UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Željko D. Savković

Diverzitet i sezonska distribucija mikromiceta u vazduhu prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Željko D. Savković

Diversity and seasonal distribution of micromycetes in the air of cultural heritage conservation premises

Doctoral Disertation

Belgrade, 2019

Mentori:

_____

dr Milica Ljaljević Grbić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

_____

dr Jelena Vukojević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

_____

dr Žarko Ivanović, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

_____

dr Ana Džamić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

_____

dr Miloš Stupar, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija je realizovana na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju, Instituta za botaniku i botaničke bašte „Jevremovac", Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu.

Prvo, zahvaljujem se svojim mentorima, dr Milici Ljaljević Grbić i dr Jeleni Vukojević, profesorima Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na profesionalnom usmeravanju pri izradi ovog rada kao i za znanje koje sam stekao od trenutka kada sam počeo da se bavim mikologijom.

Zahvaljujem se prof. dr Mili Popović-Živančević na omogućenoj saradnji i konzervatorima Tatjani Nedeljković i Maji Franković, koje su mi bile od velike pomoći.

Veliku zahvalnost dugujem dr Žarku Ivanoviću, višem naučnom saradniku i Jovani Blagojević, istraživaču saradniku iz Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, koji su mi nesebično pomogli u molekularnoj identifikaciji i naučili značajnim stvarima iz ove oblasti.

Takođe se zahvaljujem dr Suzani Erić i dr Kristini Šarić, profesorima Rudarsko-geološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na realizaciji mineraloško petrografskih analiza.

Veliku pomoć su mi pružile i dr Ana Džamić, profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, i dr Jovana Milosavljević pri analizi rezultata antifungalne aktivnosti, na čemu im se zahvaljujem.

Zahvaljujem se dr Slađani Popović, naučnom saradniku iz Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju za obradu statističkih podataka.

Zahvaljujem se i svojim dragim kolegama dr Milošu Stuparu, višem naučnom saradniku, i dr Nikoli Unkoviću, naučnom saradniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na svakodnevnoj nesebičnoj pomoći pri izradi ove disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem svim svojim kolegama sa Katedre za algologiju, mikologiju i lehenologiju, zbog prijateljstva i podrške tokom svih ovih godina.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem porodici, ocu Draganu, majci Ljiljani, bratu Urošu i svojim prijateljima, koji su me uvek i bezuslovno podržavali u svim trenutcima.

Diverzitet i sezonska distribucija mikromiceta u vazduhu prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine

Sažetak

Sprovedeno je istraživanje diverziteta mikromiceta i monitoring koncentracije vijabilnih fungalnih propagula u vazduhu 20 odabranih prostorija za konzervaciju predmeta kulturne baštine i vazduha neposredne okoline, tokom 4 sezone 2014/2015. Dokumentovane su visoke vrednosti koncentracije spora u vazduhu tokom celog perioda uzorkovanja, posebno tokom prolećnog i letnjeg perioda u prostorijama sa visokim RH vrednostima. U uzorcima vazduha identifikovano je ukupno 74 vrste gljiva a najbrojnije su bile *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. Na osnovu dobijenih vrednosti relativne gustine i relativne učestalosti, najzastupljeniji aerogeni izolati iz ispitivanih prostorija su bili pripadnici *Cladosporium* i *Penicillium* vrsta. Na osnovu *in vitro* testova biodeterioracije aerogenih izolata *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* vrsta pokazana je sposobnost produkcije ekstracelularnih enzima, kiselina i pigmenata, formiranja mikogenih minerala i hemolitička aktivnost. Takođe, urađena je mikološka analiza kamene stele koja je bila na konzervacijskom tretmanu i zabeležen je visok nivo kolonizacije i deterioracije kamenog suspstrata što odgovara dobijenoj vrednosti indeksa deterioracije. Dokumentovana je sposobnost produkcije kiselih i baznih metabolita, produkcije pigmenata, solubilizacija krečnjaka i formiranje mikogenih minerala autohtonih izolata sa stele. Na kraju, analiziran je antifungalni potencijal odabranih etarskih ulja, metil salicilata i benzalkonijum hlorida na aerogenim izolatima *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. a najjača antifungalna aktivnost je zabeležena za benzalkonijum hlorid i etarsko ulje *Cinnamomum zeylanicum*. Rezultati molekularnog dokinga dominantnih komponenti etarskih ulja su bili u korelaciji sa jačinom antifungalne aktivnosti ispitivanih biocida.

Ključne reči: Aeromikologija, antifungalna aktivnost, biodeterioracija, etarska ulja, kamena stela, kulturna baština, mikromicete, propagule gljiva, prostorije za konzervaciju

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

Diversity and seasonal distribution of micromycetes in the air of cultural heritage conservation premises

Abstract

Diversity and monitoring of viable fungal propagules was investigated in the air of 20 selected cultural heritage conservation premises as well as in the outdoor air during 4 seasons of the 2014/2015 period. High spore loads were determined in the air during the study period, especially during spring and summer in the rooms with high RH values. A total of 74 fungal species were documented while most numerous species were *Aspergillus* spp. (19) and *Penicillium* spp. (15). According to obtained relative frequency and relative density values, the most frequent airborne isolates were *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. *In vitro* biodeterioration tests were applied on airborne *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolates and production of extracellular enzymes, acids and pigments was demonstrated as well as the ability to form mycogenic minerals and hemolytic activity. Ancient stone stela, which was on conservation treatment during the study period, was investigated and a high degree of biological colonization as well as deterioration of stone substrata was detected, corresponding to obtained index of deterioration value. Additionally, production of acid and alkaline metabolites, pigment production, carbonate solubilization and biogenesis of secondary mycogenic minerals was determined by autochtonous isolates from stone stela. Finally, antifungal potential of selected essential oils, metyl salicylate and benzalconium chloride was evaluated on airborne *Aspergilli* and *Penicillia*. The strongest antifungal activity was demonstrated for benzalconium chloride and *Cinnamonum zeylanicum* essential oil. Results of the molecular docking of the main essential oils componnents were in excellent correlation with the documented antifungal activity of the examined biocides.

Key words: Aeromycology, antifungal activity, biodeterioration, conservation premises, cultural heritage, essential oils, fungal propagules, micromycetes, stone stela

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Algology and mycology

Lista skraćenica i simbola

ABPA – alergijska bronhopulmonarna aspergiloza (*allergic bronchopulmonary aspergillosis*)

BAC – benzalkonijum hlorid (*benzalkonium chloride*)

BLAST – *basic local alignment sarch tool*

a_w – sadržaj aktivne vode u supstratu (*water activity*)

CCA – kanonijska korespodentna analiza (*canonical correspondence analysis*)

CFU – jedinica formiranja kolonije (*colony forming unit*)

CMC – karboksimetil celuloza (carboxymethyl cellulose)

CN – kazein agar (*Casein nutrient agar*)

CREA – kreatinin saharoza agar (*creatin sucrose agar*)

CYP51 – enzim 14-α demetilaza

dNTP – dezoksiribonukleozid trifosfat (*deoxyribosenucleoside triphosphate*)

DNK – dezoksiribonukleinska kielina

EDS – energetsko-disperzivna spektroskopija X zraka (*energy dispersive X-ray spectroscopy*)

EF1-α – elongacioni factor translacije 1-alfa (*translation elongation factor 1-alpha*)

EPS – ekstracelularne polimerne supstance (*extracellular polymeric substances*)

ERH – ravnotežna vrednost relativne vlažnosti vazduha (*equilibrium relative humidity*)

FID – plameno-jonizujući detector (*falme ionization detector*)

GC/MS – gasna hromatografija sa spektrometrijom masa (*gas chromatography–mass spectrometry*)

HVAC – grejanje, ventilacja i klimatizacija (*heating, ventialation and air conditioning*)

IA – indeks antifungalne aktivnosti

ID – indeks deterioracije (*deterioration index*)

IPA – invazivna pulmonarna aspergiloza (*invasive pulmonary aspergillosis*)

IR – inhibicija rasta kolonije

ITS – interni transkribovani region (*internal transcribed spacer*)

LPCB – laktofenol pamuk plavo (*lactophenol cotton blue*)

M40Y – sladni kvaščev agar sa 40% saharoze (*malt 40% sucrose yeast extract agar*)

MCF – mikrokolonijalne gljive (*microcolonial fungi*)

mCzA – mininmalni Czapekov agar (*minimal Czapek agar*)

mCzB – minimalni Czapekov bujon (*minimal Czapek broth*)

MEA – malt agar (*malt extract agar*)

MEB – tečni malt (*malt extract broth*)

MFK – minimalna fungicidna koncentracija

MIBAC – *Ministero per i beni e le attività culturali*

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MSD – maseno-spektrometrijski detector (*mass spectrometric detector*)

NCBI – Nacionalni centar za biotehnološke informacije (*National center for biotechnology information*)

OA – ovseni agar (*oatmal agar*)

OSHA – Služba za bezbednost na radu i zdravlje radnika (*Occupational safety and health administration*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (*polymerase chain reaction*)

RG – relativna gustina (*relative density*)

RH – relativna vlažnost vazduha (*relative humidity*)

rRNK – ribozomalna ribonukleinska kiselina

RU – relativna učestalost (*relative frequency*)

SBS – sindrom bolesne zgrade (*sick building syndrome*)

SEM – skening elektronska mikroskopija (*scanning electron microscopy*)

T – temperatura (*temperature*)

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (*World health organization*)

wt% – masaeni udeo (*wight percent*)

XRPD – energetska difrakcija praha (*X-ray powder diffraction*)

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1 Aerobiologija 1

1.2 Propagule gljiva kao komponenta bioaerosola 2

1.3 Faktori koji utiču na zastupljenost spora gljiva u vazduhu 3

1.4 Mikromicete kao uzrok zdravstvenih problema kod ljudi 7

1.4.1 Alergijske reakcije 8

1.4.2. Respiratorne infekcije 11

1.4.3 Mikotoksikoze 12

1.4.4 Sindrom bolesne zgrade 14

1.4.5 Zdravstveni standardi u svetu 15

1.5 Uloga gljiva u deterioraciji objekata kulturne baštine 16

1.5.1 Mehaničko dejstvo 17

1.5.2 Hemijsko dejstvo 18

1.5.2.1 Produkcija kiselina 18

1.5.2.2 Enzimska aktivnost 19

1.5.2.3 Produkcija pigmenata 22

1.5.3 Gljive kolonizatori kamenog suspstrata 22

1.6 Antifungalni agensi u procesu konzervacije 28

2 Predmet istraživanja 31

2.1 Prostorije za konzervaciju 31

2.2 Rimska kamena stela 32

3 Ciljevi rada 33

4 Materijal i metode 34

4.1 Materijal 34

4.1.1 Hranljive podloge 34
4.1.2 Boje i reagensi 39
4.1.3 Suspenzije konidija 39
4.1.4 Antifungalni agensi 40
4.2 Metode 42
4.2.1 Merenje mikroklimatskih parametara 42
4.2.2 Uzorkovanje vazduha i određivanje koncentracije spora 42
4.2.3 Petrografska analiza kamene stele 44
4.2.4 Određivanje indeksa deterioracije 44
4.2.5 Optička mikroskopija *in situ* 45
4.2.6 Uzimanje uzoraka sa kamene stele 45
4.2.7 Identifikacija mikromiceta 46
4.2.7.1 Molekularna identifikacija aerogenih izolata 47
4.2.7.2 Molekularna identifikacija izolata sa kamene stele 48
4.2.8 *In vitro* testovi biodeterioracije 50
4.2.8.1 Testovi produkcije kiselih i baznih metabolita 50
4.2.8.2 Test rastvaranja kalcijum karbonata 52
4.2.8.3 Testovi produkcije ekstracelularnih pigmenata 52
4.2.8.4 Test produkcije celulaza 53
4.2.8.5 Test produkcije proteaza 53
4.2.8.6 Testovi formiranja sekundarnih mikogenih minerala 53
4.2.8.7 Test hemolitičke aktivnosti i sposobnost rasta na 37 °C 54
4.2.9 SEM-EDS i XRPD 54
4.2.9.1 SEM-EDS 54
4.2.9.2 XRPD 55
4.2.10 Analiza sastava etarskih ulja 55

4.2.11 Testiranje antifungalne aktivnosti 56
4.2.11.1 Mikrodiluciona metoda 57
4.2.11.2 Metoda aromatične komore 58
4.2.11.3 Agar-diluciona (makrodiluciona) metoda 59
4.2.11.4 Molekularni doking 60
4.2.12 Statističke analize 61
5 Rezultati 63
5.1 Mikroklimatski parametri 63
5.2 Diverzitet i distribucija mikromiceta u vazduhu 64
5.3 Biodeterioracioni potencijal izolata gljiva iz vazduha 75
5.4 Petrografska identifikacija kamene stele 89
5.5 Biološka kolonizacija kamene stele 89
5.6 Potencijal biodeterioracije fungalnih izolata sa kamene stele 94
5.7 Hemisjki sastav etarskih ulja 99
5.8 Antifungalna aktivnost testiranih biocida 102
6 Diskusija 112
6.1 Distribucija i diverzitet mikromiceta u vazduhu 112
6.2 Biodeterioracioni potencijal aerogenih izolata 118
6.3 Potencijalni uticaj na ljudsko zdravlje 124
6.4 Diverzitet i biodeterioracioni potencijal mikromiceta na kamenoj steli 130
6.5 Antifungalna aktivnost 135
7 Zaključci 142
8 Literatura 144
9 Prilog 1 180
10 Prilog 2 241

1. Uvod

1.1 Aerobiologija

Vazduh predstavlja jedinstvenu smešu gasova ali i složen sistem u kome su dispergovane čestice neorganskog i organskog porekla kao i veliki broj mikroorganizama i njihovih propagula. Vazduh je ujedno i specifična sredina u kojoj se dešavaju bitni životni procesi, pre svega rasejavanje propagula brojnih živih bića. Aerobiologija je multidisciplinarna nauka koja se bavi proučavanjem prisustva i značaja bioaerosolnih komponenti u vazduhu. Bioaerosol je agregat čestica poreklom iz biosfere suspendovan u vazduhu dovoljno dugo da obezbeđuje monitoring njegovog kvaliteta. Predmet proučavanja je emisija, disperzija i depozicija bioaerosola, izvora bioaerosolnih komponenti kao i uticaj bioaerosola na organizme i različite supstrate (Douwes i dr., 2003; Kasprzyk, 2008; de Nuntiis i Palla, 2017). Komponente bioaerosola uključuju, pre svega, polen i spore biljaka, mikroskopske beskičmenjake, protiste, spore gljiva i bakterija, bakterije i viruse ali isto tako i fragmente mikroorganizama (ćelijskih zidova, flagele, fragmenti hifa i dr.), alergene velike molekulske mase, toksine, visoko isparljive metabolite, glukane i molekule nukleinskih kiselina (Stetzenbach, 2007; de Nuntiis i Palla, 2017). Ove komponente često mogu biti uzrok kontaminacije različitih susptrata ili izazivači infekcija i oboljenja biljaka, životinja i čoveka. Aerobiološka istraživanja su vema značajna i aplikativna zbog toga jer imaju veliku primenu u meteorologiji, medicini, veterini, poljoprivredi, prehrambenoj industriji, kao i u konzervaciji umetničkih predmeta i objekata kulturne baštine.

1.2 Propagule gljiva kao komponenta bioaerosola

Aeromikologija je subdisciplina aerobiologije koja se bavi proučavanjem kvalitativne i kvantitativne zastupljenosti propagula gljiva u vazduhu, kao jedne od najznačajnijih bioaerosolnih komponenti. One su uvek prisutne u vazduhu kako otvorenih tako i zatvorenih prostora a njihova koncentracija zavisi od sredinskih faktora (Kasprzyk, 2008). U reproduktivnoj fazi životnog ciklusa, gljive produkuju različite tipove spora tokom polnog i/ili bespolnog razmnožavanja. Spore, pojedinačne ili združene, se oslobađaju i emituju aktivnim ili pasivnim putem i disperguju vazdušnim strujama na dostupne supstrate. S obzirom na mikroskopske dimenzije fungalnih propagula, njihova disperzija putem vazdušnih strujanja se može odvijati na velike razdaljine (Hjelmroos, 1993). Iako je za germinaciju i dalji nastavak životnog ciklusa neophodno da propagule budu vijabilne, poznato je da čak i nevijabilne propagule gljiva sadrže alergene i toksične supstance (Kasprzyk, 2008). Novija ispitivanja su pokazala da se i fungalni fragmenti mnogo manjeg dijametra od spora (oko 0,3 μm) oslobađaju u okolni vazduh i njihova brojnost može biti i do 300 puta veća od broja dispergovanih spora (Górny i dr., 2002; Nielsen, 2003).

Približni globalni kontinentalni emisioni fluks spora iznosi 200 m^{-2} s^{-1} ili čak 50 Tg godišnje (Elbert i dr., 2007) što čini fungalne spore veoma značajnim bioaerosolnim komponenetama. Pretpostavlja se da u tropskim kišnim šumama fungalne spore čine oko 45% mase grubog aerosola (1 – 10 μm) i 4 – 11% mase finog aerosola (< 2.5 μm) u gradskim sredinama (Fröhlich-Nowoisky i dr., 2009; Elbert i dr., 2007). Bauer i dr. (2008) su pokazali da fungalne propagule čine 8% masene koncentracije organskog ugljenika u vazduhu tokom leta u urbanim i 14% u suburbanim sredinama.

Brojne vrste mikromiceta su izazivači biljnih, animalnih i humanih infekcija i oboljenja – mikoza, kontaminanti hrane i uzročnici deterioracije unutrašnjih i spoljašnjih zidova zgrada, kao i objekata i predmeta kulturne baštine. Uzimajući u obzir činjenicu da su u vazduhu često prisutne propagule gljiva, izazivači alergija, mikoza i mikotoksikoza, posebnu pažnju treba posvetiti proučavanju njihovom uticaju na zdravlje ljudi. Poslednjih decenija povećano je interesovanje za unapređenje kvaliteta vazduha i stoga se intenzivira

monitoring mikrobiološkog stanja zatvorenih prostora sa ciljem kvalitativne i kvantitativne analize mikrobijalne zajednice vazduha, kao i faktora koji mogu uticati na sastav bioaerosola unutrašnjih prostora (Abdel Hameed i Farag, 1999; Gutarowska i Jakubowska, 2002; Yazicioglu i dr., 2002; Sautour, 2009; Hwang i Cho, 2016; Heo i dr., 2017).

1.3 Faktori koji utiču na zastupljenost spora gljiva u vazduhu

Aeromikološka ispitivanja su pokazala da su sredinski faktori značajniji za rast i sporulaciju gljiva u odnosu na fiziološke i genetičke (Ingold, 1971). Zastupljenost spora različitih vrsta gljiva zavisi od sezonskog i diurnalnog ciklusa, tj. od spoljašnjih faktora sredine kao što su temperatura (T), relativna vlažnost vazduha (RH), cirkadijalni ciklus svetlosti i tame i drugih. Zbirni efekat ovih faktora je kompleksan i često je teško precizno ustanoviti kako pojedinačni faktori utiču na zastupljenost propagula gljiva u vazduhu (Kasprzyk, 2008).

Fungalne propagule su prisutne u vazduhu tokom cele godine i njihova zastupljenost zavsi od klimatskih faktora (Adams, 1974; Calderón i dr., 1997). U uslovima umerene klimatske zone, maksimum koncentrcije fungalnih propagula je zabeležen tokom leta i rane jeseni, tj. u onom periodu kada je najviša RH (Simeray i dr., 1993). U tropskim i suptropskim regionima, velika brojnost propagula u vazduhu je zabeležena tokom hladnih meseci (od novembra do februara) a najmanja u toplim (od maja do septembra) (Kasprzyk, 2008). Lehtonen i dr. (1993) su pokazali da, tokom prolećnog i letnjeg perioda, koncentracije spora u vazduhu spoljašnje sredine i u zatvorenim prostorima korespondiraju. S druge strane, tokom zimskog perioda, koncentracija spora u zatvorenim prostorima dostiže više vrednosti u odnosu na spoljašnju sredinu (Reponen i dr., 1992). Na zastupljenost spora značajno utiču diurnalne varijacije, sezona i stanište (Kasprzyk, 2008).

Calderón i dr. (1995) naglašavaju ulogu mikromklimatskih uslova na koncentraciju fungalnih spora u vazduhu. U urbanim sredinama, povišena temperatura utiče kako na sezonske tako i na cirkadijalne promene u zastupljenosti propagula u vazduhu. Na osnovu

RH vazduha, može se izvršiti podela na propagule koje su visoko zastupljene u uslovima visoke i niske vlažnosti (Kasprzyk, 2008). Prilikom povišene T i snižene RH vazduha, najčešće tokom podneva i posledpodnevnih časova, povećana je koncentracija konidija *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* i *Drechslera* vrsta dok zastupljenost askospora i bazidiospora raste u uslovima povećane RH vazduha (tokom noći i ranih jutarnjih časova) (Burch i Levetin, 2002; Kasprzyk, 2008). RH vazduha utiče na brojnost propagula gljiva i u zatvorenim prostorima. Garrett i dr. (1998) u svojoj studiji ističu da su spore *Cladosporium* vrsta brojnije pri RH manjoj od 60% dok su pri većim vrednostima RH zastupljenije spore *Penicillium* vrsta. Isti autori navode da adekvatna ventilacija zatvorenih prostora utiče na smanjenje koncentracije spora vrsta roda *Cladosporium*. Temperaturni od opseg 20 – 25°C u zatvorenim prostorima (takozvana „sobna temperatura") obično promoviše rast termomezofilnih mikromiceta (Khan i Karuppayil, 2012).

Drugi značajan faktor koji utiče na zastupljenost propagula gljiva u vazduhu jeste dostupnost supstrata koji utiče na životni ciklus gljiva, pa samim tim i na pojavu sporulacije i njen intenzitet. Tokom zime i ranog proleća, kada je dostupnost supstrata mala, brojnost fungalnih spora je neznatna dok se maksimum postiže za vreme leta i jeseni (Horner i dr., 1995). Brojnost spora patogenih gljiva u vazduhu je zavisna i od neposrednog prisustva i učestalosti domaćina. Povećanje brojnosti konidija *Alternaria* spp., poznatih bijnih patogena i saproba, zabeležena je tokom vremena žetve u vazduhu iznad žitnih polja (Chakraborty i dr., 2003; Corden i dr., 2003). Slični rezultati su saopšteni i za *Botrytis cinerea* tokom sazrevanja grožđa (Adams, 1964; Bush i Portnoy, 2001). Dostupnost supstrata je isto toliko značajna i za rast i sporulaciju gljiva u zatvorenim prostorima. Ostaci hrane ali i prašina i voda koji su prisutni u zatvorenim prostorima obezbeđuju nutrijente neophodne za fungalni rast na različitim tipovima supstrata, uključujući i građevinske materijale (Khan i Karuppayil, 2012). Prisustvo vode u supstratu jedan je od najvažnijih faktora koji treba uzeti u obzir prilikom ispitivanja kolnizacije i rasta gljiva na građevinskom materijalu u prostorijama (Nielsen, 2003). Mikromicete, kolonizatori ovih materijala, mogu se podeliti u tri grupe na osnovu aktivnosti vode u supstratu (a_w). Kserofilne i kserotolerantne vrste su primarni kolonizatori, i razvijaju se pri niskoj a_w (ispod 0,8), iako kserotolerantne vrste imaju optimalni rast pri višim vrednostima a_w, neke

čak blizu 1. Mezofilne mikromicete zahtevaju minimalan a_w između 0,8 i 0,9 (sekundarni kolonizatori) dok su tercijarni kolonizatori higrofilne vrste za čiji rast je nepohodan a_w iznad 0,9. U treću grupu spadaju i vrste koje su česte u tropskim ekosistemima, usled

a_w vrednost supstrata se definiše kao količnik parcijalnog pritiska vode u vazuhu neposredno iznad supstrata (p) i parcijalnog pritiska vodene pare u vazduhu neposredno iznad čiste vode (p_0) pri istim uslovima:

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

a_w govori o tome koliko efikasno voda može učestvovati u fizičkim ili hemijskim reakcijama. Vrednosti su u opsegu od 0 (nije prisutna slobodna voda) do 1 (čista voda). U prvom slučaju, molekuli vode su čvrsto vezani za molekule supstrata i ne mogu da ispare u okolni vazduh pa stoga ne vrše parcijalni pritisak.
Ravnotežna vrednost relativne vlažnosti vazduha (ERH) je direktno povezana sa a_w:

$$ERH = a_w \times 100\%$$

što znači da relativna vlažnost vazduha utiče na a_w supstrata (Pitt i Hocking, 2009; Sandulachi, 2012).

humidnih uslova koji preovladavaju (Nielsen, 2003). Mikormicete zatvorenih prostora stoga mogu kolonizovati supstrate sa velikim opsegom a_w vrednosti (Tabela 1). Treba istaći da gljive rastu pri nižim a_w vrednostima u odnosu na bakterije (Beuchat, 1983).

Različita su mišljenja o najzastupljenijim vrstama gljiva u vazduhu otvorenih prostora (eng. o*utdoor fungi*). Mnogi autori su zabeležili da su spore *Cladosporium* spp. najbrojnije i da njihova zastupljenost tokom godine varira od 40% do 90% (D'amato i Spieksma, 1995; Kasprzyk, 2008). Literaturni podaci prezentuju reziltate koji ukazuju na veliku brojnost konidija vrsta rodova *Alternaria*, *Epicoccum*, *Botrytis* i *Aureobasidium* (Miller, 1992; D'amato i Spieksma, 1995; Nikkels i dr., 1996; Kasprzyk i Worek., 2006). S druge strane, spore *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta su značajno manje zastupljene u vazduhu otvorenih prostora (Miller, 1992). Bazidiospore i askospore su prema nekim autorima prisutne u velikom broju (Adams, 1964; Calderón i dr., 1995) dok drugi autori imaju suprotno mišljenje (Levetin i dr., 1995).

Prisustvo propagula mikromiceta u vazduhu zatvorenih prostora (eng. *indoor fungi*) zavisi od od antropogenih faktora ali i od dotoka spoljašnjeg vazduha. Studije sprovedene u prostorijama različitih zgrada (sa i bez oštećenja uzrokovanih vlagom) su pokazale da je

Tabela 1. Mikromicete, često ozolovane iz zatvorenih prostora sa minimalnim a_w vrednostima (Miller i dr. 2003; Pitt i Hocking, 2009).

a_w min.	vrsta	grupa
0,94	*Chaetomium globosum* *Stachybotrys chartarum*	**Tercijarni kolonizatori (higrofilne i higrotolerantne vrste) aw > 0,9**
0,93	*Botrytis cinerea*	
0,91	*Trichoderma harzianum*	
0,90	*Fusarium graminearum* *Penicillium digitatum* *Rhizopus microsporus* *Scopulariopsis brevicaulis* *Trichothecium roseum*	
0,88	*Fusarium proliferatum*	**Sekundarni kolonizatori (mezofilne vrste) 0,8 < a_w < 0,9**
0,87	*Fusarium verticillioides* *Penicillium decumbens*	
0,86	*Alternaria alternata* *Cladosporium cladosporioides*	
0,84	*Penicillium purpurogenum*	
0,83	*Penicillium expansum*	
0,82	*Aspergillus fumigatus* *Emericella nidulans*	
0,81	*Penicillium griseofulvum* *Penicillium viridicatum*	
0,80	*Paecilomyces variotii* *Penicillium citreonigrum* *Penicillium citrinum*	
0,79	*Aspergillus ochraceous*	**Primarni kolonizatori (kserofili, kserotoleranti, osmofilne i osmotolerantne vrste) a_w < 0,8**
0,78	*Aspergillus flavus* *Aspergillus sydowii* *Aspergillus terreus* *Aspergillus versicolor* *Penicillium brevicompactum* *Penicillium chrysogenum*	
0,77	*Aspergillus niger* *Aspergillus wentii*	
0,75	*Aspergillus candidus* *Aspergillus restrictus*	
0,71	*Eurotium chevalieri* *Eurotium rubrum*	
0,70	*Eurotium amstelodami*	
0,69	*Wallemia sebi*	
0,68	*Aspergillus penicillioides*	
0,61	*Xeromyces bisporus**	
< 0,60	**Odsustvo fungalnog rasta**	

****Xeromyces bisporus*** **ima sposobnost rasta pri najnižoj a_w od bilo kog drugog poznatog organizma**

zabeleženi diverzitet fungalnih propagula generalno visok ali varira od tipa objekta i njegove namene. Geografski položaj sa tipom klimata određuje sastav zajednice gljiva na globalnoj skali tako da dotok spoljašnjeg vazduha značajno utiče na profil zastupljenosti spora zatvorenih prostora (Amend i dr., 2010; Adams i dr., 2013). Vrste koje se smatraju tipičnim za zatvorene prostore pripadaju rodovima: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* i dr. (Micali i dr., 2003; Stryjakowska-Sekulska i dr., 2007). Garrett i dr. (1998) su u studiji sprovedenoj u stambenim prostorijama detektovali vijabilne propagule kvasaca i *Cladosporium* i *Penicillium* vrsta kao najzastupljenije tokom zime (73% ukupnog uzorka) i kasnog proleća (86%) uz vrste rodova *Aspergillus* (2,6%), *Cephalosporium* (2,2%) i *Botrytis* (1,1%).

1.4 Mikromicete kao uzrok zdravstvenih problema kod ljudi

Ljudi provode veći deo svog života u zatvorenim prostorima (stambeni objekti, obrazovne institucije, kancelarije, bolnice, ugostiteljski objekti, institucije kulture…), čak 90 – 95% vremena (Micali i dr., 2003; Oliviera i dr., 2012). Prisustvo visoke koncentracije fungalnih spora u vazduhu zatvorenih prostora, kao i kolonizacija gljiva na različitim tipovima materijala u unutrašnjosti građevinskih objekata, je povezano sa povećanom incidencom različitih zdravstvenih problema, uključujući alergijske reakcije, mikoze i mikotosikoze. Smatra se da se čovek svakodnevno izlaže propagulama barem 600 različitih vrsta gljiva dok se manje od 50 vrsta u epidemiološkim studijama smatraju frekventnim (Khan i Karuppayil, 2012). Pretpostavlja se da oko 30% zdravstvenih problema koji se javljaju usled lošeg kvaliteta vazduha zatvorenih prostora nastaju zbog reakcije ljudskog organizma na propagule mikromiceta (Gutarowska i Jakubowska, 2002). Takođe, smatra se i da su spore patogenih mikroorganizama više zastupljene u vazduhu zatvorenih prostora u odnosu na spoljašnje (Stryjakowska-Sekulska i dr., 2007). Navedeno je posledica odsustva prirodnih mehanizama samopročišćavanja vazduha u zatvorenim prostorima i činjenice da propagule mikroorganizama često mogu biti inkorporirane u čestice prašine i kapljice vode

čime su zaštićene od uticaja sredine (Micali i dr., 2013). Aktuelna istraživanja posvećuju pažnju respiratornim alergijama i infekcijama kao i mikotoksikozama (koje su posledica inhalacije mikotoksina) i drugim respiratornim problemima čiji su uzrok fungalne propagule ili fungalni metaboliti (Bennet i Klich, 2003; Kasprzyk, 2008; Nevalainen i dr., 2015).

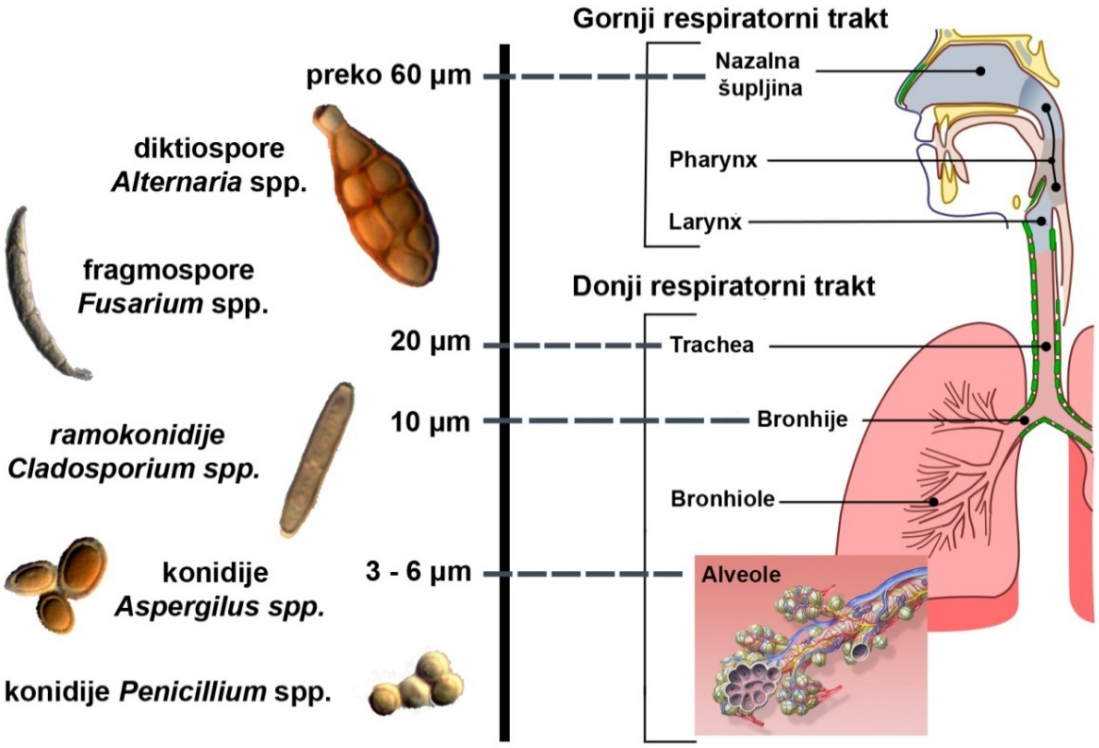
1.4.1 Alergijske reakcije

Prisustvo gljiva u zatvorenim prostorima se povezuje sa pojavom alergijskih simptoma, pre svega u prostorijama sa neadekvatno održavanim sistemom klima uređaja, sa velikom količinom prašine, ili prostorijama sa povećanom vlažnošću (Bennett i Klich, 2003). Veliki broj vrsta gljiva, sa preko 80 rodova, je asocirano sa simptomima respiratone alergije i najčešće pripadaju vrstama iz podrazdela Deuteromycotina ali i drugim taksonomskim grupama (Tabela 2) (Horner i dr., 1995). Prilikom respiracije, većina proropagula dijametra preko 10 μm se zadržavaju u nazofarinksu i njihova depozicija je asocirana sa pojavom nazalnih i/ili očnih simptoma poznatih kao alergijski rinitis (Luo, 1991; Horner i dr., 1995). Propagule koje su manje od 10 μm u dijametru, naročito one

Tabela 2. Gljive najčešći izazivači alergijskih rekacija (Horner i dr., 1995)

Deuteromycotina	**Basidiomycotina**	**Zygomycotina**	**Oomycetes**	**Kvasci**
Alternaria alternata	*Calvatia* spp.	*Rhizopus nigricans*	*Phytophtora infestans*	*Candida albicans*
Aspergillus spp.	*Pleurotus ostreatus*			
Cladosporium spp.	*Coprinus* spp.		*Plasmopara viticola*	*Malassezia furfur*
Botrytis cinerea	*Ganoderma* spp.			
Epicoccum nigrum	*Psilocybe cubensis*			*Saccharomyces cerevisiae*
Fusarium spp.				
Helmithosporium spp.				
Penicillium spp.				
Trichophyton spp.				

manje od 5 µm, mogu dospeti u donje respiratorne puteve (Slika 1) što može dovesti do alergijskih reakcija koje se manifestuju kao astma (Pepys, 1965; Horner i dr., 1995). Propagule dijametra 3 – 0,5 µm su posebno značajne zato što mogu dospeti do alveola pa mogu biti uzročnici ozbiljnijih respiratornih problema (Micali i dr., 2003). Pored spora, postoje dokazi da i njihovi fragmenti mogu imati alergeni karakter, što znači da i delovi krupnijih spora kao što su one kod vrsta roda *Alternaria* i *Epicoccum* mogu dospeti do donjih respiratornih puteva i izazvati alergijske simptome (Horner i dr., 1995). Poznato je da su alergijski simptomi donjih respiratonih puteva češće uzrokovani fungalnim sporama nego polenovim zrnima, mada su alergijske reakcije na fungalne propagule ređe zastupljene kod ljudi od drugih tipova alergija zbog čega se teže dijagnostifikuju i leče s obzirom na veliki diverzitet gljiva i njihovih alergena (Horner i dr., 1995).



Slika 1. Šematski prikaz spora fungalnih alergena i mesta depozicije u repiratornom traktu

Pokazano je da su spore gljiva jedan od glavnih uzročnika respiratornih alergijskih reakcija kod dece u higijenski neadekvatno održavanim prostorijama u kojima je prisutna vlaga (Garrett i dr., 1998). Ukupna koncentracija spora mikromiceta u vazduhu je od manjeg značaja za pojavu astme, atopije i respiratornih simptoma dok su navedeni zdravstveni problemi u značajnoj korelaciji upravo sa koncentracijom spora određene vrste

Definicija i mehanizmi alergijskih rekacija

Ne postoji jedinstvena definicija pojma alergije. Pod ovim pojmom podrazumeva se stanje imunske hipersenzitivnosti koje nastaje kao posledica izlaganja alergenu i karakteriše se povećanim odgovorom imunskog sistema (Horner i dr., 1995).

Od 4 osnovna tipa hipersenzitivnosti, alergije su obično asocirane sa tipom I. Tip I nastaje nakon reakcije imunoglobulin E-specifičnih antigena (alergena) sa IgE antitelom na površini mastocita i bazofilnih leukocita. Alergeni su stoga, podgrupa antigena koji stimulišu IgE posredovan odgovor imunskog sistema (Horner i dr., 1995).

Smatra se da oko 10% ljudske populacije poseduje IgE antitela i predviđa se da će oko polovine tog broja individua ispoljiti alergijske simptome u određenom vremenskom periodu kao posledicu izloženosti fungalnim propagulama (Bush i dr., 2006).

gljiva. Brojne studije dovode u vezu visoke koncentracije vrsta roda *Penicillium* i *Alternaria* sa incidencom pojave astme (Licorish i dr., 1985; Bush i dr., 2006) dok je izloženost sporama vrsta roda *Aspergillus* povezana sa atopijskim dermatitisom (Garrett i dr., 1998). Stoga je ispitivanje koncentracije spora određenih fungalnih taksona značajnije za procenu zdravstvenog rizika od merenja ukupne koncentracije svih spora po jedinici vazduha (Garrett i dr., 1998).

Visoke koncentracije propagula određenih vrsta u vazduhu mogu dovesti do pojave simptoma sličnih pneumonitisu. Hipersenzitivni pneumonitis (alergijski alveolitis) je retko alergijsko oboljenje koje može nastati kao posledica prolongirane senzibilizacije na prisustvo veće koncentracije fungalnih antigena (Bush i dr., 2006; Khan i Karuppayil, 2012). Poznata je pojava ovog simptoma u prostorijama sa visokom koncentracijom spora gljiva kao i volatilnih mikotoksina trihotecena (Khan i Karuppayil, 2012).

1.4.2. Respiratorne infekcije

Izloženost propagulama različitih vrsta gljiva može rezultovati ozbiljnim respiratornim infekcijama koje se javljaju najčešće kod imunokompromitovanih osoba (Khan i Karuppayil, 2012) ali i kod imunokompetentnih (Tillie-Leblond i Tonnel, 2005). Od brojnih tipova fungalnih infekcija, najznačajnije je pomenuti aspergiloze. Do sada je identifikovano oko 20 vrsta roda *Aspergillus*, uzročnika oportunističkih fungalnih infekcija kod čoveka. Među njima, *A. fumigatus* je najčešće izolovana vrsta iza koje slede *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* i *A. terreus* (Herrecht i dr., 2004). Mikoze koje su uzrokovane vrstama ovog roda uključuju alergijsku bronhopulmonarnu aspergilozu (ABPA), invazivne ili semi-invazivne pulmonarne aspergiloze i pulmonarni aspergilom (Khan i Karuppayil, 2012).

ABPA je neinvazivno oboljenje pluća koje se javlja kod nekih imunokompetentnih osoba hipersenzitivnih na antigene vrsta roda *Aspergillus* (najčešće *A. fumigatus*) pri čemu dolazi do pojave inflamacije usled rasta hifa unutar mukusa bronhija (Horner i dr., 1995; Tillie-Leblond i Tonnel, 2005). Alergijski fungalni sinuzitis je oboljenje sa sličnim simptomima kao ABPA, takođe se javlja kod imunokompetentnih individua pri čemu dolazi do kolonizacije paranazalnih sinusa (Schnadig i dr., 1999; Bush i dr., 2006). Pored *A. fumigatus*, uzročnici ove infekcije pripadaju vrstama rodova *Curvularia*, *Bipolaris* i dr. (Bush i dr., 2006). Za razliku od pomenutih, invazivna pulmonarna aspergiloza (IPA) je najčešći tip plućne infekcije kod imunokompromitovanih osoba, kod osoba sa malignitetom podvrgnutih hemoterapiji ili kod pacijenata nakon transplantacije organa (Oren i Goldstein, 2002; Herbrecht i dr., 2004). Dolazi do prodiranja spora preko plućnog epitela i njihove diseminacije u druge organe putem krvotoka (Herbrecht i dr., 2004). Aspegilom predstavlja leziju nastalu kao posledica fungalnog rasta u plućnom tkivu pri čemu se formira loptasta struktura od micelije i okolnog tkiva (Rafferty i dr., 1983).

Pored aspergiloza, treba pomenuti i respiratorne infekcije čiji su uzrok druge vrste mikromiceta. *Histoplasma capsulatum* je jedan od značajnih uzročnika respiratornih infekcija (histoplazmoze, Darlingova bolest) u određenim delovima sveta, pre svega na severnoameričkom kontinentu, gde je ova vrsta najzastupljenija. Ova dimorfna mikromiceta je prisutna u zemljištu, u pećinskim ekosistemima, ali i u starim zgradama i na

građevinama gde su prisutni prašina i ekskrementi slepih miševa i ptica. Izlaganje propagulama *H. capsulatum* je veoma frekventno u oblastima gde je ona zastupljena mada se kod malog broja inficiranih osoba (< 1%) razvijaju simptomi pulmonarne ili diseminirajuće histoplazmoze (Kauffman, 2007). Za stanovništvo novog sveta su značajne i respiratorne infekcije koje izazivaju vrste dimorfnih mikromiceta rodova *Coccidioides* (*C. immitis* i *C. posadasii*) i *Paracoccidioides* (*P. brsiliensis*). Kokcidiomikoze se manifestuju kod oko 40% inficiranih osoba u vidu pulmonarnih infekcija (tzv. dolinska groznica) koje mogu biti praćene ekstrapulmonarnom progresijom oboljenja (Hector i Laniado-Laborin, 2005). Paracokcidiomikoze su karakteristične za južnoamerički kontinent i slično kao i kokcidiomikoze, primarno se manifestuju kao plućne infekcije (Brummer i dr., 1993). *Blastomyces dermatitidis* je dimorfna mikromiceta koja izaziva kako pulmonarna tako i kutana oboljenja, poznata kao blastomikoze. Ove infekcije su karakteristične za severnoamerički kontinent i javljaju se primarno kod imunokompromitovanih osoba (Meyer i dr., 1993). Treba pomenuti i kriptokokoze, infekcije izazvane kvascem *Cryptococcus neoformans*, koji je prisutan širom sveta u zemljištu i izmetu ptica. Infekcija započinje inhalacijom i može se manifestovati u formi pulmonarnih kriptokokoza. Pojačana incidenca pojave kriptokokoza je zabeležena kod HIV pozitivnih osoba ali i kod drugih imunokompromitivanih ljudi (Mitchell i Perfect, 1995).

1.4.3 Mikotoksikoze

Mikotoksikoze se odnose na intoksikacije nastale usled ingestije ili inhalacije nekih jedinjenja, produkata sekundarnog metabolizma gljiva, pre svega mikotoksina. Ovo su jedinjenja male molekulske mase i nisu neophodna za normalan rast i reprodukciju (Bush i dr., 2006). Najveći broj mikotoksina ne spada u visoko isparljiva jedinjenja pa je njihovo unošenje u organizam moguće putem inhalacije fungalnih spora, fragmenata micelije ili čestica prašine kontaminiranih mikotoksinima (Albright, 2001; Bennet i Klich, 2003). Relativno mali broj radova je objavljen o zastupljenosti mikotoksina u fungalnim sporama, kao i o tome da li su oni više zastipljeni u miceliji ili reproduktivnim strukturama.

Pretpostavlja se da su mikotoksini prisutni u sporama toksikogenih gljiva znatno više nego što je to poznato (Jarvis, 1990; Sorenson, 1999).

Među najpoznatije mikotoksine spadaju aflatoksini (produkuju ih vrste *A. flavus* grupe), ohratoksini (*A. ochraceus, A. niger*, *A. glaucus, Penicilium verrucosum*), fumonizini (*Fusarium* spp., *Alternaria alternata* var. *lycopersici*), trihoteceni (vrste rodova *Fusarium*, *Stachybotrys, Trichoderma, Trichotecium*), citrinin (*Penicillium* spp., *A. terreus*, *A. niveus*), zearalenoni (*Fusarium graminearum* i druge vrste roda *Fusarium*) i dr. (Bennet i Klich, 2003; Samson, 2004). Neki autori navode da zearalenone ne treba smatrati mikotoksinima s obzirom da ova jedinjenja, iako veoma biološki aktivna, imaju nisku toksičnost. Nasuprot njima, aflatoksine odlikuje hepatotoksična, mutagena i kancerogena aktivnost (aflatoksin B1 se smatra najkancerogenijom supstancom biogenog porekla) (Bennet i Klich, 2003). Citrinin i ohratoksini su nefrotoksični (ohratoksin je uzrok endemske balkanske nefropatije) a trihoteceni imaju citotoksično, imunosupresivno i neurotoksično dejstvo (takođe su asocirani sa incidencom pojave alimentarne toksične aleukije) (Bennet i Klich, 2003).

Neke studije ukazuju na veću potencijalnu toksičnost mikotoksina unetih putem inhalacije u odnosu na druge načine unošenja (Robbins i dr., 2000). Rezulatati nekih istraživanja zatvorenih prostora govore o tome da je unos mikotoksina u organizam putem inhalacije spora relativno mali i nedovoljan da izazove akutnu intoksikaciju, čak i u slučaju veoma visoke koncentracije spora u vazduhu (Kelman i dr. 2004). S druge strane, manji broj mikotoksina spada u grupu visoko isparljivih jedinjenja i mogu dospeti u organizam bez nužne inhalacije fungalnih propagula. Visoko isparljivi mikotoksini (eng. *airborne mycotoxins*) su detektovani u vazduhu spoljašnje sredine sa visokom koncentracijom fungalnih spora (npr. farme i kompostare) ali je njihovo prisustvo u vazduhu zatvorenih prostora dokumentovano sporadično (Nielsen, 2003). Trihoteceni su zabeleženi u prašini i uzorcima vazduha u prostorijama gde je vidljiv porast *Stachybotrys* spp. Nielsen (2003) ističe da je neophodno analizirati protok vazduha relativno velike zapremine (> $10m^3$) koristeći filtere jako malog dijametra pora (< 0,2 μm) kako bi se adekavatno detektovali aerogeni mikotoksini.

1.4.4 Sindrom bolesne zgrade

Sindrom bolesne zgrade (eng. *Sick building syndrome* – SBS) se karakteriše serijom nespecifičnih simptoma koji se javljaju kod ljudi koji duže borave u određenim zatvorenim prostorima (Joshi, 2008). SBS je čest kako u novim ili renoviranim prostorijama koje poseduju grejanje, ventilaciju i HVAC uređaje ali isto tako i u starim, neadekvatno održavanim prostorijama, bez odgovarajućih sistema ventilacije (Redlich i dr., 1997). Osobe tokom boravka u ovakvim prostorijama mogu ispoljiti akutne zdravstvene simptome koji su direktno povezani sa periodom boravka u njima (Joshi, 2008). Pomenuti simptomi, iako najčešće nemaju letalne posledice, izazivaju neprijatnost i mogu uticati na svakodnevne aktivnosti. U simptome se ubrajaju: 1. iritacija sluzokože (iritacija očiju i grla, kašalj); 2. neurotoksični efekti (glavobolja, zamor, smanjenje koncentracije i pamćenja); 3. respiratorni simptomi (otežano disanje), 4. kožni simtomi (osip, svrab, suvoća kože) i 5. hemosenzorne promene (pojačan ili promenjen osećaj mirisa, zamućenje vida) (Redlich i dr., 1997). Posledično, tokom krećeg ili dužeg perioda boravka u ovakvim prostorijama može doći do pojave dermatoza, respiratornih bolesti (uključujući astmu) pa čak i kancera (Stryjakowska-Sekulska i dr., 2007). Za SBS nije identifikovan specifični etiološki faktor ali se kao uzroci obično navode: loša ventilacija prostorija, prašina, prisustvo visoko isparljivih jedinjenja i različitih sintetičkih supsanci (kao što su boje, lepak, hemikalije koje se koriste za čišćenje itd.), duvanski dim i različite vrste mikrobiološke kontaminacije (Bennet i Klich, 2003; Burge, 2004; Khan i Karuppayil, 2012). SBS se često asocira sa prisustvom mikotoksigenih mikromiceta, pre svega sa vrstama roda *Stachybotrys*, poznatih producenata neurotoksičnih trihotecena (Bennet i Klich, 2003) mada određeni autori smatraju da i dalje ne postoje čvrsti dokazi (Miller i dr., 2003). Podaci Svetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization*, WHO) iz 1986. godine ističu da čak 10-30% novoizgrađenih poslovnih prostora ima nezadovoljavajući kvalitet vazduha (Spengler i Chen, 2000). U Srbiji SBS je sporadično proučavan a simptomi nisu dovoljno prepoznati od strane službi primarne zdravstvene zaštite.

1.4.5 Zdravstveni standardi u svetu

U svetu još uvek nije prihvaćena zvanična standardizacija fungalne kontaminacije zatvorenih prostora. Prema standardima *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (1995) kontaminacija vazduha do 100 CFU m^{-3} se smatra niskom (odnosi se na prostorije u bolnicama i sterilnim komorama), 100 – 1000 CFU m^{-3} se smatra intermedijernom (opšte vrednosti za *indoor* i *outdoor* vazduh) dok se vrednosti preko 1000 CFU m^{-3} smatraju visokom kontaminacijom (dozvoljene u prostorijama za čuvanje domaćih životinja) (Rao i dr., 1996). Standardi prihvaćeni u Poljskoj postavljaju limit 1000 CFU m^{-3} za bakterije i 3000 CFU m^{-3} za gljive za spoljašnju sredinu dok su limiti za zatvorene prostore 2000 CFU m^{-3} za bakterije i 300 CFU m^{-3} za gljive (Kolwzan i dr., 2006). Ukoliko koncentracija mikroorganizama prelazi propisani limit ili ukoliko su prisutne propagule patogenih mikromiceta, vazduh se smatra mikrobiološki kontaminiranim. Ipak, autori naglašavaju da se propisani limiti razlikuju za prostorije različitih namena. Na primer, vazduh u operacionim salama ne sme da sadrži fungalne spore i najviše 100 CFU m^{-3} bakterija dok je, sa druge strane, za prostorije za čuvanje domaćih životinja limit propisan na 200.000 CFU m^{-3} za bakterije i 10.000 CFU m^{-3} za gljive.

Prema preporukama *Wonder Makers Environmental*, Inc. (2001) i prema OSHA, *Eagle Industrial Hygiene Associates* (2004), zatvoreni prostor se smatra kontaminiranim ako je dokumentovano više od 1000 CFU m^{-3} dok de Aquino Neto i de Góes Siqueira (2000) smatraju da broj vijabilnih propagula gljiva u zatvorenim prostorijama ne sme prelaziti 750 CFU m^{-3}. Prema drugoj studiji (Clark, 2001), 500 CFU m^{-3} je limit za stambene prostorije a 250 CFU m^{-3} za prostorije poslovnih objekata. Određeni autori (Oliviera i dr., 2012; *American conference of governmental industrial hygenists,* 1995) smatraju da se u kontekstu mikrobiološke kontaminacije vazduha moraju ispuniti sledeći uslovi: 1) taksonomski sastav mikobiote vazduha spoljašnje sredine i zatvorenih prostora treba da bude sličan a odnos koncentracije spora treba da bude niži od 1; 2) ukupna koncentracija spora u opsegu od 100 do 1000 CFU m^{-3}; 3) potrebno je ispitati prisustvo patogenih vrsta i vrsta koje su indikatori povišene vlage (Oliviera i dr., 2012). U praksi se

još uvek poštuju preporuke WHO iz 1990. godine po kojima se koncentracija vijabilnih propagula gljiva u vazduhu zatvorenih prostora toleriše ako ne prelazi 500 CFU m^{-3} (World Health Organization, 1990). U Srbiji postoji Pravilnik o preventivnim merama za bezbedan i zdrav rad pri izlaganju biološkim štetnostima (2010) u kome je data klasifikacija bioloških štetnosti, uključujući i gljive. Ipak, još uvek ne postoje zvanični standardi koji definišu limit koncentracije fungalnih propagula u vazduhu.

1.5 Uloga gljiva u deterioraciji objekata kulturne baštine

Ars longa vita braevis, kaže stara latinska izreka. Čovekova potreba za umetničkim izražavanjem je stara koliko i sam čovek pa su brojna do danas sačuvana umetnička dela samo fragment onoga što je čovečanstvo stvaralo tokom istorije. Zajedno sa stvaranjem javlja se i potreba da se umetničko delo sačuva od spoljašnjih, često štetnih uticaja. Umetnička dela su deo kulturne baštine određenog naroda pa se stoga javlja potreba za njihovim očuvanjem za buduća pokoljenja. Biodeterioracija se definiše kao bilo koja nepoželjna promena u osobini materijala a čiji su uzrok živi organizmi i objeki kulturne baštine su često podložni ovom procesu (Hueck, 1968; Sterflinger i Piñar, 2013). Ona može biti izazvana kako od strane makroorganizama (biljke i životinje) tako i od mikroorganizama (bakterije, gljive, alge, lišajevi). Bioaerosol predstavlja značajan izvor biodeteriogena s obzirom da je veliki broj propagula mikroorganizama suspendovan u vazduhu. Neadekvatno skladištenje i neredovno održavanje predmeta u arhivima, muzeijima i depoima umetnina često favorizuje proliferaciju mikroorganizama, pre svega gljiva (di Carlo i dr., 2017). S obzirom da su gljive kosmopolitski, ubikvitalni organizmi koji imaju sposobnost kolonizacije različitih tipova supstrata i poseduju izraženu metaboličku aktivnost, veoma su značajni uzorčnici biodeterioracije predmeta i objekata kulturne baštine širom sveta.

Gljive prisutne na umetničkim predmetima na njega mogu delovati na dva načina – mehanički i hemijski. Ova dva procesa se najčešće dešavaju simultano pri čemu jedan od

njih može da ima dominantan efekat zavisno od tipa supstrata, prirode gljive ili sredinskih uslova (Garg i dr., 1995; Pinna i Salvadori, 2008a). Treba napomenuti i da, zavisno od lokalizacije, fungalni kolonizatori mogu da deluju dvosmerno – od površine supstrata ka unutrašnjosti ili obrnuto (Garg i dr., 1995).

1.5.1 Mehaničko dejstvo

Fizički mehanizmi deterioracije se odvijaju pod uticajem apikalnog rasta hifa ili obrazovanja plodonosnih tela na površini ili u dubljim slojevima kolonizovanog materijala, bilo da je u pitanju zidna ili umetnička slika, drvo, platno, kameni supstrat itd. Ukoliko hife rastu ispod površine bojenog sloja, može doći do raslojavanja boje ili odvajanja od podloge, što se označava kao eksfolijacija. Sličan efekat mogu da prouzrokuju askokarpi ili piknidije, koji se često formiraju ispod površine bojenog sloja. Ukoliko je rast gljive površinski, to rezultira u formiranju micelije koja se širi po površini, čime prekriva supstrat i menja originalni izgled i estetsku vrednost dela (Garg i dr., 1995). Melanizovani predstavnici mikromiceta su izazivači mehaničke degradacije kamenog supstrata s obzirom da prisustvo melanina hifama daje mehaničku čvrstinu, povećava turgor hifa i olakšava penetraciju u supstrat (Diakumaku i dr., 1995; Pinna i Salvadori, 2008a).

Lihenizovane gljive su česti kolonizatori kamenog supstrata, pa samim tim i umetničkih dela napravljenih od kamena kao što su arhitektonska i vajarska dela. Mehanička deterioracija uključuje penetraciju hifa, rizina (foliozni lišajevi) ili rizomorfa (skvamulozni lišajevi) u supstrat i cikličan proces ekspanzije i kotrakcije talusa usled promena vlažnosti sredine (medula lišajeva poseduje higroskopne osobine s obzirom da hife gljiva imaju visok kapacitet apsorpcije vode) (Adamo i Violante, 2000; Chen i dr., 2000). Mehanička deterioracija kamena može biti i posledica formiranja biogenih minerala koji vrše pritisak na zidove pukotina ili je uzrokovana inkorporacijom fragmenata kamena u sam talus. Pod uticajem lišajeva, kameni supstrat je podložniji dejstvu spoljašnjih faktora i vremenom dolazi do narušavanja njegove strukture (Chen i dr., 2000).

1.5.2 Hemijsko dejstvo

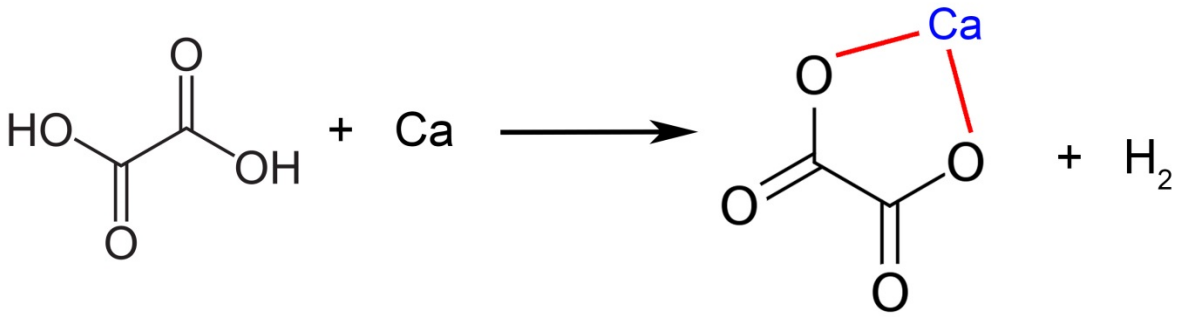
Mehanizmi hemijske biodeterioracije su mnogo kompleksniji i zastupljeniji od fizičkih mehanizama. Gljive menjaju supstrat hemijskim putem kroz procese asimilacije i disimilacije (Caneva i dr., 2003). U procesu asimilacije, gljive koriste nutrijente iz supstrata kao izvor ugljenika, pri čemu luče enzime koji katalizuju degradaciju supstrata. Pod disimilacijom se podrazumeva da gljive produkuju različite metabolite koji utiču na supstrat koji naseljavaju, uključujući krajnje produkte metabolizma, primarne i sekundarne metabolite, kao i metaboličke intermedijere kao što su organske kiseline i pigmenti. Ove supstance menjaju ili oštećuju supstrat koji gljive kolonizuju. S obzirom da je površina hifa velika u odnosu na zapreminu, ovi metaboliti brzo difunduju između ćelija a isto tako i iz ćelija u supstrat (Garg i dr., 1995; Pinna i Salvadori, 2008a).

1.5.2.1 Produkcija kiselina

Produkcija kiselina i acidoliza su najpoznatiji i najbolje proučeni mehanizmi biodeterioracije, pre svega na neorganskim materijalima (Warscheid i Braams, 2000; Pinna i Salvadori, 2008a). Zahvaljujući metaboličkoj aktivnosti, gljive produkuju organske kiseline kao što su glukonska, limunska, oksalna, jabučna, ćilibarna, itakonska itd. (Gomez-Alarcon i de la Torre, 1994). Paralelno sa germinacijom spora, započinje i respiracija i produkcija organskih kiselina koje se formiraju u mitohondrijama kao intermedijerni produktakti Krebsovog ciklusa. Ukoliko gljiva raste na supstratu bogatom nutrijentima, formira se veća količina organskih kiselina i stoga se višak izlučuje u supstrat kao sekundarni metaboliti (Florian, 2002). Ove kiseline reaguju sa različitim supstancama supstrata, rastvaraju katjone i vrše helaciju metala koji su prisutni u bojenom sloju slike ili mineralnom supstratu skulptura i zidnih slika. Reakcijom kiselina sa različitim metalima (kalcijum, gvožđe, magnezijum i dr.) dolazi do formiranja soli i kompleksnih jedinjenja (Garg i dr., 1995). Posebno treba napomenuti sposobnost organskih kiselina, pre svega oksalne (Slika 2), da vrše helaciju metala (kompleksoliza). Ova kiselina može da formira

komplekse sa brojnim metalima (Ca, Mg, Fe, Cu i dr.) pri čemu se obrazuju sekundarni mikogeni minerali, među kojima je najpoznatiji kalcijum oksalat, CaC_2O_4 (Gadd, 1999). Pomenuti kristali su često sastavni deo patina na kamenim predmetima ali je njihovo formiranje potvrđeno i na freskama, umetničkim slikama, staklu, drvetu i drugim materijalima (Pinna i Salvadori, 2008a).

Ugljen dioksid, produkt respiracije, se u uslovima povišene vlažnosti prevodi u ugljenu kiselinu koja je sposobna da rastvara kalcijum karbonat ($CaCO_3$) i magnezijum karbonat ($MgCO_3$) prisutan u krečnjaku, malteru i gipsu pri čemu se formiraju bikarbonati koji se lako rastvaraju u vodi. Povećanje koncentracije vodonikovih jona, tj. zakišeljavanje supstrata, favorizuje njegovu kolonizaciju acidofilnim gljivama koje ubrzavaju procese deterioracije (Garg i dr., 1995; Pinna i Salvadori, 2008a).

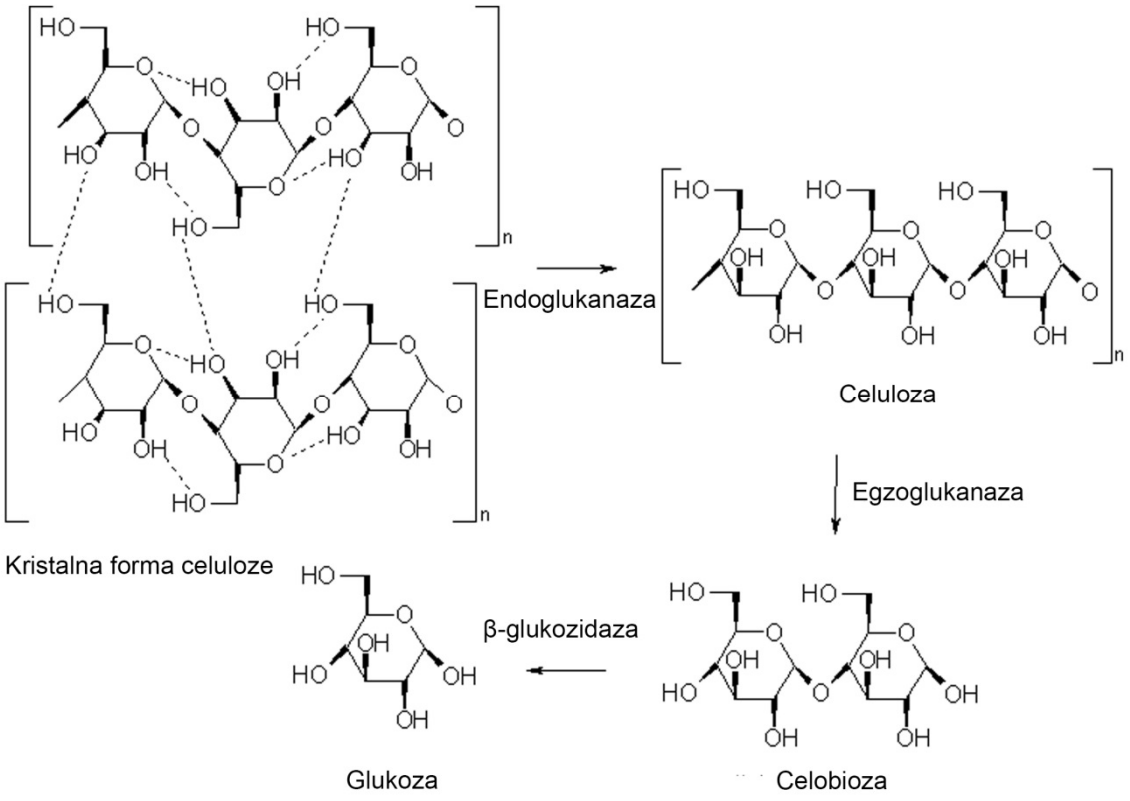


Slika 2. Obrazovnje kalcijum oksalata helacijom kalcijuma pomoću oksalne kiseline

1.5.2.2 Enzimska aktivnost

Gljive produkuju veliki broj ekstracelularnih enzima čija aktivnost može uticati na supstrat, tj. na umetnički predmet, izazivajući proces degradacije (Rebricova, 1991). Enzimi su proteinski molekuli specifične aktivnosti koji katalizuju određenu hemijsku reakciju. U procesu biodeterioracije veliku ulogu imaju ekstracelularni enzimi koji prevode velika, kompleksna i često u vodi nerastvorljiva jedinjenja (celuloza, hemiceluloza, lignin, proteini) u rastvorljiva jedinjenja male molekulske mase (Garg i dr., 1995).

Celulolitički enzimi vrše degradaciju celuloze do glukoznih monomera. U celuloznim vlaknima, molekuli celuloze su prisutni u formi kristalne i amorfne strukture pri čemu su amorfni regioni vlakna podložniji enzimskoj aktivnosti. Celulazni kompleks (Slika 3) čine enzimi egzoglukanaza (hidrolizuje β-glikozidne veze na krajevima lanca), endoglukanaza (hidrolizuje β-1,4-glikozidne veze) i β-glukozidaza (vrši hidrolizu celobioze i celodekstrina do glukoze) (Pasquariello i dr., 2008a). Aerogene gljive mogu biti producenti celulolitičkih enzima ali primarno koriste proste šećere kao izvor ugljenika.Vrste koje poseduju značajnu celulolitičku aktivnost pripadaju rodovima *Chaetomium* i *Trichoderma* i česte su na papiru tekstilu. Pomenute gljive samo u uslovima male dostupnosti monosaharida produkuju celulaze na celulaznim supstratima (Florian, 2002). Stoga, prisustvo celulolitičkih vrsta gljiva nikada ne sme biti zanemareno u arhivima, bibliotekama i muzeijima.



Slika 3. Enzimatski put razgradnje celuloze

Umetničke predmete od drveta često kolonizuju makromicete, producenti celulolitičkih i ligninolitičkih enzima. Gljive izazivači meke i braon truleži predstavljaju gljive sa celulolitičkom aktivnošću koje slabe strukturu drvenog supstrata razlaganjem celuloze kao sastavne komponente drvene mase. Izazivači meke truleži pomenuti proces vrše produkcijom celulaza dok izazivači braon truleži to vrše indirektno, razlaganjem hemiceluloze. Pri degradaciji hemiceluloze se produkuje vodonik peroksid koji razlaže celulozu pa drvna masa gubi mehaničku čvrstinu i dobija braon boju. Gljive bele truleži sintetišu ligninolitičke enzime što je jedinstvena karakteristika koja im omogućava da razlagažu lignin, fenolni polimer koji je glavna komponenta drvene mase (Florian, 2002). U grupu ligninolitičkih enzima spadaju lignin peroksidaze, mangan zavisne peroksidaze i lakaze (Pinna i Salvadori, 2008a). S obzirom da se u ovom procesu lignin uklanja, ostaju nerazložene celulozne površine bele boje (otuda naziv gljive bele truleži). Za aktivnost ovih gljiva neophodna je povišena vlažnost supstrata da bi otpočele razgradnju drvenog supstrata. Diskoloracije uzrokovane aktivnošću ovih gljiva su često prisutne na drvenim skulpturama kao što su totemi američkih naroda ili na arheološkim relikvijama – drvene kutije koje su dugo vremena bile u kontaktu sa zemljištem (Florian, 2002).

Neke vrste gljiva naseljavaju umetničke predmete koji predstavljaju supstrate bogate fibrilarnim proteinima (vuna, pergament, koža, svila...). Proteolitički enzimi (proteaze) degraduju različita proteinska vlakna kao što su kolagen (vuna), fibroin (svila) i keratin (pergament). Gljive retko produkuju proteaze a proteinska vlakna (po prirodi veoma otporna) često mogu da budu razgrađena aktivnošću bakterija ili dejstvom abiotičkih faktora (Caneva i dr., 2003). Ipak, pod određenim uslovima, neke vrste gljiva mogu da vrše njihovu degradaciju i ovde se izdvajaju vrste roda *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* i *Chaetomium* (Michaelsen i dr., 2006; Arroyo, 2009; Ljaljević Grbić i dr. 2014). U procesu keratinolize enzimi vrše fisiju disulfidnih mostova, odgovornih za rezistentnost vlakana, a potom ekstracelularne proteaze vrše hidrolitičku degradaciju. Degradacija keratina je zabeležana za vrste rodova *Microsporum, Trichophyton, Fusarium, Chaetomium, Aspergillus, Penicillium* itd. (Szostak-Kotowa, 2004). Gljive ređe kolonizuju supstrate od svile i pokazano je da umetnički predmeti koji sadrže staru, delimično oštećenu svilu mogu predstavljati supstrat za rast mikrogljiva (Florian, 2002).

1.5.2.3 Produkcija pigmenata

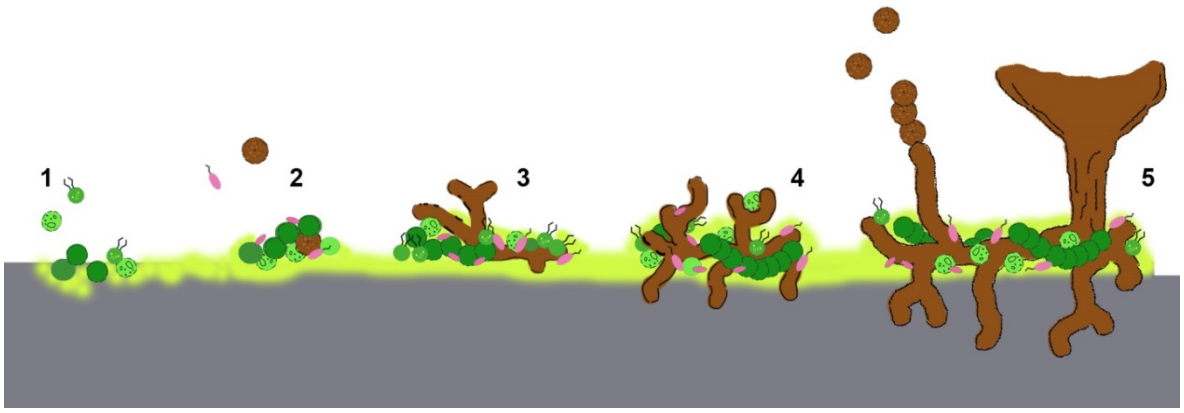
Mkromicete produkuju pigmente koji pripadaju različitim klasama jedinjenja, mogu biti različitih boja (zeleni, sivi, plavi, ljubičasti...) i specifični su za vrstu (Garg i dr., 1995). Pigmenti mogu da budu prisutni u hifama, konidijama ili da se izlučuju u supstrat a njihova produkcija je uslovljena količinom dostupnih nutrijenata i minerala, intenzitetom UV zračenja i drugim limitirajućim sredinskim faktorima (Florian, 2002). Sekrecija pigmenata na/u supstrat dovodi do pojave različitih pigmentacija čija boja ne zavisi samo od njihovog hemijskog sastava, već i od prirode supstrata (kamen, bojeni sloj, drvo...), prisustva drugih mikroorganizama i mikroklimatskih uslova. Novonastale promene pigmentacije su često ireverzibilne što dovodi do estetskih promena na predmetima kulturne baštine (Garg i dr., 1995; Caneva i dr., 2003).

Gljive najčešće produkuju pigment braon boje – melanin koji daje miceliji i reproduktivnim strukturama karakterističnu crnu ili braon obojenost. Ove nesolubilne supstance se formiraju oksidativnom polimerizacijom fenolnih jedinjenja (ortodihidroksifenola) i predstavljaju veoma stabilna i rezistentna jedinjenja biogenog porekla (Jackobson, 2000). Melanini su karakteristični za predstavnike grupe Dematiaceae i prisutni su u ćelijskom zidu u granularnoj ili amorfnoj formi odakle difunduju i u supstrat. Opisano je četiri tipova melanina kod gljiva: 1) 3,4-dihidroksifenilalanin melanin (DOPA), 2) katehol melanin, 3) glutaminil-4-hidroksibenzen melanin (GHB), 4) 1,8-dihidroksinaftalen melanin (DHN) (Butler i Day, 1998). Količina melanina se povećava sa starenjem gljive (Florian, 2002).

1.5.3 Gljive kolonizatori kamenog suspstrata

Kamen se smatra ekstremnim staništem za rast i proliferaciju mikroorganizama, pre svega zbog velikih kolebanja dnevnih i sezonskih mikroklimatskih parametara i nedostatka nutrijenata i vode (Pinna i Salvadori, 2008b). Površina kamena koja je direktno izložena sunčevoj svetlosti može da dostigne temperaturu i iznad 60°C (Jenkins i Smith, 1990) a

istovremeno je podložna ciklusima zamrzavanja-odmrzavanja (Gorbushina i Krumbein, 1999). I pored pomenutog, određene grupe mikroorganizama imaju sposobnost kolonizacije ovog ekstremnog staništa. To su, u prvom redu, primarni kolonizatori, autotrofni fotosintetički organizmi – cijanobakterije, alge i lišajevi (Slika 4). U sekundarne kolonizatore spadaju oligotrofni i poikilotrofni organizmi, pre svega hemolitotrofne i



Slika 4. Kolonizacija kamena i formiranje biofilma: 1) adhezija propagula primarnih kolonizatora (alge i cijanobakterije); 2) depozicija propagula sekundarnih kolonizatora (heterotrofne bakterije i nelihenizovane gljive); 3) germinacija spora gljiva i proliferacija ćelija algi i bakterija; 4) maturacija biofilma; 5) formiran biofilm i disperzija članova konzorcijuma putem novoformiranih propagula

hemoorganotrofne bakterije kao i gljive sa razvijenom rezistencijom na stresne uslove sredine (Gorbushina i Krumbein, 1999). Mikroorganizmi koji kolonizuju kamen često formiraju biofilm tj. visoko strukturisan konzorcijum mikroorganizama uronjen u zajednički ekstracelularni matriks. Formiranje biofilma počinje nespecifičnim, reverzibilnim interakcijama. Nakon što propagule mikroorganizama dospeju na površinu supstrata, dolazi do uspostavljanja stabilnih interakcija koje su posledica formiranja specifičnih molekula (lipopolisaharidi, membranski proteini) i struktura (flagele). Nakon inicijalne adhezije ćelija, dolazi do produkcije ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) koje učestvuju kako u prijanjanju ćelija za supstrat (adhezija) tako i u međusobnom povezivanju (kohezija) (Pinna i Salvadori, 2008a). Evolutivne prednosti formiranja

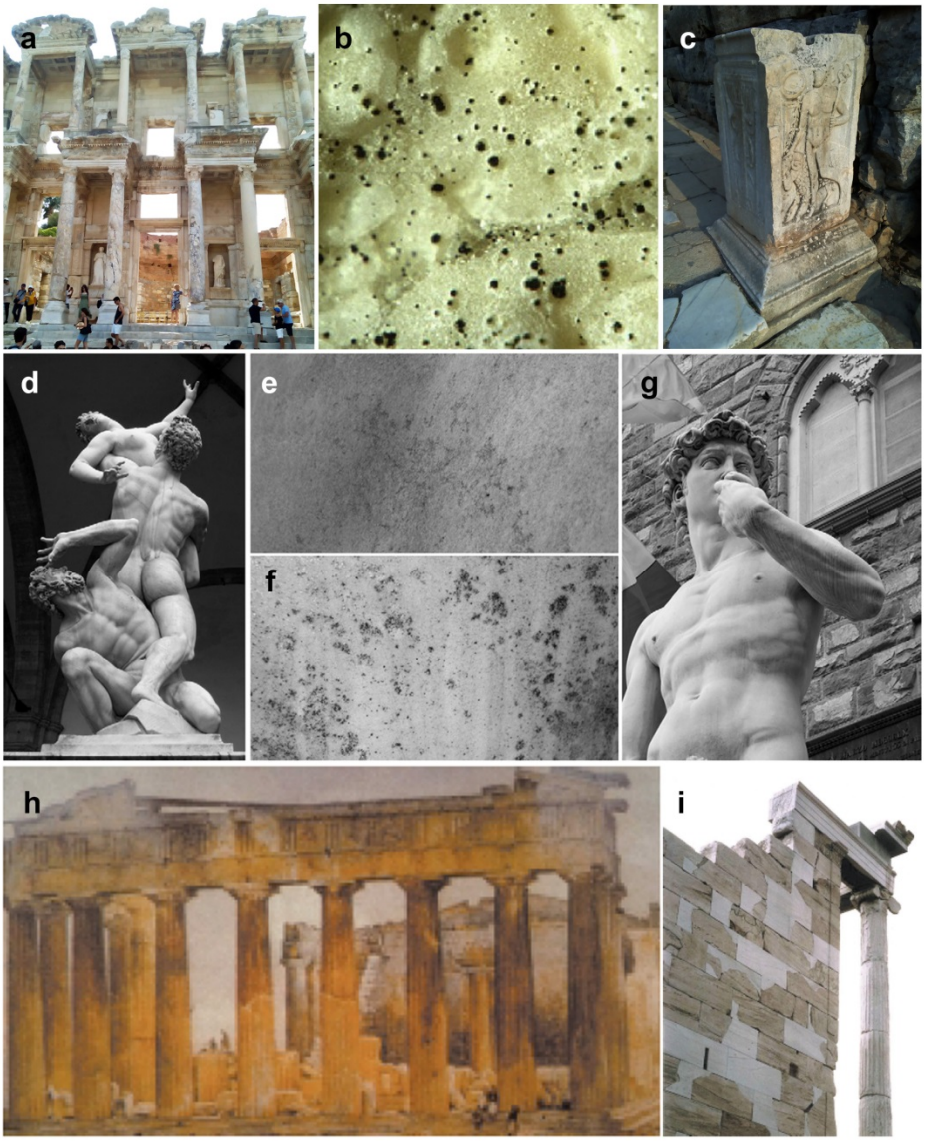
biofilma jesu zaštita, rezistencija na fizičke i hemijske stresore, metabolička kooperacija i zajednički regulisana ekspresija gena (Ramage i dr., 2012). Treba pomenuti da i unutrašnjost kamena takođe predstavlja specifično mikrostanište za rast takozvanih endolitskih mikroorganizama (pre svega cijanobakterija, algi i lišajeva sa kojima ponekad mogu biti asocirane heterotrofne bakterije i nelihenizovane gljive). U ovoj sredini mikromklimatski uslovi su nešto povoljniji nego na površini kamena – zadržavanje vode je veće a solarna radijacija i intenzitet vazdušnih strujanja je niži (Pinna i Salvadori, 2008b).

Poikilotrofni mikroorganizmi se generalno karakterišu sporim rastom, ćelijama nepravilnog oblika, često združenih u agregate. Retko kada dolazi do formiranja specijalizovanih reproduktivnih struktura već se aktivnim rastom formiraju debeli, pigmentisani ćelijski zidovi koji omogućavaju prelazak u stanje dormancije ukoliko dođe do dužeg perioda nepovoljnih sredinskih uslova. Sposobnost izlučivanja ekstracelularnih polimernih supstanci i formiranje debelih ćelijskih zidova omogućavaju retenciju vode, adsorbciju nutrijenata, smanjenje desikacije i sposobnost adsorbcije ćelija za susptrat ili za druge organizme (Gorbushina i Krumbein, 1999).

Sve grupe mikroorganizama koji naseljavaju kameni supstrat se odlikuju velikom fenotipskom plastičnošću koji se ogleda u polimorfizmu, tj. promenom forme rasta ili sporulacije u skladu sa promenama u spoljašnjoj sredini. Mikromicete koje kolonizuju kamen imaju veoma izraženu sposobnost polimorfizma koji se ogleda u formiranju različitih somatskih i reproduktivnih struktura kao što su skleriocije, hlamidospore, klasteri konidija i dr. Ova životna strategija je analogna mehanizmu latentne invazije koji je prisutan kod fitapatogenih gljiva (Cooke i Rayner, 1984; Gorbushina i Krumbein, 1999). Neki mikroorganizmi koji naseljavaju kamen se karakterišu formiranjem mikrokolonija koje nastaju kao posledica meristemskog rasta što ima nekoliko prednosti. Pre svega, specifična morfologija mikrokolonija se karakteriše niskim odnosom površine u odnosu na zapreminu čime se smanjuje gubitak vode, izloženost solarnoj radijaciji i drugim fizičkim i hemijskim stresorima (Zakharova i dr., 2013). Dodatno, formiranjem gusto pakovanih ćelijskih agregata kod kojih dolazi do funkcionalne diferencijacije pojedinačnih ćelija povećava se sposobnost preživljavanja u odnosu na jednoćelijske organizme (Gorbushina i Krumbein, 1999).

Gljive iz grupe Dematiaceae se smatraju najvažnijim agensima deterioracije kamenog supstrata. Za sve pripadnike ove grupe je karakteristična intenzivnija produkcija melanina koji ima ulogu u zaštiti od prekomerene sredniske radijacije (UV radijacija, x- i γ-zraci) kao i od hemijskih agenasa. Ovoj grupi pripadaju mikrokolonijalne gljive (MCF – *microcolonial fungi*) i crni kvasci, tj. vrste rodova: *Acrodictys*, *Aureobasidium*, *Capnobotryella*, *Coniosporium*, *Exophiala*, *Hormonema*, *Hortaea*, *Knuffia*, *Lichenothelia*, *Monodictys*, *Phaeococcus*, *Phaeococcomyces*, *Phaeosclera*, *Sarcinomyces* i *Trimmatostroma*, veoma značajni kolonizatori kamena u aridnim i semiaridnim sredinama (Sterflinger, 2010; Pinna i Salvadori, 2008b). Pripadnici ove familije su takođe i predstavnici kosmopolitski rasprostranjenih vrsta hifomiceta rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Epicoccum* i dr. koje se mogu razviti na kamenu u nešto povoljnijim sredinskim uslovima (ukoliko je veća dostupnost nutrijenata i pri manjim fluktuacijama temperature i vlažnosti) tako da su one glavni kolonizatori kamenog supstrata u uslovima umerene klime i u humidnim sredinama (Sterflinger, 2010). Isto tako, njihova uloga je mnogo značajnija u deterioraciji restauriranih predmeta od kamena (Pinna i Salvadori, 2008b).

Gljive mogu da vrše biodeterioraciju kamena fizičkim ili hemijskim putem. Fizički mehanizmi obuhvataju penetraciju hifa koje izazivaju fragmentaciju kamene površine dok hemisjki mehanizmi najčešće uključuju sekreciju kiselina i ekstracelularnih pigmenata. Pomenuto je da gljive produkuju brojne kisele metabolite kojima vrše rastvaranje mineralnog supstrata pri čemu može doći do formiranja sekundarnih kristalnih struktura. Sinteza i sekrecija ekstracelularnih pigmenata uglavnom izaziva estetske promene površine kamenih spomenika. Usled pomenutih dejstava gljiva dolazi do pojave simptoma biodeterioracije kao što su biopiting (nastanak perforacija malog dijametra), formiranje biogene patine i različitih pigmentacija (Slika 5) (Caneva i dr., 2003). Rast gljiva iz grupe Dematiaceae je razlog pojave različitih tamnih pigmentacija dok su MCF glavni uzročnici biopitinga na kamenim spomenicima, pre svega na krečnajku i mermeru (Gorbushina i dr,, 1993; Sterflinger, 2010).



Slika 5. Simptomi biodeteriracije prisutni na predmetima i objektima kulturne baštine od mermera: a i b) Simptomi biopitinga prisutni na fasadi Celzusove biblioteke (Efes, Turska); c) kolonizacija lišajevima na reljefnom prikazu boga Hermesa (Efes, Turska); d i e) Skulptura *Otmica Sabinjanki* i simptomi tamnih pigmentacija na levom delu abdomena (Firenca, Italija); f i g) *Kopija Davida* i tamne pigmentacije na pozadini skulpture poreklom od mikrokolonijalnih gljiva (Firenca, Italija); h) slika Partenona iz 1840. – jasno vidljiva biogena patina koja prekriva površinu hrama; i) restaurirani deo Akropolja (Atina, Grčka) sa uočljivom tamnom biopatinom na originalnim blokovima (b i d–i Krumbein, 2002; Sterflinger, 2010; Marvasi i dr., 2012a)

Saksikolni lišajevi su pionirski organizami na kamenom supstratu i imaju sposobnost ekstenzivne kolonizacije. Ovi organizmi pokazuju veliku sposobnost tolerancije na sredinske faktore, pre svega na ekstremene vrednosti temperature i sunčevog zračenja što omogućava njihovu kosmopolitsku distribuciju i sposobnost naseljavanja ekstremnih staništa (Rikkinen, 1995). Tome doprinosi i činjenica da su lišajevi poikilohidrični organizmi, tj. sposobni da izdrže cikluse desikacije i rehidratacije s obzirom da pri nedostatku dostupne vode snižavaju stopu metabolizma i ulaze u stanje kriptobioze (Piervittori i dr., 2008). Najčešći morfološki tip talusa koji se javlja na kamenu pripada krustoznom tipu dok se foliozni razvija u manjem broju slučajeva. Talus se može razviti na površini kamena (epilitski), delimično unutar kamena (hemiendolitski) ili u potpunosti unutar kamena (endolitski) (Pinna i Salvadori, 2008b). Endolitski lišajevi su u posebnom fokusu istraživanja tokom poslednjih decenija i česti su kolonizatori krečnjačkog kamena (Pinna i dr., 1998; Pinna i Salvadori, 2000; Tretiach i dr., 2003). Treba napomenuti da endolitski lišajevi imaju sposobnost najdubljeg prodiranja u kameni supstrat od svih mikroorganizama, čak i do nekoliko milimetara (Salvadori, 2000). Pored toga što hife mikobionta vrše penetraciju kamenog supstrata, rast peritecija nekih endolitskih vrsta lišajeva može probiti površinu kamena od iznutra ka spolja, što posledično vodi pojavi biopitinga (Pinna i Salvadori, 2008b). Pored biopitinga, rast lišajeva može dovesti do eksfolijacije, enkrustacije i disagregacije kamena (Chen i dr., 2000; Caneva i dr., 2003).

