

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Miloš Č. Stupar

**Diverzitet mikromiceta na objektima
kulture baštine i testiranje fungicida
primenljivih u konzervaciji**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

University of Belgrade
Faculty of Biology

Miloš Č. Stupar

**Micromycetes diversity on cultural
heritage objects and testing the
fungicides applicable in conservation**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

dr Jelena Lević, naučni savetnik
Institut za kukuruz „Zemun Polje“

dr Gordana Subakov Simić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ana Džamić, docent
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju, Univerziteta u Beogradu, Biološkog fakulteta, Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“. Zahvaljujem se svim članovima ove i drugih institucija koji su mi pružili pomoć i podršku tokom izrade disertacije.

Srdačno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Milici Ljaljević Grbić, na pruženim mogućnostima za rad, nesebičnoj pomoći u interpretaciji rezultata i konsultacijama tokom izrade disertacije.

Posebno se zahvaljujem, prof. dr Jeleni Vukojević, prof. dr Gordani Subakov Simić, dr Ani Džamić i dr Jeleni Lević na korisnim savetima i predlozima tokom čitanja disertacije.

Zahvaljujem se Aleksi Jelikiću, hemičaru - savetniku, mr Draganu Stanojeviću, slikaru - restauratoru - savetniku, mr Biljani Šipetić, konzervatoru i Veselinu Ladiću, restauratoru - savetniku na korisnim sugestijama, pristupu predmetima kulturne baštine i pomoći tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se mr Mihailu Ristiću za ekstrakciju i hemijsku analizu etarskih ulja.

Hvala mojoj porodici, prijateljima i svima koji su bili uz mene tokom izrade ove disertacije.

Diverzitet mikromiceta na objektima kulturne baštine i testiranje fungicida primenljivih u konzervaciji

Rezime

Cilj istraživanja doktorske disertacije je bio proučavanje biodeterioracije objekata kulturne baštine u Srbiji. Na osnovu predloga stručnih timova u institucijama za zaštitu objekata kulturne baštine izvršen je odabir istraživanih objekata i predmeta. Spomenici kulture obuhvaćeni u istraživanju bili su: crkva Svete Trojice manastira Sopoćani i crkva Svete Bogorodice manastira Gradac kod Novog Pazara, crkva Svetog Nikole u Paležu, Ajfelova prevodnica kod Bečeja, spomenik Neznamom junaku na Avali, Branikov most u Beogradu i srednjovekovni kameni stećci sa lokaliteta Mramorje i Rastište kod Perućca. Opservacijom *in situ* opisani su simptomi biodeterioracije: pojava biopatine, izmenjena tekstura kamene površine, fenomen „biopitting“ i drugi. Sa mesta sa vidljivim simptomima biopatine izvršeno je uzorkovanje fragmenata biofilma adhezivnom trakom sa kamenog supstrata. Direktnim posmatranjem fototrofne komponente biofilma, svetlosnim mikroskopom, identifikovane su prisutne cijanobakterije i alge, uzročnici različite obojenosti supstrata. Crvena biopatina na fasadi crkve svete Bogorodice je posledica prisusutva kolonija *Gloeocapsa sanguinea* (C.Agardh) Kützing dok je *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) C.F. P. Martius izazvala pojavu narandžaste biopatine na istom objektu. Crna katranasta biopatina na Ajfelovoj prevodnici je posledica prisusutva kolonija *Nostoc* sp., dok je *Haematococcus pluvialis* Flotow uzročnik narandžaste bio-

patine na spomeniku Neznamom junaku. Cijanobakterija *Oscillatoria* sp. i zelena alga *Cylindrocistis brebissonii* (Ralfs) de Bary su uzročnici zelene biopatine na istom objektu. U okviru fototrofne komponente biofilma na površini kamenog supstrata 5 istraživanih spomenika kulturne baštine u Srbiji identifikovano je 17 taksona cijanobakterija i 13 taksona algi, što sugerira nizak diverzitet fototrofa. Najčešće identifikovana vrsta na kamenom supstratu objekata materijalne kulturne baštine je cijanobakterija *Gloeocapsa violacea* (Corda) Rabenhorst a najčešće identifikovana alga je *Desmococcus olivaceus* (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon. Mikromicete prisutne na površini spomenika kulture i umetničkih predmeta uzorkovane su metodom sterilnog brisa, izolovane su monosporične kulture i identifikovane do nivoa roda ili vrste. U okviru fungalne komponente biofilma na površini kulturno-istorijskih spomenika u Srbiji identifikovano je 28 taksona. Zastupljenost identifikovanih mikromiceta je različita na ispitivanim objektima. *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries i vrste rodova *Alternaria* i *Fusarium* bile su prisutne na svim ispitivanim objektima. *Epicoccum purpurascens* Ehrenb je izolovan, sa visokom učestalošću, na četiri objekta. Najveći broj vrsta mikromiceta (13) zabeležen je na kamenu peščaru Ajfelove prevodnice. Mikološka analiza zidnih slika u srpskim sakralnim objektima pokazala je njihovu kolonizaciju vrstama rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Emericella*, *Nigrospora* i *Penicillium*. Izolacija i identifikacija mikromiceta sa umetničkih predmeta sačinjenih od različitih tipova materijala, pokazala je različit afinitet mikromiceta da kolonizuju ove supstrate. Analizirani su umetnički predmeti iz zbirke Muzeja istorije Jugoslavije, Muzeja grada Beograda, Galerije Slika „Sava Šumanović“ i zbirke Muzeja savremene umetnosti. Najveći diverzitet mikromiceta zabeležen je na umetničkim predmetima od drveta, na kome su zabeležene vrste rodova *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma* i *Ulocladium*. Umetničke slike su do sada retko proučavane sa stanovišta biodeterioracije i fungalne kontaminacije. Tokom ovog istraživanja pokazano je da i bojani slojevi slika i slikarska platna mogu biti kolonizovani različitim vrstama mi-

kromiceta. Sa slikarskih boja izolovane su vrste rodova: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Paecylomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* i *Ulocladium*, dok su sa slikarskih platna izolovane vrste rodova: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Ulocladium* i *Wardomyces*. Najmanji diverzitet zabeležen je na fotografskom papiru (vrste rodova *Fusarium*, *Humicola*, *Paecylomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma* i *Ulocladium*) i na tkaninama (*Aspergillus* i *Penicillium* vrste). Mikološka analiza vazduha zatvorenih prostorija različite namene u institucijama kulture, izvršena je metodom pasivne sedimentacije, a procena brojnosti gljiva je određena metodom po Omelijanskom. Kvantitativna analiza vazduha, poređenjem sa standardima Svetske zdravstvene organizacije, pokazala je umerenu kontaminaciju vazduha zatvorenih prostorija ispitivanih institucija kulture. Dominirale su vrste rodova *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* i *Aspergillus*. U cilju pronalaženja neagresivnih, efikasnih i ekološki bezbednih agenasa, koji se mogu koristiti u procesu prevencije i sanacije u okviru konzervatorskih postupaka, testirana je antifungalna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih biljka (*Rosmarinus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Origanum vulgare* L. i *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don i benzalkonijum hlorida, osnove nekih komercijalnih biocida. Test mikromicete su izolati sa objekata kulturne baštine *Aspergillus fumigatus* Fresen, *Aspergillus niger* Tiegh, *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab., *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram, *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill., *Epicoccum purpurascens* Ehrenb, *Penicillium* spp. i *Trichoderma viride* Pers. Hemijski sastav etarskih ulja određen je kombinacijom metoda gasne hromatografije i gasne hromatografije sa spektrometrijom masa. Sastav etarskog ulja *R. officinalis* pokazuje dominaciju komponente 1.8-cineol (44,28 %). Dominantne komponente etarskog ulja *L. angustifolia* su linalol (37,61%) i linalol acetat (34,86 %), dok je karvakrol (64,06%) dominirao u etarskom ulju *O. vulgare*. Najzastupljenija komponenta etarskog ulja *H. italicum* je γ -kurkumen (22,45 %). Kombinacijom različitih metoda za ispitivanje antifungalne aktivnosti (metoda mikroatmosfera, mikrodiluciona metoda, makrodiluciona metoda i metoda neutra-

lizacije biocida) pokazano je da svi testirani agensi poseduju antifungalnu aktivnost različitog stepena. Etarsko ulje *O. vulgare* i benzalkonijum hlorid pokazali su snažnu antifungalnu aktivnost, etarska ulja *R. officinalis* i *L. angustifolia* umerenu, dok je najslabije dejstvo zasbeleženo za *H. italicum*. Dobijeni rezultati sugerišu mogućnost implementacije etarskih ulja kao potencijalno novih fungicida u sistem konzervacije i sanacije objekata kulturne baštine.

Ključne reči: biodeterioracija, biofilm, mikromicete, kulturna baština, etarska ulja, antifungalna aktivnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

UDK broj: 581.135.5:[582.28/.282+582.282.12/582.282.123.4]+582.232+582.26/.27] : 725/728(497.11) (043.3)

Micromycetes diversity on cultural heritage objects and testing the fungicides applicable in conservation

Abstract

The aim of presented PhD thesis was research of biodeterioration of cultural heritage objects in Serbia. The objects and artefacts for this study were chosen according to the recommendations of the experts in the field of cultural heritage conservation. Cultural heritage monuments chosen for this study were The Church of The Holly Trinity of the Monastery Sopoćani (Novi Pazar), The Holly Virgin Church of the Monastery Gradac (Novi Pazar), Saint Nicholas church (Palež), Eiffel's Lock (Bečej), Monument of the Unknown Hero (Avala), bridge „Brankov most“ (Belgrade) and medieval tombstones on two localities Mramorje and Rastište (Perućac). During *in situ* observations of examined stone monuments clear signs of biodeterioration were observed, such as presence of biopatinas, changed texture of stone surface, biopitting and other. Biofilm fragments were sampled using adhesive tape from the stone surfaces with visible biopatinas and examined using light microscopy in order to identify cyanobacteria and algae as phototrophic components of biofilm. It was shown that causative agent of red biopatina on the facade of Holly virgin church was *Gloeocapsa sanguinea* (C.Agardh) Kützing colonies, while *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) C.F. P. caused the orange biopatina on the same monument. Black gelatinous patina on Eiffel's Lock was caused by *Nostoc* sp. colonies. *Haematococcus pluvialis* Flotow cau-

sed the orange biopatina on the Monument of the Unknown Hero. On the same monument the green biopatina caused by *Oscillatoria* sp. and *Cylindrocistis brebissonii* (Ralfs) de Bary was documented. The total of 17 taxa of cyanobacteria and 13 taxa of algae from all five examined monuments suggested low diversity of phototrophs. Cyanobacteria *Gloeocapsa violacea* (Corda) Rabenhorst and green algae *Desmococcus olivaceus* (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon were the phototrophs most frequently found during this research. Fungi were sampled using sterile cotton swabs from the surface of the monuments, and cultivated in laboratory in order to obtain pure cultures and identified to the species or genus level. The total of 28 fungal taxa were documented on the surface of the stone monuments. *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries along with species belonging to genera *Alternaria* and *Fusarium* were present on all examined surfaces. *Epicoccum purpurascens* Ehrenb was isolated with high frequency. The biggest fungal diversity was documented on sandstone substrata of the Eifel's Lock (13). Fungi isolated from wall paintings in Serbian monasteries and churches belonged to genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Emericella*, *Nigrospora* and *Penicillium*. Isolation and identification of fungi from museum artefacts suggested different susceptibility of different substrata to be colonized by fungi. Examined artefacts belonged to the collections of the Museum of Yugoslav History, Belgrade City Museum, Gallery „Sava Šumanović” and Museum of Contemporary Art. The wooden substrata were the most susceptible for fungal colonization and fungi belonging to genera *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma* and *Ulocladium* were isolated from wooden artefacts. Canvas paintings, which in general have seldomly been investigated for biodeterioration, can be also colonized by fungi. This research showed that fungi belonging to genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* and *Ulocladium* colonize pictorial surface, while *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Ulocla-*

dium and *Wardomyces* colonize the canvases. Photographic papers and textiles were less susceptible for fungal colonization. From the surfaces of examined photographs fungi *Fusarium* sp, *Humicola* sp, *Paecylomyces* sp, *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp. and *Ulocladium* sp. were isolated. Examined textiles were colonized by *Aspergillus* and *Penicillium* species. Sampling of air mycota in indoor environment in Serbian cultural institutions was carried out using passive sedimentation method and the fungal prevalence in the air was estimated using Omelyansky's method. The obtained results were compared with World Health Organization's recommendations and low risk for human health was proved. *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp, *Trichoderma* spp. and *Aspergillus* spp. were the most dominant air-borne fungi in examined indoor environments. In order to find efficacious and non aggressive and safe chemical agents which can be used in cultural heritage conservation, the antifungal activity of selected aromatic plants (*Rosmarinus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Origanum vulgare* L. and *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) along with biocide benzalconium chloride were tested against fungi isolated from cultural heritage objects (*Aspergillus fumigatus* Fresen, *Aspergillus niger* Tiegh, *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab., *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram, *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill., *Epicoccum purpurascens* Ehrenb, *Penicillium* spp. and *Trichoderma viride* Pers.). The chemical composition of essential oils were carried out using gas chromatography and mass chromatography mass spectrometry. The main component of *R. officinalis* essential oil was 1,8-cineole (44,28 %), the main components of *L. angustifolia* oil were linalool (37,61%) and linalool acetate (34,86 %). Carvacrol (64,06%) was the main component of *O. vulgare* oil, while γ -curcumene were the main component of *H. italicum* oil. Using different methods for testing antifungal activity (microatmosphere method, microdilution method, macrodilution method and biocide neutralization method) all tested agents showed different antifungal potential. *O. vulgare* oil and biocide were the strongest inhibitors fungi, while oils of *R. officinalis* and *L. angustifolia* showed moderate antifungal activity. *H. italicum* oil was the

weakest inhibitor of fungal growth. However, presented research could be the first step in implementation of essential oils as potentially novel fungicides in cultural heritage conservation.

Key words: Biodeterioration, biofilm, micromycetes, cultural heritage, essential oils, antifungal activity

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Algology and mycology

UDK number: 581.135.5:[582.28/.282+582.282.12/582.282.123.4]+582.232+582.26/.27] : 725/728(497.11) (043.3)

Skraćenice

AH – apsolutna vlažnost vazduha (eng. absolute humidity)

a_w – sadržaj aktivne vode u supstratu (eng. water activity)

BAC – benzalkonijum hlorid (eng. Benzalconium chloride)

CFU – broj kolonija po Petri kutiji (eng. colony forming units)

CZA – Czapek-ov agar (eng. Czapek' agar)

EPS – ekstracelularne polimerne substance (eng. extracellular polymere substances)

GC – gasna hromatografija (eng. gas chromatography)

GC/MC – gasna hromatografija sa spektrometrijom masa (eng. gas chromatography mass spectrometry).

IAQ – kvalitet vazduha zatvorenih prostora (eng. Indoor air quality)

ID₅₀ – inhibitorna doza 50% (eng. Inhibitory dose 50%)

ID₉₅ – inhibitorna doza 95% (eng. Inhibitory dose 95%)

MEA – Malt agar (eng. Malt Extract Agar)

MEB – Tečni malt (eng. Malt extract broth)

MCF – mikrokolonijalne gljive (eng. microcolonial fungi)

MFC – minimalna fungicidna koncentracija (eng. minimal fungicidal concentration)

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (eng. minimal inhibitory concentration)

RH – relativna vlažnost vazduha (eng. relative humidity)

RIF – gljive kolonizatori kamena (eng. rock inhabiting fungi)

SAB – subaerialni biofilm (eng. subaerial biofilms)

SBS – Sindrom bolesne zgrade (eng. Sick building syndrome)

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)

Sadržaj

1 Uvod	1
1.1 Fungi – Gljive	1
1.1.1 Diverzitet gljiva	1
1.1.2 Mikrobiota objekata i predmeta kulturne baštine	2
1.1.2.1 Taksonomska pripadnost gljiva izolovanih sa objekata i predmeta kulturne baštine	5
1.1.2.2 Izvor fungalne infekcije na objektima i predmetima kulturne baštine	5
1.1.2.3 Rast mikromiceta na objektima kulturne baštine	8
1.1.3 Gljive kao uzročnici biodeterioracije	10
1.1.3.1 Biodeterioracija kamenih spomenika i građevina	11
1.1.3.1.1 Gljive u sastavu subaerialnih biofilmova na kamenom supstratu	13
1.1.3.1.2 Mehanizmi fungalne biodeterioracije kamenog supstrata	16
1.1.3.1.3 Simptomi biodeterioracije na kamenim građevinama	19
1.1.3.2 Biodeterioracija umetničkih i zidnih slika	26
1.1.3.3 Biodeterioracija umetničkih predmeta od celuloznih vlakana	27
1.2 Prevencija i sanacija u sistemu konzervacije objekata i predmeta kulturne baštine	29
2 Cilj rada	33
3 Istraživani objekti i predmeti kulturne baštine	35
3.1 Kulturno-istorijski spomenici	35
3.1.1 Crkva Svete Trojice manastira Sopoćani kod Novog Pazara	35
3.1.2 Crkva Svete Bogorodice manastira Gradac kod Novog Pazara	36
3.1.3 Crkva Svetog Nikole u Paležu	37

3.1.4	Ajfelova prevodnica kod Bečeja	37
3.1.5	Spomenik Neznamom junaku na Avali	38
3.1.6	Brankov most u Beogradu	38
3.1.7	Srednjovekovni kameni stećci u Perućcu	39
3.2	Umetnički predmeti (artefakti) iz muzeja i galerija	40
3.2.1	Zbirka štafeta i poklona Josipa Broza Tita iz Muzeja istorije Jugoslavije.	40
3.2.2	Umetnički predmeti iz zbirki Muzeja grada Beograda	41
3.2.3	Zbirka slika iz Galerije slika „Sava Šumanović“ u Šidu	42
3.2.4	Zbirke Muzeja Savremene umetnosti u Beogradu	43

4 Materijal i metode 44

4.1	Materijal	44
4.1.1	Hranljive podloge	44
4.1.2	Etarska ulja	45
4.1.3	Sintetički biocid	46
4.1.4	Izolati	46
4.2.	Metode.	47
4.2.1	Uzorkovanje mikromiceta	47
4.2.2	Uzorkovanje cijanobakterija i algi	48
4.2.3	Identifikacija mikromiceta	48
4.2.4	Identifikacija cijanobakterija i algi	49
4.2.5	Analiza hemijskog sastava etarskih ulja	49
4.2.6	<i>In vitro</i> testovi za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja i biocida benzalkonijum hlorida.	50
4.2.7	Statistička obrada rezultata	53

5 Rezultati i diskusija 54

5.1	Biofilm na kamenom suspstratu kulturno-istorijskih spomenika u Srbiji	54
5.1.1	Analiza biofilma na fasadi Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac	54
5.1.2	Analiza biofilma sa Ajfelove prevodnice	59
5.1.3	Analiza biofilma sa Spomenika Neznamom junaku na Avali	63

5.1.4	Analiza biofilma sa stubova Brankovog mosta u Beogradu	67
5.1.5	Analiza biofilma sa srednjovekovnih kamenih stećaka na lokalitetima Mramorje i Rastište kod Bajine Bašte.	71
5.1.6	Mikromicete izolovane sa kamena kulturno-istorijskih spomenika	76
5.1.7	Cijanobakterije i alge detektovane na kamenom supstratu kulturno-istorijskih spomenika	78
5.2	Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha u zatvorenim prostorijama institucija kulture	87
5.2.1	Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha iz zbirke štafeta i poklona Josipa Broza Tita u Muzeju istorije Jugoslavije.	87
5.2.2	Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha Muzeja grada Beograda	90
5.2.3	Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha izložbenog prostora i depoa Galerije slika „Sava Šumanović“	97
5.2.4	Mikromecete izolovane sa zbirki i iz vazduha Muzeja savremene umetnosti u Beogradu	101
5.2.5	Pregled izolovanih mikromiceta iz muzejskih zbirki prema supstratima koje kolonizuju.	106
5.2.6	Pregled mikromiceta izolovanih iz vazduha zatvorenih prostorija ispitivanih institucija kulture	107
5.3	Mikromicete izolovane sa zidnih slika	115
5.3.1	Mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svetog Nikole u Paležu.	115
5.3.2	Mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac	116
5.3.3.	Mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svete Trojice manastira Sopoćani	118
5.4	Opis identifikovanih taksona mikromiceta na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima	121
5.4.1	Zygomycotina	123
5.4.2	Ascomycotina	128
5.4.3	Deuteromycotina.	132

5.5 Antifungalna aktivnost etarskih ulja i biocida	160
5.5.1 Antifungalna aktivnost odabranih etarskih ulja	162
5.5.1.1 Antifungalna aktivnost etarskog ulja <i>Rosmarinus officinalis</i>	162
5.5.1.2 Antifungalna aktivnost etarskog ulja <i>Lavandula angustifolia</i>	167
5.5.1.3 Antifungalna aktivnost etarskog ulja <i>Origanum vulgare</i>	173
5.5.1.4 Antifungalna aktivnost etarskog ulja <i>Helichrysum italicum</i>	178
5.5.2 Antifungalna aktivnost biocida BAC	182
5.5.3 Uporedna analiza antifungalne aktivnosti etarskih ulja i biocida BAC	190
5.6 Opšta diskusija	198
6 Zaključci	201
7 Literatura	206

1 Uvod

1.1 Fungi – Gljive

1.1.1 Diverzitet gljiva

Prema Index of Fungi, do 1991. godine bilo je opisano 69 000 vrsta gljiva, a svake godine se opiše novih 1700 vrsta (Hawksworth, 1991). Pretpostavka je da na planeti Zemlji egzistira 1,5 miliona vrsta gljiva. Do ovog broja došlo se na osnovu odnosa broja vrsta viših biljaka i gljiva (1:6) utvrđenog na jednom ograničenom području. Potencijalni izvori novih vrsta gljiva za nauku, predstavljaju slabo istražena staništa i ekosistemi pre svega tropske kišne šume (Hawksworth, 2004). Intenzivna proučavanja mikrobiote tropskih kišnih šuma u oblasti Hong Konga doprinela su da se broj opisanih vrsta gljiva u tom regionu učetrostruči, a od toga 150 vrsta bilo je novo za nauku (Hyde, 2001). Istraživanjem različitih tipova zemljišta u Australiji otkriveno je 209 hipogeičnih vrsta gljiva, od čega je za nauku bilo čak 152 novootkrivene vrste (Claridge i dr., 2000). Nove vrste gljiva se često otkrivaju na ekstremnim staništima. Rubai i dr. (2005) su sa krečnjačkih stena u okolini Majorke izolovali 117 morfološki različitih izolata melanizovanih gljiva koje su predstavljene sa 39 različitih genotipova od kojih su samo 3 izolata uspešno identifikovana a za ostale se pretpostavlja da su nove vrste za nauku.

Broj neistraženih staništa na kojima egzistiraju retke i specijalizovane gljive je veliki. Gljive koje su zabeležene kao nove za nauku u periodu od 1981 do 1990 bile su asocirane sa 1982 roda različitih domaćina ili supstrata (Ljaljević Grbić, 2006).

Složen životni ciklus gljiva takođe otežava procenu njihove brojnosti. Posebnost taksonomije gljiva definisana je “Međunarodnim kodeksom botaničke nomenklature” usvojenim na XI međunarodnom botaničkom kongresu u Sijetlu 1969. godine. Na ovom kongresu je odlučeno da jedna vrsta može imati više autonomnih, fenotipskih, binarnih naziva, i predloženi su termini: holomorf, teleomorf i anamorf. Holomorf se odnosi na gljive koje imaju opisan kompletni životni ciklus, teleomorf karakteriše polni stadijum gljive, a anamorf bespolni. Uglavnom teleomorf i anamorf imaju različite latinske nazive. Jedan teleomorf može imati više anamorfa i obrnuto (Muntañola-Cvetković, 1987; Vukojević, 2000).

1.1.2 Mikrobiota objekata i predmeta kulturne baštine

Gljive su kosmopolitski ili ubikvitalni organizmi, sposobni da kolonizuju veliki broj različitih staništa i mikrostaništa. Izolovane su sa velikog broja čvrstih supstrata, kao što su drvo, kamen, plastika, kao i antropogenih veštačkih površina u urbanim sredinama (beton, crep, fasade, metalni delovi i sl). Veliki broj vrsta gljiva može se naći i na zidovima, tapetama, tkaninama, drvenom nameštaju, silikonskom materijalu, posebno u vlažnim uslovima. Imajući u vidu veliki potencijal gljiva da kolonizuju vrlo heterogene tipove supstrata, ne iznenađuje činjenica da su gljive izolovane sa objekata i predmeta koji pripadaju kulturnoj baštini. Kulturna baština podrazumeva dobra nasleđena od prethodnih generacija ili koja nastaju u sadašnjosti, a imaju specifičnu vrednost za ljude i treba da budu sačuvana za buduće generacije. U materijalnu kulturnu baštinu spadaju izuzetne građevine (sakralne ili svetovne), spomenici i materijalna umetnička dela (Jokilehto, 2005)

Kulturno istorijski spomenici, izgrađeni od različitih tipova građevinskih materijala, pre svega različitih tipova kamena i maltera, mogu biti kolonizovani gljivama. Takođe i predmeti i objekti, izgrađeni od različitih tipova organskih i neorganskih materijala, koji se nalaze u izložbenim prostorijama muzeja i depoima muzeja mogu biti kolonizovani mikromicetama. Poslednjih nekoliko decenija posebna pažnja u svetu pridaje se gljivama

koje su opisane kao uzročnici propadanja umetničkih predmeta i objekata kulturne baštine. Stoga, veliki izazov je za konzervatore i restauratore umetničkih objekata da se pronađu odgovarajuća sredstva i metode za zaštitu od destruktivnog dejstva gljiva. Prvi korak u uspešnoj sanaciji umetničkih predmeta i objekata kulturne baštine kolonizovanih gljivama predstavlja identifikacija uzročnika.

Zanimljivo je pomenuti da je devastacija materijala od kojih su bile izgrađene neka-
dašnje kuće, od strane različitih vrsta plesni prvi put pomenuta u Bibliji kao bela, crvena
ili zelena „gubavost“ na ciglama, opeci i drvnom materijalu (Stari Zavet, Treća Knjiga
Mojsijeva, poglavlje 14, stihovi 33-57):

14: 33 I reče Gospod Aronu i Mojsiju govoreći:

*14: 34 Kad dođete u zemju hanansku, koju ću vam ja dati da je vaša,
pa kad pustim gubu na koju kuću u zemlji koju ćete držati,*

*14: 35 Onda onaj čija je kuća neka dođe i javi svešteniku
govoreći: čini mi se da je guba na kući.*

*14: 36 A sveštenik neka zapovedi da se isprazni kuća pre
nego on dođe da vidi gubu, da se ne bi oskrnavilo šta je
u kući i potom neka sveštenik dođe da vidi kuću.*

*14: 37 Pa kad vidi bolest, ako bude bolest na zidovima kućnim
kao rupice zelenkaste ili crvenkaste i na oči niže od zida,*

*14: 38 Neka izađe sveštenik iz kuće one na vrata
kućna, i zatvori kuću za sedam dana.*

*14: 39 Pa opet neka dođe sveštenik u sedmi dan, pa ako vidi
sveštenik, da se bolest dalje razišla po zidovima kućnim,*

*14: 40 Zapovediće sveštenik da se da povade kamenje na
kome je bolest i da ga bace iza grada na mesto nečisto,*

*14: 41 A kuću zapovediće da ostružu iznutra svuda unaokolo, i
prah što sastružu da prospu iza grada na mesto nečisto,*

14: 42 I da uzmu drugo kamenje i da ugrade na mesto gde je bilo predašnje kamenje; tako i blato drugo uzevši da oblepe kuću.

14: 43 Ako se povrati bolest i opet izraste po kući, pošto se povadi kamenje i ostruže i nanovo oblepi,

14: 44 Tada došavši sveštenik ako vidi da se bolest razišla po kući, ljuta je guba na kući, nečista je.

14: 45 Neka se razruši ona kuća, kamenje i drva i sav lep od one kuće, i neke se iznese iza grada na mesto nečisto.

14: 46 A ko je ušao u kuću dok je ona zatvorena, da je nečist do večeri.

14: 47 I ko bi spavao u onoj kući, neka opera haljine svoje; tako i ko bi jeo u onoj kući neka opere haljine svoje.

14: 48 Ako li sveštenik došavši vidi da se bolest nije razišla po kući i pošto je kuća nanovo obnovljena, neka proglasi sveštenik da je čista, jer se izlečila bolest.

14: 49 I neka uzme da bi se kuća očistila dve ptice i drvo kedrovo i crvca isopa,

14: 50 I neka zakolje jednu pticu nad sudom zemljanim nad vodom živom.

14: 51 Pa neka uzme drvo kedrovo i isop i crvac i drugu pticu živu i neka zamoči u krv od zaklane ptice i u vodu živu i pokropi kuću sedam puta.

14: 52 I tako će očistiti kuću onu krvlju ptičijom i vodom živom i drvetom kedrovim i isopom i crvcem.

14: 53 Pa onda neka pusti pticu živu iza grada u polje; i očisti kuću, i biće čista.

14: 54 Ovo je zakon za svaku gubu i za ospu,

14: 55 Za gubu na haljini i na kući,

14: 56 I za otok i za krastu i za bubuljicu,

14: 57 Da se zna kad je ko nečist i kad je ko čist. To je zakon za gubu.

1.1.2.1 Taksonomska pripadnost gljiva izolovanih sa objekata i predmeta kulturne baštine

Gljive zabeležene na objektima kulturne baštine pripadaju podrazdelima Zygomycotina, Ascomycotina i Deuteromycotina. U okviru podrazdela Zygomycotina sa objekata kulturne baštine često su izolovani pripadnici reda Mucorales klase Zygomycetes. Ipak prema Sterflinger (2010) pripadnici Zygomycotina nisu „pravi kolonizatori” objekata kulturne baštine, već tranzijenti. Teleomorfna faza gljiva je retko nađena na umetničkim predmetima zbog čega su pripadnici podrazdela Ascomycotina retko opisani kao kolonizatori ovih predmeta. Ipak, na supstratima sa niskim sadržajem aktivne vode (a_w) (npr. istorijski dokumenti u arhivama, tekstil, koža) nalažene su kleistotecije pripadnika reda Eurotiales, a njihovi anamorfni stadijumi su često izolovani i pripadaju *Aspergillus glaucus* grupi (Florian, 2002). Isti autor je zabeležio peritecije vrsta rodova *Chaetomium* i *Neurospora* (red Sordariales) na umetničkim predmetima. Vrste roda *Chaetomium*, posebno vrsta *C. globosum* Künze, se često izoluju sa celuloznih supstrata (drvo, papir). Iako je opisano pet anamornih rodova za ovaj teleomorf, konidijalni stadijumi su do sada retko saopštavani na umetničkim predmetima (Florian, 2002). Na objektima kulturne baštine dominantnu grupu gljiva predstavljaju pripadnici podrazdela Deuteromycotina, i to klase Hyphomycetes. Pripadnici druge dve klase Coelomycetes i Blastomycetes, takođe, su identifikovani na objektima kulturne baštine ali u manjem obimu (Florian, 2002).

Predstavnici podrazdela Basidiomycotina su retko zabeleženi kao kolonizatori objekata kulturne baštine. Ipak, određeni umetnički predmeti od drveta ili drvene građe mogu biti kolonizovani vrstama rodova *Poria*, *Polyporus*, *Ganoderma*, *Coniophora* i *Serpula* iz reda Aphylophorales (Florian, 2002).

1.1.2.2 Izvor fungalne infekcije na objektima i predmetima kulturne baštine

Propagule gljiva dospevaju na površinu objekata i predmeta kulturne baštine uglavnom iz vazduha. Izuzetak predstavljaju umetnički predmeti koji su sakupljeni iz arheoloških iskopina i oni su uglavnom kontaminirani zemljišnim gljivama (Heaton i Cleal,

2000). Konidije, sporangiospore, askospore, bazidiospore, fragmenti hifa i konidiofora velikog broja vrsta gljiva nalaze se u vazduhu, i zajedno sa česticama polena čine najznačajniju bioaerosolnu komponentu vazduha. Aerobiologija je grana biologije koja se bavi proučavanjem bioaerosolnih komponenti vazduha (gljivične strukture, polen, bakterije, sitni insekti). U okviru nje je aeromikologija koja se bavi proučavanjem struktura gljiva u vazduhu (Urzi i dr., 2001). Gljivične strukture koje se nalaze u vazduhu označavaju se kao air-borne fungi ili airspora ali za ovaj termin ne postoji adekvatan prevod u srpskom jeziku. Strukture gljiva koje imaju sposobnost klijanja na odgovarajućem supstratu predstavljaju vijabilne propagule gljiva u vazduhu (Dix i Webster, 1995).

Od svih struktura gljiva u vazduhu najdominantnije su konidije predstavnika Deuteromycotina. Ove gljive se odlikuju jednostavnim životnim ciklusom, tokom koga se na miceliji formira konidiogeni aparat sa konidijama koje prolaze kroz četiri faze u razvoju: sazrevanje, dormancija, aktivacija i klijanje. Kod većine vrsta sazrevanje konidija se dešava dok su još uvek pričvršćene za konidiogenu ćeliju. Tokom procesa sazrevanja konidije postaju morfološki i fiziološki „spремne“ za klijanje. Zrele konidije se oslobađaju u vazdušni prostor i vrši se njihova disperzija. Kada padnu na pogodan supstrat konidije kličaju ako su ekološki faktori odgovarajući. Kod nekih vrsta gljiva procesu klijanja prethodi dormancija i aktivacija konidija. Dormanciju odlikuje niska metabolička aktivnost i osnovna funkcija ove faze je da se spreči klijanje konidija u nepovoljnim uslovima. Aktivacijom se prekida faza dormancije, konidija postaje spremna za germinaciju. Određeni fizički, ili hemijski faktori, kao i kombinacija ovih faktora mogu imati funkciju aktivatora. Tokom klijanja konidija usvaja vodu, bubri, na ćelijskom zidu se formira ruptura kroz koju izlazi kličajuća cevčica koja formira hife koje će obrazovati somatsko telo-miceliju. Na miceliji se obrazuje konidiogeni aparat a u ređim slučajevima, uglavnom u nepovoljnim uslovima, dolazi do polnog procesa i obrazovanja plodonosnih tela sa seksualnim sporama (Gottlieb, 1978).

Na disperziju konidija utiču mnoge njihove karakteristike: oblik, veličina, ornamentura ćelijskog zida, gustina, težina, pigmentacija i naelektrisanje. Na kolonizaciju odgovarajućih površina utiču morfologija konidija i uslovi sredine. Na kvalitativni i kvantitavni

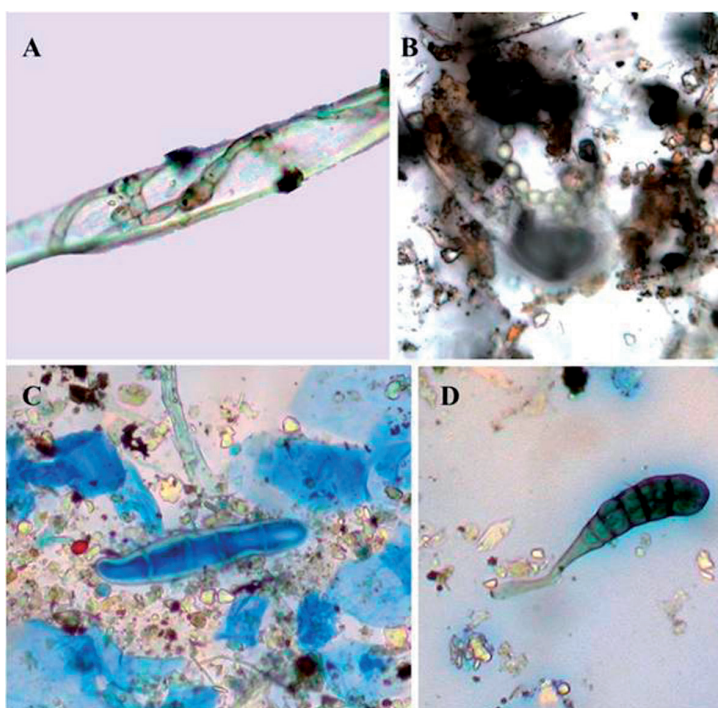
sastav bioaresolnih komponenti utiču dnevni i sezonski klimatski faktori (Gregory, 1973). Na svim geografskim širinama i u svim klimatskim zonama konidije vrsta roda *Cladosporium* su najzastupljenija bioaresolna komponenta, a po zastupljenosti odmah slede konidije vrsta roda *Alternaria*. Konidije rodova *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta su vrlo česte, s tim što su konidije *Penicillium* spp. učestalije u umerenim klimatskim regionima, a *Aspergillus* spp. u uslovima vlažne tropske klime (Florian, 2002). O zastupljenosti i brojnost konidija gljiva u vazduhu govori podatak da je u toplim letnjim danima u Nemačkoj izbrojano preko 20000 konidija po kubnom metru vazduha, a samo 100–2000 polenovih zrna (Gravesen, 1979).

Gljive koje su prisutne na kulturnim dobrima, takođe su prisutne i u vazduhu depoa i galerija. Međutim, sve gljive prisutne u vazduhu nisu sposobne da kolonizuju objekte materijalne kulturne baštine (Florian, 2002). U zatvorene prostore vijabilne propagule gljiva uglavnom dospevaju iz spoljašnjih izvora, kroz vrata, prozore, klima uređaje, ili ih posetioci i zaposleni unose na odeći (Camuffo i dr., 2001). Ponekad broj spora može biti i viši u zatvorenim prostorima nego u spoljašnjoj sredini kada je prisutan neki sekundarni izvor infekcije (vuna, pokvarena hrana, biljni materijal) (Lehtonen i Reponen, 2002). U slučaju poplava i pojave povišene vlage u prostorijama na zidovima se mogu stvoriti idealni uslovi za prenamnožavanje gljiva (Slika 1).



Slika 1. Vidljiv porast plesni na različitim supstratima u unutrašnjosti zatvorenih prostora usled povećanja vlažnosti

Ljaljević Grbić i dr. (2008) su saopštili da se u filterima klima uređaja nalazi masa konidija gljiva koje su sposobne da kličaju i formiraju miceliju. Veliki broj čestica prašine sa organskim materijama (polen viših biljaka, delovi egzoskleta insekata, fragmenti pera ptica) akumuliraju se u filterima klima uređaja gde predstavljaju nutrijente za gljive. Tokom toplih letnjih meseci, kad su optimalni uslovi temperature i vlažnosti, spore gljiva kličaju, formiraju miceliju i sporulišu (Slika 2A, B i D). Tokom letnjih meseci klima uređaji zajedno sa hladnim vazduhom u prostorije ubacuju i spore gljiva što ima za posledicu njihovo prenamnožavanje. Periode nepovoljnih uslova u filterima klima uređaja gljive preživljavaju obrazovanjem hlamidospora (Slika 2C).



Slika 2. Fungalne strukture prisutne u filterima klima uređaja (Ljaljević Grbić i dr, 2008): **A.** hifa sa hlamidosporom obrasta vlakno filtera; **B.** lance konidija vrste roda *Aspergillus*; **C.** hlamidospora; **D.** diktiospora *Alternaria* sp.

1.1.2.3 Rast mikromiceta na objektima kulturne baštine

Spore iz vazduha se talože na površinu kulturnih dobara. U zavisnosti od tipa supstrata, kao i od ekoloških faktora dolazi do germinacije, obrazovanja micelije, i sporulacije, nekada i do formiranja kolonija. Vidljiv porast gljiva na kulturnim dobrima se smatra simptomom oštećenja. Ekološki faktori: vlažnost, temperatura, kiseonik, ugljen dioksid,

pH, svetlost, nutrijenti i toksičnost supstrata utiču na germinaciju konidija i na rast hifa (Dix i Webster, 1995).

Za germinaciju spora i rast hifa najvažniji faktor je vlažnost vazduha, i vlažnost prisutna u supstratu. Vlažnost vazduha se može izraziti kao apsolutna (AH) ili relativna vlažnost (RH) koja je značajna za rast mikromiceta. U cilju sprečavanja rasta mikromiceta u muzejskim prostorima (depoi i izložbeni prostori) preporučeno je da se pri temperaturi od 20°C, RH održava na nivou nižem od 70%. Vlažnost supstrata izražava se pomoću sadržaja aktivne vode (water activity, a_w). Optimalna a_w za rast većine vrsta gljiva kreće se od 0.90 do 0.99, dok konidije mnogih vrsta ne mogu da klijaju ako je a_w ispod 0.98. Vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* spadaju u kserofilne gljive i njihove konidije mogu klijati i formirati miceliju na supstratima koji imaju a_w ispod 0.85 (Dix i Webster, 1995). Pojedine kserofilne vrste mogu klijati na supstratima na kojima je a_w 0.70 i one su često izolovane sa objekata materijalne kulturne baštine, posebno sa celuloznih materijala (papiri, stare knjige i dokumenti, fotografije deponovani u arhivima i bibliotekama).

Optimalna temperatura za klijanje spora i rast hifa kod većine vrsta gljiva je u opsegu od 20°C do 25°C. Brojne vrste tolerišu i niže (do 5°C) kao i više (do 40°C) temperature. Gljive kolonizuju supstrate koji se odlikuju blago kiselom reakcijom (pH 5,6–6,5), ali mnoge tolerišu širok dijapazon pH vrednosti (pH 2,0–9,0) (Dix i Webster, 1995). Imajući u vidu veliku toleranciju gljiva prema ekstremnim vrednostima temperature i koncentracije vodoničnih jona, ovi faktori nemaju limitirajući efekat prema gljivama koje kolonizuju predmete i objekte kulturne baštine. Glavni limitirajući ekološki faktor, za vrste koje kolonizuju kamene spomenike u spoljašnjoj sredini, predstavljaju visoke vrednosti UV zračenja. Da bi uspešno preživele nepovoljne ekološke uslove gljive su tokom procesa evolucije razvile određene adaptacije. Polimorfizam, posebno obrazovanje različitih tipova spora, predstavlja odličnu životnu strategiju za preživljavanje i naseljavanje različitih tipova staništa. Preživljavanje nepovoljnih uslova omogućeno je sposobnošću gljiva da brzo transportuju nutrijente kroz micelijalu (Gadd, 2007). Od ekstremnih mikroklimatskih

uslova na kamenim objektima (radijacija, salinitet, pH, vodni potencijal i dr.), gljive se štite produkcijom antioksidativnih supstanci – npr. mikosporina i melanina u ćelijskim zidovima, kao i spajanjem kolonija uz pomoć mucilogenih supstanci (Gorbushina i dr., 2003a). Kao još jedan vid adaptacije mnoge vrste gljiva u nepovoljnim uslovima formiraju modifikacije micelije – hlamidospore i sklerocije.

1.1.3 Gljive kao uzročnici biodeterioracije

Supstrat na i u kome se razvijaju gljive tokom vremena podložan je promenama usled njihovog rasta i metaboličke aktivnosti što dovodi do procesa biodeterioracije. Hueck (1965, 1968) je definisao biodeterioraciju **kao svaku neželjenu promenu u osobinama materijala nastalu usled aktivnosti živih organizama.**

Prema kasnijim istraživanjima Morton i Surman (1994) su biodeterioraciju podelili na: **mehaničku, hemijsku asimilacionu i hemijsku disimilacionu.**

Mehanička biodeterioracija predstavlja svaku promenu u osobinama i kvalitetu materijala usled direktne aktivnosti organizama (pokret, rasteenje). Gljive koje kolonizuju kameni supstrat oštećuju ga apikalnim rastom hifa koje imaju sposobnost penetracije kroz supstrat (Kumar i Kumar, 1999; Sterflinger, 2000). Proces penetracije je olakšan visokim vrednostima turgorovog pritiska u hifama (Money, 1999).

Hemijska asimilaciona biodeterioracija se ogleda u aktivnosti odgovarajućih enzima koji razlažu supstrat do gradivnih komponenti, koje gljiva usvaja u procesu ishrane (Erickson i dr., 1990). Karakteristična je za celulolitičke i ligninolitičke gljive, izazivače bele, mrke i meke truleži na drvnim objektima i drugim celuloznim supstratima. Vrste rodova *Chaetomium* i *Trichoderma*, koje proizvode celulolitičke enzime, često su kolonizatori umetničkih predmeta izgrađenih od celuloznih materijala (papir, drveni umetnički predmeti). Gljive koje proizvode proteolitičke enzime mogu da razlažu keratinozni supstrat i one su česte na umetničkim predmetima od kože (Nigam i dr., 1994). Za ovaj tip biodeterioracije u literaturi se često koristi sinonim **biodegradacija**.

Hemijska disimilaciona biodeterioracija predstavlja promenu materijala kao posledicu produkcije metabolita, najčešće organskih kiselina i pigmenta, koji oštećuju materijal izazivajući koroziju ili pigmentaciju (Sayer i Gadd, 2001). Najčešće organske kiseline koje produkuju gljive su: limunska, oksalna, sukcinatna, glutaminska, fumarinska, jabučna i sirćetna (Hanson, 2008). Pigmenti gljiva su brojni i raznovrsni po hemijskom sastavu. Lokalizovani su u hifama, konidijama ili se mogu izlučiti u supstrat, i odgovorni su za proces pigmentacije ili dekolorizacije, dok obojene konidije prisutne u masi ne mogu da oboje površinu supstrata (Florian, 2002). Melanin nastaje oksidativnom polimerizacijom indolnih i fenolnih jedinjenja i karakterističan je za Dematiaceae, koje se odlikuju tamnim i debelim hifama (Butler i Day, 1998). Veliki broj pigmenata gljiva spadaju u kvinone i nastaju poliketidnim biosintetskim putem. U ovu grupu spada fumigatin koga sintetiše *Aspergillus fumigatus* Fresen, auroglaucin, flavoglaucin i rubraglaucin koje sintetiše više vrsta *A. glaucus* grupe (Hanson, 2008). Isti autor saopštava da pigmente iz grupe hidroksiantrakvinona sintetišu vrste rodova *Helminthosporium*, crveni pigment, aurofusarin, sintetiše *Fusarium graminearum* Schw., dok je bikhaverin, prvobitno izolovan iz *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. (anamorf: *F. moniliforme* J. Sheld). Pigmenti iz grupe karotenoida su retki u carstvu gljiva, ali je pokazano da sposobnost produkcije ovih pigmenata imaju vrste *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff i *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge (Hanson, 2008).

1.1.3.1 Biodeterioracija kamenih spomenika i građevina

Odavno je poznato da gljive mogu uspešno da kolonizuju kameni supstrat i da svojim rastom i metaboličkom aktivnošću izazovu biodeterioracione promene na njemu. Kamen se definiše kao prirodno formiran čvrst materijal koji se sastoji od jednog ili više minerala. Naučna disciplina koja se bavi proučavanjem gljiva na kamenom supstratu je geomikologija. Ona je deo geomikrobiologije čiji je predmet proučavanja uticaj mikroorganizama na geološke procese, uključujući promene i propadanje kamena i minerala, akumulaciju

metala i njihovu ulogu u kruženju nutrijenata, kao i uticaj kamena na proliferaciju mikrobnih zajednica na mineralnom supstratu. Uloga gljiva u biogehemijskom ciklusu kruženja ugljenika u prirodi je dobro proučena, dok se o njihovoj ulozi u geohemijskim procesima malo zna (Burford i dr., 2003).

Kolonizacija kamenog supstrata mikroorganizmima, kao i intenzitet kolonizacije, zavise od stepena bioreceptivnosti kamene površine (Prieto i Silva, 2005). Termin bioreceptivnost je u nauku uveo Guille (1995) definišući ga kao **spособnost materijala da bude kolonizovan od strane jedne ili više grupa mikroorganizama i ta kolonizacija ne mora da dovodi do procesa biodeterioracije**. Isti autor razlikuje tri osnovna tipa bioreceptivnosti. Primarna bioreceptivnost kamena odnosi se na sposobnost intaktnih kamenih površina, na kojima ne postoje znaci oštećenja, da budu kolonizovane različitim grupama organizama. Sekundarna bioreceptivnost predstavlja podložnost kamenih površina sa simptomima deterioracije (fizičkim, hemijskim i biološkim) da budu kolonizovani drugim organizmima. Tercijarna bioreceptivnost predstavlja potencijal kamenih površina objekata kulturne baštine, koje su očišćene tokom restauracije i konzervacije, da budu rekolonizovane različitim grupama organizama.

Ekološki faktori koji bitno utiču na kolonizaciju kamenog supstrata jesu vlažnost, dostupnost nutrijenata, temperatura, pH, kao i petrološki parametri (mineraloški sastav, tip cementa, poroznost i permeabilnost). Ovaj tip ekosistema podložan je stalnim dnevnim i sezonskim kolebanjima ekoloških faktora (May, 2003). Bioreceptivnost kamena zavisi od njegove strukture i hemijskog sastava, dok intenzitet kontaminacije gljivama zavisi od faktora sredine kao i od antropogene eutrofikacije atmosfere (Prieto i Silva, 2005). Prisustvo velike količine karbonatnih jedinjenja u kamenu (npr. krečnjački pešćar, beton, krečnjački malter) stvara puferski sistem i održava pH konstantnim i optimalnim za razvoj bakterija (Warscheid i dr., 1989). Tako, na građevinama izgrađenim od kamena na bazi silikata obično nema mikrobne kontaminacije. Međutim, posle restauracije ovih zgrada malterom i cementom može doći do kontaminacije mikroorganizama (Arino i Saiz-Jimenez, 1996). Krečnjak i mermer koji dozvoljavaju samo površinsku

mikrobnu kontaminaciju, su vrlo podložni kolonizaciji gljivama i lišajevima. Feldspati, gline i ferunginozni minerali vrlo su pogodni za razvoj mikroorganizama (Warscheid i Braams, 2000). Kameni građevinski materijali, takođe su bioreceptivni u zavisnosti od veličine pora i pH vrednosti. Istorijska cigla i malter kod kojih su dodavane organske supstance kao adhezivi (npr. piljevina, dlaka, lepak) imaju povećanu bioreceptivnost (Palmer i dr. 1991).

Gljive su sposobne da kolonizuju kamen, sve tipove stena koje se mogu naći u prirodi (magmatske, sedimentne i metamorfne), kao i kamen koji se koristi u građevinarstvu i od koga su izgrađeni i kulturno-istorijski spomenici na čijim površinama, sa drugim mikroorganizma, formiraju specifične mikrobijalne zajednice tzv. biofilm (Sterflinger, 2000).

1.1.3.1.1 Gljive u sastavu subaerialnih biofilмова na kamenom supstratu

Poznato je da mikroorganizmi u svojim prirodnim staništima retko opstaju kao pojedinačni organizmi već je tokom evolucije došlo do pozitivnog selektivnog pritiska koji je doveo do organizovanja grupa mikroorganizama u kompleksne zajednice, biofilm, u kojima su bolje zaštićeni od stresnih uslova spoljašnje sredine (Hall-Stoodley, i dr. 2004). Biofilm se može naći u vrlo različitim sredinama (voda, zemljište, čvrste površine, živi organizmi i sl.), formiran na površini objekata i predmeta koji su u direktnom kontaktu sa atmosferskim vazduhom naziva se subaerialni biofilm (SAB) (Gorbushina i Broughton, 2009). Bakterije, cijanobakterije, alge, protozoe i gljive (uključujući i kvasce i filamentozne forme) predstavljaju značajne komponente SAB. S obzirom da kameni supstrat u ekološkom smislu predstavlja ekstremno mikrostanište ono favorizuje udruživanje mikroorganizama u SAB. Mikroorganizmi u sastvu SAB na kamenom supstratu su adaptirani na uslove vodnog deficita (Morton i Surman, 1994) i suočavaju se sa izraženim temperaturnim kolebanjima, promenama u relativnoj vlažnosti vazduha i zračenju, što je posledica dnevno-sezonskih kolebanja klimatskih faktora u određenim regionu (Gorbushina i dr., 2003a). Čelije mikroorganizama u sastavu SAB pričvršćene su za površinu pomoću organskog matriksa koga čine ekstracelularne polimerne supstance (EPS) kao što

su polisaharidi, lipopolisaharisi, proteini, glikoproteini, lipidi, glikolipidi, masne kiseline i enzimi. Ove supstance su odgovorne za povezivanje ćelija mikroorganizama (kohezija) i za njihovo vezivanje za supstrat (adhezija) (Warscheid i Braams, 2000). SAB je teško analizirati konvencionalnim mikrobiološkim tehnikama. Za proučavanja i izolacije mikroorganizama, komponenata SAB, primenjuju se različite metode zavisno od grupa mikroorganizama. Sa trofičkog stanovišta alge i cijanobakterije se navode kao fotosintetička ili fotoautotrofna komponenta, dok se gljive i bakterije označavaju kao heterotrofna komponenta SAB. Gorbushina (2007) uvodi termin fungalna komponenta subaerialnog biofilma za gljive u sastavu SAB.

Harding i dr. (2009) smatraju, takođe, da filamentozne gljive u sastavu SAB imaju izmenjenu gensku ekspresiju koja dovodi do fenotipa sa drukčijom fiziologijom. Pre svega, filamentozne gljive u sastavu SAB imaju veći stepen rezistencije na antimikrobna jedinjenja i biocide, a odlikuju se i izmenjenom produkcijom ekstracelularnih enzima i sekundarnih metabolita.

Iako su hemolitotrofni mikroorganizmi često opisani kao činioci biofilma na kamenim površinama, novija istraživanja naglašavaju da su fotoautotrofi i hemoorganotrofi glavni kolonizatori kamena pri čemu fotoorganotrofi imaju ulogu u pionirskom naseljavanju (Chertov i dr., 2004). Fotoautotrofi, za čiji su razvoj najbitniji svetlost i vlažnost, grade vidljivi zaštitni biofilm obogaćen neorganskom i organskom biomasom na kamenoj površini (Darlington, 1981) čija je glavna uloga regulacija temperature i vlažnosti supstrata (Warscheid, 2000; Chertov i dr. 2004). Akumulacija fotosintetičke biomase omogućava stvaranje nutrijenata za heteroorganotrofe obzirom da fototrofi izlučuju ugljene hidrate, faktore rasta, antibiotike i dr. (Strzelcyk, 1981). Asocijacija koju formiraju fototrofi može da posluži kao bioindikator fizičko-hemijskih parametara okruženja (Caneva i dr., 1993).

Fototrofi nisu jedini izvori nutrijenata za heteroorganotrofe jer gljive mogu da usvajaju hranljive materije iz vazduha i kišnice (čestice prašine sa organskim materijama) što im olakšava kolonizaciju kamenih površina (Karavaiko, 1978). Ostali izvori nutrije-

nata mogu biti u samom kamenu, npr. diagenetičke rezidue u sedimentnim stenama mogu se smatrati pogodnim nutrijentom za razvoj mikroorganizama (Hunt, 1961; Nooner i dr., 1972). Atmosfersko zagađenje, takođe, predstavlja dobar izvor nutrijenata za gljive (Palmer i dr., 1991). Mnoga organska jedinjenja koja čine polutante dolaze od izduvnih gasova automobila sa dizel motorima ili iz procesa sagorevanja u industriji i domaćinstvima (Simoneit, 1984). Takođe, i šumski ekosistemi ispuštaju određenu količinu ugljovodonika u atmosferu (Lamb i dr., 1987). Uglavnom organske supstance koje se mogu naći na kamenim površinama spadaju u alifatične i aromatične ugljovodonike, mono i dikarboksilne kiseline s kratkim lancim i dugolančane masne kiseline i alkohole (Sáiz-Jiménez, 1993; Steiger i dr. 1993).

Mikroorganizmi u sastavu SAB predstavljaju pionire u naseljavanju kamenih površina, ovi organizmi prethode lišajevima, mahovinama i višim biljkama sposobnim da takođe kolonizuju kameni supstrat (Morton i Surman, 1994).

Fungalne komponente SAB na kamenom supstratu mogu se podeliti na: (i) **epilitne** – nalaze se isključivo na površini kamena; (ii) **hipolitne** – nalaze se ispod površine i najčešće su pričvršćene za šljunak; (iii) **endolitne** – naseljavaju pukotine i rasepe na kamenoj površini; (iv) **hazmolitne** – posebna grupa endolitnih gljiva koja se mogu uočiti i na površini kamena; (v) **kriptoendolitne** – nalaze se duboko u pukotinama i ne mogu se videti sa spoljne strane; (vi) **euendolitne** – imaju sposobnost penetracije u kameni supstrat (Burford i dr., 2003).

Gljive su široko rasprostranjeni kolonizatori kamena u svim geografskim i klimatskim zonama (Gadd, 2007). U uslovima umerene i vlažne klime u sastavu SAB dominiraju predstavnici klasa Hyphomycetes i Coelomycetes (Deuteromycotina) i to vrste rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium* i *Phoma* (Sterflinger, 2010). U sušnim regionima najčešći kolonizatori kamenih spomenika su crni kvasci i mikrokolonijalne gljive (MCF), vrste rodova *Hortaea*, *Sarcinomyces*, *Coniosporium*, *Capnobotryella*, *Exophiala* i *Trimmatostroma*, koje penetriraju u kamen i vrlo često grade zajednice sa lišajevima (Sterflinger, 2005).

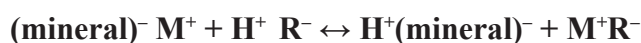
1.1.3.1.2 Mehanizmi fungalne biodeterioracije kamenog supstrata

Na trajnost kamena utiču fizički, hemijski i biološki faktori koji mogu delovati sinergistički ili antagonistički. U prirodi je jako teško razdvojiti efekte fizičkog i hemijskog oštećenja kamena od biološkog (Ehrlich, 1981). Deterioracija i degradacija kamena su bitni procesi kojim započinje formiranje zemljišta, što je značajno za evoluciju živog sveta. Međutim, na kamenu koji se koristi u građevinarstvu kao gradivni materijal, deterioracija je neželjena pojava koji stvara oštećenja na objektima. Ovaj proces počinje od trenutka kad kamen „napusti“ kamenolom, a na njega utiču vetar, sunčevo zračenje, temperatura, kiša, sneg i vlažnost. Navedeni faktori utiču na fizičke i hemijske procese propadanja kamena (eng. weathering), (Warscheid i Braams, 2000). Fizičko propadanje manifestuje se kao poremećaj stabilnosti kamenog matriksa, dok se hemijsko ogleda u koroziji minerala koji formiraju kamen u reakcijama oksidacije i hidratacije, kao i u rastvaranju karbonata i solubilizaciji nekih elemenata iz silikatnih minerala (Keller, 1957).

Gljive na kamenom supstratu vrše mehaničku i hemijsku disimilacionu biodeterioraciju. Mehanička biodeterioracija može biti direktna i indirektna (Gadd, 2007). Direktna nastaje penetracijom hifa i pravljenjem tunela u inače intaktan mineralni materijal (Kumar i Kumar, 1999; Sterflinger, 2000). Bitna karakteristika rasta hifa jeste „istraživanje prostora“ pri čemu je tigmotropizam dominantan faktor koji usmerava rast hifa prema pukotinama i porama u čvrstom materijalu nalazeći najslabija mesta za dalju penetraciju (Watts i dr., 1998). Veliku ulogu u prodiranju hifa u supstrat ima i hemotropizam važan za izbegavanje stresa, npr. toksičnih metala (Formina i dr. 2000). Intenzitet kolonizacije kamena od strane gljiva kao i prostorni raspored najviše zavise od hemijskog sastava i mikrotopografije. Invazivni rast micelije na kamenu potpomognut je visokim turgorovim pritiskom u hifama (Money, 1999). Prisustvo melanina takođe olakšava penetraciju i štiti hife od toksičnih metala. Indirektna biomehanička deterioracija potpomognuta je lučenjem mucilogenih EPS, koji mogu da sadrže kiseline i metal-helatne metabolite (Burford i dr., 2003). Razvoj i bujanje SAB utiče na povećanje pritiska na kamen, što dovodi do erozije ili abrazije. Utvrđeno je da su homogene karbonatne stene, koje se sastoje

od krečnjaka (CaCO_3) ili dolomita ($\text{MgCa}(\text{CO}_3)_2$), često kolonizovane kriptoenolitnim, hazmolitnim i euendolitnim gljivama koje aktivnom penetracijom grade sistem kanala i šupljina (Gadd, 2007).

Hemijska disimilaciona biodeterioracija kamenog supstrata posledica je produkcije i lučenja organskih kiselina koje gljive sintetišu kao primarne ili sekundarne metabolite od intermedijera ciklusa trikarbonskih kiselina (Krebsov ciklus). Prema Bertherlin (1983), organske kiseline su sposobne da vezuju katjone iz minerala i grade kompleksna jedinjenja (helate). „Izvlačenje“ katjona i njegova zamena protonom označava se kao acidoliza kamena, čiji je mehanizam:



Acidolizu mogu da vrše i neorganske kiseline kao što su karbonatna, nitritna, i sumporna kiseline, ali ovaj tip acidolize je karakterističan isključivo za hemolitotrofe, sumporne i azotne bakterije (Keller, 1957). Hemoorganotrofi, pre svega gljive, uglavnom luče oksalnu, limunsku, glukonsku, 2-oksoglukonsku, glioksaličnu, oksalacetalnu i fumaričnu kiselinu, kao i karbonatnu tokom procesa disanja. Ove kiseline lako mobilizuju katjone iz minerala (npr. Ca^{2+} , Al^{3+} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} i Mg^{2+}) sa kojima lako grade helate. Biogene organske kiseline mnogo su uspešnije u vezivanju katjona iz minerala nego neorganske i prouzrokuju veću štetu (Manley i Evans, 1986). Utvrđeno je da *Aspergillus niger* Tiegh. sintetiše 4-6 g l⁻¹ oksalne kiseline u prisustvu 3% glukoze (Henderson i Duff, 1963), a *Penicillium chrysogenum* Thom. 1-27 g l⁻¹ (Eckhardt, 1988). Velike količine limunske i glukonske kiseline sintetiše *P. frequentans* Westling (Gómez-Alacrón i dr., 1994). Eckhardt (1985) je saopštio da oksalna i limunska kiselina mogu da „izvlače“ nekoliko katjona iz biotita ($\text{K}(\text{Mg,Fe})_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{F,OH})_2$), dok Manley i Evans (1986) su pokazali da oksalna, limunska i neke aromatične kiseline mogu da razlažu feldspat (KAlSi_3O_8 - $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ - $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$). Prema Gómez-Alacrón i dr. (1994) vrste rodova *Penicillium* i *Fusarium* mogu da sintetišu oksalnu, fumaričnu i sukcinatnu kiselinu koje su biokorozivne. Ovi autori su saopštili da *P. corylophilum* Dierckx može da sintetiše oksalnu kiselinu ako se

u podlogu doda alga *Chlorolobion braunii* (Nägeli) Komárek (*Monoraphidium braunii* (Nägeli) Komárková-Legnerová) kao jedini izvor ugljenika i azota. Time je pokazano da u prirodnim uslovima gljive mogu da žive na račun hranljivih materija iz algi, posebno polisaharida i da uz pomoć njih sintetišu organske kiseline. Produkcija organskih kiselina je inter ili intra specijska i uglavnom je indukovana prisustvom toksičnih metala (Sayer i Gadd, 2001). Kiseline sa snažnom helatnom aktivnošću su oksalna i limunska i one mogu snažno da se vezuju za metale (Formina i dr., 2004). Tako, oksalna kiselina može da gradi oksalne komplekse sa gvožđem i aluminijumom (Gadd, 2007).

Epilitne i endolitne gljive izlučuju i mnoge druge metabolite koji mogu da vezuju metal, pre svega poliole. Uloga poliola je u osmotskoj zaštiti u uslovima vodnog stresa (osmoprotektori). Oni se odlikuju malom molekulskom masom i zajedno sa polisaharidima mogu da se vezuju za silikatne slojeve (liskuni) vodoničnim vezama (Gaylarde i Gaylarde, 2004).

Osim acidolizom, gljive mogu da „izvlače“ metale iz minerala i aktivnom bioapsorpcijom velikog broja metala, Fe, Ni, Zn, Ag, Cu, Cd i Pb (Gadd, 1990). Bioapsorpcija metala zavisi od pH supstrata., tako pri niskim pH vrednostima apsorpcija Cu, Zn i Cd je smanjena (Rome, de i Gadd, 1987). Prisustvo hitina i melanina u ćelijskom zidu gljiva takođe utiče na apsorpciju metala (Manoli i dr., 1997). Metali se unose u hife najčešće aktivnim transportom (H^+ ATP-aze) ili se vezuju za specifičnu grupu jedinjenja, siderofore (Callot i dr., 1987).

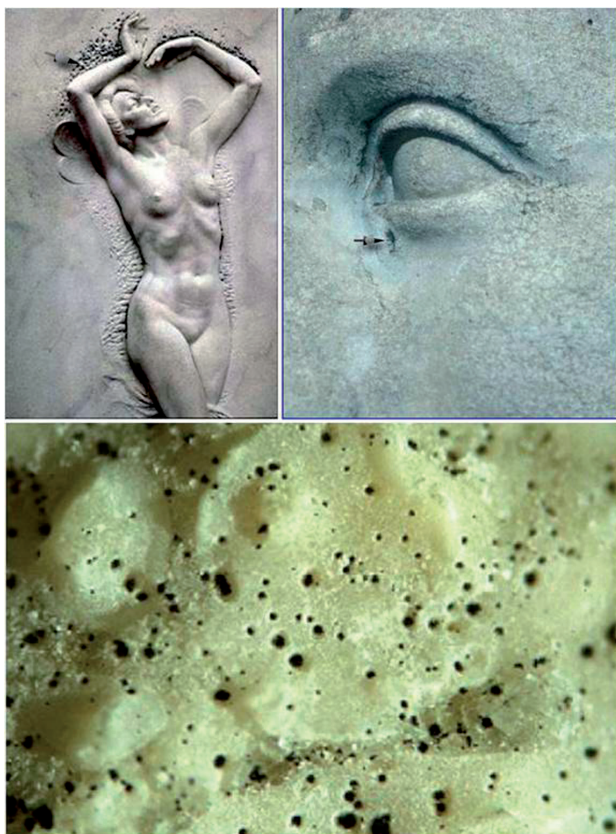
Gljive imaju sposobnost da vrše oksidaciju minerala koji ulaze u sastav kamenog supstrata procesom biooksidacije ili biokorozije. Poznato je da su Fe i Mn esencijalni elementi mikroorganizama koji naseljavaju kameni supstrat. Mnoge gljive izolovane s kamenih površina imaju sposobnost oksidacije oba elementa i to direktnim (enzimskim) i indirektnim putem, mada je enzimska oksidacija dominantna (Torre, de la i Gómez-Alarcón, 1994). Vrste roda *Lichenothelia* mogu da oksidiju Mn i Fe iz minerala siderita ($FeCO_3$) i rodohrozita ($MnCO_3$) i da na površinami nagrade i nekoliko milimetara debeo

sloj patine (Grote i Krumbein, 1992). Intenzitet biokorozije zavisi od petroloških, morfoloških i fizičko-hemijskih osobina kamena (Warscheid i Braams, 2000).

1.1.3.1.3 Simptomi biodeterioracije na kamenim građevinama

Dominantne komponente SAB koji se formira na zgradama i spomenicima su cijanobakterije, mikroalge (najčešće iz razdela Bacilariophyta i Chlorophyta) i gljive. Svojom biološkom aktivnošću ovi mikroorganizmi vrše biodeterioraciju što za posledicu ima zapušten i neprivlačan izgled tih površina, kao i smanjenje estetske vrednosti pogotovo u slučaju objekata od istorijskog i kulturnog značaja.

Na kulturno-istorijskim spomenicima od kamena opisani su različiti simptomi kao posledica procesa biodeterioracije, od kojih su najznačajniji fenomen „biopitting“ i pojava pinte i patine. Fenomen „biopitting“ predstavlja formiranje lezija dubokih i do 2 cm na kamenim površinama (Slika 3). Najčešći uzročnici ovog fenomena su crni kvasci iz grupe MCF.



Slika 3. Fenomen „biopitting“ na kamenom supstratu spomenika kulturne baštine

SAB je prekursor za formiranje kvržica na kamenoj površini koje su posledice acidolitičke i oksidoreduktivne biokorozije minerala iz supstrata (Slika 4) (Blaschke, 1987) što u slučaju spomenika posebno utiče na umanjenje estetske vrednosti. Takođe je utvrđeno da SAB na kamenim spomenicima ubrzava akumulaciju polutanata iz atmosfere (Steiger i dr., 1993).



Slika 4. Crne kvržice mikrokolonijalnih gljiva (MCF) na površini kamenog supstrata kulturnih dobara

Patina (ili pinta) predstavlja golim okom vidljivu manifestaciju prisustva SAB na različitim materijalima, uključujući i kamene spomenike (Warscheid i Braams, 2000). Ranije se smatralo da patina ima isključivo neorgansko poreklo i da predstavlja depoziciju iz vazduha. Tako se smatralo da crne, narandžaste ili braon diskolorizacije objekata, pogotovo mermera ili krečnjaka, potiču od fizičko-hemijskih reakcija izazvanih klimatskim faktorima i zagađenjem neorganskim materijama, kao i od ostataka boja i hemikalija korišćenih za konzervaciju (Jenkins i Middleton, 1988). Tek je kasnije uveden termin biopatina kad je uočeno da nastaje od fototrofnih mikroorganizama, a potom je i utvrđeno da i heterotrofne gljive mogu biti izazivači biopatine.

Smatra se da je Filippo Baldinucci prvi uveo termin patina u rečnik umetnosti 1881. godine. On je pod patinom smatrao vremenski zavisno tamnjenje fresaka i uljanih slika. Veruje se da reč patina potiče iz italijanskog jezika i da prvi opis pojma potiče od vene-

cijanskog pesnika M. Boschini-ja, 1660. godine. U 18. veku termin patina se koristio za promene obojenosti na bakarnim i bronzanim objektima usled procesa oksidacije (ital. *verde di bronzo*). Danas se termin patina široko upotrebljava za starenje svih površina umetničkih predmeta. Savremenu definiciju patine dao je Brachert (1985), kao transformacije površine svih tipova materijala koji se koriste za izradu umetničkih predmeta. Nešto kasnije, Krumbein (1992) je definisao patinu kao zbir materijalnih i teksturnih promena na površini materijala usled starenja, raspadanja, uticaja sredine i uticaja živih organizama, posebno na objektima od istorijskog nasleđa.

Formiranje patine je vrlo kompleksan proces koji traje dugo zbog čega je i sama patina objekat od arheološkog značaja. Ponekad se opisuje i kao razmena materije i energije između dva otvorena sistema (čvrstog supstrata i okruženja). Oba sistema su definisana njihovim fizičkim (masa, veličina i oblik čestica, gustina, kohezija, pritisak, vlažnost, difuziona konstanta), hemijsko-kristalografsko-mineralno-petrografskim, biološkim i termodinamičkim karakteristikama. Takođe, formiranje patine utiče na termohigroskopske karakteristike kamena, posebno na stenama s velikom količinom kvarca i gline. Prvu promenu obojenosti kamene površine izazvanu delimično mineralizovanim hlorofilom iz cijanobakterija i algi opisao je Jaag (1945).

Biopatina koju izazivaju izlučeni pigmenti živih organizama se prema boji može podeliti na:

1. **Crne prevlake** (Slika 5) su posledica prisustva melanina, melanoida, produkata degradacije hlorofila kao i Fe i Mn minerala u SAB. Kao što je istaknuto melanin i njemu srodne pigmente sintetišu vrste iz familije Dematiaceae, ali i aktinomicete, pseudomonade, gram pozitivne korineformne i metilotrofne bakterije. Takođe, oslobađanje enzima tirozinaze iz uginulih ćelija mikroorganizama dovodi do formiranja crne biopatine (Willimzig i dr., 1993). Ovaj enzim vrši oksidaciju fenolnih jedinjenja i katalizuje biosintezu melanina.

