

Otpornost mikrobiote (kvasaca) lanenog platna na gama zračenje

Matijević, Marija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:513167>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Matijević

**Otpornost mikrobiote (kvasaca) 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, svim ostalim zaposlenicima Zavoda za mikrobiologiju, također i dr.sc. Branki Mihaljević i dr.sc. Katarini Marušić s Instituta Ruđer Bošković na suradnji i ozračivanju uzoraka, kao i osoblju na Zavodu za radijacijsku kemiju i dozimetriju instituta Ruđer Bošković te Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi. Na prvom mjestu zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj potpori, kao i svim prijateljima i kolegama koji su obilježili moj studentski put bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kulturna baština i metode prezervacije	1
1.2. Utjecaj gama zračenje na gljivice.....	3
1.3. Značajke gljivica i <i>Cladosporium spp.</i>.....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1. Mikrobiološka obrada uzoraka metodom razrjeđenja	7
3.2. Inokuliranje platna vrstom <i>Cladosporium spaherospermum</i>	7
3.3 Ozračivanje uzoraka gama zračenjem	8
3.4. Određivanje doze D10	8
4. REZULTATI I RASPRAVA	10
5. ZAKLJUČAK	20
6. LITERATURA	21
7. SAŽETAK	24

1. UVOD

1.1. Kulturna baština i metode prezervacije

Knjižnice, arhivi i ostale ustanove u kojima se nalaze predmeti kulturne baštine, često imaju pogodne uvjete za rast gljivica, što uvelike ovisi o temperaturi i vlažnosti. Pored samog propadanja i raspada ovakvih dokumenata, koji su često unikatni i rijetki, ovakva situacija može dovesti do rizika po ljudsko zdravlje zbog kontaminacije knjiga i dokumenata plijesnima (da Silva i sur., 2006).

Prema Marasoviću, pojam kulturne baštine odnosio bi se na „dostignuća što su nam preci ostavili 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; Marasović, 2001).

Još šire shvaćanje kulturne baštine imaju Prott i O'Keefe pošto navode da taj pojam obuhvaća manifestacije ljudskog života koje su odraz određenog pogleda na život i svjedoče o povijesti i valjanosti toga pogleda (Šošić, 2014; Prott i O'Keefe, 1992). Također, pojam kulturne baštine naglašava ideju skrbništva tj. zaštite materijalnih i nematerijalnih dostignuća ljudske kulture, ne samo na dobrobit i uživanje sadašnjeg naraštaja nego također i budućih ljudskih generacija (Šošić, 2014).

Svaka definicija, iako međusobno različite, naglašavaju neizmjernu važnost istraživanja i rada na ovome području.

Pojam kulturne baštine obuhvaća ne samo materijalne oblike kulturnog nasljeđa, nego i nematerijalna dostignuća ljudske kulture. Materijalna kulturna baština dijeli se na pokretna i nepokretna kulturna dobra. U pokretna kulturna dobra mogu spadati svi predmeti koji imaju neku poveznicu s ljudskom kulturom, kao što su umjetnine poput slika i kipova, ali i nakit, posuđe, liturgijski predmeti, stari novac, knjige i sl. Nepokretna kulturna dobra su, pored povijesnih građevina, primjerice i arheološka nalazišta, čitave graditeljske cjeline, okoliš objekta tj. prostorni kontekst u kojem se nepokretno kulturno dobro nalazi. Nematerijalnu baštinu čine primjerice plesovi i druge umjetničke izvedbe, glazba, običaji, tradicionalna znanja i vještine, vjerski rituali itd. Načelno treba razlikovati kulturnu od prirodne baštine: kulturna baština nužno je nastala kao rezultat ljudskog djelovanja (Šošić, 2014).

Nažalost, na globalnoj razini, predmeti i lokaliteti kulturne baštine suočavaju se s mnoštvom prijetnji uslijed: starosnog i prirodnog propadanja, krađe i pljačke, ratnih sukoba, turizma, agresivne urbanizacije, špekulativnog razvoja, prirodnih katastrofa i okolišnih utjecaja, kako unutar ustanova kulturne baštine, kao i na terenu, pojedinačni istraživači, profesionalna društva, muzeji, sveučilišta i vlade prihvatile su nove medijske tehnologije kako bi proširile tradicionalne metode upravljanja kulturom. Ann Marie Sullivan u svojem radu govori o primjeni novih medija i digitalizacije općenito na kulturnu baštinu u cilju unapređenja i očuvanja iste (Sullivan, 2016).

Najveće štete u zatvorenom okruženju prvenstveno uzrokuju celulolitičke gljive, što rezultira gubitkom čvrstoće vlakana i propadanjem materijala. Ostale posljedice prisutnosti mikroba mogu nastati kao rezultat trajnog bojenja od pigmentacije i prodora micelija, kako od celulolitičkih tako i od necelulolitičkih gljivica, a zanimljivo je što koriste izvore hrane u rasponu od škroba do površinske prljavštine i ulja (Montegut i sur., 1991).

Pokazano je da su spore većine fungalnih vrsta sposobne iskoristiti kondenzacijsku vlagu, a pri uvjetima visoke relativne vlažnosti (75-95%), spore germiniraju u micelij. Ako vlažni uvjeti ostanu nepromijenjeni, dolazi do razvoja novih spora unutar 48-72 h i tako postpuno dolazi do dominacije na materijalu (Garg i sur., 1995).

Sterilizacija općenito, definirana je kao bilo koji proces koji efektivno ubija ili eliminira gotovo sve mikroorganizme poput gljivica, bakterija, virusa i spora, a izbor metode sterilizacije ovisi o materijalima i njihovoj uporabi uporabi kako se ne bi izazvala šteta (da Silva Aquino, 2012). Pošto je poznato da primjena određenih sterilizacijskih uvjeta ovisi i o vrsti mikroorganizama koji se nalaze na uzorku, Ettenauer i suradnici istraživali su metode koje se koriste za identifikaciju mikroba. U današnje se vrijeme se izolacija i identifikacija mikroorganizama, posebno gljivica, i dalje drži tradicionalnih metoda za procjenu mikrobiološke kontaminacije. Ove klasične tehnike uzgoja omogućuju kvantitativnu i kvalitativnu procjenu istraženog okoliša i predstavljaju važnu metodologiju na ovom polju. S druge strane, primjenom standardnih tehnika s laboratorijskim podlogama, procjenjuje se da se može uzgajati samo manjina od oko 1% ukupnih bakterija i do 10% populacije gljiva uočljivih u prirodi. Stoga su molekularne i filogenetske metode osigurale sredstva koja omogućuju identifikaciju bez uzgoja kolonija. Brze i osjetljive alternative klasičnim tehnikama uzgoja su tehnike temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (PCR) koje nude priliku za analizu pune raznolikosti mikrobnih zajednica (Ettenauer i sur., 2012).

Gljivice mogu hidrolizirati široki raspon polimera, uključujući celulozu, što je rezultat njihovih učinkovitih degradirajućih enzima, a razvijeno je nekoliko tehnika za konzervaciju knjiga i dokumenata od biodeteriorirajućih agensa (da Silva i sur., 2006).

Kako bi se spriječila ili barem smanjila biorazgradnja predmeta kulturne baštine, koriste se razne metode poput fumigacije, anoksije ili kemijski biocidi. Učinci svih ovih metoda ograničeni su difuzijom, a neki od njih mogu izazvati ozbiljne nuspojave na materijal obrađenog predmeta, na okoliš ili na konzervatore i kustose ili čak na posjetitelje muzeja (Marušić i sur., 2019). Neke od ovih tehnika uključuju uporabu jako toksičnih kemikalija, uključujući etilen oksid koji je kancerogen i uz to što je skup, zabranjen je u velikom broju država. Alternativa ovakvim tehnikama upravo je gama zračenje, obećavajući tretman u polju konzervacije (da Silva i sur., 2006).

1.2. Utjecaj gama zračenje na gljivice

Gama zračenje su elektromagnetski valovi visoke moći prodiranja koji prolaze kroz materijale bez ostavljanja ikakvih zaostataka, što je prednost nad nekim drugim metodama jer nakon zračenja, rukovanje knjigama i dokumentima može se obavljati sigurno (da Silva i sur., 2006).