Kao što je već pomenuto, adhezija i prodiranje hifa kao i repetitivni ciklusi ekspanzije i kontrakcije talusa su najvažniji mehanizmi mehaničke deterioracije kamena od strane lišajeva. Ipak, različita morfologija talusa kao i njegova adhezivna sposobnost nisu uvek u korelaciji sa kapacitetom lišajeva da menja supstrat. Fiziološke razlike između vrsta su od mnogo većeg značaja za ovu pojavu (Adamo i dr., 1993; Adamo i Violante, 2000). Sintezu različitih hemijskih agenasa značajnih u biodeterioraciji vrši prevashodno mikobiont. Pored karboksilnih, lišajevi imaju sposobnost sinteze lišajskih kiselina, polurastvorljivih polifenolnih jedinjenja, koja mogu da formiraju komplekse sa katjonima metala. Sposobnost lišajeva da apsorbuju i zadržavaju vodu dozvoljava da se hemijske reakcije degradacije odvijaju tokom dužeg vremenskog perioda, znatno duže nego na kamenu koji nije naseljen ovim organizmima (Chen i dr., 2000; Adamo i Violante, 2000).

1.6 Antifungalni agensi u procesu konzervacije

Konzervacija objekata kulturne baštine se zasniva na upotrebi preventinih i remedijacionih tehnika u cilju inhibicije rasta mikroorganizama ili njihove eradikacije. Primena metode zavisi od tipa umetničkog premeta, njegove očuvanosti, dimenzija, lokacije ali isto tako i od sredinskih uslova (Sterflinger i Pinzari, 2012; Orlita, 2004; Young i dr., 2008). Preventivne (indirektne) metode uključuju monitoring sredinskih parametara, pre svega T, pH i RH vrednosti. S druge strane, remedijacione (direktne) metode uključuju upotrebu mehaničkih, fizičkih i hemijskih sredstava. (Koestler i Santoro, 1990; Kumar i Kumar, 1999; Sterflinger i Pinzari, 2012).

Hemijski tretmani uključuju aplikaciju različitih tipova biocida u tečnom ili gasovitom stanju (metoda fumigacije). U restauraciji objekata kulturne baštine se često upotrebljavaju benzalkonijum hlorid (BAC), nistatin, kamfor, timol, natrijum fluorid, naftalen i dr. Ove supstance se obično apliciraju na polihrone predmete, drvene skulpture, bojene površine, tekstil i predmete od papira. Komercijalni biocidi se veoma često primenjuju u cilju konzervacije različitih predmeta kulturne baštine, iako još uvek nije potpuno ustanovljen njihov štetni efekat kako na same predmete tako i na životnu sredinu i ljudsko zdravlje (Barresi i dr., 2017). Zbog toga, supstance koje se upotrebljavaju u konzervaciji objekata kulturne baštine treba da ispunjavaju sledeće kriterijume: a) visok stepen efikasnosti protiv biodeteriogena, b) odsustvo destruktivnog efekta na tretirani materijal, c) niska toksičnost i d) nizak rizik od zagađenja životne sredine (Caneva i dr., 2008a). Generalno, trend savremenih isptivanja u ovoj oblasti ide u pravcu upotrebe efikasnih ali nedestuktivnih i netoksičnih supstanci.

Poslednjih godina je objavljen veći broj studija u kojima se navodi da biocidi biološkog porekla predstavljaju održivu alternativu tradicionalnim procedurama kontrole mikrobiološke infestacije objekata kulturne baštine (de la Paz i dr., 2006; Borrego i dr., 2012; Barresi i dr., 2015; Casiglia i dr., 2015). Biocidi biljnog porekla (biljni ektrakti i etarska ulja) imaju široku upotrebu u medicini, farmaciji i prehrambenoj industriji i pokazano je da mnogi od njih imaju izraženu antimikrobnu aktivnost (Dubey i dr., 2000;

Barresi i dr., 2017). Biljni ekstrakti i etraska ulja sadrže produkte sekundarnog metabolizma kao što su terpenoidi, steroidi, flavonoidi, fenoli, kumarini, tanini i alkaloidi koji su nosioci biološke aktivnosti. Poznato je da sekundarni metaboliti imaju različit mehanizam delovanja kao što je uticaj na regulaciju intermedijernog metabolizma, inhibicija enzima ili uticaj na komponente ćelijske membrane mikroorganizama (Barresi i dr., 2017). Smatra se da pomenute supstance imaju nisku toksičnost i da su ekološki prihvatljive (Borrego i dr., 2012). Pored toga, važno je napomenuti da određena etarska ulja ne ispoljavaju negativni efekat na materijale organskog porekla pa se mogu koristiti u procesu konzervacije različitih predmeta kulturne baštine (Chung i dr., 2001).

Do danas je objavljen veći broj studija upotrebe biocida biljnog porekla u svrhu ispitivanja antimikrobne aktivnosti na autohtone izolate sa predmeta kulturne baštine i aerogene izolate iz objekata gde se predmeti čuvaju (Guiamet i Gómez de Saravia, 2005; Ghalem i Mohamed, 2008; Gómez de Saravia i dr., 2008; Rotolo i dr., 2016). Ipak, broj studija antifungalne aktivnosti etarskih ulja u ovom kontekstu je relativno mali. Borrego i dr. (2012) su demonstrirali snažan antifungalni efekat etarskih ulja *Syzigium aromaticum*, *Allium sativum* i *Origanum vulgare* na fungalnim izolatima iz arhivskih prostorija. U sličnoj studiji, Lavin i dr. (2016) su zabeležili antifungalnu aktivnost etarskih ulja *O. vulgare* i *Thymus vulgaris* na izolatima sa papira. Antifungalna aktivnost etarskih ulja *Lavandula angustifolia*, *O. vulgare* i *Rosmarinus officinalis* je dokumentovana na gljivama izolovanim sa kamenih i drvenih umetnina (Stupar i dr., 2014). Pored toga, Savković i dr. (2016a) utvrdili su snažnu anti-*Aspergillus* aktivnost etarskog ulja *O. vulgare* testiranu na izolatima sa različitih predmeta kulturne baštine (kamen, svila, cigla i papir).

Studije primene etarskih ulja direktno na supstratu su takođe malobrojne. Fierascu i dr. (2014) su izvršili antifungalnu evaluaciju etarskog ulja *Ocimum basilicum* apliciranom direkno na papir zajedno sa sporama vrsta rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Mucor* prethodno izolovanih sa papirnog materijala. S druge strane, Salem i dr. (2016) su demonstrirali antifungalnu aktivnost etarskih ulja *Pinus rigida* i *Eucalyptus camaldulensis* korišćenjem metode fumigacije na drvenom supstratu. Ljaljević Grbić i dr. (2018) su pokazali antifungalni efekat etarskih ulja i smola *Boswellia careteri* i *Commiphora myrrha* a zatim, primenom metoda evaporacije i fumigacije, pokazali njihovu *in situ* aktivnost u

vazduhu crkve iz 17. veka. Pomenuta istraživanja govore u prilog tome da se etarska ulja mogu potencijalno koristiti ne samo u prezervaciji predmeta kultune baštine već i u svrhu dezinfekcije vazduha prostorija u kome se održavaju ili skladište.

2 Predmet istraživanja

2.1 Prostorije za konzervaciju

Ispitivanja su izvršena u prostorijama za restauraciju i konzervaciju umetničkih dela u Beogradu. Aeromikološka analiza je rađena tokom četiri sezone 2014. i 2015. godine: jesen 2014., zima, proleće i leto 2015. Merenja su sprovedena u 20 prostorija različite namene, pre svega u prostorijama za konzervaciju predmeta kulturne baštine, kao i u vazduhu neposredne okoline zgrade, ispred ulaza.

Mesta uzorkovanja:

a) ateljei za konzervaciju predmeta od kamena (I1, I2, I3 i I4), ostava – van upotrebe (I5), hodnik (I6) u prizemlju;

b) depo (I7), ateljei za konzervaciju slika (I8, I9 i I10), ateljei za konzervaciju tekstila (I11, I12), atelje za konzervaciju metalnih predmeta (I13), karantinska soba (I14) i hodnik (I15) na prvom spratu;

c) foto studio (I16) i hodnik (I17) na drugom spratu;

d) atelje za konzervaciju keramike (I18), biblioteka (I19) i hodnik (I20) na trećem spratu;

e) vazduh neposredne okoline objekta (O1, O2).

2.2 Rimska kamena stela

Ispitivana kamena stela pripada rimskoj kolekciji Nacionalnog muzeja u Požarevcu. Objekat je pronađen na arheološkom nalazištu u Kostolcu (44°43’58,4’’N 21°13’49,9’’E) i, prema muzejskoj dokumentaciji, pretpostavlja se da pripada kasnom rimskom periodu (kraj 3. ili početak 4. veka n.e.). Objekat je bio izložen u lapidarijumu ispred muzeja gde je izložen faktorima spoljašnje sredine.

Stela je kuboidnog oblika, dimenzija 66 x 67 x 28 cm. Prednja strana je podeljena na dve niše u kojima su simetrično postavljene figure muškaraca, uklesane u reljefu. Svaka figura nosi dugačak štap koji je blago savijen na donjoj strani. Na reljefu su prisutni tragovi erozije pri čemu su oštećenja zastupljena na levoj strani. Uočljivo je prisustvo biološkog materijala koji je prisutan na prednjoj strani u vršnom delu, iznad niša. Na gornjoj površini niša prisutna je patina crne boje koja menja estetski izgled antičke stele. Ispod enkrustrirane površine vidljiva je disagregacija kamenog materijala a donji deo objekta je prekriven česticama zemlje (Savković i dr., 2016b; Slika 6).

Slika 6. Izgled rimske stele: a) pre i b) nakon konzervacijskog tretmana (Nacionalni muzej u Požarevcu)

3 Ciljevi rada

Na osnovu izloženih polaznih osnova postavljeni su ciljevi rada:

1. uzorkovanje vazduha iz prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine za kvantitativnu i kvalitativnu mikološku analizu;

2. uzorkovanje biofilma sa površine kamene stele za kvalitativnu mikološku analizu;

3. inokulacija na standardne i selektivne mikološke podloge, izolacija i identifikacija izolata;

4. monitoring sezonske distribucije brojnosti fungalnih propagula i taksona u vazduhu prostorija u odnosu na temperaturu i relativnu vlažnost vazduha;

5. formiranje kolekcije izolata gljiva, iz vazduha i sa predmeta, sa ciljem:
    a. testiranja potencijalnih biodeterioracionih sposobnosti odabranih mikromiceta, *in vitro*,
    b. testiranja antifungalne aktivnosti agenasa biološkog porekla i komercijalnih biocida, primenljivih u konzervciji, na autohtone isolate, *in vitro*;

6. analiza najzastupljenijih komponenti agenasa biološkog porekla, *in silico*.

4 Materijal i metode

4.1 Materijal

4.1.1 Hranljive podloge

Za izolaciju aerogenih vrsta gljiva u ispitivanim prostorijama korišćene su neselektivne mikološke podloge malt ekstrakt agar (eng. *malt extract agar*, MEA) i ovseni agar (eng. *oatmeal agar*, OA) i selektivna mikološka podloga (eng. *malt 40% sucrose yeast extract agar*, M40Y). M40Y je izabrana u cilju izolacije potencijalnih kserofilnih, kserotolernatnih, osmofilnih i osmotolerantnih vrsta a OA za izolaciju potencijalnih celulolitičkih vrsta. Za primarnu izolaciju gljiva sa istraživanog predmeta kulturne baštine takođe je korišćena MEA podloga.

U cilju procene biodeterioracione sposobnosti izolata korišćene su specifične mikološke podloge: *minimal Czapek broth* (mCzB) – za detekciju produkcije kiselih i/ili baznih metabolita, *creatin sucrose agar* (CREA) – za detekciju produkcije kiselina, $CaCO_3$ glukozni agar (CCGA) – za detekciju rastvaranja kalcijum karbonata, kazein agar (CN) – za detekciju proteolitičke aktivnosti, *carboxymethyl cellulose agar* (CMC) – za detekciju celulolitičke aktivnosti i B4 i modifikovani B4 – za detekciju produkcije sekundarnih mikogenih minerala. Za detekciju produkcije ekstracelularnih pigemata korišćene su podloge CCGA, OA i *minimal Czapek agar* (mCzA). U svrhu ispitivanja hemolitičke aktivnosti korišćen je krvni agar.

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti korišćene su standardne mikološke podloge MEA i MEB (*malt extract broth*).

MEA

pH 6,5-6,8

ekstrakt slada.....40 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) dodati agar (15 g) i zagrevati uz konstantno mešanje. Nakon što se agar rastvori, dodati ekstrakt slada (40 g) i nastaviti sa zagrevanjem do ključanja (Booth, 1971).

M40Y

pH 6,8-7,2

ekstrakt slada.....20 g
ekstrakt kvasca.....5 g
saharoza.....400 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (600 ml) dodati agar (15 g) i zagrevati uz konstantno mešanje. Nakon što se agar rastvori, dodati ekstrakt slada (20 g), ekstrakt kvasca (5 g) i saharozu (400 g). Dopuniti destilovanom vodom do 1000 ml. Nastaviti sa zagrevanjem do ključanja (Samson i dr., 2004).

OA

pH 5,8-6,2

ovsene pahulje.....30 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanoj vodi (1000 ml) kuvati ovsene pahulje tokom 2 h uz konstantno mešanje. Potom smešu profiltrirati i doliti destilovanu vodu do 1000 ml. U proceđenu podlogu zatim dodati agar (15 g) i zagrevati još 30 min (Samson i dr., 2004).

mCzB

pH 7

$NaNO_3$.....2 g
K_2HPO_4.....1 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$.....0,5 g
KCl.....0,5 g
$FeSO_4 \times 7H_2O$.....0,01 g
glukoza…….....10 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanoj vodi (1000 ml) rastvoriti soli, jednu po jednu, po sledećem redosledu: $NaNO_3$, K_2HPO_4, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KCl, $FeSO_4 \times 7H_2O$. Potom dodati glukozu (10 g) i prokuvati uz konstantno mešanje do ključanja (Borrego i dr., 2010).

CREA

pH 7,8-8,2

kreatin.....3 g
saharoza.....30 g
KCl.....0,5 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$.....0,5 g
$FeSO_4$ x $7H_2O$.....0,01 g
K_2HPO_4 x $3H_2O$.....1,3 g
bromokrezol ljubičasto.....0,05 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanoj vodi (1000 ml) rastvoriti soli, jednu po jednu, po sledećem redosledu: KCl, $MgSO_4$ x $7H_2O$, $FeSO_4$ x $7H_2O$, K_2HPO_4 x $3H_2O$. Potom dodati kreatin (3 g), saharozu (30 g), agar (15 g) i boju bromokrezol ljubičasto (0,05 g). Prokuvati uz konstantno mešanje do ključanja (Samson i dr., 2004).

CCGA

pH 8

$CaCO_3$.....5 g
glukoza.....10 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) rastvoriti $CaCO_3$ (5 g) i potom dodati glukozu (10 g) i agar (15 g). Prokuvati uz konstantno mešanje do ključanja. Nakon sterilizacije podloge u autoklavu, podlogu ohladiti do 45 °C i blagim mešanjem resuspendovati $CaCO_3$. Potom podlogu ostaviti na hladnom mestu dok se ne stegne (Albertano i Urzì, 1999).

Kazein agar (CN)

pH 6,8

NaCl.....5 g
pepton.....5 g
ekstrakt kvasca.....3 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml
obrano mleko.....250 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) rastvoriti NaCl (5 g), potom dodati pepton (5 g), ekstrakt kvasca (3 g) i agar (15 g). Prokuvati uz konstantno mešanje do ključanja. Nakon sterilizacije, 750 ml tople podloge pomešati sa 250 ml obranog mleka, prethodno frakciono sterilisanog u autoklavu (AES-75, Raypa) na 100 °C u trajanju od 30 min (Saran i dr, 2007).

CMC agar

pH 5

urea.....0,3 g
$(NH_4)_2SO_4$.....1,4 g
KH_2PO_4.....2 g
$CaCl_2$.....0,3 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$.....0,3 g
ekstrakt kvasca.....0,25 g
pepton.....0,75 g
$FeSO_4$ x $7H_2O$.....0,005 g
$CoCl_2$.....0,002 g
$MnSO_4$.....0,0016 g
$ZnSO_4$.....0,0014 g
agar.....20 g
natrijumova so karboksimetil celuloze.....10 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) dodati natrijumovu so karboksimetil celuloze (10 g) i zagrevati uz konstantno mešanje dok se u potpunosti ne rastvori. Potom rastvoriti ostale soli, jednu po jednu, po sledećem redosledu $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, $CaCl_2$, $MgSO_4$ x $7H_2O$, $FeSO_4$ x $7H_2O$, $CoCl_2$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$. Nakon toga dodati ureu (0,3 g), ekstrakt kvasca (0,25 g), pepton (0,75 g) i agar (20 g). Nastaviti sa kuvanjem podloge do ključanja (Mandels i Reese, 1957; Liang i dr., 2014).

B4

pH 8

$Ca(CH_3COO)_2$.....10 g
ekstrakt kvasca.....5 g
glukoza…….....5 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) rastvoriti $Ca(CH_3COO)_2$ (10 g). Nakon rastvaranja soli dodati ekstrakt kvasca (5 g), glukozu (5 g) i agar (15 g). Zagrevati podlogu uz konstanto mešanje do ključanja (Bouquet i dr., 1973; Marvasi i dr., 2012b).

Modifikovani B4

pH 8

$CaCO_3$.....10 g
ekstrakt kvasca.....5 g
glukoza…….....5 g
agar.....15 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) rastvoriti $CaCO_3$ (10 g). Nakon rastvaranja soli dodati ekstrakt kvasca (5 g), glukozu (5 g) i agar (15 g). Zagrevati podlogu uz konstanto mešanje do ključanja (Savković i dr., 2016b).

mCzA

pH 5,5

$NaNO_3$.....2 g
K_2HPO_4.....1 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$.....0,5 g
KCl.....0,5 g
$FeSO_4$ x $7H_2O$.....0,01 g
glukoza…….....10 g
agar.....20 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) rastvoriti soli, jednu po jednu, po sledećem redosledu: $NaNO_3$, K_2HPO_4, $MgSO_4$ x $7H_2O$, KCl, $FeSO_4$ x $7H_2O$. Potom dodati glukozu (1 g) i agar (20 g). Podlogu zagrevati uz konstantno mešanje do ključanja (Borrego i dr., 2010).

MEB

pH 6,5 - 6,8

ekstrakt slada.....40 g
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) dodati ekstrakt slada (40 g) i zagrevati uz konstantno mešanje do ključanja (Booth, 1971).

krvni agar

pH 7 - 7,6

$NaNO_3$.....2 g
K_2HPO_4.....1 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$.....0,5 g
KCl.....0,5 g
$FeSO_4$ x $7H_2O$.....0,01 g
saharoza..…….....30 g
agar.....15 g
streptomicin.....0,5 g
defibrinisana krv ovna.....50 ml
destilovana voda.....1000 ml

U destilovanu vodu (1000 ml) rastvoriti soli, jednu po jednu, po sledećem redosledu: $NaNO_3$, K_2HPO_4, $MgSO_4$ x $7H_2O$, KCl, $FeSO_4$ x $7H_2O$. Potom dodati saharozu (30 g), agar (15 g) i streptomicin (0,5 g). Zagrevati uz konstantno mešanje do ključanja. Nakon autoklaviranja, podlogu ohladiti do 45 °C i nakon toga dodati 50 ml defibrinisane krvi ovna. (Bogomolova i Kirtsideli, 2009).

Kiselost podloga je regulisana dodatkom 2M NaOH ili 1M HCl i merena pomoću pH metra (CyberScan pH 510, Eutech). Sve podloge su sterilisane u autoklavu (AES-75, Raypa) na temperaturi od 114°C i pritisku od 0,08 Mpa tokom 15 minuta.

4.1.2 Boje i reagensi

Za pravljenje mikroskopskih preparata korišćena je standardna mikološka boja Lactophenol Cotton Blue (LPCB) sastava:

fenol.....20 g
glicerol.....40 g
destilovana voda.....20 ml
safranin ili metilensko plavo.....50 ml

4.1.3 Suspenzije konidija

Izolati na MEA podlozi, stari 7 dana, su korišćeni za pripremu suspenzije konidija koje su dobijene spiranjem sterilnim fiziološkim rastvorom (NaCl 0,9%, Hemofarm hospital Logica) uz dodatak 0,1% Tween 20 (Sinex Laboratory). Brojanje konidija je vršeno pomoću hemocitometra tamnog polja (Reichert, Warner-Lambert Techonologies, Inc. Buffalo, New York, USA) na površini od 1 mm^2. Za određivanje koncentracije konidija u suspenziji korišćena je formula:

$$\text{Broj konidija/mm}^2 \times \text{razblaženje} \times 10\,000$$

Finalne koncentracije konidija u suspenziji iznosile su između 2×10^7 i $5{,}7 \times 10^7$ konidija ml^{-1} zavisno od izolata. Suspenzije konidija su čuvane na temperaturi od -20 °C do upotrebe. Provera vijabilnosti konidija i akseničnost suspenzije izvršena je inokulacijom na MEA.

4.1.4 Antifungalni agensi

Za testiranje antifungalne aktivnosti na odabrane izolate, korišćeni su:

1. etarsko ulje *Achillea millefolium*,
2. etarsko ulje *Carum carvi* (Simić i dr., 2008; Tabela 3),
3. etarsko ulje *Cinnamomum zeylanicum* (Simić i dr., 2004; Tabela 4),
4. etarsko ulje *Eugenia caryophyllata* (Džamić i dr., 2009; Tabela 5),
5. etarsko ulje *Leptospermum scoparium*,
5. metil salicilat (ulje zimzelena), dominantna komponenta *Gaultheria procumbens*,
6. benzalkonijum hlorid (BAC), aktivna supstanca velikog broja komercijalnih biocida.

Etarska ulja i metil salicilat su nekomercijalni preparati dobijeni iz kolekcije Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka, Biološkog Fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Vodeni rastvor BAC (50% vol/vol) dobijen je od Republičkog zavoda za zaštitu spomenika kulture – Beograd.

Tabela 3. Hemisjki sastav etarskog ulja *Carum carvi* (Simić i dr., 2008)

Komponenta	Udeo (%)	Komponenta	Udeo (%)
p-cimen	0,08	*trans*-dihidrokarvon	0,24
limonen	45,49	izodihidrokarveol	0,38
trans-*p*-menta-2,8-dien-1-ol	0,28	*trans*-karveol	0,48
cis-*p*-menta-2,8-dien-1-ol	0,25	*cis*-karveol	1,11
kamfor	0,06	karvon	46,62
α-terpineol	0,07	perila-aldehid	0,19
dihidrokarveol	0,45	safrol	1,44
cis-dihidrokarvon	1,01	eugenol	0,66

Tabela 4. Hemisjki sastav etarskog ulja *Cinnamomum zeylanicum* (Simić i dr., 2004)

Komponenta	Udeo (%)	Komponenta	Udeo (%)
α-pinen	1,83	timol	0,26
benzaldehid	1,66	cinamil alkohol	0,15
β-mircen	0,35	eugenol	7,09
α-felandren	0,41	α-kopaen	0,09
p-cimen	0,77	α-cedren	0,17
limonen	8,31	*trans*-cinamil acetat	0,32
benzilalkohol	1,00	α-humulen	0,13
linalol	1,22	*trans*-metil izoeugenol	0,10
dihifrocinamil aldehid	0,29	etil estar 2-propenoične kiseline 3(4-metoksifenil)	0,69
cis-cinamaldehid	0,17	eugenilacetat	0,38
***trans*-cinamaldehid**	62,79	cinamaldehid propilen	5,55
safrol	0,42	benzil benzoat	0,63

Tabela 5. Hemisjki sastav etarskog ulja *Eugenia caryophyllata* (Džamić i dr., 2009)

Komponenta	Udeo (%)	Komponenta	Udeo (%)
metil salicilat	0,05	eugenilacetat	0,50
havikol	0,12	kariofilenil alkohol	0,24
eugenol	78,57	kariofilen oksid	0,47
α-kopaen	0,32	viridiflorol	0,20
metil eugenol	0,12	humulen epoksid	0,14
***β*-kariofilen**	15,56	*trans*-seskvilavandulol	0,20
trans- *α*-bergamoten	0,24	aloaromadendren epoksid	0,25
α-humulen	1,88	4-hidroksi-*cis*-kariofilen	0,20
δ-kadinen	0,07	-	-

4.2 Metode

4.2.1 Merenje mikroklimatskih parametara

T (°C) i RH (%) su mereni četiri puta godišnje u svakoj ispitivanoj prostoriji i u neposrednoj okolini zgrade. Za merenje T i RH korišćen je Temperature and Humidity Data Logger with probe (TESTO 635).

Srednje vrednosti T i RH za svaku ispitivanu sezonu su izračunate prema formuli:

$$\bar{X} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} X_i$$

X – T ili RH
$\bar{X}$ – prosečna vrednost parametra (T ili RH) u određenoj sezoni
n – ukupan broj merenja
X_i – konkretna vrednost parametra (T ili RH) iz ukupnog opsega podataka

4.2.2 Uzorkovanje vazduha i određivanje koncentracije spora

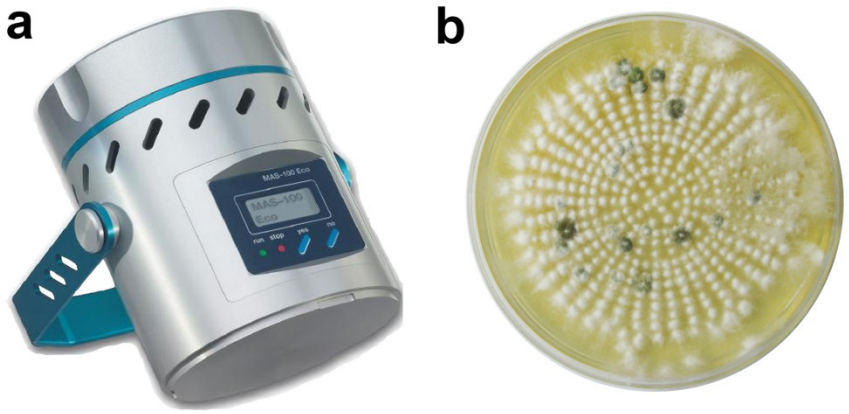
Fungalne propagule su sakupljene metodom volumetrijskog uzorkovanja vazduha. Vazduh (100 L) je usisan pomoću uzorkivača vazduha (MAS-100 Eco Air Sampler) sa protokom vazduha 100 L min^{-1} kroz 400 perforacija prečnika 0,7 mm na tri mikološke podloge: MEA, M40Y i OA (Slika 7). Petri kutije sa inokulisanim podlogama su inkubirane u termostatu (UE 500, Memmert) na 25 °C u tokom 7 dana. Nakon perioda inkubacije, vršeno je brojanje kolonija primarnih izolata (CFU - *colony forming unit*). Dobijene vrednosti su korigovane u očekivanu statističku brojnost prema formuli (Feller, 1950):

$$Pr = N\,[1/N + 1/(N-1) + 1/(N-2) + \ldots + 1/(N-r+1)]$$

Pr – očekivana statistička brojnost propagula,
N – broj otvora na perforianoj glavi uzorkivača vazduha (400),
r – broj formiranih kolonija na medijumu u petri kutiji (Ø 90 mm)

Dobijene vrednosti CFU m^{-3} vazduha za svaku pojedinačnu prostoriju i neposrednu okolinu zgrade (X) su određene množenjem Pr sa faktorom 10, prema formuli:

$$X = Pr \times 1000\ L\ m^{-3}/100\ L$$



Slika 7. a) Korišćeni uzorkivač vazduha; b) izgled mešovite kulture na M40Y

Ukupna koncentracija propagula u vazduhu je izražena kao srednja vrednost sa standardnom greškom, za svaku sezonu uzorkovanja i za svaku podlogu pojedinačno, prema formuli:

$$\bar{X} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} X_i$$

$\bar{X}$ – prosečna vrednost koncentracije spora na određenom medijumu u određenoj sezoni
n – ukupan broj prostorija
X_i – konkretna vrednost izmerene koncentracije spora iz ukupnog opsega podataka

Kao standard za dozvoljene granice koncentracije spora u vazduhu, koristiće se standard propisan od strane „*Ministero per i beni e le attività culturali*" za italijanske biblioteke, (MIBAC, 2001).

Relativna gustina (RG) pojedinačnih fungalnih taksona u vazduhu je izračunata prema formuli (Smith, 1980):

$$\text{RG}\ (\%) = \frac{\text{broj kolonija određene vrste ili roda}}{\text{ukupan broj kolonija}} \times 100$$

Relativna učestalost (RU) pojedinačnih fungalnih taksona je određena prema formuli (Esquivel i dr., 2003):

$$\text{RU (\%)} = \frac{\text{ukupan broj puta određen rod je zabeležen}}{\text{ukupan broj uzorkovanja}} \times 100$$

Na osnovu dobijenih vrednosti RU vršiće se kategorizacija dokumentovanih rodova na pet grupa (Borrego i Perdomo 2016):

a) veoma česti (81 – 100%),
b) učestali (61 – 80%),
c) česti (41 – 60%),
d) povremeni (21 – 40%),
e) retki (0,1 – 20%).

4.2.3 Petrografska analiza kamene stele

Primenjena je nedestruktivna petrografska analiza u cilju identifikacije tipa kamena od kojeg je stela napravljena. Izvršena je *in situ* makroskopska opservacija kamena kako bi se utvrdila boja i tekstura površine i prisustvo makroksopski uočljivih konstituenata kao što su mineralni fragmenti i fosilni ostaci. Relativna tvrdoća kamena je utvrđena grebanjem površine noktom, metalom i staklom. Testirana je i reakcija kamena sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom kako bi se utvrdilo prisustvo mineralnih faza.

4.2.4 Određivanje indeksa deterioracije

U cilju određivanja stepena deterioracije ispitivane kamene stele, izvršena je vizuelna *in situ* opservacija četiri simptoma deterioracije:

a) biopiting,
b) pigmentacija površine,
c) stepen kolonizacije lišajevima i mahovinama i
d) prisustvo micelije.

Intenzitet simptoma deterioracije, evaluran je pomoću skale od strane Piotrowska i dr., (2014):

a) 0 – simptomi deterioracije nisu prisutni,
b) 1 – promene manjeg intenziteta (do 20% ispitivane površine),
c) 2 – promene srednjeg intenziteta (20 – 50% ispitivane površine),
d) 3 – promene većeg intenziteta (preko 50% ispitivane površine).

Indeks deterioracije (ID) je izračunat za svaku ispitivanu površinu stele (prednja, zadnja, vršna, leva i desna) prema jednačini:

$$\mathrm{ID} = \frac{a_1 + a_2 + \ \ldots + \ a_n}{n * \ a_{max}}$$

n – broj ispitivanih simptoma deterioracije (n = 4),
a_1, a_2, ... a_n – procena intenziteta promene na ispitivanoj strani (a_{max} = 3).

Ukupan ID izračunat je kao srednja vrednost svih pojedinačnih indeksa deterioracije za svaku ispitivanu površinu stele.

4.2.5 Optička mikroskopija *in situ*

Biološka kolonizacija stele je detektovana primenom optičke mikroskopije *in situ* na površini kamenog supstrata. Za opservaciju i snimanje je korišćen prenosni digitalni mikroskop ShuttlePix P-400R (Nikon) a analiza dobjenih mikrografija izvršena je pomoću softverskog paketa ShuttlePix Editor v3.4.0.2. *In situ* mikroskopska analiza je ponovljena nakon planiranih restauratorskih postupaka, s ciljem provere efikasnosti korišćenih konzervatorskih i restauratorskih metoda.

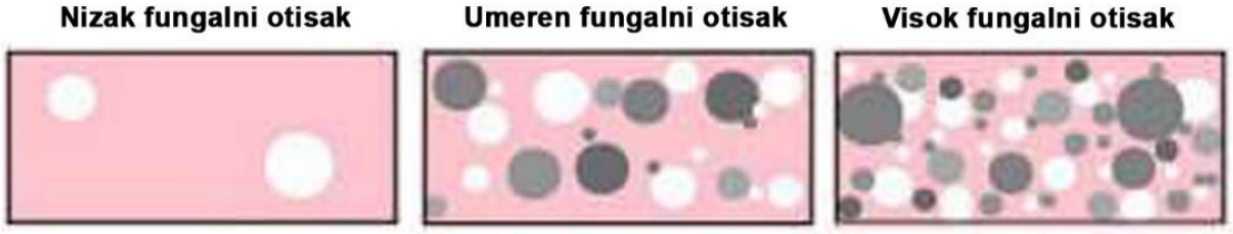
4.2.6 Uzimanje uzoraka sa kamene stele

Uzorkovanje biološkog materijala sa ispitivanog objekta je vršeno metodom adhezivne trake, metodom sterilnih briseva i metodom kontaktnih slajdova (Urzi i de Leo, 2001).

Neinvazivna adhezivna traka je zalepljena na kamenu površinu i potom skinuta ujednačenim pokretom ruke i zalepljena za predmetno mikroskopsko staklo do mikroskopske analize.

Vijabilne fungalne propagule sa površine kamena uzorkovane su sterilnm brisevima i w/TSA/Rose Bengal CAF kontaktnim slajdovima (3M Microbiology). U bris sa uzorkovanim materijalom je dodat u 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora i homogenizovan u aseptičnim uslovima, pomoću vorteksa (ZX3, VELP Scientifica). Homogenat je potom inokulisan na MEA podlogu i inkubiran u termostatu na 25 °C tokom 7 dana.

Kontakni slajdovi koji sadrže *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (RB CAF) su prislonjeni laganim pritiskom na površinu kamena sa vidljivim simptomima deterioracije. Inokulisani slajdovi su inkubirani u termostatu na 25 °C tokom 7 dana. Ovom metodom utvrđuje se stepen kontaminacije, na osnovu brojnosti vijabilnih fungalnih propagula po jedinici površine ispitivanog kamena (10 cm^2). Brojnost fungalnih propagula po jedinici površine („fungalni otisak") je utvrđen po preporuci proizvođača (Slika 8).



Slika 8. Standardizovana šema brojnosti fungalnih kolonija data u uputstvu proizviđača kontaktnih slajdova

4.2.7 Identifikacija mikromiceta

U cilju dobijanja monosporinih kultura, izvršena je reinokulacija primarnih izolata iz vaduha i sa kamene stele na MEA, M40Y, i OA podloge. Nakon 7 dana inkubacije (25 °C) izvršena je identifikacija na osnovu makroskopskih karakteristika kolonija (dijametar, boja, tekstura, prisustvo margine, zonacija, radijalnih brazda, itd.), mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura (tip, izgled i veličina sporonosnih struktura, spora, plodonosnih tela, sklerocija, stroma...) i fizioloških osobina (dinamika rasta kolonije na različitim podlogama, prisustvo/odsustvo i dinamika sporulacije i pigmentacije, prisustvo eksudata, ekstracelularnih pigmenata, način klijanja spora i dr.). Za analizu morfologije

kolonija korišćen je i stereomikroskop Stemi DV4, Carl Zeiss. Izgled kolonija na različitim podlogama je fotografisan nakon čega su pravljeni mikroskopski preparati. Fiksiranje preparata je vršeno glicerolom ili bojom LPCB. Mikroskopske karakteristike reproduktivnih struktura su analizirane svetlosnim mikroskopom Axio Imager M.1 (Zeiss) uz primenu softverskog paketa AxioVision release 4.6 software. Identifikacija je izvršena upotrebom ključeva Ellis i Ellis (1997), Watanabe (2002), Samson i dr. (2010), Bensch i dr. (2012) i Woudenberg i dr. (2013). Identifikacija izolata je potvrđena primenom molekularnih metoda.

4.2.7.1 Molekularna identifikacija aerogenih izolata

Fungalni izolati iz vazduha su reinokulisani na MEA, M40Y i OA podloge i inkubirani na 25±2 °C tokom 7 dana. Nakon perioda inkubacije, 50 mg suve marginalne micelije je sakupljeno pomoću sterilne igle i prebačeno u plastične mikrotube. Izolacija DNK je izvršena pomoću kita za izolaciju DNK (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) prema preporuci proizvođača.

Izvršena je amplifikacija dva genomska regiona: *ITS* i gena za *β-tubulin*. Amplifikacija *ITS* regiona je izvršena pomoću ITS1/ITS4 prajmera a amplifikacija gena za *β-tubulin* pomoću Bt2a/Bt2b prajmera (Tabela 6). PCR smeša (25 µl ukupne zapremine po uzorku) je sadržala: 5 ng DNK, 1 × PCR pufer (20 mM Tris/HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1 µM prajmera, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 mM svakog dNTP-a, 1 U Taq polimeraze. Reakcije umnožavanja DNK su izvršene u PCR mašini Mastercycler personal model (Eppendorf, Hamburg, Germany). Umnožavanje *ITS* genskog regiona je sprovedeno u sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 95 °C (4 min), 35 ciklusa amplifikacije (denaturacija na 95 °C, 30 s; hibridizacija prajmera na 52 °C, 1 min; elongacija na 72 °C, 1 min) i finalna faza elongacije na 72 °C (7 min). S druge strane, uslovi umnožavanja gena za *β-tubulin* su bili: inicijalna denaturacija na 94 °C (4 min), 35 ciklusa amplifikacije (denaturacija na 94 °C, 1min; hibridizacija prajmera na 58 °C, 1min; elongacija na 72 °C, 1 min) i finalna faza elongacije na 72 °C (7min). Umnoženi fragmenti DNK su potom frakcionisani u 1%

agaroznom gelu u 0,5 × TBE puferu. Vizuelizacija je sporovedena bojenjem sa etidijum bromidom i iluminacijom pomoću UV svetla. Produkti PCR reakcije su razdvojeni elektroforezom i prečišćeni upotrebom kita (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, USA). Prečišćeni produkti su uslužno sekvencirani u kompaniji Macrogene (Seoul, Republic of Korea). Dobijene sekvence su upoređene sa drugim srodnim sekvencama u GenBank NCBI bazi sekvenci upotrebom BLAST programa (BLAST+ 2.7.1) u cilju identifikacije. Sekvence su nakon toga deponovane u GenBank NCBI bazu.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni u umnožavanju genomskih regiona fungalnih izolata iz vazduha

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Genomski region	Reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	*ITS1* i *ITS2* + 5,8S rRNK	White i dr. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
BT2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Gen za *β-tubulin*	Glass i Donaldson (1995)
BT2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC		

Filogenetska analiza je sprovedena korišćenjem CLUSTALW programa integrianog u MEGA6 softver (Tamura i dr., 2013). Filogenetsko stablo je konstruisano na osnovu poravnavanja i poređenja DNK sekvenci, korišćenjem Maximum likelihood filogenije primenom 1000 *bootstrap* replikata i *pairwise* delecije. Primenom Model testa u okviru MEGA6 programa, Kimura 2 parametar model je određen kao najbolji model za nukleotidnu supstituciju.

4.2.7.2 Molekularna identifikacija izolata sa kamene stele

Fungalni izolati sa kamene stele su reinokuisani na MEA i inkubirani na 25 ± 2 °C tokom 7 dana. Nakon inkubacije, micelija (70 mg) je sakupljena pomoću sterilne igle, prebačena u plastične mikrotube i suspendovana u sterlinoj destilovanoj vodi (200 µl).

Izolacija DNK je izvršena pomoću kita za izolaciju DNK (ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep KIT) prema preporuci proizvođača (Zymo Research, USA).

Izvršena je amplifikacija četiri regiona genoma lančanom reakcijom polimerizacije: *ITS1* (interni transkribovani region 1), *ITS2* (parcijalna 5,8S rDNK + interni transkribovani region 2 + parcijalna 28S rDNK), gen za *β-tubulin* i elongacioni factor translacije 1-alfa (*EF1-α*). Korišćeni prajmeri i njihovi PCR *profile* su prikazani u Tabeli 7. PCR procedura

Tabela 7. Prajmeri korišćeni u amplifikaciji genomskih regiona fungalnih izolata sa stele

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Genomski region	Reference
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	*ITS1* i *ITS2* + 5,8S rRNK	White i dr. (1990)
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS3-F	GCATCGATGAAGAACGCAGC	parcijalna 5.8S + *ITS 2* + parcijalna 28S	White i dr. (1990)
TW13-R	GGTCCGTGTTTCAAGACG		
EF3E-F	GTCGTYATCGGCCACGTCGA	*EF1-α*	Lim i dr. (2004)
TEF1-rev-R	GCCATCCTTGGAGATACCAGC		Samuels i dr. (2002)
T1-F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	*β-tubulin* gen	O'Donnell i Cigelnik (1997)
BT12-R	GTTGTCAATGCAGAAGGTCTCG		Kim i dr. (2003)
BT12-internal R	CCTCMGTGTAGTGMCCCTTG		Roe i dr. (2010)

za sve amplifikovane genske regione je izvršena prema protokolu koji su predložili Six i dr. (2011). PCR smeša (25 µl ukupne zapremine po uzorku) se sastojala od 17,4 µl (za amplifikaciju *ITS* regiona) i 19,4 µl (za amplifikaciju *EF1-α* i *β-tubulin* regiona), ultra-čiste vode, slobodne od DNaze i RNaze (Gibco, UK), 2,5 µl 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems, USA), 0,25 µl dNTP-a (10 mM) (KAPA Biosystems, USA), 0,25 µl svakog prajmera (10 µM), 1,5 µl ekstrakta DNK i 0,1 µl (5U/µl) KAPA Taq DNK polimeraze (KAPA Biosystems, USA). Za amplifikaciju *ITS* regiona, dodato je 0,5µl 25 mM $MgCl_2$, odnosno 2,5 µl 25 mM $MgCl_2$) za amplifikaciju *EF1-α* i regiona za *β-tubulin*. PCR je sproveden u sledećim uslovima: jedan ciklus denaturacije na 94°C (4 min), potom 30 ciklusa amplifikacije (denaturacija na 94 °C, 30 s; hibridizacija na 55 °C, 50 s; elongacija na 72 °C, 50 s) i jedan finalni ciklus elongacije na 72 °C (10 min). Produkti PCR reakcije

su prečišćeni upotrebom kita QIAquick PCR Purification KIT/250 prema uputstvu proizvožača (Qiagen, Germany). Prečišćeni produkti PCR reakcije su uslužno sekvencirani u kompaniji Macrogen (Netherlands). Sekvenciranje produkata je izvršeno jednosmerno, radi jednostavnijeg prikupljanja podataka. Pretraga sekvenci je izvršena BLAST metodom u GenBank NCBI bazi sekvenci, radi utvrđivanja homologije sa postojećim sekvencama. Pozicije nukleotida u hromatogramima su proverene ručnim poravnanjem.

Svi izolati su deponovani u kolekciji kultura Instituta za botaniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (BEOFB) i čuvaju se u 30% rastvoru glicerola na -80°C.

4.2.8 *In vitro* testovi biodeterioracije

Primenom različitih *in vitro* testova analiziran je potencijal fungalnih izolata da vrše biodegradaciju različitih jedinjenja produkcijom ekstracelularnih enzima, njihovu sposobnost produkcije kiselina, pigmenata, sposobnost formiranja sekundarnih mikogenih minerala kao i hemolitičku sposobnost. Izvršeno je testiranje odabranih izolata iz vazduha prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine. Rezultati biodeterioracione sposobnosti aerogenih izolata su prikazani pomoću Venovog dijagrama, korišćenjem online programa „InteractiVenn" (Heberle i dr., 2015). Nakon toga, izvršeno je testiranje 5 odabranih autohtonih izolata sa kamene stele na rastvaranje kalcijum karbonata kao i produkciju kiselina/baza, ekstracelularnih pigmenata, proteaza i sekundarnih mikogenih minerala. Ispitivanje produkcije celulolitičkih enzima i sposobnost hemolize nisu izvršeni za fungalne izolate sa kamene stele s obzirom da metodologija ovih testova nije prikladna za ispitivanje porcesa biodeterioracije kamena.

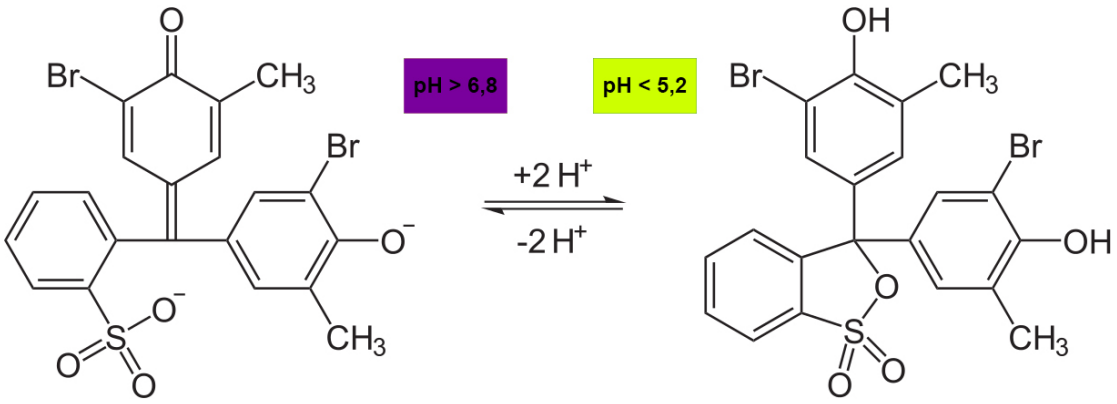
4.2.8.1 Testovi produkcije kiselih i baznih metabolita

Produkcija kiselih/baznih metabolita je testirana kultivacijom izolata u tečnoj i na čvrstoj podlozi. U svrhu određivanja kvantitativne produkcije kiselih/baznih metabolita,

izvršena je inokulacija izolata u erlenmajere sa 100 ml mCzB podloge (Slika 9) koji su inkubirani na šejkeru (Titramax 1000, Heidolph, 300 opm, 25 °C, 72 h) (Borrego i dr., 2010). Nakon perioda inkubacije, izmerena je pH vrednost tečnog medijuma pomoću pH metra (CyberScan pH 510, SUPER Laboratory). Kvalitativna produkcija kiselih metabolita

Slika 9. Kultivacija izolata u tečnoj podlozi na šejkeru

je izvršena inokulacijom izolata na CREA medijum koji sadrži pH indikator bromokrezol ljubičasto (5',5''-dibromo-*o*-krezolsulfoftalein, Slika 10). Produkcija kiselina je određena nakon 7 dana inkubacije na 25 °C, a pozitivna reakcija se manifestuje pojavom žuto obojene zone oko kolonija na ljubičasto obojenoj podlozi (promena boje se dešava na pH ispod 5,2). Izolati iz vazduha su testirani primenom i kvantitativne i kvalitativne metode a izolati sa kamene stele su testirani samo kvantitativnom metodom.



Slika 10. Ekvilibrijum redukovane i oksidovane forme indikatora bromokrezol ljubičasto

4.2.8.2 Test rastvaranja kalcijum karbonata

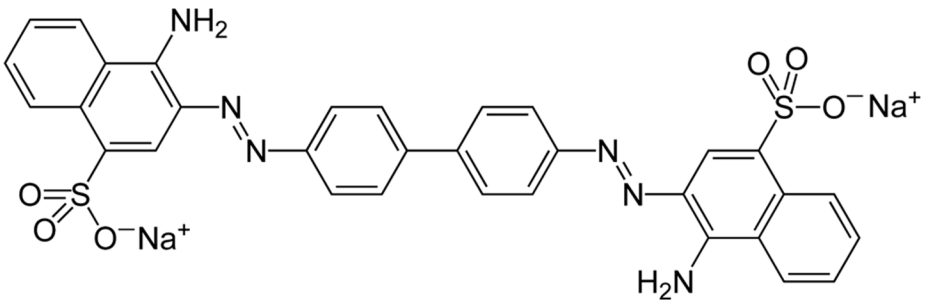
Rastvaranje karbonata je izvršeno kvalitativnom metodom prema Albertano i Urzi (1999). Ispitivani izolati su inokulisani na CCGA i inkubirani na 25 °C, tokom 14 dana. Nakon perioda inkubacije, posmatrano je formiranje transparentne zone rastvaranja kalcijum karbonata.

4.2.8.3 Testovi produkcije ekstracelularnih pigmenata

Testiranje produkcije ekstracelularnih pigmenata je izvršeno kvalitativnom metodom. Izolati su inokulisani na OA, mCzA i CCGA. Nakon 7 dana inkubacije na 25 °C, produkcija pigmenata je vidljiva kao promena boje agarizovanog medijuma (Borrego i dr., 2010; Savković i dr., 2019). Sposobnost produkcije pigmenata izolata sa kamene stele je određena samo kultivacijom na mCzA s obzirom da se radi o minimalnoj mikološkoj podlozi i o gljivama koje su izolovane sa supstrata siromašnog nutrijentima.

4.2.8.4 Test produkcije celulaza

U cilju određivanja *in vitro* celulolitičke aktivnosti, izolati su inokulisani na CMC agar. Nakon 7 dana inkubacije na 25 °C, fungalne kolonije su prelivene sa 0,1% rastvorom boje Kongo crveno (Slika 11). Nakon 15 minuta vršeno je obezbojavanje sa 1 M rastvorom NaCl. Pojava žuto obojene zone oko kolonija predstavlja indikaciju produkcije celulaza (Teather and Wood, 1982).



Slika 11. Strukturna formula boje Kongo crveno

4.2.8.5 Test produkcije proteaza

Produkcija proteaza je izvršena kvalitativnom metodom. Izolati su inokulisani na CN podlogu i inkubirani na 25 °C tokom 7 dana. Nakon perioda inkubacije, kolonije su prelivene sa 5 ml 10% rastvora taninske kiseline kako bi se olakšala vizuelizacija zone hidrolize kazeina (Saran i dr., 2007).

4.2.8.6 Testovi formiranja sekundarnih mikogenih minerala

Testiranje sposobnosti izolata da formiraju sekundarne mikogene minerale je izvršeno kvalitativnom metodom. Izolati su inokulisani na B4 podlogu i inkubirani na 25 °C tokom 7 dana. Dodatno, izolati sa kamene stele su inokulisani na modifikovanu B4

podlogu i inkubirani u istim uslovima. Nakon perioda inkubacije, pravljeni su mikroskopski preparati od fragmenata medijuma sa micelijom i fiksirani glicerolom. Formirani mikogeni minerali su detektovani i analizirani primenom optičke mikroskopije. U cilju određivanja morfologije kao i hemijskog sastava kristala primenjena je skening elektronska mikroskopija sa energetsko-disperzivnom spektroskopijom X zraka (SEM-EDS) i rendgenska difrakcija praha (XRPD) (poglavlje 4.2.9).

4.2.8.7 Test hemolitičke aktivnosti i sposobnost rasta na 37 °C

Testiranje hemolitičke aktivnosti izolata je izvršeno kvalitativnom metodom. Izolati su reinokulisani na krvni agar i inkubirani na 25 °C tokom 14 dana. Nakon perioda inkubacije, posmatrano je formiranje zona hemolize oko formiranih kolonija (Buxton, 2005):

α-hemoliza (delimična hemoliza) – pojava zone zelene ili braon boje oko formirane kolonije,

β-hemoliza (potpuna hemoliza) – pojava transparentne zone oko formirane kolonije i

γ-hemoliza (odsustvo hemolize) – pozitivan rast bez formiranja zone oko kolonije.

Sposobnost rasta na 37 °C je testirana reinokulacijom izolata na krvni agar i inkubacijom na 37 °C tokom 7 dana. Nakon perioda inkubacije, dokumentovan je porast kolonija pozitivnih izolata.

4.2.9 SEM-EDS i XRPD

4.2.9.1 SEM-EDS

Morfologija i hemijski sastav sekundarnih mikogenih minerala su analizirani pomoću SEM-EDS. Analizirani su odabrani izolati iz vazduha prostorija za konzervaciju objekata kultune baštine i izolata sa kamene stele. Fragmenti B4 podloge obrasli micelijom

su osušeni na sobnoj temperaturi i prebačeni na aluminijumske cilindre nakon čega su prekriveni slojem zlata primenom uređaja BALTEC-SCD-005. Analiza je izvršena skening elektronskim mikroskopom JSM-6610LV povezanog sa X-Max energetsko-disperzivnim spektrometrom (Oxford Instruments). Snimanje je izvršeno u visokom vakuumu u sledećim uslovima: napon ubrzanja 15 kV, snop struje 20 nA, veličina tačke 1 mm. Hemijske analize su izvršene upotrebom standarda. Granica detekcije za većinu ispitivanih elemenata je bila 0,1%. S obzirom na to da uzorci nisu bili polirani, analiza hemijskog sastava kristala se smatra semi-kvantitativnom.

4.2.9.2 XRPD

XRPD je primenjena na uzorcima izolata sa kamene stele. Uzorci u formi praha su pripremljeni odrstanjivanjem vazdušne micelije sa fragmenata B4 medijuma nakon čega je 5 g podloge osušeno na 70 °C tokom 24 h i usitnjeno. Fazni sastav praha određen je rendgenskim difraktometrom PW-1710 (Philips). Difraktogrami su dobijeni od 5 do 50°, 2Θ, korišćenjem CuKα1,2 zračenja sa skeniranjem od 0,03°, 2Θ i 0,95 s između svakog koraka.

SEM-EDS i XRPD analize su izvršene u laboratorijama Rudarsko-geološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

4.2.10 Analiza sastava etarskih ulja

Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja *Achillea millefolium* i *Leptospermum scoparium* urađeno je na Instutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić" u Beogradu. Kvantitativna i kvalitativna analiza dobijenih etarskih ulja izvršena je kombinacijom metoda gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije sa spektrometrijom masa (GC/MS).

Analiza etarskih ulja je izvršena korišćenjem plameno-jonizujućeg (FID) i maseno-spektrometrijskog detektora (MSD). GC analiza etarskih ulja je urađena pomoću GC HP-

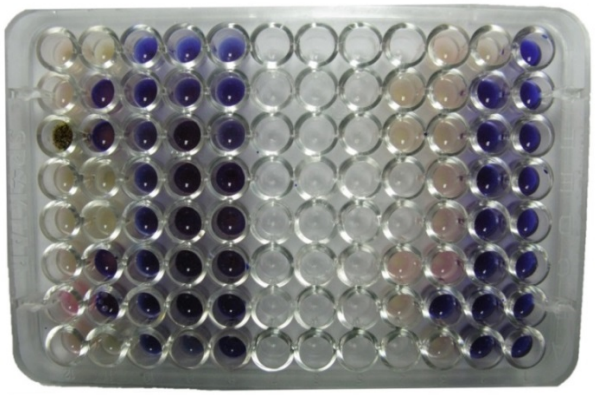
5890 II gasnohromatografskog aparata, opremljenog split-splitless injektorom, HP-5 kolonom (25 m × 0,32 mm, debljina filma 0,52 μm, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) i povezan sa FID-om. Protok nosećeg gasa (H_2) je bio 1 ml min^{-1}, split mod 1:30, temperatura injektora 250 °C i temperatura detektora 300 °C, dok je temperatura kolone programirano linearno povećavana od 40 do 280 °C (brzina 4 °C/min).

GC-MS je urađena u istim analitičkim uslovima i korišćenjem aparata HP G1800 C Series II GCD opremljen sa HP-5MS kolonom (30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Transfer linija je zagrejana na 260 °C a maseni spektri su snimani u EI modu (70 eV, m/z opseg 40-300). Identifikacija jedinjenja je izvršena poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima iz Wiley 275 i NIST/NBS biblioteke koristeći različite pretraživače. Vrednosti retencionih indeksa su određeni upotrebom kalibrisanog softvera Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS ver. 2.1., National Institute of Standards and Technology - NIST, Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD, USA) i u svrhu potvrde MS nalaza poređeni sa onima iz dostupne literature (Adams, 2007).

4.2.11 Testiranje antifungalne aktivnosti

Za ispitivanja antifungalne aktivnosti odabranih biocida *in vitro*, primenjene su 3 metode: mikrodiluciona metoda, agar diluciona metoda i metoda mikroatmosfere. Korišćene su suspenzije spora autohtonih izolata *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta: *A. flavus* (BEOFB315m), *A. melleus* (BEOFB3180m), *A. niger* (BEOFB345m), *A. sydowii* (BEOFB3142m), *P. brevicompactum* (BEOFB1102m), *P. canescens* (BEOFB11180m), *P. carneum* (BEOFB11150m) i *P. citrinum* (BEOFB11110m). Za utvrđivanje potencijalnog mehanizma dejstva odabranih bocida, primenjena je *in silico* metoda molekularnog dokinga.

Mikrodilucionom metodom (Hanel i Raether, 1988) ispitivana je antifungalana aktivnost etarskih ulja, metil salicilata i benzalkonijum hlorida (BAC). Testirane koncentracije ispitivanih supstanci su bile u opsegu od 0,1 do 10,0 mg ml^{-1}. Pre upotrebe, decimalana razblaženja etarskih ulja (1:10 i 1:100) su tretirana u ultrazvučnom kupatilu (Sonic 4GT, VIMS elektrik) tokom 10 min na sobnoj temperaturi. Određene zapremine svake testirane supstance su dodavane u bunarčiće mikrotitracione ploče (96 *well-plate*) sa odgovarujćim zapreminama MEB podloge i 10 µl inokuluma. Kao negativna kontrola korišćen je bunarčić sa 90 µl podloge i 10 µl inokuluma. Eksperiment je urađen u triplikatu. Mikrotitracione ploče su inkubirane na 25 °C u trajanju od 72 h. Nakon perioda inkubacije dodato je 10 µl redoks indikatora resazurina radi utvrđivanja prisustva ili odsustva respiracije u sadržaju svakog bunarčića (Slika 12). Takođe je izvršena i opservacija sadržaja svakog bunarčića pomoću stereo-mikroskopa (Stemi DV4, Carl Zeiss) u cilju verifikacije prisustva/odsustva fungalnih struktura. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je utvrđena kao najniža koncentracija pri kojoj nije uočen porast mikromicete u



Slika 12. Mikrotitraciona ploča ispunjena etarskim uljem, tečnom podlogom, inokulumom i redoks indikatorom resazurinom

bunarčiću mikrotitracione ploče. Utvrđivanje minimalne fungicidne koncentracije (MFK) je izvršeno pipetiranjem 10 µl sadržaja iz bunarčića bez vidljivog rasta u novi bunarčić sa MEB u aseptičnim uslovima. Podloge su ponovo inkubirane na 25 °C u trajanju od 72 h

nakon čega je izvršena opservacija porasta mikromicete u inokulisanoj podlozi. MFK je najmanja testirana koncentracija antifungalne supstance pri kojoj nema rasta mikromicete ni nakon reinokuacije u podlogu (MEB) bez dodate antifungalne supstance.

U cilju određivanja antifungalnog potencijala testiranih biocida, osmišljena je i primenjena formula:

$$\text{IA} = \frac{2n_a + n_b}{4n_i}$$

IA – indeks antifungalne aktivnosti testiranog biocida,
n_a – broj zabeleženih MIK i MFK vrednosti opsega 0,1 - 1 mgml^{-1},
n_b – broj zabeleženih MIK i MFK vrednosti opsega 1,01 - 10 mgml^{-1},
n_i – broj testiranih izolata.

Na osnovu dobijenih IA vrednosti, antifungalni potencijal testiranih biocida je okarakterisan prema skali:

a) slab (0,00 – 0,25),
b) srednji (0,25 – 0,50),
c) jak (0,50 – 0,75),
d) veoma jak (0,75 – 1,00).

4.2.11.2 Metoda aromatične komore

Antifungalna aktivnost metil salicilata i etarskih uja *A. millefolium* i *E. caryophyllata* je ispitana metodom aromatične komore po modifikovanom protokolu Maruzzella i Sicurella (1960). Eksperiment je izvršen u pločama (eng. 6 *well plate*) koje sarže MEA (10 ml). Fragment micelije svakog ispitivanog izolata je inokulisan, u aseptičnim uslovima, na centralni deo podloge, nakon čega su inokulisane ploče obrnute. Potom su komadići sterilnog filter papira postavljeni na unutrašnju stranu poklopca ploče i na njih je ispipetirana testirana količina ispitivanog etarskog ulja. Koncentracije su bile u opsegu od 0,062 do 1,000 mg ml^{-1} (masa etarskog ulja/volumen vazduha bunarčića). Ploče su zatvorene parafilmom i inkubirane na 25 °C tokom 72 h. Nakon perioda inkubacije, izmereni su dijametri kolonija formiranih rastom u mikroatmosferi zasćenoj etarskim uljem

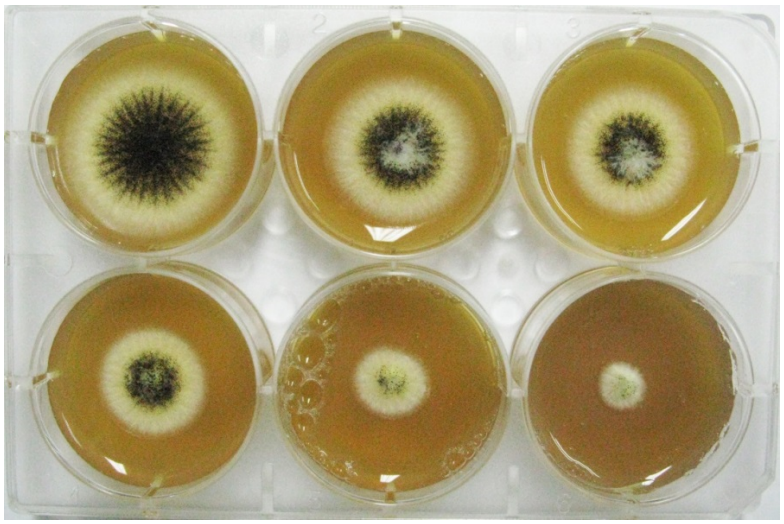
i upoređeni sa dijametrom kontrolne kolonije (bez etarskog ulja). Inhibicija rasta kolonije (IR) je izračunata po formuli (Shahi i Patra, 2003):

$$\mathrm{IR} = 1 - \frac{\text{dijametar kolonije pri testiranoj koncentraciji etarskog ulja}}{\text{dijametar kontrolne kolonije}} * 100\%$$

Pored uticaja na dinamiku rasta kolonije, izvršeno je dokumentovanje i drugih morfofizioloških promena: intenzitet sporulacije i depigmentacije reproduktivnih struktura.

4.2.11.3 Agar-diluciona (makrodiluciona) metoda

Antifungalna aktivnost benzalkonijum hlorida (BAC) je izvršena agar-dilucionom metodom prema modifikovanom protoklu koji je predložio Ishii (1995). Eksperiment je izvršen u pločama (eng. *6 well plate*) sa MEA podlogom (10 ml) u koje su dodate ispitivane zapremine biocida (Slika 13). Testirane koncentracije su bile u opsegu od 0,062 do 1,000 mg ml^{-1}. Komadić micelije svakog ispitivanog izolata je inokulisan, u aseptičnim uslovima,



Slika 13. Izged ploče (eng. *6 well plate*) sa MEA podlogom i različitim koncentracijama benzalkonijum hlorida sa inokulisane sa *Aspergillus niger*

na centralni deo podloge i inkubiran na 25 °C tokom 72 h. Nakon perioda inkubacije, izmereni su dijametri kolonija formiranih na medijumu obogaćenom biocidom i upoređeni

sa dijametrom kontrolne kolonije, bez biocida. Inhibicija rasta kolonije (IR) je izračunata prema formuli (Shahi i Patra, 2003):

$$\mathrm{IR} = 1 - \frac{\text{dijametar kolonije na medijumu obogaćenom biocidom}}{\text{dijametar kontrolne kolonije}} * 100\%$$

Pored uticaja na dinamiku rasta kolonije, izvršeno je dokumentovanje i drugih morfofizioloških promena: intenzitet sporulacije i depigmentacije reproduktivnih struktura.

4.2.11.4 Molekularni doking

Molekularni doking je *in silico* ispitivanje interakcije između komponenata etarskog ulja i odabranog fungalnog enzima. 3D strukture ispitivanih jedinjenja su konstruisane pomoću softvera Marvin 6.1.0, 2013, ChemAxon. Za optimizaciju 3D geometrijske slike korišćeno je MMFF94 polje sila. Kao model za ispitivanje interakcije korišćena je struktura enzima 14-alfa demetilaze (CYP51) *Candida albicans* (PDB kod 5TZ1). Cilj ove metode jeste da se utvrdi adekvatan geometrjski oblik i pozicija odabranog jedinjenja etarskog ulja (liganda) unutar aktivnog mesta enzima (receptora). Ovom metodom je moguće izvršiti proračun ligand-receptor energije vezivanja sa primenom skoring funkcija (eng. *scoring function*). U svrhu ispitivanja dokinga kompleksnih strukutura unutar grubog modela DNK, za dodatnu identifikaciju vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija kao i za izračunavanje relevantnih energija veze korišćen je Molegro Virtual Docker (MVD v. 2013.6.0.1.) softver.

Aktivno mesto vezivanja je izračunato sa rezolucijom koordinatne mreže od 0,3 Å. MolDock SE je korišćen kao algoritam pretrage, sa brojem koraka podešenim na 100. Odabrani parametri doking procedure su: veličina populacije -50, maksimalni broj ponavljanja -1500, energetski prag -100,00 i maksimalni broj koraka -300. Najveći broj iteracija je postavljen na 10. Procena DNK-ligand interakcija je opisana primenom MVD-povezanih skoring funkcija: *Cofactor (VdW)*, *Cofactor (hbond)*, *E-Inter (cofactor-ligand)*, *E-Inter (protein - ligand)*, *E-Inter total*, *Energy*, *HBond*, *Moldock Score*, *Rerank Score*, *Steric* i *VdW*.

Upotrebom skoring funkcija definisane su interakcije putem izračunavanja adekvatnih energija veze: CYP51 sadrži kofaktor (hem) i energije interakcija između kofaktora i proučavanih jedinjenja su predstavljene sa *Cofactor (VdW)*, *Cofactor (hbond)* i *E-Inter (cofactor-ligand)* skoring funkcijama. *Cofactor (VdW)* predstavlja energiju Van der Valsovih interakcija između ispitivanog molekula i kofaktora, dok *Cofactor (hbond)* predstavlja energije vodoničnih veza između ispitivanog molekula i kofaktora. *E-Inter (cofactor-ligand)* označava energije drugih interakcija uključujući formiranje kompleksnih veza. *E-Inter total* označava ukupnu energiju određene konformacije dok *E-Inter (protein-ligand)* predstavlja energiju potrebnu za interakciju između liganda i enzima. Vodonične veze su izračunate pomoću *HBond*, Vand der Valsove interakcije sa *WdW* skoring funkcijom dok su druge sterne interakcije izračunate sa sternim skoring funkcijama. Energija svih interakcija je predstavljena *Moldock Score* i *Rerank Score* skoring funkcijom. Ligand je postavljen u koordinatnu mrežu pomoću MolDock Optimizer algoritma i njegove interakcije su praćene upotrebom detaljnih procena energije. Parametri maksimalne populcaije (100) i maksimalnog broja ponavljanja (10.000) su upotrebljeni za svaki korak i dobijeno je 5 optimalnih konformacija. Vizuelizacija konformacije sa najnižom energijom je dobijena primenom CHIMERA (http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/) programa za konstruisanje molekularnih grafika.

4.2.12 Statističke analize

Obrada podataka za izračunavanje srednje vrednosti mikroklimatskih parametara i koncentracije propagula u vazduhu kao i RU, RG, ID, IA i IR indeksa je izvršena upotrebom programa Microsoft Exel 2010.

Za analizu dobijenih podataka distribucije propagula gljiva u vazduhu ispitivanih prostorija korišćena je kanonijska korespodentna analiza (*Canonical Correspondence Analysis* – CCA). Baza koja je uneta u program obuhvatala je podatke o taksonima gljiva koji su predstavljeni brojem izolata svakog dokumentovanog taksona. Ukupno su urađene tri CCA analize, u zavisnosti od toga koje su eksplanatorne (glavne) i suplementarne

(dodatne) varijable korišćene. Ova unimodalna metoda korišćena je iz razloga što je dužina gradijenta kod svih analiza iznosila 3,3 SD jedinice.

Prvom CCA analizom prikazan je odnos između zabeleženih taksona gljiva i tipa podloge na kojoj su taksoni izolovani (MEA, M40Y i OA), gde je varijabla koja se odnosi na tip podloge korišćena kao eksplanatorna. Drugom CCA analizom ispitivan je odnos između taksona gljiva i sezone u kojoj su dokumentovani (proleće, leto, jesen i zima). Kao u slučaju podloga, i u ovoj analizi je varijabla koja se odnosi na sezone korišćena kao eksplanatorna. Treća CCA analiza je sa jedne strane predstavila taksone gljiva u odnosu na T i RH koje su korišćene kao eksplanatorne varijable, dok su ukupna koncentracija propagula u vazduhu određene prostorije (CFU m^{-3}), kao i šifra prostorija (namena i pozicija) u kojima je uzorkovanje vršeno (I1 – I20) korišćene kao suplementarne. Rezultati ove analize prikazani su sa dva dijagrama, tako da se na prvom zapaža potencijalni efekat T i RH na zastupljenost taksona i CFU m^{-3}, a na drugom, odnos svih eksplanatornih i suplementarnih varijabli sa akcentom na prostorije u kojima je uzorkovanje vršeno. Pošto su oba dijagrama izvedena iz iste CCA analize, kombinacijom prvog i drugog dijagrama je predstavljena i distribucija taksona u odnosu na prostorije u kojima je vršeno uzorkovanje.

5 Rezultati

5.1 Mikroklimatski parametri

Izmerene vrednosti temperature ispitivanih prostorija tokom perioda uzorkovanja su bile u opsegu: 13,7 – 28,2°C (jesen), 14,3 – 26,8°C (zima), 22,7 – 28,7 °C (proleće) i 23,2 – 29,2 °C (leto). Vrednosti temperature vazduha neposredne okoline zgrade su bile: 4,2 – 10,1 °C (jesen), 14,6 – 16,1 °C (zima), 24,8 – 28,6 °C (proleće) i 29,8 – 30,5 °C (leto) (Slika 14). Najviša srednja vrednost temperature ispitivanih prostorija je zabeležena tokom leta (26,21 ± 0,40 °C) a najniža tokom jesenjeg perioda (22,44 ± 0.88 °C). Isti trend je zabeležen i u vazduhu neposredne okoline (leto 30,15 ± 0,35 °C; jesen 7,15 ± 2,95 °C) (Slika 15).

Dobijene vrednosti RH ispitivanih prostorija su bile u opsegu: 25,1 – 54,8% (jesen), 19,3 – 43,5% (zima), 42,2 – 70,2 % (proleće) i 24,7 – 89,2% (leto). Vrednosti relativne vlažnosti vazduha neposredne okoline su bile: 75,5 – 86,5% (jesen), 33,7 – 42,4% (zima), 42,7 – 51,7 (proleće) i 36,6 – 46,9% (leto) (Slika 14). Najviša srednja vrednost RH ispitivanih prostorija je zabeležena u proleće (54,92 ± 1,53%) a najniža u zimskom periodu (33,04 ± 2,47%). S druge strane, najviša srednja RH vrednost je u vazduhu neposredne okoline zabeležena u jesenjem periodu (81 ± 5,5%), a najniža takođe u zimskom (38,05 ± 4,35%) (Slika 15).

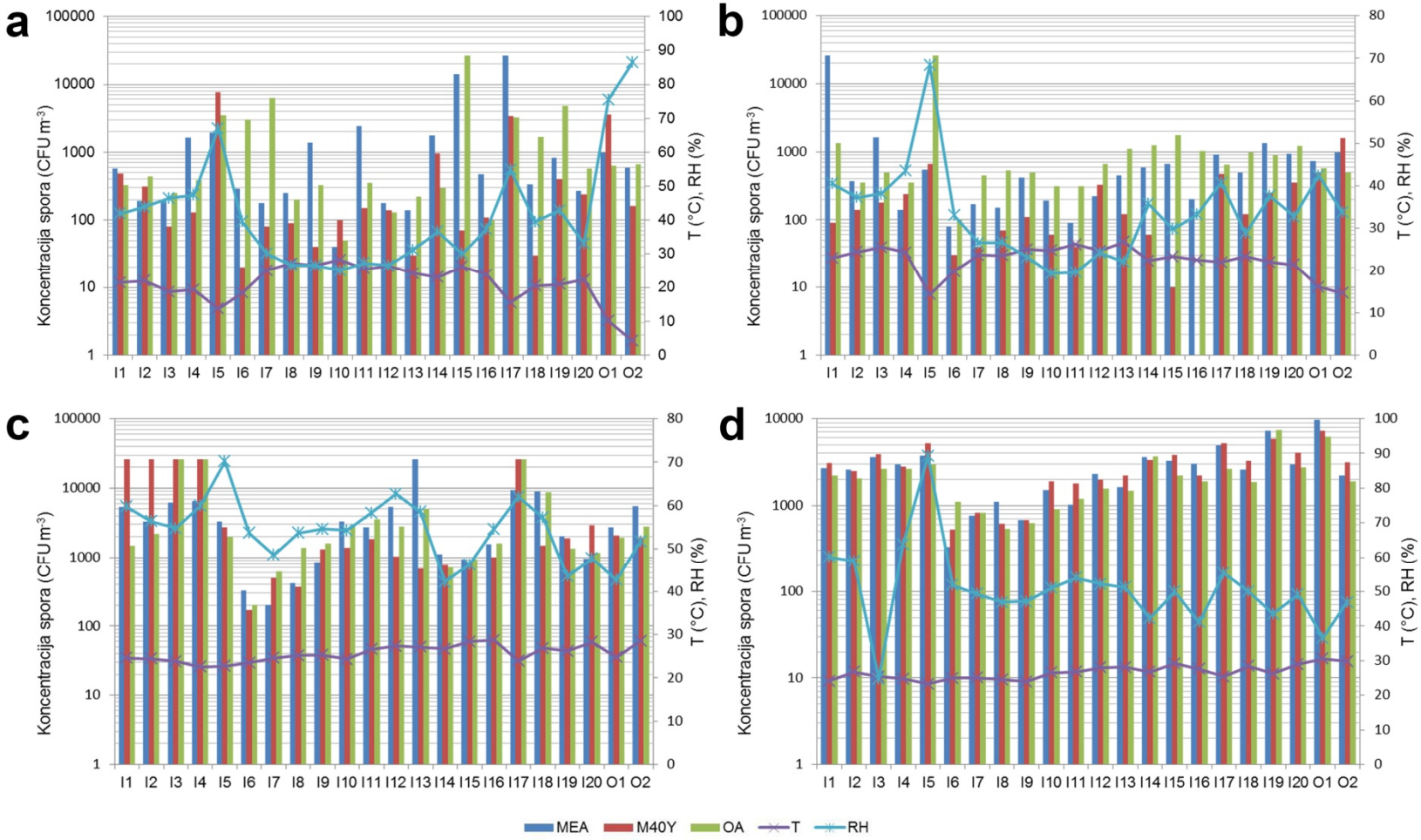
Uočeno je da su u svim sezonama najviše RH vrednosti zabeležene u prostorijama I5 i I17. S druge strane, vrednosti T su u ovim prostorijama bile relativno niže u odnosu na ostale.

5.2 Diverzitet i distribucija mikromiceta u vazduhu

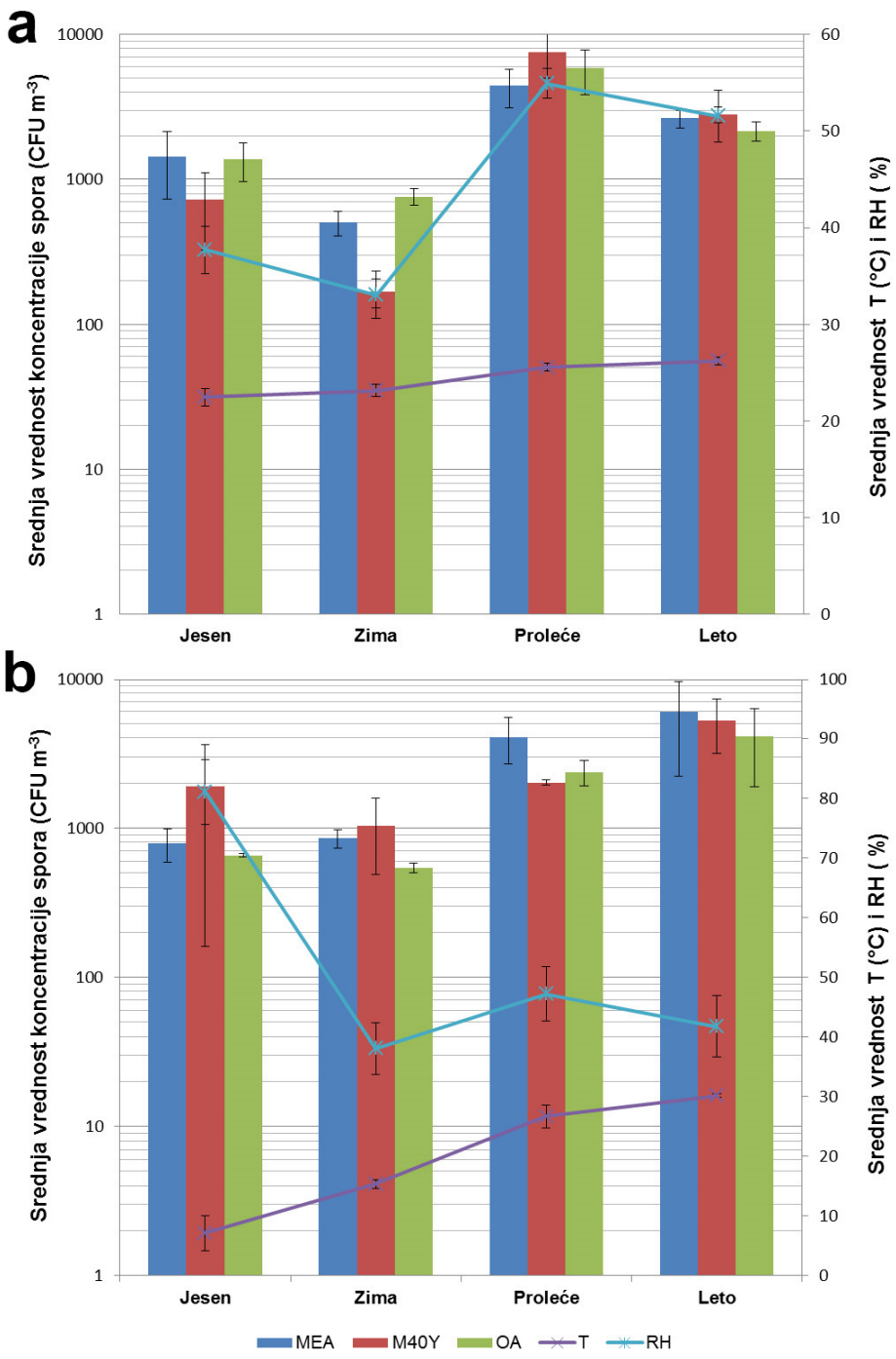
Dokumentovane vrednosti koncentracije vijabilnih propagula su bile u opsegu: 20 – 26.280 CFU m^{-3} (jesen), 0 – 26.280 CFU m^{-3} (zima), 170 – 26.280 CFU m^{-3} (proleće) i 530 – 5820 CFU m^{-3} (leto). U vazduhu neposredne okoline, zabeležene vrednosti su bile: 160 – 3610 CFU m^{-3} (jesen), 490 – 1580 CFU m^{-3} (zima), 1910 – 5450 CFU m^{-3} (proleće) i 1890 – 9690 CFU m^{-3} (leto) (Slika 14). Maksimalne koncentracije spora (> 25.000 CFU m^{-3}) su izmerene u 6 prostorija tokom prolećnog perioda uzorkovanja, u 2 prostorije tokom zimskog i u jednoj prostoriji tokom jesenjeg perioda (I1 – I6, I14 i I18). Dozvoljene vrednosti prema italijanskom standardu za biblioteke (MIBAC, 2001), veće od 150 CFU m^{-3}, su izmerene u većini prostorija tokom zimskog, jesenjeg i prolećnog perioda dok su iste zabeležene u svim prostorijama tokom letnjeg perioda. Najviša srednja vrednost koncentracije spora u vazduhu ispitvanih prostorija je zabeležena na M40Y tokom prolećnog perioda (7153 ± 2490 CFU m^{-3}), odnosno na MEA tokom letnjeg perioda u vazduhu neposredne okoline (5960 CFU m^{-3}) (Slika 15). S druge strane, najniže srednje vrednosti brojnosti vijabilnih spora u vazduhu su izmerene tokom zimskog perioda (168,5 ± 38,30 CFU m^{-3} u vazduhu prostorija na M40Y i 540 CFU m^{-3} u vazduhu neposredne okoline na OA) (Slika 15).

U uzorcima je identifikovano ukupno 74 vrste gljiva, pripadnika 23 roda (Tabela 8). Najzastupljenije su bile vrste roda *Aspergillus* (19) a potom slede vrste rodova *Penicillium* (15), *Fusarium* (8), *Alternaria* (6), *Cladosporium* (4), *Talaromyces* (3) i *Arthrinium* (3). Ostali rodovi su zabeleženi sa samo jednom vrstom. Pored pomenutih, u uzorcima su identifikovani i predstavnici Zygomycota (*Rhizopus* spp. i *Mucor* spp.), kvasci i *Mycelia sterilia*. Mikrografije odabranih izolata su date u Prilogu 1 a filogenetski odnos između aerogenih izolata, konstruisan na osnovu sekvenci *ITS* regiona je prikazan na dendrogramu u Prilogu 2.

Na osnovu dobijenih vrednosti RU u ispitivanim prostorijama, najfrekventniji izolati su bili *Cladosporium* i *Penicillium* vrste – zabeleženi su *veoma često* tokom prolećnog, letnjeg i jesenjeg perioda uzorkovanja i *učestalo* tokom zimskog (Slika 16).



Slika 14. Koncentracije vijabilnih spora, vrednosti temperature (T) i relativne vlažnosti (RH) u vazduhu ispitivanih prostorija (I1 – I20) i vazduha neposredne okoline zgrade (O1 i O2) na različitim podlogama (MEA, M40Y i OA) tokom perioda uzorkovanja: a) jesen; b) zima; c) proleće; d) leto



Slika 15. Srednje vrednosti koncentracija vijabilnih spora u vazduhu na različitim podlogama (MEA, M40Y i OA) uporedno date sa srednjim vrednostima temperature (T) i relativne vlažnosti (RH) tokom perioda ispitivanja: a) ispitivanih prostorija i b) neposredne okoline zgrade; vrednosti na levoj ordinati su prikazane u logaritamskoj skali.