Na mnogim građevinama u gradskim zonama vremenom se mogu pojaviti crne prevlake a jedan od uzročnika je i čađ. U novije vreme su se pojavile i teorije koje crne prevlake na građevinskom kamenu objašnjavaju biološkim uzročnicima. Anagnostidis i

dr. (1992) su analizirajući crne prevlake na spomeniku Partenon na Akropolju prvi izneli hipotezu da crna obojenost spomenika potiče od hlorofila a i b i karotenoida cijanobakterija, melanina i melanoida gljiva i aktinomiceta. Do sličnih zaključaka došli su Krumbein (1992) i Urzi i dr. (1992) proučavajući diskoloricaju na više mermernih spomenika u Evropi (u Atini, Potsdamu, Sankt Petersburgu, Rimu i Beču). Prema ovim autorima crne prevlake na kulturno istorijskim spomenicima, osim čađi, izazivaju i gljive, te se stoga ove promene mogu smatrati biopatinom.



Slika 5. Crna biopatina na spomeniku Angkor Vat u Kambodži

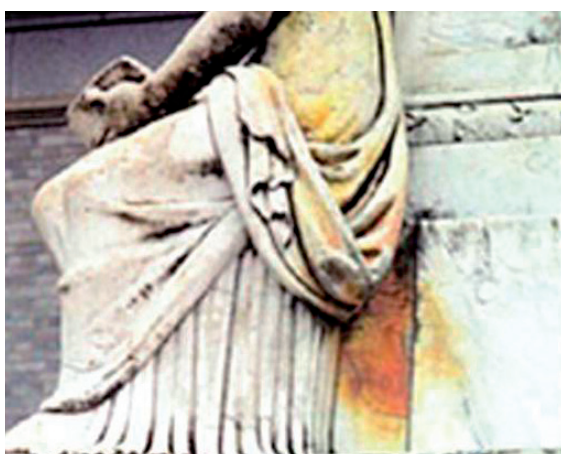
2. **Zelene prevlake** (Slika 6) su posledica prisustva fotosintetičkih pigmenata algi i cijanobakterija, najčešće hlorofila a i b. Najpoznatiji primer zelenih prevlaka opisan je na slikama u pećini Lascaux u Francuskoj (1963). Otkriće impresivne preistorijske umetnosti u ovoj pećini 1940. godine jedno je od najznačajnijih arheoloških otkrića 20. veka. Od kada je pećina otvorena za posetioce i instalirana rasveta, kao i veliki broj posetilaca su tokom vremena doveli do povećanja koncentracije CO₂ što je omogućilo razvoj fotoau-

totrofa. Za samo 20 godina razvila se zelena biopatina, koja do tada nije bila prisutna, i u potpunosti prekrila preistorijske slike. U literaturi ova biopatina opisana je kao zelena bolest (ital. *maladie verte*), a kao uzročnik je naavedena zelena alga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrová (Lefèvre, 1974).



Slika 6. Zelena biopatina na spomenicima

3. **Žuto-narandžasto-braon prevlake** (Slika 7) karakterišu se prisustvom karotena i karotenoida, kao i fikobiliproteina koji nastaju kao produkti degradacije hlorofila.



Slika 7. Žuto-narandžasto-braon biopatina na spomeniku

4. **Svetlo oranž-crvene prevlake** (Slika 8) nastaju usled produkcije različitih pigmentata heterotrofnih organizama, kao i degradacionih produkata algi i cijanobakterija obogaćenih gvoždem.



Slika 8. Crvena biopatina na stubovima i fasadi istorijske građevine



Slika 9. Patina „sciabaltura“ na stubovima i fasadi istorijske građevine

Na mermernim spomenicima je opisana jedna specifična patina braon-crvenkasto-žute boje koja je označena kao „scialbatura“ (ital.) (Slika 9). Nju čine dva minerala, vevelit (kalcijum oksalat monohidrat) i vedelit (kalcijum oksalat dihidrat). Oksalna kiselina, koju proizvode određene mikromicete i lišaji koji se razvijaju na mermeru, ima sposobnost da „izvlači“ Ca iz kalcita (CaCO_3) i dolomita (MgCO_3) i da sa njima gradi hidratizane soli oksalne kiseline. Način nastanka ovih minerala ih svrstava u sekundarne mikogene minerale.

Kolonizacija kamenih površina lišajevima, mahovinama i višim biljkama narušava estetsku vrednost spomenika kulture. Intenzivna kolonizacija spomenika ovim grupama organizmima takođe se smatra simptomom biodeterioricaje (Slika 10). Nasuprot opšte prihvaćenom mišljenju da su lišajevi „pioniri vegetacije“ sposobni da kolonizuju intaktnu kamenu površinu nenaseljenu drugim organizmima, Savoye i Lallemand (1980) smatraju da je preduslov za uspešnu kolonizaciju kamena lišajevima depozicija nutrijenata iz

atmosfera i prethodna kolonizacija bakterijama. Mahovine i više biljke zahtevaju dodatnu eutrofikaciju kamene površine, i prisustvo inicijalnog sloja zemljišta – protosoil (Warscheid i Braams 2000; Gómez-Alarcón i dr., 1995a). Smenjivanje različitih grupa organizama na kamenom supstratu predstavlja ekološku sukcesiju.



Slika 10. Mahovine na površini nadgrobnog spomenika

Na mnogim poznatim spomenicima u svetu opisani su simptomi biodeterioracije (Sterflinger, 2010). Na antičkom spomeniku Erehteon, izgrađenom od mermera, koji se nalazi na severnoj strani Akropolja u Atini opisana je žuta biopatina kao posledica biodeterioracije aktivnost MCF i heterotrofnih bakterija. Na kamenu peščaru koji se nalazi u Novom muzeju Pinakoteke u Minhenu opisana je zelena biopatina formirana od zelenih algi koje zajedno sa gljivama i bakterijama obrazuju SAB. Takođe, na ovom spomeniku primećene su velike površine obrasle lišajevima. Spomenik Rotorua na Novom Zelandu, izgrađen od kamena peščara u potpunosti je prekriven crvenom biopatinom koju su formirale cijanobakterije, alge i gljive. Produkcija pigmenata od strane mikroorganizama u sastavu SAB svakako dovodi do narušavanja estetske i umetničke vrednosti kulturno-istorijskih spomenika. Biološka uloga produkcije pigmenata je zaštitna jer oni štite SAB od visokih vrednosti UV radijacije, desikacije i temperaturnih stresova (Sterflinger, 2010).

1.1.3.2 Biodeterioracija umetničkih i zidnih slika

Slikarstvo predstavlja umetnost stvaranja slika bilo realističnih, fiktivnih ili apstraktnih na površinama različite prirode, tehnikom mešanja pigmenata sa drugim supstancama organskog ili sintetičkog porekla. Umetničke slike na platnu, kao i zidne slike u crkvama i manastarima predstavljaju specifične ekološke niše koje mogu biti kolonizovane različitim grupama mikroorganizama. Tokom istorije različiti materijali su korišćeni kao podloge za slike: platno, kamen, drvo, papir, pergament, koža, metal. Hemijski sastav boja varirao je u zavisnosti od načina slikanja, tehnike, istorijskog perioda i samog slikara. Boje su pripremane od mineralnih pigmenata pomešanih sa vezivom, od kojih su najčešće korišćeni različita ulja, smole, voskovi, žumance, kazein, biljni i životinjski lepak (Sterflinger, 2010). Hemijski gledano slike se sastoje od različitih organskih i neorganskih materija koje imaju različit stepen bioreceptivnosti, a pojedini konstituenti slika su vrlo biodegradabilni. Danas se većina umetničkih slika radi na slikarskom platnu na koje se nanose slikarske boje. Biodeterioracija slikarskih boja je malo izučavana i literaturni podaci u ovoj oblasti su vrlo oskudni. Kao organsko vezivo, stari majstori koji su naslikali najlepše freske u manastirima, vrlo često su koristili žumance, kazein, ulja iz različitih biljaka (lan, mak, konoplja) i različite smole. Sorlini i dr. (1987) utvrdili su da materijal sa želatinom zečje šape pogoduje obilnom rastu gljiva, ali ako se u želatin dodaju pigmenti limonit, hematit i malahit, dolazi do inhibicije rasta gljiva. Supstrati srednjovekovnih slika vrlo su postojani jer sadrže visoke koncentracije teških metala – olova, bakra, žive (Ciferri, 1999), ali i organske supstance životinjskog porekla – npr. žumance koje je bogato lipidima (Huang i dr., 2003), lateks smokve bogat masnim kiselinama (Hosamani i Pattanashettar, 2003), lišće smokve koje sadrži triterpenoide (Saeed i Sabir, 2002). Ovi organski rastvarači odlično su se vezivali za neorganske boje koje su srednjovekovni umetnici koristili za bojenje fresaka i slika. Materijali koji se koriste za konzervaciju zidnih slika mogu, takođe, da posluže kao nutrijent za gljive (Sorlini i dr., 1987). Slikarska platna i drveni ramovi se pre nanošenja slikarskih boja često premazuju želatinom zečje šape, što im povećava stepen bioreceptivnosti. Prisutni nutrijenti u zidnim

i umetničkim slikama kombinovani sa optimalnim ekološkim faktorima (temperatura i vlažnost) omogućavaju prenamnožavanje gljiva na ovim supstratima koje mogu izazvati proces biodeterioracije slika (Gorbushina i dr., 2004). Mehanička biodeterioracija slika manifestuje se rastom hifa i njihovom penetracijom kroz supstrat ili formiranjem plodnosnih tela i drugih modifikacija micelije. Kao posledica formiranja peritecija, piknidija ili stroma na površini zidnih slika mogu se pojaviti ispupčenja ili pukotine (Garg i dr., 1995). Takođe, može doći do odvajanja slikarske boje od podloge i ova pojava označava se kao eksfolijacija. Produkcijom različitih ekstracelularnih enzima (celulaza, glukanaza, lakaza, fenolaza, keratinaza, mono-oksigenaza i drugih) gljive su sposobne da vrše asimilacionu biodeterioraciju, a produkcijom organskih kiselina i disimilacionu biodeterioraciju. Ove kiseline reaguju sa različitim konstituentima slika, najčešće rastvarajući katjone ili gradeći helatne komplekse sa metalima prisutnim u mineralnim pigmentima (Gómez-Alarcón i Torre de la, 1994). Najupečatljiviji simptom koji se može javiti na slikama, a posledica je biodeterioracione aktivnosti gljiva, je promena obojenosti slika, bilo kao posledica gubljenja slikarske boje ili kao obojenost izazvanu produktima gljiva, što svakako dovodi do umanjenja estetske i umetničke vrednosti dela. Emoto i Emoto (1974) su objavili da je prisustvo crnih, zelenih i crvenih prevlaka na zidnim slikama drevnih japanskih grobnica posledica rasta gljiva.

1.1.3.3 Biodeterioracija umetničkih predmeta od celuloznih vlakana

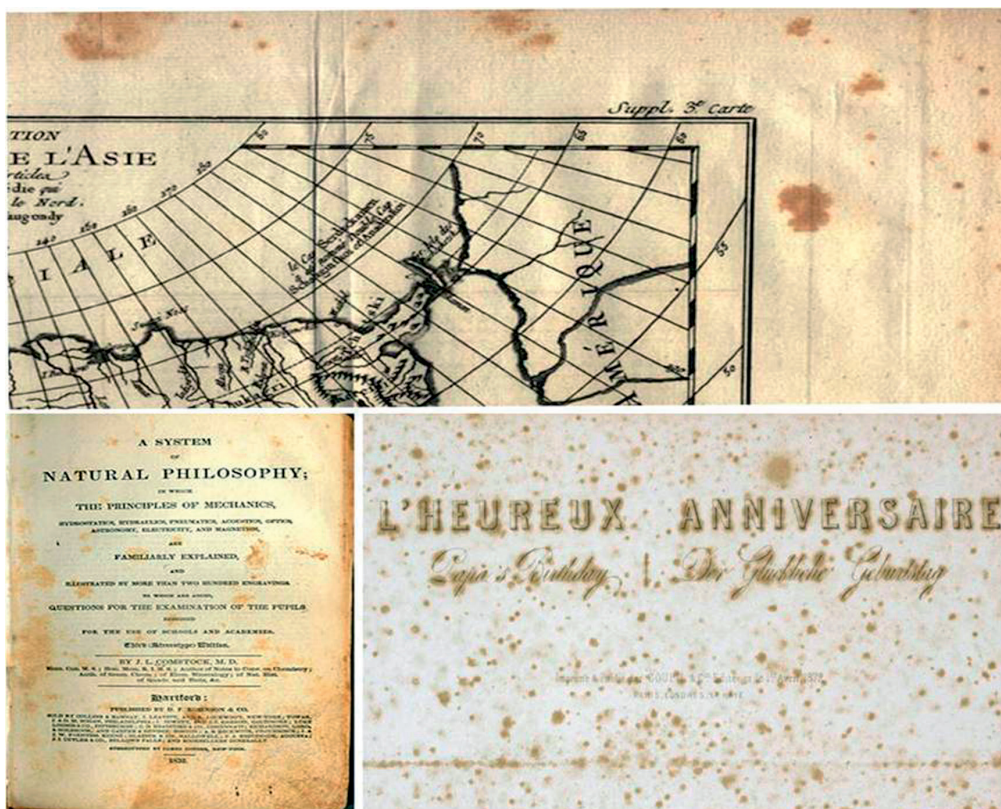
Celuloza je složeni makromolekul, empirijske formule $(C_6H_{10}O_5)_n$, koji predstavlja dominantnu komponentu ćelijskog zida biljaka i gljiva iz klase Oomycetes (podrazdeo Mastigomycotina). Celulozna vlakna predstavljaju glavnu gradivnu komponentu mnogih umetničkih predmeta pre svega onih sačinjenih od drveta. Papir predstavlja najznačajniji materijal na kome se beleže i čuvaju kulturna dostignuća u celom svetu. S obzirom na to da nastaje kao produkt drvne industrije i izgrađen je od vlakana celuloze, u ekološnom smislu papir smatramo celuloznom supstratom. Knjige, dokumenti, spisi, stare mape, fotografije

i dr. su predmeti napravljeni od papira koji se najčešće čuvaju u bibliotakama, arhivima i muzejima. Pamuk i lan su tkanine izgrađene od celuloznih vlakana. Mnogi umetnički predmeti, pre svega stara nošnja, i predmeti koji su koristili naši preci izgrađeni su od ovih tkanina i deponovani su u muzejskim prostorima.

Umetnički predmeti izgrađeni od celuloznih vlakana mogu da budu kolonizovani celulolitičkim gljivama sposobnim da vrše asimilacionu biodeterioraciju papirnih vlakana. Celuloliza ili hidroliza celuloze je katalizovana enzimskim kompleksom koji se označava kao celulaza i koji se sastoji od ekstracelularnih $\beta(1\rightarrow4)$ glukanaza. Svi celulolitički enzimi se dele na endo- i egzonukleaze. Endohidrolaze seku $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnu vezu na ma kom mestu proizvodeći glukozu, celobiozu i frakcije glukanskih lanaca veće molekulske mase. Egzohidrolaze ($\beta(1\rightarrow4)$ celobiohidrolaze) seku samo krajeve $\beta(1\rightarrow4)$ glukanskih lanaca dajući kao proizvod reakcije isključivo disaharid celobiozu (Dix i Webster, 1995). Postoje i glukohidrolaze koje seku samo jednu D-glukozidnu jedinicu iz polisaharidnog lanca, ali one su jako retke kod mikroorganizama (Dix i Webster, 1995). Primeri celulolitičkih vrsta gljiva često izolovanih sa dokumenata i knjiga koje su čuvaju u bibliotekama i arhivima su vrste rodova *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium* i *Trichoderma* (Sczezepanowska i Cavaliere, 2000; Corte i dr., 2003). Većina kolonizatora papirnog supstrata su kserofilne vrste sposobne da se razvijaju na supstratima sa niskim vodnim potencijalom. Celulolitičke vrste gljiva mogu vrlo brzo da potpuno razlože papir (Adamo i dr., 2003).

Specifična i ireverzibilna pojava u vidu braon do riđih mrlja na papirnom materijalu opisana je u literaturi (Arai, 2000). S obzirom na to da boja ovih mrlja podseća na boju lišćjeg krzna pojava je nazvana „foxing“ (Slika 11). Poreklo ove pojave na papirnim dokumentima objašnjavaju dve teorije – abiotička i biotička. Prema abiotičkoj teoriji „foxing“ je posledica prirodnih hemijskih procesa, najčešće oksidacije, koji se odigravaju na papirnom materijalu, kao i posledica depozicije određenih jedinjenja na površini papira (Cain i Miller, 1982). Prema biotičkoj teoriji, „foxing“ izazivaju mikroorganizmi, posebno gljive koje produkcijom organskih kiselina vrše disimilacionu biodeterioraciju papira trajno ga

oštećujući (Press, 1976; Meynell i Newsam 1978; Meynell, 1979; Nol i dr., 1983; Arai, 2000). Izolacija velikog broja vrsta gljiva upravo sa delova papira na kojima se primećuju simptomi „foxing“ govori u prilog biotičkoj teoriji.



Slika 11. Simptomi „foxinga“ na starim spisima i mapama

1.2 Prevencija i sanacija u sistemu konzervacije objekata i predmeta kulturne baštine

Pod konzervacijom objekata kulturne baštine podrazumeva se korišćenje efikasnih metoda u održavanju kulturne baštine u stanju što bližem izvornom, pri čemu je neophodno zadržati prvobitnu nameru umetnika (Kabbani, 1997). Preventivna konzervacija omogućava da se umanje ili eliminišu rizici od oštećenja predmeta materijalne kulturne baštine, dok se mere sanacije sprovode na objektima i predmetima na kojima ima znakova oštećenja. Tri osnovne aktivnosti koje se moraju sprovoditi tokom prevencije su: kontrola mikro-

klimatskih uslova, učestalo mehaničko čišćenje i redovni monitoring (Sterflinger, 2010). Pod kontrolom mikroklimatskih uslova, u prostorijama, depoima i izložbenim prostorima muzeja, podrazumeva se kontrola RH i temperature i njihovo održavanje na određenom nivou. Da bi se koncentracija spora u vazduhu zatvorenog prostora održavala na minimumu preporučuje se korišćenje specifičnih filtera klase F5-F7, na ventilacionim sistemima, koji sprečavaju prodor spora gljiva i polenovih zrna. Monitoring koncentracije spora se određuje uz pomoć specifičnih „air-sampler“ uređaja. Zbog specifičnosti namene svakog muzejskog prostora potrebno je predložiti higijenske mere koje bi bile primenljive za svaki muzejski prostor pojedinačno. Takođe, poželjno je da svaki muzej poseduje posebnu prostoriju za skladištenje, tzv. karantin, u koji bi se odlagali objekti sa vidljivim porastom plesni (Sterflinger, 2010).

Mehaničko čišćenje predstavlja fizičko uklanjanje micelije sa kolonizovanih umetničkih objekata gde je golim okom vidljiv porast plesni. Takođe, na kamenim spomenicima i građevinskim objektima potrebno je mehanički ukloniti prisutnu biopatinu, kao i lišajevе, mahovine i više biljke ako su prisutne. Prilikom mehaničkog čišćenja mora se uzeti u obzir tip materijala da ne bi došlo do dodatnog oštećenja umetničkog predmeta. Nakon uklanjanja mikromiceta sa objekata kulturne baštine, neophodno je ispitati njihovu vijabilnost u laboratorijskim uslovima. Prisustvo vijabilnih propagula na predmetima i objektima materijalne kulturne baštine zahteva primenu mera sanacije u vidu dezinfekcije kontaminiranih površina. Takođe, gajenjem izolata na selektivnim mikološkim podlogama može se odrediti njihov biodeteracioni potencijal, pre svega sposobnost produkcije ekstrakcelularnih enzima i organskih kiselina (Sterflinger, 2010).

Dezinfekcija predmeta i objekata materijalne kulturne baštine se može vršiti fizičkim ili hemijskim sredstvima. γ – radijacija je predloženo fizičko sredstvo za uklanjanje plesni a vrednosti od 20 kGy i više eliminiše sve prisutne plesni i njihove spore. Međutim, ovaj metod nije primenljiv za sve tipove materijala, pogotovo za celulozni supstrat koji se hemijski menja dejstvom zračenja. Kao hemijska sredstva dezinfekcije koriste se biocidi.

Veliki broj biocida je do sada primenjivan za dezinfekciju objekata i predmeta kulturne baštine izgrađenih od različitih tipova materijala (Sterflinger, 2010).

Blazquez i dr. (2000) su izvršili efikasnu dezinfekciju krečnjačkog i granitnog supstrata Katedrale Alcalá de Henares (Španija) upotrebom biocida Mergal S97 (karbendazim oktil izotiazolin-5-benzimidazol metilkarbamat), Preventol A9D (N-dihlorofluor-metil-tio-N',N'-dimetil-N-p-tolil sulfamid) i Metatin N5810/101 (smeša tributil tin-naftenata i kvarternarnih amonijumovih soli). Ipak, kvasolike forme gljiva su pokazale rezistentnost prema primenjenim biocidima. Diakumaku i dr. (1995) su saopštili da se triciklazol, fungicid iz grupe triazolnih jedinjenja, može uspešno primeniti za uništavanje mikromiceta iz familije Dematiacea prisutnih na mermernim i krečnjačkim spomenicima. Sharma i dr. (2011) preporučuju 2% rastvor natrijum pentahlorofenola kao biocid koji uspešno inhibira rast većine mikromiceta koje kolonizuju kameni supstrat.

Veliki broj hemijskih agenasa do sada je primenjivan prilikom konzervacije umetničkih predmeta izgrađenih od papira. Najčešće korišćen agens u konzervaciji papira je timol (3-hidroksi-p-cimen) koji spada u grupu jedinjenja derivata fenola. Ostala fenolna jedinjenja pentahlorofenol, p-hloro-*m*-krezol, ortofenilfenol, n-fenilsalicilanid i 2-fenilfenol ređe su u upotrebi. Ipak zbog visoke toksičnosti kao i zbog mogućnosti da trajno oštete papirni supstrat upotreba ovih jedinjenja više se ne preporučuje (Nittereus, 2000). Izotiazolinon spada u grupu savremenih biocida koji se od nedavno primenjuje u konzervaciji papira i do sada je pokazao visoku antifungalnu aktivnost (Sterflinger, 2010).

Konzervacija umetničkih i zidnih slika do sada je vršena različitim hemijskim sredstvima. Paner (2012) je pokazao da su komercijalni proizvodi Preventol R-80 (benzalkonijum hlorid) i Umonium-38 u poređenju sa ostalim biocidima najefikasniji prilikom dezinfekcije slika rađenih tehnikom ulje na platnu. Benzalkonijum hlorid i Preventol A8 su pokazali veliku efikasnost u inhibiciji rasta svih gljiva izolovanih sa površine murala (Gorbushina i dr., 2003b). Danas se konzervacija murala uspešno vrši rastvorom vodonik peroksida (H₂O₂) niskih koncentracija i 70% izopropil alkohola (Kigawa i dr., 2009). Čišćenje slika izopropil alkoholom nakon tretmana drugim biocidima predstavlja vrlo

uspešnu preventivnu metodu čiji je cilj sprečavanje rekolonizacije dezinfikovanih površina rezistentnim mikroorganizmima (Helmi i dr., 2011).

Veliki broj biocida do sada je više ili manje uspešno primenjivan prilikom konzervacijskih tretmana umetničkih predmeta od drveta. Osim primene biocida, uobičajena praksa u muzejima je premazivanje drveta odgovarajućim hemijskim agensima koji na površini drvnog supstrata formira zaštitni sloj koji onemogućava kolonizaciju mikroorganizama. Efikasna zaštita se postiže premazivanjem drveta smešom 10% Paraloid B72 i 6% pentahlorofenola. Podjednako dobri rezultati se dobijaju primenom smeše 10% polivinil acetata i 6% pentahlorofenola (Kalpana i dr., 2011).

Biocidi primenljivi u procesu konzervacije i restauracije moraju da zadovolje sledeće kriterijume: (1) da imaju visoku fungicidnu ili fungistatsku aktivnost tj. sposobnost zaustavljanja ili inhibicije rasta mikromiceta pri niskim koncentracijama; (2) ne smeju da reaguju sa materijalom od koga je izgrađeno umetničko delo i da na bilo koji način utiču na njegov sastav i kvalitet; (3) i treba da su netoksični za ljude (Sterflinger, 2010). Veliki broj biocida, do sada primenjivanih prilikom konzervacije objekata i predmeta kulturne baštine, je zabranjen od strane Evropske direkcije za biocide zbog neispunjavanja navedenih kriterijuma, pre svega toksičnosti po ljude i životnu sredinu. Tri grupe biocida primenljivih u konzervaciji i restauraciju kulturnih dobara odobrenih od strane Evropske direkcije za biocide su:

1. jedinjenja koja oslobađaju formaldehid;
2. kvarterne amonijumove soli;
3. izotiazolinon.

U određenim slučajama moguće je koristiti i 70% etanol u cilju prevencije kontaminacije gljivama na kulturno-istorijskim objektima, dok je preporučeno da se do sada vrlo često korišćena fenolna jedinjenja (timol i cimol) više ne upotrebljavaju zbog njihove veće toksičnosti za ljude.

2 Cilj rada

Na osnovu svega do sada predstavljenog, u cilju proučavanja biodeterioracije na objektima i predmetima kulturne baštine u ovom radu su postavljeni sledeći ciljevi istraživanja:

1. opis simptoma deterioracije na ispitivanim objektima kulturne baštine, izgrađenih od različitih tipova kamena;
2. identifikacija cijanobakterija i algi, fototrofnih komponenti subaerialnih biofilmova koji kolonizuju kameni supstrat kulturno-istorijskih spomenika i prouzrokuju promene u vidu različito obojenih biopatina;
3. izolacija i identifikacija mikromiceta, heterotrofnih komponenti subaerialnih biofilmova koje kolonizuju kameni supstrat kulturno-istorijskih spomenika i vrše njegovu biodeterioraciju;
4. izolacija i identifikacija mikromiceta sa umetničkih predmeta izgrađenih od različitih tipova materijala (drvo, tekstil, papir, fotografski papir, slikarske boje);
5. izolacija i identifikacija mikromiceta prisutnih u vazduhu zatvorenih prostorija institucija kulture (muzejski depoi i izložbeni prostori);
6. izolacija i identifikacija mikromiceta koje kolonizuju zidne slike odabranih srpskih crkava i manastira.

U cilju pronalaženja neagresivnih, efikasnih i ekološki bezbednih agenasa koji se mogu koristiti u procesu prevencije i sanacije u okviru konzervatorskih postupaka u ovom radu su postavljeni sledeći ciljevi:

7. uporedna analiza antifungalne aktivnosti etarskih ulja odabranih aromatičnih biljaka kao potencijalno novih agenasa primenljivih u konzervaciji baštine i komercijalnog biocida benzalkonijum hlorida (BAC) odobrenog od strane Evropske direkcije za biocide na odabrane izolate objekata kulturne baštine;
8. hemijska analiza odabranih etarskih ulja;
9. ispitivanje uticaja etarskih ulja i biocida BAC na rast somatskih hifa i germinaciju spora odabranih izolata sa kulturnih dobara;
10. određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC), minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC) i doza inhibicije (ID_{50} i ID_{95}) ispitivanih etarskih ulja i biocida BAC;
11. ispitivanje uticaja dužine tretmana (kontaktnog vremena) na inhibitorni potencijal biocida BAC u niskim koncentracijama.

3 Istraživani objekti i predmeti kulturne baštine

3.1 Kulturno-istorijski spomenici

Izbor istraživanih objekata i predmeta izvršen je na osnovu opservacije i stepena deterioracije kao i predloga stručnih timova u institucijama kulture za zaštitu objekata kulturne baštine Srbije.

3.1.1 Crkva Svete Trojice manastira Sopoćani kod Novog Pazara

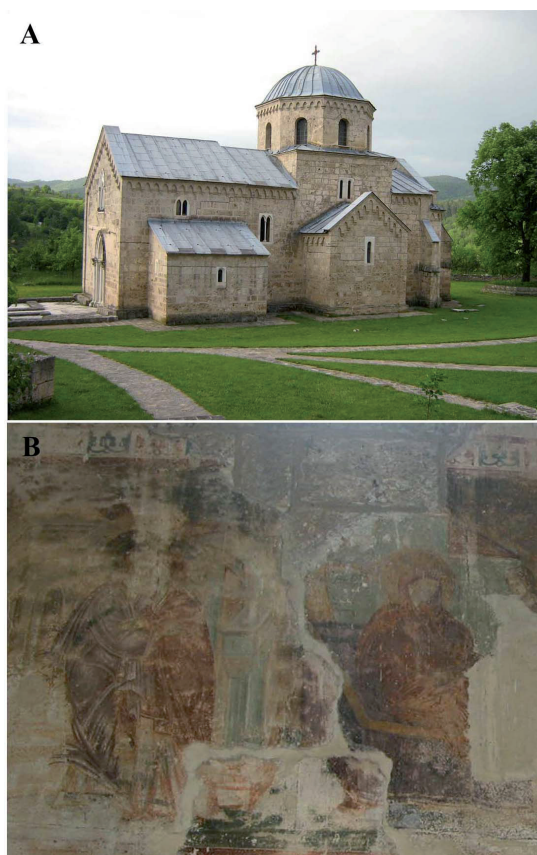
Manastir Sopoćani (Slika 12A), dom Svete Trojice, datira iz XIII veka i zadužbina je kralja Stefana Uroša I. Nalazi se na 17 km od Novog Pazara (43° 11' 49.20" N; 20° 33' 16.42" E, 683 mnv). Jedan je od najznačajnijih srpskih kulturno-istorijskih spomenika, i od 1979. godine uvršćen je na Unesco listu svetske baštine. Arhitektura crkve Svete Trojice rađena je u stilu Raške škole, sa uticajima romaničke arhitekture. Unutrašnjost crkve oslikana je freskama koje datiraju iz XIII veka (Slika 12B). Umetničku vrednost Sopoćana predstavljaju freske koje su prvobitno zahvatale 760 m² zidne površine, od kojih je danas sačuvano oko polovina. Prema opštem mišljenju freske u Sopoćanima su vrhunac ne samo srpskog, već i vizantijskog slikarstva uopšte. Sopoćani su danas muški manastir i u njemu živi 30 monaha i iskušenika (Mandić, 1965).



Slika 12. Crkva Svete Trojice manastira Sopoćani: A. izgled crkve; B. detalj freske

3.1.2 Crkva Svete Bogorodice manastira Gradac kod Novog Pazara

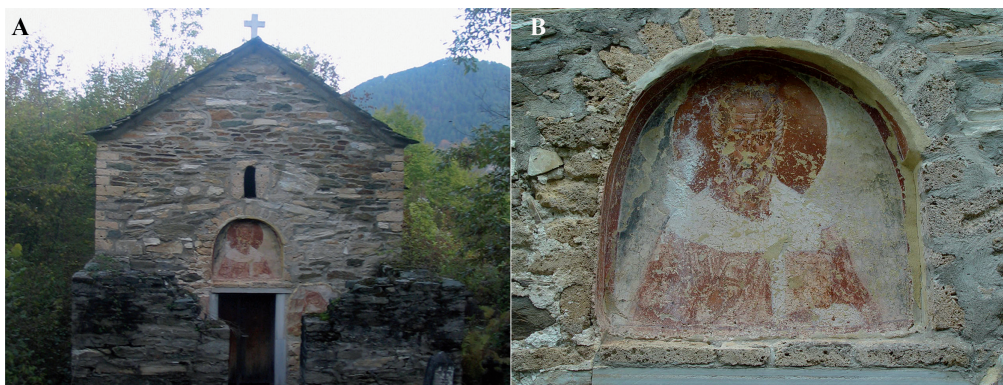
Manastir Gradac (Slika 13A), je podignut u XIII veku i predstavlja zadužbinu Jelene Anžijske, supruge srpskog kralja Stefana Uroša I. Na ruševima prethodne crkve u centru manastirskog kompleksa podignuta je Crkva Svete Bogorodice, posvećena prazniku Blagovesti. Crkva je zidana u stilu Raške škole, ali su na samoj građevini prisutni i elementi vizantijskog i romanogotičkog i gotičkog arhitektonskog stila. Nalazi se u južnoj Srbiji na obodima planine Golija ($43^{\circ} 17' 10.60''$ N; $20^{\circ} 36' 59.10''$ E, 563 mnv). Unutrašnjost crkve oslikana je freskama koje datiraju iz XIII veka (Slika 13B). Manastir Gradac je proglašen za spomenik kulture od izuzetnog značaja za republiku Srbiju 1979. godine. Manastir Gradac danas funkcioniše kao ženski manastir (Kandić, 2008).



Slika 13. Crkva Svete Bogorodice manastira Gradac: A. izgled crkve; B. detalj freske

3.1.3 Crkva Svetog Nikole u Paležu

Crkva Svetog Nikole (Slika 14A) datira iz XIV veka i nalazi se u selu Reka, u zaseoku Palež nedaleko od sela Rudno (43° 24' 06.59" N; 20° 28' 54.63" E, 1022 mnv). Ova crkva je jedan od najznačajnijih kulturno-istorijskih spomenika u slivu Studenice. Iznad ulaznih vrata nalazi se i dobro očuvana freska Svetog Nikole kome je ova crkva posvećena (Slika 14B). Unutrašnjost crkve je oslikana freskama. Nekoliko figura iz crkve, kao i delovi fresaka, su zbog svoje lepote prenete u Narodni Muzej u Beogradu (Pavić-Basta, 1975).



Slika 14. Crkva Svetog Nikole u Paležu: **A.** izgled crkve; **B.** detalj freske iznad ulaznih vrata

3.1.4 Ajfelova prevodnica kod Bečeja



Slika 15. Ajfelova prevodnica

Ajfelova prevodnica (Slika 15) je izgrađena je 1898. godine i nalazi se na ušću Bačkog dela kanala Dunav-Tisa-Dunav u Tisu, kod Bečeja (45° 36' 15.50" N; 20° 03' 08.23" E, 76 mnv). Gvozdena konstrukcija ovog spomenika potiče iz radionice čuvenog francuskog inženjera Gustava Ajfela, po kome je spomenik dobio ime. Ovaj objekat predstavlja i značajno industrijsko

nasleđe Srbije jer je kod njega za pokretanje mehanizma prevodnice prvi put korišćena sopstveno proizvedena električna energija (Ljaljević Grbić i dr., 2009).

3.1.5 Spomenik Neznamom junaku na Avali



Slika 16. Spomenik Neznamom junaku

Spomenik Neznamom junaku (Slika 16) je monumentalni mauzolej na vrhu planine Avala ($44^{\circ} 42' 25.64''$ N; $20^{\circ} 31' 05.70''$ E, 486 mnv). Spomenik je delo vajara Ivana Meštrovića i podignut je 1938. Izgradnju spomenika inicirao je kralj Aleksandar I Karađorđević, po uzoru na

spomenike koje su u čast zahvalnosti mnogim poginulim vojnicima tokom Prvog svetskog rata podignuti u Francuskoj, Sjedinjenim američkim državama, Velikoj Britaniji i drugim državama. Ovaj spomenik predstavlja memorijal žrtvama Balkanskih ratova i Prvog Svetkog rata. Nalazi se na mestu nekadašnje srednjovekovne tvrđave Žrnov i projektovan je u neoklasičnom stilu u formi grčkog hrama. Direktna inspiracija za izgradnju ovog spomenika Meštroviću je poslužila grobnica persijskog vladara Kira II u Parsagadu. Grob leži na pet uspravnih blokova granita i okružen je sa 8 karijatida koje nose krov. Karijatide simbolizuju majke vojnika iz regija Kraljevine Jugoslavije (Šumadinka, Panonka-vojvođanka, Crnogorka, Kosovka, Dalmatinka, Zagorka, Slovenka i Makedonka) (Ignjatović, 2006).

3.1.6 Brankov most u Beogradu

Brankov most (Slika 17) premošćuje reku Savu i spaja centar Beograda sa Novim Beogradom ($44^{\circ} 48' 53.15''$ N; $20^{\circ} 26' 51.35''$ E, 67 mnv). Pušten je u saobraćaj 1956.

godine, a sagrađen je na ostacima visećeg mosta kralja Aleksandra koji je srušen tokom Drugog svetskog rata, a bio je napravljen po uzoru na viseći most preko Rajne u Kelnu. Kamene površine Brankovog mosta izgrađene su od kamena peščara i datiraju iz 1934. godine, kada su predstavljale deo starog Mosta kralja Aleksandra (Buđevac i Stipanić, 1989).

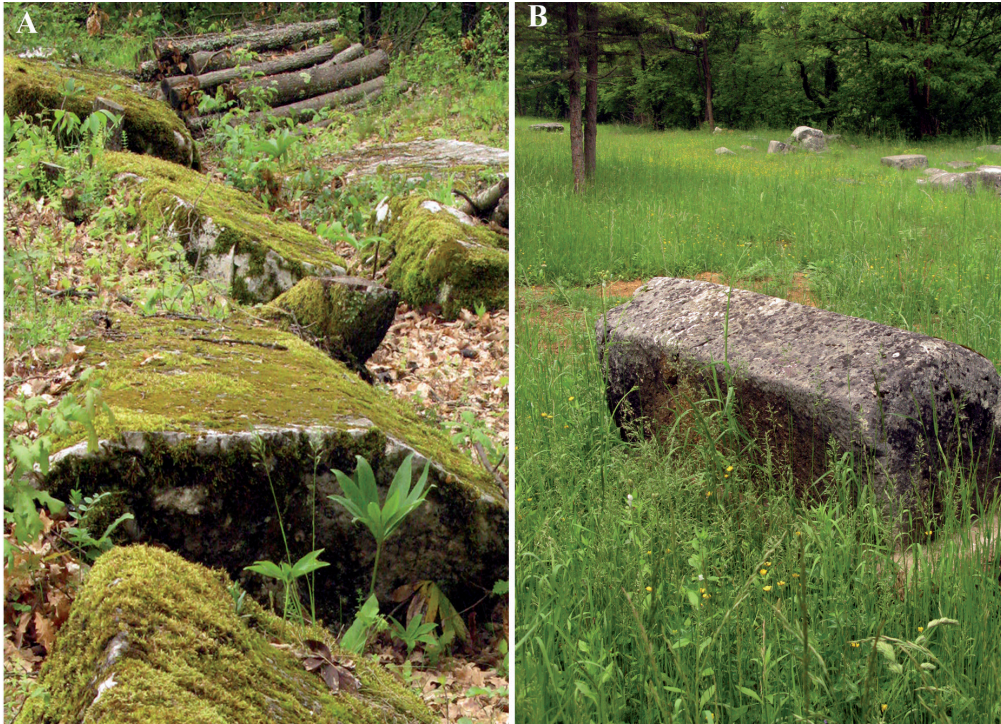


Slika 17. Centralni stub Brankovog mosta – starobeogradska strana

3.1.7 Srednjovekovni kameni stećci u Perućcu

Arheološko nalazište Mramorje (Slika 18B) je jedna od najočuvanijih srednjovekovnih nekropola stećaka i nalazi se u Perućcu kod Bajine Bašte (43° 57' 20.90" N; 19° 23' 39.87" E, 698 mnv). Nekropola potiče iz XIV veka. Lokalitet je pod zaštitom Republike kao spomenik kulture od izuzetnog značaja od 1968. godine. U okviru nekropole nalazilo se 200 stećaka, izgrađenih od karbonatnog kamena dužine do 2 m, a širine i visine do 1 m. Prema poslednjim podacima u nekropoli je sačuvano 93 nadgrobna spomenika. Stećci su poredani paralelno i orijentisani istok-zapad (Đorđević, 2011).

U selu Rastište (43° 56' 02.21" N; 19° 20' 58.70" E, 729 mnv) u blizini jezera Perućac nalazi se arheološko nalazište sa 38 nadgrobničkih spomenika (Slika 18A) (Đorđević, 2012).



Slika 18. Srednjovekovni kameni stećci: **A.** Lokalitet Rastište; **B.** Lokalitet Mramorje

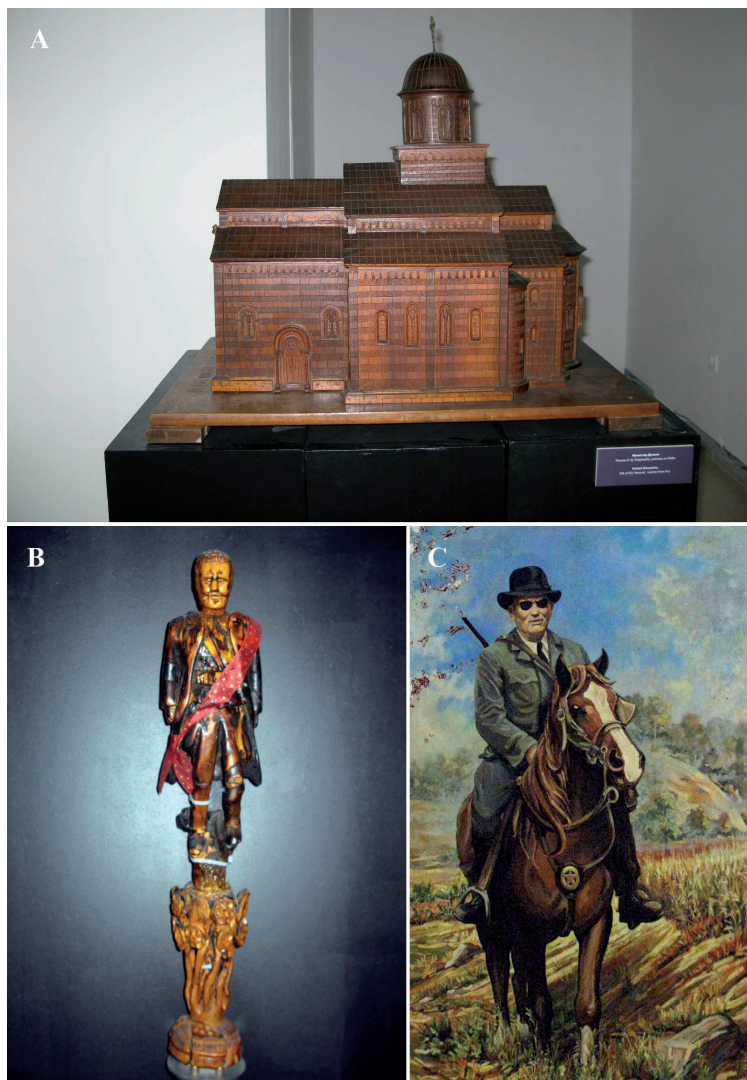
3.2 Umetnički predmeti (artefakti) iz muzeja i galerija

Izbor umetničkih predmeta za mikološku analizu izvršen je od strane konzervatora Muzeja istorije Jugoslavije, Muzeja grada Beograda, Galerije slika “Sava Šumanović” i Muzeja savremene umetnosti na osnovu opservacije i utvrđenog stepena deterioracije.

3.2.1 Zbirka štafeta i poklona Josipa Broza Tita iz Muzeja istorije Jugoslavije

Zbirka se čuva u Muzeju istorije Jugoslavije osnovanom 1956. godine spajanjem memorijalnog centra „Josip Broz Tito“ i muzeja Revolucije naroda i narodnosti Jugoslavije. Fond Muzeja obuhvata preko 200 000 eksponata koji ilustruju jugoslovensku istoriju tokom 20. veka sa posebnim akcentom na lik i delo Josipa Broza Tita. U muzeju se čuvaju,

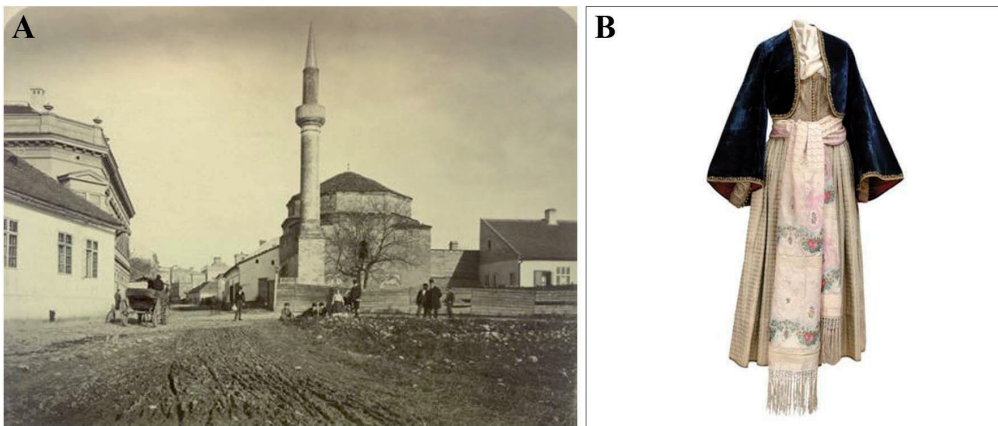
pokloni koje je Josip Broz Tito dobio u zemlji i inostranstvu, a osnovno obeležje muzeja je i stalna postavka zbirke štafeta (Slika 19).



Slika 19. Predmeti iz Zbirke štafeta i poklona Josipa Broza Tita: **A.** drvena maketa Crkve Hrista Pantokratora Manastira Dečani; **B.** drvena štafeta; **C.** umetnička slika „Tito na konju“, ulje na platnu

3.2.2 Umetnički predmeti iz zbirki Muzeja grada Beograda

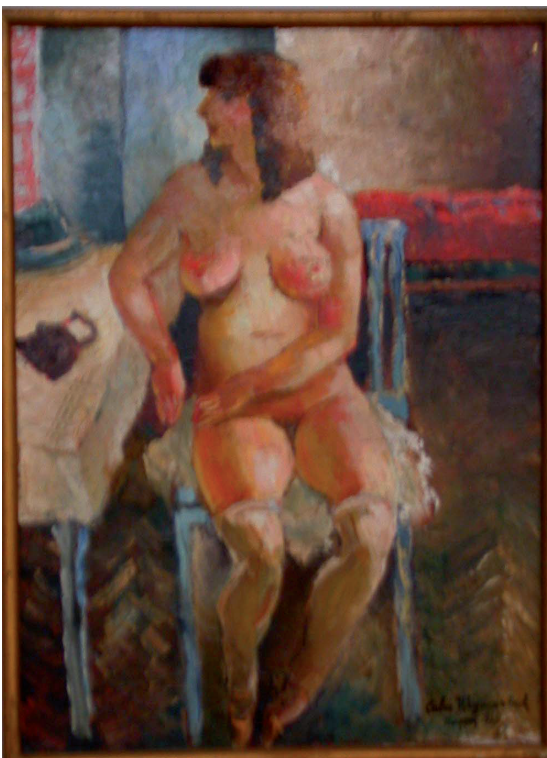
Muzej grada Beograda je osnovan 1903. godine i sadrži 132 000 registrovanih predmeta iz različitih perioda istorije grada Beograda. Muzejski eksponati (Slika 20) su prikupljeni i sistematizovani u tri glavna odeljenja: arheološko, istorijsko i odeljenje za istoriju kulture i umetnosti. Odeljenja su podeljenja na 25 odseka u okviru kojih se nalazi 25 legata.



Slika 20. Predmeti iz depoa Muzeja grada Beograda: **A.** fotografija starog Beograda, crno-bela tehnika; **B.** komplet građanske nošnje

3.2.3 Zbirka slika iz Galerije slika „Sava Šumanović“ u Šidu

Galerija slika „Sava Šumanović“ nalazi se u Šidu, gde se čuva preko 400 likovnih dela ovog umetnika. Najveći deo slika rađen je tehnikom ulje na platnu (Slika 21), dok ostala dela čine pasteli, crteži i dokumentacija.

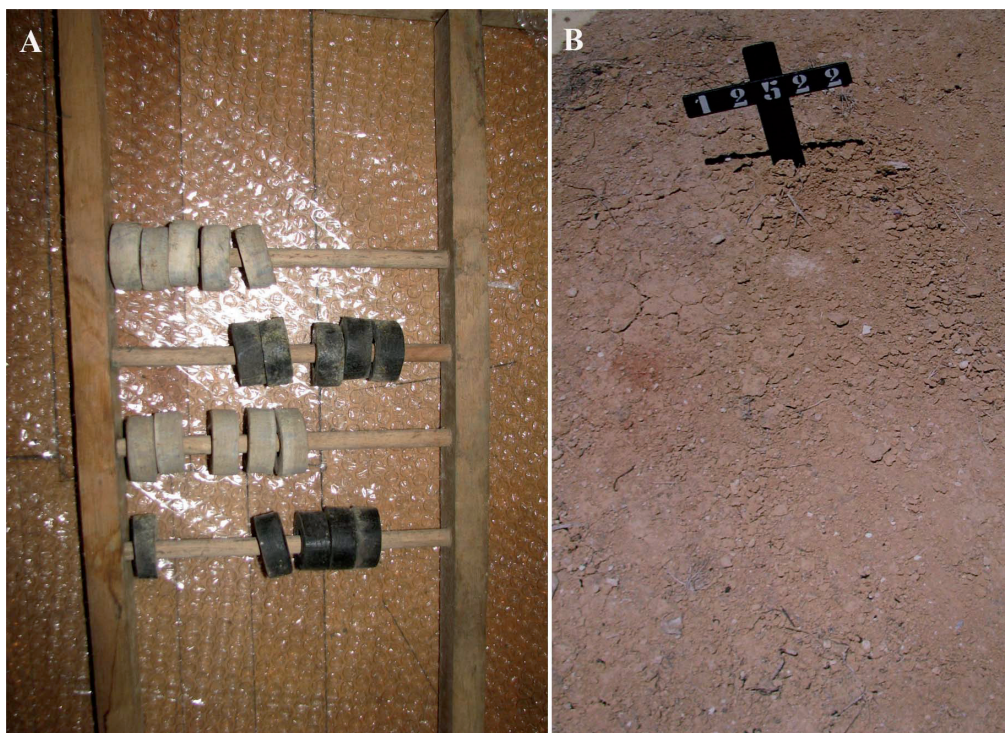


Slika 21. Umetnička slika Save Šumanovića, ulje na platnu

3.2.4 Zbirke Muzeja Savremene umetnosti u Beogradu

Muzej savremene umetnosti u Beogradu prikuplja, čuva, proučava, publikuje i izlaže jugoslovensku i srpsku umetnost od 1900. godine do danas. Fundus muzeja čine: zbirka slika od 1900 do 1945. godine, zbirka slika posle 1945. godine, zbirka skulptura, zbirka grafika i crteža, zbirka novih umetničkih medija. Deo eksponata ovog muzeja (slike, skulpture, fotografije) skladišten je u trezoru Narodne banke Srbije.

Edukativne igračke autora Marka Crnobrnje (Slika 22A) i fotografije „Nebo“ i „Zemlja“ (slika 22B) autora Aleksandra Rafajlovića bile su poslate u Istanbul radi učešća na izložbi Beogradsko iskustvo: Oktobarski salon. U skladištu Bursan, na ispostavi istanbulske carine u Halkali, desila se poplava nezapamćenih razmera. Skladište je bilo blokirano tokom dve nedelje, nakon čega je ugovoren povratak eksponata u Srbiju.



Slika 22. predmeti iz ispitivanih zbirki: **A.** računaljka, edukativna igračka autora Marka Crnobrnje; **B.** umetnička fotografija „Zemlja“ autora Aleksandra Rafajlovića

4 Materijal i metode

4.1 Materijal

4.1.1 Hranljive podloge

Za primarnu izolaciju mikromiceta sa uzorkovanih mesta korišćena je hranljiva podloga malt agar (MEA) sa dodatkom antibiotika (streptomycin ili sinacilin). Za dobijanje čistih kultura mikromiceta iz primarnih izolata korišćene su podloge MEA i Czapek-ov agar (CZA). Podloga MEA je korišćen i za testiranje antifungalne aktivnosti odabranih etarskih ulja i benzalkonijum hlorida metodama mikroatmosfera, makrodilucionom i metodom neutralizacije biocida. Kao hranljivi medijum u mikrodilucionoju metodi korišćen je tečni malt (MEB).

Malt agar (MEA)

ekstrakt slada	40 g
agar	15g
destilovana voda	1000 ml

Agar (15 g) sipati u 1000 ml destilovane vode, zatim zagrevati uz stalno mešanje do rastvaranja. Dodati 40 g ekstrakta slada i doliti do 1000 ml destilovane vode i prokuvati. Kiselost podloge regulisati na 6,5 – 6,8 korišćenjem 1N NaOH (Booth, 1971a).

Za primarne izolacije pre regulisanja pH podloge dodato je 500 mg odabranog antibiotika

MEB se priprema kao MEA samo bez dodatka agara (Booth, 1971a).

Czapek-ov agar (CZA)

NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,01 g
saharoza	30,0 g
agar	15 g
destilovana voda	1000 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvara se jedna po jedna so navedenim redosledom (NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄ × 7H₂O, KCl, FeSO₄ × 7H₂O). Naredna so se ne dodaje sve dok se prethodna potpuno ne rastvori. Nakon soli dodati 30 g saharoze i na kraju 15 g agara. Podlogu zagrevati uz stalno mešanje dok se agar potpuno ne rastvori, doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge se reguliše na 6,5 – 6,8 uz pomoć 1N NaOH (Booth, 1971a).

Pripremljene hranljive podloge su sterilisane u autoklavu (Raypa) na temperaturi od 114° C pod pritiskom od 0,08 Mpa u trajanju od 25 minuta.

4.1.2 Etarska ulja

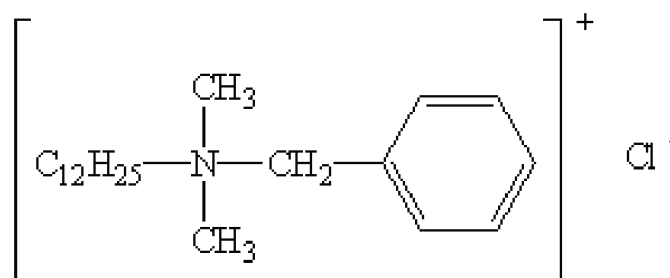
Testirana je antifungalna aktivnost etarskih ulja četiri aromatične biljke i ispitan njihov hemijski sastav. Sva ulja predstavljaju komercijalne uzorke dobijene od Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” u Beogradu (Tabela 1).

Tabela 1: Ispitivana etarska ulja

Aromatična biljka	Familija	Šifra
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (ruzmarin)	Lamiaceae	(Herba) impr 107 / 2002
<i>Lavandula angustifolia</i> Miller (lavanda)	Lamiaceae	Frey Lav
<i>Origanum vulgare</i> L. (origano)	Lamiaceae	(Po 125 062) Frey Lav
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don (smilje)	Asteraceae	Herba

4.1.3 Sintetički biocid

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti biocida koji se koriste u konzervaciji odabran je sintetički biocid benzalkonijum hlorid (BAC) (Slika 23). Vodeni rastvor BAC (50%) dobijen je u saradnji sa timom stručnjaka za restauraciju Zavoda za zaštitu spomenika kulture – Beograd.



Slika 23. Benzalkonijum hlorid, strukturna formula

4.1.4 Izolati

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti odabranih etarskih ulja i sintetičkog biocida BAC korišćeni su sledeći izolati mikromiceta: *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Aspergillus*

niger Tiegh, *Aspergillus ochraceus* G. Wilh., *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab., *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram, *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill., *Epicoccum purpurascens* Ehrenb, *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2. i *Trichoderma viride* Pers. Sve mikromicete na kojima je ispitivana antifungalna aktivnost izolovane su sa objekata kulturne baštine i sa umetničkih predmeta.

4.2. Metode

4.2.1 Uzorkovanje mikromiceta

Uzorkovanje mikromiceta sa čvrstih supstrata

Vijabilne propagule gljiva prisutne na površini spomenika kulture i umetničkih predmeta uzorkovane su sterilnim brisevima. U aseptičnim uslovima u bris je dodat 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora i sadržaj je homogenizovan vorteksom. Inokulacija je izvršena na MEA sa dodatkom antibiotika i Petri kutije inkubirane u termostatu na 25° C u trajanju 5 do 7 dana. Nakon razvoja primarnih izolata, morfološki različite kolonije su reinokulisane na podlogu MEA u cilju dobijanja čistih kultura za identifikaciju.

Uzorkovanje mikromiceta iz vazduha

Metodom pasivne sedimentacije izvršena je analiza kontaminacije vazduha vijabilnim propagulama gljiva u zatvorenim prostorijama izložbenih prostora i depoa muzeja. Veći broj otvorenih Petri kutija sa MEA sa antibiotikom je izloženo, na visini od 1 m iznad poda, u trajanju od 30 minuta. Nakon 7 do 15 dana inkubacije u termostatu na temperaturi od 25°C brojane su kolonije gljiva. Procena brojnosti spora gljiva u vazduhu izračunata je po formuli (Omelyansky, 1940):

$$N = 5a \times 10^4(bt)^{-1}$$

N – broj CFU/m³ vazduha

a – broj formiranih kolonija po Petri kutiji,

b – površina Petri kutije u cm²

t – vreme koliko je Petri kutija bila otvorena.

Relativna gustina mikromiceta u vazduhu zatvorenih prostorija, izražena u procentima, računata je po formuli (Smith, 1980):

$$\text{Relativna gustina} = (\text{broj kolonija određene vrste ili roda/ukupan broj kolonija}) \times 100$$

4.2.2 Uzorkovanje cijanobakterija i algi

Uzorci cijanobakterija i algi izeti su površinski sa kamenog supstrata kulturno-istorijskih spomenika. Uzorci su uzimani sa mesta sa simptomima diskolorizacije usled prisustva biopatine. Za uzorkovanje sa mesta sa očiglednim porastom biofilma korišćena je metoda adhezivne trake (Gaylarde i Gaylarde 1998; Urzi i Leo de, 2001).

4.2.3 Identifikacija mikromiceta

Identifikacija dobijenih izolata izvršena je na osnovu makroskopskih karakteristika kolonija i mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura monosporičnih kultura. Rezultati su dokumentovani originalnim fotografijama. Za svetlosnu mikroskopiju korišćen je mikroskop Zeiss Axio Imager M.1, sa softverom AxioVision Release 4.6. Za identifikaciju izolovanih mikromiceta korišćeni su dostupni ključevi: Raper i Fennel (1965), Rifai (1969), Booth (1971b), Ellis (1971, 1976), Ainsworth i dr. (1973), Arx von (1974), Ellis i Ellis (1997), Pitt (1979), Sutton (1980), Watanabe (2002) i Samson i dr. (2004).

4.2.4 Identifikacija cijanobakterija i algi

Preparati cijanobakterija i algi pravljani su u glicerinu i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom Zeiss Axio Imager M.1, sa softverom AxioVision Release 4.6. Identifikacija cijanobakterija i algi izvršena je uz pomoć ključeva: Elliot (1934), Starmach (1972), Komarek i Fott (1983), Laundon (1985), Krammer i Lange-Bertalot (1988), Komarek i Anagnostidis (1998; 2005), Lange-Bertalot (2001), Lenzenweger (2003).

4.2.5 Analiza hemijskog sastava etarskih ulja

Određivanje hemijskog sastava etarskih ulja urađeno je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”.

Kvantitativna i kvalitativna analiza dobijenih etarskih ulja izvršena je kombinacijom metoda gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije sa spektrometrijom masa (GC/MS).

Analiza etarskog ulja vršena je korišćenjem plameno-jonizujućeg (FID) i maseno-spektrometrijskog detektora (MSD). GS analiza je urađena na gasnohromatografskom aparatu HP-5890 series II koji je opremljen split-splitless injektorom, HP-5-srednje polarnom kolonom (25 m × 0.32 mm) i povezan sa plameno-jonizujućim detektorom (FID). Protok nosećeg gasa (H₂) je 1 ml min⁻¹. Rastvor etarskog ulja u etanolu injektovan je u split modu (1:30), temperatura injektora je bila 250 °C, detektora 300°C, dok je temperatura kolone povećavana programirano od 40-280°C, po 4°C/min. Za GC-MSD, korišćen je HP G1800 C serije, II GCD opremljen sa HP-5MS kolonom (30 m × 0,25 mm). Transfer linija je zagrejana na 280°C. EIMS spektri su snimani na 70 eV u opsegu *m/z* 40-300. Identifikacija jedinjenja izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenom referentnih terpenoida, metodom koinjektiranja, poređenjem masenih spektara (za šta je korišćena biblioteka masenih spektara (Wiley 275. L)) i na osnovu retencionih indeksa dobijenih korišćenjem kalibrisanog AMDIS programa u odnosu na literaturne podatke (Adams, 2007). Kvantifikacija je izvršena metodom normalizacije površina ispod GC pikova.

4.2.6 *In vitro* testovi za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja i biocida benzalkonijum hlorida

Metoda mikroatmosfera

Za ispitivanje uticaja etarskih ulja na rast micelije odabranih izolata korišćen je metoda mikroatmosfera (Singh i dr., 2006). Inokulacija test mikromiceta izvršena je na podlogu MEA iz 7 dana starih monosporičnih kultura. Inokulisane Petri kutije sa hranljivom podlogom su okrenute sa poklopcem na dole i na sredinu unutrašnje strane poklopca postavljen je sterilni filter disk Ø 1cm. Na filter papir mikropipetom nanete su odgovarajuće zapremine testiranih etarskih ulja. Za etarska ulja *R. officinalis*, *L. angustifolia* i *H. italicum* ispitivana je antifungalna aktivnost u opsegu koncentracija od 10 do 100 µl ml⁻¹, dok je za etarsko ulje *O. vulgare* korišćen opseg koncentracija od 0,1 do 2,0 µl ml⁻¹. Inokulisane podloge su inkubirane na 25°C. Dinamika rasta micelije praćena je svakih 7 dana merenjem prečnika kolonije tokom tri nedelje. Inhibicija rasta micelije izražena u procentima određena je formulom (Pandey i dr., 1982):

$$\% \text{ inhibicije} = 100 (dk - dt) / dt ,$$

dk – dijametar kontrolne kulture

dt – dijametar kolonije koja je rasla u uslovima aromatične atmosfere.

Najniža koncentracija ulja koja 100% inhibira rast micelije, u korišćenom opsegu koncentracija, je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Ukoliko nakon reinokulacije inokuluma na MEA, nije zabeležen rast micelije dobijena je minimalna fungicidna koncentracija (MFC).

Makrodiluciona metoda

Makrodiluciona metoda je korišćena za ispitivanje uticaja biocida BAC na rast micelije odabranih izolata (Ishi, 1995). Za razliku od metode mikroatmosfera biocid je dodat direktno u zagrejanu hranljivu podlogu (40°C) razlivenu u Petri kutije. Ispitivan je

antifungalni potencijal biocida u rasponu koncentracija od 0.1 do 5.0 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije, kao i MIC i MFC vrednosti određivane su na isti način kao u metodi mikroatmosfera.

Mikrodiluciona metoda

Mikrodilucionom metodom ispitivan je uticaj etarskih ulja i biocida BAC na germinaciju spora odabranih izolata (Hanel i Raether, 1998). Inokulum je pripremljen spiranjem spore sa površine 21 dana starih kulture na kosom MEA sterilnim fiziološkim rastvorom koji sa dodatkom 0.1% Tween 20. Suspenzija spora je dovedena do konačne koncentracije $1,0 \times 10^5 \text{ CFU ml}^{-1}$ pomoću hemocitometra. Tako pripremljen inokulum čuvan je na -20°C do upotrebe. Provera validnosti inokuluma i odsustva kontaminacije vršena je inokulacijom suspenzije spora na podlogu MEA pre upotrebe. Određene zapremine etarskih ulja ili biocida BAC dodavana je u „bunarčiće“ mikrotitracionih ploča u koje je prethodno dodat MEB sa suspenzijom spora. Za etarska ulja *R. officinalis*, *L. angustifolia* i *H. italicum* antifungalna aktivnost je ispitivana u opsegu koncentracija ulja od 10 do 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$, za etarsko ulje *O. vulgare* korišćen je opseg koncentracija od 0,1 do 2,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$, dok je za biocid BAC korišćen opseg od 0,1 do 5,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$.

Izvršene su dve varijante eksperimenta. U prvom slučaju mikrotitracione ploče su inkubirane na 28°C u trajanju od 24h. Germinacija konidija je zaustavljena dodavanjem standardne mikološke boje Lactofenol cotton blue. Na mikroskopsku pločicu je naneto, mikropipetom, 8 μl sadržaja svakog „bunarčića“. Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i brojane klijale i neklijale konidije. Za izolate koji se odlikuju sitnim globoznim ili subgloboznim konidijama, konidije su smatrane klijalim ako je dužina klijajuće cevčice bila jednaka ili veća od dijametra konidije. Za vrste koje se odlikuju krupnim porokonidijama, konidija je smatrana klijalom ako je klijajuća cevčica bila jednaka polovini dužine porokonidije ili veća. Poređenjem broja klijalih i neklijalih konidija određene su inhibitorne doze (ID). ID_{50} vrednost predstavlja onu koncentraciju antifungalnog agensa gde je uočen približno jednak broj klijalih i neklijalih konidija. ID_{95} vrednost predstavlja koncentraciju

antifungalnog agensa gde preovlađaju neklizale konidije, i njihov broj se procentualno kreće od 90 do 100%. U drugom slučaju mikrotitracione ploče su inkubirane na 28°C u trajanju 72h. Rast hifa i formiranje micelije u „bunarčićima“ posmatran je pod lupom. Najmanja koncentracija ispitivanog antifungalnog agensa gde nije detektovan rast hifa uzimana je za MIC vrednost. MFC je određivan reinokulacijom sadržaja „bunarčića“ gde je zabeležena inhibicije rasta na podlogu MEA. Najniža koncentracija antifungalnog agensa na kome nije došlo do obrazovanja kolonije nakon reinokulacije smatrana je MFC vrednošću.

Metod neutralizacije biocida

Metodom neutralizacije testiran je uticaj kontaktnog vremena na antifungalni potencijal niskih koncentracija biocida BAC (Tortorano i dr., 2005) Inokulum je pripremljen spiranjem spora sa površine 7 dana starih kultura na kosom MEA sterilnim fiziološkim rastvorom sa dodatkom 0,1% Tween 20. Suspenzija spora je dovedena do konačne koncentracije $1,5 \times 10^7$ CFU ml⁻¹ pomoću hemocitometra. 1 ml pripremljene suspenzije spora je dodat u vodeni rastvor BAC određene koncentracije i dopunjen do 10 ml sterilnom destilovanom vodom. Testirane koncentracije biocida iznosile su: 0,25 %, 0,15% i 0,05%. Biocidna aktivnost BAC je određivana za 4 kontaktna vremena (5, 15, 30 i 60 min). Na kraju svakog kontaktnog vremena, 1 ml testirane suspenzije i 1ml sterilne destilovane vode su dodati u 8 ml prethodno pripremljenog neutrališućeg rastvora (3% Tween 20, 0,3% lecitin, 0,1% histidin i 3% saponin). Nakon neutralizacije u trajanju od 5 minuta, 1 ml neutrališućeg rastvora je inokulisan na podlogu MEA, u duplikatu. Inokulisane Petri kutije su inkubirane na 24°C u trajanju od 48h.

Redukcija vijabilnosti konidija za dato kontaktno vreme izračunava se kao: odnos $N \times 10^{-1} / N_a$.

N_a – srednja vrednost broja kolonija na obe Petri kutije pomnožene sa faktorom razblaženja 10^2 .

Početna suspenzija konidija je razblažena do konačnih koncentracija $1,5 \times 10^2$ CFU ml⁻¹ i $1,5 - 5 \times 10^1$ CFU ml⁻¹ i po 1 ml obe suspenzije se u duplikatu inokulisane na MEA.

Inokulisane Petri kutije se inkubiraju na 24° C u trajanju od 48h. Broj CFU po ml (N) određuje se pomoću formule:

$$N = c / (n_1 + 0.1n_2) \times d ,$$

c- zbir svih kolonija formiranih na sve četiri Petri kutije

n₁, n₂ – broj Petri kutija prvog i drugog razblaženja

d- faktor razblaženja u poređenju sa prvim rastvorom

4.2.7 Statistička obrada rezultata

Sva merenja tokom eksperimenata metode mikroatmosfera, makrodilucione, i mikrodilucione metode su vršena u najmanje tri ponavljanja radi statističke obrade rezultata u programu Microsoft Excel 2003. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost više merenja ± standardna greška. Statistički test One way ANOVA je korišćen za statističku obradu rezultata dobijenih u *in vitro* testovima za ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja i biocida BAC, na nivou značajnosti p<0,05.

5 Rezultati i diskusija

5.1 Biofilm na kamenom supstratu kulturno-istorijskih spomenika u Srbiji

Analiza biofilma u ovom istraživanju obuhvatila je kulturno-istorijske spomenike: Crkvu Svete Bogorodice manastira Gradac (**MG**), Ajfelovu Prevodnicu na ušću Velikog bačkog kanala u Tisu (**AP**), Spomenik Neznamom junaku na Avali (**NJ**), Brankov most u Beogradu (**BM**) i srednjovekovne kamene stećke na lokalitetima Mramorje i Rastište kod Bajine Bašte (**SS**). Uzorkovanje je izvršeno sa više tipova kamenog supstrata, sa karbonatnog kamena na lokalitetima MG i SS, sa mermera na lokalitetu MG, sa kamena peščara na lokalitetima AP i BM i sa granita na lokalitetu NJ.

5.1.1 Analiza biofilma na fasadi Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac

Opservacija in situ i simptomi

Opservacijom *in situ* konstatovana je biodeterioracija visokog stepena na pojedinim delovima fasade. Uočeni su brojni epilitski lišajevi uglavnom krustoznog tipa (Slika 24C), mahovine i paprati (Slika 24E), a na pojedinim mestima i biljke cvetnice (Slika 24F) što ukazuje na dugogodišnju sukcesiju. Uzorci biofilma su uzeti sa mesta promenjene teksture

površine karbonatnog kamena i simptomima biopatine na velikim površinama (Slika 24A i B). Biopatina se manifestovala u vidu prevlaka različite obojenosti, teksture i forme. Dominantna biopatina na fasadnim zidovima je bila tamno crvena, crna i zelenkasta (Slika 24C i D).



Slika 24. Simptomi biodeterioracije fasade Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac: **A.** biopatina na fasadi i ulaznim vratima crkve; **B.** promene u teksturi i pukotine na fasadi; **C.** crna biopatina na mermernom stubu; **D.** crveno obojena biopatina na oštećenoj površini maltera; **E.** mahovine i paprati na oštećenoj površini kamena; **F.** biljke cvetnice u pukotinama devastiranog stuba

Sastav zajednice biofilma

Sa 7 uzorkovanih mesta sa vidljivim simptomima biodeterioracije identifikovano je 9 taksona gljiva, dva taksona cijanobakterija i dva taksona algi (Tabela 2).

