljivice nađene na područjima ekstremno visoke radioaktivnosti kao što su reaktor u Černobilu, svemirska stanica te planine na Antartici. Smatra se da su radioprotektivna svojstva melanina posljedica njegovog kemijskog sastava, hvatanja slobodnih radikala kao i specifičnog prostornog rasporeda čestica melanina u stanici. (Dadachova i Casadlevall, 2008).

## 5. ZAKLJUČAK

Antifungalni učinak gama zračenja ovisan je o dozi i brzini doze. Vrste *Fusarium spp.*, narančasti kvasci i *Cladosporium spp.* pokazali su se najrezistentijim gljivicama na gama zračenje. Iz rezultata pokusa određena je i  $D_{10}$  vrijednost za višu brzinu zračenja 13,72 kGy. Potrebno je provesti kemijsku analizu lanenog platna kako bi se dobio bolji uvid u utjecaj određenih doza i brzina zračenja na sastav platna. Za učinkovitu primjenu gama zračenja u konzervaciji platnenih predmeta kulturne baštine potreban je interdisciplinarni pristup.

## 6. LITERATURA

- Adamo M, Brizzi M, Magaudda G, Martinelli G, Plossi-Zappala M, Rocchetti F, Savagnone F. Gamma radiation treatment of paper in different environmental conditions: Chemical, physical and microbiological analysis, *Restaurator*, 2001, 22, 107–131.
- Allsopp D. Worldwide wastage: the economics of biodeterioration. *Microbiol Tod*, 2011, 38, 150-153.
- 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.
- Aquino KAS. Sterilization by Gamma Irradiation. U: Gamma Radiation. Adrovic F, urednik, InTech, 2012, str. 171-179.
- Calvo AM, Docters A, Miranda MV, Saparrat MCN. The Use of Gamma Radiation for the Treatment of Cultural Heritage in the Argentine National Atomic Energy Commission: Past, Present, and Future. U: Applications of Radiation Chemistry in the Fields of Industry, Biotechnology and Environment. Topics in Current Chemistry Collections. Venturi M, D'Angelantonio M, urednici, Springer, Cham., 2017, str. 227-247.
- Ciferri Orio. Microbial degradation of paintings. *AEM*, 1999, 65(3), 879–885.
- Cragg SM, Beckham, GT Bruce NC, Bugg TDH, Distel DL, Dupree P, Etxabe AG, Goodell BS, Jellison J, McGeehan JE, McQueen-Mason SJ, Schnorr K, Walton PH, Watts JEM, Zimmer M. Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 29, 108–119.
- Craig R. Alternative approaches to the treatment of mould - biodeterioration - an international problem. *Pap Conserv*, 1986, 10, 27-30.

- 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.
- Dadachova E, Casadevall A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(6), 525-531.
- Daniels VD. The Chemistry of paper conservation, *Chem Soc Rev*, 1996, 25, 179-186.
- Duraković S, Redžepović S. Uvod u opću mikrobiologiju. Zagreb, Kugler, 2002, str. 343-352.
- Dželalija M. Ionizirajuće zračenje u biosferi (interna skripta). Split, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2006, str. 5-6.
- Fellers SC, Iversen T, Lindstrom T, Nilsson T, Righdahl M. Ageing/Degradation of Paper. A literature Survey, FoU-projectet for Papperkonservering Report 1E, 1989, Stockholm.
- Feretić D. Uvod u nuklearnu energetiku (drugo dopunjeno izdanje), Zagreb, Školska knjiga, 2011, str. 66-67.
- Florian MLE. Fungal Facts. London, Archetype publications, 2002, str.146.
- Giuffrida MG, Mazzoli R, Pessione E. Back to the past. Decyphering cultural heritage secrets by protein identification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102, 5445-5455
- Grant C, Hunter CA, Flanigan B, Bravery AF. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterior Biodegradation*, 1989, 25, 259–284.
- Gutarowska B, Pietrzak K, Machnowski W, Milczarek JM. Historical textiles – a review of microbial deterioration analysis and disinfection methods. *Text Res J*. 2017, 87(19), 2388-2406.
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=17513>,



<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=3443>,

<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=59130>. pristupljeno 14.3.2021.