Tabela 8. Gljive izolovane iz vazduha prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine i vazduha neposredne okoline zgrade

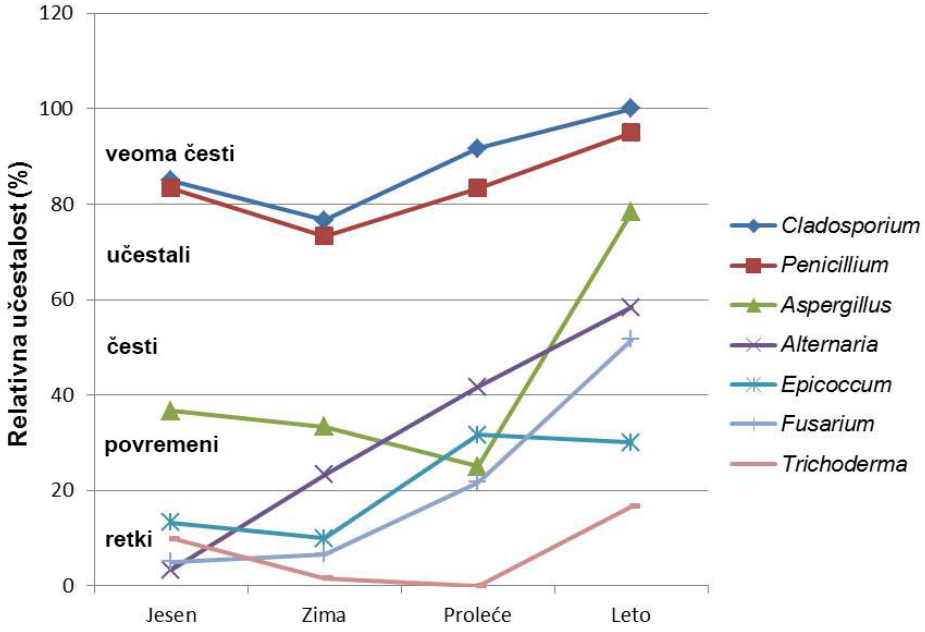
Br.	Vrsta	Šifra izolata	GenBank pristupni broj	
			ITS	***β-tubulin***
1	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.	BEOFB213m	MH647085	MH780986
2	*Alternaria burnsii* Uppal, Patel & Kamat	BEOFB240m	MH647090	MH780987
3	*Alternaria infectoria* E.G. Simmons	BEOFB222m	MH647089	MH780985
4	*Alternaria solani* Sorauer	BEOFB250m	MH647091	-
5	*Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire	BEOFB230m	MH647088	-
		BEOFB231m	MH647086	MH780983
		BEOFB232m	MH647087	-
6	*Alternaria obovoidea* (E.G. Simmons) Woudenb. & Crous	BEOFB260m	MH647092	MH780984
7	*Arthrinium arundinis* (Corda) Dyko & B. Sutton	BEOFB3410m	MH647102	MH791358
		BEOFB3411m	MH647103	MH791359
8	*Arthrinium kogelbergense* Crous	BEOFB3420m	-	MH791360
9	*Arthrinium phaeospermum* (Corda) M.B. Ellis	BEOFB3400m	MH647101	MH791357
10	*Aspergillus amstelodami* Thom & Church	BEOFB3160m	MH605074	MH605078
		BEOFB3161m	MH630041	MH779494
11	*Aspergillus calidoustus* Varga, Houbraken & Samson	BEOFB3220m	-	MH779486
12	*Aspergillus creber* Jurjević, S.W. Peterson & B.W. Horn	BEOFB3250m	MH630031	MH779491
13	*Aspergillus domesticus* Sklenar, Houbraken, Zalar & Hubka	BEOFB3270m	MH630033	MH779493
14	*Aspergillus europaeus* Hubka, A. Nováková, Samson, Houbraken, Frisvad & M. Kolařík	BEOFB382m	MH630019	MH780982
15	*Aspergillus flavus* Link	BEOFB315m	MH630017	MH757118
16	*Aspergillus jensenii* Jurjević, S.W. Peterson & B.W. Horn	BEOFB3200m	MH630022	MH779482
		BEOFB3201m	MH630023	MH779484
		BEOFB3202m	-	MH779485
		BEOFB3203m	-	MH779487

17	*Aspergillus melleus* Yukawa	BEOFB3180m	MH630018	MH779480
18	*Aspergillus niger* Tiegh.	BEOFB345m	MH630013	MH605080
		BEOFB346m	MH630014	-
		BEOFB347m	MH630015	-
		BEOFB348m	MH630016	-
19	*Aspergillus penicillioides* Speg.	BEOFB3190m	MH630020	MH779481
20	*Aspergillus proliferans* G. Sm.	BEOFB3280m	MH605071	MH605077
		BEOFB3281m	MH605072	-
21	*Aspergillus protuberus* Munt.-Cvetk.	BEOFB3240m	MH630030	MH779489
22	*Aspergillus pseudoglaucus* Blochwitz	BEOFB3170m	MH630012	MH605079
23	*Aspergillus ruber* (Jos. König, Spieck. & W. Bremer) Thom & Church	BEOFB3150m	MH605073	-
24	*Aspergillus salinicola* Zalar, Sklenar, Visagie & Hubka	BEOFB3191m	MH630021	MH779490
25	*Aspergillus sydowi* (Bainier & Sartory) Thom & Church	BEOFB3142m	MH630029	MH779488
26	*Aspergillus tabacinus* Nakaz., Y. Takeda, Simo & A. Watan.	BEOFB3260m	MH630032	MH779492
27	*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab.	BEOFB3133m	MH630024	-
		BEOFB3134m	MH630025	-
		BEOFB3135m	MH630026	-
		BEOFB3136m	MH630027	-
28	*Aspergillus westerdijkiae* Frisvad & Samson	BEOFB3210m	MH630028	MH779483
29	*Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.	BEOFB2900m	MH647093	MH791351
30	*Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst.	BEOFB1603	MH605076	-
31	*Botrytis cinerea* Pers.	BEOFB3100m	MH647094	MH791352
		BEOFB3101m	MH647095	MH791353
		BEOFB3102m	MH647096	-
		BEOFB3103m	MH647097	-
32	*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries	BEOFB1822m	MH647073	MH780979
		BEOFB1823m	MH647072	MH780075
		BEOFB1824m	MH647074	-
		BEOFB1825m	MH647075	-
		BEOFB1826m	MH647076	-

		BEOFB1827m	MH647077	-
		BEOFB1828m	MH647078	-
33	*Cladosporium herbarum* (Pers.) Link	BEOFB1812m	MH647079	MH780976
		BEOFB1813m	MH647080	-
34	*Cladosporium sphaerospermum* Penz.	BEOFB1850m	MH647083	MH780978
35	*Cladosporium uredinicola* Speg.	BEOFB1842m	MH647081	MH780977
		BEOFB1843m	MH647082	-
36	*Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	BEOFB3300m	MH647100	MH791356
37	*Coprinellus radians* (Fr.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson	BEOFB2110	MH671318	-
38	*Didymella glomerata* (Corda) Qian Chen & L. Cai	BEOFB2700m	MH647084	MH780981
39	*Epicoccum nigrum* Link	BEOFB1703m	MH671310	MH791361
		BEOFB1704m	MH671311	-
		BEOFB1705m	MH671312	-
		BEOFB1706m	MH671313	-
		BEOFB1707m	MH671314	-
40	*Fusarium acuminatum* Ellis & Everh.	BEOFB870m	MH647118	MH791371
41	*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.	BEOFB810m	MH647104	MH791368
42	*Fusarium graminearum* Schwabe	BEOFB820m	MH647106	MH791369
		BEOFB821m	MH647105	MH791366
43	*Fusarium incarnatum* (Desm.) Sacc.	BEOFB830m	MH647107	MH791370
44	*Fusarium lateritium* Nees	BEOFB840m	MH647108	MH791372
45	*Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg	BEOFB850m	MH647109	MH791364
		BEOFB851m	MH647110	-
		BEOFB852m	MH647111	MH791365
		BEOFB853m	MH647112	-
46	*Fusarium sporotrichioides* Sherb.	BEOFB860m	MH647113	MH791363
		BEOFB861m	MH647114	-
		BEOFB862m	MH647115	-
47	*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg	BEOFB802m	MH647116	MH791367
		BEOFB803m	MH647117	-
48	*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.	BEOFB1910	MH671316	-

49	*Microsphaeropsis arundinis* (S. Ahmad) B. Sutton	BEOFB3200m	-	MH791362
50	*Meyerozyma guilliermondii* (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki	BEOFB3000m	MH671320	-
51	*Nothophoma quercina* (Syd. & P. Syd.) Qian Chen & L. Cai	BEOFB3500m	MH647099	MH791355
52	*Penicillium brevicompactum* Dierckx	BEOFB1102m	MH630035	MH780058
		BEOFB1103m	MH630036	-
		BEOFB1104m	MH630037	-
		BEOFB1105m	MH630038	-
		BEOFB1106m	MH630039	-
		BEOFB1107m	MH630040	-
53	*Penicillium canescens* Sopp.	BEOFB11180m	MH630046	MH780072
54	*Penicillium carneum* (Frisvad) Frisvad	BEOFB11150m	MH630061	MH780069
55	*Penicillium chrysogenum* Thom	BEOFB11120m	MH630054	MH780066
		BEOFB11122m	MH630056	-
		BEOFB11123m	MH630055	-
		BEOFB11124m	MH630057	-
		BEOFB11125m	MH630058	-
56	*Penicillium citreonigrum* Dierckx	BEOFB11190m	MH630047	MH780073
57	*Penicillium citrinum* Thom	BEOFB11110m	MH630043	MH780063
58	*Penicillium decumbens* Thom	BEOFB11160m	MH630044	MH780070
59	*Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.	BEOFB1112m	MH630059	MH780065
60	*Penicillium expansum* Link	BEOFB11130m	MH630060	MH780067
61	*Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling	BEOFB11100m	MH630042	MH780059
62	*Penicillium rubens* Biourge	BEOFB11121m	MH630053	MH780064
63	*Penicillium sanguifluum* (Sopp) Biourge	BEOFB11170m	MH630045	MH780071
64	*Penicillium solitum* Westling	BEOFB1190m	MH630034	MH780057
65	*Penicillium ulaiense* H.M. Hsieh, H.J. Su & Tzean	BEOFB11140m	-	MH780068
66	*Penicillium viridicatum* Westling	BEOFB11200m	MH630048	MH780980
67	*Schizophyllum commune* Fr.	BEOFB1810	MH671317	-
68	*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary	BEOFB2202m	MH647098	-
69	*Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.	BEOFB1710	MH671319	-

70	*Talaromyces amestolkiae* N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad & Samson	BEOFB2610m	MH630052	MH780062
71	*Talaromyces sayulitensis* Visagie, N. Yilmaz, Seifert & Samson	BEOFB2600m BEOFB2601m	MH630050 MH630051	MH780060 MH780061
72	*Talaromyces verruculosus* (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	BEOFB2620m	MH630049	MH780074
73	*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk	BEOFB2402m	MH605075	-
74	*Trichoderma citrinoviride* Bissett	BEOFB1220m	MH671315	-



Slika 16. Relativna učestalost (RU) najzastpljenijih rodova gljiva, izolata iz vazduha prostorija za konzervaciju objekata kultune baštine

Izolati navedenih rodova su bili najzastupljeniji i prema vrednostima RG (Tabela 9). Takođe, najviše RG vrednosti su zabeležene za pomenute vrste i u vazduhu neposredne okoline tokom svih sezona. Izolati ovih vrsta su bili *učestali* tokom letnjeg a najređi tokom jesenjeg perioda uzorkovanja (Tabela 9).

Tabela 9. Relativne gustine (RG, %), izolata iz vazuha tokom perioda uzorkovanja

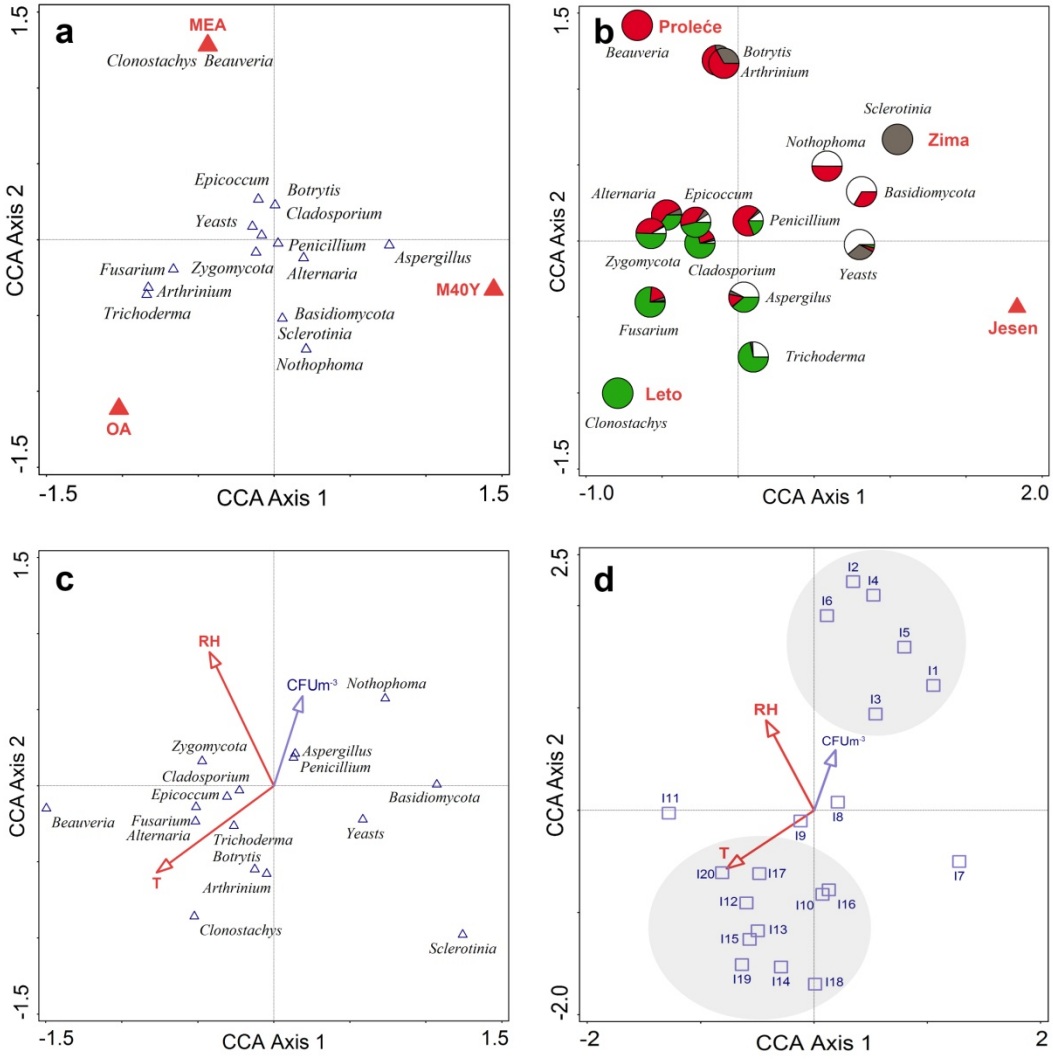
Rodovi	MEA				M40Y				OA			
	jesen	zima	proleće	leto	jesen	zima	proleće	leto	jesen	zima	proleće	leto
Vazduh prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine												
Cladosporium	12,78	14,92	22,11	81,82	2,34	7,69	25,78	54,98	2,55	3,05	17,40	83,75
Penicillium	16,28	9,92	49,63	6,40	14,70	16,62	58,33	29,68	20,01	3,54	44,16	7,54
Aspergillus	2,93	0,59	0,08	2,44	47,77	11,08	4,40	8,42	0,00	0,19	0,08	1,23
Alternaria	0,05	0,42	0,53	1,43	0,00	5,54	5,70	0,64	0,09	0,23	0,45	2,23
Fusarium	0,00	0,42	0,10	1,37	0,00	0,00	0,06	0,18	0,14	0,12	0,72	2,49
Epicoccum	0,26	0,08	0,48	0,84	0,00	0,62	0,34	0,29	0,23	0,18	0,24	0,23
Trichoderma	0,31	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,06	0,00	0,71
Vazduh neposredne okoline zgrade												
Cladosporium	3,50	26,79	82,79	89,18	2,36	62,71	38,61	65,95	8,26	22,77	33,05	91,24
Penicillium	6,99	3,92	1,21	7,84	0,79	2,82	7,91	8,11	9,09	15,84	3,67	3,85
Aspergillus	2,10	0,00	0,00	0,19	33,86	1,69	3,80	7,75	0,00	0,00	0,00	1,50
Alternaria	0,00	2,61	2,02	0,93	0,00	7,91	23,73	3,78	0,00	1,98	3,95	1,71
Epicoccum	2,10	0,65	1,01	0,37	0,00	2,82	2,22	1,26	0,00	2,97	1,41	0,21
Fusarium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,00	1,65	0,00	1,41	1,07

Izolati *Aspergillus* vrsta su *učestalo* zabeleženi tokom leta, a *povremeno* tokom ostalih sezona (Slika 16). Ipak, najveći broj izolata ovog roda je izolovan tokom jeseni na M40Y (47,77%) (Tabela 9). Uočeno je linerano povećanje učestalosti izolata *Alternaria* spp. tokom perioda jesen 2014 – leto 2015. Naime, pomenuti izolati su bili *retko* zabeleženi tokom jeseni, *povremeno* tokom zime i *često* u proleće i leto prema korišćenoj skali. Sličan trend je zabeležen i za izolate *Epicoccum* i *Fusarium* vrsta.

Rezultati prve CCA analize (F = 5,6; P = 0,0002) ilustruju odnos brojnosti izolata određenog taksona gljiva i tipa podloge. Većina taksona (prikazanih u sredini CCA dijagrama) su izolovani na sve tri podloge. Ipak, neki od njih pokazuju preferenciju ka određenoj podlozi npr. vrste rodova *Trichoderma*, *Fusarium* i *Arthrinium* su najčešće izolovane na OA, a vrste roda *Aspergillus* na M40Y. S druge strane, postoje i taksoni izolovani na dva ili samo na jednom tipu podloge: *Nothophoma quercina* i *Sclerotinia sclerotiorum* su izolovane samo na M40Y i OA, dok su *Beauveria bassiana* i *Clonostachys rosea* izolovani isključivo na MEA (Slika 17a).

Drugi CCA dijagram („*pie diagram*" prema programu Canoco) (F = 8,8; P = 0,0002) prikazuje odnos taksona gljiva i sezona u kojima je uzorkovanje vršeno (Slika 17b). Određeni taksoni su zabeleženi samo u jednoj sezoni (*Sclerotinia sclerotiorum* – zima, *Beauveria bassiana* – proleće i *Clonostachys rosea* – leto) dok su drugi zabeleženi tokom dve sezone (*Botrytis cinerea* i *Arthrinium* spp. u prolećnom i zimskom periodu dok su *Nothophoma quercina* i predstavnici Basidiomycota zabeleženi u jesenjem i zimskom). Taksoni u centralnom delu dijagrama su prisutni tokom sve četiri sezone, pri čemu je zastupljenost nekih taksona bila viša tokom letnjeg perioda (vrste rodova *Cladosporium, Epicoccum, Fusarium* i Zygomycota). S druge strane, vrste rodova *Penicillium* i *Alternaria* su zastupljenije tokom prolećnog, a vrste roda *Aspergillus* tokom jesenjeg i letnjeg perioda.

Trećom CCA analizom (F = 9,0; P = 0,0002) predstavljena je potencijalna korelacija T, RH vrednosti i zastupljenosti fungalnih taksona, ali i varijabli koje se odnose na vrednosti ukupne koncentracije propagula (CFU m^{-3}) i prostorije u kojima je vršeno uzorkovanje (I1 – I20). Na Slici 17c prikazan je odnos taksona, T, RH i CFU m^{-3}, a na Slici 17d su izdvojene sve eksplanatorne i suplementarne varijable korišćene u ovoj analizi, sa fokusom na prostorije u kojima je uzorkovanje vršeno. Pošto su oba prikazana dijagrama



Slika 17. CCA analiza odnosa taksona gljiva i testiranih varijabli: a) eksplanatorne – vrsta mikološke podloge (MEA, M40Y i OA); b) eksplanatorne – sezone (proleće – crveno, leto – zeleno, jesen – belo i zima – sivo); c i d) eksplanatorne – mikroklimatski parametri (RH i T) i suplementarne – CFU m^{-3} i prostorije (I1 – I20)

izvedena iz iste CCA analize, sa Slike 17d, a na osnovu kombinacije sa Slikom 17c, moguće je opisati ne samo odnos T, RH, CFU m^{-3} i prostorija, već i distribuciju taksona u odnosu na prostorije u kojima je vršeno uzorkovanje. Na osnovu analize Slike 17d mogu se izdvojiti dve grupe prostorija. Prva grupa ulkučuje prostorije I1 – I6 tj. one prostorije u kojima su zabeležene više vrednosti RH (uglavnom > 45%) i niže vrednosti T vazduha

(uglavnom < 24˚C). Druga grupa prostorija uključuje prostorije sa nižim RH vrednostima (uglavnom < 45%) i višim T (uglavnom > 24˚C). Većina taksona se može povezati sa drugom grupom, gde se uočava pozitivna korelacija sa T. Nasuprot tome, manji broj taksona ima negativnu korelaciju sa ovim parametrom, uključujući vrste *N. quercina*, *S. sclerotiorum* i pripadnike Basidiomycota. Određeni taksoni pokazuju pozitivnu korelaciju sa RH (npr. *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp.) dok je negativna korelacija u odnosu na ovaj parametar zabeležena kod *S. sclerotiorum*, *Arthrinium* spp., *B. cinerea* i dr. Više vrednosti koncentracije propagula (CFU m^{-3}) su zabeležene u prvoj grupi prostorija, gde su zabeležene više RH vrednosti, dok su izmerene koncentracije propagula u drugoj grupi prostorija bile niže.

5.3 Biodeterioracioni potencijal izolata gljiva iz vazduha

Biodeterioracioni potencijal ispitivanih *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta je prikazan u Tabeli 10 i na Slici 18. Najveća sposobnost deterioracije je zabeležena za izolate *Penicillium brevicompactum*, *P. glabrum* i *Talaromyces sayulitensis*, koji su pokazali pozitivnu reakciju u 6 od 8 primenjenih testova dok je za *P. chrysogenum* pozitivna reakcija detektovana u 5 testova. Nasuprot tome, za izolate *A. domesticus*, *A. penicillioides*, *A. pseudoglaucus* i *A. ruber* nije dokumentovana pozitivna reakcija ni u jednom primenjenom testu.

Sposobnost rastvaranja karbonata je zabeležena za 5 izolata (*A. niger*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. glabrum* i *T. sayulitensis*) pri čemu je za *T. sayulitensis* uočena transparentna zona najvećeg dijametra (Slika 19). Primenom testa produkcije kiselih/baznih metabolita, izmereno je značajno smanjenje pH vrednosti tečnog medijuma za 8 izolata (23,53%) a najniža pH vrednost podloge je bila izmerena za *T. sayulitensis* (3,45). Nasuprot tome, ni za jedan testirani izolat nije izmereno značajno povećanje pH vrednosti u tečnom medijumu. S druge strane, produkcija kiselina na CREA je zabeležena za 11 izolata (32,35%) a zone žute boje najvećeg dijametra su izmerene za

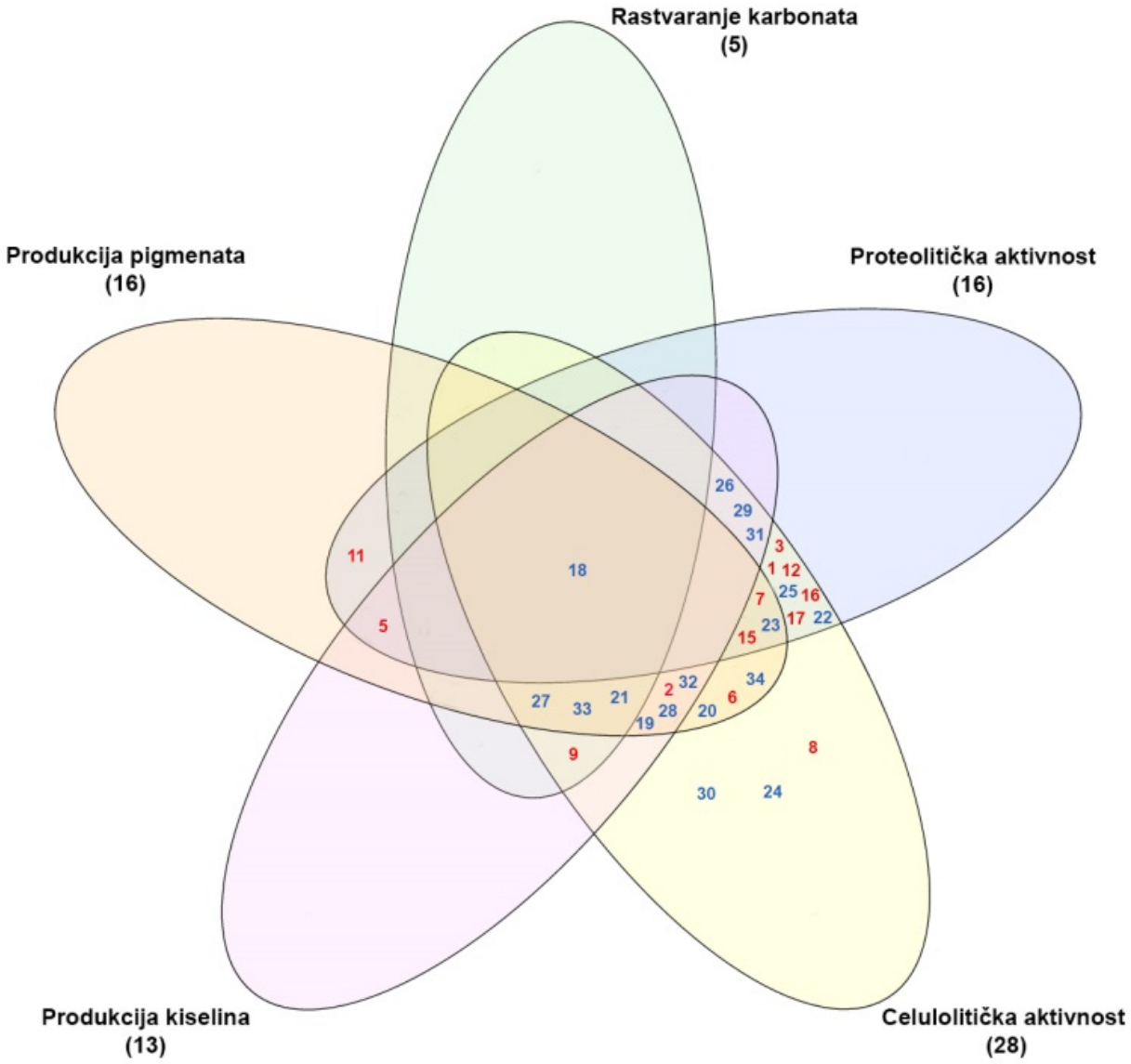
A. niger, *P. expansum* i *P. viridicatum* (Slika 20). Od pomenutih, samo je 5 testiranih izolata (*A. niger*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. glabrum* i *T. sayulitensis*) ispoljilo sposobnost produkcije kiselih metabolita i u tečnom i na čvrstom medijumu. Treba napomenuti i da je kod većine izolata kultivisanih na CREA, sa izuzetkom *P. carneum*, *P. solitum* i *P. viridicatum*, zabeležen slab, kako micelijski rast, tako i intenzitet sporulacije.

Tabela 10. Potencijal biodeterioracije ispitivanih fungalnih izolata iz vazduha

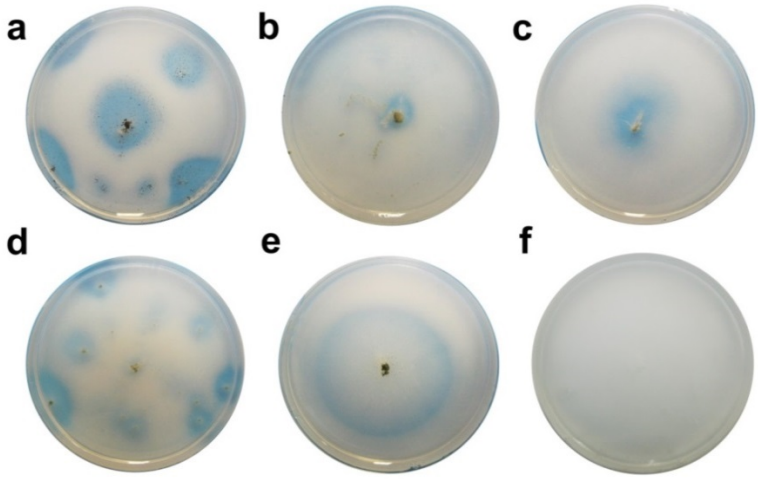
Br.	Izolat	Produkcija pigmenata			Rastvaranje karbonata	Proteolitička aktivnost	Celulolitička aktivnost	Produkcija kiselina/baza	
		OA	mCzA	CCGA				CREA	mCzB (pH)
1	*Aspergillus amstelodami* BEOFB3160m	-	-	-	-	+	+	-	6.87
2	*Aspergillus calidoustus* BEOFB3220m	ZŽ	SŽ	-	-	-	+	-	**5.8**
3	*Aspergillus creber* BEOFB3250m	-	-	-	-	+	+	-	6.9
4	*Aspergillus domesticus* BEOFB3270m	-	-	-	-	-	-	-	6.95
5	*Aspergillus europaeus* BEOFB382m	Ž	-	Z	-	+	-	+	7.22
6	*Aspergillus flavus* BEOFB315m	-	-	Ž	-	-	+	-	7.26
7	*Aspergillus jensenii* BEOFB3200m	-	-	SŽ	-	+	+	-	7.15
8	*Aspergillus melleus* BEOFB3180m	-	-	-	-	-	+	-	7.26
9	*Aspergillus niger* BEOFB345m	-	-	-	+	-	+	+	**4.25**
10	*Aspergillus penicillioides* BEOFB3190m	-	-	-	-	-	-	-	6.47
11	*Aspergillus proliferans* BEOFB3280m	-	-	SN	-	+	-	-	6.92
12	*Aspergillus protuberus* BEOFB3240m	-	-	-	-	+	+	-	6.92
13	*Aspergillus pseudoglaucus* BEOFB3170m	-	-	-	-	-	-	-	6.91
14	*Aspergillus ruber* BEOFB3150m	-	-	-	-	-	-	-	6.9
15	*Aspergillus sydowii* BEOFB3142m	-	SN	TC	-	+	+	-	7.73

16	*Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m	-	-	-	-	+	+	-	6.92
17	*Aspergillus versicolor* BEOFB3133m	-	-	-	-	+	+	-	7.3
18	*Penicillium brevicompactum* BEOFB1102m	-	-	ŽB	+	+	+	+	**4.86**
19	*Penicillium canescens* BEOFB11180m	SB	-	-	-	-	+	+	6.5
20	*Penicillium carneum* BEOFB11150m	-	SN	-	-	-	+	-	6.67
21	*Penicillium chrysogenum* BEOFB11120m	-	SŽ	-	+	-	+	+	**4.55**
22	*Penicillium citreonigrum* BEOFB11190m	-	-	-	-	+	+	-	6.55
23	*Penicillium citrinum* BEOFB11110m	Ž	-	-	-	+	+	+	6.24
24	*Penicillium decumbens* BEOFB11160m	-	-	-	-	-	+	-	6.46
25	*Penicillium digitatum* BEOFB1112m	-	-	-	-	+	+	-	6.83
26	*Penicillium expansum* BEOFB11130m	-	-	-	-	+	+	+	6.61
27	*Penicillium glabrum* BEOFB11100m	-	SŽ	Ž	+	-	+	+	**4.63**
28	*Penicillium sanguifluum* BEOFB11170m	B	SN	-	-	-	+	-	**4.77**
29	*Penicillium solitum* BEOFB1190m	-	-	-	-	+	+	+	6.43
30	*Penicillium ulaiense* BEOFB11140m	-	-	-	-	-	+	-	6.36
31	*Penicillium viridicatum* BEOFB11200m	-	-	-	-	+	+	+	6.5
32	*Talaromyces amestolkiae* BEOFB2610m	SB	C	-	-	-	+	-	**4.86**
33	*Talaromyces sayulitensis* BEOFB2600m	C	SŽ	-	+	-	+	+	**3.45**
34	*Talaromyces verruculosus* BEOFB2620m	B	Ž	N	-	-	+	-	6.49
Ukupan broj pozitivnih izolata		**8 (23.53%)**	**9 (26.47%)**	**8 (23.53%)**	**5 (14.71%)**	**16 (47.05%)**	**28 (82.35%)**	**11 (32.35%)**	**8 (23.53%)**

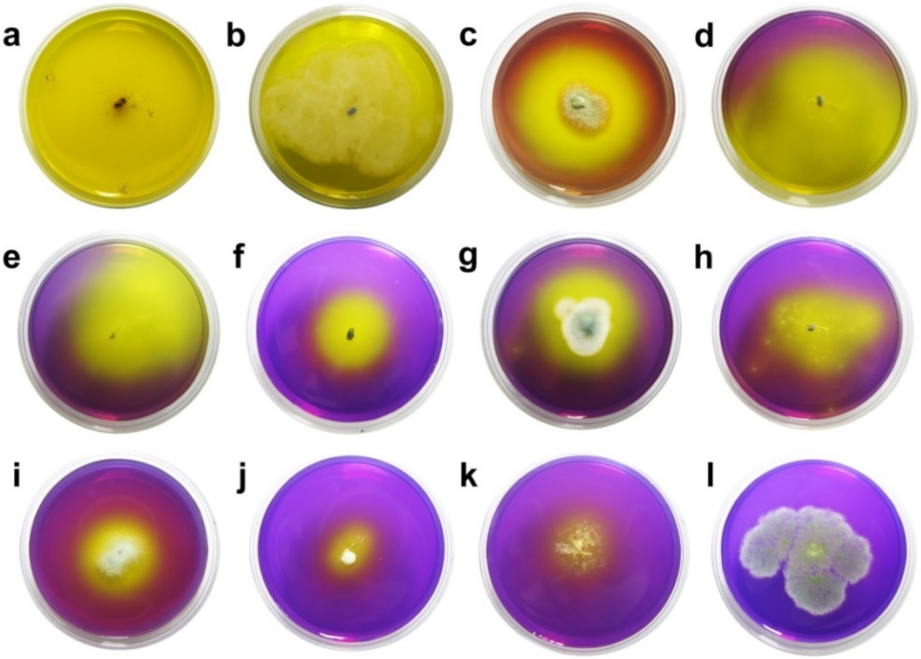
(+) - test pozitivan, (-) - test negativan; boje ekstracelularnih pigmenata: Ž – žuta, SŽ – svetlo žuta, ŽB – žuto braon, Z – zelena, ZŽ – zeleno žuta, C – crvena, SC – svetlo crvena, TC – tamno crvena, N – narandžasta, SN – svetlo narandžasta, B – braon, SB – svetlo braon.



Slika 18. Šematski prikaz biodeterioracionog potencijala testiranih vrsta roda *Aspergillus* (1 – 17, crveno) i *Penicillium* (18 – 34, plavo) prikazan Venovim dijagramom; numerički simboli odgovaraju rednom broju izolata u Tabeli 7

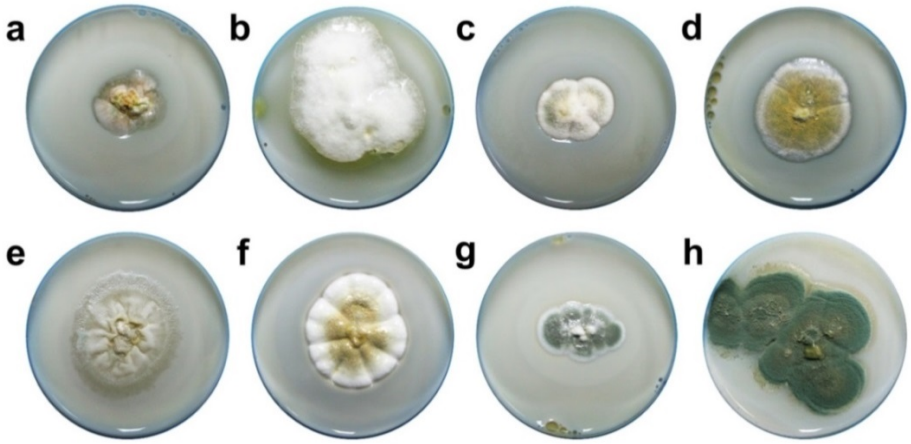


Slika 19. Transparentne zone nastale kao posledica rastvaraja $CaCO_3$ u kulturi aerogenih izolata (14. dan, CCGA): a) *Aspergillus niger*; b) *Penicillium brevicompactum*; c) *P. chrysogenum*; d) *P. glabrum*; e) *Talaromyces sayulitensis*; f) kontrolna podloga



Slika 20. Sposobnost produkcije kiselih metabolita aerogenih izolata (7. dan, CREA): a) *Aspergillus niger*; b) *Penicillium expansum*; c) *P. viridicatum*; d) *P. brevicompactum*; e) *P. glabrum*; f) *Talaromyces sayulitensis*; g) *P. solitum*; h) *P. citrinum*; i) *P. chrysogenum*; j) *P. echinulatum*; k) *A. europaeus*; l) *P. carneum* (a – d. intenzivna; e – h. srednja; i – k. slaba; l. odsustvo produkcije kiselina)

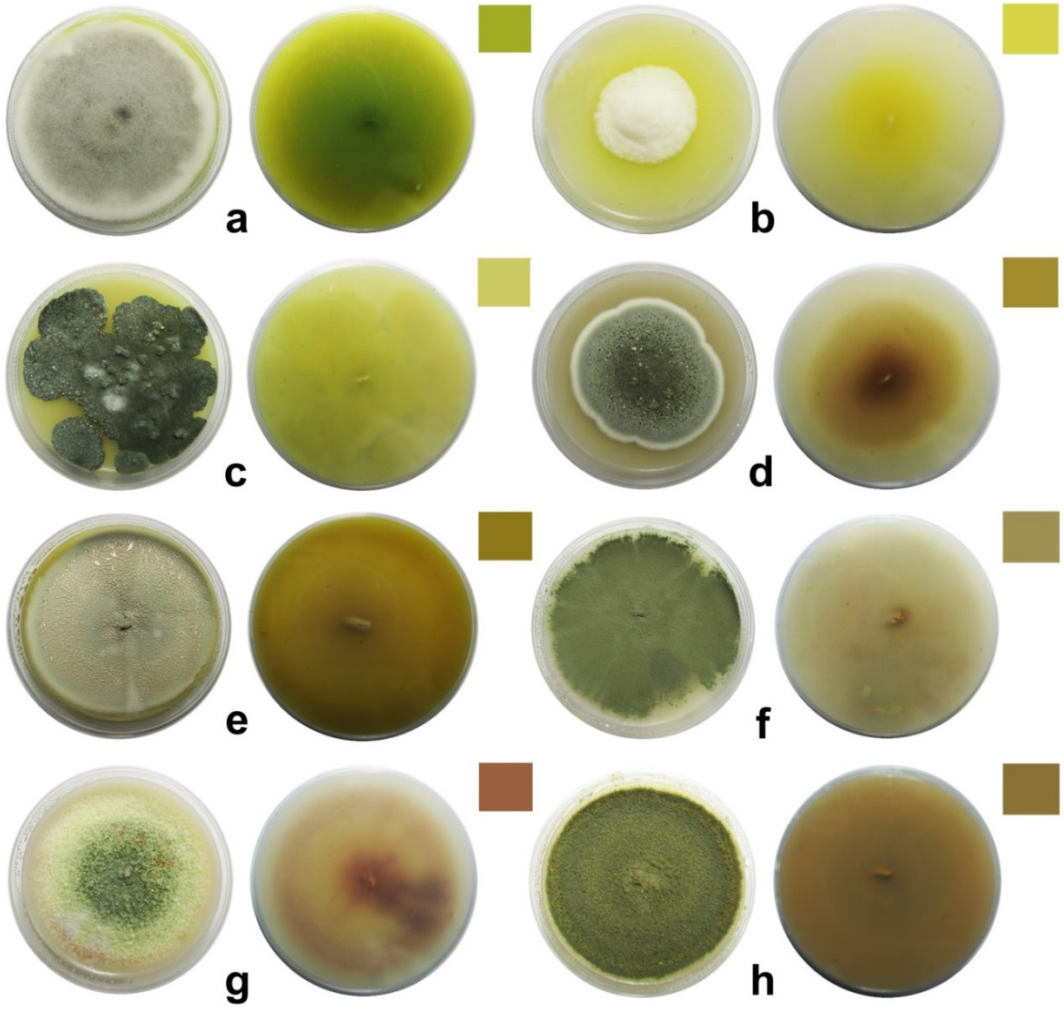
Zone hidrolize kazeina su zabeležene kod 16 izolata (47,05%), tj. kod 9 vrsta roda *Aspergillus* i 7 *Penicillium* vrsta (Sika 21). Za razliku od svih ostalih testova biodeterioracije, celulolitička aktivnost je dokumentovana, kao pojava zona žute boje oko kolonija, kod većine ispitivanih izolata (ukupno 28, tj. 82,35%) i to kod svih *Penicillium* i većine testiranih *Aspergillus* vrsta (Slika 22).



Slika 21. Transparentne zone, posledica hidrolize kazeina oko kolonija aerogenih izolata (7. dan, CN): a) *Aspergillus creber*; b) *A. europaeus*; c) *A. jensenii*; d) *A. protuberus*; e) *A. sydowii*; f) *A. tabacinus*; g) *Penicillium citreonigrum*; h) *P. solitum*

Slika 22. Sposobnost testiranih aerogenih izolata da produkuju celulaze (7. dan, CMC agar): a) *A. jensenii*; b) *A. protuberus*; c) *A. tabacinus*; d) *A. versicolor*; e) *P. canescens*; f) *P. ulaiense*

Produkcija ekstracelularnih pigmenata je zabeležena za 8 izolata (25,53%) kultivisanih na OA i CCGA i za ukupno 9 izolata kultivisanih na mCzA (Slika 7). Boja uočenih pigmenata je varirala u zavisnosti od ispitivane mikromicete i tipa medijuma – uočene su različite nijanse zelene (kod *A. calidoustus*), žute (kod *A. europaeus* i *P. citrinum*), narandžaste (kod *T. verruculosus*), crvene (kod *A. sydowii*, *T. amestolkiae*, *T. sayulitensis*) i braon boje (kod *P. canescens*, *P. sanguifluum*).



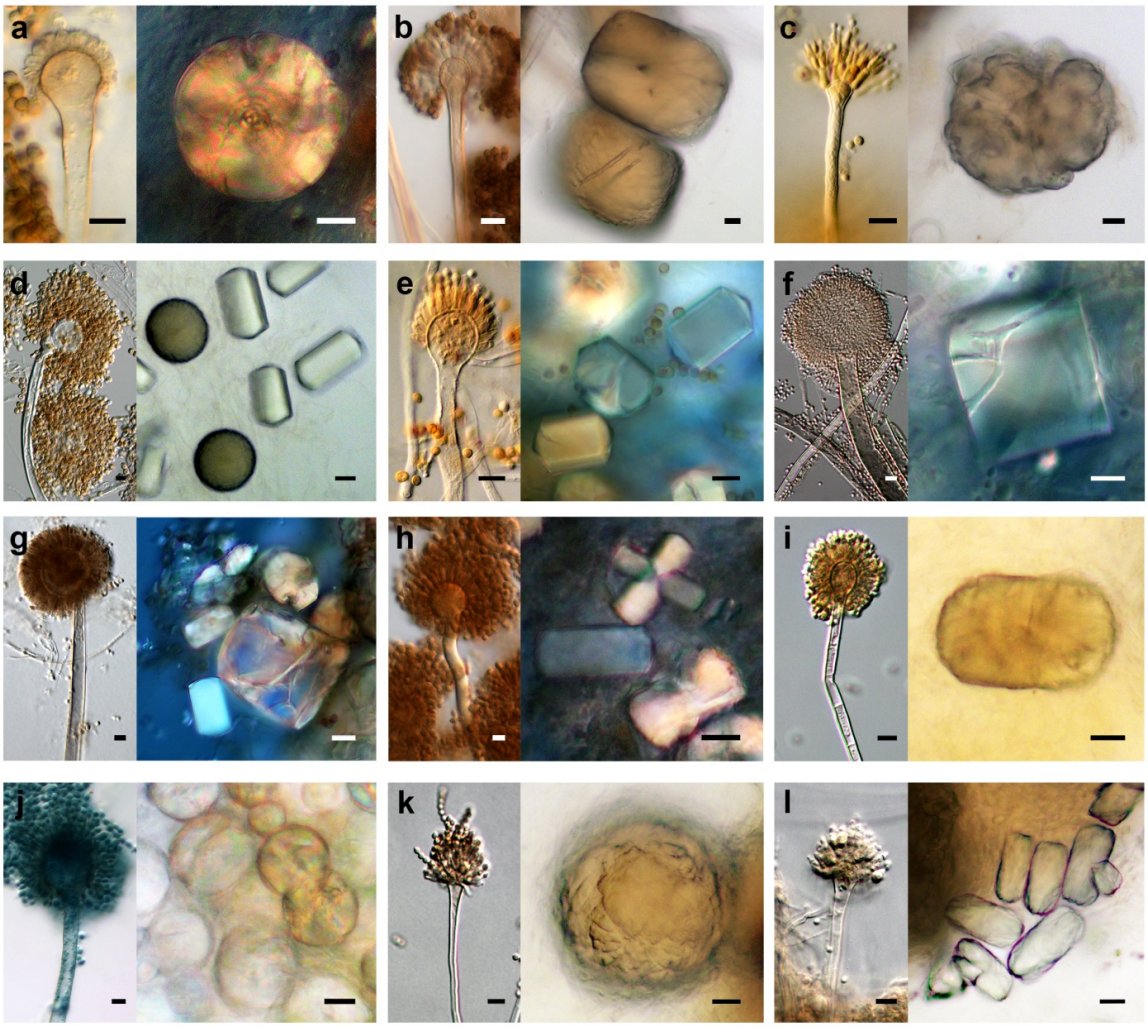
Slika 23. Sposobnost produkcije ekstracelularnih pigmenata u kulturi aerogenih izolata (7. dan, OA), izgled lica i naličja kolonija (boja pigmenta izdvojena gore desno): a) *Aspergillus calidoustus*; b) *A. europaeus*; c) *Penicillium citrinum*; d) *P. canescens*; e) *P. sanguifluum*; f) *Talaromyces amestolkiae*; g) *T. sayulitensis*; h) *T. verruculosus*

Sposobnost precipitacije mikogenih minerala na B4 podlozi je zabeležena za većinu testiranih izolata tj. za 14 vrsta roda *Aspergillus* i 15 izolata roda *Penicillium* (Tabela 11). Kristalne forme različite morfologije i dimenzija su uočene primenom svetlosne (Slike 24 i 25) i skenirajuće elektronske mikroskopije (Slika 26).

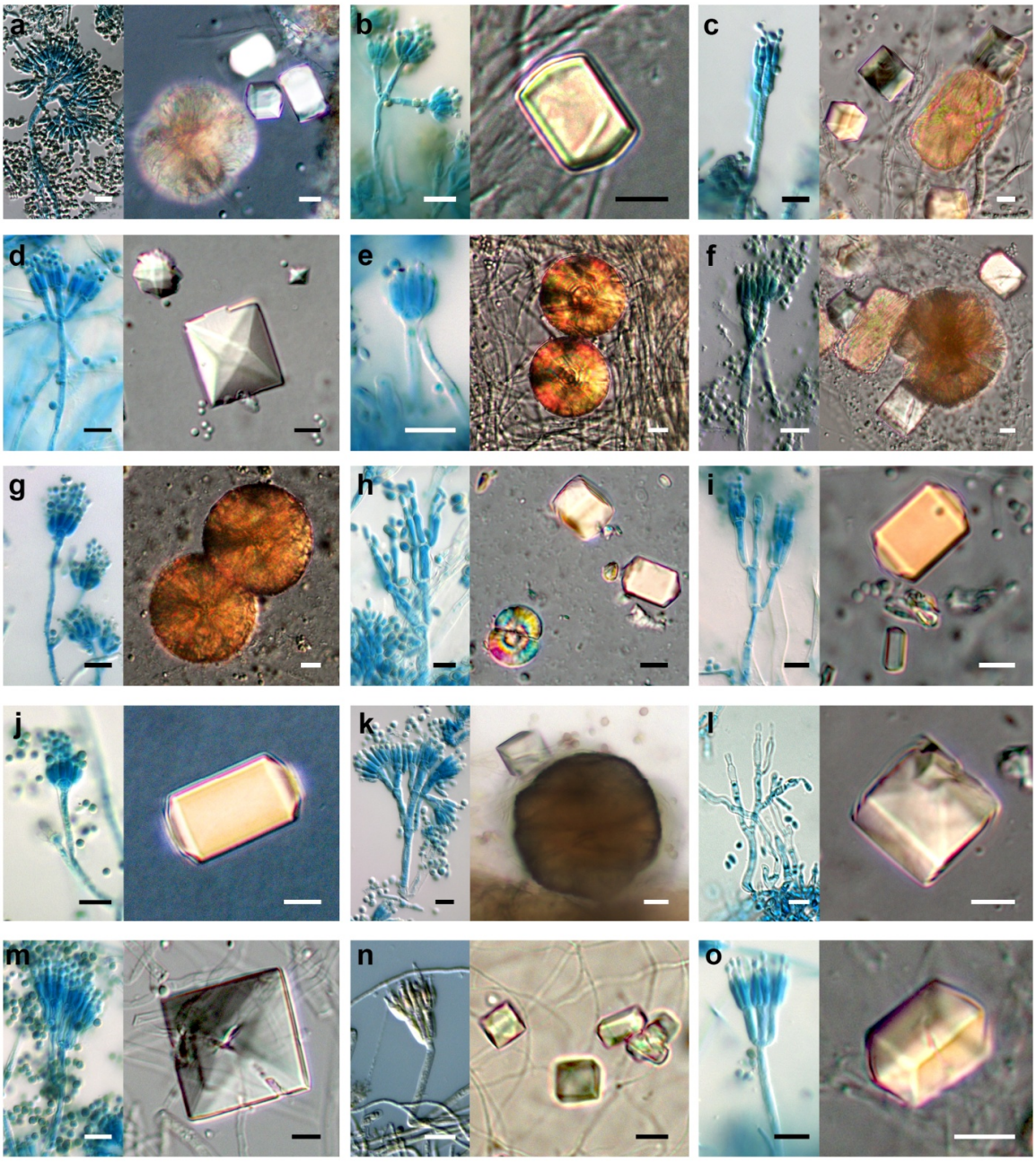
Tabela 11. Sposobnost aerogenih izolata da formiraju sekundarne mikogene minerale

Br.	Izolat	Formiranje minerala*	Br.	Izolat	Formiranje minerala*
1	*Aspergillus amstelodami* BEOFB3160m	+	**18**	*Penicillium brevicompactum* BEOFB1102m	+
2	*Aspergillus calidoustus* BEOFB3220m	+	**19**	*Penicillium canescens* BEOFB11180m	+
3	*Aspergillus creber* BEOFB3250m	+	**20**	*Penicillium carneum* BEOFB11150m	O
4	*Aspergillus domesticus* BEOFB3270m	-	**21**	*Penicillium chrysogenum* BEOFB11120m	O
5	*Aspergillus europaeus* BEOFB382m	O	**22**	*Penicillium citreonigrum* BEOFB11190m	+
6	*Aspergillus flavus* BEOFB315m	O, CC	**23**	*Penicillium citrinum* BEOFB11110m	O
7	*Aspergillus jensenii* BEOFB3200m	+	**24**	*Penicillium decumbens* BEOFB11160m	+
8	*Aspergillus melleus* BEOFB3180m	O	**25**	*Penicillium digitatum* BEOFB1112m	+
9	*Aspergillus niger* BEOFB345m	O	**26**	*Penicillium expansum* BEOFB11130m	+
10	*Aspergillus penicillioides* BEOFB3190m	-	**27**	*Penicillium glabrum* BEOFB11100m	+
11	*Aspergillus proliferans* BEOFB3280m	+	**28**	*Penicillium sanguifluum* BEOFB11170m	-
12	*Aspergillus protuberus* BEOFB3240m	CC	**29**	*Penicillium solitum* BEOFB1190m	CC
13	*Aspergillus pseudoglaucus* BEOFB3170m	+	**30**	*Penicillium ulaiense* BEOFB11140m	O
14	*Aspergillus ruber* BEOFB3150m	-	**31**	*Penicillium viridicatum* BEOFB11200m	O
15	*Aspergillus sydowii* BEOFB3142m	O	**32**	*Talaromyces amestolkiae* BEOFB2610m	-
16	*Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m	+	**33**	*Talaromyces sayulitensis* BEOFB2600m	+
17	*Aspergillus versicolor* BEOFB3133m	+	**34**	*Talaromyces verruculosus* BEOFB2620m	+

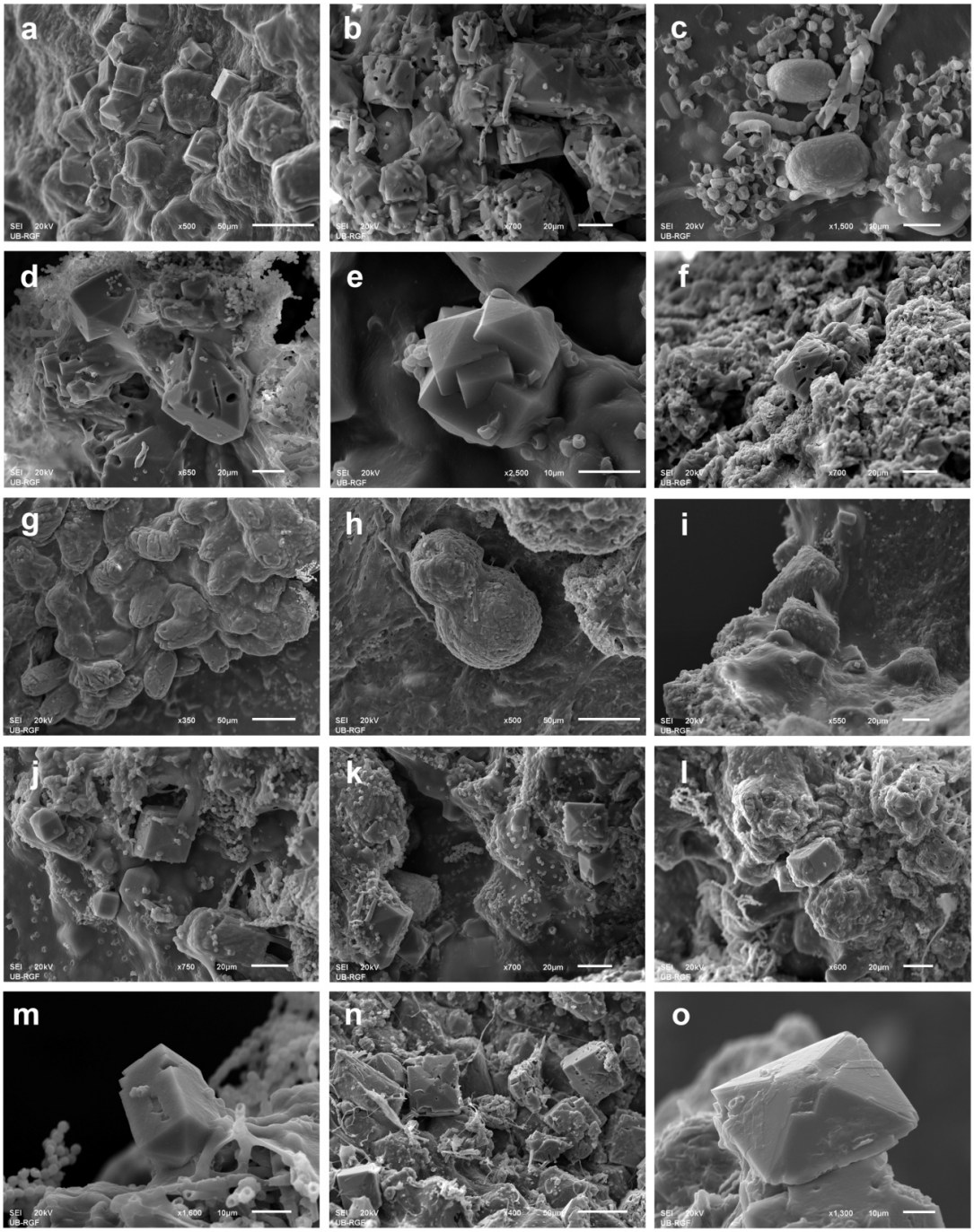
*(+) – mineralizacija dokumetovana, (-) – mineralizacija odutna, O - minerali kalcijum oksalata, CC - minerali kalcijum karbonata



Slika 24. Konidiogeni aparati i sekundarni mikogeni minerali vrsta roda *Aspergillus*: a) *Aspergillus amstelodami*; b) *A. calidoustus*; c) *A. creber*; d) *A. europaeus*; e) *A. flavus*; f) *A. melleus*; g) *A. niger*; h) *A. proliferans*; i) *A. protuberus*; j) *A. pseudoglaucus*; k) *A. sydowii*; l) *A. versicolor* (bar = 10 µm; svetlosna mikroskopija)



Slika 25. Konidiogeni aparati i sekundarni mikogeni minerali vrsta roda *Penicillium i Talaromyces*: a) *Penicillium brevicompactum*; b) *P. canescens*; c) *P. carneum*; d) *P. chrysogenum*; e) *P. citreonigrum*; f) *P. citrinum*; g) *P. decumbens*; h) *P. digitatum*; i) *P. expansum*; j) *P. glabrum*; k) *P. solitum*; l) *P. ulaiense*; m) *P. viridicatum*; n) *Talaromyces sayulitensis*; o) *T. verruculosus* (bar = 10 µm; svetlosna mikroskopija)



Slika 26. Mikrografije sekundarnih mikogenih minerala formiranih u kulturama vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium*: a) *A. europaeus*; b i c) *A. flavus*; d i e) *A. melleus*; f) *A. niger*; g) *A. protuberus*; h) *A. sydowii*; i) *Penicillium canescens*; j) *P. carneum*; k) *P. chrysogenum*; l) *P. citirnum*; m) *P. solitum*; n) *P. ulaiense*; o) *P. viridicatum* (SEM)

Dokumentovane su dve hemijski i morfološki različite komponente: kalcijum karbonat i kalcijum oksalat. Uočeni kristali kalcijum karbonata su uglavnom u formi nepravilnih sfera i elipsoida (Slike 24i, 25k i 26c,g). Primenom EDS analize ovi kristali su potvrđeni kod samo 3 testirana izolata: *Aspergillus flavus*, *A. protuberus* i *P. solitum* (Tabela 12). Nasuprot tome, kristali kalcijum oksalata su produkovani kod većine ispitivanih izolata i to najčešće u formi tetragonalne prizme kombinovane sa bipiramidom kao kod *A. europaeus* (Slike 24d i 26a), *A. flavus* (Slike 24e i 26b), *P. canescens* (Sika 25b), *P. expansum* (Slika 25i), *P. glabrum* (Slika 25j), *P. ulaiense* (Slike 25l i 26n) i *Talaromyces verruculosus* (Slika 25o). U određenim slučajevima zabeležene su forme tetragonalne bipiramide kao kod *P. chrysogenum* (Slika 25d) i *P. viridicatum* (Slike 25m i 26o) ili forme penetracionih blizanaca (Slika 26e). Opisane kristalne strukture kalcijum oksalata po morfologiji odgovaraju vedelitu. Na površini kristalnih struktura su često vidljivi hifalni otisci (Slike 24f i 26b,d,f,m,n).

Tabela 12. Hemijski sastav kristala kod odabranih aerogenih izolata (SEM-EDS).

Hemijski sastav	Kalcijum oksalat					Kalcijum karbonat		
Br. izolata (Tab. 8)	6	8	9	23	30	6	12	29
C (wt%)	20,2	15,0	18.2	20,3	17,0	12,2	17,7	16,3
O (wt%)	52,1	57,5	55,5	53,9	60,2	46,3	47,7	31,2
Ca (wt%)	27,7	27,5	26,3	25,7	22,8	40,9	34,6	52,5
Σ (wt%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Hemolitička aktivnost na krvnom agaru je demonstrirana za ukupno 16 testiranih izolata (Tabela 13). Sposobnost potpune (β) hemolize je dokumentovana za 9 dok je delimična (α) hemoliza zabeležena kod ukupno 7 izolata (Slika 27). Ipak, za većinu izolata je zabeležen rast na krvnom agaru a hemoliza nije detektovana (γ hemoliza). Sposobnost rasta na krvnom agaru na 25 °C nije zabeležena samo kod 5 izolata *Aspergillus* spp. S druge strane, sposobnost rasta na 37 °C je dokumentovana za 12 izolata i to 6 vrsta roda

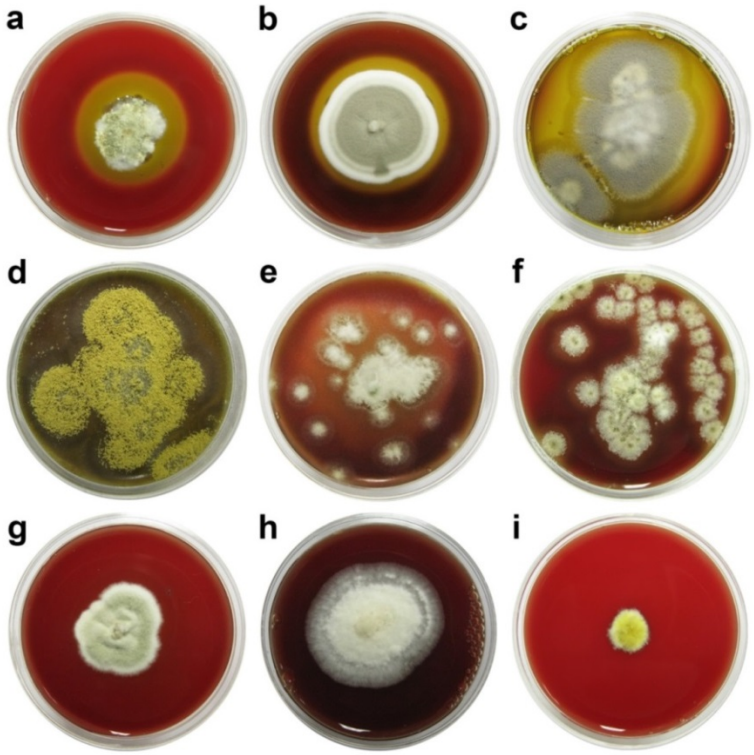
Aspergillus i 6 vrsta roda *Penicillium*. Za izolate *A. calidoustus*, *A. melleus*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. decumbens*, *T amestolkiae* i *T. sayulitensis* je pokazana i sposobnost rasta na 37 °C i sposobnost hemolize (α hemoliza kod *A. melleus* i *Talaromyces* spp. dok je kod ostalih zabeležen β tip) (Tabela 13).

Tabela 13. Hemolitička aktivnost i sposobnost rasta na 37°C ispitivanih aerogenih izolata

Br.	Vrsta	Sposobnost rasta na 37 °C*	Tip hemolize**
1	*Aspergillus amstelodami* BEOFB3160m	-	**γ**
2	*Aspergillus calidoustus* BEOFB3220m	+	**β**
3	*Aspergillus creber* BEOFB3250m	-	**γ**
4	*Aspergillus domesticus* BEOFB3270m	-	-
5	*Aspergillus europaeus* BEOFB382m	-	**γ**
6	*Aspergillus flavus* BEOFB315m	+	**γ**
7	*Aspergillus jensenii* BEOFB3200m	-	**γ**
8	*Aspergillus melleus* BEOFB3180m	+	**α**
9	*Aspergillus niger* BEOFB345m	+	**β**
10	*Aspergillus penicillioides* BEOFB3190m	-	-
11	*Aspergillus proliferans* BEOFB3280m	+	-
12	*Aspergillus protuberus* BEOFB3240m	-	**β**
13	*Aspergillus pseudoglaucus* BEOFB3170m	-	-
14	*Aspergillus ruber* BEOFB3150m	-	**γ**
15	*Aspergillus sydowii* BEOFB3142m	+	**γ**
16	*Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m	-	**β**
17	*Aspergillus versicolor* BEOFB3133m	-	-
18	*Penicillium brevicompactum* BEOFB1102m	-	**α**
19	*Penicillium canescens* BEOFB11180m	-	**β**
20	*Penicillium carneum* BEOFB11150m	-	**γ**
21	*Penicillium chrysogenum* BEOFB11120m	+	**β**
22	*Penicillium citreonigrum* BEOFB11190m	-	**γ**
23	*Penicillium citrinum* BEOFB11110m	+	**β**
24	*Penicillium decumbens* BEOFB11160m	+	**β**
25	*Penicillium digitatum* BEOFB1112m	-	**γ**

26	*Penicillium expansum* BEOFB11130m		**α**
27	*Penicillium glabrum* BEOFB11100m	-	**α**
28	*Penicillium sanguifluum* BEOFB11170m	-	**β**
29	*Penicillium solitum* BEOFB1190m	+	**γ**
30	*Penicillium ulaiense* BEOFB11140m	-	**γ**
31	*Penicillium viridicatum* BEOFB11200m	-	**γ**
32	*Talaromyces amestolkiae* BEOFB2610m	+	**α**
33	*Talaromyces sayulitensis* BEOFB2600m	+	**α**
34	*Talaromyces verruculosus* BEOFB2620m	-	**α**
	Ukupan broj pozitivnih izolata	**12 (35,29%)**	**16 (47,05%)**
	Izolati pozitivni na α hemolizu		**7 (20,59 %)**
	Izolati pozitivni na β hemolizu		**9 (26,47%)**

*(+) – rast pozitivan, (-) – rast negativan; ** α – alfa hemoliza, β – beta hemoliza, γ – gama hemoliza



Slika 27. Hemolitička aktivnost testiranih izolata: a) *Aspergillus protuberus*; b) *Penicillium canescens*; c) *P. chrysogenum*; d) *A. melleus*; e) *P. glabrum*; f) *Talaromyces amestolkiae*; g) *A. creber*; h) *A. europaeus*; i) *A. ruber* (a–c. β-hemoliza; d–f. α-hemoliza; g–i. γ-hemoliza)

5.4 Petrografska identifikacija kamene stele

Ispitivana stela je isklesana od organogenog krečnjačkog kamena, žućkaste boje, kristalne teksture koji je homogeno strukturiran i visoko porozan. Kamen sadrži ostatke organogenih konstituenata, mikrofosila uronjenih u kristalni matriks. Na osnovu testa relativne tvrdoće i na osnovu intenzivne reakcije sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom može se zaključiti da se kamen sastoji od kalcita (kalcijum karbonata).

5.5 Biološka kolonizacija kamene stele

Na osnovu opservacije simptoma biodeterioracije, ukupan ID je iznosio 0,8 što ukazuje na visok stepen deterioracije (Tabela 14). Detektovano je prisustvo različitih pigmentacija, biopitinga, biofilma i crne kore. Upotrebom *in situ* optičke mikroskopije dokumentovano je prisustvo micelije i reproduktivnih struktura različitih gljiva. Ispitivane površine su prekrivne hijalinom micelijom u vidu karakteristične mreže (Slika 28a–g). Uočeno je prisustvo melanizovanih diktiospora koje po obliku, dimenzijama i orijentaciji septi ukazuju na vrste roda *Alternaria* (Slika 28g). Zabeležene su i agregacije obovatnih konidija zlatno-braon boje zajedno sa hijalinom micelijom što morfološki odgovara vrsti *Acremoniella atra* (Slika 28d–f). Takođe, *in situ* mikroskopijom su dokumentovane i apotecije lišajeva i fragmenti njihovih talusa ispod guste hifalne mreže (Slika 28h). Zabeležen je i granularni izgled mineralnog supstrata (Slika 28i).

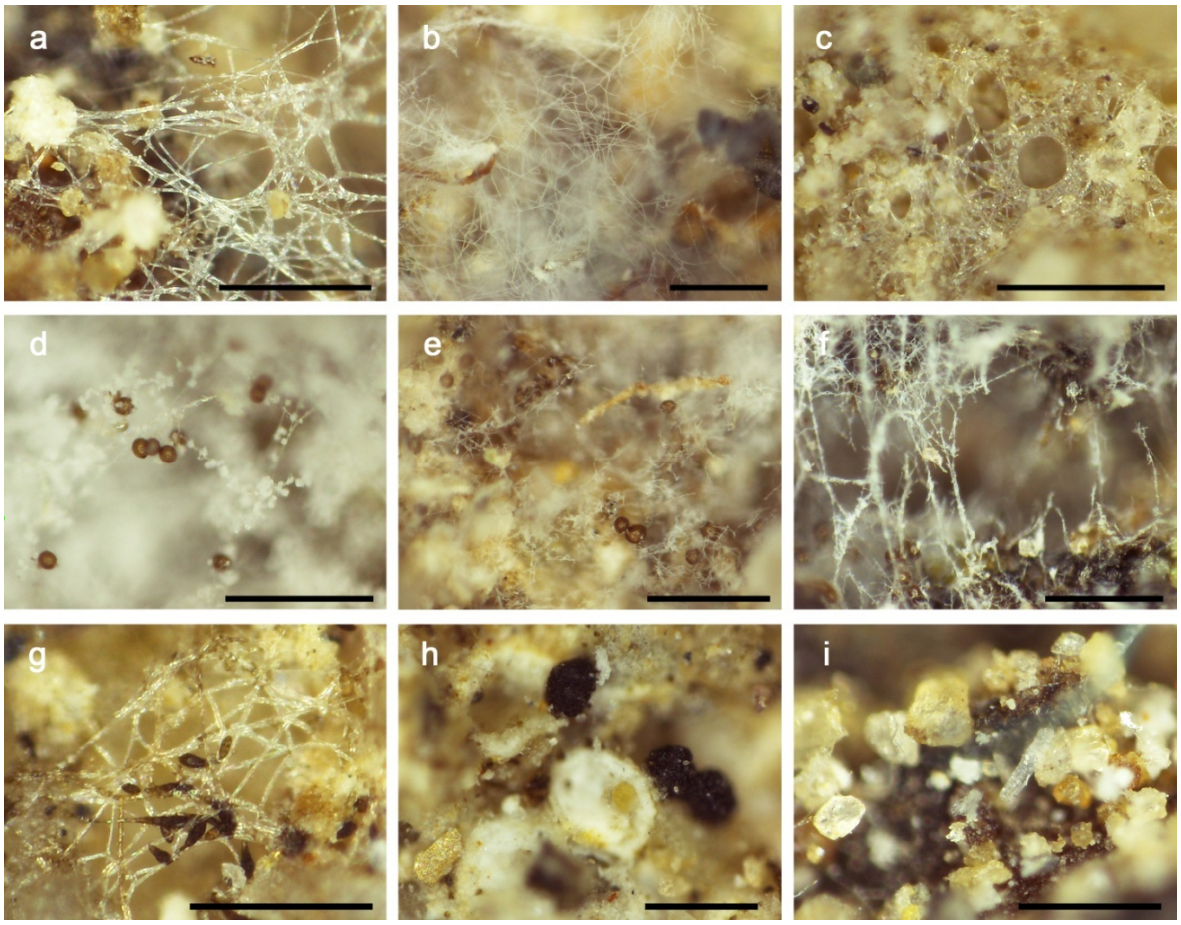
Posmatranjem uzoraka adhezivne trake svetlosnim mikroskopijom, dokumentovana je značajna fungalna kolonizacija. Uočena su tamno pigmentisana plodonosna tela sa melanizovanim sporama oblika zrna kafe – strukture koje odgovaraju peritecijama i askosporama vrste roda *Chaetomium* (Slika 29a). Uočene su i agregacije obovatnih konidija *Acremoniella atra* (Slika 29b) identične sporama pomenute vrste dokumentovanih *in situ* mikroskopijom (Slika 28d–f) kao i razbacane fragmospore *Drechslera* sp. (Slika 29c) i

Tabela 14. Simptomi deterioracije kamene stele i identifikovani taksoni gljiva

Ispitivane strane	Promena			Dokumentovane gljive	
	Izgled	**Opis simptoma deterioracije**	**ID***	**Ime taksona**	**Metoda uzorkovanja****
1. Prednja strana		**pigmentacija** prisutna na celoj površini; **biopiting** dominantan u vršnom delu; **talusi mahovina i lišajeva** u vršnom delu; **hijalna micelija** prekriva veliki deo površine figura. **crna kora** prekriva gornji deo niša;	0,8	*Alternaria* Link spp.	AT
				Bionectria ochroleuca (Schwein.) Schroers & Samuels	KS
				Chaetomium Künze sp.	AT
				Chaetomium murorum Corda	KS
				Cladosporium oxysporum Berk. & M.A. Curtis	SB
				Drechslera S. Ito sp.	AT
				Periconiella Sacc. sp.	AT
2. Zadnja strana		**pigmentacija** prisutna na celoj površini; **talusi mahovina i lišajeva** na gornjoj površini.	0,7	*Acremoniella atra* (Corda) Sacc.	AT
				Alternaria Link sp.	AT
				Cladosporium Link spp.	AT
				Epicoccum nigrum Link	SB
				Mucor racemosus Fresen.	KS
				Trichoderma harzianum Rifai	SB
3. Bočne strane (leva/ desna)		**biopiting** u vršnom delu; **blaga pigmentacija** prisutna na celoj površini; **talusi mahovina** na gornjoj polovini.	levo 0,8	*Cladosporium* Link sp.	AT
				Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries	SB
				Drechslera S. Ito sp.	AT
		biopiting zabeležen na 2/3 površine; **pigmentacija srednjeg intenziteta** na celoj površini; **talusi mahovina** prisutni pri vrhu.	desno 0,8	*Epicoccum nigrum* Link	AT
				Fusarium proliferatum (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg	SB
4. Gornja strana		**pigmentacija** prisutna na celoj površini; **talsui mahovina i lišajeva** prekrivaju celu površinu.	0,8	*Alternaria* Link spp.	AT
				Cladosporium Link spp.	AT
				Penicillium crustosum Thom	SB
				Rhizopus stolonifer (Ehrem.) Vuill	SB
				Trichothecium roseum (Pers.) Link	AT

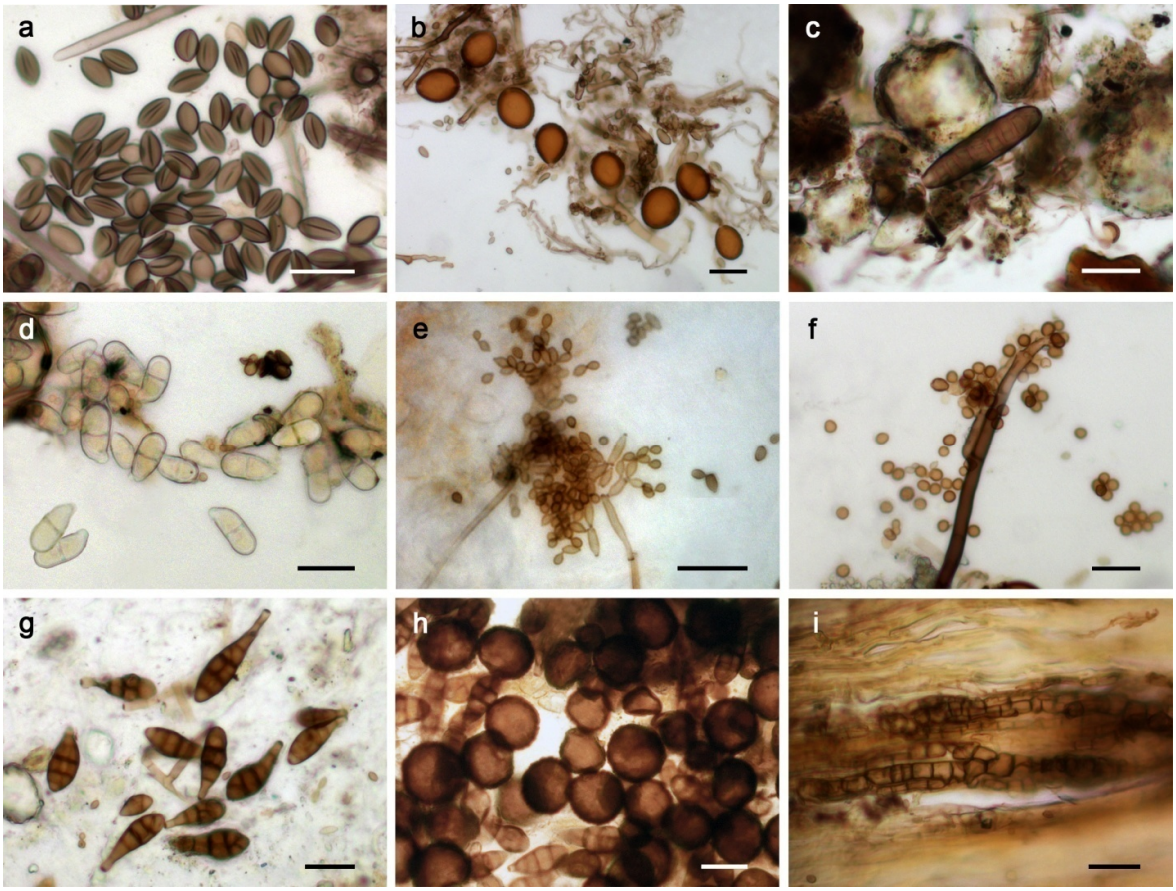
*ID – indeks deterioracije svake ispitivane strane; **AT – adhezivna traka; KS – kontaktni slajdovi; SB – sterlni brisevi

didimospore *Trichothecium roseum* (Slika 29d). Pored toga, uočeni su dugački, melanizovani konidiofori sa ramokonidijama i konidijama koji morfološki odgovaraju *Cladosporium cladosporioides* (Slika 29e) kao i melanizovana micelija, konidiofori i konidije koje odgovaraju opisu *Periconiella* sp. (Slika 29f), *Alternaria* sp. (Slika 29g) i *Epicoccum nigrum* (Slika 29h). Takođe su uočeni i fragmenti talusa mahovina (Slika 29i), talusi lišajeva, ćelije algi i lisni trihomi.



Slika 28. Kolonizacija kamene stele pre konzervatorskog tretmana: a–c) mreža hifa koja prekriva fragmente kamena; d–f) micelija i melanizovane obovatne konidije *Acremoniella atra*; g) micelija i melanizovane diktiospore *Alternaria* sp.; h) talusi lišajeva; i) granularna površina deterioriranog kamena (bar = 150 µm; *in situ* mikroskopija)

Na osnovu morfo-fizioloških karakteristika identifikovane su vrste izolovane pomoću brisa i kontaktnih slajdova: *Clonostachys rosea*/*Bionectria ochroleuca,* vrste rodova *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Trichoderma*. Kolonije kod kojih sporulacija nije detektovana označene su kao *Mycelia sterilia*. Dodatno, molekularnim analizama, na osnovu homologije dobijenih sekvenci sa GenBank bazom, potvrđena je morfo-fiziološka identifikacija (Tabela 15).

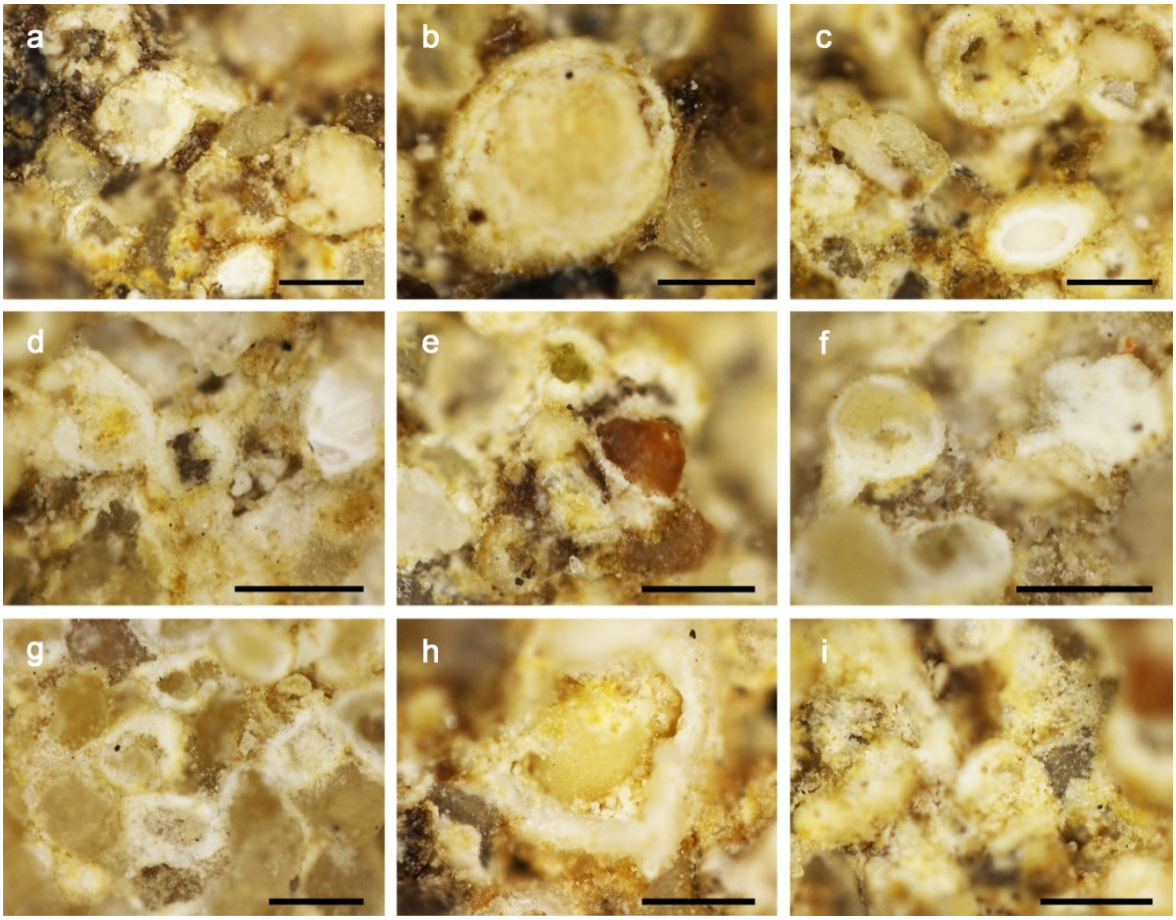


Slika 29. Fungalne strukture na površini kamene stele: a) askospore *Chaetomium* sp.; b) konidije *Acremoniella atra*; c) fragmospora *Drecschlera* sp.; d) didimospore *Trichothecium roseum*; e) konidiofor, ramokonidije i konidije *Cladosporium cladosporioides*; f) konidiogeni aparat *Periconiella* sp.; g) diktiospore *Alternaria* sp.; h) diktiospore *Epicoccum nigrum*; i) tkivo talusa mahovine prožeto melanizovanim hlamidosporama (bar = 20 μm; svetlosna mikroskopija)

Nakon konzervacije stele, primenom *in situ* optičke mikroskopije, dokumentovana je deterioriana površina kamena prekrivena talusima lišajeva sa uočljivim apotecijama (Slika 30). Micelija i reproduktivne strukture mikromiceta nisu zabeležene. Fungalne strukture nisu zabeležene ni na uzorcima adhezivne trake. RB CAF podloge na kontaknim slajdovima, apliciranim nakon tretmana, su ostale uglavnom sterilne (izolovane su samo dve kolonije roda *Alternaria* sp.). Dodatno, metodom sterilnih briseva su izolovane malobrojne kolonije identifikovane kao *Aspergillus* sect. *Nigri*, *Cladosporium* sp. i *Penicillium* sp.

Tabela 15. Molekularna identifikacija fungalnih izolata sa kamene stele

Br.	Blast rezultat	Šifra izolata	Genbank pristupni broj	Genomski region	Homologija (%)
1	*Bionectria* cf. *ochroleuca* CBS 113336	BEOFB3301m	EU552110	*ITS II*	99,66
2	*Chaetomium murorum* strain 00153-1	BEOFB730m	KT192199	*ITS I*	99,62
3	*Cladosporium cladosporioides* strain STE-U 3683	BEOFB1829m	AY251074	*ITS II*	99,88
4	*Cladosporium oxysporum* strain ATCC 66669	BEOFB1832m	EF101454	*β-tubulin*	100,00
5	*Epicoccum nigrum* strain KUC21264	BEOFB1708m	T207680	*β-tubulin*	100,00
6	*Fusarium proliferatum* isolate AZhT01	BEOFB854m	KJ938409	*β-tubulin*	100,00
7	*Mucor racemosus* strain ATCC 42647	BEOFB3500m	FJ345353	*ITS II*	98,86
8	*Penicillium crustosum* NRRL 32595	BEOFB11300m	EF634372	*ITS II*	99,89
9	*Rhizopus stolonifer* CBS 609.82	BEOFB3600m	AB512268	*EF1-α*	98,43
10	*Trichoderma harzianum* strain CKP01	BEOFB1231m	KC330218	*ITS I*	99,11



Slika 30. Kolonizacija kamene stele nakon konzervatorskog tretmana: a–i) talusi lišajeva sa apotecijama (bar = 150 μm; *in situ* optička mikroskopija)

5.6 Potencijal biodeterioracije fungalnih izolata sa kamene stele

Od svih izolata sa kamene stele, biodeteriorativni potencijal je testiran kod 5 izolata (Tabela 16). Sposonobnost rastvaranja $CaCO_3$ je zabeležena u kulturi *Penicillium crustosum* u vidu pojave transparentne zone oko kolonije. Produkcija pigmenata je zabeležena samo kod *Fusarium proliferatum* – manifestovana kao promena boje medijuma, posledica sekrecije ekstracelularnog pigmenta tamno crvene boje. S druge strane, ni kod jednog testiranog izolata nije zabeležena značajna sposobnost produkcije kiselina dok je

povećanje pH vrednosti tečnog medijuma zabeleženo samo za *F. proliferatum* i *P. crustosum*.

