

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nikola D. Unković

**Diverzitet i uloga mikromiceta
u procesu biodeterioracije zidnih slika
crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg
u Velikom Krčimiru**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nikola D. Unković

**Diversity and role of micromycetes
in wall painting biodeterioration process:
Church of the Holy Ascension
in Veliki Krčimir**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

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

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

Članovi komisije:

dr Aleksandar Djordjević, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet

dr Peđa Janačković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Nevena Debljović Ristić, naučni saradnik
Republički zavod za zaštitu spomenika kulture - Beograd

Datum odbrane:

Doktorska disertacija je realizovana na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju, Instituta za botaniku i botaničke bašte "Jevremovac", Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u saradnji sa Aleksom Jelikićem i mr Draganom Stanojevićem iz Republičkog zavoda za zaštitu spomenika kulture – Beograd.

Najiskrenije se zahvaljujem mentorima, članovima komisije, kolegama, prijateljima i porodici na bezrezervnoj podršci i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Diverzitet i uloga mikromiceta u procesu biodeterioracije zidnih slika crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru

Sažetak

Analiziran je diverzitet i sezonska dinamika mikromiceta na zidnim slikama i u vazduhu istraživane crkve. Identifikovana je mikrobiota od 46 taksona mikromiceta, sa dominacijom *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* vrsta. Najveći diverzitet je zabeležen tokom leta, dok je najveća brojnost propagula po jedinici površine ("fungalni otisak") konstatovana u zimu. Aeromikrobiota je okarakterisana sa 33 taksona gljiva. Kontaminacija vazduha propagulama gljiva tokom godine višestruko je prevazilazila standarde za zatvorene prostore. Mikroskopska analiza biofilma pokazala je da su reproduktivne strukture *Cladosporium* sp. i *Chaetomium* sp. u kontaktu bojenog sloja i maltera glavni biotski faktor deterioracije. Metodom ATP bioluminiscenije, 75% površina zidnih slika je okarakterisano kao "Zona opasnosti". Monitoringom indukovane i spontane kolonizacije na modelu zidne slike zaključeno je da su lihenizovane i mikrokolonijalne gljive uzrok fenomena "biopitting". Testirani izolati su demonstrirali veliki potencijal deterioracije zidnih slika u eksperimentima *in vitro*. BAC i novosintetisani BAC/FNP nanokompozit pokazali su dobru antifungalnu aktivnost, kao i uticaj na povećanje produkcije aflatoksina B1 i smanjenje produkcije ohratoksina A. Etarsko ulje tamjana imalo je jači antifungalni efekat u odnosu na etarsko ulje smirne, ali slabiji u poređenju sa smešom ulja. Dim tamjana poseduje inhibitorno dejstvo na germinaciju konidija, mehaničkim i hemijskim dejstvom voštanog sloja deponovanog iz dima, *in vitro*. Tretman vazduha crkve dimom tamjana redukovao je nivo kontaminacije vazduha fungalnim propagulama za približno 80%. Preko predloženog metodološkog protokola, data je mogućnost implementacije rezultata ovog istraživanja u praksu konzervacije i restauracije kulturnih dobara.

Ključne reči: antifungalna aktivnost, biodeterioracija, biofilm, "fungalni otisak", mikromicete, model zidne slike, nanokompozit, tamjan, Veliki Krčimir, zidne slike

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

UDK broj: [582.28+7.025]:7.021.333(497.11)(043.3)

Diversity and role of micromycetes in wall painting biodeterioration process: Church of the Holy Ascension in Veliki Krčimir

Abstract

Diversity and seasonal dynamics of micromycetes from wall paintings and surrounding air of investigated church was analyzed. A total of 46 fungal taxa was documented, with dominance of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* species. The greatest species diversity was recorded in the summer, while the highest abundance of fungal propagules per unit area ("fungal print") was observed in the winter. Air mycobiota was characterized by 33 fungal taxa. Fungal air contamination, throughout the year, exceeded permissible levels for indoor environment. Microscopic biofilm analyzes revealed that reproductive structures of *Cladosporium* sp. and *Chaetomium* sp. are the main biodeteriogens. ATP bioluminescence method showed that 75% of the surfaces are deemed as "Danger zone". Monitoring of induced and spontaneous colonization of mock-model established lichenized and micro-colonial fungi as the main causative agents of "biopitting" phenomenon. Tested isolates demonstrated pronounced deterioration capabilities in experiments *in vitro*. BAC and newly-synthesized BAC/FNP nanocomposite had very strong antifungal activity, stimulated aflatoxin B1 production, and inhibited ochratoxin A production. Frankincense essential oil showed stronger antifungal property compared to the oil obtained from myrrh, but weaker than the oil mixture. Burn incense had inhibitory effect on conidia germination via mechanical and chemical activity of thin waxy layer deposited from fume, *in vitro*. Treatment of air within church, with burn incense, reduced the level of fungal air contamination by approximately 80%. Through the proposed methodological protocol, the possibility of implementing results into the practice of conservation and restoration of cultural heritage is given.

Key words: antifungal activity, biodeterioration, biofilm, frankincense, “fungal print”, micromycetes, mock-model, nanocomposite, Veliki Krčimir, wall paintings

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Algology and micology

UDK number: [582.28+7.025]:7.021.333(497.11)(043.3)

Lista simbola i skraćenica

ADP	Adenozin-5'-difosfat (eng. Adenosine-5'-diphosphate)
AFB1	Aflatoksin B1 (eng. Aflatoxin B1)
AFM	Mikroskop atomskih sila (eng. Atomic force microscope)
AMP	Adenozin-5'-monofosfat (eng. Adenosine-5'-monophosphate)
ATP	Adenozin-5'-trifosfat (eng. Adenosine-5'-triphosphate)
a_w	Sadržaj aktivne vode u supstratu (eng. Water activity)
BAC	Benzalkonijum hlorid (eng. Benzalkonium chloride)
BAC/FNP	Benzalkonijum hlorid/fulerenol nanokompozit
BDP	Evropska direktiva o biocidima (eng. European biocides products directive)
CCA	Kanonijska korespondentna analiza (eng. Canonical correspondence analysis)
CFU	Broj kolonija po kontaktnom slajdu ili Petri kutiji (eng. Colony forming units)
CN	Kazein agar (eng. Casein nutrient agar)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina (eng. Deoxyribonucleic acid)
EDX	Energetsko-disperzivna spektroskopija X-zraka (eng. Energy dispersive X-ray spectroscopy)
EMC	Ravnotežna vrednost relativne vlažnosti supstrata (eng. Equilibrium moisture content)
EPS	Ekstracelularne polimerne supstance (eng. Extracellular polymeric substance)
FNP	Nanočestice fulerenola (eng. Fullereneol nano particles)
GC-FID	Gasna hromatografija sa plameno-jonizujućim detektorom (eng. Gas chromatography with flame ionization detector)
GC-MS	Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. Gas chromatography Mass spectrometry)
GPK	Semi-sintetička podloga sa glukozom (eng. Semi-synthetic medium with glucose)
HOPG	Visoko orijentisani pirolitički grafit (eng. Highly orientated pyrolytic graphite)
ITS I	Interni transkribovani region 1 (eng. Internal transcribed spacer 1)
LCB	Laktofenol pamuk plavo (eng. Lactophenol cotton blue)
MC	Mikrociklična konidijacija (eng. Microcycle conidiation)

MCF	Mikrokolonijalne gljive (eng. Microcolonial fungi)
MCZA	Minimalna Czapek-ova podloga (Minimal Czapek dox agar)
MCZB	Minimalni Czapek-ov bujon (Minimal Czapek dox broth)
MEA	Malt agar (eng. Malt extract agar)
MEAS	Malt agar sa streptomycinom (eng. Malt extract agar with streptomycine)
MEB	Tečni malt (eng. Malt extract broth)
MFC	Minimalna fungicidna koncentracija (eng. Minimum fungicidal concentration)
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija (eng. Minimum inhibitory concentration)
M40Y	Sladni kvasčev agar sa 40% sukroze (eng. Malt yeast 40% sucrose agar)
NOP	Nacionalni program organskih proizvoda (eng. National organic program)
¹O₂	Singlet kiseonik (eng. Singlet oxygen)
O₂⁻	Superoksid anjon radikal (eng. Superoxide anion radical)
OA	Ovseni agar (eng. Oatmeal agar)
OTA	Ohratoksin A (eng. Ochratoxin A)
PCA	Analiza glavnih komponenti (eng. Principal component analysis)
PCR	Reakcija lančanog umnožavanja (eng. Polymerase chain reaction)
PDA	Krompir dekstrozni agar (eng. Potato dextrose agar)
R²	Koeficijent determinacije (eng. Coefficient of determination)
RB CAF	Roze bengal agar sa hloramfenikolom (eng. Rose bengal chloramphenicol agar)
RF	Relativna frekvenca (eng. Relative frequency)
RH	Relativna vlažnost vazduha (eng. Relative humidity)
RLU	Relativne svetlosne jedinice (eng. Relative light units)
rpm	Broj obrtaja u minuti (eng. Revolutions per minute)
SAB	Subaerialni biofilm (eng. Subaerial biofilms)
SBS	Sindrom bolesne zgrade (eng. Sick building syndrome)
SEM	Skening elektronska mikroskopija (eng. Scanning electron microscopy)
T	Temperatura (eng. Temperature)
TOW	Period povećane vlažnosti (eng. Time of wetness)
QAC	Kvaternarna amonijum jedinjenja (eng. Quaternary ammonium compounds)

VOF	Organski farmeri Vermonta (eng. Vermont organic farmers)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (eng. World health organization)
wt%	Težinski procenat (eng. Weight percent)
XRPD	Rendgenska difrakcija praha (eng. X-ray powder diffraction)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Gljive između nauke i umetnosti	1
1.2. Zidno slikarstvo – “majka umetnosti”	3
1.3. Zidne slike kao stanište mikromiceta.....	9
1.4. Mikrobiota zidnih slika	14
1.5. Potencijal i mehanizmi fungalne deterioracije zidnih slika	16
1.6. Prevencija i sanacija u sistemu konzervacije zidnih slika	23
2. ISTRAŽIVANI LOKALITET	30
3. CILJEVI RADA.....	34
4. MATERIJAL I METODE.....	36
4.1. Materijal	36
4.1.1. Hranljive podloge.....	36
4.1.2. Suspenzije konidija.....	42
4.1.3. Biljne smole	42
4.1.4. Sintetički biocidi	43
4.1.5. Test izolati.....	45
4.2. Metode.....	45
4.2.1. Monitoring mikroklimatskih parametara u naosu primenom data logger-a.....	45
4.2.2. Merenje sadržaja istorijske vlage u zidu	47
4.2.3. Kvalitativna analiza pigmenata bojenog sloja zidnih slika	47
4.2.4. Kvalitativna analiza soli bojenog sloja zidnih slika.....	48
4.2.5. Uzimanje uzoraka za kultivaciju gljiva.....	49
4.2.5.1. Uzimanje uzoraka za izolaciju i identifikaciju mikromiceta sa zidnih površina	49
4.2.5.2. Uzimanje uzoraka za izolaciju i identifikaciju mikromiceta iz vazduha naosa i	
egzonarteksa	51
4.2.6. Uzimanje uzoraka za mikroskopske analize	53
4.2.7. Mikroskopske analize.....	53
4.2.7.1. Skening elektronska mikroskopija.....	53
4.2.7.2. Svetlosna mikroskopija.....	53

4.2.7.3. Mikroskopija <i>in situ</i>	54
4.2.8. Identifikacija mikromiceta	54
4.2.9. Identifikacija cijanobakterija i algi.....	56
4.2.10. Određivanje stepena kontaminacije površine zidnih slika metodom ATP bioluminiscencije	56
4.2.11. Monitoring indukovane i spontane kolonizacije mikromicetama na formulisanom modelu zidne slike.....	58
4.2.12. Testovi za određivanje aktivnosti izolovanih mikromiceta <i>in vitro</i>	59
4.2.12.1. Test produkcije kiselih i baznih metabolita.....	60
4.2.12.2. Test rastvaranja kalcijum karbonata.....	60
4.2.12.3. Test formiranja sekundarnih mikogenih minerala.....	61
4.2.12.4. Test proteolitičke aktivnosti mikromiceta	61
4.2.12.5. Test produkcije fungalnih pigmenata.....	62
4.2.13. Ekstrakcija i hemijska analiza etarskih ulja i produkata paljenja tamjana	62
4.2.13.1. Ekstrakcija etarskih ulja.....	62
4.2.13.2. Analiza hemijskog sastava etarskih ulja.....	63
4.2.13.3. Ekstrakcija dima i čađi	63
4.2.14. Metode testiranja antifungalne aktivnosti biocida i etarskih ulja <i>in vitro</i>	65
4.2.14.1. Mikrodiluciona metoda	65
4.2.14.2. Makrodiluciona metoda	65
4.2.14.3. Metoda mikroatmosfera.....	66
4.2.14.4. Metoda aromatične komore	66
4.2.14.5. Test produkcije mikotoksina.....	67
4.2.15. Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskog ulja i dima tamjana <i>in situ</i>	68
4.2.16. Statistička obrada rezultata	70
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	71
5.1. Stanje zidnih slika naosa i egzarteksa.....	71
5.2. Deterioracija zidnih slika detektovana mikroskopijom <i>in situ</i>	76
5.3. Mikroklima naosa i sadržaj vode u zidovima.....	78
5.4. Detekcija korišćenih slikarskih pigmenata.....	85
5.5. Rasoljavanje i analiza soli na zidnim slikama naosa.....	90

5.6. Diverzitet i sezonska dinamika mikromiceta izolovanih sa bojenog sloja zidnih slika naosa i egzonerterksa.....	95
5.6.1. Morfo-fiziološke promene izolata sa bojenog sloja zidnih slika.....	105
5.7. Diverzitet i sezonska dinamika propagula mikromiceta u vazduhu naosa i egzonerterksa	108
5.8. Diverzitet fungalnih propagula i aktivno rastućih mikromiceta na zidnim slikama i fasadi	122
5.9. Cijanobakterije i alge prisutne na zidnim slikama i fasadi	137
5.10. Stepen kontaminacije bojenog sloja zidnih slika naosa („Zone čistoće”)	142
5.11. Fungalna kolonizacija i deterioracija modela zidne slike u eksperimentalnim uslovima	148
5.12. Potencijal deterioracije odabranih mikromiceta <i>in vitro</i>	152
5.12.1. Produkcija kiselih i baznih metabolita	154
5.12.2. Sposobnost rastvaranja krečnog maltera.....	157
5.12.3. Sposobnost formiranja sekundarnih mikogenih minerala	160
5.12.4. Sposobnost proteolize kazeina	169
5.12.5. Sposobnost produkcije fungalnih pigmenata	173
5.13. Antifungalna aktivnost biocida i etarskih ulja	177
5.13.1. Antifungalna aktivnost BAC/FNP nanokompozita	178
5.13.1.1. Fizičko-hemijska karakterizacija nanokompozita	178
5.13.1.2. Antifungalna aktivnost nanokompozita	180
5.13.1.3. Morfo-fiziološke promene indukovane dejstvom BAC/FNP nanokompozita i biocida BAC.....	184
5.13.2. Efekat BAC/FNP nanokompozita na sintezu mikotoksina	189
5.13.3. Antifungalna aktivnost etarskih ulja tamjana i smirne.....	192
5.13.3.1. Antifungalna aktivnost etarskog ulja tamjana	193
5.13.3.1.1. Hemijski sastav.....	193
5.13.3.1.2. Antifungalna aktivnost.....	195
5.13.3.1.3. Antifungalna aktivnost isparljive faze	197
5.13.3.2. Antifungalna aktivnost etarskog ulja smirne	201

5.13.3.2.1. Hemijski sastav.....	201
5.13.3.2.2. Antifungalna aktivnost.....	203
5.13.3.3. Antifungalna aktivnost smeše etarskih ulja tamjana i smirne	205
5.13.4. Antifungalna aktivnost dima tamjana.....	206
5.13.4.1. Sastav dima i čađi.....	206
5.13.4.2. Antifungalna aktivnost dima <i>in vitro</i>	211
5.13.5. Antifungalna aktivnost dima i etarskog ulja tamjana, <i>in situ</i>	212
5.13.5.1. Antifungalna aktivnost dima	212
5.13.5.2. Antifungalna aktivnost etarskog ulja.....	213
5.14. Značaj i implementacija primenjenih metoda i rezultata u proces konzervacije zidnih slika u Srbiji	214
6. ZAKLJUČCI.....	219
7. LITERATURA.....	222

1. UVOD

1.1. Gljive između nauke i umetnosti

Sva umetnička dela su izložena invaziji mikroorganizama i podložna infestaciji. Od primitivnih ukrasa, od ljuštura puževa i školjki, sačinjenih pre 75,000 godina, preko prvobitnih skulptura i pećinskog slikarstva (40,000 p.n.e.), antičke, srednjovekovne, renesansne umetnosti, pa sve do savremene umetnosti 21. veka, kreativnost i personalni izraz majstora umetnika u velikoj meri podrazumevao je primenu široke palete prirodnih materijala. Boje su često pripremane mešanjem zemljanih pigmenata sa dodavanjem prirodnih veziva, poput ulja iz semena maka, konoplje i lana. Slikarska platna, na drvenim ramovima, su često premazivana lepkom iz zečije kože pre slikanja, dok su kamene i gipsane skulpture i drugi umetnički predmeti ulepšavani dodavanjem dekora izrađenih od tekstila, kože, slame, gline, kose, ili perja. Ovi materijali su veoma pogodni supstrati za rast mikroorganizama koji su sveprisutni u životnoj sredini, u vijabilnom ili dormantnom stanju i predstavljaju veliku opasnost za umetnička dela širom sveta. Suptilne promene, kao što su kratkotrajan porast vlažnosti, ili drastične, poput poplava, mogu dovesti do razvoja mikroorganizama na umetničkim delima u veoma kratkom vremenskom periodu. U ovakvim okolnostima multidisciplinarni pristup uz saradnju biologa i konzervatora/restauratora postaju presudni u procesu zaštite i očuvanja kulturnog nasleđa u najširem smislu.

Poslednjih nekoliko godina posebna pažnja u svetu pridaje se gljivama kao primarnim uzročnicima deterioracije umetničkih predmeta i kulturno istorijskih spomenika. Mada se do skoro smatralo da na Zemlji egzistira oko 1,5 miliona vrsta gljiva, savremene procene, bazirane na analizama molekula dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), sugerišu da carstvo gljiva može da broji i do 5,1 miliona vrsta (Blackwell, 2011). Gljive su kosmopolitski i ubikvitalni organizmi sposobni da kolonizuju veliki broj mikrostaništa. Usled izražene enzimске aktivnosti i

prilagođenosti rastu na supstratu sa niskim sadržajem aktivne vode u mogućnosti su da razgrade veliki broj organskih i neorganskih komponenti u sastavu predmeta i kulturnih dobara (Sterflinger, 2010). Usled neadekvatnih uslova čuvanja i održavanja, a kao posledica intenzivnog fungalnog rasta u uslovima povišene temperature (T) i relativne vlažnosti vazduha (RH) narušava se strukturni integritet i nastaju estetski neprihvatljive promene na kulturnim dobrima (Slika 1). Takođe, boravak u prostorima sa infestiranim umetničkim delima predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik, kako za posetioce i muzejsko osoblje, tako i za konzervatore i restauratore.



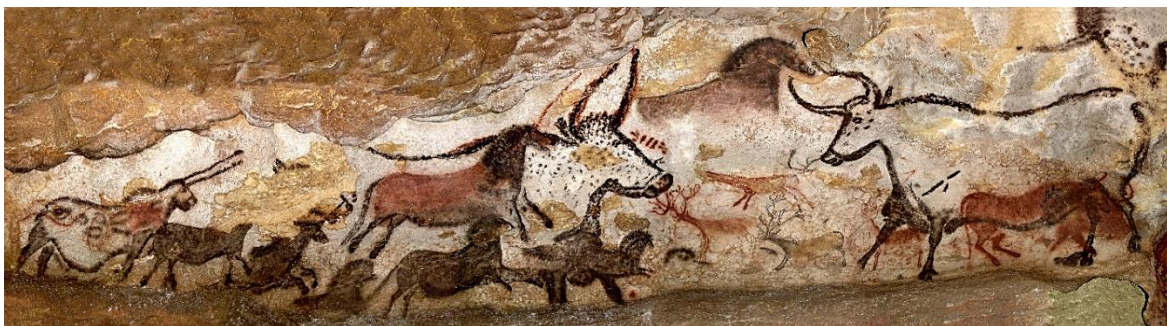
Slika 1. Kulturna dobra širom sveta infestirana mikromicetama i drugim mikroorganizmima

Do sada, jedan od osnovnih problema u radu sa kulturnim dobrima kontaminiranim sporama mikromiceta ili sa prisutnim simptomima porasta je bio nedovoljan nivo saradnje između naučnika – mikologa i konzervatora. Mada se veoma veliki broj gljiva karakteriše izraženim potencijalom deterioracije i patogenošću, to su činjenice koje nisu poznate mnogim konzervatorima, restauratorima i kustosima. Prema tome, danas, uspostavljanje saradnje mikologa i stručnjaka zaduženog za brigu

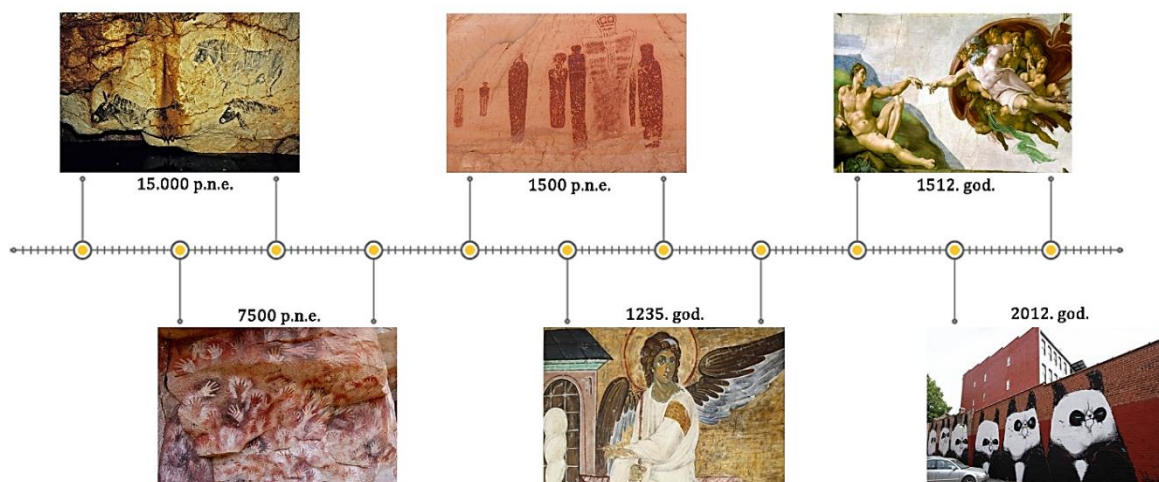
o umetninama, sa razmenom znanja i iskustava, predstavlja neophodan prvi uslov u pronalasku odgovarajućeg sredstva i metode za zaštitu od destruktivnog dejstva mikromiceta. Naravno, za uspešno sprečavanje fungalnog razvoja i saniranje nastalih problema neophodno je sprovesti istraživanja diverziteta i potencijala deterioracije prisutnih vrsta gljiva u svakom pojedinačnom slučaju.

1.2. Zidno slikarstvo – “majka umetnosti”

Zidno slikarstvo, kao forma umetničkog izražavanja ljudi iz praistorijskog doba i deo šamanističkih rituala nepoznate svrhe, vode poreklo iz perioda Paleolita. Prve poznate zidne slike, sa simboličnim predstavama lovaca i životinja, oslikane su na kamenu prirodnim pigmentima, u periodu između 15,000 i 10,000 godina p.n.e. na stenama u pećinama Lasko i Altamira (Slika 2) (Stanojević, 2014). Od tog perioda, do slika modernog doba, umetnički izraz mnogih naroda i kultura rezultovao je veoma bogatom zaostavštinom zidnog slikarstva širom sveta (Slika 3). Ova vredna umetnička dela zauzimaju važno mesto u riznicama kulturnog nasleđa raznih naroda i često se smatraju najvrednijom zaostavštinom čovečanstva sa neiscrpnim izvorom informacija za savremeno društvo.



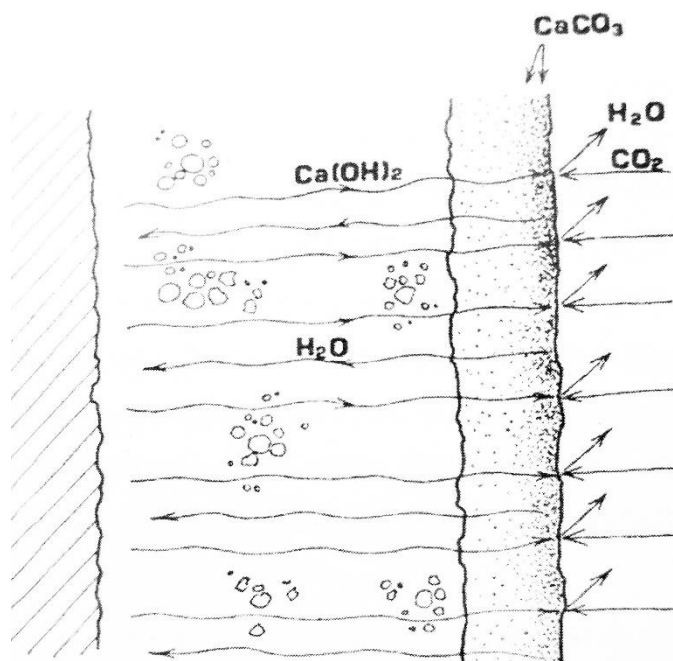
Slika 2. Predstave goveda, bizona i jelena na zidovima pećine Lasko u blizini Montinjaka, južna Francuska



Slika 3. Zidno slikarstvo od praiskona do danas

Danas se pod „zidnim slikarstvom“ podrazumevaju sve slikarske tehnike za ulepšavanje zidnih površina. Freskoslikarstvo, kao vid zidnog slikarstva, se uglavnom definiše kao tradicionalni postupak slikanja u kome se pigmenti, suspendovani u vodi ili ulju, nanose direktno na svež krečni malter (Garg i dr., 1995). Na osnovu arheoloških nalaza pretpostavlja se da su prve zidne slike, izvedene *al fresco* tehnikom na krečnom malteru, nastale u periodu između 1700. i 1450. godine p.n.e. u palatama u Knososu i Festosu (Krit, Grčka) (Stanojević, 2014). U zanatskom pogledu kritske freske se mogu meriti sa freskama nastajalim u slavnim vremenima Rima, Vizantije i Renesanse. Rađene su na malteru koji je u prvom sloju nanosa bio sačinjen od kreča i mermernog praha ili peska i gornjeg čisto krečnog sloja. O ovoj staroj tehnici slikanja ostali su pisani izvori u delima Vitruvija, Čeninija, Vazarija. Freska: “Radi se na malteru dok je svež i ne sme se napustiti dnevni deo dok nije završen...ona se sastoji u radu od jednog dana za razliku od drugih načina gde se doterivanje može vršiti dan za danom preko već završenog” (Vazari, 1961). Tokom dugog niza vekova, ova tehnika slikanja se prenela i na ceo evropski kulturni region i postepeno menjala u skladu sa potrebama, zadacima i zahtevima majstora određene epohe i regiona neretko zadržavajući samo suštinu izvorne tehnike - krečno vezivo u sastavu podloge i boja. Uprkos tome što nema univerzalno priznatog obrazloženja šta je zapravo freska i koje

se sve tehnike mogu uračunati u ovu vrstu zidnog slikarstva, danas se pod terminom *al fresco* uglavnom podrazumeva slikanje po svežoj krečnoj osnovi sa pigmentima zamešanim vodom bez dodatka veziva, ili bojama sa krečnim vezivom u sastavu (krečno testo ili krečna voda) (Komarov, 1989). Tokom procesa izrade zidnih slika, pigmenti pomešani sa vodom se nanose četkom na vlažan malter, ili premaz na krečnoj bazi, pri čemu sušenjem freske zasićen Ca(OH)_2 iz maltera migrira na površinu i reaguje sa CO_2 prisutnim u vazduhu vezujući nanete pigmente u CaCO_3 kristalnu rešetku (Slika 4).



Slika 4. Šema procesa vezivanja pigmentata tokom živopisanja zidnih slika. Preuzeto iz Mora i dr. (1984)

Termin "freska" vodi poreklo od izraza "*a fresco*" ili "*affresco*" što u prevodu znači "po svežem", tj. podrazumeva slikanje na svežem još vlažnom malteru. Pored termina *al fresco*, u upotrebi su i termini *buone fresco*, odnosno prava ili čista freska, čime se naglašava izrada u kojoj je vlažni krečni malter jedino vezivo za čestice pigmentata. *Al fresco* tehnika je najviše korišćena slikarska tehnika u freskoslikarstvu,

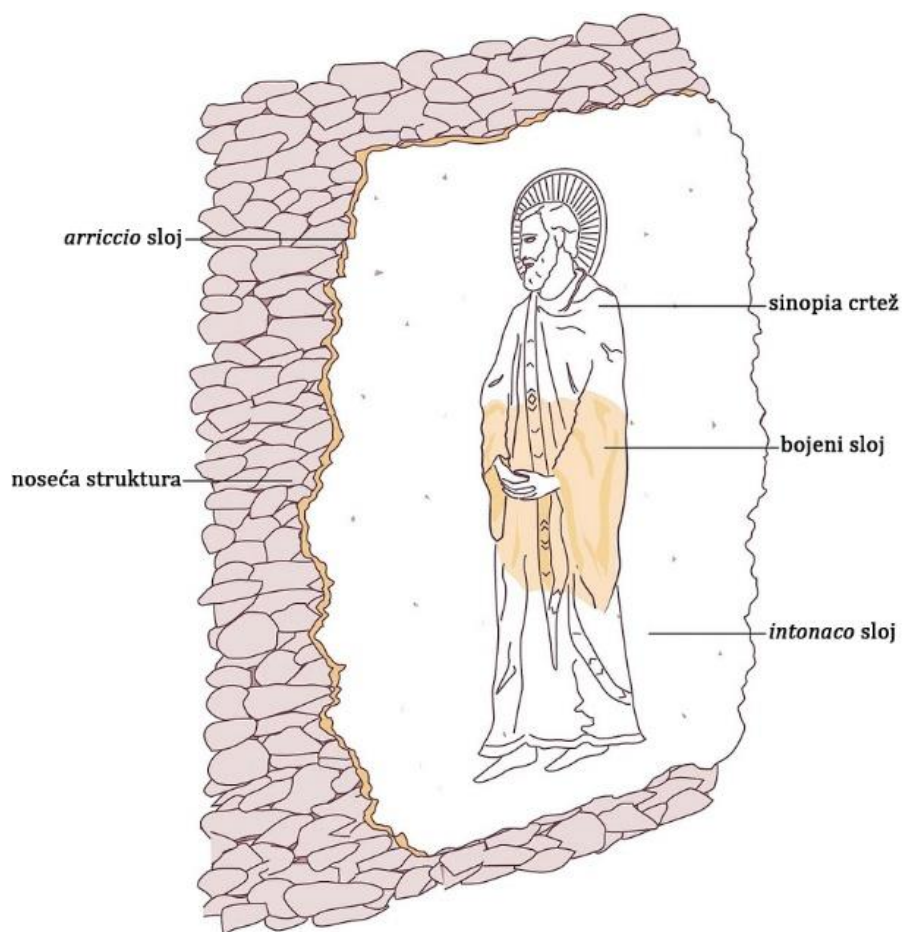
široko poznata na svim geografskim prostorima širom planete. U zavisnosti od veštine slikara, proces slikanja se morao dovršiti za kratko vreme, obično za 2 do 10 časova. Ako je bilo potrebno više vremena da se započeta slika dovrši, vreme vezivanja se produžavalo dodatnim vlaženjem maltera (Žikić, 2014).

Nasuprot *al fresco* tehnici, *fresco a secco* tj. *al secco* tehnika izrade zidnih slika, poznata i kao tempera ili fresko na suvo, podrazumeva slikanje sa prethodno zamešanim bojama po suvom malteru (Stanojlović, 2014). Malter za podlogu zidne slike pripreman je na različite načine, često uz upotrebu raznorodnih materijala - punioca u vidu armature ili radi poboljšanja fizičkih i mehaničkih karakteristika maltera. Poznato je da su pored osnovnih sastojaka kreča i peska, dodavani mlevena opeka, tufovi, seckana slama, pleva, kučina, krv, brašno, jaja, životinjska dlaka i dr. Malter se aplicirao na zidnu površinu, arhitektonsku strukturu sačinjenu od kamena ili opeke ili u njihovoj alternaciji. Kao horizontalno ojačanje zidnih površina ne retko se javljaju drvene grede, santrači. Boje su pripremane mešanjem mineralnih pigmenata sa organskim vezivom: uljem, smolom, voskom, žumancetom, belancetom, žuči, urinom, lakom, kazeinom, skrobom, brašnom, šećerom, medom, alkoholom, mašću, krvlju, i mnogim drugim prirodnim vezivima (Ciferri, 1999; Daniilia i dr., 2007; Sterflinger, 2010). Među navedenim vezivima, neka su korišćena i tokom izrade zidnih slika *al fresco* tehnikom, posebno kada se radilo sa "problematičnim" pigmentima. Međutim, te zidne slike nisu tempera jer su rađene na svežem malteru i vezivanje pigmenata se u potpunosti zasnivalo na procesu obrazovanja kristala karbonata tokom sušenja maltera.

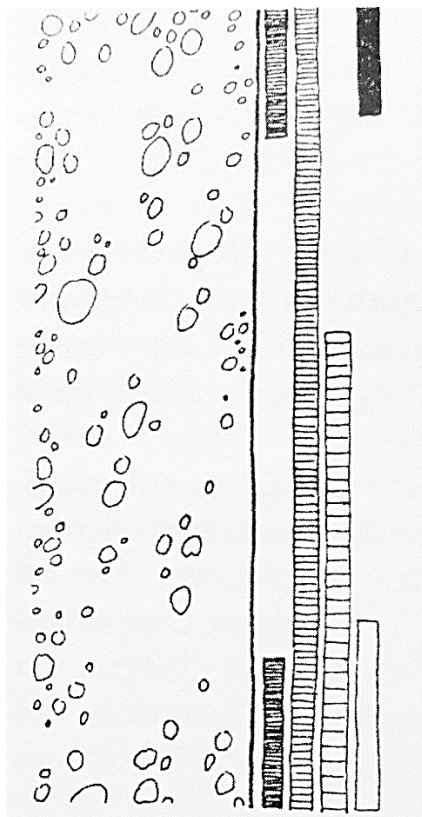
Tipična zidna slika, bez obzira na tehniku izrade, sačinjena je od 3 celine, svaka sa svojom ulogom, debljinom i tehnikom izrade (Karbowska-Berent, 2003; Tripković, 2014) (Slika 5):

- ✚ noseća struktura: uglavnom cigleni zid, ređe zid od krečnjaka, cementa, drveta, ili mermera;

- ✚ premaz: zidne slike se uglavnom rade na mineralnom malteru, sačinjenom od kreča i peska pomešanog sa vodom, a ponekad uz dodatak gipsa i punioca, kao što su pumica ili mermerni prah. Ova celina je sastavljena od 2 sloja:
 - *arriciato* (*arriccio*): unutrašnji, grublji, i deblji sloj bogat peskom;
 - *intonaco*: spoljašnji, tanji, i glađi sloj, sačinjen od maltera, a često sadrži jednake količine kreča i peska. Na njemu se slika;
- ✚ bojeni sloj: 50-500 µm debljine, urađen mnogobrojnim tehnikama. Bojeni sloj čine originalno postavljeni višestruki slojevi boja. Sačinjen je od pet stratigrafski posebnih odrednica (Slika 6) (Mora i dr., 1984).