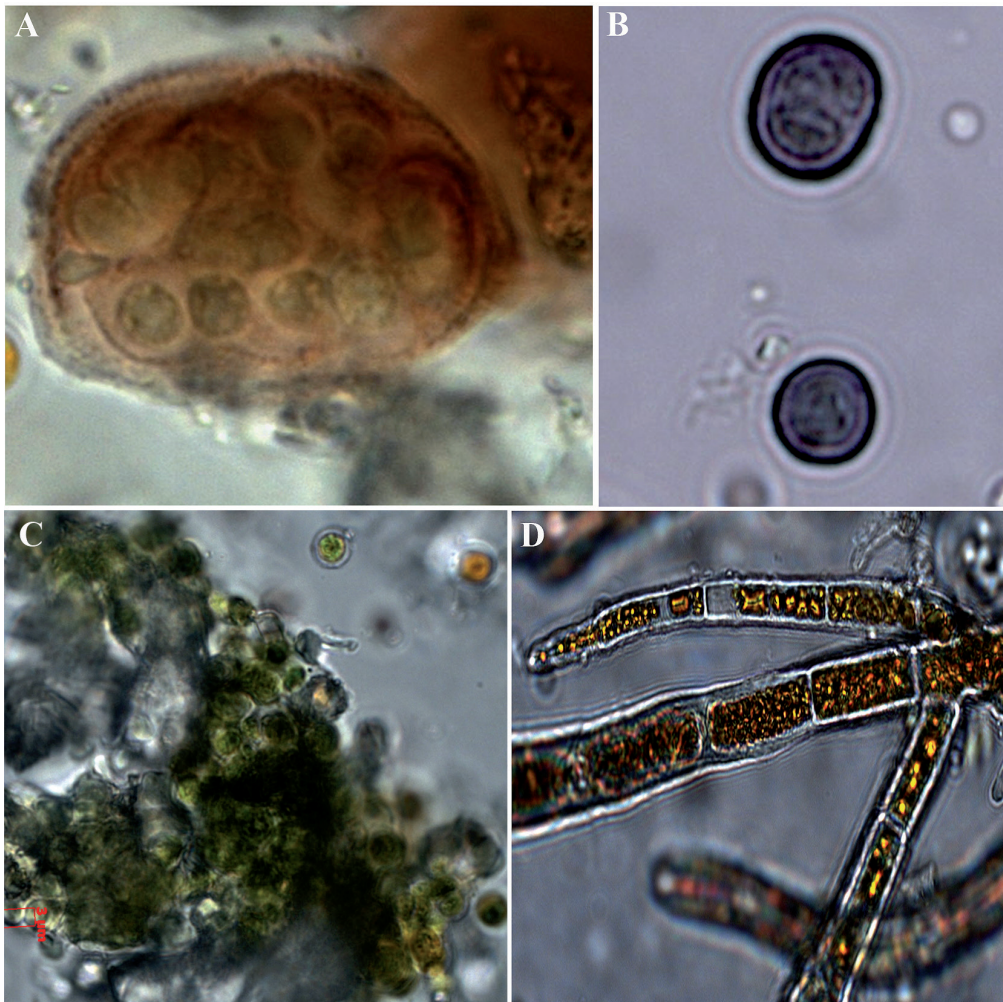
Najveći broj taksona gljiva pripada klasi Hyphomycetes podrazdela Deuteromycotina (8), dok je *Sporobolomyces roseus* Kluyver & C.B. Niel jedini pripadnik klase Blastomycetes. Dominiraju predstavnici grupe Dematiaceae sa 6 izolata, uključujući i neidentifikovani izolat označen kao *Mycelia sterilia* (Tabela 2).

Tabela 2. Mikromicete, cijanobakterije i alge u biofilmu na fasadi Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac (MG)

Šifra uzorka	Simptomi	Mikromicete	Cijanobakterije i alge
MG1	- tamno crvena biopatina u udubljenju u zidu		<i>Gloeocapsa sanguinea</i> (C.Agarth) Kützing <i>Desmococcus olivaceus</i> (Pers. ex Achar.) J.R.Laundon Ciste neidentifikovane zelene alge
MG2	- crna biopatina - vaskularne biljke u pukotinama	<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	
MG3	- sivo-braon biopatina - pukotine i lezije	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Penicillium</i> Link spp.	
MG4	- zelenkasto-narandžasta biopatina - mahovine	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Penicillium</i> Link spp. <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	<i>Trentepohlia aurea</i> (Linnaeus) C.F. P. Martius
MG5	- zelenkasto-narandžasta biopatina	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Nigrospora sphaerica</i> . (Sacc.) Mason <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	<i>Gloeocapsa violacea</i> (Corda) Rabenhorst <i>Trentepohlia aurea</i> (Linnaeus) C.F. P. Martius
MG6	- zeleno-braon biopatina; - mahovine i krupni foliozni i krustozni lišajevi	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Fusarium</i> Link spp. <i>Sporobolomyces roseus</i> Kluyver & C.B. Niel <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	<i>Desmococcus olivaceus</i> (Pers.ex Achar.) J.R.Laundon <i>Gloeocapsa violacea</i> (Corda) Rabenhorst <i>Trentepohlia aurea</i> (Linnaeus) C.F. P. Martius
MG7	- crna biopatina na mermemom stubu - krustozni i skvamulozni epilizski lišajevi - biopitting	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Sporobolomyces roseus</i> Kluyver & C.B. Niel <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	

Iz grupe cijanobakterija identifikovani su kokalni pripadnici reda Chroococcales, *Gloeocapsa sanguinea* (C.Agardh) Kützing i *G. violacea* (Corda) Rabenhorst, dok su identifikovane alge iz razdela Chlorophyta i to kokalna vrsta *Desmococcus olivaceus* (Pers.ex Achar.) J.R. Laundon (Prasiolales, Trebouxiophyceae) i trihalna *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) C.F.P. Martius (Trentepohliales, Ulvophyceae) (Tabela 2).

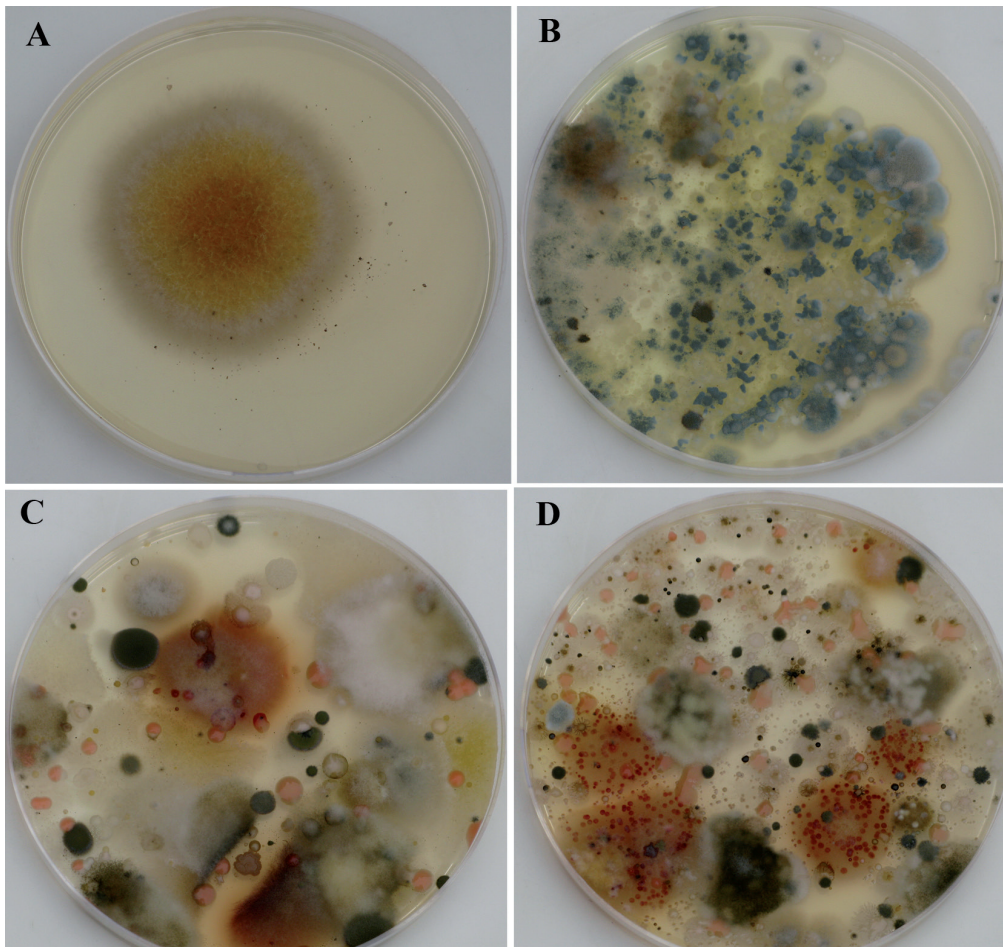
U uzorcima uzetim metodom adhezivne trake sa mesta sa simptomima tamno crvene biopatine kao dominantna vrsta identifikovana je svetlosnom mikroskopijom *G. sanguinea* (Slika 25A). Analizom fragmenta SAB uočavaju se kolonije sa debelim crveno obojenim galertnim omotačima, koje su gusto pakovane zajedno sa agregatima ćelija *D. olivaceus*



Slika 25. Cijanobakterije i alge u biofilmu na fasadi Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac: **A.** kolonija *Gloeocapsa sanguinea*; **B.** kolonije *Gloeocapsa violacea*; **C.** agregati ćelija *Desmococcus olivaceus* sa neorganskim sadržajem; **d.** trihomi *Trentepohlia aurea*

(Slika 25C) čineći kompaktni sloj biofilma. Na mestima sa narandžasto-zelenom biopatinom konstatovana je dominacija trihalne, zelene alge *T. aurea* (Slika 25D). U uzorku biofilma trihomi *T. aurea* sa kolonijama *G. violacea* (Slika 25B) i gusto pakovanim agregatima *D. olivaceus* formiraju sloj narandžasto-zelene biopatine na fasadi u vidu somotaste prevlake.

Nakon perioda inkubacije uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa dobijeni su primarni izolati (mešovite kulture) filamentoznih gljiva i kvasaca (Slika 26). U skoro svim uzorcima bile su dominantne vrste iz familije Dematiaceae: *E. purpurascens* (Slika 26A), *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *Alternaria* spp. i *N. sphaerica* kao i kvasci i aktinomicete (Slika 26C i D). U uzorku MG3 *Penicillium* spp. je bio zastupljen sa velikim brojem kolonija (Slika 26B).

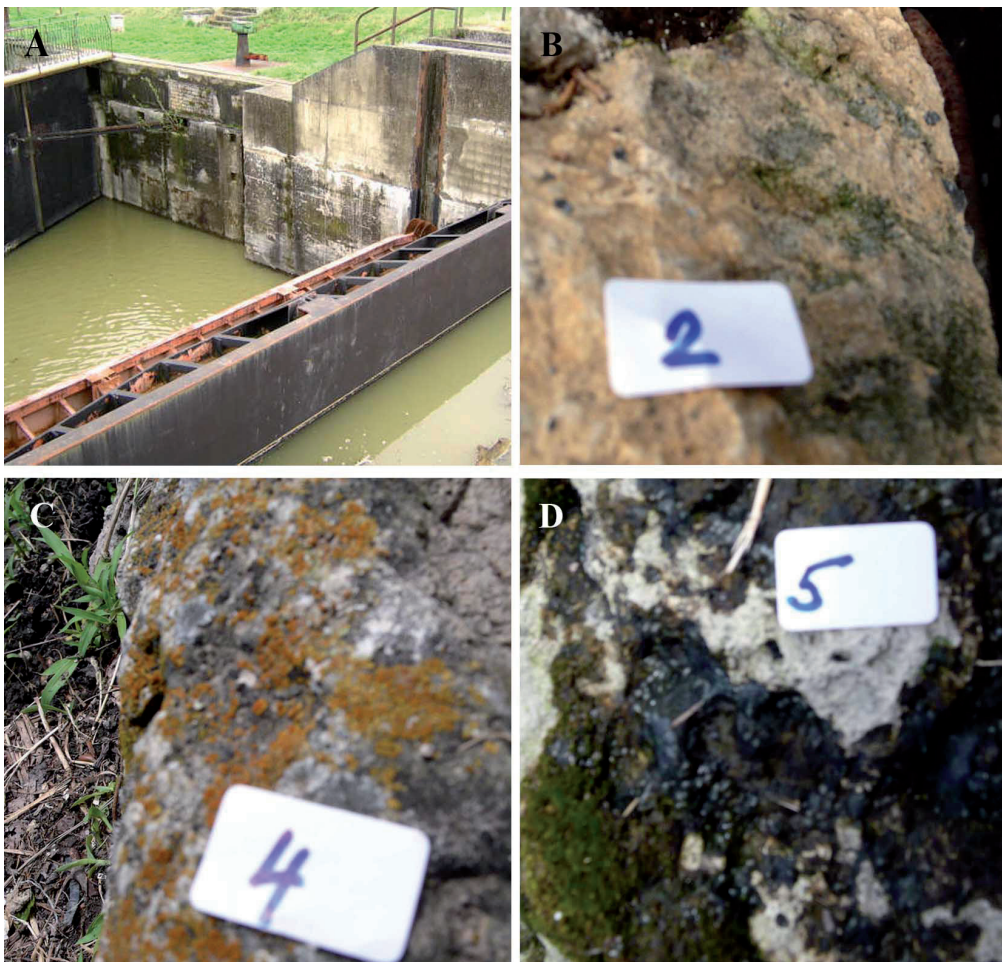


Slika 26. Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa fasade Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac: **A.** *Epicoccum purpurascens*, monosporična kultura (MG2); **B.** *Penicillium* spp., kolonije u masi (MG3); **C.** kolonije dominantnih predstavnika Dematiaceae (MG6); **D.** dominantne kolonije kvasaca i aktinomiceta (MG7)

5.1.2 Analiza biofilma sa Ajfelove prevodnice

Opservacija in situ i simptomi

Opservacijom *in situ* konstatovana je biodeterioracija visokog stepena na pojedinim delovima Ajfelove prevodnice, kao što su izmenjen izgled površine kamena i prisustvo zelene i crne biopatine na velikim površinama (Slika 27A, B i D). Uočeni su i brojni epilitski lišajevi krustoznog tipa (Slika 27C). Talusi pojedinih lišaja dostižu i nekoliko desetina centimetara i pokrivaju veliku površinu kamenog supstrata. Uzorci biofilma su uzeti na mestima izmenjenog izgleda sa promenama u teksturi površine kamena i simptomima biopatine na velikim površinama.



Slika 27. Simptomi biodeterioracije kamena peščara Ajfelove prevodnice: **A.** velike površine prekrivene crnom i zelenom biopatinom; **B.** izmenjena tekstura kamena sa biofilmom; **C.** izmenjena tekstura kamena sa krustoznim lišajevima; **D.** biopatina u vidu crne želatinozne prevlake

Sastav zajednice biofilma

Sa 8 uzorkovanih mesta kamenog supstrata Ajfelove prevodnice identifikovano je 13 taksona gljiva, četiri taksona cijanobakterija i dva taksona algi (Tabela 3).

Najveći broj identifikovanih gljiva (12 taksona) pripada klasi Hyphomycetes (Deuteromycotina) dok je samo *Rhizopus stolonifer* (Ehreb.) Vuill. iz klase Zygomycetes (Zygomycotina). Izolati su identifikovani do nivoa roda ili vrste, dok su izolati koji u kulturama nisu formirali reproduktivne strukture označeni kao *M. sterilia* (Tabela 3).

Četiri identifikovana taksona cijanobakterija nalaze se na trihalnom stupnju morfološke organizacije. *Leptolyngbya* sp. i *Microcoleus vaginatus* (Vaucher) Gomont ex Gomont pripadnici su reda Oscillatoriales, dok su *Nostoc* sp. i *Stigonema ocellatum* (Dillwyn) Thuret ex Bornet & Flauhault pripadnici reda Nostocales.

Razdeo Chlorophyta je zastupljen sa 2 taksona: jednoćelijskom algom *Haematococcus* sp. (Chlamydomonadales, Chlorophyceae) i agregatima ćelija vrste *Desmococcus olivaceus* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) (Tabela 3).

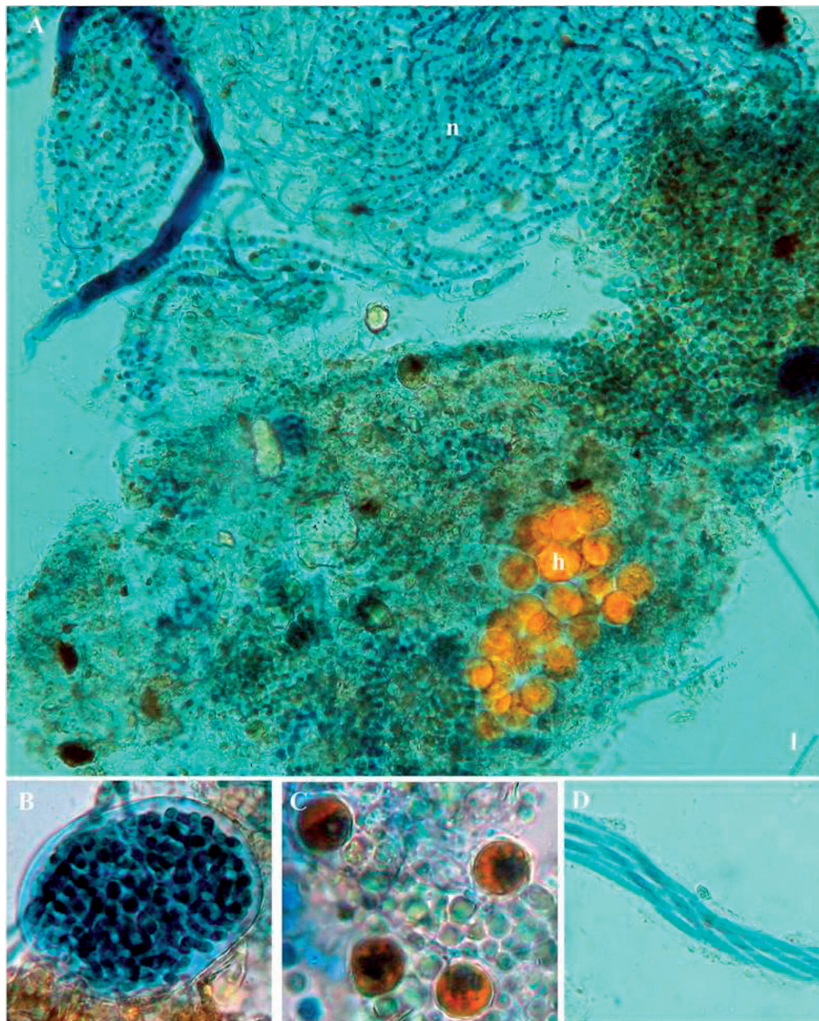
U uzorcima sa mesta izrazito katranaste biopatine, čvrste želatinozne konzistencije, uočene su direktnim posmatranjem na svetlosnom mikroskopu dominantne loptaste kolonije filamentozne cijanobakterije *Nostoc* sp. (Slika 28A i B). Filamenti ove vrste su gusto isprepletani sa drugim fototrofnim komponentama SAB: filamenti *Leptolyngbya* sp. (Slika 28A i C), ciste *Haematococcus* sp. (Slika 28A i D) i filamenti *M. vaginatus* (Slika 28D).

Posmatranjem fragmenta kamena pod binokularnim mikroskopom identifikovan je krustozni lišaj *Caloplaca* sp. Na površini kamenog supstrata su prisutne narandžaste apotecije (Slika 29A), dok je na uzdužnom preseku kamena uočeno prodiranje hifa u dublje slojeve poroznog kamena. Fotobiont ove vrste čini zelena alga *Trebouxia* sp. (Slika 29B), dok je mikobiont gljiva iz klase Discomycetes, Ascomycotina.

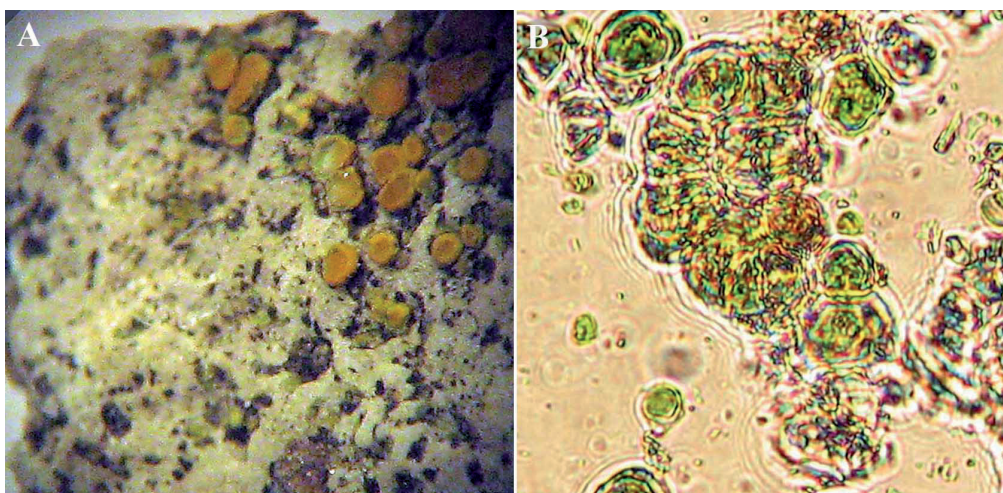
Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (mešovite kulture) na MEA sa antibiotikom uzeti metodom sterilnog brisa (Slika 30). Od 13 identifikovanih taksona gljiva vrsta *Acremonium strictum* W. Gams sa porastom u vidu belih spororastućih kolonija je bila prisutna i dominantna u svim uzorcima (Slika 30A-D). U nekim uzorcima broj kolonija *A. strictum* po

Tabela 3. Mikromicete, cijanobakterije i alge u biofilmu na Ajfelovoj Prevodnici na ušću Bačkog kanala u Tisu

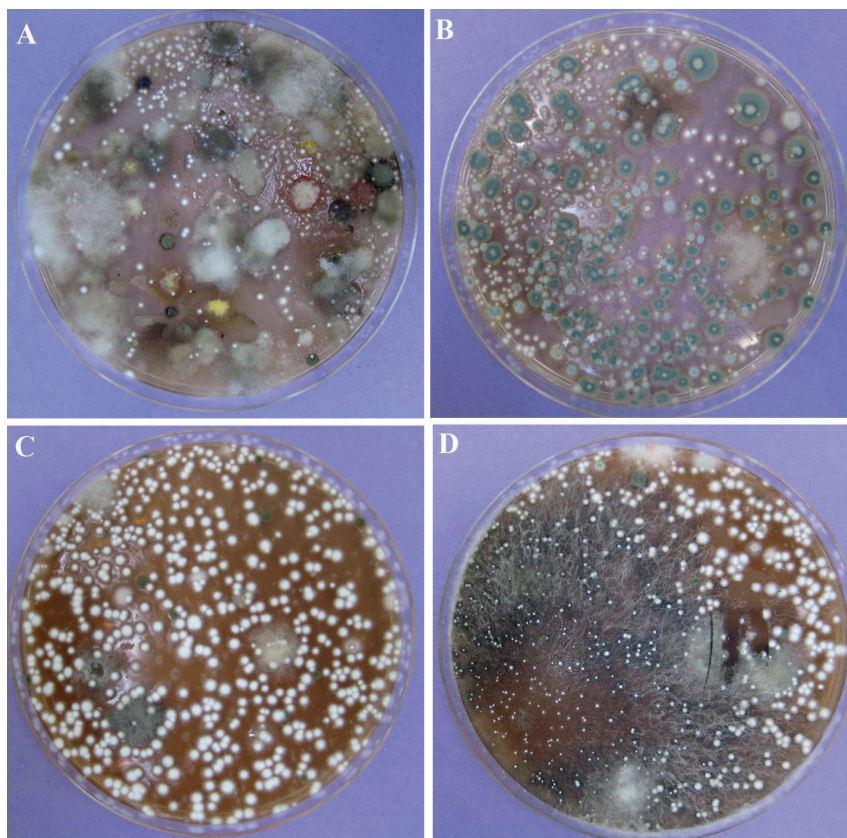
Šifra uzorka	Simptomi	Mikromicete	Cijanobakterije i alge
AP1	- eksofolijacija kamena	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Penicillium expansum</i> Link <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill	
AP2.	- tamna biopatina	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. A. Maund <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Drechslera dematidea</i> (Bubák & Wrobl.) Scharif <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	<i>Nostoc</i> Vaucher ex Bornet & Flahault sp. <i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek sp. <i>Haematococcus</i> Flotow sp. <i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R. Laundon <i>Stigonema ocellatum</i> (Dillwyn) Thuret ex Bornet & Flahault
AP3	- tamna biopatina	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Drechslera dematidea</i> (Bubák & Wrobl.) Scharif <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	
AP4	- eksofolijacija sa tamnom pigmentacijom	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Drechslera dematidea</i> (Bubák & Wrobl.) Scharif <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Penicillium expansum</i> Link	
AP5	- crna želatinozna biopatina	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Aspergillus terreus</i> Thom <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	<i>Nostoc</i> Vaucher ex Bornet & Flahault sp. <i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek sp. <i>Haematococcus</i> sp. Flotow
AP6	- krustozni lišaji	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Alternaria</i> spp. Nees <i>Bipolaris spicifera</i> (Bainier) Subram <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Fusarium</i> spp. Link	<i>Nostoc</i> Vaucher ex Bornet & Flahault sp. <i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek sp. <i>Haematococcus</i> Flotow sp.
AP7	- zelenkasta biopatina	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Drechslera dematidea</i> (Bubák & Wrobl.) Scharif <i>Penicillium expansum</i> Link	<i>Nostoc</i> Vaucher ex Bornet & Flahault sp. <i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek sp. <i>Haematococcus</i> Flotow sp. <i>Microcoleus vaginatus</i> (Vaucher) Gomont ex Gomont
AP8	- eksofolijacija sa tamnom pigmentacijom	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams <i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Mycelia sterilia</i>	



Slika 28. Cijanobaterije i alge u biofilmu Ajfelove prevodnice:
A. filamenti *Nostoc* sp. (n) i *Leptolyngbya* sp. (l) sa cistama *Haematococcus* sp. (h); **B.** kolonija *Nostoc* sp.; **C.** ciste *Haematococcus* sp.; **D.** isprepletani filamenti *Microcoleus vaginatus* u zajedničkoj sari



Slika 29. *Caloplaca* sp.: **A.** krustozni talus sa apotecijama; **B.** fotobiont *Trebouxia* sp.



Slika 30. Primarni izolati filamentoznih gljiva (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa kamena peščara Ajfelove prevodnice: **A.** kolonije sa dominacijom predstavnika Dematiaceae (AP6); **B.** kolonije sa dominacijom *Penicillium expansum* (AP7); **C.** kolonije sa dominacijom *Acremonium strictum* (AP3); **D.** kolonije sa dominacijom *Acremonium strictum* i predstavnicima Dematiaceae (AP2)

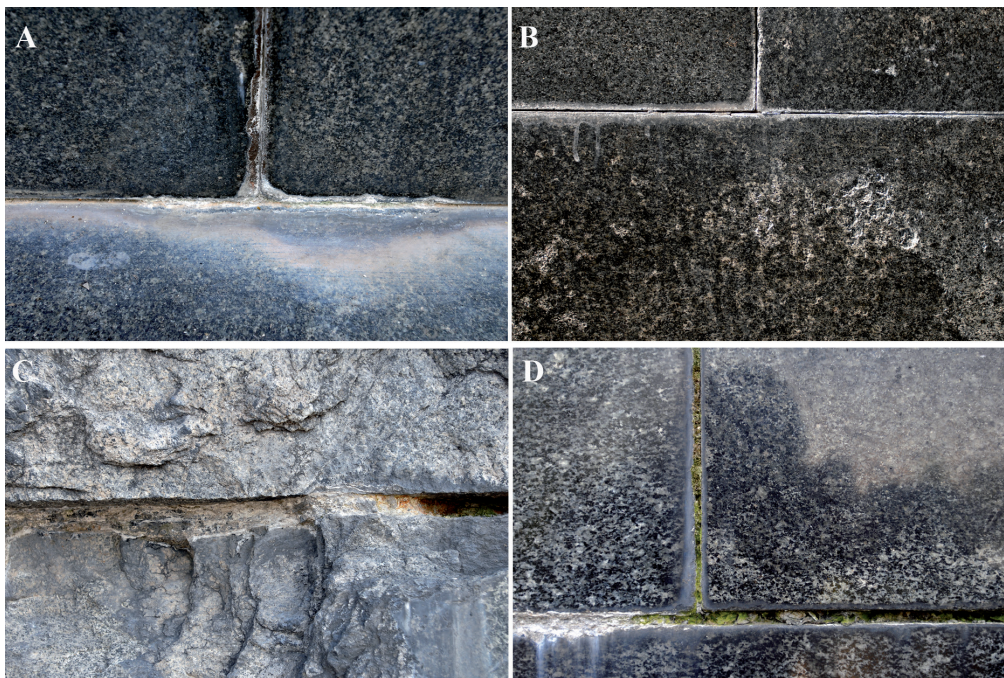
Petri kutiji (CFU) iznosio je više od 500 (Slika 30C). Na uzorkovanom mestu AP7 dominirala je vrsta *Penicillium expansum* Link sa CFU vrednošću preko 300 kolonija po Petri kutiji (Slika 30B). U skoro svim uzorcima zabeležene su morfološki različite kolonije braon i crne boje vrste rodova: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechslera* i *Epicoccum* (Slika 30A-D).

5.1.3 Analiza biofilma sa Spomenika Neznamom junaku na Avali

Opservacija in situ i simptomi

Opservacijom *in situ* konstatovana je biodeterioracija na pojedinim delovima granitnog supstrata na Spomeniku Neznamom junaku na Avali. Uzorci biofilma su uzeti na

mestima izmenjenog izgleda, sa promenama u teksturi površine kamena i simptomima biopatine na velikim površinama, ali i sa površina na kojima nije bilo simptoma deterioracije. Najupečatljivija promena u izgledu površine granita bila je eksfolijacija (ljuspanje) sa suvim, belim prevlakama (Slika 31A i B), a biopatina na ovom spomeniku se manifestovala u vidu narandžastih i zelenih prevlaka u pukotinama i spojnica između granitnih ploča (Slika 31C i D).



Slika 31. Simptomi deterioracije granitnog Spomenika Neznamom junaku na Avali: **A.** izmenjena tekstura površine granita sa depozitom soli; **B.** eksfolijacija granita sa depozitom soli; **C.** narandžasta biopatina u pukotini spomenika; **D.** zelena biopatina u spojnici granitnih ploča

Sastav zajednice biofilma

Sa ukupno 11 uzorkovanih mesta sa granitnog supstrata i vezivnog maltera u pukotinama i spojnica granita identifikovano je 11 taksona gljiva, jedan takson cijanobakterija i pet taksona algi (Tabela 4).

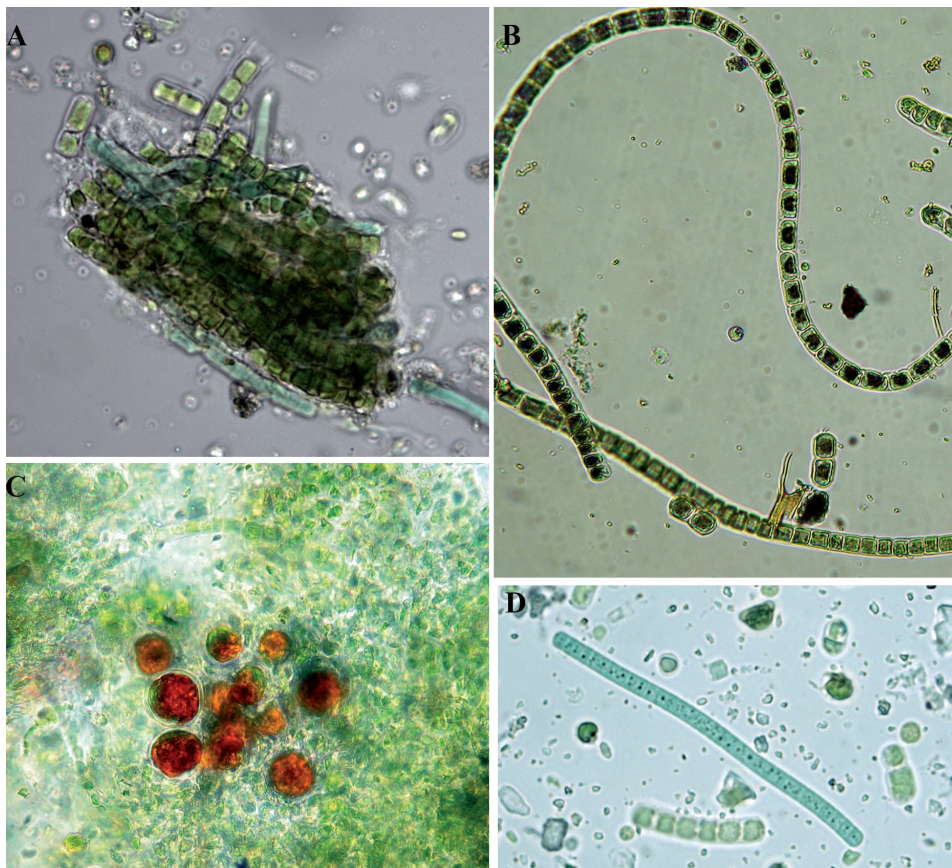
Najveći broj taksona gljiva (9) pripada klasi Hyphomycetes, Deuteromycotina, dok je 2 taksona iz klase Zygomycetes, Zygomycotina. Izolati koji u datim uslovima kultivacije nisu formirali reproduktivne strukture označeni su kao *M. sterilia* (Tabela 4).

Tabela 4. Mikromicete, cijanobakterije i alge u biofilmu na Spomeniku Neznanog junaka na Avali

Šifra uzorka	Simptomi	Mikromicete	Cijanobakterije i alge
NJ1	- podklobučenje i eksfolijacija	<i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana) <i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz. <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Mycelia sterilia</i>	<i>Navicula veneta</i> Kützing
NJ2	- bez vidljivih simtoma		
NJ3	- bez vidljivih simtoma	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	
NJ4	- tamna biopatina	<i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Mucor</i> P. Micheli ex L. sp. <i>Fusarium</i> Link sp.	
NJ5	- bez vidljivih simtoma	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Drechlera dematoides</i> (Bubák & Wróbl.) Scharif <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Mycelia sterilia</i>	
NJ6	- tamna biopatina		
NJ7	- bez vidljivih simtoma	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz. <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb Kvasci	<i>Navicula veneta</i> Kützing
NJ8	- zelena biopatina na vezivnom malteru)	<i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt <i>Fusarium</i> sp. Link <i>Mucor</i> P. Micheli ex L. Sp. <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	<i>Oscillatoria</i> Vaucher ex Gomont sp.
NJ9	- zelena biopatina na vezivnom malteru	<i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	<i>Oscillatoria</i> Vaucher ex Gomont sp. <i>Cylindrocapsa</i> Reinsch sp. <i>Cylindrocistis brebissonii</i> (Ralfs) de Bary <i>Microspora</i> Thuret sp.
NJ10	- bez vidljivih simtoma	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	
NJ11	- crveno-narandžasta biopatina u pukotini između granitnih ploča	<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt <i>Mucor</i> P. Micheli ex L. sp. <i>Mycelia sterilia</i> (melanizovana)	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow

Identifikovana cijanobakterija je vrsta roda *Oscillatoria*, pripadnik reda Oscillatoriales, na trihalnom stupnju morfološke organizacije. Iz razdela Chlorophyta identifikovana su 5 pripadnika: *Cylindrocapsa* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae), *Cylindrocistis brebissonii* (Ralfs) de Bary (Zygnematales, Zygnematomyceae), *Microspora* sp. (Microsporales, Chlorophyceae) i *Haematococcus pluvialis* Flottow (Chlamydomonadales, Chlorophyceae). Razdeo Bacillariophyta je zastupljen samo sa vrstom *Navicula veneta* Kützing (Naviculales, Bacillariophyceae) (Tabela 4).

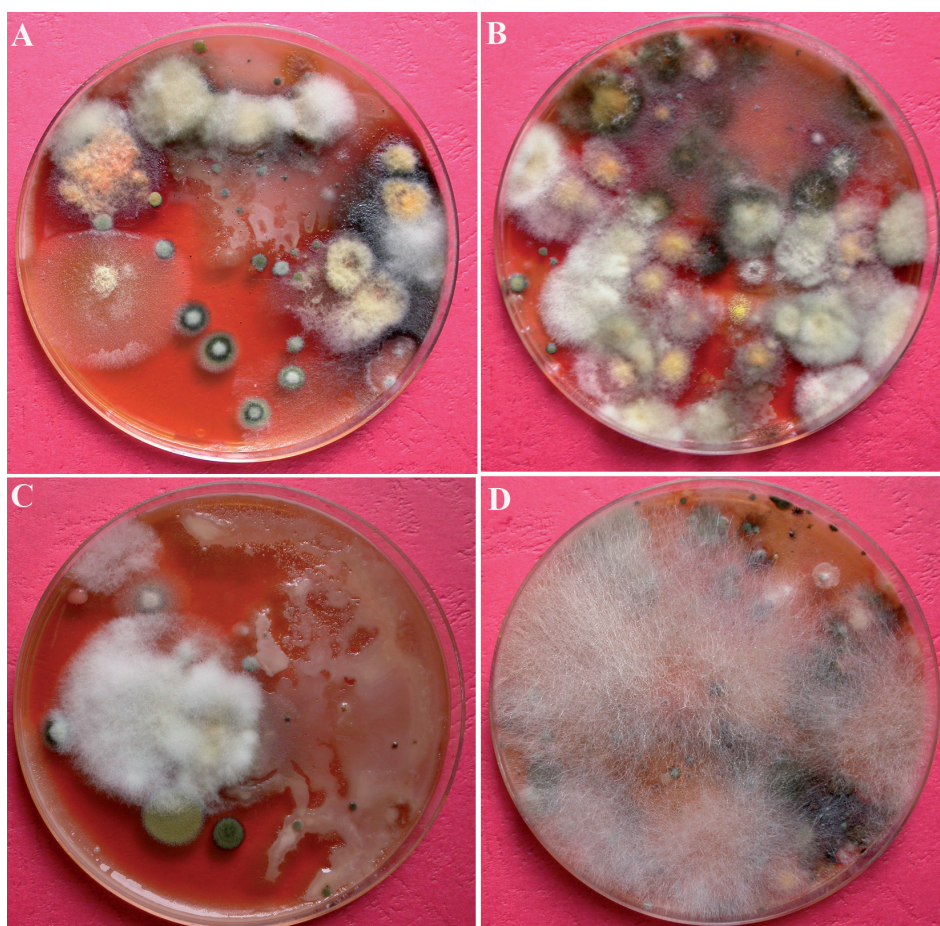
Kao dominantna vrsta, identifikovana direktnim posmatranjem svetlosnim mikroskopom, u uzorcima sa mesta sa simptomima narandžaste biopatine bila je zelena alga *H. pluvialis* (Slika 32C). U uzorcima sa simptomima zelene biopatine na vezivnom malteru kao dominantne vrste su identifikovane cijanobakterija *Oscillatoria* sp. (Slika 32D), i zelena alga *C. brebissonii* (Slika 32B), koje se gusto prepliću formirajući kompaktni sloj biofilma (Slika 32A). Komponentu SAB čine hife, hlamidospore i konidije gljiva gusto ispreletane sa ćelijama cijanobakterija i zelenih algi, formirajući kompaktni sloj.



Slika 32. Cijanobakterije i alge u biofilmu na površini Spomenika Neznamom junaku na Avali: **A.** isprepletani trihomi zelene alge i cijanobakterije; **B.** trihom *Cylandrocistis brebissonii*; **C.** ciste *Haematococcus pluvialis*; **D.** trihomi *Oscillatoria* sp.

Nakon 7 dana inkubacije Petri kutija (MEA sa antibiotikom) inokuliranih brisevima razvile su se filamentozne gljiva i kvasci (Slika 33A-D). Identifikacija mikromiceta pokazala je dominaciju vrsta iz familije Dematiaceae koje su bile prisutne na svim uzorkovanim mestima (*Alternaria* spp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp.) (Slika 33 A). Pripadnici

Zygomycotina, *Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt. i *Mucor* sp., zabeleženi su na tri uzorkovana mesta (Slika 33D). Najveću kvantitativnu zastupljenost po jednom uzorku imale su dve vrste roda *Aspergillus* (*A. flavus* Link i *A. versicolor*) čiji je CFU iznosio oko 50 kolonija po Petri kutiji (Slika 33B).



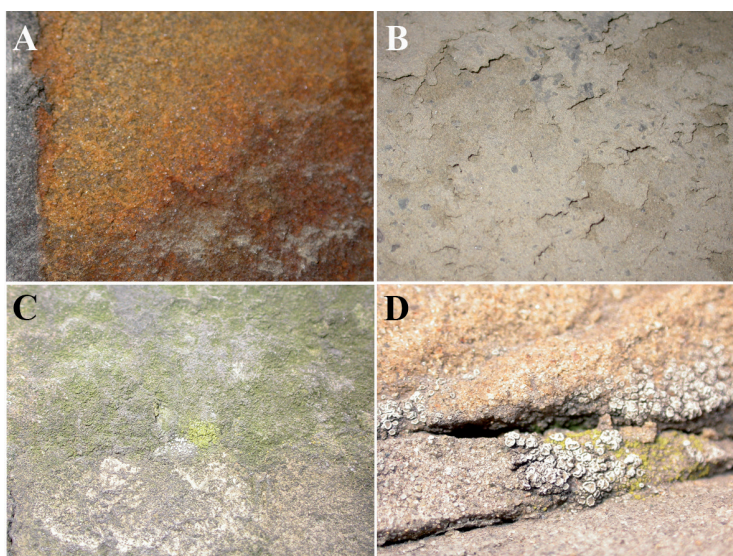
Slika 33. Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa površine Spomenika Neznamom junaku na Avali: **A.** kolonije sa dominacijom predstavnika Dematiaceae (NJ7); **B.** kolonije sa dominacijom *Aspergillus flavus* i *A. versicolor* (NJ9); **C.** kolonije sa dominacijom kvasaca (NJ6); **D.** invazivni rast pripadnika Zygomycotina (NJ8)

5.1.4 Analiza biofilma sa stubova Brankovog mosta u Beogradu

Opservacija in situ i simptomi

Direktnom opservacijom *in situ* kamena peščara na stubovima Brankovog mosta u Beogradu primećena je eksfolijacija kao najzastupljeniji simptom biodeterioracije (Slika

34B). Prisutni su i simptomi biopatine u vidu zelenih i narandžastih prevlaka na velikim površinama (Slika 34A i C). Uzorci biofilma su uzeti na mestima izmenjenog izgleda sa promenama u teksturi površine kamena i simptomima biopatine. Epilitski lišajevi krustoznog tipa (Slika 34D) i mahovine su takođe zastupljeni ali sa malom učestalošću.



Slika 34. Simptomi deterioracije površine kamena peščara na stubovima Brankovog mosta: **A.** narandžasta patina; **B.** eksfolijacija površine kamena peščara; **C.** zelena biopatina; **D.** apotecije krustoznih lišajeva

Sastav zajednice biofilma

Sa 8 uzorkovanih mesta identifikovano je 12 taksona gljiva, 4 taksona cijanobakterija i 7 taksona algi (Tabela 5).

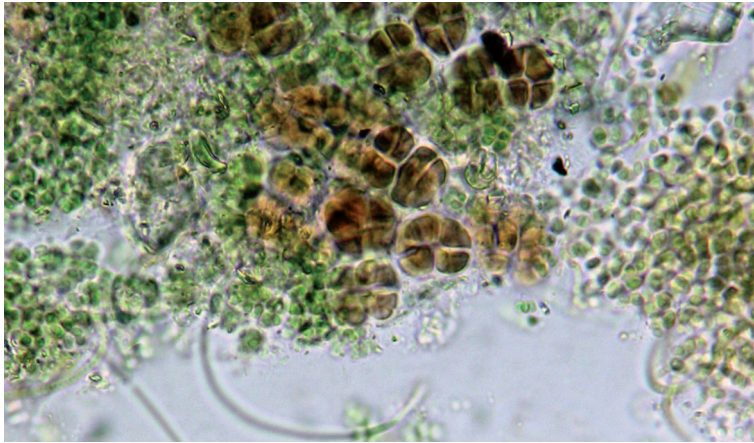
Podrazdelu Deuteromycotina pripada 11 taksona: 10 klasi Hyphomycetes a samo *Phoma* sp. klasi Coelomycetes. *Mucor racemosus* Bull. je jedini pripadnik klase Zygomycetes (Zygomycotina). I u ovim uzorcima su prisutni izolati bez reproduktivnih struktura, tj. *M. sterilia*. Kvasci su bili prisutni u dva uzorka (Tabela 5).

Cijanobakterije su bile zastupljene sa 3 kokalna pripadnika iz reda Chroococcales i jednim filamentoznim pripadnikom reda Oscillatoriales (*Leptolyngbia*). Alge su zastupljene sa 7 taksona: 6 iz razdela Bacillariophyta i jedan iz razdela Chlorophyta. Jedini identifikovan takson zelenih algi je jednoćelijska vrsta, *D. olivaceus* (Prasiolales, Trebouxiophyceae), koja formira agregate ćelija. Pet identifikovanih taksona silikatnih algi pripada redu Naviculales, Bacillariophyceae, dok je *Planothidium frequentissimum* var. *magnum* (F.Straub) Lange-Bertalot jedini pripadnik reda Achnanthes (Tabela 5).

Tabela 5. Mikromicete, cijanobakterije i alge u biofilmu na stubovima Brankovog mosta u Beogradu

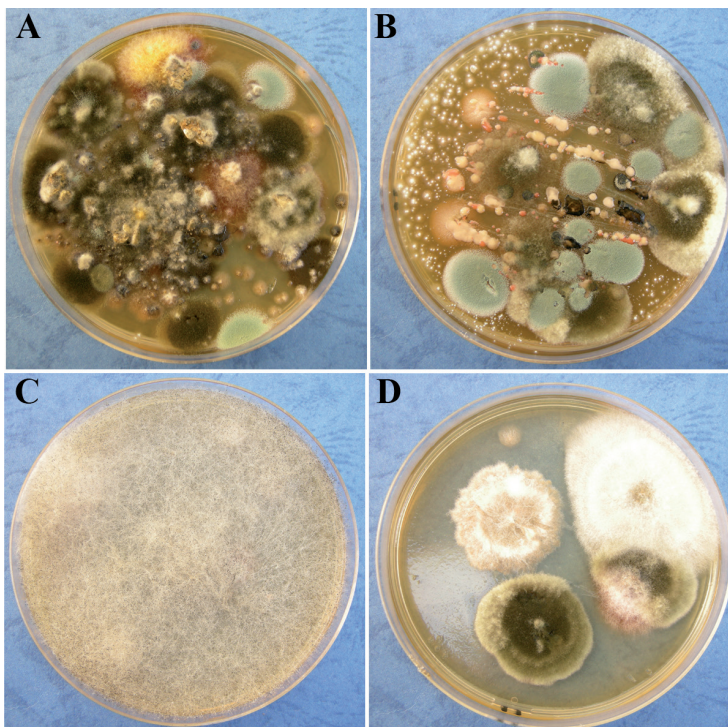
Šifra uzorka	Simptomi	Mikromicete	Cijanobakterije i alge
BM1	- eksofolijacija	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries <i>Phoma</i> Fr. Sp. <i>Mycelia sterilia</i>	<i>Luticola</i> D.G.Mann sp. <i>Navicula veneta</i> Kützing <i>Nitzschia communis</i> Grunow <i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow <i>Nitzschia inconspicua</i> Grunow <i>Planothidium frequentissimum</i> var. <i>magnum</i> (F.Straub) Lange-Bertalot
BM2	- zelena biopatina	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Fusarium</i> Link sp. <i>Paecilomyces varioti</i> Bainier <i>Penicillium</i> Link spp.	<i>Aphanocapsa muscicola</i> (Meneghini) Wille <i>Desmoccocus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon <i>Gloeocapsa novacekii</i> Komárek & Anagnostidis <i>Gloeocapsa violacea</i> (Corda) Rabenhorst <i>Leptolyngbya</i> Anag. & Kom sp.
BM3	- eksofolijacija	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud Kvasci <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	
BM4	- eksofolijacija	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dietrich	
BM5	- zelena biopatina	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries <i>Mycelia sterilia</i>	<i>Aphanocapsa muscicola</i> (Meneghini) Wille <i>Desmoccocus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon <i>Gloeocapsa novacekii</i> Komárek & Anagnostidis <i>Gloeocapsa violacea</i> (Corda) Rabenhorst <i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek sp.
BM6	- eksofolijacija	<i>Mucor racemosus</i> Bull. <i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Fusarium</i> Link sp. <i>Penicillium</i> Link spp. kvasci	
BM 7	- eksofolijacija		
BM 8	- eksofolijacija		

Velikog broj cijanobakterija i zelenih algi koje se razvijaju u masi i formiraju debeo kompaktni sloj biofilma, zelenu biopatinu, uočen je direktnim posmatranjem uzoraka svetlosnim mikroskopom. Kokalne cijanobakterije *Gloeocapsa* sp. i *Aphanocapsa* sp. su uglavnom bile zastupljene u malim otvorima između čestica peska (Slika 35).



Slika 35. Agregati ćelija *Desmococcus olivaceus* grupisani sa kokalnim cijanobakterijama

I u uzorcima BM, uzetih metodom sterilnog brisa, nakon perioda inkubacije dobijeni su primarni izolati (mešovite kulture) filamentoznih gljiva i kvasaca (Slika 36A-D). Identifikacija mikromiceta pokazala je dominaciju vrsta iz familije Dematiaceae koje su bile identifikovane na 6 uzorkovanih mesta (*Alternaria* spp., *Aureobasidium* sp. *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp.) (Slika 36A i D), dok su kvasci, pripadnici podrazdela Zygomycotina (Slika 36C), i vrste roda *Penicillium* (Slika 36B) bile ređe zastupljene.

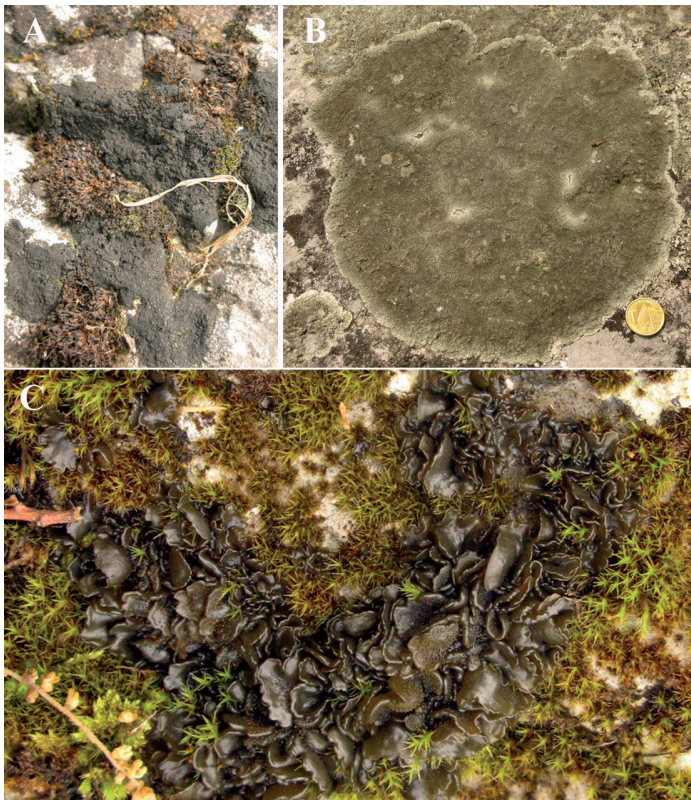


Slika 36. Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa površine kamena peščara stubova Brankovog mosta: **A.** kolonije sa dominacijom predstavnika Dematiaceae (BM4); **B.** kolonije sa dominacijom kvasaca i *Penicillium* sp. (BM3); **C.** invazivni rast *Mucor racemosus* (BM6); **D.** kolonije *Alternaria* sp. i *Mycelia sterilia* (BM1)

5.1.5 Analiza biofilma sa srednjovekovnih kamenih stećaka na lokalitetima Mramorje i Rastište kod Bajine Bašte

Opservacija in situ i simptomi

Opservacijom *in situ* srednjovekovnih kamenih stećaka konstatovana je biodeterioracija visokog stepena. Na lokalitetu Mramorje na površini stećaka dominiraju katranaste kolonije *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault i epilitski lišajevi velikog dijametra, krustoznog tipa i mahovine (Slika 37A i B). Na lokalitetu Rastište stećci su sa gotovo 100% pokrovnosti prekriveni mahovinama i talusom lišaja *Collema auriforme* (With.) Coppins & J.R. Laundon (Slika 37C). Uzorci biofilma su uzeti na mestima izmenjenog izgleda sa promenama u teksturi površine kamena.



Slika 37. Simptomi biodeterioracije površine kamena na srednjovekovnim kamenim stećcima: **A, B.** krustozni lišajevi i mahovine na lokalitetu Mramorje; **C.** talus *Collema auriforme* i mahovine na lokalitetu Rastište

Sastav zajednice biofilma

Sa stećka na lokalitetu Mramorje uzeto je 3 uzorka metodom sterilnog brisa za mikološku analizu i 3 uzorka direktnom metodom adhezivne trake za analizu SAB, dok je sa

stećka na lokalitetu Rastište uzeto 2 uzorka metodom sterilnog brisa i 2 uzorka metodom adhezivne trake. Iz uzoraka sa lokaliteta Mramorje identifikovano je 10 taksona podrazdela Deuteromycotina od kojih 9 pripadaju klasi Hyphomycetes a samo *Phoma* sp. klasi Coelomycetes. Na lokalitetu Rastište identifikovana su samo dva taksona: *Phoma* sp. (Coelomycetes) i *C. echinulata* (Zygomycetes). I u izolatima sa stećaka razvila se sterilna micelija, tj. *M. sterilia*. *Phoma* sp. je jedini zajednički takson za oba lokaliteta (Tabela 6).

Na kamenim srenjovekovnim stećcima na lokalitetu Mramorje u okviru fototrofne komponente SAB, identifikovano je 8 taksona cijanobakterija, dok alge nisu bile prisutne. Dominiraju kokalne cijanobakterije iz reda Chroococcales, sa 6 identifikovanih taksona, dok su trihalne cijanobakterije iz reda Nostocales bile zastupljene sa dve vrste. Na lokalitetu Rastište identifikovano je 7 taksona cijanobakterija, 4 kokalna pripadnika reda Chroococcales i 3 trihalne iz reda Nostocales. *D. olivaceus* (Priaes, Trebouxiophyceae) jedini je pripadnik Chlorophyta identifikovan na stećcima iz Rastišta. Zajednički taksoni cijanobakterija prisutni na oba lokaliteta su: *Gloeocapsa compacta* Kützing, *Gloeocapsopsis pleurocapsoides* (Nováček) J.Komárek & K.Anagnostidis, *Gleotheca* sp. *N. commune*, i *Scytonema myochrous* (Dillwyn) C.Agardh ex Bornet & Flahault (Tabela 6).

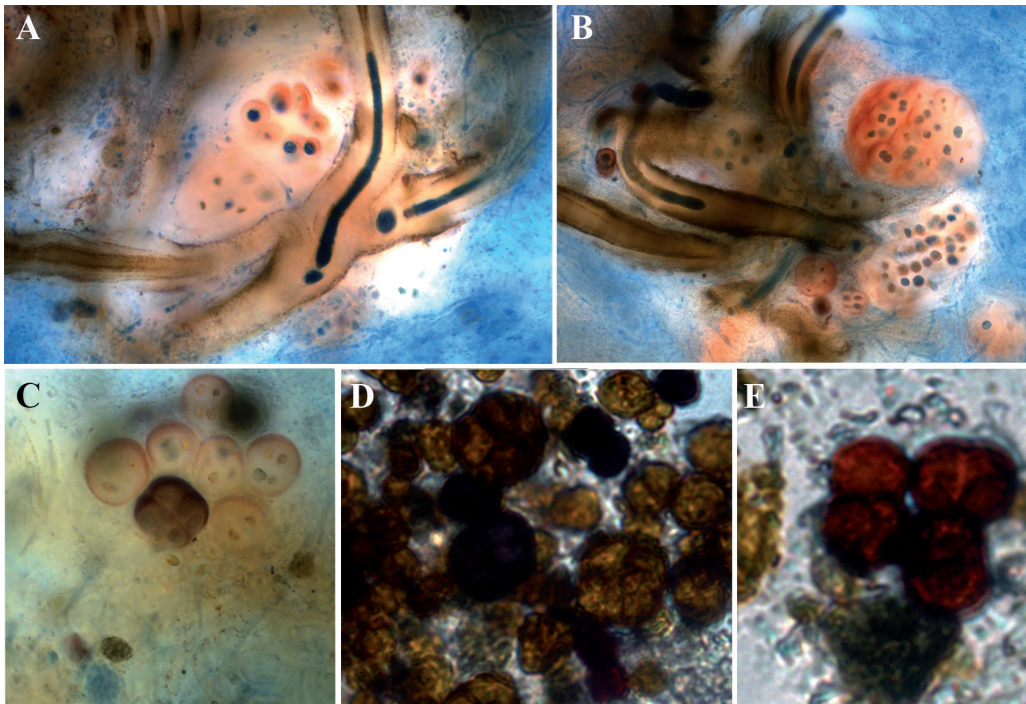
Analizom fragmenata biofilma sa lokaliteta Mramorje u uzorcima sa mesta izmenjene površine kamena uočeno je prisustvo gusto isprepletanih filamenata sa dobro razvijenim želatinoznim omotačima cijanobakterije *S. myochrous* i kolonija *G. sanguinea* koje formiraju kompaktni sloj (Slika 38A i B). U pojedinim snimcima dominiraju kolonije *G. sanguinea* različite starosti (Slika 38C), kao i suve kolonije *G. pleurocapsoides* (Slika 38D i E).

Direktnim posmatranjem fragmenata biofilma sa lokaliteta Rastište u uzorcima sa mesta izmenjene površine kamena uočeno je prisustvo velikog broja loptastih kolonija cijanobakterije *N. commune* (Slika 39C), kao i veliki broj praznih sara filamentozne vrste *Tolypothryx byossoidea* (C.Agardh) Kirschner (Slika 39B). U pojedinim snimcima vide se filamenti *S. myochrous* okruženi kolonijama *G. pleurocapsoides* (Slika 39A). Agregati ćelija *D. olivaceus* okruženi mladim ćelijama *G. violacea* takođe su prisutni. U pojedinim

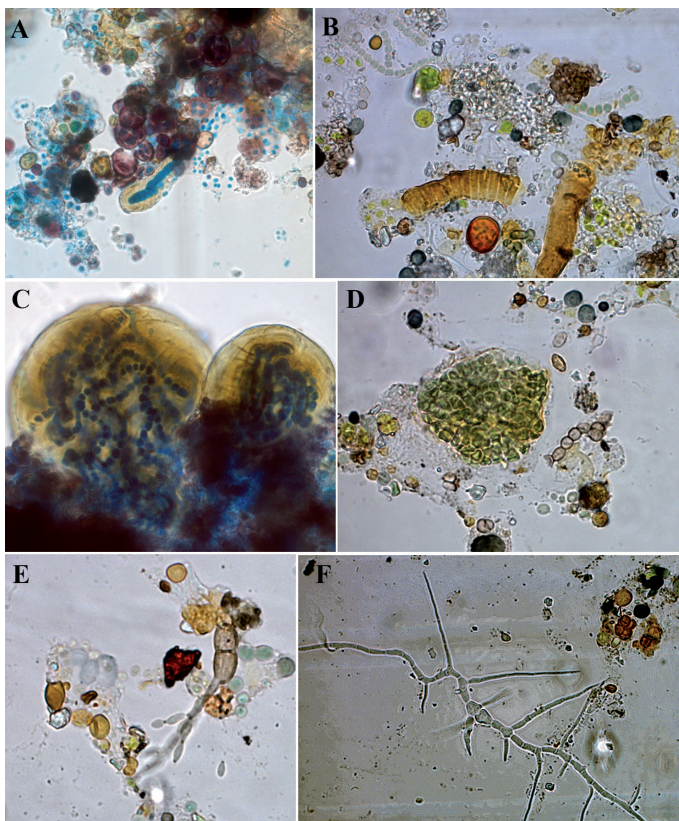
snimcima konstatovane su dvoćelijske i troćelijske spore gljiva koje kličaju i formiraju mi-
celiju (Slika 39E i F). Retko, u uzorcima je zabeležena pojava melanizovanih, toruloznih
hifa karakterističnih za grupu gljiva koje naseljavaju kamen (RIF), poznatih i kao MCF.

Tabela 6. Mikromicete, cijanobakterije i alge u biofilmu srednjevekovnih kamenih stećaka

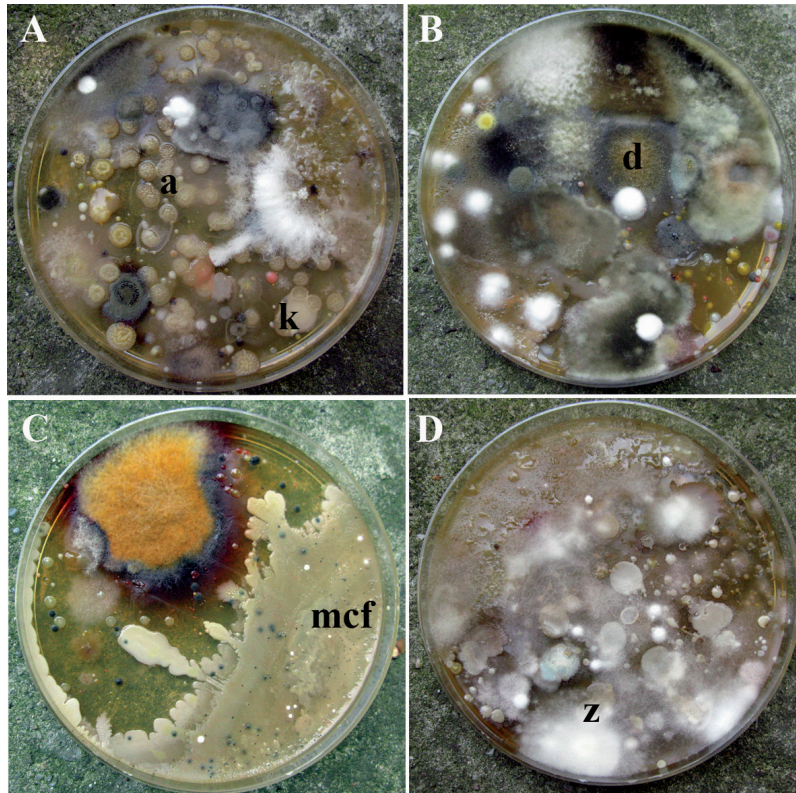
Šifra uzorka	Simptomi	Mikromicete	Cijanobakterije i alge
Lokalitet Mramorje u Peruću – spomenik 20 slemenjak			
SS1	- krustozni lišaj i	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier <i>Phoma</i> Fr. sp. <i>Mycelia sterilia</i>	<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) J.Komárek & K.Anagnostidis <i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault <i>Gloeotheca</i> sp. Nägeli <i>Gloeotheca incerta</i> Skuja <i>Gloeocapsopsis</i> sp. Geitler ex Komárek <i>Scytonema myochrous</i> (Dillwyn) C.Agarth ex Bornet & Flahault <i>Gloeocapsa sanguinea</i> (C.Agarth) Kützing
SS2	- krustozni lišaj i crna katranasta biopatina	<i>Alternaria</i> Nees spp. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Drechlera dematoides</i> (Bubák & Wróbl.) Schanf <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb <i>Fusarium</i> Link sp. <i>Mycelia sterilia</i> MCF	<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) J.Komárek & K.Anagnostidis <i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault <i>Gloeotheca</i> sp. Nägeli <i>Gloeotheca incerta</i> Skuja <i>Gloeocapsopsis</i> sp. Geitler ex Komárek <i>Scytonema myochrous</i> (Dillwyn) C.Agarth ex Bornet & Flahault <i>Gloeocapsa sanguinea</i> (C.Agarth) Kützing
SS3	- krustozni lišaj i crna katranasta biopatina	<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link sp. <i>Fusarium</i> Link sp. <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier MCF	<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) J.Komárek & K.Anagnostidis <i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault <i>Gloeotheca</i> Nägeli sp. <i>Gloeotheca incerta</i> Skuja <i>Gloeocapsopsis</i> Geitler ex Komárek sp. <i>Scytonema myochrous</i> (Dillwyn) C.Agarth ex Bornet & Flahault <i>Gloeocapsa sanguinea</i> (C.Agarth) Kützing
Lokalitet Mramorje u selu Rastište			
SS4	- mahovine	<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt <i>Mycelia sterilia</i> MCF	<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) J.Komárek & K.Anagnostidis <i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault <i>Gloeotheca</i> sp. Nägeli <i>Scytonema myochrous</i> (Dillwyn) C.Agarth ex Bornet & Flahault <i>Gloeocapsa violacea</i> Kützing <i>Tolythrix byssoidea</i> (C.Agarth) Kirchner <i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon
SS5	- mahovine	<i>Phoma</i> Fr. sp. <i>Mycelia sterilia</i> Kvasci MCF	<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) J.Komárek & K.Anagnostidis <i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault <i>Gloeotheca</i> Nägeli sp. <i>Scytonema myochrous</i> (Dillwyn) C.Agarth ex Bornet & Flahault <i>Gloeocapsa violacea</i> Kützing <i>Tolythrix byssoidea</i> (C.Agarth) Kirchner <i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon



Slika 38. Cijanobakterije u biofilmu sa površine srednjovekovnih kamenih stećaka sa lokaliteta Mramorje: **A,B**, filamenti *Scytonema myochrous* i trajne spore *Gloeocapsa sanguinea*; **C**, mlade i uginule kolonije *Gloeocapsa sanguinea*; **D, E**, suve kolonije *Gloeocapsopsis pleurocapsoides*



Slika 39. Cijanobakterije, zelene alge i gljivice u biofilmu sa srednjovekovnih kamenih stećaka sa lokaliteta Rastište: **A**, filamenti *Scytonema myochrous* i kolonije *Gloeocapsopsis pleurocapsoides*; **B**, prazne sare *Tolypothrix byossoidea* sa kolonijama *Gloeocapsa compacta*, *Gloeocapsa violacea* i *Desmococcus olivaceus*; **C**, kolonija *Nostoc commune*; **D**, agregati ćelija *Desmococcus olivaceus* sa mladim kolonijama *Gloeocapsa violacea*; **E**, dvoćelijka klijajuća spora gljivice. **F**, micelija



Slika 40. Primarni izolati filamentoznih gljiva, kvasaca, aktinomiceta i mikrokolonijalnih gljiva (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa srednjovekovnih kamenih stećaka: **A.** kolonije sa dominacijom kvasaca i aktinomiceta (SS3), **B.** kolonije sa dominacijom Dematiaceae (SS5), **C.** dominacija *Epicoccum purpurascens* i kvasaca (SS2); **D.** invazivni rast *Cunninghamella echinulata* (SS4)

Nakon perioda inkubacije uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa dobijeni su primarni izolati (mešovite kulture) filamentoznih gljiva i kvasaca (Slika 40A-D). Mikrobiota površine analiziranih stećaka se kvalitativno razlikuje na istraživanim lokalitetima. U uzorcima sa lokaliteta Mramorje dominiraju predstavnici familije Dematiaceae (Slika 40Bd) i podrazdela Zygomycotina (Slika 40Dz). Dok na lokalitetu Rastište dominiraju aktinomicete (Slika 40Aa) i kvasci (Slika 40Ak). Često su prisutne spororastuće, tačkaste, crne kolonije označene kao MCF (Slika 40Cmcf).

5.1.6 Mikromicete izolovane sa kamena kulturno-istorijskih spomenika

Sa svih pet istraživanih kamenih kulturno-istorijskih spomenika u Srbiji identifikovano je ukupno 28 taksona gljiva. 24 taksona pripada podrazdelu Deuteromycotina; 22 klasi Hyphomycetes, vrste roda *Phoma* pripadaju klasi Coelomycetes, a vrsta *S. roseus* klasi Blastomycetes. Podrazdeo Zygomycotina zastupljen je sa 4 taksona klase Zygomycetes (Tabela 7).

Tabela 7. Mikromicete izolovane sa kamenih spomenika u Srbiji

Redni broj	Takson	Lokalitet				
		MG	AP	NJ	BM	SS
1.	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams		+			
2.	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	+	+			
3.	<i>Alternaria</i> Nees spp.	+	+	+	+	+
4.	<i>Aspergillus flavus</i> Link			+		
5.	<i>Aspergillus terreus</i> Thom		+			
6.	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.			+		
7.	<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link sp.					+
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	+	+		+	
9.	<i>Bipolaris spicifera</i> (Bainier) Subram		+			
10.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+	+	+	+	+
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.			+	+	
12.	<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt			+		+
13.	<i>Drechslera dematoidea</i> (Bubák & Wróbl.) Scharif		+	+		+
14.	<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	+	+	+	+	
15.	<i>Fusarium</i> Link spp.	+	+	+		
16.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl.				+	
17.	<i>Fusarium sambucinum</i> Fuckel					+
18.	<i>Mucor racemosus</i> Bull.				+	
19.	<i>Mucor</i> P. Micheli ex L.sp.			+		
20.	<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason	+				
21.	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier				+	+
22.	<i>Penicillium expansum</i> Link		+			
23.	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx				+	
24.	<i>Penicillium</i> Link spp.	+			+	
25.	<i>Phoma</i> Fr. spp.				+	+
26.	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.		+			
27.	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier		+			
28.	<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluver & C.B. Niel	+				

Kvantitativna zastupljenost identifikovanih taksona se veoma razlikuje prema istraživanim lokalitetima. Najviše identifikovanih taksona zabeleženo je na lokalitetu AP (13) a najmanje na SS (8). Vrsta *C. cladosporioides* i vrste rodova *Alternaria* i *Fusarium* zabeležene su na svim istraživanim lokalitetima. Visoku frekvencu pojavljivanja imala je i vrsta *E. purpurascens* koja je utvrđena na četiri od pet istraživanih spomenika. Vrste *A. pullulans* i *D. dematoidea* su prisutne na 3 istraživana lokaliteta.

Prosečan broj identifikovanih taksona gljiva na 5 istraživanih lokaliteta (n) prikazan u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom iznosi $10,6 \pm 0,93$.

Analizom zajednica mikromiceta mogu se izdvojiti grupe izolovane sa različitih tipova kamena:

1. sa karbonatnog kamena na lokalitetima MG i SS izolovano je 14 taksona gljiva: *A. alternata*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *C. echinulata*, *E. purpurascens*, *F. sambucinum*, *Fusarium* sp., *N. sphaerica*, *P. variotii*, *Penicillium* sp., *Phoma* sp. i *S. roseus*,
2. sa mermera na lokalitetu MG izolovano je 5 taksona gljiva: *A. alternata*, *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *E. purpurascens* i *S. roseus*,
3. sa granita na lokalitetu NJ izolovano je 10 taksona gljiva: *Alternaria* sp., *A. flavus*, *A. versicolor*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. echinulata*, *D. dematoidea*, *E. purpurascens*, *Fusarium* sp. i *Mucor* sp. i
4. sa kamena peščara na lokalitetima AP i BM izolovano je 20 taksona gljiva: *A. strictum*, *A. alternata*, *Alternaria* sp., *A. terreus*, *A. pullulans*, *B. spicifera*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *D. dematoidea*, *E. purpurascens*, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp., *M. racemosus*, *P. variotii*, *P. aurantiogriseum*, *P. expansum*, *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *R. stolonifer* i *S. brevicaulis*.

Sastav zajednica mikromiceta na različitim kamenim supstratima pokazuje veliki broj zajedničkih vrsta.

5.1.7 Cijanobakterije i alge detektovane na kamenom supstratu kulturno-istorijskih spomenika

Sa svih pet istraživanih kamenih kulturno-istorijskih spomenika identifikovano je 17 taksona cijanobakterija. Red Chroococcales bio je zastupljen sa 9 identifikovanih pripadnika, red Nostocales sa 5, a red Oscillatoriales sa 3 (Tabela 8).