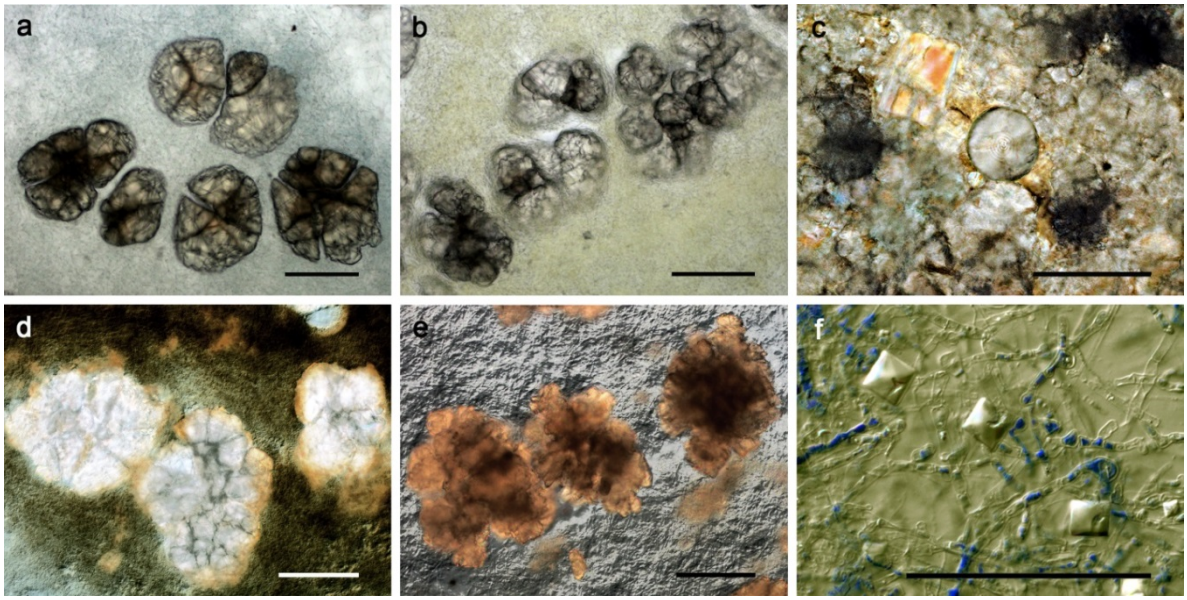
Tabela 16. Biodeterioracioni potencijal odabranih izolata sa kamene stele

Izolat	Produkcija kiselih/baznih metabolita (pH vrednost)	Produkcija pigmenata	Solubilizacija $CaCO_3$	Biomineralizacija	
				B4	Modofikovan B4
Chaetomium murorum	7,0	-	-	kal	-
Bionectria ochroleuca	7,0	-	-	kal, vev	-
Fusarium proliferatum	8,45	+	-	kal	-
Penicillium crustosum	7,0 – 7,79	-	+	ved, kal	ved, kal
Trichoderma harzianum	6,67 – 6,78	-	-	kal	-

(+) – test pozitivan, (-) – test negativan, kal – kalcit, vev – vevelit, ved – vedelit

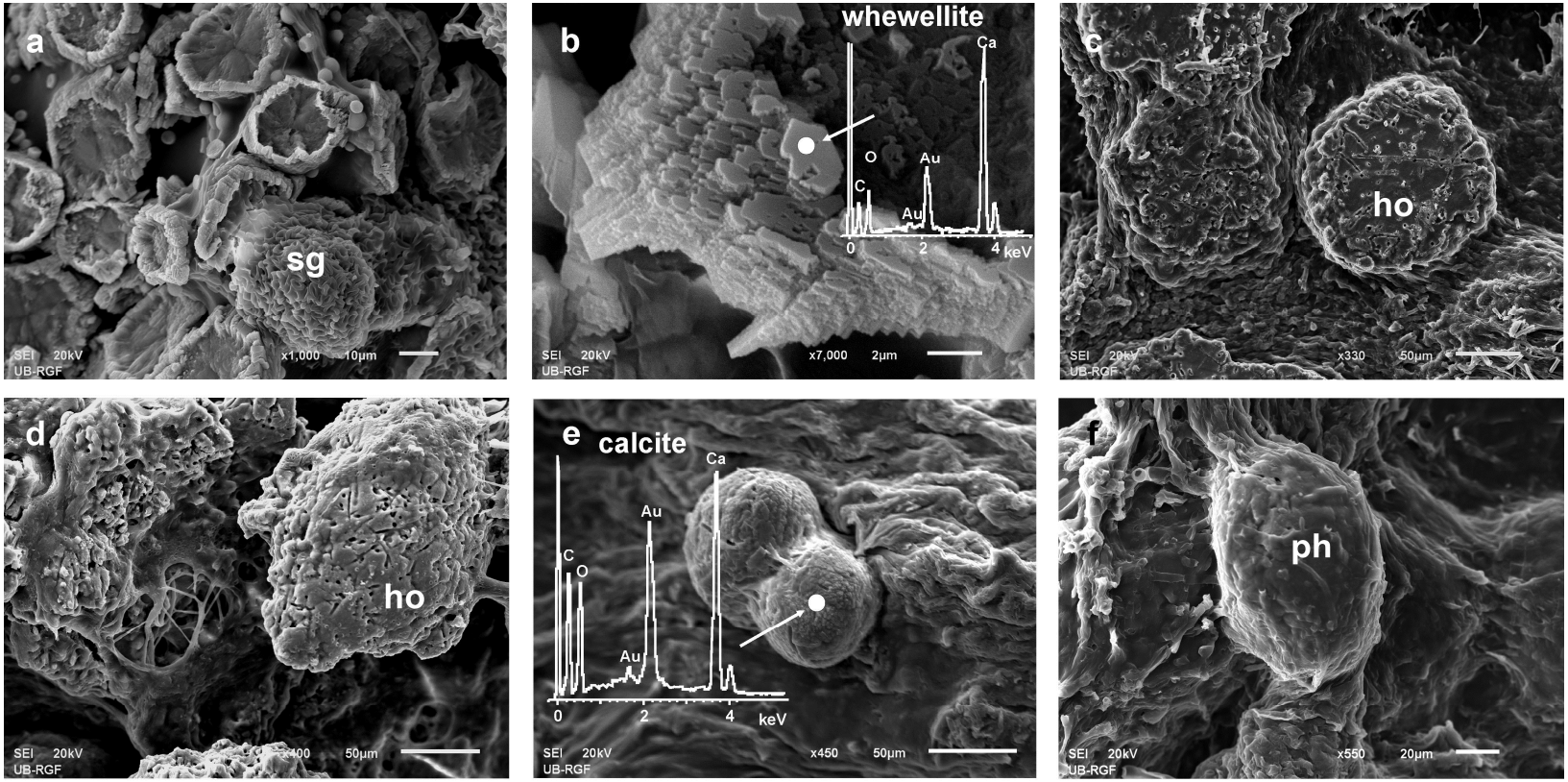
Biomineralizacija je detektovana kod svih testiranih izolata inkubiranih na B4 podlozi. U kulturi *Bionectria ochroleuca* su zabeleženi kristalni agregati kalcita, pljosnati, oblika polusfere (Slike 31e i 32a). EDS analizom utvrđen je hemijski sastav kristalnih agregata koji odgovara kalcijum oksalatu, najverovatnije formi vevelita: C ~16,5 wt%, Ca ~30,5 wt% i O ~53,0 wt% (Slika 32b). Sferične i elipsoidne forme kalcita su uočene u kulturama *Trichoderma harzianum* i *F. proliferatum* (Slike 31a,d i 32d–f). Na površini kristala vidljiva je gusta hifalna mreža koja ga u potpunosti prekriva (Slika 32f) kao i karakteristični „otisci" verticilatne forme kondiogenog aparata *T. harzianum* (Slika 32d). Kristali kalcita, formirani u kulturi *Chaetomium murorum*, su skoro kockastog oblika što je karakteristično za tetragonalnu formu kalcijum oksalata, tj. vedelita (Slike 31b, 32c). Ipak, analiza hemisjkog sastava ovih kristala je potvrdila prisustvo kalcitne forme $CaCO_3$ (11,5 wt% C, 40,5 wt% Ca, 48,0 wt% O). U kulturi *P. crustosum* su zabeležene dve mineralne faze: kalcijum oksalat (vedelit) i kalcijum karbonat (kalcit) (Slike 31c i 33a–f). Vedelit je

zabeležen u formi kristala oblika kombinovane tetragonalne prizme i bipiramide, ređe u formi bipiramide, dok su kristali kalcita sferičnog onlika i dimenzija do 50 μm (Slika 33e,f).

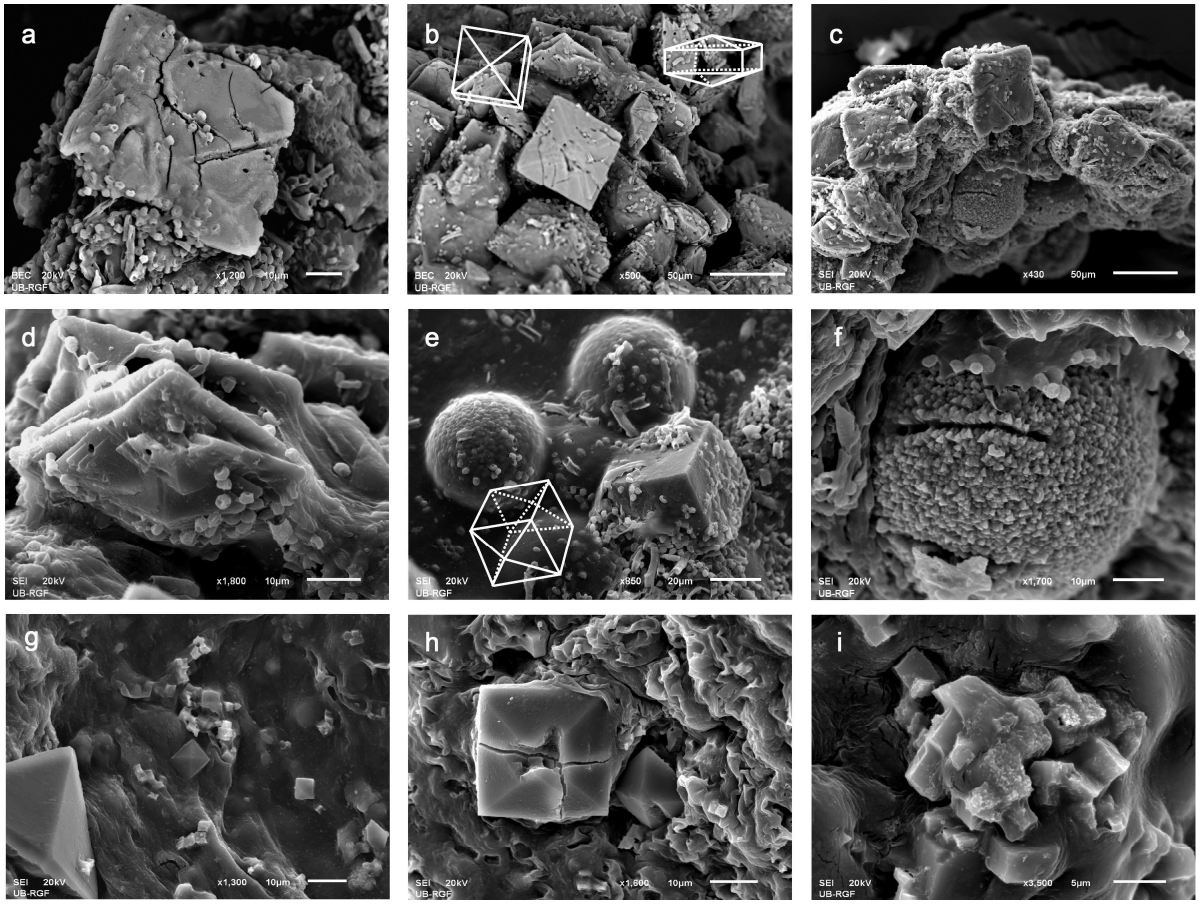


Slika 31. Sekundarni mikogeni minerali testiranih izolata: a) *Fusarium proliferatum*; b) *Chaetomium murorum*; c i f) *Penicillum crustosum*; d) *Trichoderma harzianum*; e) *Bionectria ochroleuca* (a–e. B4; f. modifikovana B4 podloga) (bar = 20 μm; svetlosna mikroskopija)

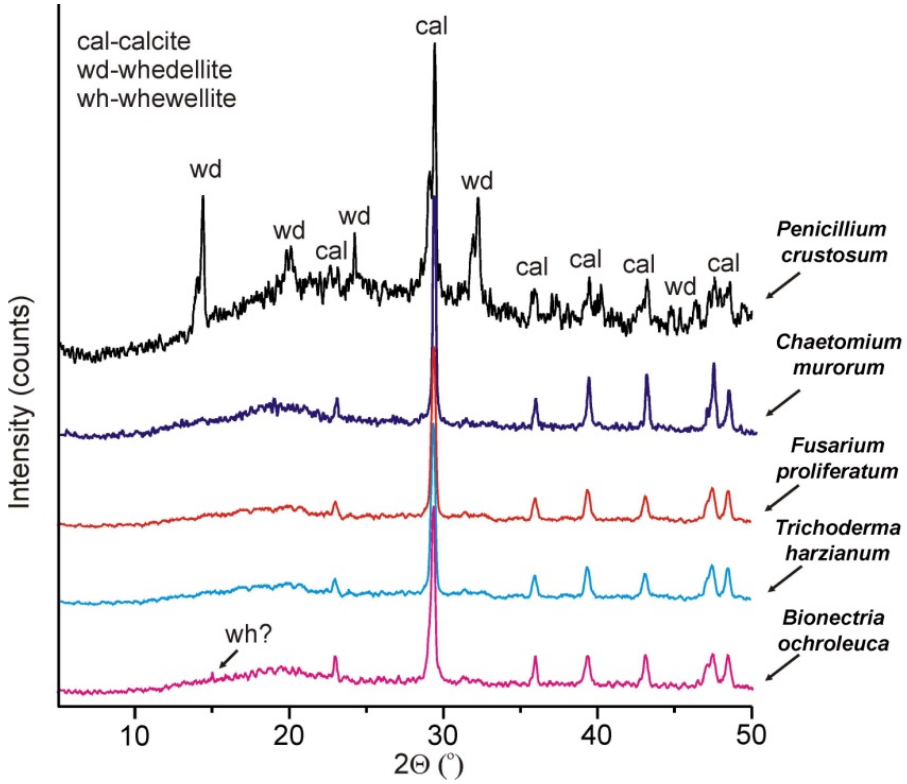
Biomineralizacija na modifikovanoj B4 podlozi je zabeležena samo u kulturi *P. crustosum* gde su formirani kristali vedelita i kalcita. Kao i u slučaju kristala ovog izolata na B4 podlozi, vedelit je u formi tetragonalne prizme sa bipiramidom (Slike 31f i 33g–i). XRPD analize uzoraka B4 podloge potvrđuju prisustvo kalcita. Dodatno, vedelit je identifikovan u uzorku *P. crustosum* dok su male količine vevelita verovatno prisutne u uzorku *B. ochroleuca* (Slika 34).



Slika 32. Sekundarni mikogeni minerali na B4 podlozi: a i b) vevelit *Bionectria ochroleuca*; c) kalcit *Chaetomium murorum*; d) kalcit *Trichoderma harzianum*; e i f) kalcit *Fusarium proliferatum* (sg – sluzave konidijalne glavice, ho – hifalni „otisci", ph – „prekrivač" od hifa) (SEM-EDS)



Slika 33. Sekundarni mikogeni minerali *Penicillium crustosum*: a–f) vedelit (bipiramidalna forma i forma kombinovane tetragonalne prizme i tetragonalne bipiramide) i kalcit (sferična forma) formirani u kulturi na B4 podlozi; g–i) kristali vedelita na modifikovanoj B4 podlozi (SEM-EDS)



Slika 34. Spektar mineralnih faza vedelita i kalcita formiranih u kulturama testiranih izolata (XRPD)

5.7 Hemisjki sastav etarskih ulja

Analizom etarskog ulja *Achillea millefolium* identifikovane su 43 komponente (97,92%) od koji su najzastupljenije bile eukaliptol (28,08%) i kamfor (10,57%) (Tabela 17). Analizom etarskog ulja *Leptospermum scoparium* identifikovano je 50 komponenti (97,07%) od kojih je najzastupljenija α-pinen (26,01%) (Tabela 18).

Tabela 17. Hemisjki sastav etarskog ulja *Achillea millefolium*

Komponenta	Udeo (%)	Komponenta	Udeo (%)
santolina trien	0,48	borneol	4,57
triciklen	0,30	terpinen-4-ol	1,47
α-tujen	0,22	*p*-cimen-8-ol	0,26
α-pinen	2,18	*α*-terpineol	1,07
kamfen	2,59	mirtenal	0,42
sabinen	0,88	grandizol	1,16
β-pinen	1,74	*trans*-hrizantenil acetat	1,74
jomogi alkohol	1,02	kuminaldehid	0,19
α-terpinen	0,60	havikol	0,23
p-cimen	8,29	*cis*-hrizantenil acetat	1,18
eukaliptol (1,8 cineol)	**28,08**	boranil acetat	1,75
γ-terpinen	6,60	kumil alkohol	0,56
artemizia keton	0,44	timol	0,34
artemizia alkohol	1,07	*cis*-karidol	1,60
p-cimenen	0,34	*cis*-jasmon	0,51
trans-tujan-4-ol	0,34	*β*-kariofilen	0,95
α-tujon	5,73	germakren D	0,27
β-tujon	3,08	*α*-kurkumen	0,29
hrizantenon	1,05	kariofilen oksid	0,65
trans-*p*-ment-2-en-1-ol	0,67	viridiflorol	0,28
kamfor	**10,57**	*β*-eudezmol	0,23
trans-hrizantenol	1,93	-	-
Ukupno		**97,92%**	

Tabela 18. Hemisjki sastav etarskog ulja *Leptospermum scoparium*

Komponenta	Udeo (%)	Komponenta	Udeo (%)
α-tujon	0,34	*β*-elemen	1,55
***α*-pinen**	**26,01**	*α*-gurjunen	0,58
sabinen	0,10	*β*-kariofilen	5,52
β-pinen	3,88	*β*-gurjunen	0,62
β-mircen	1,65	aromadendren (+)	0,34
α-terpinen	0,12	3,7-guadien	2,59
p-cimen	0,68	*α*-humulen	2,14
limonen	1,10	(E)-*β*-farnezen	0,77
1,8-cineol	3,99	aloaromadendren	0,65
β-ocimen	0,28	*β*-hamigren	1,73
γ-terpinen	0,87	*α*-amorfen	2,02
p-menta-2,4(8)-dien	0,28	*β*-selinen	5,20
linalol	3,45	*α*-selinen	7,22
izoamilizovalerat	0,27	δ-kadinen	1,36
terpinen-4-ol	0,28	kalaren	0,10
α-terpineol	0,77	*β*-kadinen	3,96
citronelil format	0,26	kadina-1,4-dein	0,74
geraniol	1,30	*α*-kalakoren	0,44
metil geranat	0,05	elemol	0,08
α-kubeben	1,57	spatulenol	0,33
citronelil acetat	0,35	kariofilen oksid	0,63
α-ilangen	1,06	guaiol	0,16
α-kopaen	0,09	*γ*-eudezmol	1,59
metil cinamat	3,33	hinezol	0,28
geranil acetat	1,41	*α*-eudezmol	2,60
Ukupno		**97,07%**	

5.8 Antifungalna aktivnost testiranih biocida

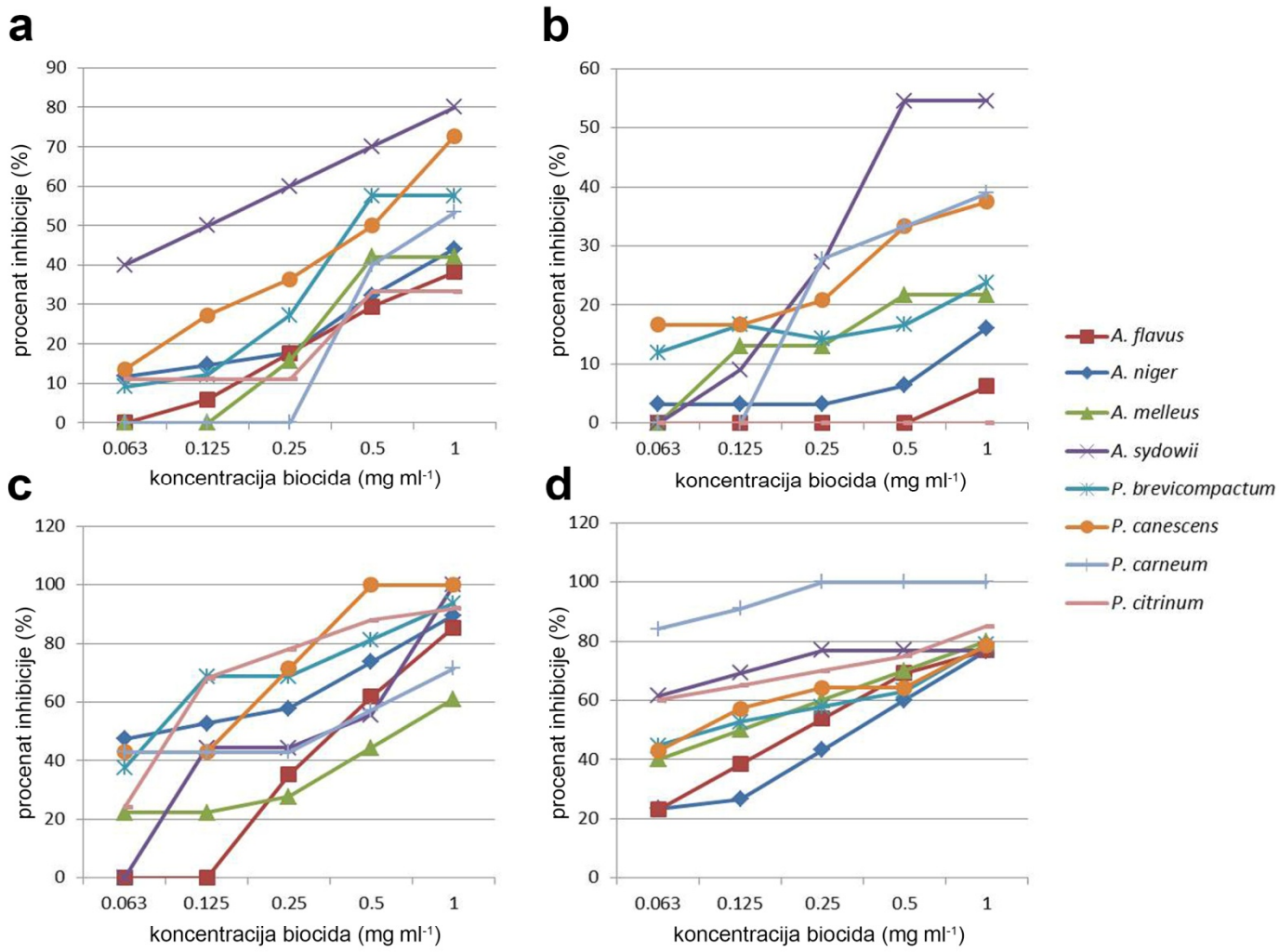
Antifungalna aktivnost je testirana na aerogene izolate identifikovane tokom istraživanja. Najviši indeksi antiungalne aktivnosti (IA) su zabeleženi za BAC (1,000) i etarsko ulje *C. zeylanicum* (0,781) što ih svrstava u kategoriju vrlo jakih biocida (Tabela 19). MIK i MFK vrednosti BAC-a su bile 0,1 mg ml^{-1}, odnosno 0,1 – 0,5 mg ml^{-1} dok su kod etarskog ulja *C. zeylanicum* bile u opsegu 0,5 – 1,0 mg ml^{-1} tj. 1,0 – 10,0 mg ml^{-1}. Na osnovu dobijenih IA vrednosti, metil salicilat (0,688) i etarsko ulje *E. caryophyllata* (0,531) spadaju u kategoriju jakih biocida dok etarska ulja *A. millefolium* (0,500) i *L. scoparium* (0,281) spadaju u biocide srednje antifungalne aktivnosti. Najniži antifungalni potencijal je zabeležen za etarsko ulje *C. carvi* (IA = 0,156) gde su sve MFK i većina MIK vrednosti bile iznad 10,0 mg ml^{-1} (kategorija slabih biocida). Najrezistentniji testirani izolat je bio *A. flavus* gde inhibicija rasta nije postignuta ni pri jednoj testiranoj koncentraciji ulja *C. carvi*, *L. scoparium* i *A. millefolium* dok u slučaju etarskog ulja *E. caryophyllata* nije pokazan fungicidni efekat. Međutim, iako su zabeležene MFK vrednosti za etarsko ulje *C. zeylanicum* i metil salicilat, one su bile relativno visoke (10,0 mg ml^{-1}). Najsenzitivniji izolat je bio *P. citrinum* gde su zabeležene MIK opsega 0,1 – 5,0 mg ml^{-1}.

Rezultati metode mikroatmosfere i agar dilucione metode potvrđuju antifungalni potencijal testiranih supstanci različitog intenziteta (Slike 35 i 36). Na osnovu dobijenih vrednosti inhibicije rasta kolonije (IR) najjača antifungalna aktivnost je dobijena za BAC i metil salicilat. U slučaju BAC-a, IR testiranih izolata pri koncentraciji od 0,500 mg ml^{-1} je bila u opsegu 60 – 100% dok je isti efekat za metil salicilat bio pri koncentraciji od 1,000 mg ml^{-1}. Potpuna inhibicija rasta (IR = 100%) je bila kod izolata *A. sydowii* i *P. canescens* pri koncentraciji 1 mg ml^{-1} metil salicilata (Slika 35c) dok je isti efekat bio za *P. carneum* u slučaju primene BAC-a pri koncentracijama 0,250 – 1,000 $mgml^{-1}$ (Slika 35d). Nešto slabiji antifungalni potencijal zabeležen je za etarsko ulje *A. millefolium* gde je inhibicija iznad 50% postignuta za *A. sydowii* i testirane izolate vrsta roda *Penicillium* (Slika 35a). Za etarsko ulje *L. scoparium* je zabeležena relativno slaba antifungalna aktivnost s obzirom da je inhibicija iznad 50% postignuta samo za izolat *A. sydowii* (Slika 35b).

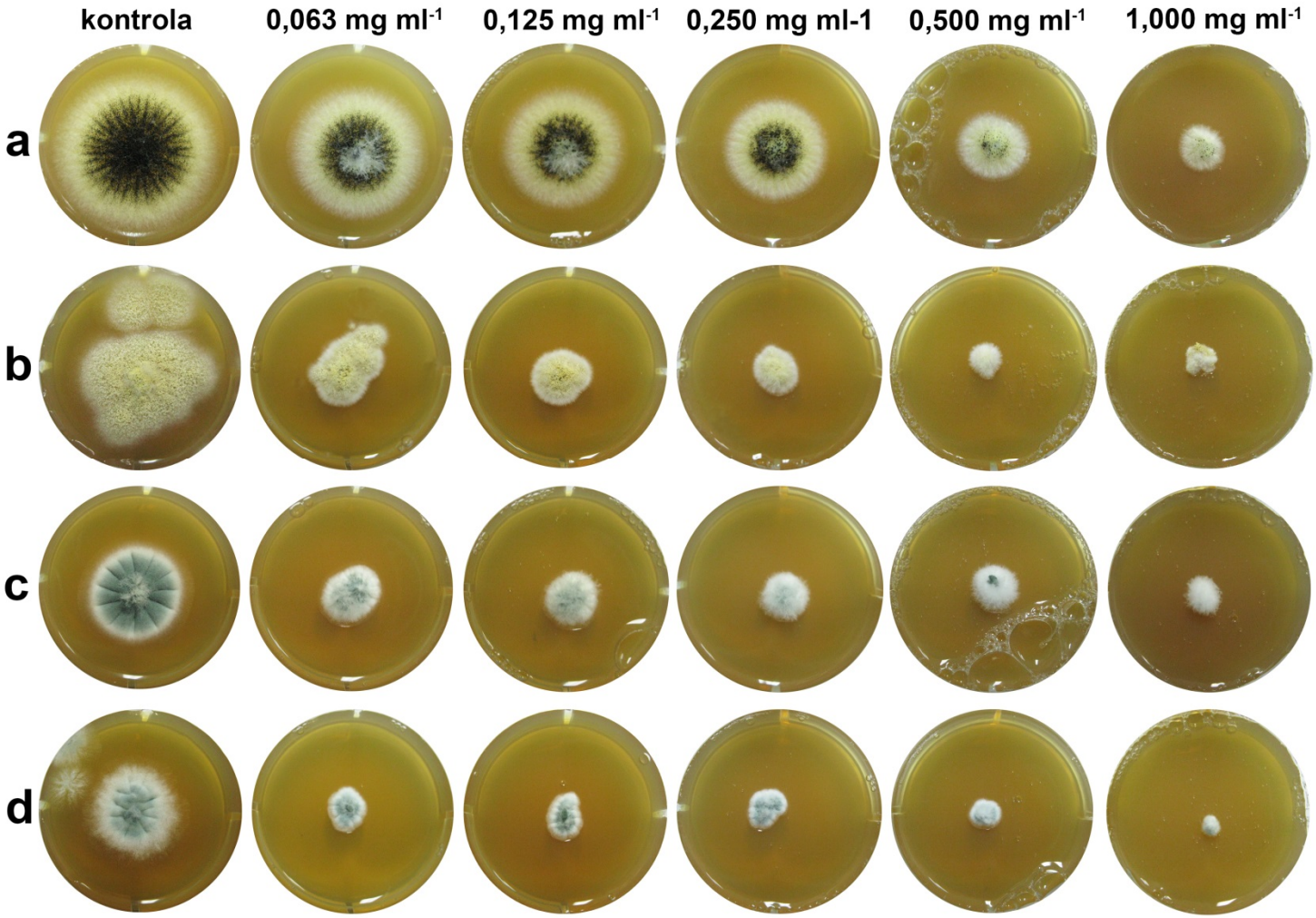
Tabela 19. Antifungalna aktivnost ispitivanih etarskih ulja, metil salicilata i benzalkonijum hlorida (BAC) primenom mikrodilucione metode

Vrsta	*Eugenia caryophyllata*		*Cinamomum zeylanicum*		*Carum carvi*		*Leptospermum scoparium*		*Achillea millefolium*		Metil salicilat		BAC	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
A. flavus	1,0	> 10,0	1,0	10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	10,0	0,1	0,1
A. melleus	1,0	5,0	0,5	5,0	5,0	> 10,0	1,0	> 10,0	0,5	5,0	0,1	5,0	0,1	0,5
A. niger	5,0	5,0	0,5	5,0	> 10,0	> 10,0	5,0	> 10,0	5,0	10,0	0,5	> 10,0	0,1	0,5
A. sydowii	10,0	> 10,0	1,0	5,0	> 10,0	> 10,0	0,1	> 10,0	0,5	> 10,0	0,1	5,0	0,1	0,1
P. brevicompactum	5,0	5,0	1,0	5,0	> 10,0	> 10,0	10,0	> 10,0	5,0	10,0	0,1	5,0	0,1	0,1
P. canescens	5,0	> 10,0	1,0	5,0	> 10,0	> 10,0	10,0	> 10,0	1,0	5,0	0,5	0,5	0,1	0,1
P. carneum	0,5	1,0	0,5	5,0	0,5	> 10,0	5,0	> 10,0	5,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	0,1	0,1
P. citrinum	5,0	5,0	0,5	1,0	1,0	> 10,0	5,0	> 10,0	1,0	10,0	0,5	0,5	0,1	0,1
Indeks aktivnosti	**0,531**		**0,781**		**0,156**		**0,281**		**0,500**		**0,688**		**1,000**	

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija (mg ml^{-1}), MFK – minimalna fungicidna koncentracija (mg ml^{-1}); crveno (0,1 – 1,0 mg ml^{-1}), narandžasto (5,0 i 10,0 mg ml^{-1}); žuto > 10,0 mg ml^{-1}



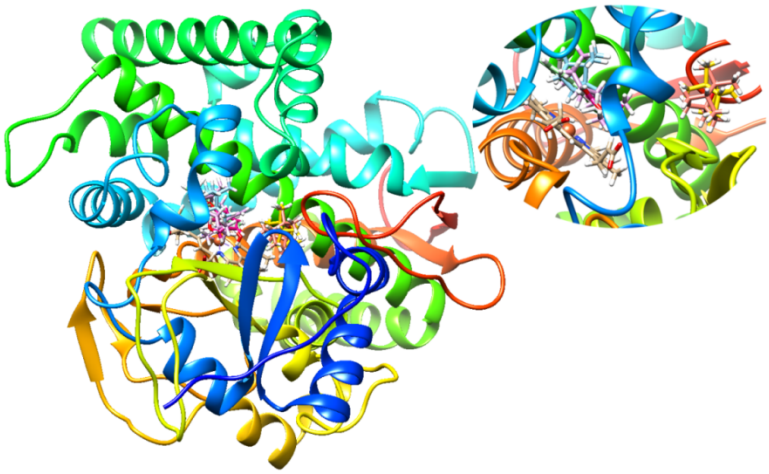
Slika 35. Antifungalna aktivnost etarskih ulja: a) *Achillea millefolium*; b) *Leptospermum scoparium*; c) metil salicilata; d) benzalkonijum hlorida



Slika 36. Efekat različitih koncentracija benzalkonijum hlorida na rast kolonija testiranih izolata: a) *Aspergillus niger*; b) *A. melleus*; c) *Penicillium brevicompactum*; d) *P. citrinum*

Pored uticaja na dinamiku rasta kolonija, zabeležena je i postepena depigmentacija reproduktivnih struktura i smanjenje intenziteta sporulacije pri višim koncentracijama BAC-a (Slika 36), metil salicilata i etarskih ulja *A. millefolium* i *E. caryophyllata*.

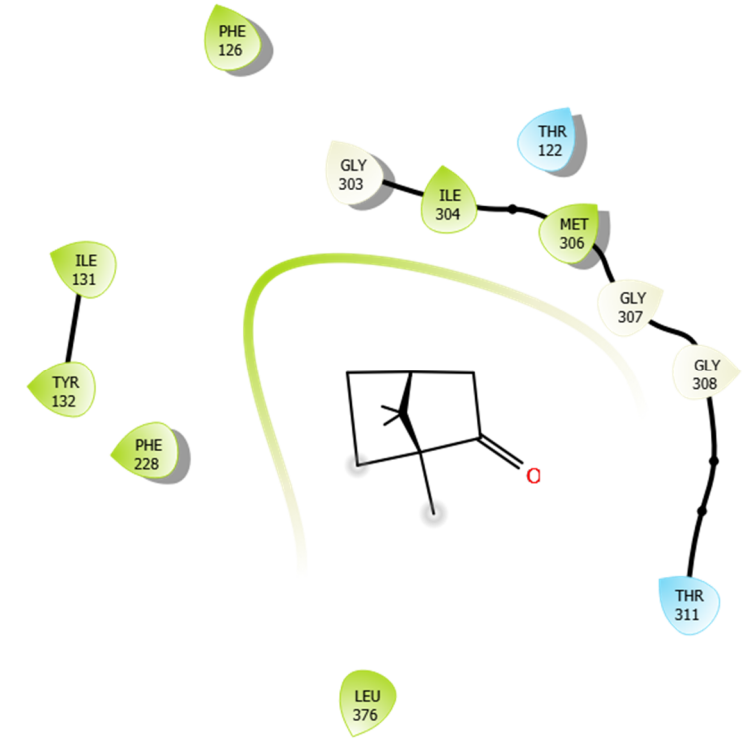
Metodom molekularnog dokinga pokazane su interakcije komponenti etarskih ulja sa CYP51 i dobijene skoring funkcije su prikazane u Tabeli 20. Za sva ispitivana jedinjenja dokumetovan je određeni tip interakcije sa CYP51 enzimom. Tako, za eukaliptol i α-pinen su zabeležene slabe interakcije sa kofaktorom. Pomenuti molekuli ne formiraju vodonične niti kompleksne veze sa kofaktorom i u ovom slučaju su zabeležene samo veoma slabe Van der Valsove veze. Dobijene vrednosti pokazuju da eugenol formira vodoničnu vezu sa hem grupom kofaktora. Najviša energija interakcije sa kofaktorom je takođe dobijena za eugenol. Od svih ispitivanih jedinjenja, samo je za metil salicilat zabeleženo formiranje vodoničnih veza sa amino kiselinama aktivnog mesta CYP51. Za eukaliptol i α-pinen je pokazano formiranje najjačih Van der Valsovih veza i sternih interakcija sa amino kiselinama aktivnog mesta CYP51. Razmatranjem svih interakcija i na osnovu funkcija Moldokovog i Rerankovog skora, najjača interakcija sa CYP51 je dokazana za kariofilen. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se ispitivani molekuli vezuju za dve određene lokacije unutar aktivnog mesta CYP51, i to u neposrednoj blizini kofaktora (kariofilen, eugenol, cinamaldehid, metil salicilat i kamfor) kao i na lokaciji udalejnoj od kofaktora (eukaliptol i α-pinen). Optimalne pozicije vezivanja unutar aktivnog mesta CYP51 su date na Slici 37 a njihovi dvodimenzionalni modeli na Slikama 38–44.



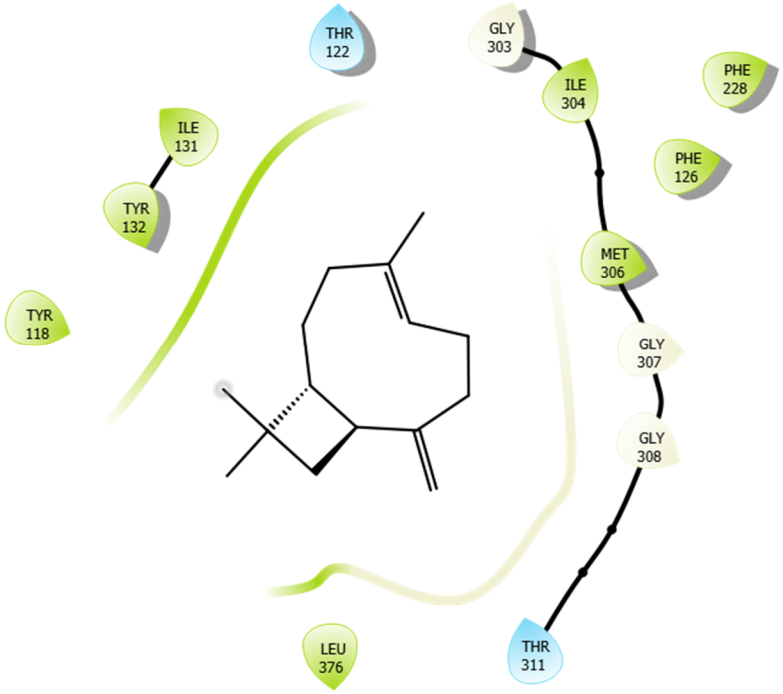
Slika 37. Optimalne pozicije ispitivanih jedinjenja unutar aktivnog mesta CYP51

Tabela 20. Vrednosti skoring funkcija (kcal mol^{-1}) ispitivanih komponenti etarskih ulja i metil salicilata

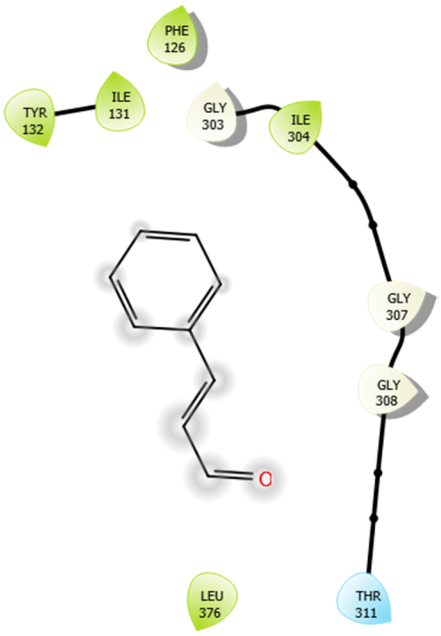
Molekul	Cofactor (VdW)	Cofactor (hbond)	E-Inter (cofactor - ligand)	E-Inter (protein - ligand)	E-Inter total	Energy	HBond	Moldock Score	Rerank Score	Steric	VdW
Kariofilen	0,364713	0	-58,6169	-39,9483	-98,5652	-101,175	0	-98,6199	-66,4363	-39,9483	-12,1077
Eugenol	-17,0473	-1,59899	-67,8641	-30,3404	-98,2045	-88,6994	0	-92,7115	-58,7574	-30,3404	-10,8901
Cinamaldehid	-12,8123	0	-49,0897	-33,4308	-82,5205	-76,7042	0	-75,4839	-55,1727	-33,4308	-13,3398
Metil salicilat	-16,7632	0	-62,2709	-28,2508	-90,5217	-75,4633	-4,9295	-78,9012	-56,2568	-23,3213	-10,7264
Kamfor	-9,2080	0	-34,6457	-35,7687	-70,4144	-61,0671	0	-59,5818	-47,8317	-35,7687	-13,4482
Eukaliptol	-0,0811	0	0	-72,8421	-72,8421	-58,6001	0	-57,263	-53,9362	-72,8421	-22,2914
α-pinen	-0,0412	0	0	-69,5219	-69,5219	-55,6941	0	-52,0836	-51,3346	-69,5219	-22,935



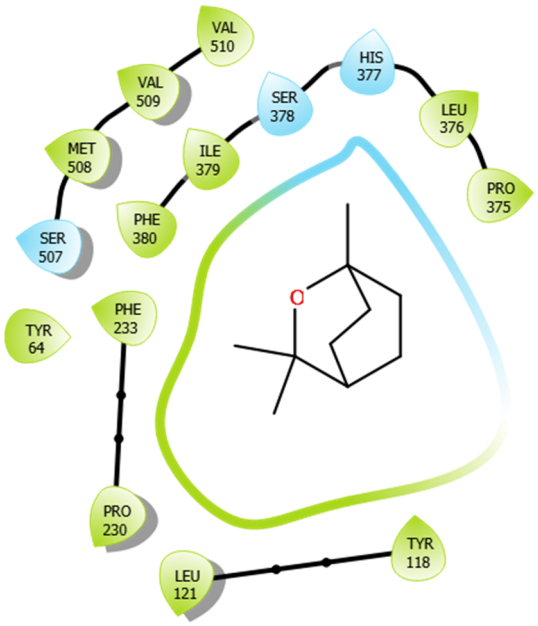
Slika 38. Dvodimenzionalni model interakcije kamfora unutar aktivnog mesta CYP51



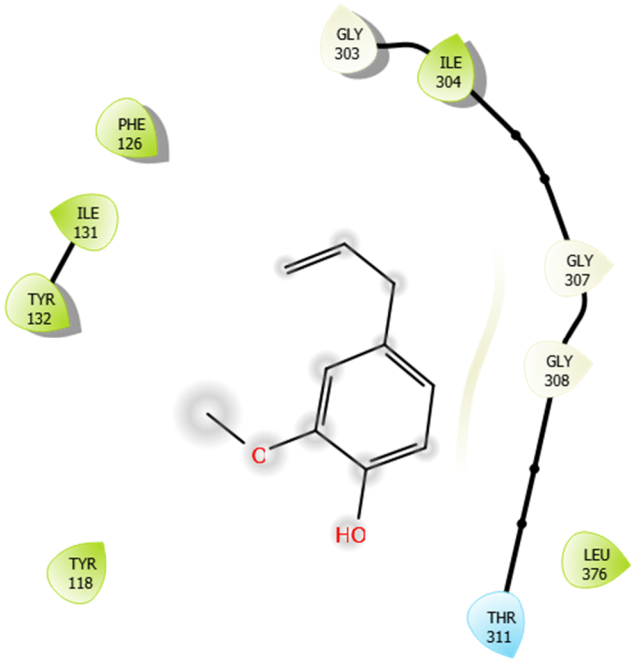
Slika 39. Dvodimenzionalni model interakcija kariofilena unutar aktivnog mesta CYP51



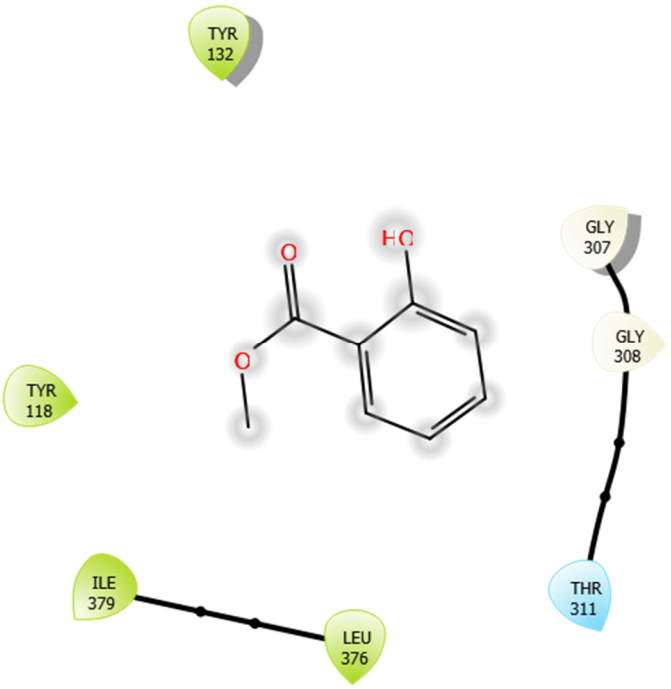
Slika 40. Dvodimenzionalni model interakcija cinamaldehida unutar aktivnog mesta CYP51



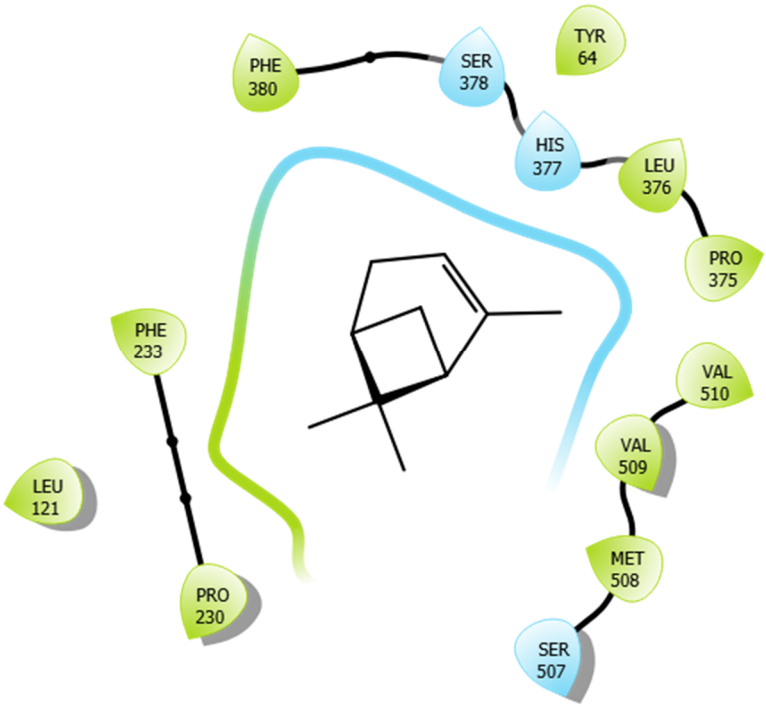
Slika 41. Dvodimenzionalni model interakcija eukaliptola unutar aktivnog mesta CYP51



Slika 42. Dvodimenzionalni model interakcija eugenola unutar aktivnog mesta CYP51



Slika 43. Dvodimenzionalni model interakcija metil salicilata unutar aktivnog mesta CYP51



Slika 44. Dvodimenzionalni model interakcija α-pinena unutar aktivnog mesta CYP51

6 Diskusija

Institucije čija je funkcija čuvanje, javno izlaganje ili konzervacija predmeta kulturne baštine (arhivi, muzeji, biblioteke i drugi) su često smeštene u starim zgradama sa neadekvatinim uslovima. Temperatura, vlažnost i kontaminacija iz spoljašnjih izvora utiču na povećanje koncentracije bioaerosola što ugrožava kako same objekte kulturne baštine tako i zdravlje ljudi (di Carlo i dr., 2016). Stoga je određivanje koncentracije vijabilnih propagula gljiva u vazduhu i proučavanje diverziteta izolata neophodno u cilju utvrđivanja kontaminacije artefakata i potencijalnog uticaja na ljudsko zdravlje.

6.1 Distribucija i diverzitet mikromiceta u vazduhu

Vrednosti koncentracije spora u ispitivanim prostorijama su bile relativno visoke tokom celog perioda uzorkovanja, pogotovu tokom prolećnog i letnjeg perioda. Vrednosti od preko 150 CFU m^{-3}, prema standardima propisanim za italijanske biblioteke (MIBAC, 2001), zabeležene su u većini prostorija tokom zimskog, jesenjeg i prolećnog perioda dok su navedene vrednosti izmerene u svim prostorijama tokom letnjeg perioda. U određenim prostorijama, pre svega u hodniku prizemlja i ostave, koncentracije spora prelazile su merljive vrednosti od 25.000 CFU m^{-3}. Treba napomenuti da koncentracije propagula gljiva u prometnim prostorijama mogu u određenim slučajevima dostići nivo i do 10^9 m^{-3} vazduha (Piecková i Jesenská, 1999). Izmerene vrednosti ukazuju na veoma visoku fungalnu kontaminaciju u istraživanim prostorijama. Do danas ne postoje opšte prihvaćeni limiti koncentracije spora zatvorenih prostora i prema Rao i dr. (1996) kvantitativni standardi su u opsegu od 100 CFU m^{-3} do preko 1000 CFU m^{-3} ukupnih fungalnih propagula. Kao što je pomenuto, standardi Svetske zdravstvene organizacije iz 1990. godine preporučuju vrednosti do 500 CFU m^{-3} za propagule gljiva zatvorenih prostora samo ukoliko su detektovane vrste pripadnici roda *Cladosporium* i drugih čestih gljiva filosfere (World

Health Organization,1990). Ipak, noviji standardi predloženi od strane WHO eksperata, definišu mnogo veći limit, do 1000 CFU m^{-3} (Nevalainen i Morawaska, 2009). Što se tiče standarda za prostorije u kojima se vrši skladištenje predmeta kulturne baštine, preporučeni limiti su 1000 CFU m^{-3} za arhivske prostore (Borrego i dr., 2010, Nunes i dr., 2013) i 150 CFU m^{-3} za italijanske biblioteke (MIBAC, 2001). Pomenuti italijanski stnadard je uzet kao referentan u našoj studiji. Poslednjih godina je objavljen veći broj aerobioloških istraživanja u prostorijama za čuvanje i konzervaciju predmeta kulturne baštine i vrednosti koncentracija bioaerosola variraju od studje do studije. Niesler i dr. (2010) su analizom vazduha u Auschwitz-Birkenau muzeju zabeležili relativno niske vrednosti koncentracije vijabilnog bioaerosola (39 CFU m^{-3} za gljive i 714 CFU m^{-3} za bakterije). Takođe, niske vrednosti vijabilnog bioaerosola su dokumentovane i u univerzitetskom arhivu (Koimbra, Portugalija), 107 CFU m^{-3}, od čega samo 6 CFU m^{-3} za gljive (Nunes i dr., 2013). Prema studiji Borrego i dr. (2010), sprovednoj u prostorijama nacionalnog arhiva Kube, srednje vrednosti koncentracije spora gljiva su bile 492,8 CFU m^{-3} i 1010,4 CFU m^{-3} za bakterije, iako treba naglasiti da se usled različitih klimatskih uslova Kube i Srbije, pomenute vrednosti ne mogu adekvatno porediti sa rezultatima ove disertacije. Dodatno, Karbowska-Berent i dr. (2011) su u vazduhu skladišta bibilioteka i arhiva zabeležili vrednosti ukupnog bioaerosola u opsegu 142 – 798 CFU m^{-3} (od čega 19 – 86 CFU m^{-3} fungalnog aerosola). U skorije vreme su objavljeni i rezultati studije sprovedene upravo u laboratorijama za konzervaciju kulturne baštine u Poljskoj i u ovom slučaju izmerene koncentracije vijabilnog biaerosola su bile u opsegu 105 – 1845 CFU m^{-3} za bakterije i 49 – 413 CFU m^{-3} za gljive (Górny i dr., 2016). Kada se uporede rezultati dobijeni u ovoj disertaciji sa svim pomenutim studijama, uočava se da su citirane koncentracije spora relativno niske. S druge strane, u studiji sprovedenoj u manastirskoj biblioteci (Jasna Góra, Poljska) zabeležene su relativno visoke vrednosti kontaminacije vazduha tokom prolećnog i jesenjeg perioda – do 7100 CFU m^{-3} vijabilnog bioaerosola i čak do 100.000 čestica po m^3 ukupnog bioaerosola (Harkawy i dr., 2011). Navedeno istraživanje je jedno od retkih studija čiji su rezultati u opsegu izmerenih koncentracija vijabilnih propagula u ovoj disertaciji što najverovatnije može biti posledica sličnih mikroklimatskih uslova u ispitivanim objektima.

Različiti faktori kao što su tip građevinskog materijala, prisustvo povišene vlažnosti i kondenzacije, stanje ventilacionih sistema, prašina, ostataci hrane i dr. utiču na koncentraciju i sastav spora u zatvorenim prostorima (Samson i dr., 2010). S obzirom da temperatura zatvorenih prostora ne varira u velikoj meri i čestice prašine mogu sadržati različite nutrijente, smatra se da temperatura i dostupnost hranljivih materija uglavnom nisu limitirajući faktor za rast gljiva u zatvorenim prostorima, iako mogu uticati na dinamiku rasta kao i na fungalni metabolizam. S druge strane, vlažnost je kritičan faktor za fungalni rast i proliferaciju pa se stoga sa povećanjem vlažnosti povećava emisija fungalnih spora i njihova koncentracija u vazduhu (World Health Organization Europe, 2009). Poznato je da su rast gljiva i emisija spora favorizovani u arhivima, muzejima i prostorijama za konzervaciju predmeta kulturne baštine u slučajevima povišene RH vazduha (Samson i dr., 2010). Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa navedenim s obzirom da je zabeležena povišena koncentracija fungalnih spora u vazduhu prostorija sa visokom RH vrednošću, pre svega smeštenih u prizemlju (I1 – I6) (Slika 17d). U ovim prostorijama je aktivnost ljudi povećana a u određenim je ventilacija neadekvatna, pre svega u ostavi koja je van upotrebe i u kojoj je prisutna velika količina vlage. Takođe, i namena prostorija je uticala na koncentraciju spora u vazduhu na višim spratovima, što se može pripisati intenzivnijoj aktvnosti na tim mestima. Bitno je napomenuti i da koncentracija fungalnih spora u zatvorenim prostorima zavisi od spoljašnjih uticaja (Adams i dr., 2013; Nevalainen i dr., 2015). Na taj način se može objasniti podudarnost maksimuma i minimuma koncentracija spora u vazduhu prostorija za konzervaciju sa koncentracijom istih u vazduhu neposredne okoline (Slika 15). Kako srednje vrednosti koncentracije spora u prostorijama tokom prolećnog i letnjeg perioda premašuju srednje vrednosti koncentracija propagula u spoljašnjem vazduhu ne ispunjava se uslov standarda predloženih od strane Oliviera i dr. (2012) i *American conference of governmental industrial hygenists* (1995). Prema preporukama nekih autora, sredinski parametri prostorija koje služe za očuvanje objekata kulturne baštine (muzeja, biblioteka, skladišta umetnina, crkvenih objekata i dr.) jesu: RH vazduha između 50% i 65%, T između 18 i 24 °C, svetlosni intenzitet do 150 lux sa ograničenom upotrebom UV zračenja (200 – 380 nm) i dobra ventilacija (Cacace i dr., 2003). Zabeležene vrednosti mikoklimatskih parametara ispitivanih prostorija za

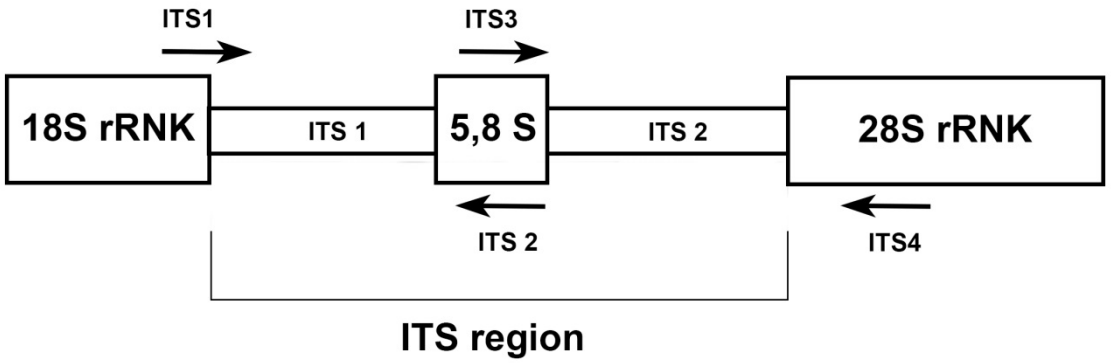
konzervaciju su prevazilazile preporučene vrednosti i dostizale do 30,5 °C (T) i 89,2% (RH).

U slučajevima veoma visokih koncentracija spora u vazduhu, neophodno je utvrditi potencijalne izvore kontaminacije. S obzirom da se u ispitivanim ateljeima vrši kako restauracija, tako i privremeno čuvanje različitih umetničkih predmeta, izvesno je da su predmeti koji se donose na restauraciju jedni od izvora kontaminacije. Artefakti na kojima se vrši restauracija su od raznovrsnih materijala i čuvani su u različitim uslovima pa stoga predstavljaju specifično mikrostanište za razvoj mikobiote. S obzirom da se neposredno pre procesa restauracije predmeti prenose kroz različite prostorije zgrade, neophodno je vršiti aeromikološku analizu u svim prostorijama kroz koje su predmeti prenošeni ili se privremeno odlažu.

Poznato je da koncentracije spora brojnih vrsta gljiva u spoljašnjem vazduhu dostižu svoj maksimum tokom leta i rane jeseni u uslovima umerene klimatske zone (Kasprzyk i Worek, 2006; Kasprzyk, 2008). Nasprot tome, tokom zime i ranog proleća, kada su adekvatni supstrati za rast gljiva oskudni, koncentracije spora u vazduhu su relativno niske (Kasprzyk, 2008). Navedeno je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji s obzirom da su izmerene koncentracije spora u spoljašnjem vazduhu bile najviše tokom letnjeg perioda uzorkovanja (početkom septembra) a najniže tokom zimskog (početkom marta).

Za identifikaciju aerogenih gljiva korišćene su morfo-fiziološke i molekularne karakteristike. Tradicionalne metode se zasnivaju na posmatranju i dokumentovanju makroskopskih karakteristika kolonija, mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura kao i fizioloških osobina. Za potvrdu ili identifikaciju izolata, u ovoj disertaciji je dodatno korišćena metoda sekvenciranja DNK koja je za razliku od tradicionalnih metoda identifikacije visoko reproducibilna, nedvosmislena i prenosiva (Samson i dr., 2010). Pomenuto sugeriše da je neophodno imati adekvatno obučene eksperte u oblastima taksonomije i identifikacije gljiva koji treba da budu ukjuceni u multidisciplinarne timove koji se bave proucavanjem fenomena biodeterioracije kulturne baštine. U ovoj disertaciji, metode molekularne identifikacije su se bazirale na upotrebi prajmera za *ITS* i gena za *β-tubulin*. *Internal transcribed spacer* rDNK region (Slika 45) je prihvaćen kao zvanični

DNK marker za identifikaciju gljiva i predstavlja najčešće sekvenciran genomski region s obzirom da poseduje prajmerska mesta koji su univerzalna za pripadnike ovog carstva (Schoch i dr., 2012). *ITS* region je smešten između rRNK gena male subjedinice ribozoma (18S rRNK, SSU) i rRNK velike subjedinice (28S rRNK, LSU) a čine ga *internal transcribed spacer* 1 (ITS1), 5,8S rRNK i *internal transcribed spacer* 2 (ITS2). Protein



Slika 45. Šematski prikaz nuklearnog RNK cistrona kod gljiva. Pored strelica su naznačena imena prajmera (ITS1-4)

kodirajući geni se takođe široko koriste za identifikaciju vrsta i filogenetske analize u mikologiji i adekvatniji su za identifikaciju taksona unutar razdela Ascomycota (Schoch i dr., 2009; Schoch i dr., 2012). Gen za *β-tubulin* je odgovarajući marker za identifikaciju vrsta rodova *Penicillium* i *Aspergillus* (Samson i dr., 2010). U ovoj disertaciji, primenom tradicionalnih metoda bilo je moguće identifikovati određene izolate samo do nivoa podroda ili sekcije a pomoću molekularnih metoda su identifikovani do nivoa vrste. To su, pre svega, vrste rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* i *Alternaria*, koje se teško mogu adekvatno identifikovati samo na osnovu morfo-fizioloških karakteristika. Dodatno, primenom molekularnih metoda je izvršena identifikacija izolata čije kolonije nisu sporulisale na korišćenim podlogama, pre svega pripadnika razdela Basidiomycota (kao što su pripadnici rodova *Irpex*, *Coprinellus*, *Schizophyllum* i dr.). Takođe, na ovaj način su identifikovane i vrste pripadnici specifičnih ekoloških grupa kao što su animalni i biljni patogeni (pripadnici rodova *Beauveria* i *Nothophoma*) a koje u aeromikološkim studijama mogu biti zanemarene. Stoga se poslednjih godina molekularne

metode sve češće primenjuju u identifikaciji biodeteriogena u bibliotekama, muzeijima i arhivskim prostorima (Skóra i dr., 2015; Micheluz i dr., 2015; de Carvalho, 2018; Ponizovskaya i dr., 2019).

U vazduhu istraživanih prostorija za konzervaciju artefakata zabeležen je veliki diverzitet fungalnih taksona pri čemu su spore *Cladosporium*, *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta bile najzastupljenije. Pomenuti rezultat je u saglasnosti sa utemeljenom činjenicom da su spore pripadnika ovih vrsta najčešće u zatvorenim prostorima što je i potvrđeno rezultatima brojnih studija (Pei-Chih i dr., 2000; Shelton i dr., 2002; Wu i dr., 2003; de Ana i dr., 2006 i drugih). Poznato je da vrste pomenutih rodova formiraju suve spore male mase koje se lako odvajaju od konidiofora, pa je njihova emisija u okolni vazduh olakšana. Stoga spore pomenutih vrsta mogu biti masovno prisutne u vazduhu zatvorenih prostora i mogu se lako inhalirati (Samson i dr., 2010; Viegas i dr., 2015). Nasuprot tome, transmisija spora *Fusarium*, *Beauveria* i *Trichoderma* vrsta, koje se formiraju u sluzavim agragatima, je otežana pa su one manje zastupljene u vazduhu (Samson i dr., 2010; Viegas i dr., 2015) što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disetaciji.

Studije o sezonskoj dinamici spora gljiva u vazduhu su relativno malobrojne pa rezultati ove disertacije predstavljaju, generalno, značajan doprinos aeromikološkim istraživanjima, posebno u oblasti biodeterioracije objekata kulturne baštine. Sezonska dinamika brojnosti aerogenih spora *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria, Fusarium, Aspergillus* i *Trichoderma* vrsta objašnjava se promenama u dostupnosti supstrata tokom godine (Slika 16, Tabela 9). Povećane koncentracije spora biljnih patogena su evidentne tokom toplijeg perioda godine, tj. tokom vegetacionog perioda. Slična sezonska distribucija spora je zabeležena za vrste roda *Cladosporium* u vazduhu bolnice u Francuskoj (Sautour i dr., 2009) i za vrste roda *Alternaria* u stambenim prostorijama (de Ana i dr., 2006).

S obzirom da su gljive izolovane u ovom istraživanju pripadnici različitih ekoloških grupa, može se konstatovati da je u aeromikološkim studijama neophodna upotreba većeg broja mikoloških podloga kako bi se izvršila optimalna izolacija i dobila slika što realnijeg diverziteta prisutnih gljiva. Treba istaći važnost što potpunije izolacije kserofilnih i celulolitičkih vrsta s obzirom na njihov značaj u procesu deterioracije predmeta kulturne baštine.

6.2 Biodeterioracioni potencijal aerogenih izolata

Brojne identifikovane aerogene gljive su u literaturi već citirane u kontekstu biodeterioracije i/ili biodegradacije (Florian, 2002; Caneva i dr., 2008b; Sterflinger, 2010). S obzirom da su vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* bile najzastupljenije u ovoj studiji i činjenice da su veoma značajne u procesima biodeterioracije i biodegradacije njima je posvećena posebna pažnja. Vrste pomenutih rodova su značajne, pre svega kao česti kontaminanti brojnih tipova supstrata, i često su izolovane iz vazduha zatvorenih prostora (Samson i dr. 2010). One su takođe brojne i na objekatima i predmetima kulturne baštine na kojima mogu izazvati pojavu kako estetskih tako i strukturnih promena usled izražene metaboličke aktivnosti.

Vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* su poznate i kao oligotrofne vrste, često izolovane sa kamenog supstrata, kojeg mogu da degradiraju mehaničkim ili biohemijskim putem (Warscheid i Braams, 2000; Scheerer i dr., 2009). Rastvaranje krečnjaka, kao posledica metaboličke aktivnosti gljiva, je poznat ali još uvek nedovoljno izučen fenomen u kontekstu objekata kulturne baštine od kamena (Unković i dr., 2018). Rastvaranje krečnjaka u prirodi se dešava posredstvom produkcije organskih kiselina i liganada kao i kroz redoks reakcije (Jones i Pemberton, 1987). U ovoj disertaciji, ratsvaranje karbonata je demonstrirano za samo 5 aerogenih *Aspergillus* i *Penicillium* izolata. Literaturni podaci u pogledu rastvaranja $CaCO_3$ od strane *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta su kontradiktorni. Albertano i Urzi (1999) nisu dokazali rastvaranje $CaCO_3$ od strane gljiva izolovanih sa kamenog supstrata iz Katakombi Svetog Kalista i Priscile u Rimu. S druge strane, ova sposobnost je demonstrirana za *A. versicolor*, *A. flavus* i *A. awamori* kao i za različite vrste roda *Penicillium* izolovanih iz vazduha i sa različitih umetničkih predmeta (Pangallo i dr., 2009; Pangallo i dr., 2012). Navedeni autori saopštavaju da je *P. chrysogenum* aktivan u razgradnji $CaCO_3$ što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Dodatno, Unković i dr. (2018) su pokazali sposobnost *A. niger*, *A. europaeus* i određenih *Penicillium* vrsta, izolovanih iz vazduha i sa zidnih slika, da rastvaraju kalcit dok je u našoj studiji ta sposobnost pokazana samo za *A. niger*. Neki autori naglašavaju da je ekskrecija kiselina

povezana sa rastvaranjem $CaCO_3$ pa je stoga utvrđivanje potencijala produkcije kiselina važan korak u razumevanju procesa biodeterioracije kamenog supstrata (Burford i dr., 2003; Ortega-Morales i dr., 2016). Pomenuti iskaz je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja s obzirom da su svi izolati koji su pokazali sposobnost rastvaranja $CaCO_3$ imali i sposobnost produkcije kiselina prilikom kultivacije kako u tečnoj tako i na čvrstoj podlozi.

Warscheid i Braams (2000), analizirajući faktore koji utiču na deterioraciju kamena, ističu da gljive imaju sposobnost produkcije kako neorganskih (ugljena kiselina) tako i organskih kiselina (glukonska, limunska, oksalna, fumarna i druge). Organske kiseline su produkt primarnog metabolizma i njihova produkcija zavisi od dostupnosti uljenika u supstratu. Stoga je u našoj studiji nakon samo 72 h kultivacije izmerena značajna promena pH vrednosti u tečnoj podlozi. Kiseline igraju važnu ulogu u rastvaranju katjona i u reakcijama helacije. Organske kiseline su od posebnog značaja u procesu deterioracije s obzirom da imaju sposobnost interakcije sa različitim metalima što rezultira u formiranju soli (Garg i dr., 1995). Posebno je značajna oksalna kiselina, s obzirom da utiče na formiranje kristala kalcijum oksalata koji izazivaju deterioraciju kamenog supstrata (Dakal i Cameotra, 2012; Savković i dr., 2016b). Pretpostavlja se da veliki broj vrsta gljiva ima pomenutu sposobnost, tj. da u većoj ili manjoj meri, formiraju oksalnu kiselinu što posledično vodi precipitaciji oksalata (Sterflinger, 2000; Ortega-Morales i dr. 2016). Isto tako, i za *Aspergillus* i *Penicillium* vrste je pokazano da produkuju kiseline sa snažnim korozivnim efektom (Gutarowska, 2010). U ovoj disertaciji, produkcija kiselina je zabeležena za veći broj izolata, pre svega za vrste roda *Penicillium*. Iako su ih određeni izolati produkovali tokom kultivacije i u tečnoj i na čvrstoj podlozi, za neke nije pokazana ova doslednost što se može objasniti činjenicom da sposobnost produkcije zavisi od tipa podloge i uslova kultivacije. Za *Talaromyces sayulitensis* je izmerena najviša promena pH vrednosti u tečnoj podlozi dok je ista aktivnost dokumentovana za *A. niger* i *P. expansum* na CREA što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija. Naime, *A. niger* je veoma poznat producent limunske, oksalne i glukonske kiseline (Samson i dr., 2010). Takođe, produkcija glukonske kiseline je zabeležena za *P. expansum* (Barad i dr., 2012) dok je *T. sayulitensis* citiran kao snažan producent kiselina od strane Visagie i dr. (2014). Produkcija

raznovrsnih kiselih metabolita je dokumentovana i za druge vrste roda *Penicillium* (Bartman i dr., 1981; Frisvad i dr., 2004).

Aerogene mikromicete poseduju izražen metabolički potencijal, pre svega u produkciji hidrolitičkih enzima, pa se u tu svrhu primenjuju različiti enzimski testovi u cilju evaluacije potencijala degradacije supstrata (de Nuntiis i Palla, 2017). Stoga je testiranje produkcije proteaza i celulaza u ovoj doktorskoj tezi bilo značajno zbog uloge ovih enzima u deterioraciji predmeta kulturne baštine od organskog materijala. Test proteolitičke aktivnosti, koji je korišćen u našoj studiji, je inicijalno osmišljen za identifikaciju bakterija mlečnokiselinskog vrenja ali je pronašao svoju upotrebu i u izučavanju biodeterioracionog potencijala gljiva (Pangallo i dr., 2012). Ovom metodom je moguće utvrditi potencijalnu produkciju ekstracelularne kazeaze koja katalizuje razlaganje kazeina do oligopeptida i amino kiselina. Pod uticajem enzimske aktivnosti, dolazi do formiranja transparentne zone oko kolonije izolata koji daje pozitivnu reakciju. Iako se pomenutom metodom ne može precizno utvrditi kvantitet produkovane kazeaze, smatra se da je ova metoda prihvatljiva za inicijalno testiranje proteolitičke aktivnosti različitih izolata (Saran i dr., 2007). Vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* se generalno smatraju dobrim producentima kazeaze i stoga su jedni od primarnih razlagača proteina koji ulaze u sastav predmeta kulturne baštine kao što su pergament, svilene i vunene tkanine ili adhezivi bojenog sloja umetničkih slika (Unković i dr., 2018). Dokumentovana proteolitička aktivnost izolata *A. versicolor*, *A. sydowi*, *A. europeus* i *A. creber* u našim istraživanjima je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija (Pangallo i dr., 2012; Rojas i dr., 2012; Unković i dr., 2018). Nasuprot pomenutom, za izolate *A. flavus* i *A. niger* nije zabeležena proteolitička aktivnost, iako su često citirani kao proteolitičke vrste (Rojas i dr., 2012; Shivani i Kumar, 2015; Anaya i dr., 2016; Borrego i dr., 2017). Za određene aerogene izolate poreklom iz objekta za konzervaciju u Srbiji, kao što su *A. proliferans*, *A. jensenii*, *A. protuberus* i *A. tabacinus*, po prvi put je demonstrirana proteolitička aktivnost. Podaci o proteolitičkom kapacitetu vrsta roda *Penicillium* variraju. Specifičan primer je *P. chrysogenum*, za koga su određeni autori pokazali produkciju kazeaze (Rojas i dr., 2012; Borrego i dr., 2017) dok su rezultati drugih autora (Anaya i dr., 2016), uključujući i rezultate ove disertacije, pokazali upravo suprotno. Navedeno potvrđuje činjenicu da izolati iste vrste mogu imati različit metabolički profil

čime se naglašava da je fiziološka karakterizacija izolata u studijama biodegradacije i biodeterioracije objekata kulturne baštine neophodna u istoj meri koliko i identifikacija uzročnika.

Celuloza se smatra jednim od najzastupljenijih organskih molekula na planeti što implicira obilje potencijalnog supstrata za gljive (Horton, 2012). Brojni predmeti kulturne baštine sadrže celulozu: arhivski dokumenti, drvene figure i skulpture, lanene tkanine i drugi. Razlagači celuloze produkuju kompleks celulolitičkih enzima (Pasquariello i dr., 2008a). Kao posledica enzimske reakcije, celuloza se degradira u prostije ugljene hidrate koje mikroorganizmi mogu lako da usvoje. Na degradaciju celuloze značajan uticaj imaju sredinski faktori: povećanje temperature i relativne vlažnosti stimulišu rast biodeteriogena dok hemijski faktori mogu uticati na depolimerizaciju celuloznih lanaca koji su tada podložniji degradaciji od strane mikroorganizama (Pasquariello i dr., 2008b). Do sada poznate mikromicete sa celulolitičkim potencijalom pripadaju rodovima: *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria, Aspergillus* i *Penicillium* (Wainwright, 1999; Harkawy i dr. 2011). Vrste pomenutih rodova su često citirane u kontekstu degradacije arhivskih materijala i knjiga u bibliotekama (Nittérus, 2000; Lugauskas i Krikŝtaponis, 2004; Harkawy i dr., 2011). Iako su određene *Aspergillus* i *Penicillium* vrste poznati producenti celulaza, degradacija celuloze još uvek nije dokumentovana za brojne vrste pomenutih rodova. Neke od vrsta koje su često citirane kao degraderi celuloznih materijala jesu *A. aculeatus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *P. funiculosum*, *P. luteum* i *P. purpurogenum* (de Vries i Visser, 2001; Pasqariello i dr., 2008b). Treba naglasiti da neke vrste izolovane sa papira vrše asimilaciju samo neceluloznih supstanci kao što su parafin, voskovi i gume koji se mogu naći na određenim vrstama papira (Nyuksha, 1994). U ovoj disertaciji, degradacija celuloze na CMC podlozi je zabeležena za većinu testiranih izolata. Primenjena metoda se bazira na kuplovanju boje za molekul polisaharida – ukoliko dođe do hidrolize boja-polimer kompleksa, produkti hidrolize difunduju u prostor okoline kolonije što rezultira pojavom oreola žute boje (Jo i dr., 2009). U ovom slučaju, degradacija karboksimetil celuloze je indikacija produkcije endoglukanaza koje nasumično vrše hidrolizu unutrašnjih β-1,4-D-glikozidnih veza u celulozi (Onsori i dr., 2005). Primenom iste metode kao u našoj studiji, nekoliko autora su demonstrirali celulolitičku aktivnost *A.*

niger (Onsori i dr., 2005; Narasimha i dr., 2016). Degradacija celuloze je takođe demonstrirana za *Aspergillus* i *Penicillium* vrste izolovane iz arhivskih prostorija, uključujući *A. flavus*, *A. niger*, *P. chrysogenum* i *P. citrinum* (Anaya i dr., 2016; Borrego i dr., 2017). Dodatno, Pangallo i dr. (2009) su dokumentovali najviši stepen celulolitičke aktivnosti za različite izolate vrsta pomenutih rodova izolovanih iz vazduha zatvorenih prostora i sa drvenih umetničkih predmeta. Neke gljive za koje je demonstrirana proteolitička i/ili celulolitička sposobnost su izolovane ili iz prostorija u kojima se vrši restauracija predmeta od tekstila ili iz biblioteke, pa stoga predstavljaju potencijalnu opasnost za deponovane predmete.

Poznato je da gljive mogu biti uzročnici estetskih promena na predmetima i objektima kultune baštine i da ove promene nastaju kao posledica rasta micelije i/ili produkcije pigmenata (Sterflinger, 2010). Gljive produkuju pigmente različite boje i hemijske strukture i njihova sinteza je zavisna od kako sredinskih faktora tako i od fiziološkog stanja organizma. Neki od sredinskih uslova koji utiču na sintezu pigmenata su dostupnost ugljenika, azota i metala u supstratu kao i intenzitet UV radijacije (Florian, 2002). Pored produkcije melanina, koji su često uzrok pojave raznovrsnih pigmentacija na kamenim spomenicima, estetske alteracije na organskim materijalima su često izazvane kao posledica ekskrecije različitih ekstracelularnih pigmenata (Pinna i Salvadori, 2008b). U ovoj disertaciji, produkcija pigmenata je detektovana uglavnom za vrste roda *Penicillium*. Houbraken i dr. (2010) su pokazali produkciju solubilnog žutog pigmenta vrste *P. citrinum*. Dodatno, poznato je da vrste roda *Talaromyces* produkuju difundujuće pigmente žute, narandžaste ili crvene boje (Yilmaz i dr., 2014). Treba napomenuti da su neki autori zabeležili produkciju pigmenata i za vrstu *A. niger* (Rojas i dr., 2012; Borrego i dr., 2017) što nije dokumentovano u ovoj disertaciji. Pomenuti disparitet se može objasniti činjenicom da izolati iste vrste mogu produkovati pigmente različitih boja ili čak da pokazuju potpuno odsustvo produkcije ukoliko su izolovani sa različitih supstrata (Rojas i dr., 2012).

Treba napomenuti da za nekoliko testiranih izolata (*A. domesticus*, *A. penicillioides*, *A. pseudoglaucus* i *A. ruber*) nije uočena pozitivna reakcija ni u jednom primenjenom *in vitro* testu ili je izmeren veoma slab porast na korišćenoj podlozi (*A. amstelodami* i *A. proliferans*). Ipak, to nužno ne znači da pomenuti izolati nemaju sposobnost degradacije

niti da pomenute vrste nemaju ulogu u procesu deterioracije objekata kulturne baštine. Ove vrste pripadaju ekološkoj grupi kserofila i stoga njihova dinamika rasta može biti mala ili je rast odsutan na određenim tipovima mikoloških podloga. Međutim, u uslovima sniženih a_w vrednosti supstrata, što nije redak slučaj na predmetima kulturne baštine, neke od vrsta mogu imati značajnu dinamiku rasta i biti uzročnici kako estetskih tako i strukturnih promena. U ovom kontekstu, bitno je pomenuti pojavu foksing (*foxing*) fenomena koji se javlja na papirnom materijalu a čiji su uzročnici *A. penicillioides* i *Eurotium herbariorum* (Arai, 2000). *A. pencilliioides* je veoma retko dokumentovan u svom istraživanju s obzirom da se radi o ekstremno kserofilnoj vrsti koja se jako teško izoluje. Nasuprot navedenom, za neke izolate u našoj studiji je pokazana višestruka biodeteriorativna aktivnost. Tako, neki izolati imaju potencijal da vrše deterioraciju velikog broja supstrata, uključujući kamen, papir, drvo, bojene slojeve slika i dr. kao i da uzrokuju estetske promene produkujući ekstracelularne pigmenate. S obzirom da je u svetu veliki broj objekata kulturne baštine u opasnosti od fungalne infestacije, poznavanje biologije gljiva i ispitivanje potencijala biodeterioracije autohtonih izolata je od krucijalnog značaja za adekvatnu prevenciju i zaštitu kulturno istorijskih dobara.

Kod većine ispitivanih aerogenih izolata u našoj studiji je zabeležena produkcija sekundarnih mikogenih minerala. Kao što je rečeno, ova sposobnost je verovatno rezultat aktivnosti testiranih izolata da vrše produkciju različitih neorganskih i/ili organskih kiselina koje reaguju sa supstratom pri čemu dolazi do formiranja kristala oksalata i karbonata (mehnizmi ovih procesa će biti opisani u poglavlju 6.4 koji se odnosi na biodeterioraciju kamena). Treba napomenuti i da je morfologija mikogenih minerala predložena u svojstvu potencijalnog taksonomskog karaktera mada je to i dalje predmet debate (Gadd i dr., 2014). Unković i dr. (2017) su saopštili mineralnu precipitaciju za određene pripadnike rodova *Aspergillus* i *Penicillium* izolovanih sa zidnih slika i iz vazduha sakralnog objekta, uključujući *A. europaeus*, *A. flavus* i *A. niger*. S druge strane, nisu potvrdili ovu aktivnost za *A. creber* i *A. versicolor*, koja je zabeležena u testu biomineralizacije u našoj studiji. Produkcija kristala oksalata je dokumentovana na papirnom supstratu od strane *A. terreus* (Pinzari i dr., 2010). S druge strane, biomineralizacija na B4 podlozi nije dokumentovana ni za jedan aerogeni izolat iz prostorija Slovačke nacionalne galerije iako je zabeleženo

formiranje kristala od strane izolata gljiva sa drvenih skulptura (Pangallo i dr., 2009). Veoma je bitno napomenuti da su krstali oksalata fungalnog porekla bili prisutni na papiru sa foksing promenama (Piñar i dr., 2015). Ipak, formiranje minerala posredstvom metaboličke aktivnosti gljiva je najčešće zabeleženo na izolatima sa kamenog supstrata (Burford i dr., 2006; Gadd i dr., 2014; Savković i dr., 2016b). S obzirom da je demonstrirano da brojni predstavnici rodova *Aspergillus* i *Penicillium* imaju sposobnost precipitacije minerala, može se zaključiti da je ispitivanje potencijala aerogenih izolata da vrše biomineralizaciju isto toliko neizostavno u procesu konzervacije predmeta kulturne baštine kao i testiranje produkcije kiselina, pigmenata i enzima.

Pored ispitivanih predstavnika rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces*, treba napomenuti da su u našoj studiji izolovane i druge vrste često citirane u kontekstu biodeterioracije. Naime, vrste rodova *Arthrinium*, *Fusarium* i *Trichoderma* su citirane kao producenti celulolitičkih enzima (Sukumaran i dr, 2005; Elsababty i dr., 2015). Pored pomenutih, vrste roda *Alternaria* i *Botrytis cinera* su često izolovane sa papira i drugih materijala od celuloze (pamučni i laneni tekstil) dok su *Cladosporium cladosporioides* i *Epicoccum nigrum* izolovani sa pergamenta (Sterflinger, 2010). Makromicete iz razdela Basidiomycota (*Bjerkandera adusta, Coprinellus radians*, *Stereum hirsutum* i *Schizophyllum commune*), izolovane iz vazduha u našem istraživanju, su producenti celulolitičkih i/ili ligninolitičkih enzima što su potvrdili Desrochers i dr. (1981), Heinfling i dr. (1998), Lee i dr. (2010) i Liers i dr. (2011).

6.3 Potencijalni uticaj na ljudsko zdravlje

Prisustvo mikroorganizama u vazduhu je obično zanemareno i zahteva detaljno proučavanje i razmatranje, pogotovu u zatvorenim prostorima i u slučajevima prisustva potencijalnih izvora kontaminacije. Konzervatori i restauratori objekata kulturne baštine su izloženi različitim potencijalnim uzročnicima infekcija i alergijskih reakcija (Tarsitani, 2008). Ipak, mnogi faktori utiču na pojavu bolesti, pre svega, imunološki status organizma i

koncentracija spora. Najčešći zdravstveni problemi koji se javljaju kod pomenutih osoba su: alergije, infekcije kože, oboljenja respiratornog trakta, infekcije očiju i dr. U svrhu evaluacije potencijalnog uticaja na zdralje ljudi, potrebno je poznavanje kako sastava mikobiote tako i ukupne koncentracije propagula mikroorganizama u vazduhu. Ukupna koncentracija pruža informaciju o stepenu kontminacije dok identifikacija određene vrste govori o prisustvu uzročnika specifičnog zdravstvenog problema. Kao što je već pomenuto, u vazduhu određenih prostorija za konzervaciju su zabeležene veoma visoke vrednosti koncentracije vijabilnih propagula gljiva što se ne sme zanemariti jer inhalacija velikog broja fungalnih propagula može dovesti do pojave hiperzentivnih reakcija, alergija i astme (Tarsitani, 2008).

S obzirom da je poznavanje vrednosti koncentracije spora određenih vrsta mikromiceta u određenim slučajevima važnije za procenu zdravstvenog rizika u odnosu na vrednosti ukupne koncentracije spora, identifikacija aerogenih fungalnih izolata je od posebne važnosti u aeromikološkim istraživanjima (Garrett i dr., 1998). Zabeležen je značajan fungalni diverzitet u toku naših istraživanja i od ukupno 74 identifikovane vrste, više od polovine su u literaturi citirane kao potencijalni humani patogeni, alergeni ili producenti mikotoksina (Tabela 21). Postoje brojne studije koje govore o vezi između pojave respiratornih alergija i astme sa prisustvom spora određenih mikomiceta, pre svega vrsta rodova *Penicillium* i *Alternaria* (Licorish i dr., 1985.; Garrett i dr., 1998; Bush i dr., 2006). Glavni uzročnici fungalnih alergija su upravo vrste *A. alternata* i *C. herbarum*, izolovani u ovoj disertaciji (Achatz i dr., 1995; Breitenbach i Simon-Nobbe, 2002). Izloženost sporama određenih vrsta mikromiceta može dovesti do pojave ozbiljnih respiratornih infekcija, pogotovu kod imunokompromitovanih pacijenata (Khan i Karuppayil, 2012). U aerobiološkim studijama, posebna pažnja je posvećena vrstama roda *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger* i *A. flavus*) koje se često citiraju kao uzročnici oportunističkih respiratornih infekcija kod ljudi (Herrecht i dr., 2004). Vrste ovog roda su veoma poznati producenti toksičnih metabolita kao što su kancerogeni aflatoksini (*A. flavus*) i nefrotoksični ohratoksini (*A. melleus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*) (Bennet i Klich, 2003; Samson i dr., 2004) koje su izolovane i u proučavanjima u ovoj disertacji. Takođe, izolovane su i vrste roda *Penicillium* za koje Samson i dr. (2010) navode da mogu biti

producenti toksičnih metabolta: ohratoksina A (*P. verruculosum*), patulina (*P. carneum*, *P. expansum*), citrinina (*P. citrinum*, *P. verruculosum*), penicilinske kiseline (*P. viridicatum*) i drugih. Prema Desjardins i Hohn (1997) i Samson i dr. (2010) *Fusarium* spp. su poznati producenti sekundarnih metabolita trihotecena, fumonizina i zearalenona a veliki broj ovih vrsta je identifikovan u toku naših istraživanja (*F. acuminatum*, *F. lateritium*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum, F. proliferatum* i *F. verticillioides*). Ljudi koji često borave u zatvorenim prostorima su uglavnom izloženi štetnom dejstvu mikotoksina putem inhalacije fungalnih propagula, hifalnih fragmenata i kontaminiranih čestica prašine (Albright, 2001; Bennet i Klich, 2003). Treba napomenuti i da su određene vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* povezane sa pojavom SBS (Schwab i Straus, 2004) a veliki broj identifikovanih vrsta u našoj studiji su potencijalni uzročnici ovog sindroma (*A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii* i *A. versicolor*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum* i *P. brevicompactum*). S obzirom da je u vazduhu prostorija za konzervaciju izolovan veliki broj vrsta, potencijalnih uzročnika različitih zdravstvenih problema kod ljudi, pre svega kod zaposlenih, neophodno je da sistematska konrola kvaliteta vazduha postane rutinski i sastavni deo procedura higijenskog monitoringa prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine što ističu i Górny i dr. (2016).