Slika 5. Stratigrafija zidne slike u *al fresco* tehnici



Slika 6. Šema poprečnog preseka bojenog sloja i podloge zidnih slika. Preuzeto iz Mora i dr. (1984)

Proučavanjem tehnika izrade zidnih slika širom sveta, analizom preseka fragmenata bojenog sloja i podloge, zaključeno je da se zidne slike na Istoku uglavnom karakterišu jasnim razdvajanjem maltera i bojenog sloja, što je svojstveno tempera slikarstvu. Nasuprot tome, u zapadnjačkim kulturama zidne slike su prevashodno rađene *al fresco* tehnikom, tj. uočava se da pigmenti delimično prožimaju donje slojeve (Han i dr., 2013). Prema Stanojeviću (2014) neki autori pogrešno navode da je srpsko srednjovekovno zidno slikarstvo tempera, u našoj i drugim zemljama iz okruženja zidno slikarstvo se primarno izvodilo *al fresco* tehnikom, sa dostizanjem vrhunca izrade u periodu između 12. i 14. veka. Dobar primer tehnološkog i umetničkog savršenstva zidnog slikarstva tog perioda čine zidne slike manastira Sopoćani, svrstane u sam vrh svetske umetničke baštine (Stanojević, 2014). Srpski narod je od

predaka nasledio zidne slike kao jedan od osnovnih elemenata nacionalne kulturne baštine, sa ukupnom površinom koja po nekim procenama iznosi i preko 100 000 m² (Stanojlović, 2014).

S obzirom na sve navedeno, neophodna su temeljna i sveobuhvatna proučavanja kako bi se sprovedo delotvorno i dugotrajno očuvanje izuzetnog, velikog i neponovljivog nasleđa zidnog slikarstva. Treba imati u vidu da su zidne slike, kao vid umetnosti, jedinstvene i da je najčešće unutrašnji arhitektonski nadčulni prostor nastajao u sadejstvu simboličkih oblika arhitektonskih struktura i zidnih slika. Prema tome, propadanje fresaka neminovno utiče na estetičku i strukturnu stabilnost same građevine, pa je neophodno da se preduzmu adekvatne mere za očuvanje zidnih slika i građevine čije su integralni deo. Zidne slike su kompleksan polu-zatvoren tip staništa, na prelazu atmosfere i kompaktnog višeslojnog supstrata bogatog organskim i neorganskim komponentama, sa mikrobiotom zatvorenom u relativno stabilan mezosistem izolovan od uslova spoljašnje sredine (Gorbushina i Petersen, 2000; Gorbushina i dr., 2004). U ovom mikroekosistemu mogu se naći predstavnici svih pet carstava i tri domena života, od kojih se po izraženim sposobnostima deterioracije naročito izdvajaju predstavnici Petog carstva - Fungi (Gorbushina i Petersen, 2000).

1.3. Zidne slike kao stanište mikromiceta

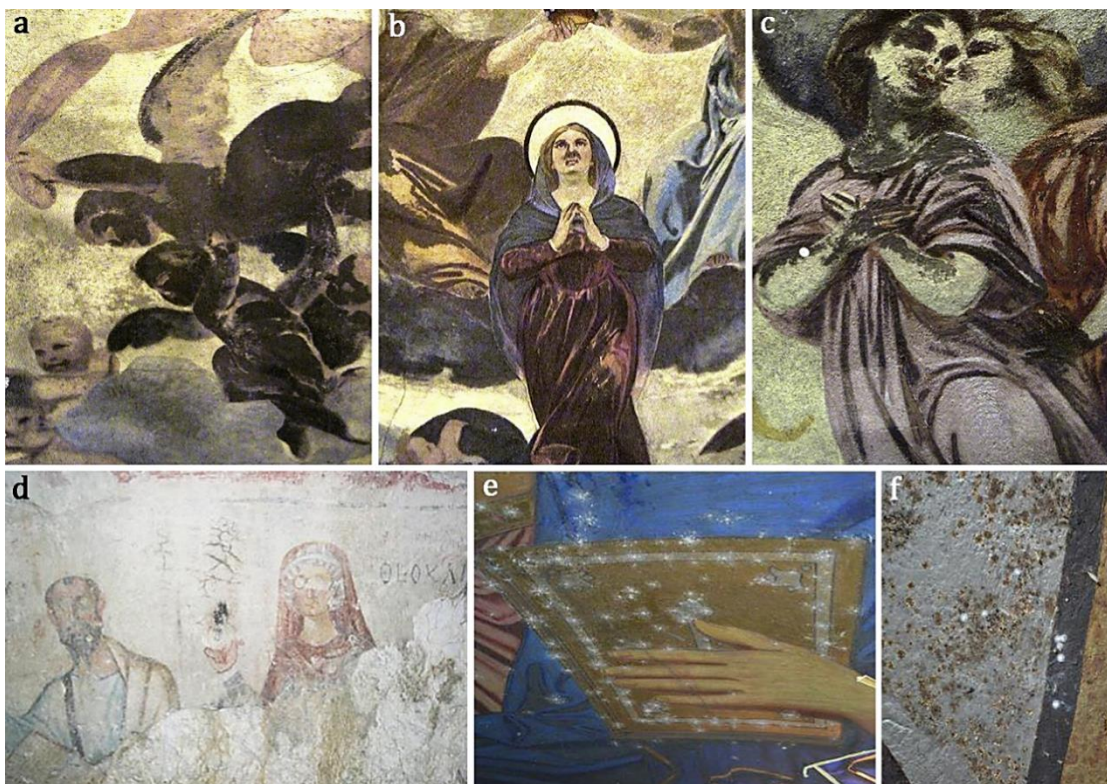
Bojeni sloj i podloga zidnih slika, mada u ekološkom smislu ekstremni tipovi staništa, smatraju se veoma pogodnim i bioreceptivnim supstratima za rast mikromiceta. Prema Milanesi i dr. (2006a) ovo je posledica mineralnog sastava i porozne prirode krečnog maltera, i činjenice da organske i neorganske komponente bojenog sloja predstavljaju nišu za razvoj širokog spektra heterotrofnih mikroorganizama. Propagule gljiva na površinu zidnih slika dospevaju iz pet glavnih izvora (Garg i dr., 1995):

- ✚ kontaminiranog vazduha u kontaktu sa zidnim slikama;
- ✚ sa posetioca i crkvenog osoblja;

- ✚ kontaminiranih konzervatorskih instrumenata;
- ✚ zemljišta i biljaka iz neposredne okoline objekta; i
- ✚ unutrašnjih žarišta.

Glavni izvor kontaminacije zidnih slika je vazduh, s obzirom na to da spore za seksualno i aseksualno razmnožavanje, hlamidospore i fragmenti hifa i konidiofora čine primarnu komponentu bioaerosola. To je i osnovni razlog zašto se povećana raznovrsnost fungálnih spora može gotovo uvek zabeležiti na zidnim slikama u blizini prozora i vrata, ukazujući na presudan značaj kruženja vazduha u procesu taloženja spora na površinu bojenog sloja (Saarela i dr., 2004). Ako se ima u vidu vazduh, kao glavni izvor fungálnih propagula, mikrobiota zidnih slika u većini slučajeva se podudara sa aeromikrobiotom (Sterflinger i Piñar, 2013). Nasuprot vazduhu, redovni posetioци crkve i crkveno osoblje ne doprinose u značajnoj meri povećanju brojnosti koliko dovode do porasta raznovrsnosti mikromiceta (Saarela i dr., 2004).

Uprkos opsežnom poznavanju mogućih izvora kontaminacije zidnih slika, sve faze složenog mehanizma naseljavanja bojenog sloja, od strane mikromiceta, su i dalje nepoznate. Nepoznavanje svih faza kolonizacije zidnih slika i faktora koji utiču na sam proces je posebno izraženo u slučajevima kada u identičnim uslovima sredine jedna zidna slika biva visoko kontaminirana i sa vidnim porastom, dok druga, nekoliko metara dalje, ostaje "netaknuta" (Giustetto i dr., 2015). Međutim, generalni tok procesa je poznat i započinje kontaktom propagula sa bojenim slojem. U narednih 48 do 72 h, u nepromenjenim uslovima sredine, spore klijaju, obrazuje se micelija i dolazi do sporulacije, a aktivnim oslobađanjem spora kontaminiraju se površine u neposrednoj blizini primarnog žarišta (Garg i dr., 1995). Ovo za posledicu ima vidljiv porast kolonija gljiva na bojenom sloju zidnih slika (Slika 7).



Slika 7. Kolonije mikromiceta na zidnim slikama: **a-c.** kupole Svetilišta Gospe od Piona u Moretu; **d.** Paulus pećine u Efesu; **e-f.** crkve Sv. Đorđa u Kairu. Slike preuzete iz Sterflinger i Piñar (2013); Abd El-Tawab i dr. (2014); Giustetto i dr. (2015)

Da li će određena gljiva moći da kolonizuje bojeni sloj zidnih slika zavisi od ekoloških i fizioloških zahteva date vrste. Ukoliko su zahtevi ispunjeni proces je dalje pod kontrolom tri glavna faktora: dostupnosti nutrijenata, relativne vlažnosti vazduha i temperature (Sterflinger, 2010). Poreklo nutrijenata vezano je za (Heyn i dr., 1995; Ciferri, 1999; Warscheid, 2003; Sterflinger, 2010; Miličić, 2014; Stanojević, 2014):

- ✚ dodatke (pleva, pšenična pasta, ječmene pahuljice, životinjske dlake, vlakna konoplje i lana, belance, ulja, masti) pomešane sa mineralnim i kompleksnim puniocima od seckane slame i krečnim malterom;

- ✚ dodatke korišćene pri spravljanju maltera (tečne smole, katran, polimerni lateks, emulzije, bitumen, mleko, maslinovo i laneno ulje, svinjska mast, životinjska krv);
- ✚ veziva biljnog i životinjskog porekla pomešana sa pigmentima pri pravljenju boja;
- ✚ kazein, paraloid smeše, fiksative i konsolidante na bazi polimernih komponenti (celulozni acetati, polivinil acetat, polimetil akrilat itd.) koji se primenjuju prilikom restauratorskih radova.

Takođe, Petersen i Hammer (1992) ističu da rastvori amonijum karbonata i hidroksipropil celuloze, korišćeni za čišćenje zidnih slika, mogu biti izvori ugljenika i azota za rast mikromiceta. S obzirom na to da većina gljiva primarno koristi organska veziva bojenog sloja dugo se verovalo da zidne slike rađene *al fresco* tehnikom nisu podložne fungalnoj kolonizaciji. Međutim, danas se pouzdano zna da su izvor nutrijenata za rast gljiva na zidnim slikama i organske materije deponovane u prašini, prirodna veziva iz boja korišćenih za doslikavanja oštećenih motiva slika, kao i atmosferski ugljovodonici prirodnog i antropogenog porekla (Wainwright i dr., 1993; Garg i dr., 1995). Prema López-Miras del Mar i dr. (2013) organski biocidi naneti na površinu bojenog sloja takođe predstavljaju potencijalni izvor nutrijenata. S druge strane, Sáiz-Jiménez i Samson (1981b) i Karpovich-Tate i Rebrikova (1990) smatraju da su zbog jako niskih nutritivnih zahteva, primarni kolonizatori zidnih slika uvek nitrifikacione i sumporne bakterije. Prema ovim autorima, posledica metaboličke aktivnosti i lize bakterija je akumulacija organskih materija, polisaharida levana i dekstrana, neophodnih za rast mikromiceta. Dodatno, Ciferri (1999) smatra da gljive prisutne na površini, a koje ne učestvuju u procesu biodeterioracije zidnih slika, verovatno rastu samo na račun trofičkih odnosa sa bakterijama. Nasuprot zidnim slikama unutar sakralnih objekata, primarni kolonizatori bojenog sloja zidnih slika na fasadama su fototrofni mikroorganizmi. U uslovima dostupne svetlosti i CO₂,

procesom fotosinteze nastaju neophodni metaboliti za rast mikromiceta i drugih heterotrofnih mikroorganizama (Saarela i dr., 2004).

U poređenju sa izvorima ugljenika i azota, za rast na bojenom sloju ili u podlozi od većeg značaja je vlažnost supstrata (Weirich, 1989; Petersen i dr., 1995). Atmosferska vlaga i vlaga u zidu i prašini su primarni izvori vode neophodni za rast i razmnožavanje mikromiceta kolonizatora zidnih slika. Dostupnost vode u supstratu je blisko povezana sa karakteristikama građevine kao što su prisustvo termičke izolacije i strukturnih oštećenja, ali zavisi i od uzlaznog kretanja podzemnih voda kroz kapilare u zidovima, i od kondenzacije vlage iz toplog vazduha na hladnu površinu zidnih slika (Sterflinger, 2010). Optimalni uslovi za rast većine mikromiceta podrazumevaju relativnu vlažnost vazduha preko 70%, odnosno sadržaj aktivne vode u supstratu (a_w) u vrednosti od 0,7 do 0,85 za klijanje spora i između 0,85 i 0,95 za aktivan rast (Garg i Dhawan, 1994; Karbowska-Berent, 2003). Međutim, gljive su u mogućnosti da uslove promenljive RH prevaziđu stvaranjem sopstvene mikroklimе na određeni vremenski period, dok dostupnost organskih komponenti unutar bojenog sloja i optimalne temperature za rast može povećati otpornost mikromiceta na uslove nedostatka vode putem povećanja sinteze vode u respiratornim procesima (Florian, 2002; Martens, 2012). Pored toga, u uslovima smanjene vlažnosti, stvaranjem invazivnih hifa (haustorija) kao odbrambenog mehanizma, mikromicete prodiru u supstrat, izazivajući destrukciju zidnih slika (Milanesi i dr., 2006b). Osim nedostatka vode, kratkotrajni uslovi povećane vlažnosti su takođe faktor rizika, pošto gljive mogu veoma brzo apsorbovati vlagu i započeti rast (Martens, 2012).

U pogledu značaja temperature za naseljavanje zidnih slika, mnogi autori smatraju da ona ima veću ulogu od dostupnosti nutrijenata, a manju od vlažnosti supstrata i RH (Garg i dr., 1995; Petersen i dr., 1995). Međutim, efekat temperature na rast mikromiceta na zidnim slikama je slabo proučen. Poznato je da niže temperature inhibiraju fungalni rast, dok na višim temperaturama relativna vlažnost vazduha ima veći značaj (Karbowska-Berent, 2003). Optimalne temperature za rast većine

mikromiceta su u opsegu od 20 do 35 °C. Pored toga što direktno utiču na rast, promene temperature određuju a_w zidnih slika pri datom sadržaju vode. S druge strane, u uslovima visoke relativne vlažnosti ili povećanog sadržaja vode u supstratu, gljive lakše tolerišu odsustvo optimalne temperature za rast na zidnim slikama.

1.4. Mikrobiota zidnih slika

Raznovrsnost komponenti bojenog sloja i podloge uslovljava veliko bogatstvo mikrobiote zidnih slika. Pošto u sastavu bojenog sloja i maltera dominiraju neorganske komponente, mikrobiota formirana na ovom tipu supstrata razlikuje se u velikoj meri od zajednice formirane na drugim oslikanim predmetima i kulturnim dobrima (Ciferri, 1999). Takođe, zbog velike raznovrsnosti pigmentata korišćenih tokom živopisanja, Giustetto i dr. (2015) navode da se heterogeno pigmentisane zone bojenog sloja zidnih slika mogu smatrati selektivnim podlogama koje uslovljavaju razvoj posebne mikrobiote. Položaj zidnih slika u odnosu na izvore vlage i toplote takođe utiču na sastav zajednice mikromiceta. Pored toga, ograničena zapremina vazduha crkve sadrži znatno manju raznovrsnost i broj fungalnih propagula, u poređenju sa vazduhom spoljne sredine, pa su promene sastava zajednice uglavnom posledica međusobnih interakcija članova mikrobiote. S druge strane, zidne slike na fasadi crkve su izložene visokim dozama UV zračenja, i dnevnim i sezonskim promenama temperature i vlažnosti vazduha, pa ovi ekstremni uslovi sredine uslovljavaju potpuno drugi sastav mikrobiote (Gorbushina i dr., 2004).

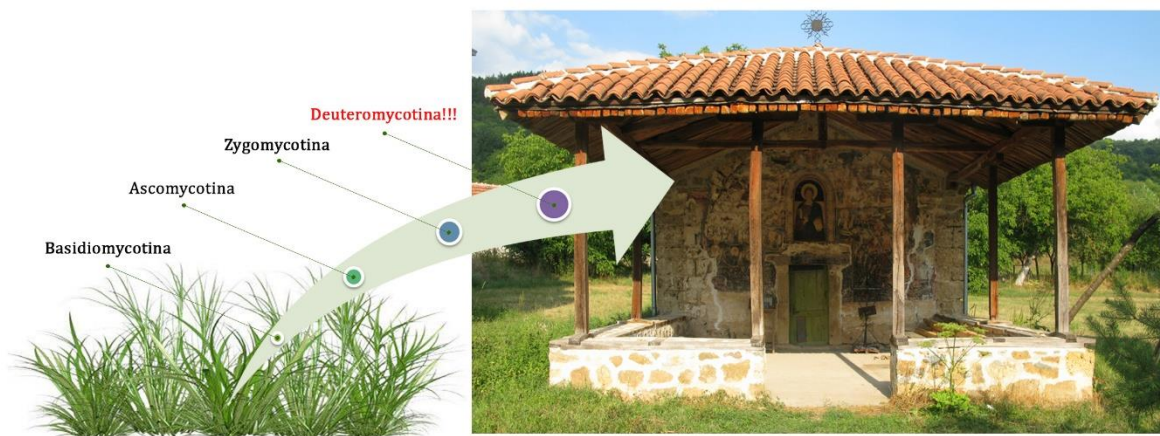
Nakon početnih faza kolonizacije bojenog sloja, na zidnim slikama se uspostavlja pionirska fungalna zajednica, kao osnovni preduslov za sve naredne ekološke sukcesije. Sve dalje kvalitativne i kvantitativne promene u sastavu mikrobiote se dešavaju pod uticajem biotskih i abiotičkih faktora. Primarni kolonizatori rastom, lučenjem produkata metabolizma, potpunom ili delimičnom razgradnjom komponenti supstrata i zadržavanjem vode u značajnoj meri menjaju karakteristike zidnih slika, čime one postaju dostupne za veći broj vrsta (Karbowska-Berent, 2003). Ukoliko su

zidne slike bogate nutrijentima, primarni kolonizatori su brzorastuće vrste koje koriste lako razgradive organske komponente. Nakon iscrpljivanja prostih šećera sukcesija u mikrobioti se kreću ka uspostavljanju dominacije zajednica sposobnih za korišćenje složenih jedinjenja. Nasuprot zidnim slikama unutar crkve, na bojenom sloju zidnih slika fasada ekstremni uslovi sredine igraju mnogo veću ulogu i dovode do brze smene u sastavu primarne zajednice u korist uspostavljanja tamno pigmentisanih, spororastućih, kvasolikih formi, sa somatskim strukturama visoko adaptiranim na uslove stresa (Dornieden i dr., 2000). Bez obzira na to da li su u pitanju zidne slike na malteru ili fasadi, najveća raznovrsnost mikromiceta se uvek može naći u početnim fazama kolonizacije. Vremenom diverzitet opada, pa su samo određeni, visoko specijalizovani članovi mikrobiote prisutni u kasnim fazama i odgovorni za nastanak većine oštećenja.

Primenom tradicionalnih i metoda baziranih na analizama sekvenci molekula DNK ustanovljeno je da su dominantne komponente fungalne zajednice oštećenih zidnih slika predstavnici sve tri klase podrazdela Deuteromycotina (Garg i dr., 1995; Ciferri, 1999; Gorbushina i Petersen, 2000; Gorbushina i dr., 2004; Saarela i dr., 2004; Ravikumar i dr., 2012; itd.) tj. vrste rodova *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Engyodontium*, *Epicoccum*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gliomastix*, *Phoma*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium*, *Sporotrichum*, *Stachybotrys*, *Stemphylium*, *Trichoderma*, *Trichotecium*, *Ulocladium* i *Verticillium*.

Predstavnici podrazdela Zygomycotina, Ascomycotina i Basidiomycotina su znatno ređi, i samo su sporadično zabeleženi na zidnim slikama. Osim *Chaetomium* i *Eurotium* vrsta, podrazdela Ascomycotina, teleomorfi se veoma retko detektuju na devastiranim zidnim slikama (Sterflinger, 2010). S druge strane, vrste podrazdela Basidiomycotina, mada su česte na drvenim sakralnim predmetima u crkvi, retko su kada zabeležene na zidnim slikama (Ripka, 2005). Gljive podrazdela Zygomycotina, vrste rodova *Mucor* i *Rhizopus*, česti su kontaminanti zidnih slika, ali se smatraju samo

tranzientima, bez direktne uloge u procesu biodeterioracije zidnih slika (Ravikumar i dr., 2012). Bez obzira na taksonomsku pripadnost, mikromicete, kolonizatori površina zidnih slika, poreklo vode sa biljaka i iz zemljišta neposredne okoline istraživanih kulturnih dobara (Garg i dr., 1995; Ciferri, 1999; Gorbushina i dr., 2004; Pepe i dr., 2010) (Slika 8).



Slika 8. Glavni izvor mikromiceta kolonizatora fasade i zidnih slika sa rasporedom podrazdela po dominantnosti

Uprkos tome što su izvori i raznovrsnost mikromiceta kolonizatora zidnih slika dobro poznati, mali broj autora se bavio proučavanjem kompleksnih i slabo poznatih mehanizama nastanka oštećenja zidnih slika kao posledice rasta i metabolizma gljiva (Sterflinger, 2010; Sterflinger i Piñar, 2013). Opisani mehanizmi, mada generalno poznati, nisu u potpunosti razjašnjeni, uglavnom usled nemogućnosti proučavanja procesa biodeterioracije bez narušavanja strukturnog integriteta zidnih slika i zbog nekompletnog poznavanja potencijala gljiva za razgradnju specifičnih supstrata.

1.5. Potencijal i mehanizmi fungalne deterioracije zidnih slika

Dugo se verovalo da su mikroklimatski faktori (T, RH), neorganske soli, depoziti čađi i prašine, i atmosferska zagađenja, glavni uzročnici oštećenja zidnih slika

(Garg i dr., 1995; Dornieden i dr., 2000). Gettens i dr. (1941) su među prvima istakli da propadanje umetničkih dela može da nastane i usled rasta i metabolizma „malih parazitskih biljaka“ tada označenih kao plesan ili buđ. Međutim, tek šezdesetih godina prošlog veka, Tonolo i Giacobini (1961) su potvrdili, na primeru fresaka oštećenih rastom i metabolizmom vrsta gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cephalosporium*, algi klase Chlorophyceae kao i filamentoznih bakterija roda *Streptomyces*, da mnogi mikroorganizmi zaista mogu biti uzročnici simptoma deterioracije zidnih slika. Da li su abiotski ili biotski faktori, dominantan uzrok nastanka oštećenja još uvek nije u potpunosti poznato, međutim, danas je široko prihvaćeno mišljenje da mikroorganizmi u sadejstvu sa abiotskim faktorima životne sredine, predstavljaju primarni uzrok ubrzanog propadanja fresaka (Dornieden i dr., 2000). Od bioloških agenasa, gljive su ne samo glavni kolonizatori bojenog sloja zidnih slika, već su i usled izražene enzimske aktivnosti, sposobnosti rasta na supstratu sa niskim sadržajem vode i održavanja metabolizma u nepovoljnim uslovima životne sredine, u mogućnosti da razgrade veliki broj organskih i neorganskih komponenti u bojenom sloju i malteru (Sterflinger, 2010). Međutim, mikromicete su retko samostalni uzročnici nastanka promena na zidnim slikama i uglavnom su nastala oštećenja posledica međusobnih interakcija gljiva sa drugim mikroorganizmima: bakterijama, cijanobakterijama, algama, lihenizovanim gljivama i ponekad virusima (Giustetto i dr., 2015). Zajedno ovi mikroorganizmi imaju od 100 do 1000 puta veću razornu aktivnost u poređenju sa abiotskim faktorima sredine (Aghamiri i Schwartzman, 2002; Dakal i Arora, 2012).

Kao što je već navedeno, na zidnim slikama se može dokumentovati prisustvo velikog broja vrsta mikromiceta. Međutim, samo određene vrste, konstituenti mikrobiote, su odgovorni za nastanak promena na bojenom sloju i malteru. Kada se govori o čestim kolonizatorima, vrste rodova *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Penicillium* i *Trichoderma* smatraju se glavnim uzročnicima procesa biodeterioracije (Ravikumar i dr., 2012). Usled aktivnosti ovih, kao i mnogih

drugih mikromiceta, na zidnim slikama nastaju mehaničke, hemijske i estetske promene (Slika 9) (Allsopp i dr., 2004).

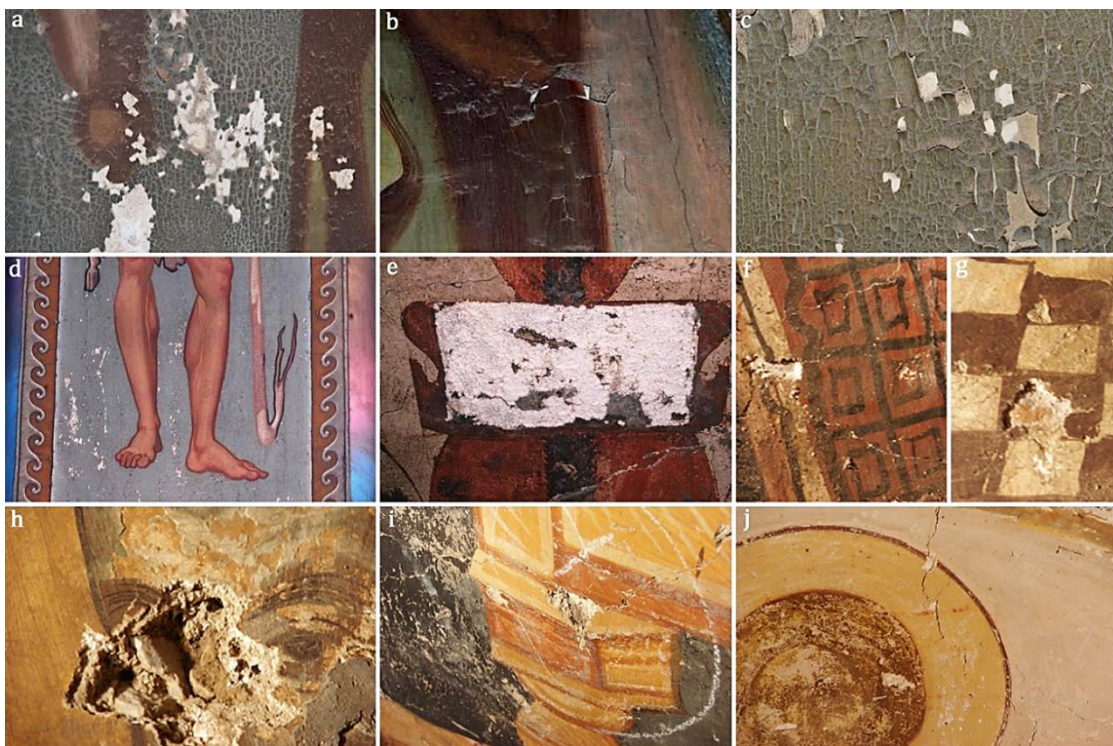


Slika 9. Promene na zidnim slikama uzrokovane rastom i produktima metabolizma mikromiceta

Mehaničke promene na zidnim slikama nastaju kao posledica fungalnog rasta, ali bez korišćenja supstrata za ishranu (Morton i Surman, 1994). Gljive penetracijom hifa u supstrat, formiranjem plodonosnih tela i modifikacijom micelije dovode do porasta pritiska u supstratu, čime se povećava poroznost, proširuju postojeće pukotine i formiraju naprsline u bojenom sloju i malteru. Pored toga, mehanička oštećenja zidnih slika mogu nastati i usled promene volumena hifa, pri učestalim promenama vlažnosti (Dakal i Cameotra, 2012). Ove promene mogu biti lokalizovane i duboko u supstratu, na 10 mm ispod površine gde je štetan efekat jači u poređenju sa promenama na površini (Karbowska-Berent, 2003). Prema Dornieden i dr. (2000) oštećenja na bojenom sloju i podlozi zidnih slika izazvana mehaničkom aktivnošću mikromiceta su od većeg značaja za očuvanje strukturnog integriteta zidnih slika u poređenju sa promenama izazvanim faktorima sredine i hemijskom aktivnošću gljiva.

Promene na zidnim slikama, uzrokovane hemijskom aktivnošću gljiva, mogu se grubo podeliti na one izazvane hemijskom asimilacionom i hemijskom disimilacionom aktivnošću.

Hemijska asimilaciona aktivnost gljiva podrazumeva korišćenje komponenti supstrata kao izvora nutrijenata (Garg i dr., 1995). Ekstracelularni enzimi mikromiceta razlažu veziva bojenog sloja i organske komponente maltera na prostije molekule, čime je moguće njihovo usvajanje i lakša penetracija hifa u supstrat, a što za posledicu ima slabljenja vezivne komponente (pucanje i ljušpanje bojenog sloja i krečnog maltera) (Slika 10). Glavni enzimi uključeni u procese razgradnje komponenti bojenog sloja su β -glukozidaze, fosfataze, lipaze, arilsulfataze, esteraze, proteaze i endo-N-acetil-P-D-glukozamidaze (López-Miras del Mar i dr., 2012; Rosado i dr., 2013c). Fosfataze, arilsulfataze i β -glukozidaze vrše transformacije u komponentama na bazi fosfora, sumpora i ugljenika. Lipaze hidrolizuju veze triacilglicerola, proteaze započinju proteinski katabolizam hidrolizom peptidnih veza između aminokiselina u polipeptidnim lancima, dok esteraze deluju samo na komponente supstrata rastvorljive u vodi. S druge strane, endo-N-acetil-P-D-glukozamidaze ne deluju na komponente zidnih slika, već vrše hidrolizu glikozidnih veza između endo-N-acetil-P-D-glukozamskih ostataka i susednih monosaharida, čime se razlažu murein i hitin u sastavu ćelijskih zidova prisutnih bakterija i gljiva. Narušena struktura ćelijskog zida uzrokuje lizu ćelija i oslobađanje intracelularnog sadržaja čime se obezbeđuju neophodne organske materije za rast mikromiceta. Međutim, mnogi od oslobođenih metabolita, takođe, interaguju sa brojnim komponentama zidnih slika, što dovodi do nastanka neželjenih promena (López-Miras del Mar i dr., 2013).



Slika 10. Pucanje, ljušpanje i gubitak fragmenata bojenog sloja i podloge zidnih slika: **a-d.** crkve Sv. Đorđa u Kairu; **e.** vile Papiri u Herkulanumu; **f-j.** crkvama Sv. Nikole i Sv. Đorđa od Planine na Kritu. Slike preuzete iz Iordanidis i dr. (2011); Abd El-Tawab i dr. (2014); Amadori i dr. (2015)

Hemijska disimilaciona aktivnost mikromiceta podrazumeva sintezu, lučenje i interagovanje fungalnih metabolita, uglavnom organskih kiselina i pigmentata, sa organskim i neorganskim komponentama bojenog sloja i podloge što dovodi do promena u osobinama supstrata (Sayer i Gadd, 2001). Organske kiseline sintetisane tokom primarnog metabolizma gljiva rastvaraju neorganske boje i heliraju neke jone metala prisutne u malteru i nekim pigmentima, usled čega se formiraju minerali, soli i kompleksna jedinjenja. Formirani kristali soli dovode do porasta pritiska u porama, što za posledicu ima pucanje, ljuštenje, i gubitak fragmenata bojenog sloja i maltera (Piñar i dr., 2009). Prema Sáiz-Jiménez i Laiz (2000) promene su još više izražene kada u vlažnim uslovima sredine soli kristališu i rekristališu u hidrate i stvore dodatni

pritisak. Pored toga, soli snižavaju viskozitet matriksa ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) i stimulišu formiranje površinskih neravnina koje služe kao pogodna mesta za naseljavanje heterotrofnih mikroorganizama, čime se povećava bioreceptivnost zidnih slika (Giullitte, 1995; Roldán i dr., 2003). U navedenim uslovima, dolazi do nekontrolisanog formiranja biofilma i ubrzavanja hemijske disimilacione aktivnosti kroz oksidaciju, redukciju i transformaciju jona metala, primarno Fe i Mn, ali i As, Pb, Cu, Zn i Hg, prisutnih u pigmentima, čime se menja originalna obojenost bojenog sloja (Urzì i Realini, 1998; Gorbushina i dr., 2004). Takođe, CO₂, produkovan tokom respiratornog metabolizma, u uslovima visoke vlažnosti transformiše se u ugljenu kiselinu (H₂CO₃) koja rastvara CaCO₃ i MgCO₃ iz maltera i formira u vodi lako rastvorne Ca(HCO₃)₂ i Mg(HCO₃)₂ (Garg i dr., 1995). Pored kiselina, fungalni pigmenti sekretovani na površinu zidnih slika dovode do promena u originalnoj obojenosti, što zavisi od hemijskog sastava pigmenta, uslova sredine i interakcija sa komponentama supstrata (Garg i dr., 1995) (Slika 11). Ove promene se jako teško saniraju, s obzirom na to da su fungalni pigmenti veoma stabilni i perzistiraju čak i kada producenti više nisu prisutni (Ettenauer i dr., 2014).