IAEA, Uses od ionizing radiation for tangible cultural heritage conservation, 2017, poglavlja 2, 3, 5, 7, 8, 25.

Iordache O, Stănculescu I, Plavan V, Miu L. Scientific Aspects of Degradation and Conservation of Heritage Artifacts, ICAMS 2012 – 4th International Conference on Advanced Materials and Systems

Kaarakainen P, Rintala H, Vepsäläinen A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Meklin T., Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci Total Environ*, 2009, 407, 4673–4680.

Le Caër S. Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H<sub>2</sub> production under ionizing radiation. *Water*, 2011, 3:253.

Material response as a criteria for the approach to radiation treatment of cultural heritage objects, 2014, <http://www.h-r-z.hr>, pristupljeno 17.3.2021.

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

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

Menier J, Sur quelques insectes prédateur des archives, Patrimoine culturel et alterations biologiques. *Actes des journées d'études de la S.F.I.I.C.*, Poitiers, 17-18 November 1988, 45-52.

Michaelsen A, Pinzari F, Barbabietola N, Pinar G. Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi. *Int Biodeter Biodegr*, 2013, 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.
- Ražem D, Anđelić L, Dvornik I. In High-dose Dosimetry; Proc. IAEA Symp., Vienna, 1984.
- Sharma A, Gaidamakova EK, Grichenko O, Matrosova VY, Hoeke V, Klimenkova P, Conze IH, Volpe RP, Tkavc R, Gostinčar C, Gunde-Cimerman N, DiRuggierof J, Shuryak I, Ozarowski A, Hoffman BM, Daly MJ. Across the tree of life. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, E9253–E9260.
- Shea KM. Technical report: irradiation of food. *Pediatrics*, 2000, 106:1505–10.
- Shuryak I, Tkavc R, Matrosova VY, Volpe RP, Grichenko O, Klimenkova P, Conze IH, Balygina IA, Gaidamakova EK, Daly MJ. Chronic gamma radiation resistance in fungi correlates with resistance to chromium and elevated temperatures, but not with resistance to acute irradiation. *Sci Rep*, 2019, 9, 11361.
- Stepanik T, Kost D, Nowicki T, Gaba D. Effects of electron beam irradiation on deoxynivalenol levels in distillers' dried grain and solubles and in production intermediates. *Food Addit Contam*, 2007, 24:1001–6.
- Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills?. *AMB*, 2013, vol. 97, 22, 9637-46.
- Sterflinger K, Pinzari F, The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environ Microbiol*, 2012, 14(3): str. 559–566.
- Strassberg R. The Use of Fumigants in Archival Repositories. *Am Arch*, 1978, Vol. 41, No. 1, str. 25-36.
- Szostak-Kotowa J. Biodeterioration of textiles, *Int Biodeter Biodegr*, 2004, Volume 53, Issue 3, str. 165-170.

Thornley MJ. Radiation Resistance among bacteria. *J Appl Bacteriol*, 1963, 26, 334-345.

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. Bukurešt, ICAMS, 2014, str. 561-566.

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

## 7. SAŽETAK

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

Prirodnu mikrobiotu platna čine vrste iz rodova *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* i kvasci. Antifungalni učinak gama zračenja ovisan je o dozi i brzini doze. Vrste *Fusarium spp.*, narančasti kvasci i *Cladosporium spp.* pokazali su se najrezistentnijim gljivicama na gama zračenje. Iz rezultata pokusa određena je i  $D_{10}$  vrijednost od 13,72 kGy za višu brzinu zračenja (8,6 Gy/s). Potrebno je provesti kemijsku analizu platna kako bi se dobio bolji uvid u utjecaj određenih doza i brzina zračenja na sastav platna. Za učinkovitu primjenu gama zračenja u konzervaciji platnenih predmeta kulturne baštine potreban je interdisciplinarni pristup.