Gama zračenje dostavlja određenu dozu zračenja, što može trajati od nekoliko minuta do više sati, ovisno o debljini i veličini materijala koji zračimo, a njegov energetska raspon iznosi od 1000 eV do 30 MeV. Megaelektronvolt je decimalni višekratnik jedinice elektronvolt ($\text{MeV} = 10^6 \text{ eV}$) (Struna, hrvatsko jezično nazivlje, 2021.) Mjerna jedinica za gama zračenje je grej (Gy). Grej (Gy) je izvedena SI jedinica apsorbirane doze ionizirajućeg zračenja. Definiran je dozom zračenja koje je tijelu mase jedan kilogram predalo energiju jednog džula ($\text{Gy} = \text{J/kg}$) (Dželalija, 2011). Kako bi se izbjegla inducirana radioaktivnost, koja se može dogoditi ako je riječ o zračenju koje prelazi 5 MeV, zabranjena je upotreba viših doza. S druge strane, upotreba energija nižih od 0,2 MeV nije racionalna. Energija gama zraka slična je svjetlosti, ali s većom energijom fotona i kraćom valnom duljinom (da Silva Aquino, 2012).

Gama zračenje kao postupak sterilizacije uzrokuje direktno oštećenje DNA tako što dovodi do mutacija i stanice. Također, ima i indirektni učinak jer uzrokuje radiolizu vode pri čemu se stvaraju reaktivni kisikovi spojeva, radikali i peroksidi, koji uzrokuju jednolančane i dvolančane DNA lomove (da Silva i sur., 2006).

Budući da i prokarioti (npr. bakterije) i eukarioti (npr. kvasci i plijesni) imaju sposobnost popravka mnogih različitih DNA lomova, radiosenzitivnost visoko je uvjetovana sposobnošću

organizma za popravak jednolančanih lomova (da Silva Aquino, 2012). Studija je pokazala da, što je duži period zračenja zbog niske brzine zračenja, veća je vjerojatnost da kisik uđe u interakciju s celuloznim polimerima i uzrokuje kemijsku modifikaciju i uzrokuje veću indirektnu štetu (Magaudda, 2004). Bez obzira na to, ta razina depolimerizacije nije značajno promijenila mehanička svojstva papira (Adamo i sur., 1998; Gonzalez i sur., 2002).

Uočeno je različito ponašanje gljivica ovisno o tome jesu li pod utjecajem akutnog ili kroničnog zračenja, odnosno, potrebni su različiti odgovori stanica. Kad je riječ o akutnom zračenju, stanice se odjednom suočavaju s velikim količinama oštećenja uzrokovanih gama zračenjem, a nakon toga slijedi oporavak u ne-stresnim uvjetima. Pri kroničnom zračenju odgovor je drugačiji jer se stanice nalaze pod kontinuirano povišenom stopom stvaranja štete (Shuryak, 2017). Učinkovitost sterilizacije gama zračenjem zahtjeva određeno vrijeme, kontakt i temperaturu, a također ovisi o tipu prisutnog organizma tj. njegovoj radiorezistenciji. Pritom je uočeno da je teže eliminirati skupinu različitih mikroba na jednom materijalu nego li samo jednu vrstu u istoj količini (da Silva Aquino, 2012). Rezultati istraživanja Shuryak i sur. (2019) pokazuju da se velik broj enzima eksprimira kao odgovor na stresne uvjete. Nadalje, pokazano je da izloženost jednoj vrsti stresa može prouzročiti unakrsnu zaštitu od drugih stresora, što daje dobru podlogu za daljnja istraživanja.

Tretman predmeta kulturne baštine zračenjem započet je 1960-ih i danas je dobro uspostavljena jeftina tehnika dekontaminacije. Budući da je brz (nekoliko sati do nekoliko dana), posebno je pogodan za obradu velikih količina materijala u kratkom vremenu (Katušin-Ražem i sur., 2017). Neovisan je o temperaturi, ne ostavlja ostatke i barem djelomično inaktivira enzime koji bi inače oštetili predmet čak i nakon početnog tretiranja sredstava za razgradnju. Gama zračenje je visokoenergetsko elektromagnetsko zračenje koje emitiraju radioaktivne jezgre i ne inducira sekundarnu radioaktivnost. Njegova je penetracija vrlo velika, tako da tretirani predmeti mogu biti spakirani i ostat će zaštićeni dok god je ambalaža netaknuta (Marušić i sur., 2019). Michaelsen i sur. (2013) radili su istraživanje koristeći gama zračenje te su došli do zaključka da se gama zrake mogu koristiti za istovremeno tretiranje velike količine papira i to bez naknadne kemijske opasnosti. Ovaj postupak može se smatrati samo postupkom dekontaminacije, tj. metodom smanjenja bio-deteriorirajućih mikroorganizama na prihvatljivu razinu, što je presudno u očuvanju papira. S druge strane, sušenje smrzavanjem s kojim je napravljena usporedba, može se primijeniti samo za zaustavljanje širenja plijesni prije daljnjeg tretmana.

Budući da samo starenje uzrokuje drastičan pad stupnja polimerizacije, što je papir stariji, stupanj polimerizacije se manje smanjuje. Također je pokazano da kod doza korištenih za tretiranje predmeta kulturne baštine, promjene na papiru izazvane zračenjem i starenjem ne predisponiraju materijal za novi napad insekata ili gljivica (Magaudde i sur. 2001; Adamo i Magaudde, 2003; Adamo i sur. 2003).

1.3. Značajke gljivica i *Cladosporium* spp.

Gljivice proizvode degradacijske enzime koji hidroliziraju celulozne materijale. Posebice aktivne celulolitičke gljivice uključuju i kladosporije. Kao posljedica biodegradacije javljaju se promjene u izgledu i mehaničkoj čvrstoći objekta, što u nekim slučajevima rezultira djelomičnom ili čak potpunom dezintegracijom. Osim biodegradacije, rukovanje materijalom kontaminiranim gljivicama može biti ozbiljan zdravstveni rizik iz razloga što mnoge vrste, uključujući i kladosporije, imaju alergeni potencijal, a neki poput vrsta iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* proizvode niz mikotoksina koji mogu dovesti do trovanja (Marušić i sur., 2019).

Kladosporija ima tamni micelij koji može biti smeđe do crnosmeđe ili sivozelene boje. Vrste roda *Cladosporium* proizvode mnogo jednostaničnih konidija, ali česta je pojava i dvostaničnih i trostaničnih oblika. Dvije najčešće vrste su *C. cladosporioides* i *C. herbarum*. Njihova pojava česta je i na hrani poput žitarica i voća, a mogu rasti i pri niskim temperaturama (Bullerman, 2003). Vrste roda *Cladosporium* kozmopolitske su rasprostranjenosti i često se susreću na svim vrstama biljnih, gljivičnih i drugih otpadaka, često su izolirane iz tla, hrane, boje, tekstila i drugih organskih tvari ili se koloniziraju kao sekundarni uljezi na lezijama uzrokovanim biljnim patogenim gljivama (Bensch i sur., 2012). Također, konidije kladosporija najučestalije su plijesni u okolišu, posebice u zraku otvorenih i zatvorenih prostora. Sa svojim malim konidijama, obično formiranim u razgranatim lancima, dobro su prilagođeni na lako širenje u velikom broju na velike udaljenosti. Ostale vrste ovog roda su biljni patogeni, tj. uzročnici su lisnih pjega i drugih lezija ili se javljaju kao hiperparaziti na drugim gljivama (Bensch i sur., 2012). Budući da su mnoge vrste kladosporija kozmopolitske, da su agensi propadanja, ili su uzročnici alergije ili čak biljnih ili životinjskih bolesti i često imaju velik utjecaj na okoliš, rod je zanimljiv istraživačima u raznim disciplinama (Bensch i sur., 2012).