Tabela 21. Aerogene gljive izolovane iz prostorija za konzervaciju objekata kulturne baštine i vazduha neposredne okoline sa potencijalnim zdravstvenim implikacijama

Br.	Identifikovana vrsta	Zdravstvene implikacije
1	*Alternaria alternata*	Respiratorne alergije (Achatz i dr., 1995)
2	*Alternaria burnsii*	-
3	*Alternaria infectoria*	Kutane infekcije (Samson i dr., 2010)
4	*Alternaria solani*	-
5	*Alternaria tenuissima*	-
6	*Alternaria obovoidea*	Potencijalni alergen (Sharpe i dr., 2016)
7	*Arthrinium arundinis*	Onihomikoze (Dylag i dr., 2017)
8	*Arthrinium kogelbergense*	-
9	*Arthrinium phaeospermum*	Izolovan iz eritematoznih nodula (Rai, 1989)

10	*Aspergillus amstelodami* /*Eurotium amstelodami*	-
11	*Aspergillus calidoustus*	Retki slučajevi invazivnih infekcija kod imunokompromitovanih osoba (Varga i dr., 2008; Slack i dr., 2009)
12	*Aspergillus creber*	-
13	*Aspergillus domesticus*	-
14	*Aspergillus europaeus*	-
15	*Aspergillus flavus*	Glavni uzročnik invazivnih aspergiloza i površinskih infekcija, uzročnik sinuzitisa, keratitisa i kutanih aspergiloza, producent aflatoksina (Hedayati i dr., 2007)
16	*Aspergillus jensenii*	-
17	*Aspergillus melleus*	Producent ohratoksina (Klich i dr., 2009)
18	*Aspergillus niger*	Plućne infekcije i otomikoze, producent ohratoksina A i fumonizina (Schuster i dr., 2002; Samson i dr., 2010)
19	*Aspergillus penicillioides*	Dokumentovan slučaj diseminativne aspergiloze kod obolelih od cistične fibroze (Gupta i dr., 2016)
20	*Aspergillus proliferans*	-
21	*Aspergillus protuberus*	-
22	*Aspergillus pseudoglaucus*	-
23	*Aspergillus ruber*	-
24	*Aspergillus salinicola*	-
25	*Aspergillus sydowi*	Onihomikoze i invazivne aspergiloze (Balajee i dr., 2009)
26	*Aspergillus tabacinus*	-
27	*Aspergillus versicolor*	Producent sterigmatocistina (Samson i dr., 2010), uzročnik respiratornih simptoma (Hodgson i dr., 1998)
28	*Aspergillus westerdijkiae*	Producent ohratoksina i drugih toksičnih metabolita (Samson i dr., 2010)
29	*Beauveria bassiana*	Dokumentovani slučajevi epieme i diseminiranih infekcija kod pacijenata sa akutnom limfoblastičnom leukemijom (Tucker i dr., 2004; Gürcan i dr., 2006)
30	*Bjerkandera adusta*	-
31	*Botrytis cinerea*	Uzročnik respiratorne alergijske reakcije poznate kao „pluća berača grožđa” (Samson i dr., 2010)
32	*Cladosporium cladosporioides*	Kožne infekcije i infekcije noktiju (Samson i dr., 2010)
33	*Cladosporium herbarum* /*Davidiella tassiana*	Alergijske reakcije (Breitenbach i Simon-Nobbe, 2002)
34	*Cladosporium sphaerospermum*	Alergijske reakcije (Yew i dr., 2016)
35	*Cladosporium uredinicola*	-
36	*Clonostachys rosea*	-

37	*Coprinellus radians*	-
38	*Didymella glomerata*	-
39	*Epicoccum nigrum*	Potencijalni alergen (Sharpe i dr., 2016)
40	*Fusarium acuminatum*	Producent T2 toksina (Rabie, 1986)
41	*Fusarium avenaceum*	Producent moniliformina i drugih mikotoksina (Bottalico i Perrone, 2002)
42	*Fusarium graminearum /Giberella zeae*	Producent trihotecena i zearalenona (Samson i dr., 2010)
43	*Fusarium incarnatum*	-
44	*Fusarium lateritium*	Produent trihotecena (Desjardins, i Hohn, 1997)
45	*Fusarium proliferatum*	Producent fumonizina i drugih toksičnih metabolita (Logrieco i dr., 1995)
46	*Fusarium sporotrichioides*	Producent trihotecena (Bottalico i Perrone, 2002)
47	*Fusarium verticillioides /Giberella moniliformis*	Uzročnik keratitisa, producent fumonizina i drugih toksina (Samson i dr., 2010)
48	*Irpex lacteus*	-
49	*Microsphaeropsis arundinis*	Uzročnik feohifomikoze (Reppas i dr., 2015)
50	*Meyerozyma guilliermondii*	Uzročnik brojnih infekcija kod imunokompromitovanih osoba (Savini i dr., 2011)
51	*Nothophoma quercina*	-
52	*Penicillium brevicompactum*	Producent botriodiploidina (Samson i dr., 2010)
53	*Penicillium canescens*	-
54	*Penicillium carneum*	Producent patulina i penitrama A (Samson i dr., 2010)
55	*Penicillium chrysogenum*	Producent PR-toksina i sekalonske kiseline (Samson i dr., 2010)
56	*Penicillium citreonigrum*	Uzročnik kardiovaskularnog beriberija, producent citreoviridina (Samson i dr., 2010)
57	*Penicillium citrinum*	Producent citrinina (Samson i dr., 2010)
58	*Penicillium decumbens*	-
59	*Penicillium digitatum*	Dokumentovan slučaj plućne infekcije kod obolelog od bronhijalne astme i plućnog emfizema (Oshikata i dr., 2013).
60	*Penicillium expansum*	Producent patulina (Samson i dr., 2010)
61	*Penicillium glabrum*	-
62	*Penicillium rubens*	-
63	*Penicillium sanguifluum*	-
64	*Penicillium solitum*	-
65	*Penicillium ulaiense*	-

66	*Penicillium viridicatum*	Producent penicilinske kiseline i drugih toksičnih metabolita (Samson i dr., 2010)
67	*Schizophyllum commune*	Alergijske bronhopulmonarne bolesti i sinuzitis (Chowdhary i dr., 2013)
68	*Sclerotinia sclerotiorum*	-
69	*Stereum hirsutum*	-
70	*Talaromyces amestolkiae*	Oportunistički patogen (Guevara-Suarez i dr., 2016)
71	*Talaromyces sayulitensis*	-
72	*Talaromyces verruculosus*	Producent ohratoksina A i patulina (Samson i dr., 2010)
73	*Thanatephorus cucumeris*	-
74	*Trichoderma citrinoviride*	-

Procena potencijalne virulentnosti aerogenih izolata podrazumevala je testiranje hemolitičke aktivnosti i sposobnost rasta na 37 °C odabranih vrsta rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* s obzirom da su pomenute vrste, često citirani humani patogeni, alergeni i producenti miktoksina. Pojava transparentne zone oko kolonije izolata odgovara potpunoj (β) hemolizi koja je posledica destrukcije eritrocita od strane ekstracelularnih metabolita mikroorganizama. S druge strane, delimična (α) hemoliza je dokumentovana u vidu pojave zona braon ili zelene boje što je posledica redukcije hemoglobina u methemoglobin (Buxton, 2005).

Hemolitička sposobnost je zabeležena za 16 izolata od čega je čak 9 ispoljilo potpunu hemolizu na krvnom agaru. Ipak, sposobnost rasta na 37 °C je detektovana za nešto manji broj izolata (ukupno 12). Anaya i dr. (2016) su istakli sposobnost hemolize za veći broj aerogenih fungalnih izolata iz arhivskih prostorija, uključujući *A. flavus*, *A. niger* i *P. chrysogenum* što je u sagalasnosti sa rezultatima datim u ovoj disertaciji. Slični rezultati su objavljeni i od strane Borrego i dr. (2017). Nasuprot tome, Bogomolova i Kirtsideli (2009) nisu dokazali hemolitičku sposobnost za *A. niger* i *P. chrysogenum* izolovanih iz vazduha metroa u Sankt Petersburgu ali su zabeležili hemolitički potencijal za *A. caespitosus* i nekoliko pripadnika roda *Penicillium*. Neke patogene gljive, pripadnici

ekološke grupe termofila, imaju optimum rasta na višim temperaturama. Npr. optimum rasta za *A. niger* je u opsegu 35 – 37 °C (Krijgsheld i dr., 2013) dok neki autori navode temperaturni optimum od 37 °C i za *A. flavus* (Hedayati i dr., 2007). Rast na ovoj temperaturi je preduslov proliferacije hifa na ćelijama epitela, endotela i krvnih sudova (Borrego i dr. 2017). Hemolitička aktivnost i sposobnost rasta na 37 °C se stoga smatraju značajnim faktorima virulencije patogenih vrsta gljiva i od velikog su značaja u medicinskoj mikologiji (Schaller i dr., 2005; Bogomolova i dr., 2007). Treba ipak naglasiti da ovaj tip testiranja može samo grubo ukazati na stepen virulencije gljiva i da je za adekvatniju procenu potrebno primeniti studiju na eksperimentanim životinjama (Bogomolova i Kirtsideli, 2009). Ipak, vrednost ovih ispitivanja se ogleda u preliminarnom utvrđivanju potencijala patogenosti kako bi se izvršila kategorizacija autohtonih izolata u kontekstu procene zdravstvenog rizika. S obzirom da su neke vrste, izolovane iz prostorija u kojima se često boravi, potvrđeni humani patogeni (*A. calidoustus*, *A. niger*, *A. flavus*) a sposobnost hemolize *in vitro* je detektovana za 47% izolata, njihov potencijalni efekat na ljudsko zdravlje ne sme biti zanemaren.

6.4 Diverzitet i biodeterioracioni potencijal mikromiceta na kamenoj steli

Primena *in situ* mikroskopije omogućila je bolji uvid kako u strukturu prisutnog biofilma tako i u strukturu površine kamenog supstrata ispitivane stele, pri čemu je zabeleženo prisustvo mikromiceta, lišajeva i mahovina. Detektovan je visok nivo biološke kolonizacije i visok stepen deterioracije kamenog suspstrata što odgovara i dobijenoj relativno visokoj vrednosti indeksa deterioracije (0,8).

Iako se površina kamena smatra oligotrofnom sredinom, depozit iz vazduha i produkcija od strane fototrofnih organizama mogu u velikoj meri povećati količinu dostupnih nutrijenata na/u kamenom supstratu što posledično može uticati na rast i proliferaciju heterotrofnih mikroorganizama (Ortega-Morales i dr., 2016). Zabeležen fungalni rast na površini stele implicira potencijalno odvijanje procesa biodeterioracije

putem mehaničke i hemijske aktivnosti mikroorganizama. Gljive su česti kolonizatori kamenog supstrata jer brzo rastuće, turgescentne hife, imaju sposobnost penetracije u kamen, sa jedne strane, a produkuja kiselih i baznih metabolita dovodi do biokorozije, s druge strane. Gljive koje se često izoluju sa kamenog supstrata su pripadnici rodova *Exophiala*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Ulocladium* i *Phoma* (Warscheid i Braams, 2000). Dodatno, Ortega-Morales i dr. (2016) pominju i vrste rodova *Fusarium* i *Trichoderma* kao česte kolonizatore kamena, što je u saglasnosti sa dokumentovianim taksonima u ovoj disertaciji. Pripadnici MCF, kao često citirani kolonizatori kamenog supstrata, nisu dokumentovani u ovoj disertaciji pre svega zbog neadekvatno primenjenih metoda izolacije kao i zbog načina kultivacije koji favorizuje vrste koje su kompetitivnije u uslovima umerene zone.

Može se zaključiti da je mehanička degradacija, posledica hifalne penetracije, jedan od mehanizama deterioracije ispitivane stele, s obzirom da su *in situ* mikroskopijom detektovana oštećenja u vidu granulisane površine kamena. Strukturne alteracije uzrokovane hifalnom penetracijom nelihenizovanih i lihenizovanih gljiva su pokazane od strane brojnih autora (Sterflinger, 2000; de los Rios i Ascaso, 2005; Mohammadi i Krumbain, 2008). Lihenizovane gljive su poznati kolonizatori kamenog supstrata i uzočnici njegove mehaničke deterioracije. U ovom slučaju, strukturne alteracije mogu biti izazvane ne samo hifalnom penetracijom već i procesom ciklične ekspanzije i kontrakcije talusa što je posledica promena vlažnosti sredine (Adamo i Violante, 2000). Takođe, Chen i dr. (2000) i Caneva i dr. (2003) su saopštili da su lišajevi glavni uzročnici disagregacije kamenog supstrata što je potvrđeno proučavanjem kamene stele *in situ* mikroskopijom. Dodatno, mikromicete i lišajevi mogu biti glavni uzročnici biopitinga kamenih supstrata što je detektovano i na površini stele.

Gljive koje kolonizuju površinu kamenog sustrata poseduju potencijalnu sposobnost da vrše hemijsku degradaciju suspstrata putem produkcije kiselih i baznih metabolita. Sniženje pH vrednosti prilikom inkubacije *Trichoderma harzianum* u tečnoj podlozi je dokaz produkcije kiselih metabolita a samo u slučaju *Fusarium proliferatum* se povećala vrednost vodoničnog potencijala što ukazuje na produkciju baznih metabolita. U određenim okolnostima, posebno ukoliko je supstrat bogat nutrijentima, kiseli metaboliti se produkuju

u višku i putem ekskrecije dospevaju na/u supstrat (Florian, 2002). Kiseline imaju sposobnost da rastvore katjone ili da vrše helaciju metala prisutnih u mineralnoj podlozi i tako nastaju stabilna kompleksna jedinjenja (Sohalscha i dr., 1967; Garg i dr., 1995). Organske kiseline često reaguju sa metalima gradeći soli pri čemu je možda najbitnije napomenuti formiranje kalcijum oksalata dejstvom oksalne kiseline na $CaCO_3$. U uslovima vlažne klime, CO_2 reaguje sa vodom pri čemu se formira ugljena kiselina koja takođe može rastvoriti $CaCO_3$ (Garg i dr., 1995). S druge strane, proces deterioracije može biti stimulisan i alkalnim reakcijama, putem degradacije azotnih kompleksa i natrijumovih soli organskih kiselina (Berthelin, 1983). Produkcija kiselina od strane gljiva izolovanih sa kamenog supstrata je dokazana od strane brojnih autora kao što su Silverman i Munoz (1970), Palmer i dr. (1991), Hirsch i dr. (1995) i drugi.

Produkcija ekstracelularnog pigmenata tokom kultivacije *F. proliferatum* kao i produkcija melanina od strane *Epicoccum nigrum* i *Cladosporium* spp. može biti uzrok tamnih pigmentacija na ispitivanom spomeniku. Produkcija pigmenata od strane mikroorganizama na umetničkim predmetima je saopštena i od strane autora kao što su Sterflinger (2010), Marco i dr. (2016), Borrego i dr. (2010), ali i dalje je malo istraživanja koji proučavaju ovaj fenomen u kontekstu kamenog supstrata. Prisustvo crne kore na površini stele se može tumačiti kao posledica depozicije polutanata iz atmosfere, tj. u reakciji kiselih komponenti prisutnih u vazduhu sa karbonatima u sastavu kamena što je u saglasnisti sa ranijim saopštenjima (Fitzner i Heinrichs, 2002; Vergès-Belmin, 2008). Ipak, pigmentacija kamene površine kao posledica metaboličke aktivnosti gljiva je važan faktor koji doprinosi formiranju pigmentisane kore na površini spomenika, što dovodi do estetskih promena (Warscheid i Braams, 2000). Treba istaći i da pomenuta aktivnost gljiva može biti uzrok promene termo-higričkih osobina kamena (Dornieden i dr., 2000).

Penicillium crustosum je izazvao rastvaranje $CaCO_3$ što je veoma važan rezultat ukoliko se uzme u obzir krečnjačka priroda ispitivane stele. Do danas je objavljen veći broj studija o solubilizaciji krečnjaka pod uticajem metaboličkih aktivnosti mikroorganizama (Ascaso i dr., 1998; Chang i Li, 1998; Hou i dr., 2013). Takođe su opisani procesi solubilizacije, rekristalizacije i depozicije kalcita od strane gljiva (Jones i Pemberton, 1987). Pangallo i dr. (2012) su demonstrirali rastvaranje $CaCO_3$ od strane *A. versicolor*,

Penicillium spp. i *Sclerotinia* spp. dok su Gu i dr. (1998) pokazali solubilizaciju betona od strane *Fusarium* sp. i predložili mehanizam biodeterioracije koji se zasniva na interakciji fungalnih metabolita i kalcijuma, pri čemu dolazi do formiranja organskih kompleksa.

Formirani sekindarni mikogeni minerali su po hemijskom sastavu kalcijum oksalati na osnovu čega se može tvrditi da su pomenuti izolati imali sposobnost produkcije oksalne kiseline. XRPD analiza je potvrdila prisustvo i kalcijum oksalata u formi vedelita kao i prisustvo kristala kalcijum karbonata (kalcita) u kulturi *Penicilium crustosum*. Formiranje kristala usled dejstva fungalne aktivnosti je objavljeno i od strane drugih autora (Ahmad i dr., 2004; Burford i dr., 2006; Gadd i dr., 2014). Smatra se da je ovaj process nastao kao adaptacija tokom rasta na supstratima bogatim kalcijumom (Pinna i Salvadori, 2008a). Formiranje sekundarnih mikogenih minerala na krečnjaku je posledica solubilizacije $CaCO_3$ i njegove transformacije u kalcijum oksalat što neminovno dovodi do deterioracije površine kamena (Dakal i Cameotra, 2012). Simultano formiranje kalcita i kalcijum oksalata je zabeleženo za *Cephalotrichum* sp. (syn. *Doratomyces*) koja kolonizuje krečnjak (Burford i dr., 2006). U pomenutoj studiji je naglašeno da je proces sedimentacije kalcijum karbonata na površini hifa posledica dejstva fungalnog metabolizma, ali i degradacije oksalata od strane bakterija.

S obzirom da je nosilac kalcijuma u B4 podlozi kalcijum acetat, vedelit i vevelit su najverovatnije formirani u reakciji oksalne kiseline (produkti *Bionectria ochroleuca* i *P. crustosum*) sa kalcijum acetatom:

$$Ca^{2+} + 2CH_3COO^- + 2H^+ + C_2O_4^{2-} + nH_2O \rightarrow CaC_2O_4{\times}nH_2O_{(s)} + 2CH_4 + 2CO_2$$

Očigledno je da CO_2, kao proizvod reakcije acetata i vode, dodatno povećava njegovu koncentraciju u mikrosredini. Nakon rastvaranja CO_2 dolazi do formiranja H_2CO_3 kao intermedijera, što posledično vodi formiranju kalcita, pogotovu na mestima akumulacije kalcijuma (dokumentovane hife određenih izolata se nalaze unutar kristala, Slika 33). Navedeni mehanizam je predstavljen reakcijom:

$$Ca^{2+} + H_2O + CO_2 \rightarrow CaCO_{3(s)} + H_2$$

Za oslobađanje kalcijumovih jona u B4 podlozi nije uvek neophodno da fungalni izolati produkuju organske kiseline, s obzirom da se kalcijum acetat (glavni sastojak ove podloge) karakteriše visokom rastvrljivošću pa su joni kalcijuma inicijalno prisutni u rastvoru. S

obzirom da određeni fungalni izolati (*T. harzianum*, *F. proliferatum* i *Ch. murorum*) prilikom kultivacije verovtno nisu produkovali oksalnu kiselinu (zato što nije uočeno formiranje oksalata u podlozi) pod uticajem produkata njihovog metabolzma je došlo do obrazovanja samo jedne kristalne faze – kalcita:

$$2Ca^{2+} + 4CH_3COO^- + H_2O + CO_2 \rightarrow CaCO_{3(s)} + 2CH_3COOH_{(aq)}$$

S druge strane, modifikovana B4 podloga sadrži teško rasvorljivi kalcijum karbonat, i stoga je neophodno prisustvo kiseline, produkovane od strane gljiva, kako bi došlo do oslobađanja Ca^{2+}:

$$CaCO_{3(s)} + 2H^+ \rightarrow Ca^{2+} + H_2O + CO_2$$

Oslobođeni Ca^{2+} zatim reaguje sa oksalatom što rezultira foriranjem kristala kalcijum oksalata:

$$Ca^{2+} + C_2O_4^{2-} + nH_2O \rightarrow CaC_2O_4 \times nH_2O_{(s)}$$

U slučaju kultiviacije *P. crustosum* na ovoj podlozi, kristali kalcita su nastali putem simultane kristalizacije sa kalcijum oksalatom. S obzirom da tokom formiranja kalcijum oksalata dolazi do rastvaranja $CaCO_3$ i produkcije CO_2 (pri čemu je dodatna količina ovog gasa u reakciji prisutna kao produkt fungalne respiracije i iz okolnog vazduha) dolazi do precipitacije kalcita putem reakcije CO_2 sa Ca^{2+}.

I u ranijim istraživanjima depozicije oksalata su zabeležene na brojnim istorijskim spomenicima od karbonatnog kamena (krečnjak i mermer) i to u vidu patine narandžasto braonkaste boje, tzv. „*scialbatura*". U sastav pomenute patine ulaze kristali kalcijum oksalata i karbonatni minerali, ponekad pomešani sa osušenim fragmentima talusa lišajeva (del Monte i dr., 1987). Iako je prisustvo oksalatne patine povezano sa procesom biodeterioracije, neki autori tvrde da *scialbatura* ima protektivnu ulogu (Pinna i Salvadori, 2008a). Bez obzira na pomenuto, prisustvo oksalatne patine utiče na estetski izgled spomenika kulturne baštine.

Konzervatorski tretman je uklonio postojeći biofilm sa površine stele i uspostavio prvobitni estetski izgled spomenika. *In situ* mikroskopijom je potvrđeno da je restauracijom stele uspešno uklonjena micelija i reproduktivne strukture gljiva što je potvrđeno egzaminacjom uzoraka adhezivne trake. Primenom kontrolnih sterilnih briseva i kontaktnih slajdova dokumentovan je mali broj fungalnih spora koje se mogu smatrati aerogenim

depozitom. Međutim, *in situ* mikroskopija nakon konzervatorskog tretmana otkrila je prisustvo rezidulanih fragmenata talusa lišajeva koji nisu uklonjeni laserskim tretmanom. Iako nevijabilni, zaostali talusi lišajeva predstavljaju potencijalna mesta rekolonizacije što daje na značaju primeni *in situ* mikroskopije.

In situ mikroskopija je efikasna, praktična i inovativna metoda koja predstavlja prvi korak u proceni i analizi stepena biodeterioracije umetničkih predmeta od kamena. Pomenutu metodu je potrebno implementirati u složen sistem konzervacije s obzirom da se njenom primenom može brzo izvršiti evaluacija biološke kontaminacije čime se usmerava odabir konzervatorskih tehnika kao i biocida za hemijski tretman. Značaj ove metode u proučavanju predmeta i objekata kulturne baštine je u skorijem periodu opisan u kontekstu konzervacije zidnih slika (Unković i dr., 2016). Treba napomenuti da konzervatori sa Getty instituta predlažu upotrebu USB digitalnog mikroskopa kao jeftiniju varijantu uređaja kojim se može vršiti *in situ* mikroskopska analiza na terenu u cilju smanjenja utrošenog vremena za analizu podataka u studijamu konzervacije (http://blogs.getty.edu/iris/conservation-tools-the-usb-digital-microscope/). Ipak, na osnovu iskustva u ovoj disertaciji, daje se prednost upotrebi savremenog portabl mikroskopa visokih performansi (ShuttlePix P-400R, Nikon) zbog portabilnosti i mogućnosti nezavisnog i vremenski efikasnog fotografisanja deteriorirane površine objekata kulturne baštine od kamena, bez upotrebe dodatne opreme.

6.5 Antifungalna aktivnost

Antifungalni potencijal brojnih agenasa biološkog porekla je testiran sa ciljem dobijanja biofungicida. Rezultati primenjenih *in vitro* metoda pokazuju da testirani biocidi poseduju različit antifungalni potencijal (Tabela 19, Slike 35 i 36). Tokom istraživanja, BAC i etarsko ulje *Cinnamomum zeylanicum* su ispoljili najsnažniju antifungalnu aktivnost a mehanizam delovanja tj. interakcija između ispitivanih molekula i aktivnog mesta enzima je pokazana *in silico* metodom molekularnog dokinga. Navedene interakcije uključuju

utvrđivanje adekvatnog geometrijskog oblika (konformacije) ispitivanih molekula unutar definisanog prostora kao i energije interakcija što su objasnili Halperin i dr. (2002) i Kitchen i dr. (2004).

BAC je kvaternarno amonijum jedinjenje koje se koristi u farmaceutskoj industriji i aktivna je supstanca većine biocida koji se koriste u konzervaciji predmeta kulturne baštine (Xu i dr., 2013; Barresi i dr., 2017). Treba napomenuti da BAC nije testiran u studiji molekularnog dokinga s obzirom da se radi o jedinjenju koje poseduje varijabilnu alifatičnu grupu i nije primenljiv za ovu vrstu analize. Snažna antifungalna aktivnost BAC-a je potvrđena od strane Stupar i dr. (2014) na fungalnim izolatima sa kamenih i drvenih predmeta kulturne baštine kao i od strane Ljaljević Grbić i dr. (2018) na aerogenim izolatima iz sakralnog objekta što je u saglasnosti sa rezultatima u ovoj disertaciji. Mehanizam antifungalne aktivnosti ovog jedinjenja se pripisuje njegovom uticaju na integritet ćelijske membrane (Xu i dr., 2013). Ipak, prekomerna upotreba ove supstance može dovesti do pojave rezistencije kod određenih mikroorganizama (Mullapudi i dr., 2008; To i dr., 2002; Langsrud i dr., 2003). Stoga je ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i biocida biološkog porekla sve više predmet istraživanja poslednjih godina (Borrego i dr., 2012; Stupar i dr., 2014; Lavin i dr., 2016; Savković i dr., 2016a; Ljaljević Grbić i dr., 2018).

U ovoj disertaciji, dokumentovana je snažna antifungalna aktivnost etarskog ulja *C. zeylanicum*. S obzirom da je najzastupljenije jedinjenje etarskog ulja *trans*-cinamaldehid (Simić i dr., 2004) i da je za ovo jedinjenje metodom molekularnog dokinga pokazana relativno visoka energija vezivanja sa CYP51, može se pretpostaviti da je ono nosioc antifungalne aktivnosti. Gende i dr. (2008) su demonstrirali antibakterijsku aktivnost etarskog ulja *C. zeylanicum*, cinamaldehida i eugenola na sojevima *Paenibacillus larvae*. S druge strane, Unlu i dr. (2010) su zabeležili anti-*Candida* aktivnost etarskog ulja ove biljke (MIK < 0,04 mg ml^{-1} – 1,12 mg ml^{-1}) što je u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije. S druge strane, detektovane glavne komponente etarskog ulja u ovom radu su bile cinamaldehid, benzaldehid i cinamil acetat. Simić i dr. (2004) su dokazali snažnu antifungalnu aktivnost etarskog ulja *C. zeylanicum* na 17 vrsta mikromiceta, uključujući *Aspergillus* i *Penicillium* vrste. Pomenuti autori su detektovali slične MIK i MFK vrednosti

sa onima zabeleženim u ovoj disertaciji (MIK 0,05 – 1 mg ml^{-1} i MFK 0,1 – 2,5 mg ml^{-1}). Zabeležena je i anti-*Aspergillus* aktivnost ekstrakata *C. zeylanicum* pri čemu je najviši stepen inhibicije rasta micelije postignut za izolat *A. flavus* a najniži za *A. niger* (Hameed i dr., 2016). Nasuprot tome, dobijeni rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju na to da je izolat *A. flavus* bio najrezistentniji na pomenuto etarsko ulje dok je *A. niger* bio jedan od osetljivijih izolata.

Metil salicilat je ispoljio jaku antifungalnu aktivnost u *in vitro* testovima što je u saglasnosti sa zabeleženom relativno jakom interakcijom sa CYP51. Ovo jedinjenje je visoko isparljivi metil estar salicilne kiseline i sastojak je etarskih ulja različitih vrsta biljaka a u većim količinama je zastupljen kod *Gaultheria procumbens* (Ericaceae), *Betula lenta* (Betulaceae) i svih vrsta roda *Spirea* (Rosaceae). Naziv „ulje zimzelena" je dat s obzirom da etarsko ulje *Gaultheria procumbens* (zimzelen) sadrži 98% ovog jedinjenja (Ghosh, 2015). Pretpostavlja se da kod biljaka ima ulogu signalnog molekula putem kojeg se indukuju mehanizmi odbrane od herbivora i patogena (Shulaev i dr., 1997; James i Price, 2004). S obzirom da je metil salicilat derivat salicilne kiseline, koristi se kao analgetik (Ghosh, 2015). Ipak, studije antimikrobne aktivnosti metil salicilata su malobrojne. Rath dr. (2008) su pokazali antibakterijsku aktivnost metil salicilata na *Escherichia coli* a Papandreou i dr. (2002) su zabeležili antibakterijsku i anti-*Candida* aktivnost etarskih ulja izolovnih iz vrsta roda *Paeonia* koja sadrže metil salicilat kao jednu od glavnih komponenti.

Za etarsko ulje *Eugenia caryophyllata* (syn. *Syzygium aromaticum*) je zabeležena relativno jaka antifungalna aktivnost što je u saglasnosti sa rezultatima molekularnog dokinga najzastupljenijih jedinjenja ovog ulja – za eugenol i kariofilen su zabeležene najjače interkacije sa CYP51. U literaturi je pronađen veći broj publikovanih radova na temu antifungalne aktivnosti etarskog ulja pomenute biljke. Džamić i dr. (2009) su demonstrirali antifungalnu aktivnost etarskog ulja *E. caryophyllata* na različitim vrstama mikromiceta, uključujući vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Autori su za pripadnike pomenutih rodova zabeležili MIK i MFK vrednosti opsega 0,5 – 2,5 mg ml^{-1} što je približno dobijenim vrednostima u rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Isti autori su zabeležili veliku rezistenciju izolata *A. flavus*, koji je takođe bio jedan od otpornijih izolata

i u našoj studiji. Park i dr (2007) su pokazali antifungalnu aktivnost etarskog ulja *S. aromaticum* i eugenola na izolatima dermatomiceta. Takođe, Pinto i dr. (2009) su demonstrirali antifungalni efekat pomenutog etarskog ulja i eugenola na kliničkim izolatima dermatomiceta, *Candida* spp. i *Aspergillus* spp., pri čemu su zabeležili relativno niske MIK i MFK (opsega 0,32 – 1,25 mg ml^{-1}) za *Aspergillus* izolate. U novijoj studiji (Císarová i dr., 2016) zabeleženo je da etarsko ulje *S. aromaticum* poseduje jaču anti-*Aspergillus* aktivnost od drugih tesiranih ulja, uključujući i etarsko ulje *C. zeylanicum* što nije u saglasnosti sa našim rezultatima. Pomenuto neslaganje se može objasniti činjenicom da različite vrste istog roda kao i različiti izolati iste vrste mogu posedovati drugačiji stepen osetljivosti na etarska ulja. Etarsko ulje *S. aromaticum* (sa sadržajem eugenola od 67%), testirano na različitim fungalnim izolatima iz arhivskih prostorija, pokazalo je jaku fungistatičku aktivnost i na *A. niger*, *A. clavatus* i *Penicillium* sp. (Borrego i dr, 2012).

Etarsko ulje *Achillea millefolium* je pokazalo antifungalnu aktivnost srednjeg intenziteta što je u saglasnosti sa rezultatima molekularnog dokinga. Naime, za najzastupljenija jedinjenja ovog ulja (eukaliptol i kamfor) je dobijena relativno slaba interakcija sa CYP51. Candan i dr. (2003) su u etarskom ulju *A. millefolium* subsp. *millefolium* zabeležili visok procenat monoterpena, pre svega eukaliptola i kamfora, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Pomenuti autori su pokazali i antifungalnu ativnost ovog etarskog ulja na *C. albicans* i *C. krusei* - MIK vrednsoti (4,5 i 18 mg ml^{-1}) su u opsegu koncentracija dobijenih u našoj studiji. Dodatno, Fierascu i dr. (2015) su ustanovili inhibitornu aktivnost ulja *A. millefolium* na rast *A. niger* i *P. hirsutum*, dok su Stojanović i dr. (2005) i Tajik i dr. (2008) prikazali efekat ekstrakta ove biljke na inhibiciju rasta *C. albicans* i *A. niger*. S druge strane, neki autori (Kokoska i dr., 2002; Karaalp i dr., 2009) su testiranjem ekstrakta *A. millefolium* pokazali antibakterijsku ali ne i antifungalnu aktivnost.

Etarsko ulje *Leptospermum scoparium* je imalo antifungalnu aktivnost srednjeg intenziteta, ali nižu u odnosu na etarsko ulje *A. millefolium* što je u saglasnosti sa rezultaima molekularnog dokinga. Naime, za najzastupljenije jedinjenje ovog etarskog ulja, α-pinen, zabeležena je najslabija interakcija sa CYP51 ali i formiranje najjačih Van der Valsovih veza sa aktivnim mestom enzima. Porter i Wilkins (1999) su demonstrirali fungicidni efekat etarskog ulja *L. scoparium* na *C. albicans*. U studiji sprovedenoj od strane

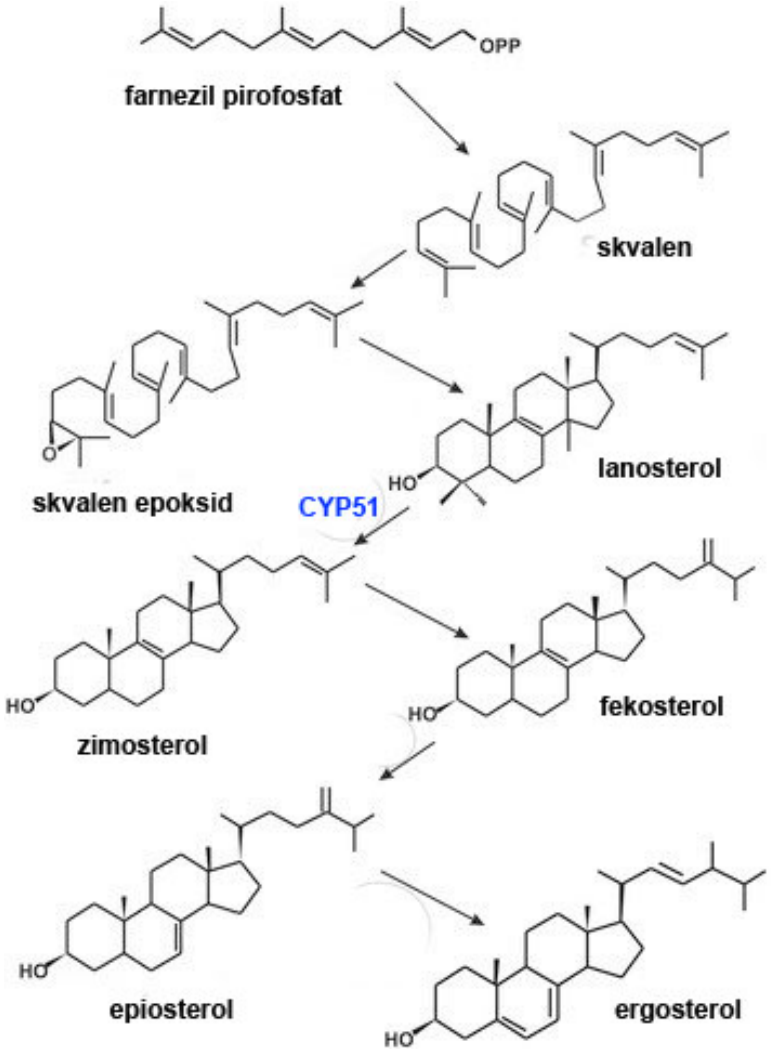
Christoph i dr. (2000) je zabeležen snažan fungistatski efekat etarskog ulja *L. scoparium* na izolatima dermatomiceta ali slab na izolatima *C. albicans*, *A. niger* i *P. notatum*. Prema rezultatima pomenute studije, najzastupljenije jedinjenje etarskog ulja je bio leptospermon (17,6%) dok je količina α-pinena bila znatno manja (1,3%). Disparitet u sastavu etarskih ulja *L. scoparium* u našoj studiji u odnosu na studije drugih autora se može objasniti postojanjem različitih hemotipova ove vrste. Douglas i dr. (2004) su analizom populacija *L. scoparium* sa Novog Zelanda identifikovali 10 različitih hemotipova među kojima je prisutan i *α*-pinen hemotip koji sadrži 21,5% ovog jedinjenja.

Najslabija antifungalna aktivnost je dobijena za etarsko ulje *Carum carvi* i stoga studije molekularnog dokinga nisu sprovedene. Ipak, Simić i dr. (2008) su demonstrirali jaku antifungalnu aktivnost ovog ulja na izolatima 19 vrsta gljiva, uključujući i pripadnike *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta (MIK opsega 0,5 – 1 mg ml^{-1} i MFK 1 – 2,5 mg ml^{-1}). Císarová i dr., (2016) su zabeležili uticaj etarskog ulja *C. carvi* na inhibiciju rasta i produkciju aflatoksina izolata *A. flavus* i *A. parasiticus*. Takođe, de Martino i dr. (2009) su demonstrirali anti-*Penicillium* aktivnost ovog etarskog ulja i zabeležili najveću osetljivost za izolat *P. citrinum*, vrste koja je bila jedna od najosetljivijih na pomenuto etarsko ulje i u ovoj disertaciji.

Poznato je da etarska ulja mogu da indukuju različite morfo-fiziološke promene kod gljiva. Pored uticaja na dinamiku rasta kolonije, zabeležena je i postepena depigmentacija konidiogenih aparata i smanjenje intenziteta sporulacije testiranih izolata pri višim koncentracijama BAC, metil salicilata i etarskih ulja *A. millefolium* i *E. caryophyllata*. Depigmentacija konidiogenih aparata i odsustvo sporulacije *Aspergillus* spp. usled aktivnosti etarskog ulja *Origanum vulgare* je saopšteno od strane Souza i dr. (2010) i Savković i dr. (2016a). De Billerbeck i dr. (2001) su zabeležili gubitak sporulacije i pigmentacije *A. niger* tretiranog etarskim uljem *Cymbopogon nardus* dok su Inouye i dr. (1998) pokazali da etarska ulja *Lavandula* sp. i *Thymus* sp. inhibiraju sporulaciju *A. fumigatus*. Wheeler i Bell (1988) ističu važnost sporulacije kao esencijalnog dela životnog ciklusa gljiva i neophodnost melanina za preživljavanje i germinaciju spora. Ovo potvrđuje značaj melanina kao faktora virulencije kod patogenih vrsta gljiva s obzirom da njegov gubitak značajno može da umanji stepen patogenosti (Tsai i dr., 1999). Navedeno je od

posebnog značaja s obzirom da su određeni testirani izolati, pre svega *A. niger* i *A. flavus*, poznati humani patogeni.

CYP51 (lanosterol 14α-demetilaza) je enzim iz porodice citohroma P450 koji kod eukariota učestvuje u sintezi sterola. Kod gljiva ovaj enzim katalizuje demetilaciju lanosterola u prekursor ergosterola pa je stoga ključan u njegovoj sintezi (Slika 46) (Lepesheva i Waterman, 2007; Sharma i dr., 2015). Poslednjh godina je objavljen veći broj studija molekularnog dokinga koje uključuju interakcije različitih biocida sa fungalnim CYP51 proteinom. Potvrđeno je da CYP51 predstavlja važan ciljni enzim antifungalnih



Slika 46. Šematski prikaz puta biosinteze ergosterola kod gljiva i uloga CYP51 (adaptirano iz Sharma i dr., 2015)

supstanci iz grupe azola kao što su ketokonazol, flukonazol i vorikonazol (Che i dr., 2009; Hargrove i dr., 2012; Vengurlekar i dr., 2014; Wu i dr., 2018). U novijoj studji zabeležena je i antifungalna aktivnost analoga vorikonazola na izolatu *A. fumigatus* uz potvrdu molekulranog dokinga sa konstruisanim CYP51 enzimom prisutnim kod vrsta roda *Aspergillus* (Wu i dr., 2018). Ipak, dugotrajna upotreba azola u tretmanu mikoza rezultira u nastajanju rezistentnih fungalnih sojeva što ukazuje na potrebu pronalaženja novih biocida sa sposobnošću inhibicije ovog enzima (Becher i Wirsel, 2012).

Na osnovu navedenog, može se zaključiti da su rezultati molekularnog dokinga u dobroj korelaciji sa jačinom antifungalne aktivnosti ispitivanih etarskih ulja i metil salicilata. Naime, za etarska ulja *C. zeylanicum*, *E. caryophyllata* i metil salicilat je pokazana najjača antifungalna aktivnost a za njihove konstituente najjače energije vezivanja za CYP51. Isto tako, konstituenti etarskih ulja slabjeg antifingalnog dejstva (*A. millefolium* i *L. scoparium*) su imali najnižu energiju vezivanja za CYP51. Mehanizam antifungalnog dejstva etarskih ulja se često pripisuje interakcijama njegovih komponenti sa ćelijskom membranom gljiva, pri čemu dolazi do narušavanja njene strukture i funkcije (Burt, 2004; Pinto i dr., 2009; Savković i dr., 2016a). Ergosterol, kao konstituent ćelijske membrane gljiva, ima značajnu ulogu u održavanju njene strukture. Pored toga, ovo jedinjenje je odgovorno za toleranciju prema variranjima u vlažnosti okoline i smatra se da je nastalo kao posledica adaptacije gljiva za život na kopnu (Dupont i dr., 2012). Takođe se smatra da fenolna jedinjenja (kao što su eugenol i metil salicilat u ovoj disertaciji) imaju sposobnost formiranja vodoničnih veza sa aktivnim mestima ciljnih enzima (Velluti i dr., 2003). Stoga se može pretpostaviti da se mehanizam antifungalne aktivnosti testiranih etarskih ulja i metil salicilata delimično zasniva na inaktivaciji CYP51 enzima. Ipak, ne treba zanemariti ni ulogu manje zastupljenih komponenti etarskih ulja u antifungalnoj aktivnosti zbog toga što u određenim slučajevima etarska ulja imaju jače biološko dejstvo u odnosu na dejstvo pojedinačnih komponenata (Velluti i dr., 2003). S obzirom na antifungalnu aktivnost testiranih etarskih ulja i metil salicilata, rezultati dobijeni u našoj studiji sugerišu njihovu potencijalnu implementiaciju kao niskotoksičnih biocida biološkog porekla u oblasti konzervacije objekata i predmeta kulturne baštine.

7 Zaključci

- Vrednosti koncentracije spora u ispitivanim prostorijama za konzervaciju su bile relativno visoke tokom celog perioda uzorkovanja, pogotovu tokom prolećnog i letnjeg perioda.
    - U određenim prostorijama, zabeležene koncentracije spora su prevazišle merljive vrednosti od 25.000 CFU m^{-3}.
    - Povišena koncentracija fungalnih spora je detektovana u vazduhu prostorija sa visokim RH vrednostima, pre svega u prostrijama smeštenim u prizemlju zgrade.

- U vazduhu prostorija je zabeležen visok diverzitet fungalnih taksona pri čemu je najviša specijska raznovrsnost kod rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.

- Propagule *Cladosporium* i *Penicillium* vrsta su bile najzastupljenije u vazduhu ispitivanih prostorija tokom sve četiri sezone.

- Određeni aerogeni izolati *Aspergillus, Penicillium* i *Talaromyces* vrsta su pokazali različit biodeteriorativni potencijal:
    - produkcije ekstracelularnih enzima, kiselina i pigmenata,
    - formiranja sekundarnih mikogenih minerala, oksalata i karbonata,
    - hemolize i rasta na 37 °C što indikuje njihovu patogenost.

- U vazduhu prostorija za konzervaciju izolovane su i idenifikovane brojne patogene, alergene i toksikogene vrste gljiva.

- Na steli je zabeležen visok nivo biološke kolonizacije i deterioracije kamenog suspstrata što odgovara dobijenoj relativno visokoj vrednosti indeksa deterioracije.

- Autohtoni izolati sa kamene stele su pokazali sposobnost produkcije kiselih i baznih metabolita, pigmenata, solubilizacije krečnjaka i formiranja sekundarnih mikogenih minerala.

- Najjača antifungalna aktivnost na *Aspergillus* i *Penicillium* vrste je zabeležena za benzalkonijum hlorid i etarsko ulje *Cinnamomum zeylanicum*

- Rezultati molekularnog dokinga testiranih supstanci su u korelaciji sa jačinom antifungalne aktivnosti ispitivanih etarskih ulja i metil salicilata.

8 Literatura

1. Abdel Hameed, A.A., Farag, S.A. (1999): An indoor bio-contaminants air quality. International Journal of Environmental Health Research, 9: 313.
2. Achatz, G., Oberkofler, H., Lechenauer, E., Simon, B., Unger, A., Kandler, D., Ebner, C., Prillinger, H., Kraft, D., Breitenbach, M. (1995): Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. Molecular immunology, 32: 213-227.
3. Adamo, P., Marchetiello, A., Violante, P. (1993): The weathering of mafic rocks by lichens. Lichenologist, 25: 285-297.
4. Adamo, P., Violante, P. (2000): Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. Applied Clay Science, 16: 229-256.
5. Adams, K.F. (1964): Year to year variation in the fungus spore content of the atmosphere. Allergy, 19: 11-50.
6. Adams, R.P. (2007): Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
7. Adams, R.I., Miletto, M., Taylor, J.W., Bruns, T.D. (2013): Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. The ISME journal, 7: 1262-1273.
8. Ahmad, A., Rautaray, D., Sastry, M. (2004): Biogenic calcium carbonate: Calcite crystals of variable morphology by the reaction of aqueous Ca^{2+} ions with fungi. Advanced Functional Materials, 14: 1075-1080.
9. Albertano, P., Urzì, C. (1999): Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. Microbial Ecology, 38: 244-252.
10. Albright, D.M. (2001): Human Health Effects of Airborne Mycotoxin Exposure in Fungi-Contaminated indoor Environments. Proffessional Safety, 46: 21-28.
11. Amend, A.S., Seifert, K.A., Samson, R., Bruns, T.D. (2010): Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones

than in the tropics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 13748-13753.

12. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (1995): Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. ACGIH.
13. Anaya, M., Borrego, S.F., Gámez, E., Castro, M., Molina, A., Valdés, O. (2016): Viable fungi in the air of indoor environments of the National Archive of the Republic of Cuba. Aerobiologia, 32: 513-527.
14. Arai, H. (2000): Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. International Biodeterioration & Biodegadation, 46: 181-188.
15. Arroyo, I. (2009): The role of fungi in the deterioration of movable and immovable cultural heritage. e_conservation, 9: 40-50.
16. Ascaso, C., Wierzchos, J., Castello, R. (1998): Study of the biogenic weathering of calcareous litharenite stones caused by lichen and endolithic microorganisms. International Biodeterioration & Biodegradation, 42: 29-38.
17. Balajee, S.A., Kano, R., Baddley, J.W., Moser, S.A., Marr, K.A., Alexander, B.D., Andes, D., Kontoyiannis, D.P., Perrone, G., Peterson, S., Brandt, M.E., Pappas, P.G., Chiller, T. (2009): Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. Journal of Clinical Microbiology, 47: 3138-3141.
18. Barad, S., Horowitz, S.B., Moscovitz, O., Lichter, A., Sherman, A., Prusky, D. (2012): A *Penicillium expansum* glucose oxidase-encoding gene, GOX2, is essential for gluconic acid production and acidification during colonization of deciduous fruit. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25: 779-788.
19. Barresi, G., Carlo, E., Trapani, M.R., Parisi, M.G., Chillè, C., Mulè, M.F., Cammarata, M., Palla, F. (2015): Marine organisms as source of bioactive molecules applied in restoration projects. Heritage Science, 3:17-20.
20. Barresi, G., Cammarata, M., Palla, F. (2017): Biocide. In: Palla, F., Barresi, G. (eds), Biotechnology and conservation of cultural heritage. Springer, Berlin, pp. 49-65.

21. Bartman, C.D., Doerfler, D.L., Bird, B.A., Remaley, A.T., Peace, J.N., Campbell, I.M. (1981): Mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* on solid media. Applied and Environmental Microbiology, 41: 729-736.
22. Bauer, H., Schueller, E., Weinke, G., Berger, A., Hitzenberger, R., Marr, I. L., Puxbaum, H. (2008): Significant contributions of fungal spores to the organic carbon and to the aerosol mass balance of the urban atmospheric aerosol. Atmospheric Environment, 42: 5542-5549.
23. Becher, R., Wirsel, S.G. (2012): Fungal cytochrome P450 sterol 14α-demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology, 95: 825-840.
24. Bennet, J.W., Klich, M. (2003): Mycotoxins. Clinical Mycrobiology Reviews, 16: 497-516.
25. Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2012): The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology, 72: 1-401.
26. Berthelin, J. (1983): Microbial weathering processes. In: Krumbein, W.E. (ed.), Microbial Geochemistry, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 223-262.
27. Beuchat, L.R. (1983): Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. Journal of Food Protection, 46: 135-141.
28. Bogomolova, E.V., Minenko, E.A., Kirtsideli, I.Y. (2007): Potential pathogenicity of micromycetes isolated from the museum environments. Mikologiya I Fitopatologiya, 41: 113-119.
29. Bogomolova, E., Kirtsideli, I. (2009): Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg Underground railway system. International Biodeterioration & Biodegradation, 63: 156-160.
30. Booth, C. (1971): The fungal culture media. In: Methods in Microbiology. Booth, C. (ed.). Academic Press, UK, pp. 49-94.
31. Borrego, S., Guiamet, P., de Saravia, S.G., Batistini, P., Garcia, M., Lavin, P., Perdomo, I. (2010): The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. International Biodeterioration & Biodegradation, 64: 139-145.

32. Borrego, S., Valdés, O., Vivar, I., Lavin, P., Guiamet, P., Battistoni, P., Gómez de Saravia, S., Borges, P. (2012): Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine Documentary heritage. ISRN Microbiology, Article ID 826786.
33. Borrego, S., Perdomo, I. (2016): Airborne microorganisms cultivable on naturally ventilated document repositories of the National Archive of Cuba. Environmental Science and Pollution Research, 23: 3747-3757.
34. Borrego, S., Molina, A., Santana, A. (2017): Fungi in archive repositories Environments and the deterioration of the graphics documents. EC Microbiology, 11: 205-226.
35. Bottalico, A., Perrone, G. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology, 108: 611-624.
36. Bouquet, E., Boronat, A., Ramos-Cormenzana, A. (1973): Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. Nature, 246: 527-529.
37. Breitenbach, M., Simon-Nobbe, B. (2002): The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. Chemical Immunology, 81: 48-72.
38. Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. (1993): Paracoccidioidomycosis: an update. Clinical Microbiology Reviews, 6: 89-117.
39. Burch, M., Levetin, E. (2002): Effects of meteorological conditions on spore plumes. International Journal of Biometeorology, 46: 107-117.
40. Burford, E.P., Fomina, M., Gadd, G.M. (2003): Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. Mineralogical Magazine, 67: 1127-1155.
41. Burford, E.P., Hillier, S., Gadd, G.M. (2006): Biomineralization of fungal hyphae with calcite ($CaCO_3$) and calcium oxalate mono- and dihydrate in carboniferous limestone microcosms. Geomicrobiology Journal, 23: 599-611.
42. Burge, P.S. (2004): Sick building syndrome. Occupational and Environmental Medicine, 61: 185-190.

43. Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
44. Bush, R.K., Portnoy, J.M. (2001): The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 107: S430-S440.
45. Bush, R.K., Portnoy, J.M., Saxon, A., Terr, A.I., Wood, R.A. (2006): The medical effects of mold exposure. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 117: 326-333.
46. Butler M.J., Day, A.W. (1998): Fungal melanins: a review. Canadian Journal of Microbiology, 44: 1115-1136.
47. Buxton, R. (2005): Blood agar plates and hemolysis protocols. American Society for Microbiology.
48. Cacace, C., Caneva, G., Gallo, F., Georgiadis, T., Maggi, O., Valenti, P. (2003): Measurement of environmental physical parameters. In: Mandrioli, P., Caneva, G., and Sabbioni, C. (eds), Cultural heritage and aerobiology. Methods and measurement techniques for biodeterioration monitoring. Springer Science + Business Media Dordrecht, pp. 47-79.
49. Calderón, C., Lacey, J., McCartney, H.A., Rosas, I. (1995): Seasonal and diurnal variation of airborne basidiomycete spore concentrations in Mexico City. Grana, 34: 260-268.
50. Calderón, C., Lacey, J., McCartney, A., Rosas, I. (1997): Influence of urban climate upon distribution of airborne Deuteromycete spore concentrations in Mexico City. International Journal of Biometeorology, 40: 71-80.
51. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A. (2003): Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, 87: 215-220.
52. Caneva, G., Maggi, O., Nugari, M.P, Pietrini, A.M., Piervittori, V, Ricci, S., Roccardi, A. (2003): The biological aerosol as a factor of biodeterioration. In: Mandrioli, P., Caneva, G., Sabbioni, C. (eds), Cultural heritage and aerobiology.

Methods and Measurement Techniques for Biodeterioration Monitoring. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp. 3-29.

53. Caneva, C., Nugari, M.P., Salvadori, O. (2008a): Chemical methods. In: Caneva, G, Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 99-100.
54. Caneva, G., Nugari, M. P., Nugari, M. P., Salvadori, O. (2008b): Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Publications.
55. Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F., Senatore, F. (2015): Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. Arabian Journal of Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.05.017.
56. Chakraborty, P., Gupta-Bhattacharya, S., Chanda, S. (2003): Aeromycoflora of an agricultural farm in West Bengal, India: A five-year study (1994–1999). Grana, 42: 248-254.
57. Chang, T.T., Li, C.Y. (1998): Weathering of limestone, marble, and calcium phosphate by ectomycorrhizal fungi and associated microorganisms. Taiwan Journal of Forest Science 13: 85-90.
58. Che, X., Sheng, C., Wang, W., Cao, Y., Xu, Y., Ji, H., Dong, G., Miao, Z., Yao, J., Zhang, W. (2009): New azoles with potent antifungal activity: design, synthesis and molecular docking. European Journal of Medicinal Chemistry, 44(: 4218-4226.
59. Chen, J., Blume, H.P., Beyer, L. (2000): Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review. Catena, 39: 121-146.
60. Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Gaur, S.N., Agarwal, K., Kathuria, S., Roy, P., Classen, C.H., Meis, J.F. (2013): *Schizophyllum commune* as an emerging fungal pathogen: a review and report of two cases. Mycoses, 56: 1-10.

61. Christoph, F., Kaulfers, P.M., Stahl-Biskup, E. (2000): A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils *s.l.* with special reference to the activity of β-triketones. Planta Medica, 66: 556-560.
62. Chung, Y.J., Lee, K.S., Han, S.H., Kang III, D., Lee, M.H. (2001): The use of fungicide and insecticide from medicinal plants for the conservation of cultural property. Conservation studies, 22: 5-26.
63. Císarová, M., Tančinová, D., Medo, J., Kačániová, M. (2016): The *in vitro* effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 51: 668-674.
64. Clark, G.A. (2001): Assessment and Sampling Approaches for Indoor Microbiological Assessments. American Industrial Hygiene Association: The Synergist. November.
65. Cooke, R.C., Rayner, A.D. (1984): Ecology of saprotrophic fungi. Longman, New York.
66. Corden, J.M., Millington, W.M., Mullins, J. (2003): Long-term trends and regional variation in the aeroallergen *Alternaria* in Cardiff and Derby UK - are differences in climate and cereal production having an effect? Aerobiologia, 19: 191-199.
67. D'amato, G., Spieksma, F.T.M. (1995): Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. Allergy, 50: 870-877.
68. Dakal, T.C., Cameotra, S.S. (2012): Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. Environental Sciences Europe, 24: 36.
69. de Ana, S.G., Torres-Rodriguez, J.M., Ramirez, E.A., Garcia, S.M., Belmonte-Soler, J. (2006): Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology, 16: 357-363.
70. de Aquino Neto, F.R., de Góes Siqueira, L.F. (2000): Guidelines for indoor air quality in offices in Brazil. Proceedings of Healthy Buildings, 4: 549-554.

71. de Billerbeck, V.G., Roques, C.G., Bessière, J.M., Fonvieille, J.L., Dargent, R. (2001): Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. Canadian Journal of Microbiology, 47: 9-17.
72. de Carvalho, H.P., Mesquita, N., Trovão, J., Rodríguez, S.F., Pinheiro, A.C., Gomes, V., Alcoforado, A., Gil, F., Portugal, A. (2018): Fungal contamination of paintings and wooden sculptures inside the storage room of a museum: Are current norms and reference values adequate? Journal of Cultural Heritage, 34: 268-276.
73. de la Paz, J., Larionova, M., Maceira, M.A., Borrego, S.F., Echevarría, E. (2006): Control of biodeterioration using a fraction isolated from leaves of *Ricinus communis* Linn. Pharmacologyonline, 3: 462–466.
74. de los Rios, A., Ascaso, C. (2005): Contributions of *in situ* microscopy to the current understanding of stone biodeterioration. International Microbiology, 8: 181-188.
75. de Martino, L., de Feo, V., Fratianni, F., Nazzaro, F. (2009): Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. Natural Product Communications, 4: 1741-1745.
76. de Nuntiis, P., Palla, F. (2017): Bioaerosol. In: Palla, F., Barresi, G. (eds), Biotechnology and conservation of cultural heritage. Springer, Berlin.
77. de Vries, R.P., Visser, J. (2001): *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65: 497-522.
78. del Monte, M., Sabbioni, C., Zappia, G. (1987): The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. Science of the Total Environment, 67: 17-39.
79. Desjardins, A.E., Hohn, T.M. (1997): Mycotoxins in plant pathogenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions, 10: 147-152.
80. Desrochers, M., Jurasek, L., Paice, M.G. (1981): High production of β-glucosidase in *Schizophyllum commune*: isolation of the enzyme and effect of the

culture filtrate on cellulose hydrolysis. Applied and Environmental Microbiology, 41: 222-228.

81. di Carlo, E., Chisesi, R., Barresi, G., Barbaro, S., Lombardo, G., Rotolo, V., Sebastianelli, M., Travagliato, G., Palla, F. (2016): Fungi and bacteria in indoor cultural heritage environments: microbial-related risks for artworks and human health. Environment and Ecology Research, 4: 257-264.
82. di Carlo, E., Barresi, G., Palla, F. (2017): Biodeterioration. In: Palla, F., Barresi, G. (eds), Biotechnology and conservation of cultural heritage. Springer, Berlin.
83. Diakumaku, E., Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Panina, L., Soukharjevski, S. (1995): Black fungi in marble and limestones - an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. Science of the Total Environment, 167: 295-304.
84. Dornieden, Th., Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E. (2000): Patina - physical and chemical interactions of sub-aerial biofilms with objects of Art. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (eds), Of microbes and art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 105-119.
85. Douglas, M.H., van Klink, J.W., Smallfield, B.M., Perry, N.B., Anderson, R.E., Johnstone, P., Weavers, R.T. (2004): Essential oils from New Zealand manuka: triketone and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. Phytochemistry, 65: 1255-1264.
86. Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003): Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. The Annals of Occupational Hygiene, 47: 187-200.
87. Dubey, N.K., Tripathi, P., Singh, H.B. (2000): Prospects of some essential oils as antifungal agents. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 22: 350-354.
88. Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., Beney, L. (2012): Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? Evolution: International Journal of Organic Evolution, 66: 2961-2968.

89. Dyląg, M., Hryncewicz-Gwóźdź, A., Jagielski, T. (2017): Onychomycosis due to *Arthrinium arundinis*: a case report. Acta Dermato-Venereologica, 97: 860-861.
90. Džamić, A., Soković, M., Ristić, M.S., Grijic-Jovanovic, S., Vukojević, J., Marin, P.D. (2009): Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. Chemistry of Natural Compounds, 45: 259-261.
91. Elbert, W., Taylor, P.E., Andreae, M.O., Pöschl, U. (2007): Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. Atmospheric Chemistry and Physics, 7: 4569-4588.
92. Ellis, M.B., Ellis, J.P. (1997): Microfungi on land plants: an identification handbook, new enlarged edition. Slough, Richmond.
93. Elsababty, Z., Ali, A.M., Houbraken, J. (2015): Cellulolytic and pectinolytic enzymes of some selected heat resistant fungi. Journal of Microbiology and Experimentation, 2: 00042.
94. Esquivel, P., Mangiaterra, M., Giusiano, G., Sosa, M.A. (2003): Microhongos anemófilos en ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. Boletín Micológico, 18: 21-28.
95. Feller, W. (1950): An introduction to probability theory and its applications. Vol. 1. Jokn Wiley & Sons, Inc., New York.
96. Fierascu, I., Ion, R.M., Radu, M., Dima, S.O., Bunghez, I.R., Avramescu, S.M., Fierascu, R.C. (2014): Comparative study of antifungal effect of natural extracts and essential oils of *Ocimum basilicum* on selected artefacts. Revue Roumaine de Chimie, 59: 207-211.
97. Fierascu, I., Ungureanu, C., Avramescu, S.M., Fierascu, R.C., Ortan, A., Soare, L.C., Paunescu, A. (2015): *In vitro* antioxidant and antifungal properties of *Achillea millefolium* L. Romanian Biotechnological Letters, 20: 10626-10636.
98. Fitzner, B., Heinrichs, K. (2002): Damage diagnosis on stone monuments - weathering forms, damage categories and damage indices. In: Prikryl, R., Viles, H. (eds), Understanding and managing stone decay, Proceeding of the

International Conference „Stone weathering and atmospheric pollution network (SWAPNET)", Charles University, The Karolinum Press, Prague, pp. 11-56.

99. Florian, M.L.E. (2002): Fungal facts: Solving fungal problems in heritage collections. Archetype Publications Ltd., London.
100. Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., Robert, A. (2004): Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Studies in Mycology, 49: 201-241.
101. Fröhlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D.A., Després, V.R., Pöschl, U. (2009): High diversity of fungi in air particulate matter. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106: 12814-12819.
102. Gadd, G.M. (1999): Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. Advances in microbial physiology, 41: 47-92.
103. Gadd, G.M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y.J., Wei, Z., Fomina, M., Liang, X. (2014): Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. Fungal Biology Reviews, 28: 36-55.
104. Garg, K.L., Jain, K.K., Mishra, A.K. (1995): Role of fungi in the deterioration of wall paintings. Science of the Total Environment, 167: 255-271.
105. Garrett, M.H., Rayment, P.R., Hooper, M.A., Abramson, M.J., Hooper, B.M. (1998): Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. Clinical and Experimental Allergy, 28: 459-467.
106. Gende, L.B., Floris, I., Fritz, R., Eguaras, M.J. (2008): Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. Bulletin of Insectology, 61: 1-4.
107. Ghalem, B.R., Mohamed, B. (2008): Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2: 211-215.
108. Ghosh, S. (2015): Microwave spectroscopic study of methyl salicylate and water clusters. Master thesis. University of Alberta. Department of chemistry.

109. Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1323–1330.
110. Gomez-Alarcon, G., de la Torre, M.A. (1994): The effect of filamentous fungi on stone monuments - the Spanish experience. In: J. Singh, J. Singh (ed.), Building mycology, management of decay and health in buildings. E & FN Spon, London, pp. 295-309.
111. Gómez de Saravia, S.G., de la Paz Naramjo, J., Guiamet, P., Arenas, P., Borrego, S.F. (2008): Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, 7: 25-29.
112. Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Hamman, C.H., Panina, L.K.S.S., Soukharjevski, S., Wollenzien, U. (1993): Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. Geomicrobiology Journal, 11: 205-221.
113. Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E. (1999): The poikilotrophic micro-organism and its environment. In: Seckbach J. (ed.), Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. Cellular origin and life in extreme habitats. Vol. 1. Springer, Dordrecht, pp. 175-185.
114. Górny, R.L., Reponen, T., Willeke, K., Schmechel, D., Robine, E., Boissier, M., Grinshpun, S.A. (2002): Fungal fragments as indoor air biocontaminants. Applied and Environmental Microbiology, 68: 3522-3531.
115. Górny, R.L., Harkawy, A.S., Lawniczek-Walczyk, A., Karbowska-Berent, J., Wlazlo, A., Niesler, A., Gołofit-Szymczak M., Cyprowski, M. (2016): Exposure to culturable and total microbiota in cultural heritage conservation laboratories. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, 29: 255-275.
116. Gu, J.D., Ford, T.E., Berke, N.S., Mitchell, R. (1998): Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. International Biodeterioration & Biodegradation, 41: 101-109.

117. Guevara-Suarez, M., Sutton, D.A., Cano-Lira, J.F., García, D., Martin-Vicente, A., Wiederhold, N., Guarro J., Gené, J. (2016): *Penicillium*-like fungi from clinical samples in the USA and their antifungal susceptibility. Journal of Clinical Microbiology, JCM-00960.
118. Guiamet, P.S., Gómez de Saravia, S.G. (2005): Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. Latin American Applied Research, 35: 295-300.
119. Gupta, K., Gupta, P., Mathew, J.L., Bansal, A., Singh, G., Singh, M., Chakrabarti, A. (2016): Fatal disseminated *Aspergillus penicillioides* infection in a 3-month-old infant with suspected cystic fibrosis: autopsy case report with review of literature. Pediatric and Developmental Pathology, 19: 506-511.
120. Gutarowska, B. (2010): Metabolic activity of moulds as a factor of building materials biodegradation. Polish Journal of Microbiology, 59: 119-124.
121. Gutarowska B., Jakubowska A. (2002): The estimation of moulds air pollution in university settings. In: Jędrzejewska-Ścibak, T., Sowa, J. (eds), Problems of indoor air quality in Poland. Publishing House of Warsaw University of Technology. Warsaw. pp. 103-112.
122. Gürcan, Ş., Tuğrul, H.M., Yörük, Y., Özer, B., Tatman-Otkun, M., Otkun, M. (2006): First case report of empyema caused by *Beauveria bassiana*. Mycoses, 49: 246-248.
123. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R. (2002): Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 47: 409-443.
124. Hameed, I.H., Altameme, H.J., Mohammed, G.J. (2016): Evaluation of antifungal and antibacterial activity and analysis of bioactive phytochemical compounds of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon bark) using gas chromatography-mass spectrometry. Oriental Journal of Chemistry, 32: 1769-1788.

125. Hanel, H., Raether, W. (1988): A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. Mycoses, 31: 148-154.
126. Hargrove, T.Y., Kim, K., Soeiro, M.D.N.C., da Silva, C.F., Batista, D.D.G.J., Batista, M.M., Yazlovitskaya, E.M., Waterman, M.R., Sulikowski, G.A., Lepesheva, G.I. (2012): CYP51 structures and structure-based development of novel, pathogen-specific inhibitory scaffolds. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 2: 178-186.
127. Harkawy, A., Górny, R.L., Ogierman, L., Wlazlo, A., Lawniczek-Walczyk, A., Niesler, A. (2011): Bioaerosol assessment in naturally ventilated historical library building with restricted personnel access. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 18: 323-329.
128. Hector, R.F., Laniado-Laborin, R. (2005): Coccidioidomycosis - a fungal disease of the Americas. PLoS Medicine, 2: e2.
129. Heberle, H., Meirelles, G.V., da Silva, F.R., Telles, G.P., Minghim, R. (2015): InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC bioinformatics, 16: 169.
130. Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. (2007): *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153: 1677-1692.
131. Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A.T. (1998): A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. FEBS letters, 428: 141-146.
132. Heo, K.J., Lim, C.E., Kim, H.B., Lee, B.U. (2017): Effects of human activities on concentrations of culturable bioaerosols in indoor air environments. Journal of Aerosol Science, 104: 58-65.
133. Herbrecht, R., Natarajan-Amé, S., Letscher-Bru, V., Canuet, M. (2004): Invasive pulmonary aspergillosis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 25: 191-202.

134. Hirsch, P., Eckhardt, F.E.W., Palmer, Jr.R.J. (1995): Fungi active in weathering of rock and stone monuments. Canadian Journal of Botany, 73: 1384-1390.
135. Hjelmroos, M. (1993): Relationship between airborne fungal spore presence and weather variables: *Cladosporium* and *Alternaria*. Grana, 32: 40-47.
136. Hodgson, M.J., Morey, P., Leung, W.Y., Morrow, L., Miller, D., Jarvis, B.B., Robbins, H., Hasley, J.F., Storey, E. (1998): Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 40: 241-249.
137. Horner, W.E., Helbling, A., Salvaggio, J.E., Lehrer, S.B. (1995): Fungal allergens. Clinical Microbiology Reviews, 8: 161-179.
138. Horton, D. (2012): Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Vol. 68. Academic Press, Oxford, UK.
139. Hou, W., Dou, C., Lian, B., Dong, H. (2013): The interaction of fungus with calcite and the effects on aqueous geochemistry in karst systems. Carbonates and Evaporates, 28: 413-418.
140. Houbraken, J.A., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2010): Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. Fungal Diversity, 44: 117-133.
141. Hueck, H.J. (1968): The biodeterioration of materials – an appraisal. In: Walters, A.H., Elphick, J.S. (eds), Biodeterioration of materials. Elsevier, London, pp. 6-12.
142. Hwang, S.H., Cho, J.H. (2016): Evaluation of airborne fungi and the effects of a platform screen door and station depth in 25 underground subway stations in Seoul, South Korea. Air Quality, Atmosphere & Health, 9: 561-568.
143. Ingold, C.T. (1971): Fungal spores. Their liberation and dispersal. Clarendon Press, Oxford.
144. Inouye, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Takeo, K., Akao, M., Yamaguchi, H. (1998): Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. Mycoses, 41: 403-410.

145. Ishii, H. (1995): Monitoring of fungicide resistance in fungi: biological to biochemical approaches. In: Simgh, S.U., Singh, P. R. (eds), Molecular methods in plant pathology, Lewis Publisher, Boca Raton, London, Tokyo, pp. 483-495.
146. James, D.G., Price, T.S. (2004): Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. Journal of Chemical Ecology, 30: 1613-1628.
147. Jarvis, B.B. (1990): Mycotoxins and indoor air quality. In: Morey, P.R., Feeley, J.C., Otten, J.A. (eds), Biological contaminants in indoor environments. ASTM International, West Conshohocken, PA, pp. 201-211.
148. Jenkins, K. A., Smith, B.J. (1990): Daytime rock surface temperature variability and its implications for mechanical rock weathering: Tenerife, Canary Islands. Catena, 17: 449-459.
149. Jo, W.S., Bae, S.H., Cho, D.H., Park, S.D., Yoo, Y.B., Park, S.C. (2009): Optimal medium conditions for the detection of cellulolytic activity in *Ganoderma lucidum*. Mycobiology, 37: 313-316.
150. Jones, B., Pemberton, S.G. (1987): The role of fungi in the diagenetic alteration of spar calcite. Canadian Journal of Earth Sciences, 24: 903-914.
151. Joshi, S.M. (2008): The sick building syndrome. Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine, 12: 61-64.
152. Karaalp, C., Yurtman, A.N., Karabay Yavasoglu, N.U. (2009): Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts. Pharmaceutical Biology, 47: 86-91.
153. Karbowska-Berent, J., Górny, R.L., Strzelczyk, A.B., Wlazło, A. (2011): Airborne and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives. Building and Environment, 46: 1872-1879.
154. Kasprzyk, I. (2008): Aeromycology - Main research fields of interest during the last 25 years. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 15: 1-7.
155. Kasprzyk, I., Worek, M. (2006): Airborne fungal spores in urban and rural environments in Poland. Aerobiologia, 22: 169-176.

156. Kauffman, C.A. (2007): Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clinical Microbiology Reviews, 20: 115-132.
157. Kelman, B.J., Robbins, C.A., Swenson, L.J., Hardin, B.D. (2004): Risk from inhaled mycotoxins in indoor office and residential environments. International Journal of Toxicology, 23: 3-10.
158. Khan, A.H., Karuppayil, S.M. (2012): Fungal pollution of indoor environments and its management. Saudi Journal of Biological Sciences, 19: 405-426.
159. Kim, J.J., Kim, S.H., Lee, S., Breuil, C. (2003): Distinguishing *Ophiostoma ips* and *O. montium* two bark beetle-associated sapstain fungi. FEMS Microbiology Letters, 222: 187-192.
160. Kitchen D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J. (2004): Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nature Reviews Drug Discovery, 3: 935-949.
161. Klich, M.A. (2009): Health effects of *Aspergillus* in food and air. Toxicology and Industrial Health, 25: 657-667.
162. Koestler, R.J., Santoro, E.D. (1990): Biodeterioration in museums - observations. In: Llewellyn, G.C., O'Rear, C.E. (eds), Biodeterioration Research 3. Springer science + Business media LLC, New York, pp. 505-509.
163. Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T. (2002): Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology, 82: 51-53.
164. Kolwzan, B., Adamiak, W., Grabas, K. Pawe1czyk, A. (2006): Introduction to environmental microbiology. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wroc1awskiej, Wroc1aw.
165. Krijgsheld, P., Bleichrodt, R.V., Van Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J., Wösten, H.A.B. (2013): Development in *Aspergillus*. Studies in Mycology, 74: 1-29.
166. Krumbein, W.E. (2002): Patina and cultural heritage - a geomicrobiologist's perspective. Proceedings of the 5th European Commission Conference. Cultural Heritage Research: a Pan European Challenge, Cracow, pp. 16-18.

167. Kumar, R., Kumar, A.V. (1999): Biodeterioration of stone in tropical environments: an overview. The Getty Conservation Institute, Los Angeles.
168. Langsrud, S., Sundheim, G., Borgmann-Strahsen, R. (2003): Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology, 95: 874-882.
169. Lavin, P., de Saravia, S.G., Guiamet, P. (2016): *Scopulariopsis* sp. and *Fusarium* sp. in the documentary heritage: evaluation of their biodeterioration ability and antifungal effect of two essential oils. Microbial Ecology, 71: 628-633.
170. Lee, K.M., Lee, K.M., Kim, I.W., Kim, Y.S., Jeya, M., Lee, J.K. (2010): One-step purification and characterization of a β-1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87: 2107-2116.
171. Lehtonen, M., Reponen, T., Nevalainen, A. (1993): Everyday activities and variation of fungal spore concentrations in indoor air. International Biodeterioration & Biodegradation, 31: 25-39.
172. Lepesheva, G.I., Waterman, M.R. (2007): Sterol 14α-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1770: 467-477.
173. Levetin, E., Shaughnessy, R., Fisher, E., Ligman, B., Harrison, J., Brennan, T. (1995): Indoor air quality in schools: exposure to fungal allergens. Aerobiologia, 11: 27-34.
174. Liang, Y.L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., Feng, J.X. (2014): Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. BioMed Research International, Article ID 512497.
175. Licorish, K., Novey, H.S., Kozak, P., Fairshter, R.D., Wilson, A.F. (1985): Role of *Altemaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 76: 819-825.
176. Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2011): Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood-and litter-

colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. FEMS Microbiology Ecology, 78: 91-102.

177. Lim, Y.W., Alamouti, S.M., Kim, J.J., Lee, S., Breuil, C. (2004): Multigene phylogenies of *Ophiostoma clavigerum* and closely related species from bark beetle-attacked *Pinus* in North America. FEMS Microbiology Letters, 237: 89–96.
178. Ljaljević Grbić, M., Unković, N., Stupar, M., Vukojević, J., Nedeljković, T. (2014): Implementation of ATP biolumenescence method in the study of the fungal deterioration of textile artefacts. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 6: 132-137.
179. Ljaljević Grbić, M., Unković, N., Dimkić, I., Janaćković, P., Gavrilović, M., Stanojević, O., Stupar, M., Vujisić, Lj., Jelikić, A., Stanković, S., Vukojević, J. (2018): Frankincense and myrrh essential oils and burn incense fume against micro-inhabitants of sacral ambients. Wisdom of the ancients? Journal of Ethnopharmacology, 219: 1-14.
180. Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., Corda, P. (1995): Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. Plant Disease, 79: 727-731.
181. Lugauskas, A., Krikŝtaponis, A. (2004): Microscopic fungi found in the libraries of Vilnius and factors affecting their development. Indoor and Built Environment, 13: 169-182.
182. Luo, W. (1991): Deposition of large particles in the nose and mouth. Grana, 30: 79-81.
183. Mandels, M., Reese, E.T. (1957): Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. Journal of Bacteriology, 73: 269-278.
184. Marco, A., Moreira, P.R., Pintado, M., Vieira, E. (2016): Enzymatic degradation of fungal pigmentation from wall painting's isolates. Color Research & Application. 41: 299-301.
185. Maruzzella, J.C., Sicurella, N.A. (1960): Antibacterial activity of essential oil vapors. Journal of American Pharmacists Association, 49: 692–694.

186. Marvasi, M., Gallagher, K.L., Martinez, L.C., Molina Pagan, W.C., Rodríguez Santiago, R.E., Castilloveitía Vega, G., Visscher, P.T. (2012a): Importance of B4 medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. Geomicrobiology Journal, 29: 916-924.
187. Marvasi, M., Donnarumma, F., Frandi, A., Mastromei, G., Sterflinger, K., Tiano, P., Perito, B. (2012b): Black microcolonial fungi as deteriogens of two famous marble statues in Florence, Italy. International Biodeterioration & Biodegradation, 68: 36-44.
188. Meyer, K.C., McManus, E.J., Maki, D.G. (1993): Overwhelming pulmonary blastomycosis associated with the adult respiratory distress syndrome. New England Journal of Medicine, 329: 1231-1236.
189. MIBAC (2001): Atto d'indirizzo sui criteri tecnico-scientifici e sugli standard di funzionamento e sviluppo dei musei, D.Lgs. n.112/98 art.150 comma 6.
190. Micali, O., Montacutelli, R., Tarsitani, G. (2003): Pathogenic microorganisms and situations of risk to man. In: Mandrioli, P., Caneva, G., Sabbioni, C. (eds), Cultural heritage and aerobiology. Methods and measurement techniques for biodeterioration monitoring. Springer Science + Business Media Dordrecht.
191. Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz, W., Piñar, G. (2006): Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. International Biodeterioration & Biodegradation, 58: 133-141.
192. Micheluz, A., Manente, S., Tigini, V., Prigione, V., Pinzari, F., Ravagnan, G., Varese, G.C. (2015): The extreme environment of a library: xerophilic fungi inhabiting indoor niches. International Biodeterioration & Biodegradation, 99: 1-7.
193. Miller, J.D. (1992): Fungi as contaminants in indoor air. Atmospheric Environment. Part A. General Topics, 26: 2163-2172.
194. Miller, J.D., Rand, T.G., Jarvis, B.B. (2003): *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? Medical Mycology, 41: 271-291.

195. Mitchell, T.G., Perfect, J.R. (1995): Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clinical Microbiology Reviews, 8: 515-548.
196. Mohammadi, P., Krumbein, W.E. (2008): Biodeterioration of ancient stone materials from the Persepolis monuments (Iran). Aerobiologia, 24: 27-33.
197. Mullapudi, S., Siletzky, R.M., Kathariou, S. (2008): Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey-processing plants. Applied and Environmental Microbiology, 74: 1464-1468.
198. Narasimha, G., Reddi Pradeep, M., Sridevi, A. (2016): Chemical pretreatment of agricultural feedstock for enhanced production of cellulase by mutant fungus, *Aspergillus niger*. Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering, 1: 00004.
199. Nevalainen, A., Morawaska, L. (2009): Biological agents in indoor environments. Assessment of health risks. Work conducted by a WHO Expert Group between 2000-2003. Copenhagen, Denmark: World Health Organization.
200. Nevalainen, A., Täubel, M., Hyvärinen, A. (2015): Indoor fungi: companions and contaminants. Indoor Air, 25: 125-156.
201. Nielsen, K.F. (2003): Mycotoxin production by indoor molds. Fungal Genetics and Biology, 39: 103-117.
202. Niesler, A., Górny, R.L., Wlazło, A., Łudzeń-Izbińska, B., Ławniczek-Wałczyk, A., Gołofit-Szymczak, M., Meres, Z., Kasznia-Kocot, J., Harkawy, Lis D.O., Anczyk, E. (2010): Microbial contamination of storerooms at the Auschwitz-Birkenau Museum. Aerobiologia, 26: 125-133.
203. Nikkels, A.H., Terstegge, P., Spieksma, F.T.M. (1996): Ten types of microscopically identifiable airborne fungal spores at Leiden, The Netherlands. Aerobiologia, 12: 107-112.
204. Nittérus, M. (2000): Fungi in archives and libraries. Restaurator, 21: 25-40.
205. Nunes, I., Mesquita, N., Verde, S.C., Bandeira, A.M.L., Carolino, M.M., Portugal, A., Botelho, M.L. (2013): Characterization of an airborne microbial

community: a case study in the archive of the University of Coimbra, Portugal. International Biodeterioration & Biodegradation, 79: 36-41.

206. Nyuksha, Ju.P. (1994): The biodeterioration of paper and books. In: Garg, K.L., Garg, N., Mukerji, K.G. (eds), Recent advances in bodeterioration and biodegradation. Naya Prokash, Calcutta, India, pp. 1-88.
207. O'Donnell, K., Cigelnik, E. (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution, 7: 103–116.
208. Oliviera, M., Lage, O.M., Araujo, R. (2012): Airborne fungi and bacteria in public indoor environments. In: Daniels, J.A. (ed.), Indoor air quality: bioindicators, improvements methods, and health effects. Nova Science Publishers, pp. 1-32.
209. Onsori, H., Zamani, M.R., Motallebi, M., Zarghami, N. (2005): Identification of over producer strain of endo-β-1,4-glucanase in *Aspergillus* species: characterization of crude carboxymethyl cellulase. African Journal of Biotechnology, 4: 26-30.
210. Oren, I., Goldstein, N. (2002): Invasive pulmonary aspergillosis. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 8: 195-200.
211. Orlita, A. (2004): Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 53: 157–163.
212. Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J., Reyes-Estebanez, M., Quintana, P., De la Rosa-García, S., Bullen, H., Gómez-Cornelio, S., Chan-Bacab, M.J. (2016): Bioweathering potential of cultivable fungi associated with semiarid surface microhabitats of Mayan buildings. Frontiers in Microbiology, 7: 201.
213. OSHA, Eagle Industrial Hygiene Associates (2004): Microbial Sampling and Analysis: Molds and Bacteria.
214. Oshikata, C., Tsurikisawa, N., Saito, A., Watanabe, M., Kamata, Y., Tanaka, M., Tsuburai, T., Mitomi, H., Takatori, K., Yasueda, H., Akiyama, K. (2013): Fatal pneumonia caused by *Penicillium digitatum*: a case report. BMC Pulmonary Medicine, 13: 16.

215. Palmer, Jr.R.J., Siebert, J., Hirsch, P. (1991): Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building: production by bacterial and fungal isolates. Microbial Ecology, 21: 253-266.
216. Pangallo, D., Chovanova, K., Šimonovičová, A., Ferianc, P. (2009): Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. Canadian Journal of Microbiology, 55: 277-287.
217. Pangallo, D., Kraková, L., Chovanová, K., Šimonovičová, A., De Leo, F., Urzì, C. (2012): Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 2015-2027.
218. Papandreou, V., Magiatis, P., Chinou, I., Kalpoutzakis, E., Skaltsounis, A.L., Tsarbopoulos, A. (2002): Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek Paeonia taxa. Journal of Ethnopharmacology, 81: 101-104.
219. Pasquariello, G., Maggi, O., Persiani, A.M. (2008a): General processes of Biodeterioration of Materils of Plant origin. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 99-100.
220. Pasqariello, G., Valenti, P., Maggi, O., Persiani, A.M. (2008b): Paper. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 108-113.
221. Pei-Chih, W., Huey-Jen, S., Chia-Yin, L. (2000): Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. Science of the Total Environment, 253: 111-118.
222. Pepys, J. (1965): Hypersensitivity disease of the lung due to fungi and organic dusts. Monographs in Allergy, 4: 51.

223. Piecková, E., Jesenská, Z. (1999): Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 6: 1-12.
224. Piervittori, R., Nimis, P., Tretiach., M. (2008): Lichens. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 77-81.
225. Pinna, D., Salvadori, O. (2000): Endolithic lichens and conservation: an underestimate question. Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. pp. 513-519.
226. Pinna, D., Salvadori, O. (2008a): Processes of biodeterioration: general mechanisms. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 15-34.
227. Pinna, D., Salvadori, O. (2008b): Stone and related materials. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 128-144.
228. Pinna, D., Salvadori, O., Tretiach, M. (1998): An anatomical investigation of calcicolous endolithic lichens from the Trieste karst (NE Italy). Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 132: 183-195.
229. Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2009): Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology, 58: 1454-1462.
230. Pinzari, F., Zotti, M., De Mico, A., Calvini, P. (2010): Biodegradation of inorganic components in paper documents: formation of calcium oxalate crystals as a consequence of *Aspergillus terreus* Thom growth. International Biodeterioration & Biodegradation, 64: 499-505.