Tabela 8. Identifikovane cijanobakterije sa kamenih spomenika u Srbiji

Redni broj	Takson	Lokalitet				
		MG	AP	NJ	BM	SS
1.	<i>Aphanocapsa muscicola</i> (Meneghini) Wille				+	
2.	<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing					+
3.	<i>Gloeocapsa novacekii</i> Komárek & Anagnostidis				+	
4.	<i>Gloeocapsa sanguinea</i> (C.Agardh) Kützing	+				+
5.	<i>Gloeocapsa violacea</i> (Corda) Rabenhorst	+	+		+	+
6.	<i>Gloeocapsopsis</i> sp. Geitler ex Komárek					+
7.	<i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) J. Komárek & K.Anagnostidis					+
8.	<i>Gloeothece</i> Nägeli sp.					+
9.	<i>Gloeothece incerta</i> Skuja					+
10.	<i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek sp.				+	
11.	<i>Microcoleus vaginatus</i> (Vaucher) Gomont ex Gomont		+			
12.	<i>Nostoc</i> Vaucher ex Bornet & Flahault sp.		+		+	
13.	<i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault					+
14.	<i>Oscillatoria</i> Vaucher ex Gomont sp.			+		
15.	<i>Scytonema myochrous</i> (Dillwyn) C.Agardh ex Bornet & Flahault					+
16.	<i>Stigonema ocellatum</i> (Dillwyn) Thuret ex Bornet & Flahault		+			
17.	<i>Tolypothrix byssoidea</i> (C.Agardh) Kirchner					+

Zastupljenost i raspored identifikovanih taksona se veoma razlikuje prema istraživanim lokalitetima. Najviše identifikovanih taksona zabeleženo je na lokalitetu SS (11). Jedna vrsta iz roda *Oscillatoria* bila je jedini pripadnik cijanobakterija dokumentovan u fragmentima SAB na lokalitetu NJ. Vrsta *G. violacea* je imala najveću zastupljenost na 4 istraživana lokaliteta, dok su vrste roda *Nostoc* bile prisutne na 3 istraživana lokaliteta.

Prosečan broj identifikovanih taksona cijanobakterija na 5 istraživanih lokaliteta (n) prikazan u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom iznosi $4,4 \pm 1,7$.

Površina ispitivanih kamenih spomenika u Srbiji je kolonizovana zajednicom cijano-bakterija, koje se prema tipu supstrata na kome su zabeležene mogu podeliti na sledeće grupe:

1. na površini karbonatnog kamena na lokalitetima MG i SS identifikovano je 10 taksona cijanobakterija : *G. compacta*, *G. sanguinea*, *G. violacea*, *G. pleurocapsoides*, *Gloeo-capsopsis* sp., *G. incerta*, *Gloeothece* sp., *N. commune*, *S. myochrous* i *T. byssoidea*,
2. na površini vezivnog maltera na lokalitetu NJ identifikovana je samo jedna vrsta roda *Oscillatoria*,
3. na površini kamena peščara na lokalitetima AP i BM identifikovano je 6 taksona cijanobakterija: *A. muscicola*, *G. novacekii*, *G. violacea*, *Leptolyngbya* sp., *M. vaginatus*, *Nostoc* sp. i *S. ocellatum*.

Na pet kulturno-istorijskih spomenika u Srbiji identifikovano je 13 taksona algi, 7

Tabela 9. Identifikovane alge sa kamenih spomenika u Srbiji

Redni broj	Takson	Lokalitet				
		MG	AP	NJ	BM	SS
1.	<i>Cylindrocapsa</i> Reinsch sp.			+		
2.	<i>Cylindrocistis brebissonii</i> (Ralfs) de Bary			+		
3.	<i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon	+	+		+	+
4.	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow			+		
5.	<i>Haematococcus</i> sp. Flotow		+			
6.	<i>Luticola</i> sp. D.G.Mann				+	
7.	<i>Microspora</i> sp. Thuret			+		
8.	<i>Navicula veneta</i> Kützing			+	+	
9.	<i>Nitzschia communis</i> Grunow				+	
10.	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow				+	
11.	<i>Nitzschia inconspicua</i> Grunow				+	
12.	<i>Planothidium frequentissimum</i> var. <i>magnum</i> (F.Straub) Lange-Bertalot				+	
12.	<i>Trentepohlia aurea</i> (Linnaeus) C.F. P. Martius	+				

taksona pripada razdelu Chlorophyta i 6 razdelu Bacilariophyta. Razdeo Chlorophyta bio je zastupljen sa četiri klase: Chlorophyceae (redovi Chlorococcales, Chlamydomonadales i Microsporales), Zygnematophyceae (red Zygnematales) Trebouxiophyceae (red Prasiolales) i Ulvophyceae (red Trentepohliales). Sve identifikovane alge iz razdela Bacilariop-

hyta pripadaju klasi Bacilariophyceae, i to 5 taksona pripada redu Naviculales, dok je *P. frequentissimum* var. *magnum* jedini pripadnik reda Achnanthales (Tabela 9).

Najčešće nalažena alga je *D. olivaceus*, zabeležena na lokalitetima MG, AP, BM i SS. Najviše predstavnika algi zabeleženo na lokalitetu BM. Prosečan broj identifikovanih taksona algi na 5 istraživanih lokaliteta (n) prikazan u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom iznosi $3,4 \pm 1,3$.

Alge prisutne u okviru fototrofne komponente SAB ispitivanih kulturno istorijskih spomenika u Srbiji prema tipu supstrata koji kolonizuju mogu se podeliti na četiri grupe:

1. na površini karbonatnog kamena na lokalitetima MG i SS identifikovane su alge iz razdela Chlorophyta: *D. olivaceus* i *T. aurea*,
2. na površini granitnog supstrata na lokalitetu NJ identifikovana je vrsta *N. veneta*,
3. na površini kamena peščara na lokalitetima AP i BM identifikovano je 7 taksona algi: *D. olivaceus*, *Haematococcus* sp., *Luticola* sp., *N. veneta*, *N. communis*, *N. frustulum* i *N. inconspicua* i
4. na površini vezivnog maltera na lokalitetu NJ identifikovano je 4 taksona algi: *Cylindrocapsa* sp., *C. brebissonii*, *H. pluvialis* i *Microspora* sp.

Prosečan broj svih identifikovanih taksona fototrofne komponente SAB (cijanobakterije i alge) na 5 istraživanih lokaliteta (n) prikazan u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom iznosi $7,6 \pm 1,9$.

* * *

Metodom sterilnog brisa moguće je izolovati i do 70% mikromiceta prisutnih na uzorkovanim mestima. Iako je ovom metodom nemoguće izolovati sve prisutne vrste, ona je vrlo pogodna za izolaciju mikromiceta, dok je za izolaciju bakterija neodgovarajuća, jer se izoluje se manje od jednog procenta (Sterflinger, 2010). Iako je srednja vrednost ukupnog broja identifikovanih taksona gljiva sa svih ispitivanih lokaliteta relativno niska ($10,6 \pm 0,93$, $n = 5$), diverzitet mikromiceta na kamenim površinama nije zanemarljiv. Prisustvo nevijabilnih propagula u uzorcima, kao i nemogućnost svih izolata da formi-

raju reproduktivne strukture na hranljivoj podlozi MEA (*M. sterilia*) imaju za posledicu evidentiranje manjeg broja taksona u odnosu na realno stanje što se oslikava manjom srednjom vrednošću broja taksona gljiva. Srednja vrednost ima isključivo komparativni značaj u cilju poređenja dobijenih rezultata kvantitativne i kvalitativne zastupljenosti mikromiceta na kamenim spomenicima sa drugim rezultatima istraživanja iz ove oblasti. Suihko i dr. (2007) su sa površine kulturno-istorijskih spomenika i ruševina u Škotskoj izolovali 13 morfološki različitih kolonija mikromiceta od kojih su 11 izolata sekvenciranjem ITS segmenta DNK identifikovali do nivoa roda. Sa fasade crkve Carrascosa del Scampo u Španiji, sa 10 uzorkovanih mesta, sa vidljivim oštećenjima kamene površine Gómez-Alarcón i dr. (1995a) izolovali su i identifikovali 13 taksona mikromiceta.

Na svim istraživanim lokalitetima metodom sterilnog brisa sa najvećom učestalošću izolovane su gljive iz familije Dematiaceae, i to vrste rodova: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Epicoccum* i *Nigrospora*. Zbog obrazovanja piknidija vrste roda *Phoma* su prema Ainsworth (1973) svrstane u klasu Coelemycetes, ali zbog prisustva melanina u ćelijskim zidovima vrste ovog roda mogu se svrstati u melanizovane gljive. Od hijalinih vrsta veliku učestalost izolacije imale su i vrste roda *Fusarium*, koje se takođe odlukuju produkcijom pigmenata. Produkcija melanina i drugih pigmenata javlja se prilikom gajenja izolata na MEA. Uočene su i kvalitativne razlike u sastavu zajednica mikromiceta na različitim ispitivanim lokalitetima usled različitog stepena bioreceptivnosti ispitivanih tipova kamena, kao i različitog dejstva ekoloških faktora, pre svega temperature, vlažnosti, insolacije i dostupnosti nutrijenata. Sa mermernog stuba na lokalitetu MG izolovane su *A. alternata*, *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *E. purpurascens*, *S. roseus* i melanizovana *M. sterilia*. U okviru SAB sa mermernih spomenika izloženih na terasi muzeja u Mesini (Sicilija), kao glavni kolonizatori navedeni su taksoni: *Alternaria* spp., *A. pullulans*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Phoma eupyrena* Sacc., *Phoma* spp., *Stemphylium*., *Trichoderma* spp., *Ulocladium* spp. (Urzi i dr., 2001). Isti autori su, prilikom posmatranja SAB, svetlosnim mikroskopom, konstatovali melanizovane strukture slične hlamidosporama gljiva, grupisane sa agregatima

prašine. Poređenjem dobijenih rezultata sa navedenim uočava se sličnost u dominantnom prisustvu predstavnika Dematiaceae, kao i drugih pigmentisanih vrsta, i mala zastupljenost hijalinih (nepigmentisanih) vrsta gljiva. Do sličnih rezultata došli su i Gorbushina i dr. (2002), koji navode da su glavni kolonizatori mermernih spomenika na lokalitetima Manastir Smolenske Bogorodice (Новодевичий монастырь, Богородице-Смоленский монастырь) i Donski Manastir (Донской монастырь) u Moskvi gljive iz familije Dematiaceae.

Analizom SAB sa kamena peščara na lokalitetima AP i BM izolovane su vrste rodova *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecylomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus* i *Scopulariopsis*. Takođe, za peščar od koga su sagrađena utvrđenja iz srednjeg veka u Madridu (*Alcala de Henares*), Gómez-Alarcón i dr. (1995b) su saopštili vrste rodova *Alternaria*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Ulocladium*, *Dictyodesmium*. Poređenjem navedenih rezultata istraživanja uočava se dominancija pigmentisanih vrsta, dok su hijaline vrste manje zastupljene. Prema Sterflinger (2010) gljive iz podrazdela Zygomycotina (vrste rodova *Mucor* i *Rhizopus*) obično ne kolonizuju kamen, već se na kamenim površinama nalaze uglavnom kao tranzijenti. Zanimljivo je pomenuti da kameni supstrat može biti i potencijalni izvor novih, do sada neopisanih, vrsta gljiva. Sert i Sterflinger (2010) su sa mernog poklopca sarkofaga u Muzeju u Sideu (Turska) izolovali i opisali do tada nepoznatu vrstu iz roda *Coniosporium* (Dematiaceae). Na osnovu detaljnih morfoloških i molekularnih ispitivanja ustanovljeno je da se radi o *Coniosporium sümbüli*, novoj vrsti za nauku.

Metoda adhezivne trake se pokazala odgovarajućom za analizu fotoautotrofne komponente SAB, posebno sa mesta sa vidljivim siptomima deterioracije. Iako prema Tomaselli i dr. (2000) diverzitet fototrofnih mikroorganizama u sastavu SAB na kamenim površinama treba da bude visok, dobijena srednja vrednost svih organizama fototrofne komponente SAB ($7,6 \pm 1,9$, $n = 5$) ukazuje da je diverzitet cijanobakterija i algi na ispitivanim lokalitetima nizak. Ipak, iako je ukupan broj identifikovanih taksona cijanobakterija i algi mali, direktna posmatranje fragmenata SAB svetlosnim mikroskopom pokazala su da su jedinice pojedinih vrsta vrlo brojne i gusto pakovane čineći kompaktni sloj. Kvalita-

tivni sastav zajednica fotoautotrofa se razlikuju na ispitivanim lokalitetima usled različite bioreceptivnosti kamenog supstrata i različitog dejstva ekoloških faktora (osunčanost i zasenčenost staništa, vodni režim, temperatura, prostorna orijentacija staništa). Prema Tomaseli i dr. (2000) više od 200 taksona cijanobakterija i algi iz razdela Chlorophyta i Bacilariophyta može da formira aerofitne zajednice na kamenom supstratu. Isti autori saopštavaju da su u okviru fototrofne komponente SAB sa kamenog supstrata najčešće dokumentovana grupa mikroorganizama cijanobakterije sa više od 35 rodova i 90 vrsta, dok su alge iz Chlorophyta zastupljene sa 20 rodova i više od 35 vrsta. Dominacija algi iz razdela Bacilariophyta može se očekivati na spomenicima koji su u bliskom kontaktu sa vodom, npr. fontana di Trevi u Rimu ili kod spomenika koji se nalaze u blizini mora (Partenon u Atini). Ovaj podatak je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima najvećeg diverziteta predstavnika Bacilariophyta kod nas na stubovima BM, koji se nalaze u neposrednoj blizini reke Save. Pionirsko istraživanje fototrofnih mikroorganizama koji mogu da formiraju aerofitne zajednice na kamenom supstratu sproveli su Anagnostidis i dr. (1983) i saopštili prisustvo 14 taksona cijanobakterija i 17 taksona algi iz razdela Bacilariophyta na mermernim stubovima spomenika Partenon na Akropolju (Atina, Grčka).

Na granitnom supstratu na lokalitetu NJ identifikovan je samo jedan takson algi, vrsta *N. veneta* (Bacilariophyta). Prema Ortega-Calvo i dr. (1995), granitni supstrat se odlikuje malom bioreceptivnošću, što ga čini nepovoljnim za kolonizaciju cijanobakterijama i algama. Glavni limitirajući faktor za razvoj fotoautotrofa na granitu je mala poroznost i niska pH vrednost supstrata koji sprečavaju usvajanje vode kapilarnim silama (Prieto i Silva, 2005). Potvrda da je granit nepovoljan supstrat su i rezultati Macedo i dr. (2009) koji su na granitnim spomenicima Mediteranskog područja zabeležili samo 10 taksona cijanobakterija. Takođe, mali broj vrst beleže i Gärtner i Stoyneva (2003) koji su saopštili da su glavni uzročnici zelene biopatine na granitnim spomenicima u gradu Koprivštica u Bugarskoj alge iz razdela Chlorophyta: *Apatococcus lobatus* (Chodat) J.B. Petersen, *Trebouxia arboricola* Puymaly i *Coccomyxa* sp.

U ovim istraživanjima sa lokaliteta AP i SS identifikovani su taksoni cijanobakterija: *A. muscicola*, *G. novacekii*, *G. violacea*, *Leptolyngbya* sp., *M. vaginatus*, *Nostoc* sp. i *S. ocellatum* i sledeći taksoni algi *D. olivaceus*, *Haematococcus* sp., *Luticola* sp., *N. veneta*, *N. communis*, *N. frustulum* i *N. inconspicua*. Međutim, u radu Macedo i dr. (2009) vrste rodova *Gloeocapsa* i *Microcoleus* su zabeležene na spomenicima od kamena pešćara na području Mediterana, dok je je *M. vaginatus* bila prisutna u SAB sa fasade crkve Carrascosa del Campo u Španiji izgrađenoj od kamena pešćara (Gómez-Alarcón i dr., 1995a). Zelena alga *D. olivaceus* je identifikovana na kamenu pešćaru podzemnih galerija kazamata Pêtrusse u Luksemburgu (Hoffman i Darienko, 2005).

Kada je analiziran SAB sa karbonatnog kamena na lokalitetima MG i SS identifikovano je ukupno 10 taksona cijanobakterija: *G. compacta*, *G. sanguinea*, *G. violacea*, *Gloeocapsopsis* sp., *G. pleurocapsoides*, *Gloeotheca* sp., *G. incerta*, *N. commune*, *S. myochrous* i *T. byssoidea* i dva taksona algi iz razdela Chlorophyta: *D. olivaceus* i *T. aurea*. Prema Macedo i dr. (2009) vrste rodova *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Tolypothrix* i *Desmococcus* do sada su saopštene kao kolonizatori kamenih spomenika na području Mediterana izgrađenih od kamena pešćara.

Pretpostavka je da su razlike u kvalitativnom sastavu zajednica fototrofnih organizama na kamenom supstratu, posledica različitog dejstva ekoloških faktora i različite bioreceptivnosti različitih tipova kamena.

Simptomi deterioracije koji su dokumentovani prilikom *in situ* opservacije uzorkovanih mesta na ispitivanim spomenicima mogu biti hemijskog, fizičkog ili biološkog porekla (Suihko i dr., 2007). Efekte hemijske fizičke i biološke deterioracije je vrlo teško razdvojiti pogotovo ako se uzme u obzir njihov sinergistički efekat i za to su potrebne dodatne analize. Njihov konačni efekat je stvaranje estetski neprihvatljive površine spomenika. Direktnim posmatranjem pod mikroskopom fragmenata SAB dokazano je da su obojene prevlake na površini ispitivanih spomenika poreklom od fototrofnih organizama i da se stoga mogu smatrati biopatinama. Tamno crvena biopatina u udubljenju fasadnog zida crkve svete Bogorodice (MG), je posledica prisustva pigmenta gleokapsina koga pro-

dukuje cijanobakterija *G. sanguinea*. Višeslojni galertni omotači bogati ovim pigmentom bili su uočeni prilikom posmatranja ćelija *G. sanguinea* pod svetlosnim mikroskopom. Zeleno-narandžasta biopatina na površini istog spomenika, može se objasniti dominacijom trihalne alge *T. aurea* čije su ciste bogate pigmentima iz grupe karotenoida, posebno β -karotenom (Goodwin i Jamicorn, 1954). Crvena biopatina na lokalitetu NJ posledica je prisustva pigmenta astaksantina (Goodwin i Jamikorn, 1954). Ovaj pigment, iz grupe karotenoida, sintetišu ciste alge *H. pluvialis*, koja je identifikovana u udubljenju spomenika iz Drugog svetskog rata, gde su bile vidljive ciste sa depozitima astaksantina. Biološka funkcija produkcije pigmenata je zaštita od nepovoljnih uslova životne sredine. Cijanobakterije proizvode pigmente koje skladište u ćelijama ili ih izlučuju u galertne omotače što predstavlja adaptaciju na visoku solarnu radijaciju koja je ujedno i limitirajući ekološki faktor za aerofitne fototrofne mikroorganizme (Garcia-Pitchel i dr., 1992). Pigmenti u galertnim omotačima predstavljaju i zaštitu od sitnih artropoda prisutnih u biofilmu koji se hrane cijanobakterijama (Gaylarde i Gaylarde, 2005).

Mikromicete takođe učestvuju u formiranju biopatine, posebno u vidu crnih prevlaka na kamenoj površini. Opservacija *in situ* je pokazala prisustvo crnih prevlaka na svim lokalitetima MG, AP i NJ. Osim crne katranaste biopatine na lokalitetu AP, posledice prenamnožavanja cijanobakterije *Nostoc* sp., uzročnik ostalih patina mogu biti i gljive iz familije Dematiacea (Krumbein, 1992; Urzi i dr., 1992). Prema ovim autorima crne prevlake na kulturno istorijskim spomenicima, osim čađi, izazivaju i melanizovane gljive, te se stoga ove promene mogu smatrati biopatinom. Gorbushina i dr. (2002) su analizirali fungalnu komponentu SAB na kamenim spomenicima na 3 lokaliteta u Sankt Petersburgu: Manastir Aleksandra Nevskog (Свято-Троицкая Александрo-Невская Лавра), Letnja bašta (Летний сад) i groblje Smolensk (Смоленское кладбище) i na krečnjačkim i mermernim skulpturama na dva lokaliteta u Moskvi: Manastir Smolenske Bogorodice (Новодевичий монастырь, Богородице-Смоленский монастырь) i Donski Manastir (Донской монастырь). Kao dominantan simptom biodeterioracije na svim istraživanim mermernim spomenicima opisana je pojava crnih mikrokolonija prečnika od 100 do 150 μ m, prisutnih

na uzorkovanim mestima sa povećanom vlažnošću. Mikroskopskim posmatranjem (SEM) patine, ustanovljeno je prisustvo hifa i mikrokolonija koje rastu i radijalno se šire od centra kolonije. Slična biopatina, samo manjih dimenzija, od 70 do 80 μm , uzrokovana mikromicetama opisana je na mermernim spomenicima na antičkom lokalitetu Hersinosos na Krimu u Ukrajini (Gorbushina i dr., 1996). Osim crne biopatine melanizovane gljive se navode i kao uzročnici još jedne ireverzibilne promene na kamenim kulturno istorijskim spomenicima – fenomena „biopitting“. Opservacijom *in situ*, lezije koje bi se mogle okarakterisati kao „biopitting“ konstatovane su na mermernom stubu na lokalitetu MG i u tom uzorku bili su dominantni predstavnici familije Dematiaceae (vrste rodova *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*). Inokulacijom određenih sojeva gljiva iz familije Dematiaceae na intaktne sterilne kocke od Karara mermera *in vitro* je pokazano da za formiranje lezija dijametra 500 μm potrebno 10 meseci. Takođe, proučavajući fenomen „biopitting“ na mermernim spomenicima Svetilišta Delos na ostrvu Ciklade u Grčkoj, autori su pokazali da su kolonije gljiva iz familije Dematiaceae uvek prisutne na delovima spomenika gde je konstatovan „biopitting“. Melanin osim primarne funkcije u zaštiti od UV povećava otpornost na hidrolitičke enzime koje proizvode bakterije i zglavkari prisutni u biofilmu, i štiti mikromicete od slobodnih radikala (Bloomfield i Alexander, 1967; Jacobson, 2000).

Neposredno uočljiva promena koje se takođe može smatrati simptomom biodeterioracije je odmakla kolonizacija površine kamenih spomenika epifitskim lišajevima, mahovinama i cvetnicama tokom dugogodišnje ekološke sukcesije. Od ispitivanih lokaliteta posebno se ističu fasadni zidovi Crkve Svete Bogorodice na lokalitetu MG i srednjovekovni kameni stećci na lokalitetima Rastište i Mramorje (SS). Prisustvo talusa lišaja *C. auriforme*, koji je na lokalitetu Rastište bio prisutna sa preko 80% pokrovnosti, a čiji su pojedeni talusi iznosili i više desetina centimetara u prečniku, ukazuje da je zajednica na stadijumu klimaksa. Na lokalitetu MG opisana je velika pokrovnost kamenih površina epifitskim lišajevima i mahovina i prisustvo cvetnica u pukotinama između gradivnih kamenih blokova. Neophodan preduslov za kolonizaciju kamenih površina mahovinama i cvetnicama je eutrofikacija kamene površine i početak formiranja inicijalnog sloja zemlji-

šta (protosoil formation). Na ove procese utiču prethodni kolonizatori kamene površine – gljive, bakterije, cijanobakterije i alge, ali i depozicija organskih polutanata iz atmosfere koje u pukotinama i šupljinama na kamenoj površini mogu ostati tokom dugog perioda vremena (Gómez-Alarcón i dr., 1995a; Warscheid i Braams, 2000).

5.2 Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha u zatvorenim prostorijama institucija kulture

Fungalna kontaminacijama u zatvorenim prostorijama dovodi do biodeterioracije različitih tipova materijala a prisustvo velike koncentracije spora gljiva u vazduhu može imati štetne posledice po zdravlje ljudi.

Uzorkovanje je izvršeno u depoima i izložbenim prostorima muzeja: Muzej Istorije Jugoslavije u Beogradu (**MIJ**), Muzej grada Beograda (**MGB**), Muzej savremene umetnosti u Beogradu (**MSU**), Dvorana kulturnog centra (**DKC**) u Beogradu i Galerija slika Sava Šumanović u Šidu (**GSSŠ**).

5.2.1 Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha iz zbirke štafeta i poklona Josipa Broza Tita u Muzeju istorije Jugoslavije

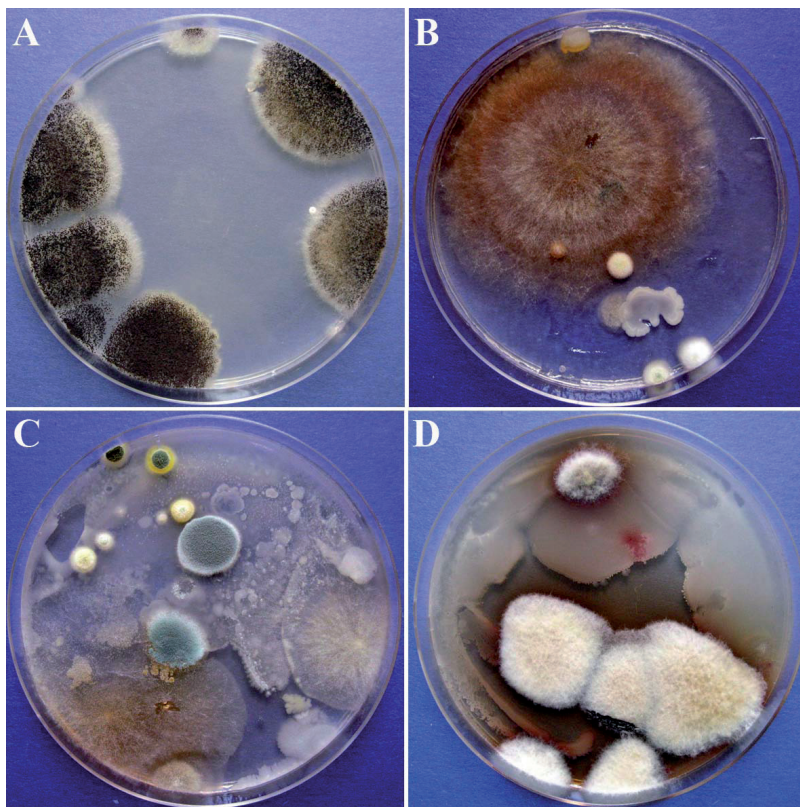
Mikromicete sa umetničkih predmeta

Uzorkovanje je izvršeno na ukupno 12 umetničkih predmeta od kojih je 11 bilo bez vidljivih simptoma deterioracije. Jedino su u unutrašnjosti drvene makete manastira Dečani zabeleženi simptomi vidljivog porasta plesni (Slika 41).

Nakon perioda inkubacije uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa dobijeni su primarni izolati (mešovite kulture) filamentoznih gljiva i kvasaca (Slika 42).



Slika 41. Unutrašnjost drvene makete crkve manastira Dečani sa vidljivim porastom plesni (MIJ5)



Slika 42. Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa umetničkih predmeta iz zbirke u Muzeju istorije Jugoslavije: **A.** čista kultura *Aspergillus niger* (MIJ/4); **B.** dominacija kvasaca i *Chaetomium globosum* (MIJ/10); **C.** dominacija vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (MIJ/7); **D.** sterilna micelija i kvasci (MIJ/5)

Identifikovano je ukupno 8 taksona filamentoznih gljiva (Tabela 10). Dominiraju predstavnici klase Hyphomycetes sa 6 identifikovanih vrsta. *R. stolonifer* je jedina vrsta klase Zygomycetes, dok je *C. globosum* jedini pripadnik klase Pyrenomycetes. Izolovane filamentozne gljive koje u kulturama nisu obrazovale reproduktivne strukture označene su kao *M. sterilia*. Prisutni kvasci nisu identifikovani do nivoa roda ili vrste.

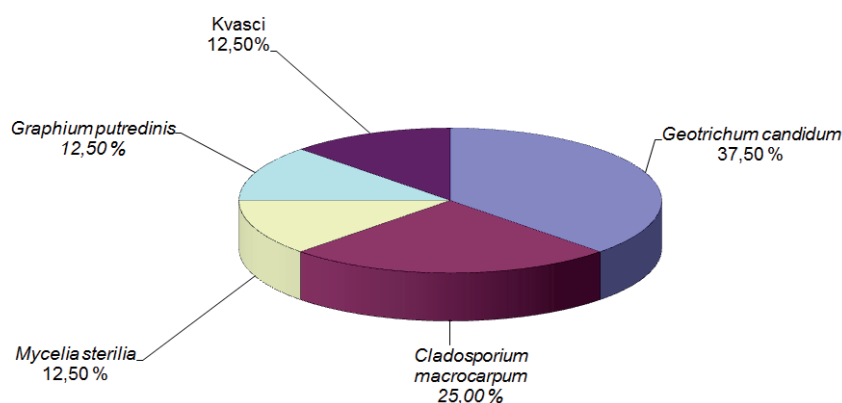
Tabela 10. Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta u Muzeju istorije Jugoslavije

šifra uzorka	Umetnički predmet/supstrat	Identifikovane mikromicete
MIJ/1	skulptura Josipa Broza/drvo	<i>Penicillium</i> Link sp. <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. <i>Mycelia sterilia</i>
MIJ/2	tapiserija sa likom Josipa Broza/ sintetička vuna	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh
MIJ/3	štafeta sa likom Josipa Broza/drvo	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh
MIJ/4	štafeta u obliku ploda kruške/drvo	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh
MIJ/5	maketa manastira Dečani/drvo	kvasci <i>Mycelia sterilia</i>
MIJ/6	skulptura u obliku ruke/metal, drvo (uzorak sa drvenog dela)	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh <i>Penicillium</i> Link sp.
MIJ/7	maketa kamiona/metal, pliš (uzorak sa plišanog postolja)	<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link sp. <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. <i>Penicillium</i> Link sp. kvasci
MIJ/8	slika "Nosioći štafeta", ulje na platnu/ slikarske boje	<i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Mycelia sterilia</i>
MIJ/9	slika "Tito na konju", ulje na platnu/ slikarske boje	kvasci
MIJ/10	slika "Tito na konju", ulje na platnu/ slikarsko platno, naličje	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze kvasci
MIJ/11	portret Josipa Broza Tita/drvo (lesonit)	sterilno
MIJ/12	portret Josipa Broza Tita, tuš/papir, naličje	<i>Graphium putredinis</i> (Corda) S. Hughes

Mikološla analiza vazduha

U cilju određivanja stepena kontaminacije vazduha sporama gljiva metodom pasivne sedimentacije izvršeno je uzorkovanje vijabilnih propagula gljiva prisutnih u Galeriji Muzeja istorije Jugoslavije. Sve izolovane filamentozne gljive iz vazduha pripadaju klasi

Hyphomycetes podrazdela Deuteromycotina. U vazduhu su bili prisutni i kvasci, ali oni nisu identifikovani do nivoa roda ili vrste. Metodom Omelijanskog koncentracija spora gljiva u vazduhu je procenjena na $104,78 \pm 13,96$ CFU m⁻³ (n = 4). U vazduhu galerije dominiraju vijabilne propagule vrsta *Geotrichum candidum* Link, *Cladosporium macrocarpum* Preuss i *Graphium putredinis* (Corda) S. Hughes (Slika 43).



Slika 43. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Galeriji Muzeja istorije Jugoslavije

5.2.2 Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha Muzeja grada Beograda

Mikromicete sa umetničkih predmeta

Uzorkovanje je izvršeno sa ukupno 15 umetničkih predmeta bez vidljivih simptoma deterioracije. Nakon perioda inkubacije uzoraka uzetih metodom sterilnog dobijeni su primarni izolati (mešovite kulture) filamentoznih gljiva i kvasaca, a čak 5 zasejanih hranljivih podloga je ostalo sterilno. Ukupno je identifikovano 9 taksona gljiva. Dominiraju predstavnici klase Hyphomycetes (Deuteromycotina) sa ukupno 8 identifikovanih taksona, posebno vrste rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*. *R. stolonifer* je jedina vrsta klase Zygomycetes (Zygomycotina). Izolovani kvasci nisu identifikovani do nivoa roda ili vrste (Tabela 11).

Tabela 11. Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta u Muzeju grada Beograda

Šifra uzorka	Umetnički predmet/supstrat	Identifikovane mikromicete
MGB/1	umetnička skulptura/keramika	sterilno
MGB/2	orman/metal	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Cladosporium macrocarpum</i> Preuss <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
MGB/3	skulptura Bivolja glava/kost	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries kvasci
MGB/4	fotografija, crno-bela tehnika/ fotografski papir	sterilno
MGB/5	plan Beograda /papir	sterilno
MGB/6	kožni šlem/koža	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
MGB/7	balska haljina/tkanina	sterilno
MGB/8	umetnička slika/slikarske boje	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. Kvasci
MGB/9	slika iz zemunska zbirke/ slikarske boje	sterilno
MGB/10	Beograda/papir	sterilno
MGB/11	mađarski leksikon posle čišćenja/ papir	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx <i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link sp.
MGB/12	slika Petra Dobrovića/bojeni sloj	<i>Drechslera</i> S. Ito sp. <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx
MGB/13	fotografija iz 1931.god.,crno bela tehnika/fotografski papir	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
MGB/14	dokument iz obrenovačke zbirka/ papir	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx <i>Penicillium</i> Link sp. <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.
MGB/15	skulptura iz 1969.godine/drvo	sterilno

Mikološka analiza vazduha

Mikološka analiza vazduha metodom pasivne sedimentacije izvršena je u ukupno 12 prostorija Muzeja grada Beograda. Procenjene vrednosti koncentracije spora gljiva metodom po Omelijanskom prikazane su u tabeli 12. Najveća kontaminacija sporama gljiva bila je u depou za skladištenje ekspanata iz srednjeg veka ($366,60 \pm 9,80$ CFU m⁻³, n = 4, dok je najmanja u Istorijском odeljenju i Odeljenju za konzervaciju keramike ($26,25 \pm 2,92$ CFU m⁻³, n = 4 i $26,45 \pm 2,94$ CFU m⁻³, n = 4).

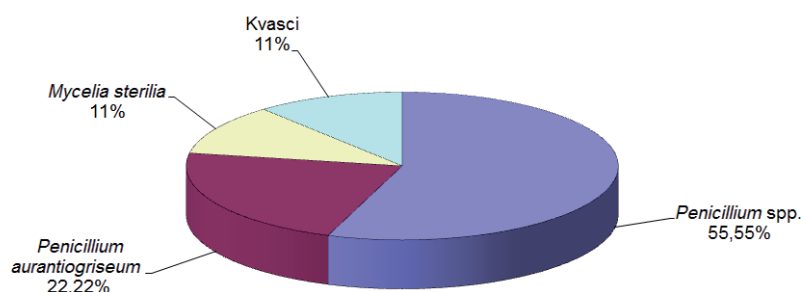
Iz vazduha svih 12 ispitivanih prostorija u Muzeju grada Beograda izolovane su filamentozne gljive i kvasci. Sve filamentozne gljive pripadaju klasi Hyphomycetes, dok kvasci nisu identifikovani. Kvalitativna zastupljenost pojedinih taksona gljiva se razlikuje

Tabela 12. Procenjene koncentracije vijabilnih propagula gljiva u vazduhu različitih prostorija Muzeja grada Beograda

Prostorija	Koncentracija spora u vazduhu (CFU m ⁻³)
1. Arheološki depo	235,78 ± 7,87
2. Depo za skladištenje eksponata iz srednjeg veka	366,60 ± 9,80
3. Istorijsko odeljenje	26,25 ± 2,92
4. Odsek za književnost, kulturu i nauku	235,78 ± 7,79
5. Istorijsko odeljenje za eksponate od 1941. god.	104,74 ± 7,79
6. Odsek za primenjenu umetnost i etnologiju	209,52 ± 7,90
7. Depo za likovnu umetnost	130,99 ± 6,71
8. Odeljenje za arhitekturu i urbanizam	209,84 ± 7,92
9. Depo za skulpture	288,18 ± 8,94
10. Odeljenje za konzervaciju metala	183,39 ± 6,85
11. Odeljenje za konzervaciju keramike	26,45 ± 2,94
12. Prijemna prostorija	183,43 ± 8,18m

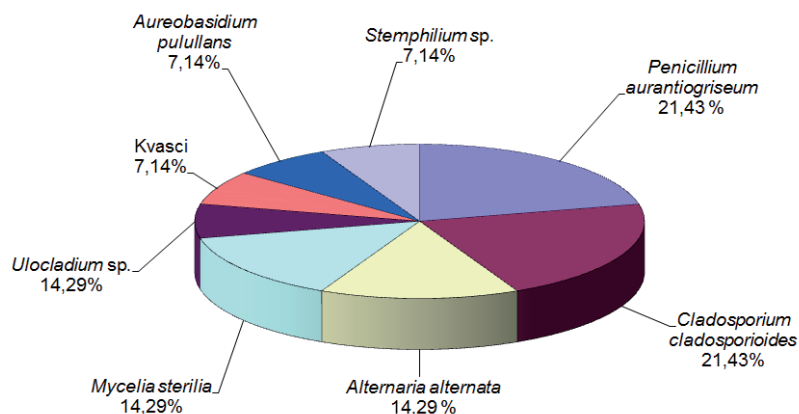
*Dobijene vrednosti su prikazane u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom sa 4 Petri kutije (n).

u ispitivanim prostorijama. U arheološkom depou u vazduhu su bile najbrojnije spore vrsti roda *Penicillium* (Slika 44).



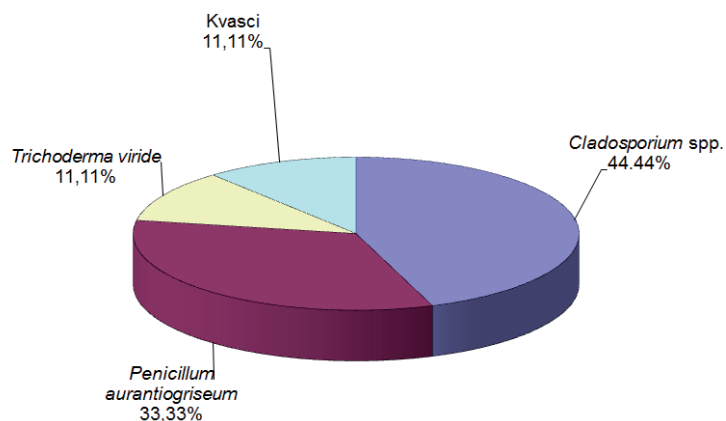
Slika 44. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u arheološkom depou Muzeja grada Beograda

Veliki diverzitet vijabilnih propagula gljiva u vazduhu zabeležen je u depou za skladištenje eksponata iz srednjeg veka. Vrste *C. cladosporioides* i *P. aurantiogriseum* bile su najdominantnije, dok su sa manjom učestalošću izolovane vrste rodova *Alternaria*, *Ulocladium*, *Aureobasidium* i *Stemphylium* (Slika 45).



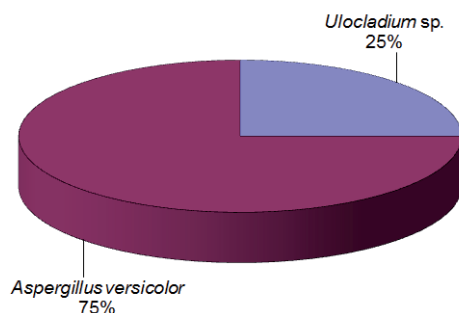
Slika 45. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u depou za skladištenje eksponata iz srednjeg veka Muzeja grada Beograda

U Istorijskom odeljenju u vazduhu je zabeležena jedino vrsta *T. viride*, dok je u vazduhu Odeljenja za književnost, kulturu i nauku, najdominantniji identifikovani takson je *Cladosporium spp.*, dok su vijabilne propagule vrsta *P. aurantiogriseum* i *T. viride* zastupljene sa manjom učestalošću (Slika 46).



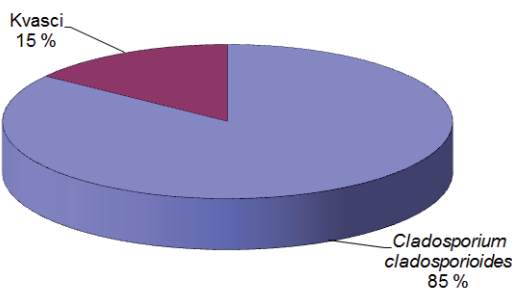
Slika 46. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Odeljenju za književnost, kulturu i nauku Muzeja grada Beograda

U istorijskom odeljenju za skladištenje eksponata od 1941. god najučestalija vrsta bila je *A. versicolor*, a spore jedne vrste roda *Ulocladium* su takođe bile prisutne u vazduhu (Slika 47).



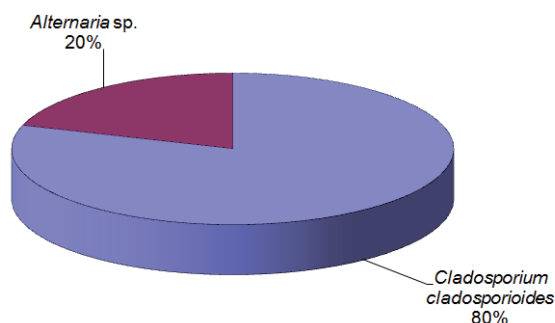
Slika 47. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Odeljenju za skladištenje eksponata od 1941. god. Muzeja grada Beograda

U vazduhu Odeljenja za primenjenu umetnost i etnologiju jedini zabeleženi takson filamentoznih gljiva je *C. cladosporioides* (slika 48).



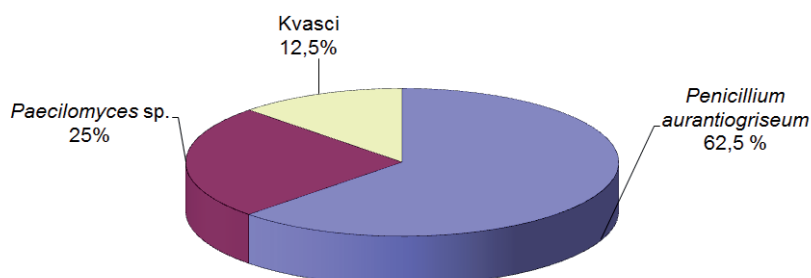
Slika 48. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Odeljenju za primenjenu umetnost i etnologiju Muzeja grada Beograda

U vazduhu depoa za likovnu umetnost kao dominantni takson zabeležena je vrsta *C. cladosporioides*, dok je *Alternaria sp.* imala manju učestalost (Slika 49).



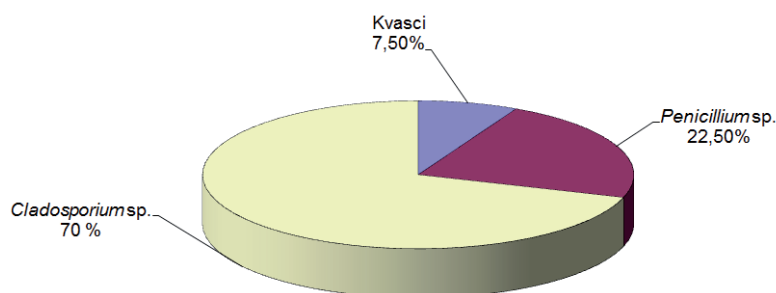
Slika 49. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Odeljenju za likovnu umetnost Muzeja grada Beograda

Najdominantnija vrsta izolovana iz vazduha Odeljenja za arhitekturu i urbanizam je *P. aurantiogriseum*, dok je *Paecilomyces sp.* imala manju učestalost (Slika 50).



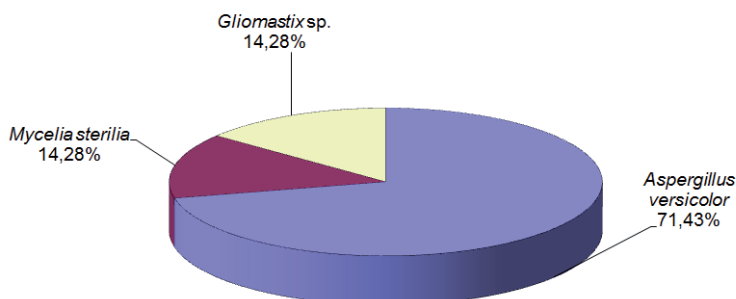
Slika 50. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Odeljenju za arhitekturu i urbanizam Muzeja grada Beograda

Iz vazduha depoa za skulpture izolovani su *Cladosporium sp.* i *Penicillium sp.* sa različitom učestalošću (Slika 51).



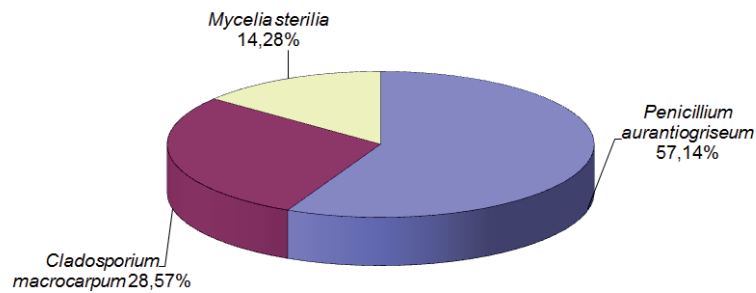
Slika 51. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u depou za skulpture Muzeja grada Beograda.

U vazduhu Odeljenja za konzervaciju metala najdominantnija vrsta bila je *A. versicolor*, dok je *Gliomastix* sp. bila manje zastupljena (Slika 52).



Slika 52. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Odeljenju za konzervaciju metala Muzeja grada Beograda

Vrsta *P. aurantiogriseum* je jedina identifikovana vrsta u vazduhu Odeljenja za konzervaciju keramike. Ista vrsta zajedno sa vrstom *C. macrocarpum* imala je veliku relativnu gustinu i u prijemnoj prostoriji Muzeja grada Beograda (Slika 53).

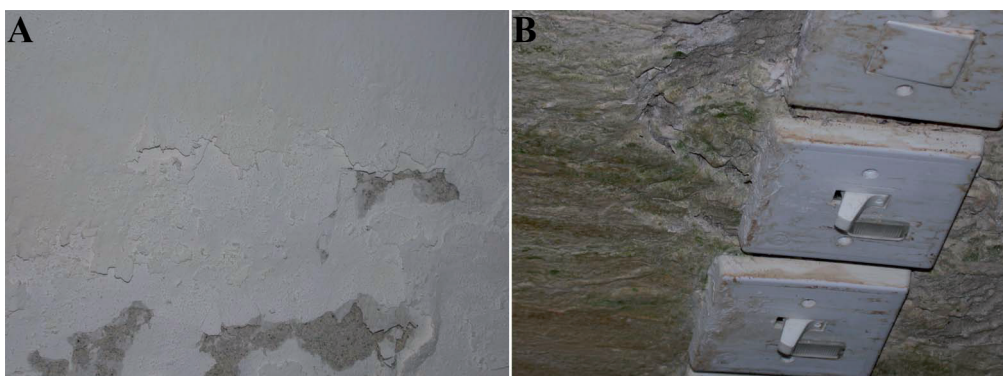


Slika 53. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u prijemnoj prostoriji Muzeja grada Beograda

5.2.3 Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta i iz vazduha izložbenog prostora i depoa Galerije slika „Sava Šumanović“

Mikromicete sa umetničkih predmeta

Uzorkovanje je izvršeno na ukupno 14 umetničkih slika u depou i izložbenom prostoru Galerije slika „Sava Šumanović“. Na zidovima izložbenog prostora uočena je deterioracija sa simptomima eksfolijacije i depozitom soli (Slika 54A). Na delovima zidova sa povećanom vlažnošću usled curenja vode konstatovana je zelena biopatina (Slika 54B).



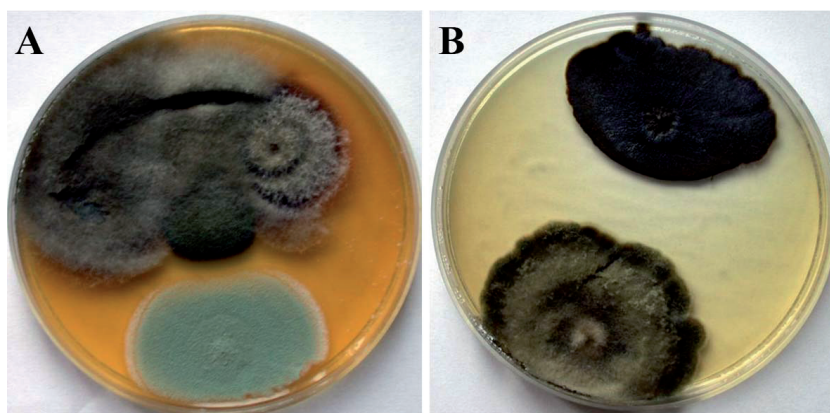
Slika 54. Simptomi deterioracije u Galeriji slika Sava Šumanović: **A.** eksfolijacija sa depozicijom soli; **B.** zelena biopatina

Na pojedinim umetničkim slikama uočen je vidljiv porast plesni na ramovima (Slika 55A), kao i na bojenim slojevima slika (Slika 55B).



Slika 55. Vidljiv porast plesni na umetničkim slikama Save Šumanovića: **A.** ram slike; **B.** bojeni sloj

Nakon perioda inkubacije uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa dobijeni su primarni izolati (mešovite kulture) filamentoznih gljiva i kvasaca (Slika 56).



Slika 56. Primarni izolati filamentoznih gljiva (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa umetničkih slika u Galeriji slika “Sava Šumanović”: **A.** primarni izolat sa slikarskih boja (GSSŠ/5); **B.** primarni izolat sa drvenog rama (GSSŠ/13)

Sa ukupno 8 umetničkih slika iz depoa Galerije slika Sava Šumanović identifikovano je ukupno 9 taksona filamentoznih gljiva (Tabela 13). Dominiraju pripadnici klase Hypohomycetes sa 8 identifikovanih taksona, dok je vrsta *R. stolonifer* jedini identifikovani izolat klase Zygomycetes. Izolovane filamentozne gljive koje u kulturama nisu obrazovale

reproduktivne strukture označene su kao *M. sterilia*. Izolovani kvasci nisu identifikovani do nivoa roda ili vrste.

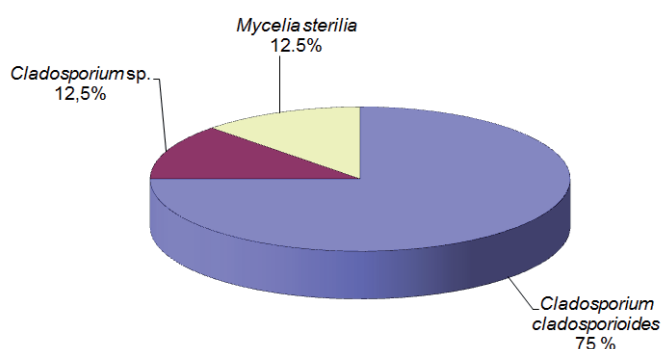
Sa ukupno 6 umetničkih slika iz izložbenog prostora identifikovano je ukupno 10 taksona filamentoznih gljiva (Tabela 13). Dominiraju pripadnici klase Hyphomycetes sa 9 identifikovanih taksona, dok je vrsta *R. stolonifer* jedini identifikovani izolati klase Zygomycetes. *M. sterilia* i kvasci nisu bili prisutni.

Tabela 13. Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta u galeriji Save Šumanovića

šifra uzorka	Umetnički predmet/supstrat	Identifikovane Mikromicete
depo		
GSSŠ/1	slika 206/slikarske boje– kolonije, sa bojenog sloja	<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link sp. beo kvasac <i>Mycelia sterilia</i>
GSSŠ/2	slika 351/slikarske boje	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. <i>Penicillium</i> Link sp.
GSSŠ/3.	ram velike slike/drvo	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. <i>Penicillium</i> Link sp.
GSSŠ/4	slika 35/1/slikarsko platno, naličje	<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) E.G. Simmons Crni kvasac
GSSŠ/5	slika 101/1, /slikarske boje	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Penicillium</i> Link sp. <i>Mycelia sterilia</i>
GSSŠ/6	slika 351 /slikarsko platno, naličje	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Ulocladium oudemansii</i> E.G. Simmons <i>Penicillium</i> Link sp. <i>Wardomyces</i> F.T. Brooks & Hansf. sp.
GSSŠ/7	slika 240, /slikarske boje	<i>Cladosporium</i> Link sp.
GSSŠ/8	slika 103 Š – vidljivi simptomi/ slikarske boje	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Penicillium</i> Link sp. <i>Ulocladium</i> Preuss sp. <i>Mycelia sterilia</i>
izložbeni prostor		
GSSŠ/9	slika 51/slikarske boje	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.
GSSŠ/10	slika 140 /slikarsko platno naličje	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Cladosporium</i> Link sp.
GSSŠ/11	ram slika 5/drvo	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) E.G. Simmons <i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb. <i>Penicillium</i> Link sp.
GSSŠ/12.	ram slika 140/drvo	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. <i>Penicillium</i> Link sp.
GSSŠ/13	ram slika 256/drvo	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.
GSSŠ/14	ram slike 256 /drvo	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. <i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Penicillium</i> Link sp.

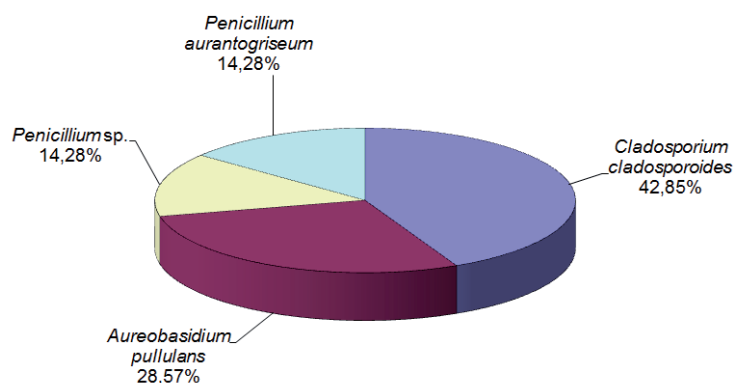
Mikološka analiza vazduha

U cilju određivanja kontaminacije vazduha zatvorenih prostorija sporama gljiva metodom pasivne sedimentacije izvršeno je uzorkovanje vijabilnih propagula gljiva prisutnih u depou i izložbenom prostoru Galerije slika “Sava Šumanovića”. Metodom Omelijanskog koncentracija spora gljiva u vazduhu depoa je procenjena na $104,87 \pm 8,18$ CFU m⁻³ (n = 4), dok je koncentracija vijabilnih propagula gljiva u izložbenom prostoru iznosila $91,76 \pm 8,06$ CFU m⁻³ (n = 4). Iz obe prostorije metodom pasivne sedimentacije izolovane su samo filamentozne gljive, dok kvasci nisu bili prisutni. Svi identifikovani taksoni pripadaju klasi Hyphomycetes. Spore vrsta roda *Cladosporium* imale su najveću frekvencu izolacije (Slika 57).



Slika 57. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u depou Galerije slika Sava Šumanović

Najdominantnija vrsta u izložbenom prostoru bila je *C. cladosporioides*, dok su vrste rodova *Aureobasidium* i *Penicillium* bile manje zastupljene (Slika 58).



Slika 58. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Izložbenom prostoru Galerije slika Sava Šumanović

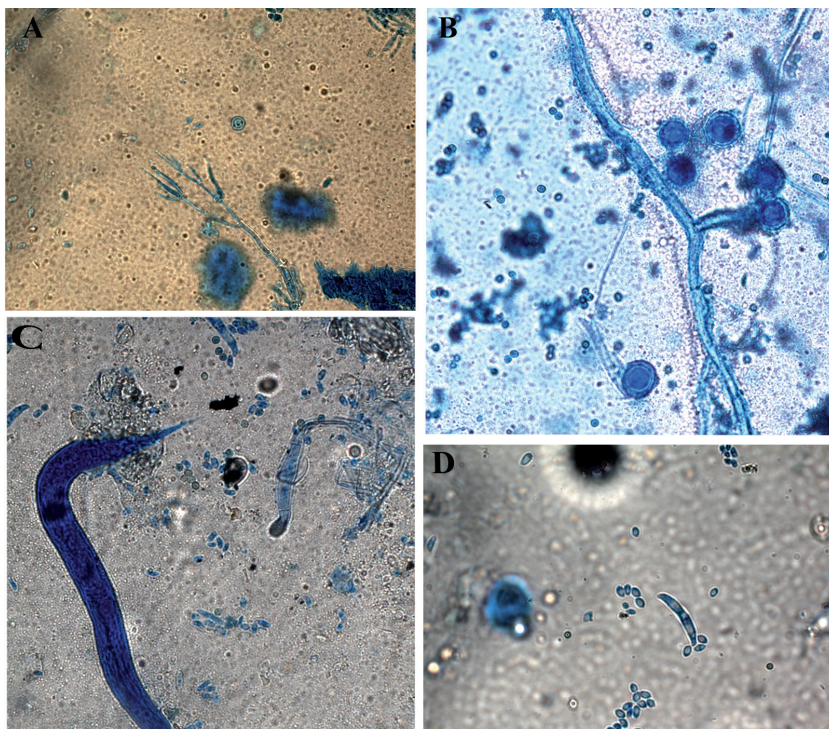
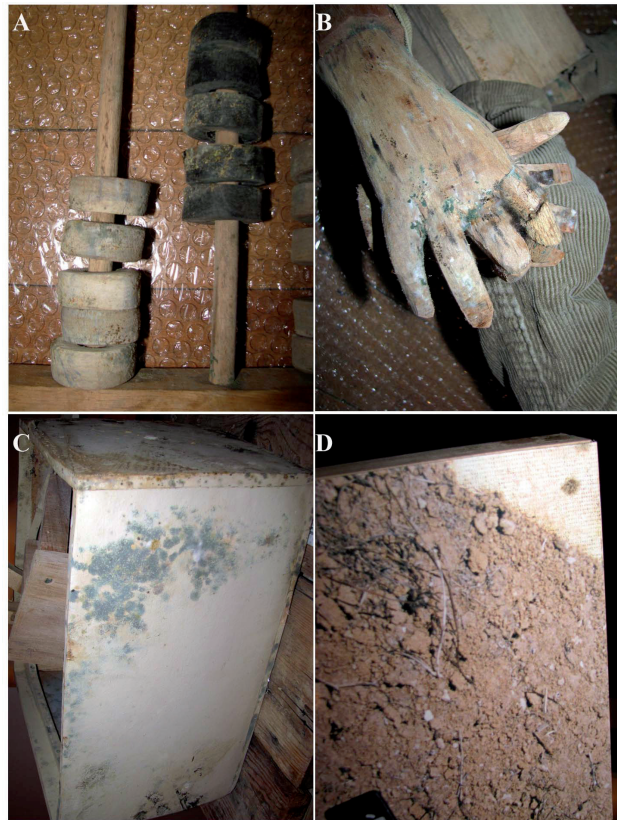
5.2.4 Mikromecete izolovane sa zbirki i iz vazduha Muzeja savremene umetnosti u Beogradu

Mikromicete sa umetničkih predmeta – edukativne igračke i fotografije

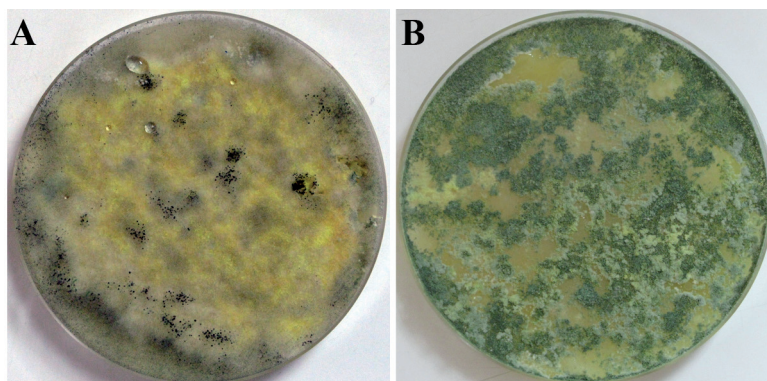
Uzorkovanje je izvršeno na ukupno 6 umetničkih predmeta u depou u Dvorani kulturnog centra. Na oštećenim drvenim predmetima bili su vidljivi simptomi oštećenja i porast plesni (Slika 59A-C), dok su na fotografijam prisutne dekolorizacije (Slika 59D).

Fragmenti biofilma sa dekolorizovanih fotografija uzeti su metodom adhezivne trake i posmatrani svetlosnim mikroskopom. Zabeleženo je prisustvo fungálnih struktura na oštećenim delovima fotografija. U pojedinim snimcima uočeni su konidiogeni aparati vrsta rodova *Paecilomyces* (Slika 60A) i *Humicola* (Slika 60B) kao i makro- i mikrokonidije vrste roda *Fusarium* (Slika 60D). Samo na jednom snimku uočene su nematode (Slika 60C).

Slika 59. Simptomi biodeterioracije na umetničkim predmetima iz zbirke Aleksandra Rafajlovića: **A-C.** vidljiv porast plesni na drvenim predmetima; **D.** dekolorizacija umetničke fotografije



Slika 60. Strukture gljiva i drugih organizama uočene pod svetlosnim mikroskopom u uzorcima uzetih metodom adhezivne trake sa oštećenih fotografija Aleksandra Rafajlovića: **A.** konidiogeni aparat *Paecylomyces variotii*; **B.** konidiogeni aparat *Humicola* sp.; **C.** nematoda; **D.** mikro- i makrokonidije *Fusarium* sp.



Slika 61. Primarni izolati filamentoznih gljiva (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa umetničkih predmeta i fotografija iz zbirke Aleksandra Rafajlovića u Dvorani Kulturnog Centra u Beogradu: **A.** primarni izolat sa drvenog sanduka sa dominacijom vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (DKC/4); **B.** primarni izolat fotografskog papira sa dominacijom *Trichoderma viride* (DKC/6)

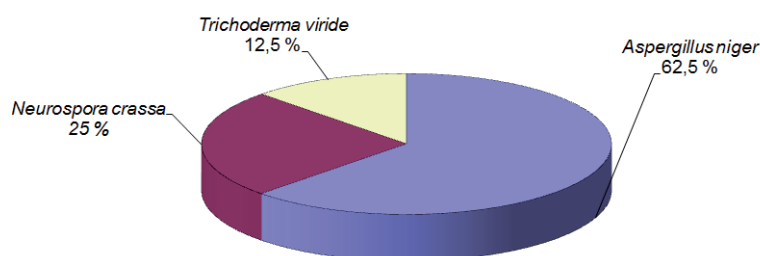
U primarnim izolatima (Slika 61) identifikovano je 15 taksona filamentoznih gljiva (Tabela 14). Dominiraju predstavnici klase Hyphomycetes sa 10 identifikovanih taksona. Klasa Pyrenomycetes podrazdela Ascomycotina je zastupljena sa dva predstavnika dok su iz klase Zygomycetes identifikovane tri vrste. I u ovim uzorcima je zabeležena *M. sterilia*.

Tabela 14. Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta u Dvorani kulturnog centra

šifra uzorka	Umetnički predmet/supstrat	Identifikovane Mikromicete
DKC/1	sanduk/drvo	<i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Trichoderma viride</i> Pers.
DKC/2	skulptura –računaljka/drvo	<i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Eurotium pseudoglaucum</i> (Blochwitz) Malloch & Cain <i>Mycelia sterilia</i>
DKC/3	ram i površina fotografije/ fotografski papir	<i>Fusarium</i> Link sp. <i>Paecylomices variotii</i> Bainier <i>Trichoderma viride</i> Pers. <i>Ulocladium</i> Preuss sp.
DKC/4	drveni sanduk – igračke/ drvo	<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter <i>Aspergillus niger</i> Tiegh. <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. <i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx <i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn
DKC/5	ram sanduka/drvo	<i>Alternaria</i> Nees sp. <i>Aspergillus niger</i> Tiegh. <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
DKC/6	fotografija/fotografski papir	<i>Humicola</i> Traaen sp. <i>Paecylomices variotii</i> Bainier <i>Trichoderma viride</i> Pers.

Mikološka analiza vazduha u sali Dvorane kulturnog centra Beograda

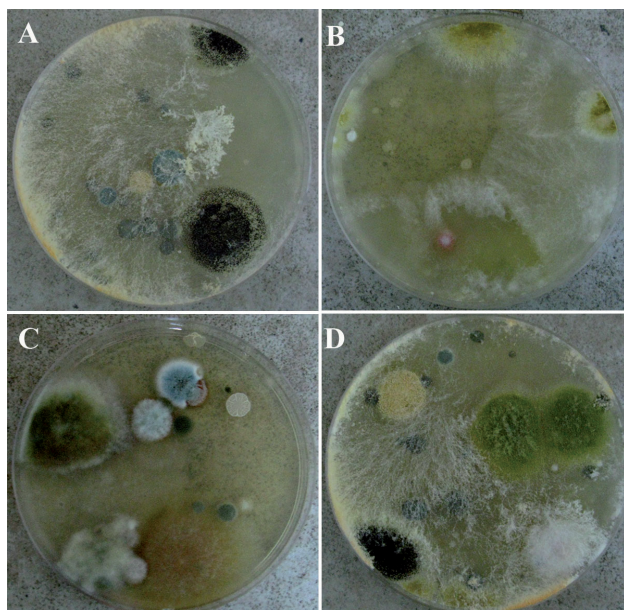
Mikološka analiza vazduha je izvršena u sali Dvorane kulturnog centra Beograda gde je privremeno skladištena zbirka edukativnih igračaka Marka Crnobrnje i fotografija Aleksandra Rafajlovića, oštećenih posle poplave u Turskom skladištu. Koncentracija spora gljiva u vazduhu je procenjena na $210,09 \pm 8,06$ CFU m⁻³ (n = 4), a dominiraju vijabilne propagule vrsta *A. niger*, *N. crassa* i *T. viride* (Slika 62).



Slika 62. Relativna zastupljenost taksona gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u Dvorani Kulturnog Centra

Mikromicete sa umetničkih predmeta iz trezora Narodne banke Srbije

Sa ukupno 6 umetničkih predmeta bez vidljivih simptoma deterioracije u trezoru Narodne banke Srbije izolovano je 11 taksona filamentoznih gljiva. Ispitivani umetnički predmeti nisu fotografisani iz sigurnosnih razloga. U primarnim izolatima (Slika 63) dominiraju pripadnici klase Hyphomycetes sa 10 identifikovanih taksona. *N. crassa* je jedini pripadnik Pyrenomycetes. Među primarnim izolatima su prisutni i kvasci i *M. sterilia* (Tabela 15).



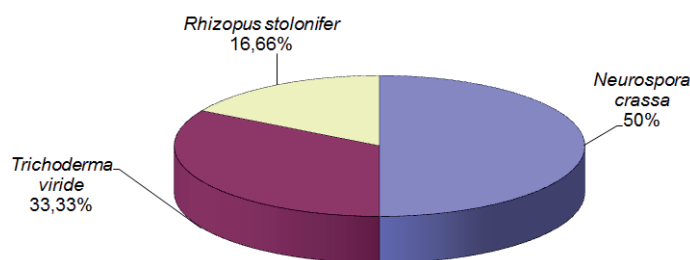
Slika 63. Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (MEA sa antibiotikom) iz uzoraka uzetih metodom sterilnog brisa sa umetničkih predmeta iz trezora Narodne banke: **A.** kolonije sa dominacijom *Penicillium* sp. i *Cladosporium cladosporioides* (MSU/5); **B.** kolonije sa dominacijom *Neurospora crassa* (MSU/1); **C.** kolonije sa dominacijom *Penicillium* spp. (MSU/3); **D.** izolati sa dominacijom *Aspergillus* sp i *Penicillium* sp. (MSU/2)

Tabela 15. Mikromicete izolovane sa umetničkih predmeta u trezoru Narodne banke Srbije

šifra uzorka	Opis uzorkovanog mesta	Identifikovane Mikromicete
MSU/1	slika "Pijana lađa", Sava Šumanović/slikarske boje	<i>Fusarium</i> Link sp. <i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier <i>Trichoderma viride</i> Pers.
MSU/2	slika Save Šumanovića/slikarsko platno, naličje	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. <i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx <i>Penicillium</i> Link sp. <i>Trichoderma viride</i> Pers <i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge kvasci
MSU/3	skulptura/drvo	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx <i>Penicillium</i> Link sp <i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge <i>Trichoderma viride</i> Pers. kvasci
MSU/4	slika Vere Božičković Popović/slikarske boje	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. <i>Trichoderma viride</i> Pers <i>Penicillium</i> Link sp
MSU/5	skulptura/drvo	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge kvasci
MSU/6	slika Save Šumanovića/slikarsko platno, naličje	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries <i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx <i>Trichoderma viride</i> Pers.

Mikološka analiza vazduha u trezoru Narodne banke Srbije

U trezoru Narodne banke Srbije nakon analize vazduha metodom pasivne sedimentacije procenjena koncentracija spora je $157,27 \pm 8,74$ CFU m⁻³ (n = 4). U vazduhu su prisutne vijabilne propagule vrsta *N. crassa*, *T. viride* i *R. stolonifer* (Slika 64).



Slika 64. Relativna gustina mikromiceta gljiva (%) izolovanih metodom pasivne sedimentacije u trezoru Narodne banke Srbije

5.2.5 Pregled izolovanih mikromiceta iz muzejskih zbirki prema supstratima koje kolonizuju

Uzorkovanje vijabilnih propagula gljiva sa umetničkih predmeta u ustanovama kulture izvršeno je metodom sterilnog brisa. Ispitivani umetnički predmeti su izrađeni od različitih tipova materijala, koji predstavljaju supstrat za kolonizaciju gljivama. Stoga je izvršeno grupisanje mikromiceta prema tipu supstrata koje kolonizuju na:

- 1. mikromicete izolovane sa materijala od drveta:** *A. corymbifera* (DKC/4); *A. alternata* (GSSŠ/13, MSU/3); *Alternaria* spp. (DKC/4, DKC/5); *A. flavus* (GSSŠ/14, DKC/2); *A. niger* (MIJ/3, MIJ/4, MIJ/6, GSSŠ/11, DKC/4, DKC/5, MSU/5); *A. ochraceus* (DKC/4, DKC/5, MSU/5); *C. globosum* (DKC/1, DKC/5); *C. cladosporioides* (GSSŠ/11, GSSŠ/12, GSSŠ/13, GSSŠ/14, MSU/5); *E. purpurascens*

- (GSSŠ/11); *E. pseudoglaucum* (DKC/2); *N. crassa* (DKC/5, MSU/3, MSU/5); *P. verrucosum* (MSU/3, MSU/5); *Penicillium* spp. (MIJ/1, MIJ/6, GSSŠ/3, GSSŠ/11, GSSŠ/12, GSSŠ/14, MSU/3); *R. stolonifer* (MIJ/1, GSSŠ/3, GSSŠ/12, GSSŠ/14, DKC/5); *S. racemosum* (DKC/4); *T. viride* (MSU/3) i *U. chartarum* (GSSŠ/11),
2. **mikromicete izolovane sa bojnih slojeva slika:** *Alternaria* sp. (MIJ/8); *A. ochraceus* (MSU/4); *A. versicolor* (GSSŠ/9); *Aspergillus* sp. (GSSŠ/1); *C. cladosporioides* (GSSŠ/5, GSSŠ/8); *Cladosporium* sp. (: GSSŠ/7); *Drechslera* sp. (MGB/12); *Fusarium* sp. (MSU/1); *N. crassa* (MSU/1); *P. variotii* (MSU/1, MSU/4); *P. aurantiogriseum* (MGB/8, MGB/12); *Penicillium* spp. (GSSŠ/2, GSSŠ/5, GSSŠ/8, MSU/4); *R. stolonifer* (MGB/8, GSSŠ/2); *T. viride* (MSU/1, MSU/4) i *Ulocladium* sp. (GSSŠ/8).
3. **mikromicete izolovane sa poledine slikarskih platna:** *A. alternata* (MSU/2); *A. flavus* (MSU/2); *A. niger* (MSU/2); *A. ochraceus* (MSU/2); *C. globosum* (MIJ/10); *C. cladosporioides* (GSSŠ/6, GSSŠ/10, MSU/2); *Cladosporium* sp. (GSSŠ/10); *P. verrucosum* (MSU/2); *Penicillium* sp. (GSSŠ/6, MSU/2); *T. viride* (MSU/2); *U. chartarum* (GSSŠ/4); *U. oudemansii* (GSSŠ/6) i *Wardomyces* sp. (GSSŠ/6),
4. **mikromicete izolovane sa fotografskog papira:** *Fusarium* sp. (DKC/3); *Humicola* sp. (DKC/6); *P. variotii* (DKC/3, DKC/6); *R. stolonifer* (MGB/13); *T. viride* (DKC/3, DKC/6) i *Ulocladium* sp. (DKC/3).
5. **mikromicete izolovane sa tkanina:** *A. niger* (MIJ/2); *A. versicolor* (MIJ/7); *Aspergillus* sp. (MIJ/7) i *Penicillium* sp. (nalaz: MIJ/7).