Kladosporije su jedne od najučestalijih vrsta gljivica nađenih na pergamentu, umjetničkim slikama, kao i keratinoznim supstratima poput vune, kostiju, krzna i sl (Sterflinger, 2010).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Platno je jedan od najčešćih materijala koje nalazimo kao dio predmeta kulturne baštine, bilo to kao slikarsko platno, platno kao dio tradicionalne odjeće kao dio kulturne baštine, namještaj i mnoge druge razne umjetnine. S obzirom na njegovu osjetljivost i podložnost kontaminaciji, kao i samu važnost kulturne baštine, potrebno je pronaći adekvatnu metodu dekontaminacije, a jedna od njih je gama zračenje. Gama zračenje učinkovita je i relativno sigurna metoda, ali ponekad je teško odrediti točne doze i ostale uvjete zračenja koji bi bili adekvatni s obzirom na značajke uzorka kojeg zračimo (bioraznolikost mikroba, njihova koncentracija, osjetljivost na zračenje, vrsta i osjetljivost materijala i sl).

Cilj ovog diplomskog rada je procijeniti doze i brzinu gama zračenja u svrhu dekontaminacije platna, bez oštećivanja istog, kao i određivanje decimalne redukcijska doze D10 (doza potrebnu za inaktivaciju 90% mikroba u uzorku).

Specifični cilj bio je ispitati utjecaj doza gama zračenja od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy) u međusobnim kombinacijama sa brzinama zračenja 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s na inhibiciju rasta namjerno inokulirane vrste *Cladosporium spaherospermum* neposredno nakon zračenja tj. 0. dan nakon zračenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Mikrobiološka obrada uzoraka metodom razrjeđenja

Platno je priređeno u obliku kvadratića dimenzija 3,5cm x 3,5 cm koji su potom ostavljeni da se homogeniziraju u plastičnoj vrećici. U pokusu je korišteno laneno platno. Komade platna raspoređuju se u sterilne konusne polipropilenske epruvete (tzv. falkonice), nakon čega se iste autoklaviraju na 121 C, 1,2 bar, 15 min.

Hranjiva podloga na kojoj se provode nasađivanja je MALT ekstrakt agar (MEA) proizvođača Sigma-Aldrich koji se priređuje suspendiranjem 50 g praška u 1l destilirane vode, a zatim kuhanjem uz miješanje do otapanja. Nakon toga podloga se hladi i autoklavira prema uvjetima sterilizacije za mikrobiološke podloge, a to je na 121 C, 1,2 bar, 15 min, a zatim i inkubacija uzoraka 5-7 dana na 25 C, nakon čega se ploče očitavaju tj. broje se izrasle kolonije. Bitno je naglasiti da se za brojanje uzimaju ona razrjeđenja na kojima je naraslo manje od 150 kolonija.

Nakon izbrojanih kolonija, broj plijesni po gramu materijala CFU/g (colony forming units) računa se prema formuli:

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

ΣC – zbroj kolonija izbrojenih na svim pločama

V – volumen inokuluma u mililitrima stavljen na hranjivu podlogu

n1 – broj ploča zadržanih za brojanje kod prvog razrjeđenja

n2 – broj ploča zadržanih za brojanje kod drugog razrjeđenja

d – razrjeđenje iz kojeg su dobiveni prvi brojevi

3.2. Inokuliranje platna vrstom *Cladosporium spaherospermum*

Gljivica *Cladosporium spaherospermum* inokulira se na MEA podlogu na kojoj se inkubira 10 dana na 25 C. Porasle sporulirajuće kulture koriste se za pripravu suspenzije plijesni u vodi.

Prethodno pripremljeni komadići platna umeću se u sterilne polipropilenske konusne epruvete od 15 mL i dijele se u dvije skupine – jedna skupina inokulirana s kladosporijom, a druga bez inokuluma, a obje skupine rađene su u duplikatu. Prva skupina najprije je sterilizirana u

autoklavu (121 °C, 1,2 bar, 15 minuta), a zatim inokulirana suspenzijom *Cladosporium spaherospermum* 1x10²CFU/g i odmah nasađena u duplikatu kao kontrola.

Nakon inkubacije obje skupine su ozračivane različitim dozama zračenja (2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20 kGy) u kombinaciji sa različitim brzinama zračenja (0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s). Uzorci predviđeni za nasađivanje odmah nakon zračenja (0.dan) nasađeni su na MEA.

3.3 Ozračivanje uzoraka gama zračenjem

Svi uzorci zračeni su na Institutu Ruđer Bošković unutar Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju uporabom panoramskog uređaja sa ⁶⁰Co kao izvorom gama zračenja. (Ražem i sur., 1984). Obrada materijala ionizirajućim zračenjem provodi se u skladu s nacionalnim pravilnikom (Narodne novine br. 046/1994) i međunarodnim propisima. ISO standardom (International Organization for Standardisation), ISO 13285:2003, Medical devices – QMS – Requirements for regulatory purposes, slijedeći metodu ISO 11137-1:2006, Sterilization of Health Care Products – Radiation. Cilj dozimetrijskih mjerenja je pokazati da su preporučene i određene doze zračenja ispravno predane materijalu izloženom zračenju prema unaprijed utvrđenim doznim mapama. Za dozimetrijska mjerenja u uporabi je i rutinski kemijski dozimetar od etanolklorbenzena (ISO/ASTM 51538:2009).

Pripremljeni, obrađeni i označeni uzorci ozračeni su jačinom doza od 2 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy i 20kGy pri različitim brzinama zračenja od 0,04 Gy/s, 0,1 Gy/s, 0,2 Gy/s, 0,4 Gy/s i 6,7 Gy/s. Svi uzorci napravljeni su u duplikatu. Sva su mjerenja napravljena u duplikatu, a razlika vijabilnosti prije i nakon zračenja prikazani su kao srednje vrijednosti CFU/g.

3.4. Određivanje doze D10

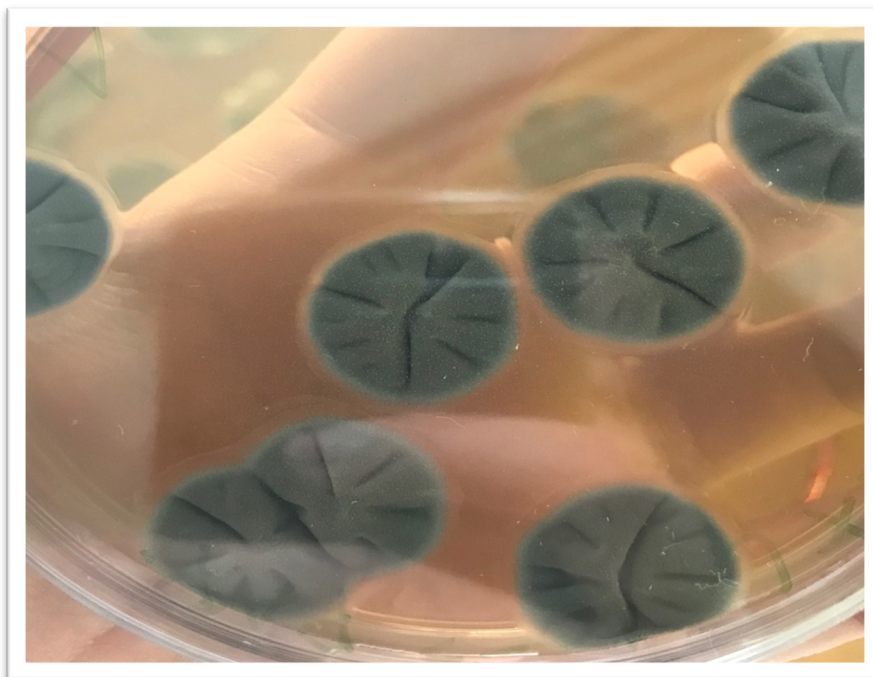
D10 (decimalna redukcijska doza) zapravo označava dozu potrebnu da se inaktivira 90% broja plijesni tj. da se broj mikroorganizama smanji za jednu logaritamsku jedinicu. Njome se izražava radijacijska osjetljivost: niža D10 indicira veću osjetljivost dotičnog organizma (Kortei i sur., 2015).