Slika 11. Promene originalne obojenosti zidnih slika i maltera: **a.** kapele Sv. Jovana u Štajerskoj; **b.** zamka Rapotenštajn u Rapotenštajnu; **c-d.** crkve Sv. Đorđa u Kairu. Slike preuzete iz Abd El-Tawab i dr. (2014); Ettenauer i dr. (2014)

Pored strukturnih promena, nastalih mehaničkom i hemijskom aktivnošću gljiva, rast mikromiceta dovodi i do narušavanja estetske vrednosti zidnih slika. Ove promene su međusobno uslovljene s obzirom na to da estetske promene često prethode strukturnim, dok strukturna oštećenja uvek za posledicu imaju i smanjenje estetske vrednosti zidnih slika. Do estetskog narušavanja zidnih slika može doći usled udruživanja gljiva sa drugim organizmima, kao što alge, bakterije, cijanobakterije i protozoe, u kompaktni trodimenzionalni EPS matriks - subaerialni biofilm (SAB) (Morton i Surman, 1994; Allsopp i dr., 2004; Gorbushina i Broughton, 2009). Udruživanje mikromiceta u SAB pruža mnogobrojne prednosti od kojih je najznačajnija formiranje barijere za antifungalne agense (Morton i Surman, 1994). Primarno, SAB samo estetski narušava izgled zidnih slika sakrivajući boje i oslikane motive, ali ne dovodi do promena u supstratu. Međutim, tokom vremena usled rasta i metabolizma mikroorganizama u sastavu biofilma, može doći do promena komponenata supstrata (Allsopp i dr., 2004). S druge strane, SAB može imati i pozitivnu ulogu, kao zaštita od drugih, antropogenih i prirodnih, štetnih faktora, čime struktura zidnih slika može ostati netaknuta tokom dužeg vremenskog perioda. Uklanjanje biofilma za posledicu ima veoma brzo propadanje zidnih slika, usled gubitka zaštite od atmosferskih zagađivača, soli i drugih štetnih abiotskih faktora sredine (Lluveras i dr., 2008).

Sáiz-Jiménez i Samson (1981a) su, na primeru zidnih slika manastira Santa María de la Rábida, opisali opšti tok procesa fungalne deterioracije zidnih slika. Prema ovom modelu, u prvim fazama naseljavanja bojenog sloja, kao rezultat rasta mikromiceta, može doći do promena u originalnoj obojenosti zidnih slika. Tokom vremena usled penetracije hifa u supstrat i hemijske razgradnje veziva smanjuje se kohezija bojenog sloja što za posledicu ima narušenu stabilnost i pucanje i ljušpanje bojenog sloja i maltera. Prema Ruga i dr. (2015), prelaz iz mikroskopske, početne, faze rasta u makroskopsku fazu, se dešava brzo, nakon čega gljive postižu optimalnu prilagođenost na date uslove sredine. Prema tome, mada su u ranim fazama fungalnog rasta oštećenja zidnih slika minimalna, sa nastankom očiglednih promena mikrobiota

je već dobro uspostavljena. U daljem toku, članovi fungalne zajednice mogu ostati metabolički aktivni ili, u zavisnosti od uslova sredine, preći u dormantne strukture (Saarela i dr., 2004). Usled toga, nisu retki primeri zidnih slika sa čitavim spektrom promena, od veoma sitnih i neprimetnih, do teških oštećenja sa jasno narušenim integritetom bojenog sloja i maltera (Raschle, 2001).

Prema savremenim procenama, na globalnom nivou, deterioracija uzrokovana gljivama ima za posledicu godišnje gubitke u iznosu od preko 40 milijardi američkih dolara (Allsopp, 2011). Uprkos tome što su zidne slike kulturna dobra od velike vrednosti za celokupno čovečanstvo, troškovi savremenih sistema zaštite od bioloških agenasa su veoma visoki. S obzirom na sve navedeno neophodno je postaviti pitanje:

Da li se proces biodeterioracije zidnih slika, kao i drugih predmeta i kulturnih dobara, mora prihvatiti kao prirodan tok stvari ili se treba zaustavi po svaku cenu?

1.6. Prevencija i sanacija u sistemu konzervacije zidnih slika

Za dugotrajno očuvanje zidnih slika, kao dela složene forme spomenika kulture u kome su slikarstvo i arhitektura međusobno uslovljeni, prvi, osnovni korak predstavlja sticanje kompletnog uvida u stanje zidnih slika i neposredne okoline, kao i u uzroke pojave simptoma oštećenja. Danas se u svetu sve više akcenat stavlja na multidisciplinarni pristup izučavanja ove problematike, sa formiranjem stručnih timova sastavljenih od stručnjaka iz mnogih oblasti nauke i umetnosti: hemije, biologije, medicine, slikarstva, arhitekture, istorije umetnosti, itd. Samo se putem zajedničke saradnje u svim fazama istraživanja, od sagledavanja stanja i stepena ugroženosti fresaka, pa sve do analize uzroka pojave oštećenja, može formulisati adekvatan plan rada za dugotrajnu zaštitu i očuvanje ove vredne zaostavštine čovečanstva.

Sa aspekta konzervacije, nekoliko faktora zidne slike čini specifičnom formom umetnosti (Garg i dr., 2010):

- ✚ strukturno i estetsko jedinstvo zidnih slika i građevine;
- ✚ izražena osetljivost zbog prisustva tankog bojenog sloja na prelazu između podloge i neposredne okoline;
- ✚ ograničena mogućnost kontrolisanja uzročnika oštećenja zidnih slika;
- ✚ veliki rashodi neophodni za konzervatorsko-restauratorske radove, ali i monitoring i druge vidove praćenja stanja zidnih slika.

Upravo su navedene karakteristike zidnih slika i osnovni razlog zašto su ova kulturna dobra jako problematična za sistemsko i dugoročno održavanje i upravljanje. U poslednje vreme je, takođe, primećena interesantna pojava da zidne slike propadaju brže nakon sprovedenih konzervatorskih tretmana (Garg i dr., 2010). Smatra se da je osnovni razlog ovog fenomena to što konzervatori i drugo osoblje namenjeno održavanju i prezentovanju zidnih slika imaju slabo razumevanje samog procesa fungalne deterioracije, pa tretmani kontaminiranih zidnih slika, sprovedeni u cilju očuvanja estetske i istorijske vrednosti umetničkog dela, često narušavaju veoma složenu ravnotežu fungalne zajednice, sa dalekosežnim efektima koje nije uvek moguće predvideti (Sterflinger i Sert, 2006).

Kontrola i sprečavanje fungalnog rasta su od suštinskog značaja za dugotrajnu zaštitu i očuvanje zidnih slika. U svetu savremeni trendovi podrazumevaju visoke standarde tokom svih faza složenog procesa planiranog i sistemskog očuvanja fresaka. Međutim, kao jedna od glavnih mana savremenog sistema često se navodi nedostatak adekvatnih i optimizovanih metoda za monitoring kolonizacije zidnih slika mikromicetama i drugim mikroorganizmima. Trenutno je prihvaćen stav da se primenom standardnih mikoloških podloga može izolovati približno 1% mikromiceta kolonizatora kulturnih dobara (Michaelsen i dr., 2006; Sterflinger, 2010). Prema Hawksworth i Rossman (1997) to za posledicu ima poznavanje samo 5% gljiva uključenih u procese biodeterioracije predmeta i kulturnih dobara. S obzirom na to,

prevencija, sanacija i konzervacija su veoma problematične, usled nekompletnog poznavanja mikromiceta sposobnih da degraduju jedinstvene supstrate. Pored toga, jednokratno uzimanje uzoraka pruža uvid u trenutni sastav mikrobiote koji se konstantno menja. Da bi se dobila potpuna slika neophodna je primena adekvatnih metoda za monitoring u toku dužeg vremenskog perioda, pre i posle konzervatorsko-restauratorskih tretmana. Takođe, neophodno je da metode budu optimizovane, kako bi mogle da se koriste za procenu razlika u sastavu mikrobiote, nastalih usled promena uslova sredine, tretmana biocidima i konzervatorskih radova (Sterflinger i Piñar, 2013). Tokom godina, mnoge metode su korišćene za detektovanje prisustva gljiva na zidnim slikama (McCarthy, 1989):

- ✚ merenje ukupne metaboličke aktivnosti primenom adenzin-5'-trifosfata (ATP) kao biomarkera;
- ✚ detektovanje prisustva komponenti ćelijskog zida i membranskih lipida;
- ✚ praćenje procesa glikolize;
- ✚ fluorescentno bojenje za određivanje prisustva metabolički aktivnih ćelija;
- ✚ indirektna imunofluorescencija; i
- ✚ merenje promena u električnom otporu supstrata kao posledice fungalnog rasta.

Međutim, većina navedenih metoda je sporadično primenjivana, uglavnom zbog skupe aparature i potrebe za velikom količinom uzorka. S druge strane, sve više u svetu mikološka analiza, kao sastavni deo prakse u okviru zaštite zidnih slika, podrazumeva primenu savremenih molekularnih metoda baziranih na analizama sekvenci ribozomalne DNK i gena za proteine u cilju određivanja komponenti mikrobiote i proučavanja odnosa mikromiceta sa supstratom (Sterflinger, 2010). Tokom godina, primenom ovih metoda, prikupljeni su značajni podaci o raznovrsnosti mikromiceta na bojenom sloju zidnih slika. Jurado i dr. (2008), međutim, ističu da ovaj pristup pruža samo taksonosmi spisak, bez ikakvog osvrta na ekološke karakteristike zabeleženih vrsta. Takođe, kao nedostatak autori često navode nemogućnost

određivanja da li je detektovani organizam živ ili mrtav, kao i odsustvo obrazloženja o uzroku prisustva vrsta na ovom karakterističnom tipu staništa (Ramírez i dr., 2005; Jurado i dr., 2008). Za mikologe, uključene u početnu fazu ispitivanja procesa biodeterioracije zidnih slika, podaci o poreklu gljiva i raznovrsnosti vektora rasprostiranja, su od presudnog značaja za kompletno razumevanje širenja i sprečavanje budućih kontaminacija bojenog sloja fungalnim propagulama. De los Rios i Ascaso (2005), takođe, navode da je primena metoda baziranih na analizama DNK korisna, ali da skening elektronska mikroskopija (SEM) i optičke analize adhezivne trake i preparata primarnih izolata treba da uvek budu prvi korak u proučavanju fungalne deterioracije zidnih slika.

Savremeni sistemi zaštite i očuvanja zidnih slika u svetu zasnivaju se na upotrebi seta mehaničkih i hemijskih metoda u cilju uklanjanja fungalnog porasta, bez štetnih posledica po bojeni sloj (Allsopp i dr., 2004). Pri sprovođenju tretmana zidnih slika, kao i drugih predmeta i kulturnih dobara, konzervatori treba da se pridržavaju starog Hipokratovog pravila "*primum non nocere*" – "prvo, ne oštećuj". U početnim fazama, kontrola rasta mikromiceta na zidnim slikama je relativno jednostavna, međutim, kada se fungalni porast proširi preko veće površine tretmani se teško sprovode i slabo su delotvorni (Garg i Dhawan, 1994). Bez obzira na stanje i fazu u kojoj se zidne slike nalaze, prvi korak uvek podrazumeva mehaničko čišćenje površina od porasta plesni i formiranog biofilma i patine. Odabir metode čišćenja zavisi od nekoliko faktora:

- ✚ tipa i intenziteta porasta plesni;
- ✚ prirode supstrata;
- ✚ prisutnih simptoma; i
- ✚ stepena oštećenja bojenog sloja i podloge.

U pojedinim slučajevima, kada se uklanja osušen kompaktni porast, pre mehaničkog čišćenja, radi se tretmanom alkalnim rastvorima čime je omogućeno da osušeni delovi nabubre, omekšaju i lakše se uklone (Giustetto i dr., 2015). Takođe,

posebnu pažnju treba posvetiti uklanjanju patina bogatih melaninima i karotenima, s obzirom na to da odabir pogrešne metode može za posledicu imati pojavu tamnih fleka (Sterflinger i Sert, 2006). Nakon što se eliminiše vidljiv porast sa površine zidnih slika, pristupa se tretmanu biocidima kako bi se zaustavio fungalni rast unutar pukotina i na prelazu bojenog sloja i maltera. Neophodno je spomenuti da se tretman biocidima u konzervaciji zidnih slika predlaže kao poslednja mera, i to samo kada su se druge metode pokazale kao neadekvatne ili iz nekog razloga nisu prihvatljive u datom slučaju. Pre tretmana biocidima neophodno je postaviti (*i odgovoriti!*) nekoliko pitanja (Garg i Dhawan, 1994):

- ✚ Da li je tretman neophodan?
- ✚ Da li je štetan po strukturu zidne slike?
- ✚ Da li je delotvoran i na somatsku i na reproduktivnu fazu rasta gljiva?
- ✚ Da li je odabrani agens fungistatik ili fungicid?
- ✚ Da li ostavlja rezidue?
- ✚ Da li je štetan po zdravlje ljudi?

Tretman zidnih slika biocidima podrazumeva upotrebu ograničenog opsega efikasnih i ekološki bezbednih agenasa prirodnog i sintetičkog porekla. Usled veoma velikih površina zidnih slika, glavni problem tretmana je metod primene biocida. Generalno, pet tehničkih postupaka su u upotrebi za *in situ* tretman biocidima, a izbor adekvatne metode zavisi od prirode fungicida, tipa porasta i stepena oštećenja bojenog sloja zidnih slika (Slika 12) (Pauli, 1972; Garg, 1995; Allsopp i dr., 2004):

- ✚ Ubrizgavanje biocida – koristi se za uklanjanje fungalnog rasta u podlozi i/ili ispod bojenog sloja ograničenog dela zidne slike;
- ✚ Prskanje biocidom – omogućava tretman velikih površina, ali je metoda pogodna samo za kontrolu rasta mikromiceta na površini zidnih slika;
- ✚ Premazivanje biocidom – omogućava bolji kontakt fungicida sa tretiranom površinom, ali je proces dugotrajan i zahteva nekoliko ponavljanja;

- ✚ Fumigacija – metoda pogodna za tretmane velikih prostora isparljivim fungicidima;
- ✚ Mešanje biocida sa bojom – tretman se vrši tokom restauratorskih aktivnosti.



Slika 12. Tehnike nanošenja biocida tokom konzervatorskih tretmana zidnih slika i malterne podloge: **a.** ubrizgavanje; **b.** premazivanje; **c.** prskanje

Odabir adekvatnog biocida za tretmane zidnih slika u velikoj meri je, danas, ograničen Evropskom direktivom o biocidima (BDP) (EU No. 528/2012). Iz tog razloga mnogi efikasni, ali visoko toksični, biocidi na bazi žive i drugih teških metala više nisu u upotrebi. Osim toga, odabir je otežan time što je mali broj agenasa testiran na kompatibilnost sa organskim i neorganskim komponentama zidnih slika: pigmentima, vezivima, premazima i malterom. Veoma mali broj istraživanja bavio se dugoročnim efektima biocida kao što su promene originalne obojenosti i obrazovanje toksičnih međuprodukata raspada biocida (Sterflinger, 2010). Tretmani biocidima treba da se sprovode sa velikim oprezom i tek nakon opsežnih ispitivanja osetljivosti izolovanih gljiva, *in vitro* (Sterflinger i Piñar, 2013). Takođe, mora se uzeti u obzir da su na zidnim slikama prisutne mikromicete različitog nivoa rezistentnosti i da je lakše ukloniti rast pojedinačnih vrsta nego čitave fungalne zajednice, a da biocidi mogu prouzrokovati selektivni pritisak na mikrobiotu i pojavu fungalne zajednice potpuno otporne na biocide (Sterflinger i Piñar, 2013). Imajući sve navedeno u vidu, Strzelczyk (1981) i Langsrud i dr. (2003) preporučuju da se primenjuje više biocida sa

rotiranjem upotrebe u pravilnim vremenskim intervalima, a da odabrani fungicidi moraju da poseduju sledeća svojstva:

- ✚ da budu efikasni u niskim koncentracijama;
- ✚ da ne interaguju sa organskim i neorganskim komponentama zidnih slika;
- ✚ da obezbede produžen efekat kroz nisku isparljivost;
- ✚ da ne izgube fungicidan efekat nakon kontakta sa zidnim slikama; i
- ✚ da ne budu toksični za čoveka i okolinu.

Danas se za tretmane zidnih slika uglavnom koriste tri grupe fungicida sa produženim efektom i sa odsustvom ili minimalnim uticajem po strukturu zidnih slika (Kigawa i dr., 2006; Sterflinger i Sert, 2006; Diaz-Herraiz i dr., 2013):

- ✚ biocidi na bazi formaldehida;
- ✚ smeše vodonik peroksida i 70% izopropil alkohola; i
- ✚ kvaternarna amonijum jedinjenja (QAC) sa optimalnom dužinom lanaca C₁₄-C₁₆.

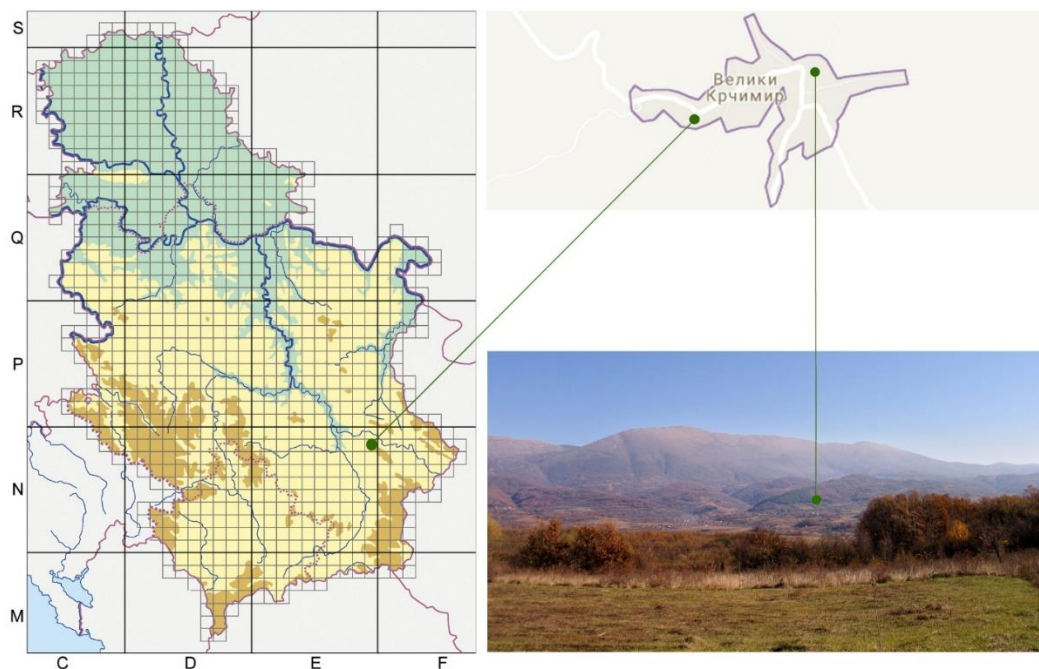
Pored ovih fungicida, *in situ* su testirani i uspešno primenjeni i karbendazim, benomil, dihlorofloamid, imazalil, organo-tin komponente, ortofenilfenol, fenil živin acetat i fenil živin acetat sa parahloro-m-krezolom (Garg i dr., 2010). Međutim, ni jedan od najčešće korišćenih biocida nema dugotrajan efekat i ne sprečava naknadno naseljavanje mikromiceta na bojenu sloj zidnih slika. Takođe, biocidi iz grupe ditiokarbamata, uprkos širokom spektru aktivnosti, su stabilni samo na pH 7, pa nisu pogodni za primenu na alkalnim zidnim slikama (Sterflinger i Sert, 2006). Prema tome, osim tretmana biocidima neophodno je i sprovođenje dodatnih mera zaštite, u formi tretmana zidnih slika izopropil alkoholom - C₃H₈O, primena biološki otpornih materijala tokom restauracije ali i konstantna kontrola glavnih mikroklimatskih parametara – RH i T (Garg, 1995; Helmi i dr., 2011).

2. ISTRAŽIVANI LOKALITET

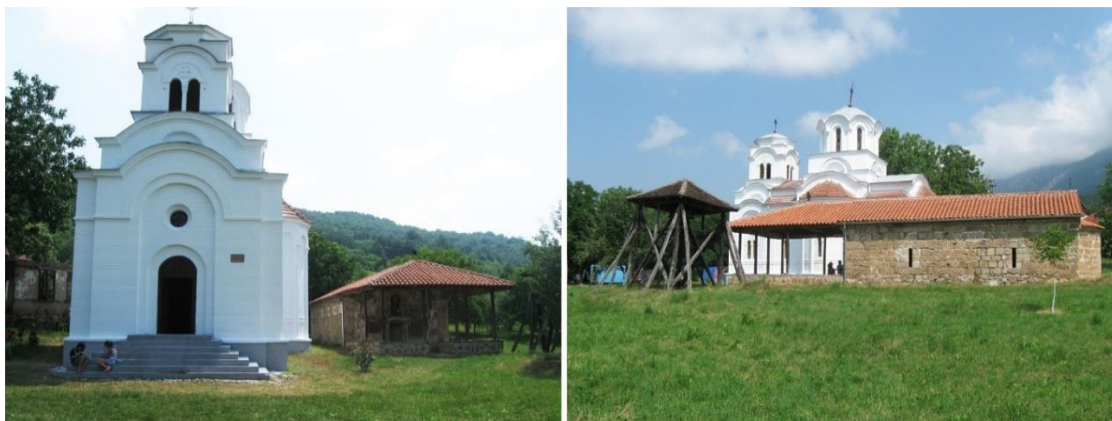
Kulturno dobro crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru

Stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru, je odabrana kao kulturno dobro za višegodišnja eksperimentalna istraživanja, prema preporuci tima eksperata Republičkog zavoda za zaštitu spomenika kulture - Beograd, a na osnovu činjenica da je u pitanju spomenik kulture u zapuštenom stanju, sa izraženim simptomima biodeterioracije, relativno niskim stepenom zaštite, i planiranim restauratorskim radovima na zidnim slikama u bližoj budućnosti.

Stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg, posvećena Hristovom vaznesenju, nalazi se na jugozapadnim obroncima Suve planine, u oblasti Gornjeg Zaplanja (Gadžin Han), u selu Veliki Krčimir ($43^{\circ}5'28,2''N$, $22^{\circ}12'14,4''E$) (Slika 13). Unutar spomeničkog kompleksa prisutne se dve sakralne građevine: stara, manja crkva, i novo, veće zdanje, osvećeno 1937. godine (Slika 14).



Slika 13. UTM karta Republike Srbije sa naznačenim položajem sela Veliki Krčimir



Slika 14. Spomenički kompleks sela Veliki Krčimir sa novom i starom crkvom posvećenom Hristovom Vaznesenju

Stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg je jedan od najstarijih hramova na teritoriji Niške eparhije. Mada po narodnom predanju podignuta u prednemanjičkom periodu, na temelju i ruševinama znatno starijeg vizantijskog hrama sagrađenog od rečnog kamena, kontrolna arheološka proučavanja su negirala da je crkva podignuta na starijem kulturnom mestu (Deljanin, 1995; Vučković, 2008). Bogomolja je sazidana početkom 17. veka od krupnih blokova tesanog kamena, sige, u krečnom malteru, i predstavlja izduženu poluobličasto zasvedenu građevinu (6,5 x 12 m) sa naglašenim čelom luka svoda na poprečnim fasadama i polukružnom apsidom, pokrivenu dvoslivnim krovom (Slika 15). Parom pilastera uz bočne zidove, ostataka starog pregradnog zida, unutrašnjost je podeljena na dva traveja. U priprati crkve, nalazi se poboden u zemlju nadgrobni kameni krst sa uklesanim tekstom: “*Ереу Јанко, Здравко, Крста 1907.г*” (Slika 16). Oslikavanje bogomolje je prema natpisu iznad vrata sprovedeno 1629. godine. Fragmenti starog živopisa sačuvani su u naosu, oltarskom prostoru i zapadnom spoljnom zidu priprate, i prikazuju starozavetne i novozavetne predstave i svece: Hristos u mandorli, Bogorodica šira od nebesa, Pričešće apostola, Mironosnice na Hristovom grobu, Oplakivanje Hrista, Lestvice što dušu spasavaju i u nebo vode, Jona u čeljustima čudovišta, itd. (Deljanin, 1995) (Slika 17). Proučavanjem je utvrđeno da se radi o vrednim umetničkim ostvarenjima, sa nastankom vezanim za

slikarski izraz karakterističan za Srpsko zidno slikarstvo sa kraja 16. i početka 17. veka.



Slika 15. Stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru



Slika 16. Priprata stare crkve sa nadbrobniim spomenikom posvećenim trojci sveštenika koja su organizovala ustanak protiv Turaka



Slika 17. Živopisi sa starozavetnim i novozavetnim predstavama i svecima na zidovima naosa i oltarskog prostora stare crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg

Do danas izvršeno je nekoliko konzervatorskih radova na objektu:

- ✚ 1957. – podignuta nadstrešnica radi očuvanja živopisa spoljnog zida priprate;
- ✚ 1970. i 1974. – živopisanje crkve; čišćenje slojeva čađi i prašine, zatvaranje pukotina;
- ✚ 2003. – konsolidacija i uklanjanje poznih slojeva;
- ✚ 2004. i 2005. – rekonstrukcija egzonarteksa, i zida između naosa i priprate;
- ✚ 2009. – preventivni konzervatorski radovi na živopisu.

Danas, stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg predstavlja nepokretno kulturno dobro od velikog značaja, pod upravom Zavoda za zaštitu spomenika kulture Niš (SK305; „Službeni glasnik SRS“ 28/83). U crkvi se poslednjih decenija ne obavljaju bogoslužjenja, osim tokom nekih značajnijih praznika zbog čega se bogomolja nalazi u veoma zapuštenom stanju. Potpuna konzervacija, restauracija i adekvatna prezentacija veoma vrednog zidnog slikarstva ove crkve nije izvedena u potpunosti zbog nedostataka neophodnih finansijskih sredstava.

3. CILJEVI RADA

Stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg je odabrana kao objekat multidisciplinarnog istraživanja sa mogućnošću implementacije rezultata u sklopu integrisanog sistema preventivne konzervacije i sanacije biodeterioracije zidnih slika u crkvama i manastirima Srbije. U skladu sa navedenim, tokom ovog pionirskog istraživanja su postavljeni sledeći ciljevi:

- ✚ procena stanja i opis simptoma deterioracije na zidnim slikama istraživane crkve;
- ✚ praćenje osnovnih mikroklimatskih parametara, temperature i relativne vlažnosti vazduha, u naosu, kao i sadržaja vlage u zidovima, tokom perioda od godinu dana;
- ✚ analiza pigmenata bojenog sloja, detekcija rasoljavanja i analiza deponovanih soli;
- ✚ izolacija, identifikacija i analiza sezonske dinamike mikromiceta iz uzoraka sa površine bojenog sloja zidnih slika naosa i egzonarteksa;
- ✚ izolacija, identifikacija i analiza sezonske dinamike propagula mikromiceta prisutnih u vazduhu naosa i egzonarteksa;
- ✚ detekcija i utvrđivanje raznovrsnosti fungalnih struktura aktivno rastućih mikromiceta, uzročnika procesa deterioracije zidnih slika, i alohtonih tranzienata;
- ✚ detekcija i identifikacija cijanobakterija i algi u sastavu subaerialnog biofilma sa površine fasade i zidnih slika istraživane crkve;
- ✚ *in situ* procena kontaminacije površine bojenog sloja zidnih slika naosa;

- ✚ monitoring indukovane i spontane fungalne kolonizacije i deterioracije bojenog sloja na modelu zidne slike;
- ✚ ispitivanje sposobnosti odabranih izolata gljiva da razlažu organske i neorganske komponente zidnih slika i proizvode destruktivne metabolite;

U cilju pronalaska efikasnih, neagresivnih, ekonomičnih i ekološki bezbednih agenasa za primenu tokom konzervatorsko-restauratorskih tretmana zidnih slika, a čija bi primena omogućila dugotrajnu zaštitu i očuvanje strukturnog i estetskog integriteta ovih vrednih dela umetnosti postavljeni su i sledeći ciljevi:

- ✚ *de novo* sinteza i testiranje antifungalne aktivnosti BAC/FNP nanokompozita na originalne izolate gljiva sa zidnih slika, *in vitro*;
- ✚ testiranje efekta BAC/FNP nanokompozita na sintezu mikotoksina u kulturama izolata sa zidnih slika i iz vazduha, *in vitro*;
- ✚ ekstrakcija i hemijska analiza etarskih ulja iz tamjana (smola tamjan drveta - *Boswellia carteri*) i smirne (smola balzamovog drveta - *Commiphora myrrha*);
- ✚ ekstrakcija i hemijska analiza dima i čađi nastalih paljenjem tamjana;
- ✚ testiranje antifungalne aktivnosti etarskih ulja i dima tamjana na izolate mikromiceta sa zidnih slika i iz vazduha, *in vitro*;
- ✚ tretmana etarskim uljem i dimom tamjana u naosu i đakonikonu crkve, *in situ*.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Hranljive podloge

Za primarnu izolaciju gljiva korišćena su dva tipa hranljivih podloga, Malt agar sa streptomycinom (MEAS) i Roze bengal agar sa hloramfenikolom (RB CAF). U cilju dobijanja akseničnih kultura gljiva korišćene su tri standardne (Malt agar (MEA), Ovseni agar (OA) i Krompir dekstrozni agar (PDA), i jedna selektivna (Sladni kvašćev agar sa 40% sukroze (M40Y)) mikološka podloga. Za detektovanje sposobnosti izolovanih mikromiceta da degraduju specifične supstrate i proizvode metabolite sa negativnim efektom po strukturu zidnih slika upotrebljene su agarizovana B4 podloga, CaCO₃ glukozni agar, Kazein agar (CN), minimalna Czapek-ova podloga (MCZA) i minimalni Czapek-ov bujon (MCZB). U testovima za određivanje antifungalne aktivnosti novosintetisanog BAC/FNP nanokompozita, etarskih ulja i dima tamjana, *in vitro*, korišćene su MEA i M40Y (makrodiluciona metoda i mikroatmosfera) i tečni malt (MEB) (mikrodiluciona metoda). MEA i M40Y podloge su, takođe, korišćene tokom testiranja etarskog ulja i dima tamjana, *in situ*. Tokom testiranja efekta nanokompozita na sintezu aflatoksina B1 (AFB1) i ohratoksina A (OTA), odabrani izolati su gajeni na semi-sintetičkoj podlozi sa glukozom (GPK).

RB CAF podloga je sastavni deo Dipslide w/TSA/Rose Bengal CAF kontaktnih slajdova (3M Microbiology).

MEA

<i>ekstrakt slada</i>	40 g
<i>agar</i>	15 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

Agar (15 g) sipati u 1000 ml destilovane vode i zagrevati uz konstantno mešanje dok se u potpunosti ne rastvori. Nakon toga, dodati 40 g ekstrakta slada, doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge (6,5-6,8) regulisati dodatkom 4M NaOH (Booth, 1971).

MEAS

<i>ekstrakt slada</i>	40 g
<i>agar</i>	15 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml
<i>streptomycin</i>	500 mg

Priprema se prema recepturi za MEA. Pre regulisanja kiselosti podloge (6,5-6,8), na 1000 ml pripremljenog MEA dodati 500 mg streptomicina (Vukojević, 2012).

MEB

<i>ekstrakt slada</i>	40 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

Ekstrakt slada (40 g) dodati u 1000 ml destilovane vode, i zagrevati uz stalno mešanje. Kiselost podloge (6,5-6,8) korigovati dodatkom 4M NaOH (Booth, 1971).

M40Y

<i>ekstrakt slada</i>	40 g
<i>ekstrakt kvasca</i>	5 g
<i>sukroza</i>	400 g
<i>agar</i>	15 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

Agar (15 g) sipati u 1000 ml destilovane vode i zagrevati uz konstantno mešanje dok se u potpunosti ne rastvori. Potom dodati 40 g ekstrakta slada, 5 g ekstrakta kvasca, 400 g sukroze, i prokuvati. Kiselost podloge (6,5-6,8) regulisati dodatkom 4M NaOH (Samson i dr., 2004).

PDA

<i>krompir</i>	200 g
<i>dekstroza</i>	20 g
<i>agar</i>	17 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

Očišćen i sitno iseckan krompir (200 g) kuvati 25 minuta u 500 ml destilovane vode. Tečnost profiltrirati kroz dvostruku gazu i doliti destilovane vode do 1000 ml. Dodati 17 g agara i zagrevati uz stalno mešanje dok se ne rastvori. Zatim, dodati 20 g dekstroze i mešati dok se u potpunosti ne rastvori. Doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge regulisati na 6,5-6,8 dodatkom 4M NaOH (Booth, 1971).

MCZA

<i>NaNO₃</i>	2 g
<i>K₂HPO₄</i>	1 g
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	0,5 g
<i>KCl</i>	0,5 g
<i>FeSO₄ x 7H₂O</i>	0,01 g
<i>glukoza</i>	1 g
<i>agar</i>	20 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvoriti date soli po sledećem redosledu: NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Narednu so ne dodavati, dok se prethodna potpuno ne rastvori. Nakon soli, dodati 1 g glukoze i 20 g agara. Podlogu zagrevati uz stalno mešanje dok se agar u potpunosti ne rastvori, doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost regulisati na 5,5 uz pomoć 10M HCl (Borrego i dr., 2010).

MCZB

<i>NaNO₃</i>	2 g
<i>K₂HPO₄</i>	1 g
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	0,5 g
<i>KCl</i>	0,5 g
<i>FeSO₄ x 7H₂O</i>	0,01 g
<i>glukoza</i>	1 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvoriti date soli po sledećem redosledu: NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Narednu so ne dodavati, dok se prethodna u potpunosti ne rastvori. Nakon toga, dodati 1 g glukoze, doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge regulisati na 7,0 uz pomoć 10M HCl (Borrego i dr., 2010).

B4

<i>Ca(CH₃COO)₂</i>	10 g
<i>ekstrakt kvasca</i>	5 g
<i>glukoza</i>	5 g
<i>agar</i>	15 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvoriti 10 g $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Po rastvaranju soli dodati 5 g glukoze, 5 g ekstrakta kvasca i 15 g agara. Podlogu zagrevati uz stalno mešanje dok se agar u potpunosti ne rastvori, doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge regulisati na 8,0 uz pomoć 4M NaOH (Bouquet i dr., 1973).

GPK

<i>glukoza</i>	50 g
<i>pepton</i>	1 g
<i>ekstrakt kvasca</i>	1 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvoriti 50 g glukoze, 1 g peptona i 1 g ekstrakta kvasca. Podlogu zagrevati uz konstantno mešanje do ključanja. Kiselost podloge regulisati na 5,6 uz dodatak 10M HCl (Jajić i dr., 2007).

Sve gore navedene podloge su sterilisane u autoklavu (AES-75, Raypa) na 114°C i 0,08 Mpa u trajanju od 25 minuta.