5.2.6 Pregled mikromiceta izolovanih iz vazduha zatvorenih prostorija ispitivanih institucija kulture

Uzorkovanje vijabilnih propagula gljiva iz vazduha, metodom pasivne sedimentacije, izvršeno je u 17 prostorija (n), u 4 ustanove kulture. U Muzeju grada Beograda, uzorkovanje je izvršeno u ukupno 12 prostorija. U Galeriji Sava Šumanović u dve prostorije, dok je u Muzeju Savremene umetnosti Beograda i u Muzeju istorije Jugoslavije, Dvorani

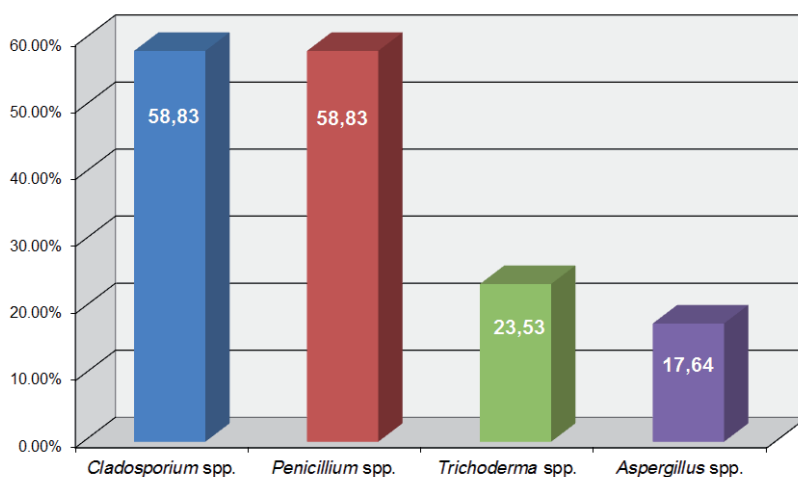
kulturnog centra i trezoru Narodne banke Srbije uzorkovanje izvršeno u po jednoj prostori-ri. Poređenjem kvalitativnog sastava identifikovanih mikromiceta iz vazduha u svih 17 ispitivanih prostorija utvrđeno je da je najveću frekvencu izolacije imala vrsta *P. aurantiogriseum* (41,18%), a zatim *C. cladosporioides* (29,41%). Najmanja zastupljenost od 5,88% je zabeležena kod 9 taksona, tj. 8 vrsta i *Alternaria* spp. Učestalost identifikovanih mikromiceta iz vazduha svih ispitivanih prostorija prikazana je u Tabeli 16.

Poređenjem kvalitativnog sastava identifikovanih rodova može se zaključiti da u

Tabela 16. Učestalost identifikovanih mikromiceta u vazduhu ispitivanih 17 prostori-ri različitih muzeja na teritoriji Beograda.

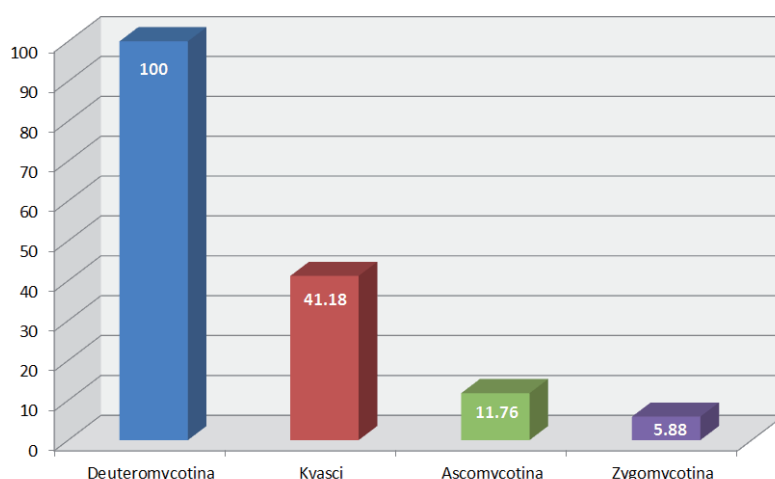
Takson	Učestalost (%)
<i>Alternaria</i> Nees spp.	5,88
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	5,88
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	5,88
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	11,76
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	11,76
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	29,41
<i>Cladosporium</i> Link sp.	17,64
<i>Cladosporium macrocarpum</i> Preuss	11,76
<i>Geotrichum candidum</i> Link	5,88
<i>Gliomastix</i> Guég. sp.	5,88
<i>Graphium putredinis</i> (Corda) S. Hughes	5,88
<i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge	11,76
<i>Paecylomyces</i> Bainer. sp.	5,88
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	41,18
<i>Penicillium</i> Link sp.	17,64
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	5,88
<i>Stemphylium</i> Wallr. sp.	5,88
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	23,53
<i>Ulocladium</i> Preuss sp.	11,76

bioaresolnoj komponenti vazduha zatvorenih prostorija ispitivanih muzeja na teritoriji Beograda dominiraju vrste rodova *Cladosporium* i *Penicillium*, sa učestalošću izolacije preko 50%, dok su vrste rodova *Aspergillus* i *Trichoderma* bile dvostruko manje zastupljene (25%) u aerosolnoj komponenti vazduha analiziranih prostorija (Slika 65).



Slika 65. Procentualna zastupljenost dominantnih rodova mikromiceta u vazduhu ispitivanih prostorija

Izolacija gljiva iz vazduha korišćenom metodom pokazala je dominaciju filamentoznih gljiva koje su izolovane iz svih ispitivanih prostorija, dok je učestalost kvasolikih formi 41,18%. U okviru filamentoznih gljiva pripadnici klase Hyphomycetes (Deuteromycotina) imale su najveću učestalost izolovanja (100%), dok je učestalost gljiva iz podrazdela Ascomycotina i Zygomycotina znatno manja (Slika 66).



Slika 66. Procentualna zastupljenost filamentoznih gljiva različite taksonomske pripadnosti sa izdvojenim kvasolikim formama, u vazduhu ispitivanih prostorija u različitim institucijama kulture

* * *

Korišćena metoda pasivne sedimentacije za analizu vazduha je vrlo prihvatljiva jer ne zahteva skupe uzorkivače vazduha i do rezultata se dolazi vrlo brzo. Ipak, treba naglasiti da dobijene vrednosti predstavljaju samo procenu stanja fungalne kontaminacije vazduha, a ne realne vrednosti. Analiza prisustva gljiva u vazduhu u zatvorenih prostorija vrši se zbog njihovog mogućeg uticaja na objekte kulturne baštine i zdravlje ljudi. Umetnički predmeti izrađeni su od različitih materijala koji se odlikuju različitim stepenom bioreceptivnosti i mogu predstavljati supstrat za kolonizaciju gljivama, ako su spore prisutne u vazduhu. Kolonizacija umetničkih predmeta gljivama dovodi do procesa biodeterioracije što često ima za posledicu promenu njihovog izgleda i vrednosti. Prisustvo spore gljiva u zatvorenom prostoru može biti jedan od uzročnika „sindroma bolesne zgrade” (SBS). (Godish, 2001). SBS predstavlja skup simptoma (alergijske reakcije, astma, umor, glavobolja, mučnina, suva koža, iritacija očiju i nosa), koji se javljaju usled dugog boravka u zatvorenim prostorijama, a posledica je lošeg kvaliteta vazduha (IAQ). Prisustvo spora gljiva u visokoj koncentraciji u zatvorenim prostorijama snižava IAQ. SBS se prvi put pominje u izveštaju Svetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 1990. godine (Godish, 2001). Spore gljiva dospevaju u zatvorene prostore iz spoljašnje sredine kroz različite tipove otvora (prozori, vrata, ventilacioni sistemi i dr.) ili ih ljudi unose na svojoj odeći (Niesler i dr., 2010; Ljaljević Grbić i dr., 2008).

U svetu još uvek nije prihvaćena zvanična standardizacija kontaminacije zatvorenih prostora sporama gljiva. Prema Wonder Makers Environmental, Inc., (2001) i prema Eagle Industrial Hygiene Associates (2004), zatvoreni prostor se smatra kontaminiranim ako je CFU m⁻³ veći od 1000. Radler de Aquino i de Góes, (2000) smatraju da nivo broj vijabilnih propagula gljiva u zatvorenim prostorijama ne sme biti procenjen na više od 750 CFU m⁻³, dok Kolwzan i dr. (2006) smatraju da je već preko 300 CFU m⁻³ kritično. U praksi se još poštuju preporuke WHO iz 1990 godine po kojima se koncentracija vijabilnih propagula gljiva u vazduhu zatvorenih prostorija toleriše ako ne prelazi 500 CFU m⁻³. Poređenjem dobijenih rezultata istraživanja sa svetskim standardima, može se

zaključiti da su ispitivane prostorije u Srbiji umereno kontamirane. Najveća koncentracija vijabilnih propagula gljiva bila je u depou za skladištenje eksponata iz srednjeg veka Muzeja grada Beograda ($366,60 \pm 9,80$ CFU m⁻³, n = 4), što je ispod kritičnog nivoa preporuke WHO. Imajući u vidu namenu prostorije, vrednost CFU m⁻³ svakako nije zanemarljiva i zahteva primenu preventivnih mera, kao i konstantno praćenje stanja. Borrego i dr. (2010) su takođe koristili metodu pasivne sedimentacije po Omelijanskom za procenu fungalne kontaminacije u Biblioteci fotografija Nacionalnog arhiva Kube (Photographic Library of the National Archive of the Republic of Cuba, PLNARC) i u istorijskom arhivu Muzeja La Plata (Historical Archive of the Museum La Plata, HAMP). U PLNARC fungalna kontaminacija je procenjena na 492,8 CFU m⁻³, a u HAMP 229,9 CFU m⁻³. Ovi autori razlike u koncentraciji vijabilnih propagula gljiva tumače različitim okruženjem objekata. PLNARC je smešten u šumskom okruženju, gde je u prirodnim uslovima veća koncentracija vijabilnih propagula gljiva, a samim tim veći je influks spora iz spoljašnje sredine, dok je HAMP smešten u urbanoj sredini. Imajući u vidu da su svi ispitivani prostori u Srbiji u urbanom okruženju, CFU vrednosti su bliske procenjenim vrednostima u HAMP.

Metoda pasivne sedimentacije je često korišćena za ispitivanje aeromikrobiote mnogih zatvorenih prostorija. Ovom metodom su Bogomolova i Kirtsideli (2009) ispitivali prisustvo gljiva u vazduhu stanica podzemne železnice u Moskvi i Sankt Petersburgu, a procenu brojnosti vijabilnih propagula gljiva uradili metodom po Omelijanskom. U svim ispitivanim stanicama CFU vrednost bila je ispod dozvoljene gornje granice po WHO, osim u slučaju stanice Гостіный двор u Sankt Petersburgu (864 ± 374 CFU m⁻³). Imajući u vidu da je ova stanica najprometnija i da dnevno kroz nju prođe više od 49 000 putnika, rezultat sugeriše da je i ljudski faktor vrlo bitan za dospevanje spora gljiva u zatvorene prostore.

Sa stanovišta potencijalnog rizika po zdravlje ljudi koji borave u zatvorenim prostorijama, osim brojnosti vijabilnih propagula gljiva u vazduhu bitan je kvalitativni sastav prisutnih zajednica mikromiceta. U vazduhu svih ispitivanih zatvorenih prostorija koje

predstavljaju depoe za skladištenje umetničkih dela i izložbene prostore najveću frekvencu izolacije imale su vrste rodova: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Trichoderma*. Izolovane mikromicete mogu uticati na IAQ i biti uzročnici SBS, pre svega alerijskih reakcija i respiratornih smetnji. Predstavnici rodova *Cladosporium* i *Alternaria* su glavni izazivači alergijskih reakcija u zatvorenim prostorijama (Achatz i dr., 1995). Konstantno izlaganje visokim koncentracijama spora vrsta roda *Cladosporium* uzrokuje hroničnu astmu i jake alergijske reakcije (Flanning i dr., 2001). Iz konidija velikog broja vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* izolovani su mnogi protenski molekuli koji se vezuju za imunoglobulin G (IgG) i izazivaju alergijske reakcije (Schwab i Straus, 2004). Izolovana vrsta *A. versicolor*, sa značajnom učestalošću (11,76%), je producent proteina Asp v 13 koji deluje kao snažan alergen (Shi i Miller, 2011). Takođe, *A. niger* je producent alergena označenih Asp n 14 i Asp n 18 (Knutsen i dr., 2011). Niesler i dr. (2010) su proučavali kontaminaciju vazduha u depou za skladištenje slika, mapa i predmeta koji su pripadali logorašima u muzejskom kompleksu Aušvic-Birkenau i pronašli dominaciju filamentoznih gljiva u odnosu na kvasce što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Ovi autori kao najfrekventnije izolate navode vrste rodova *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Rhizopus* i *Ulocladium*, dok su samo vrste roda *Aspergillus* bile među frekventnijim u ovim istraživanjima. Međutim, rezultati analize vazduha iz depoa za skladištenje starih mapa u Nacionalnom arhivu Republike Kube autora Guiamet i dr. (2011) u velikom procentu podudaraju sa dobijenim rezultatima (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* i *Syncephalastrum*). Poređenjem rezultata ovih istraživanja može se zaključiti da sastav aeromikrobiote zatvorenih prostorija uglavnom čine propagule vrsta koje obilno sporulišu i proizvode sitne spore u masi.

Na supstratu od drveta metodom sterilnog brisa izolovane su vrste rodova *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma* i *Ulocladium*. Neke od izolovanih vrsta zabeležene su i na drugim umetničkim predmetima od drveta, tako Fazio i dr. (2010) su saopštili da mikromicete *C. globosum* i *N. sphaerica* kolonizuju jezuitsku drvenu skulpturu,

deponovanu u Prirodnjačkom muzeju u Buenos Ajresu (Argentina). Mnogo veći broj mikromiceta (vrste rodova *Cadophora*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Cryptococcus*, *Hormonema*, *Rhodotorula* i *Fusarium*) kolonizovao je arheološko drvo od koga su izgrađene kolibe za potrebe naučnoistraživačke ekspedicije istraživača Robert F. Scott i Ernest Shackleton na Antarktiku u periodu od 1901. do 1911 (Arenz i dr., 2006). Takođe, sa arhološkog drva sa nalazišta iz perioda Neolita u Grčkoj Dispilio, izolovane su vrste rodova *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Stemphylium*, *Trichoderma* (Pournou i Bogomolova, 2009). Poređenjem rezultata ovih istraživanja uočava se veliki broj zajedničkih taksona mikromiceta saopštenih na supstratu od drveta. Dominantan tip biodeterioracije na ovom tipu supstrata je hemijska asimilaciona biodeterioracija i većina gljiva koje kolonizuje drvo proizvode celulolitičke i ligninolitičke enzime koji dovode do truljenja i devastacije predmeta od drveta. U zavisnosti od tipa enzimskog kompleksa koje posuduju i tipa promene koje se javljaju na predmetima od drveta kolonizatori drveta se mogu podeliti u nekoliko grupa: izazivači bele truleži, izazivači mrke truleži i izazivači meke truleži (Erickson i dr. 1990). Ipak, primarni kolonizatori supstrata od drveta su oportunističke vrste sposobne da kao izvore ugljenika i azota koriste proste šećere, hemicelulozu, proteine i aminokiseline (Florian, 2002). Vrste sposobne da razlažu celulozu i lignin kolonizuju supstrat od drveta ako je supstrat bio vlažan tokom dužeg perioda vremena. *C. globosum* i *Alternaria* sp. proizvode enzime koji razlažu supstrate od drveta, i zabeležene su na drvenim skulpturama i edukativnim igračkama iz zbirke Marka Crnobrnje, koje su natopljene vodom tokom poplave u Turskoj. *C. globosum* spada u grupu gljiva izazivača meke truleže i ima sposobnost razlaganja celuloze u S₂ sloju sekundarnog ćelijskog zida biljaka (Popescu i dr., 2011), dok vrste roda *Alternaria* proizvode veliki broj enzima sposobnih da hidrolizuju celulozu do molekula glukoze (Sohail i dr., 2011).

Na umetničkim slikama, na bojenom sloju zabeležene su brojne mikromicete klasifikovane u 11 rodova, od kojih je 6 identifikovanih rodova zabeleženo i na poleđini slikarskog platna a *C. globosum* i *Wardomyces* sp. su karakteristični za platno. Za razliku

od zidnih slika i murala čija je mikrobiološka kontaminacija bila predmet mnogih istraživanja, umetničke slike su retko istraživane sa ovog aspekta, i stoga ne postoji veliki broj literaturnih podataka iz ove oblasti. Vukojević i Ljaljević Grbić (2011) su proučavali kontaminaciju umetničkih slika u 11 muzeja u Srbiji i najučestaliji taksoni su u velikoj meri podudarni kao i u ovim istraživanjima. Raznovrsnost mikromiceta je bila veća u istraživanju Vukojević i Ljaljević Grbić (2011) gde su zabeleženi i rodovi *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Graphium* i *Mucor*, dok jedino vrste roda *Neurospora* nisu nađene. Istraživanja Inoue i Koyano (1991) su potvrdila da su vrste rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Trichoderma* česti kolonizatori umetničkih slika oslikane metodom ulja na platnu. Poređenjem navedenih istraživanja uočava se veliki broj zajedničkih taksona zabeleženih na površini i platnima umetničkih slika.

Fotografski papir je retko proučavan sa stanovišta fungalne kolonizacije. Umetničke fotografije imaju slojevitou strukturu i sastoje se od papirne osnove, materijala potrebnih za formiranje slike i emulzionih gelova koji služe kao vezivo. Delovi fotografija najpodložniji kolonizaciji mikromicetama su papirna osnova i emulzije (Lourenço i Sampaio, 2009). Proučavanjem biodeterioracije fotografskog papira skladištenog u PL-NARC i HAMP i saopšteno je su da ga od filamentoznih gljiva kolonizuju samo vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, dok su glavni uzročnici propadanja kvasci i bakterije (Borrego i dr., 2010). Ipak, u slučaju zbirke oštećenih fotografija Aleksandra Rafajlovića, može se zaključiti da su filamentozne gljive glavni uzročnik propadanja fotografija. Možda je objašnjenje ovih razlika u tome što je ova zbirka poplavljena pa vlažan fotografski papir postao povoljni supstrat za kolonizaciju filamentoznim gljivama koje su sposobne da svojim enzimskim kompleksima vrše hemijsku disimilacionu biodeterioraciju. Metoda adhezivne trake, kojom je moguće direktno posmatrati mikroorganizme prisutne na različitim površinama spada u destruktivne metode koje mogu dodatno oštetiti umetničko delo, pa se stoga izbegava ili selektivno koristi prilikom proučavanja biodeterioracije umetničkih predmeta. Imajući u vidu da su fotografije iz zbirke Aleksandra Rafajlovića potpuno devastirane, ova metoda je mogla biti primenjena.

5.3 Mikromicete izolovane sa zidnih slika

U cilju proučavanja biodeterioracije zidnih slika crkvi i manastira u Srbiji metodom sterilnog brisa izvršeno je uzorkovanje vijabilnih propagula gljiva prisutnih na površini oslikanih zidova. Simptomi biodeterioracije koji se na zidnim slikama javljaju najčešće u vidu promene originalne obojenosti opisani su prilikom opservacije spomenika *in situ*.

Uzorkovanje plesni je izvršeno sa zidnih slika na sledećim lokalitetima: Crkva Svetog Nikole u Paležu, Crkva Svete Bogorodice Manastira Gradac i Crkva Svete Trojice Manastira Sopoćani.

5.3.1 Mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svetog Nikole u Paležu



Slika 67. Simptomi deterioracije freske Crkve Svetog Nikole u Paležu: dekolorizacija i promena u teksturi

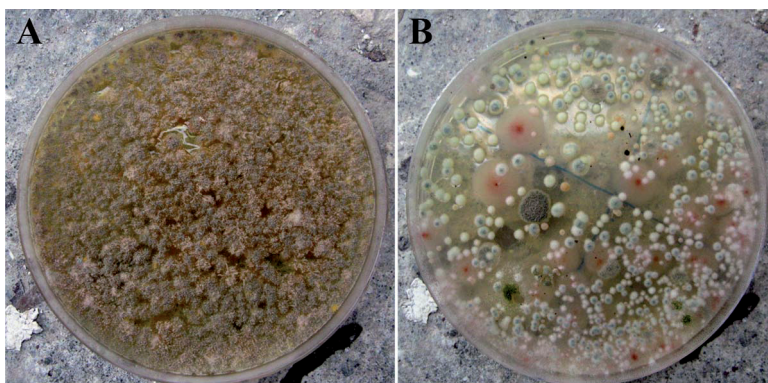
Opservacija in situ i simptomi

Opservacijom *in situ* konstatovana je promena intenziteta originalnih slikarskih boja korišćenih prilikom oslikavanja zidova kao i promena teksture površine freske i maltera (Slika 67).

Mikromicete sa zidnih slika

Sa 4 uzorkovana mesta sa vidljivim simptomima biodeterioracije izolovano je ukupno 7 taksona filamentoznih gljiva: 6 taksona pripada klasi Hyphomycetes, podrazdela Deuteromycotina. Jedan takson nije identifikovan do nivoa, ali se na osnovu prisustva piknidija zauključuje da pripada klasi Coelomycetes (Deuteromycotina). Taksoni identifikovani do nivoa roda ili vrste na zidnim slikama Crkve Svetog Nikole su: *A. favus*, *C. cladosporioides*, *E. purpurascens*, *P. aurantiogriseum* i *Penicillium* spp.

Nakon kultivacije na inokulisanim hranljivim podlogama dominirale su kolonije malog prečnika vrsta roda *Penicillium* (Slika 68). Broj kolonija gljiva po Petri kutiji (CFU) iznosio je više od 500.



Slika 68. A.,B.
Primarni izolati mikromiceta sa freske na Crkvi Svetog Nikole u Paležu

5.3.2 Mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac

Opservacija in situ i simptomi

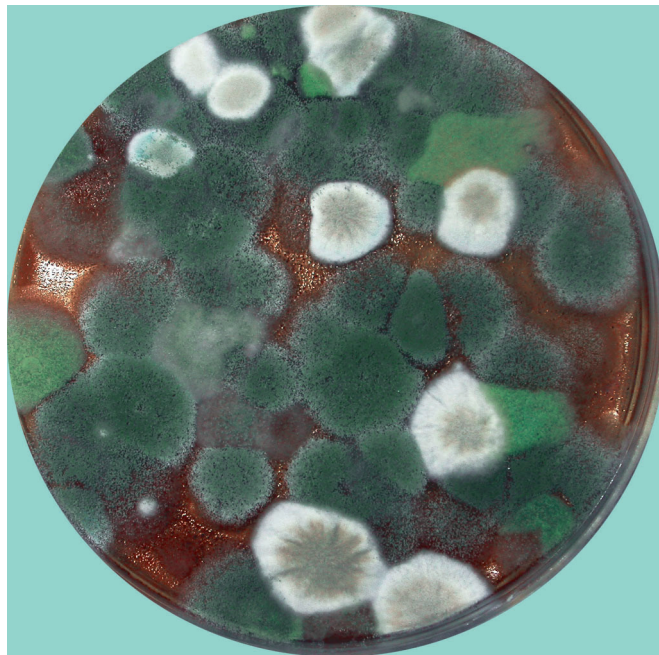
Opservacijom *in situ* uočena je totalna devastacija zidne slike. Na preostalom fragmentu freske vidljive su promene u vidu gubljenja boje i diskoloracija originalnih boja (Slika 69a). U bliskom okruženju fragmenta freske, u udubljenjima u malteru konstatovano je prisustvo gustog, zelenog biofilma (Slika 69b).

Mikromicete sa zidnih slika

Sa 4 uzorkovana mesta sa vidljivim simptomima biodeterioracije izolovano je 4 taksona filamentoznih gljiva. Sve identifikovane mikromicete pripadaju klasi Hyphomycetes (Deuteromycotina). Vrste roda *Aspergillus* bile su predstavljene sa tri od 4 identifikovane vrste: *A. fumigatus*, *Emericella nidulans* (Eidam) G. Winter (anamorf: *A. nidulans* (Eidam) G. Winter) i *A. versicolor*. U primarnim izolatima pored navedenih bio je prisutan i *Penicillium* sp. (Slika 70).



Slika 69. Simptomi deterioracije fragmenta freske Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac: **a.** diskoloracija bojenog sloja; **b.** biofilm u udubljenjima na malteru

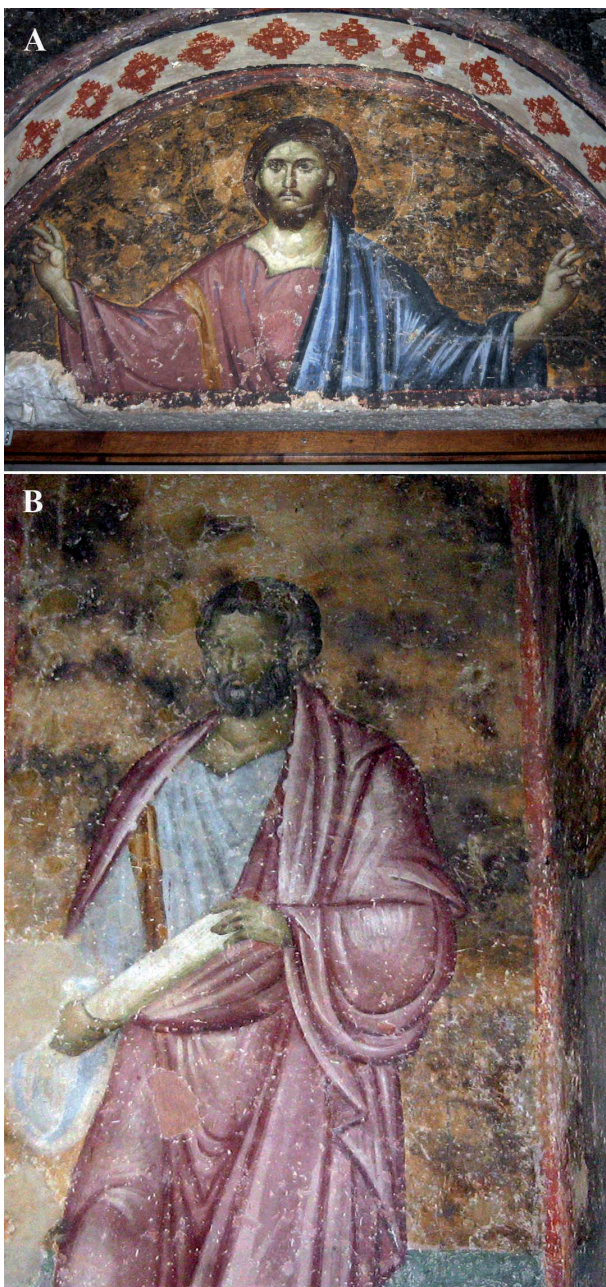


Slika 70. Primarni izolati mikromiceta sa freske u crkvi Svete Bogorodice manastira Gradac

5.3.3. Mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svete Trojice manastira Sopoćani

Opservacija in situ i simptomi

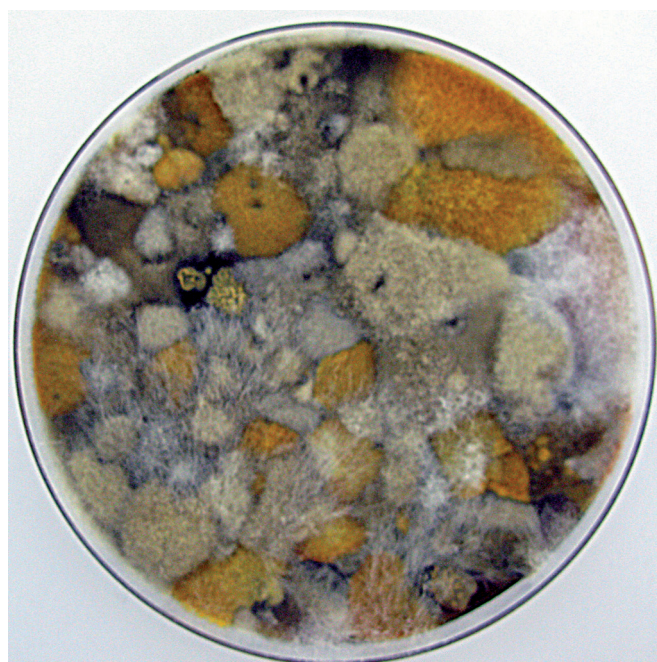
Opservacijom *in situ* konstatovana je promena intenziteta originalnih slikarskih boja korišćenih prilikom oslikavanja zidova. Na zlatno obojenom sloju konstatovana su mrko obojena polja nepravilnog oblika (Slika 71A i B).



Slika 71. Simptomi deterioracije fresaka Crkve Svete Trojice manastira Sopoćani:
A., B. diskoloracije zlatno obojenog sloja u vidu mrkih polja

Mikromicete sa zidnih slika

Sa 9 uzorkovanih mesta sa vidljivim simptomima biodeterioracije identifikovano je 7 taksona gljiva. Svi taksoni pripadaju klasi Hyphomycetes. Taksoni identifikovani do nivoa roda ili vrste na zidnim slikama Manastira Sopoćani su: *A. alternata*, *A. niger*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *E. purpurascens*, *N. sphaerica* i *Penicillium ochrochloron* Biourge (Slika 72).



Slika 72. Primarni izolati mikromiceta sa freske u crkve Svete Trojice manastira Sopoćani

* * *

Korišćena metoda sterilnog je nedestruktivna i vrlo primenljiv za uzorkovanje mikromiceta sa objekata kulturne baštine, uključujući i zidne slike. Vrste rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Nigrospora* i *Penicillium* su zabeležene na zidnim slikama u srpskim crkvama i manastirima. Najveću učestalost izolacije imale su vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* koje su zabeležene na svim istraživanim zidnim slikama. Biodeterioracija zidnih slika prouzrokovana gljivama u mnogim sakralnim objektima široma sveta bila je predmet mnogih istraživanja. Guglielmineti i dr. (1994) proučavajući

biodeteriorizaciju murala i fresaka u manastiru Sveti Demijan u Asizi (Italija) na slikama “Crocifisso con Francesco giovane” i “Mensa di S. Chiara zabeležili su veću raznovrsnost mikromiceta (*Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. i *Penicillium* spp.)”. Tako, 20 morfološki različitih gljiva iz rodova *Acremonium*, *Aspergillus*, *Blastobotrys*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Mortierella*, *Penicillium* i *Verticillium* je identifikovane su sa srednjovekovnih zidnih slika Kapele zamka Herberštajn (Schloss Herberstein) i Parohijskoj Crkvi Sveti Georgije u Štajerskoj, Austriji (Berner i dr., 1997). Gorbushina i Petersen (2000) su proučavali razvoj biofilma na zidnim slikama u Nemačkoj: Parohijskoj crkvi u Kodersdorfu sa zidnim slikarstvom iz XVIII veka, crkvi Svetog Petra i Pola sa freskama koje datiraju iz XII veka ali su bojene 1894. godine, i crkvi Sveti Martin u Grin Krajnsenu sa freskama iz XVI veka koje su ponovo bojene 1716. godine. Autori su izolovali oko 15 vrsta mikromiceta gde su značajni udeo imale vrste rodova *Acremonium*, *Aspergillus* i *Cladosporium*, često izolovane i sa drugih proučavanih fresko slika. Većina izolovanih gljiva spada u grupu halotolerantnih i uspešno su se razvijale na hranljivoj podlozi MEA obogaćenoj 10% NaCl. Ovo ukazuje da su gljive, koje kolonizuju freske, sposobne da se razvijaju u uslovima visokog osmotskog pritiska u spoljašnjoj sredini. Milanesi i dr. (2006) su proučavali biodeterioraciju fresaka u kapeli Svete Katarine u Sijeni (Italija) prouzrokovanu filamentoznim gljivama. Molekularnim metodama utvrdili su da je *P. chrysogenum* uzročnik deterioracije zidnih slika. Poređenjem predstavljenih rezultata različitih istraživanja uočava se veliki broj zajedničkih taksona gljiva izolovanih sa zidnih slika, posebno vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Kako veliki broj vrsta ova 2 roda su kserofilne gljive, to objašnjava njihovu učestalu pojavu na zidnim slikama gde je niska vrednost a_w (Dix i Webster, 1995). Pored toga, zidne slike su specifičan supstrat i po svom hemijskom sastavu, pa ova dva faktora imaju ključni uticaj na vrstu kolonizatora ali svakako dominiraju gljive adaptirane na vodni deficit.

Iako je broj morfološki različitih izolata identifikovanih na zidnim slikama u crkvama i manastirima u Srbiji relativno mali, imajući u vidu sposobnost gljiva da trajno i ireverzibilno izmene ovaj supstrat, broj identifikovanih taksona nije zanemarljiv. Penetracijom

hifa kroz oslikane slojeve dolazi do eksfolijacije bojenog sloja od podloge. Produkcijom enzima, neorganskih i organskih kiselina gljive oksiduju ili redukuju komponente supstrata zidnih slika i trajno ih oštećuju (Berner i dr., 1997).

5.4 Opis identifikovanih taksona mikromiceta na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima

Tokom ispitivanja mikrobiote na kulturno istorijskim objektima i umetničkim predmetima do nivoa vrste identifikovano je 38 izolata gljiva. Podrazdeo Zygomycotina je zastupljen sa 5 vrsta iz klase Zygomycetes. Iz podrazdela Ascomycotina identifikovane su po dve vrste iz klasa Pyrenomycetes i Plectomycetes. Najveći broj vrsta pripada klasi Hyphomycetes podrazdela Deuteromycotina (29), dok samo jedna identifikovana vrsta pripada klasi Blastomycetes podrazdela Deuteromycotina (*S. roseus*) (Tabela 17). Izolati određeni do nivoa roda na predmetima i objektima kulturne baštine, kao i u vazduhu zatvorenih prostorija institucija kulture su *Alternaria* spp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* spp., *Drechslera* sp., *Gliomastix* sp., *Fusarium* spp., *Humicola* sp, *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Stemphylium* sp., *Ulocladium* sp. i *Wardomyces* sp. Osim izolata *Mucor* sp. svi ostali pripadaju klasama Coelomycetes i Hyphomycetes (Deuteromycotina). Takođe, određeni broj izolata nije formirao reproduktivne strukture tako da nije bila moguća njihova identifikacija do nivoa roda ili vrste, pa su označene kao *M. sterilia*. Na osnovu građe micelije i ranijih iskustava ovi izolati najverovatnije pripadaju podrazdelu Deuteromycotina.

Sve izolovane vrste su predstavljene originalnim fotografijama izuzev *A. strictum*, *A. pullulans*, *E. purpurascens*, *S. roseus*, *S. racemosum* i *T. viride* preuzetih sa interneta i *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, dobijenih od dr Jelene Lević.

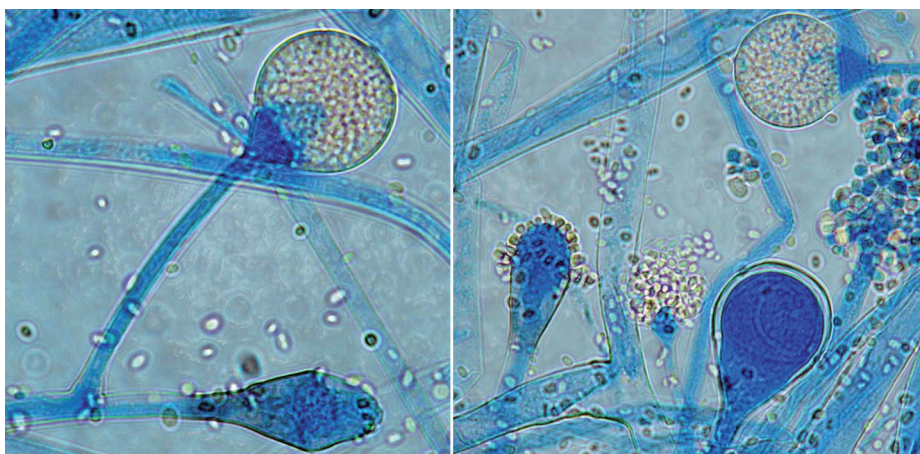
Tabela 17. Spisak identifikovanih taksona sa kulturno-istorijskih spomenika i umetničkih predmeta i vazduha zatvorenih prostoriya institucija kulture i njihova taksonomska pripadnost

Podrazdeo	Klasa	Vrsta
Zygomycotina	Zygomycetes	<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter
		<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt
		<i>Mucor</i> P. Micheli ex L. Sp.
		<i>Mucor racemosus</i> Bull.
		<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
Ascomycotina	Pyrenomycetes	<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn
	Plectomycetes	<i>Chaetomium globosum</i> Künze
		<i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge
		<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.
Coelomycetes	Blastomycetes	<i>Eurotium pseudoglaucum</i> (Blochwitz) Malloch & Cain
		<i>Phoma</i> Fr. spp.
		<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluyver & C.B. Niel
Deuteromycotina	Hyphomycetes	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams
		<i>Alternaria</i> Ness sp.
		<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.
		<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Link sp.
		<i>Aspergillus flavus</i> Link
		<i>Aspergillus fumigatus</i> Fressen
		<i>Aspergillus niger</i> Tiegh
		<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh
		<i>Aspergillus terreus</i> Thom
		<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.
		<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud
		<i>Bipolaris spicifera</i> (Bainier) Subram
		<i>Cladosporium</i> Link sp.
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries
		<i>Cladosporium macrocarpum</i> Preuss
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.
		<i>Drechslera</i> S. Ito sp.
		<i>Drechslera dematoidea</i> (Bubák & Wróbl.) Scharif
		<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb
		<i>Fusarium</i> Link spp.
		<i>Fusarium oxysporum</i> Schl.
		<i>Fusarium sambucinum</i> Fuckel
		<i>Geotrichum candidum</i> Link
		<i>Gliomastix</i> Guég sp.
		<i>Graphium putredinis</i> (Corda) S. Hughes
		<i>Humicola</i> Traen sp.
		<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason
		<i>Paecilomyces</i> Bainer sp.
		<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier
		<i>Penicillium</i> Link sp.
		<i>Penicillium expansum</i> Link
		<i>Penicillium ochrochloron</i> Biourge
		<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx		
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier		
<i>Stemphylium</i> Wallr. sp.		
<i>Trichoderma viride</i> Pers.		
<i>Ulocladium</i> Preuss sp.		
<i>Ulocladium chartarum</i> Preuss Simmons		
<i>Ulocladium oudemansii</i> E.G. Simmons		
<i>Wardomyces</i> F.T. Brooks & Hansf. sp.		

5.4.1 Zygomycotina

Absidia corymbifera (Cohn) Sacc. & Trotter

Morfologija: micelija raste vrlo brzo i prerasta Petri kutiju (Ø 9 cm), za manje od nedelju dana, formirajuću sivkastu paučinastu koloniju. Stoloni su 5-20 µm dugi, često sa kapljicama, hijalini ili smeđu, glatkih zidova. Granati rizoidi se obrazuju na zadebljanjima stolona, i dugi su do 370 µm. Sporangiofori su hijalini ili blago pigmentisani, glatki ili blago hrapavih zidova, retko granati, uzdižu se pojedinačno sa stolona ili u grupama od 3 do 7, dimenzija 40-500 × 3-13 µm (Slika 73). Sporangija je kruškasta, 10-40 µm u prečniku, u početku hijalina, a sa sazrevanjem postaje sivo mrka. Zid sporangije je providan, gladak ili blago hrapav. Kolumela je hijalina ili siva, loptasta ili jajasta ponekad sa kragom, Ø 7-30 µm (Slika 73). Sporangiospore su poluloptaste ili duguljasto elipsaste, hijaline ili svetlo sive, glatkih zidova, dimenzija 2,5-7 × 2,5-4,5 µm. Zigospore su loptaste ili blago spljoštene, smeđe, debelih zidova, sa nekoliko ekvatorijalnih grebena, Ø 40-95 µm.



Slika 73. *Absidia corymbifera*, sporangiofor sa kolumelom i sporangijom

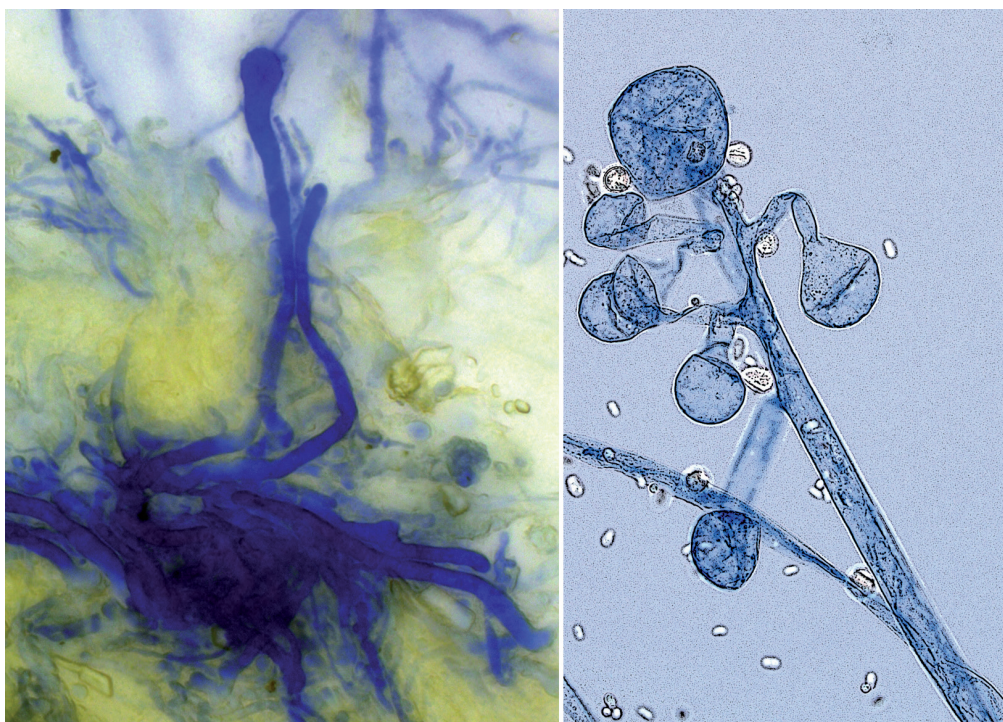
Ekologija i rasprostranjenje: kosmopolitska vrsta, izolovana sa različitih supstrata (zemljište, izmet, namirnice, mleko, zrna žita). Rede se javlja na životinjama (Samson i dr., 2004).

Nalaz: drvene edukativne igračke (DKC/4).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); stubovi kriptе „Abbey of Montecorona“, Peruđa, Italija (Cataldo i dr., 2008).

***Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt**

Morfologija: u kulturi micelija raste vrlo brzo i prerasta Petri kutiju (Ø 9 cm) za manje od nedelju dana, formirajući belo-sivu paučinastu koloniju. Glavnu masu kolonije čine uspravni sporangiofori koji se granaju verticilatno ili simpodijalno, dužine preko 800 µm (Slika 74). Sa njihove osnove polaze rizoidi. Sporangiofor i grane se terminalno završavaju sporangijom, koja je hijalina ili svetlo smeđa, loptasta ili poluloptasta. Sporangija formirana na sprangioforu je krupnija, dimenzija 25-37,5 × 20-35 µm, dok je formirana na granama sitnija, 13-23 × 11-20 µm (Slika 74). Sporangiospore su jednoćelijske i pojedinačne, loptaste, ređe jajaste, Ø 8,7-14 µm, ornamentisane sa šiljcima dugim od 2,5 do 3,8 µm. Na sporangiosporama se nekada mogu formirati kristalne strukture.



Slika 74. *Cunninghamella echinulata*, sporangiofor sa sporangijama

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsko rasprostranjenje, ali je učestalija u uslovima tople klime. Izolovana je iz vazduha, i zemljišta, i sa biljnog materijala.

Nalaz: granit (NJ) i karbonatni kamen (SS).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: zidne slike iz XIV do XVII veka u manastirima Voronet, Sučevita, Humor, Arbore, Patrata, Varatec, Agapia, Putna, Kozia i crkvi Curtea de Arges, Severna Moldavija, (Savulescu i Ionita, 1971).

***Mucor racemosus* Bull.**

Morfologija: u kulturi micelija raste vrlo brzo i prerasta Petri kutiju (Ø 9 cm) za manje od nedelju dana, formirajući sivo–smeđu paučinastu koloniju. Glavnu masu kolonije čine kratki i dugi sporangiofori koji se granaju monopodijalno ili simpodijalno (Slika 75). Kratke grane su uglavnom zakrivljene sa inkrustacijama na ćelijskom zidu. Sporangije su hijaline, sa starenjem postaju smeđe, bodljikavih zidova, do 70 µm u prečniku (Slika 75). Kolumela je jajasta, ili blago kruškolika, najčešće sa skraćenom bazom, svetlo smeđe boje sa kragom, Ø 37-55 µm. Sporangiospore su eliptične ili poluloptaste, glatkih zidova, sivkaste, dimenzija 5,5-10 × 4-7 µm. Hlamidospore su brojne, često i u sporangiorima, nekad i u kolumeli, oblika su bureta kad su mlade, poluloptaste u starijim kulturama, žućkaste boje. Zigospore su crveno–smeđe ili svetlo smeđe, loptaste ili poluloptaste, do 110 µm. Na površini zigospora obrazuju se kratke bodlje do 5 µm dužine.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsku distribuciju, a izolovana je sa različitih supstrata (zemljište, izmet, namirnice, mleko, semena žitarica). Kolonizuje je i životinje (Samson i dr., 2004).



Slika 75. *Mucor racemosus*, sporangiofori i sporangije

Nalaz: kamen pešćar (BM).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: kinematografski filmovi deponovani u muzejima i arhivama u Madridu, Barseloni i Gran Kanariji (Abrusci i dr., 2005).

***Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.**

Morfologija: micelija raste vrlo brzo u kulturi i za 7 dana prerasta Petri kutiju (Ø 9 cm) i formira belu paučinastu koloniju koja sa starenjem postaje sivo–smeđa usled obrazovanja smeđih sporangiofora i crno-smeđe sporangije. Visina kolonije može da dostigne i 20 mm. Sporangiofori su 1,5-4 mm visoki, pojedinačni ili u grupama od 2 do 7 (Slika 76). Uzdižu se sa bezbojnih ili tamno smeđih stolona sa grubim zidovima, sa kojih polaze i granati rizoidi (Slika 76). Sporangija je loptasta ili poluloptasta, Ø 50-360 µm, crno smeđe boje kad sazri (Slika 76). Kolumela je loptasta, poluloptasta, ili jajasta, Ø 40-250 µm. Sporangiospore su različitog oblika, često poligonalne ili jajaste, eliptične sa strijama, dimenzija 4-5 × 6-8 µm. Hlamidospore se nikad ne formiraju na stolonama, ali se ponekad mogu obrazovati na hifama.



Slika 76. *Rhizopus stolonifer*, rizoidi i sporangiofori sa sporangijama

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsku distribuciju i izolovana je iz zemljišta, žita, voća, povrća, orašica. Spore ove vrste su česte u vazduhu. Iako ima kosmopolitsko rasprostranjenje, češća je u toplijim krajevima (Samson i dr., 2004).

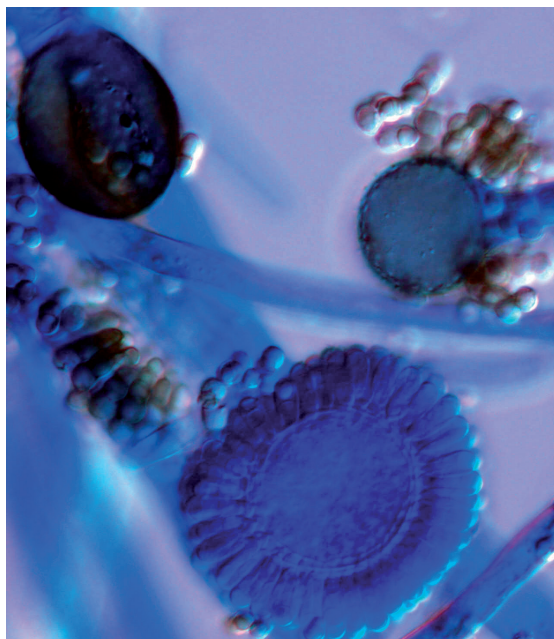
Nalaz: kamen pešćar (AP); drvena skulptura (MIJ/1); drveni ramovi slika (GSSŠ/3, GSSŠ/12 i GSSŠ/14); drveni sanduk (DKC/5); bojeni slojevi slika (MGB/8, GSSŠ/2); fotografski papir (MGB/13) i vazduh (MSU).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: vazduh katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); vazduh galerije egiptskih i vavilonskih eksponata Muzeja Baroda, Indija (Arya i dr., 2001); bojeni slojevi slika i drveni ramovi umetničkih slika u 11 muzeja, Srbija (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010).

***Syncephalastrum racemosum* Cohn.**

Morfologija: micelija raste vrlo brzo u kulturi i prerasta Petri kutiju (Ø 9 cm) za manje od nedelju dana, formirajući belu paučinastu koloniju koja sa starenjem postaje siva.

Visina kolonije dostiže i do 15 mm. Somatske hife su hijaline, granate. Septe se javljaju samo prilikom formiranja reproduktivnih struktura. Glavni sporangiofor polazi sa rizoida, nosi veliki broj izuvijanih bočnih grana, i završava se terminalnom vezikulom (Slika 77) a bočne grane lateralnom vezikulom. Preko cele površine vezikule obrazuju se merosporangije (Slika 77). Vezikule su smeđe, loptaste ili poluloptaste, retko jajaste. Terminalna vezikula je 30-40 µm, a lateralne 10-40 µm u prečniku. Merosporangije su sive, cilindrične, dimenzija 15-33 × 4 µm i sadrže 5 do 18 merospora. Merospore su loptaste ili jajaste, svetlo smeđe, blago grubih zidova, Ø 2,5-6,5 µm (Slika 77). Zigospore su loptaste, Ø 50-90 µm, narandžasto-smeđe boje i formiraju se uglavnom u supstratnoj miceliji.



Slika 77. *Syncephalastrum racemosum*, glavni sporangiofor sa terminalnom vezikulom, merosporangijom i merosporama.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je izolovana iz hrane, izmeta, žita. Češća je u tropskim i subtropskim krajevima (Samson i dr., 2004).

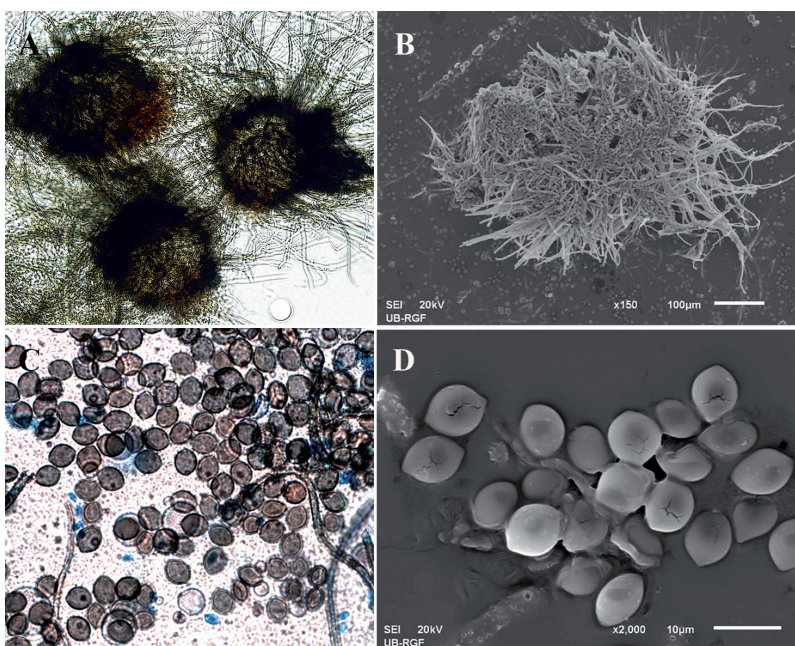
Nalaz: drvene edukativne igračke (DKC/4).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: vazduh galerije egipatskih i vavilonskih eksponata Muzeja Baroda, Indija (Arya i dr., 2001).

5.4.2 Ascomycotina

Chaetomium globosum Kunze

Morfologija: raste relativno brzo (5-7,5 cm, 10 dana, MEA) i formira maslinasto-smeđu koloniju. Boja kolonije potiče od gusto pakovanih peritecija. Peritecije su crno-smeđe, loptaste ili jajaste, obrasle velikim brojem tamnih hifa (hete ili dlake), dimenzija 150-350 μm (Slika 78A i B). Askusi su klavatni i sadrže 8 askospora. Askospore su limunaste, sa apikalnom klijajućom porom, dimenzija 9-11 \times 7-8,5 μm (Slika 78C i D). Askusi se razlažu se dok su u periteciji i oslobađaju askospore u masi zajedno sa mucilogenom supstancom kroz ostiolum.



Slika 78.
Chaetomium globosum:
A,B. peritecija sa hetama;
C,D. askospore

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsko rasprostranjenje i često je izolovana sa celuloznih supstrata (Samson i dr., 2004).

Nalaz: drveni sanduk (DKC/1 i DKC/5) i naličje slike (MIJ/10).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: polihromna drvena skulptura poreklom iz Južne Amerike, Prirodnjački muzej La Plata, Buena Aires, Argentina, (Fazio i dr., 2010); istorijski papirni dokumenti iz 18. i 19. veka, Kolekcija Porodice Tilman, Merilend, SAD (Szczepanowska i Cavaliere, 2000); vazduh katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); knjiga iz 19. veka sa simptomima foksinga (Rakotonirainy i dr., 2007) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielminetti i dr., 1994).

***Emericella nidulans* (Eidam) Vuill.**

Anamorf: *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter

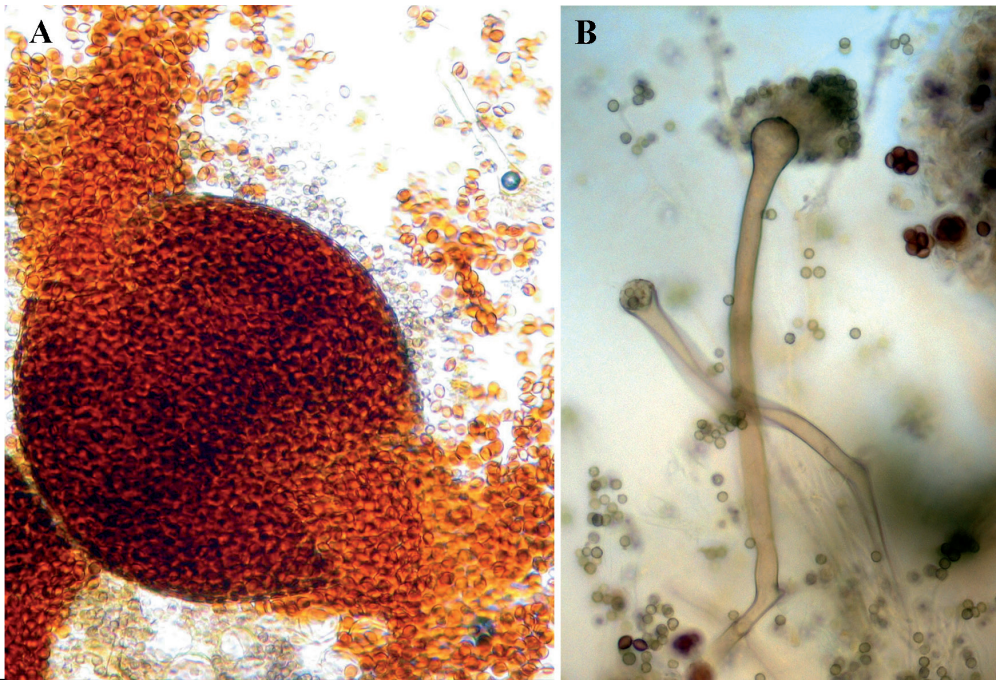
Morfologija: u kulturi raste relativno sporo i formira tamno zelenu koloniju. Nakon obrazovanja kleistotecija, na koloniji se uočavaju žute ili narandžaste zone. Smeđi ekskudat je često prisutan na površini micelije. Kleistotecije su smeđe ili crne, Ø 100-200 µm, često okružene sa Hülle ćelijama (Slika 79A). Askospore su crveno-smeđe, sočivastog oblika, Ø 4-5 µm, često sa dva longitudinalna grebena. Hife su hijaline, glavice su kolumnarne. Konidiofori su u nijansama smeđe boje, glatkih zidova dužine 60-150 µm i uzdižu se sa stopaone ćelije (Slika 79B). Vezikule su poluloptaste, Ø 8-12 µm. Metule i fjalide se vezuju samo na gornjem delu vezikule (biserijadni tip). Konidije su loptaste i hrapavih zidova, Ø 3-4 µm (Slika 79B).

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je široko rasprostranjena i često izolovana iz zemljišta. Kolonizuje i vlažne zidove (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: produkuje nidulotoksin i sterigmatocistin (Samson i dr., 2004).

Nalaz: zidne slike crkve svete Bogorodice (MG).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: knjiga iz šesnaestog veka sa simptomima foksinga (Michaelsen i dr., 2009); kinematografski



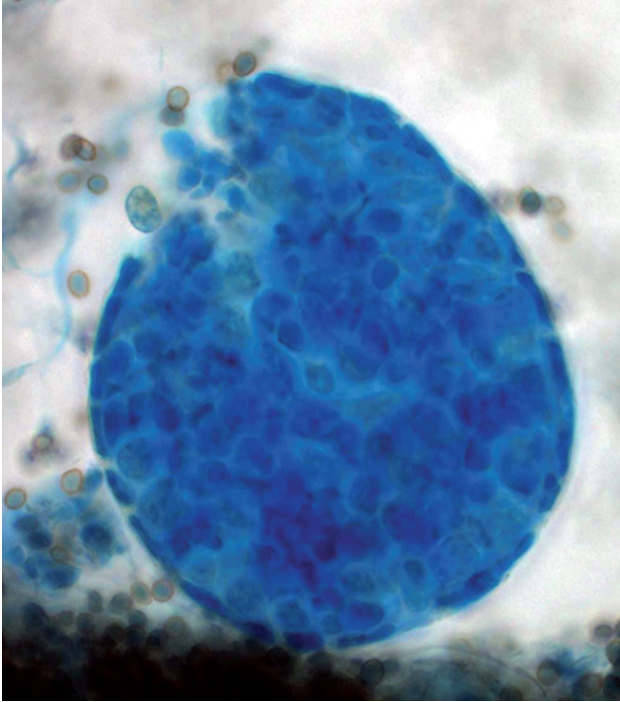
Slika 79. *Emericella nidulans*: **A.** kleistotecija; **B.** grupa konidiofora sa klavratnom glavicom i konidijama

filmovi deponovani u muzejima i arhivama u Madridu, Barseloni i Gran Kanariji (Abrusci i dr., 2005); kamen pešćar, tvrđava Gwalior Fort, Indija (Pandey i dr., 2011) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

***Eurotium pseudoglaucum* (Blochwitz) Malloch & Cain**

Anamorf: *Aspergillus pseudoglaucus* Blochwitz

Morfologija: u kulturi formira sivo-tirkiznu koloniju, koja sa starenjem postaje tamno zelena i žuta u centru. Žute zone u centru kolonije su posledica obrazovanja kleistotecija. Hife su hijaline, a glavice radijatne. Prosečna dužina konidiofora je od 200-350 μm . Vezikule su loptaste ili poluloptaste i uvek uniserijatne. Fijalide se obrazuju samo na gornjoj strani vezikule. Konidije su loptaste ili poluloptaste, na površini bodljikave, \O 3,5-6,5 μm . Kleistotecije su žute, tankozide \O 75-125 μm i obično obrasle crvenim hifama (Slika 80). Askospore su hijaline i glatke ili blago ornamentisane i poseduju jednu ekvatorijalnu brazdu.



Slika 80. *Eurotium pseudoglaucus*, kleistotecija

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je kosmopolitska, izolovana sa velikog broja različitih supstrata. Najčešće je to biljni materijal i zemljište, ali kolonizuje i celulozne supstrate, kožne predmete i tekstil.

Specifični metaboliti: proizvodi toksične metabolite: hloroanizol, ehinulin, eritroglaucin i flavoglaucin.

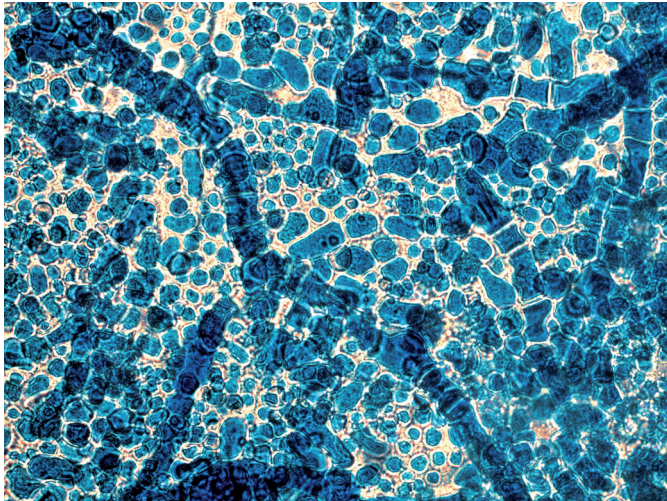
Nalaz: drvena edukativna igračka (DKC/2).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: knjiga iz 1854 godine sa simptomima foksinga (Florian i Manning, 2000).

***Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge**

Anamorf: *Chrysonilia crassa* (Shear & Dodge) v Arx

Morfologija: u kulturi raste brzo (2,5 cm za jedan dan, MEA) i formira koloniju koja je u početku bezbojna, sa staranjem postaje narandžasta. Konidiogene hife su septirane, glatkih zidova i granaju se lateralno. Jednoćelijske konidije se formiraju u lancima i povezane su uskom hijalinom niti, eliptične, cilindrične, loptaste ili poluloptaste, glatkih zidova, dimenzija 5-8 x 4-6 μm (Slika 81). Askokarp je tipična peritocija u kojoj se obrazuju tamne askospore.



Slika 81. *Neurospora crassa*, konidije anamorfnog stadijuma *Chrysonilia crassa*, povezane lancima

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima široko rasprostranjene i izolovana je sa različitih supstrata. Kontaminira namirnice i poznata je kao „crvena hlebna buđ“. Spada u ekološku grupu fenikoidnih gljiva jer se javlja na zgarištima posle požara (Dix i Webster, 1995).

Nalaz: drveni sanduk (DKC/5); skulpture od drveta (MSU/3 i MSU/5); bojani slojevi slike (MSU/1) i vazduh (MSU i DKC).

5.4.3 Deuteromycotina

Acremonium strictum W. Gams

Morfologija: u kulturi raste sporo (1-2 cm za 10 dana, MEA) i obrazuje belu, hijalinu miceliju somotaste teksture. Konidiofori kratki i uglavnom negranati. Fijalide uspravne, na vrhovima zašiljene, blago obojene u bazalnom delu, 20-65 μm duge. Konidije slepljene sluzavim supstancama u glavice (Slika 82). Konidije cilindrične ili eliptične, dimenzija 3,3-5,8 x 0,9-1,8 μm . Ćelijski zid konidija je hijalin i gladak.

Ekologija i rasprostranjenje: široko rasprostranjena vrsta, često izolovana iz zemljišta, biljnog materijala i vlažnih površina u zatvorenim prostorima, ali može biti oportunistički patogen životinja i ljudi (Samson i dr., 2004).

Nalaz: kamen pešćar (AP).



Slika 82. *Acremonium strictum*, konidiofor, fjalide i konidije

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: stubovi od breča i mermera na kripti Katedrale “Cattedrale di Otranto”, južna Italija (Cataldo i dr., 2005) i podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004).

***Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.**

Morfologija: u kulturi raste brzo (5-6 cm za 7 dana, MEA) i obrazuje vunaste sive, maslinasto zelene ili crne kolonije. Konidiofori kratki, $40-70 \times 3-4 \mu\text{m}$, svetlo smeđi, glatki, uglavnom negranati, retko sa kolenastim proširenjima. Konidije po tipu diktiospore, jajaste ili eliptične sa kljunom, dimenzija $25-40 \times 5-12 \mu\text{m}$. Zrele konidije su smeđe obojene i poseduju do 8 transverzalnih i nekoliko longitudinalnih septi, glatkih zidova, ređe hrapave, povezane u duge lance (Slika 83).

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsku distribuciju. Izolovana je sa svežeg voća, žita, povrća, vlažnog tekstila i drugih vlažnih supstrata (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi altenuen, alternariol, monometiletar, tentoksin (Samson i dr., 2004).



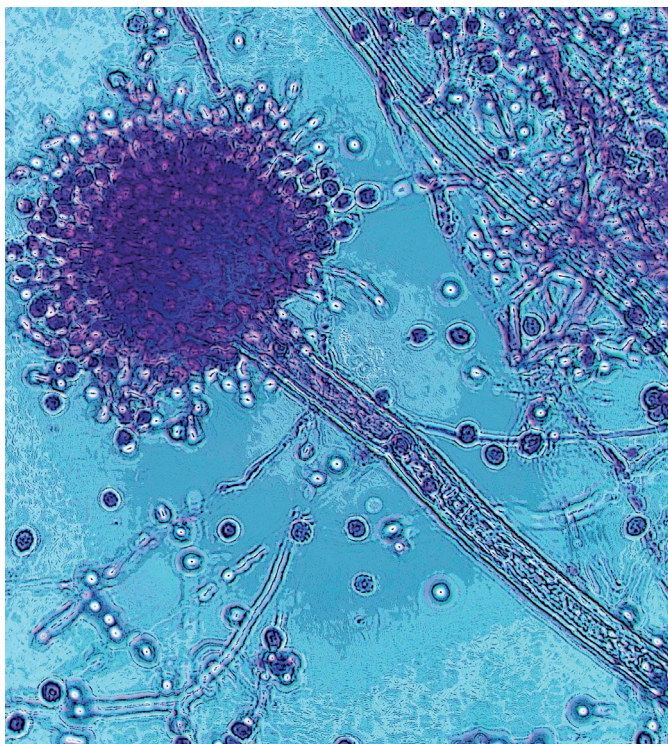
Slika 83. *Alternaria alternata*, diktyospore u masi.

Nalaz: karbonatni kamen (MG); kamen peščar (AP); drveni ram slike (GSSŠ/13); skulptura od drveta (MSU/3); poledina slikarskog (MSU/2); zidna slika Manastira Sopoćani i vazduh (MGB).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: mermer-nii spomenici izloženih na terasi muzeja u Mesini, Sicilija (Urzi i dr., 2001); kinematografski filmovi deponovani u muzejima i arhivama u Madridu, Barseloni i Gran Kanariji (Abrusci i dr., 2005); fontana Gallatea a Villa Litta sa simptomima crnih mrlja, Milano (Sorlini i dr., 1994); zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994) i podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004).

***Aspergillus flavus* Link**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (3-5 cm za 7 dana, CZA). Kolonije su zeleno-žute, a glavica je tipično radijatna (Slika 84). Konidiofori su hijalini i hrapavi, dugi do 1,0 mm. Vezikula je loptasta ili poluloptasta, Ø 25-45 µm. Fijalide se vezuju za vezikulu indirektno preko metula (biserijadni tip). Dijametar fijalida iznosi 6-10 × 4-5,5 µm, a metula 6,5-10 × 3-5 µm. Konidije su loptaste ili poluloptaste, svetlo zelene, bodljikave, Ø 3,6 µm (Slika 84). Formira sklerocije nepravilnih oblika i varijabilnih dimenzija koje su svetle dok su mlade, a sa starenjem postaju crno-smeđe.



Slika 84. *Aspergillus flavus*, konidiofor sa radijatom glavicom i konidije

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je široko rasprostranjena, ali je uglavnom izolovana u tropskim i subtropskim regionima. Kolonizuje različite supstrate (namirnice, drvo, pamuk, građevinski materijal). Često je izolovana sa perja ptica (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi kojičnu kiselinu, 3–nitropropionsku kiselinu, ciklopiazoničnu kiselinu, aflatoksin B₁ i aspergiličnu kiselinu (Samson i dr., 2004).

Nalaz: granit (NJ); drveni slikarski ram (GSSŠ/14); drvene edukativne igračke (DKC/2); poledina slike (MSU/2) i zidna slika u crkvi Svetog Nikole Palež.

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: muralne slike u Egiptu (Helmi i dr., 2011); vazduh zatvorenih prostorija zoološkog muzeja u Pandžabu (Shabir i dr., 2007); zidine drevnog hrama Deverbi u Indiji (Sharma i Agarwal, 2011); kamen pešćar, tvrđava Gwalior Fort, Indija (Pandey i dr., 2011); istorijski papir topografskih mapa iz XVIII veka kolekcije “Collezione Topografica del Comune di Genova” (Zotti i dr., 2008) i unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007).

***Aspergillus fumigatus* Fresen.**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (3-5 cm za 7 dana, CZA) i formira tamno zelenu koloniju. Glavica je tipično kolumnarna ili paličasta (Slika 85). Konidiofori su kratki, glatkih zidova. Vezikule su široko klavatne, fertile samo u terminalnom delu, $\text{\O} 20\text{--}30 \mu\text{m}$. Fijalide su obojene kao i konidiofori i direktno se vezuju za vezikulu (uniserijatni tip). Dimenzije fijalida iznose $6\text{--}8 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$. Konidije su loptaste ili poluloptaste, hrapavih zidova ili bodljaste, $\text{\O} 2,5\text{--}3 \mu\text{m}$.

Ekologija i rasprostranjenje: često je utvrđena na žitima, komunalnom otpadu, u kućnoj prašini, kompostu, klima uređajima. Izazivač je respiratorne aspergiloze pluća (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi gliotoksin, verukologen, fumitremorgin A i B, fumitoksine i triptokvivaline (Samson i dr., 2004).

Nalaz: zidne slike crkve Svete Bogorodice (MG).

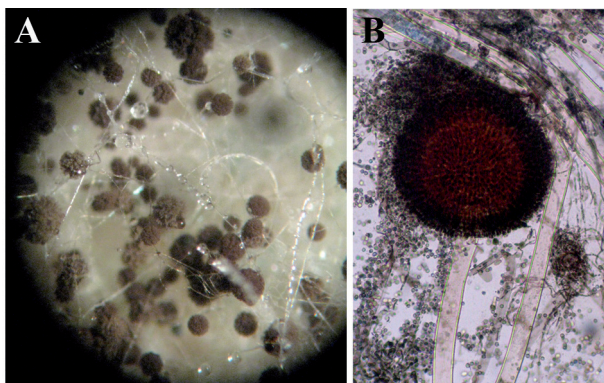
Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: zidine antičkih hramova u Indiji (Sharma, 2011); vitraž manastira Cartuja de Miraflores, Španija, (Carmona i dr., 2006); kamen pešćar, tvrđava Gwalior Fort, Indija (Pandey i dr., 2011); unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).