Na slikama (slike 3-7) je prikazan graf ovisnosti logaritma broja preživjelih gljivica (točnije, ovisnosti logaritma broja izraslih kvasaca) o primijenjenoj dozi neposredno nakon zračenja. Iz dobivenog pravca izračunata je D10 za sve primijenjene brzine, tako što je računata kao

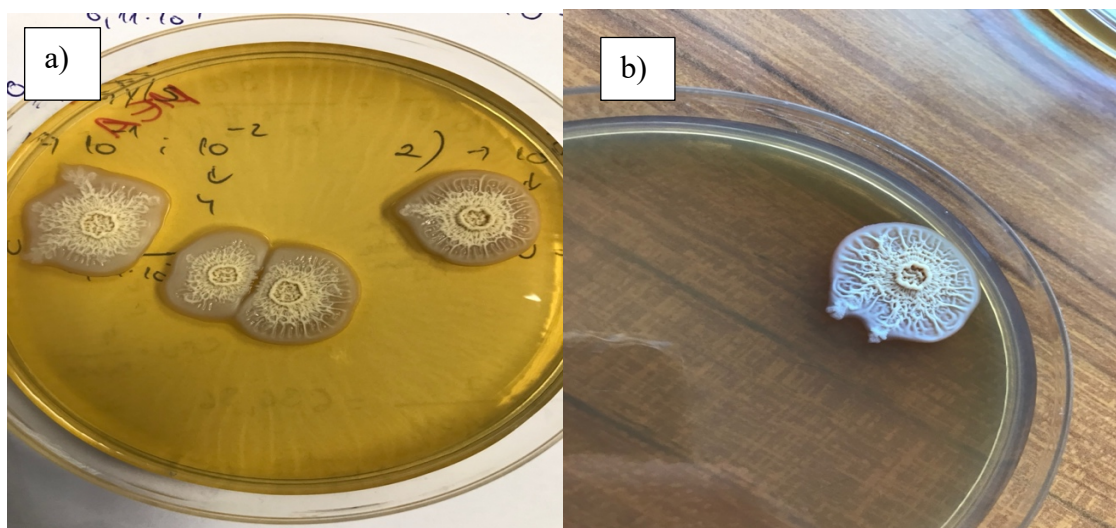
negativna recipročna vrijednost nagiba pravca ($D_{10} = -1/a$, pri čemu a označava nagib pravca). D_{10} računamo kako bismo mogli uspoređivati različite mikroorganizme ili iste mikroorganizme pri različitim uvjetima, a poznavanje D_{10} ponekad može osigurati željenu redukciju mikroorganizama. Pritom u procjeni treba uzeti u obzir i stupanj degradacije artefakta, kao i stupanj kontaminacije (Trandafir i sur., 2014).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pošto su svi uzorci rađeni u duplikatu, prilikom očitavanja rezultata uzimana je aritmetička sredina broja kolonija na pojedinim pločama. Očekivane kolonije na hranjivim podlogama bile su kolonije *Cladosporium spaherospermum*. Međutim, na pločama kladosporija nije rasla već je uočen porast kolonija kvasaca. Kvasac je rastao na pločama inokuliranim kladosporijom (slika 1), kao i na onima koje nisu bile inokulirane. Uočeni kvasci su mliječno bijele boje, malih, blago razgranatih kolonija presvučenih masnim voštanim slojem.



Slika 1. Kolonije vrste *Cladosporium sphaerospermum* koje su inokulirane na uzorke platna.



Slika 2. Kolonije neidentificiranog bijelog kvasca izraslog na MEA podlozi nakon zračenja; a) dozom 5 kGy; b) dozom 10 kGy.

Rezultati preživljenja gljivica nakon pojedine doze zračenja s pripadajućom brzinom prikazani su u tablicama 1-5.

Tablica 1. Porast broja kolonija kvasca na inokuliranim i neinokuliranim uzorcima platna nakon gama zračenja dozom od 2 kGy pri različitim brzinama zračenja

Brzina zračenja	Inokulirano kladosporijom (CFU/g)	Bez inokuluma (CFU/g)
0,04 Gy/s	872727	$\gg 10^4$
0,1 Gy/s	500	4545
0,2 Gy/s	818	591
0,4 Gy/s	773	500
6,7 Gy/s	318	591

Pri brzini od 0,1 Gy/s u inokuliranim uzorcima pri razrjeđenju od 10^{-2} , odnosno 10^{-3} i 10^{-4} uz kvasce, uočene su i kolonije bijele, odnosno zelene plijesni.

Tablica 2. Porast broja kolonija kvasca na inokuliranim i neinokuliranim uzorcima platna nakon gama zračenja dozom od 5 kGy pri različitim brzinama zračenja

Brzina zračenja	Inokulirano kladosporijom (CFU/g)	Bez inokuluma (CFU/g)
0,04 Gy/s	455	91
0,1 Gy/s	50000	136
0,2 Gy/s	45	0
0,4 Gy/s	909	90909
6,7 Gy/s	196363	91

Tablica 3. Porast broja kolonija kvasca na inokuliranim i neinokuliranim uzorcima platna nakon gama zračenja dozom od 10 kGy pri različitim brzinama zračenja

Brzina zračenja	Inokulirano kladosporijom (CFU/g)	Bez inokuluma (CFU/g)
0,04 Gy/s	0	0
0,1 Gy/s	591	455
0,2 Gy/s	909	909
0,4Gy/s	455	455
6,7 Gy/s	182	864

Na pojedinim razrjeđenjima ponovo su uočene bijele plijesni, a pri brzini 0,1 Gy/s uočena je i vrsta roda *Aspergillus*.

Tablica 4. Porast broja kolonija kvasca na inokuliranim i neinokuliranim uzorcima platna gama zračenja dozom od 15 kGy pri različitim brzinama zračenja

Brzina zračenja	Inokulirano kladosporijom (CFU/g)	Bez inokuluma (CFU/g)
0,04 Gy/s	455	45
0,1 Gy/s	45	455
0,2 Gy/s	45	455
0,4Gy/s	909	455
6,7 Gy/s	455	500

Uz kvasce je pri brzini zračenja od 0,2 Gy/s uočen i porast penicilija,

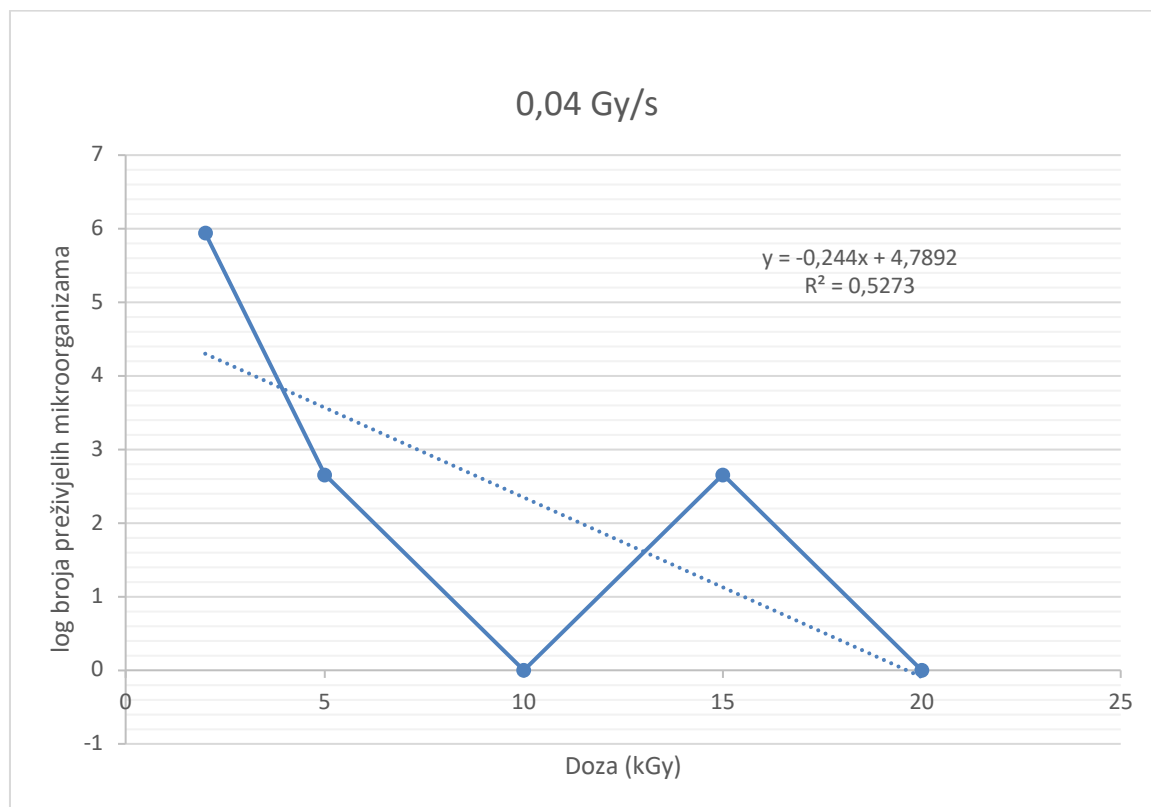
Tablica 5. Porast broja kolonija kvasca nakon gama zračenja dozom od 20 kGy pri različitim brzinama zračenja

Brzina zračenja	Inokulirano kladosporijom (CFU/g)	Bez inokuluma (CFU/g)
0,04 Gy/s	0	2500
0,1 Gy/s	0	0
0,2 Gy/s	0	0
0,4Gy/s	0	909
6,7 Gy/s	0	0

Pri jačini zračenja od 20 kGy nisu uočena značajnija oštećenja, što daje dobru podlogu za daljnje proučavanje otpornosti pojedinih kolonija na gama zračenje.