231. Piñar, G., Tafer, H., Sterflinger, K., Pinzari, F. (2015): Amid the possible causes of a very famous foxing: molecular and microscopic insight into Leonardo da Vinci's self-portrait. Environmental Microbiology Reports, 7: 849-859.
232. Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009): Fungi and food spoilage, third edition. Springer. New York.
233. Ponizovskaya, V.B., Rebrikova, N.L., Kachalkin, A.V., Antropova, A.B., Bilanenko, E.N., Mokeeva, V.L. (2019): Micromycetes as colonizers of mineral building materials in historic monuments and museums. Fungal Biology, 123: 290-306.
234. Porter, N.G., Wilkins, A.L. (1999): Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. Phytochemistry, 50: 407-415.
235. Pravilnik o preventivnim merama za bezbedan i zdrav rad pri izlaganju biološkim štetnostima (2010): „Sl. glasnik RS", br. 96/2010.
236. Rabie, C.J., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Lübben, A., Marasas, W.F. (1986): T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. Applied and Environmental Microbiology, 52: 594-596.
237. Rafferty, P., Biggs, B.A., Crompton, G.K., Grant, I.W. (1983): What happens to patients with pulmonary aspergilloma? Analysis of 23 cases. Thorax, 38(8): 579-583.
238. Rai, M.K. (1989): Mycosis in Man Due to *Arthrinium phaeospermum* var. *indicum*. First Case Report. Mycoses, 32(9): 472-475.
239. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C. (2012): Fungal biofilm resistance. International journal of microbiology, Article ID 528521.
240. Rao, C.Y., Burge, H.A., Chang, J.C. (1996): Review of quantitative standards and guidelines for fungi in indoor air. Journal of the Air & Waste Management Association, 46: 899-908.
241. Rath, C.C., Devi, S., Dash, S.K., Mishra, R.K. (2008): Antibacterial potential assessment of *Jasmine* essential oil against *E. coli*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 70: 238-241.

242. Rebricova, N.L. (1991): Some ecological aspects of protection of old Russian wall paintings from microbiological deterioration. In: Agrawal, O.P., Dhawan S. (eds), Biodeterioration of Cultural Property. Macmillan, New Delhi, India, pp. 294-306.
243. Redlich, C.A., Sparer, J., Cullen, M.R. (1997): Sick-building syndrome. The Lancet, 349: 1013-1016.
244. Reponen, T.A.M.M.P., Nevalainen, A., Jantunen, M., Pellikka, M., Kalliokoski, P. (1992): Normal range criteria for indoor air bacteria and fungal spores in a subarctic climate. Indoor Air, 2: 26-31.
245. Reppas, G., Gottlieb, T., Krockenberger, M., Halliday, C., Malik, R. (2015): *Microsphaeropsis arundinis*: an emerging cause of phaeohyphomycosis in cats and people. Microbiology Australia, 36: 74-78.
246. Rikkinen, J. (1995): What's behind the pretty colors: a study on the photobiology of lichens. Bryobrothera, 4: 1-239.
247. Robbins, C.A., Swenson, L.J., Nealley, M.L., Kelman, B.J., Gots, R.E. (2000): Health effects of mycotoxins in indoor air: a critical review. Applied Occupational and Environmental Hygiene, 15: 773-784.
248. Roe, A.D., Rice, A.V., Bromilow, S.E., Cooke, J.E., Sperling, F.A. (2010): Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle. Molecular Ecology Resources, 10: 946-959.
249. Rojas, T.I., Aira, M.J., Batista, A., Cruz, I.L., González, S. (2012): Fungal biodeterioration in historic buildings of Havana (Cuba). Grana, 51: 44-51.
250. Rotolo, V., Barresi, G., Di Carlo, E., Giordano, A., Lombardo, G., Crimi, E., Costa, E., Bruno, M., Palla, F. (2016): Plant extracts as green potential strategies to control the biodeterioration of cultural heritage. International Journal of Conservation Science, 2: 839-846.
251. Salem, M.Z., Zidan, Y.E., Mansour, M.M., El Hadidi, N.M., Elgat, W.A.A. (2016): Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three

commercial woods deteriorated by five common mold fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, 106: 88-96.

252. Salvadori, O. (2000): Characterisation of endolithic communities of stone monuments and natural outcrops. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (eds), Of Microbes and Art. Springer, Boston, MA, pp. 89-101.
253. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004): Introduction to food and airborne fungi. 7th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
254. Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2010): Food and indoor fungi. 1st edition. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands.
255. Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A., Petrini, O. (2002): *Trichoderma* species associated with green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia, 94: 146–170.
256. Sandulachi, E. (2012): Water activity concept and its role in food preservation. Meridian Engineering, 4: 40-48.
257. Saran, S., Isar, J., Saxena, R.K. (2007): A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70: 697-699.
258. Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Fourquenet, V., Calinon, C., Paul, K., Valvin, S., Maurel, A., Aho, S., Couillault, G., Cachia, C., Vagner, O., Cuisenier, B., Caillot, D., Bonnin, A. (2009): Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. Science of the Total Environment, 407: 3766-3771.
259. Savini, V., Catavitello, C., Onofrillo, D., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Febbo, F., D'amario, C., D'Antonio, D. (2011): What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. Mycoses, 54: 434-441.
260. Savković, Ž.D., Stupar, M.Č., Ljaljević Grbić, M.V., Vukojević, J.B. (2016a): Comparison of anti-*Aspergillus* activity of *Origanum vulgare* L. essential oil and

commercial biocide based on silver ions and hydrogen peroxide. Acta Botanica Croatica, 75: 121-128.

261. Savković, Ž., Unković, N., Stupar, M.. Franković, M., Jovanović, M., Erić, S., Šarić, K., Stanković, S., Dimkić, I., Vukojević, J., Ljaljević Grbić, M. (2016b): Diversity and biodeteriorative potential of fungal dwellers on ancient stone stela. International Biodeterioration & Biodegradation, 115: 212-223.
262. Savković, Ž., Stupar, M., Unković, N., Ivanović, Ž., Blagojević, J., Vukojević, J., Ljaljević Grbić, M. (2019): *In vitro* biodegradation potential of airborne *Aspergilli* and *Penicillia*. The Science of Nature, 106: 8.
263. Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B. (2005): Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses, 48: 365-377.
264. Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C. (2009): Microbial deterioration of stone monuments - an updated overview. Advances in Applied Microbiology, 66: 97-139.
265. Schoch, C.L., Sung, G.H., López-Giráldez, F., Townsend, J.P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P.B., Kauff, F., Zheng, W., Gueidan, C., Andrie, R.M., Trippe, K. , Ciufetti, L.M., Wynns, A., Fraker, E. et al. (2009): The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. Systematic Biology, 58, 224-239.
266. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109: 6241-6246.
267. Schnadig, V.J., Rassekh, C.H., Gourley, W.K. (1999): Allergic Fungal Sinusitis. Acta Cytologica, 43: 268-272.
268. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., Van Dijck, P. (2002): On the safety of *Aspergillus niger* - a review. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 426-435.

269. Schwab, C.J., Straus, D.C. (2004): The roles of *Penicillium* and *Aspergillus* in sick building syndrome. Advances in Appied Microbiolpgy, 55: 215–237.
270. Shahi, S.K., Patra, M. (2003): Microbially synthesized bioactive nanoparticles and their formulation active against human pathogenic fungi. Reviews on Advanced Materials Science, 5: 501-509.
271. Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., Sandmann, G., Thines, M. (2015): The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina. BMC Genomics, 16: 233.
272. Sharpe, R.A., Le Cocq, K., Nikolaou, V., Osborne, N.J., Thornton, C.R. (2016): Identifying risk factors for exposure to culturable allergenic moulds in energy efficient homes by using highly specific monoclonal antibodies. Environmental Research, 144: 32-42.
273. Shelton, B.G., Kirkland, K.H., Flanders, W.D., Morris, G.K. (2002): Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1743-1753.
274. Shivani, D., Kumar, J.S. (2015): Extracellular enzymatic profile of fungal deteriogens of historical Palace of Ujjain. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4: 122-132.
275. Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I. (1997): Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature, 385: 718-721.
276. Silverman, M.P., Munoz, E.F. (1970): Fungal attack on rock: solubilization and altered infrared spectra. Science, 169: 985-987.
277. Simeray, J., Chaumont, J.P., Léger, D. (1993): Seasonal variations in the airborne fungal spore population of the East of France (Franche-Comte). Comparison between urban and rural environment during two years. Aerobiologia, 9: 201-206.
278. Simić, A., Soković, M.D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P.D. (2004): The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. Phytotherapy Research, 18: 713-717.

279. Simić, A., Rančic, A., Soković, M.D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P.D. (2008): Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. Pharmaceutical Biology, 46: 437-441.
280. Skóra, J., Gutarowska, B., Pielech-Przybylska, K., Stępień, Ł., Pietrzak, K., Piotrowska, M., Pietrowski, P. (2015): Assessment of microbiological contamination in the work environments of museums, archives and libraries. Aerobiologia, 31: 389-401.
281. Slack, G.J., Puniani, E., Frisvad, J.C., Samson, R.A., Miller, J.D. (2009): Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. Mycological Research, 113: 480-490.
282. Smith, G. (1980): Ecology and field biology. Harper & Row. New York.
283. Sohalscha, E.B., Appelt, H., Schatz, A. (1967): Chelation as a weathering mechanism - I. Effect of complexing agents on the solubilization of iron from minerals and granodiorite. Geochimica et Cosmochimica Acta, 31: 587-596.
284. Sorenson, W.G. (1999): Fungal Spores: Hazardous to Health? Environmental Health Perspectives, 107: 469-472.
285. Souza, N.A.B., Lima, E.D.O., Guedes, D.N., Pereira, F.D.O., Souza, E.L.D., Sousa, F. B.D. (2010): Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 46: 499-508.
286. Spengler, J.D., Chen, Q. (2000): Indoor air quality factors in designing a healthy building. Annual Review of Energy and the Environment, 25: 567-600.
287. Sterflinger, K. (2000): Fungi as geologic agents. Geomicrobiology Journal, 17: 97-124.
288. Sterflinger, K. (2010): Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. Fungal Biology Reviews, 24: 47-55.

289. Sterflinger, K., Pinzari, F. (2012): The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. Minireview. Environmental Microbiology, 14: 559–566.
290. Sterflinger, K., Piñar, G. (2013): Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills? Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 9637-9646.
291. Stetzenbach, L.D. (2007): Introduction to aerobiology. In: Hurst, C., Crawford, R., Garland, J., Lipson, D., Mills, A., Stetzenbach, L. (eds), Manual of Environmental Microbiology, Third Edition. ASM Press, Washington, DC, pp. 925-938.
292. Stojanović, G., Radulović, N., Hashimoto, T., Palić, R. (2005): *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. Journal of Ethnopharmacology, 101: 185-190.
293. Stryjakowska-Sekulska, M., Piotraszewska-Pajak, A., Szyszka, A., Nowicki, M., Filipiak, M. (2007): Microbiological quality of indoor air in university rooms. Polish Journal of Environmental Studies, 16: 623-632.
294. Stupar, M., Ljaljević Grbić, M., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., Jelikić, A., Vukojević, J. (2014): Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. South African Journal of Botany, 93: 118-124.
295. Sukumaran, R.K.., Singhania, R.R., Pandey, A. (2005): Microbial cellulases - production, applications and challenges. Journal of Scientific and Industrial Research, 64: 832-844.
296. Szostak-Kotowa, J. (2004): Biodeterioration of textiles. International Biodeterioration & Biodegradation, 53: 165-170.
297. Tajik, H., Jalali, F.S.S., Sobhani, A., Shahbazi, Y., Zadeh, M.S. (2008): *In vitro* assessment of antimicrobial efficacy of alcoholic extract of *Achillea millefolium* in comparison with penicillin derivatives. Journal of Animal and Veterinary Advances, 7: 508-11.

298. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
299. Tarsitani, G. (2008): The prevention of biological risk: health aspects related to microflora. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Nugari, M.P., Salvadori, O. (eds), Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Conservation Institute, Los Angeles, pp. 99-100.
300. Teather, R.M., Wood, P.J. (1982): Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology, 43: 777-780.
301. Tillie-Leblond, I., Tonnel, A.B. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy, 60: 1004-1013.
302. To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W. (2002): Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 5258-5264.
303. Tretiach, M., Pinna, D., Grube, M. (2003): *Caloplaca erodens* [sect. *Pyrenodesmia*], a new lichen species from Italy with an unusual thallus type. Mycological Progress, 2: 127-136.
304. Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. (1999): A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. Journal of Bacteriology, 181: 6469-6477.
305. Tucker, D.L., Beresford, C.H., Sigler, L., Rogers, K. (2004): Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. Journal of Clinical Microbiology, 42: 5412-5414.
306. Unković, N., Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Savković, Ž., Jelikić, A., Stanojević, D., Vukojević, J. (2016): Fungal-induced deterioration of mural paintings: *in situ* and mock-model microscopy analyses. Microscopy and Microanalyisis. 22: 410-421.

307. Unković, N., Erić, S., Šarić, K., Stupar, M., Savković, Ž., Stanković, S., Stanojević O., Dimkić I., Vukojević J., Ljaljević Grbić, M. (2017): Biogenesis of secondary mycogenic minerals related to wall paintings deterioration process. Micron, 100: 1-9.
308. Unković, N., Dimkić, I., Stupar, M., Stanković, S., Vukojević, J., Ljaljević Grbić, M. (2018): Biodegradative potential of fungal isolates from sacral ambient: *in vitro* study as risk assessment implication for the conservation of wall paintings. PloS one 13: e0190922.
309. Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G.V., Zeytinoglu, H.S., Vural, N. (2010): Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food and Chemical Toxicology, 48: 3274-3280.
310. Urzi, C., de Leo, F. (2001): Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. Journal of Microbiological Methods, 44: 1-11.
311. Varga, J., Houbraken, J., Van Der Lee, H.A., Verweij, P.E., Samson, R.A. (2008): *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. Eukaryotic Cell, 7: 630-638.
312. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J., Marın, S. (2003): Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. International Journal of Food Microbiology, 89: 145-154.
313. Vengurlekar, S., Sharma, R., Trivedi, P. (2014): Synthesis, antifungal activity and molecular docking studies on N-(substituted-benzylidineamine)-3-cycloalkylidine-thiosemicarbazide derivatives. International Journal of Drug Delivery, 6: 99-112.
314. Vergès-Belmin, V. (ed.) (2008): Illustrated glossary on stone deterioration patterns. Monuments and Sites XV. ICOMOS, Paris.

315. Viegas, C., Pinheiro, A.C., Sabino, R., Viegas, S., Brandão, J., Veríssimo, C. (2015): Environmental mycology in public health: fungi and mycotoxins risk assessment and management. Academic Press. Cambridge, Massachusetts, USA.
316. Visagie, C.M., Hirooka, Y., Tanney, J.B., Whitfield, E., Mwange, K., Meijer, M., Amend, A.S., Seifert, K.A., Samson, R.A. (2014): *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. Studies in Mycology, 78: 63-139.
317. Wainwright, M. (1999): An introduction to environmental biotechnology. Springer, Boston, MA.
318. Warscheid, T., Braams, J. (2000): Biodeterioration of stone: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 46: 343-368.
319. Watanabe, T. (2002): Soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Crc press. London.
320. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, pp. 315-322.
321. Wonder Makers Environmental, Inc. (2001): Post-remediation guideline. Information Series 147, December.
322. World Health Organization. (1990): Indoor Air Quality: Biological Contaminants. European Series No 31. WHO Regional publications. Copenhagen, p. 67.
323. World Health Organization Europe (2009): WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Dampness and Mould. WHO, Copenhagen.
324. Wheeler, M.H., Bell, A.A. (1988): Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGiniss, M.R. (ed.), Current topics in medical mycology. Springer-Verlag, New York, pp. 338–387.
325. Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. (2013): *Alternaria* redefined. Studies in Mycology, 75: 171-212.

326. Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G., Wang, X.R. (2003): 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. Applied and Environmental Microbiology, 69: 5389-5397.

327. Wu, J., Ni, T., Chai, X., Wang, T., Wang, H., Chen, J., Jin, Y., Zhang, D., Yu, S., Jiang, Y. (2018): Molecular docking, design, synthesis and antifungal activity study of novel triazole derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, 143: 1840-1846.

328. Xu, Y., He, Y., Li, X., Gao, C., Zhou, L., Sun, S., Pang, G. (2013): Antifungal effect of ophthalmic preservatives phenylmercuric nitrate and benzalkonium chloride on ocular pathogenic filamentous fungi. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 75: 64-67.

329. Yazicioglu, M., Asan, A., Ones, U., Vatansever, U., Sen, B., Ture, M., Bostancioglu, M., Pala, O. (2002): Indoor air fungal spores and home characteristics in asthmatic children from Edirne region of Turkey. Allergologia et Immunopathologia, 32: 197-203.

330. Yew, S.M., Chan, C.L., Ngeow, Y.F., Toh, Y.F., Na, S.L., Lee, K.W., Hoh, C., Yee, W., Ng, K.P., Kuan, C.S. (2016): Insight into different environmental niches adaptation and allergenicity from the *Cladosporium sphaerospermum* genome, a common human allergy-eliciting Dothideomycetes. Scientific Reports, 6: 27008.

331. Yilmaz, N., Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2014): Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. Studies in Mycology, 78: 175-341.

332. Young, M.E., Alakomi, H.L., Fortune, L., Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Maxwell, I., McCullagh, C., Robertson, P., Saarela, M., Valero, J., Vendrell, M. (2008): Development of a biocidal treatment regime to inhibit biological growths on cultural heritage: BIODAM. Environmental Geology, 56: 631–641.

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

Lista fotografija korišćenih prema Creative commons licenci za slobodnu dokumentaciju:

Slika 1. Deo slike preuzet i adaptiran:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illu_conducting_passages.svg
Autor: Lord Akryl, Jmarchn
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bronchial_anatomy.jpg
Autor: Patrick J. Lynch

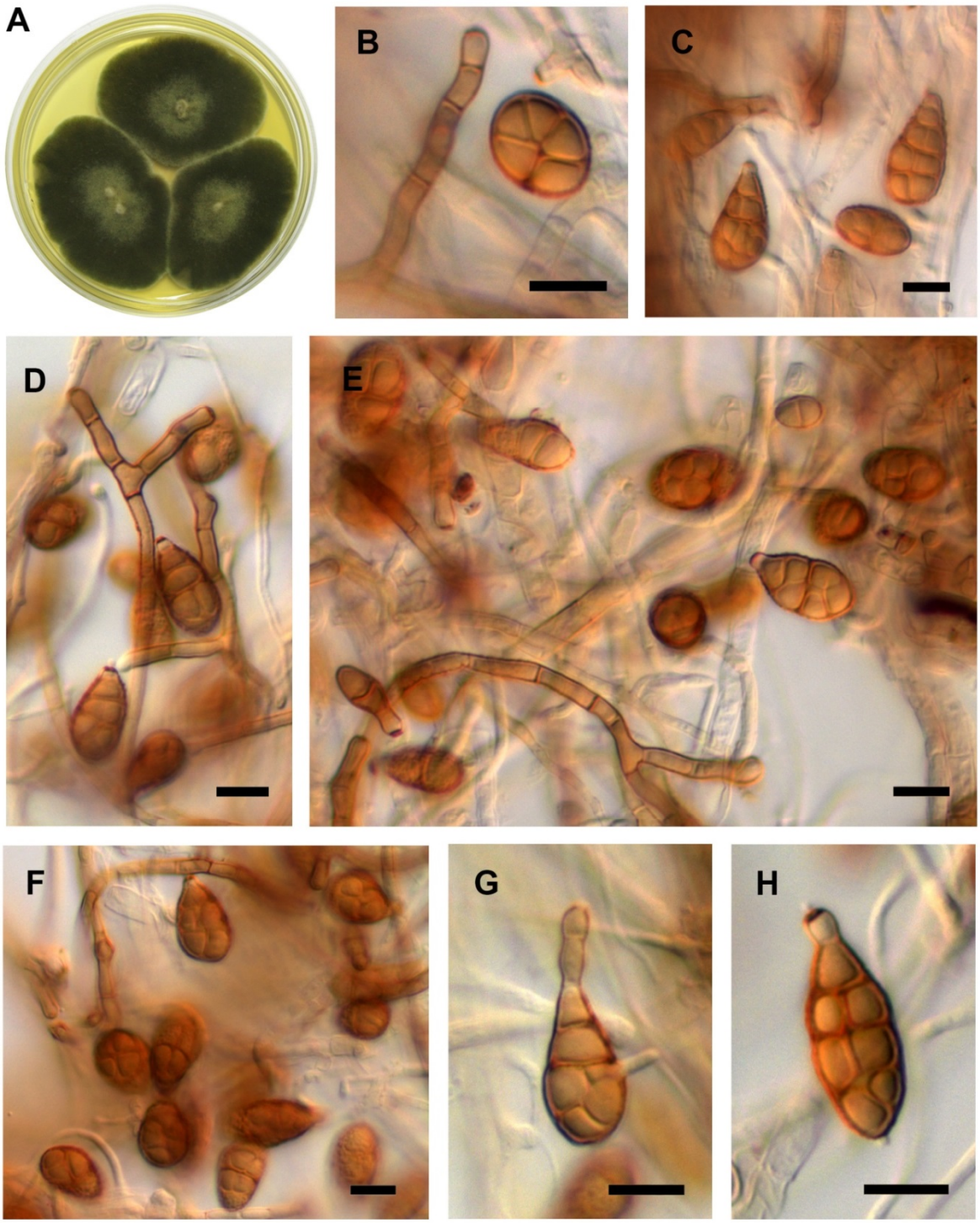
Slika 2. Deo slike preuzet i adaptiran:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oxals%C3%A4ure2.svg
Autor: NEUROtiker

Slika 3. Preuzeto i adaptirano:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Types_of_Cellulase2.png
Autor: Trikly

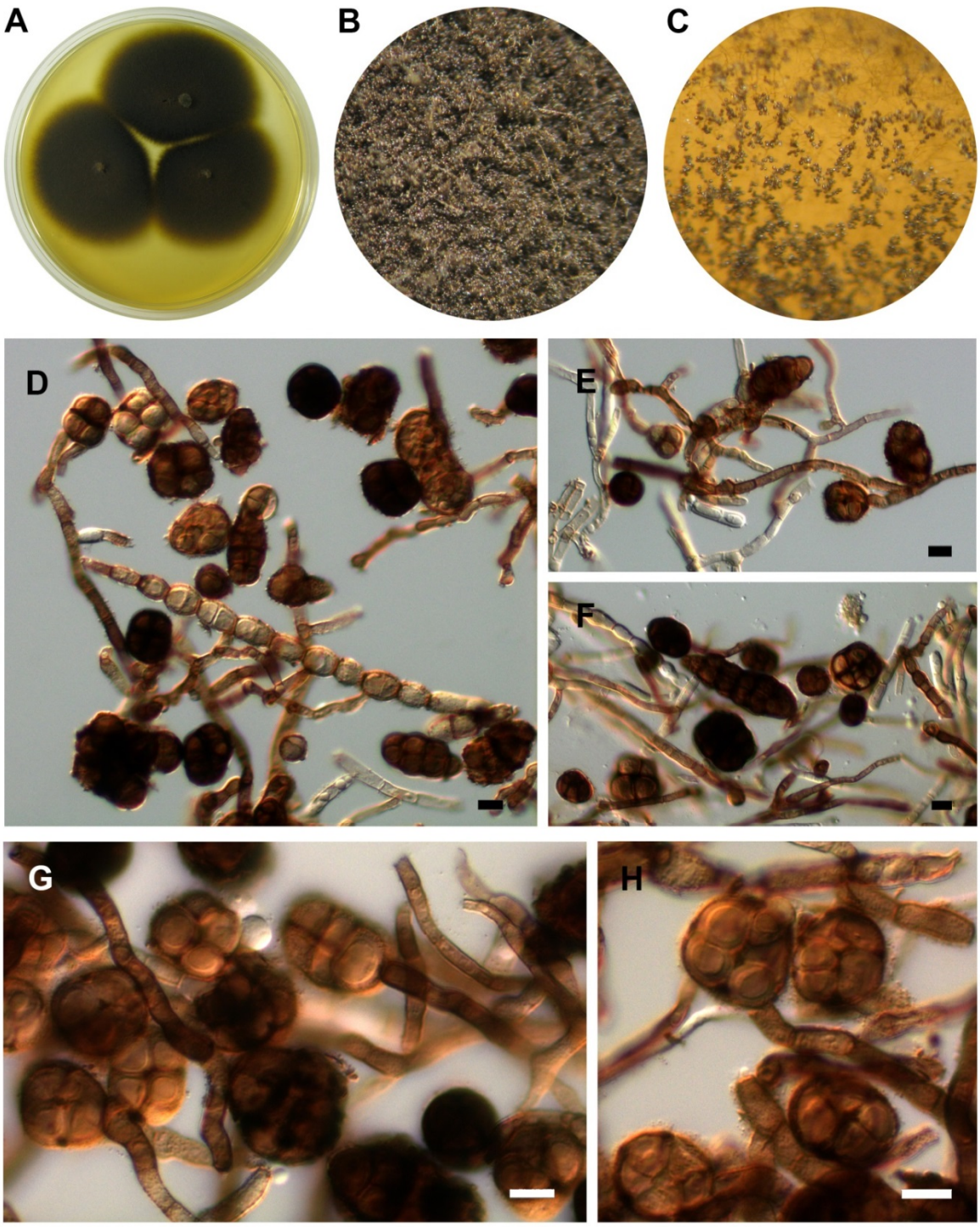
Slika 10. Preuzeto i adaptirano:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bromkresolpurpur,_Gleichgewicht.svg
Autor: NEUROtiker

Slika 11. Preuzeto i adaptirano:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Congo-red-2D-skeletal.png
Autor: Benjah-bmm27

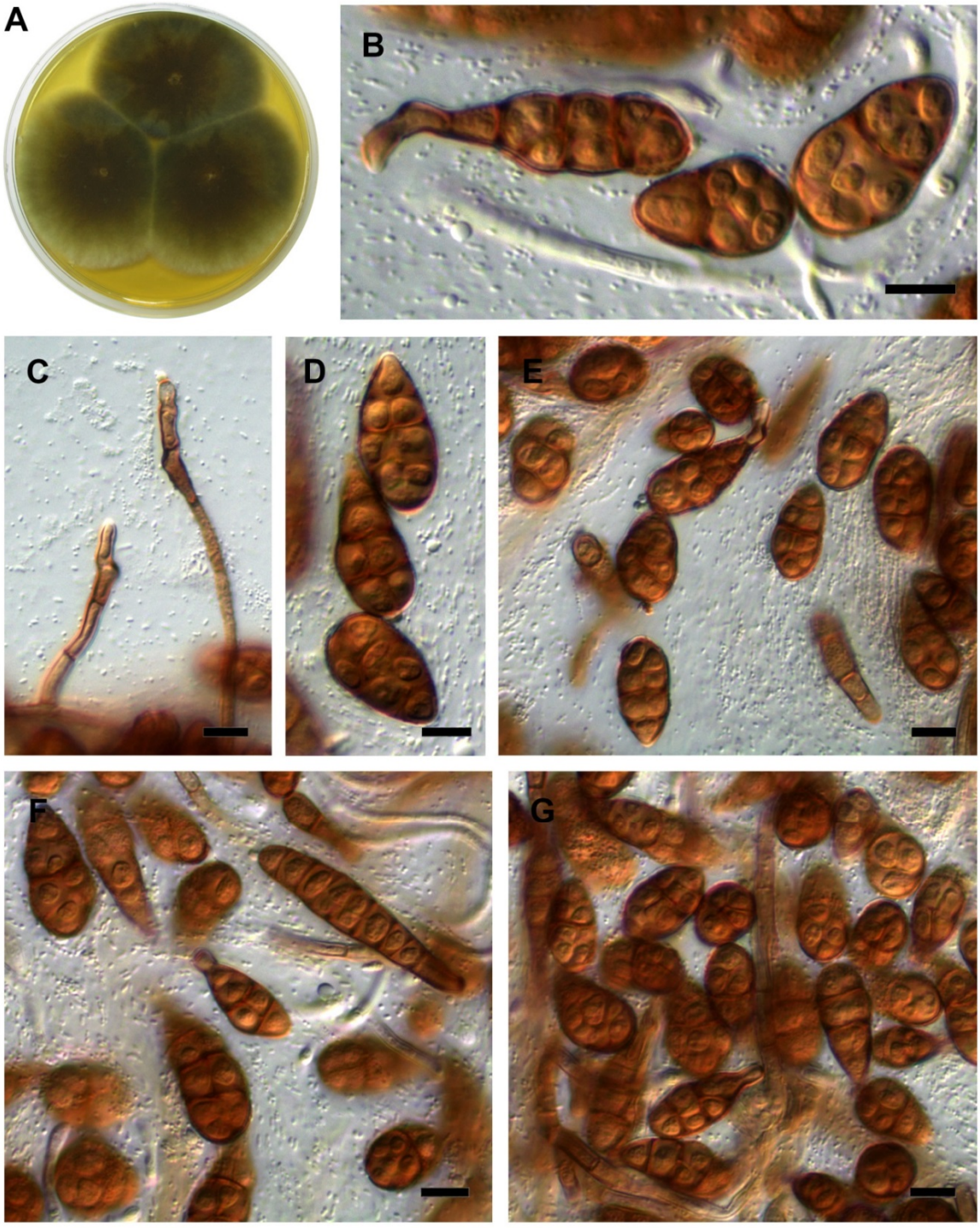
9 Prilog 1



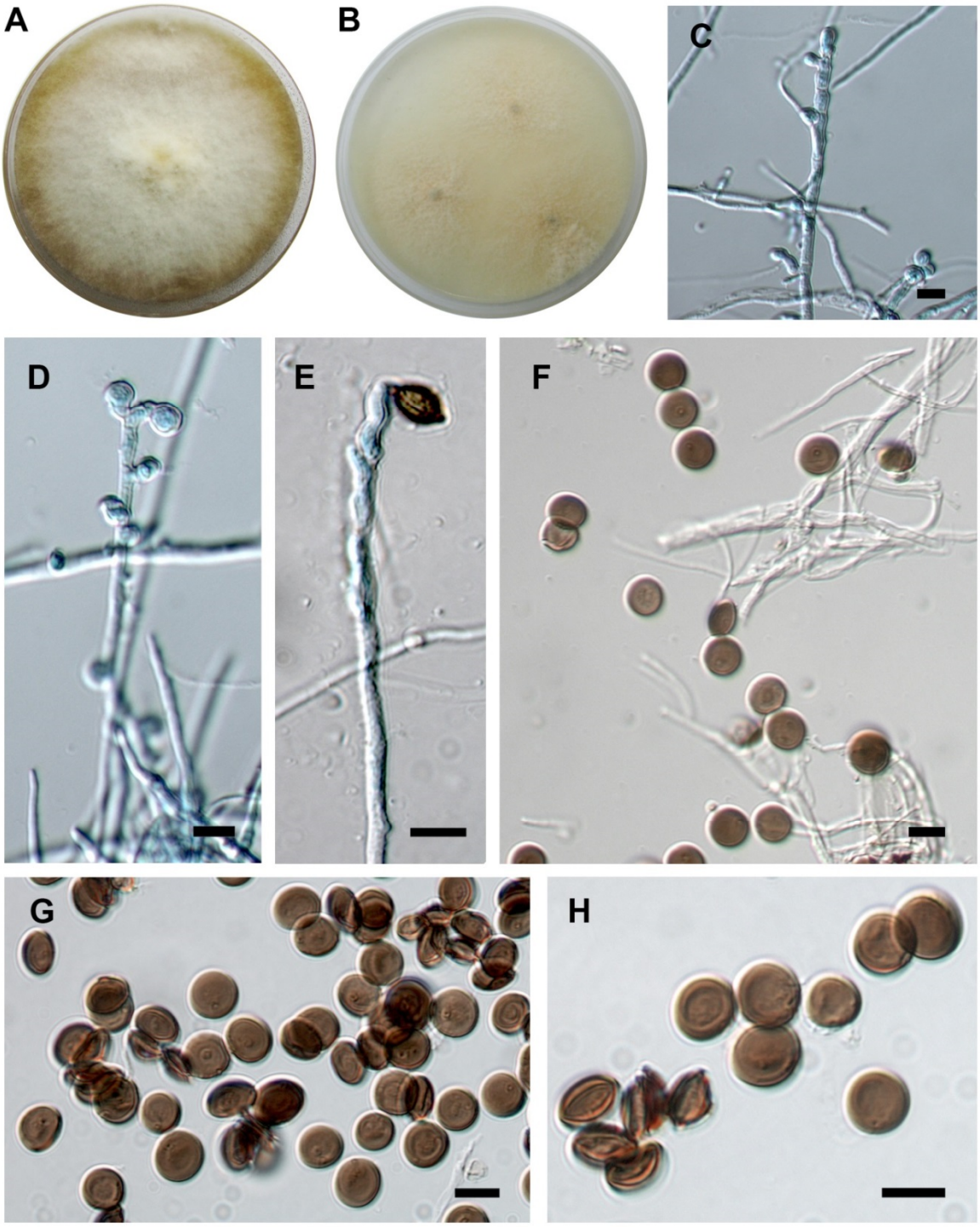
Slika 1. *Alternaria alternata* BEOFB213m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B–H) konidiofori i konidije. Bar = 10 µm.



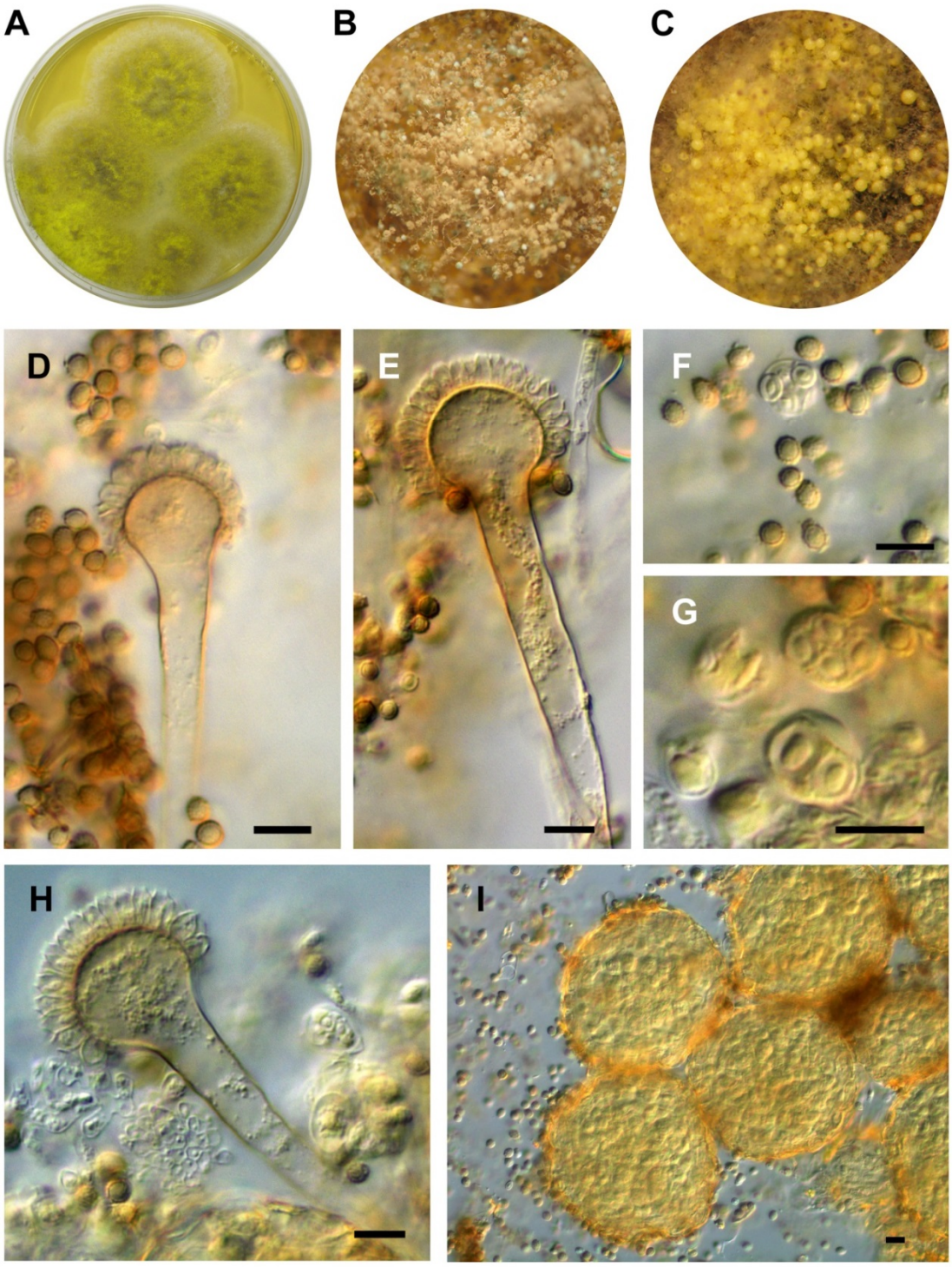
Slika 2. *Alternaria obovoidea* BEOFB260m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) kolonija *in situ*; D–H) konidiofori, konidije i hlamidospore. Bar = 10 µm.



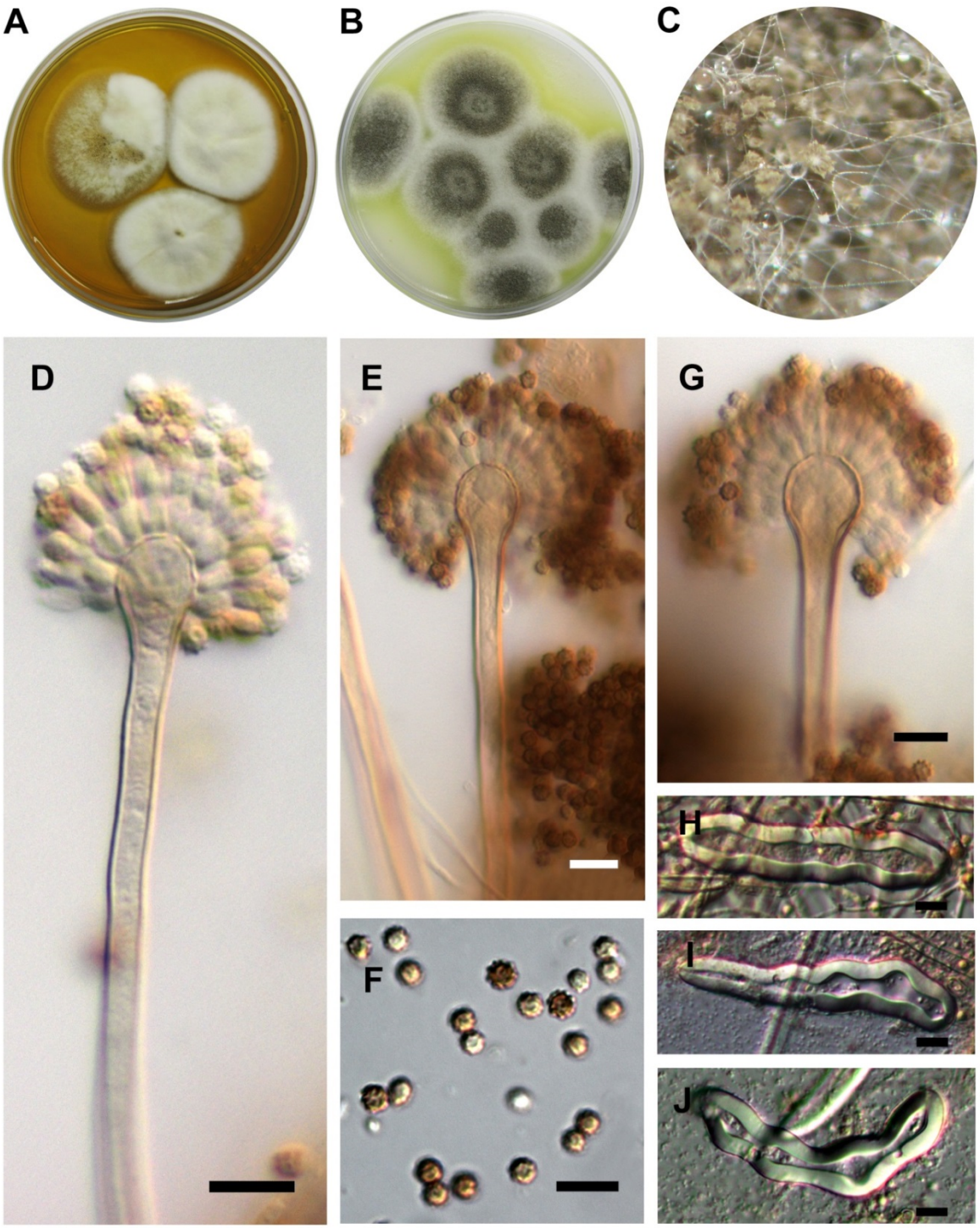
Slika 3. *Alternaria solani* BEOFB250m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B, D–G) konidije; C) konidiofori. Bar = 10 µm.



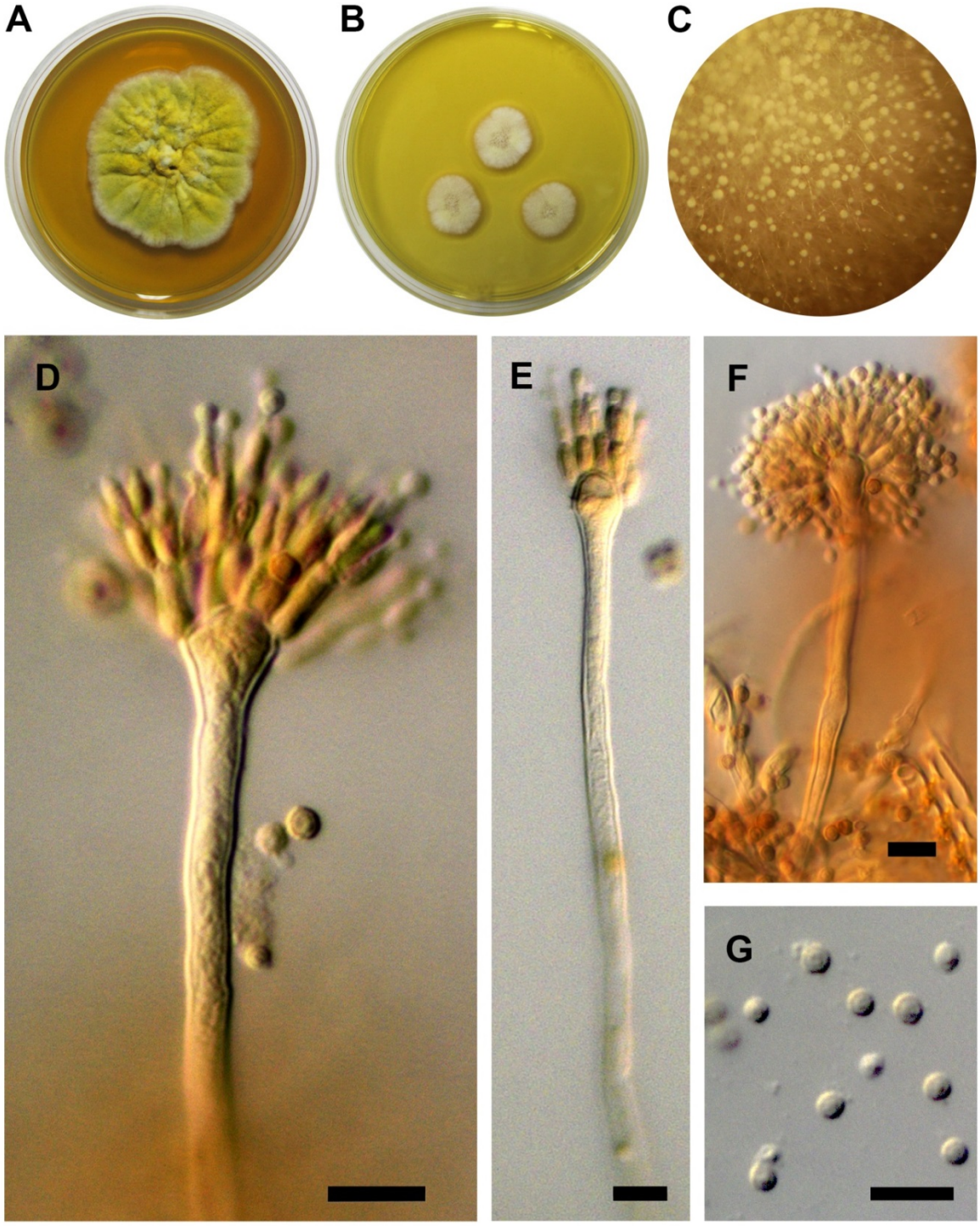
Slika 4. *Arthrinium phaeospermum* BEOFB3400m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C–E) konidiofori sa konidijama; F–H) melanizovane konidije. Bar = 10 μm.



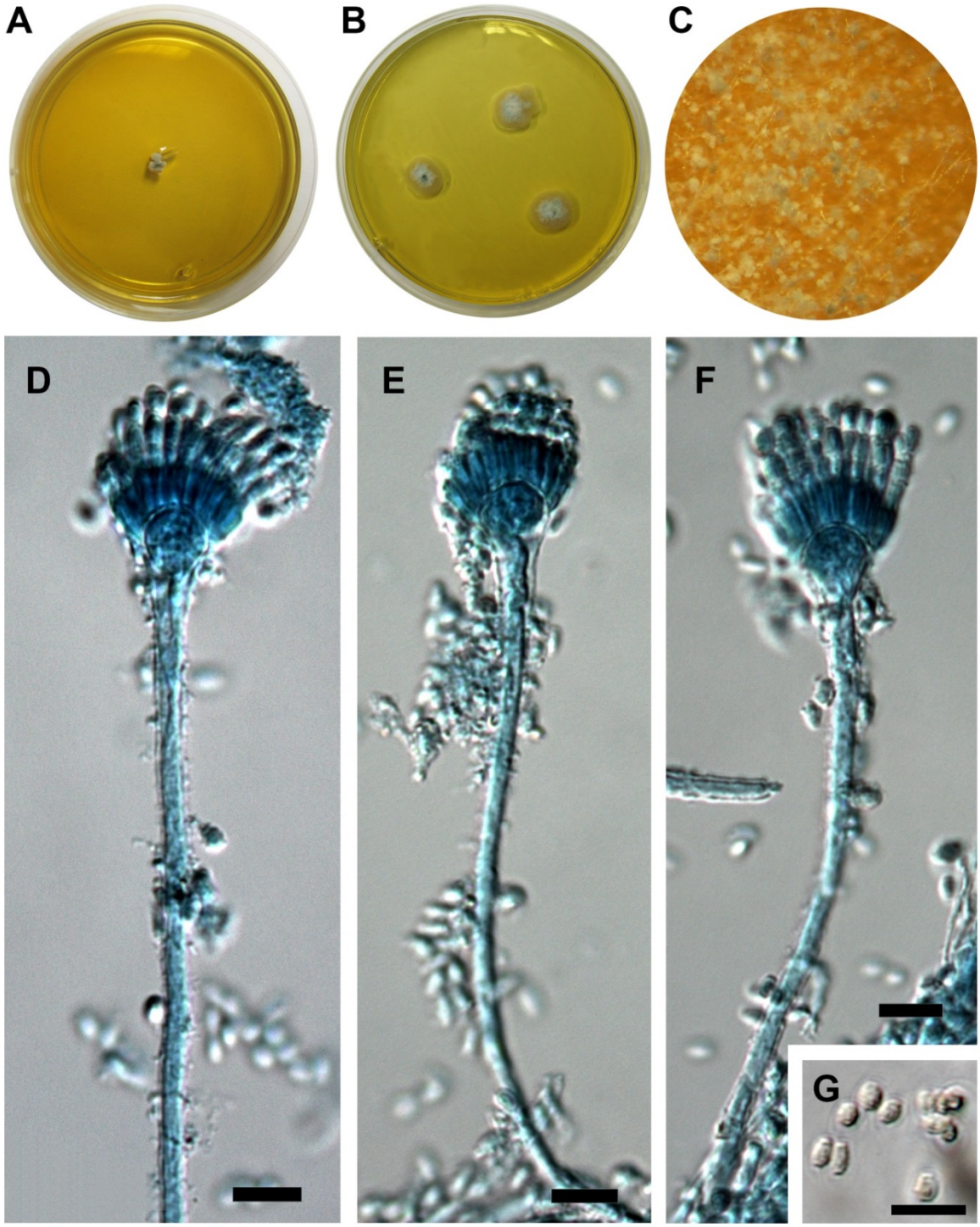
Slika 5. *Aspergillus amstelodami* BEOFB3160m: A) izgled kolonije, 7. dan, M40Y; B i C) konidiogeni aparati i kleistotecije *in situ*; D, E i H) konidiogeni aparat; F) askus sa askosporama i konidije; G) askusi sa askosporama; I) kleistotecije. Bar = 10 μm.



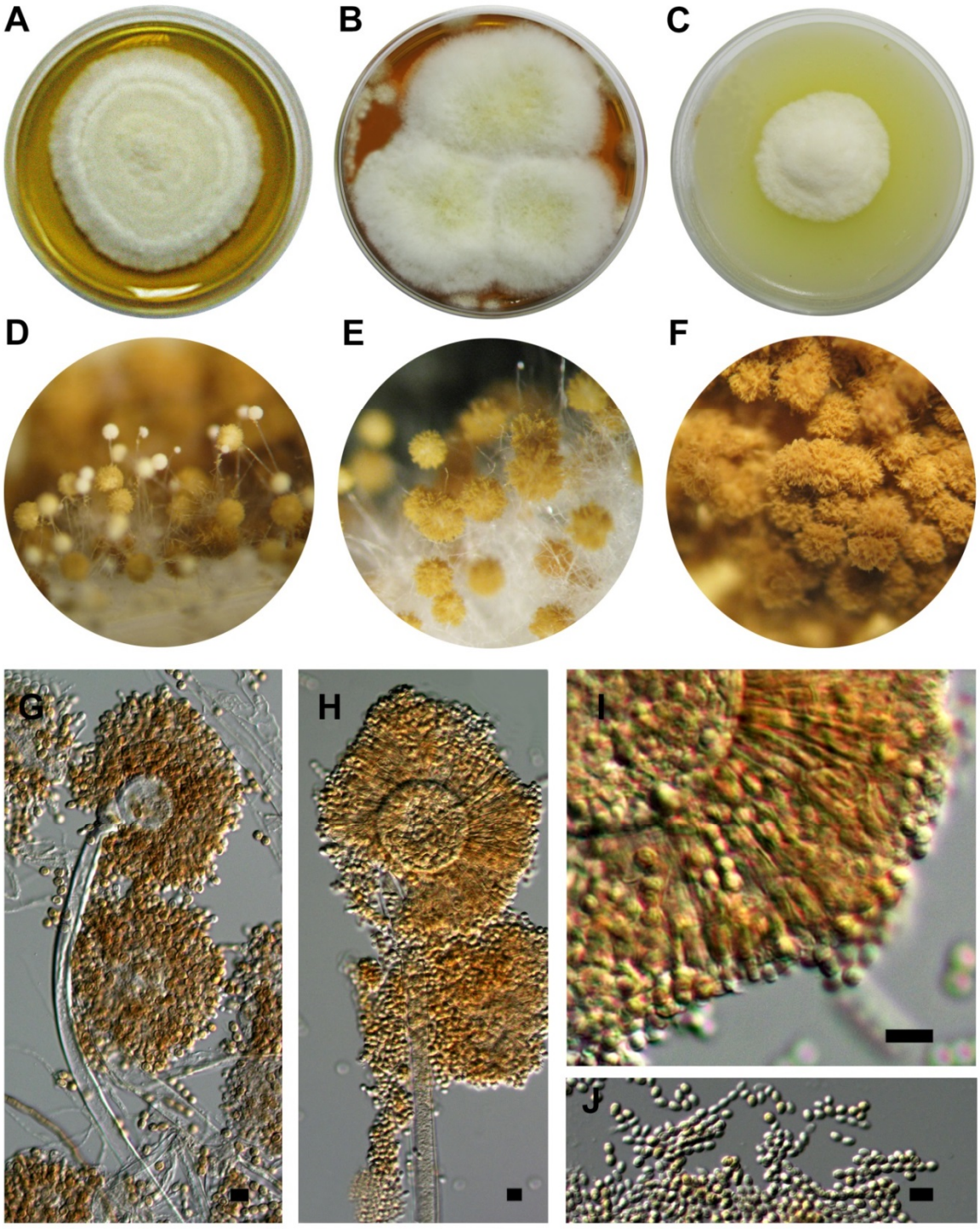
Slika 6. *Aspergillus calidoustus* BEOFB3220m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D, E i G) konidiogeni aparat; F) konidije; H–J) hülle ćelije. Bar = 10 μm.



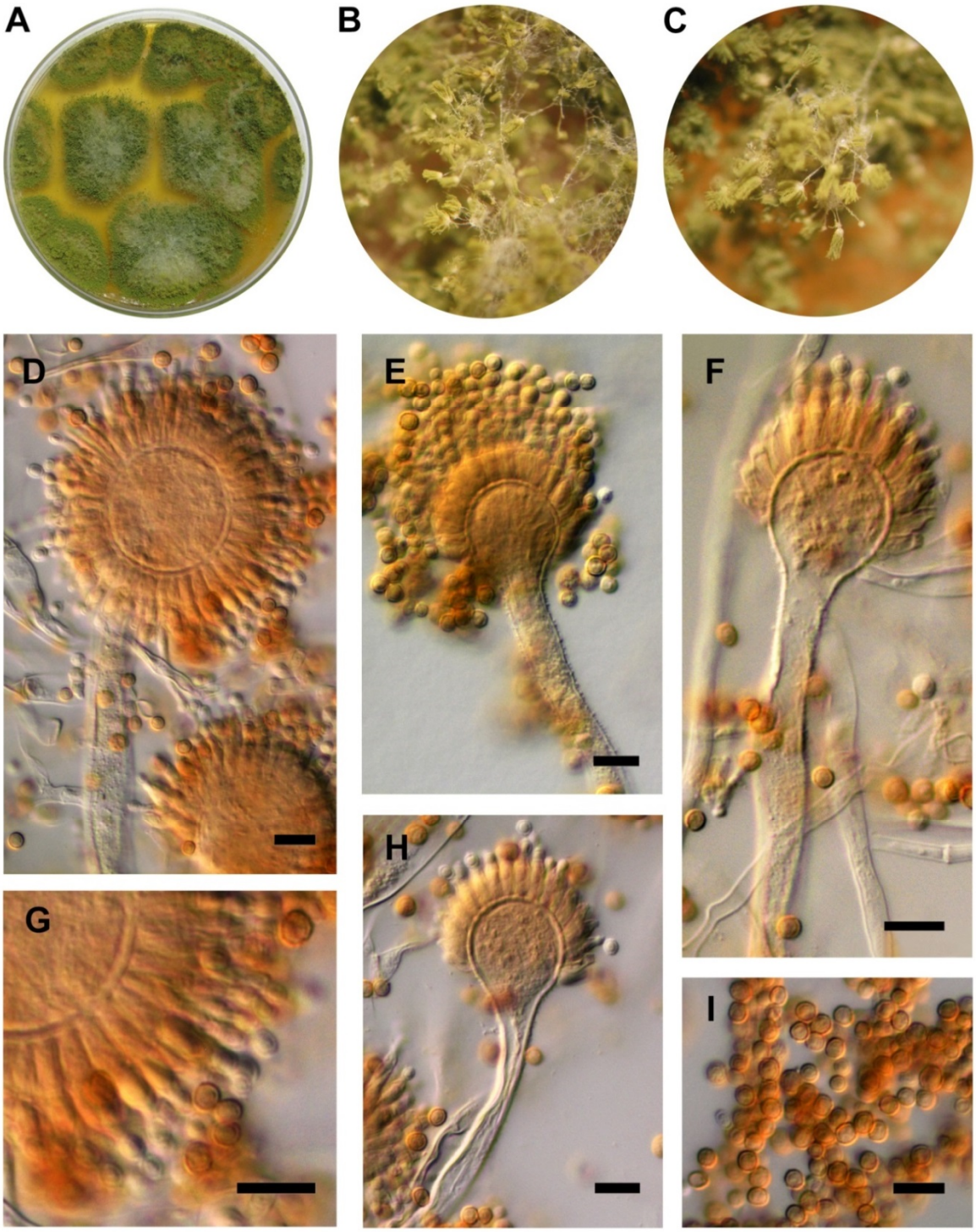
Slika 7. *Aspergillus creber* BEOFB3250m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i M40Y; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–F) konidiogeni aparat; G) konidije. Bar = 10 µm.



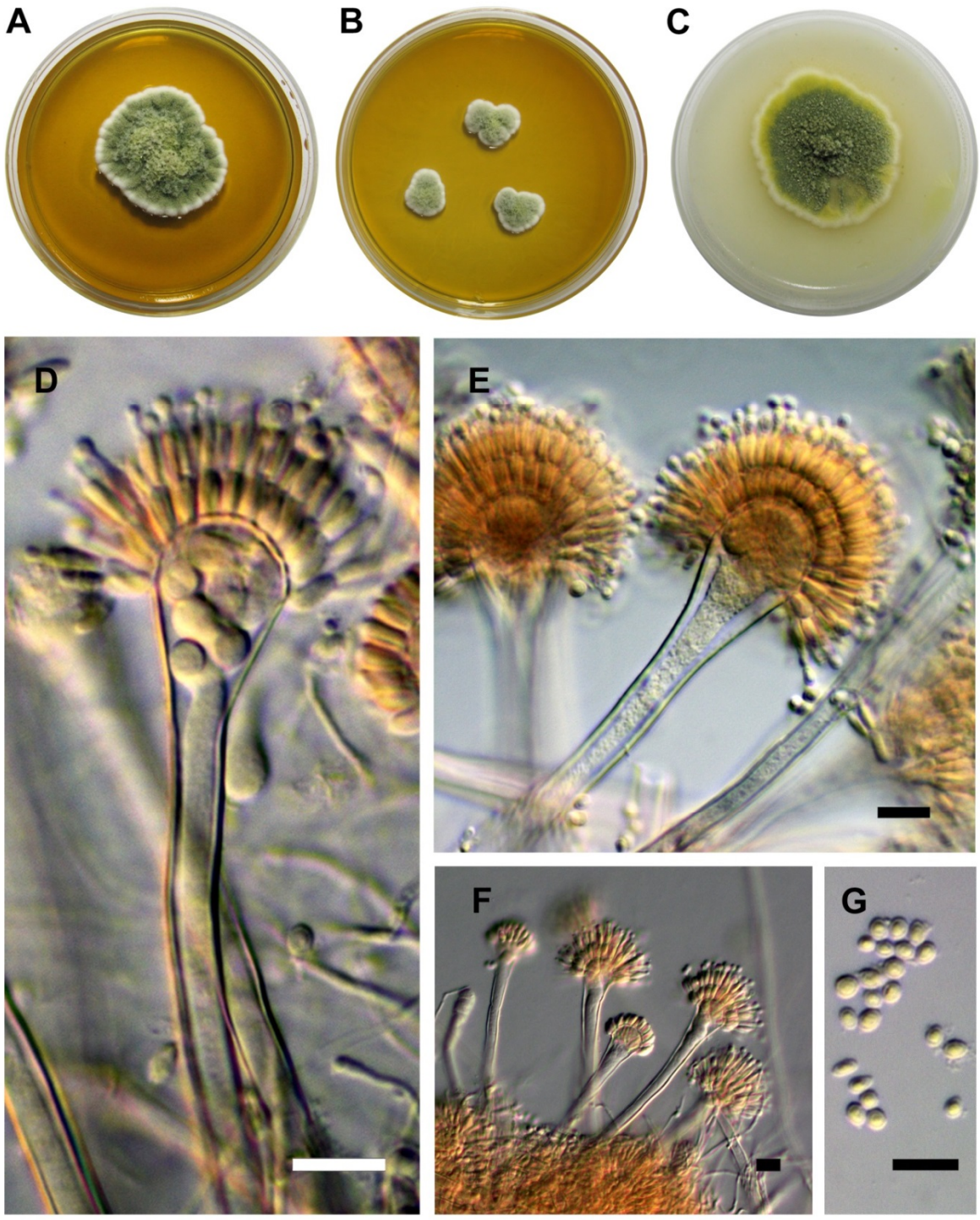
Slika 8. *Aspergillus domesticus* BEOFB3270m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i M40Y; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–F) konidiogeni aparat; G) konidije (preparati bojeni sa LactophenolCottonBlue). Bar = 10 µm.



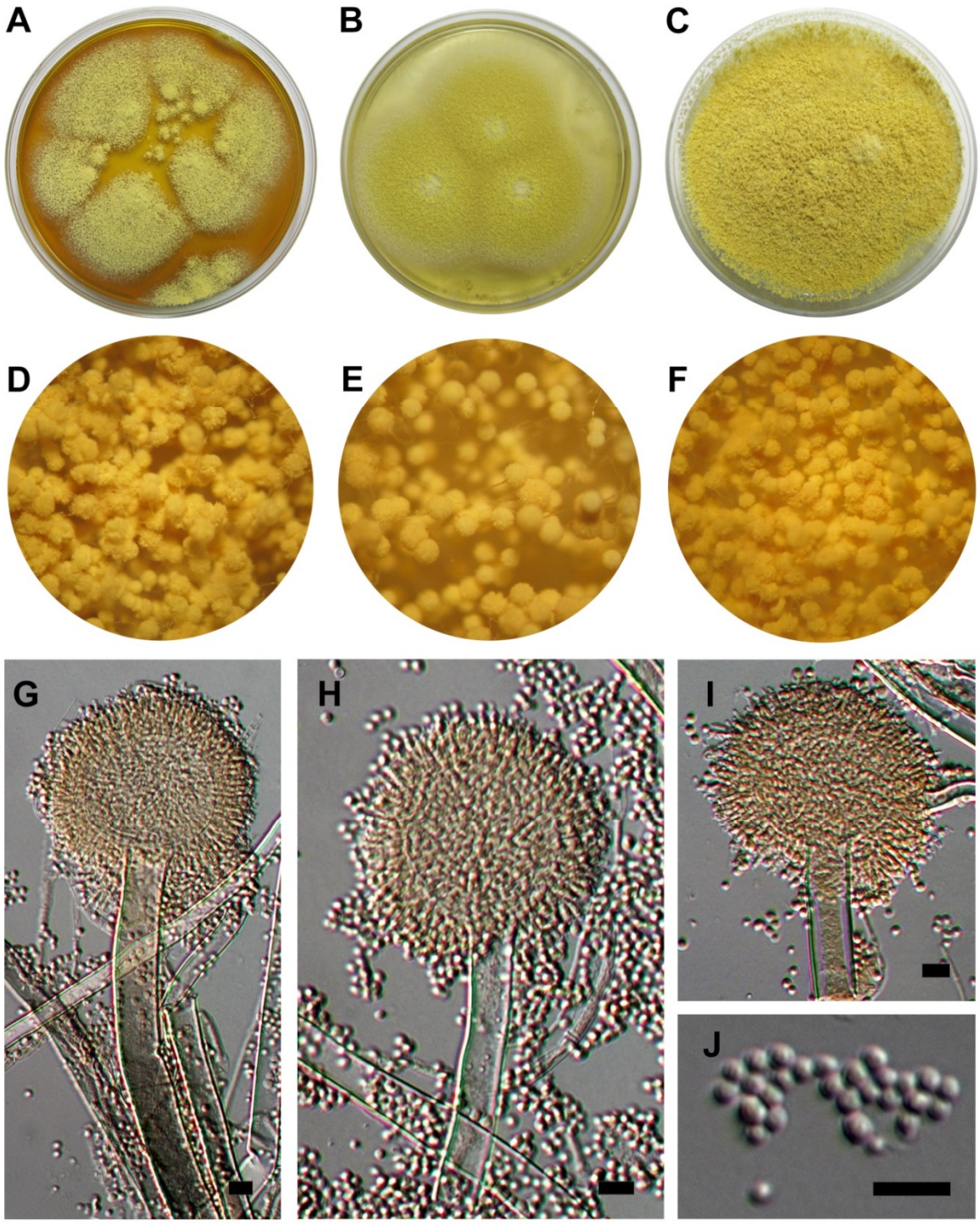
Slika 9. *Aspergillus europaeus* BEOFB382m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparati *in situ*; G i H) konidiogeni aparat; I) vezikula sa konidiogenim ćelijama i konidijama; J) konidije. Bar = 10 μm.



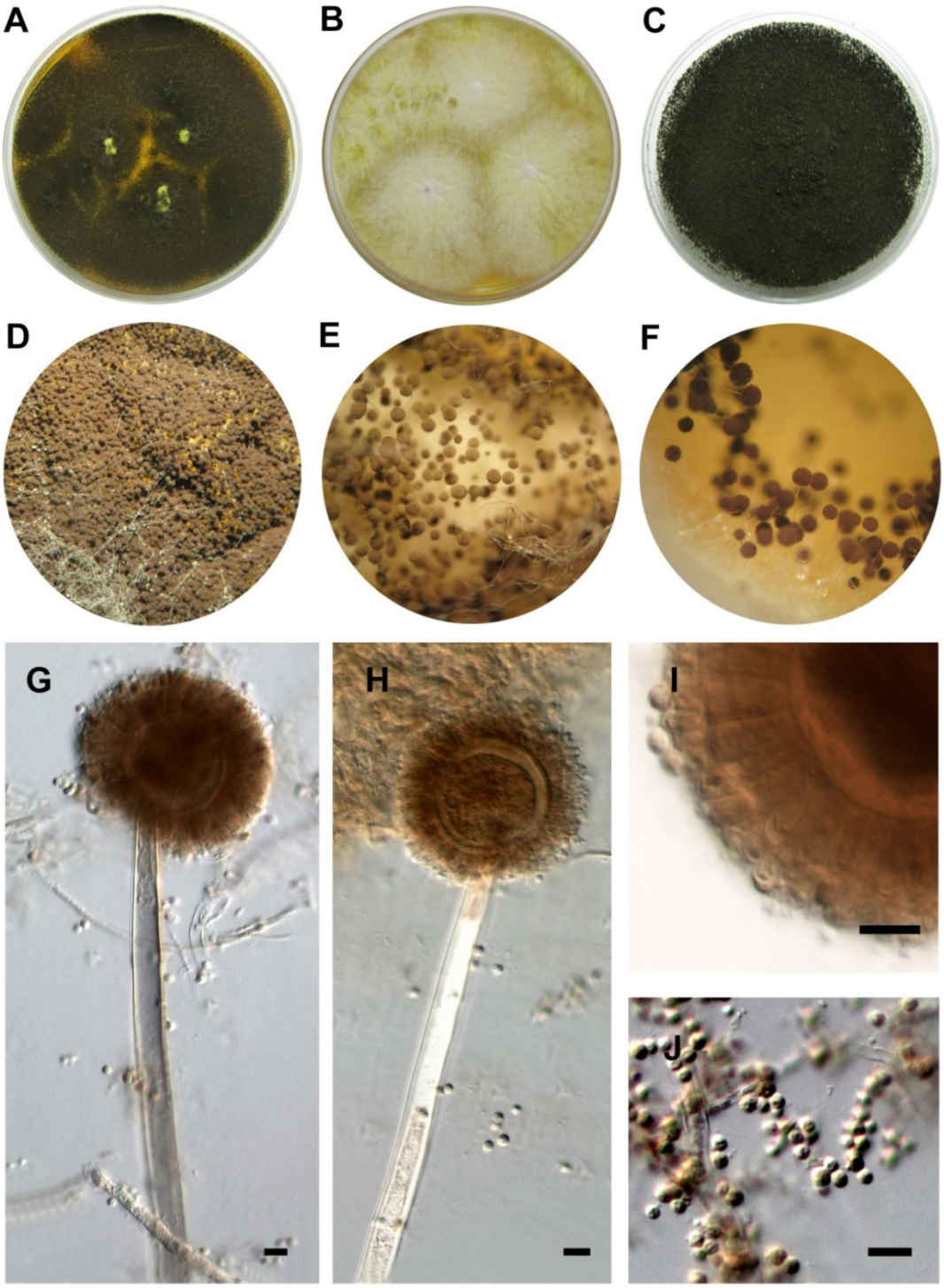
Slika 10. *Aspergillus flavus* BEOFB3150m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) konidiogeni aparati *in situ*; D–F i H) konidiogeni aparat; G) vezikula sa konidiogenim ćelijama i konidijama; I) konidije. Bar = 10 μm.



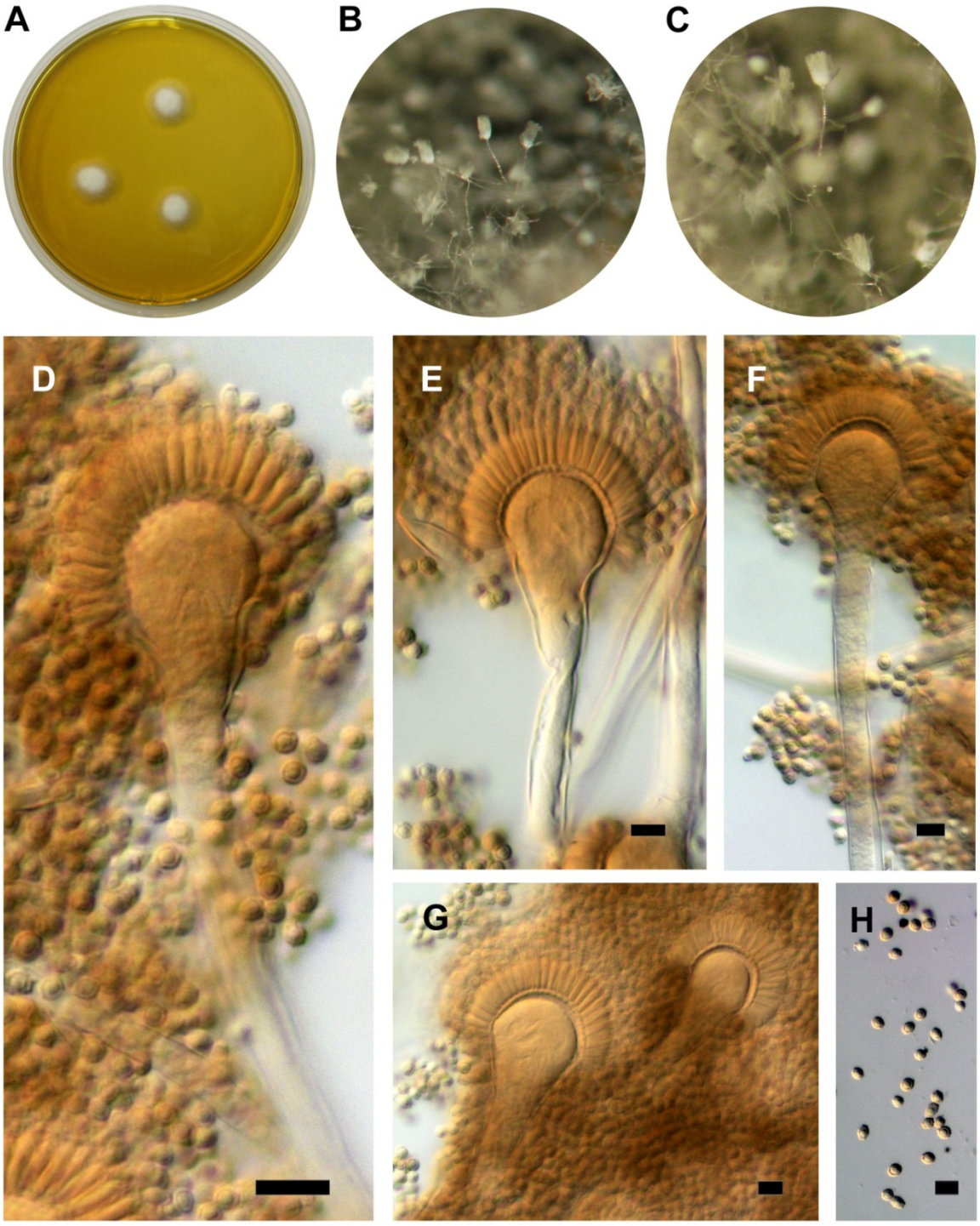
Slika 11. *Aspergillus jensenii* BEOFB3200m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparat; G) konidije. Bar = 10 μm.



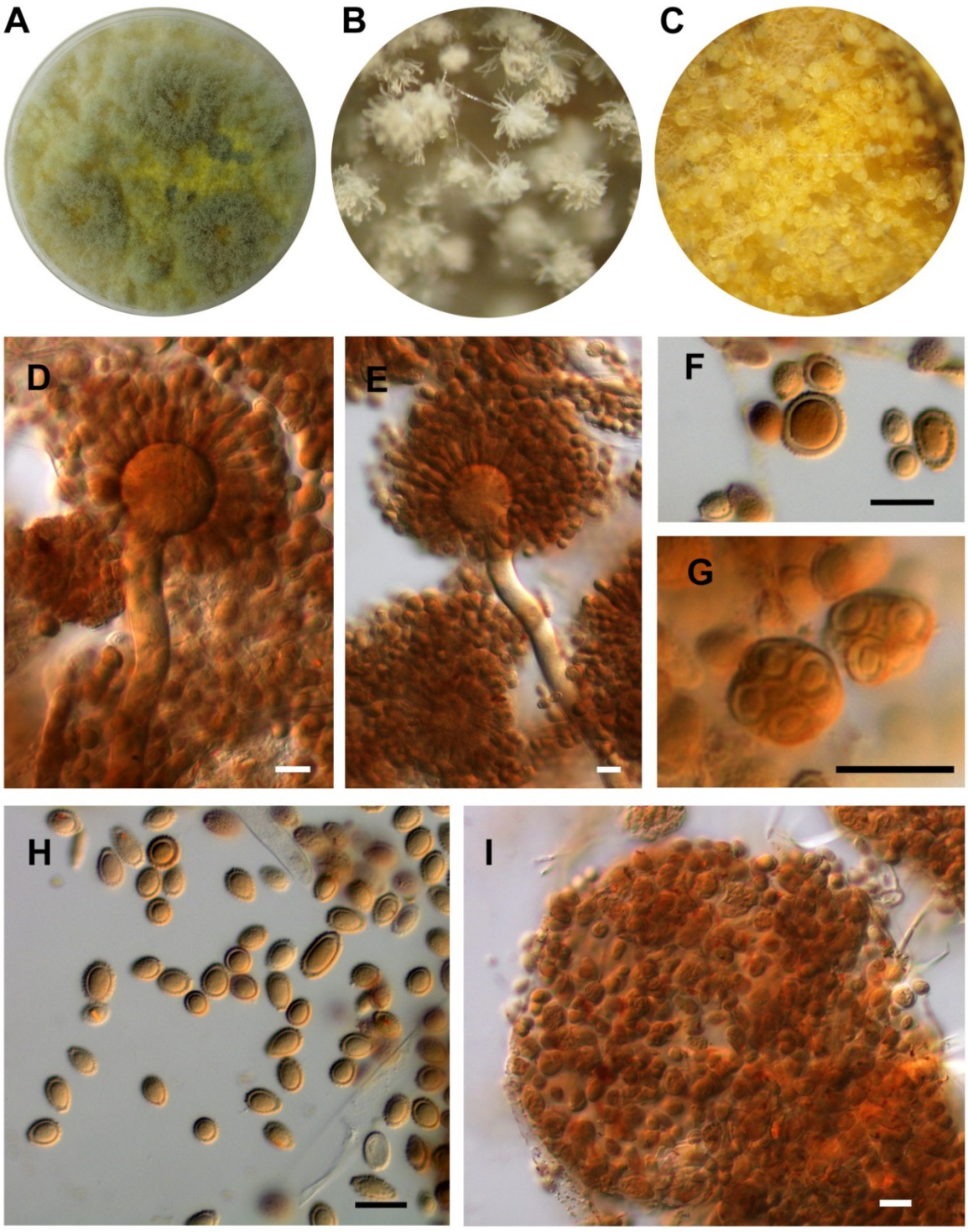
Slika 12. *Aspergillus melleus* BEOFB3180m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparati *in situ*; G–I) konidiogeni aparat; J) konidije. Bar = 10 μm.



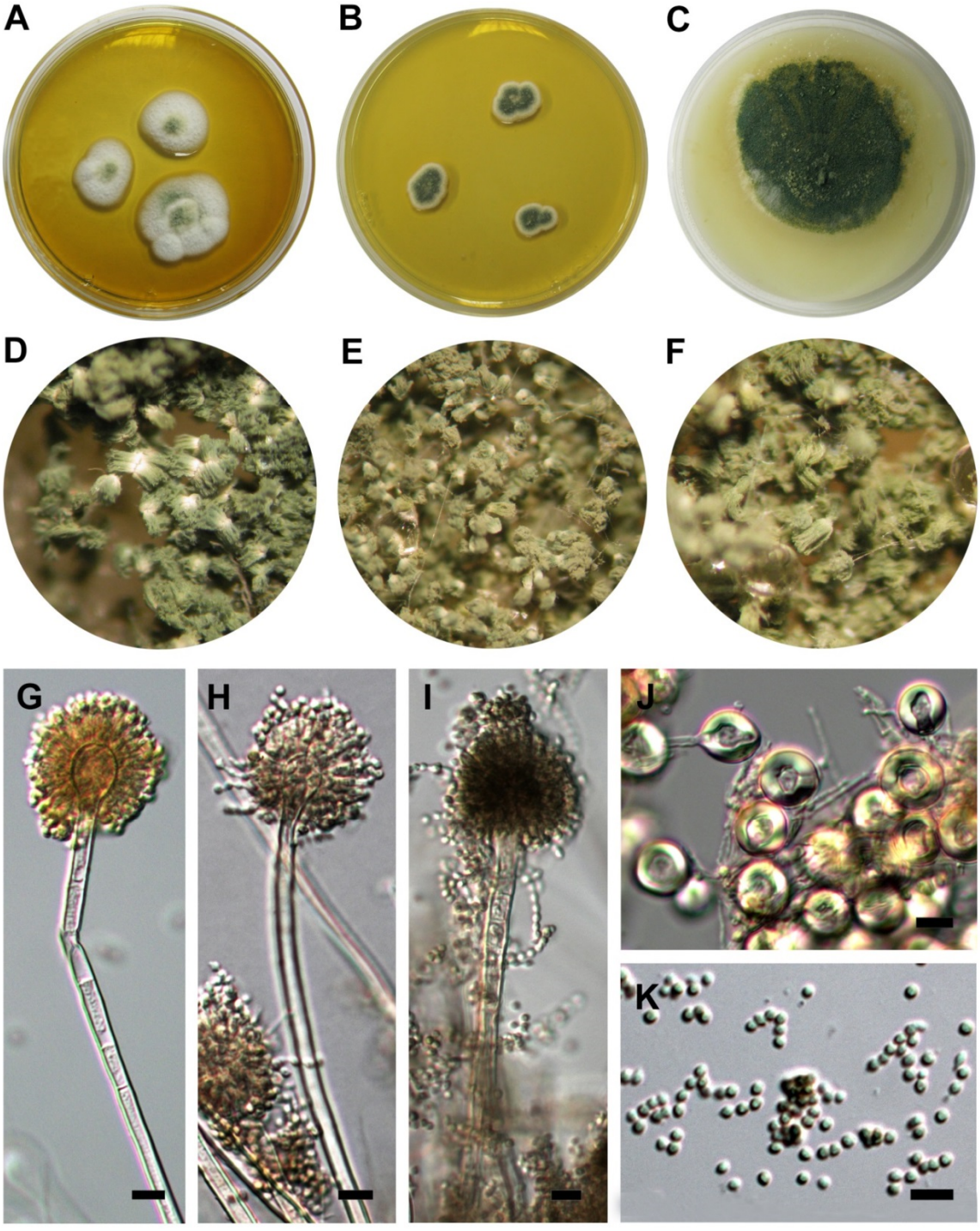
Slika 13. *Aspergillus niger* BEOFB345m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparati *in situ*; G i H) konidiogeni aparat; I) vezikula sa konidiogenim ćelijama i konidijama; J) konidije. Bar = 10 μm.



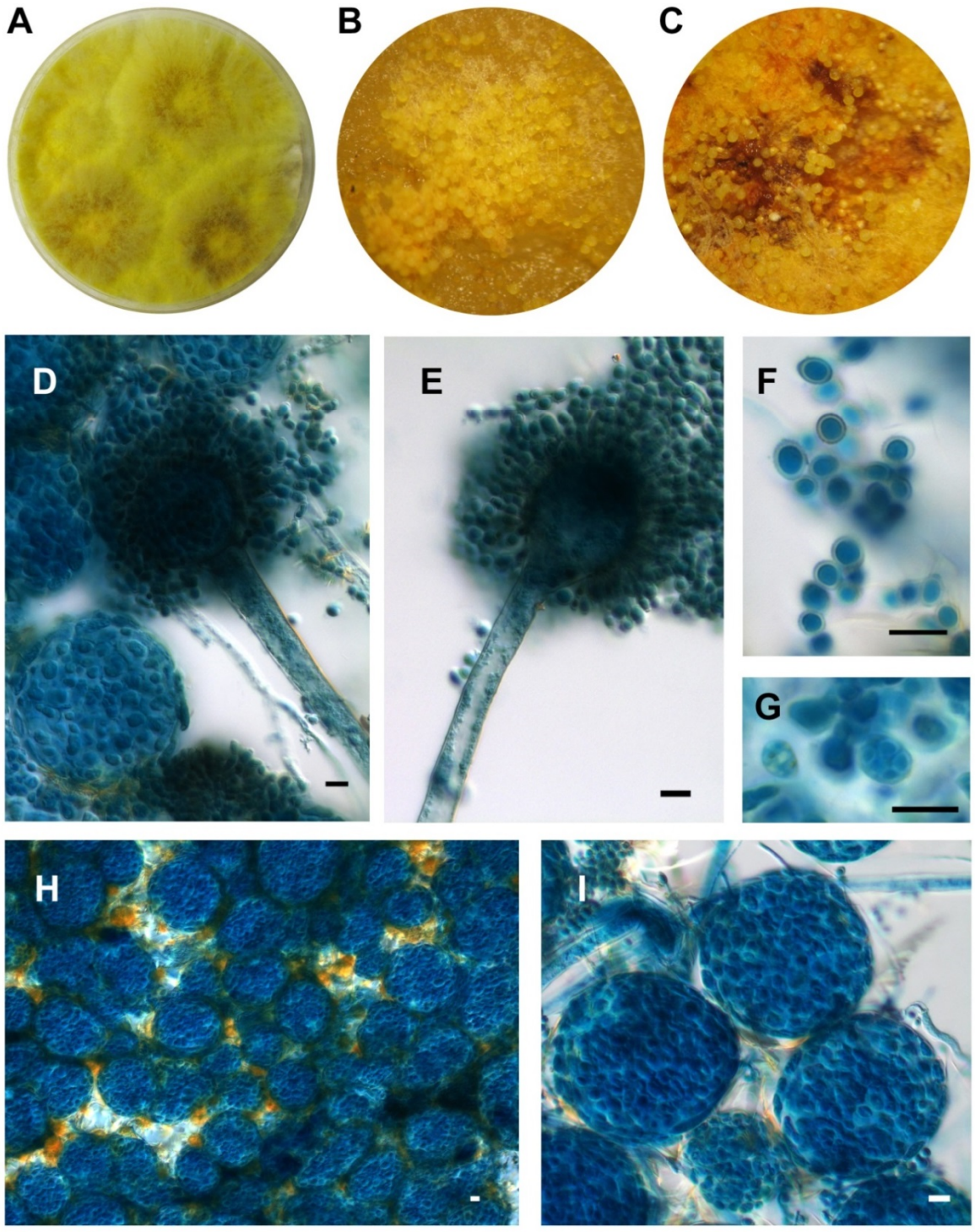
Slika 14. *Aspergillus penicillioides* BEOFB3190m: A) izgled kolonije, 7. dan, M40Y; B i C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat; H) konidije. Bar = 10 µm.



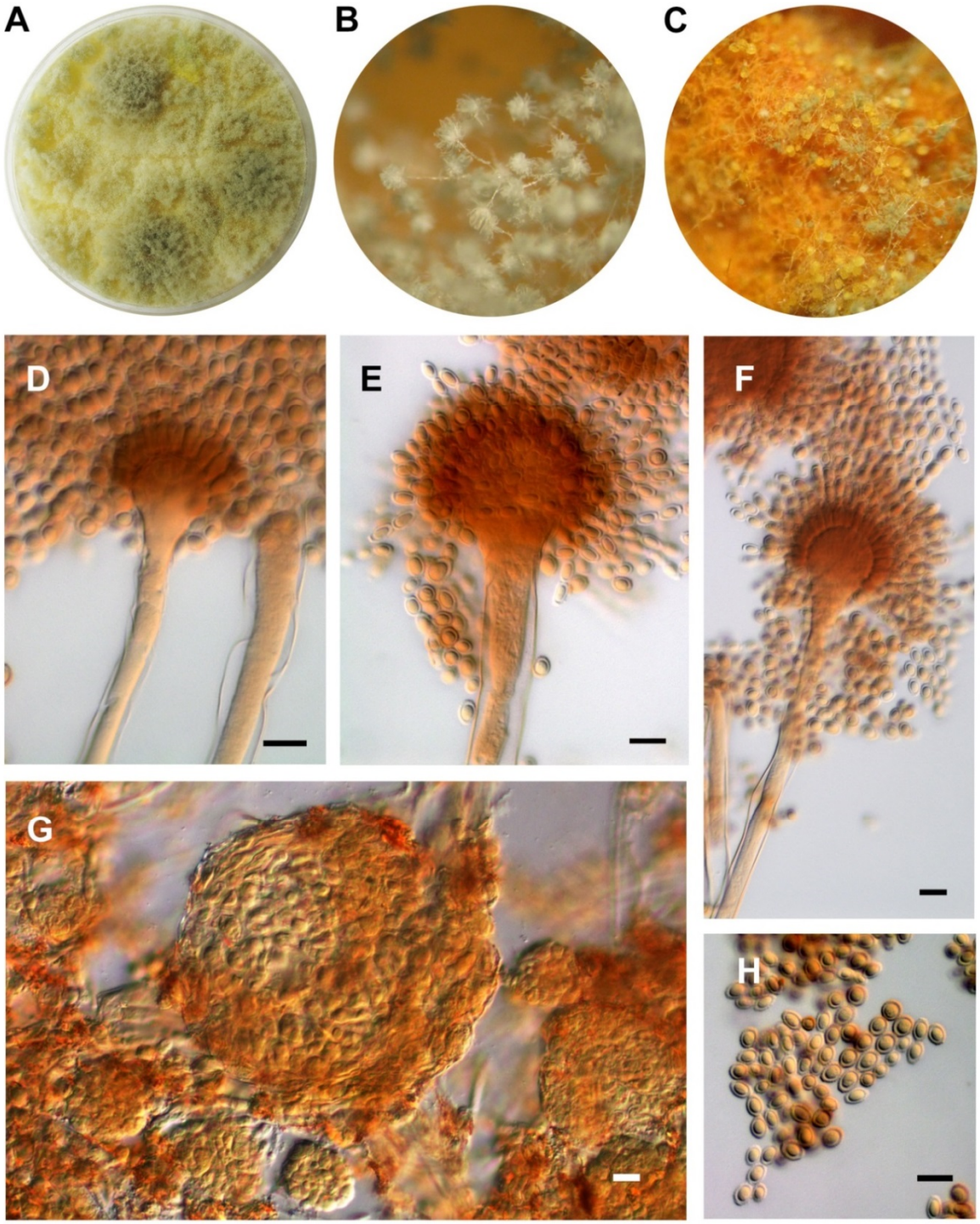
Slika 15. *Aspergillus proliferans* BEOFB3280m: A) izgled kolonije, 7. dan, M40Y; B i C) konidiogeni aparati i kleistotecije *in situ*; D i E) konidiogeni aparat; F i H) konidije; G) askusi sa askosporama; I) kleistotecija. Bar = 10 μm.