Slika 85. *Aspergillus fumigatus*, konidiofor sa kolumnarnom glavicom

***Aspergillus niger* Tiegh**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (4-5 cm za 7 dana, CZA) i formira kompaktni beli ili žuti bazalni sloj sa koga se uzdižu gusto pakovani tamno smeđi ili crni konidiofori. Glavica je radijatna i obično se sa starenjem kolonije podeli u kolumne (Slika 86). Konidiofori su hijalini, ali postaju smeđi u vršnom delu, glatkih zidova, dugi 400-3000 μm . Vezikula je loptasta ili poluloptasta, Ø 50-100 μm . Na celjoj površinu vezikule se formiraju sterilne metule sa 4 konidiogenim ćelijama – fjalidama (biserijadni tip). Metule su hijaline ili smeđe, često septirane, dimenzija 15-25 \times 4,5-6 μm . Dimenzije fjalida su 7-9,5 \times 3-4 μm . Konidije su loptaste ili poluloptaste, Ø 3,5-5 μm , često sa nepravilnim bradavicama i grebenima.



Slika 86. *Aspergillus niger*:
A. konidijalne glavice u masi (*in situ*); **B.** konidiofor sa radijatom glavicom

Specifični metaboliti: sintetiše nafto- γ -pirone i malformine. Pojedini izolati sintetišu i ohratoksin A (Samson i dr., 2004).

Ekologija i rasprostranjenje: kosmopolitska vrsta. Čest je kontaminant na različitim supstratima kao što su suva semena, plodovi, tekstil (Samson i dr., 2004).

Nalaz: drvene štafete (MIJ/3 i MIJ/4); Metalna skulptura u obliku ruke (uzorak sa drvenog dela skulpture) (MIJ/6); drveni sanduk i drvene edukativne igračke (DKC/4 i DKC/5); skulptura od drveta (MSU/5); drveni ram slike (GSSŠ/11); platno slike (MSU/2); tapiserija (MIJ/2); zidne slike Manastira Sopoćani i vazduh (DKC).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: mermerni spomenici na Smolenskom groblju i Letnjoj bašti, Sankt Petersburg (Gorbushina

i dr., 2002); mermernii spomenici izloženi na terasi muzeja u Mesini, Sicilija (Urzì i dr., 2001); vazduh katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); kamen pešćar, tvrđava Gwalior Fort, Indija (Pandey i dr., 2011) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

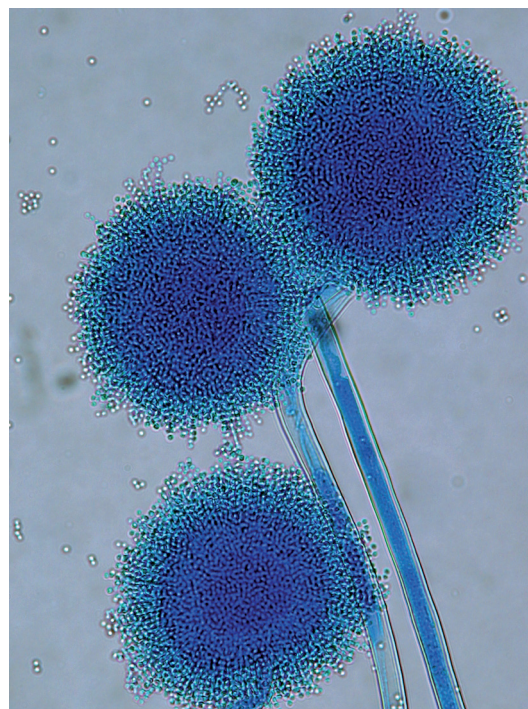
***Aspergillus ochraceus* G. Wilh.**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (2,5-3,5 cm za 7 dana, CZA) i formira oker-žutu koloniju. Boja kolonije potiče od gusto pakovanih konidijalnih glavica. Glavica je loptasta i sa starenjem se deli u dve ili više kompaktnih kolumni (Slika 87). Konidiofori su do 1,5 mm dugi, žute ili smeđe boje, hrapavih zidova. Vezikule su loptaste, hijaline, Ø 35-50 µm. Na celoj površinu vezikule se formiraju metule sa fjalidama (biserijadni tip) (Slika 87). Dimenzije metula iznose 15-20 × 5-6 µm, a fjalida 7-11 × 2-3,5 µm. Konidije su loptaste ili poluloptaste, hijaline, glatkih zidova ili blago hrapave, Ø 2,5-3 µm. Obrazuje sklerocije nepravilnog oblika.

Ekologija i rasprostranjenje: široko rasprostranjena vrsta, posebno česta u tropskim i suptropskim krajevima. Izolovana je iz vazduha, kućne prašine a česta je na zrnima kafe i začinicima (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: produkuje penicilinsku kiselinu, ohratoksin A, ksantomegnin, viomelein i vioksantin (Samson i dr., 2004).

Nalaz: drveni sanduk i drvene edukativne igračke (DKC/4 i DKC/5); skulptura od (MSU/5); bojani slojevi slike (MSU/4) i platno slike (MSU/2).



Slika 87. *Aspergillus ochraceus*, konidiofori sa radijatom glavicom

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: freske, arheološko nalazište Herkulaneum blizu Napulja, Italija (Pepe i dr., 2011).

***Aspergillus terreus* Thom**

Morfologija: U kulturi raste relativno brzo (3,5-5 cm za 7 dana, CZA) i formira koloniju žuto-smeđe boje koja sa starenjem tamni. Boja kolonije podseća na boju zemljišta. Glavica je kolumnarna (Slika 88). Konidiofori su hijalini, glatkih zidova. Vezikula je poluloptasta, Ø 10-20 µm. Posедуje i metule i fjalide (biserijadni tip). Dimenzije metula su $5-7 \times 2-2,5$ µm, a fjalida $5-7 \times 1,5-2$ µm. Konidije su loptaste ili eliptične, hijaline ili žućkaste, glatkih zidova, Ø 1,5-2,5 µm.

Ekologija i rasprostranjenje: ima široku distribuciju a posebno je česta u tropskim i subtropskim krajevima. Tipično je zemljišna gljiva i česta je u zoni rizosfere (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi terein, patulin, citrinin i citreoviridin (Samson i dr., 2004).

Nalaz: kamen pešćar (AP).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: vazduh katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); građevina iz 18. veka, izgrađena od tufa, Palazzo De Francesco, Kampanija, Italija, (Felice de i dr., 2010) i kamen pešćar, tvrđava Gwalior Fort, Indija (Pandey i dr., 2011).

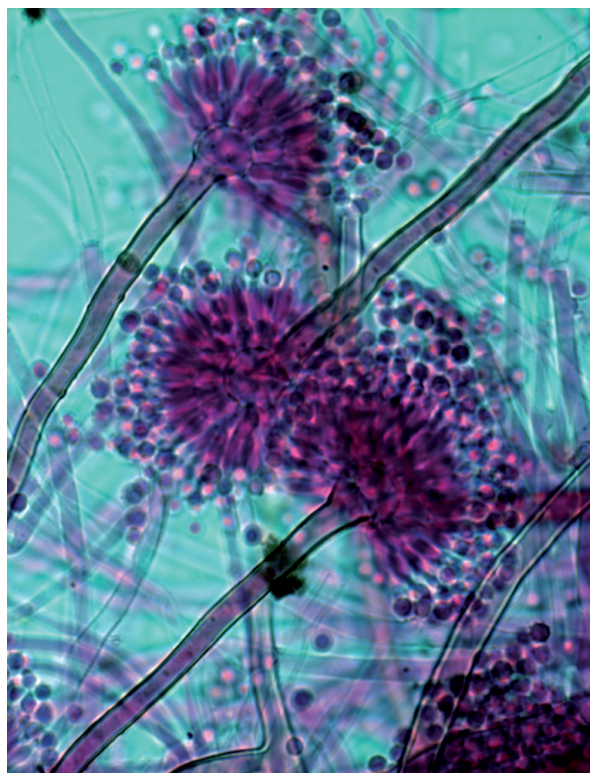


Slika 88. *Aspergillus terreus*, konidiofor sa kolumnarnom glavicom

***Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab.**

Morfologija: u kulturi raste sporo (1-1,5 cm za 7 dana, CZA) i odlikuje se slabom sporulacijom. Boja kolonije je u početku bela, zatim žućkasto-narandžasta, do žuto-zelena sa ružičastim slojevima. Konidiofori su hijalini ili blago pigmentisani, glatkih zidova. Vežikula je loptasta ili eliptična, Ø 12-16 µm. Poseduje i metule i fjalide (biserijadni tip) (Slika 89). Dimenzije metula su 5-7,5 × 2-2,5 µm, a fjalida 5,5-8 × 2,5-3 µm. Konidije su u loptaste i bodljikave, Ø 2-3,5 µm (Slika 89). Ponekad su prisutne Hülle ćelije.

Ekologija i rasprostranjenje: za razliku od ostalih vrsta ovog roda, *A. versicolor* je češće izolovana u umerenim nego u tropskim regionima. Čest je kontaminant hrane (sirevi, žita, začini, mesni proizvodi). Prisutna je u kućnoj prašini (Samson i dr., 2004).



Slika 89. *Aspergillus versicolor*, konidiofori sa radijantnim glavicama

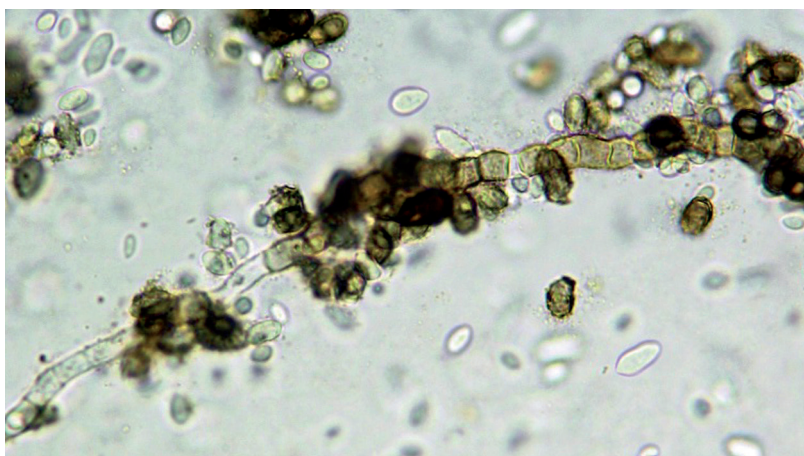
Specifični metaboliti: produkuje sterigmatocistin i nidulatoksin (Samson i dr., 2004).

Nalaz: granit (NJ); bojeni sloj slike (GSSŠ/9); skulptura metalni kamion (uzorak sa plišanog postolja) (MIJ/7); zidne slike crkve Svete Bogorodice (MG) i vazduh (MGB).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: knjiga iz XVI veka sa simptomima foksinga (Michaelsen i dr., 2009); kinematografski filmovi deponovani u muzejima i arhivama u Madridu, Barseloni i Gran Kanariji (Abrusci i dr., 2005); knjiga sa simptomima foksinga, javna biblioteka, Brazil (Silva da i dr., 2006); podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

***Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (4 cm za 7 dana, MEA) i formira glatku koloniju prekrivenu sluzavom masom konidija. Kolonija može biti žuta, ružičasta, smeđa ili crna. Ponekad se javlja i vazдушna micelija. Hife su hijaline, tankozidne i septirane, $\text{\O} 2\text{-}16 \mu\text{m}$. Sa starenjem hife postaju debelozidne i tamne. Debelozidne hife imaju ulogu hlamidospora ili se često mogu procesom holotalusne transformacije raspasti na pojedinačne ćelije formirajući lančano povezane artrokonidije (Slika 90). Stadijum artrokonidija je u literaturi opisan i kao drugi anamorfni rod *Scytalidium*. Konidiogene ćelije se formiraju interkalarano ili terminalno na subhijalinim hifama. Konidije koje su po tipu amerspore, formiraju se sinhrono procesom blastične konidiogeneze i ostaju u grupama (Slika 90). Konidije su jednoćelijske, najčešće elipsoidnog oblika, hijaline, glatkih zidova, sa hilumom, dimenzija $8\text{-}12 \times 4\text{-}6 \mu\text{m}$. Ponekad se javljaju i sekundarne konidije, manjih dimenzija.



Slika 90.
Aureobasidium pullulans,
artrokonidije
stadijuma
Scytalidium sp.
i amerspore
u grupama

Ekologija i rasprostranjenje: kosmopolitska distribucija. Tipičan je saprob, često izolovana iz zemljišta, sa filofere, semena, žita, voćnih sokova. Izolovana je i sa kože i noktiju ljudi i neretko može izazvati feohifomikoze (Samson i dr., 2004).

Nalaz: karbonatni kamen (MG); kamen pešćar (AP i BM) i vazduh (MGB i GSSŠ).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: bojeni slojevi slika iz više muzeja u Srbiji (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010); podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004);

unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); istorijski papir topografskih mapa iz XVIII veka kolekcije “Collezione Topografica del Comune di Genova” (Zotti i dr., 2008) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielminetti i dr., 1994).

***Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram**

Telemorf: *Cochliobolus spicifer* R.R. Nelson

Morfologija: u kulturi raste brzo (5 cm za 7 dana, CZA) i formira vunastu koloniju. U početku je kolonija bela, a starenjem postaje sivo mrka, ili crna. Na periferiji kolonije često se formira svetlo siva margina. Hife su septirane i smeđe boje (Slika 91). Konidiofori su dužine 4,5-6 μm , prosti ili simpodijalno granati, često genikulatni i savijaju se na mestima gde se formiraju konidije obrazujući cik-cak strukturu. Konidije su po tipu porokonidije, fuziformne ili eliptične, zaravnjene na oba kraja, dimenzija 30-35 μm \times 11-13,5 μm (Slika 91). Na porokonidijama se uočava tamni hilum. Klijanje konidija je bipolarno.



Slika 91. *Bipolaris spicifera*, melanizovane hife i porokonidije u masi

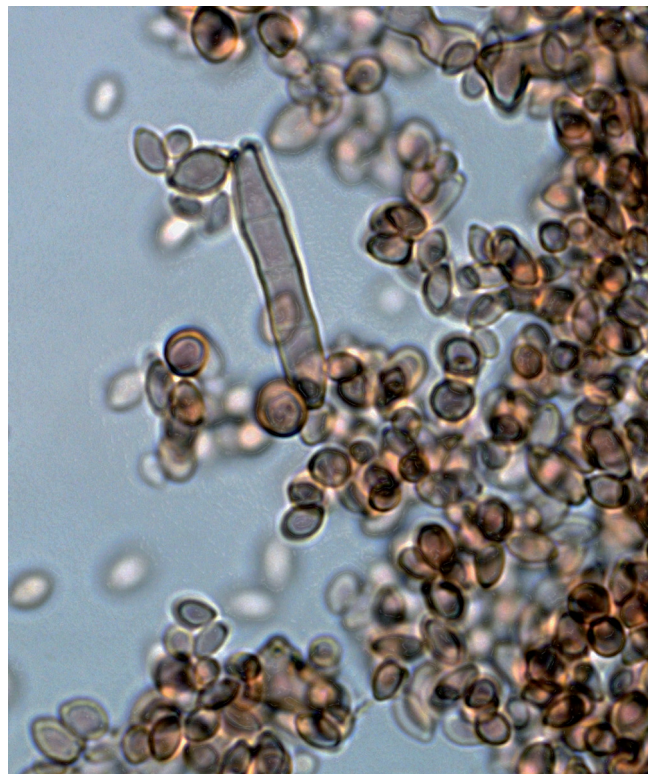
Ekologija i rasprostranjenje: kosmopolitsko rasprostranjenje. Izolovana je sa različitih supstrata (zemljište, biljni materijal). Oportunistički je humani patogen i izaziva feohifomikoze (McGinnis i dr., 1992).

Nalaz: kamen pešćar (AP).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: zid depoa za skladištenje umetničkih predmeta, Narodni muzej, Srbija (Ljaljević Grbić i dr., 2011).

***Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries**

Morfologija: u kulturi raste sporo (1,5-4 cm za 10 dana, MEA) i formira somotastu ili praškastu koloniju maslinasto-smeđe ili sivo-zelene boje. Kolonija je često radijalno zonirana. Naličje kolonije je zeleno crno. Konidiofori se uzdižu bočno ili ređe terminalno sa tamnih hifa i mogu da dostignu dužinu do 350 μm ali su uglavnom kraći, 2-6 μm široki. Sa vrha konidiofora se uzdižu ramokonidije cilindričnog oblika, smeđe ili zelenkasto-smeđe boje, uglavnom glatkih zidova, dimenzija 30 \times 3,5 μm (Slika 92). Konidije elipsoidnog ili limunastog oblika, hrapavih zidova, dimenzija 3-11 \times 2-5 μm , često grupisane u akropetalnim lancima (Slika 92).



Slika 92. *Cladosporium cladosporioides*, ramokonidija i konidije u masi

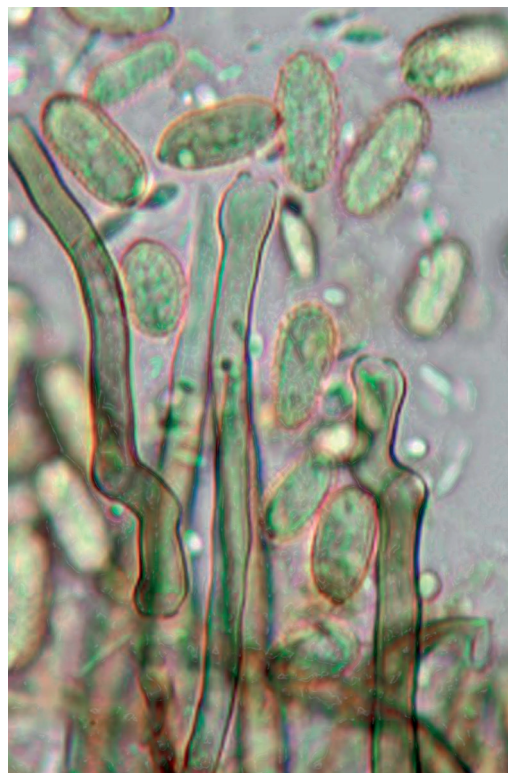
Ekologija i rasprostranjenje: veoma česta vrsta, izolovana sa biljnog materijala, zemljišta, tekstila, hrane, semena. Spore ove vrste su česte u vazduhu zatvorenih prostorija (Samson i dr., 2004).

Nalaz: karbonatni kamen (MG i SS); mermer (MG); kamen pešćar (AP i BM); granit (NJ); drveni ramovi slika (GSSŠ/11, GSSŠ/12, GSSŠ/13 i GSSŠ/14); bojene slojevi slika (GSSŠ/5 i GSSŠ/8); poledine slika (MSU/6, GSSŠ/6 i GSSŠ/10); zidne slike Crkve Svetog Nikole Palež i zidne slike Manastira Sopoćani i vazduh (MGB i GSSŠ).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: kinematografski filmovi deponovani u muzejima i arhivama u Madridu, Barseloni i Gran Kanariji (Abrusci i dr., 2005); istorijski papirni dokumenti, Univerzitetski Arhiv, Coimbra, Portugal, (Mesquita i dr., 2009); zidovi Gojine sobe za skladištenje tapiserija, Muzej katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007); podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004); bojene slojevi slika i slikarski ramovi iz više muzeja u Srbiji (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielminetti i dr., 1994).

***Cladosporium macrocarpum* Preuss**

Morfologija: u kulturi raste sporo (2,5-3,5 za 7 dana, MEA) i formira somatstu koloniju, često prekrivenu slojem maslinasto zelene vazdušne micelije. Naličje kolonije je zeleno-crno. Konidiofori se uzdižu lateralno sa tamnih hifa i dostižu dužinu do 300 μm i širinu 4-8 μm (Slika 93). Konidiofori su često kolenasto savijeni, i na njima se obrazuju proširenja (čvorići) usled simpodijalne elongacije i terminalnog ili interkalarnog bubrenja. Konidije su uglavnom jednoćelijske, eliptičnog oblika, bradavičaste, u kratkim lancima, poseduju 0-3 septe, dimenzija 7-17 \times 5-8 μm (Slika 93).



Slika 93. *Cladosporium macrocarpum*, konidiofori i konidije

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsku distribuciju, i izolovana je uglavnom sa biljnog materijala (Samson i dr., 2004).

Nalaz: vazduh (MIJ i MGB)

Ostali nalazi na kulturno istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: vazduh katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007) i bojeni slojevi slika iz više muzeja u Srbiji (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010).

***Cladosporium sphaerospermum* Penz.**

Morfologija: u kulturi raste relativno sporo (1,5-2 cm za 10 dana, MEA) i formira maslinasto zelene do maslinasto-braon somotaste ili praškaste kolonije. Naličje kolonije je zelenkasto-crno. Konidiofori se uzdižu lateralno ili terminalno sa hifa i dosežu do 300 μm , ali su obično kraći, širine 3-5 μm (Slika 94). Konidiofori nisu nikad genikulatni. Na konidioforima se formiraju granati lanci konidija, koji počinje sa ramokonidijama (Slika 94). Ramokodije poseduju 0-3 septe, glatkih su zidova ili bradavičaste, dimenzija $33 \times 3-5 \mu\text{m}$. Konidije su grupisane u akropetalne lance, uglavnom su jednoćelijske, loptaste ili poluloptaste, smeđe ili zelenkasto braon, verukozne, 3-7 μm u prečniku.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosmopolitsku distribuciju. Izolovana je sa različitih supstrata, vazduha, zemljišta, hrane, semena, boje, tekstila. Ova vrsta je sekundarni kolonizator mnogih biljnih vrsta. Retko se može izolovati sa životinja i ljudi (Samson i dr., 2004).



Slika 94. *Cladosporium sphaerospermum*, konidiofor, ramokonidije i konidije u masi

Nalaz: granit (NJ); kamen pešćar (BM) i zidne slike Manastira Sopoćani.

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: freske iz XV veka, Sveti Augustin (Botticelli) i Sveti Žerom (Ghirlandaio), crkva Ognissanti, Firenca, Italija (Sampò i Mosca, 1989); vazduh katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

***Drechslera dematioidea* (Bubák & Wróbl.) Scharif**

Morfologija: u kulturi raste brzo (5 cm za 7 dana, MEA) i formira tamnu, vunastu koloniju. Hife su septirane i smeđe boje (Slika 95). Konidiofori su braon, pojedinačni ili manjim grupama, ponekad genikulatni, dužine do 350 µm. Konidije su cilindrične ili klavatne, oblih krajeva, debelih zidova, zlatno do tamno smeđe sa dve ili tri pseudosepte, sa hilumom, dimenzija 20-70 × 10-16 µm (Slika 95).

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je široko rasprostranjena i često je izolovana sa uginulog biljnog materijala, posebno biljaka iz familije Poacea. Kolonizator je uginulih listova i cvasti vrsta roda *Anthoxanthum* (Ellis i Ellis, 1997).

Nalaz: kamen pešćar, lokalitet AP; granit (NJ) i karbonatni kamen (SS).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: bojeni slojevi slika i drveni slikarski ramovi iz više muzeja u Srbiji (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010).



Slika 95. *Drechslera dematioidea*, melanizovane hife i konidije

***Epicoccum purpurascens* Ehrenb**

Morfologija: u kulturi raste vrlo brzo (6 cm za 10 dana, MEA) i formira vunastu koloniju, žuto narandžaste boje, ponekad crno–smeđe. Naličje kolonije je uvek intenzivnije obojenije od lica. U kulturama često ostaje sterilna. Sporulacija se može indukovati izlaganjem kolonije „crnom“ svetlu (Samson i dr., 2004). *E. purpurascens* obrazuje pulvinatne sporodohije, Ø 100-2000 µm (Slika 96). Konidiofori su kratki, dimenzija 5-15 × 3-6 µm, grupisani u klastere koji se završavaju izodijametričnim konidiogenim ćelijama (Slika 96). Konidije se obrazuju procesom blastične konidiogeneze, i loptastog su ili kruškastog oblika, bradavičaste, 15-25 µm (Slika 96). Bazalni deo konidije je levkastog oblika, a na konidiji se formira septa koja deli konidiju na do 15 ćelija.



Slika 96. *Epicoccum purpurascens*, pulvinatna sporodohija sa konidioforima grupisanim u klastere i višećelijskim konidijama

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je kosmopolitska,

često je izolovana iz zemljišta, semena, papira, tekstila, insekata, kože i sputuma. Spada u sekundarne kolonizatore mnogih biljnih vrsta (Samson i dr., 2004).

Nalaz: karbonatni kamen (MG); kamen pešćar (AP i BM); granit (NJ); drveni ram slike (GSSŠ/11) i zidne slike crkve Sveti Nikola Palež i Manastira Sopoćani.

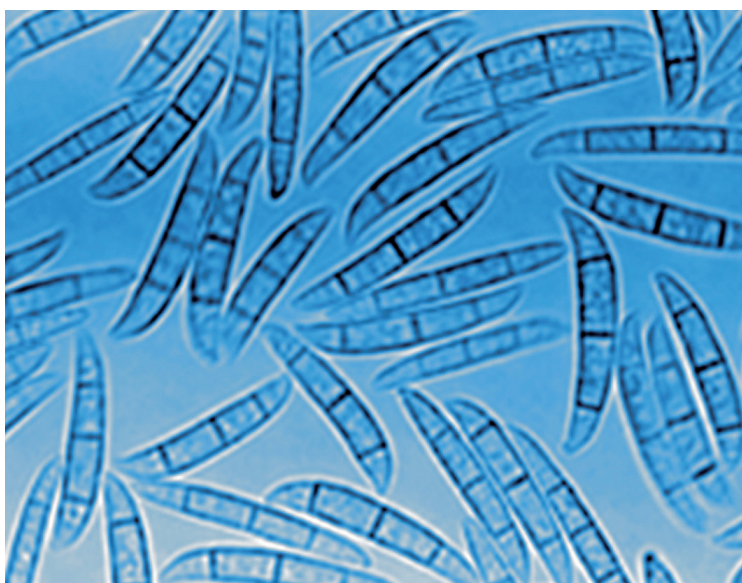
Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: bojeni slojevi slika i drveni slikarski ramovi iz više muzeja u Srbiji (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010); zidne slike grobnica Ozuka (Fukuoka) i Kibusan (Kumamoto), Japan, (Emo-

to i Emoto, 1974); zidne slike starih crkava, Pavia, Italija, (Crippa, 1983) i zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

***Fusarium oxysporum* Schl.**

Morfologija: u kulturi raste brzo (3-5,5 cm za 4 dana) i formira oskudnu vazdušnu miceliju koja postaje boje breskve. Kolonija u centru ima ružičastu nijansu. Naličje kolonije je žuto sa purpurnim nijansama. Neki sojevi obrazuju narandžaste sporodohije. Konidiofori mogu biti granati

ili negranati i na njima se formiraju monofijalide. Mikrokonidije su sa 0-2 septe, formiraju se na bočnim fjalidama ili na fjalidama formiranim na kratkim granatim konidioforima i vrlo su brojne (Slika 97). Varijabilnog su oblika i veličine, mogu biti jajaste,



Slika 97. *Fusarium oxysporum*, makrokonidije

cilindrične ili elipstične, prave ili blago zakrivljene, dimenzija $5-12 \times 2,2-3,5 \mu\text{m}$. Makrokonidije su retke, razvijaju se na fjalidama na granatim konidioforima, ili u sporodohijama i obrazuju 3-5 septe. Fuziformnog su oblika i blago zakrivljene, zašiljene na oba kraja (Slika 97). Dimenzije makrokonidija su $20-50 \times 3-5 \mu\text{m}$. Hlamidospore su poluloptaste ili loptaste, glatkih ili hrapavih zidova, $\emptyset 5-15 \mu\text{m}$. Formiraju se terminalno ili interkalarno u paru ili pojedinačno.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima kosopolitsku distribuciju. Česta je saprob u zemljištu, ali i patogen mnogih biljnih vrsta. Izazivač je truljenja u skladištima hrane. Može da opstane u anaerobnim uslovima (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi fuzaričnu kiselinu, moniliformin, pigmente na bazi naftokvinona i nektriafuron (Samson i dr., 2004).

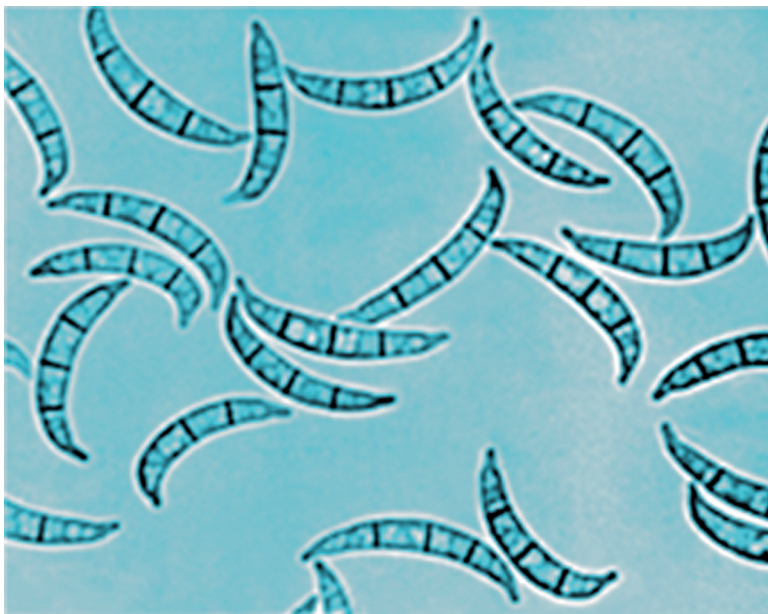
Nalaz: kamen pešćar (BM).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

***Fusarium sambucinum* Fuckel**

Teleomorf: *Giberella pulicaris* (Fr.) Sacc.

Morfologija: u kulturi raste brzo (3,4–5,9 cm za 4 dana) i formira vazдушnu miceliju bele boje sa roze nijansama. Naličje kolonije je žućkasto ili roze do crveno. Konidiofori se



Slika 98. *Fusarium sambucinum*, makrokonidije

uzdižu u vidu pojedinačnih bočnih monofijalida, koji se kasnije granaju na sporodohijama i pionotama. Kod ove vrste se ne obrazuju mikrokonidije. Makrokonidije su uniformne, srpastog oblika, snažno dorzoventralno zakrivljene, debelih zidova, sa 3-7 septi (Slika 98). Dimenzije makrokonidija sa tri septe iznose $22-35 \times 4-5,2 \mu\text{m}$, sa 4 ili 5 septi $26-44 \times 4-5,6 \mu\text{m}$, a sa 6 ili 7 septi $37-50 \times 4,5-5,6 \mu\text{m}$. Hlamidospore ako se formiraju mogu biti pojedinačne ili u grupi.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima široku distribuciju i uglavnom je izolovana sa žita, krompira, trava, kore drveta. Kolonizuje i zemljište (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi butenolide, eniaine i trihotecene (Samson i dr., 2004).

Nalaz: karbonatni kamen (SS).

***Geotrichum candidum* Link**

Teleomorf: *Galactomyces geotrichum* (Butler & Peterson) Redhead & Malloch

Morfologija: U kulturi raste brzo (7 cm za 7 dana) i formira belu, glatku puterastu koloniju, često prijatnog mirisa. Hife su septirane, dihotomo granate i formiraju strukture slične viljušci, širine 7-11 μm . Konidije su po tipu artrokonidije cilindrične su, oblika bureta ili elipsoidne, dimenzija 6-20 \times 3-9 μm i nastaju razdeljivanjem fertilnih hifa (Slika 99). Mogu biti uzdignute ili položene i uglavnom su u lancima.

Ekologija i rasprostranjenje: Vrsta je široko rasprostranjena. Izolovana je iz zemljišta, vode, vazduha, žita, mlečnih proizvoda, papira, tekstila i dr. (Samson i dr., 2004).

Nalaz: vazduh (MIJ).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: bojeni slojevi slika umetničkih slika u 11 muzeja, Srbija (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010).

***Graphium putredinis* (Corda) S. Hughes**

Morfologija: u kulturi formira sivu, maslinasto smeđu do crnu koloniju. Konidiofori su grupisani u sinemate maslinasto do crvenkasto smeđe boje, dužine do 1 mm (Slika 100). Debljina sinemate je do 40 μm u bazi, prema vrhu se širi. Anelide su cilindrične ili oblika šila, dimenzija 10-30 \times 1-2 μm . Konidije su eliptične ili kljunaste, smeđe boje, glatkih zidova, 5-11 \times 2-4 μm .

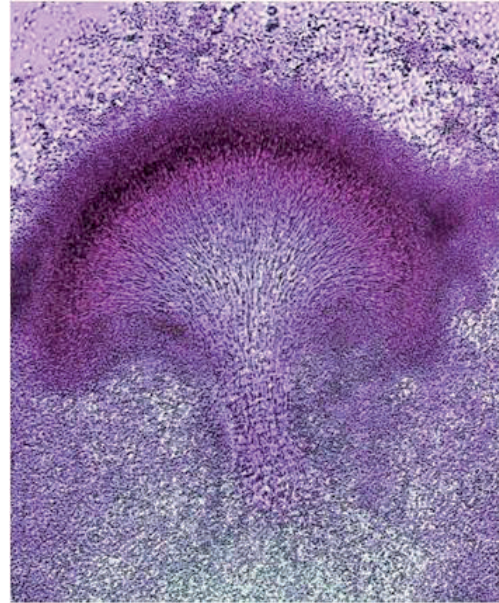


Slika 99. *Geotrichum candidum*, artrokonidije

Ekologija i rasprostranjenje: česta je na biljnom materijalu i u zemljištu. Kolonizuje stabljike *Brassica* sp. (Ellis, 1971).

Nalaz: vazduh (MIJ)

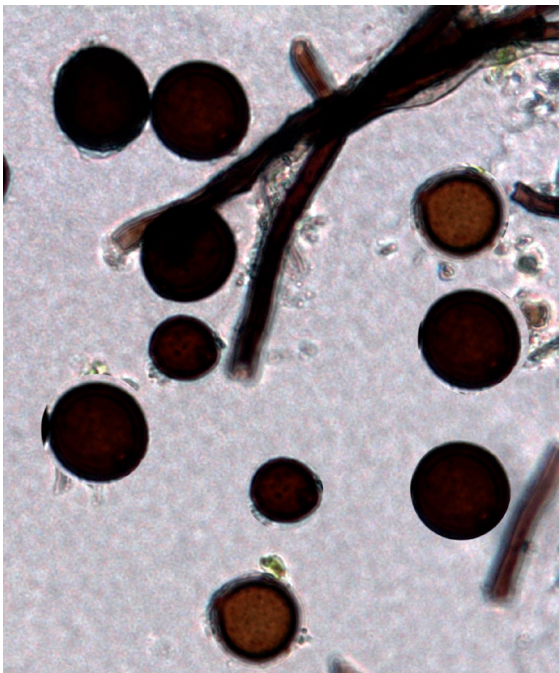
Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: bojeni slojevi slika umetničkih slika u 11 muzeja, Srbija (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010).



Slika 100. *Graphium putredinis*, sinemata

***Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason**

Morfologija: u kulturi u početku formira belu koloniju, koja staranjem postaje tamna do potpuno crna, što je praćeno obilnom sporulacijom. Konidiofori su smeđe boje, glatkih zidova, 4-8 µm debljine. Konidiogene ćelije su bezbojne, ampuliformnog oblika, dijame-



Slika 101. *Nigrospora sphaerica*, tamne hife i konidije

tra 8-11 µm. Konidije su pojedinačne, sferične ili elipsoidne, tamne, sjajne bez septi, glatkih zidova, Ø 14-20 µm (Slika 101).

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je kosmopolitska, vrlo česta u tropskim regionima. Kolonizuje veliki broj biljnih vrsta, a izolovana je i iz zemljišta i različitih namirnica (Ellis i Ellis, 1997).

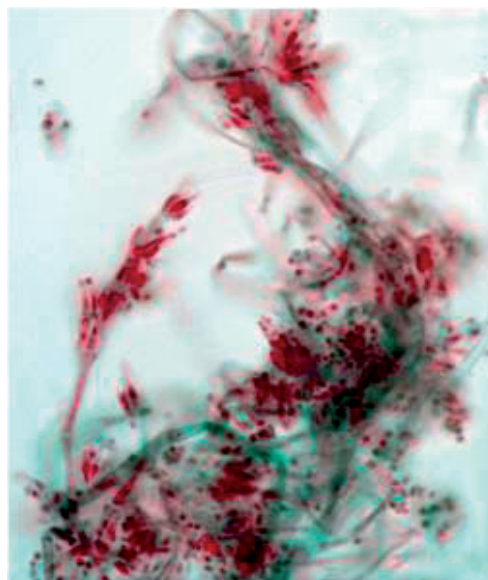
Nalaz: karbonatni kamen (MG) i zidne slike Manastira Sopoćani.

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim

predmetima: polihromna drvena skulptura poreklom iz Južne Amerike, Prirodnjački muzej La Plata, Buena Aires, Argentina, (Fazio i dr., 2010).

***Paecilomyces variotii* Bainier**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (3-5 cm za 7 dana, MEA) i formira žuto-smeđu praškastu koloniju. Praškasta konzistencija kolonije je posledica velikog broja gusto zbijenih konidiofora. Često je prisutan slatkast miris kolonije. Konidiofori se sastoje od vertikalno postavljenih grana, od kojih svaka nosi od 2 do 7 fjalida. Fjalide mogu biti pojedinačne ili u snopovima, flašolikog su oblika, dimenzija $12-20 \times 2,5-5 \mu\text{m}$. Konidije se obrazuju u dugim divergentnim



Slika 102. *Paecilomyces variotii*, konidiogeni aparat

lancima i uvek su jednoćelijske, hijaline ili žute, glatkih zidova, varijabilnih dimenzija ali najčešće $3-5 \times 2-4 \mu\text{m}$ (Slika 102). Hlamidospore su pojedinačne ili u kratkim lancima, braon boje, glatkih debeih zidova, poluloptaste ili kruškolike, $4-8 \mu\text{m}$ u prečniku.

Ekologija i rasprostranjenje: čest kontaminan vazduha. Vrsta je termofilna i zbog toga se često izoluje sa komposta (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: proizvodi patulin i viriditoksin (Samson i dr., 2004).

Nalaz: kamen pešćar (BM); karbonatni kamen (SS); bojene slojevi slika (MSU/1 i MSU/4) i fotografski papir (DKC/3 i DKC/6).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: istorijski papir topografskih mapa iz XVIII veka kolekcije “Collezione Topografica del Comune di Genova” (Zotti i dr., 2008) i unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007).

***Penicillium aurantiogriseum* Dierckx**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (3-3,5 cm za 7 dana, CZA) i formira radijalno zoniranu koloniju, glatke ili zrnaste teksture tirkizno zelene boje sa izraženom marginom. Eksudacija je često prisutna u vidu smeđih kapljica blizu periferije kolonije. Naličje kolonije je blede, do smeđe, ponekad u nijansama narandžaste. Konidiofori su pojedinačni ili grupisani u fascikule i uzdižu se sa subpovršinskih hifa. Konidiofor je hrapavih zidova, ređe gladak, dimenzija 200-400 x 3-4 μm . Konidiogeni aparat



Slika 103. *Penicillium aurantiogriseum*, konidiogeni aparat

po tipu može biti terverticilata ili biverticilata (Slika 103). Rami su pojedinačni, dimenzija 15-25 x 3-4 μm . Metule su u grupama od tri ili četiri, 10-12 x 2,8-3,5 μm . Od 5 do 8 tankih, ampuliformnih fialida dimenzija 9-10 x 2,5-2,8 μm se nalazi na metuli. Konidije su poluloptaste do eliptične, dimenzija 3,5-4 x 2,5-3,2 μm .

Ekologija i rasprostranjenje: kosmopolitska vrsta, najčešće izolovana plesan na Zemlji. Kolonizuje hranu, posebno žita (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: producent je toksičnih metabolita: nefrotoksični glikopeptidi, verukozidin, penicilična kiselina i terestrična kiselina. Ostali metaboliti sa još neispitanom toksičnošću su auranciamin, aurancin i anacin (Samson i dr., 2004).

Nalaz: kamen pešćar (BM); bojani slojevi slika (MGB/8 i MGB/12); zidne slike u crkvi Svetog Nikole Palež i vazduh (MGB i GSSŠ).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007) i podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004).

***Penicillium expansum* Link**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (4-5 cm za 14 dana, CZA) i formira koloniju žute do plavo zelene boje. Ponekad miriše na jabuke. Eksudacija je prisutna u vidu hijalinih kapljica. Naličje kolonije je žuto ili žuto-smeđe. Konidiofori su hijalini, uglavnom pojedinačni (mononematozni), ređe u grupama (sinematozni). Konidiofori u grupama se nalaze na periferiji kolonije. Konidiogeni aparat po tipu može biti terverticilata ili kvaterverticilata (Slika 104). Metule su cilindrične, dimenzija $10-15 \times 2-3 \mu\text{m}$ i obično nose od 5 do 8 fijalida. Fijalide su cilindrične sa izraženim vratom, dimenzija $8-12 \times 2-3,5 \mu\text{m}$. Konidije su poluloptaste ili eliptične, zelene sa glatkim zidom, dimenzija $3-3,5 \times 2,5-3 \mu\text{m}$.

Ekologija i rasprostranjenje: uglavnom je izolovana sa namirnica. Uzročnik je brzog truljenja jabučastog voća (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: produkuje rokverfortin C, patulin, citrinin, komunezine i hetoglobozin C (Samson i dr., 2004).

Nalaz: kamen pešćar (AP).

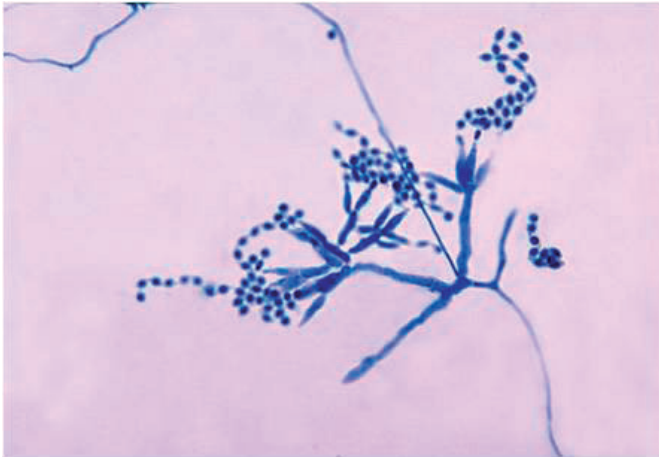
Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: bojeni slojevi slika umetničkih slika u 11 muzeja, Srbija (Vukojević i Ljaljević Grbić, 2010); zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994) i podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004).



Slika 104. *Penicillium expansum*, konidiogeni aparat

***Penicillium ochrochloron* Biourge**

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (3,5-4,5 cm za 7 dana, CZA) i formira radijalno zoniranu koloniju bele do svetlo roze boje. Eksudacija je prisutna u vidu hijalinih kapljica. Naličje kolonije nije obojeno. Konidiofori se formiraju na subpovršinskim hifama na periferiji kolonije ili na vazдушnim hifama na celoj površini kolonije. Konidiofori su



Slika 105. *Penicillium ochrochloron*, konidiogeni aparat

glatkih zidova ili hrapavi, 300-500 μm dužine. Konidiogeni aparat je po tipu biverticilata (Slika 105). Metule mogu biti terminalne ili interkalarne, dimenzija 15-25 \times 2-2,5 μm , fialide su ampuliformne sa dugom kolulom, dimenzija 8-12 \times 2,2-2,5, i u grupama od 4 do 8. Konidije su eliptične ili apikulatne, glatkog zida, dimenzija 3-4 \times 2-2,8 μm .

Ekologija i rasprostranjenje: tipična zemljišna gljiva (Pitt, 1979).

Nalaz: zidne slike manastira Sopoćani.

***Penicillium verrucosum* Dierckx**

Morfologija: U kulturi raste relativno sporo (1,5-2,5 mm za 7 dana, CZA) i formira radijalno zoniranu koloniju bele do zelene boje sa izraženom belom marginom širene 2-4 mm. Eksudacija je prisutna u vidu žutih kapljica. Naličje kolonije je svetlo do tamno smeđe. Konidiofori se razvijaju na subpovršinskim ili površinskim hifama i poseduju duge i robusne konidiofore, dimenzija 200-500 \times 3,5-4 μm . Konidiogeni aparat je po tipu terverticilata ili kvaterverticilata, ređe biverticilata (Slika 106). Jedan ili dva rama glatkih

ili hrapavih zidova se vezuje za konidiofor. Ramuli podsećaju na sitnije rame. Metule se formiraju u grupama od 2 do 7, dimenzija $7-10 \times 3,5-4 \mu\text{m}$. Fijalide su ampuliformne sa kratkom kolulom, dimenzija $7-9 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$. Konidije su loptaste, ređe poluloptaste ili eliptične, glatkih zidova, često povezane u lance, dimenzija $3-3,5 \times 2,5-2,8 \mu\text{m}$.

Ekologija i rasprostranjenje: često se izoluje sa namirnica, posebno sa žita i sireva (Samson i dr., 2004).

Specifični metaboliti: produkuje toksične metabolite ohratoksin A, citrinin, arabenoičnu kiselinu i verucine (Samson i dr., 2004).

Nalaz: skulpture od drveta (MSU/3 i MSU/5) i platno slike (MSU/2).

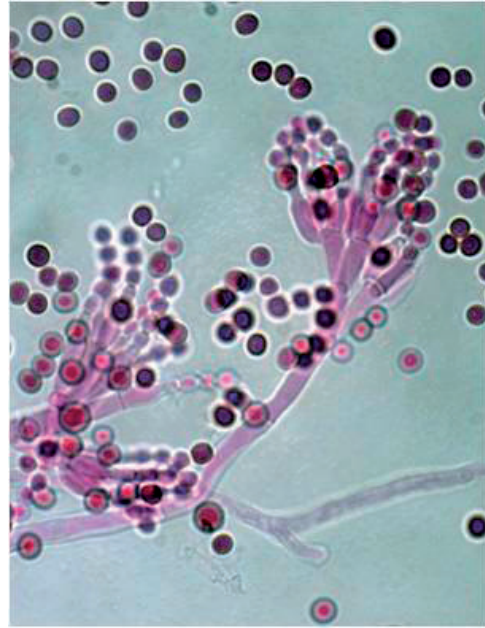
Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: zidne slike Manastira Sveti Demijan, Asiza, Italija (Guglielmineti i dr., 1994).

***Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier**

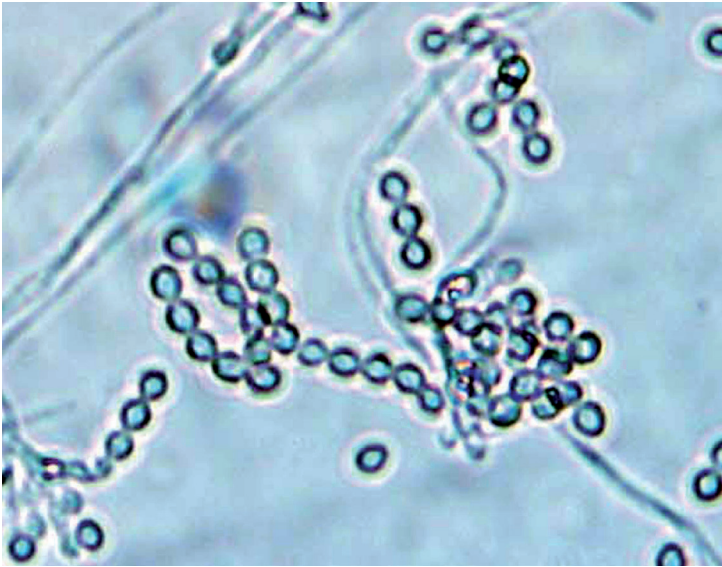
Teleomorf: *Microascus brevicaulis* Abbot, Sigler & Currah

Morfologija: u kulturi raste relativno brzo (4,5-5,5 cm za 7, MEA) i formira braon roze koloniju koja sa starenjem postaje praškasta. U centru kolonije formira se ispupčenje. Naličje kolonije je smeđe. Konidiogene ćelije su anelatne i razvijaju se direktno na vazдушnim hifama, terminalno ili na granatim konidioforima koji su u grupama do 4. Cilindričnog su oblika sa ispupčenom bazom, dimenzija $9-25 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ (Slika 107). Anelide su $2,5-3,5 \mu\text{m}$ široke. Konidije su loptaste ili jajaste sa izraženo bazalnim delom i zašiljenim apeksom, grubih zidova, dimenzija $5-9 \times 5-7 \mu\text{m}$.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta ima široku distribuciju i izolovana je iz zemljišta, sena, žita, voća, mrtvih insekata, izmeta, papira. Može da kolonizuje i hranu, pre



Slika 106. *Penicillium verrucosum*, konidiogeni aparat



Slika 107.
Scopulariopsis brevicaulis, konidiofor sa konidijama povezanim u lance

svega meso, i mlečne proizvode, a u retkim slučajevima kolonizuje pluća i kožu ljudi. Ponekad prisustvo ove gljive može da se pretpostavi na osnovu mirisa amonijaka (Samson i dr., 2004).

Nalaz: kamen peščar (AP).

***Sporobolomyces roseus* Kluyver & C.B. Niel**

Morfologija: u kulturi raste sporo i formira belo žute kolonije tipične za kvasolike forme mikromiceta. Konidiofori se retko diferenciraju, već se konidije obrazuju direktno na hifama ili na sterigmama. Konidije mogu da se umnožavaju pupljenjem, hijaline su, cilindrične ili polumesečaste (Slika 108), dimenzija $7,5-12,6 \times 1,5-2,5 \mu\text{m}$.

Ekologija i rasprostranjenje: vrsta je kosmopolitska, izolovana sa različitih supstrata.

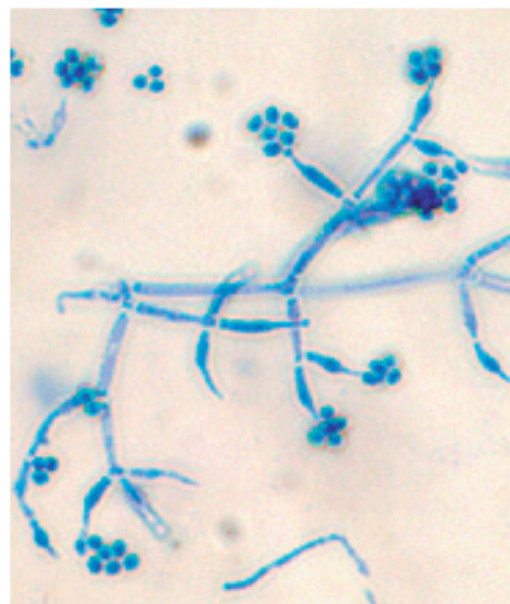
Nalaz: karbonatni kamen i mermer (MG).



Slika 108. *Sporobolomyces roseus*, konidije

***Trichoderma viride* Pers.**

Morfologija: u kulturi raste vrlo brzo (5-7 cm za 7 dana, MEA) i formira imerznu koloniju, iz koje u vidu bokora izranjaju konidiofori. Kolonija je u početku bela, zatim postaje belo-zelena. Naličje kolonije nije obojeno. Konidiofori su nepravilno-piramidalnog oblika, i sastoje se od grana i bočnih grana (Slika 109). Dužina grana se smanjuje prema apeksu konidiofora. Fijalide su u grupama, od 2 do 4, oblika bureta i obično zakrivljene, dimenzija $6-20 \times 2,4-3$



Slika 109. *Trichoderma viride*, konidiogeni aparat

μm . Konidije su poluloptaste, ređe eliptične, $3,6-4,5 \mu\text{m}$ u prečniku, hrapavih zidova, što predstavlja glavni morfološki kriterijum za razdvajanje ove vrste od *T. harzianum* kod koje su konidije glatkih zidova. Hlamidospore se formiraju interkalarno ili terminalno na miceliji u starijim kulturama. Hijaline su, loptaste i glatkih zidova.

Ekologija i rasprostranjenje: tipična zemljišna gljiva i izolovana je iz različitih tipova zemljišta u različitim zonama (umerena zona, tropi, alpska zona). Zbog potentnog celulitičkog kompleksa enzima uzročnik je truljenja drvene mase. Često kolonizuje žitarice u silosima, i vrlo je otporna na konzervanse i druge antifungalne agense (Samson i dr., 2004).

Nalaz: skulptura od drveta (MSU/3); platno slike (MSU/2); fotografski papir i (DKC/3 i DKC/6) i vazduh (MGB, DKC i MSU).

Ostali nalazi na kulturno-istorijskim spomenicima i umetničkim predmetima: kinematografski filmovi deponovani u muzejima i arhivama u Madridu, Barseloni i Gran Kanariji (Abrusci i dr., 2005); unutrašnji zidovi katedrale Santiago de Compostela, Španija (Aira i dr., 2007) i podzemni spomenici od krečnjaka na Jevrejskom groblju, Bratislava (Šimonovičova i dr., 2004).

***Ulocladium chartarum* Preuss Simmons**

Morfologija: u kulturi raste brzo (do 5,5 cm za 7 dana, MEA) i formira crnu vunastu koloniju, ponekad sa belom marginom. Konidiofori su uglavnom negranati, glatkih zidova, zlatno smeđe boje, genikulatni, sa jednim ili više mesta za vezivanje konidija, dimenzija $40-55 \times 5-7 \mu\text{m}$. Konidije su po tipu diktiospore, jajaste, glatkih zidova, dimenzija $19-39 \times 11-22 \mu\text{m}$, sa jednom do 5 transferzalnih i jednom do 5 longitudinalnih ili kosih septi (Slika 110). Konidije su pojedinačne, ređe u lancima.



Slika 110. *Ulocladium chartarum*, diktiospore na kratkim konidioforima

Ekologija i rasprostranjenje:

izolovana je iz zemljišta, boja, celuloznih materijala: drvo, papir, vlakna. Nekad kolonizuje i biljke (Samson i dr., 2004).

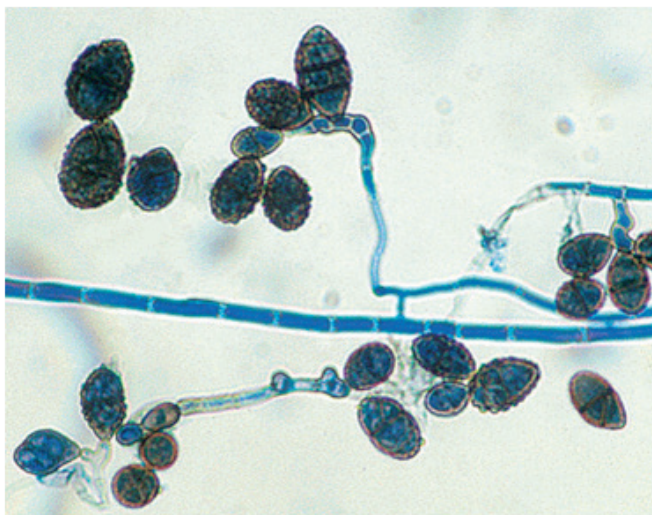
Nalaz: drveni ram slike (GSSŠ/11); poledina slike (GSSŠ/4).

***Ulocladium oudemansii* E.G. Simmons**

Morfologija: u kulturi raste brzo (do 5,5 cm za 7 dana, MEA) i formira crnu vunastu koloniju. Konidiofori su glatkih zidova, smeđi ili zlatno obojeni, dimenzija $250 \times 5-7 \mu\text{m}$. Konidije su po tipu diktiospore, jajaste, klavatne ili eliptične sa 3 do 5 transferzalnih i nekoliko longitudinalnih septi, zlatno do tamno smeđe, izrazito bradavičaste osim u bazalnom delu, dimenzija $18-34 \times 9-17 \mu\text{m}$ (Slika 111).

Ekologija i rasprostranjenje: Široko je rasprostranjena i izolovana je uglavnom sa biljnog materijala (Ellis, 1976).

Nalaz: poledina slike (GSSŠ/6).



Slika 111. *Ulocladium oudemansii*, diktiospore

5.5 Antifungalna aktivnost etarskih ulja i biocida

U cilju pronalaženja efikasnih i odgovarajućih antifungalnih agenasa, koji bi mogli biti primenjeni u sistemu konzervacije objekata i predmeta kulturne baštine ispitana antifungalna aktivnost nekoliko agenasa biološkog porekla – etarskih ulja i komercijalnog biocida benzalkonijum hlorida (BAC). Za ispitivanje fungistatske i fungicidne aktivnosti kao test mikromicete korišćeni su odabrani izolati sa različitih objekata kulturne baštine i umetničkih predmeta (Tabela 18).

Tabela 18. Test mikromicete korišćene u eksperimentima za odeđivanje antifungalne aktivnosti

Vrsta	Nalaz
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	zidna slika Crkve Svete Bogorodice (MG)
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	drveni sanduk i drvene edukativne igračke (DKC/4)
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	drveni sanduk i drvene edukativne igračke (DKC/5)
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	zidna slika Crkve Svete Bogorodice (MG)
<i>Bipolaris spicifera</i> (Bainier) Subram	kamen peščar (AP)
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.	zidna slika Crkve Svete Bogorodice (MG)
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	granit (NJ)
<i>Penicillium</i> sp. 1	skulptura od drveta (MSU/3)
<i>Penicillium</i> sp. 2.	zidna slika Crkve Svete Bogorodice (MG)
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	fotografski papir (DKC/6)

Antifungalna aktivnost odabranih etarskih ulja i biocida BAC ispitivana je metodom mikroatmosfera, makrodilucionom metodom, mikrodilucionom metodom i metodom neutralizacije biocida. Kombinacijom ovih metoda praćen je uticaj antifungalnih agenasa na rast somatskih hifa *in vitro* i germinaciju spora *in vitro*

Metoda mikroatmosfera je efikasna ispitivan je uticaja etarskih ulja na rast somatskih hifa *in vitro*. Ovom metodom praćena je inhibicija rasta micelije, kao i promene u izgledu, teksturi, boji kolonije i intenzitetu sporulacije u poređenju sa kontrolnom kulturom. Za testirane izolate određene su MIC i MFC vrednosti etarskih ulja. Za određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja ovom metodom korišćene su mikromicete: *A. niger*, *A. ochraceus*, *B. spicifera*, *E. purpurascens*, *Penicillium* sp. 1. i *T. viride*.

S obzirom na slabu isparljivost BAC, uticaj ovog biocida na rast somatskih hifa *in vitro* ispitan je makrodilucionom metodom. Korišćeni su isti izolati kao i u metodi mikroatmosfera i određene su MIC i MFC vrednosti, kao i promene u izgledu, teksturi, boji kolonije i intenzitetu sporulacije.

Mikrodilucionom metodom ispitivan je uticaj i etarskih ulja i biocida BAC na klijanje spora. Praćeno je klijanje konidija u tečnoj podlozi (MEB) sa dodatim antifungalnim agensom. U ovom eksperimentu su korišćeni izolati koji obilno sporulišu na MEA medijumu tokom tri nedelje (*A. niger*, *A. ochraceus*, *B. spicifera*, *Penicillium* sp. 1. i *T. viride*). Brojanjem klijalih i neklijalih konidija u tečnoj podlozi sa antifungalnim agensom određene su koncentracije koje izazivaju približno 50 i 95% inhibicije klijanja konidija (ID_{50} i ID_{95} vrednosti), nakon 24h inkubacije. Za pojedine izolate mikrodilucionom metodom određene su i MIC i MFC vrednosti.

Metodom neutralizacije biocida određeno je minimalno vreme za koje u kontaktu biocida BAC i konidija gljiva, dolazi do najvećeg stepena inhibicije vijabilnosti konidija. U ovom eksperimentu korišćene su mikromicete izolovane sa zidnih slika Crkve Svete Bogorodice (MG): *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *E. nidulans* i *Penicillium* sp. 2.

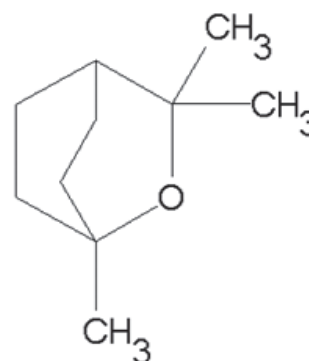
5.5.1 Antifungalna aktivnost odabranih etarskih ulja

Polazeći od osnove da etarska ulja mnogih biljaka poseduju antifungalna svojstva, ispitivana je antifungalna aktivnost komercijalnih uzoraka etarska ulja (*R. officinalis*, *L. angustifolia*, *O. vulgare* i *H. italicum*.) metodom mikroatmosfera i mikrodilucionom metodom. U ovom odeljku prikazana je analiza hemijskog sastava etarskih ulja i njihov uticaj na rast somatskih hifa kao i njihov antifungalni potencijal.

5.5.1.1 Antifungalna aktivnost etarskog ulja *Rosmarinus officinalis*

Hemijski sastav ulja

Kombinacijom metoda GC i GC/MS izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza etarskog ulja *R. officinalis*. Identifikovane su 23 komponente ulja što predstavlja 100% ulja. Dominantna komponenta u ovom ulju je 1.8-cineol (eukaliptol) koji je u uzorku ulja bio zastupljen sa 44,28%.



Slika 112. 1.8-cineol, strukturalna formula

(Slika 112). U značajnijem procentu zastupljene komponente su kamfor (12,54%) i α -pinen (11,62%), dok se ostale komponente nalaze u manjem procentu od 0,14 % do 8,26% (Tabela 19).

Uticaj ulja na rast somatskih hifa in vitro

Metodom mikroatmosfera testiran je uticaj etarskog ulja *R. officinalis* na micelijalni rast 6 odabranih izolata merenjem prečnika kolonija 21. dana od inokulacije. Testirane koncentracije ulja iznosile su 10, 15, 25, 50, 75 i 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije (%) dobijena je poređenjem prečnika kolonija koje su rasle u uslovima aromatične atmosfere sa prečnikom kolonije u kontroli, starosti 21 dan.

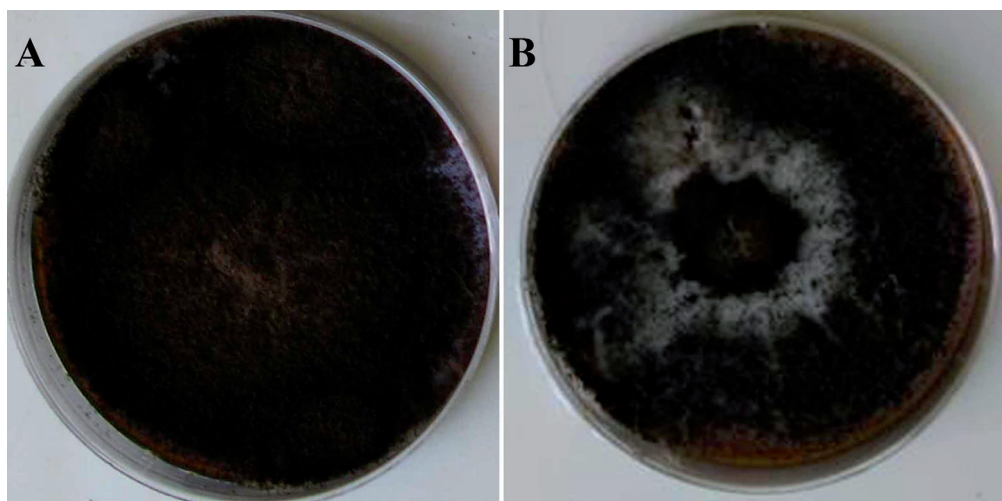
Tabela 19. Procentualna zastupljenost komponenti etarskog ulja *Rosmarinus officinalis*

Komponenta	KIE ¹	KIL ²	%
triciklen	915,7	921	0,24
α -tujen	921,6	924	0,14
α -pinen	927,5	932	11,62
kampfen	941,2	946	4,60
β -pinen	969,8	974	8,26
mircen	987,2	988	0,98
α -felandren	-	1002	0,18
p-cimen	1019,5	1020	1,22
limonen	1023,2	1024	2,79
1.8-cineol	1028,5	1026	44,28
γ -terpinen	1053,7	1054	0,91
terpinolen	1083,2	1086	0,19
linalol	1097,5	1095	0,46
kamfor	1140,0	1141	12,54
izoborneol	1151,7	1155	0,52
borneol	1161,4	1165	2,96
terpinen-4-ol	1172,8	1174	0,55
α -terpineol	1186,9	1186	1,55
γ -terpineol	1193,9	1199	0,38
bornil acetat	1281,2	1287	1,13
juniperen	1397,6	1402	0,19
<i>trans</i> - β -kariofilen	1413,1	1417	3,96
α -humulen	1447,0	1452	0,36
ukupno			100

¹ Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)

² Kovačev (retencioni) indeks literaturni podatak (Adams, 2007)

Etarsko ulje *R. officinalis* izazvalo je morfo-fiziološke promene u kulturi *A. niger*. Potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji ulja od 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 20). Niže koncentracije ulja u eksperimentu (10, 15 i 25 $\mu\text{l ml}^{-1}$) prouzrokovale su pojavu belih sektora u koloniji *A. niger* (Slika 113). Mikroskopskom analizom struktura



Slika 113. Efekat etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* ($25 \mu\text{l ml}^{-1}$) na miceliju *Aspergillus niger*: **A.** kontrola; **B.** beli sektori sterilne micelije

gljiva sa belih sektora konstatovano je prisustvo sterilnih, septiranih hifa *A. niger* i odsustvo reproduktivnih struktura.

U kulturi *A. ochraceus* potpuna inhibicija rasta micelije (100%) je postignuta pri koncentraciji ulja od $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 20). Morfo-fiziološke promene nastale usled interakcije gljive i etarskog ulja *R. officinalis* pri koncentracijama od 10, 15, 25, 50 i $75 \mu\text{l ml}^{-1}$ manifestovale su se u vidu pojave bele vazdušne micelije u centru kolonije i masom sklerocija oker boje, mekane konzistencije. Mikroskopskom analizom micelije *A. ochraceus* uočene su transformacije hifa za koje se pretpostavlja da predstavljaju začetke formiranja sklerocija. U kontrolnoj kulturi sklerocije nisu konstatovane.

Kod *B. spicifera* nijedna korišćena koncentracija ulja nije prouzrokovala 100% inhibicije rasta micelije (Tabela 20). Kolonije *B. spicifera* koje su se razvijale u uslovima aromatične atmosfere bile su svetlije nego u kontrolnoj kulturi. Pri koncentracijama ulja od 75 i $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ uočeni su i beli sektori u centru kolonije koji nisu bili prisutni u kontrolnoj kulturi. Mikroskopskom analizom dokazano je prisustvo malog broja porokoni-dija, smanjenog intenziteta melanizacije.

Najosetljiviji testirani izolat bio je *E. purpurascens* kod koga je potpuna inhibicija (100%) postignuta sa najmanjom korišćenom koncentracijom ulja ($10 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela

20). Stoga, kod ove vrste nije bilo moguće pratiti morfo-fiziološke promene nastale usled interakcije ulja i gljive.

U kulturi *Penicillium* sp.1 potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji ulja od 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 20). Osim smanjenja dijametra kolonije pri nižim koncentracijama ulja nisu dokumentovane morfo-fiziološke promene.

Izolat *T. viride* pokazao je potpunu rezistenciju na sve korišćene koncentracije ulja. Nije konstatovan uticaj na rast micelije (Tabela 20) kao ni morfo-fiziološke promene u kulturi.

Tabela 20. Efekat ulja *Rosmarinus officinalis* na rast micelije testiranih mikromiceta metodom mikroatmosfera

Izolant	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Inhibicija rasta micelije (%)					
10	0	0	0	100	6,67 \pm 1,66*	0
15	0	0	0	100	24,31 \pm 2,16*	0
25	0	6,67 \pm 1,66*	0	100	51,31 \pm 7,71*	0
50	100	32,66 \pm 2,33*	23,33 \pm 1,66*	100	66,33 \pm 3,43*	0
75	100	65,33 \pm 2,67*	30,66 \pm 1,21*	100	73,26 \pm 2,33*	0
100	100	100	50,67 \pm 2,52*	100	100	0

*dobijene vrednosti prikazane su u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom (n=3, p<0,05)

Nakon utvrđivanja koncentracije ulja koja izaziva 100% inhibicije rasta micelije bilo je moguće preciznije odrediti MIC vrednosti. U opsegu koncentracija ulja od 10 do 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ nije bilo moguće odrediti MIC vrednosti za *B. spicifera* i *T. viride*. Kod ovih izolata MIC vrednosti se nalaze iznad najveće testirane koncentracije od 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 21). Reinokulacijom tretiranih inokuluma čiji je rast bio inhibiran u uslovima aromatične atmosfere pri određenim koncentracijama ulja ustanovljeno je da li je inhibicija reverzibilnog karaktera ili ne i na taj način određene su MFC vrednosti. Najniža MIC vrednost zabeležena je za vrstu *E. purpurascens* (10 $\mu\text{l ml}^{-1}$). Ova vrednost ujedno i predstavlja i MFC za ovu vrstu (Tabela 21). MIC vrednost za *A. niger* iznosi 30 $\mu\text{l ml}^{-1}$, dok MFC

vrednost za ovu gljivu iznosi $80 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 21). MIC vrednosti za *A. ochraceus* i *Penicillium* sp. 1 iznosi $80 \mu\text{l ml}^{-1}$. MFC vrednost za *A. ochraceus* jednak je MIC vrednosti ove gljive, dok MFC za *Penicillium* sp. 1 iznosi $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 21).

Tabela 21. MIC i MFC vrednosti ulja *Rosmarinus officinalis* određene metodom mikroatmosfera na testiranim mikromicetama

Izolot	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)						
MIC	30	80	> 100	10	80	> 100
MFC	80	80	> 100	10	100	> 100

Uticaj ulja na germinaciju spora

Uticaj etarskog ulja *R. officinalis* na germinaciju spora ispitivanih izolata praćen je mikrodilucionom metodom. Testirane su iste koncentracije ulja kao i u metodi mikroatmosfera: 10, 15, 25, 50, 75 i $100 \mu\text{l ml}^{-1}$. Zaustavljanjem reakcije laktofenolom nakon 24h od trenutka inokulacije suspenzije spora i brojanjem klijalih i neklijalih konidija određene su koncentracije ulja koje izazivaju približno 50% i 95% inhibicije germinacije spora (ID_{50} i ID_{95}). Na mikrotitracionim pločama na kojima reakcija nije zaustavljena dodatkom laktofenola praćeno je formiranja hifa i micelije i određene su MIC i MFC vrednosti. Najniže ID_{50} i ID_{95} vrednosti zabeležene su za vrstu *A. ochraceus* (10 i $25 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 22). Najviša ID_{50} vrednost zabeležena je za vrstu *B. spicifera* ($100 \mu\text{l ml}^{-1}$), dok je ID_{95} vrednost bila iznad opsega testiranih koncentracija ulja (Tabela 22).

Tabela 22. ID_{50} i ID_{95} vrednosti ($\mu\text{l ml}^{-1}$) ulja *Rosmarinus officinalis* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama.

Izolot	ID_{50}	ID_{95}
<i>Aspergillus niger</i>	75	100
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10	25
<i>Bipolaris spicifera</i>	100	/
<i>Penicillium</i> sp. 1	25	50
<i>Trichoderma viride</i>	50	75

MIC i MFC vrednosti su određene za sve testirane izolate osim za vrstu *B. spicifera* kod kojih je pokazano da su MIC i MFC iznad opsega koncentracija testiranog ulja (Tabela 17). Najniža MIC vrednost zabeležena je za vrstu *A. ochraceus* ($30 \mu\text{l ml}^{-1}$), dok je najviša MIC vrednost ($100 \mu\text{l ml}^{-1}$) zabeležena za vrstu *A. niger*. MFC vrednost svih izolata određena je na $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 23).