## SUMMARY

Major part of the cultural heritage consists of objects of organic, plant material, canvas. As such, they are highly susceptible to fungal contamination, which by its action accelerates the deterioration of the canvas. One of the most suitable methods to stop the destructive action of fungi is gamma radiation. This paper investigates the resistance of linen mycobiota to gamma radiation as well as the resistance of the inoculated secondary colonizer type *Cladosporium sphaerospermum*. The samples were treated with a source at the Laboratory for radiation chemistry and dosimetry of Ruđer Bošković Institute. Absorption doses of 2, 7, 20 and 50 kGy were applied at two radiation rates of 0,1 and 8,6 Gy/s. Microbiological analysis of irradiated samples was carried out immediately after radiation and on the 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> day after radiation.

Natural mycobiota of linen material includes species from the genera *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* and yeast. The antifungal effect of gamma radiation is dependent on dose and dose rate. *Fusarium spp.*, orange yeasts and *Cladosporium spp.* proved to be the most resistant to gamma radiation. The test results also set D<sub>10</sub> value of 13,72 kGy for higher radiation rate (8,6 Gy/s). A chemical analysis of the linen material should be carried out in order to obtain better insight into the impact of certain doses and the radiation rates on the composition of the canvas. An interdisciplinary approach is required for the effective application of gamma radiation in the conservation of canvas objects of cultural heritage.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Otpornost mikrobiote lanenog platna na gama zračenje

Silvija Marjanović

#### SAŽETAK

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

Prirodnu mikobiotu platna čine vrste iz rodova *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* i kvasci. Antifungalni učinak gama zračenja ovisan je o dozi i brzini doze. Vrste *Fusarium spp.*, narančasti kvasci i *Cladosporium spp.* pokazali su se najrezistentnijim gljivicama na gama zračenje. Iz rezultata pokusa određena je i  $D_{10}$  vrijednost od 13,72 kGy za višu brzinu zračenja (8,6 Gy/s). Potrebno je provesti kemijsku analizu platna kako bi se dobio bolji uvid u utjecaj određenih doza i brzina zračenja na sastav platna. Za učinkovitu primjenu gama zračenja u konzervaciji platnenih predmeta kulturne baštine potreban je interdisciplinarni pristup.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 1 grafički prikaz, 7 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kulturna baština, gama zračenje, laneno, platno, plijesni, *Cladosporium*

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Daniela Jakšić**, poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2021.

## 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

### Resistance of linen canvas mycobiota to gamma irradiation

Silvija Marjanović

#### SUMMARY

Major part of the cultural heritage consists of objects of organic, plant material, canvas. As such, they are highly susceptible to fungal contamination, which by its action accelerate the deterioration of the canvas. One of the most suitable methods to stop the destructive action of fungi is gamma radiation. This paper investigates the resistance of linen mycobiota to gamma radiation as well as the resistance of the inoculated secondary colonizer type *Cladosporium sphaerospermum*. The samples were treated with a source at the Laboratory for radiation chemistry and dosimetry of Ruđer Bošković Institute. Absorption doses of 2, 7, 20 and 50 kGy were applied at two radiation rates of 0,1 and 8,6 Gy/s. Microbiological analysis of irradiated samples was carried out immediately after radiation and on the 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> day after radiation.

Natural mycobiota of linen material includes species from the genera *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* and yeast. The antifungal effect of gamma radiation is dependent on dose and dose rate. *Fusarium spp.*, orange yeasts and *Cladosporium spp.* proved to be the most resistant to gamma radiation. The test results also set D<sub>10</sub> value of 13,72 kGy for higher radiation rate (8,6 Gy/s). A chemical analysis of the linen material should be carried out in order to obtain better insight into the impact of certain doses and the radiation rates on the composition of the canvas. An interdisciplinary approach is required for the effective application of gamma radiation in the conservation of canvas objects of cultural heritage

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

Thesis includes: 33 pages, 1 figures, 7 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cultural heritage, gamma irradiation, linen, canvas, moulds, *Cladosporium*

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

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Daniela Jakšić, Ph.D.** Postdoktorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2021.