OA

<i>ovsene pahulje</i>	30 g
<i>agar</i>	15 g
<i>pepton</i>	5 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

Ovsene pahulje (30 g) dodati u 1000 ml destilovane vode, zagrevati do ključanja i 2 h kuvati uz konstantno mešanje. Podlogu profiltrirati i doliti do 1000 ml destilovanom vodom. Dodati 15 g agara i sterilisati na 121 °C u trajanju od 15 minuta (Samson i dr., 2004).

CN

<i>NaCl</i>	5 g
<i>pepton</i>	5 g
<i>ekstrakt kvasca</i>	3 g
<i>agar</i>	15 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml
<i>obrano mleko</i>	250 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvoriti 5 g NaCl. Nakon rastvaranja dodati 5 g peptona, 3 g ekstrakta kvasca i 15 g agara. Podlogu zagrevati uz stalno mešanje dok se agar potpuno ne rastvori, pa doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge regulisati na 6,8 uz pomoć 4M NaOH. Podlogu sterilisati u autoklavu na 114 °C u trajanju od 25 minuta. Toplu podlogu (750 ml) pomešati sa 250 ml obranog mleka, frakciono sterilisanog tri dana u autoklavu na 100 °C u trajanju od 30 minuta (Saran i dr., 2007).

CaCO₃ glukozni agar

<i>CaCO₃</i>	5 g
<i>glukoza</i>	10 g
<i>agar</i>	15 g
<i>destilovana voda</i>	1000 ml

U 1000 ml destilovane vode rastvoriti 5 g CaCO₃. Nakon rastvaranja soli dodati 10 g glukoze i 15 g agara. Podlogu zagrevati uz stalno mešanje dok se agar potpuno ne rastvori, doliti do 1000 ml destilovanom vodom i prokuvati. Kiselost podloge (8,0) regulisati pomoću 10M HCl. Podlogu sterilisati na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Toplu podlogu ohladiti do 45 °C, blagim mešanjem u potpunosti resuspendovati CaCO₃ i držati na hladnom mestu dok se agar ne stegne (Albertano i Urzi, 1999).

4.1.2. Suspenzije konidija

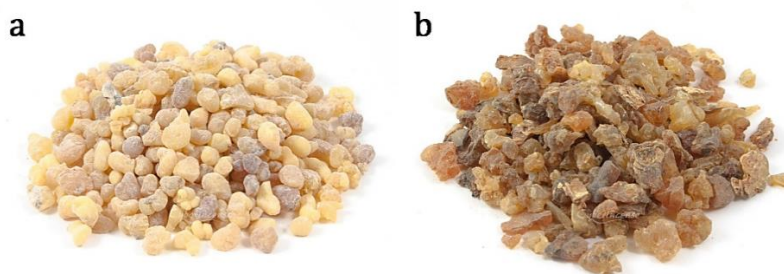
Za pripremu suspenzija konidija korišćene su 7 dana stare kulture mikromiceta odgajene na kosom MEA i spirane sterilnim fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl, HemofarmhospitaLogica) uz dodatak 0,1% Tween 20 (Sinex Laboratory). Korišćenjem hemocitometra tamnog polja (Reichert, Warner-Lambert Technologies) brojane su konidija na površini od 1 mm². Za određivanje koncentracije konidija u suspenzijama, prema uputstvu proizvođača, upotrebljena je formula:

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

Pripremljene suspenzije konidija čuvane su na temperaturi od -20 °C do upotrebe. Radi provere vijabilnosti konidija i odsustva kontaminacije, pre upotrebe, suspenzije su inokulisane na MEA podlogu.

4.1.3. Biljne smole

Smole tamjan drveta (*Boswellia carteri* Birdw.) tamjan i balzamovog drveta (*Commiphora myrrha* (Nees) Engl.) smirna (Slika 18 i Tabela 1), korišćene u istraživanju za ekstrakciju etarskih ulja i testiranje antifungalne aktivnosti, su NOP (Nacionalni program organskih proizvoda) i VOF (Organski farmeri Vermonta) sertifikovani prirodni uzorci, nabavljeni od Ismael Imports, L.L.C./Böswellnes (Berlington) i vode poreklo iz severne Somalije.



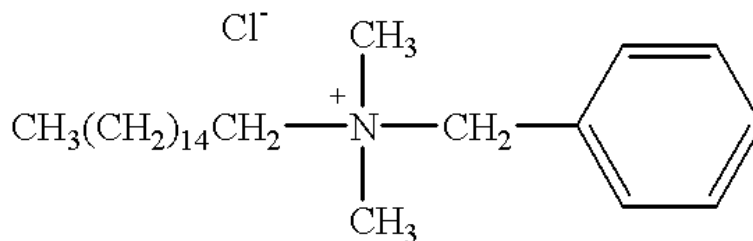
Slika 18. Izgled smola korišćenih u istraživanju: **a.** tamjan; **b.** smirna

Tabela 1. Izvor, srpski nazivi i šifra uzoraka biljnih smola korišćenih u istraživanju

Ime biljke	Familija	Naziv smole	Šifra
<i>Boswellia carteri</i> Birdw.	Burseraceae	tamjan, tamnjan, tamljan, tavjan, temjan, timjan	BC000103
<i>Commiphora myrrha</i> (Nees) Engl.	Burseraceae	smirna, mira, izmirna, basan	CM000102

4.1.4. Sintetički biocidi

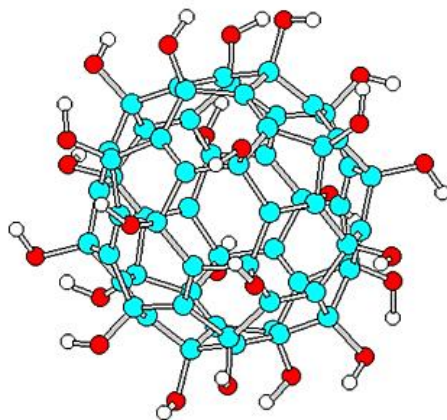
Za testiranje antifungalne aktivnosti sintetičkih biocida, *in vitro*, odabrani su benzalkonijum hlorid (BAC) (Slika 19) i novosintetisani BAC/FNP nanokompozit. Vodeni rastvor BAC (50%) dobijen je od Republičkog zavoda za zaštitu spomenika kulture - Beograd. Pre upotrebe, napravljen je 3% rastvor BAC rastvaranjem biocida u dejonizovanoj vodi.



Slika 19. Benzalkonijum hlorid, strukturalna formula

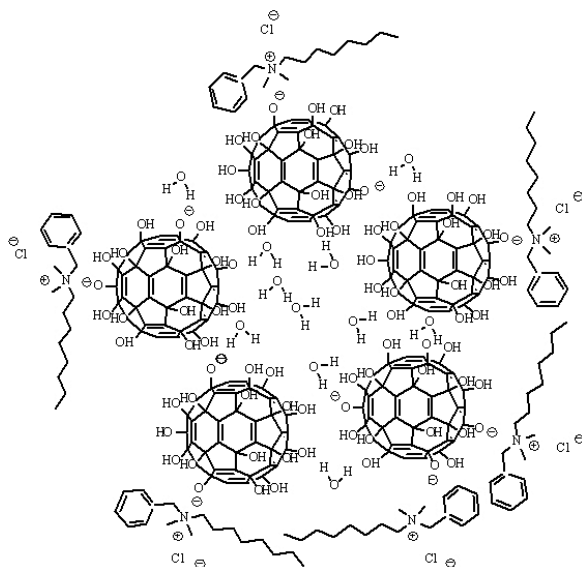
BAC/FNP nanokompozit je sintetisan i okarakterisan na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Polazeći od fulerena C₆₀ katalitičkom adicijom je sintetisan reakcioni proizvod C₆₀Br₂₄ (Djordjević i dr., 1998). Supstitucijom broma sa hidroksilnim grupama u vodenoj alkalnoj sredini sintetisan je fulerenol C₆₀(OH)₂₄ (FNP) u obliku nanočestica (Mirkov i dr., 2004; Slavić i dr., 2013) (Slika 20). Fizičko-hemijska karakterizacija nanočestica fulerenola C₆₀(OH)₂₄ izvršena je u vodenom i

ćelijskom medijumu. Pre upotrebe, rastvori nanočestica fulerenola tretirani su u ultrazvučnom kupatilu (Sonic 4GT, VIMS elektrik) 10 minuta na sobnoj temperaturi.



Slika 20. Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$, model molekula

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$, u obliku praha, rastvoren je u dejonizovanoj vodi kako bi se pripremio FNP rastvor koncentracije $0,125 \text{ mg ml}^{-1}$. Mešanjem $6,93 \text{ ml}$ 5% biocida BAC sa $4,95 \text{ ml}$ FNP rastvora koncentracije $0,125 \text{ mg ml}^{-1}$ sintetisan je BAC/FNP nanokompozit (Slika 21). Finalne koncentracije komponenti u nanokompozitu iznosile su 3% za biocid BAC i $0,052 \text{ mg ml}^{-1}$ za FNP. Smeša je čuvana u mraku i okarakterisana kao stabilna u periodu od četiri nedelje. Raspodela veličina nanočestica FNP i BAC/FNP merena je nakon perioda od 48 sati, dinamičkim rasejavanjem svetlosti, na aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern). Primenom SEM i mikroskopa atomskih sila (AFM) okarakterisane su struktura i morfologija BAC/FNP nanokompozita. Stabilni nanokompozit u vodi uparen je pod sniženim pritiskom na aluminijumskoj podlozi, naparen zlatom i snimljen na JEOL JSM 6460 LV mikroskopu. Površinska topografija i fazne slike su istovremeno dobijene u tapkajućem režimu rada AFM primenom SNC AFM sonde (NanoScience-Team Nanotec GmbH) sa poluprečnikom vrha manjim od 10 nm . Visoko orijentisani pirolitički grafit (HOPG) je korišćen kao površina. Multimode quadrex SPM sa Nanoscope IIIa kontrolor (Veeco Instruments, Inc.) je korišćen u sobnim uslovima.



Slika 21. Benzalkonijum hlorid/fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ nanokompozit, hipotetički model strukture

4.1.5. Test izolati

Za testiranje sposobnosti mikromiceta da kolonizuju površinski bojani sloj zidnih slika, razlažu njihove komponente i sintetišu metabolite sa štetnim dejstvom po čoveka i strukturu zidnih slika, kao i za proveru antifungalne aktivnosti sintetičkih biocida i etarskih ulja, korišćeni su originalni izolati gljiva poreklom iz vazduha i sa zidnih slika crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru.

4.2. Metode

4.2.1. Monitoring mikroklimatskih parametara u naosu primenom data logger-a

Osnovni mikroklimatski parametri, T (°C) i RH (%), naosa istraživanog kulturnog dobra, mereni su na svakih 30 minuta u periodu od 10.05.2013. do 16.04.2014. godine primenom uređaja Data logger EBI 20-IF (Ebro), instaliranog na

čistom malteru centralnog dela zapadnog zida, na visini od 250 cm od kote poda i 5 cm od površine zida (tačka 6.4).

Vrednosti perioda povećane vlažnosti (TOW) za dane sa izmerenom $RH \geq 80\%$, su izračunate prema formuli (Adan, 1994):

$$TOW = \text{period sa } RH \geq 80\% / \text{ukupan merni period}$$

Godišnja prosečna T i RH izračunate su na osnovu podataka za celu godinu, prema formuli:

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

\bar{X} – prosečna godišnja T (°C) ili RH (%);

X – T (°C) ili RH (%);

n – ukupan broj podataka;

X_i – određen podatak iz opsega podataka.

Na osnovu podataka za jednu sezonu, odnosno jedan mesec, izračunate su sezonske i mesečne prosečne vrednosti T i RH, prema formuli:

$$X_i = \frac{1}{n} \sum_{a=1-0,5*n}^{i+0,5*n} X_a$$

X_i – srednja sezonska/mesečna T (°C) ili RH (%);

X – T (°C) ili RH (%);

n – ukupan broj podataka u sezoni/mesecu;

i – određen podatak iz opsega podataka;

a – određen podatak iz sezonskog/mesečnog opsega podataka.

4.2.2. Merenje sadržaja istorijske vlage u zidu

Primenom uređaja Testo 635-2 (Testo Limited Instruments), u režimu za krečnjački kamen, sa uskom sondom od 4 mm, merene su ravnotežne vrednosti relativne vlažnosti supstrata (EMC) zidnih slika za period maja meseca 2013. godine. Tokom 30 minuta od postavljanja aparature u izbušene rupe (6 mm x 5 cm) u opsegu visina od 202 do 227 cm od kote poda, na svim zidnim slikama naosa, EMC vrednosti su postignute i izmerene.

4.2.3. Kvalitativna analiza pigmenata bojenog sloja zidnih slika

Za određivanje palete pigmenata korišćene pri živopisanju zidnih slika naosa crkve i rasporeda slojeva, šest uzoraka (1–2 mm) su uzeti iz postojećih pukotina i oštećenja zidne slike na severnom zidu naosa (Slika 22). Uzorci su uronjeni u hladnu polimerizacionu smolu, metil metakrilat, i neposredno nakon sečenja polirani do finoće od 2000. Poprečni preseki su posmatrani pod metalografskim mikroskopom Reichert Wien, uz korišćenje Olympus C-4040 digitalne kamere za snimanje, na uveličanju od 300 puta. Za SEM i energetska-disperzivnu spektroskopiju X-zraka (EDX) uzorci su pripremani i snimani prema SEM navedenom protokolu (4.2.7.1.).



Slika 22. Zidna slika sa naznačenim mestima uzorkovanja fragmenata bojenog sloja

4.2.4. Kvalitativna analiza soli bojenog sloja zidnih slika

Uzorak za analizu fenomena cvetanja soli uzet je sa pozadine kompozicije na drugoj zoni severnog zida (Slika 23), sa regiona sa prisutnim vidnim i intenzivnim rasoljavanjem na površini zidne slike. Uzorak soli je usitnjen u ahatnom avanu i tabletiran ručnom presom, a zatim su snimani spektri na BWS485–1064–05 μ Ramanskom mikroskopu (B&W TEK inc.). Korišćen je laser 1064 nm, sa snagom 10 mW, i mikroskop sa standardnim objektivom 20x. Vreme akvizicije je 50 sekundi. Spektar je dobijen sa površine tabletiranog uzorka. OMNIC Spectra program (Thermo Scientific) je korišćen za obradu spektara. Poređenjem sa bibliotekama minerala izvršena je determinacija soli.



Slika 23. Sakupljanje uzoraka soli u regionu vidnog i intenzivnog rasoljavanja na površini zidne slike u naosu crkve (severni zid)

4.2.5. Uzimanje uzoraka za kultivaciju gljiva

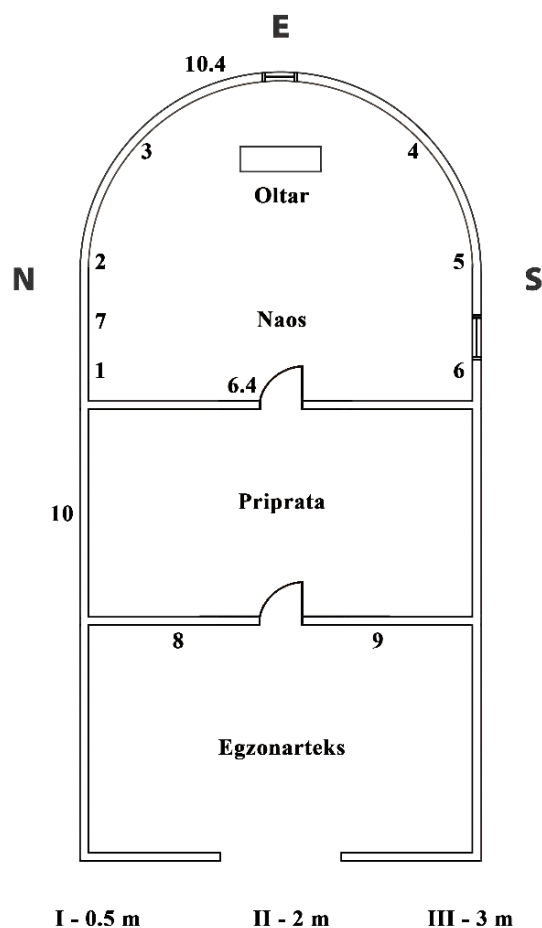
4.2.5.1. Uzimanje uzoraka za izolaciju i identifikaciju mikromiceta sa zidnih površina

Propagule mikromiceta, deponovane na površini bojenog sloja zidnih slika i ogoljenih površina u crkvi, kao i delova fasade, uzorkovane su metodama sterilnog brisa i kontaktnog slajda (Slika 24), u 4 sezone u periodu od maja 2013. do aprila 2014. godine. Opservacijom simptoma deterioracije i opšteg stanja unutrašnjih i spoljašnjih zidnih slika, kao i površina fasade, determinisano je 28 tačaka uzorkovanja (Slika 25):

- ✚ 6 na unutrašnjim zidnim slikama (naos: 1-6) i 2 na spoljašnjim (egzonarteks: 8 i 9) u tri nivoa (0,5 m; 2 m i 3 m);
- ✚ 2 na neoslikanim površinama naosa crkve: ogoljen malter (6.4) i cigla (7); i
- ✚ 2 na fasadi severne i istočne strane crkve (10 i 10.4).



Slika 24. Uzorkovanje propagula mikromiceta sa površine bojenog sloja zidnih slika naosa: **a.** metodom sterilnog brisa; **b.** metodom kontaktnog slajda

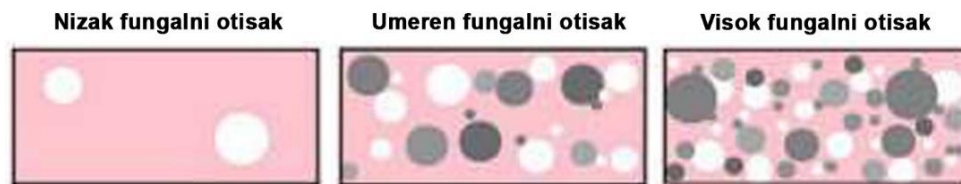


Slika 25. Šema istraživane crkve sa naznačenim tačkama uzorkovanja

U laboratoriji, u aseptičnim uslovima, materijal sakupljen metodom sterilnog brisa homogenizovan je vorteksom (ZX3, VELP Scientifica) uz dodavanje po 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora, a dobijene suspenzije su zasejane na hranljivu podlogu MEAS. Inokulisane hranljive podloge i kontaktni slajdovi inokulisani *in situ* u crkvi inkubirani su u termostatu (UE 500, Memmert) na 25 ± 2 °C, 7 dana. Nakon perioda inkubacije, u cilju dobijanja čistih kultura, primarni izolati su reinokulisani na podloge: MEA, PDA, M40Y i OA.

Izolacija gljiva na kontaktnim slajdovima iskorišćena je za određivanje stepena kontaminacije na osnovu brojnosti fungalnih propagula po jedinici uzorkovane površine zidne slike (10 cm^2). Broj vijabilnih propagula po jedinici površine definisan

je terminom “fungalni otisak”. Klasifikacija intenziteta fungalnog otiska na nizak, umeren i visok izvršena je prema preporuci proizvođača (Slika 26).



Slika 26. Standardizovana šema rasta data u uputstvu proizvođača kontaktnog slajda

4.2.5.2. Uzimanje uzoraka za izolaciju i identifikaciju mikromiceta iz vazduha naosa i egzozarteksa

Propagule gljiva, prisutne u vazduhu naosa i egzozarteksa, uzorkovane su u 4 sezone tokom perioda 2013/14. godine primenom uzorkivača vazduha (MAS-100 Eco, Merck Eurolab) (Slika 27). Protok vazduha kroz perforiranu glavu uzorkivača (400 otvora sa promerom perforacija 0,7 mm) podešen je na 100 l min^{-1} . Za izolaciju gljiva korišćena je hranljiva podloga MEAS. Inokulisane podloge su u laboratoriji inkubirane na $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 7 dana. Nakon inkubacionog perioda, na osnovu broja kolonija po Petri kutiji (CFU) izvršena je korekcija prema formuli (Feller, 1950):

$$P_r = N [1/N + 1/N-1 + 1/N-2 + \dots + 1/N-r+1]$$

P_r – očekivani broj propagula;

N – broj otvora na perforiranoj glavi uzorkivača vazduha;

r – broj formiranih kolonija po Petri kutiji.

Vrednosti CFU m^{-3} vazduha određene su množenjem vrednosti dobijene korekcijom po Feller-u sa faktorom 10.



Slika 27. Uzorkovanje propagula mikromiceta, iz vazduha naosa, primenom uzorkivača vazduha

Relativna gustina gljiva (%) u vazduhu naosa i egzozarteksa proučavane crkve računata je po formuli (Smith, 1980):

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

Na osnovu identifikovanih rodova mikromiceta izvršena je podela prema RF (relativna frekvencija) vrednostima određenim po formuli (Esquivel i dr., 2003):

$$\text{RF} = \frac{\text{ukupan broj puta određeni rod je zabeležen}}{\text{ukupan broj uzorkovanja}} \times 100$$

Na osnovu RF vrednosti, rodovi gljiva čije su propagule zastupljene u vazduhu naosa i egzozarteksa, su svrstani u sledeće grupe prema zastupljenosti:

- ✚ veoma česti (81-100%);
- ✚ učestali (61-80%);
- ✚ česti (41-60%);
- ✚ povremeni (21-40%); i
- ✚ retki (0,1-20%).

4.2.6. Uzimanje uzoraka za mikroskopske analize

Za detekciju prisustva mikromiceta i identifikaciju fototrofnih organizama biofilma, uzročnika procesa biodeterioracije zidnih slika i fasade, uzorci su uzeti prema šemi datoј na Slici 25:

- ✚ aluminiјumskim cilindrima sa ugljenom trakom (Unković i dr., 2015) za SEM analize;
- ✚ metodom adhezivne trake (Gaylarde i Gaylarde, 1998; Urzì i de Leo, 2001) za svetlosnu mikroskopiju; i
- ✚ struganjem biofilma sterilnim skalpelom sa površine fasade za svetlosnu mikroskopiju fototrofnih mikroorganizama.

4.2.7. Mikroskopske analize

4.2.7.1. Skening elektronska mikroskopija

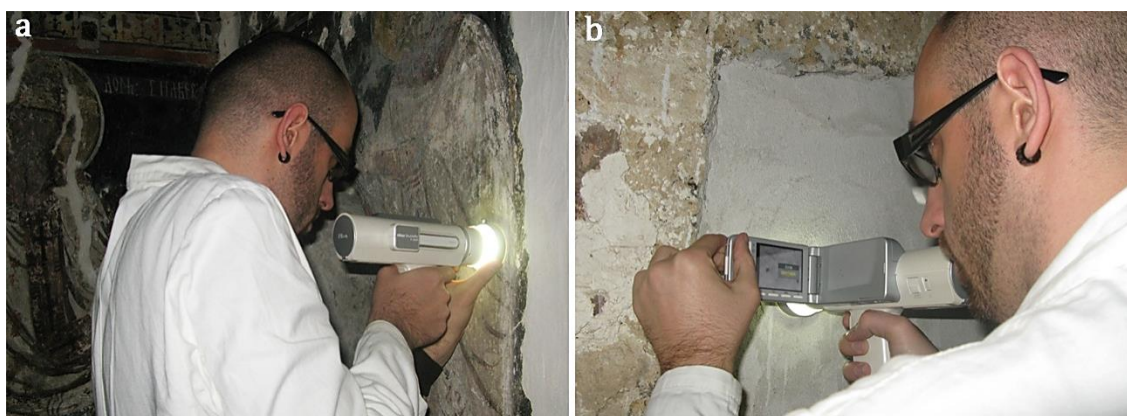
Za SEM uzorci na aluminiјumskim cilindrima prekrivani su slojem zlata ($d=15$ nm, $\rho=19,2$ g/cm³) primenom Leica EM SCD005 (Leica Microsystems). Mikroskopiranje je vršeno u SEM laboratoriji Rudarsko-geološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu korišćenjem mikroskopa JSM-6610LV (Jeol), pri naponu ubrzanja od 20kV, pritisku od 15-30 μ Pa i uveličanju u rasponu od 150 do 30.000 puta. SEM-EDX analize izvršene su SEM vezanim X-Max energetska-disperzivnim spektrometrom (Oxford Instruments).

4.2.7.2. Svetlosna mikroskopija

Za svetlosnu mikroskopiju uzorci adhezivne trake su bojani bojama Laktofenol pamuk plavo (LCB) ili gencijana violet. Mikroskopiranje je vršeno na svetlosnom mikroskopu AxioImager M.1 (Zeiss) uz primenu programa AxioVision Release 4.6.

4.2.7.3. Mikroskopija *in situ*

Strukturna oštećenja i vidljiv porast mikromiceta na površini bojenog sloja zidnih slika istraživane crkve, kao i na modelu zidne slike, direktno su posmatrani i fotografisani prenosnim mikroskopom ShuttlePix P-400R (Nikon) pri uveličanju od 20 puta (Slika 28). Analiza slika i merenja fungálnih struktura urađena su korišćenjem programa ShuttlePix Editor v3.4.0.2.



Slika 28. *In situ* posmatranje i fotografisanje oštećenja i prisustva rasta mikromiceta na: **a.** bojenom sloju zidnih slika; **b.** ogoljenom malteru

4.2.8. Identifikacija mikromiceta

Za identifikaciju izolovanih mikromiceta, na osnovu makroskopskih odlika kolonija i mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura monosporičnih kultura, korišćeni su dostupni ključevi: Raper i Fennel (1965), Ellis (1971, 1976), Schipper (1976), Ellis i Ellis (1997), Pitt (1979), Sutton (1980a, b), Nag Raj (1993), Watanabe (2002), Samson i dr. (2004, 2010), Bensch i dr. (2012) i Woudenberg i dr. (2013).

Pored tradicionalne identifikacije na bazi morfoloških karaktera, deo izolata je identifikovan i na osnovu analize sekvenci DNK. Sa margina kolonija 7 dana starih

monosporičnih kultura (MEA) sakupljeno je 70 mg micelije za ekstrakciju ukupne genomske DNK korišćenjem ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep KIT prema uputstvu proizvođača (Zymo Research). Neposredno pre ekstrakcije, micelija je suspendovana u 200 µl sterilne destilovane vode. Dva genska regiona su amplifikovana: interni transkribovani region 1 (ITS I) i β-tubulin. Prajmeri korišćeni za umnožavanje reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) i njihovi profili predstavljeni su u Tabeli 2. Za sve regione, PCR je sproveden u 25 µl reakcione smeše prema uputstvu Six i dr. (2011). Svaka reakciona smeša, ukupnog volumena 25 µl, sastavljena je od 17,4 µl (za umnožavanje ITS I regiona) i 19,4 µl (za umnožavanje β-tubulin regiona) ultra-čiste DNase/Rnase vode (Gibco), 2,5 µl 10×KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems), 0,25 µl dNTPs (10 mM) (KAPA Biosystems), 0,25 µl svakog prajmera (10 µM), 1,5 µl ekstrakta DNK i 0,1 µl (5U/µl) KAPA Taq DNA polimeraze (KAPA Biosystems). Za umnožavanje ITS I regiona, 0,5 µl 25 mM MgCl₂ je korišćeno umesto 2,5 µl 25 mM MgCl₂. PCR je sproveden u sledećim fazama: jedan ciklus denaturacije na 94 °C, 4 minuta; 30 ciklusa denaturacije na 94 °C, 30 sekundi; hibridizacija prajmera na 55 °C, 50 sekundi; elongacija na 72 °C, 50 sekundi; i finalna elongacija na 72 °C, 10 minuta. PCR produkti su prečišćeni korišćenjem QIAquick PCR Purification KIT/250 (Qiagen) i uslužno sekvencirani u kompaniji Macrogen. Sve reakcije su sekvencirane jednosmerno radi jednostavnijeg prikupljanja podataka. Homologija produkovanih sekvenci sa postojećim sekvencama deponovanim u GenBank bazu NCBI urađena je BLAST metodom. Nukleotidne pozicije su proverene ručnim poravnanjem.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za umnožavanje sekvenci i njihovi PCR profili

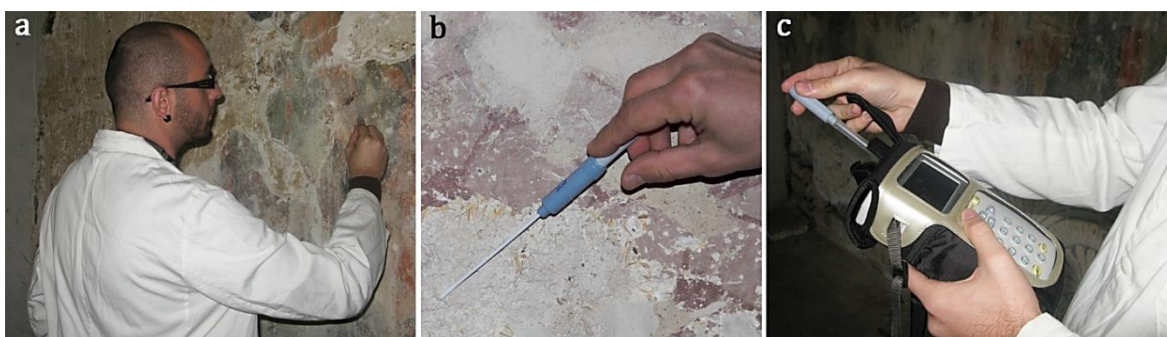
Prajmeri	Sekvence (5'-3')	Geni	Reference
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS1 i ITS2 + 5.8S rRNK	White i dr. (1990)
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
T1-F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	β-tubulin	O'Donnell i Cigelnik (1997)
BT12-R	GTTGTCAATGCAGAAGGTCTCG		Kim i dr. (2003)
BT12-internal R	CCTCMGTGTAGTGMCCCTTG		Roe i dr. (2010)

4.2.9. Identifikacija cijanobakterija i algi

Od uzoraka biofilma uzetih metodom struganja sa površine fasade i zidnih slika egzozarteksa crkve pravljene su privremeni preparati. Dobijeni preparati posmatrani su u kapi glicerola na svetlosnom mikroskopu. Identifikacija cijanobakterija i algi je izvršena na osnovu karakteristika morfologije ćelija primenom dostupnih ključeva: Starmach (1972), Komarek i Anagnostidis (1998) i John i dr. (2003).

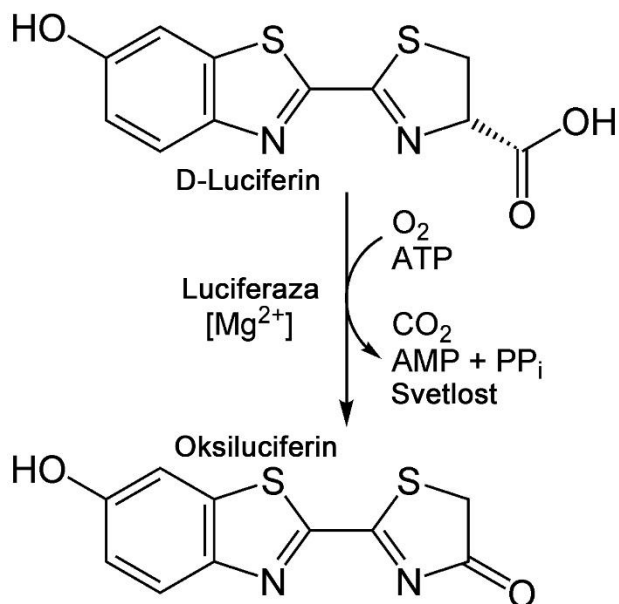
4.2.10. Određivanje stepena kontaminacije površine zidnih slika metodom ATP bioluminiscencije

Za direktnu procenu stepena kontaminacije površine zidnih slika naosa mikroorganizmima i organskim depozitom korišćena je metoda ATP bioluminiscencije primenom Lightning MVP instrumenta. Uzorci sa zidnih slika uzimani su tokom četiri sezone 2013/14. godine, prema šemi datoj na Slici 25, primenom Lightning MVP ATP briseva specijalne namene (BioControl Systems) (Slika 29). Uzorkovanje je vršeno na definisanoj površini od 100 cm².



Slika 29. Određivanje stepena kontaminacije zidnih slika metodom ATP bioluminiscencije: **a-b.** uzorkovanje; **c.** očitavanje rezultata Lightning MVP instrumentom

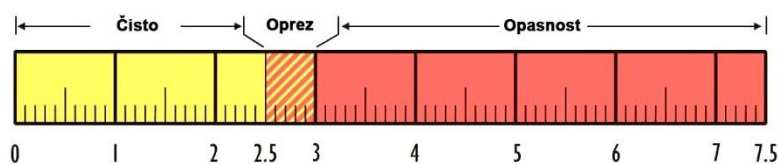
Neposredno nakon uzorkovanja, ATP brisevi su aktivirani u jednom koraku izazivanjem luciferin-luciferaza reakcije u mikrokontejneru brisa. Intenzitet fotona, talasne dužine od 470 do 700 nm, oslobođenih tokom procesa konverzije hemijske energije u svetlost (Slika 30), direktno je proporcionalan količini ATP molekula prisutnih u mikroorganizmima i organskom depozitu (Chollet i dr., 2012).



Slika 30. Dvostepeni proces konverzije hemijske energije u svetlost u reakciji luciferin-luciferaza

Rezultati izraženi kao „Zone čistoće“, logaritamski aproksimovane vrednosti relativnih svetlosnih jedinica - RLU (količine svetlosti nastale od jednog femtomola ATP) direktan su indikator stepena kontaminacije zidnih slika (Slika 31):

- ✚ čista zona (0,0-2,5);
- ✚ zona opreza (2,5-3,0);
- ✚ zona opasnosti (3,0-7,5).