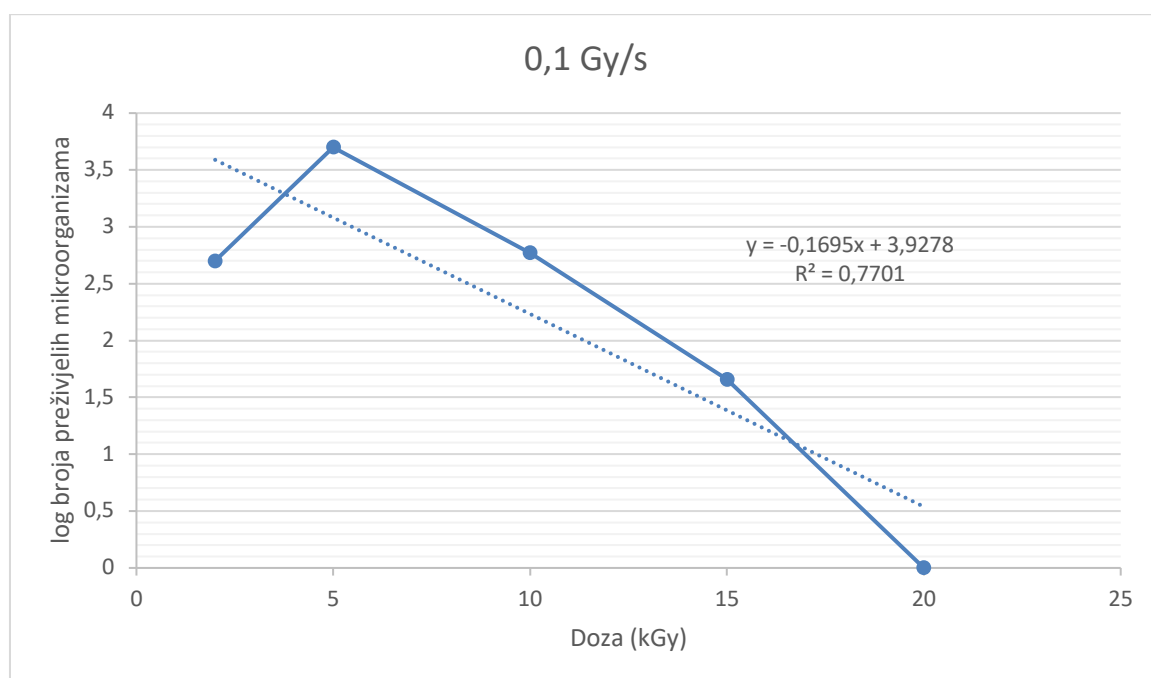
Valja napomenuti da je kod svakog nasađivanja napravljena kontrola vode nasađivanjem uzroka vode na hranjivu podlogu i svaki put je dokazana čistoća te se porast kvasaca, bijele i zelene plijesni te aspergila i penicilija može smatrati prirodnom „točkastom“ kontaminacijom platna.

Na slikama 3-7 prikazana je ovisnost logaritma broja preživjelih kvasaca o dozi i brzini zračenja.



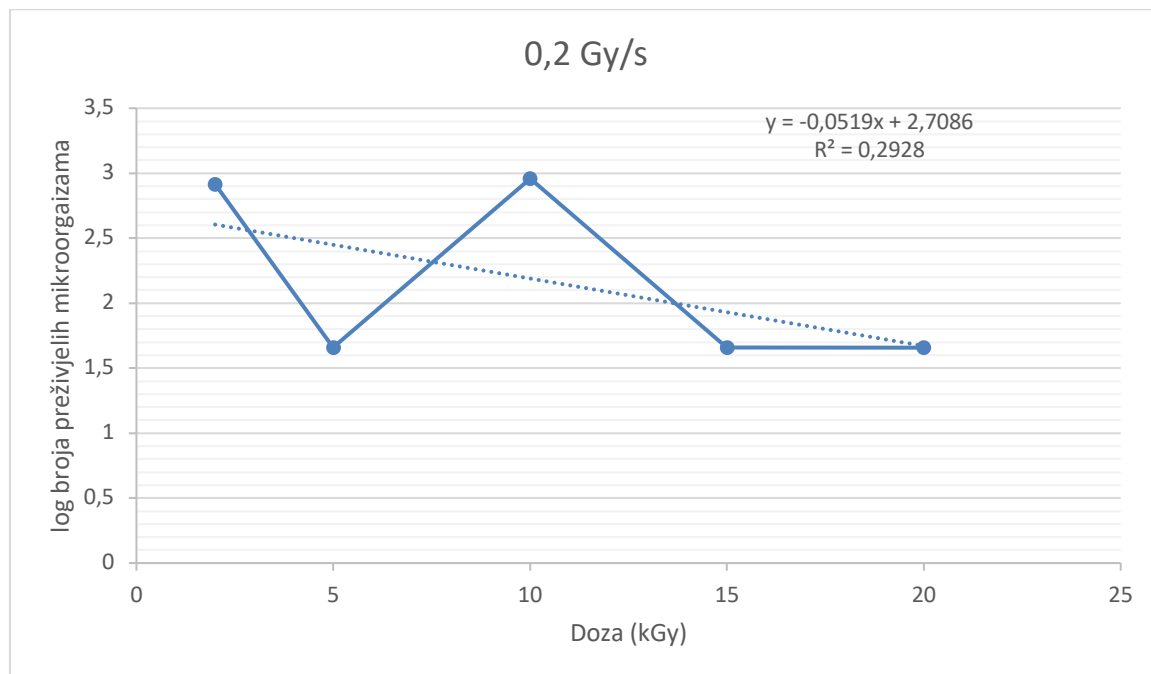
Slika 3. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih kvasaca o dozi zračenja u kGy pri brzini od 0,04 Gy/s

Za brzinu zračenja od 0,04 Gy/s dobivena je vrijednost D10 koja iznosi 4,10 Gy/s.