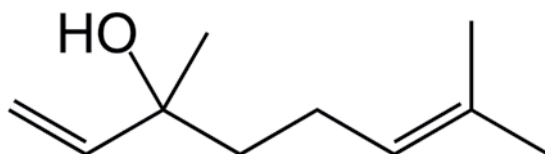
Tabela 23. MIC i MFC vrednosti ulja *Rosmarinus officinalis* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)					
MIC	100	30	> 100	50	80
MFC	100	100	> 100	100	100

5.5.1.2 Antifungalna aktivnost etarskog ulja *Lavandula angustifolia*

Hemijski sastav ulja

Kombinacijom metoda GC i GC/MS izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza ulja *L. angustifolia*. Identifikovano je ukupno 29 komponenti ulja što predstavlja 99,53 %. Dominantne komponente ovog ulja su linalol (37,61%) (Slika 114) i linalol acetat (34,86 %), dok se ostale komponente nalaze u manjem procentu (od 0,08 % do 3,45%) (Tabela 24).



Slika 114. Linalol, strukturna formula

Tabela 24. Procentualna zastupljenost komponenti etarskog ulja *Lavandula angustifolia*

Komponenta	KIE ¹	KIL ²	%
triciklen	-	-	0,08
α -pinen	927,5	932	3,45
kamfen	941,6	946	1,17
β -pinen	969,9	974	1,30
mircen	987,4	988	1,85
α -felandren	999,2	1002	0,10
δ -3-karen	1005,1	1008	1,75
<i>p</i> -cimen	1019,9	1020	1,81
limonen	1023,3	1024	0,36
1.8-cineol	1026,5	1026	1,16
<i>trans</i> - β -ocimen	1044,5	1044	0,10
γ -terpinen	1053,8	1054	0,12
α -terpinolen	1083,2	1086	0,21
linalol	1101,3	1095	37,61
kamfor	1139,4	1141	0,73
izoborneol	1152,2	1155	0,37
borneol	1161,6	1165	2,48
terpinen-4-ol	1173,1	1174	1,89
α -terpineol	1187,5	1186	0,18
n-heksil butanoat	1189,8	1191	0,51
nerol	-	-	0,19
linalol acetat	1255,2	1254	34,86
lavandulil acetat	1288,2	1288	1,06
neril acetat	1363,0	1359	2,42
geranil acetat	1380,7	1379	0,27
β -kariofilen	1413,1	1417	2,84
α -humulen	1447,1	1452	0,29
<i>trans</i> - β -farnezen	1452,3	1454	0,20
murola-4(14), 5-dien	1474,9	1465	0,17
Ukupno			99,53

¹ Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)

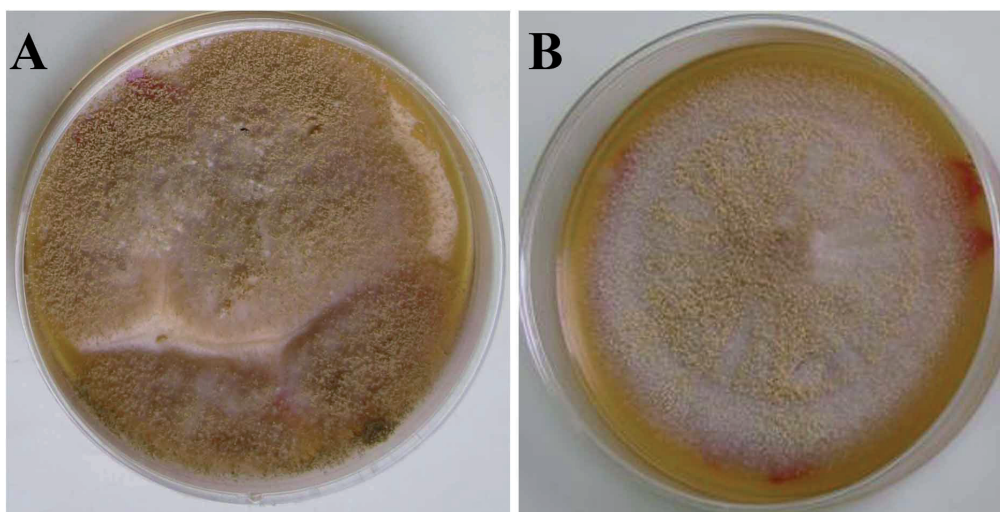
² Kovačev (retencioni) indeks literaturni podatak (Adams, 2007)

Uticaj ulja na rast somatskih hifa in vitro

Metodom mikroatmosfera testiran je uticaj etarskog ulja *L. angustifolia* na micelijalni rast 6 odabranih vrsta merenjem prečnika kolonija, 21. dana od inokulacije. Testirane koncentracije ulja iznosile su 10, 15, 25, 50, 75, i 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije (%) dobijena je poređenjem prečnika kolonija koje su rasle u uslovima aromatične atmosfere sa prečnikom kolonije u kontroli starosti 21. dan.

Korišćene koncentracije etarskog ulja *L. angustifolia* od 10, 15, i 25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ nisu izazvale promene u izgledu, teksturi i boji kolonije *A. niger*. Kolonija *A. niger* koja se razvijala u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$ bila je neznatno svetlija i na licu i na naličju od kontrolne kulture. Potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji ulja od 75 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 25).

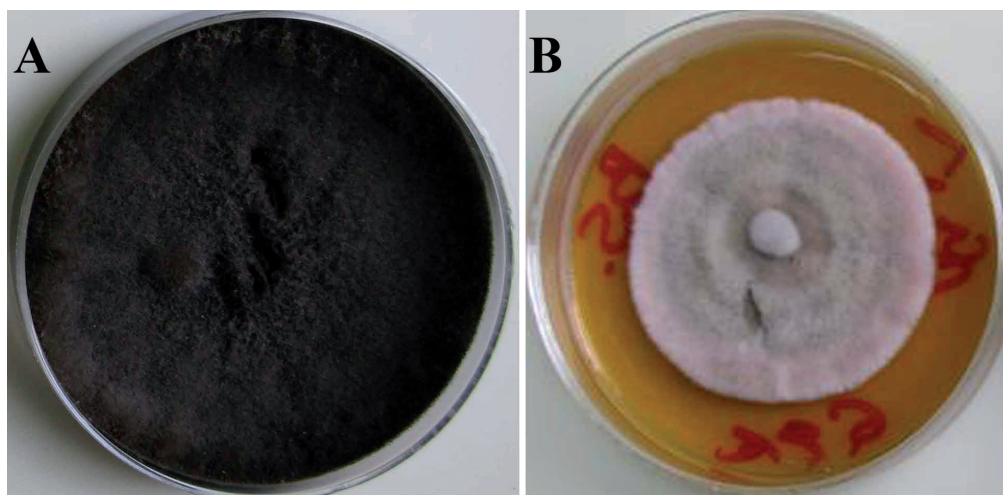
U kulturi *A. ochraceus* potpuna inhibicija rasta micelije (100%) je postignuta pri koncentraciji ulja od 75 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 25). Morfo-fiziološke promene nastale usled interakcije gljive i etarskog ulja *L. angustifolia* pri koncentracijama od 10, 15, i 25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ nisu zabeležene. U koloniji *A. ochraceus* koja se razvijala u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$ dominira bela vazдушna micelija (Slika 115). Mikroskopskom analizom uočen je zonalni rast i pokazano je da je najveći intenzitet sporulacije u centru ove kolonije, dok formiranje konidijalnih glavica opada od centra ka periferiji koloniji.



Slika 115. Efekat etarskog ulja *Lavandula angustifolia* na miceliju *Aspergillus ochraceus*: **A.** kontrola; **B.** dominacija bele vazdušne micelije, 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$

Etarsko ulje *L. angustifolia* izazvalo je morfo-fiziološke promene u kulturi *B. spicifera*. Potpuna inhibicija rasta micelije (100%) *B. spicifera* je postignuta pri koncentraciji ulja od 75 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 25). Kod *B. spicifera* pri koncentraciji ulja od 10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ konstatovano je neznatno smanjenje prečnika kolonije, dok su tekstura, izgled i boja kolonije bili identični kao u kontrolnoj kulturi. Pri koncentraciji ulja od 15 i 25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ kolonije *B.*

spicifera bile su sivo obojene i znatno svetlije nego u kontrolnoj kulturi. Najveći stepen depigmentacije zabeležen je u kulturi *B. spicifera* koja se razvijala u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od $50 \mu\text{l ml}^{-1}$. Kolonija je bila svetlo siva, sa ružičastom marginom (Slika 116). Mikroskopskom analizom ove kolonije zabeležen je visok stepen demelanizacije i smanjen intenzitet sporulacije.



Slika 116. Efekat etarskog ulja *Lavandula angustifolia* na miceliju *Bipolaris spicifera*: **A.** kontrola; **B.** depigmentacija kolonije, $50 \mu\text{l ml}^{-1}$

Najosetljivija vrsta bila je *E. purpurascens*, kod koje je potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta sa koncentracijom ulja od $25 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 25). Pri koncentraciji ulja od 10 i $15 \mu\text{l ml}^{-1}$, kolonija *E. purpurascens* se od kontrolne kulture razlikovala samo po smanjenom prečniku kolonije, dok razlike u boji, teksturi i izgledu kolonije nisu zabeležene.

Kod izolata *Penicillium* sp. 1 potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji ulja od $50 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 25). Osim smanjenja prečnika kolonije pri koncentracijama ulja od 15 i $25 \mu\text{l ml}^{-1}$ kod *Penicillium* sp. 1. nisu zabeležene morfo-fiziološke promene.

Najrezistentnija vrsta bila je vrsta *T. viride* kod koje je tek najveća korišćena koncentracija ulja od $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ izazvala potpunu inhibiciju rasta micelije (100%) (Tabela 25). Promene u boji kolonije u vidu svetlije boje vazdušne micelije u poređenju sa kontrolnom

kulturom su zabeležene kod *T. viride* koja se razvijala u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od 25, 50 i 75 $\mu\text{l ml}^{-1}$.

Tabela 25. Efekat ulja *Lavandula angustifolia* na rast micelije testiranih mikromiceta metodom mikroatmosfera

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium sp. 1</i>	<i>Trichoderma viride</i>
Koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Inhibicija rasta micelije (%)					
10	0	0	6,67 \pm 1,66*	51,31 \pm 7,71*	0	0
15	0	6,67 \pm 1,66*	10,67 \pm 1,76*	73,26 \pm 2,33*	5,67 \pm 1,66*	0
25	10,67 \pm 1,76*	21,33 \pm 1,67*	69,33 \pm 2,02*	100	59,56 \pm 1,67*	0
50	32,66 \pm 1,76*	57,33 \pm 1,66*	75,33 \pm 3,21*	100	100	59,66 \pm 2,03*
75	100	100	100	100	100	89,33 \pm 1,2*
100	100	100	100	100	100	100

*dobijene vrednosti prikazane su u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom (n=3, p<0,05)

Nakon utvrđivanja koncentracije ulja koja izaziva 100% inhibicije rasta micelije bilo je moguće preciznije odrediti MIC vrednosti za sve testirane izolate u rasponu koncentracija od 10 do 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Reinokulacijom tretiranih inokuluma čiji je rast bio inhibiran u uslovima aromatične atmosfere, pri određenim koncentracijama ulja, ustanovljeno je da li je inhibicija reverzibilnog karaktera ili ne (MFC vrednosti). Najniža vrednost MIC zabeležena je za *E. purpurascens* (20 $\mu\text{l ml}^{-1}$). MFC ove vrste je bio takođe najniži (40 $\mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 20). Ista vrednost MFC zabeležena je i za *Penicillium sp. 1* (Tabela 26). Vrsta *T. viride* imala je najveću vrednost MIC (80 $\mu\text{l ml}^{-1}$), dok je MFC bio 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 26).

Tabela 26. MIC i MFC vrednosti ulja *Lavandula angustifolia* određene metodom mikroatmosfera na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium sp. 1</i>	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)						
MIC	60	60	55	20	40	80
MFC	60	100	100	40	40	100

Uticaj ulja na germinaciju spora

Uticaj etarskog ulja *L. angustifolia* na germinaciju spora ispitivanih izolata praćen je mikrodilucionom metodom. Testirane su iste količine ulja kao i u metodi mikroatmosfera: 10, 15, 25, 50, 75 i 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Zaustavljanjem klijanja laktofenolom nakon 24h od trenutka inokulacije suspenzije spora i brojanjem klijalih i neklijalih konidija određene su koncentracije koje izazivaju 50% i 95% inhibicije germinacije spora (ID_{50} i ID_{95}). Na mikrotitracionim pločama, na kojima reakcija nije zaustavljena dodatkom laktofenola, praćeno je formiranja hifa i micelije i određene su MIC i MFC vrednosti. Mikrodilucionom metodom je pokazano da etarsko ulje *L. angustifolia* ne utiče na germinaciju spora *A. niger* i *B. spicifera*, te kod ovih izolata nije bilo moguće odrediti ID_{50} , ID_{95} , MIC i MFC vrednosti etarskog ulja *L. angustifolia* u opsegu testiranih koncentracija.

Najniže ID_{50} i ID_{95} vrednosti zabeležene su za *Penicillium* sp. 1 (10 i 15 $\mu\text{l ml}^{-1}$), dok su više vrednosti zabeležene za vrste *A. ochraceus* i *T. viride* (25 i 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 27).

Tabela 27. ID_{50} i ID_{95} vrednosti ($\mu\text{l ml}^{-1}$) ulja *Lavandula angustifolia* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	ID_{50}	ID_{95}
<i>Aspergillus niger</i>	/	/
<i>Aspergillus ochraceus</i>	25	50
<i>Bipolaris spicifera</i>	/	/
<i>Penicillium</i> sp. 1.	10	15
<i>Trichoderma viride</i>	25	50

Najniža MIC vrednost zabeležena je za *Penicillium* sp. 1 (25 $\mu\text{l ml}^{-1}$). Ova koncentracija ujedno predstavlja i MFC vrednost za ovu gljivu, dok je najviša MIC vrednost određena za *T. viride* (75 $\mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 28). Ova vrednost ujedno predstavlja i MFC za ovu gljivu (Tabela 28).

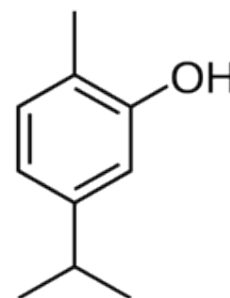
Tabela 28. MIC i MFC vrednosti ulja *Lavandula angustifolia* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)					
MIC	>100	50	> 100	25	75
MFC	>100	75	> 100	25	75

5.5.1.3 Antifungalna aktivnost etarskog ulja *Origanum vulgare*

Hemijski sastav ulja

Kombinacijom metoda GC i GC/MS izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza ulja *O. vulgare*. Identifikovana je ukupno 21 komponenta etarskog ulja što predstavlja 99.89% ulja. Dominantna komponenta ovog ulja je karvakrol (64,06%) (Slika 117). U značajnijem procentu zastupljena je komponenta linalool (17,56%), dok se ostale komponente nalaze u manjem procentu (od 0,11 % do 4,44 %) (Tabela 29).



Slika 117. Karvakrol, strukturna formula

Tabela 29. Procentualna zastupljenost komponenti etarskog ulja *Origanum vulgare*

Komponenta	KIE ¹	KIL ²	%
α -pinen	977,6	932	0,42
kamfen	941,7	946	0,16
β -mircen	987,6	988	0,52
α -felandren	999,9	1002	0,12
δ -3-karen	1011,8	1001	0,56
<i>p</i> -cimen	1020,1	1020	4,44
β - felandren	1023,6	1025	0,35
1.8-cineol	1026,8	1026	0,28
γ -terpinen	1053,9	1054	2,50
α -terpinolen	1083,3	1086	0,20
linalol	1099,8	1095	17,56
kamfor	1139,8	1141	0,11
borneol	1161,4	1165	0,95
terpinen-4-ol	1173,0	1174	1,01
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	1191,0	1186	0,33
izoterpinolen	-	-	0,11
timol	1292,0	1289	3,86
karvakrol	1307,3	1298	64,06
β -kariofilen	1413,1	1417	1,53
β -bisabolen	1503,1	1505	0,60
kariofilen oksid	1584,0	1582	0,22
Ukupno			99,89

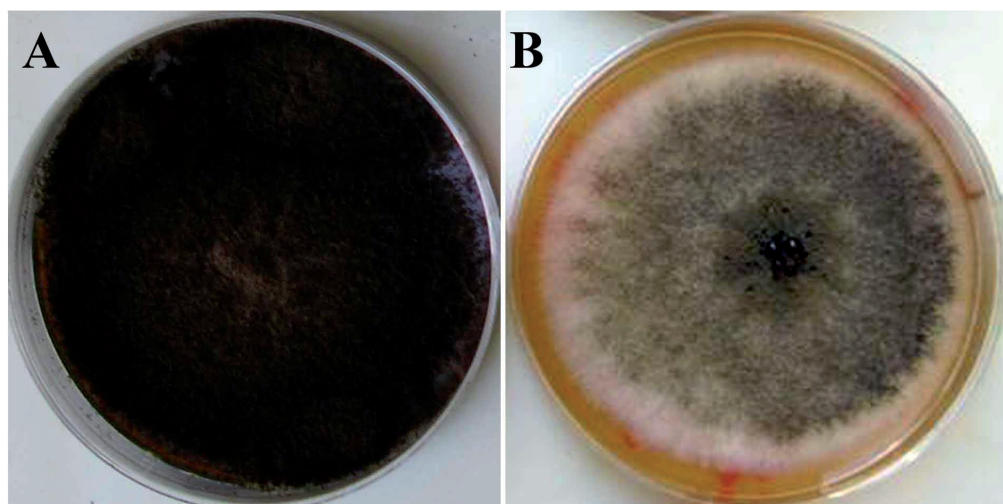
¹ Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)

² Kovačev (retencioni) indeks literaturni podatak (Adams, 2007)

Uticao ulja na rast somatskih hifa in vitro

Metodom mikroatmosfera testiran je uticaj etarskog ulja *O. vulgare* na micelijalni rast 6 odabranih izolata merenjem dijametra kolonija, 21. dana od inokulacije. Testirane koncentracije ulja iznosile su 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 i 2,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije (%) dobijena je poređenjem prečnika kolonija koje su rasle u uslovima aromatične atmosfere sa prečnikom kolonije u kontroli starosti 21. dan.

Kod *A. niger* pri koncentraciji ulja od 0,1, 0,25, 0,5 i 0,75 $\mu\text{l ml}^{-1}$ nisu zabeležene promene u izgledu, teksturi i boji kolonije. Kolonija *A. niger* koja se razvijala u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od 1 $\mu\text{l ml}^{-1}$, bila je svetlija i na licu i na naličju od kontrolne kulture sa maslinasto zelenom zonom u centru (Slika 118). Sporulacija je bila oskudnija nego u kontrolnoj kulturi. Za ovu vrstu potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji ulja od 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 30).

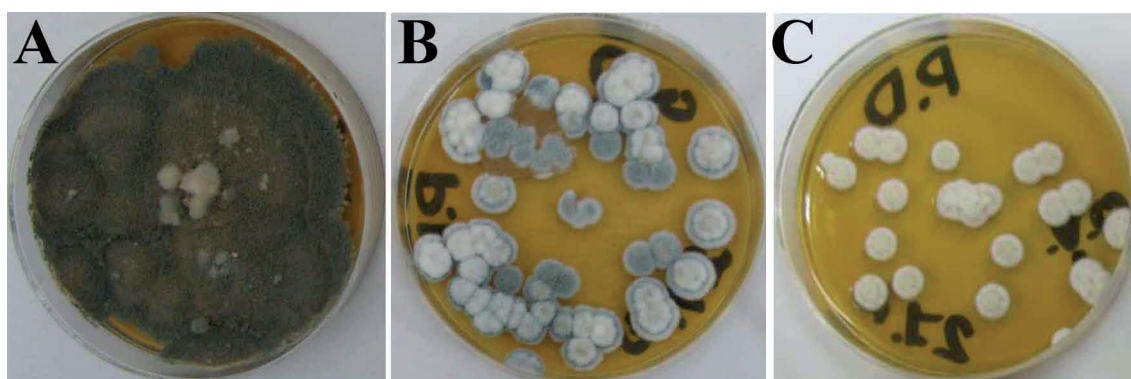


Slika 118. Efekat etarskog ulja *Origanum vulgare* na miceliju *Aspergillus niger*.
A. kontrola; B. izmenjena morfologija kolonije, 1,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$

Najosetljiviji testirani izolati bili su *A. ochraceus* i *E. purpurascens* kod kojih je potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta sa najmanjom korišćenom koncentracijom ulja (0,1 $\mu\text{l ml}^{-1}$). Kod ovih izolata nije bilo moguće pratiti morfo-fiziološke promene nastale usled interakcija ulja i gljive (Tabela 30).

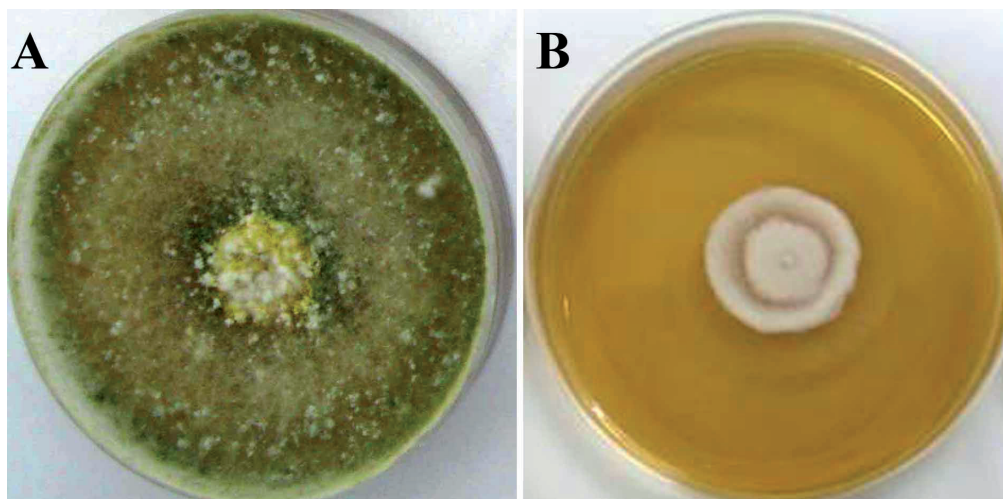
Kod izolata *B. spicifera* najmanja koncentracija ulja korišćena u eksperimentu ($0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$) izazvala je neznatnu inhibiciju rasta micelije od $29 \pm 1,32\%$, dok morfo-fiziološke promene nisu konstatovane u kulturi. Kod ove vrste potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji ulja od $0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 30).

Kod izolata *Penicillium* sp. 1 potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentracijama ulja od $0,75 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 30). Niže korišćene koncentracije ulja u eksperimentu ($0,1, 0,25$ i $0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$) izazvale su morfo-fiziološke promene u vidu depigmentacije u odnosu na kontrolnu kulturu. Kolonija *Penicillium* sp. 1 koja se razvijala u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od $0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$ odlikovala se tirkizno plavom bojom, izraženom belom zonom u centru, kao i smanjenim prečnikom kolonije u poređenju sa kontrolnom kulturom (Slika 119B). Najveći stepen depigmentacije zabeležen je u kulturi *Penicillium* sp. 1, koja je gajena u uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od $0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$. U kulturi je formirana bila micelija, praškaste konzistencije a mikroskopskom analizom je konstatovana oskudna sporulacija (Slika 119C).



Slika 119. Efekat etarskog ulja *Origanum vulgare* na miceliju *Penicillium* sp. 1: **A.** kontrola; **B.** $0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$, delimična depigmentacija kolonija; **C.** $0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$, potpuna depigmentacija kolonija

Najrezistentniji testirani izolat pripadao je vrsti *T. viride*, kod koje je potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta tek sa najvišom korišćenom koncentracijom ulja u eksperimentu ($2 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 30). Kod ove vrste su na nižim korišćenim koncentracijama ulja bile zabeležene morfo-fiziološke promene tipa depigmentacije i pojave koncentričnih zona u vazdušnoj miceliji (Slika 120).



Slika 120. Efekat etarskog ulja *Origanum vulgare* na miceliju *Trichoderma viride*: A. kontrola; B. izmenjena morfologija kolonije, 0,75 µl ml⁻¹

Tabela 30. Efekat ulja *Origanum vulgare* na rast micelije testiranih mikromiceta metodom mikroatmosfera

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Koncentracija (µl ml ⁻¹)	Inhibicija rasta micelije (%)					
0,1	0	100	29,5 ± 1,32*	100	59,56 ± 1,67*	0
0,25	0	100	100	100	66,33 ± 3,43*	0
0,5	0	100	100	100	73,26 ± 2,33*	0
0,75	0	100	100	100	100	0
1,0	62,57 ± 0,92*	100	100	100	100	6,67 ± 1,67*
1,5	100	100	100	100	100	10,67 ± 1,76*
2,0	100	100	100	100	100	100

* dobijene vrednosti prikazane su u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom (n=3, p<0,05)

Nakon određivanja koncentracije ulja koja izaziva 100% inhibicije rasta micelije bilo je moguće preciznije odrediti MIC vrednosti. Reinokulacijom inokuluma čiji je rast bio onemogućen u uslovima aromatične atmosfere pri određenim koncentracijama ulja ustanovljeno je da li je inhibicija reverzibilnog karaktera ili ne i tom prilikom određene su MFC vrednosti. Najniža vrednost MIC zabeležena je za vrste *A. ochraceus* i *E. purpurascens* (0,1 µl ml⁻¹) (Tabela 25). MFC vrste *E. purpurascens* je bio, takođe, najniži

i bio je jednak MIC vrednosti ($0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 31). Najveća vrednost MIC zabeležena je za izolate *Penicillium* sp. 1 i *T. viride* ($1,75 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 31).

Tabela 31. MIC i MFC vrednosti ulja *Origanum vulgare* određene metodom mikroatmosfera na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)						
MIC	1,25	0,1	0,25	0,1	1,0	1,75
MFC	1,5	0,75	1	0,1	1,75	2

Uticao ulja na germinaciju spora

Uticao etarskog ulja *O. vulgare* na germinaciju spora ispitivanih izolata praćen je mikrodilucionom metodom. Testirane su iste količine ulja kao i u metodi mikroatmosfera: $0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5$ i $2,0 \mu\text{l ml}^{-1}$. Zaustavljanjem reakcije laktofenolom nakon 24h od trenutka inokulacije suspenzije spora i brojanjem klijalih i neklijalih spora pod svetlosnim mikroskopom određene su koncentracije ulja koje izazivaju približno 50% i 95% inhibicije germinacije spora (ID_{50} i ID_{95}). Na mikrotitracionim pločama na kojima reakcija nije zaustavljena dodatkom laktofenola praćenje je formiranja hifa i micelije i tom prilikom su određene MIC i MFC vrednosti. Najniža korišćena koncentracija ulja u eksperimentu $0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$ predstavlja ujedno i ID_{50} vrednost za *A. niger*, *A. ochraceus*, *B. spicifera* i *Penicillium* sp. 1 (Tabela 32). ID_{95} vrednost ovih izolata zabeležena je pri koncentraciji ulja od $0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 32). Više ID_{50} i ID_{95} vrednosti zabeležene su za *T. viride* ($0,2$ i $0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 32).

Tabela 32. ID_{50} i ID_{95} vrednosti ($\mu\text{l ml}^{-1}$) ulja *Origanum vulgare* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	ID_{50}	ID_{95}
<i>Aspergillus niger</i>	0,1	0,25
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,1	0,25
<i>Bipolaris spicifera</i>	0,1	0,25
<i>Penicillium</i> sp.1	0,1	0,25
<i>Trichoderma viride</i>	0,2	0,5

MIC i MFC vrednosti su određene za sve testirane izolate. Najniže MIC vrednosti zabeležene su za izolate *A. ochraceus*, *B. spicifera* i *Penicillium* sp. 1 ($0,2 \mu\text{l ml}^{-1}$), dok je najviša MIC vrednost ($0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$) zabeležena za vrstu *T. viride* (Tabela 33). Ipak ta koncentracija predstavlja ujedno i MFC vrednost za *T. viride*, što je i najniža MFC vrednost zabeležena u eksperimentu. Najviše MFC vrednosti dokumentovane za izolate *A. niger*, *A. ochraceus* i *Penicillium* sp. 1 ($2 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 33).

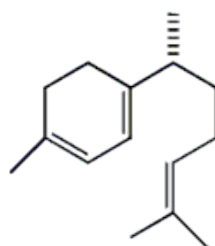
Tabela 33. MIC i MFC vrednosti ulja *Origanum vulgare* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama.

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)					
MIC	0,25	0,2	0,2	0,2	0,5
MFC	2	2	1	2	0,5

5.5.1.4 Antifungalna aktivnost etarskog ulja *Helichrysum italicum*

Hemijski sastav ulja

Kombinacijom metoda GC i GC/MS izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza etarskog ulja *H. italicum*. Identifikovano je 60 komponenti što predstavlja 100% ulja. Dominantna komponenta u ovom ulju je γ -kurkumen koji je u uzorku ulja bio zastupljen sa 22,45% (Slika 121). U značajnijem procentu zastupljene komponente su α -pinen (15,91%) i neril acetat (7,85%), dok se ostale komponente nalaze u manjem procentu od 0,05 % do 5,42 % (Tabela 34).



Slika 121. γ -kurkumen, strukturna formula

Tabela 34. Komponente etarskog ulja *Helichrysum italicum*

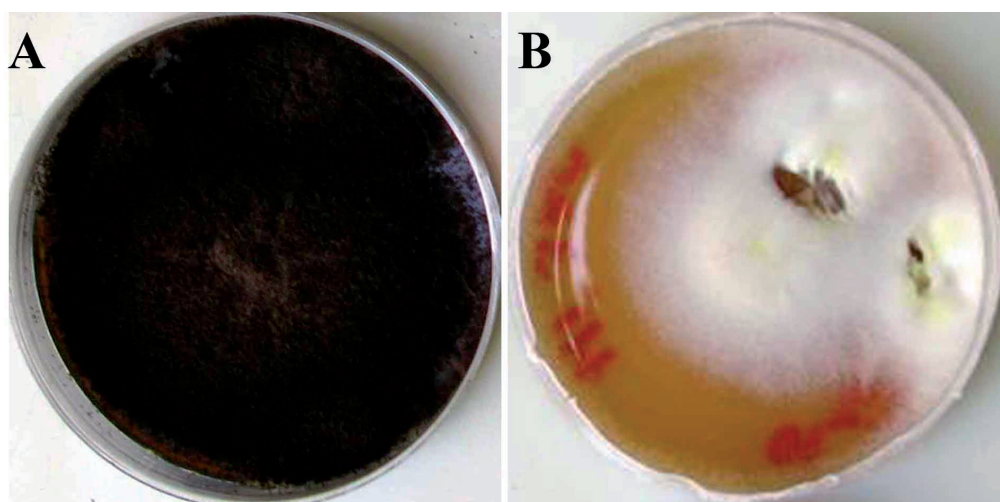
Komponenta	KIE ¹	KIL ²	%
α -pinen	926,4	932	15,91
α -fenhen	939,2	945	0,39
kamfen	949,1	946	0,20
β -pinen	969,0	969	0,31
<i>p</i> -cimen	1019,1	1020	0,06
limonen	1022,4	1024	2,52
1,8-cineol	1025,4	1026	0,30
izobutil angelat	-	1045	0,21
γ -terpinen	1052,9	1054	0,25
α -terpinolen	1082,3	1086	0,19
linalol	1096,5	1095	0,51
izoamil 2-metil butirat	1100,1	1100	0,15
endo-fenol	1108,0	1114	0,08
<i>trans</i> -pinokarveol	1133,3	1135	0,08
izoamil tiglat	1149,6	1148	0,77
nerol oksid	1150,4	1154	0,11
borneol	1160,3	1165	0,10
<i>cis</i> -pinokamfon	1179,1	1172	0,53
terpinen-4-ol	1172,2	1174	0,55
α -terpineol	1185,8	1186	0,26
dekanal	1201,8	1201	0,06
nerol	1224,7	1227	0,78
heksil 2-metil butanoat	1232,7	1233	0,16
heksil 3-metil 2-butenat	1281,8	n/a	0,30
2-undekanon	1291,4	1293	0,06
neril acetat	1362,5	1359	7,85
α -ilangen	1364,0	1373	0,42
α -kopaen	1368,7	1374	3,52
italicen	1395,8	1405	5,42
<i>cis</i> - α -bergamoten	1408,1	1411	1,44
<i>trans</i> -kariofilen	1411,6	1417	4,74
<i>trans</i> - α -bergamoten	1428,6	1432	3,24
neril propanoat	1449,4	1452	1,39
allo-aromadendren	1464,4	1458	0,28
α -akoradien	1471,0	1464	0,12
β -akoradien	1473,8	1469	0,64
selina-4,11-dien	1468,2	1475	1,13
γ -kurkumen	1474,3	1481	22,45
<i>ar</i> -kurkumen	1477,0	1479	1,90
β -selinen	1479,1	1489	6,94
α -selinen	1488,1	1498	4,78
α -muurolen	1493,2	1500	1,39
β -kurkumen	1505,0	1514	0,60
δ -kadinen	1516,0	1522	1,52
italicen eter	1526,6	1536	0,54
α -kalakoren	1535,4	1544	0,13
<i>trans</i> -nerolidol	1557,1	1561	0,06
kariolan-8-ol	1561,5	1571	0,05
geranil 2-metilbutirat	1570,2	1574	0,57
neril izovalerat	1573,7	1582	0,47
kariofilen oksid	1585,5	1582	0,08
globulol	1589,8	1590	0,17
viridiflorol	1595,8	1592	0,40
rosifoliol	1599,1	1600	2,20
humulan-1,6-dien-3-ol	1604,0	1619	0,14
γ -eudesmol	1623,0	1630	0,17
β -eudesmol	1625,8	1649	0,06
selin-11-en-4- α -ol	1646,3	1658	0,40
<i>epi</i> - β -bisabolol	1661,7	1670	0,09
α -bisabolol	1675,7	1685	0,14
ukupno			100

¹ Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)² Kovačev (retencioni) indeks literaturni podatak (Adams, 2007)

Uticaj ulja na rast somatskih hifa in vitro

Metodom mikroatmosfera testiran je uticaj etarskog ulja *H. italicum* na micelijalni rast 6 odabranih izolata merenjem prečnika kolonija, starih 21 dan. Testirane koncentracije ulja iznosile su 10, 15, 25, 50, 75, i 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije (%) dobijena je poređenjem prečnika kolonija koje su rasle u uslovima aromatične atmosfere sa prečnika kolonije u kontroli starosti 21 dan.

U rasponu korišćenih koncentracija potpuna inhibicija rasta micelije (100%) nije postignuta kod nijedne testirane vrste (Tabela 35). Etarsko ulje *H. italicum* u koncentraciji 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ izazvalo je morfo-fiziološke promene u kulturi *A. niger* u vidu potpune depigmentacije kolonije (Slika 122). Mikroskopskom analizom struktura gljiva depigmentisane micelije konstatovano je prisustvo gusto pakovanih sterilnih vazdušnih hifa, dok su glavice bile odsutne.



Slika 122. Efekat etarskog ulja *Helichrysum italicum* na miceliju *Aspergillus niger*:
A. kontrola; B. depigmentacija kolonije, 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$

U uslovima aromatične atmosfere pri koncentraciji ulja od 75 i 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$, detektovana je neznatna inhibicija rasta micelije *A. ochraceus*, dok morfo-fiziološke promene nisu bile detektovane. U kulturi *B. spicifera* pri koncentraciji ulja od 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ osim inhibicije rasta micelije od 42% uočeno je blaga depigmentacija (Tabela 35). Mikroskopskom analizom dokazano je prisustvo manjeg broja porokonidija smanjenog intenziteta melanizacije u odnosu na kontrolnu kulturu.

Najveći antifungalni efekat zabeležen je kod izolata *E. purpurascens* kod koje je najviša korišćena koncentracija ulja u eksperimentu od 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ izazvala inhibiciju rasta micelije od 77% (Tabela 35). Osim smanjenog prečnika micelije, tretirani izolati se nisu razlikovali od kontrolne kulture.

U kulturi *Penicillium* sp. 1 pri najvišoj korišćenoj koncentraciji ulja od 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ zabeležena je inhibicija rasta micelije od 65% i blaga depigmentacija kolonije (Tabela 35).

Najrezistentniji vrsta bila je *T. viride* kod koje nisu detektovani ni inhibicija rasta micelije niti promene u teksturi, boji i izgledu kolonije.

Tabela 35. Efekat ulja *Helichrysum italicum* na rast micelije testiranih mikromiceta metodom mikroatmosfera

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Inhibicija rasta micelije (%)					
10	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	24,31 \pm 2,16	73,26 \pm 2,33*	0
50	0	0	0	59,66 \pm 2,03	12,5 \pm 1,66	0
75	2,67 \pm 1,4	9,1 \pm 0,81	18,67 \pm 1,33	65,33 \pm 3,72	31,68 \pm 8,23	0
100	29 \pm 1,4	11,5 \pm 1,22	42,33 \pm 6,17	76,93 \pm 4,0	59,56 \pm 4,07	0

*dobijene vrednosti prikazane su u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom (n=3, p<0,05)

S obzirom da etarsko ulje *H. italicum* nije izazvalo inhibiciju rasta micelije od 100 % kod nijednog testiranog izolata, može se zaključiti se da se MIC i MFC vrednosti ovog ulja nalaze iznad 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ i uopšteno govoreći ovo ulje ima nizak antifungalni potencijal (Tabela 36).

Tabela 36. MIC i MFC vrednosti ulja *Helichrysum italicum* određene metodom mikroatmosfera na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)						
MIC	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MFC	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

Utica ulja na germinaciju spora

Utica etarskog ulja *H. italicum* na klijanje spora ispitivanih izolata praćen je mikrodilucionom metodom. Testirane su iste koncentracije ulja kao i u metodi mikroatmosfera: 10, 15, 25, 50, 75 i 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Nakon zaustavljanja klijanja laktofenolom nakon 24h od trenutka inokulacije mikroskopskom analizom nisu uočene nekljale kod svih testiranih izolata pri svim korišćenim koncentracijama ulja, te stoga za ovo ulje nije bilo moguće odrediti ID_{50} i ID_{95} vrednosti u opsegu korišćenih koncentracija.

Na svim mikrotitracionim pločama u kojima reakcija nije zaustavljena dodavanjem laktofenola konstatovano je formiranje hifa i micelije, te stoga ni MIC ni MFC koncentracije nije bilo moguće odrediti u opsegu koncentracija od 10 do 100 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 37).

Tabela 37. MIC i MFC vrednosti ($\mu\text{l ml}^{-1}$) ulja *Helichrysum italicum* određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)						
MIC	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MFC	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

5.5.2 Antifungalna aktivnost biocida BAC

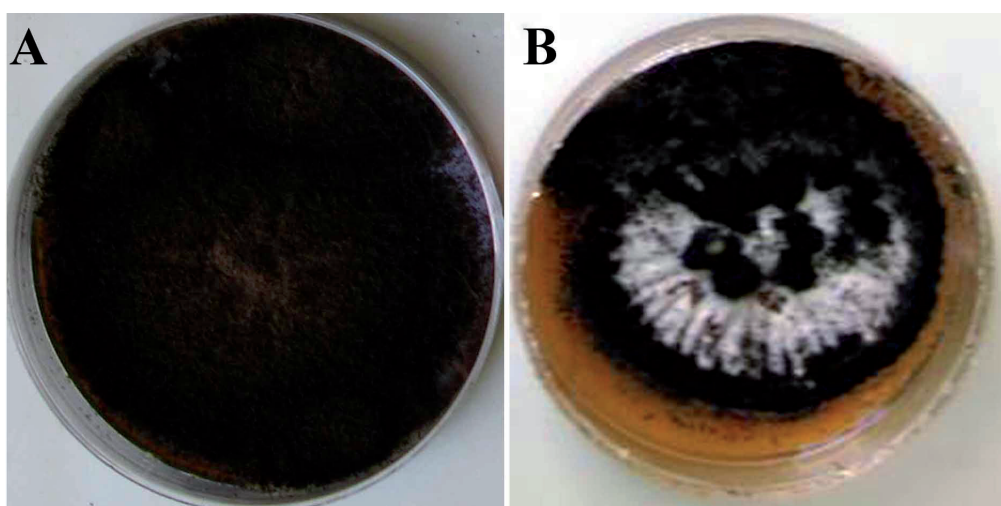
Benzalkonijum hlorid (BAC), koji spada u grupu kvarternih amonijumovih soli, preporučen je kao biocid od Zavoda za zaštitu spomenika kulture u Beogradu. Za ispitivanje antifungalne aktivnosti biocida BAC, korišćene su makrodiluciona metoda, mikrodiluciona metoda i metoda neutralizacije biocida.

Utica BAC na rast somatskih hifa in vitro

Makrodilucionom metodom testiran je utica biocida BAC na rast micelije 6 odabranih izolata merenjem prečnika kolonija 21. dana od inokulacije. Testirane koncentracije biocida iznosile su 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 i 5,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije (%) dobi-

jena je poređenjem prečnika kolonija koje su rasle sa BAC-om u podlozi sa prečnikom kolonije u pozitivnoj kontroli starosti 21. dana. Praćene su i promene u izgledu, boji i teksturi kolonije i intenzitetu sporulacije tretiranih kultura sa kontrolnom kulturom.

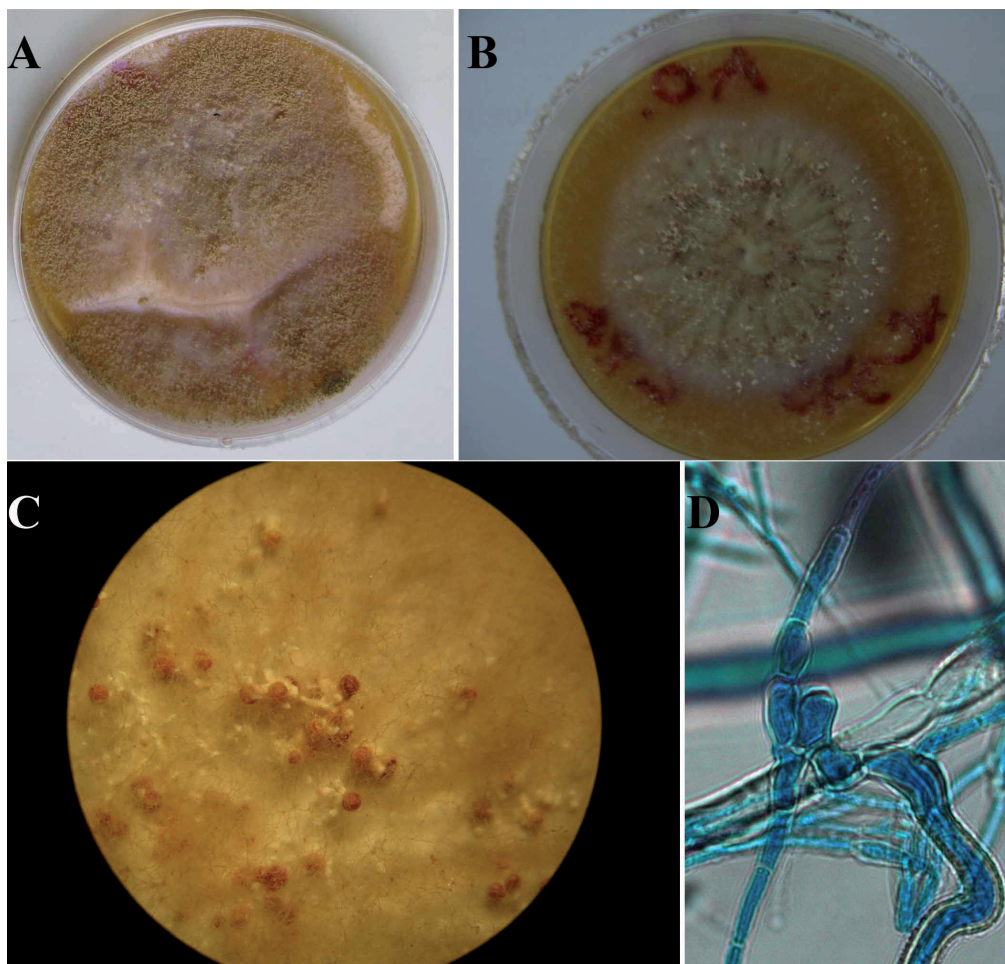
Biocid BAC izazvao je morfo-fiziološke promene u kulturi *A. niger*. Potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji biocida od $2,5 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 38). Najniža korišćena koncentracija biocida u eksperimentu ($0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$) nije izazvala inhibiciju rasta micelije, ali je na koloniji *A. niger* uočeno prisustvo belih sektora u centru micelije koji nisu bili prisutni u kontrolnoj kulturi (Slika 123). Prisustvo belih sektora konstatovano je i pri koncentracijama biocida od $0,25$, $0,5$ i $1,0 \mu\text{l ml}^{-1}$. Broj i površina belih sektora je rasla sa povećanjem koncentracije BAC u podlozi. Mikroskopskom analizom belih sektora utvrđeno prisustvo sterilne micelije.



Slika 123. Efekat benzalkonijum hlorida na miceliju *Aspergillus niger*: A. kontrola; B. beli sektori na miceliji, $0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$

U kulturi *A. ochraceus* konstatovane su morfo-fiziološke promene nastale usled reakcije gljive na BAC. Potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta je pri koncentraciji biocida od $1,0 \mu\text{l ml}^{-1}$ podloge (Tabela 38). *A. ochraceus* koja se razvijala pri nižim koncentracijama biocida BAC ($0,1$, $0,25$, i $0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$) formirala je bele sektore krupno zrnaste micelije koja nije bila prisutna u kontrolnoj kulturi (Slika 124B i C). Mikroskop-

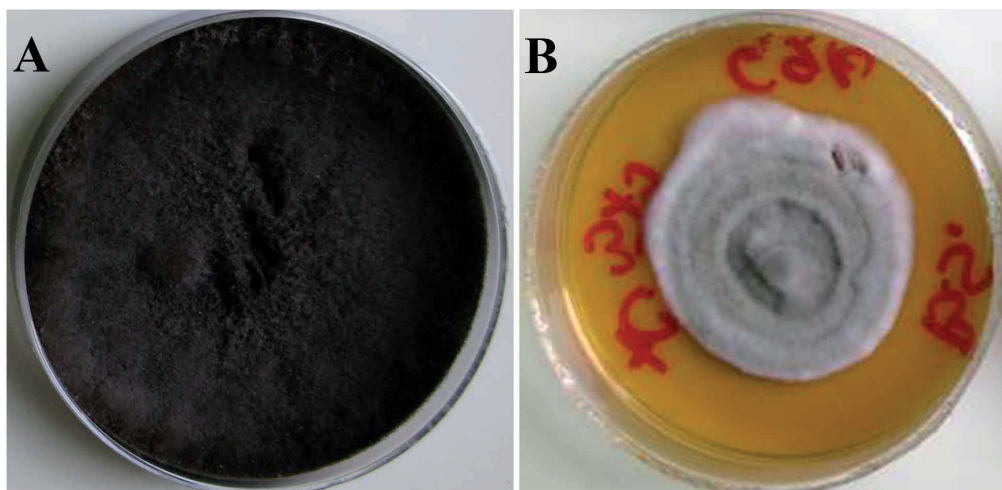
skom analizom pokazano je da u koloniji izmenjene morfologije pod uticajem biocida dominiraju sklerocije, dok su glavice retke (Slika 124D). U kontrolnoj kulturi sklerocije nisu bile prisutne.



Slika 124. Efekat benzalkonijum hlorida na miceliju *Aspergillus ochraceus*: **A.** kontrola; **B.** micelija izmenjene morfologije, 0,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$; **C.** sklerocije *in situ* **D.** početak obrazovanja sklerocija pod uvećanjem od 400 \times

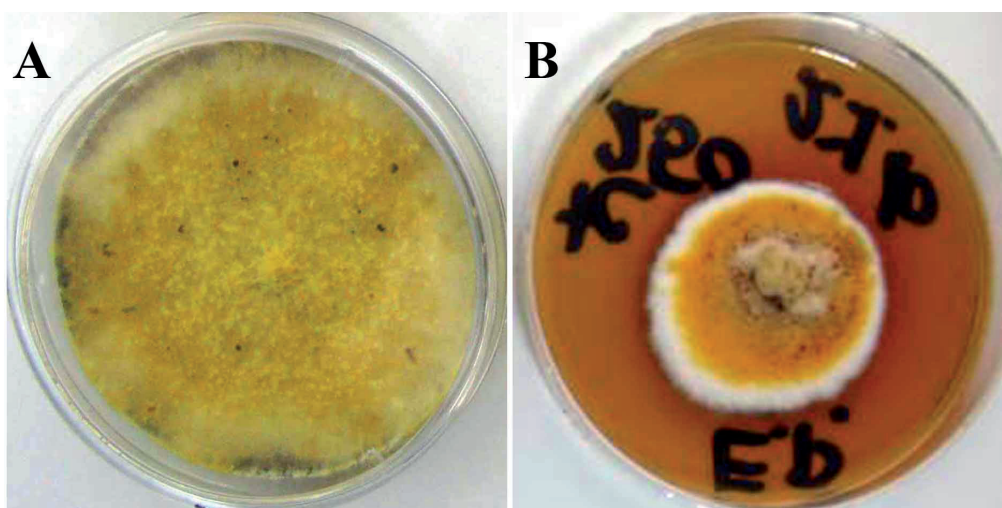
Najosetljivije testirane vrste bile su *B. spicifera*, *E. purpurascens* i *Penicillium* sp. 1 jer je kod njih potpuna inhibicija rasta micelije (100%) postignuta koncentracijom biocida BAC od 0,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 38). Niža koncentracija biocida u eksperimentu (0,1 $\mu\text{l ml}^{-1}$) prouzrokovala je formiranje kolonija sa izmenjenom morfologijom. *B. spicifera*, koja je rasla na MEA podlozi sa biocidom BAC u finalnoj koncentraciji od 0,1 $\mu\text{l ml}^{-1}$ formirala kolonije sa izmenjenom bojom lica i naličja. Ova gljiva je u tretmanu sa biocidom BAC

bila znatno svetlija od kontrolne kulture i sa izraženom belom marginom na periferiji kolonije (Slika 125). Mikroskopska analiza je pokazala smanjen intenzitet konidijacije, kao i smanjenu melanizaciju konidiofora i porokonidija.



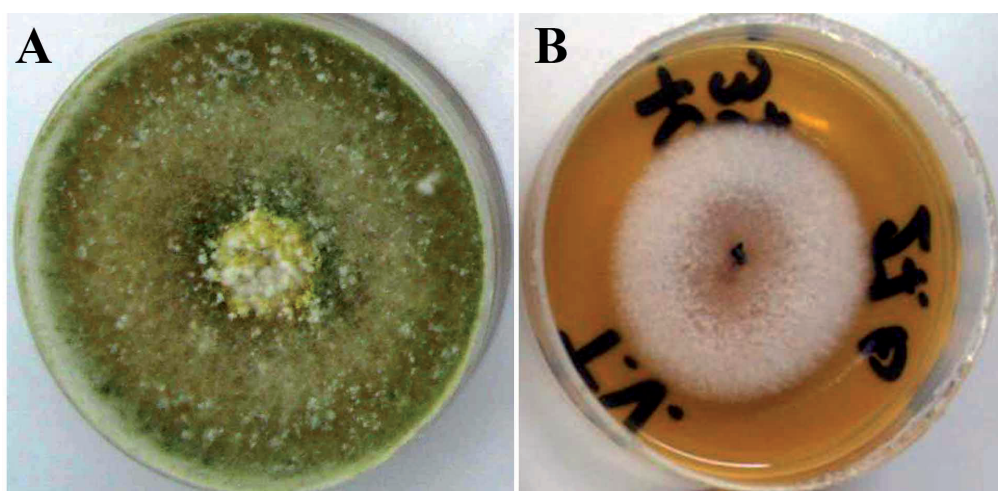
Slika 125. Efekat benzalkonijum hlorida na miceliju *Bipolaris spicifera*: **A.** kontrola; **B.** micelija izmenjene morfologije, $0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$

Kolonija *E. purpurascens* gajena na MEA sa dodatkom biocida BAC u finalnoj koncentraciji od $0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$ razlikovala se od kontrolne kulture po intenzivnijoj obojenosti lica kolonije, prisustvu bele margine na periferiji kolonije i prisustvu eksudata (Slika 126B).



Slika 126. Efekat benzalkonijum hlorida na miceliju *Epicoccum purpurascens*: **A.** kontrola; **B.** micelija izmenjene morfologije, $0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$

Potpuna inhibicija rasta micelije (100%) kod izolata *T. viride* postignuta je pri koncentraciji BAC u podlozi od $2,5 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 32). Niže koncentracije biocida BAC ($0,1$, $0,25$, $0,5$ i $1,0 \mu\text{l ml}^{-1}$) izazvale su promene u teksturi, boji i izgledu kolonije *T. viride* u poređenju sa kontrolnom kulturom. Formirane kolonije *T. viride* na MEA sa dodatkom biocida BAC ($0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$) odlikovale su izraženom belom vazдушnom micelijom (Slika 127B). Mikroskopskom analizom ovij kultura utvrđeno je da je intenzitet sporulacije manji u tretiranim kolonijama nego u kontrolnoj kulturi.



Slika 127. Efekat benzalkonijum hlorida na miceliju *Trichoderma viride*: **A.** kontrola. **B.** $0,25 \mu\text{l ml}^{-1}$

Tabela 38. Efekat benzalkonijum hlorida na rast odabranih mikromiceta u makrodilucionoj metodi

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Inhibicija rasta micelije (%)					
0,1	0	$12,5 \pm 1,66$	$42,33 \pm 6,17$	$65,33 \pm 3,72$	$73,26 \pm 2,33$	$12,5 \pm 1,66$
0,25	$6,67 \pm 3,33$	$66,67 \pm 6,67$	100	100	100	$67 \pm 1,76$
0,5	$36,67 \pm 3,33$	$68,67 \pm 0,67$	100	100	100	$84,5 \pm 7,76$
1,0	$93,83 \pm 6,17$	100	100	100	100	$96,67 \pm 3,33$
2,5	100	100	100	100	100	100
5,0	100	100	100	100	100	100

* dobijene vrednosti prikazane su u vidu srednje vrednosti sa standardnom greškom ($n=3$, $p<0,05$)

Nakon određivanja koncentracije ulja koja izaziva 100% inhibicije rasta micelije bilo je moguće preciznije odrediti MIC vrednosti. Reinokulacijom inokuluma čiji je rast bio onemogućen usled prisustva BAC u podlozi ustanovljeno je da li je inhibicija reverzibilnog karaktera ili ne i tom prilikom određene su MFC vrednosti. Na osnovu rezultata dobijenih makrodilucionom metodom bilo je moguće odrediti MIC i MFC vrednosti u rasponu koncentracija od 0,1 do 5,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$ za sve testirane gljive. Najniža vrednost MIC utvrđena je za vrstu *E. purpurascens* i iznosi 0,2 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 39). Najviša vrednost MIC od 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$, utvrđena je za vrstu *T. viride* (Tabela 39). Najniža vrednost MFC od 0,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ zabeležena je za izolate *B. spicifera*, *E. purpurascens* i *Penicillium* sp. 1, dok je najviša MFC vrednost od 4,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$ zabeležena za *A. ochraceus* (Tabela 39).

Tabela 39. MIC i MFC vrednosti ulja benzalkonijum hlorida određene makrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)						
MIC	1,25	1,0	0,25	0,2	0,25	1,5
MFC	1,5	4,0	0,5	0,5	0,5	2,0

Uticao BAC na germinaciju spora

Uticao biocida BAC na klijanje spora ispitivanih mikromiceta praćen je mikrodilucionom metodom. Testirane su iste koncentracije biocida kao i u makrodilucionoj metodi: 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 i 5,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Zaustavljanjem klijanja laktofenolom nakon 24h od trenutka inokulacije suspenzije spora određene su koncentracije koje izazivaju 50% i 95% inhibicije germinacije spora (ID_{50} i ID_{95}). Na mikrotitracionim pločama na kojima reakcija nije zaustavljena dodatkom laktofenola praćeno je formiranje hifa i micelije i tom prilikom su određene MIC i MFC vrednosti. ID_{50} vrednosti nisu određene za *A. niger* i *A. ochraceus* jer su ispod opsega testiranih koncentracija biocida. ID_{95} ovih vrsta imala je najnižu vrednost od 0,1 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Tabela 40). Najviše ID_{50} i ID_{95} vrednosti su zabeležena za *T. viride* (0,25 i 0,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 40).

Tabela 40. ID₅₀ i ID₉₅ vrednosti ($\mu\text{l ml}^{-1}$) benzalkonijum hlorida određene mikrodilucionom metodom na testiranim mikromicetama

Izolat	ID ₅₀	ID ₉₅
<i>Aspergillus niger</i>	/	0,1
<i>Aspergillus ochraceus</i>	/	0,1
<i>Bipolaris spicifera</i>	0,1	0,25
<i>Penicillium</i> sp. 1	0,1	0,25
<i>Trichoderma viride</i>	0,25	0,5

MIC i MFC vrednosti su određene za sve testirane mikromicete. Najniže MIC vrednosti zabeležene su za *A. niger* i *A. ochraceus* ($0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$), dok je najviša MIC vrednost ($0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$) zabeležena za *T. viride* (Tabela 41). Najviše MFC vrednosti zabeležene su za *A. ochraceus* i *T. viride* ($0,5 \mu\text{l ml}^{-1}$) (Tabela 41).

Tabela 41. MIC i MFC vrednosti ulja benzalkonijum hlorida određene mikrodilucionom metodom

Izolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>Trichoderma viride</i>
Minimalna inhibitorna i minimalna fungicidna koncentracija ($\mu\text{l ml}^{-1}$)					
MIC	0,1	0,1	0,25	0,25	0,5
MFC	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5

Uticaj kontaktnog vremena na inhibiciju germinacije spora BAC

Metodom neutralizacije biocida testirana je antifungalna aktivnost ispitivanih koncentracija vodenih rastvora biocida BAC (0,25%, 0,15% i 0,05%) u određenom kontaktnom vremenu (5, 15, 30 i 60 min). Antifungalna aktivnost biocida BAC određivana je posmatranjem redukcije vijabilnosti konidija usled uticaja biocida. Kao test mikromicete u eksperimentu neutralizacije biocida korišćeni su izolati sa zidnih slika Crkve Svete Bogorodice manastira Gradac (*A. fumigatus*, *A. versicolor*, *E. nidulans*, i *Penicillium* sp. 2).

Vodeni rastvori BAC (0,25 % i 0,15%) maksimalno su redukovalu vijabilnost konidija svih testiranih izolata ($> 10^4$) već nakon 5 min (Tabela 42 i 43).

Tabela 42. Redukcija vijabilnosti konidija odabranih izolata usled interakcijem sa vodenim rastvorom BAC (0,25 %)

Izolat	kontaktno vreme (min)			
	5	15	30	60
	Redukcija vijabilnosti konidija			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Aspergillus versicolor</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Emericella nidulans</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Penicillium</i> sp. 2	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴

Tabela 43. Redukcija vijabilnosti konidija odabranih izolata usled interakcijem sa vodenim rastvorom BAC (0,15 %)

Izolat	kontaktno vreme (min)			
	5	15	30	60
	Redukcija vijabilnosti konidija			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Aspergillus versicolor</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Emericella nidulans</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Penicillium</i> sp. 2	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴

Najmanja koncentracija vodenog rastvora BAC (0,05%), bila je, takođe, efikasna u redukciji vijabilnosti konidija ali je zahtevala period od 30 min (Tabela 44).

Tabela 44. Redukcija vijabilnosti konidija odabranih izolata usled interakcijem sa vodenim rastvorom BAC (0.05 %)

Izolat	kontaktno vreme (min)			
	5	15	30	60
	Redukcija vijabilnosti konidija			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	< 10 ⁴	< 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Aspergillus versicolor</i>	< 10 ⁴	< 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Emericella nidulans</i>	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
<i>Penicillium</i> sp. 2	< 10 ⁴	< 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴

5.5.3 Uporedna analiza antifungalne aktivnosti etarskih ulja i biocida BAC

Antifungalni potencijal etarskih ulja, u *in vitro* uslovima, može se predstaviti sledećim nizom, idući od najaktivnijih ka manje aktivnim uljima: *O. vulgare* > *L. angustifolia* > *R. officinalis* > *H. italicum*. Poređenjem MIC i MFC vrednosti dobijenih dvema korišćenim metodama (metoda mikroatmosfera i mikrodiluciona metoda), ispitivana etarska ulja su različito delovala na rast hifa i na klijanje konidija testiranih izolata.

Etarsko ulje vrste *O. vulgare* delovalo je najjače na sve testirane mikromicete. Konidije *A. niger* bile su osetljivije prema ulju *O. vulgare* u odnosu na miceliju, što ukazuje niža MIC vrednost dobijena mikrodilucionom metodom (0,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$). Viša MFC vrednost dobijena mikrodilucionom metodom sugerise da je fungicidni efekat etarskog ulja *O. vulgare* izraženiji na nivou rasta micelije nego na nivou klijanja konidija. Kod vrste *A. ochraceus* fungistatski i fungicidni efekat etarskog ulja *O. vulgare* bili su izraženiji na nivou rasta hifa na šta sugerisu niže MIC i MFC vrednosti dobijena metodom mikroatmosfera. Kod vrste *B. spicifera* MIC vrednost dobijena mikrodilucionom metodom neznatno je veća od MIC vrednosti dobijene metodom mikroatmosfera, dok su MFC vrednosti dobijene obema metodama jednake. Može se zaključiti da su fungistatski i fungicidni efekat etarskog ulja *O. vulgare* isti na nivou rasta micelije i na nivou klijanja spora. Kod izolata *Penicillium* sp.1 fungistatski efekat etarskog ulja bio je izraženiji na nivou germinacije konidija, dok je fungicidni bio izraženiji na nivou rasta hifa. Konidije vrste *T. viride* bile su osetljivijena ulje *O. vulgare* u odnosu na miceliju ove gljive (Tabela 45).

Tabela 45. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja *Origanum vulgare* dobijene metodama mikroatmosfera i mikrodilucionom metodom

Testirani izolati	Metod mikroatmosfera		Mikrodiluciona metoda	
	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)
<i>Aspergillus niger</i>	1,25	1,5	0,25	2,0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,1	0,75	0,2	2,0
<i>Bipolaris spicifera</i>	0,25	1,0	0,2	1,0
<i>Penicillium</i> sp. 1	1,0	1,75	0,2	2,0
<i>Trichoderma viride</i>	1,75	2,0	0,5	0,5

Etarsko ulje vrste *L. angustifolia* pokazalo je umereno-jak antifungalni potencijal. Kod vrste *A. niger* i *B. spicifera* fungistatski i fungicidni efekti ovog ulja bili su izraženiji na nivou rasta hifa. Kod ovih MIC i MFC dobijene mikrodilucionom metodom bile su iznad $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ što upućuje na nizak antifungalni efekat etarskog ulja *L. angustifolia* na nivou klijanja konidija ovih gljiva. Kod izolata *A. ochraceus*, *Penicillium* sp.1 i *T. viride* fungistatski i fungicidni efekti bili su izraženiji na nivou germinacije konidija (Tabela 46).

Tabela 46. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja *Lavandula angustifolia* dobijene metodama mikroatmosfera i mikrodilucionom metodom

Testirani izolati	Metod mikroatmosfera		Mikrodiluciona metoda	
	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)
<i>Aspergillus niger</i>	60	60	>100	>100
<i>Aspergillus ochraceus</i>	60	100	50	75
<i>Bipolaris spicifera</i>	55	100	>100	>100
<i>Penicillium</i> sp. 1	40	40	25	25
<i>Trichoderma viride</i>	80	100	75	75

Etarsko ulje vrste *R. officinalis* pokazalo je umereno-jak antifungalni potencijal prema svim testiranim izolatima osim prema vrsti *B. spicifera* kod koje su dobijene vrednosti za MIC i MFC primenom obe metode bile iznad $100 \mu\text{l ml}^{-1}$.

Fungistatski i fungicidni efekat ulja *R. officinalis* su bili izraženiji na nivou rasta hifa *A. niger*. Fungistatski efekat ovog ulja je bio izraženiji na nivou klijanja konidija *A. ochraceus*, dok je fungicidni efekat bio izraženiji na nivou rasta hifa ove gljive. Kod izolata *Penicillium* sp. 1 fungistatski efekat etarskog ulja *R. officinalis* bio je izraženiji na nivou germinacije spora. MFC vrednosti dobijene obema metodama bile su identične ($100 \mu\text{l ml}^{-1}$), što sugerise da je fungicidni efekat etarskog ulja *R. officinalis* jednak i na nivou rasta hifa i na nivou germinacije konidija. Kod vrste *T. viride* fungistatski i fungicidni efekat bili su izraženiji na nivou germinacije konidija. Metodom mikroatmosfera je pokazano da su MIC i MFC vrednosti etarskog ulja iznad $100 \mu\text{l ml}^{-1}$, i to upućuje na slab antifungalni potencijal ulja *R. officinalis* na rast hifa *T. viride* (Tabela 47).

Tabela 47. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* dobijene metodama mikroatmosfera i mikrodilucionom metodom

Testirani izolati	Metod mikroatmosfera		Mikrodiluciona metoda	
	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)
<i>Aspergillus niger</i>	30	80	100	100
<i>Aspergillus ochraceus</i>	80	80	30	100
<i>Bipolaris spiciferas</i>	>100	>100	>100	>100
<i>Penicillium</i> sp. 1	80	100	50	100
<i>Trichoderma viride</i>	>100	>100	80	100

Etarsko ulje *H. italicum* pokazalo je slab antifungalni potencijal prema svim testiranim izolatima. Obema korišćenim metodama pokazano je da su MIC i MFC vrednosti za sve testirane izolate iznad $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ što upućuje na slab fungistatski i fungicidni potencijal ovog ulja (Tabela 48).

Tabela 48. MIC i MFC vrednosti etarskog ulja *Helichrysum italicum* dobijene metodama mikroatmosfera i mikrodilucionom metodom

Testirani izolati	Metod mikroatmosfera		Mikrodiluciona metoda	
	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)
<i>Aspergillus niger</i>	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Aspergillus ochraceus</i>	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Bipolaris spicifera</i>	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Penicillium</i> sp. 1	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Trichoderma viride</i>	> 100	> 100	> 100	> 100

Antifungalni potencijal biocida BAC na nivou rasta hifa i na nivou germinacije konidija ispitivan je makrodilucionom i mikrodilucionom metodom. Zbog slabe isparljivosti biocida metod mikroatmosfera nije korišćen. Biocid BAC ispoljio je jak antifungalni potencijal u odnosu na sve testirane izolate. Kod vrsta *A. niger*, *A. ochraceus* i *T. viride* fungistatski i fungicidni efekti biocida bili su izraženiji na nivou klijanja konidija. Kod izolata *B. spicifera* i *Penicillium* sp. 1 dobijena MIC vrednost biocida u obe korišćene metode bila je jednaka ($0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$), što sugeriše da je fungistatski efekat ovog biocida identičan na nivou rasta hifa i na nivou klijanja konidija. Kod oba izolata fungicidni efekat je bio izraženiji na nivou germinacije konidija. Zaključak je da biocid BAC ima jači antifungalni efekat na nivou germinacije konidija (Tabela 49).

Tabela 49. MIC i MFC vrednosti benzalkonijum hlorida dobejine makro- i mikrodilucionom metodom

Testirani izolati	Makrodiluciona metoda		Mikrodiluciona metoda	
	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{l ml}^{-1}$)
<i>Aspergillus niger</i>	1,25	1,5	0,1	0,25
<i>Aspergillus chraceuso</i>	1,0	4,0	0,1	0,5
<i>Bipolari spicifera</i>	0,25	0,5	0,25	0,25
<i>Penicillium sp. 1</i>	0,25	0,5	0,25	0,25
<i>Trichoderma viride</i>	1,5	2,0	0,25	0,25

Poznato je da su mnoge komponente etarskih ulja teško rastvorljive u agarizovanim podlogama što onemogućava njihovu difuziju i disperziju, pa se stoga preporučuje da se antifungalna aktivnost etarskih ulja na nivou rasta micelije prati u uslovima aromatične atmosfere (Soković, 2001). S druge strane, zbog slabe isparljivosti BAC je dodavan direktno u MEA.

Glavni nedostatak metode mikroatmosfera i makrodilucione metode je dug period inkubacije (21 dan). Tokom perioda inkubacije može doći do isparavanja pojedinih komponenti ulja, a i same gljive u uslovim prisustva antifungalnog agensa mogu razviti mehanizme rezistentnosti (Soković, 2001). Gljive pre svega mogu da sintetišu odgovarajuće enzimske komplekse uz pomoć kojih mogu da metabolišu aktivne komponente ulja u inaktivne forme (Farooq i dr., 2002). Mikrodiluciona metoda u tečnoj podlozi je opšte prihvaćena metoda za ispitivanje antifungalnog potencijala različitih supstanci. Prednost korišćenja ove metode je smanjen period inkubacije na samo 3 dana kao i smanjenje iskorišćenje količine hranljive podloge i testiranih komponenti. Pojedine mikromicete ne sporulišu uopšte ili ne sporulišu obilno u laboratorijskim uslovima na hranljivim podlogama, te nije moguće pripremiti suspenzije spora u željenim koncentracijama. Vrsta *E. purpurascens* gajena na MEA bila je sterilna i zbog toga je izuzeta iz mikrodilucione metode. Različite vrednosti MIC i MFC posledica su različite osetljivosti micelije i konidija gljiva na antifungalne agense. Antifungalna aktivnost etarskih ulja, posledica je hemijskog sastava i procentualne zastupljenosti pojedinačnih komponenti, koje se odlikuju antifun-

galnom aktivnošću. Etarska ulja korišćena u ovom radu izolovana su iz aromatičnih i lekovitih biljaka, i određena svojstva etarskih ulja ovih biljaka su već poznata u literaturi, pre svega njihov antimikrobni i antioksidativni potencijal.