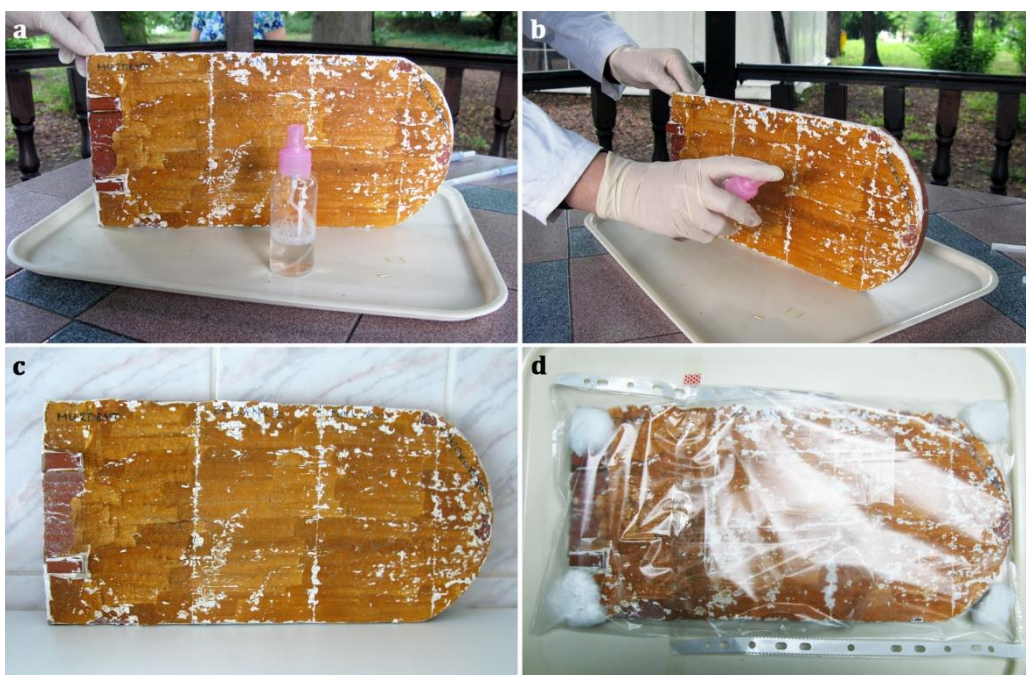
Slika 31. Lightning MVP skala „Zona čistoće“

Izmerene vrednosti „Zona čistoće“ zidnih slika i ogoljenog maltera naosa za sve sezone, korišćene su za statističku analizu u cilju utvrđivanja moguće korelacije između izmerene vrednosti „Zona čistoće“ i vrednosti CFU cm⁻² dobijenih metodom kultivacije na kontaktnom slajdu.

4.2.11. Monitoring indukovane i spontane kolonizacije mikromicetama na formulisanom modelu zidne slike

Praćenje spontane i indukovane kolonizacije bojenog sloja, rasta mikromiceta na različitim tipovima veziva prirodnog porekla, u kontrolisanim uslovima, sprovedeno je na modelu zidne slike pripremljenom po tradicionalnim recepturama opisanim u starim slikarskim priručnicima (Medić, 2002). Na model zidne slike, sačinjen od krečnjačke ploče (18×37 cm) podeljene na četiri deonice, nanet je sloj pigmenta Zlatni oker (Frank W. Joel Ltd., UK) vezan različitim tipom prirodnog veziva u svakoj deonici: belancetom, linokopijom, murdentom i tutkalom (Slika 32). U sterilnim uslovima, ploča je inokulisana prskanjem mešovitom suspenzijom konidija koncentracije 5×10⁶ CFU ml⁻¹ (po 1×10⁶ CFU ml⁻¹ suspenzije konidija *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. uredinicola* i *Penicillium biliaiae* iz akseničnih kultura mikromiceta izolovanih sa površine zidnih slika istraživane crkve). Inokulisana ploča je inkubirana tokom perioda od 6 meseci u mikroklimatskim uslovima koji simuliraju uslove u istraživanoj crkvi (prosečne godišnje vrednosti T i RH vazduha: 13,78±2,13 °C; 60,88±3,85%) (Unković i dr., 2015). Za inkubaciju je korišćena prostorija približnih vrednosti navedenih parametara, a uslovi u crkvi su dodatno imitirani i ustaljenim aktivnostima ljudi i protokom vazduha čime je

omogućen dodatni unos i taloženje propagula gljiva na površinu bojenog sloja. Nakon šestomesečnog inkubacionog perioda, model zidne slike je prebačen u vlažnu komoru sa uslovima prilagođenim da odgovaraju najvećoj prosečnoj temperaturi i relativnoj vlažnosti vazduha zabeleženim u crkvi tokom istraživanog perioda (Jul; $19,83 \pm 1,73$ °C i $70,18 \pm 6,91\%$). Inkubacija u novopostavljenim uslovima je trajala 6 meseci. Praćenje kolonizacije bojenog sloja modela zidne slike sproveden je na nedeljnoj bazi *in situ* mikroskopijom i pravljenjem i analiziranjem preparata na svetlosnom mikroskopu.



Slika 32. Faze formulacije i inkubacije modela zidne slike za monitoring spontane i indukovane kolonizacije gljivama: **a.** model zidne slike i suspenzija konidija; **b.** inokulacija prskanjem mešovitom suspenzijom konidija; **c.** inkubacija u uslovima sobne temperature; **d.** inkubacija u "vlažnoj komori"

4.2.12. Testovi za određivanje aktivnosti izolovanih mikromiceta *in vitro*

U testovima su korišćeni originalni izolati gljiva sa zidnih slika i iz vazduha istraživane crkve.

4.2.12.1. Test produkcije kiselih i baznih metabolita

Za testiranje sposobnosti izolata gljiva da proizvode kiseline i bazne metabolite korišćen je minimalni Czapek-ov bujon (Borrego i dr., 2010). Erlenmajeri sa 100 ml MCZB podloge su nakon inokulacije inkubirani 3 dana na rotor šejkeru (Titramax 1000, Heidolph) u uslovima sobne temperature i rotacije od 300 obrtaja u minuti (rpm). Nakon inkubacionog perioda, kulture su profiltrirane kroz filter papir (Whatman N°4) i korišćenjem pH metra (CyberScan pH 510, Eutech) određivana je pH vrednost filtrata (Slika 33). Testirani izolati koji su rastom i metaboličkom aktivnošću prouzrokovali značajno smanjenje ili povećanje pH vrednosti tečne podloge smatrani su producentima kiselih, odnosno baznih metabolita.



Slika 33. Test produkcije kiselih i baznih metabolita: **a.** gajenje kultura u minimalnom Czapek-ovom bujonu; **b.** određivanje pH vrednosti filtrata

4.2.12.2. Test rastvaranja kalcijum karbonata

Za utvrđivanje potencijala izolata mikromiceta da rastvaraju kalcijum karbonat korišćen je CaCO_3 glukozni agar (Bouquet i dr., 1973). Inokulisane podloge su

inkubirane na 25 ± 2 °C, 21 dan. Nakon kultivacionog perioda, posmatrana je pojava transparentne zone rastvaranja karbonata.

4.2.12.3. Test formiranja sekundarnih mikogenih minerala

Sposobnost izolata mikromiceta da formiraju kristale kalcita i Ca-oksalata ispitivana je korišćenjem agarizovane B4 podloge (Bouquet i dr., 1973). Inokulisane podloge inkubirane su na temperaturi od 25 ± 2 °C, 21 dan. Nakon inkubacionog perioda, kristali istaloženi u podlozi posmatrani su pod svetlosnim mikroskopom. Morfologija i hemijski sastav kristala određeni su SEM-EDX analizom. Uzorci su prekriveni zlatom, primenom uređaja BALTEC-SCD-005, i snimani u uslovima visokog vakuuma korišćenjem JSM-6610LV SEM vezanog za X-Max energetska disperzivni spektrometar. S obzirom na to da su uzorci nepolirani, analiza hemijskog sastava kristala smatra se semi-kvantitativnom. Za rendgensku difrakciju praha (XRPD) uzorci u prahu su pripremljeni odstranjivanjem vazdušne micelije iz kultura *Penicillium griseofulvum* i *P. manginii* gajenih tri nedelje na B4 podlozi, nakon čega je 5 g podloge sušeno na 70 °C, 24 h, i usitnjeno. Fazni sastav praha određen je PW-1710 (Philips) rendgenskim difraktometrom. Difraktogrami su dobijeni od 5 do 60° 2 θ , korišćenjem $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ zračenja sa skeniranjem od 0.03° 2 θ i 0.95 s između svakog koraka.

4.2.12.4. Test proteolitičke aktivnosti mikromiceta

Sposobnost izolovanih mikromiceta da razlažu mlečni protein, kazein, testirana je na CN podlozi (Saran i dr., 2007). Inokulisane podloge su inkubirane na temperaturi od 25 ± 2 °C, 7 dana. U cilju lakšeg detektovanja transparentne zone hidrolize kazeina, nakon kultivacionog perioda kulture su prelivane sa 5 ml 10% rastvora taninske kiseline (Sigma-Aldrich).

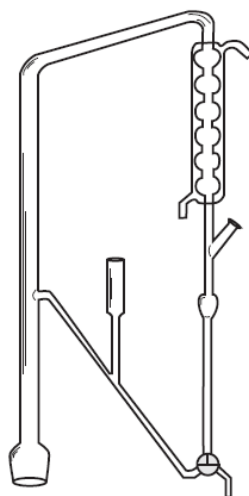
4.2.12.5. Test produkcije fungalnih pigmenata

Za testiranje sposobnosti izolata gljiva da sekretuju organske pigmente korišćena je minimalna agarizovana Czapek-ova podloga (Borrego i dr., 2010). Inokulisane MCZA podloge inkubirane su na temperaturi od 25 ± 2 °C, 21 dan. Produkcija pigmenata praćena je na osnovu promene boje transparentne podloge. Izmenjena boja podloge, kao posledica produkcije fungalnih pigmenata, poređena je sa ISCC-NBS paletom boja (Rojas i dr., 2012).

4.2.13. Ekstrakcija i hemijska analiza etarskih ulja i produkata paljenja tamjana

4.2.13.1. Ekstrakcija etarskih ulja

Etarska ulja su izolovana hidrodestilacijom 65 g tamjana i smirne, u trajanju od 3h, korišćenjem Klevendžerove aparature (Slika 34), prema proceduri datoj u Ph. Eur. 6 (European Pharmacopoeia 6th Edition, 2007). Pre upotrebe, ulja su čuvana u mraku na 4 °C.



Slika 34. Šematski prikaz Klevendžerove aparature korišćene za ekstrakciju etarskih ulja iz tamjana i smirne

4.2.13.2. Analiza hemijskog sastava etarskih ulja

Gasna i gasno-masena analiza (GC-FID i GC-MS) urađena je na sistemu Agilent 7890A opremljenim plameno-jonizacionim detektorom (FID) i selektivnim masenim detektorom 5975C (MSD) sa split/splitless injektorom (split 10:1) zagrejanim na 220 °C. Injektovana zapremina bila je 1 µl za sve analize. Razdvajanje je vršeno na HP-5 MSI kondenzovanoj silikonskoj kapilarnoj koloni dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine filma od 0,25 µm. Temperatura kolone je linearno programirana od 60 °C do 240 °C sa promenom od 3 °C/min. Temperatura detektora bila je 300 °C. Kao noseći gas korišćen je helijum (1.0 ml/min na 210 °C) pri konstantnom pritiskom.

Maseni spektri su dobijeni tehnikom elektronske jonizacije (EI-MS) od 70 eV. Opseg snimanja je bio 40-550 m/z. Pretraga po bibliotekama masenih spektara, kao i njihova dekonvolucija i ekstrakcija vršena je korišćenjem softvera NIST AMDIS (automatizovani sistem za masenu spektralnu dekonvoluciju i identifikaciju) verzija 2.64 sa kalibracijom retencionih indeksa (RI). Retencioni indeksi su eksperimentalno određeni korišćenjem standardne metode koja uključuje vreme retencije (tR) *n*-alkana, koji su injektirani nakon etarskog ulja pod istim hromatografskim uslovima. Pretraživanje je vršeno u internoj biblioteci, koja sadrži 4972 spektara i Adams 4, komercijalne biblioteke masenih spektara. Relativni procentni sadržaj identifikovanih jedinjenja izračunat je na osnovu površina pikova iz GC-FID hromatograma.

4.2.13.3. Ekstrakcija dima i čađi

Dim i čađ zapaljenog tamjana estrahovani su pomoću specijalno dizajnirane aparature (Slika 35). Komadići smole (3 g), postavljeni na ugljeni briket na azbestnoj mrežici zapaljeni su u vakuum desikatoru. Nastali dim je pomoću vakuum pumpe uveden u stakleni sud (Drechsler bottle gas washing) ispod nivoa rastvarača (metilen-hlorid). Na ovaj način vršena je ekstrakcija dima ispiranjem metilen hloridom. Ekstrakcija je vršena sve vreme do potpunog sagorevanja cele količine tamjana. Čađ,

nataložena tokom procesa ekstrakcije dima na krivini slavine vakuum desikatora ekstrahovana je metilen hloridom u ultrazvučnom kupatilu. Dobijeni uzorci analizirani su gasnom i gasno-masenom hromatografijom (GC-FID i GC-MS). Kao pozitivna kontrola korišćeni su dim i čađ nastali paljenjem ugljenog briketa, ekstrahovani i analizirani pod istim uslovima.



Slika 35. Ekstrakcija dima i čađi tamjana: **a.** aparatura; **b.** ugljeni briket sa zrnima tamjana pre paljenja; **c.** vakuum desikator ispunjen dimom nakon paljenja; **d.** čađ deponovana na slavini u metilen hloridu

4.2.14. Metode testiranja antifungalne aktivnosti biocida i etarskih ulja *in vitro*

Osetljivost originalnih izolata gljiva sa zidnih slika i iz vazduha istraživane crkve testirana je na aktivnost BAC/FNP nanokompozita, etarskih ulja *B. carteri* i *C. myrrha*, i produkata paljenja tamjana. Kao pozitivna kontrola u svim testovima korišćen je biocid BAC.

4.2.14.1. Mikrodiluciona metoda

Za određivanje antifungalne aktivnosti BAC/FNP nanokompozita i etarskih ulja *B. carteri* i *C. myrrha*, korišćena je modifikovana mikrodiluciona metoda (Hanel i Raether, 1998). U bunare mikrotitracione ploče (96-well micro test plates F-bottom, Ratiolab) dodavane su odgovarajuće zapremine MEB, suspenzije konidija i testiranih supstanci (konačne zapremine 100 µl po bunaru). Za BAC/FNP nanokompozit testiran je opseg koncentracija od 0,03/0,05 do 20,1/34,84 µg ml⁻¹. Za pojedinačna etarska ulja ekstrahovana iz tamjana i smirne, kao i smeše ovih ulja (*B. carteri*:*C. myrrha*=3:1), testiran je opseg koncentracija od 0,1 do 200 mg ml⁻¹. Inokulisane mikrotitracione ploče inkubirane su na 25±2 °C u trajanju od 72 h. Nakon kultivacionog perioda, porast micelije u bunarima posmatran je pod stereomikroskopom (Stemi DV4, Zeiss). Za minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) uzete su najniže koncentracije testiranih supstanci gde nije zabeležen rast hifa. U cilju određivanja minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC), sadržaj bunara bez prisustva micelije reinokulisan je na MEA. Najniže koncentracije nanokompozita i etarskih ulja na kojima nije došlo do obrazovanja kolonija nakon reinokulacije uzete su za MFC vrednosti. Kao pozitivna kontrola korišćen je biocid BAC.

4.2.14.2. Makrodiluciona metoda

Za ispitivanje uticaja BAC/FNP nanokompozita na rast micelije i morfofiziološke karakteristike odabranih izolata gljiva korišćena je modifikovana

makrodiluciona metoda (Ishii, 1995). Odgovarajuće zapremine nanokompozita dodavane su u hranjivu podlogu MEA prilikom razlivanja u Petri kutije (Ø 50 mm). Testirane su koncentracije BAC/FNP nanokompozita: 0,03/0,05; 0,15/0,26 i 0,6/1,04 µg ml⁻¹. Inokulisane hranjive podloge su inkubirane na 25±2 °C tokom 3 nedelje. Dinamika rasta micelije testiranih izolata praćena je merenjem prečnika kolonija na 7 dana tokom inkubacionog perioda. Inhibicija rasta micelije (%) određena je prema formuli (Pandey i dr., 1982):

$$\% \text{ inhibicije} = 100 (d_k - d_t) / d_k$$

d_k – dijametar kolonije kontrolne kulture;

d_t – dijametar kolonije u prisustvu različitih koncentracija testiranih supstanci.

4.2.14.3. Metoda mikroatmosfera

Uticaj isparljivih komponenti etarskog ulja *B. carteri* na inhibiciju germinacije konidija odabranih izolata gljiva testiran je metodom mikroatmosfera (Maruzella i Sicurella, 1960). Na 5 ml podloge MEA inokulisano je po 30 µl suspenzije konidija. Sterilni disk filter papira (Ø 1 cm) postavljen je na centar unutrašnje strane poklopca Petri šolje (Ø 50 mm) okrenute poklopcem na dole. Na filter papir mikropipetom su nanete odgovarajuće zapremine testiranog etarskog ulja, opsega koncentracija od 4 do 12 mg cm⁻³. Inokulisane podloge su inkubirane na 25±2 °C tokom 24 h. Nakon inkubacionog perioda, na centar inokulisanih podloga dodato je nekoliko kapi LCB boje i postavljeno pokrovno staklo. Germinativne cevčice konidija posmatrane su i merene svetlosnim mikroskopom.

4.2.14.4. Metoda aromatične komore

Efekat komponenti dima zapaljenog tamjana na inhibiciju germinacije konidija i rast micelije odabranih izolata gljiva testiran je modifikovanom metodom aromatične komore. Dva seta po tri Petri kutije (Ø 50 mm) sa po 5 ml podloge MEA

inokulisane su suspenzijom konidija, odnosno fragmentima micelije, *Penicillium lanosum* i *Curvularia australiensis*. Inokulisane otvorene Petri kutije su postavljene u stakleni sud zapremine vazduha $\sim 2700 \text{ cm}^3$ u čijem centru je zapaljeno 5 g tamjana. Posuda ispunjena dimom je zatvorena parafilmom tokom 30 minuta (Slika 36). Za test inhibicije germinacije konidija, inokulisane Petri kutije su inkubirane na $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 24 h, nakon čega je na centar podloge dodata kap LCB i postavljeno pokrovno staklo. Germinativne cevčice konidija posmatrane su i merene svetlosnim mikroskopom. Efekat komponenti dima na rast micelije testiranih izolata praćen je na način opisan u makrodilucionoju metodi.



Slika 36. Testiranje uticaja dima tamjana na inhibiciju germinacije konidija i rast micelije *Penicillium lanosum* i *Curvularia australiensis*: **a.** inokulisane MEA podloge u staklenom sudu; **b.** stakleni sud ispunjen dimom; **c.** stakleni sud sa inokulisanim podlogama nakon tretmana dimom

4.2.14.5. Test produkcije mikotoksina

Za proučavanje uticaja BAC/FNP nanokompozita na sintezu mikotoksina odabrane kulture kultivisane su 5 dana u 250 ml GPK podloge, obogaćene odgovarajućom zapreminom nanokompozita, na rotor šejkeru (200 rpm) u uslovima sobne temperature. Testiran je efekat koncentracije $0,003/0,0052 \mu\text{g ml}^{-1}$ nanokompozita. Nakon kultivacionog perioda, kulture su filtrirane kroz filter papir (Whatman N°4), micelija je sušena na $70 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 24 h i izmeren je suvi ostatak.

Primenom vakuum uparivača (Rotavapor R-210, Buchi) 100 ml filtrata uparavano je na 90 °C do suva, uz dodatak 150 ml (3x50 ml) 100% metanola (Sigma-Aldrich). Suvi ostaci su rastvarani u 70% metanola (1:5), nakon čega su rađeni imunoenzimski testovi (ELISA) za kvalitativnu analizu mikotoksina AFB1 (Celer AFLA B1, MA220/MA221) i OTA (I'screen OCHRA, OR360/OR361) (Tecna s.r.l.). Osetljivost metoda iznosi 1 µg kg⁻¹.

4.2.15. Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskog ulja i dima tamjana *in situ*

Antifungalna aktivnost etarskog ulja *B. carteri* testirana je *in situ* metodom modifikovane aromatične atmosfere. Udubljenje u zidu naosa (40 cm x 55 cm x 32 cm), poznato kao đakonikon i tradicionalno korišćeno za odlaganje predmeta neophodnih za verske obrede, iskorišćeno je za formiranje aromatične komore (Slika 37). Neposredno pre eksperimenta, kontaminacija vazduha đakonikona, fungalnim propagulama, određena je metodom pasivne sedimentacije (Omelyansky, 1940). Po dve Petri kutije sa MEAS i M40Y su postavljene otvorene u đakonikonu u trajanju od 30 minuta. Usled veoma male zapremine vazduha đakonikona (~ 0,02 m³) uzorkovanje propagula gljiva nije vršeno uzorkivačem vazduha. Uslovi aromatične komore postignuti su postavljanjem staklenog suda sa 2 ml etarskog ulja koje isparava unutar đakonikona tokom 30 minuta pri uslovima sobne T i RH (24,8±0,14 °C i 41,65±0,49%). U ovako pripremljenu aromatičnu komoru postavljene su Petri kutije sa MEAS i M40Y. Pripremljena aromatična komora zatvorena je najlonom fiksiranim za plastični ram, čime je omogućeno formiranje aromatične atmosfere zasićene etarskim uljem tamjana.

U laboratorijskim uslovima, inokulisane podloge su inkubirane na 25±2 °C tokom 7 dana nakon čega su brojane kolonije. Vrednosti CFU m⁻³ su određivane po formuli (Omelyansky, 1940):

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

N – vrednost CFU m⁻³ vazduha;

a – broj kolonija po Petri kutiji;

b – površina Petri kutije izražena u cm²;

t – vremenski period tokom kojeg su Petri kutije bile otvorene (min).



Slika 37. Testiranje antifungalne aktivnosti etarskog ulja *Boswellia carteri* u đakonikonu crkve: **a.** udubljenje u zidu naosa - đakonikon; **b-c.** priprema aromatične komore; **d.** eksperiment isparavanje etarskog ulja *in situ*

Antifungalna aktivnost dima nastalog paljenjem tamjana testirana je u naosu istraživane crkve. Za određivanje kontaminacije vazduha naosa, fungalnim propagulama, pre tretmana uzorci vazduha uzeti su primenom uzorkivača vazduha MAS-100 Eco (100 l min⁻¹). Smola tamjana (5 g) je postavljena na zapaljeni ugljeni briket a tretman vazduha oslobođenim dimom trajao je 30 minuta. Efikasnost sprovedenog tretmana proverena je uzimanjem uzoraka vazduha za određivanje brojnosti vijabilnih fungalnih propagula u vazduhu. U laboratorijskim uslovima, inokulisane podloge su inkubirane na 25±2 °C tokom 7 dana. Nakon inkubacionog perioda, broj kolonija je korigovan prema preporuci proizvođača (Feller, 1950) a dobijene očekivane vrednosti su pomnožene sa faktorom 10 i predstavljene kao CFU m⁻³ vazduha.

4.2.16. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata istraživanja korišćene su sledeće analize:

- ✚ Klaster analiza: procena sličnosti među analiziranim zidnim slikama na osnovu identifikovanih mikromiceta;
- ✚ Kanonijska korespodentna analiza (CCA) i analiza glavnih komponenti (PCA): obrada rezultata aeromikološkog istraživanja;
- ✚ Korelaciona analiza: utvrđivanje korelacije između vrednosti Zona čistoće i vrednosti CFU cm⁻² dobijenih metodom kultivacije na kontaktnom slajdu;
- ✚ One-way ANOVA: obrada rezultata testiranja antifungalne aktivnosti BAC/FNP nanokompozita *in vitro*. Kao nivo značajnosti uzeta je vrednost $p < 0,05$.
- ✚ Tukijev test: testiranje značajnih razlika između srednjih vrednosti inhibicije germinacije konidija nastalih pod uticajem isparljivih komponenti etarskog ulja tamjana. Kao nivo značajnosti uzeta je vrednost $p < 0,05$.

Navedene statističke analize urađene su u programima StatSoft Statistica 8 MR-3, CANOCO za Windows ver. 5 (Ter Braak i Šmilauer, 2012), Microsoft Excel 2010 (Office Professional Plus 2010), STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.) i IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS, Inc.).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Stanje zidnih slika naosa i egzozarteksa

In situ opservacija i praćenje stanja zidnog slikarstva i celokupnog kulturnog dobra, crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg, sprovedeno je od strane eksperta slikar-konzervatora Republičkog zavoda za zaštitu spomenika kulture – Beograd. Tokom istraživanog perioda konstatovano loše početno stanje živopisa nije se bitno menjalo.

Konstatovano je da su zidne slike zapadne fasade crkve, u egzozarteksu, izvedene *al fresco* tehnikom, teško oštećene, sa oko 40% ukupne površine potpuno uništene usled stalnog obrušavanja delova maltera zidnih slika. Na očuvanim delovima živopisa bojeni sloj je u veoma lošem stanju, ljušta se i drobi, što se posebno može videti na predstavi Hrista sa jevanđeljem u niši iznad vrata, gde je proces ljuštenja izražen u toj meri da je inkarnat skoro potpuno nestao i uočavaju se samo osnovne konture lica i ruku, kao i delovi draperija. Takođe, izraženo rasoljavanje uzrokovalo je formiranje beličaste skrame preko površine zidnih slika, naročito u nižim zonama, a usled delovanja atmosferskih faktora kod pojedinih pigmenta je uočena i blaga promena originalne obojenosti. Pored toga, mehanička oštećenja nastala urezivanjem imena i grafita prisutna su u čitavoj donjoj zoni živopisa do visine i od preko 2,5 m, čime se u narušava čitljivost i estetski utisak zidnih slika (Slika 38).

Oštećenja i nestanak veoma velikog dela zidnih slika egzozarteksa su posledica višegodišnje direktne izloženosti atmosferskim promenama, usled otkrivanja zapadnog zida, i dejstva "ljudskog" faktora. Posebnu opasnost predstavlja činjenica da velike pukotine južne i severne strane zida imaju sklonost daljem širenju, a što može ugroziti lošu statičku stabilnost objekta i uzrokovati obrušavanje čitave severne i južne strane zapadnog zida.



Slika 38. Narušeno stanje zidnih slika zapadne fasade egzonarteksa

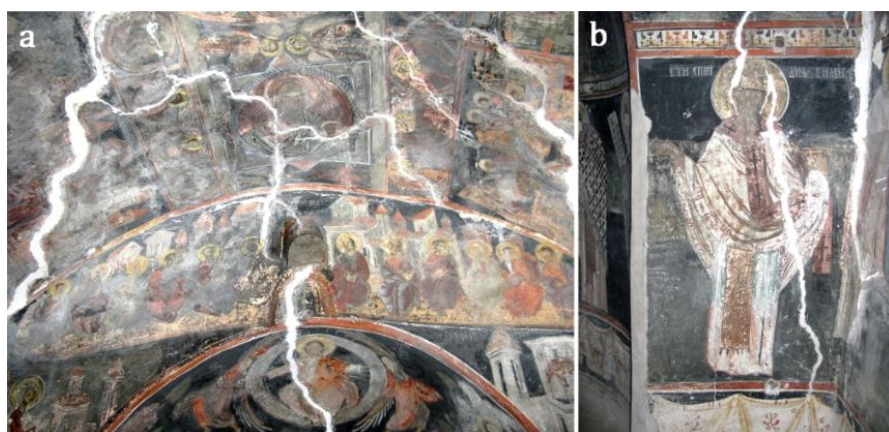
U priprati, malter zidova je u celosti očuvan na svim zidnim površinama, sa izuzetkom pilastra i luka između priprate i naosa. Od oštećenja, uglavnom su prisutna potklobučenja i obrušavanja, a malter je primarno i otpadao na mestima gde se ispod nalaze fuge između blokova kamena ili sige. Najveća oštećenja su prisutna u zoni sokla, gde je putem kapilarnog podizanja vode iz temelja, i njenog dugog zadržavanja u zidovima, dolazilo do intenzivnog vlaženja maltera. U ovoj zoni, malter je čitavom dužinom sva tri zida otpao, a postoje i brojna velika potklobučenja sa težnjom ka daljem širenju oštećenja. Malter nedostaje i na mestima gde postoje veće pukotine u zidovima i na svodu (Slika 39).



Slika 39. Potklobučenja i obrušavanje maltera severnog i južnog zida priprate

Mada zidovi priprate nisu oslikani, u zoni sokla, na mestima gde su slojevi krečnih premaza otpali, postoje tragovi crvene boje što upućuje na pretpostavku da je živopisanje priprate u nekom trenutku bilo planirano. Na južnom zidu, desno od prozora, u visini očiju posmatrača nalazi se krst naslikan istom bojom, oštećen, ali sa jasnim izgledom i veličinom. Otvaranjem sonde na južnom zidu, na spoju između pilastra u zidu, pronađena su fragmenti zidnog slikarstva i ornamentalna bordura što ukazuje na to da je između naosa i priprate postojao oslikan pregradni zid. Usled rušenja zida velike površine vrednog zidnog slikarstva su nepovratno uništene.

U naosu istraživane crkve zatečeno stanje je veoma loše. Zbog poremećaja statičke stabilnosti objekta, uzrokovanim zemljotresom i uklanjanjem pomenutog zida došlo je do uzdužnog pucanja svoda celom dužinom, kao i istočnog i zapadnog zida po vertikali (Slika 40). Takođe, zbog prethodno loše sprovedenih konzervatorsko-restauratorskih tretmana, pukotine su se naknadno otvorile i još više proširile, a novi malter se odvojio i većim delom ispao. Tako, ovim površinama pretil opasnost bespovratnog uništenja. U zidovima je, pored toga, prisutna i kapilarna vlaga koja se i bez merenja može konstatovati. Preliminarnim merenjima protimetrom (konduktometrom) najveće vrednosti su zabeležene u donjim zonama, ali su vlagom ugrožene i neke površine na više od 2 m visine (severni zid).



Slika 40. Uzdužno pucanje zidnih slika naosa: **a.** celom dužinom svoda; **b.** istočnog zida po vertikali

Originalno slikarstvo na zidovima naosa je, u najvećem delu, relativno dobro očuvano. Freske su primarno urađene u *al fresco* tehnici, sa partijama koje su završene *al secco* tehnikom: lica i šake svetitelja i drugi značajni detalji koji su zahtevali duže zadržavanje slikara. Na tim površinama bojeni sloj je u znatno lošijem stanju od ostalog živopisa, pulverizovan je ili se ljuspa (Slika 41). Na pojedinim delovima naosa živopis je čitavom svojom površinom ispucao i odvojio se u vidu ljuspi, pocrnelih od čađi. Ljuspanje je posledica toga što je sloj novog uljanog slikarstva zapušio pore na površini maltera i nije dozvoljavao “disanje” zida i njegovo isušivanje. Na mestima gde je originalni bojeni sloj bio najnestabilniji, uočljivo je da su ljespe uljanog bojenog sloja povukle sa sobom i delimično strapirale prvobitno slikarstvo. Takođe, zbog velikog vlaženja zida došlo je do snažnog rasoljavanja na površini zidnih slika i kristalizacije soli na bojenom sloju i unutar njega, kao i u površinskom sloju maltera. Iskristalisane soli formirale su belu skramu na površini zidnih slika, a na nekim mestima ona je potpuno neprozirna.



Slika 41. Ljuspanje i gubitak fragmenata bojenog sloja u oblasti lica i šaka svetitelja na zidnim slikama naosa

Decenijska zapuštenost i nebriga su jedan od osnovnih razloga za stanje zidnih slika naosa. Uklanjanjem pregradnog zida između priprate i naosa, kao i izmeštanjem ikonostasa i njegovim pomeranjem u prostor naosa, proširivanjem otvora prozora i

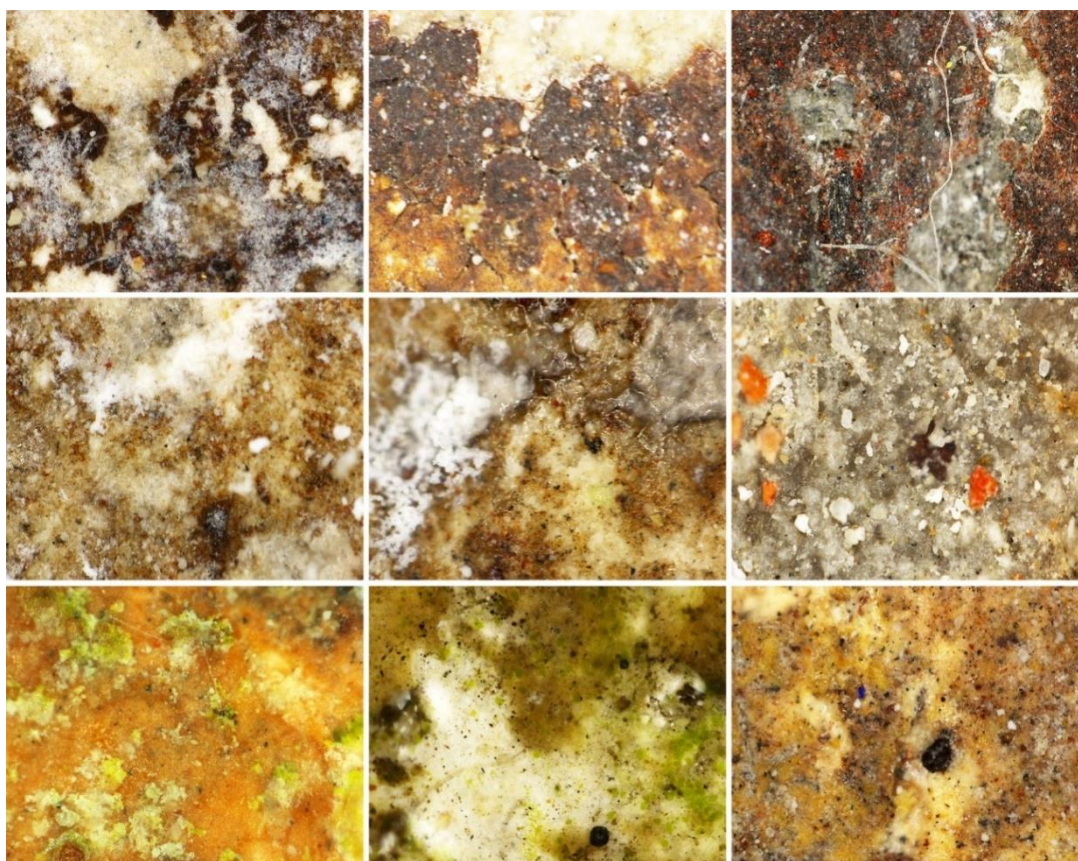
otvaranjem novih otvora za vrata i prozor, i brojnim drugim intervencijama na objektu, značajne površine živopisa bile su izložene oštećivanju i direktnom uništavanju. To je i dovelo do stanja u kome na pojedinim mestima nedostaju delovi, a negde i čitave kompozicije (Slika 42). Nerešeno pitanje odvođenja atmosferskih i eventualnih podzemnih voda i nepostojanje drenažnog sistema doprinelo je izraženom kapilarnom vlaženju zidova kao uzroku velikih oštećenja maltera, njegove kohezije, ali i adhezije prema nosiocu. Ovo je za posledicu imalo odvajanje i obrušavanje velikih površina živopisa, čime su bespovratno nestale čitave kompozicije u donjim zonama. Takođe, ljudski faktor, u formi vandalizma i primitivizma, je još jedan od uzroka propadanja zidnih slika. Najčešća su mehanička oštećenja, nastala urezivanjem imena i grafita, a javljaju se pretežno u prvoj zoni slikarstva.