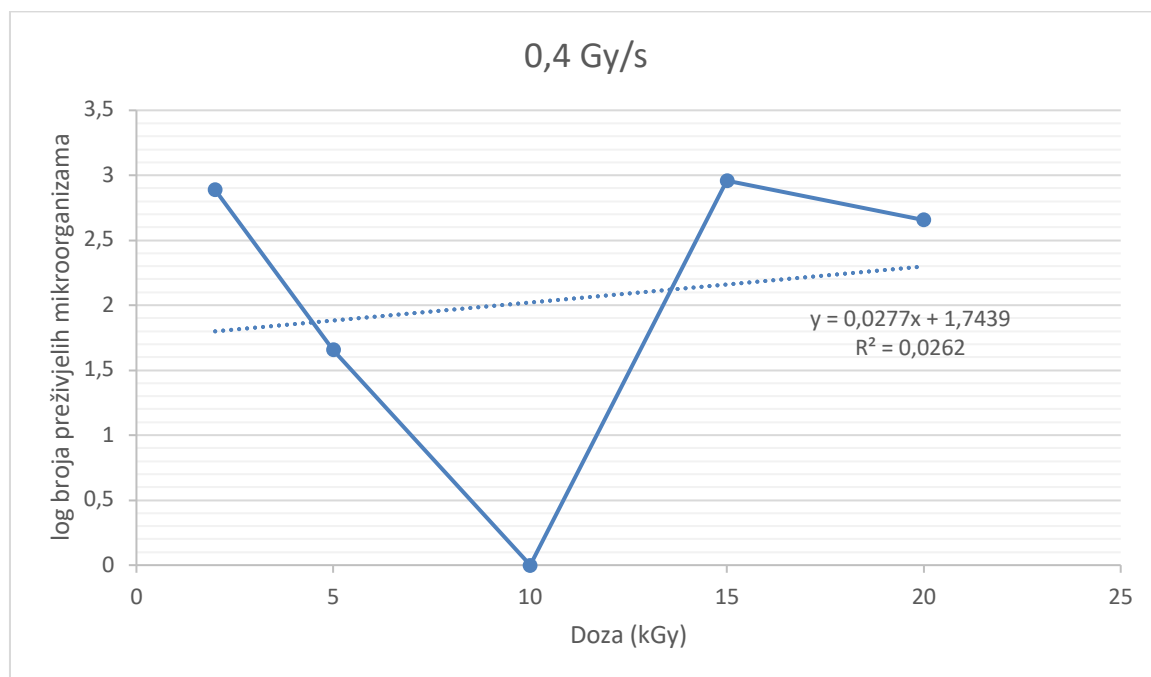
Slika 4. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih kvasaca o dozi zračenja u kGy pri brzini od 0,1Gy/s

Za brzinu zračenja od 0,1 Gy/s dobivena je vrijednost D10 koja iznosi 5,90 Gy/s.



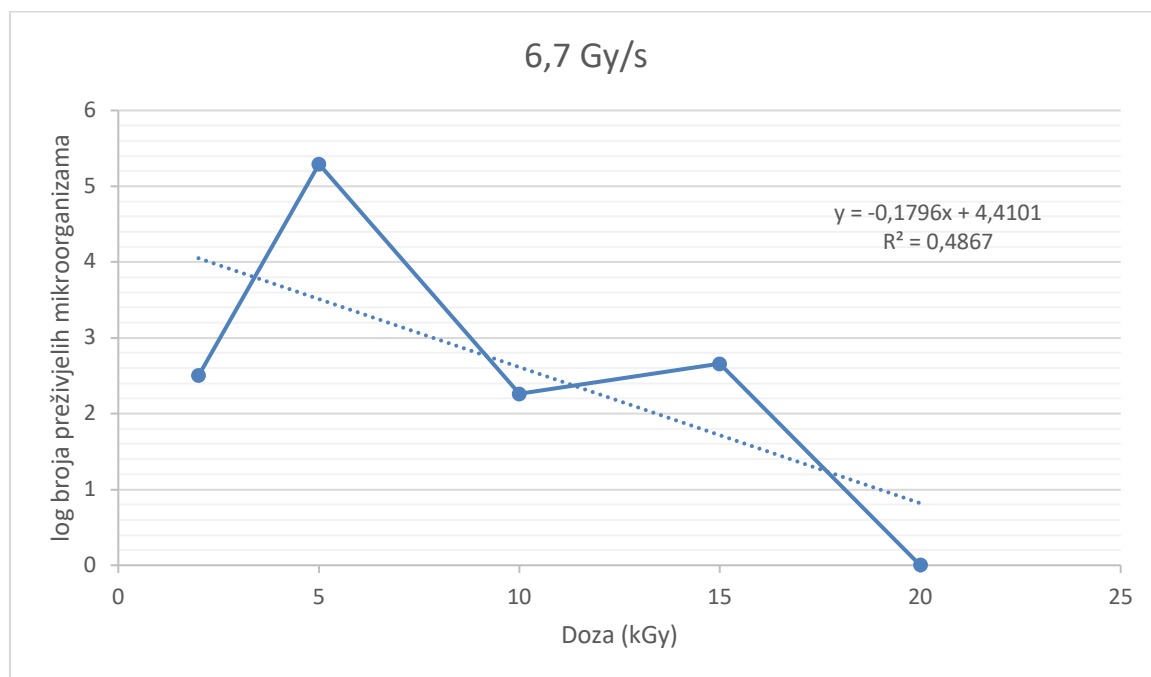
Slika 5. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih kvasaca o dozi zračenja u kGy pri brzini od 0,2 Gy/s

Za brzinu zračenja od 0,2 Gy/s dobivena je vrijednost D10 koja iznosi 19,27 Gy/s.



Slika 6. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih kvasaca o dozi zračenja u kGy pri brzini od 0,4 Gy/s

Za brzinu zračenja od 0,4 Gy/s dobivena je vrijednost D10 koja iznosi 36,10 Gy/s.

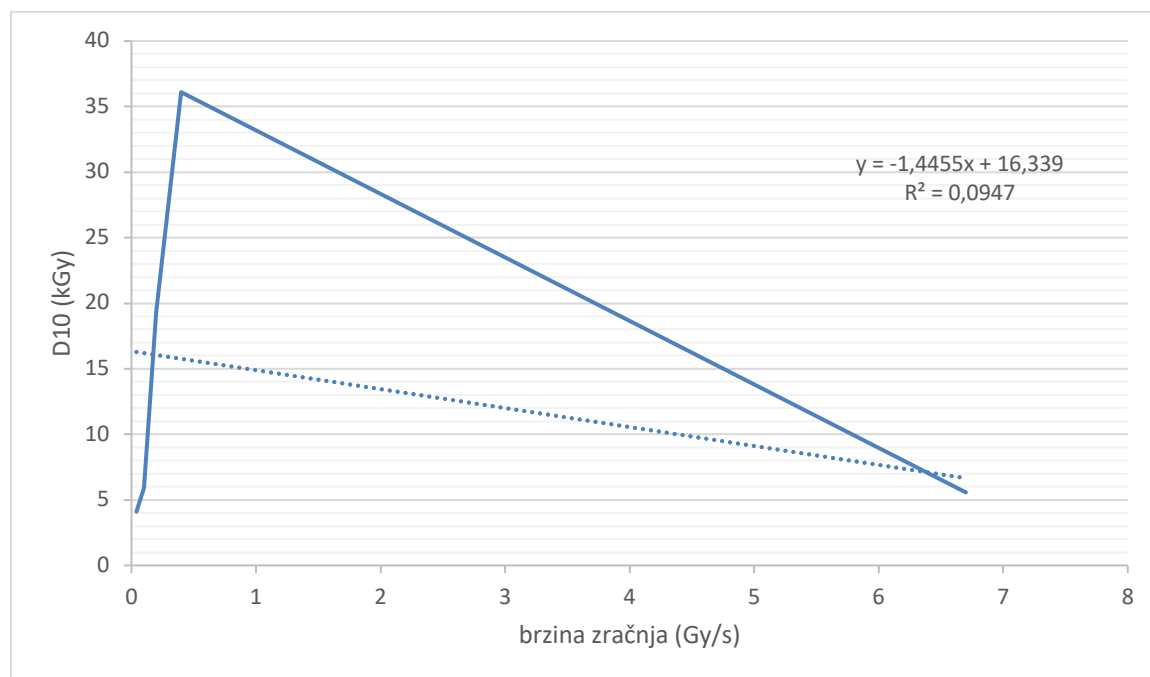


Slika 7. Graf ovisnosti logaritma broja preživjelih kvasaca o dozi zračenja u kGy pri brzini od 6,7 Gy/s

Za brzinu zračenja od 6,7 Gy/s dobivena je vrijednost D10 koja iznosi 5,57 Gy/s.

Tablica 6. Prikaz vrijednosti D10 pri određenim brzinama zračenja

Brzina zračenja (Gy/s)	Vrijednost D10
0,04	4,10
0,1	5,90
0,2	19,27
0,4	36,10
6,7	5,57



Slika 8. Grafički prikaz ovisnosti vrijednosti D10 kvasca (kGy) o brzini primijenjenog zračenja (Gy/s)

Vrijednosti D10 izračunate su po formuli za D10 iz dijela 3.4., a rezultati su prikazani tablično (tablica 6) i grafički (slike 3-7). Uočavaju se male vrijednosti D10 (jača osjetljivost) pri manjim brzinama zračenja, koje zatim postupno rastu s postupnim povećanjem brzine, dok kod znatno veće brzine od 6,7 Gy/s ponovno uočavamo nižu vrijednost D10.