R. officinalis se od davnina koristi u narodnoj medicini zbog antiinflamatorne aktivnosti što doprinosi zaceljivanju rana. Posедуje i antiviralne i antibakterijske karakteristike (Bremnes, 1994; Sosa i dr., 2000). Dominantna komponenta ulja je 1.8-cineol (sinonim: eukaliptol), koja je u našem uzorku ulja bila zastupljena sa 44,28 %, dok su ostale zastupljene komponente bile kamfor (12,54%), α -pinen (11,62%), β -pinen (8,26%), kamfen (4,60%), trans- β -kariofilen (3,96%), borneol (2,96%) i limonen (2,79%). Etarsko ulje vrste *R. officinalis* do sada su analizirali mnogi autori (Tucker i Maciarello, 1986; Bondini i dr., 1991; Bouchra i dr., 2003; Jiang i dr., 2011). Njihovi rezultati pokazuju da su najzastupljenije komponente etarskog ulja vrste *R. officinalis*: α -pinen, kamfen, β -pinen, 1.8-cineol i borneol. Morreti i dr. (1998), kao dominantne komponente etarskog ulja *R. officinalis*, navode α -pinen (38,6%), β -pinen (2,46%), kamfen (4,22%), 1.8-cineol (17,4%), limonen (3,31%), kamfor (15,0-31,0%), verbenon (10,2%) i borneol (6,61%). Soković (2001), kao dominantne komponente etarskog ulja *R. officinalis*, navodi neidentifikovanu komponentu (32,31%), borneol (22,60%), kamfor (18,04%), 1.8-cineol (8,41%), kamfen (7,31%) i α -pinen (4,87%). Zaouali i dr. (2010) su saopštili da su glavne komponente etarskog ulja *R. officinalis* 1.8-cineol (40,0%), kamfor (17,9%), α -pinen (10,3%) i kamfen (6,3%). Sastav etarskog ulja ispitivanog u ovom radu razlikuje se od drugih autora samo po kvantitativnoj zastupljenosti dominantnih komponenti. Etarsko ulje *R. officinalis* korišćeno u ovom radu pokazalo je umereno jak antifungalni potencijal prema svim testiranim mikromicetama osim prema *B. spicifera*, kod koga ovo ulje nije delovalo ni na nivou rasta micelije ni na nivou germinacije konidija. Micelija vrste *T. viride* pokazala je visoku rezistentnost prema ulju *R. officinalis* kada je primenjena metoda mikroatmosfera, dok su konidije bile osetljive prema ovom ulju kada je primenjena mikrodiluciona metoda. Ostali testirani izolati bili su umereno osetljivi, kako na nivou rasta micelije, tako i na nivou germinacije konidija. Antifungalni potencijal etarskog ulja *R. officinalis* testiran je

u mnogim radovima do sada na mnoge mikromicete, uglavnom na komercijalne sojeve, biljne i humane patogene, dok antifungalni potencijal ovog ulja na mikromicete poreklom sa kulturne baštine nije testiran. Različite koncentracije etarskog ulja *R. officinalis* delovale su inhibitorno na *A. niger* (Jiang i dr., 2011), *Botrytis cinerea* Pers. (Bouchra i dr., 2003; Soyulu i dr., 2010; Marandi i dr., 2011) *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout (Braga i dr., 2007; Jiang i dr., 2011), *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. (Braga i dr., 2007) i *P. expansum* (Marandi i dr., 2011). Rezultati dobijeni u ovom radu, zajedno sa drugim literaturnim podacima, potvrđuju visok antifungalni potencijal etarskog ulja *R. officinilis* pema širokom spektru mikromiceta.

L. angustifolia se od davnina koristi u lečenju raznih infektivnih bolesti i oboljenja kože (Bremnes, 1994). Dominantne komponente ulja korišćenog u ovom radu bile su linalol (37,61%) i linalol acetat (34,86%). Lavandulil acetat je bio slabije zastupljen (1,06%). Ove komponente su karakteristične za sve vrste roda *Lavandula* (Venskutonis i dr., 1997). Dosadašnja istraživanja hemijskog sastava etarskog ulja *L. angustifolia* pokazuju veliku varijabilnost u kvantitativnoj zastupljenosti dominantnih komponenti. Zastupljenost linalola može varirati u opsegu od 9,25 do 68,7%, linalol acetata od 1,22 do 59,49%, a lavandulil acetata od 0,28 do 21,62% (Lawrence, 1993; Venskutonis i dr., 1997; Lis-Balchin i dr., 1998). Prema Soković (2001) antifungalna aktivnost etarskog ulja vrsta roda *Lavandula* je vrlo varijabilna i može biti jaka, umerena ili slaba. Intenzitet antifungalne aktivnosti ovog ulja zavisi od procentualne zastupljenosti pojedinačnih komponenti ulja, i njihovog sinergističkog efekta, pre svega linalola i linalol acetata (Lis-Balchin i dr., 1998). Umereno jak antifungalni potencijal ovog ulja dobijen u ovom radu je u saglasnosti sa procentualnom zastupljenošću komponenti linalola i linalol acetata. Na nivou rasta micelije etarsko ulje je u nižim koncentracijama delovalo na *A. niger* i *B. spicifera*, dok se pokazalo da na nivou germinacije konidija ovih vrsta ulje deluje u višim koncentracijama. Pigmenti prisutni u konidijama *A. niger* i porokonidijama *B. spicifera* verovatno imaju zaštitnu ulogu i štite konidije od negativnog dejstva ulja. Za ispitivanju antifungalne aktivnosti etarskog ulja *L. angustifolia* na mikromicete izolovane sa kulturne baštine postoje literaturni podaci. Ra-

kotonirainy i Lavédrine (2005) su ispitivali uticaj etarskog ulja *L. angustifolia* kao i uticaj glavnih komponenti ovog ulja (linalol i linalol acetat) na vrste gljiva koje su izolovane sa iz biblioteka i arhiva: *A. niger*, *Eurotium repens* de Bary, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *P. frequentans*, *T. viride*, *C. globosum*, *P. variotii* i *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. Ovi autori su pokazali da etarsko ulje *L. angustifolia* deluje inhibitorno na sve testirane mikromicete i sugerisali su da linalol može preventivno da se koristi u konzervaciji jer sprečava rast mikromiceta na spapiru starih knjiga.

O. vulgare se od davnina koristi kao začinska biljka i lekovita biljka. Snažan i karakterističan miris i ukus mnogih jela posledica je korišćenja sasušenih listova ove biljke. Poznato je da je otac medicine Hipokrat koristio origano kao antiseptik i kao narodni lek za stomadne i respiratorne tegobe (White, 1998). Etarsko ulje ove vrste odlikuje se snažnom antioksidativnom aktivnošću zbog visokog sadržaja fenolnih i flavoniodnih jedinjenja, a odlikuje se i visokom antimikrobnom aktivnošću. Dominantna komponenta ulja testiranog u ovom radu je karvakrol (54,06%), dok je sledeća komponenta po zastupljenosti bila linalol (17,56%). Vrlo zastupljene komponente su bile i p-cimen (4,44%), timol (3,86%), γ -terpinen (2,50%). Azizi i dr. (2009) su, proučavajući hemijski sastav etarskog ulja tri varijeteta vrste *O. vulgare*, ustanovili da su najdominantnije komponente ovog etarskog ulja karvakrol (70-77,4%), γ -terpinen (8,1-9,5%) i p-cimen (4,5-5,3%). Prieto i dr. (2007) su saopštili da su glavne komponente etarskog ulja *O. vulgare* karvakrol (54,7%) i timol (22,1%). Etarsko ulje grčkog origana *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* karakterišu karvakrol (65,25%) i timol (14,84%) i ovo ulje je pokazalo izuzetno jaku antifungalnu aktivnost u mikrodilucionoj metodi (Džamic, 2010)

Sastav etarskog ulja ispitivanog u ovom radu razlikuje se od literaturnih podataka samo po kvantitativnoj zastupljenosti dominantnih komponenti. Visok antifungalni potencijal etarskog ulja *O. vulgare* prema svim testiranim izolatima sa objekata i predmeta kulturne baštine demonstriran je niskim MIC i MFC vrednostima, dobijenih primenom metode mikroatmosfera i mikrodilucione metode. Antifungalni efekat etarskog ulja *O. vulgare* testiran je do sada potvrđen mnogo puta na komercijalne sojeve mikro-

miceta, biljne i humane patogene, uzročnike kvarenja hrane. Iako i ostale komponente etarskog ulja *O. vulgare* mogu imati antifungalni potencijal, pre svega linalol, ipak antifungalna aktivnost ovog ulja najviše zavisi od količine karvakrola. Khosravi i dr. (2011) su izolovali etarsko ulje iz populacije samoniklih biljaka *O. vulgare* iz provincije Gnom u Iranu. GC/MC analizama kod ovog ulja nije konstatovano prisustvo karvakrola, dok je kao dominantna komponenta ovog ulja bile linalol (42%) i timol (25,1%). Ovo ulje je pokazalo slab antifungalni potencijal protiv *Candida glabrata* (H.W. Anderson) S.A Mey & Yarrow. Zaključak je da je dobijena jaka antifungalna aktivnost etarskog ulja *O. vulgare* na izolate sa objekturne i predmeta kulturne baštine u korelaciji sa visokim sadržajem karvakrola.

H. italicum se od davnina koristi kao začinska i lekovita biljka u mnogim kulturama posebno u južnim delovima Afrike (Germishuizen i Meyer, 2003). Hemijski profil ispitivanog uzorka vrste *H. italicum* u ovom radu pokazao je dominaciju komponenti γ -kurkumena, α -pinena i neril acetata. Kao glavne komponente etarskog ulja dva različita genotipa *H. italicum*, Perrini i dr. (2009) navode neril acetat (55,7% i 41,5%), nerol (4,4% i 13,1%) i neril propanoat (12,7% i 5,6%). Sastav etarskog ulja ispitivanog u ovom radu razlikuje se od literaturnih podataka samo po kvantitativnoj zastupljenosti dominantnih komponenti. Antifungalni potencijal etarskog ulja *H. italicum* prema izolatima sa kulturne baštine bio je slab. Literaturni podaci sugerišu da antifungalni potencijal ovog ulja može biti vrlo varijabilan, i da zavisi od zastupljenosti pojedinačnih komponenti. Tomás-Barberán i dr. (1990) su izolovali fluoroglicinol i acetofon iz vrste *H. italicum*. Ova jedinjenja su pokazala snažnu antifungalnu aktivnost pri testiranju *Penicillium* sp., *C. herbarum* i *Phytophthora capsicii* Leonian a nisu delovala uopšte na testirani *Aspergillus* sp.

BAC predstavlja smešu alkildimetilamonium hlorida sa ugljovodoničnim lancima različite dužine. Broj ugljenikovih atoma u ugljovodiničnim lancima je uvek paran. BAC spada u kvarterne amonijumove soli i odlikuje se antimikrobnom aktivnošću, jer dezintegriše ćelijsku membranu, što izaziva curenje ćelijskog sadržaja, kao i deaktivaciju enzima (Day i dr., 2009). Biocid BAC u ovom radu pokazao je jak antifungalni potencijal u od-

nosu na sve testirane izolate, što je demonstrirano niskim MIC i MFC vrednostima, kao i morfo-fiziološkim promenama tretiranih izolata koje su posledica interakcije sa BAC. Njegova upotreba kao biocida u konzervaciji i prevenciji predmeta i objekata kulturne baštine je preporučena od strane evropske direkcije za biocide (Cooke, 2002). BAC se pokazao uspešnim pri tretmanu infekcije izazvane sa kompleksom vrste *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., koja je kolonizovala zidne slike iz perioda gornjeg Paleolita u pećini Lascaux (Francuska) (Dupont i dr., 2007; Bastian i dr., 2009). Ipak, treba napomenuti da prekomerna upotreba ovog biocida može izazvati rezistentnost kod mikroorganizama. Poznato je da su Gram-negativne bakterije, kao i vrste roda *Pseudomonas*, rezistentne na BAC, i da nakon primene ovog biocida na objektima kulturne baštine može doći do kolonizacije tretiranih mesta ovim bakterijama (Langsrud i dr., 2003). Da bi se to sprečilo preporučuje se rotacija biocida.

Ispitivanje antifungalne aktivnosti metodom neutralizacije pokazalo je da biocid BAC ima snažno antifungalno dejstvo i da kao vodeni rastvor u niskim koncentracijama za najkraće kontaktno vreme inhibira germinaciju konidija testiranih gljiva. Slične rezultate su dobili i Tortorano i dr. (2005), koji su pokazali da vodeni rastvori BAC niskih koncentracija u kratkom vremenskom intervalu inhibiraju klijavost konidija kliničkih izolata vrste *A. fumigatus*.

5.6 Opšta diskusija

Biološke analize u ovoj doktorskoj disertaciji (analiza kvalitativnog sastava biofilma na kamenim spomenicima kulture, mikološka analiza vazduha u zatvorenim prostorijama institucija kulture, izolacija i identifikacija mikromiceta sa umetničkih predmeta) sprovedene su paralelno sa planiranim konzervatorskim i restauratorskim radovima na ispitivanim predmetima i objektima kulturne baštine. Ujedno istraživanja prezentovana u ovom radu predstavljaju pionirski pokušaj implementacije bioloških analiza u sistem

konzervacije u Srbiji. Rezultati mikrobioloških analiza izvršenih na kamenim stećcima na arheološkom lokalitetu Mramorje čine sastavni deo dokumentacije za nominaciju ovog kulturno – istorijskog spomenika za stavljanje na UNESCO listu kulturne baštine.

Ispitivanje antifungalne aktivnosti biocida BAC, koji se već koristi kao biocid i koji je odobren od strane Evropske direkcije za biocide (Cook, 2002), potvrdila su snažan fungistatski i fungicidni potencijal ovog hemijskog agensa na nivou rasta somatskih hifa i na nivou klijanja mikromiceta koje se često razvijaju na objektima i predmetima srpske kulturne baštine. Ipak, tokom degradacije BAC nanetog na tretirani objekat dolazi do formiranja jedinjenja benzil-di-metil-amina, benzil-metil-amina, benzil amina, benzaldehida i benzojeve kiseline, koja određeni heterotrofni mikroorganizmi mogu da koriste kao izvore ugljenika i azota (Patrauchan i Oriol, 2003). Takođe, česta upotreba biocida izaziva pojavu rezistentnosti mikroorganizama. Preporuka je testirati osetljivost izolata u *in vitro* uslovima pre njegove *in situ* implementacije, ali i testirati i uvoditi nove agense u sistem konzervacije kulturne baštine (Patrauchan i Oriol, 2003). Priroda predstavlja nepresušan izvor biološki aktivnih supstanci koje se mogu primenjivati u svim vidovima suzbijanja mikroorganizama. Sekundarni metaboliti biljaka, pre svega lako isparljiva etarska ulja se poslednju deceniju intenzivno ispituju sa stanovišta njihove antimikrobne aktivnosti. Testiranje antifungalne aktivnosti etarskih ulja i sintetičkih biocida u eksperimentima sa izolatima poreklom sa objekata i predmeta srpske kulturne baštine prvi put je objavljeno ovom radu. Etarsko ulje *O. vulgare* pokazalo je jak fungistatski i fungicidni efekat na nivou rasta somatskih hifa i na nivou germinacije konidija *in vitro*. Etarska ulja *R. officinalis* i *L. angustifolia* pokazala su umereno jak antifungalni potencijal protiv testiranih mikromiceta, dok je etarsko ulje *H. italicum* pokazalo slab antifungalni potencijal. Dobijeni rezultati se mogu tumačiti i sa stanovišta osetljivosti mikromiceta na odgovarajući testirani antifungalni agens, što ide u prilog tvrdnji da je neophodno ispitati osetljivost izolata na određeni agens u *in vitro* uslovima pre njegove implementacije *in situ*. Takođe, imajući u vidu da materijali od kojih su izgrađena umetnička dela predstavljaju specifične supstrate, mora se voditi računa o pravilnoj implementaciji antifungalnih agenasa na način koji dodatno ne

oštećuje supstrat. Uvođenje agenasa biološkog porekla u sistem konzervacije predmeta i objekata kulturne baštine do sada nije često vršeno osim pionirskih pokušaja. Polisaharid sfagnan i fenolna jedinjenja izolovana iz jetrenjače *Sphagnum palustre* Kopersky & al. su uspešno primenjeni u cilju suzbijanja rasta gljiva sa drvenih predmeta iz Etnografskog muzeja i arheoloških iskopina Arktika (Zaitseva, 2010). Axinte i dr. (2011) su utvrdili da cinamaldehyd, dominantna komponenta etarskog ulja *Cinnamomum* sp. ima snažan antifungalni efekat na kvasac *Torula* sp. i makromicetu *Coniophora puteana* (Scumach) P. Karst., uzročnike mrke truleži, na umetničkim predmetima od drveta. Hidroalkoholni ekstrakti biljaka *Arctium lappa* L. i *Centaurea cyanus* L. imaju antimikrobno dejstvo na mikroorganizame izolovane iz vazduha u arhivama kao i sa papirnih dokumenata skladištenih u arhivama (Saravia i dr., 2008). Zanimljiv pristup u ovoj problematici imali su Mironescu i dr. (2010) koji su testirali 5 novih biocida, smeša odabranih komercijalnih biocida (glutaraldehyd, heksadecil triamonijum bromid, BAC, didecil dimetil amonijum hlorid, soli 2-etil heksanoične kiseline, propikonazol, i ϵ -ftalimidoperoksiheksanoična kiselina) i etarskog ulja *Thymus vulgaris* L. u različitim koncentracijama. Sve testirane smeše delovale su antifungalno prema vrstama rodova *Alternaria*, *Aureobasidium* i *Penicillium* izolovanih sa kamenog supstrata gradskih bedema grada Sibiu (Rumunija).

Prema Cataldo i dr. (2005) biološke analize predstavljaju sastavni deo integrisanih metoda primenljivih u proučavanju deterioracije predmeta i objekata kulturne baštine, kao i njihove konzervacije. Iako su ova istraživanja novijeg datuma, dobijeni rezultati su pomogli da se shvate mehanizmi biodeterioracije spomenika kulture, kao i u izboru odgovarajućih fizičkih metoda i hemijskih agenasa primenljivih u konzervaciji. Mikroorganizmi, posebno mikromicete kao uzročnici biodeterioracije, su odavno prepoznati u svetu kao dominantan problem u očuvanju predmeta i objekata kulturne baštine. Poznavanje bioloških agenasa, uzročnika biodeterioracije, kao i praćenje i opisivanje promena koje su direktna posledica biološke aktivnosti mikroorganizama, vrše se u cilju očuvanja predmeta i objekata materijalne baštine.

6 Zaključci

1. Primenom *in situ* observacije kulturno istorijskih spomenika, izgrađenih od različitih tipova kamena opisani su simptomi biodeterioracije u vidu različito obojenih biopatina, izmenjene teksture kamene površine, fenomena „biopiting“, kao i prisustva lišajeva, mahovina i viših biljaka velike pokrovnosti.
2. Promena obojenosti kamenih površina i formiranje biopatine posledica su produkcija pigmenata od strane algi i cijanobakterija u okviru fotoautrofne komponente SAB.
 - Uzročnik crvene biopatine na fasadi crkve Svete Bogorodice Manastira Gradac (MG) je cijanobakterija *Gloeocalsa sanguinea*, a uzročnik narandžaste biopatine na istom objektu je zelena alga *Trentepohlia aurea*.
 - Uzročnik katransate biopatine želatinozne konzistencije na objektu Ajfelova prevodnica (AP) je cijanobakterija *Nostoc* sp.
 - Uzročnik narandžaste biopatine na vezivnom malteru Spomenika Nežnanom junaku na Avali (NJ) je zelena alga *Haematococcus pluvialis*, a uzročnici zelene biopatine na istom objektu su cijanobakterija *Oscillatoria* sp. i zelena alga *Cylindrocapsa brevissonii*.
3. U okviru fototrofne komponente SAB na površini kamenog supstrata 5 istraživanih spomenika kulturne baštine u Srbiji identifikovano je 17 taksona cijanobakterija.

- Cijanobakterije su bile zastupljene sa 9 taksona reda Chroococcales, 5 taksona reda Nostocales i 3 taksona reda Oscillatoriales.
 - Raspored identifikovanih cijanobakterija bio je neravnomeran na istraživanim lokalitetima. Najviše taksona (11) je zabeleženo na srednjevekovnim kamenim stećcima (SS), dok je na Spomeniku Neznamom junaku na Avali (NJ) identifikovan samo jedan pripadnik cijanobakterija.
 - Najčešće identifikovana vrsta na kamenom supstratu objekata materijalne kulturne baštine je cijanobakterija *Gloeocapsa violacea*.
 - Prosečan broj identifikovanih cijanobakterija na ispitivanim lokalitetima ($4,4 \pm 1,7$) sugeriše nizak diverzitet.
4. U okviru fototrofne komponente SAB na površini kamenog supstrata 5 istraživanih spomenika kulturne baštine u Srbiji identifikovano je 13 taksona algi.
- Alge su bile zastupljene sa 7 taksona razdela Chlorophyta i 6 taksona razdela Bacilariophyta.
 - Raspored identifikovanih algi je neravnomeran na ispitivanim lokalitetima. Najčešće identifikovan predstavnik je vrsta *Desmosoccus olivaceus*, zabeležena na četiri istraživana lokaliteta, a najveći diverzitet algi je dokumentovan na stubovima Brankovog mosta (lokalitet MG).
 - Prosečan broj identifikovanih algi na ispitivanim lokalitetima ($3,4 \pm 1,3$) sugeriše nizak diverzitet.
5. Prosečan broj svih identifikovanih taksona fototrofne komponente SAB na svim istraživanim lokalitetima ($7,6 \pm 1,9$) sugeriše nizak diverzitet fotoautotrofa.
6. U okviru komponente SAB koju su sačinjavale mikromicete na površini kulturno istorijskih spomenika u Srbiji identifikovano je 28 taksona.

– Raspored identifikovanih mikromiceta je neravnomeran na ispitivanim lokalitetima. *Cladosporium cladosporioides* i vrste rodova *Alternaria* i *Fusarium* su prisutne na svim ispitivanim lokalitetima. *Epicoccum purpurascens* je identifikovana sa visokom učestalošću na četiri istraživana lokaliteta. Najveći broj vrsta mikromiceta (13) zabeležen je na Ajfelovoj prevodnici (AP).

– Prosečan broj identifikovanih mikromiceta na svim istraživanim objektima ($10,6 \pm 0,93$) sugeriše malu raznovrsnost, tj. nizak diverzitet mikromiceta.

7. Izolacija i identifikacija mikromiceta sa različitih umetničkih predmeta, sačinjenih od različitih tipova materijala, pokazala je različit afinitet mikromiceta da kolonizuju ove supstrate.

– Najveći diverzitet mikromiceta je zabeležen na umetničkim predmetima izgrađenim od drvnog materijala, sa koga su izolovane vrste rodova: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma* i *Ulocladium*.

– Sa slikarskih boja izolovane su vrste rodova: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Paecylomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* i *Ulocladium*, dok su sa poledine slikarskih platna izolovane vrste rodova: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Ulocladium* i *Wardomyces*.

– Najmanji diverzitet mikromiceta bio je na fotografaskom papiru na tkaninama. Na fotografaskom papiru utvrđene su vrste rodova: *Fusarium*, *Humicola*, *Paecylomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma* i *Ulocladium*, a na tkaninama: *Aspergillus* i *Penicillium*.

8. U vazduhu zatvorenih prostorija različite namene u institucijama kulture dominiraju vijabilne propagule vrsta *Penicillium aurantiogriseum* (41,18 %) i *C. cladosporioides* (29,41%).

– Vrste rodova *Cladosporium* i *Penicillium* su najčešće izolovane iz vazduha zatvorenih prostorija (58,83 %).

– Visoka učestalost izolacije zabeležena je i za vrste rodova *Trichoderma* (23,53 %) i *Aspergillus* (17,64%).

– U vazduhu zatvorenih prostorija ispitivanih institucija kulture dominiraju vijabilne propagule filamentoznih gljiva, dok su kvasci izolovani sa manjom učestalošću.

– Kvantitativna analiza vazduha i poređenje sa standardima Svetske zdravstvene organizacije pokazuje umerenu kontaminaciju vazduha zatvorenih prostorija ispitivanih institucija kulture.

9. Zide slike ispitivanih srpskih sakralnih objekata kolonizuju vrste rodova: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Emericella*, *Nigrospora* i *Penicillium*. Najčešće izolovane vrste pripadaju rodovima *Aspergillus* i *Penicillium*.

10. U okviru istraživanja antifungalne aktivnosti testiranih etarskih ulja i benzalkonijum hlorida (BAC), svi testirani agensi pokazali su antifungalnu aktivnost različitog stepena.
 - Antifungalni potencijal etarskih ulja, u *in vitro* uslovima, može se predstaviti sledećim nizom, idući od najaktivnijih ka manje aktivnim uljima: *Origanum vulgare* > *Lavandula angustifolia* > *Rosmarinus officinalis* > *Helichrysum italicum*.
 - BAC pokazao je snažan antifungalni potencijal.

11. Hemijski sastav etarskog ulja *R. officinalis* pokazuje dominaciju komponente 1.8-cineol (44,28 %). Dominantne komponente etarskog ulja *L. angustifolia* su linalol (37,61%) i linalol acetat (34,86 %), dok je karvakrol (64,06%) dominirao u etarskom ulju *O. vulgare*. Dominantna komponenta etarskog ulja *H. italicum* bila je γ -kurkumen (22,45 %).

12. Različite koncentracije ispitivanih etarskih ulja i BAC delovale su različito na nivou rasta somatskih hifa i na nivou germinacije spora. Ovo je potvrđeno različitim vrednostima MIC i MFC dobijenim primenom metoda: metoda mikroatmosfera i makrodilucionom metodom.
13. Ispitivana etarska ulja i biocid BAC izazvala su morfo-fiziološke promene na somatskim i reproduktivnim strukturama testiranih gljiva.
 - Pod uticajem biocida BAC i etarskog ulja *R. officinalis* favorizovano je formiranje sklerocija u kulturu *Aspergillus ochraceus*.
 - U kulturi *Bipolaris spicifera* zabeležena je pojava demelanizacije pod uticajem biocida BAC i etarskog ulja *L. angustifolia*.
14. Vodeni rastvori BAC deluju antifungalno u niskim koncentracijama i u kratkom kontaktnom vremenu inhibiraju germinaciju konidija testiranih mikromiceta.

7 Literatura

- Abrusci, C., Martín-González, A., Del Amo, A., Catalina, F., Collado, J. & Platas, G. (2005): Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *Int Biodeter Biodegr.* 56: 58-68.
- 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*. *Mol Immunol.* 32: 213-227.
- Adamo, M., Magaudda, G., Nisini, P.T. & Tronelli, G. (2003): Susceptibility of cellulose to attack by cellulolytic microfungi after gamma irradiation and ageing. *Restaurator.* 24: 145-151.
- Adams, R.P. (2007): Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edition. Allured Pub Corp.
- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. (1973): The Fungi. The taxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Academic Press New York and London.
- Aira, M.J., Jato, V., Stchigel, A.M., Rodríguez-Rajo, F.J. & Piontelli, E. (2007): Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain). *Int Biodeter Biodegr.* 60: 231-237.

- Anagnostidis, K., Economou-Amilli, A. & Roussomoustakaki, M. (1983): Epilithic and chasmolithic microflora (Cyanophyta, Bacillariophyta) from marbles of the Parthenon (Acropolis-Athens, Greece). *Nova Hedwigia*. 38: 227-282.
- Anagnostidis, K., Gehrmann, C.K., Gross, M., Krumbein, W.E, Lisi, S., Pantazidou, A., Urzı, C. & Zagari, M. (1992): Biodeterioration of marbles of the Parthenon and Propylaea, Acropolis, Athens – associated organisms, decay and treatment suggestions. In: *La Conservation des Monuments dans le Bassin Méditerranéen*. (eds). Decrouez, D., Chamay, J. & Zezza, F. Musée d’art et d’histoire. Genève.
- Arai, H. (2000): Foxing caused by fungi: twenty five years of study. *Int Biodeter Biodegr*. 46: 181-188.
- Arenz, B.E., Held, B.W., Jurgensa, J.A., Farrell, R.L. & Blanchette, R.A. (2006): Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biol Biochem* 38: 3057–3064.
- Arino, X. & Saiz-Jimenez, C. (1996): Factors affecting the colonization and distribution of cyanobacteria, algae and lichens in ancient mortars. In: *Proceedings of the Eighth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Vol. 2. (ed). Riededer, J. Rathgen-Forschungslabor. Berlin, Germany, pp. 725-731.
- Arx von, J.A. (1974): *The genera of fungi. Sporulating in pure culture*. Vaduz: J. Cramer.
- Arya, A., Shah, A.R. & Satish Sadasivan, S. (2001): Indoor aeromycoflora of Baroda museum and deterioration of Egyptian mummy. *Curr Sci India*. 81: 793-799.
- Axinte, L., Cuzman, A.O., Feci, E., Palanti, S. & Tiano, P. (2011): Cinnamaldehyde, a potential active agent for the conservation of wood and stone religious artefacts. *Eur J Sci Theol*. 7: 25-34.
- Azizi, A., Yan, F. & Honermeier, B. (2009): Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Ind Crop Prod*. 29: 554-561.

- Bastian, F., Alabouvette, C., Jurado, V. & Saiz-Jimenez, C. (2009): Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave. *Naturwissenschaften*. 96 863-868.
- Berner, M., Wanner, G. & Lubitz, W. (1997): A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the castle Herberstein and in the parish church of St Georgen in Styria, Austria. *Int Biodeter Biodegr*. 40: 53-61.
- Betherlin, J. (1983): Microbial weathering process. In: *Microbial Geochemistry*. (ed). Krumbein, W.E. Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp, 223-262.
- Blaschke, R. (1987): Natural building stone damaged by slime and acid producing microbes. *Proceedings of the Nineth International Conference on Cement Microscopy*, Reno. Nevada. USA. pp. 70 -81.
- Blazquez, A.B., Lorenzo, J., Flores, M. & Gómez-Alarcón G. (2000): Evaluation of the effect of some biocides against organisms isolated from historic monuments. *Aerobiologia*. 16: 423-428.
- Bloomfeld, B.J. & Alexander, M. (1967): Melanins and resistance of fungi to lysis. *J Bacteriol*. 93: 1276-1280.
- Bogomolova, E. & Kirtsideli, I. (2009): Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg Underground railway system. *Int Biodeter Biodegr*. 63: 156-160.
- Bondini, A.J., Mizrachi, I. & Juarez, M.A. (1991): The Essential oil of *Rosmarinus officinalis* growing in Argentina. *J. Essent. Oil Res.*, 3: 63-65.
- Booth, C. (1971a): The fungal culture media. In: *Methods in Microbiology*. (ed). Booth, C. 4: 49-94.
- Booth, C. (1971b): The genus *Fussarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew. England.
- Borrego, S., Guiamet, P., Gómez de Saravia, S., Batistini, P., Garcia, M., Lavin, P. & Perdomo, I. (2010): The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. *Int Biodeter Biodegr*. 64: 139-145.

- Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M. & Hmamouchi, M. (2003): Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. J Ethnopharmacol. 89: 165-169.
- Brachert, T. (1985): Patina – Von Nutzen und Nachteil der Restaurierung. Callwey. München.
- Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., de O. Matos, M., Moreira, F.O., Scio, E. & Coimbra, E.S. (2007): Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. J Ethnopharmacol. 111: 396-402.
- Bremnes, L. (1994): Herbs. Eyewitness-Handbooks. DK Publishing. New York.
- Burford, P.E., Kierans, M. & Gadd, M.G. (2003): Geomycology: Fungi in mineral substrata. Mycologist. 17: 98-107.
- Buđevac, D. & Stipanić, B. (1989): Čelični mostovi. IRO. „Građevinska knjiga”. Beograd.
- Butler, J.M. & Day A.W. (1998): Fungal melanins: a review. Can J Microbiol. 44: 1115–1136.
- Cain, E. & Miller, B.A. (1982): Photographic, spectral and chromatographic searches into the nature of foxing. Preprints American Institute for Conservation, 10th Annual Meeting. Milwaukee, pp. 54-52.
- Callot, G., Maurette, M., Pottier, L. & Dubois, A. (1987): Biogenic etching of microstructures in amorphous and crystalline silicates. Nature 328: 147-149.
- Camuffo, D., Van Grieken, R., Busse, H.-J., Sturaro, G., Valentino, A., Bernardi, A., *et al.*, (2001): Environmental monitoring in four European museums. Atmos Environ.35: 127–140.
- Caneva, G., de Marco, P. & Pontrandolfi, M.A. (1993): Plant communities on the walls of Venosa Castle (Basilicata, Italy) as biodetergen and bioindicators. In: Conservation of Stone and Other Materials, vol 1. (ed). Thiel, M.-J. E & FN Spon. London, pp. 263-270.

- Carmona, N., Laiz, L., Gonzalez, J.M., Garcia-Heras, M., Villegas, M.A. & Saiz-Jimenez, C. (2006): Biodeterioration of historic stained glasses from the Cartuja de Miraflores (Spain). *Int Biodeter Biodegr.* 58: 155–161.
- Cataldo, R., de Donno, A, de Nunzio, G., Leucci, G., Nuzzo, L. & Siviero, S. (2005): Integrated methods for analysis of deterioration of cultural heritage: the Crypt of “Cattedrale di Otranto”. *J Cult Herit.* 6: 29–38.
- Cataldo, R., de Donno, A, de Nunzio, G., Leucci, G., Nuzzo, L. & Siviero, S. (2005): Integrated methods for analysis of deterioration of cultural heritage: the Crypt of “Cattedrale di Otranto”. *J Cult Herit.* 6:29–38.
- Cataldo, R., Siviero, S., Leucci, G., Pagiotti, R. & Angelini, P. (2008): Integrated surveys for the analysis of the deterioration in the Crypt of the Abbey of Montecorona – Italy. 9th International Conference on NDT of Art. Jerusalem. Israel. 25-30 May.
- Chertov, O., Gorbushina, A. & Deventer, B., (2004): A model for microcolonial fungi growth on rock surfaces. *Ecol Model.* 177: 415-426.
- Ciferri O. (1999): Microbial Degradation of Paintings. *Appl Environ Microbiol.* 65: 879-885.
- Claridge, A.W., Cork, S.J., & Trappe, J.M. (2000): Diversity and habitat relationship of hypogeous fungi, I. study design, sampling techniques and general survey results. *Biodivers. Conserv.* 9: 151 – 173.
- Cooke, M. (2002): European review of biocides: *PharmaChem.* B5srl: 48-50.
- Corte, A.M., Ferroni, A. & Salvo, V.S. (2003): Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and environment. *Int Biodeter Biodegr.* 51: 167-173.
- Crippa, A. (1983): Funghi isolati da affreschi murali in antiche chiese di Pavia, *Atti Societa Italiana Scienze Naturali Museo Civica Storia Naturale Milano.* 124: 3 – 10.
- Darlington, A. (1981) *Ecology of walls.* Heinemann. London.

- Day, S., Lalitha P., Haug, S., Forthergill, A.W., Cevallos, V., Vijayakumar, R., Prajna, N.V., Archarya, N.R., McLeod, S.D. & Lietman, T.M.. (2009): Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. Br J Ophatmol. 93: 116-119.
- Diakumaku, E., Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Panina, L. & Soukharjevski, S. (1995): Black fungi in marble and limestone – an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. Sci Tot Environ. 167: 295-304.
- Dix, N. J. & Webster J. (1995): Fungal Ecology. Chapman and Hall. New York.
- Dupont, J., Jacquet, C., Denetière, B., Lacoste, S., Bousta, F., Oriol, G., Cruaud, C., Couloux, A. & Roquebert, M.F. (2007): Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by the members of *Fusarium solani* complex. Mycologia. 99: 526-533.
- Đorđević, M. (2011): Mramorje-Projekat konzervacije srednjovekovnih kamenih obeležja-strećaka na arheološkom nalazištu Mramorje u Perućcu, opština Bajina Bašta. Republički zavod za zaštitu spomenika kulture. Beograd.
- Đorđević, M. (2012): Srednjovekovna kamena nadgrobna obeležja-stećci na arheološkom nalazištu Mramorje u Rastištu na potesima Gajevi i Uroševine, opština Bajina Bašta. Republički zavod za zaštitu spomenika kulture. Beograd.
- Džamić, Ana. (2010): Sastav, antifungalna i antioksidativna aktivnost etarskih ulja I ekstrakata odabranih vrsta iz familije Lamiacea. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet.
- Eagle Industrial Hygiene Associates (2004): Microbial Sampling and Analysis: Molds and Bacteria. Publikacija dostupna na: <http://www.eagleih.com/micro.html>.
- Eckhardt, F.E.W. (1985): Mechanism of the microbial degradation of minerals on sandstone monuments, medieval frescoes and plasters. In: Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Vol 2. Presses Polytechniques Romandes. Lausanne. pp. 85-90.

- Eckhardt, F.E.W. (1988): Influence of culture media employed in studying microbial weathering of building stones and monuments by heterotrophic bacteria and fungi. In: VI th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Nicholas Copernicus University. Torun, pp. 71-81.
- Ehrlich, H.L. (1981): Geomicrobiology. Marcel dekker Inc. New York.
- Ellis, M.B. (1971): Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. England.
- Ellis, M.B. (1976): More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. England.
- Ellis, M.B. & Ellis, P.J. (1997): Microfungi on land plants. an identification handbook. The Richmond Publishing Co. Ltd.
- Elliot, A.M. (1934): Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. Arch Protistenk. 82: 250-272.
- Erickson, K.E.L., Blanchette, R.A. & Ander, P. (1990): Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer – Verlag. Berlin, p. 407.
- Emoto, Y. & Emoto, Y. (1974): Microbiological investigation of ancient tombs with paintings. Sci Conserv. 12: 95-102.
- Farooq, A., Choudhary, M.I., Rahman, A., & Tahara, S. (2002): Detoxification of terpinolene by plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Z Naturforsch. 57: 863-866.
- Fazio, A.T., Papinutti, L., Gómez, B.A., Parera, S.D., Rodríguez Romero, Siracusa-no, A.G. & Maier, M.S. (2010): Fungal deterioration of a Jesuit South American polychrome wood sculpture. Int Biodeter Biodegr. 64: 694–701.
- Felice de, B., Pasquale, V., Tancredi, N., Scherillo, S. & Guida, M. (2010): Genetic fingerprint of microorganisms associated with the deterioration of an historical tuff monument in Italy. J Genet. 89: 253-257.
- Flanning B., Samson, R.A. & Miller, D.J. (2001): Microorganisms in home and indoor work environments. Diversity, Health Impacts, Investigation and control. Taylor & Francis

- Florian, M-L, E. (2002): Fungal facts: Solving fungal problems in heritage collections. Archetype Publications Ltd. London.
- Florian, M-L.E. & Manning, L. (2000): SEM analysis of irregular fungal fox spots in an 1854 book: population dynamics and species identification. *Int Biodeter Biodegr.* 46: 205-220.
- Formina, M.A., Alexander, I.J., Hillier, S. & Gadd, G.M. (2004): Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant symbiotic fungi. *Geomicrobiol J.* 21: 351-366.
- Formina, M., Ritz, K. & Gadd, G.M. (2000): Negative fungal chemotropism to toxic metals. *FEMS Microbiol Lett.* 193: 207-211.
- Gadd, G.M. (1990): Fungi and yeast for metal accumulation. In: *Microbial Mineral Recovery.* (eds). Ehrlich, H. L. & Brierley, C.J. McGraw-Hill. New York. pp. 249-275.
- Gadd, G.M. (2007): Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclide by fungi, biowatering and bioremediation. *Mycol Res.* 111: 3-49.
- Garcia-Pitchel, F., Sherrz, N.D. & Castenholz, R.W. (1992): Evidence for ultra-violet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloopsis* sp. *Photochem Photobiol.* 56: 17-23.
- Garg, K.L., Jain, K.K. & Mishra, A.K., (1995): Role of fungi in the deterioration of Wall Paintings. *Sci Total Environ.* 167: 255-271.
- Gärtner, G. & Stoyneva, M.P. (2003): First Study of Aerophytic Cryptogams on Monuments in Bulgaria. *Ber Nat-med.* (90): 73-82.
- Gaylarde, C.C. & Gaylarde, P.M. (2005): A Comparative study of the major microbial biomass of biofilms exterior on buildings in Europe and Latin America. *Int Biodeter Biodegr.* 55: 131-139.
- Gaylarde, P.M. & Gaylarde, C.C. (1998): A rapid method for the detection of algae and cyanobacteria on the external surfaces of buildings. In: *Third Latin American*

- Biodegradation and Biodeterioration Symposium. (eds). Gaylarde, C.C., Barbosa T.C.P. & Gabilan, N.H. Paper No. 37. The British Phycological Society, UK.
- Gaylarde, P.M & Gaylarde, C.C, (2004): Deterioration of siliceous stone monuments in Latin America: microorganisms and mechanisms. *Corros Rev.* 22: 395-415.
- Germishuizen, G. & Meyer, N.L. (2003): *Plants of Southern Africa*. Strelitzia 14. Pretoria. National Botanical Institute.
- Godish, T., (2001): *Indoor Environmental Quality*. CRC Press. New York. pp. 196-197.
- Goodwin, T.W. & Jamikorn, M. (1954): Studies in carotenogenesis. H. Carotenoid Synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochem J* 57: 376-381.
- Gorbushina A.A., Vlasov, D.Yu., Panina, L.K. & Krumbain, V.E. (1996): Fungi deteriorating marble in Cherson. *Mikol Fitopatol.*30: 23-28.
- Gorbushina, A.A. & Peterson, K., (2000): Distribution of Microorganisms on ancient Wall paintings as related to associated faunal elements. *Int Biodeter Biodegr* 46: 277-284.
- Gorbushina, A.A., Lyalikova, N.N., Vlasov, D.Yu. & Khizhnyak, T.V. (2002): Microbial communities on the monuments of Moscow and St. Petersburg: biodiversity and trophic relations. *Microbiology.* 71: 409-417.
- Gorbushina, A.A., Whitehead, K., Dornieden T., Niese, A., Schulte, A. & Hedges, J.I. (2003a): Black fungi colonies as unites of survival: hyphal mycosporines synthesiyed by rock-dwelling microcolonial fungi. *Can J Botany.* 81: 131-138.
- Gorbushina, A.A., Diakumaku, E., Müller, L. & Krumbein, W.E. (2003b): Biocide treatment of rock and mural paintings: Problems of application, moleculat techniques of control and environmental hazards. In: *Molecular biology and cultular heritage*. (ed). Saiz-Jimenez, Proc Int Congr. pp. 61-71.
- Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dornieden T., Gonyalez-Delvalle, M., Krumbein, E. W., Laiz, L., Peterson, K., Saiz-Jimenez, C. & Swings, J., (2004): Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting enviro-

- ments of St. Martins Church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int Biodeter Biodegr* 53: 13-24.
- Gorbushina, A.A. (2007): Life on the rocks. *Environ Microbiol.* 9: 1613-1631
- Gorbushina AA. & Broughton W.J, (2009): Microbiology of atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu Rev Microbiol* 63: 431-550.
- Gómez-Alarcón, G., Muñoz, M.L. & Flores, M., (1994): Excretion of Organic Acids by fungal strains isolated from decayed sandstone. *Int Biodeter Biodegr* 34: 169-180.
- Gómez-Alarcón, G. & Torre de la, A.M. (1994): The effect of filamentous fungi on stone monuments – the Spanish experience. In: *Building Mycology.* (ed). Singh. E & FN Spon, London, pp. 295–309.
- Gómez-Alarcón, G., Muñoz, M., Ariño, X. & Ortega-Calvo, J.J. (1995a): Microbial communities in weathered sand stones: the case of Carrascosa del Campo church, Spain. *Sci Total Environ.* 167: 249-254.
- Gómez-Alarcón, G., Cilleros, B., Flores, M. & Lorenzo, J. (1995b): Microbial communities and alteration process at Alcals de Henares, Spain. *Sci Total Environ.* 167: 231-239.
- Gottlieb, D. (1978): *The germination of fungus spores.* Durham. Meadowfield Press.
- Gravesen, S. (1979): Fungi a cause of allergic disease. *Allergy* 34: 135 – 154.
- Gregory, P.H. (1973): *Microbiology of the atmosphere.* 2nd edn. Aylesbury: Leonard Hill.
- Grote, G. & Krumbein, W.E. (1992): Microbia precipitation of manganese by bacteria and fungi from desert rock and rock varnish. *Geomicrobiol J.* 10: 49-57.
- Guglielmineti, M., Morghen de Guili, C., Radaeli, A., Bistoni, F., Carruba, G., Spera, G. & Careta G. (1994): Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodegradation of mural paintings. detection of fungi and mites in frescos of the Monastery of St Damian in Assisi. *Int Biodeter Biodegr.* XX: 269-283.

- Guillitte, O. (1995): A bioreceptivity: A new concept for building ecology studies. *Sci Total Environ.* 167:215–220.
- Guiamet, P., Borrego, S., Lavin, P., Perdomo, I. & Gómez de Saravia, S. (2011): Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentina and at the National Archive of the Republic of Cuba. *Colloid Surface B.* 85: 229-234.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2: 95–108.
- Hanel, H. & Raether, W. (1998): 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.
- Hanson, J.R. (2008): *The Chemistry of Fungi.* The Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House. Science Park. Milton Road. Cambridge. UK.
- Harding, M.W., Marques, L.L., Howard, R.J., & Olson, M.E. (2009): Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17: 475-480.
- Hawksworth, D.L. (1991): The fungal dimensions of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641-645.
- Hawksworth, D.L. (2004): Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud Mycol.* 50: 9–18.
- Heaton, M. & Cleal, R.M.J. (2000): Beaker pits at Crescent copse, near Shrewtown, Wiltshire, and the effect of arboreal fungi on archeological remains. *Wiltshire Archeological & Natural History Magazine.* 93: 71-61.
- Helmi, M.F., Elmitwalli, R.H., Rizk, A.M. & Hagrassy, F.A. (2011): Antibiotic extraction as a recent biocontrol method for *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* fungi in ancient Egyptian mural paintings. *Mediterr Archaeol Ar.* 11: 1-7.
- Henderson, M.E. & Duff, R.B. (1963): The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks, and soils by fungal activity. *J. Soil Sci.* 14: 236-246.

- Hoffman, L. & Darienko, T. (2005): Algal biodiversity on sandstones in Luxembourg. *Ferrantia*. 44: 99-101.
- Hosamani M.K. & Pattanashettar R.S. (2003): Occurrence of unusual fatty acids in *Ficus benghalensis* seed oil. *Ind Crop Prod*. 18: 139-143.
- Huang C.H., Liang M.F. & Kam Y C., (2003): The fatty acid composition of oophagous tadpoles (*Chiraxalus eoffingeri*) fed conspecific or chicken egg yolk. *Comp Biochem Physiol*. 135: 329-326.
- Hueck, H.J. (1965): The Biodeterioration of Materials as a part of Hylobiology. *Mater. Org.* 1: 5-34.
- Hueck, H.J.(1968): The Biodeterioration of Materials – an Appraisal. In: *Biodeterioration of materials*. (eds) Walters. A.H & Elphick, J.S. Elsevier. London, pp. 6-12.
- Hunt, J.M. (1961): Distribution of hydrocarbons in the sedimentary rocks. *Geochim Cosmochim Ac.* 22:37-49.
- Hyde, K.D. (2001): Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? *Mycol Res.* 105: 1514 -1518.
- Ignjatović, A. (2006): Od istorijskog sećanja do zamišljanja nacionalne tradicije: Spomenik Neznamom junaku na Avali. in: Institut za noviju istoriju Srbije. *Istorija i sećanje. Studije istorijske svesti*. Beograd.
- Inoue, M. & Koyano, M. (1991): Fungal contamination of oil paintings in Japan. *Int Biodeter.* 28: 23-35.
- Ishii, H. (1995): Monitoring of fungicide resistance in fungi: biological to biochemical approaches. In: *Molecular methods in plant pathology*. (eds). Singh, S.U. & Singh, P.R. Lewis Publisher. Boca Raton. London. Tokio. pp. 483-495.
- Jaag, O. (1945): Untersuchung über die Vegetation und Biologie der Algen des nackten Geistes in den Alpen I, Jura und im schweizerischen Mittelland. *Beträge zur Kryptogamenflora der Schweiz* 9. Heft 3.
- Jacobson, E.S. (2000): Pathogenic role for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 13: 708-717.

- Jenkins, I.D. & Middleton, A.P. (1988): Paint on the Parthenon Sculptures. The Annual of the British School of Archeology at Athens. 87: 183-207.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C-J., Zu, Y-G. & Liu, X-L. (2011): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential of Rosemary. Environ toxicol Pharmacol. 32: 63-68.
- Jokilehto, J. (2005): Definition of cultural heritage. References to documents in history. ICCROM Working group „Heritage Society“.
- Kabbani R.M. (1997): Conservation: a collaboration between art and science. The chemical educator. 2: 1-18.
- Kalpana, Srivastava R., Mishra A.K. & Nair, M.V. (2011): Polymeric products as effective biocide (antifungal agents) against deteriorating wood. Asiatic journal of biotechnology resources, 2: 542-546.
- Kandić, O. (2008): Manastir Gradac. Republički zavod za zaštitu spomenika culture.
- Karavaiko, G.I. (1978): Microflora of land microenvironments and its role in the turnover of substance. In: Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology, The Terrestrial Environment, Vol 2. (ed) Krumbein. W.E. Ann Arbor Science Publ. Inc. Michigan, pp. 397 – 411.
- Keller, W.D. (1957): Principles of chemical weathering. Lucas Brothers Publishers. Columbia. Missouri.
- Khosravi, A.R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M. & Parsa, S. (2011): Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. J Mycol Méd. 21: 93-99.
- Kigawa, R., Sano, C., Ishizaki, T., Miura, S. & Sugiyama, J. (2009): Biological issues in the conservation of mural paintings of Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan. In: International symposium on the conservation and restoration of cultural property—study of environmental conditions surrounding cultural properties

- and their protective measures. (ed). Sano, C. National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo, pp. 43–50.
- Knutsen, A.P., Bush, R.K., Demain, J.G., Denning, D.W., Dixit, A., Fairs, Greenberger, P.A., Kariuki, B., Kita, K., Kurup, V.P., Moss, R.B., Niven, R.M., Pashley, C.H., Slavin, R.G., Vijay, H.M. & Wardlaw, A.J. (2011): Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *Clin Rev Allerg Immu.* 280-291.
- Kolwzan, B., Adamiak, W., Grabas, K. & Pawełczyk, A. (2006): Introduction to Environmental Microbiology. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Komarek, J. & Anagnostidis, K. (1998): Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 19/1. Spektrum Akademischer Verlag. Berlin.
- Komarek, J. & Anagnostidis, K. (2005): Cyanoprokaryota. 2. Teil: Chroococcales. Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 19/2. Spektrum Akademischer Verlag. Berlin.
- Komarek, J. & Fott B. (1983): Das phytoplankton des Susswassers. Band XVI. 7. Teil 1. Halfte. In: Die Binnengewasser (ed). Huber-Pestalozzi, C. Schweizerbart'sche Verlagbuchhandlung. Stuttgart.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1988): Bacillariophyceae. 1. Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1998): Bacillariophyceae. 2. Teil. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- Krumbein, W.E. (1992): Colour changes of buildings stones and their direct and indirect biological causes. In: 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. (eds). Rodrigues, J.D., Henriques, F. & Jeremias, F.T. L.N.E.C. Lisbon. p443.
- Kumar, R. & Kumar, A.V. (1999): Biodeterioration of stone in tropical environments: an overview. The Getty Conservation Institute. Santa Monica, CA.

- Lamb, B., Guenther, A., Gay, D. & Westberg, H. (1987): A national inventory of biogenic hydrocarbon emissions. *Atmos Environ* 21: 1696-1705.
- Lange-Bertalot, H. (2001): *Diatoms of Europe*. Vol 2. A.R.G. Gantner Verlag K.G.
- Langsrud, S., Sundheim, G., Borgmann-Strahsen, R. (2003): Intrinsic and required resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J Appl Microbiol.* 95: 874–882.
- Laundon, J.R. (1985): *Desmococcus olivaceus*. The name of the common subaerial Green algae. *Taxon.* 34: 671-672.
- Lawrence, B.M. (1993): Progress in Essential oil. *Perfum Flavor.* 18:58-61.
- Lenzenweger, R. (2003): *Dezmidaceenflora von Osterreich*. Teil 4. *Bibliotheca Phycologica*. Band 111. J. Cramer. Berlin.
- Lefèvre, M.: 1974: La ‘Maladie Verte’ de Lascaux. *Stud Conserv.*19: 126-156.
- Lehtonen, M. & Reponen, T. (2003): Everyday activities and variations of fungal spore concentration in indoor air. *Int Biodeter Biodegr.* 31: 35-39.
- Lis-Balchin, M., Deans, G.S. & Eaglesham, E. (1998): Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavor Fragr. J.* 13: 98-104.
- Lourenço, M.J.L. & Sampaio, J.P. (2009): Microbial deterioration of gelatin emulsion photographs: Differences of susceptibility between black and white and colour materials. *Int Biodeter Biodegr.* 63: 496-502.
- Ljaljević Grbić, M. (2006): Ispitivanje interakcije rtanjske metvice (*Nepeta rtanjensis* Diklić et Milojević) i odabranih mikromiceta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet.
- Ljaljević Grbić, M., Vukojević J. & Stupar, M. (2008): Fungal colonization of air-conditioning systems. *Arch Biol Sci.* 60: 201-206.
- Ljaljević Grbić, M., Subakov-Simić, G., Krizmanić, J & Ladić, V. (2009): Cyanobacterial, algal and fungal biofilm on sandstone substrata of Eiffel’s Lock in Bečej (Serbia). *Bot. Serb.* 33: 101-105.

- Laljević Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J. & Grubišić, D., (2011): *In vitro* antifungal and demelanizing activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil against human pathogen *Bipolaris spicifera*. Arch Biol Sci 63: 897-905.
- Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionísio, A. & Saiz-Jimenez, C. (2009): Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in Mediterranean Basin: an overview. Microbiology. 155: 3476-3490.
- Mandić, S. (1965): Sopoćani. Beograd. Turistička štampa
- Manley, E.P. & Evans, L.J. (1986): Dissolution of feldspars by low-molecular-weight aliphatic and aromatic acids. Soil Sci. 141: 106-112.
- Manoli, F., Koutsopoulos, E. & Dalas, E. (1997): Crystalization of calcite on chitin. J Cryst growth. 1982: 116-124.
- Marandi, R.J., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A. & Sefidkon, F. (2011): Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. J Med Plant Res. 5: 626-634.
- May, E. (2003): Microbes on building stone – for good or ill?. Culture. 24: 5-8.
- Mc Ginnis, M.R., Campbell, G., Gourley, W.K. & Lucia, H.L. (1992): Phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris spicifera*: an informative case. Eur J Epidemiol 8: 383-386.
- Mesquita, N., Portugal, A., Videira, S., Rodríguez-Echeverría, S., Bandeira, A.M.L., Santos, M.J.A. & Freitas, H. (2009): Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra. Int Biodeter Biodegr 63: 626-629.
- Meynell, G., 1979. Notes on foxing, chlorine dioxide bleaching and pigments. Paper Conservator. 4: 30-32.
- Meynell, G. & Newsam, R.J. (1978): Foxing, a fungal infection of paper. Nature 274: 466-468.

- Michaelsen, A., Piñar, G., Montanari, M. & Pinzari, F. (2009): Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: A case study. *Int Biodeter Biodegr.* 63: 161-168.
- Milanesi, C., Baldi, F., Vignani, R., Ciampolini, F., Faleri, C & Cresti, M., (2006): Fungal deterioration of medieval wall fresco determined by analysing small fragments containing copper. *Int Biodeter Biodegr.* 57: 7-13.
- Mironescu, M., Mironescu, I.D. & Georgescu, C. (2010): Microstructural changes induced by five new biocidal formulations on moulds. *Annals of RSCB.* 15: 162-167.
- Money, N.P. (1999): Biophysics: fungus punches its way in. *Nature* 401: 332-333.
- Morreti, L.D.M., Peana, T.A. & Satta, M. (1998): Effects of soil properties on yield and composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *J Essent Oil Res.* 9: 199-204.
- Morton, L.H.G. & Surman, S.B. (1994): Biofilms in biodeterioration – a review. *Inter Biodeter Biodegr* 34: 203-221.
- Muntaňola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija. Književne novine. Beograd.
- Nigam, N., Dhawan, S. & Nair, V.M. (1994): Deterioration of feather and leather objects of some Indian museums by keratinophilic fungi and non-keratinophilic fungi. *Inter Biodeter Biodegr.* 33: 145-152.
- Niesler, A., Górny, R.L., Wlazlo, A., Ludzeń-Izbińska, B., Ławniczek-Wałczyk, A., Gołofit-Szymczak, M., Meres, Z., Kasznia-Kocot, J., Harkawy, A., Lis, D.O. & Anczyk, E. (2010): Microbial contamination of storerooms at the Auschwitz-Birkenau Museum. *Aerobiologia.* 26: 125-133.
- Nittereus M. (2000): Fungi in archives and libraries. *Restaurator.* 21: 25-40.
- Nol, L., Henis, Y. & Kenneth, R.G. (1983): Biological factors of foxing in postage stamp paper. *Int Biodegr* 19: 19-25.
- Nooner, D.W., Oro, J. & Gilbert, J.M. (1972): Ubiquity of hydrocarbons in nature: aliphatic hydrocarbons in weathered limestone. *Geochim Cosmochimi Acta* 36: 953-959.

- Omelyansky, V.L. (1940): Manual in Microbiology. USSR Academy of Sciences, Moscow, Leningrad.
- Ortega-Calvo, J.J., Arin˜ O.X., Hernandez-Marine, M. & Saiz-Jimenez, C. (1995): Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *Sci Total Environ* 167: 329–341.
- Palmer, R.J., Siebert, J. & Hirsch, P. (1991): Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building: production by bacterial and fungal isolates. *Microb Ecol.* 21: 253-266.
- Pandey, A.K., Shrivastav, A., Bhatnagar, P., Sarsaiya, S. & Awasthi, M.K. (2011): Diversity of monument deterioration-causing fungi at Gwalior Fort (M.P) India. *Ann Environ Sci.* 5: 35-40.
- Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D. & Dixit, S.N. (1982): Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. *Zeit Pflanzkrank Pflanzensch* 89: 344–349.
- Paner, C.M. (2012): Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the University of Santo Tomas, Museum of Art and Sciences. *Prime journal of microbiology research.* 2: 114-120.
- Patrauchan, M.A. & Oriol, P.J. (2003): Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophyla* sp. K: *J Appl Microbiol.* 96: 266–272.
- Pavić-Basta, B. (1975): Crkva Sv. Nikole u Paležu. Raška baština, Kraljevo.
- Pepe, O., Palomba, S., Sannino, L., Blaiotta, G., Ventorino, V., Moschetti, G. & Villani, F. (2011): Characterization in the archaeological excavation site of heterotrophic bacteria and fungi of deteriorated wall painting of Herculaneum in Italy. *J Environ Biol* 32: 241-250.
- Perrini, R., Morone-Fortunato, I., Lorusso, E. & Avato, P. (2009): Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp *microphyllum* (Willd.) Nyman. *Ind Crop Prod.* 29: 395-403.

- Pitt, J.I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic state *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press.
- Popescu, C-M., Tibirna, C.M. & Manoliu, A. (2011): Microscopic study of lime wood decayed by *Chaetomium globosum*. *Cem Chem Technol.* 45: 565-569.
- Pournou, A. & Bogomolova, E. (2009): Fungal colonization on excavated prehistoric wood: Implications for *in-situ* display. *Int Biodeter Biodegr.* 63: 371–378.
- Press, R.E. (1976): Observation on the foxing paper. *Int Biodegr* 12: 27-30.
- Prieto, B. & Silva B. (2005): Estimation of potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *Int Biodeter Biodegr.* 56: 206-215.
- Prieto, M.J., Iacopini, P., Cioni, P. & Chericoni, S., (2007): *In vitro* activity of the essential oils of *Origanum vulgare* and *Satureja montana* and their main constituents in peroxy-nitrite-induced oxidative process. *Food Chem.* 104: 889-895.
- Radler de Aquino, F. & de Góes, L.F. (2000): Guidelines for indoor air quality in offices in Brazil. *Proceedings of Healthy Buildings 4:* 549-553.
- Rakotonirainy, M.S. & Lavédrine, B. (2005): Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int Biodeter Biodegr.* 55: 41-147.
- Rakotonirainy, M.S., Heude, E. & Lavédrine, B. (2007): Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. *J Cult Herit.* 8: 126-133.
- Raper, B.K. & Fennel, D.I. (1965): The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- Rifai, MA. (1969): A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. England.
- Rome de, L. & Gadd, G.M. (1987): Copper adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Cladosporium resinae* and *Penicillium italicum*. *Appl Microbiol Biot* 26: 84-90.
- Rubai, C., Platas, G. & Bills, G.F. (2005): Isolation and characterization of melanized fungi from limestone formations of Mallorca. *Mycol. Progr.* 4: 23-38.

- Saeed M. A. & Sabir A.W. (2002): Irritant potential of triterpenoids from *Ficus carica*. *Fitoterapia* 73: 417-420.
- Sáiz-Jiménez, C. (1993): Deposition of airborne organic pollutants on historic buildings. *Atmos Environ.* 27: 77-85.
- Sampö, S. & Mosca, A.M.L., (1989): A study of the fungi occurring on 15th century frescoes in Florence, Italy. *Int Biodeter.* 25: 343-353.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. & Frisvad, J.C. (2004): Introduction to food- and airborne fungi. Ponse & Looyen. Wageningen. The Netherlands.
- Saravia de, S.G., Paz Naranjo de la, J., Guiamet, P., Arenas, P. & Borrego, S.F. (2008): Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. *BLACPMA* 7: 25–29.
- Savoie, D. & Lallemand, R. (1980): Evolution de la microflore d'un substrat avant et pendant sa colonisation par les lichens. I Le cas de toitures en amiante-ciment en zone urbaine. *Cryptogamie Bryol L.* 1: 21-31.
- Savulescu, A & Ionita, I, (1971): Contribution to the study of the biodeterioration of works of art and historic monuments I. Species of fungi isolated from frescoes. *Rev Roum Biol Bot.* 16: 201-206.
- Sayer, J.A. & Gadd, G.M. (2001): Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. *Mycol Res.* 105: 1261-1267.
- Schwab, C.J. & Straus, D.C. (2004): The roles of *Penicillium* and *Aspergillus* in sick building syndrome. *Adv Appl Microbiol.* 55: 215-238.
- Szczepanowska, H. & Cavaliere, A.R. (2000): Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collection, Wye House, Easton, Maryland. *Int Biodeter Biodegr.* 46: 245-249.
- Sert, H. & Sterflinger, K. (2010): A new *Coniosporium* species from historical marble monuments. *Mycol Progress.* 9: 353-359.

- Shabbir, A., Khan, M.A., Khan, A.M., Iqbal, M. & Ahmad, F. (2007): Fungal biodegradation: A case study in the zoological museum of the Punjab University. *J Anim Pl Sci* 17: 3-4.
- Sharma, K. & Agarwal, M. (2011): Prevalence of airborne *Aspergillus* in the air of monuments: Impact on biodeterioration and human health. *Curr Bot.* 2: 25-26.
- Sharma, K., Verma, K.P. & Motilal (2011): Fungal involvement in biodeterioration of ancient monuments: problem and prospects. *J Phytol.* 3: 15-17.
- Sharma, K. (2011): Microbial impacts on the Cultural Heritage. The First International Conference on Interdisciplinary Research and Development. 31 May – 1 June 2011. Thailand.
- Shi, C. & Miller, J.D. (2011): Characterization of the 41 kDa allergen AspV13, a subtilisin-like serine protease from *Aspergillus versicolor*. *Mol Immunol.* 48: 1827-1834.
- Silva da, M., Moraes, A.M.L., Nishikawa, N.N., Gatti, M.J.A., Vallim de Alencar, M.A., Brandão, L.E. & Nóbrega, A. (2006): Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. *Int Biodeter Biodegr.* 57: 163–167.
- Simoneit, B.R.T. (1984): Organic matter in the troposphere – III. Characterization and sources of petroleum and pyrogenic residues in aerosols over western United States. *Atmos Environ* 18: 51-67.
- Singh, G., Maurya, S., Lampasona de, M.P. & Catalan, C. (2006): Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control.* 17: 745–752.
- Smith, G., (1980): *Ecology and Field Biology*, second ed. Harper & Row, New York. p. 835.
- Sohail, M., Ahmad, A. & Khan, S.A. (2011): Production of cellulases from *Alternaria* sp. MS28 and their partial characterization. *Pak J Bot.* 43: 3001-3006.
- Soković, M.D. (2001): Antifungalna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih i lekovitih biljaka *in vitro* i *in vivo*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet.

- Sorlini, C., Sacchi, M. & Ferrari, A. (1987): Microbial deterioration of Gambara's frescoes exposed to open air in Brescia, Italy. *Int Biodeter.* 23: 167-179.
- Sorlini, C., Zanardini, E., Albo, S., Praderio, G., Cariatì, F., Bruni, S., Research on chromatic alterations of marbles from the fountain of Villa Litta (Lainate, Milan). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(1): 58-68.
- Sosa, S., Brkić, D., Tubaro, A., & Della Loggia, R. (2000): Topical anti-inflammatory activity of *Rosmarinus officinalis* L. extracts. Proceedings of the I conference on medicinal and aromatic plants of southeast European countries and VI meeting „Days of medicinal plants 2000“. Arandelovac. Yugoslavia. 597-601.
- Soylu, E.M., Kurt, Ş. & Soyly, S. (2010): *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int J Food Microbiol.* 143: 183-189.
- Starmach, K. (1972): Chlorophyta III flora flodkowodna polski. Tom 10. Panstwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
- Steiger, M., Wolf, F. & Dannecker, W. (1993): Deposition and enrichment of atmospheric pollutants on building stones as determined by field exposure experiments. In: *Conservation of Stone and Other Materials*, Vol. 1. (ed). Thiel, M.-J. E & FN Spon. London, pp. 35-42.
- Sterflinger, K. (2000): Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol J.* 27: 97-124.
- Sterflinger, K. & Krumbein, WE. (1997): Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiol J.* 14: 219–230.
- Sterflinger, K. (2005): Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: *Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, vol 1. (eds). Rosa, C. & Gabor, P. Springer. New York. pp. 501-514.
- Sterflinger, K. (2010): Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews.* 24: 47-55.
- Strzelczyk, A.B. (1981): Microbial biodeterioration: stone: In: *Economic Microbiology Vol 6.* (ed). Rose, A.H. Academic Press. London, pp. 62-80.

- Suihko, L.M., Alakomi, L.H., Gorbushina, A.A., Fortune, I., Marquardt, J. & Saarela, M. (2007): Characterization of Aerobic Bacterial and Fungal Microbiota on Surfaces of Historic Scottish Monuments. *Syst Appl Microbiol* 30: 494-508.
- Sutton, B.C. (1980): The coelomycetes. fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. England.
- Šimonovičova, A., Gódyova, M. & Ševc, J. (2004): Airborne and Soil Microfungi as Contaminants of Stone in a Hypogean Cemetery. *Int Biodeter Biodegr*. 54: 7-11.
- Tomás-Barberán, F., Iniesta-Sanmartín, E., Tomás-Lorente, F. & Rumbero, A. (1990): Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry*. 29: 1093–1095.
- Tomaselli, L., Lamenti, G., Bosco, M., & Tiano, P. (2000): Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *Int Biodeter Biodegr* 46: 251-258.
- Torre de la, MA. & Gómez-Alarcón, G. (1994): Manganese and iron oxidation by fungi isolated from building stone. *Microb Ecol*. 27: 177-188.
- Tortorano, A.M., Viviani, M.A., Biraghi, E., Rigoni, A.L., Pritigano, A., Grillot, R. / EGBA Network. (2005): *In vitro* testing of fungicidal activity of biocides against *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol*. 54:955–957.
- Tucker, A.O. & Maciarello, M.J. (1986): The essential oil of some essential oil cultivars. *Flav Frag J*. 1: 137-142.
- Urzi, C., Krumbein, W.E. & Warscheid, Th. (1992): On the question of biogenic colour changes of Mediterranean monuments (coating-crust-microstromatolite-patina-scialbatura-skin-rock varnish) In: *La Conservation des Monuments dans le Bassin Méditerranéen*. (eds). Decrouez, D., Chamay, J. & Zezza, F. Musée d'art et d'histoire. Genève.
- Urzi, C., Leo de, F., Salamone, P. & Criseo G. (2001): Airborne Fungal Spores Colonising Marbles Exposed in the Terrace of Messina Museum, Sicily. *Aerobiologia*. 17: 11- 17.

- Urzi, C. & Leo de, F. (2001): Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. *J Microbiol Meth.* 44: 1-11.
- Venskutonis, N.P., Dapkevicius, A & Baramanaskierue, M. (1997): Composition of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill) from Lithuania. *J Essent Oil Res.* 9:107-110.
- Vukojević, J. (1998): *Praktikum iz Mikologije i Lihenologije*, NNK Internacional, Beograd.
- Vukojević, J. & Ljaljević Grbić, M., (2010): Moulds on paintings in Serbian fine art museums. *Afr J Microbiol Res.* 13: 1453-1456.
- Watanabe, T. (2002): *Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of the cultured fungi and key to the species.* Second Edition. CRC Press. Boca Raton. London. New York. Washington DC.
- Warscheid, Th., Petersen, K. & Krumbein, W.E. (1989): Die Besiedlung unterschiedlicher Sandsteine durch chemoorganotrophe Bakterien und deren Einfluß auf der Prozeß der Gesteinszerstörung. *Z Deut Geol Gessel* 140: 209- 217.
- Warscheid, Th. (2000): Integrated concepts for the protection of cultural artifacts against biodeterioration. In: *of Microbes and Art: The Role Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage.* (eds). Cifferi, O., Tiano, P. & Mastromei, G. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 185 – 182.
- Warscheid, Th. & Braams, J. (2000): Biodeterioration of stone: a review. *Inter Bio-deter Biodegr.* 46: 343-368.
- Watanabe, T. (2002): *Soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species.* Crc press. Boca Raton. London.
- Watts, H.J., Very, A.A., Perera, T.H.S., Davies, J.M. & Gow, N.A.R. (1998): Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* 144: 689-685.

- White, S. (1998): *Origanum*: the herb marjoram and its relatives. Surrey: NCCPG. (HSA Library).
- Willimzig, M., Fahrig, N., Meyer, C. & Bock, E. (1993): Biogene schwarze Krusten auf Gesteinen. Bautenschutz + Bautensanierung. 16: 22-25.
- Wonder Makers Environmental. Inc. (2001): Post-remediation guideline. Information Series 147. Publikacija dostupna na: http://www.wondermakers.com/public_html/Articles/Remediation%20Guidelines.pdf.
- World Health Organization. (1990): Indoor Air Quality: Biological Contaminants. In: European Series No 31. WHO Regional publications. Copenhagen, p67.
- Zaitseva, N. (2010): A Polysaccharide extracted from *Sphagnum* moss as antifungal agent in archaeological conservation. Master teza. Queen's University. Kingston. Ontario. Kanada.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. & Boussaid, M. (2010): Essential oil composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food Chem Toxicol. 48: 3144-3152.
- Zotti, M., Ferroni, A. & Calvini, P. (2008): Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses. Int Biodeter Biodegr. 62: 186-194.

Biografija

Miloš Stupar je rođen 04.08.1981. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2000. godine, smer biologija, a diplomirao u redovnom roku februara 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,47.

Doktorske studije upisao je 2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Eksperimentalna mikologija. U periodu 2007–2008. bio je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, a u periodu 2008–2012, stipendista Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Od 2012. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a 2013. izabran je u zvanje istraživača saradnika.

Objavio je 8 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima i imao je 7 saopštenja na skupovima od međunarodnog značaja (Letonija, Rusija, Ukrajina, Nemačka, Švajcarska, Srbija i Brazil).

Za prezentacije svojih naučnih radova do sada je osvojio dve nagrade: nagradu na 13. međunarodnom simpozijumu evropskih studenata biologije, Symbiose, u Kazanju (Rusija) i treće mesto u kategoriji opšta biologija na Trećem međunarodnom simpozijumu studenata bioloških nauka *International Life Science Students' Conference* u Kijevu (Ukrajina).

Učestvovao je u organizaciji četvrtog međunarodnog ekološkog kampa, *Eurensa*, održanog jula 2009. na teritoriji Nacionalnog parka Đerdap. Tema skupa je bila „Uticaj klimatskih promena na ekosisteme“.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Милош Ступар

број индекса ФО 060205

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Диверзитет микромицета на објектима културне баштине и тестирање фунгицида применљивих у конзервацији“

- 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 ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 21.08.2013.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане
и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора **Милош Ступар**

Број индекса **ФО 060205**

Студијски програм **Експериментална микологија**

Наслов рада **„Диверзитет микромицета на објектима културне баштине и
тестирање фунгицида применљивих у конзервацији“**

Ментор др **Милица Љаљевић Грбић**

Потписани Милош Ступар

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао 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 докторанта

У Београду, 21.08.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Диверзитет микромицета на објектима културне баштине и тестирање фунгицида применљивих у конзервацији“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао 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 докторанта

У Београду, 21.08.2013.



1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.