Slika 42. Ekstenzivna oštećenja zidnih slika naosa crkve sa naglašenim gubitkom bojenog sloja i malterne podloge na velikim površinama

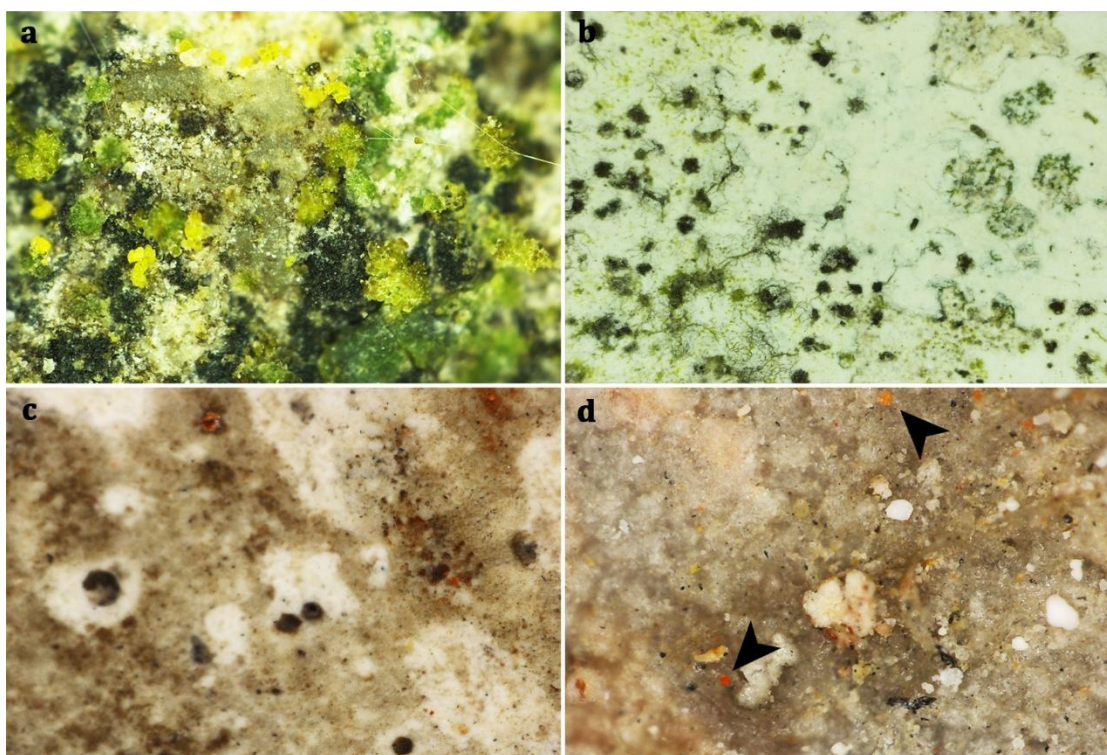
5.2. Deterioracija zidnih slika detektovana mikroskopijom *in situ*

Direktnim posmatranjem zidnih slika nije konstatovano postojanje vidljivog biofilma na površini bojenog sloja i ogoljenog maltera naosa i egzonarteksa. Primenom prenosnog Shuttle Pix P-400R mikroskopa posmatrane su i fotografisane površine sa simptomima deterioracije konstatovanim opservacijom *in situ* u cilju detekcije biofilma i njegovih komponenata. Na oštećenim delovima živopisa naosa potvrđene su promene teksture u formi ljušpanja, pucanja i odvajanja fragmenata bojenog sloja i malterne podloge (Slika 43). Takođe, zabeležene je pojava rasoljavanja tj. formiranja naslaga soli iskristalisanih u formi beličastih kristalnih agregata i vlakana, ili hidratisane prevlake, koje prekrivaju velike regione zidnih slika.



Slika 43. *In situ* mikroskopski snimci površine zidnih slika naosa sa prisutnim simptomima rasoljavanja i slojem biofilma

In situ mikroskopijom bojenog sloja zidnih slika egzonarteksa zabeleženo je prisustvo krustoznih lihenizovanih gljiva (Slika 44a, b), melanizovana plodonosna tela gljiva sa tipičnom obezbojenom zonom (Slika 44c) i depigmentisane površine sa minornim reziduama crvenog pigmenta (Slika 44d). Sa analiziranih površina uzeti su uzorci metodom adhezivne trake i pomoću aluminijumskih cilindara sa ugljenom trakom i analizirani na svetlosnom i skening elektronskom mikroskopu. Rezultati su prikazani u odeljcima 5.8. i 5.9.



Slika 44. *In situ* mikroskopski snimci površine bojenog sloja zidnih slika egzonarteksa: **a-b.** krustozne lihenizovane gljive; **c.** plodonosna tela melanizovanih gljiva **d.** depigmentisana površina – strelica pokazuje rezidue crvenog pigmenta

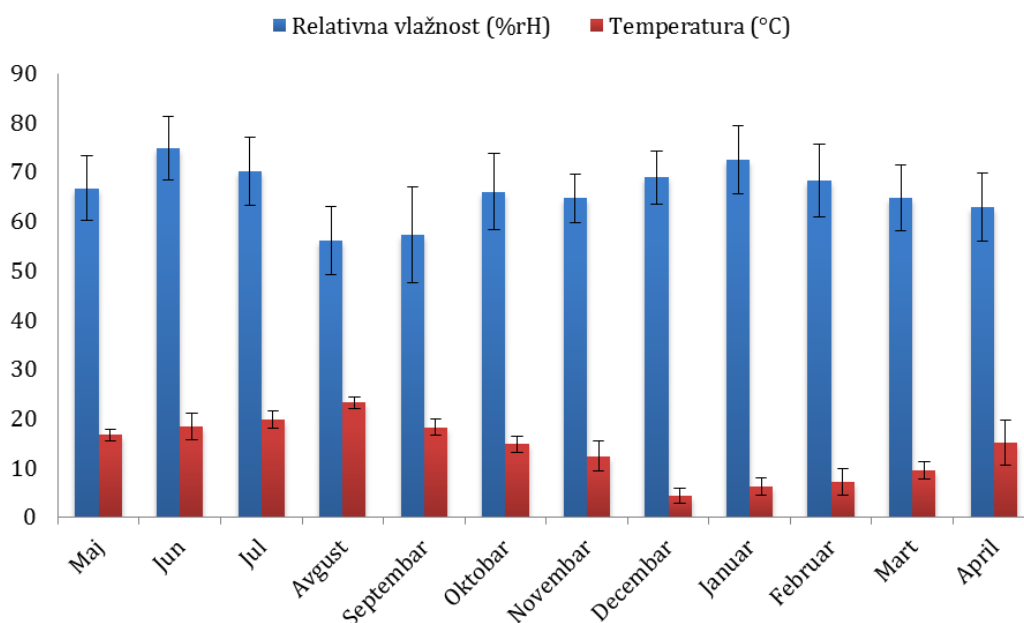
In situ mikroskopija zidnih slika predstavlja prvu do danas zabeleženu primenu prenosnog Shuttle Pix P-400R mikroskopa za detekciju bioloških agenasa kao

uzročnika oštećenja zidnih slika (Unković i dr., 2016). Prednosti *in situ* mikroskopije u konzervaciji su višestruke. Primena ovog mikroskopa omogućava detekciju prisustva biofilma na zidnim slikama bez opasnosti po nastanak strukturnih oštećenja. Takođe, omogućeno je posmatranje malih površina oštećenih zidnih slika, čime se može direktno konstatovati prisustvo mikroorganizama, bez primene standardnih metoda kultivacije i molekularnih metoda, koje su dugotrajne, skupe, i povremeno pružaju nepouzdan rezultate. Ova metoda pokazuje prednosti i u odnosu na metodu adhezivne trake, gde tokom mikroskopske analize mineralne čestice često maskiraju prisustvo struktura mikroorganizama (Bassi i Giacobini, 2001).

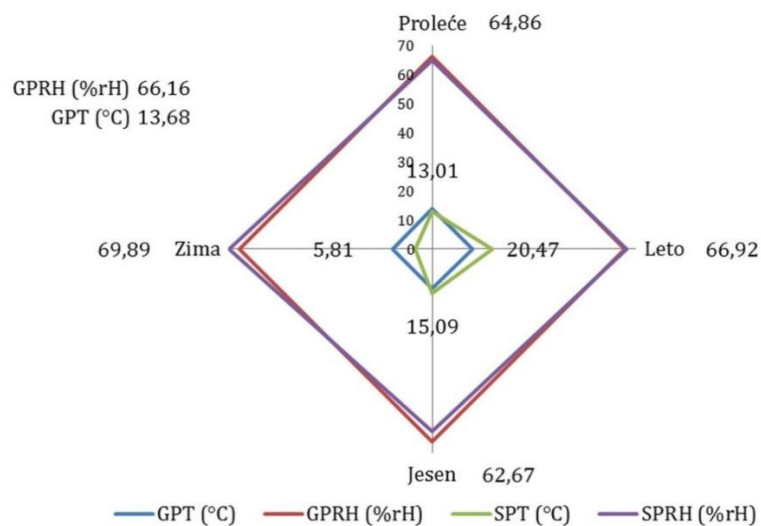
5.3. Mikroklima naosa i sadržaj vode u zidovima

Praćenje osnovnih mikroklimatskih parametara, T i RH, tokom 4 sezone 2013/14. godine sprovedeno je instalacijom uređaja (data logger) sa podešenim intervalom merenja od 30 min. Ovako kratkim mernim periodom veoma precizno su dokumentovana sva dnevna i sezonska variranja temperature i vlažnosti vazduha u naosu tokom perioda od godinu dana.

Na mesečnom nivou, minimalna prosečna temperatura je izmerena u decembru ($4,33 \pm 1,46$ °C), dok je u avgustu zabeležena maksimalna prosečna temperatura od $23,18 \pm 1,19$ °C. Prosečna relativna vlažnost vazduha se kretala u rasponu od $55,98 \pm 6,87\%$ tokom avgusta, do $74,85 \pm 6,49\%$ u junu (Slika 45). Posmatrano sezonski, temperaturni opseg je veliki i kreće se od $5,81 \pm 2,35$ °C do $20,47 \pm 2,57$ °C, dok je zabeleženi raspon relativne vlažnosti vazduha znatno umereniji, sa vrednostima od $62,67 \pm 8,61\%$ tokom jeseni do $69,89 \pm 6,91\%$ u zimskom periodu (Slika 46).

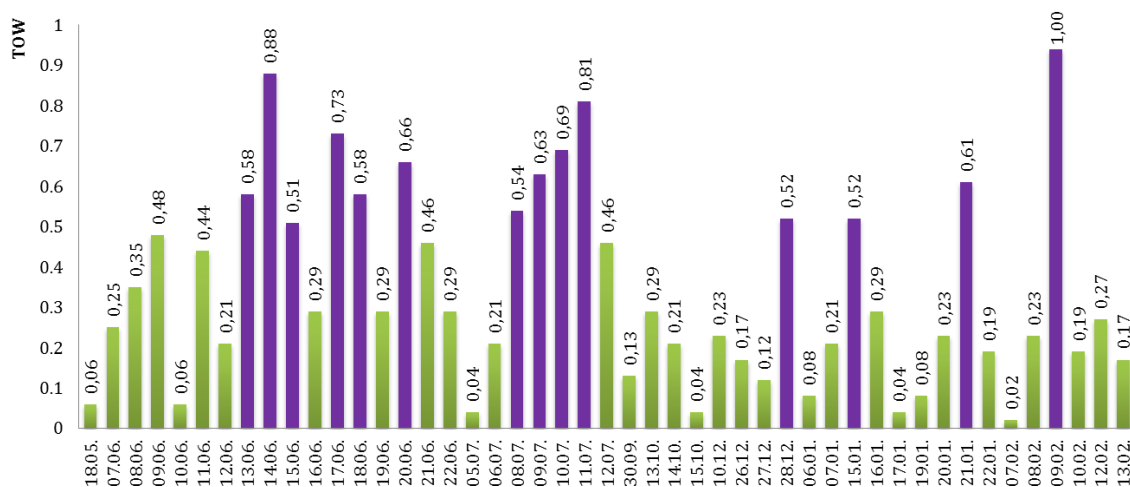


Slika 45. Prosečne vrednosti temperature i relativne vlažnosti vazduha u naosu tokom perioda 2013/14. godine. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti broja merenja sa standardnim odstupanjem



Slika 46. Šematski prikaz prosečnih godišnjih (GPT i GPRH) i prosečnih sezonskih (SPT i SPRH) temperatura i relativne vlažnosti vazduha naosa tokom perioda 2013/14. godine

Na osnovu dnevnih vrednosti RH, izmerenih tokom godinu dana, računat je period povećane vlažnosti (TOW) sa ciljem predviđanja fungalnog rasta u datim uslovima sredine. Od ukupno 365 dana, relativna vlažnost vazduha je imala vrednost preko 80% u nekom periodu dana tokom samo 47 dana, a na osnovu podataka o dužinama trajanja ovih perioda određene su TOW vrednosti sa opsegom od 0,02 do 1,00 (Slika 47). Prema Adan (1994), rast gljiva se može očekivati pri svim TOW vrednostima, ali pri TOW vrednostima ispod 0,5 rast mikromiceta na zidnim površinama je zanemarljiv. Analizom TOW vrednosti se može zaključiti da su jun i jul, kao meseci sa najvećim brojem dana sa izmerenom $RH \geq 80\%$ i najvećim zabeleženim TOW vrednostima, bili idealni periodi za rast mikromiceta na zidnim slikama naosa. Tokom ostalih meseci, $RH \geq 80\%$ su samo sporadično i kratkotrajno zabeležene, pa su u datim danima TOW vrednosti uglavnom niže od 0,5. Jedini izuzetak je zabeležen 09.02.2014. godine, kada je RH tokom 24 h konstantno bila $\geq 80\%$, pa TOW ima maksimalnu vrednost od 1,00. Ovaj period je bio najpovoljniji za rast gljiva na zidnim slikama. Pretpostavke bazirane na TOW vrednostima su potvrđene mikološkom analizom i dokumentovane u rezultatima u poglavlju 5.6.



Slika 47. Vrednosti perioda povećane vlažnosti (TOW) tokom 2013/14. godine.

Ljubičastom bojom su prikazane stubovi TOW vrednosti preko 0,5

Pored T i RH naosa, određivana je i temperatura i procentualni sadržaj vode u zidovima primenom nedestruktivne mikrotalasne metode u modu za kamen krečnjačkog porekla. EMC vrednosti su varirale u opsegu od 54,7 do 63,1%, dok su u pogledu temperature dokumentovane samo minimalne razlike ($\pm 0,2$ °C) među zidovima. Na osnovu podataka o sadržaju vlage u zidovima određene su i a_w vrednosti zidova naosa (Tabela 3).

Tabela 3. Vrednosti relativne vlažnosti zida (EMC), temperature (T) i sadržaja aktivne vode (a_w) u zidovima crkve na dubini od 5 cm

	Visina od kote poda (cm)	EMC (%)	T (°C)	a_w
Severni zid	202	63,1	18,2	0,63
Južni zid	205	56,2	18,4	0,56
Istočni zid	196	60,5	18,2	0,61
Zapadni zid	227	54,7	18,4	0,55

Dokumentovane vrednosti temperature i relativne vlažnosti vazduha naosa su u skladu sa sezonskim trendovima, kao i opšte prihvaćenim stavom da građevine bez sistema za grejanje se karakterišu visokim prosečnim RH vrednostima i velikim sezonskim razlikama u temperaturi (Martens, 2012). Na osnovu prikupljenih podataka može se zaključiti da su tokom većeg dela godine vrednosti T i RH parametara u opsegu pogodnom za rast mikromiceta, kao i uspostavljanje optimalne EMC vrednosti zida ($\geq 70\%$) za fungalni rast na bojenom sloju zidne slike (Florian, 2002; Verdier i dr., 2014). U uslovima povećane vlažnosti vazduha, kakvi su registrovani tokom najvećeg dela godine, porozna priroda maltera dovodi do nakupljanja i zasićenja pora vodom koja je neophodna mikromicetama za rast i razmnožavanje (Verdier i dr., 2014). Prisustvo vode u porama maltera vezano je za Kelvinov princip prema kome do kondenzovanja vodene pare može doći pri svim vrednostima RH nižim od 100% (Bernardi, 2000). Kapilarnim transportom voda se kreće od maltera ka površini, što prvobitno dovodi do nastanka plikova, a potom i do pucanja bojenog sloja. U uslovima dostupne vode u porama i visoke temperature

ubrzani su i prirodni hemijski procesi, kao što su oksidacija ili korozija veziva i maltera, koji narušavaju vezivne sile između pigmenata i supstrata (Broström, 2004; Martens, 2012; Tripković, 2014). S obzirom na to da istraživana crkva nema ugrađen sistem grejanja, početkom proleća sa porastom spoljne temperature dolazi do kondenzovanja pare na hladnim zidovima crkve, što je bilo naročito očigledno tokom uzorkovanja u aprilu. Pored stvaranja optimalnih uslova za rast gljiva, kondenzovana voda može formirati ugljenu kiselinu sa CO₂ oslobođenim u vazduh tokom respiratornog metabolizma mikroorganizama sa površine bojenog sloja (Garg i Dhawan, 1994). Tokom dužeg vremenskog perioda voda iz kondenzovane vlage taloži sumpor i pretvara karbonate u sulfate pri čemu nastaju promene originalne obojenosti i izraženo rasoljavanje. Takođe, sulfati iz podloge se rastvaraju, nakon čega joni migriraju na površinu bojenog sloja gde rekristališu i formiraju mikrokristalni film sačinjen od sulfatnih soli (Milanesi i dr., 2006a; Ospitali i dr., 2007). Prema Broström (2004), pored kondenzovanja vodene pare na površinama zidnih slika, u uslovima zabeleženim u prolećnom periodu, kada su zidovi hladni a vazduh topao, javlja se povećano taloženje čestica dispergovanih u vazduhu čime se povećava kontaminacija zidnih slika, a tokom dužeg vremenskog perioda mogu nastati i promene u obojenosti bojenog sloja. Osim visoke RH, tokom mernog perioda su zabeležena značajna variranja vlažnosti vazduha. Snižavanje RH do ispod 40% tokom pojedinih dana maja, avgusta, septembra i oktobra, je veoma problematično jer soli, rastvorene u vodi u uslovima visoke vlažnosti vazduha, pri naglom sniženju RH kristališu u porama ili se kristali talože na površini bojenog sloja. Ovu pojavu Bernardi i dr. (2000) i Weiss (2004) navode kao primarni abiotski faktor propadanja zidnih slika. U uslovima ovako niske RH, prema Mentu (2004), organske komponente bojenog sloja postaju krte i veoma podložne negativnom uticaju drugih faktora sredine.

U poređenju sa jako visokim ili niskim vrednostima temperature i relativne vlažnosti vazduha, koje su dominantne tokom određenog perioda dana, česte i nagle dnevne promene T i RH mogu zbog promena EMC vrednosti imati daleko veće

posledice po zidne slike i strukturu građevine (Dambis, 2004). Pri naglim promenama uslova sredine, soli u ili na zidnim slikama se u ciklusima rastvaraju, menjaju tip hemijske veze i ponovo kristališu, dok komponente u sastavu slika, međusobno čvrsto povezane, u određenom stepenu povećavaju ili smanjuju zapreminu. Sve to dovodi do povećanja unutrašnjeg pritiska, pucanja i gubitka fragmenata bojenog sloja i maltera (Weiss, 2004). S obzirom na to da su u pojedinim danima mernog perioda ovako nagle promene mikroklimе izmerene i u naosu istraživane crkve, neki od zabeleženih simptoma deterioracije zidnih slika su sigurno posledica abiotski indukovanoг oštećenja.

Dugoročno praćenje dnevne i sezonske dinamike mikroklimе naosa omogućava da se utvrdi uzrok nastanka zabeleženih strukturnih i estetskih promene na zidnim slikama, ali i formuliše plan i sprovođenje adekvatnih preventivnih mera kao osnovnog preduslova za efikasno očuvanje zidnih slika. Mada su optimalni uslovi sredine za očuvanje zidnih slika tema velikog broja polemika, svi autori se slažu po pitanju neophodnosti ograničavanja učestalih variranja temperature i vlažnosti vazduha, kao i nastanka optimalnih uslova za rast mikroorganizama (Silva i Henriques, 2014). Dugo se smatralo da temperatura u crkvama treba da bude prilagođena posetiocima, dok su se adekvatne RH vrednosti određivale na osnovu istraživanja sprovedenih u muzejima. Polazilo se od pretpostavke da se kombinovanjem ova dva standarda postižu optimalni uslovi za pravilno čuvanje i zaštitu kulturnih dobara bez obzira na tip, lokalitet i namenu građevine (Silva i Henriques, 2014). Problem predstavlja i činjenica da mikroklima zapravo nije uniformna u celom prostoru, već parametri u određenom stepenu odstupaju od proseka, što zavisi od kruženja vazduha, prodora svetlosti kroz otvore, strukture građevine kao i namene i upotrebe objekta (Martens, 2012). Zidne slike su zapravo izložene dejstvu mikroklimatskih uslova koji se ne mogu u potpunosti kontrolisati. Prema Broström (2004), vlažnost vazduha unutar crkvi se najjednostavnije može kontrolisati promenom temperature. S obzirom na to da su T i RH obrnuto proporcionalni, adekvatna temperatura treba da se odredi, a potom postigne i održava

u odnosu na stanje relativne vlažnosti vazduha. Usled snižavanja vlažnosti vazduha, snižavaju se EMC vrednosti zidnih slika što uslovljava snižavanje a_w vrednosti ispod nivoa na kome je moguć rast mikromiceta (Florian, 2002). Idealno rešenje predstavlja sistem za grejanje koji omogućava brze i nagle promene temperature, usled čega bi nastale značajne promene temperature i vlažnosti vazduha u većem delu crkve, ali ne i vazduha u kontaktu sa zidom. Na taj način negativan efekat visoke temperature na zidne slike i stimulisanje rasta gljiva bi bio sveden na minimum (Broström, 2004). Mada se radi o veoma jednostavnom principu, u praksi održavanje pogodne mikroklike za očuvanje zidnih slika je teško i uprkos tome što su crkve, i druge verske ustanove, kulturna dobra od velike duhovne vrednosti, u ovom tipu objekata problemi izazvani neadekvatnom klimom i održavanjem su konstantno prisutni.

Prema Tabunschikov i Brodatch (2004) i Mentu (2004) vazduh u unutrašnjosti većine objekata sa zidnim slikama treba da karakteriše temperatura ispod 18 °C i vlažnost vazduha oko 60%, uz sprečavanje velikih dnevnih i sezonskih variranja parametara. Međutim, većina autora se slaže po pitanju neophodnosti formiranja standarda za svaki pojedinačni slučaj, na osnovu podataka o klimi istraživanog objekta i neposredne okoline, strukturi građevine, stepenu oštećenja zidnih slika, prisutnim simptomima i raznovrsnosti mikrobiote (Broström, 2004). Formirani standard mora zadati prosečne vrednosti temperature i relativne vlažnosti vazduha, maksimalno odstupanje za oba parametra, kao i posledice promene mikroklike na zidne slike i građevinu od interesa (Martens, 2012). Navođenjem dozvoljenog opsega parametara i detaljnom analizom oštećenja nastalih u datim uslovima mikroklike moguće je predvideti i sprovesti mere za sprečavanje nastanka strukturnih i estetskih promena na zidnim slikama. Jasno formulisan standard i pravilno primenjena kontrola mikroklike u crkvi Svetog Vaznesenja Gospodnjeg bi bila jednostavna i veoma efikasna metoda za kontrolu prisutnog i sprečavanje novog rasta mikromiceta. U poređenju sa visokim cenama konzervatorsko-restauratorskih tretmana, proaktivne mere u formi kontrole mikroklike bi zapravo bile veoma ekonomične.

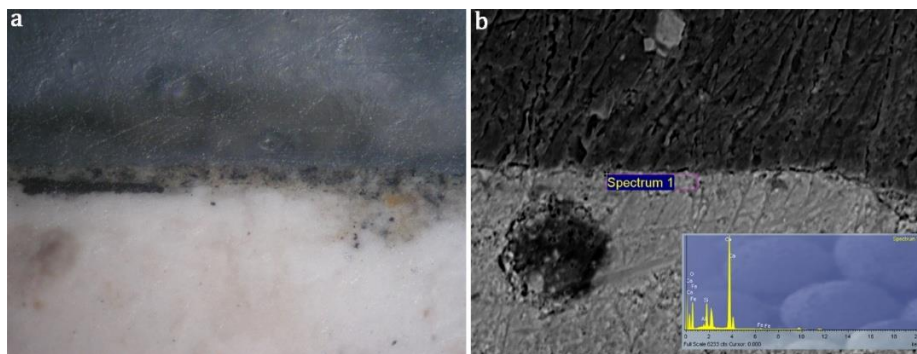
5.4. Detekcija korišćenih slikarskih pigmenata

Mineraloška, hemijska i mikrostrukturalna svojstva bojenog sloja i malterne podloge zidnih slika naosa istraživane crkve određena su SEM-EDX elementarnom analizom i analizom poprečnih preseka fragmenata zidnih slika na metalografskom mikroskopu. Svi analizirani uzorci su uzeti sa severnog zida naosa izuzev petog uzorka koji je uzet iz đakonikona naosa. Podaci o elementarnom sastavu bojenog sloja i maltera analiziranih fragmenata sumirani su u Tabeli 4. U svim uzorcima, spektar nastao fokusom elektrona na malternu podlogu bojenog sloja sadrži samo elemente u sastavu CaCO_3 i punioca čime je potvrđena krečna priroda maltera.

Tabela 4. Elementarni sastav bojenog sloja i malterne podloge zidnih slika

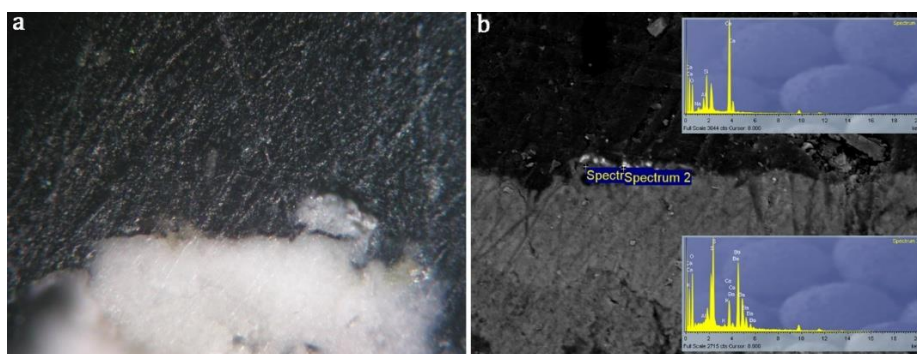
Broj uzorka	Boja fragmenta	Element (%)												
		O	Na	Mg	Al	Si	S	Cl	K	Ca	Fe	Ba	Hg	Σ
1	crna	61,95	-	-	0,63	4,48	-	-	-	32,34	0,61	-	-	100
2	crna	31,64	-	-	0,37	-	14,37	-	0,39	4,72	-	48,51	-	100
3	crvena	50,71	-	1,50	2,44	5,41	2,41	-	0,49	25,22	2,07	-	9,73	100
4	crvena	58,36	-	3,29	0,61	15,44	-	0,23	0,21	17,67	4,20	-	-	100
5	zelena	60,24	-	0,81	0,71	4,82	-	-	1,00	29,11	3,30	-	-	100
6	oker	59,83	0,53	0,32	-	0,59	-	0,36	0,36	38,02	-	-	-	100

U prvom uzorku fragmenta bojenog sloja, crne boje, zabeleženo je prisustvo dve vrste pigmentnih zrna, zelene i dominantne crne, okludovane u belom amorfnom vezivu (Slika 48a). U EDX spektru analiziranog bojenog sloja dokumentovani su elementi u sastavu CaCO_3 i manje količine Al, Si i Fe koje mogu poticati kao primese iz punioca ili su sastavni deo pigmentnih zrna zelene boje (zelena zemlja, glaukonit $\text{K}(\text{Mg},\text{Fe}_2)(\text{Fe}_3,\text{Al})\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})$ i celadonit $(\text{K},\text{Na})(\text{Fe},\text{Al},\text{Mg})_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$) (Slika 48b). U EDX spektru nastalom fokusom elektrona na crna pigmentna zrna bojenog sloja primetan je skok spektralne linije C. Na osnovu izgleda poprečnog preseka, kao i rezultata EDX analize, analizirani pigment je identifikovan kao ugljena crna sa malim primesama zelene zemlje.



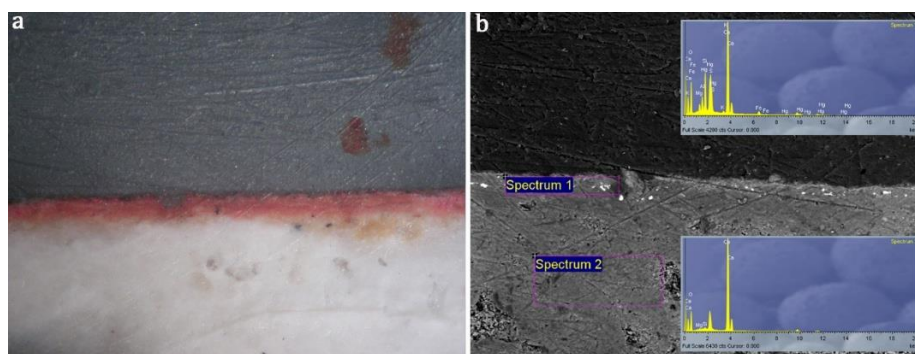
Slika 48. Izgled poprečnog preseka fragmenta bojenog sloja, crne boje: **a.** snimak sa optičkog mikroskopa, u odbijenom svetlu; **b.** SEM-EDX sa naznačenom analiziranom tačkom

EDX analizom drugog uzorka fragmenta bojenog sloja, crne boje, zabeleženi su S i Ba što upućuje na vezivo proteinskog tipa ili sulfata. Prisustvo ovih elementa je verovatno posledica restauratorskih tretmana sprovedenih u prošlosti. Pored S i Ba, u spektru bojenog sloja su uočene i spektralne linije od nekoliko drugih elemenata: C, Fe, Ca, K, Mg, Na, Al, Si, O, i Cl (Slika 49b). Uzimajući u obzir izgled preseka i elementarni sastav analizirani pigment je identifikovan kao ugljena crna. Granica razdvajanja bojenog sloja je jasna, a prisustvo veće količine S u bojenom sloju, nego u podlozi, ukazuje na korišćenje proteinskog veziva tokom živopisanja (Han i dr., 2013).



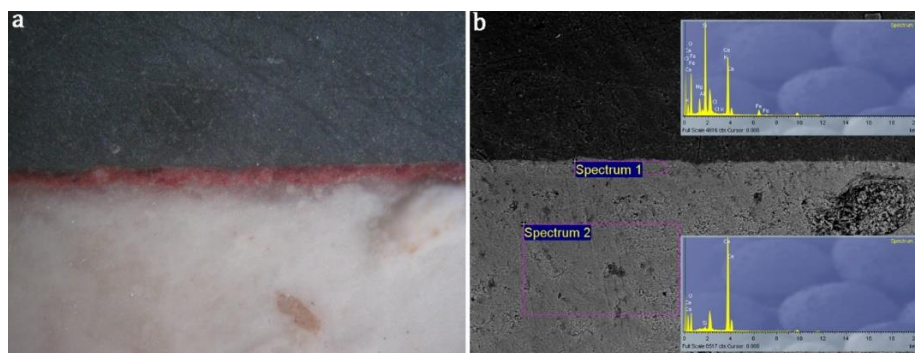
Slika 49. Izgled poprečnog preseka fragmenta bojenog sloja, crne boje: **a.** snimak sa optičkog mikroskopa, u odbijenom svetlu; **b.** SEM-EDX sa naznačenim analiziranim tačkama

Na poprečnom preseku trećeg uzorka fragmenta bojenog sloja, crvene boje, konstatovano je prisustvo crvenih pigmentnih zrna na malternoj podlozi (Slika 50a). U spektru bojenog sloja, pored Ca, detektovani su Fe, Al, Si, K, i Hg (Slika 50b). Izgled poprečnog preseka i raspodela elemenata u površinskom bojenom sloju ukazuju na to da je crveni ton formiran mešanjem pečenog okera (pečeni oker, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sa malo cinabarita (vermilion-cinabar, HgS).



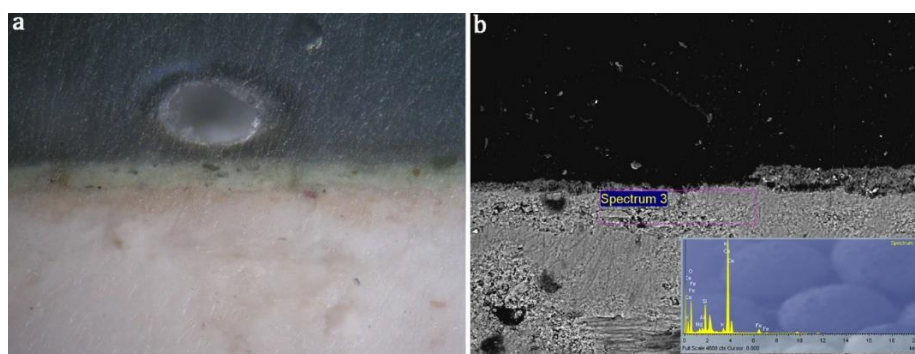
Slika 50. Izgled poprečnog preseka fragmenta bojenog sloja, crvene boje: **a.** snimak sa optičkog mikroskopa, u odbijenom svetlu; **b.** SEM-EDX sa naznačenim analiziranim tačkama

Analizom četvrtog uzorka fragmenta bojenog sloja, crvene boje, pokazano je prisustvo Fe, Ca, Cl, K, Al, Si i O u bojenom sloju (Slika 51). Cl može poticati od hlorida prisutnih u vidu soli, usled izraženog rasoljavanja na zidnim slikama. Uzimajući u obzir izgled preseka i elementarni sastav analizirani pigment je identifikovan kao pečeni oker ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) koji daje crveni ton borduri.