Razlog zbog kojeg nisu narasle kolonije prethodno namjerno inokuliranih kolonija kladosporije nije poznat, ali jedna od pretpostavki je da je možda neka tvar prisutna u platnu djelovala inhibitorno. Valja naglasiti da ne znamo je li korišteno laneno platno prethodno na neki način tretirano. Također, treba ispitati i opciju mogu li kvasci djelovati kao inhibitori kladosporija.

Kao što se može vidjeti u radu Marušić i sur. (2019) rod *Cladosporium* je vrlo otporan i učinkovitost njegove dekontaminacije uvelike ovisi i o dozi zračenja i o brzini doze. Uvjerljivo objašnjenje takve rezistencije je prisutnost melanina u njegovoj staničnoj stijenci, budući da su neke druge melanizirane gljive pronađene u područjima izuzetno visoke radioaktivnosti poput reaktora u Černobilu.

Otpornost kvasca na zračenje je u korelaciji s unutarstaničnim sadržajem manganovih antioksidansa, primjerice antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze (SOD). Mangan je važan među redoks aktivnim prijelaznim metalima u stanicama; Mn redoks-ciklus pogoduje uklanjanju O₂ bez oslobađanja vrlo reaktivnih hidroksilnih (HO •) radikala, dok redoks-ciklus ostalih metala poput Fe i Cr stvara HO • radikale. Akumulacija visokih koncentracija Mn antioksidansa također bi mogla biti vjerodostojno objašnjenje otpornosti bijelih plijesni na zračenje (Marušić i sur., 2019).

Antifungalni učinak gama zračenja snažno ovisi i o dozi i o brzini doziranja, što je upravo u fokusu ovog rada, jer rezistentne gljivice (npr. *Cladosporium* i / ili kvasci) prisutne u visokim koncentracijama izložene visokim dozama, ali pri malim brzinama doze mogu suzbiti oksidativni stres međustaničnim dijeljenjem reaktivnih enzima za uklanjanje kisika koji omogućuju istodobni rast i popravak. Pri velikim brzinama otopljeni kisik troši se brže nego što se može dopuniti iz okolne atmosfere. To rezultira većom oksidacijom u blizini površina izloženih zraku, a manje u unutrašnjosti. Kako se brzina doze smanjuje, oksidacija će se nastaviti dalje u uzorak, što će na kraju dovesti do homogeno oksidiranog materijala. U konkretnom radu, promjene papira su bile zanemarive da bi se donijeli zaključci o utjecaju mikrobiote na nuspojave zračenja na papiru (Marušić i sur., 2019).

Kortei i sur. (2015) proveli su pokus na kompostiranoj piljevini čiji su rezultati doveli do zaključka da je prethodno zračenje uzoraka s dozama od 20, 25 i 32 kGy imalo veći sterilizacijski učinak u odnosu na paru, dok su doze od 10 i 15 kGy imale učinak usporediv s parom. Nadalje, para je bila učinkovitija od zračenja jakosti 5 kGy.

Među organizmima iz istog reda, pa čak i između vrsta koje dijele određene gene i koje su evoluirale od zajedničkog pretka, otpor zračenju nije predvidljiv korištenjem bioinformatičkih pristupa temeljenih na genomici. Utvrđivanje dokaza podupire da je radiorezistencija metabolička osobina koja se razvila kao nusprodukt rezistencije na druge stresore iz okoliša koji se najčešće susreću, poput isušivanja (Shuryak i sur., 2019).

Čini se da gljivice drugačije interferiraju sa ionizirajućim zračenjem od ostalih organizama na Zemlji. Posljednji rezultati pokazuju da su neke vrste čija je stanična stijenka bogata melaninom, poput onih pronađenih u Černobilskom reaktoru, vrlo dobro rastu uz ionizirajuće zračenje. Gljivice općenito, a posebice one melanizirane, izrazito su radiorezistentne na visoke doze ionizirajućeg zračenja u eksperimentalnim uvjetima. (Dadachova i Casadevall, 2008).

Studije pokazuju da bi melanin mogao biti ključan za hvatanje i iskorištavanje energije, ali i da ima značajne radioprotektivne značajke. Zaključak bi bio da su gljivice zaštićene melaninom od ionizirajućeg zračenja i da su njegova radioprotektivna svojstva funkcija njegovog kemijskog sastava, gašenja slobodnih radikala i sfernog prostornog rasporeda. Izuzetan aspekt melanina je njihova sposobnost apsorpcije svih vrsta elektromagnetskog zračenja što gljivicama daje sposobnost i za energetske transdukcije i za zaštitu (Dadachova i Casadevall, 2008).

5. ZAKLJUČAK

- Na platnu se pojavljuju kvasci kao nazastupljenija prirodna „točkasta“ kontaminacija.
- U eradikaciji kvasaca najefikasnijom se pokazala doza od 20 kGy, koja je ujedno bila i najveća korištena doza, iako niti ona nije uzrokovala potpunu odsutnost mikroba.
- Od primijenjenih doza zračenja, uočeno je da je najmanja vrijednost D10, a time i najveća učinkovitost sterilizacije bila pri najnižim brzinama zračenja (0,04 Gy/s i 0,1 Gy/s) te pri najvećoj brzini doze od 6,7 Gy/s dok se prema većim brzinama D10 postupno povećavala.
- U nastavku treba istražiti moguću ulogu nađenih kvasaca u suzbijanju kladosporija kao i mehanizme otpornosti kvasaca na gama zračenje.

6. LITERATURA

- Adamo M, Giovannotti M, Magaudda G, Plossi M, Rocchetti F, Rossi G. Effect of gamma rayson pure cellulose paper as a model for the study of a treatment of „biological recovery“ of biodeteriorated books. *Restaurator*, 1998, 19, 41-59.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. The genus *Cladosporium*. *STUD MYCOL*, Utrecht, 2012, 72, 1-401.
- Bullerman LB. Fungi In Food – An Overview. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2003, 5511-5522.
- da Silva Aquino KA. Sterilization by Gamma Irradiation. *Gamma Radiation*, 2012, 171-206.
- da Silva M, Moraes AML, Nishikawa MM, Gatti MJA, Vallim de Alencar MA, Brandao LE, No´brega A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. *Int Biodeterior & Biodegradation*, 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, 525-531.
- Dželalija M. Ionizirajuće zračenje u biosferi (interna skripta). *Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu*, 2011.
- Ettenauer J, Piñar G, Lopandic K, Spangl B, Ellersdorfer G, Voithl C, Sterflinger K. Microbes on building materials — evaluation of DNA extraction protocols as common basis for molecular analysis. *Sci Total Environ*, 2012, 439, 44–53.
- Garg KL, Jain KK, Mishra AK. Role of fungi in the deterioration of wall paintings. *Sci Total Environ*, 1995, 167, 255–271.
- Gonzalez ME, Calvo AM, Kairiyama E. Gamma radiation for preservation of biologically damaged paper. *Radiation Phys Chem*, 2002, 63, 263–265.
- Katušin-Ražem B, Braun M, Ražem D. Massive preservation of war- damaged cultural heritage objects in Croatia by irradiation. *IAEA Radiation Technology Series, No 6. Uses of Ionising Radiation for Tangible Cultural Heritage Conservation*, 2017, 22, 191-195.

Kortei NK, Odamtten GT, Obodai M, Appiah V, Wiafe-Kwagyan M. Evaluating the Effect of Gamma Irradiation and Steam Sterilization on the Survival and Growth of Composted Sawdust Fungi in Ghana. *BMRJ*, 2015, 7, 180-192.

Magaudda, G. The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. *J Cult Herit*, 2004, 5, 113–118.

Marasović T. Kulturna baština, sv. I. Split, 2001, str. 9.

Marušić K, Šegvić Klarić M, Sinčić L, Pucić I, Mihaljević B. Combined effects of gamma-irradiation, dose rate and mycobiota activity on cultural heritage – Study on model paper. *Radiat Phys Chem*, 2019.

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.

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

Prott L, O'Keefe PJ. Cultural Heritage or Cultural Property?. 1992, 1, 307.

Shuryak I, Matrosova VY, Gaidamakova EK. Microbial cells can cooperate to resist high-level chronic ionizing radiation. *PLoS One*, 2017, 12.