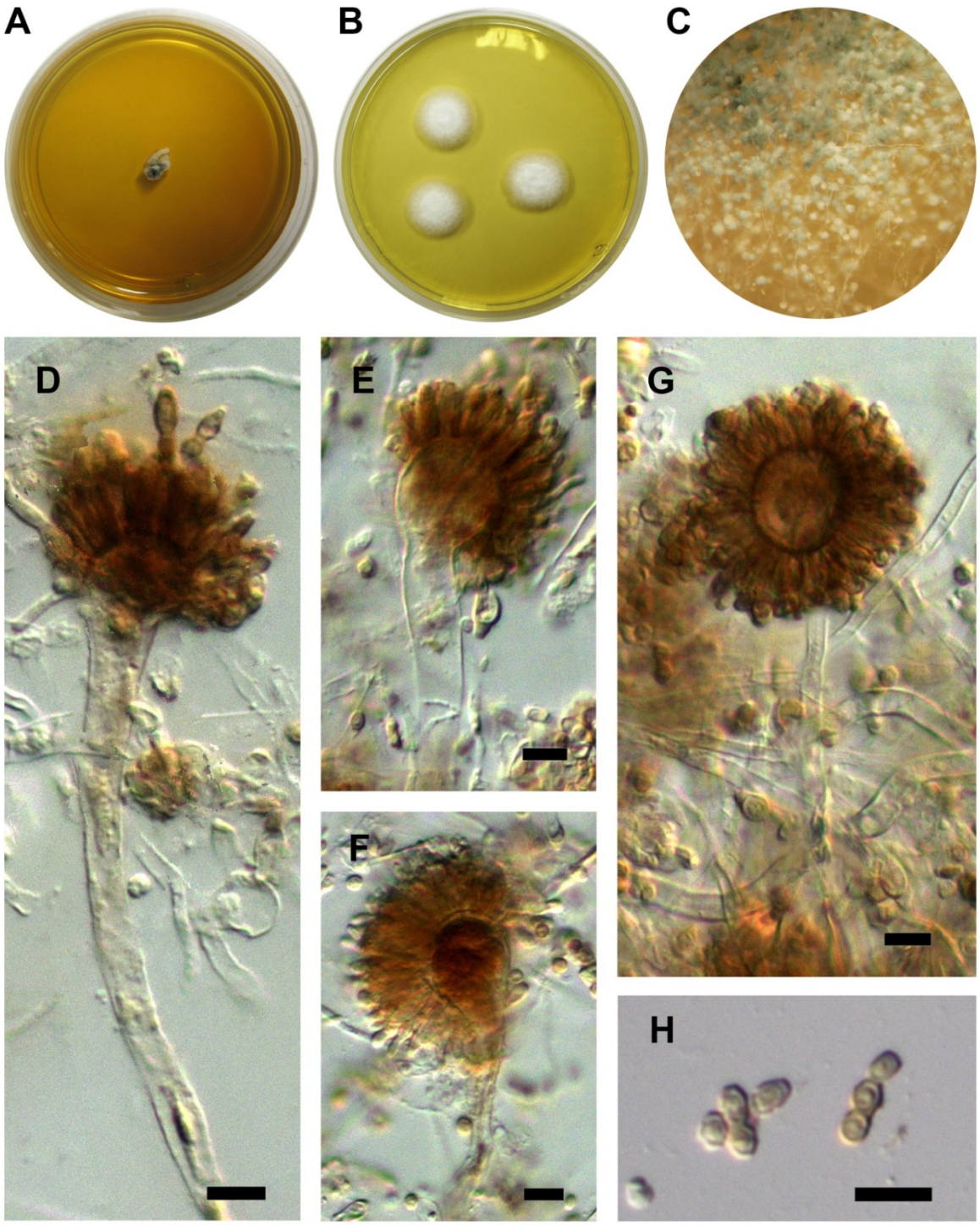
Slika 16. *Aspergillus protuberus* BEOFB3240m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparati *in situ*; G–I) konidiogeni aparat; J) hülle ćelije; K) konidije. Bar = 10 µm.



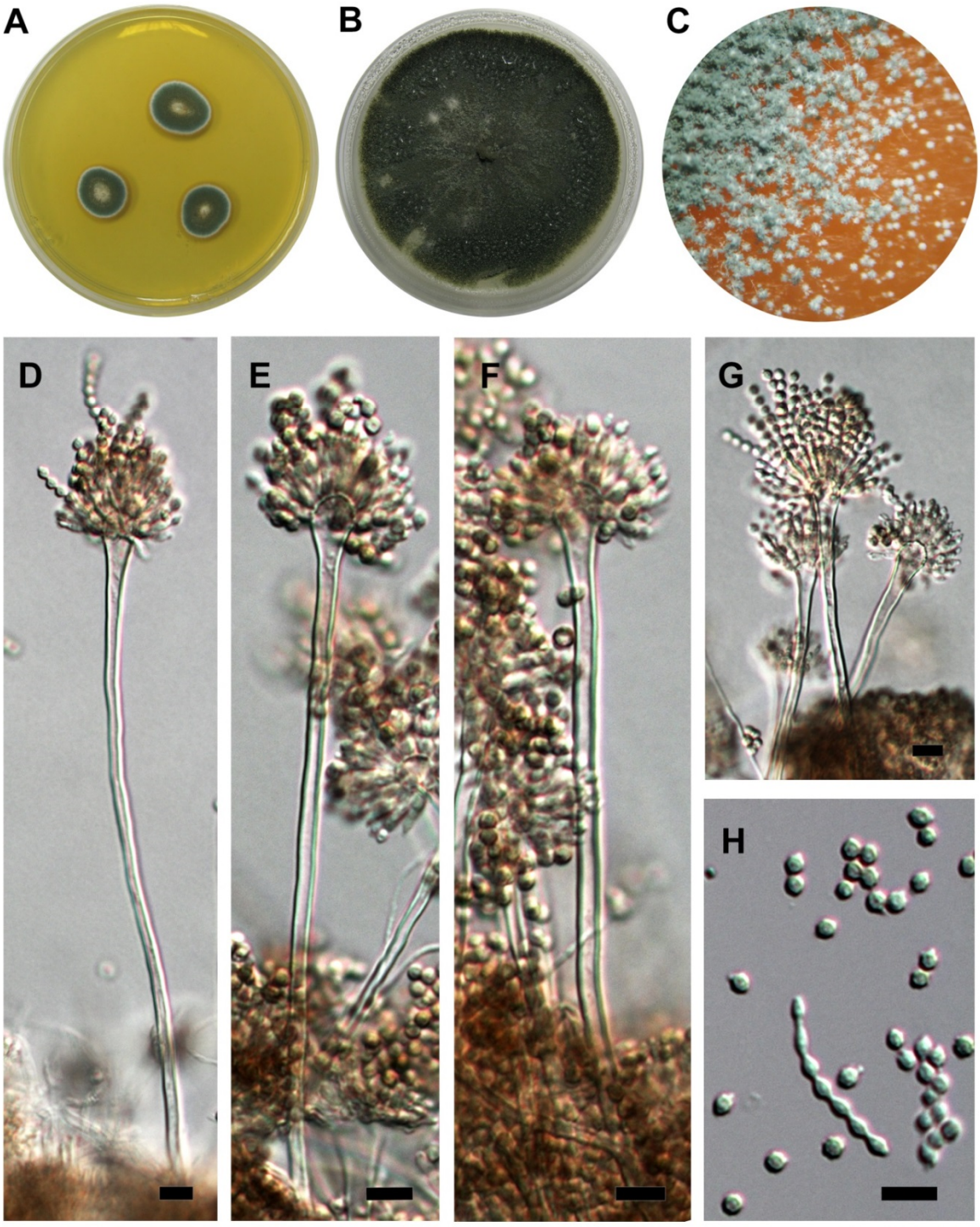
Slika 17. *Aspergillus pseudoglaucus* BEOFB3170m: A) izgled kolonije, 7. dan, M40Y; B i C) kleistotecije *in situ*; D i E) konidiogeni aparat; F) konidije; G) askusi sa askosporama; H i I) kleistotecije (preparati bojeni sa LactophenolCottonBlue). Bar = 10 μm.



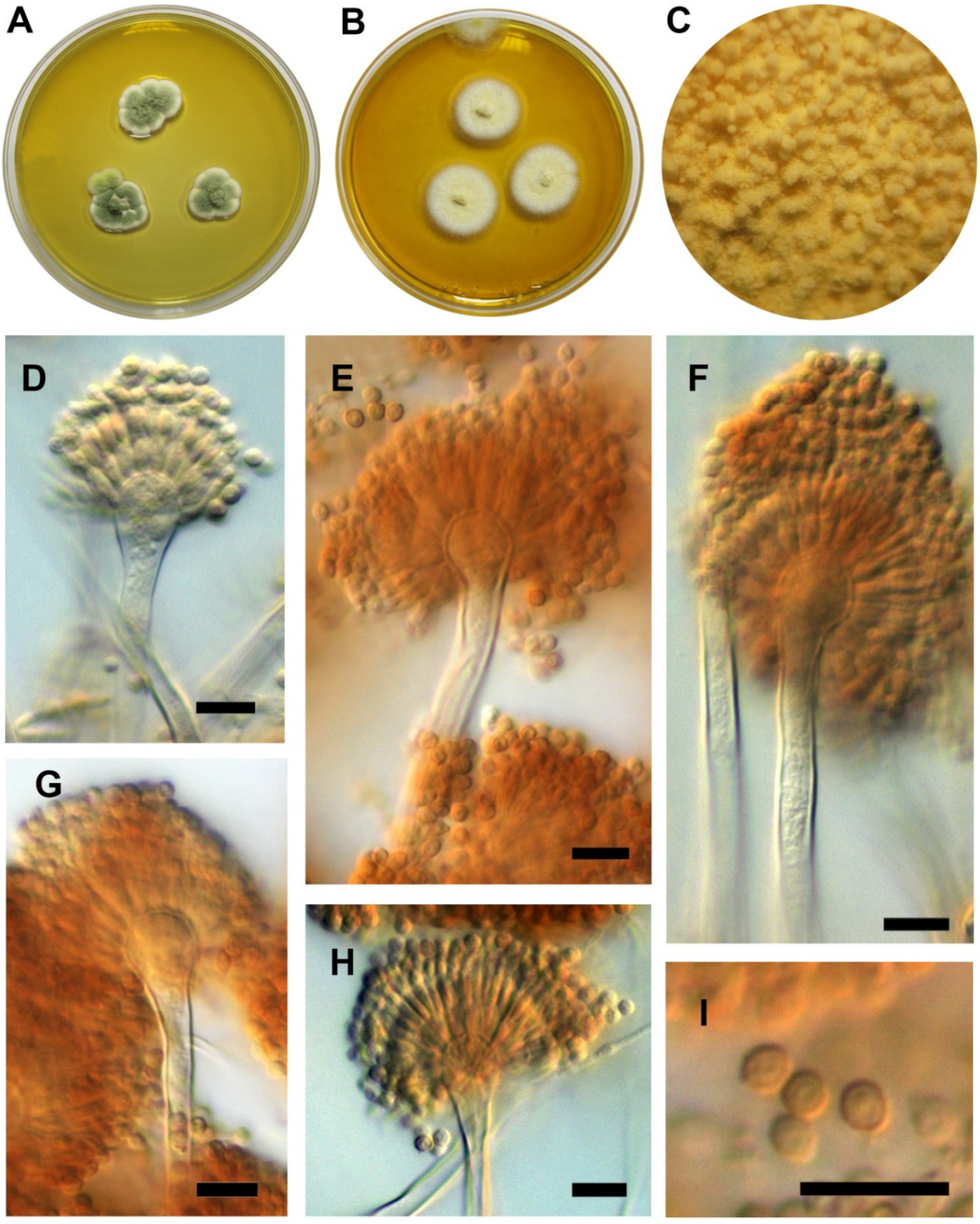
Slika 18. *Aspergillus ruber* BEOFB3150m: A) izgled kolonije, 7. dan, M40Y; B i C) konidiogeni aparati i kleistotecije *in situ*; D–F) konidiogeni aparat; G) kleistotecija; H) konidije. Bar = 10 µm.



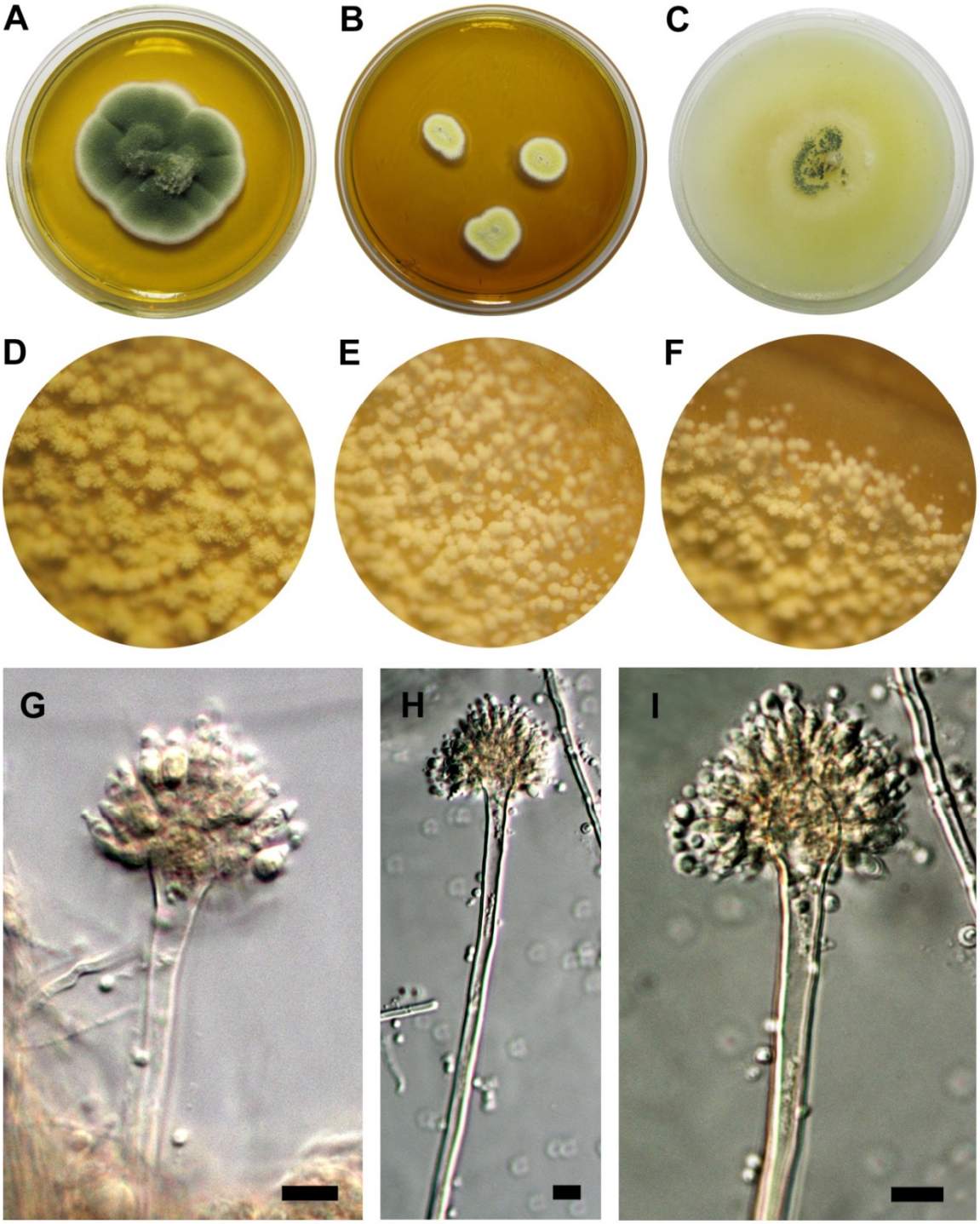
Slika 19. *Aspergillus salinicola* BEOFB3191m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i M40Y; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat; H) konidije. Bar = 10 µm.



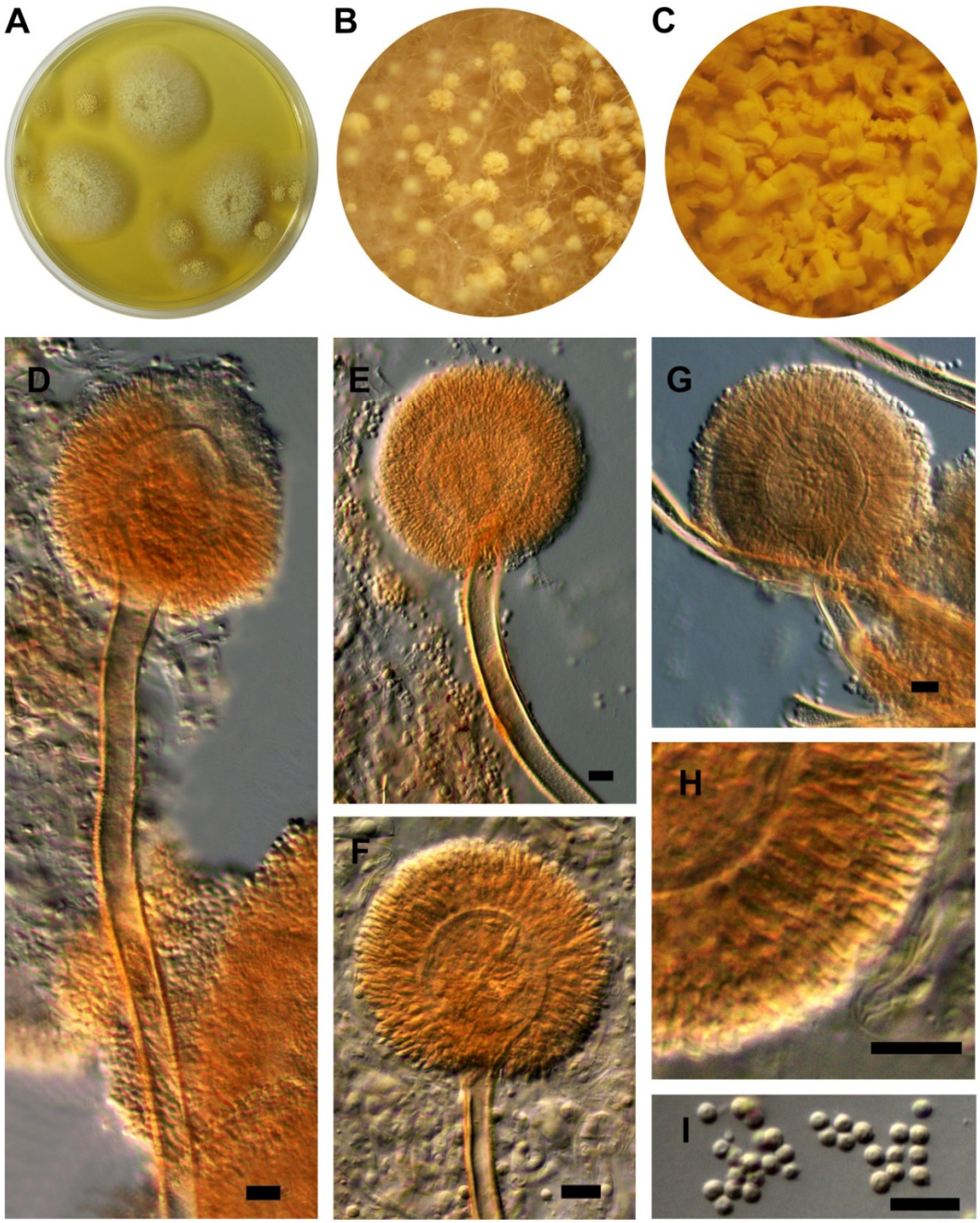
Slika 20. *Aspergillus sydowii* BEOFB3142m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat; H) konidije. Bar = 10 μm.



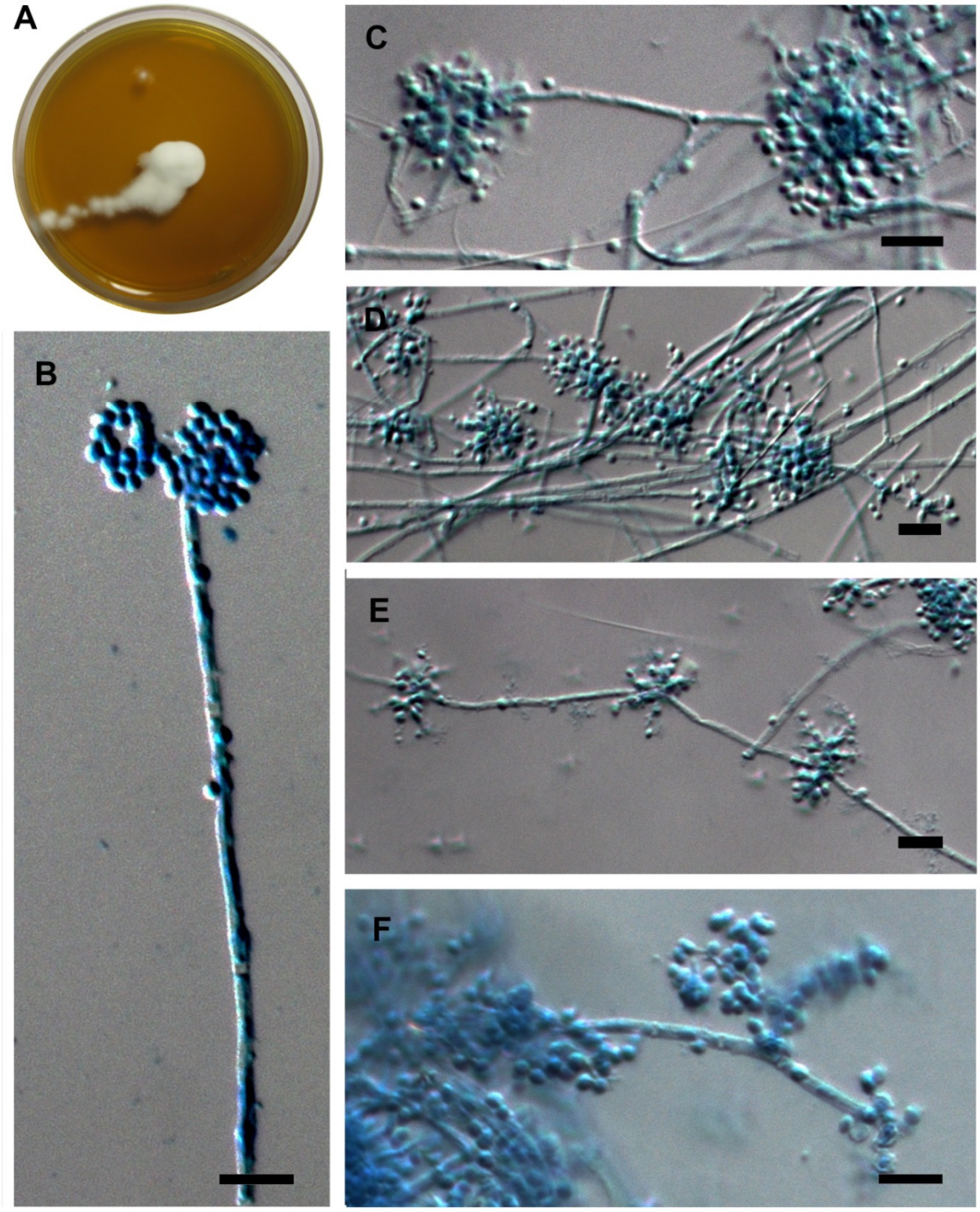
Slika 21. *Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i M40Y; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–H) konidiogeni aparat; I) konidije. Bar = 10 µm.



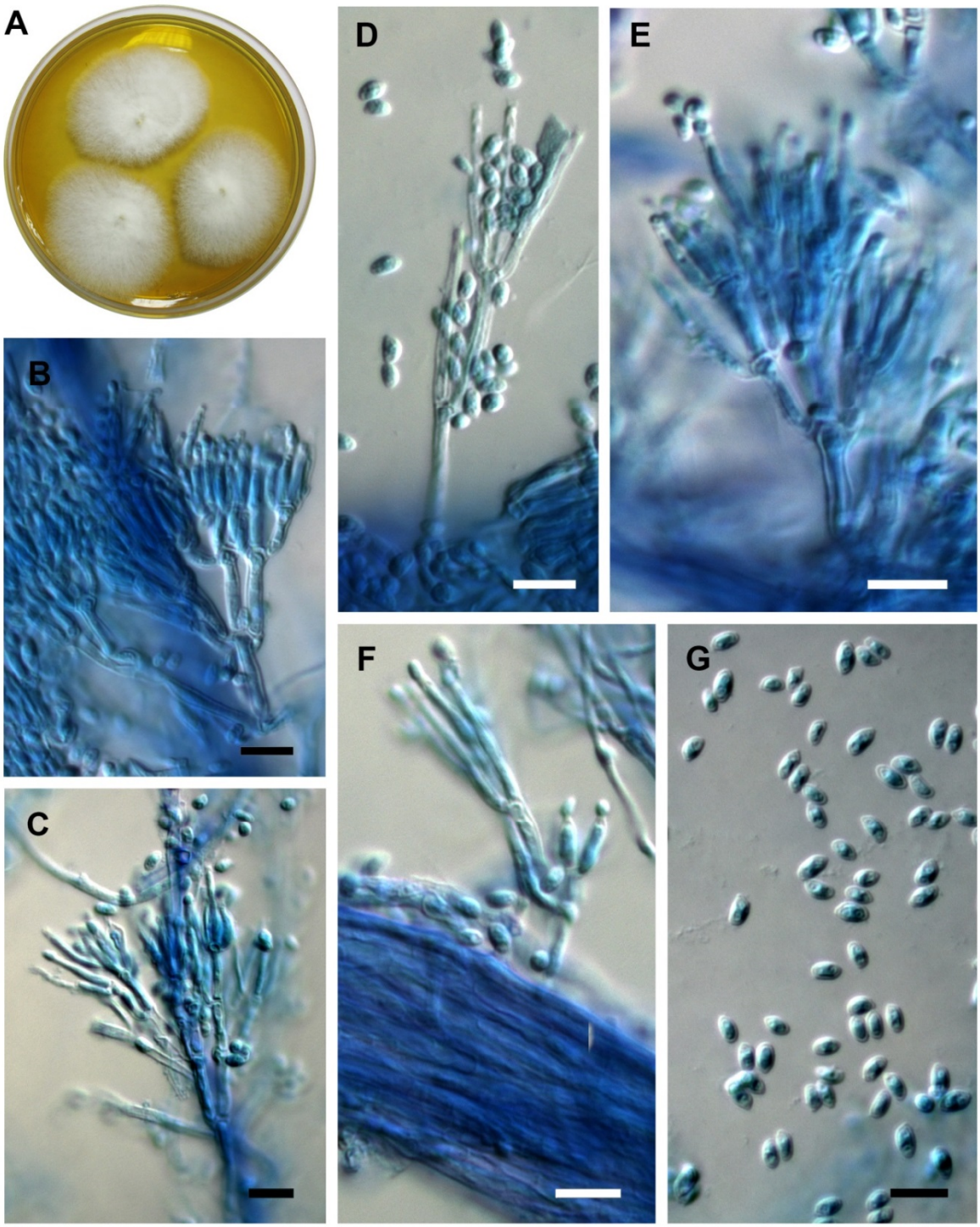
Slika 22. *Aspergillus versicolor* BEOFB3133m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparati *in situ*; G–I) konidiogeni aparat. Bar = 10 µm.



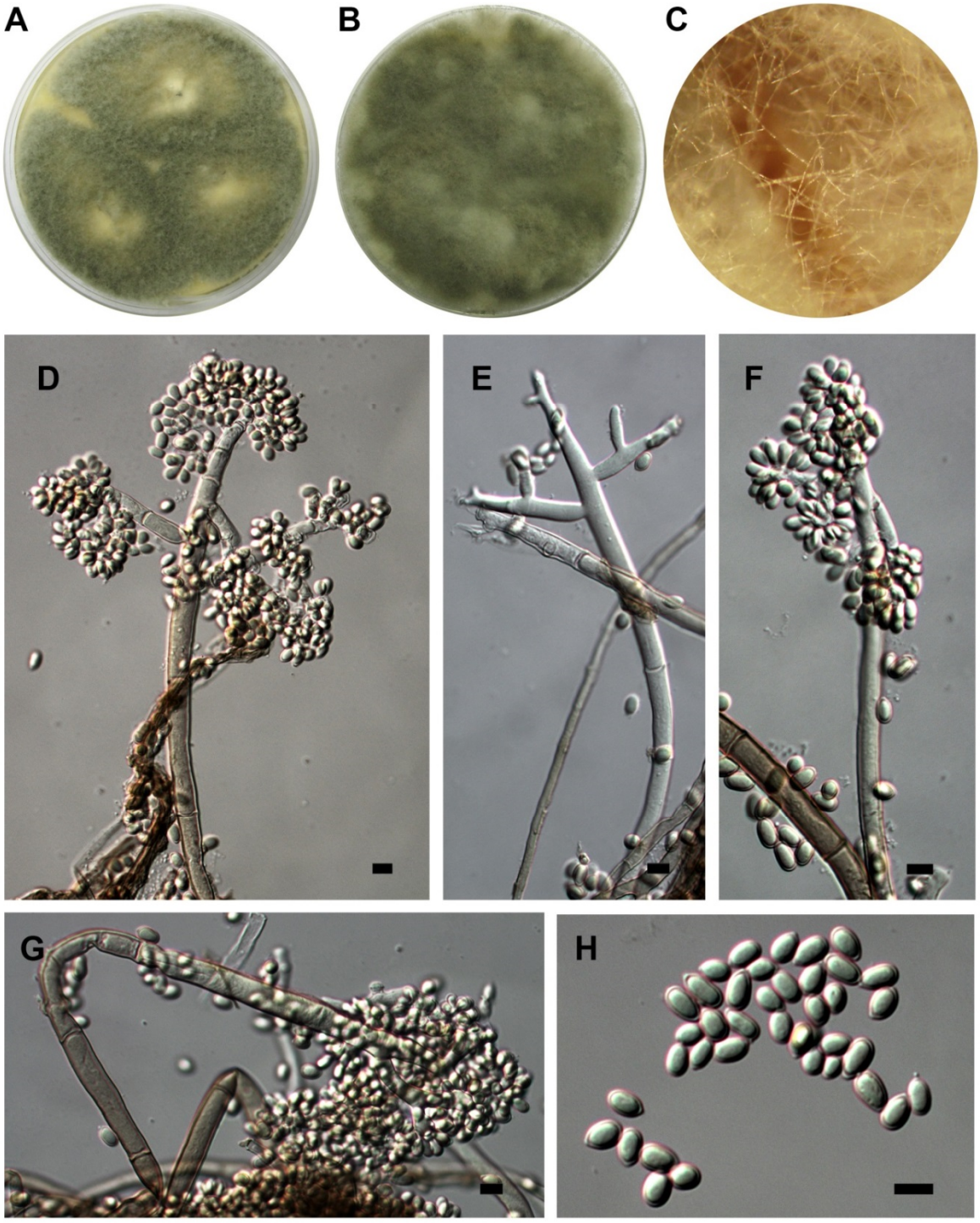
Slika 23. *Aspergillus westerdijkiae* BEOFB3210m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat; H) vezikula sa biserijatnim fijalidama; I) konidije. Bar = 10 µm.



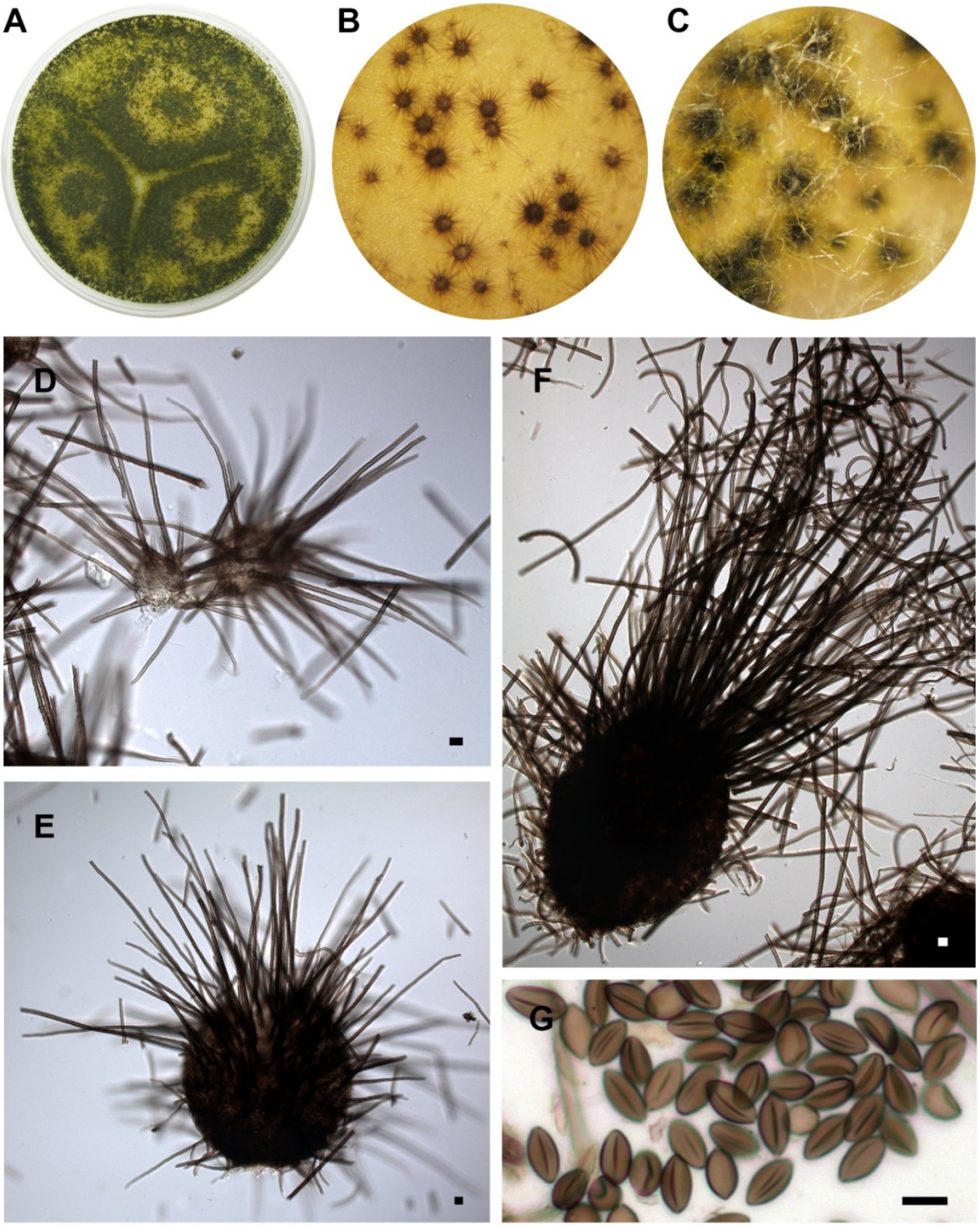
Slika 24. *Beauveria bassiana* BEOFB2900m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B–F) konidiogeni aparat i konidije. Bar = 10 μm.



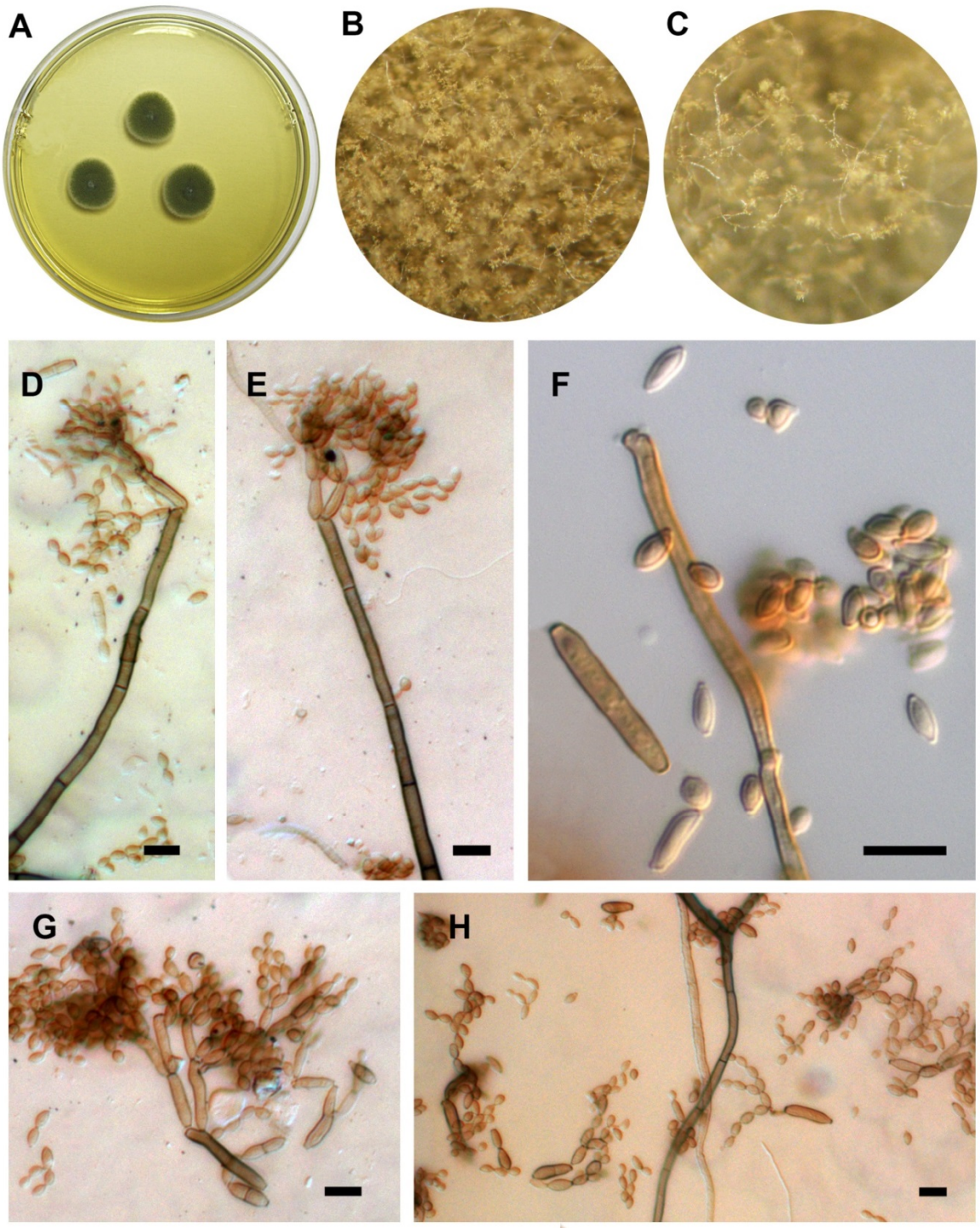
Slika 25. *Bionectria ochroleuca* BEOFB3301m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B–F) konidiogeni aparat; G) konidije. Bar = 10 µm.



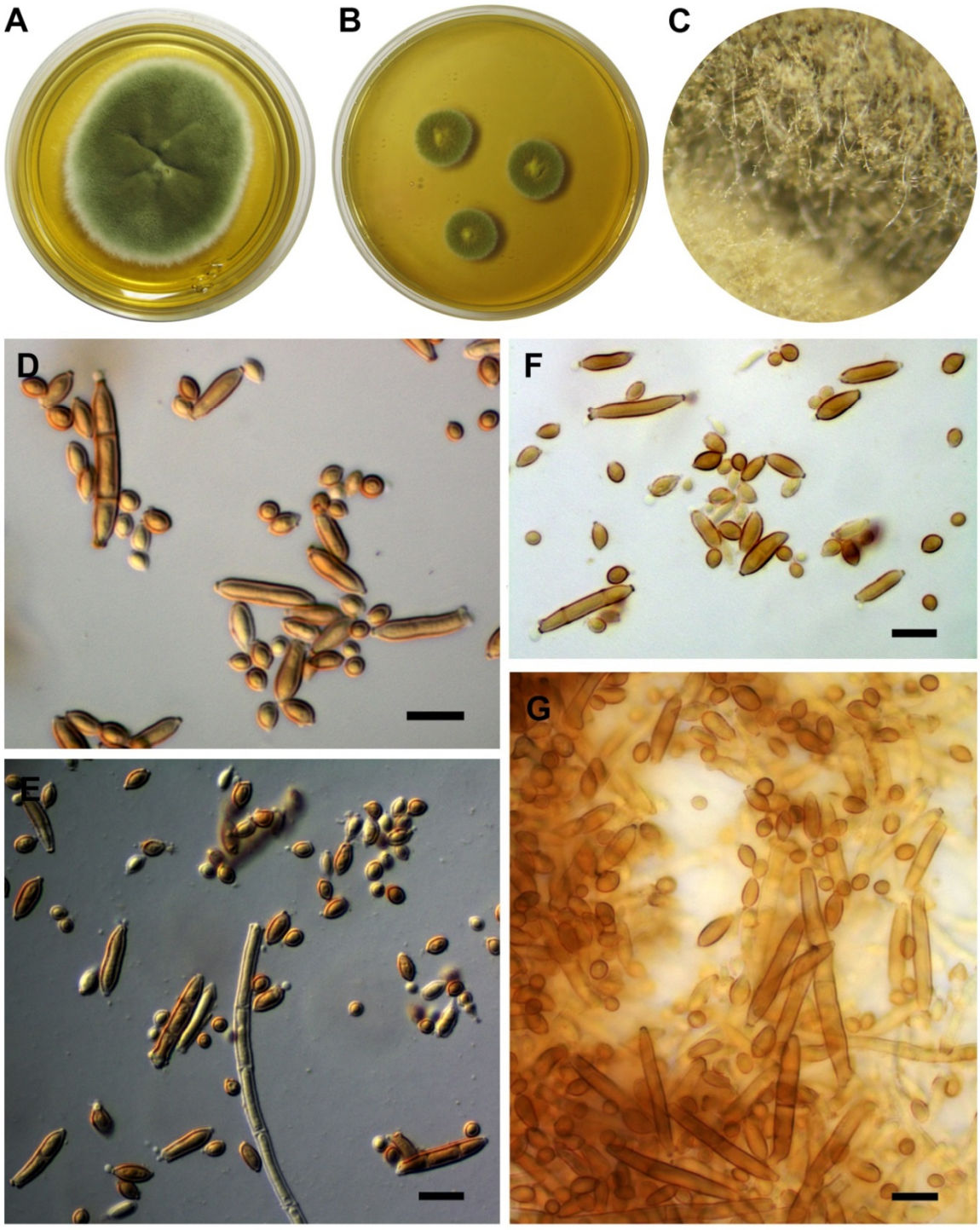
Slika 26. *Botrytis cinerea* BEOFB3100m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) micelija *in situ*; D–G) konidiogeni aparat; H) konidije. Bar = 10 μm.



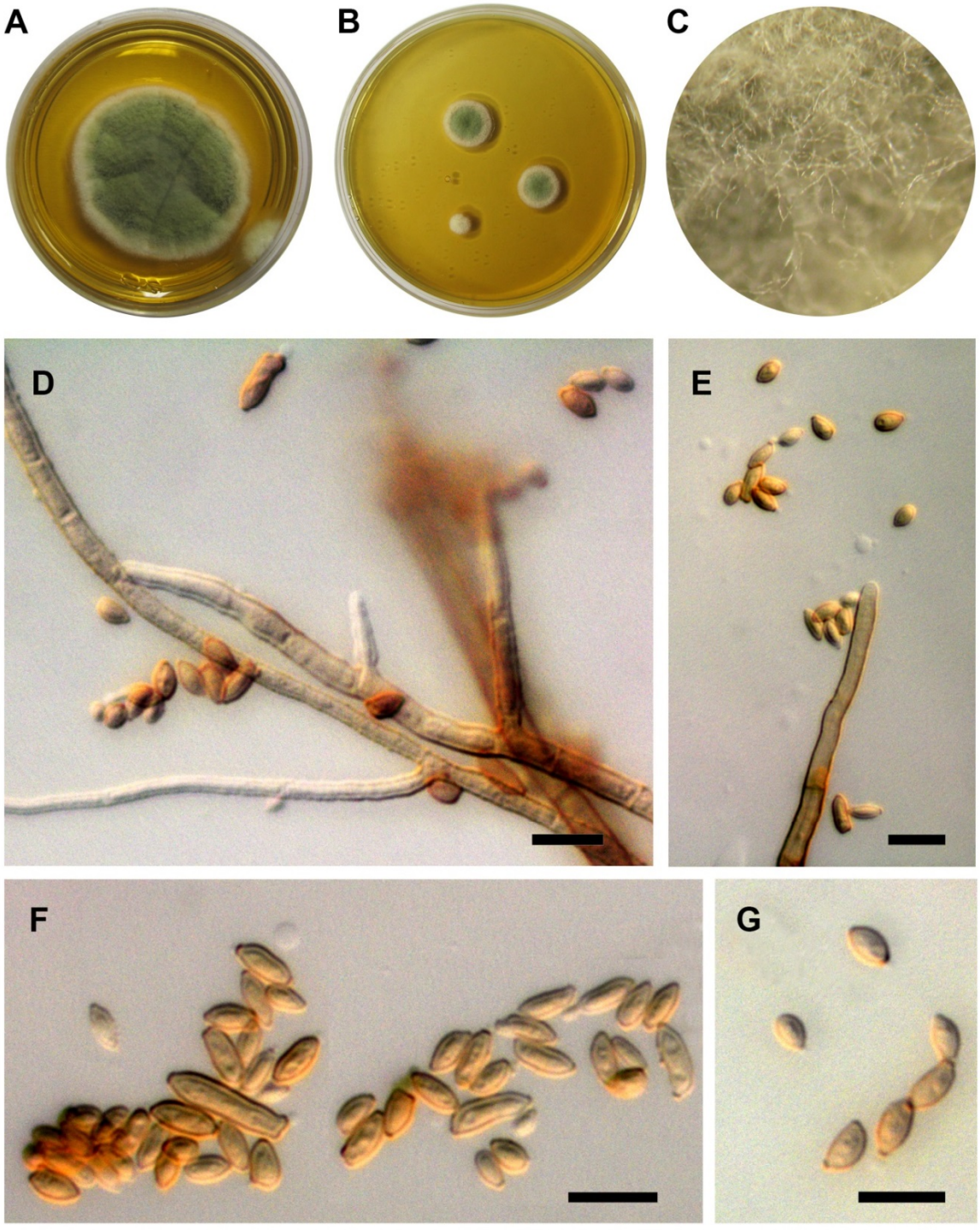
Slika 27. *Chaetomium murorum* BEOFB730m: A) izgled kolonije, 7. dan, OA; B i C) peritecije *in situ*; D–F) peritecija sa hetama; G) askospore. Bar = 10 µm.



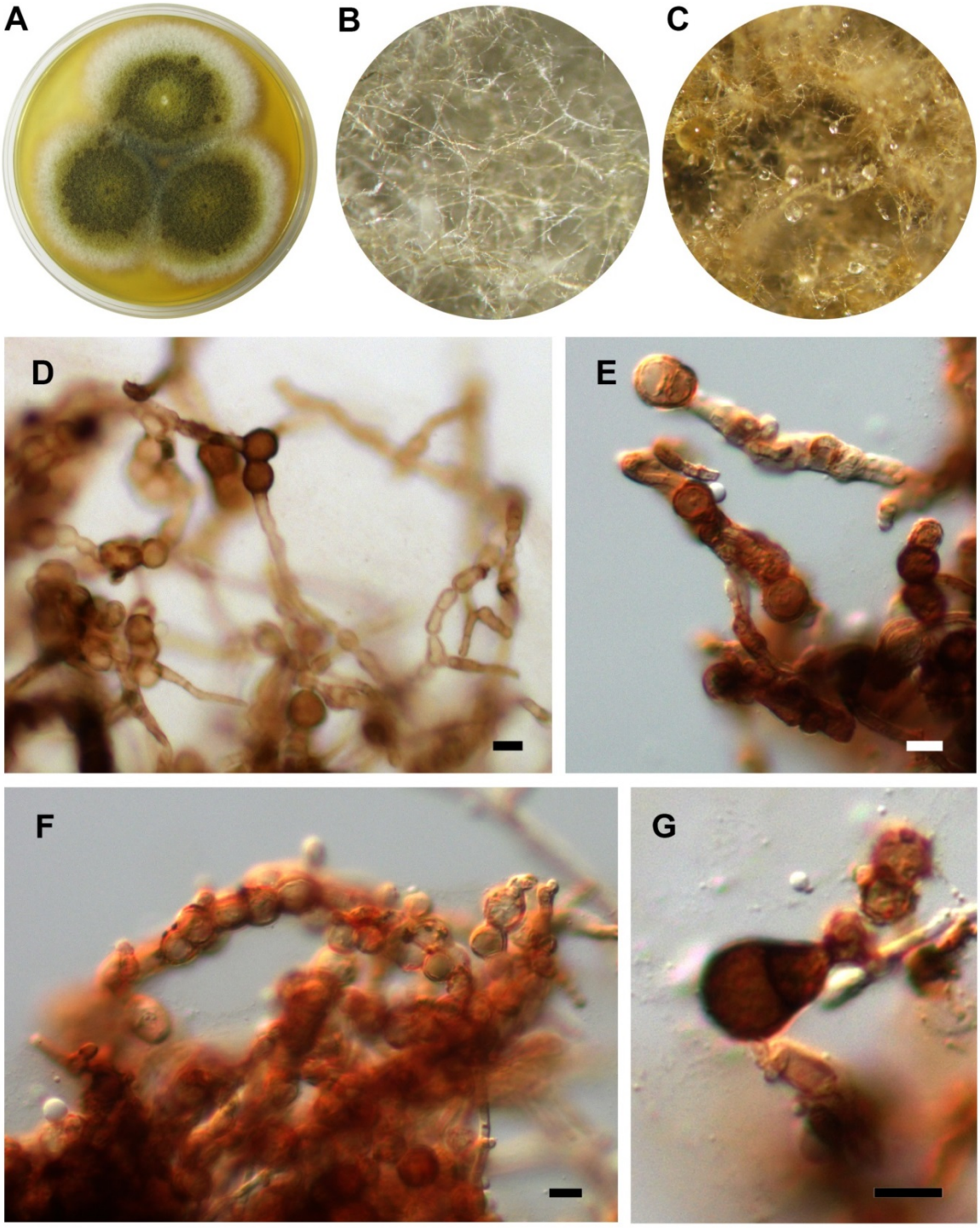
Slika 28. *Cladosporium cladosporioides* BEOFB1822m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) kolonija *in situ*; D–F) konidiofor sa ramokonidijama i konidijama, G i H) ramokonidije i konidije. Bar = 10 μm.



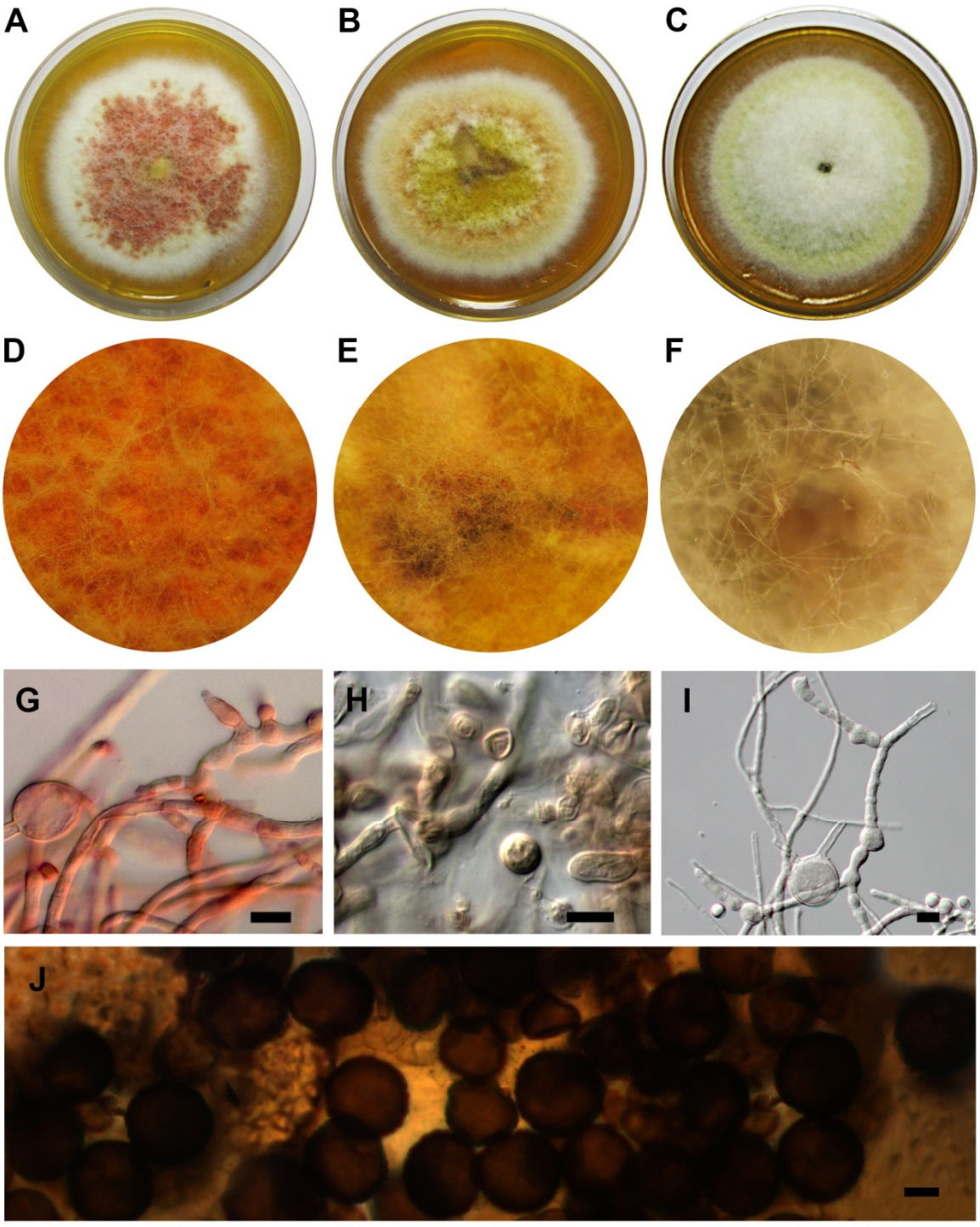
Slika 29. *Cladosporium sphaerospermum* BEOFB1850m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i M40Y; C) kolonija *in situ*; D–G) ramokonidije i konidije. Bar = 10 µm.



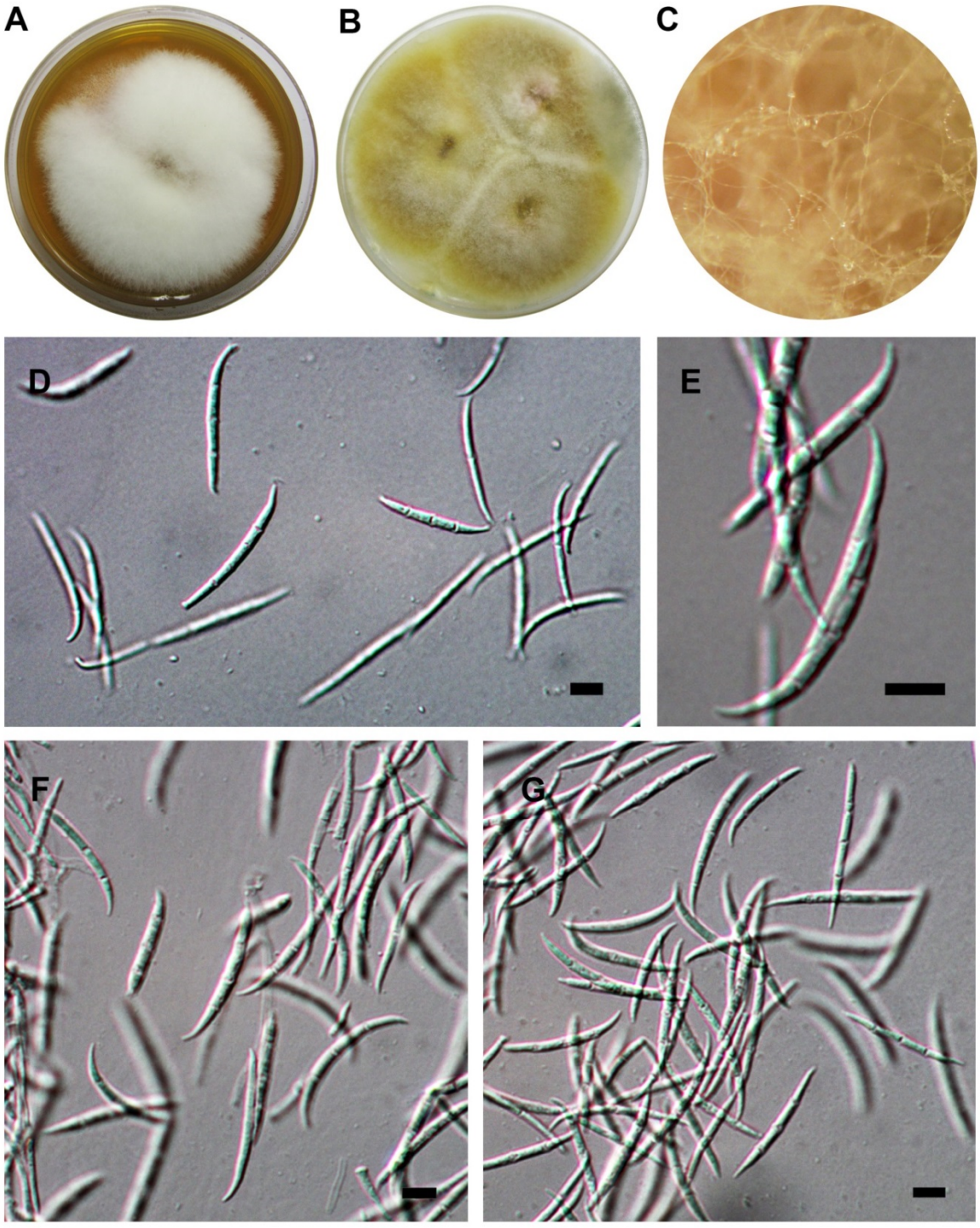
Slika 30. *Cladosporium uredinicola* BEOFB1842m: A i B) izgled kolonije, 7. dan. MEA i M40Y; C) kolonija *in situ*; D i E) konidiofor i konidije; F i G) ramokonidije i konidije. Bar = 10 μm.



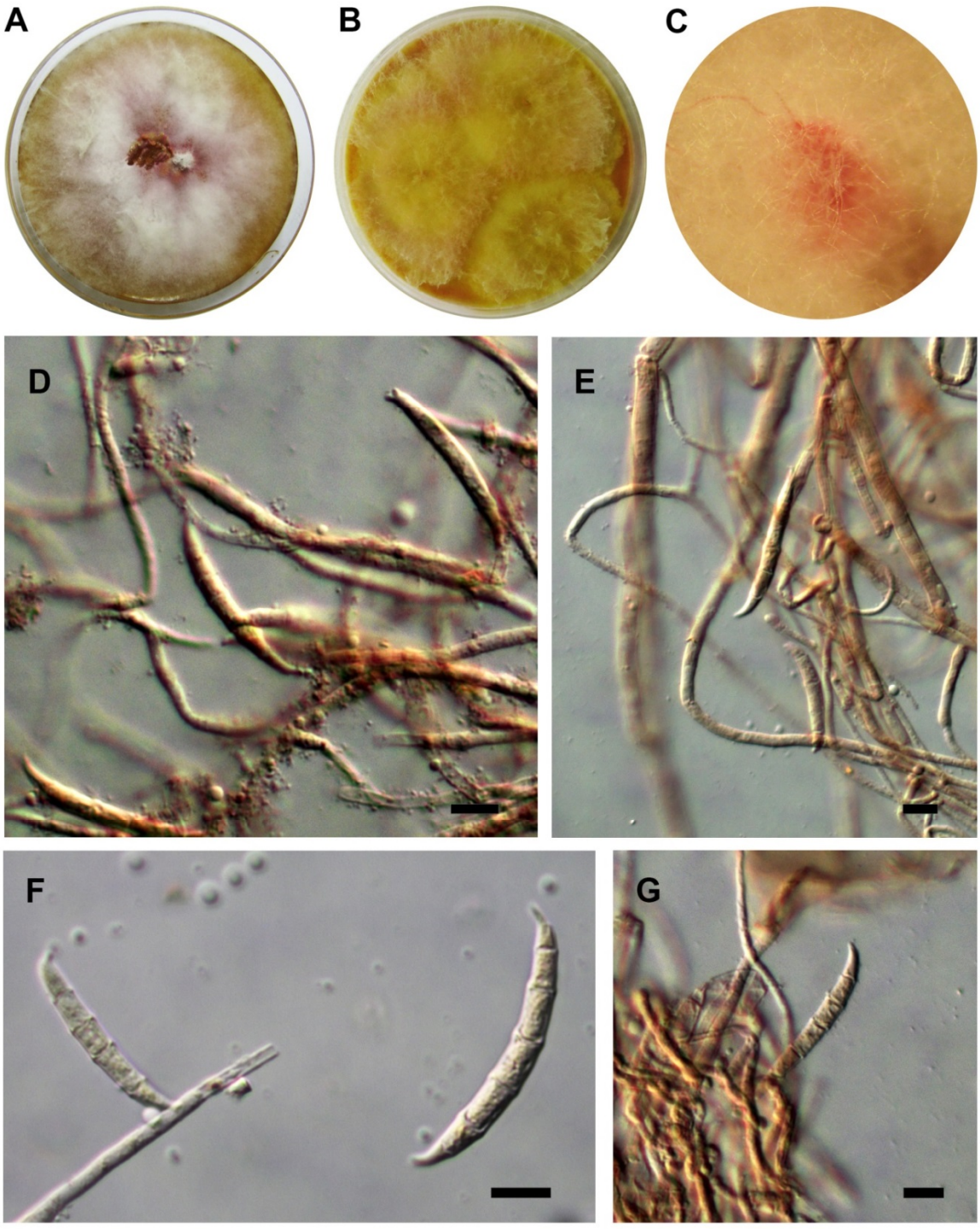
Slika 31. *Didymella glomerata* BEOFB2700m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) micelija *in situ*; D–G) hlamidospore. Bar = 10 μm.



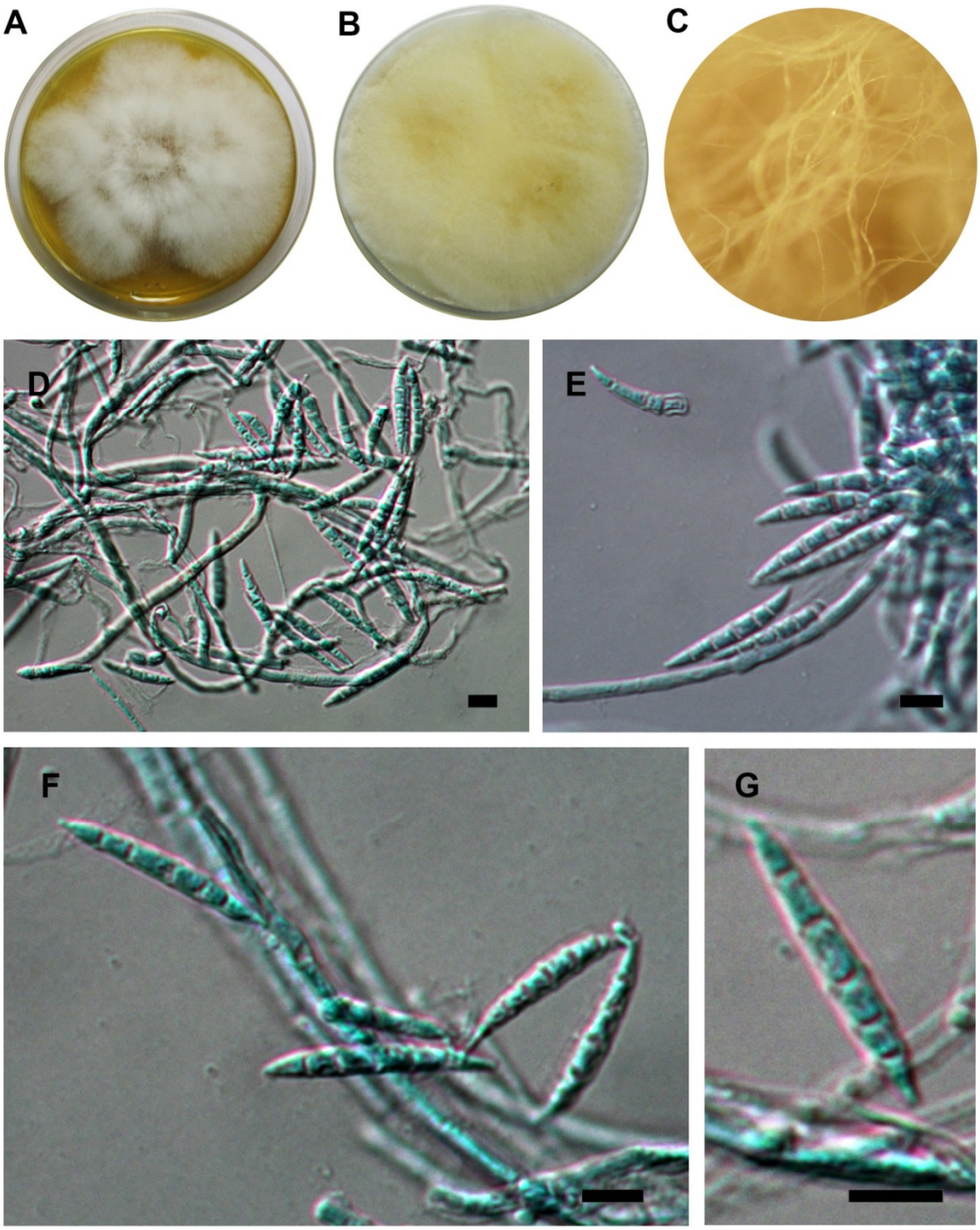
Slika 32. *Epicoccum nigrum*, izolati BEOFB1703m, BEOFB1704m i BEOFB1706m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA; D–F) micelija *in situ*; G–I) micelija i hlamidospore; J) konidije (u uzorku adhezivne trake sa površine stele). Bar = 10 µm.



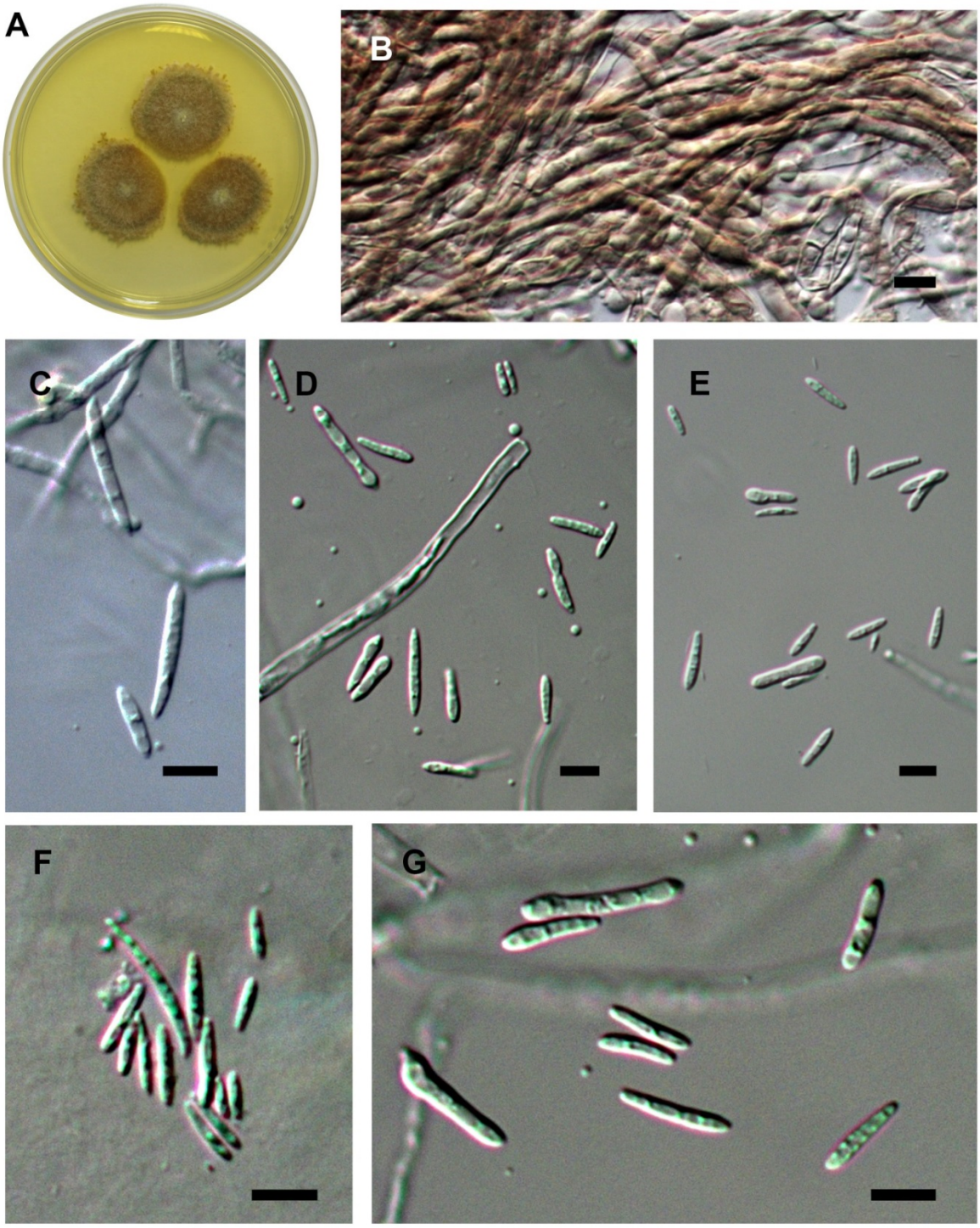
Slika 33. *Fusarium avenaceum* BEOFB810m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) kolonija *in situ*; D–G) makrokonidije. Bar = 10 µm.



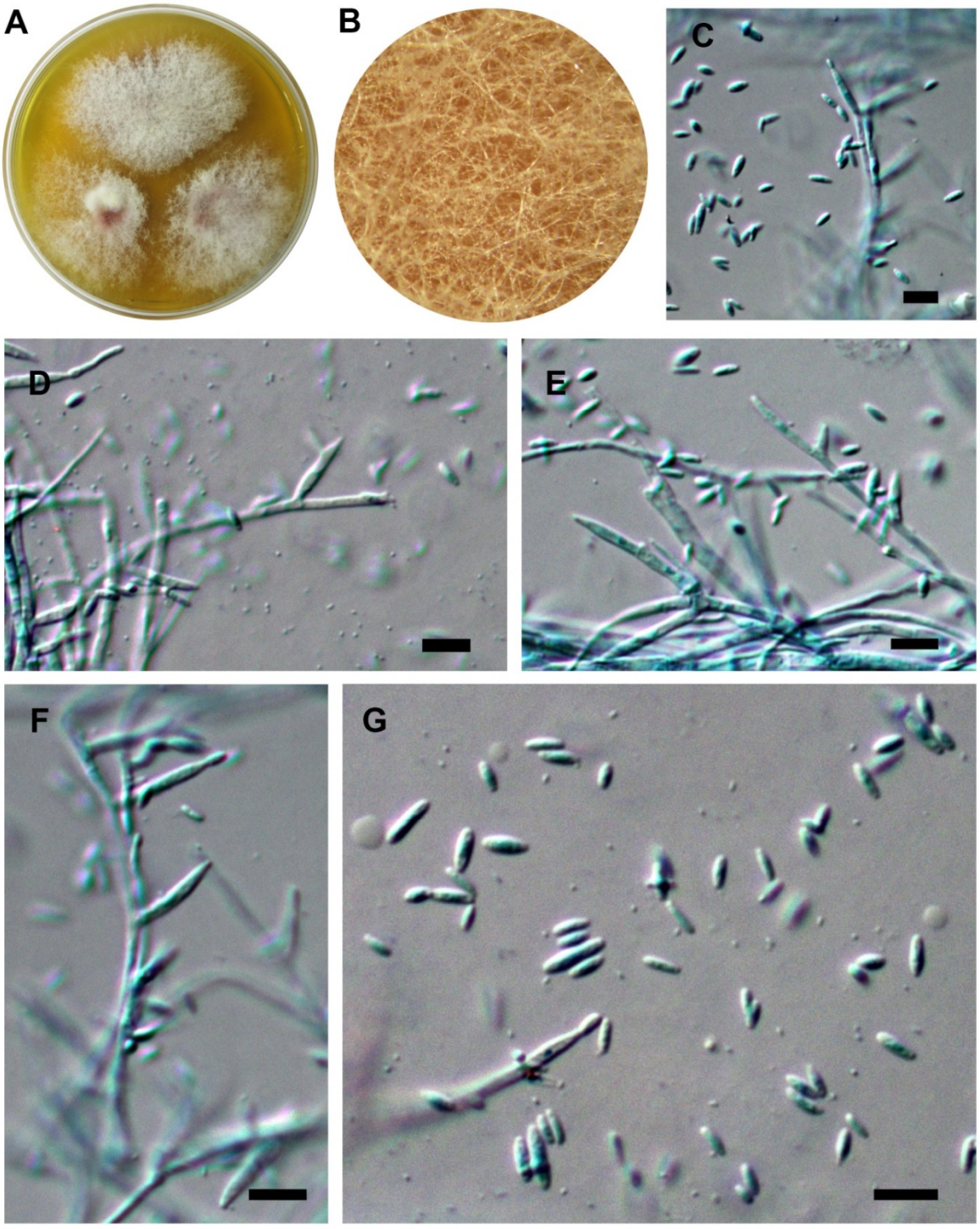
Slika 34. *Fusarium graminearum* BEOFB820m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) kolonija *in situ*; D–G) micelija i makrokonidije. Bar = 10 µm.



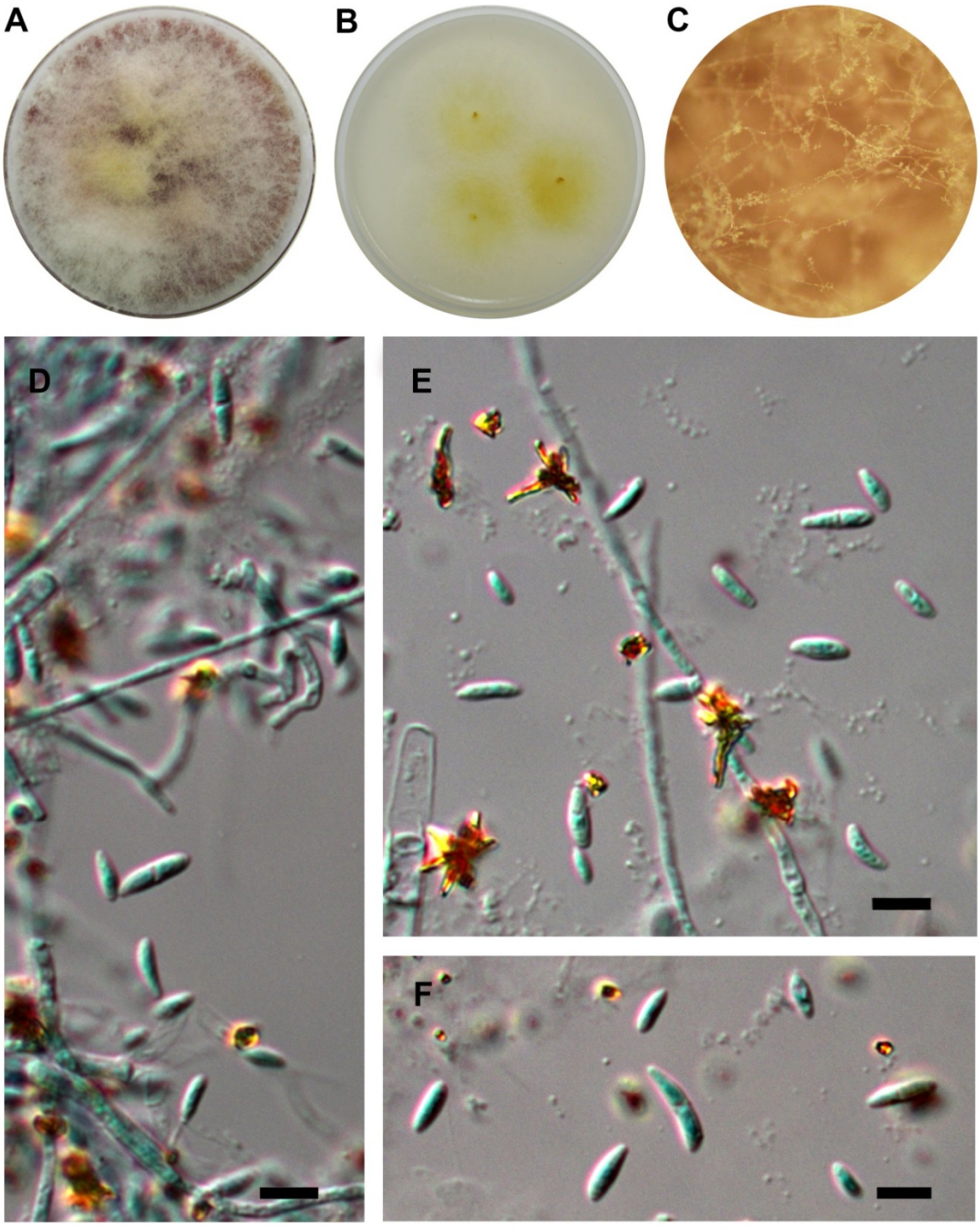
Slika 35. *Fusarium incarnatum* BEOFB830m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) kolonija *in situ*; D–G) micelija i makrokonidije. Bar = 10 µm.



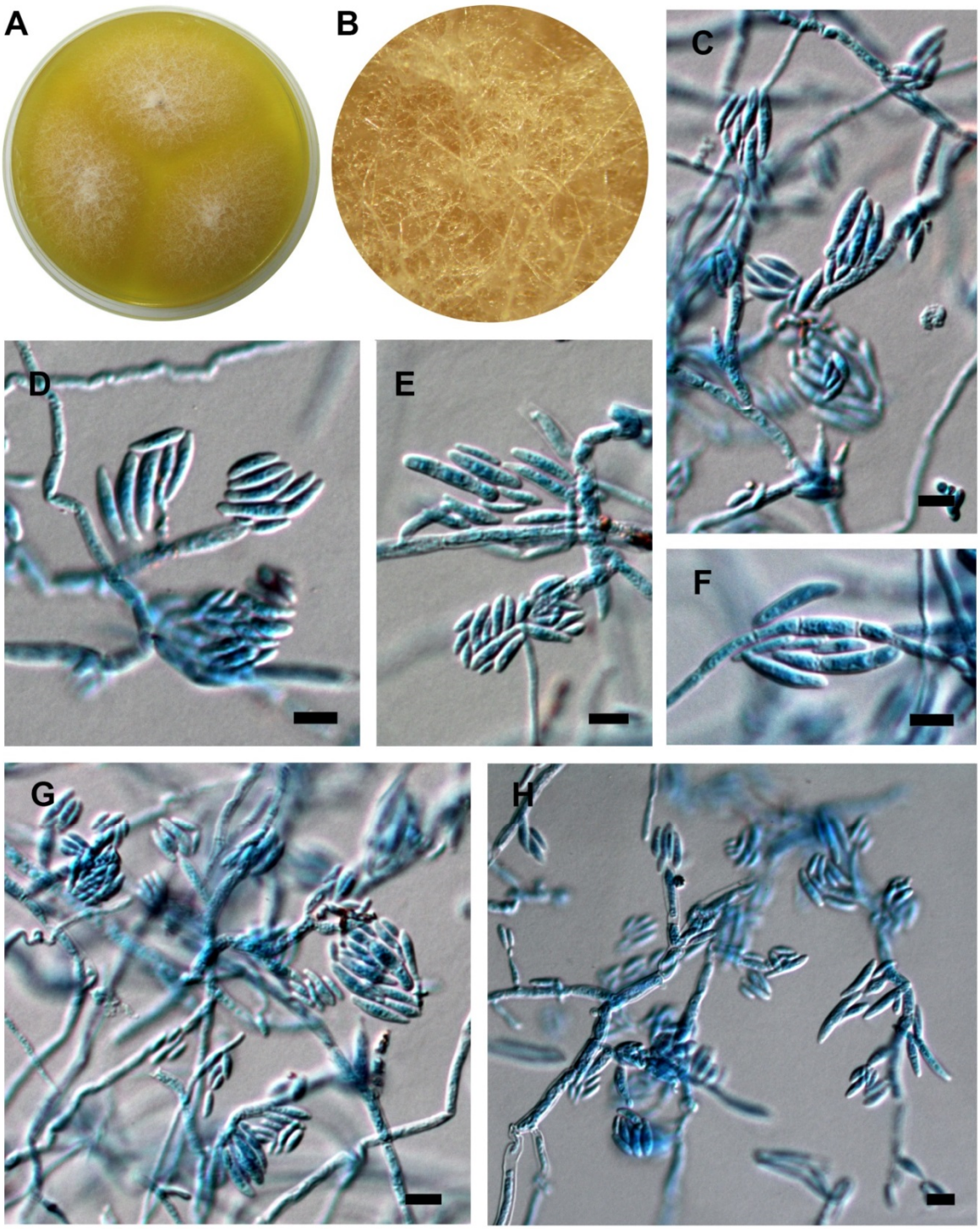
Slika 36. *Fusarium lateritium* BEOFB840m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B) micelija; C–G) makro i mikrokonidije. Bar = 10 µm.



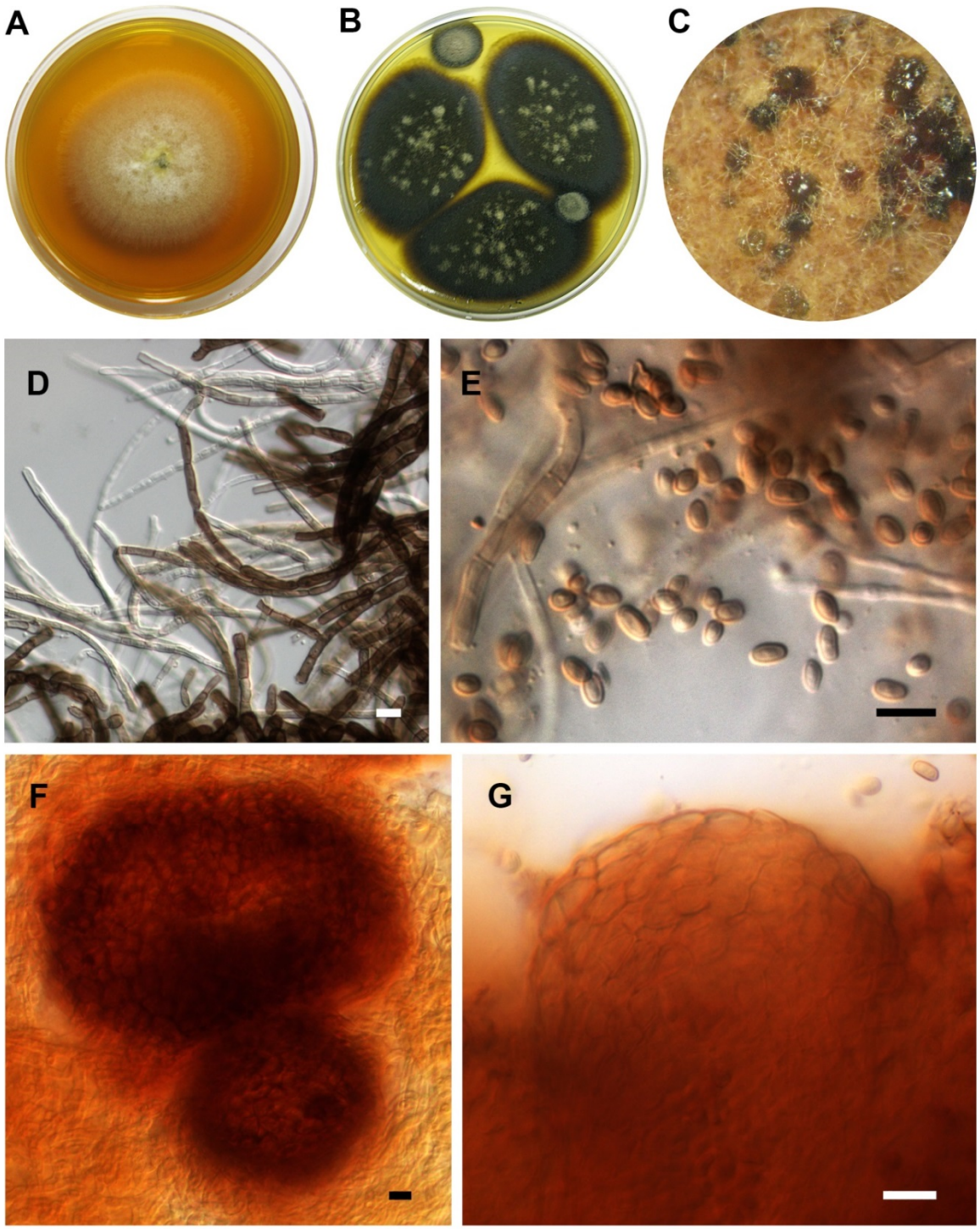
Slika 37. *Fusarium proliferatum* BEOFB850m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B) kolonija *in situ*; C–G) konidiofor, mikro i makrokonidije. Bar = 10 μm.