Slika 51. Izgled poprečnog preseka fragmenta bojenog sloja, crvene boje: **a.** snimak sa optičkog mikroskopa, u odbijenom svetlu; **b.** SEM-EDX sa naznačenim analiziranim tačkama

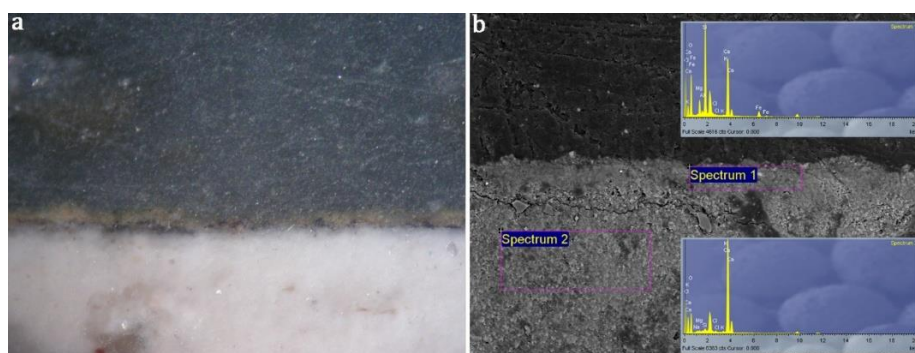
Elementarnom analizom petog uzorka fragmenta bojenog sloja, zelene boje, konstatovano je prisustvo Si, Mg, Al, Ca, K i Fe, odnosno elemenata iz sastava zelenog minerala glaukonita $K(Mg,Fe_2)(Fe_3,Al)Si_4O_{10}(OH)$ (Slika 52b). Uzimajući u obzir izgled preseka i elementarni sastav analizirani pigment je identifikovan kao zelena zemlja.



Slika 52. Izgled poprečnog preseka fragmenta bojenog sloja, zelene boje: **a.** snimak sa optičkog mikroskopa, u odbijenom svetlu; **b.** SEM-EDX sa naznačenom analiziranom tačkom

Na poprečnom preseku uzorka fragmenta bojenog sloja, oker boje, konstatovano je prisustvo dve vrste pigmentnih zrna, oker i crnih, unutar bojenog sloja na podlozi (Slika 53a). U spektru nastalom fokusom elektrona na bojeni sloj

prisutni su elementi iz sastava hidratiranih oksida gvožđa, getita (α -FeOOH) i lepidokrocita (γ -FeOOH), pomešani sa feldspatima i karbonatima (limonit) (Slika 53b). Ova smeša poznata je u slikarstvu kao oker, a ton je postignut mešanjem sa manjom količine ugljene crne.



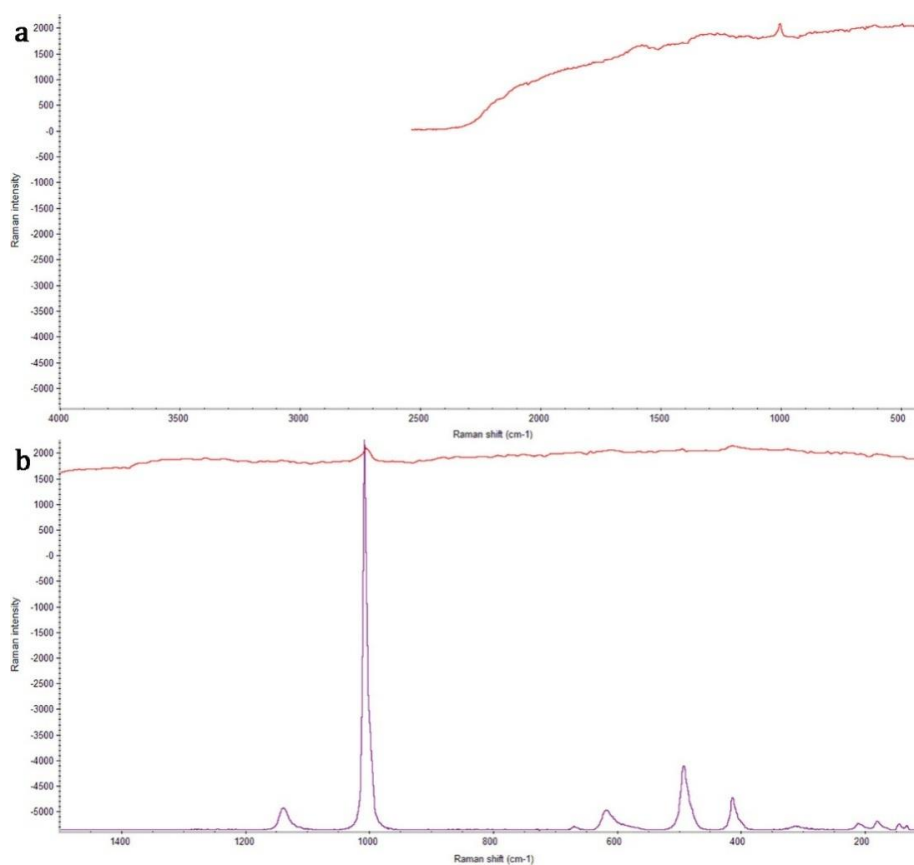
Slika 53. Izgled poprečnog preseka fragmenta bojenog sloja, oker boje: **a.** snimak sa optičkog mikroskopa, u odbijenom svetlu; **b.** SEM-EDX sa naznačenim analiziranim tačkama

Sprovedene analize su pokazale da svi pigmenti korišćeni tokom živopisanja istraživane crkve pripadaju paleti pigmenata tradicionalno korišćenoj od strane majstora srpske srednjovekovne umetnosti (Zorba i dr., 2006; Estaugh i dr., 2008). Takođe, posmatranjem bordura i granica razdvajanja slojeva, kao i potvrdom krečne prirode maltera, ustanovljeno je da su zidne slike rađene *fresco secco* kombinovanom tehnikom, što predstavlja izuzetak s obzirom na to da su zidne slike u ovom regionu prevashodno izvođene *al fresco* tehnikom (Stanojević, 2014). Da zaista nije u pitanju prosta *al fresco* tehnika, u prilog govori i prisustvo proteinskog veziva nepoznatog porekla, zabeleženo tokom spektralne analize, jer priprema boja, mešanjem mineralnih pigmenata sa vezivima organskog porekla, predstavlja karakteristiku *al secco* tehnike živopisanja. Kako bi se omogućila dugotrajna zaštita i očuvanje zidnih slika istraživane crkve, podaci o prirodi pigmenata i podloge, kao i prisustva veziva kao izvora nutrijenata za rast mikromiceta, moraju se uzeti u obzir prilikom

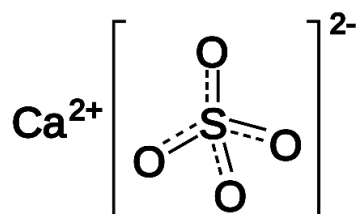
tumačenja rezultata istraživanja i odabira adekvatnih metoda preventive i saniranja nastalih oštećenja.

5.5. Rasoljavanje i analiza soli na zidnim slikama naosa

Kvalitativna analiza uzorka soli sakupljenog iz zone intenzivnog i vidnog rasoljavanja površine bojenog sloja zidnih slika naosa sprovedena je μ Ramanskom spektroskopijom. Poređenjem Raman spektra (Slika 54) sa bibliotekama minerala utvrđeno je da je rasoljavanje na zidnim slikama uzrokovano intenzivnom kristalizacijom anhidrovanog kalcijum sulfata (CaSO_4) (Slika 55).

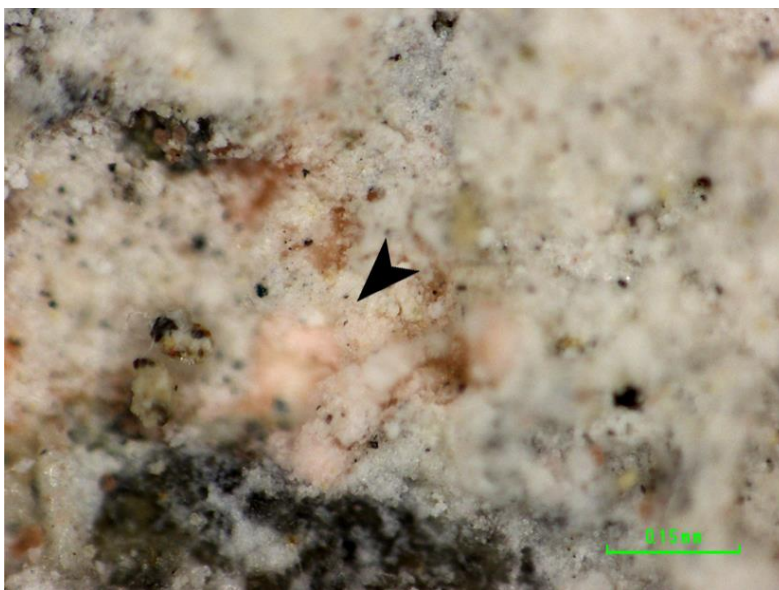


Slika 54. Analiza uzorka soli sa regiona intenzivnog rasoljavanja površine bojenog sloja: **a.** Ramanski spektar nepoznatog uzorka soli; **b.** Ramanski spektri nepoznatog uzorka soli [-] i kalcijum sulfata iz biblioteke minerala [-]



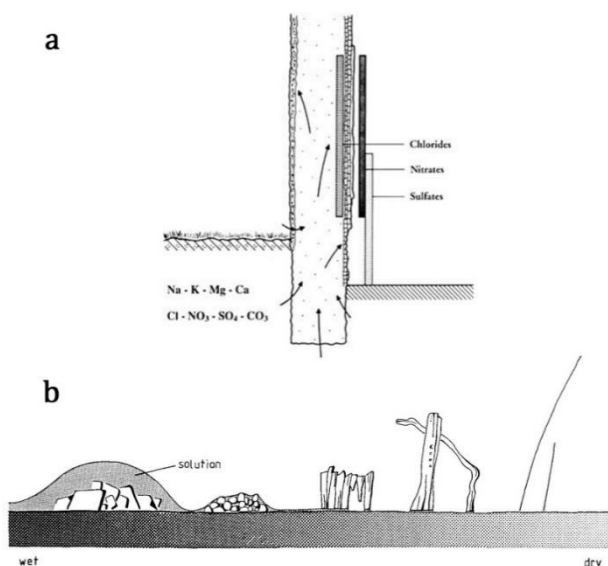
Slika 55. Kalcijum sulfat, strukturna formula

Sa konzervatorskog aspekta, prisustvo sulfata je veoma problematično jer se oni, pored nitratnih i oksalatnih soli, smatraju glavnim solima odgovornim za procese propadanja zidnih slika i drugih poroznih supstrata (Pérez-Alonso i dr., 2004). Prema Price (1996), kalcijum sulfat je široko prihvaćen u konzervatorskim krugovima kao primarni uzrok nastanka oštećenja krečnjačkih supstrata predmeta i kulturnih dobara. U uslovima povećane vlažnosti sulfati mogu dovesti do nepovratnih estetskih oštećenja zidnih slika jer rastvaraju i apsorbuju pigmente bojenog sloja, što je kao fenomen zabeleženo na istraživanim zidnim slikama (Slika 56). Pored toga, ove soli doprinose i rastvaranju organskih veziva (Escorteganha i dr., 2013).



Slika 56. Površinski depozit sulfatne soli izmenjene boje nastale usled rastvaranja i apsorbovanja crvenog pigmenta iz bojenog sloja

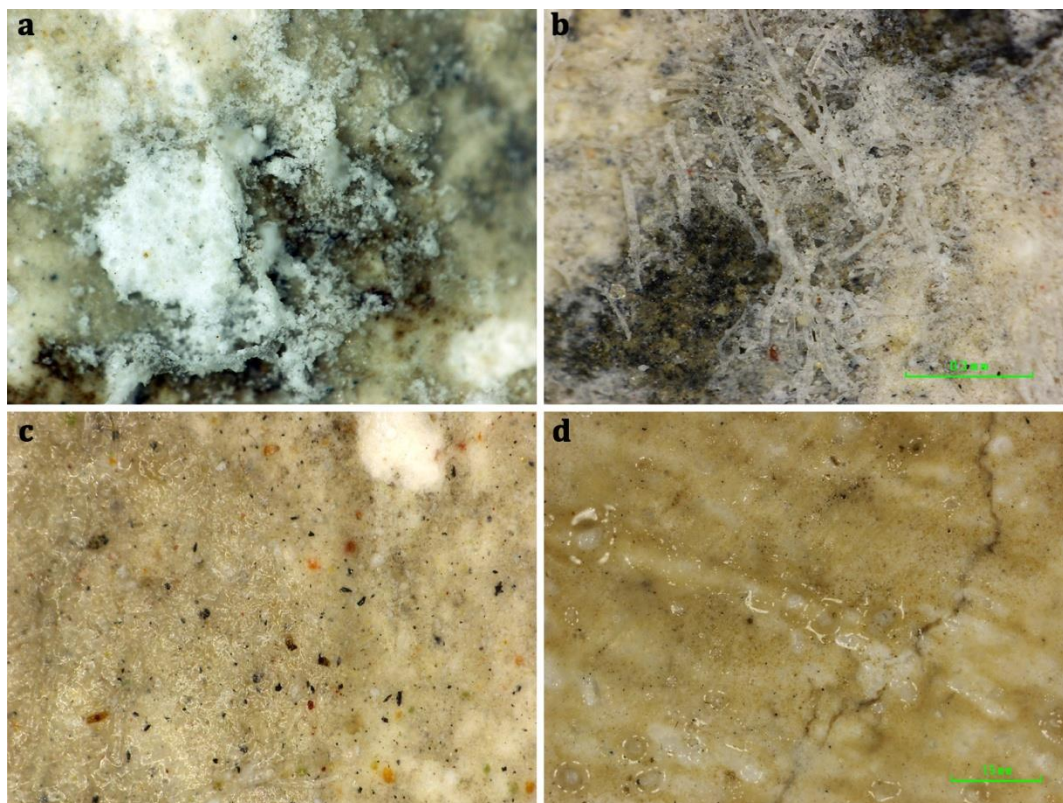
Poreklo kalcijum sulfata na površini bojenog sloja zidnih slika je verovatno vezano za sastav kamena korišćenog pri građenju crkve, ali i prisustvo podzemnih voda, bogatih jonima metala, koje mogu prodreti iz zemljišta u zidove građevine gde porozna priroda krečnog maltera omogućava jednostavno migriranje rastvora soli iz unutrašnjosti na površinu zidnih slika (Piqué i dr., 1992). Pored toga, soli mogu nastati i od jona deponovanih iz atmosferskih zagađenja prirodnog i antropogenog porekla, slanih rastvora korišćenih pri konzervatorsko-restauratorskim tretmanima, ili kao posledica metabolizma gljiva (Pérez-Alonso i dr., 2004). Organske kiseline, nastale tokom primarnog metabolizma, heliraju jone metala i rastvaraju katjone iz pigmentata i maltera što dovodi do formiranja soli i minerala. Dodatno, monohidrat i dihidrat kalcijum sulfata mogu nastati i usled razgradnje maltera pod dejstvom kiselih zagađivača (Tripković, 2014). Bez obzira na poreklo jona, sve soli se talože na zidnim slikama prema određenom redosledu pri čemu umereno rastvorni i slabo higroskopi sulfati se talože zajedno sa nitratima, a odmah posle manje rastvorni karbonati (Slika 57) (Zehnder, 2006).



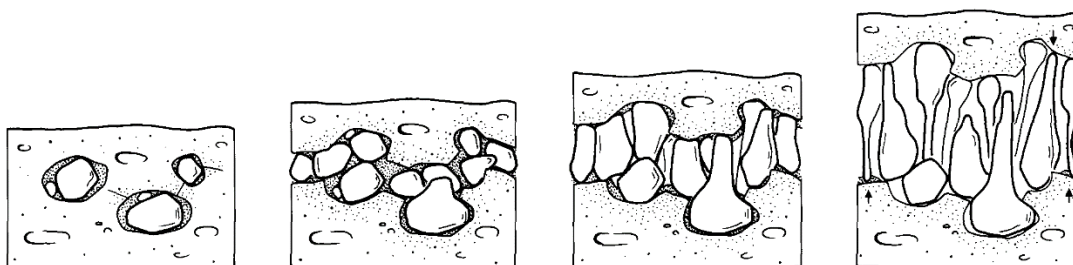
Slika 57. Model formiranja rasoljavanja na zidnim slikama: **a.** prema Zehnder (2006);
b. prema Zehnder i Arnold (1989)

Usled toga, na zidnim slikama se mogu naći dispergovane u porama maltera ili lokalno koncentrisane na površini bojenog sloja higroskopne soli, među kojima su najčešće hloridi, sulfati, oksalati i nitrati kalcijuma, natrijuma, kalijuma, magnezijuma i amonijaka (Zehnder i Arnold, 1989; Piñar i dr., 2009; Tripković, 2014).

Uprkos tome što je na bojenom sloju zabeleženo prisustvo samo površinskog kalcijum sulfata, oštećenja zidnih slika retko su kada posledica delovanja samo jedne površinske soli. Direktnim posmatranjem portabilnim mikroskopom utvrđeno je da je identifikovana so lokalno koncentrisana na površini, u formi kompaktnih agregata ili rastresite skupine tankih kristala (Slika 58). Primenom ove tehnike ne može se potvrditi eventualno prisustvo manje očiglednog podpovršinskog kristalisanja soli, na prelazu maltera i bojenog sloja ili u bojenom sloju. Bez obzira na mesto formiranja, do nastanka simptoma oštećenja zidnih slika dolazi jer pri učestalim promenama uslova sredine, pre svega relativne vlažnosti vazduha i temperature, soli kristališu i rekristališu u ciklusima (Sterflinger i Piñar, 2013). S obzirom na to da su dimenzije pora manje od veličine kristala, tokom kristalizacije soli dolazi do porasta pritiska duž zidova pora, i nastanka krunjenja i gubitka fragmenata bojenog sloja i maltera (Slika 59) (Zehnder i Arnold, 1989; Ettenauer i dr., 2014). Imajući navedeno u vidu, redovno praćenje i kontrola mikroklimatskih parametara unutar crkve postaju presudne jer određene vrednosti temperature i relativne vlažnosti vazduha uslovljavaju promene faze stanja soli. Svaka higroskopna so ima karakterističnu EMC vrednost, određenu parametrima T i RH, preko koje se so rastvara apsorbujući vlagu iz vazduha, a ispod koje dolazi do lakog kristalisanja soli u porama i na bojenom sloju. Kalcijum sulfat karakterišu umerena rastvorljivost i visoka EMC vrednost, zbog čega ova so teško i retko kristališe. Međutim, njeno učestalo formiranje na istraživanim zidnim slikama je možda posledica prisustva drugih soli unutar bojenog sloja koje delovanjem mogu da povećaju rastvorljivost i smanje RH vrednost neophodnu za laku kristalizaciju kalcijum sulfata u supstratu (Price, 1996).



Slika 58. Morfološke forme kalcijum sulfata na zidnim slikama naosa: **a.** kristalni agregati; **b.** kristalna vlakna; **c-d.** hidratizane prevlake



Slika 59. Šema procesa kristalizacije soli unutar bojenog sloja zidnih slika: prema Zehnder i Arnold (1989)

Pored mehaničkog oštećenja bojenog sloja i maltera, izazvanog promenom faze stanja soli, intenzivno rasoljavanje zidnih slika za posledicu može imati nastanak hemijskih i mineraloških promena pigmentata, uglavnom manifestovanih kao promene

originalne obojenosti (Zehnder i Arnold, 1989). Takođe, depozit soli na bojenom sloju imaju značajnu ulogu u favorizovanju kolonizacije i diverziteta mikrobiote zidnih slika, jer formirani kristali soli smanjuju gustinu i stvaraju površinske nepravilnosti u EPS matriksu koje služe kao idealna mesta za kolonizaciju heterotrofnih mikroorganizama (Milanesi i dr., 2006a). U takvim uslovima, dolazi do nekontrolisanog razvoja biofilma, što za posledicu ima ubrzanu oksidaciju, redukciju i transformaciju jona metala, primarno Fe i Mn, ali i As, Pb, Cu, Zn i Hg prisutnih u pigmentima (Gorbushina i dr., 2004).

Deterioracija zidnih slika uzrokovana rasoljavanjem predstavlja star i, sa konzervatorske tačke gledišta, još uvek nerešiv problem (Gil i dr., 2015). Mehaničko čišćenje soli primenom adekvatnih metoda je jedan od osnovnih koraka tokom procesa restauriranja zidnih slika (Kotulanová i dr., 2009). Takođe, preduzimanje mera preventive, u formi monitoringa i kontrole T i RH, je neophodno da bi se mikroklimatski parametri održavali na nivou na kojem su soli stabilne i ne dolazi do ciklusa rastvaranja i kristalisanja. Međutim, ove mere mogu samo da značajno uspore, ali ne i u potpunosti zaustave proces deterioracije zidnih slika (Zehnder, 2006).

5.6. Diverzitet i sezonska dinamika mikromiceta izolovanih sa bojenog sloja zidnih slika naosa i egzoneraksa

Mikromicete kolonizatori bojenog sloja zidnih slika, ogoljenog maltera i fasade istraživane crkve, uzorkovane su metodama kontaktnog slajda i sterilnog brisa. Sa 28 tačaka uzorkovanja (8 - zidne slike u 3 visine, 2 - ogoljen malter, 2 - fasada), tokom 4 sezone 2013/14. godine, identifikovano je 46 taksona mikromiceta (Tabela 5). Pored identifikovanih gljiva, na kontaktnim slajdovima i u mešovitim kulturama dobijenim iz uzoraka uzetih sterilnim brisom, zabeležen je i veliki broj filamentoznih gljiva koje usled odsustva reproduktivnih struktura nisu identifikovane - *Mycelia sterilia*. Sporadično su u uzorcima konstatovani i kvasci koji takođe nisu identifikovani do nivoa vrste.

Od ukupno 46 izolovanih gljiva, na zidnim slikama naosa i egzonarteksa je zabeleženo 43 (93,47%), dok je sa ogoljenog maltera i fasade izolovano 8 (17,39%) i 10 (21,74%) taksona. Poređenjem mikromiceta izolovanih sa zidnih slika, fasade i maltera, može se konstatovati 15 zajedničkih vrsta. Samo 3 vrste, *Aspergillus flavipes* i *Cladosporium oxysporum* sa fasade i *Cladosporium* sp. sa maltera, nisu zabeležene u sastavu mikrobiote bojenog sloja zidnih slika.

Tabela 5. Mikromicete izolovane sa zidnih slika naosa i egzonarteksa, ogoljenog maltera i fasade crkve

Izolovane mikromicete	ITS I/ β -tubulin - % hom.	Proleće	Leto	Jesen	Zima
<i>Alternaria alternata</i>	1173 [KU936229] 90,0% MP39 [KJ396337] 100,0%	+	+	+	+
<i>Alternaria brassicicola</i>	-				+
<i>Arthrimum cuspidatum</i>	-		+		
<i>Aspergillus aureolatus</i>	CBS 138434 [KU866663] 99,1% CCF 2474 [FR775316] 100,0%		+		+
<i>Aspergillus caespitosus</i>	-				+
<i>Aspergillus creber</i>	CCF 3994 [FR775340] 98,4%			+	
<i>Aspergillus europaeus</i>	CCF 1871 [FR727119] 98,8% CCF 1871 [FR775318] 99,4%	+	+		
<i>Aspergillus flavipes</i>	NZ-3 [KU877218] 90,4%		+		
<i>Aspergillus flavus</i>	SF45 [KR905618] 96,5% R.Kirschner 4188 [LC085664] 99,8%	+	+		+
<i>Aspergillus nidulans</i>	-		+		+
<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>dentatus</i>	-		+		
<i>Aspergillus niger</i>	AHBR5 [KF305744] 92,3% An08c0100 [AM270165] 98,2%	+	+		+
<i>Aspergillus oryzae</i>	RM103 [KU613361] 99,8% RIB40 DNA, SC038 [AP007169] 99,3%			+	
<i>Aspergillus ostianus</i>	ATCC 16887 [NR_077151] 99,8% CBS 31180 [AY819969] 99,1%				+
<i>Aspergillus parasiticus</i>	NRRL 502 [AY373859] 99,3% [L49386] 98,4%				+
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	-		+		
<i>Chaetomium</i>	C105 [HM365241] 99,6%		+		

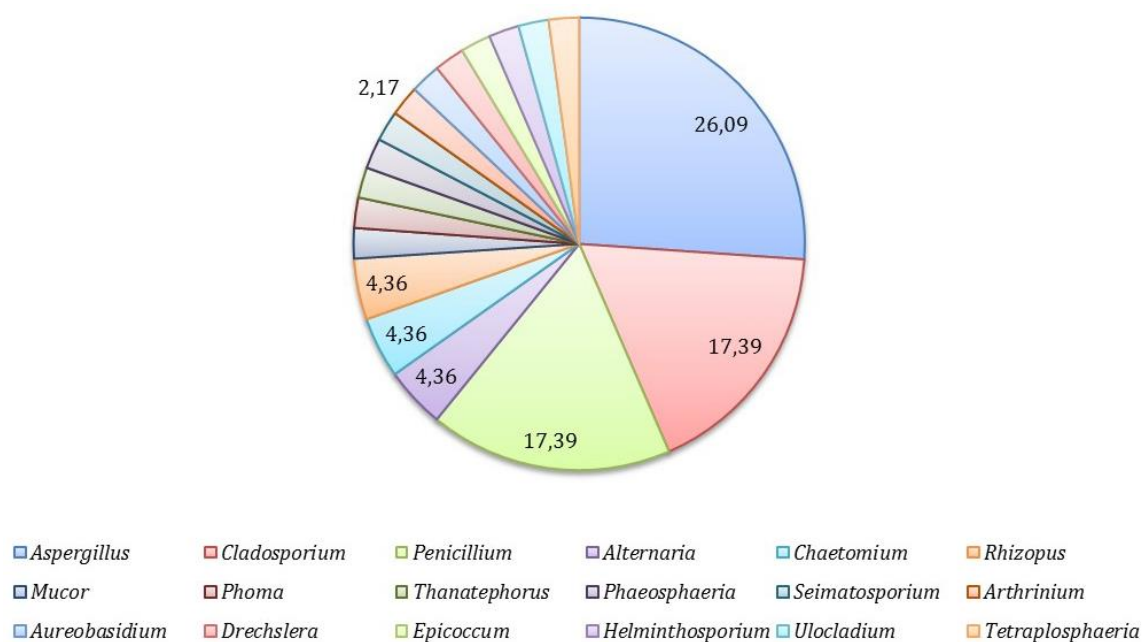
- REZULTATI I DISKUSIJA -

<i>ancistrocladum</i>					
<i>Chaetomium murorum</i>	00153-1 [KT192199] 99,6% KUC21225 [KT207641] 99,4%	+	+	+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	UTHSC DI-13-204 [LN834358] 99,6%	+	+		+
<i>Cladosporium herbarum</i>	-		+		
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	-	+	+		+
<i>Cladosporium oxysporum</i>	ATCC 66669 [F101454] 100,0%			+	+
<i>Cladosporium uredinicola</i>	JS11 [KM513616] 100,0%	+	+	+	+
<i>Cladosporium</i> spp.	-			+	+
<i>Drechslera dematioidea</i>	-		+		
<i>Epicoccum nigrum</i>	TGF1-MRL [KM977751] 94,4% KUC21264 100,0%	+	+	+	+
<i>Helminthosporium solani</i>	-		+		
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphaerosporus</i>	-				+
<i>Penicillium commune</i>	T_S1_F [KP411582] 98,1%		+		
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Yup08 [HQ262520] 100,0% F277935 [KC427061] 100,0%	+			
<i>Penicillium lanosum</i>	GZU-BCECD38-1 [JQ965090] 97,5%		+		
<i>Penicillium rubens</i>	ATCC 9179 [KU896998] 98,4%	+			
<i>Penicillium</i> spp.	-		+	+	+
<i>Phaeosphaeria avenaria</i> f. <i>triticae</i>	QLF50 [F]623271] 94,8% f. sp. <i>triticae</i> [AY786330] 91,4%		+		
<i>Phoma medicaginis</i>	23 [LN827697] 90,0% Pmed5NY [HM157913] 91,8%	+	+		
<i>Rhizopus microsporus</i>	-			+	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	+	+		
<i>Seimatosporium lichenicola</i>	V-1-9 [KT000158] 99,4%			+	
<i>Tetraplophaeria tetraploa</i>	-			+	
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	IUVV 13-411 [FR670341] 99,5%			+	
<i>Ulocladium chartarum</i>	-			+	
<i>Mycelia sterilia</i>	-	+	+	+	+
Kvasci	-	+	+	+	+

- : identifikacija izvršena na osnovu morfo-fizioloških karakteristika;

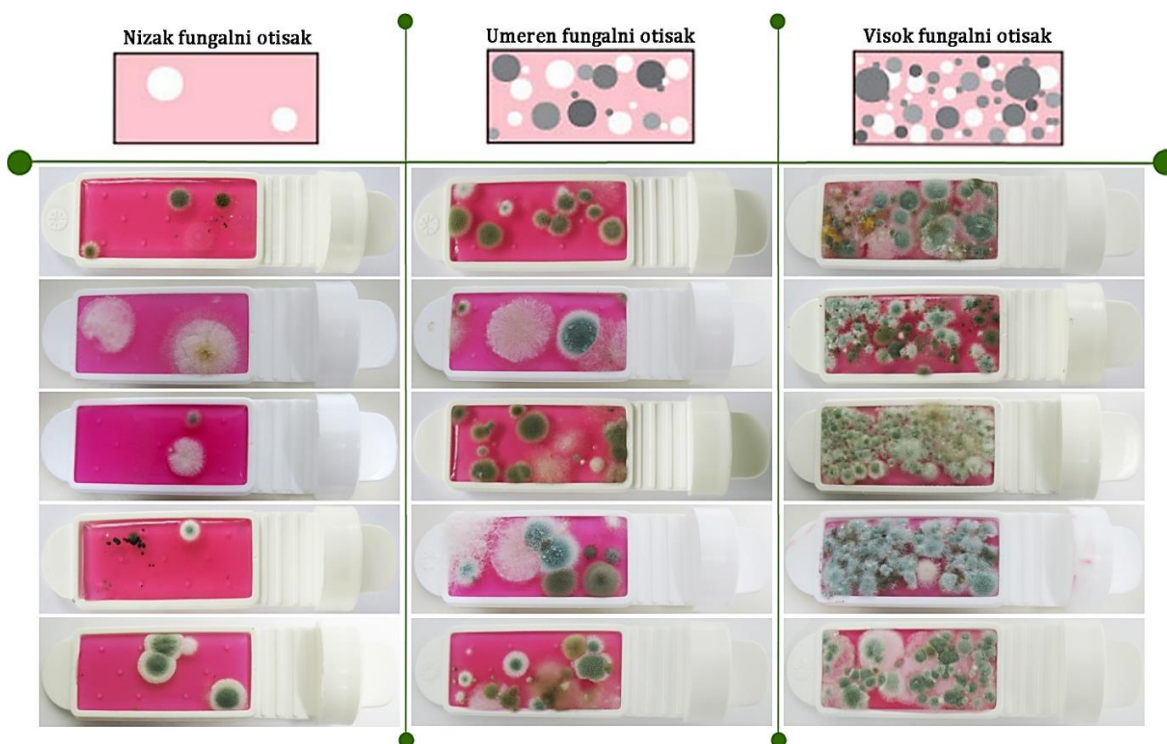
Najveći diverzitet je konstatovan tokom letnjeg perioda, kada je zabeleženo prisustvo 25 taksona filamentoznih gljiva. Tokom ostalih sezona, detektovana je nešto manja raznovrsnost, sa 16 i 18 mikromiceta zabeleženih u toku jeseni i zime. Najmanji diverzitetom (13) zabeležen je u proleće. Više od polovine taksona, 25 od 46, su samo po jednom dokumentovani tokom godine, dok su najčešće vrste, zabeležene tokom sve 4 sezone, bile *Alternaria alternata*, *Chaetomium murorum*, *Cladosporium uredinicola* i *Epicoccum nigrum*.

Među mikromicetama kolonizatorima zidnih površina istraživane crkve najviše ima predstavnika roda *Aspergillus*, 12 vrsta, dok sa po 8 zabeleženih taksona slede rodovi *Cladosporium* i *Penicillium*. Sa izuzetkom 2 vrste roda *Alternaria*, većina predstavnika Dematiaceae (*Arthrinium*, *Aureobasidium*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Helminthosporium*, *Ulocladium* i *Tetraplosphaeria*) bili su zastupljeni samo jednim taksonom (Slika 60).



Slika 60. Zastupljenost (%) rodova mikromiceta sa zidnih slika, ogoljenog maltera i fasade istraživane crkve

Procena stepena kontaminacije bojenog sloja zidnih slika izvršena je poređenjem "fungalnih otisaka" (brojnosti propagula gljiva po jedinici površine (10 cm²)) sa standardizovanom šemom rasta datom u uputstvu proizvođača kontaktnog slajda (Slika 61).