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.

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

Sullivan AM. Cultural Heritage & New Media: A Future for the Past. *J. Marshall Rev. Intell. Prop. L.* 2016, 604, 603-646.

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

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

7. SAŽETAK

Ovaj diplomski rad posvećen je proučavanju utjecaja gama zračenja na mikrobiotu platna. Konkretno, u pokusu je korištena gljivica vrste roda *Cladosporium* koje su prepoznate kao jedne od najrezistentnijih vrsta gljivica, kao i mikroba općenito, na gama zračenje. Pozadinski motiv za provođenje ovakvih vrsta ispitivanja zapravo je očuvanje i prevencija oštećenja predmeta kulturne baštine čija je vrijednost neprocjenjiva. Naime, gama zračenje pokazalo se kao iznimno korisna metoda sterilizacije predmeta, čije su prednosti, ali i potencijalne mane navedene u ovom radu. Diplomski rad rađen je u suradnji s Institutom Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu gdje su prethodno pripremljeni uzorci i zračeni. U pokusu je korišteno laneno platno, izrezano na jednake komade, homogenizirano i prethodno sterilizirano u autoklavu. Ispitivan je utjecaj gama zračenja na dvije grupe uzoraka (jedna grupa inokulirana vrstom roda *Cladosporium*, dok druga nije) pri različitim kombinacijama doza i brzina zračenja te je nakon nasađivanja i inkubacije promatran broj preživjelih kolonija pri određenim uvjetima. Korištene doze zračenja bile su 2, 5, 10, 15 i 20 kGy, a brzine 0,04, 0,1, 0,2, 0,4 te 6,7 Gy/s. Rezultati su pokazali neočekivanu odsutnost kladosporije čije su kolonije zamijenile kolonije neidentificiranog bijelog kvasca koji je preživljavao i pri višim dozama zračenja. Najučinkovitijom se pokazala doza zračenja od 20 kGy, iako su čak i pri tolikom zračenju neke kolonije preživjele, a što se tiče brzine, učinkovitije su se pokazale male brzine doze 0,04 i 0,1 Gy/s, kao i najveća brzina od 6,7 Gy/s. Potrebno je napraviti identifikaciju nepoznatog kvasca molekularnim metodama te istražiti moguće mehanizme otpornosti na gama zračenje kao i moguću ulogu kvasca u suzbijanju rasta kladosporije.

SUMMARY

This thesis is dedicated to the study of the influence of gamma radiation on canvas' mycobiota. In particular, a fungus of the genus *Cladosporium* was used in the experiment, which was recognized as one of the most resistant species of fungi, as well as microbes in general, to gamma radiation. The background motive for conducting these types of research is actually the preservation and prevention of damage of cultural heritage objects which value is invaluable. Namely, gamma radiation has proven to be an extremely useful method of sterilizing objects, whose advantages, but also potential disadvantages, are listed in this paper. The thesis was done in cooperation with the Ruđer Bošković Institute (RBI) in Zagreb, where samples were previously prepared and irradiated. Linen cloth, cut into equal pieces, homogenized and previously sterilized in an autoclave, was used in the experiment. The effect of gamma radiation on two groups of samples (one group inoculated with a species of the genus *Cladosporium*, while the other was not) at different combinations of dose and dose rate of radiation was investigated, and the number of surviving colonies under certain conditions were observed after inoculation and incubation. The radiation doses used were 2, 5, 10, 15 and 20 kGy, velocities of 0.04, 0.1, 0.2, 0.4 and 6.7 Gy / s. The results showed an unexpected absence of *Cladosporia*, whose colonies replaced colonies of unidentified white yeast that survived even at higher radiation doses. The radiation dose of 20 kGy was the most effective, although even with that radiation some colonies survived, and in terms of speed, the efficiency is shown by the lowest doses of 0.04 and 0.1 Gy / s, as well as the highest speed of 6.7 Gy / s. It is necessary to make an accurate identification of the unknown yeast in order to be able to discover the cause of its appearance.

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 (kvasaca) lanenog platna na gama zračenje

Marija Matijević

SAŽETAK

Ovaj diplomski rad posvećen je proučavanju utjecaja gama zračenja na mikrobiotu platna. Konkretno, u pokusu je korištena gljivica vrste roda *Cladosporium* koje su prepoznate kao jedne od najrezistentnijih vrsta gljivica, kao i mikroba općenito, na gama zračenje. Pozadinski motiv za provođenje ovakvih vrsta ispitivanja zapravo je očuvanje i prevencija oštećenja predmeta kulturne baštine čija je vrijednost neprocjenjiva. Naime, gama zračenje pokazalo se kao iznimno korisna metoda sterilizacije predmeta, čije su prednosti, ali i potencijalne mane navedene u ovom radu. Diplomski rad rađen je u suradnji s Institutom Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu gdje su prethodno pripremljeni uzorci i zračeni. U pokusu je korišteno laneno platno, izrezano na jednake komade, homogenizirano i prethodno sterilizirano u autoklavu. Ispitivan je utjecaj gama zračenja na dvije grupe uzoraka (jedna grupa inokulirana vrstom roda *Cladosporium*, dok druga nije) pri različitim kombinacijama doza i brzina zračenja te je nakon nasađivanja i inkubacije promatran broj preživjelih kolonija pri određenim uvjetima. Korištene doze zračenja bile su 2, 5, 10, 15 i 20 kGy, a brzine 0,04, 0,1, 0,2, 0,4 te 6,7 Gy/s. Rezultati su pokazali neočekivanu odsutnost kladosporije, čije su kolonije zamijenile kolonije neidentificiranog bijelog kvasca koji je preživljavao i pri višim dozama zračenja. Najučinkovitijom se pokazala doza zračenja od 20 kGy, iako su čak i pri tolikom zračenju neke kolonije preživjele, a što se tiče brzine, učinkovitije su se pokazale male brzine doze 0,04 i 0,1 Gy/s, kao i najveća brzina od 67 Gy/s. Potrebno je napraviti identifikaciju nepoznatog kvasca molekularnim metodama te istražiti moguće mehanizme otpornosti na gama zračenje kao i moguću ulogu kvasca u suzbijanju rasta kladosporije.

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

Rad sadrži: 25 stranica, 6 grafičkih prikaza, 6 tablica i 22 literaturih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Gama zračenje, *Cladosporium*, mikrobiota, D10, kulturna baština

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, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 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 mycobiota (yeasts) on linen textile to gamma radiation

Marija Matijević

SUMMARY

This thesis is dedicated to the study of the influence of gamma radiation on canvas' mycobiota. In particular, a fungus of the genus *Cladosporium* was used in the experiment, which was recognized as one of the most resistant species of fungi, as well as microbes in general, to gamma radiation. The background motive for conducting these types of research is actually the preservation and prevention of damage of cultural heritage objects which value is invaluable. Namely, gamma radiation has proven to be an extremely useful method of sterilizing objects, whose advantages, but also potential disadvantages, are listed in this paper. The thesis was done in cooperation with the Ruđer Bošković Institute (RBI) in Zagreb, where samples were previously prepared and irradiated. Linen cloth, cut into equal pieces, homogenized and previously sterilized in an autoclave, was used in the experiment. The effect of gamma radiation on two groups of samples (one group inoculated with a species of the genus *Cladosporium*, while the other was not) at different combinations of dose and dose rate of radiation was investigated, and the number of surviving colonies under certain conditions were observed after inoculation and incubation. The radiation doses used were 2, 5, 10, 15 and 20 kGy, velocities of 0.04, 0.1, 0.2, 0.4 and 6.7 Gy / s. The results showed an unexpected absence of *Cladosporia*, whose colonies replaced colonies of unidentified white yeast that survived even at higher radiation doses. The radiation dose of 20 kGy was the most effective, although even with that radiation some colonies survived, and in terms of speed, the efficiency is shown by the lowest doses of 0.04 and 0.1 Gy / s, as well as the highest speed of 6.7 Gy / s. It is necessary to make an accurate identification of the unknown yeast in order to be able to discover the cause of its appearance.

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

Thesis includes: 26 pages, 6 figures, 6 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Gamma irradiation, *Cladosporia*, D10, cultural heritage

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. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