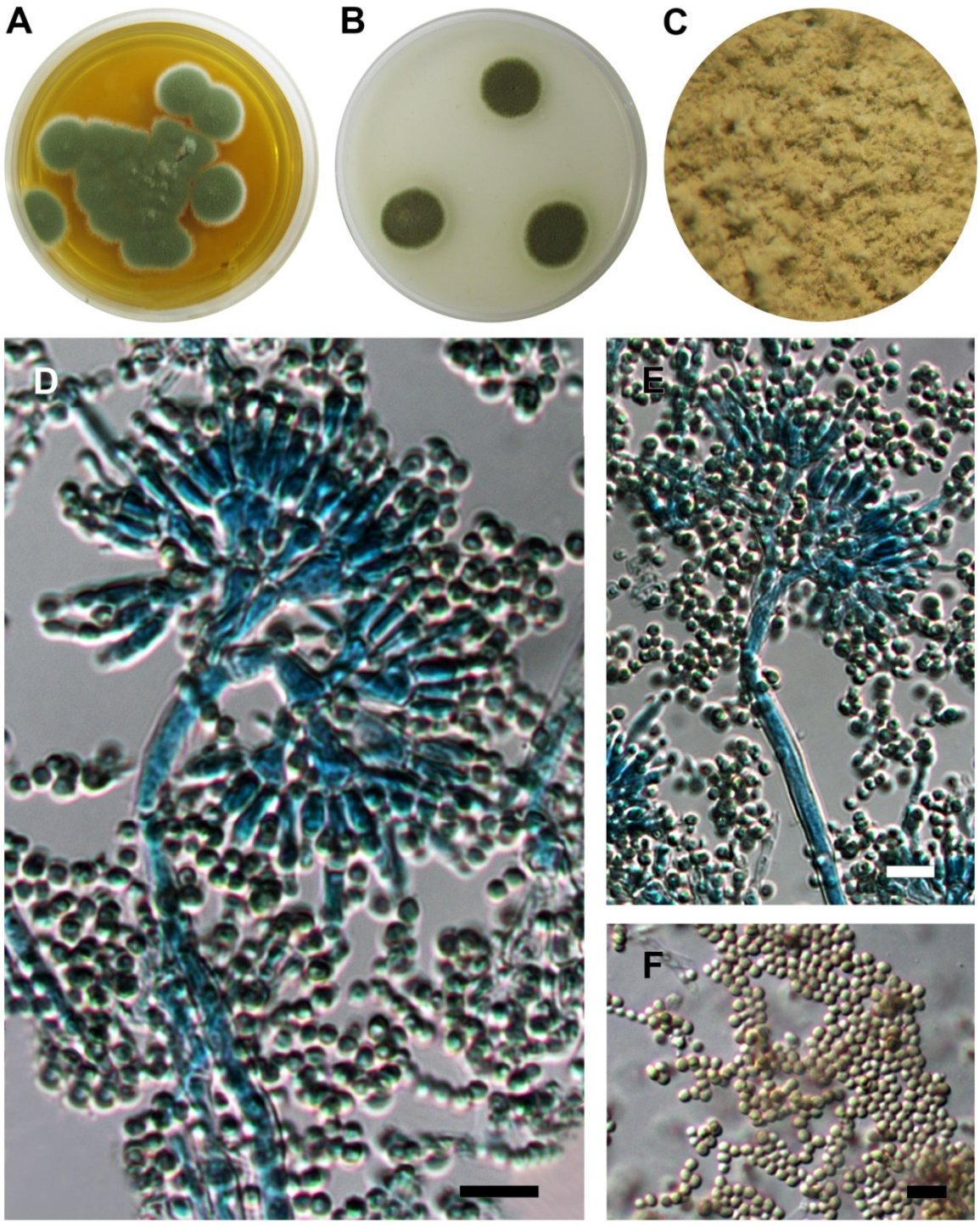
Slika 38. *Fusarium sporotrichioides* BEOFB860m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) kolonija *in situ*; D–F) konidiofor i mikrokonidije. Bar = 10 µm.



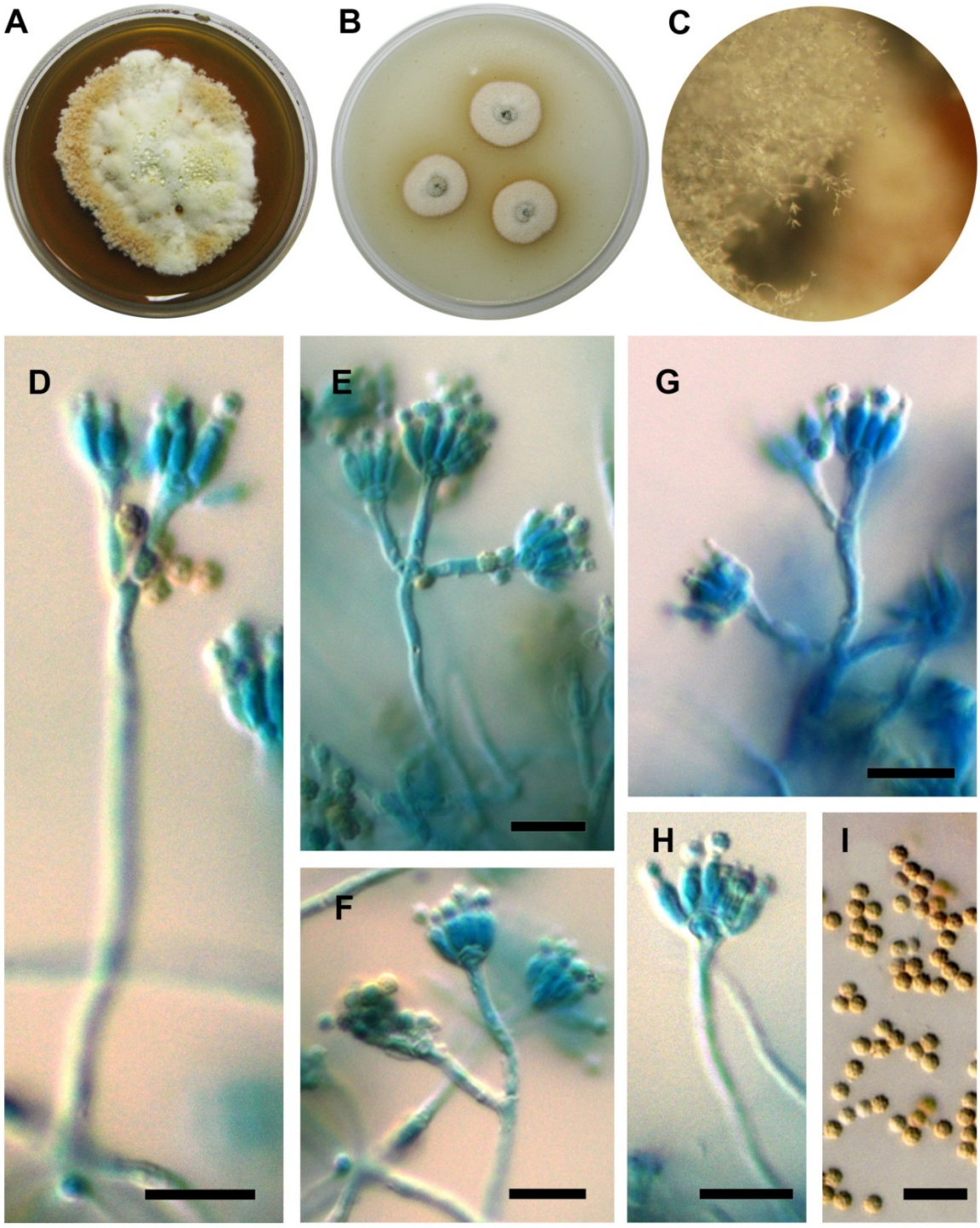
Slika 39. *Fusarium verticillioides* BEOFB802m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B) kolonija *in situ*; C–H) micelija, konidiofor, mikro i makrokonidije. Bar = 10 µm.



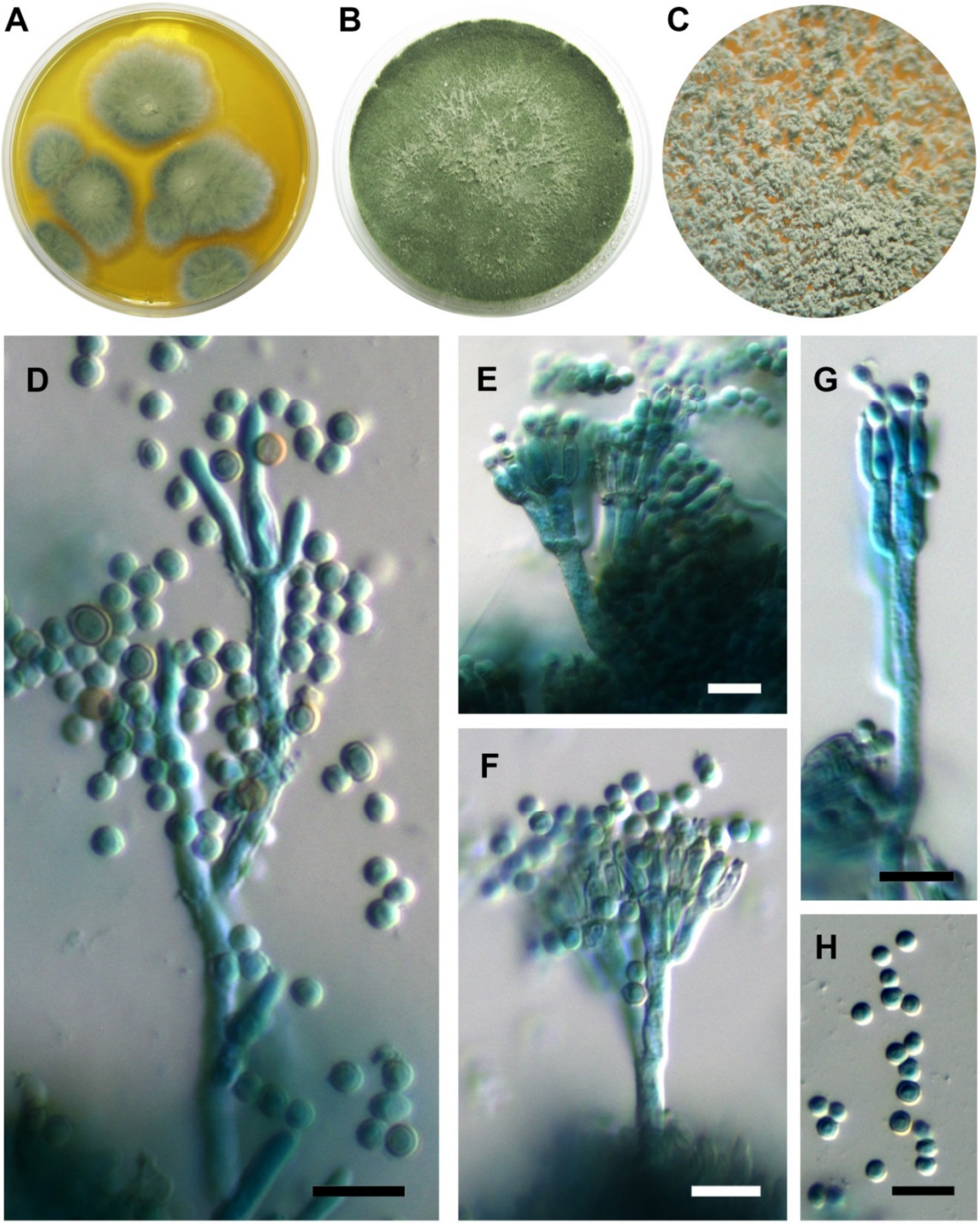
Slika 40. *Nothophoma quercina* BEOFB3500m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i M40Y; C) piknidije *in situ*; D) micelija; E) piknospore; F i G) piknidije. Bar = 10 µm.



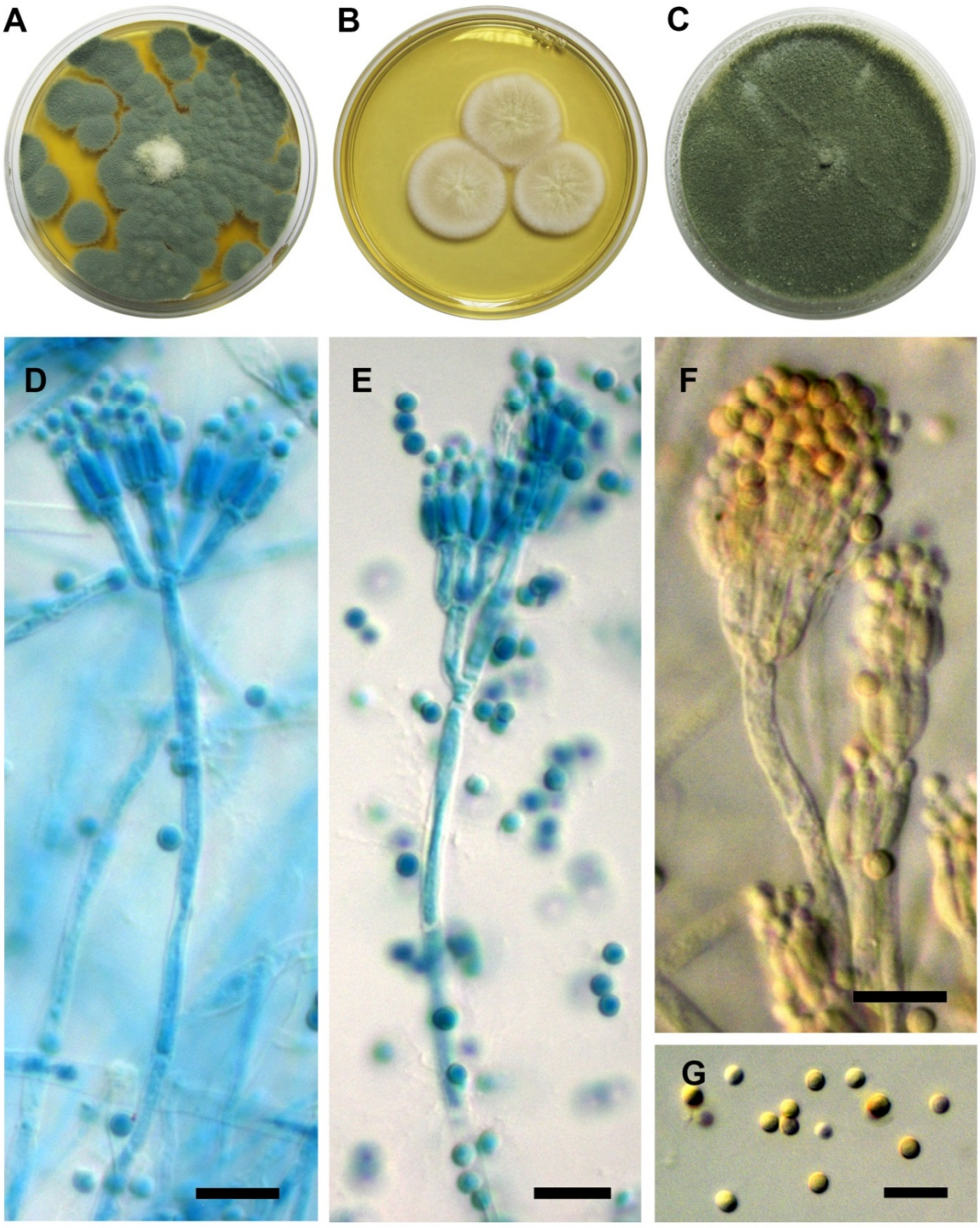
Slika 41. *Penicillium brevicompactum* BEOFB1102m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D i E) konidiogeni aparat, terverticilatni konidiofori; F) konidije. Bar = 10 μm.



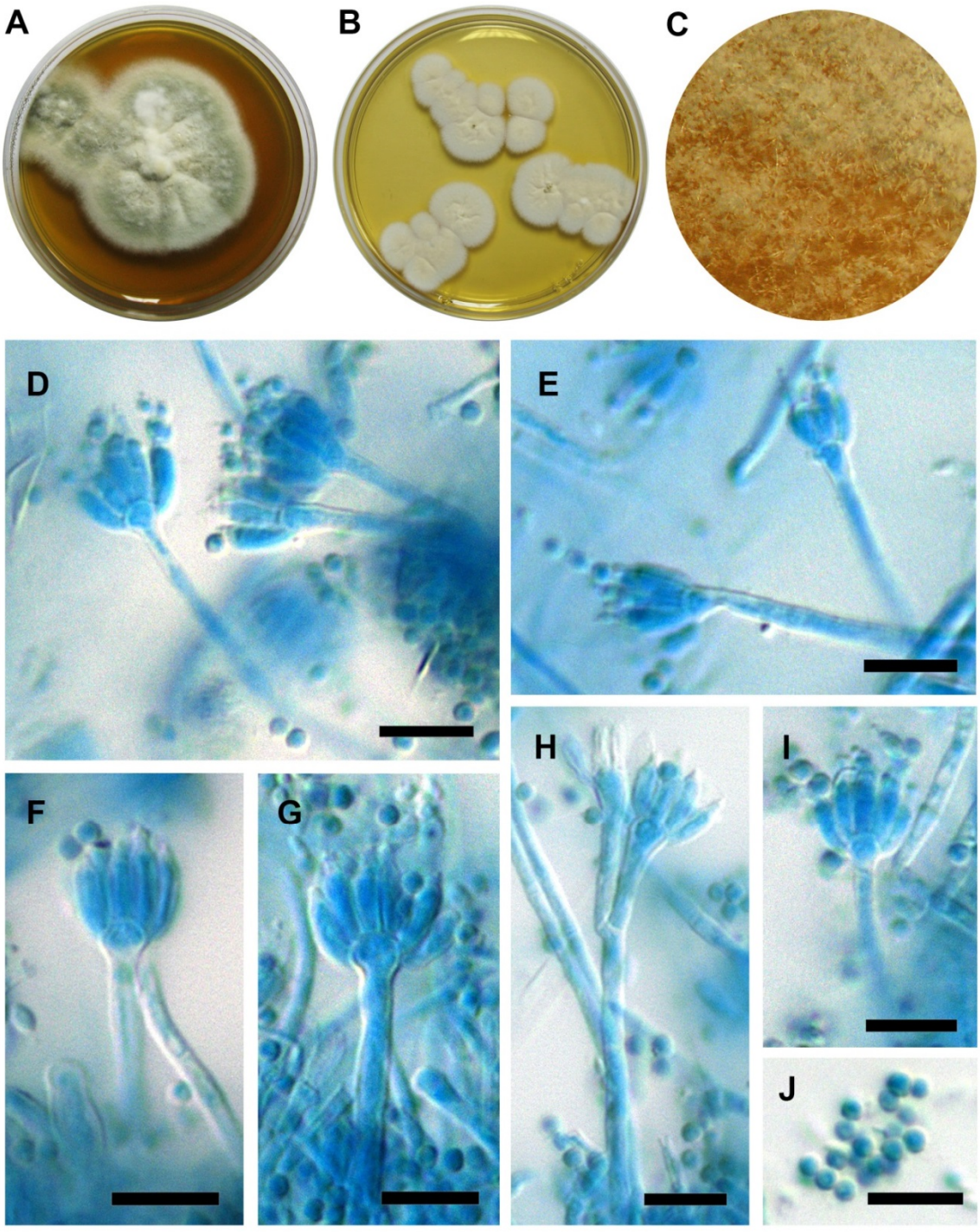
Slika 42. *Penicillium canescens* BEOFB11180m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–H) konidiogeni aparat, bi- i monoverticilatni konidiofori; I) konidije. Bar = 10 μm.



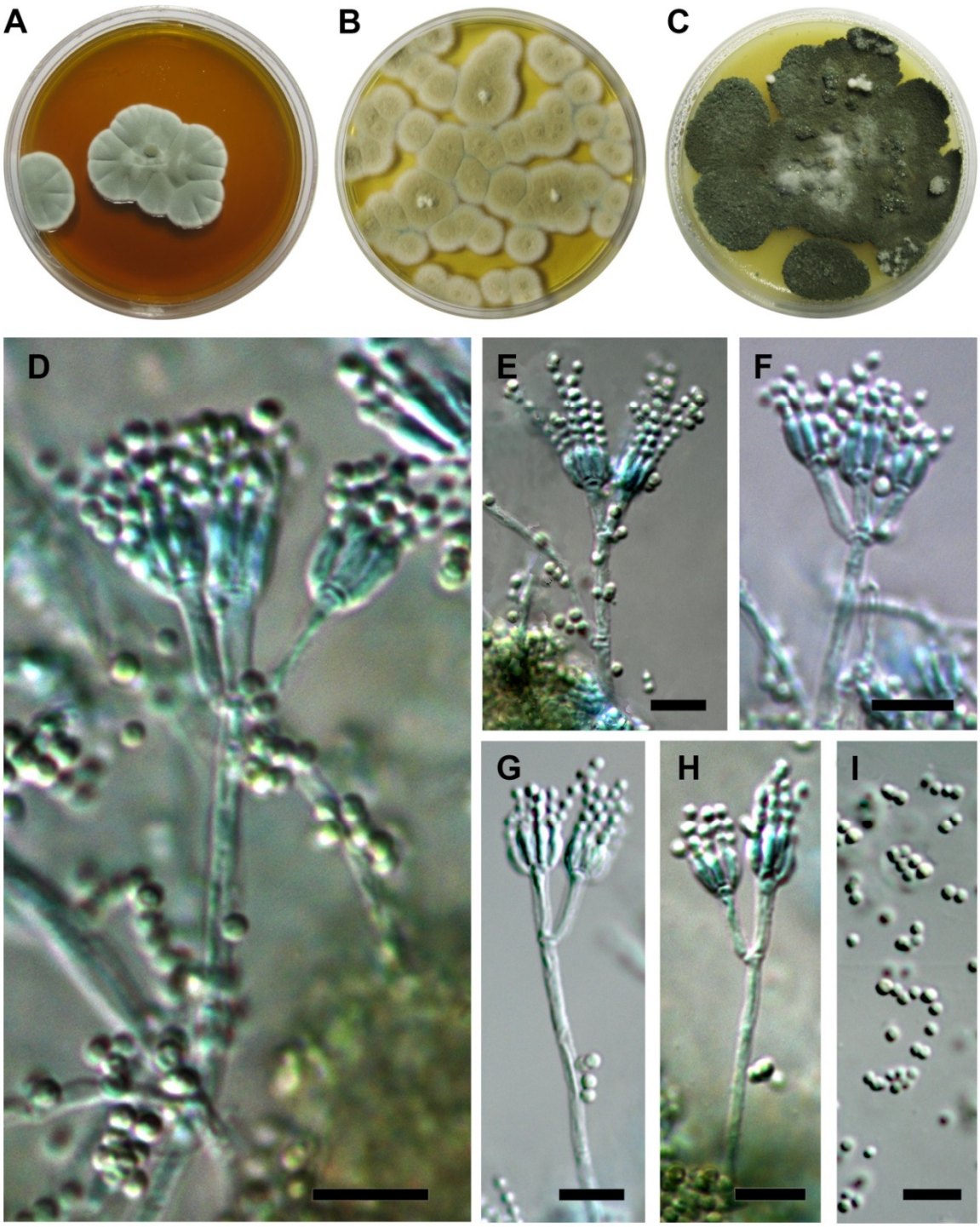
Slika 43. *Penicillium carneum* BEOFB11150m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat, mono- i biverticilatni konidiofori; H) konidije. Bar = 10 µm.



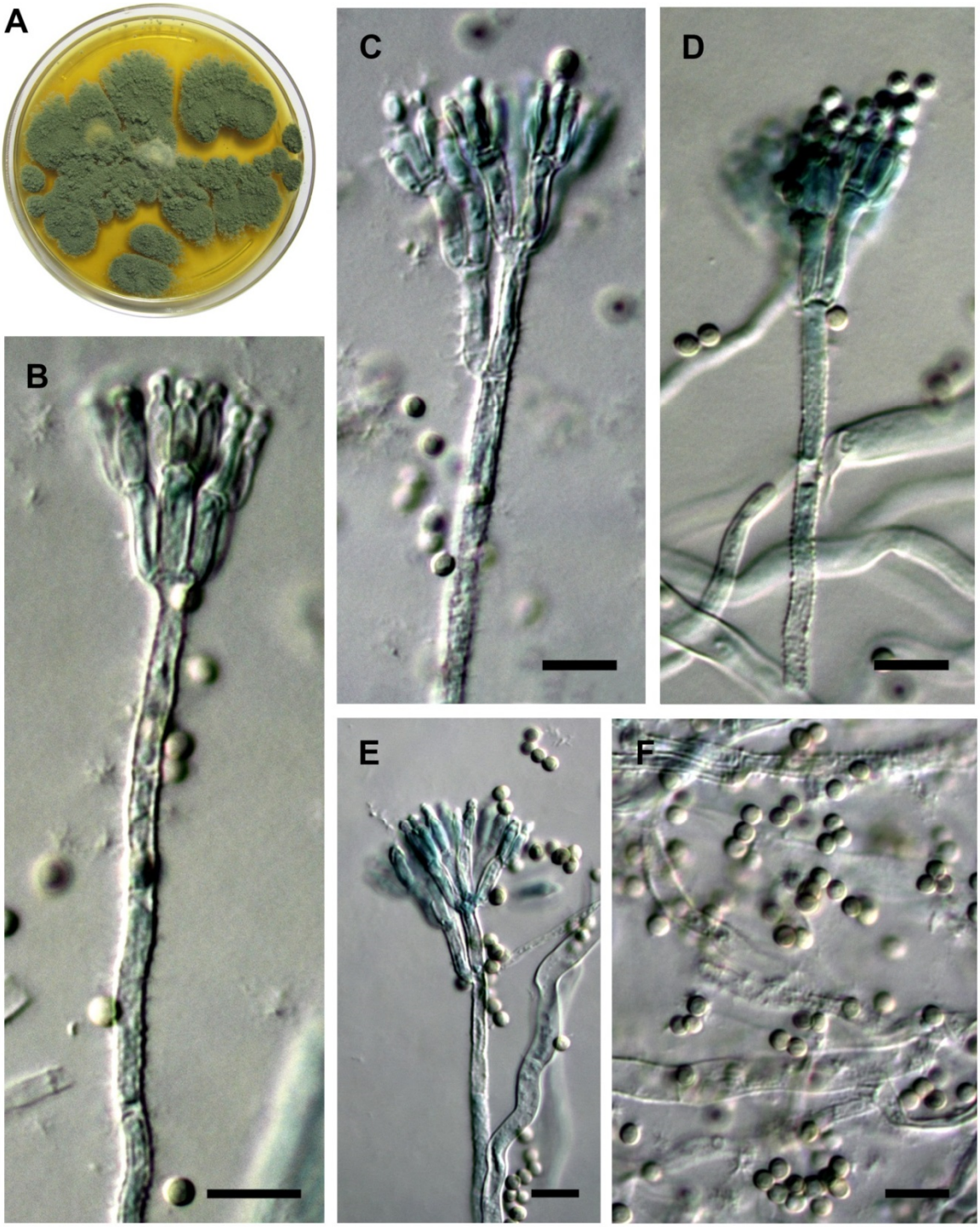
Slika 44. *Penicillium chrysogenum* BEOFB11120m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparat, mono- i biverticilatni konidiofori; G) konidije. Bar = 10 μm.



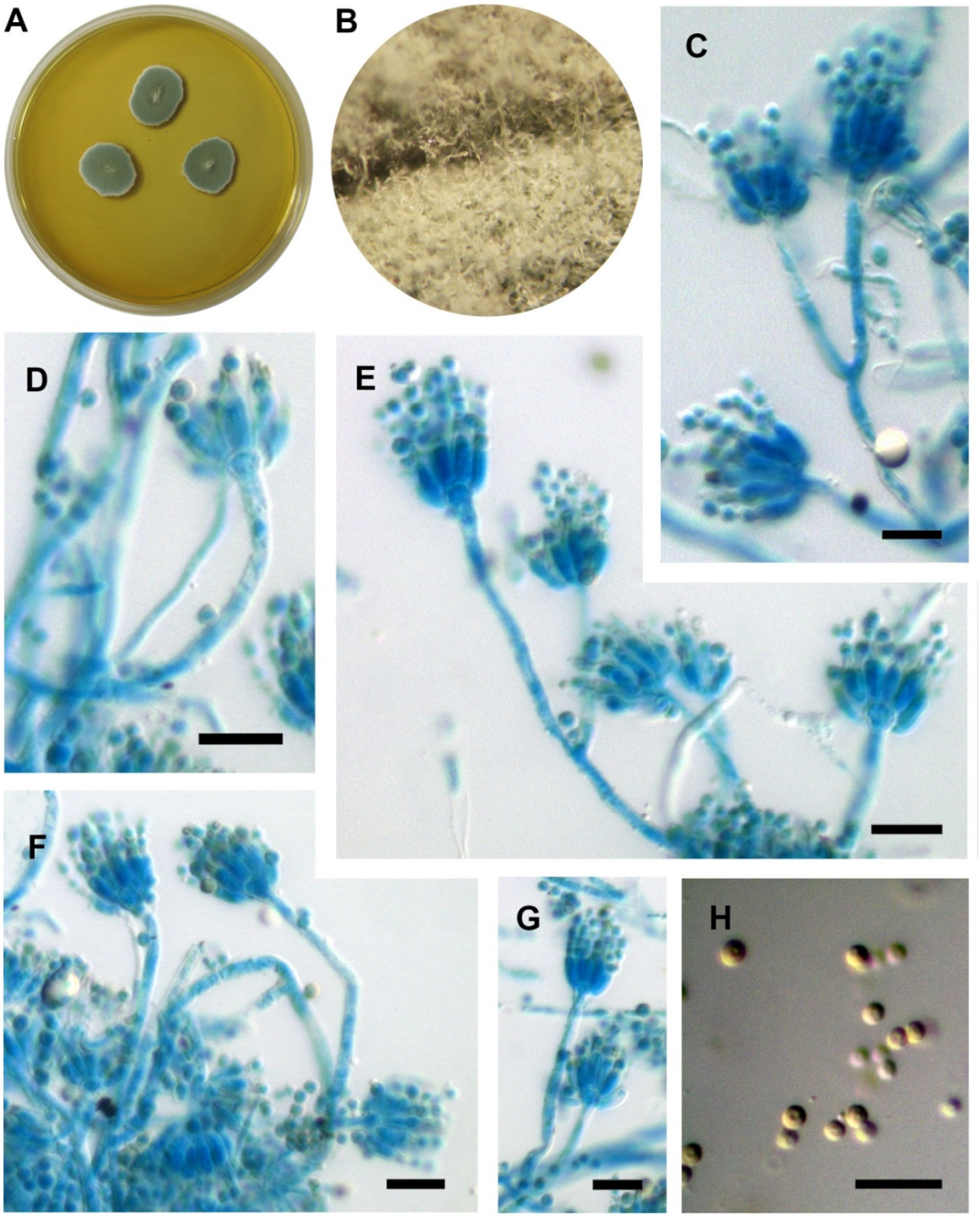
Slika 45. *Penicillium citreonigrum* BEOFB11190m: A i B) izgled kolonije, 7. dan. MEA i M40Y; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–I) konidiogeni aparat, mono- i biverticilatni konidiofori; J) konidije. Bar = 10 µm.



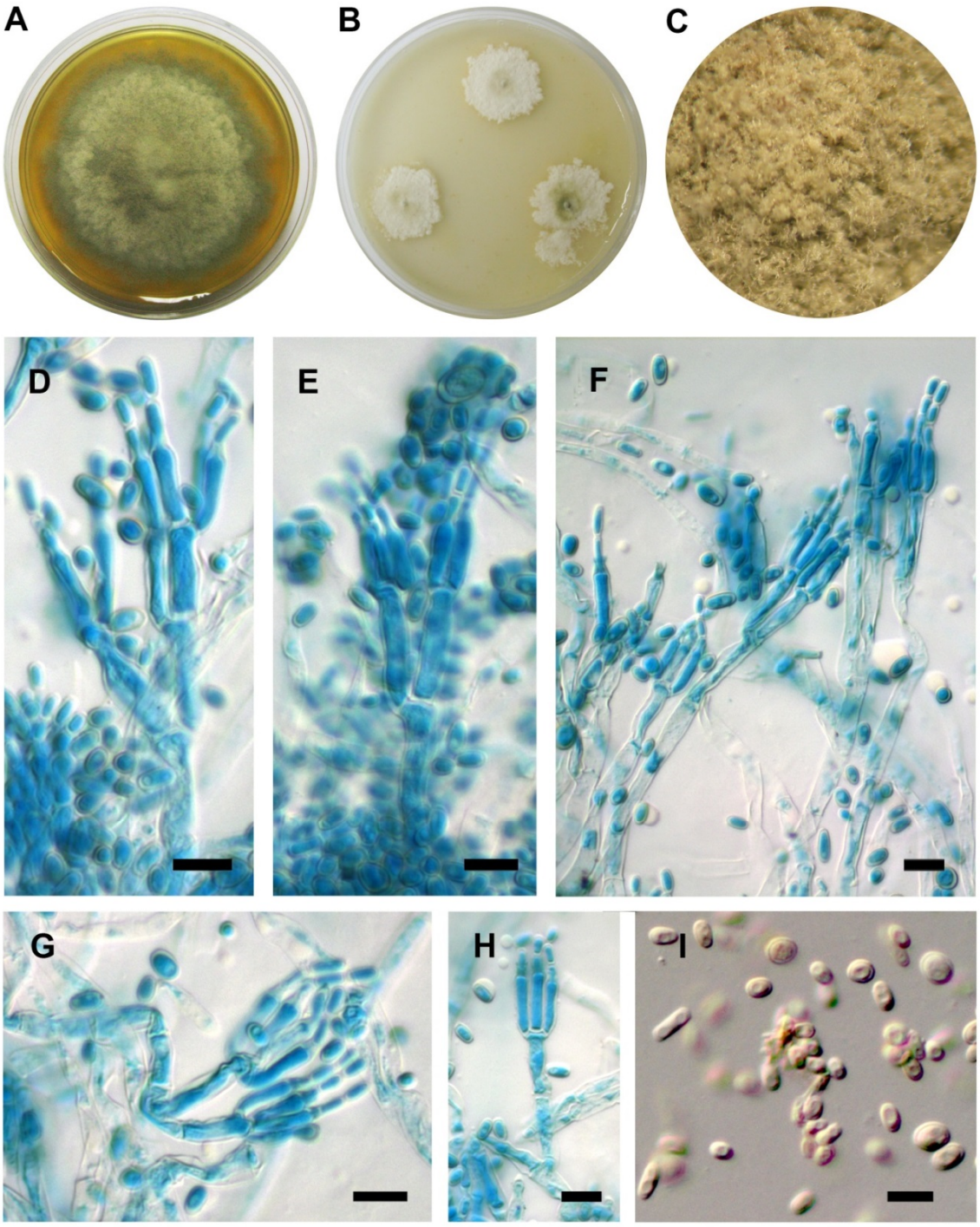
Slika 46. *Penicillium citrinum* BEOFB11110m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–H) konidiogeni aparat, biverticilatni konidiofori; I) konidije. Bar = 10 µm.



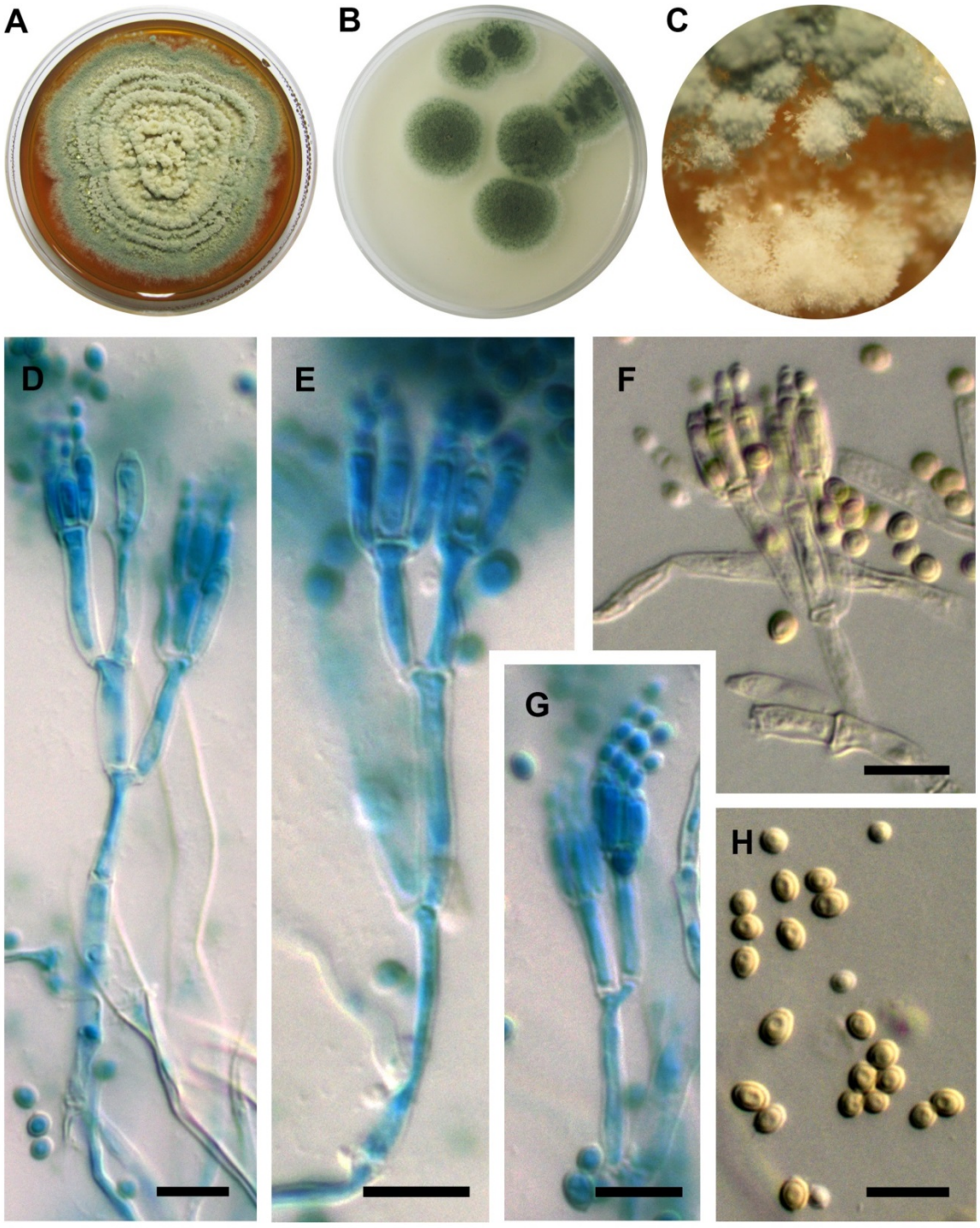
Slika 47. *Penicillium crustosum* BEOFB11300m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B–E) konidiogeni aparat, terverticilatni konidiofori; F) konidije. Bar = 10 μm.



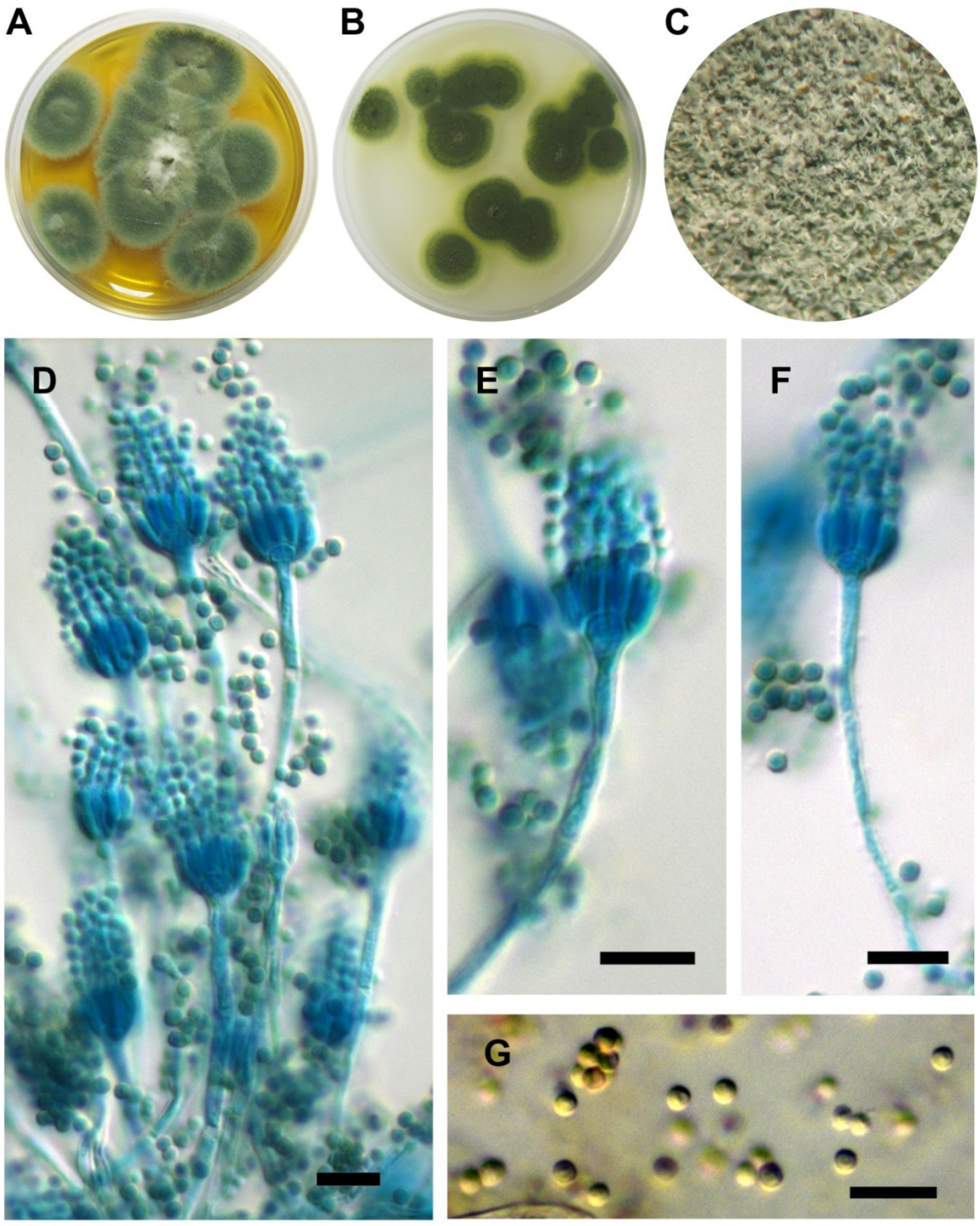
Slika 48. *Penicillium decumbens* BEOFB11160m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B) kolonija *in situ*; C–G) konidiogeni aparat, monoverticilatni konidiofori; H) konidije. Bar = 10 μm.



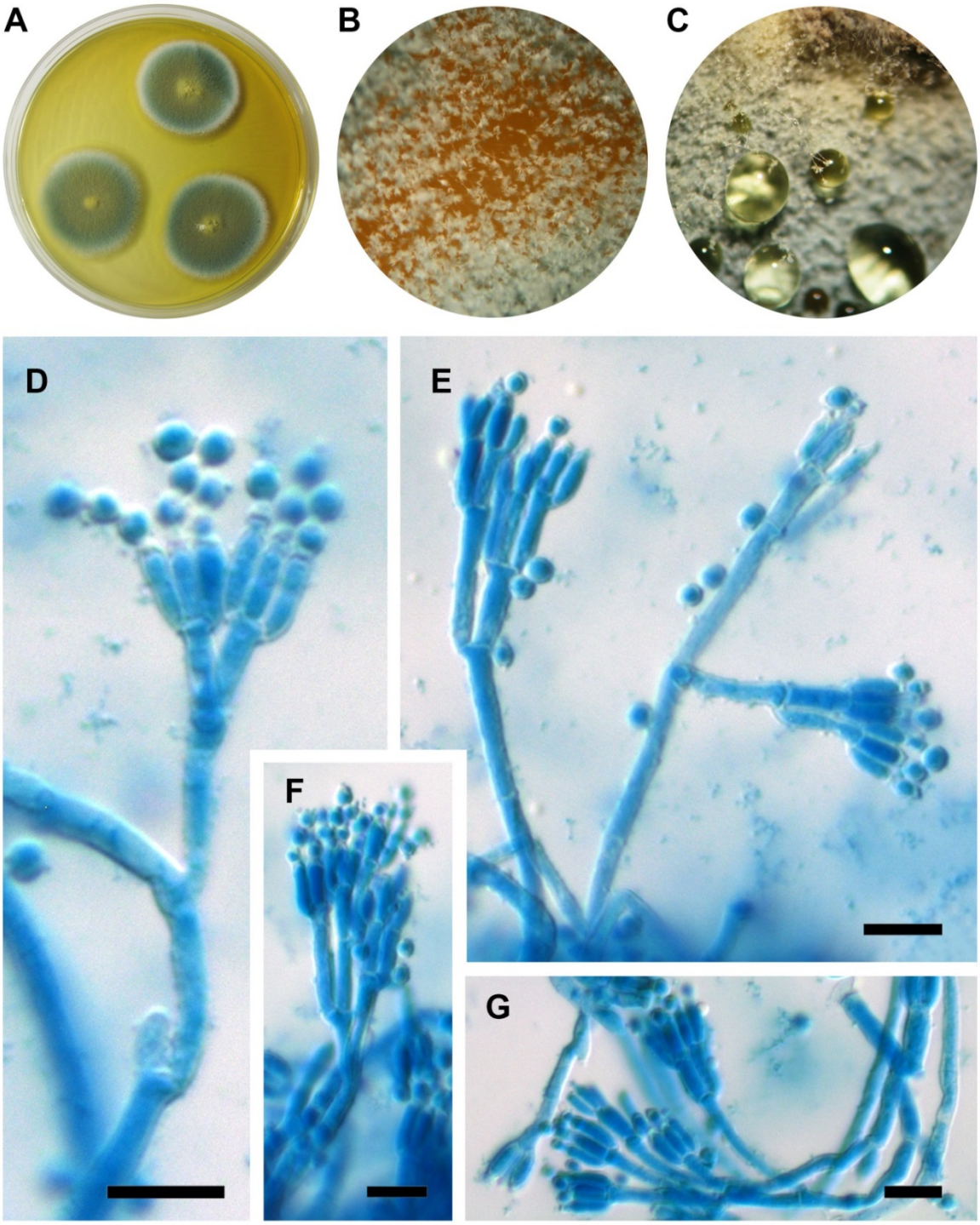
Slika 49. *Penicillium digitatum* BEOFB1112m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) kolonija *in situ*; D–H) konidiogeni aparat, biverticilatni ili nepravilno granati konidiofori; I) konidije. Bar = 10 µm.



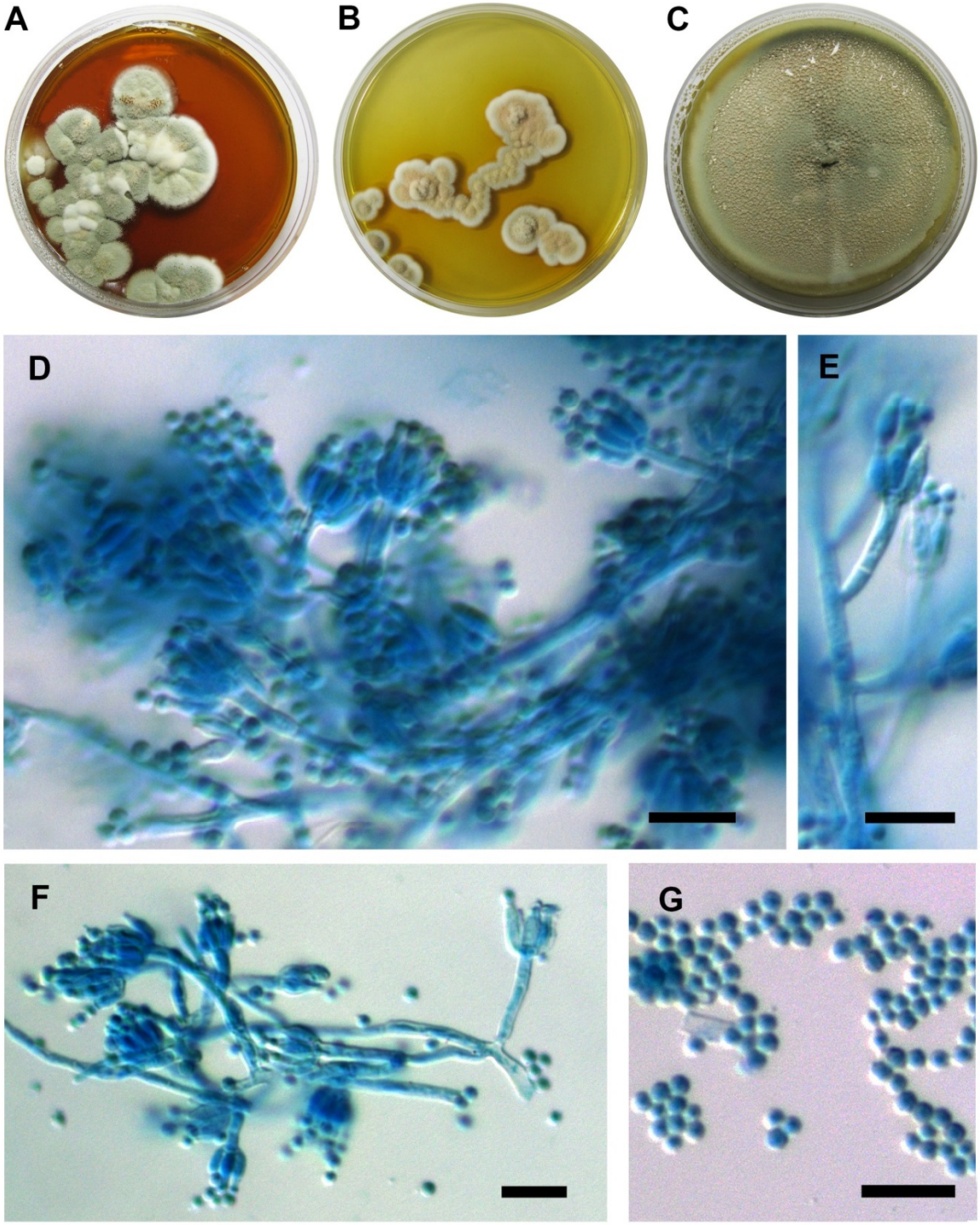
Slika 50. *Penicillium expansum* BEOFB11130m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat, terverticilatni konidiofori; H) konidije. Bar = 10 µm.



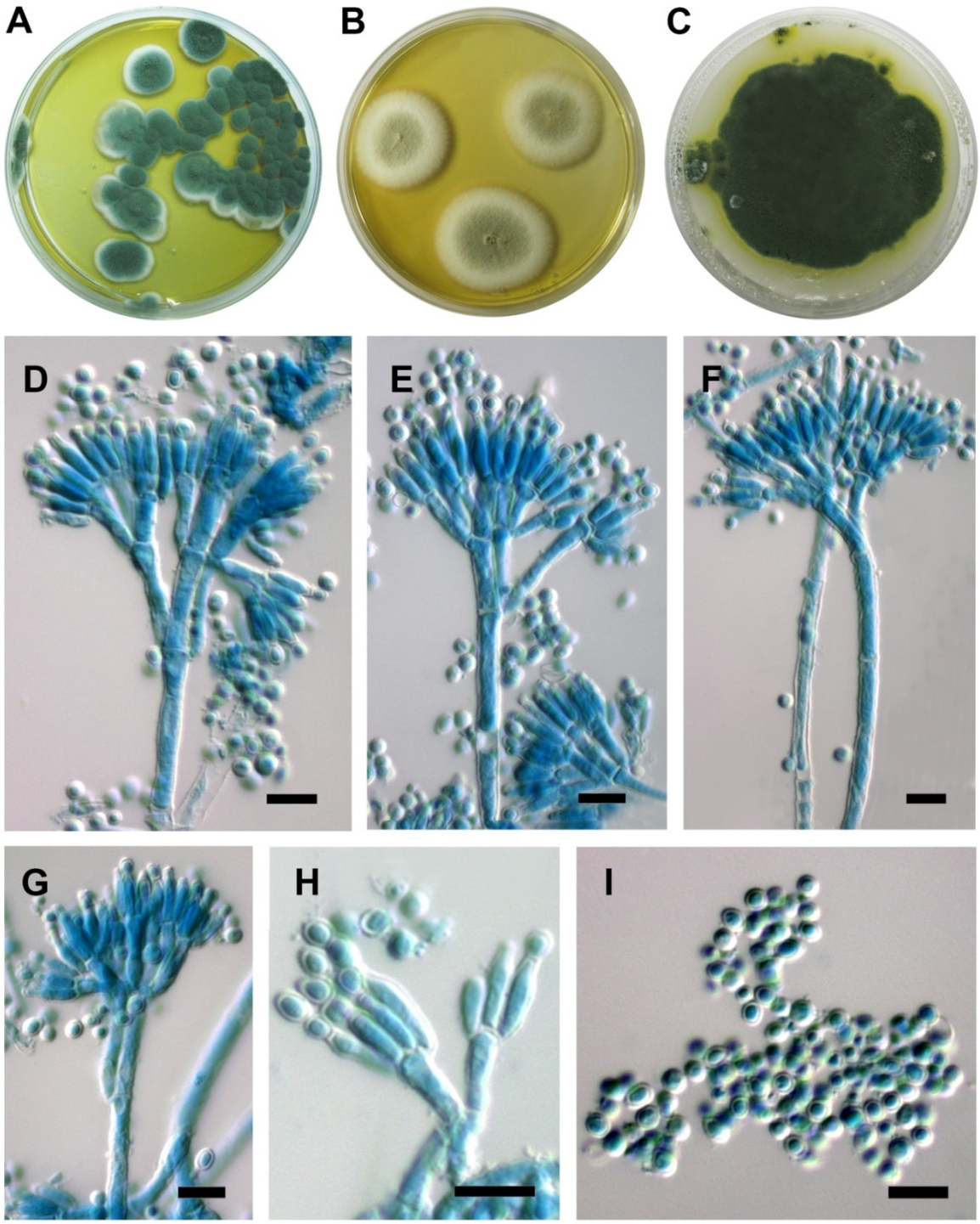
Slika 51. *Penicillium glabrum* BEOFB11100m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–F) konidiogeni aparat, monoverticilatni konidiofori; G) konidije. Bar = 10 µm.



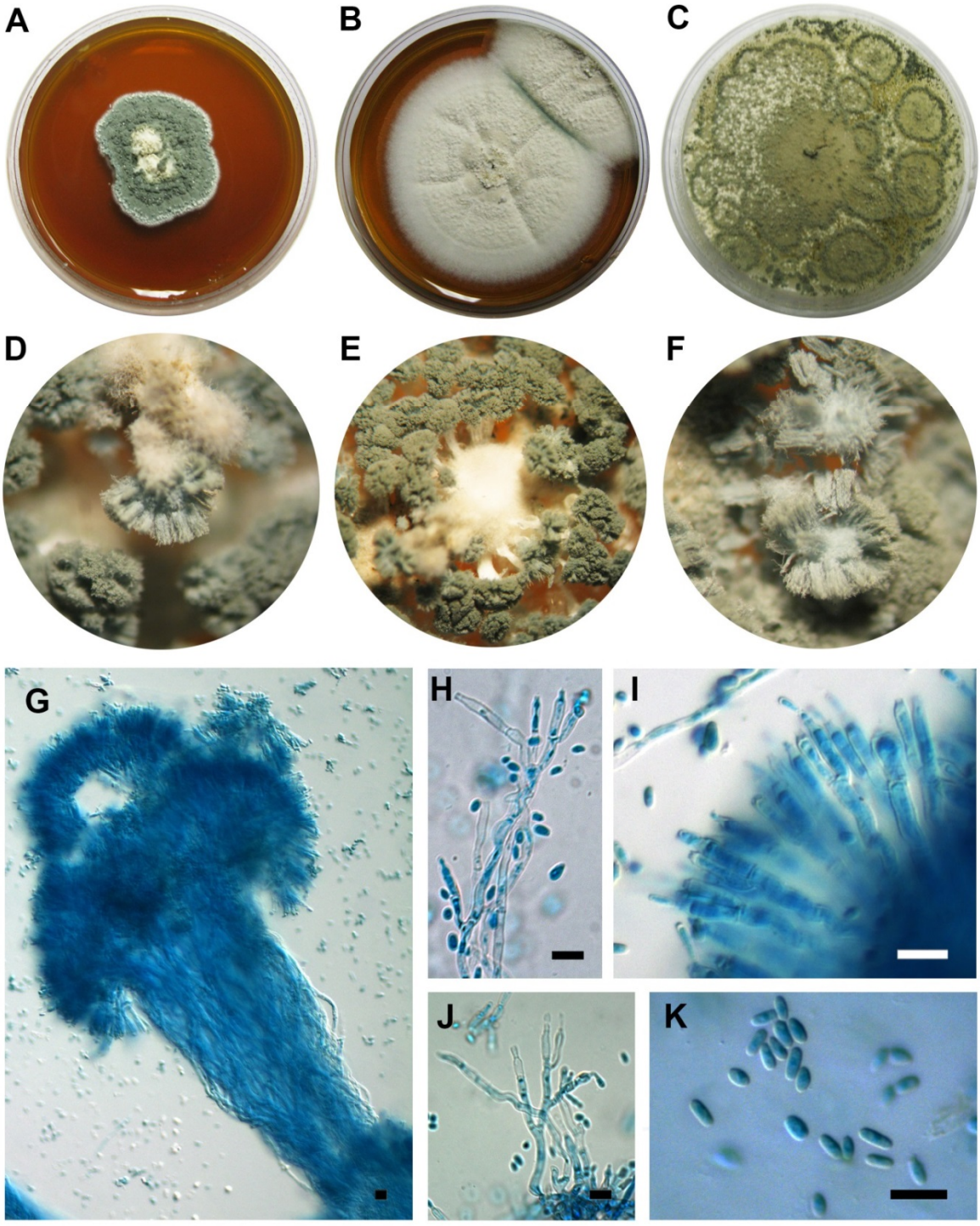
Slika 52. *Penicillium rubens* BEOFB11121m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat i konidije, mono- i biverticilatni konidiofori. Bar = 10 µm.



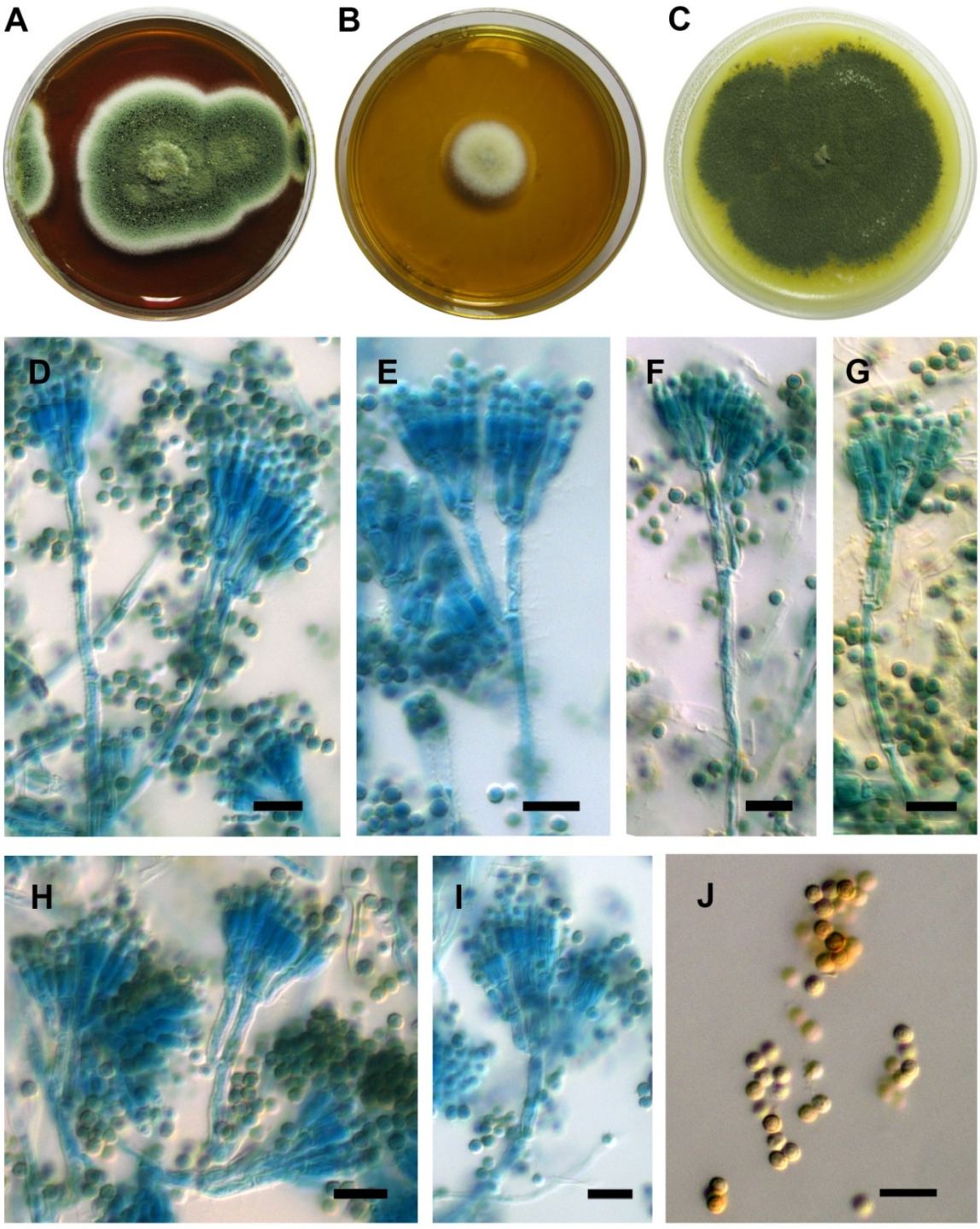
Slika 53. *Penicillium sanguifluum* BEOFB11170m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) konidiogeni aparat, monoverticilatni konidiofori; G) konidije. Bar = 10 µm.



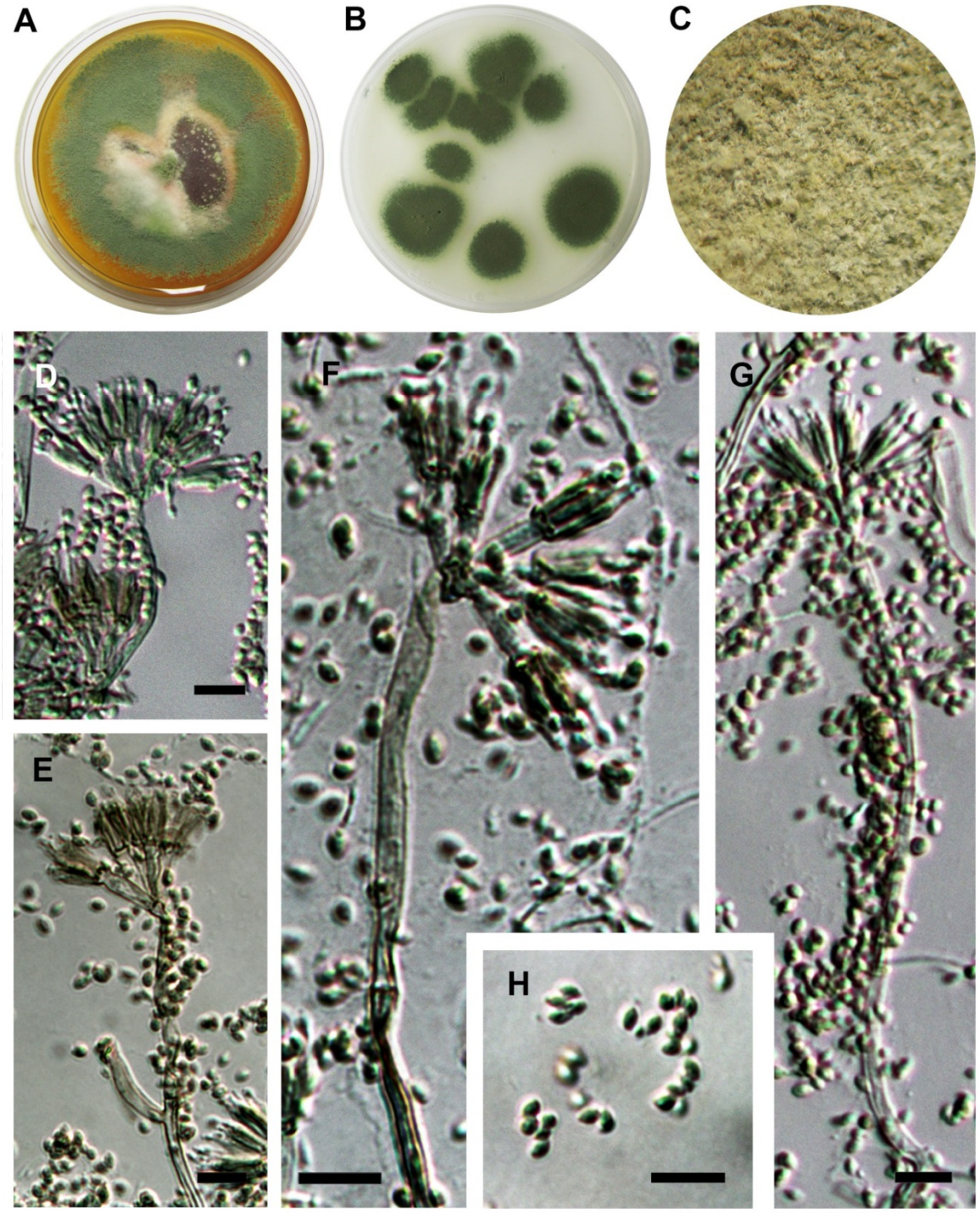
Slika 54. *Penicillium solitum* BEOFB1190m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–H) konidiogeni aparat, terverticilatni konidiofori; I) konidije. Bar = 10 µm.



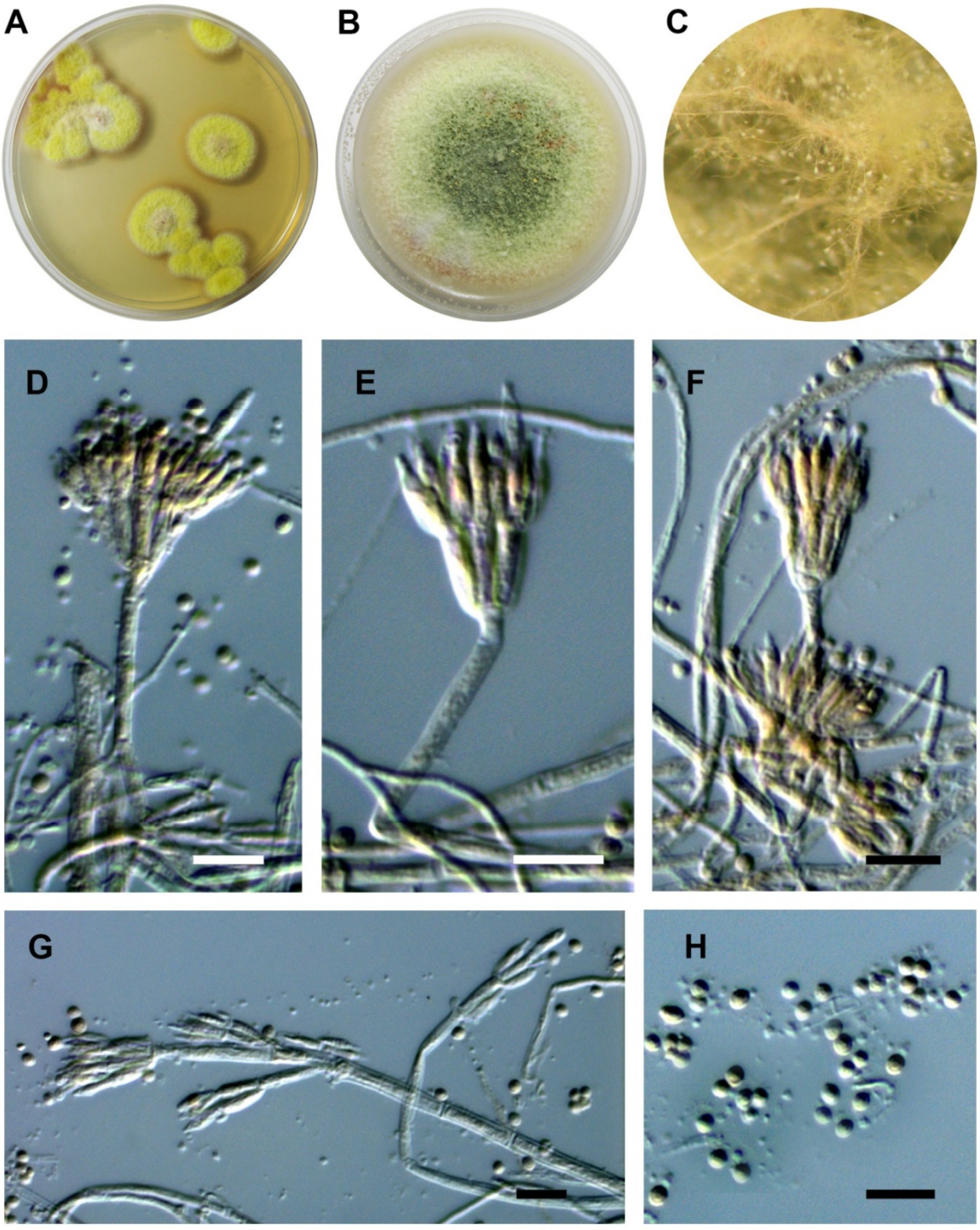
Slika 55. *Penicillium ulaiense* BEOFB11140m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–F) koremije *in situ*; G) koremija; H–J) konidiogeni aparat, asimetrični biverticilatni konidiofori; K) konidije. Bar = 10 µm.



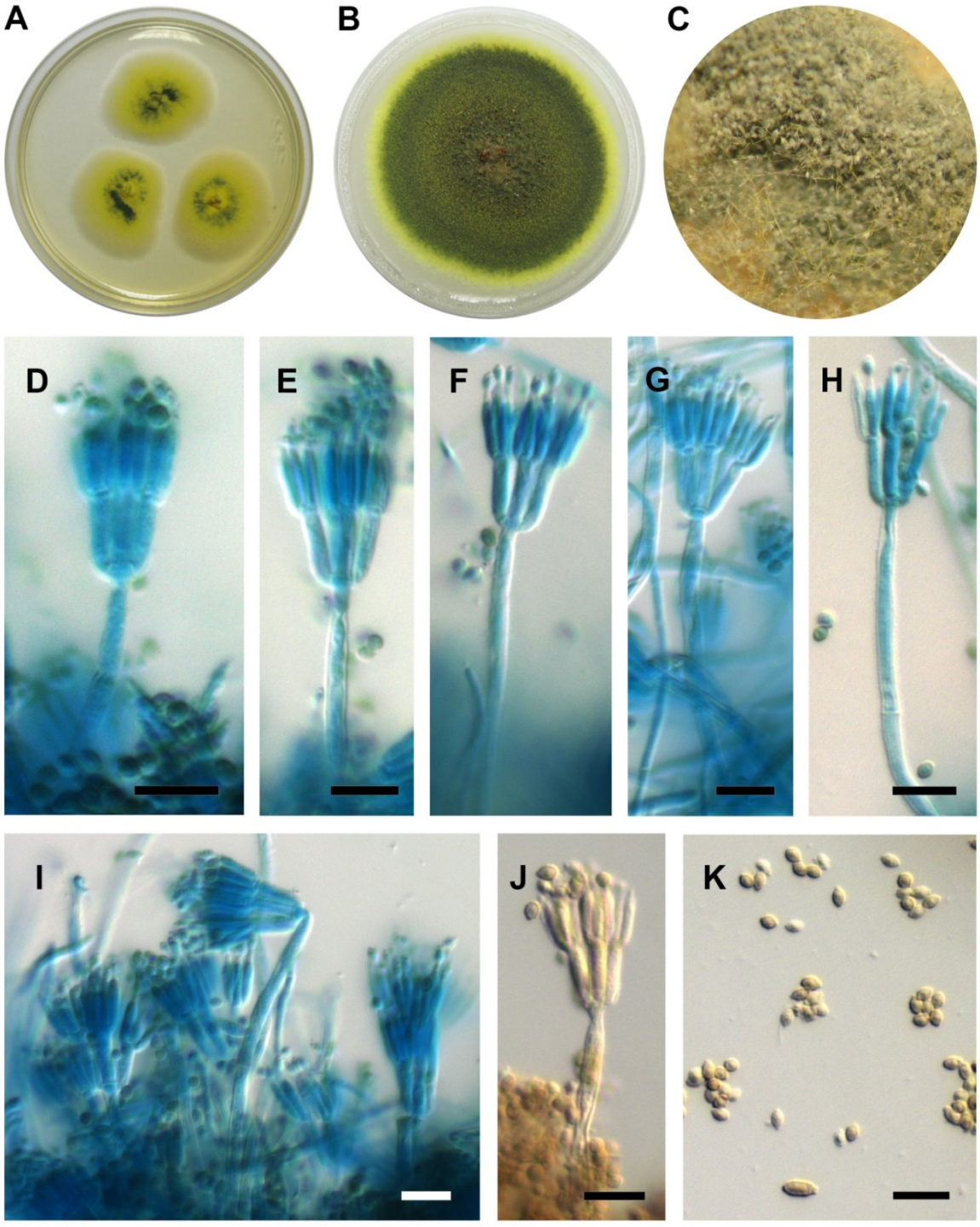
Slika 56. *Penicillium viridicatum* BEOFB11200m: A–C) izgled kolonije, 7. dan, MEA, M40Y i OA; D–I) konidiogeni aparat, terverticilatni konidiofori; J) konidije. Bar = 10 µm.



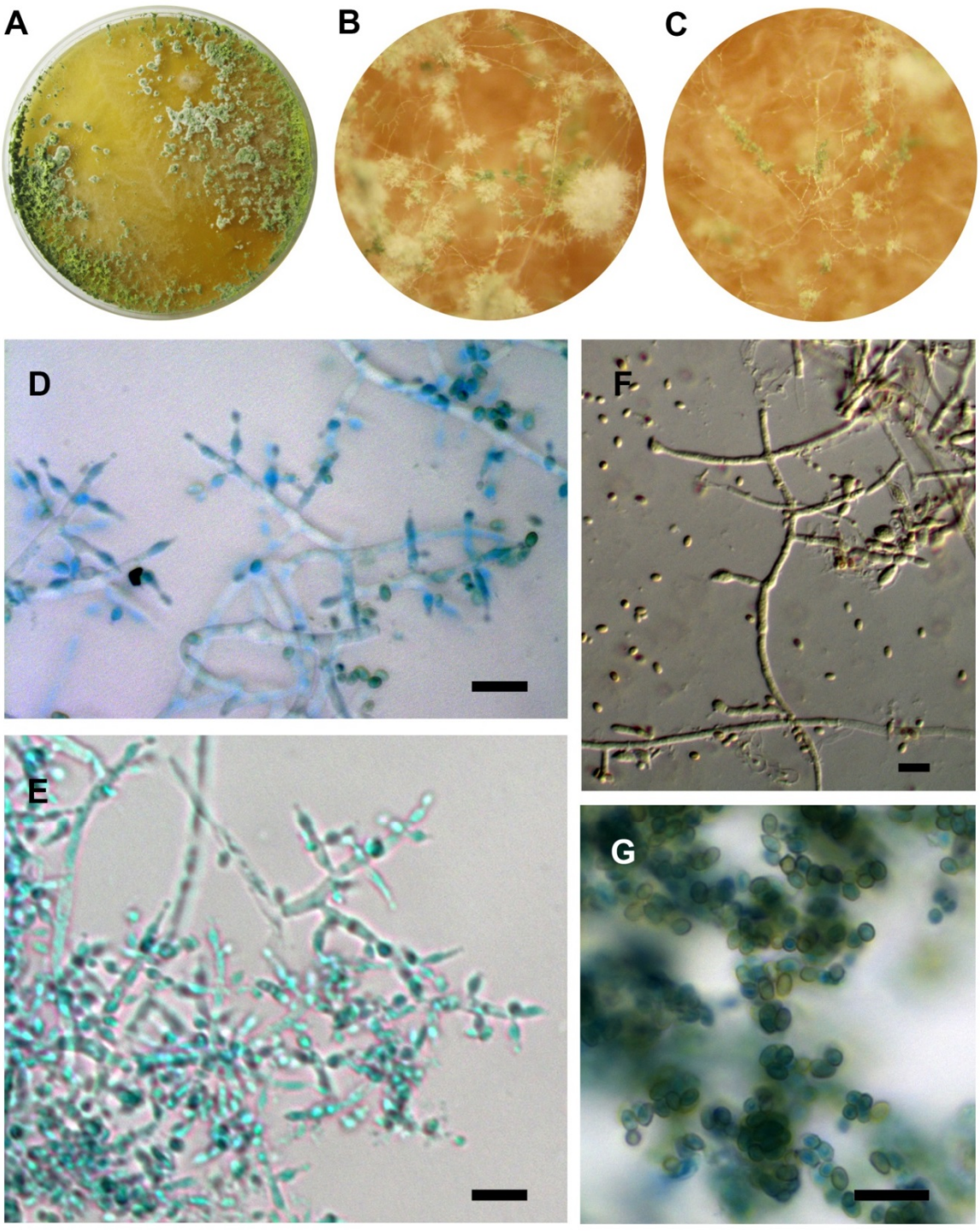
Slika 57. *Talaromyces amestolkiae* BEOFB2610m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat, biverticilatni konidiofori; H) konidije. Bar = 10 µm.



Slika 58. *Talaromyces sayulitensis* BEOFB2600m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–G) konidiogeni aparat, biverticilatni konidiofori; H) konidije. Bar = 10 µm.

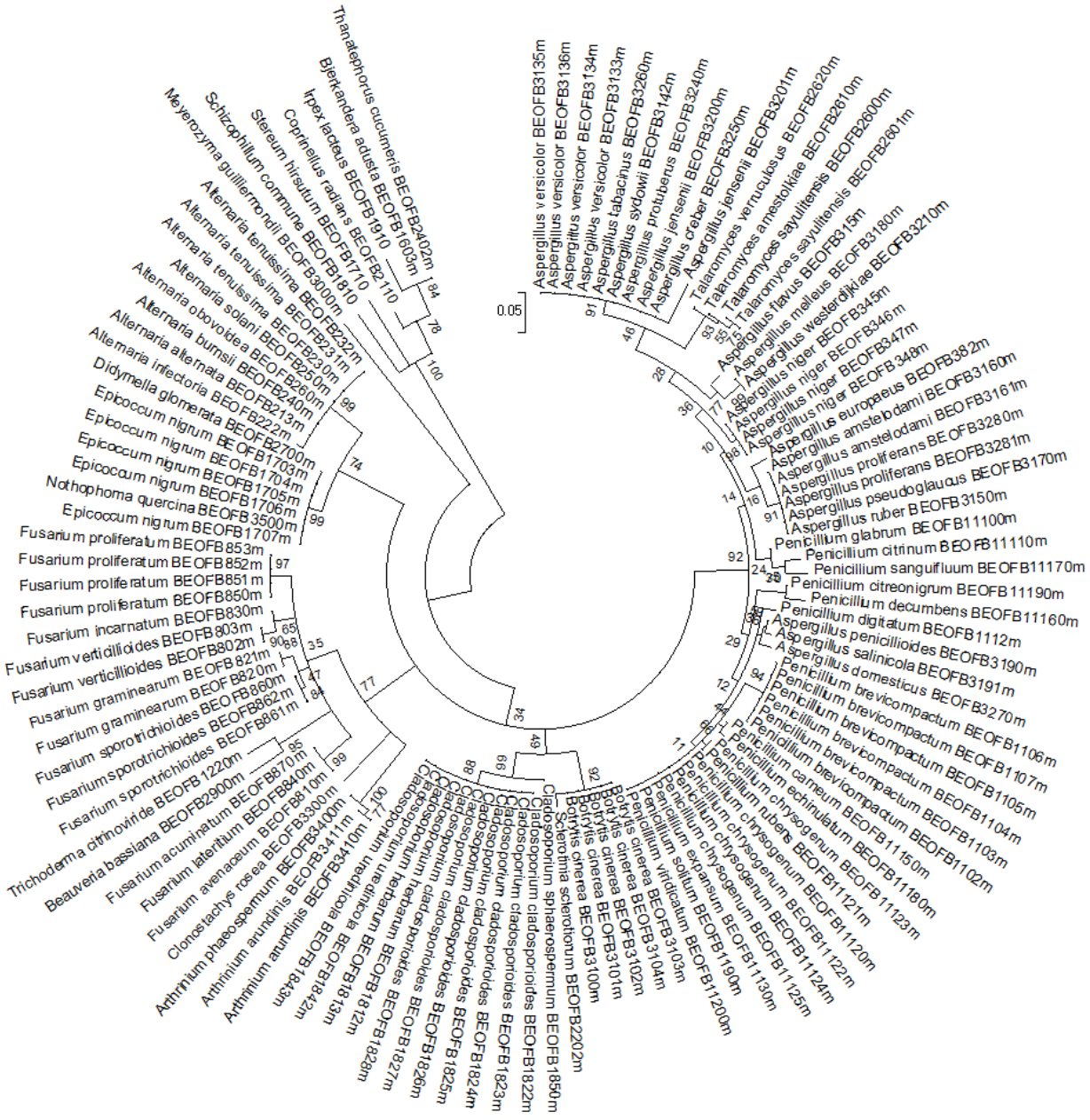


Slika 59. *Talaromyces verruculosus* BEOFB2620m: A i B) izgled kolonije, 7. dan, MEA i OA; C) konidiogeni aparati *in situ*; D–J) konidiogeni aparat, biverticilatni konidiofori; K) konidije. Bar = 10 µm.



Slika 60. *Trichoderma citrinoviride* BEOFB1220m: A) izgled kolonije, 7. dan, MEA; B i C) konidiogeni aparati *in situ*; D–F) konidiogeni aparat; G) konidije. Bar = 10 µm.

10 Prilog 2



Slika 1. Dendrogram filogenetskih odnosa aerogenih izolata dobijen na osnovu sekvenci *ITS* regiona

Biografija

Željko D. Savković je rođen 15.10.1989. u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju je završio u Raški. Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, upisao je 2008. godine a osnovne akademske studije je završio 2012. godine sa prosčnom ocenom 9,57. Iste godine upisuje master akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Biologija gljiva. Master rad pod nazivom: „Ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata *Lamium album* L. i *L. purpureum* L., etarskog ulja *Origanum vulgare* L. i komercijalnog biocida Sanosil S003" odbranio je 2013. godine sa ocenom 10. Iste godine upisuje doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Eksperimentalna mikologija.

Od 2008. do 2012. godine bio je stipendista opštine Raška a tokom 2012/2013 stipendista fonda za mlade talente Republike Srbije „Dositeja". U periodu od 2014. do 2018. godine bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije angažovan na projektu „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida" (OI173032) sa 0 istraživačkih meseci. U zvanje istraživač pripravnik izabran je 2015. godine a od 2018. godine je zaposlen na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Iste godine je izabran u zvanje istraživač saradnik.

Autor je 10 naučnih radova i 12 saopštenja na naučnim skupovima od međunarodnog značaja (Hrvatska, Makedonija i Srbija).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: **Жељко Д. Савковић**

Број индекса: **Б3022/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Диверзитет и сезонска дистрибуција микромицета у ваздуху просторија за конзервацију објеката културне баштине„

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2019.

_____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Жељко Д. Савковић**

Број индекса: **Б3022/2013**

Студијски програм: **Биологија (Експериментална микологија)**

Наслов рада: „**Диверзитет и сезонска дистрибуција микромицета у ваздуху просторија за конзервацију објеката културне баштине”**

Ментори: **др Милица Љаљевић Грбић, ванредни професор**

др Јелена Вукојевић, редовни професор

Потписани **Жељко Д. Савковић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2019.

_____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Диверзитет и сезонска дистрибуција микромицета у ваздуху просторија за конзервацију објеката културне баштине“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26.08.2019.

_____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.