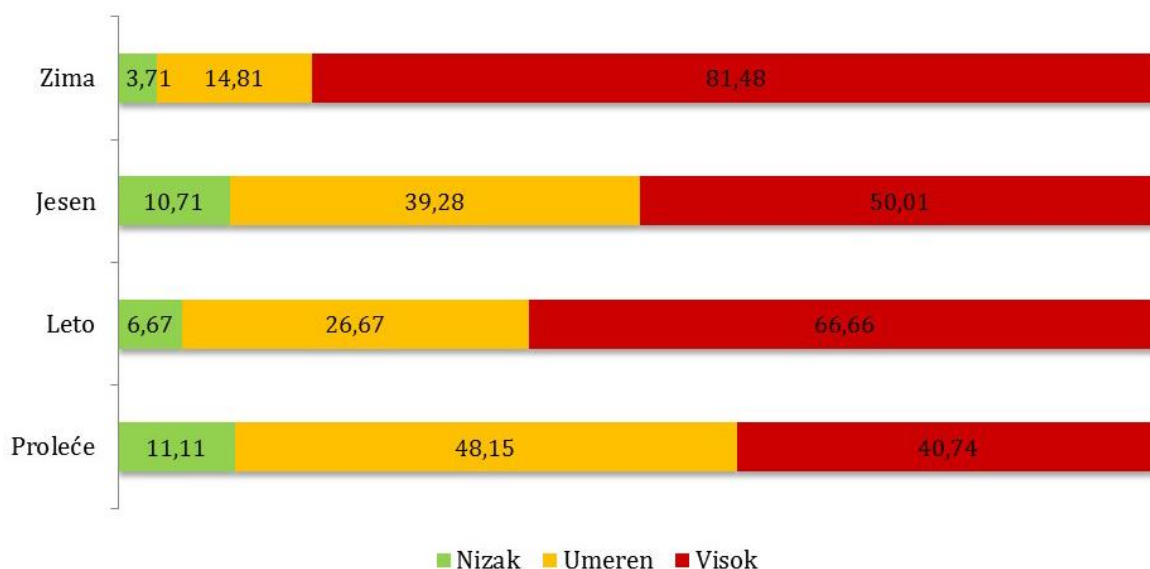


Slika 61. Kontaktne slajdove niskog, umerenog i visokog fungalnog otiska

Kontaktne slajdove niskog fungalnog otiska su tokom četiri sezone bili slabo zastupljeni, u opsegu od 3,71 do 11,11%, nasuprot kontaktnim slajdovima umerenog i visokog fungalnog otiska, zastupljenih sa 14,81 do 48,15%, odnosno od 40,74 do 81,48% (Slika 62). Sa izuzetkom prolećnog perioda, tokom preostale tri sezone, procenat kontaktnih slajdova visokog fungalnog otiska bio je u značajnoj meri veći u odnosu na druge dve kategorije, naročito u zimskom periodu kada je 81,48% od ukupnog broja kontaktnih slajdova imalo visok "fungalni otisak". Najmanji stepen kontaminacije zidnih slika mikromicetama je zabeležen u proleće kada je broj kontaktnih slajdova niskog fungalnog otiska bio najveći (11,11%), a kontaktne slajdove

umerenog otiska bili najzastupljeniji (48,15%). Zastupljenost propagula mikromiceta po jedinici površine korespondira sa zabeleženim diverzitetom gljiva. Na osnovu navedenih podataka, stepen kontaminacije bojenog sloja zidnih slika istraživane crkve tokom perioda 2013/14. godine može se predstaviti sledećim nizom, od najvećeg ka najmanjem:

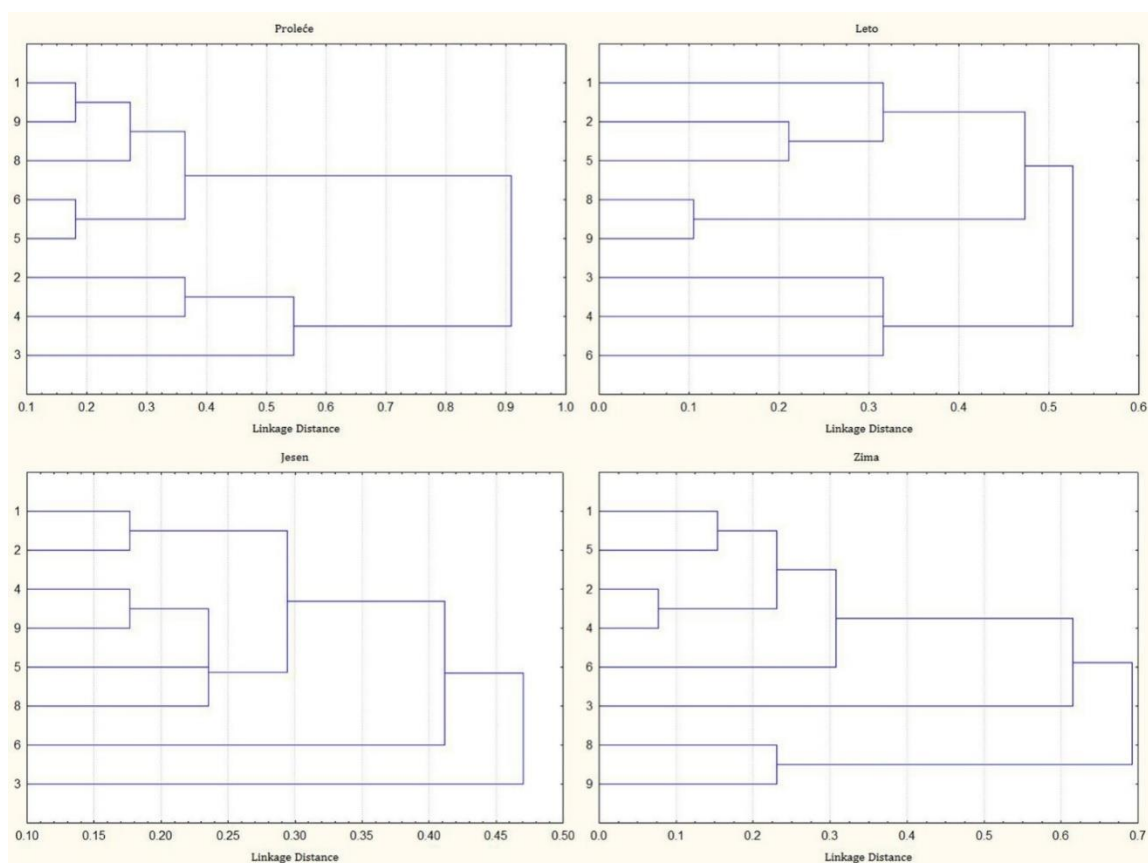
Zima > Leto > Jesen > Proleće.



Slika 62. Sezonska zastupljenost (%) "fungálnih otisaka" niskog, umerenog i visokog intenziteta na kontaktnim slajdovima

Na osnovu identifikovanih mikromiceta u sastavu mikrobiote bojenog sloja zidnih slika naosa i egzarteksa, tokom 4 sezone, sprovedena je klaster analiza za utvrđivanje sličnosti među uzorkovanim tačkama. U prolećnom periodu, zidne slike egzarteksa (8 i 9) i zidne slike u blizini ulaznih vrata (1 i 6) su po sličnosti bliske i formiraju zaseban klaster po kome se razlikuju od klastera sastavljenog od bliskih uzorkovanih tačaka 2, 3 i 4 (Slika 63). Tokom letnjeg perioda je, takođe, zabeležena velika sličnost između zidnih slika egzarteksa i onih u blizini ulaza, dok je suprotan klaster sačinjen od takođe bliskih istraživanih tačaka 3, 4 i 6. U toku jeseni zidne slike

3 i 6 se u potpunosti razlikuju od svih drugih uzorkovanih mesta. Zimski period se karakterisao potpunim izdvajanjem zidnih slika egzozarteksa u zaseban klaster, po kome se mikrobiota zidnih slika egzozarteksa razlikuje od fungalne zajednice prisutne na zidnim slikama naosa crkve. Na osnovu sprovedene klaster analize, može se zaključiti da sastav fungalne zajednice zavisi od sezone uzorkovanja. Takođe, položaj zidnih slika neposredno u odnosu na otvore određuje stepen sličnosti sa mikrobiotom spoljašnje sredine. Pored toga, fizički bliske zidne slike češće imaju sličnu mikrobiotu, u poređenju sa zidnim slikama koje su udaljene, što je posledica sličnosti mikroklimе prostora i lakše disperzije inokuluma među prostorno bliskim zidnim slikama.



Slika 63. Klaster analiza sličnosti među zidnim slikama istraživane crkve na osnovu raznovrsnosti mikromiceta izolovanih tokom 4 sezone

Na osnovu analize zabeleženih taksona i frekvence pojavljivanja može se zaključiti da konidijalne filamentozne gljive apsolutno dominiraju kao kolonizatori bojenog sloja zidnih slika crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru. Najzastupljenije su bile vrste rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*. Do sličnog zaključka došlo se često tokom višedecenijskog istraživanja procesa biodeterioracije zidnih slika. Guglielminetti i dr. (1994) su na zidnim slikama manastira Sveti Damjan u Asizi (Italija) zabeležili 21 takson mikromiceta, među kojima su najčešće bile vrste rodova *Acremonium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium* i *Penicillium*. Sa zidnih slika XIII veka kapele zamka Herberštajn i crkve Sv. Đorđa u Štajerskoj (Austrija) izolovano je 20 vrsta iz rodova *Acremonium*, *Aspergillus*, *Blastobotrys*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Mortierella*, *Penicillium* i *Verticillium* (Berner i dr., 1997). U sastavu biofilma sa zidnih slika XVIII veka crkve u Kodersdorfu, fresaka iz XVI veka crkve Svetog Martina u Grin Krajnsenu i zidnim slikama datiranim iz XII veka crkve Svetog Petra i Pola (Nemačka) pokazano je prisustvo 15 vrsta mikromiceta, a značajan udeo su imale vrste rodova *Acremonium*, *Aspergillus* i *Cladosporium* (Gorbushina i Petersen, 2000). Mikrobiota zidnih slika crkve Svetog Martina u Grin Krajnsenu je ponovo istraživana od strane istih autora nekoliko godina kasnije i od 32 zabeležena izolata većina su pripadnici rodova *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Fusarium* (Gorbushina i dr., 2004). Da mikrobiota uopšte ne mora biti raznovrsna i kompleksna da bi prouzrokovala oštećenja pokazano je na primeru zidnih slika kapele Sv. Katarine u Sijeni (Italija), gde je kao jedini uzročnik biodeterioracije zidnih slika zabeležen *Penicillium chrysogenum* (Milanesi i dr., 2006b). U veoma opsežnom istraživanju sprovedenom na velikom broju kulturnih dobara u Italiji (vila Papiri u Herkulanumu i sedam srednjovekovnih crkvi), Pepe i dr. (2010, 2011) su sa zidnih slika XI do XV veka izolovali 23 mikromicete, među kojima su vrste iz često zastupljenih rodova, kao što su *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, ali je i zabeleženo prisustvo gljiva iz netipičnih rodova za zidne slike, *Microascus* i *Coprinus*.

Dominantno zastupljene vrste rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*, kao i *Aureobasidium* i *Alternaria*, se navode kao najčešće na zidnim slikama i kao

primarni uzročnici procesa biodeterioracije u zonama sa umerenom klimom (Garg i Dhawan, 1994; Shirakawa i dr. 2002; Pepe i dr., 2011). Dominacija *Cladosporium* vrsta, kao i učestala detekcija vrsta rodova *Chaetomium* i *Alternaria*, na zidnim slikama, su posledica prisustva supstrata celulozne prirode koji sa jedne strane potiču od bujne vegetacije okoline crkve, a sa druge iz celuloznih kompresa za eliminaciju soli korišćenih tokom ranijih konzervatorsko-restauratorskih tretmana.

Prisustvo propagula na bojenom sloju zidnih slika ne znači obavezno da je izolovana mikromiceta i uzročnik procesa biodeterioracije (Florian, 2002). Većina *Cladosporium* vrsta se navode kao glavni biološki agensi u procesu biodeterioracije zidnih slika, jer su sposobne da pored diskoloracija braon boje, somatskim rastom prodru kroz ceo bojeni sloj sve do maltera (Agrawal i dr., 1989; Giacobini i dr., 1991; Nugari i dr., 1993; Bassi i Giacobini, 2001; Ruga i dr., 2015). Za mnoge vrste roda *Penicillium* se zna da u periodu od nekoliko dana do nekoliko nedelja mogu da se razviju i intenzivno sporulišu na periodično vlažnim zidnim slikama (Nevalainen i dr., 2015). Pored dominantnih, vrste iz manje zastupljenih rodova takođe mogu u značajnoj meri doprineti oštećenju zidnih slika. Prema Karbowska-Berent (2003) izolovanje vrsta roda *Phoma* sa bojenog sloja ukazuje na to da su date zidne slike u aktivnom procesu propadanja. Vrste rodova *Chaetomium*, *Aureobasidium* i *Epicoccum*, usled snažne proteolitičke aktivnosti, razgrađuju proteinska veziva bojenog sloja čime slabe vezivne sile, a što za posledicu ima podizanje i odvajanje bojenog sloja od podloge. Takođe, skoro je pokazano da vrste rodova *Mucor* i *Rhizopus* (*R. microsporus*) mogu da razgrađuju proteinska veziva bojenog sloja i epoksi smole, mada se često navode kao samo prelazne forme bez uloge u procesu biodeterioracije zidnih slika (Pangallo i dr., 2014).

Sprovedeno istraživanje mikrobiote zidnih slika se u velikoj meri razlikuje od drugih sličnih istraživanja po broju zabeleženih taksona mikromiceta. Sa zidnih slika naosa i egzonarteksa identifikovano je ukupno 45 taksona filamentoznih gljiva, što je znatno veći broj u poređenju sa drugim istraživanjima baziranim samo na primeni

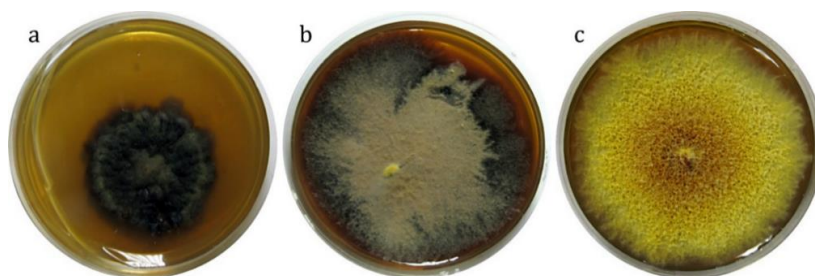
kultivacionih metoda. Veći broj zabeleženih taksona je verovatno i rezultat sezonske prirode istraživanja, odnosno činjenice da su mikološke analize zidnih slika sprovedene tokom 4 sezone jedne godine, nasuprot drugim navedenim istraživanjima koja su bila jednokratna i gde je detektovana raznovrsnost mikrobiote u samo jednom periodu godine. Takođe, ovo istraživanje predstavlja prvi zabeležen slučaj da je za izolovanje gljiva sa zidnih slika korišćena jednostavna i nedestruktivna metoda kontaktnog slajda. Kontaktni slajdovi, mada uzorkuju znatno manju površinu u odnosu na sterilni bris, sakupljaju veći broj fungalnih propagula po jedinici površine, što je možda i razlog izolovanja većeg broja vrsta u odnosu na druga istraživanja. Prema tome, ova metoda poseduje veoma veliki potencijal za implementaciju u praksu moderne konzervacije kulturnih dobara. Usled brzine i jednostavnosti primene ova metoda je posebno pogodna za rano otkrivanje kontaminacije površine zidnih slika ili neposredne okoline propagulama gljiva čime se stvara mogućnost za blagovremenu intervenciju.

Na osnovu analize vrsta u sastavu mikrobiote zidnih slika istraživane crkve može se konstatovati da su zabeleženi taksoni mikromiceta sa najvećom frekvencom detekcije upravo oni za koje je dobro poznato da poreklo uglavnom vode iz vazduha, okolnog zemljišta i biljaka, posetilaca i kontaminiranih instrumenta korišćenih za mnoge konzervatorsko-restauratorske tretmane (Garg i dr., 1995). Međutim, obzirom na zapušteno stanje crkve i mnogobrojna oštećenja na zidu i fasadi, kao i prisustvom zglakvara zabeleženih na uzorcima adhezivne trake, uloga ovih organizama kao vektora fungalnih propagula i izvora kontaminacije na zidnim slikama mora se uzeti u obzir. Da li su zglavkari uzrok prisustva nekih od zabeleženih taksona ne može se pouzdano reći bez kompletne analize mikrobiote prisutne entomofaune, međutim, mnoge od vrsta koje su detektovane na zidnim slikama su i poznati entomopatogeni: *A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. alternata*, *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *P. biliae*, *P. commune* i *P. griseofulvum* (Jurado i dr., 2008). Pored navedenih vrsta, entomopatogene gljive su takođe zastupljene i u okviru rodova *Chaetomium*, *Mucor* i *Phoma* (Trovão i dr., 2013). Ukoliko se tokom proučavanja

mikrobiote zidnih slika zabeleži prisustvo rodova sa poznatim entomopatogenim vrstama neophodno je sprovesti detaljna istraživanja lokalne entomofaune kako bi se stekao potpun uvid u obrasce širenja propagula mikromiceta i predložile adekvatne mere zaštite (Jurado i dr. 2008). Zglavkari mogu doprineti rasejavanju spora mikomiceta unutar crkve i kolonizaciji bojenog sloja zidnih slika putem nošenja spora na egzoskeletu, ali i pružajući dodatni supstrat za rast gljiva: fekalne pelete i leševe zglavkara. Mnoge entomopatogene gljive su u mogućnosti da osim na telu zglavkara, rastu i na jako vlažnim zidnim površinama (Jurado i dr., 2008).

5.6.1. Morfo-fiziološke promene izolata sa bojenog sloja zidnih slika

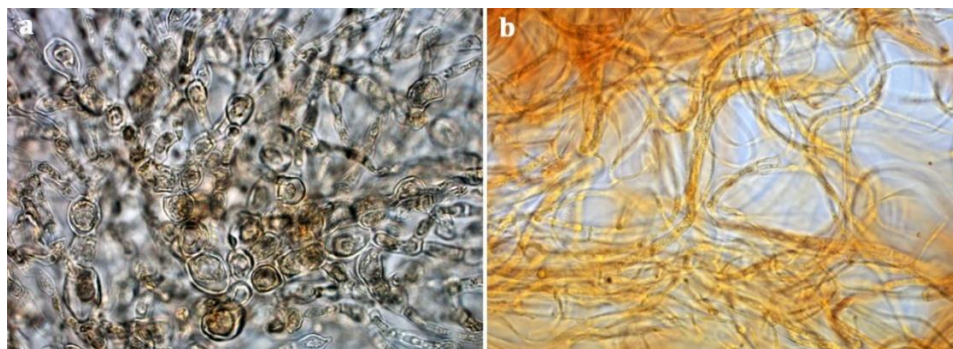
Uticaj specifičnosti bojenog sloja zidnih slika, kao ekstremnog tipa staništa, može se ilustrovati najbolje na primerima kultura *Epicoccum nigrum* i *Aspergillus aureolatus*, gde je došlo do formiranja jedinstvenih morfoloških promena. Reizolacijom sitnih, tamno pigmentisanih kolonija, prisutnih u velikom broju na kontaktnim slajdovima, na MEA, dokumentovan je meristemski tip rasta maslinasto crnih kolonija oblika karfiola (*cauliflower-like growth*), karakterističan za mikrokolonijalne gljive (MCF) (Slika 64a), i tip rasta u kome dominira supstratna micelija, sa jako malo vazdušne micelije pepeljasto krem boje (Slika 64b).



Slika 64. Izgled kolonija *Epicoccum nigrum* (21. dan, MEA): **a-b.** nakon primarne reizolacije; **c.** nakon višestrukog pasažiranja

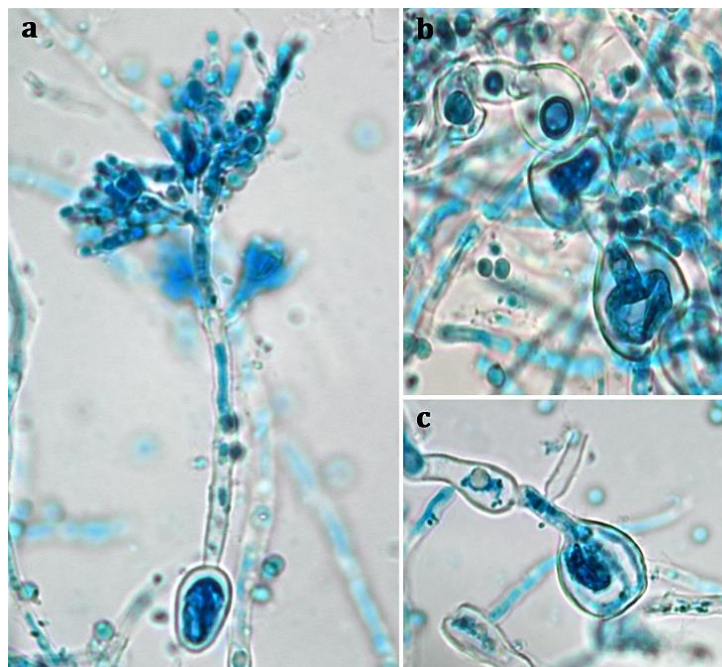
U oba slučaja mikroskopskom analizom je pokazano odsustvo reproduktivnih struktura i dominacija tamno smeđih toruloznih hifa, u formi dugih lanaca nabubrelih

ćelija odvojenih poprečnim septama (Slika 65). Na osnovu 94,4% i 93,6% poklapanja sekvenci ITS regiona, odnosno 100% i 99,4% poklapanja sekvenci β -tubulin gena, izolati su determinisani kao *E. nigrum* TGF1-MRL [KM977751] / KUC21264 [KT207680] i *E. nigrum* TGF1-MRL [KM977751] / CBS 115825 [FJ427109]. Da su zaista u pitanju sojevi *E. nigrum* dodatno je potvrđeno nakon višestrukog pasažiranja na MEA i PDA, kada su izolati počeli postepeno da poprimaju tipične odlike roda *Epicoccum*: obilatu vazдушnu miceliju, intenzivno žuto-narandžaste-smeđe boje i narandžasto do tamno crvenu boju naličija kolonija (Slika 64c). Samo u pojedinim slučajevima nakon tri nedelje gajenja na PDA primećeno je prisustvo malobrojnih, sitnih, tamno pigmentisanih septiranih konidija, nepravilnog oblika, na kratkim konidioforima u pulvinatnim sporodohijama. Ove promene u kulturama *E. nigrum* su zabeležene kod samo dva izolata, uprkos tome što je ova vrsta bila veoma zastupljena tokom mikološke analize zidnih slika i dokumentovana na velikom broju uzorkovanih mesta tokom sve četiri sezone. Ovakva zastupljenost *E. nigrum* je očekivana imajući u vidu da je u pitanju kosmopolitska vrsta kolonizator širokog spektra supstrata (De Lima Fávoro i dr., 2011). Do formiranja zabeleženih promena je verovatno došlo usled rasta na bojenom sloju zidnih slika, s obzirom na to da je poznato da nepovoljni uslovi sredine mogu kod mikromiceta iz mnogih rodova, uključujući i *Epicoccum*, da indukuju prelaz iz filamentoznog u meristemski rast (Sterflinger i Krumbein, 1995).



Slika 65. *Epicoccum nigrum*: **a.** torulozne hife sa interkalarnim i terminalnim bubrenjem u kulturama sa kontaktnih slajdova (7. dan, RB CAF); **b.** hife u kulturama nakon višestrukog pasažiranja (7. dan, MEA)

U kulturama *A. aureolatus*, izolovanim sa nekoliko tačaka u letnjem i zimskom periodu, takođe, su zabeležene morfološke promene generalno povezane sa životom u nepovoljnim uslovima sredine: nabubrele spore slične hlamidosporama, razgranati konidiofori formirani direktno na klijalim konidijama i postepeni prelazak glavica u konidiogeni aparat sličan metlicama vrsta roda *Penicillium* (Slika 66).



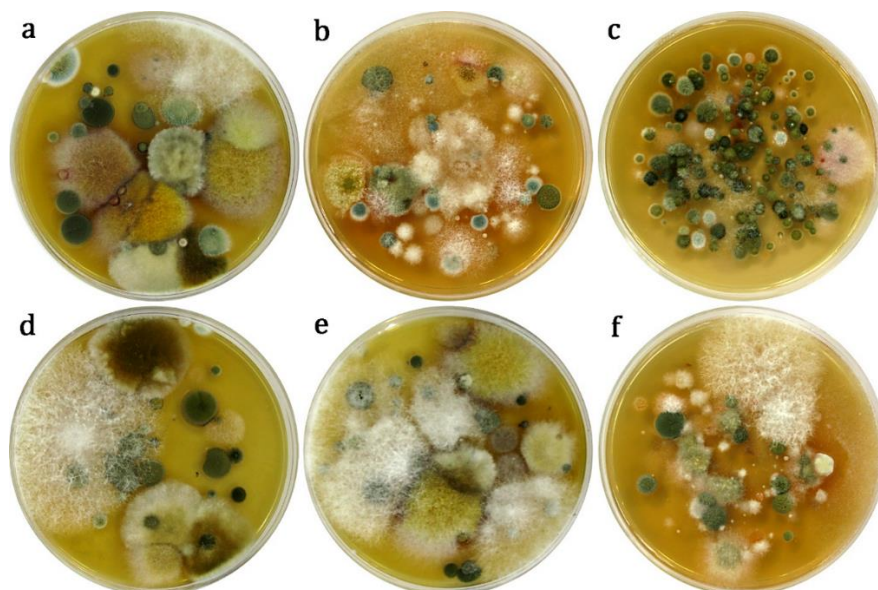
Slika 66. Mikrociklična konidijacija *Aspergillus aureolatus* (7. dan, MEA): **a.** direktno klijanje konidija u granat konidiogeni aparat sličan metlici; **b-c.** nabubrele spore slične hlamidosporama

Prema Ulloa i Hanlin (2000) i Smith i dr. (1977), promene ovog tipa su posledica direktne konidiogeneze nakon klijanja konidija, bez faze somatskog rasta, i taj fenomen je poznat pod nazivom mikrociklična konidijacija (MC). Do MC dolazi u uslovima stresa, međutim, konkretni faktori ekspresije fenotipa nisu poznati. Ahearn i dr. (2007) navode da su MC i formiranje sekundarnih konidiofora na vezikulama (eng. *Medusa head conidiophores*) glavni mehanizmi opstanka mikromiceta u zatvorenim prostorima tokom perioda stresnih uslova sredine. MC se često javlja kod mutantnih

formi vrsta rodova *Acremonium*, *Aspergillus* (Cladosarum forma), *Cercospora*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium* i *Trichoderma*. MC i formiranje sekundarnih konidiofora na vezikulama je zabeleženo od strane Ahearn i dr. (2007) u uzorcima adhezivne trake i u kulturi *Aspergillus* sp. sa bojenih zidova, što je u skladu sa opšte prihvaćenim stavom da su zidne površine, u ekološkom smislu, ekstremni tip staništa. Vrlo često, tokom gajenja izolata u kulturama dolazi do postepenog gubitka ovih karakteristika usled rasta u povoljnim uslovima sredine.

5.7. Diverzitet i sezonska dinamika propagula mikromiceta u vazduhu naosa i egzonarteksa

U cilju procene fungalne kontaminacije vazduha utvrđivanjem diverziteta i sezonske dinamike propagula mikromiceta u vazduhu naosa i egzonarteksa, uzorkovanje je vršeno korišćenjem uzorkivača vazduha u 4 sezone tokom perioda 2013/14. godine. Nakon inkubacionog perioda analizirani su primarni izolati - mešovite kulture filamentoznih gljiva i kvasaca (Slika 67).



Slika 67. Primarni izolati filamentoznih gljiva i kvasaca (7. dan, MEAS) iz uzoraka vazduha: **a-c.** egzonarteksa; **d-f.** naosa

Iz uzoraka vazduha, identifikovano je ukupno 33 mikromicete (Tabela 6). Veliki broj izolata se karakterisao odsustvom reproduktivnih struktura u kulturi, pa su označeni kao *M. sterilia*. Sa izuzetkom *Sporobolomyces roseus*, izolovani kvasci nisu identifikovani.

Tabela 6. Mikromicete izolovane iz vazduha naosa (VN) i egzozarteksa (VE)

Izolovane mikromicete	ITS I/ β -tubulin - % hom.	Proleće		Leto		Jesen		Zima	
		VN	VE	VN	VE	VN	VE	VN	VE
<i>Alternaria arborescens</i>	-			+					
<i>Alternaria alternata</i>	AA-13 [JQ907485] 94,4% MP23 [KJ396336] 98,6%	+	+	+	+	+		+	+
<i>Alternaria infectoria</i>	CNRMA10.1102 [KP131537] 99,8%					+			
<i>Alternaria tenuissima</i>	-				+		+	+	+
<i>Aspergillus europaeus</i>	CCF 1871 [FR727119] 98,8% CCF 1871 [FR775318] 99,4%				+				
<i>Aspergillus flavus</i>	SF45 [KR905618] 96,5% R.Kirschner 4188 [LC085664] 99,8%			+					
<i>Aspergillus niger</i>	AKV MKBU [KU171053] 96,6% An18c0170 [AM270409] 89,1%				+	+	+		
<i>Aspergillus oryzae</i>	RM103 [KU613361] 99,8% RIB40 DNA, SC038 [AP007169] 99,3%						+		
<i>Aspergillus ostianus</i>	ATCC 16887 [NR_077151] 99,8% CBS 31180 [AY819969] 99,1%					+			
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	-			+					
<i>Aspergillus versicolor</i>	F115 [KX082930] 97,7% ATCC 9577 [KU897001] 93,0%							+	
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	-						+		
<i>Bjerkandera adusta</i>	69D [KP794073] 100,0%						+		

- REZULTATI I DISKUSIJA -

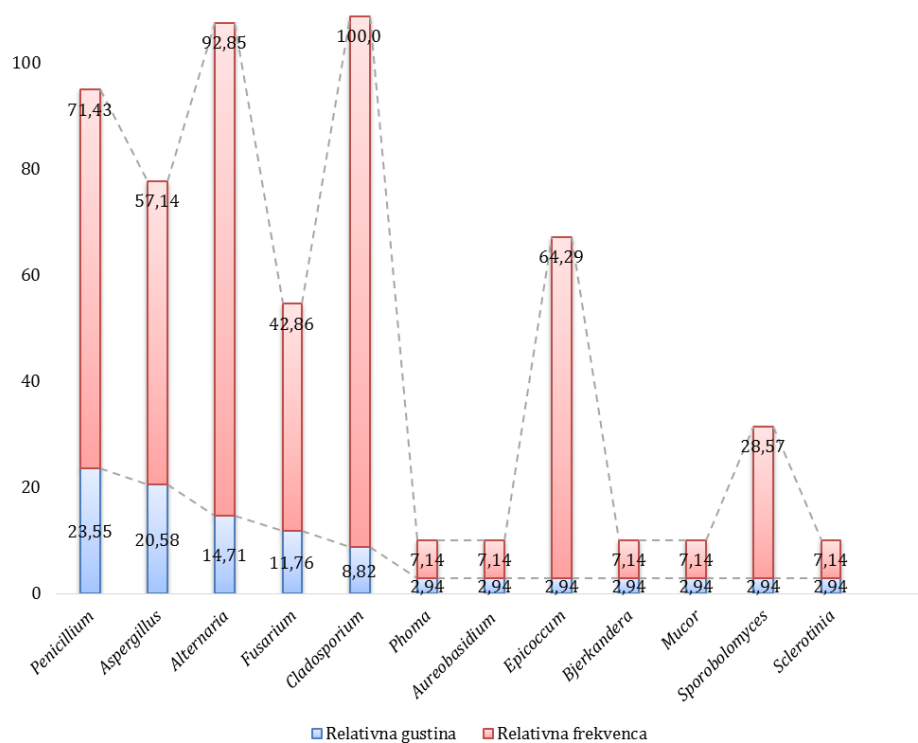
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	UTHSC DI-13-204 [LN834358] 99,6%	+	+	+		+	+	+
<i>Cladosporium oxysporum</i>	ATCC 66669 [F101454] 100,0%					+	+	+
<i>Cladosporium uredinicola</i>	JS11 [KM513616] 100,0%		+					+
<i>Epicoccum nigrum</i>	TGF1-MRL [KM977751] 93,6% CBS 115825 [F]427109] 99,4%	+	+	+			+	+
<i>Fusarium incarnatum</i>	-							+
<i>Fusarium oxysporum</i>	-							+
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	-		+					
<i>Gibberella moniliformis</i>	bxq41208 [EF556212] 99,8% FGSC 7600 [FN545356] 99,7%						+	+
<i>Mucor plumbeus</i>	-		+	+				
<i>Penicillium bilaiae</i>	MH1214 [LN901118] 99,1% LEQ 1642 [JN625962] 98,2%						+	
<i>Penicillium hirsutum</i>	-							+
<i>Penicillium lanosum</i>	GZU-BCECD38-1 [JQ965090] 97,5%							+
<i>Penicillium manginii</i>	NRRL 2134 [AY443469] 99,6% CBS 126232 [JN606648] 100,0%						+	+
<i>Penicillium spp.</i>	-			+	+	+		+
<i>Phoma medicaginis</i>	[LN827697] 91,2%							+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	GmS [KM211693] 99,2% [CP017815] 99,8%						+	
<i>Sporobolomyces roseus</i>	-						+	+
<i>Mycelia sterilia</i>	-		+	+	+	+	+	+
Kvasci	-		+	+	+	+	+	+

- : identifikacija izvršena na osnovu morfo-fizioloških karakteristika;

Od ukupno 33 identifikovana taksona, 23 vode poreklo iz vazduha naosa, dok je u vazduhu egzonarteksa konstatovano prisustvo 22 taksona. Poređenjem mikrobiote

vazduha naosa i egzozarteksa, može se konstatovati 13 preklapajućih taksona. Pored toga, poređenjem spiska taksona iz vazduha, sa rezultatima mikrobiote zidnih slika, može se konstatovati 12 zajedničkih taksona: *Alternaria alternata*, *Aspergillus europaeus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. ostianus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. uredinicola*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium lanosum* i *Phoma medicaginis*.

Prema izračunatoj relativnoj gustini zastupljenost mikromiceta rodova (%) se može prikazati nizom: *Penicillium* (8; 23,55%) > *Aspergillus* (7; 20,58%) > *Alternaria* (4; 14,71%) > *Fusarium* (4; 11,76%) > *Cladosporium* (3; 8,82%) (Slika 68). Ostali rodovi zastupljeni su sa po jednom vrstom (1; 2,94 %).

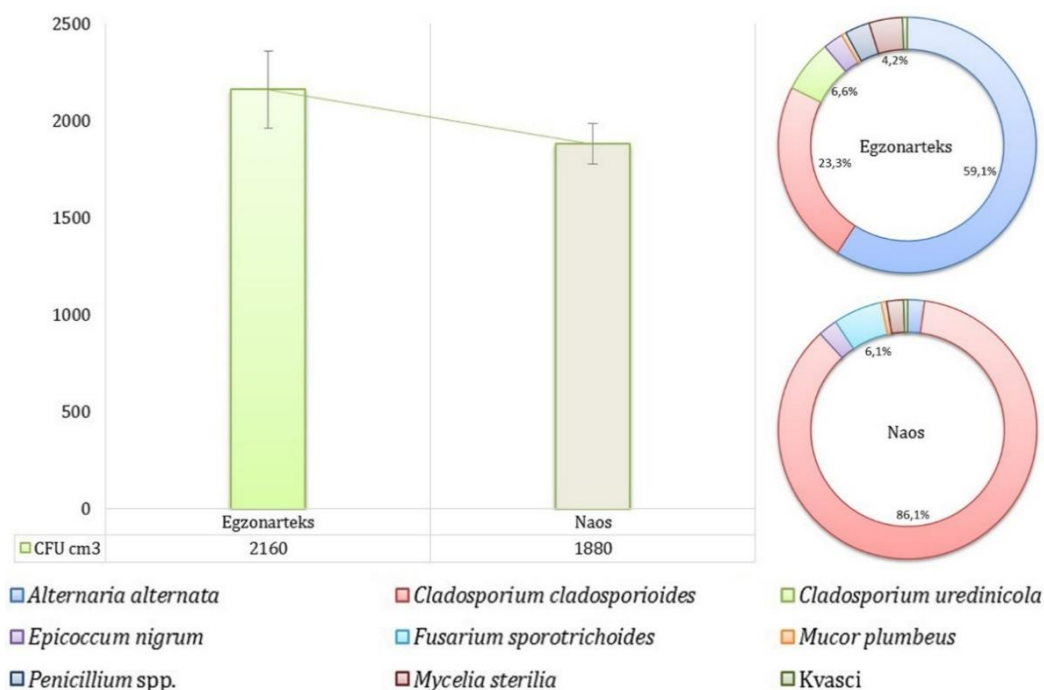


Slika 68. Relativna gustina (%) i relativna frekvencija (%) rodova mikromiceta u vazduhu naosa i egzozarteksa

Na osnovu izračunate vrednosti relativne frekvencije (RF) izolovanja, gljive rodova *Cladosporium* (100%) i *Alternaria* (92,85%) pripadaju grupi veoma čestih

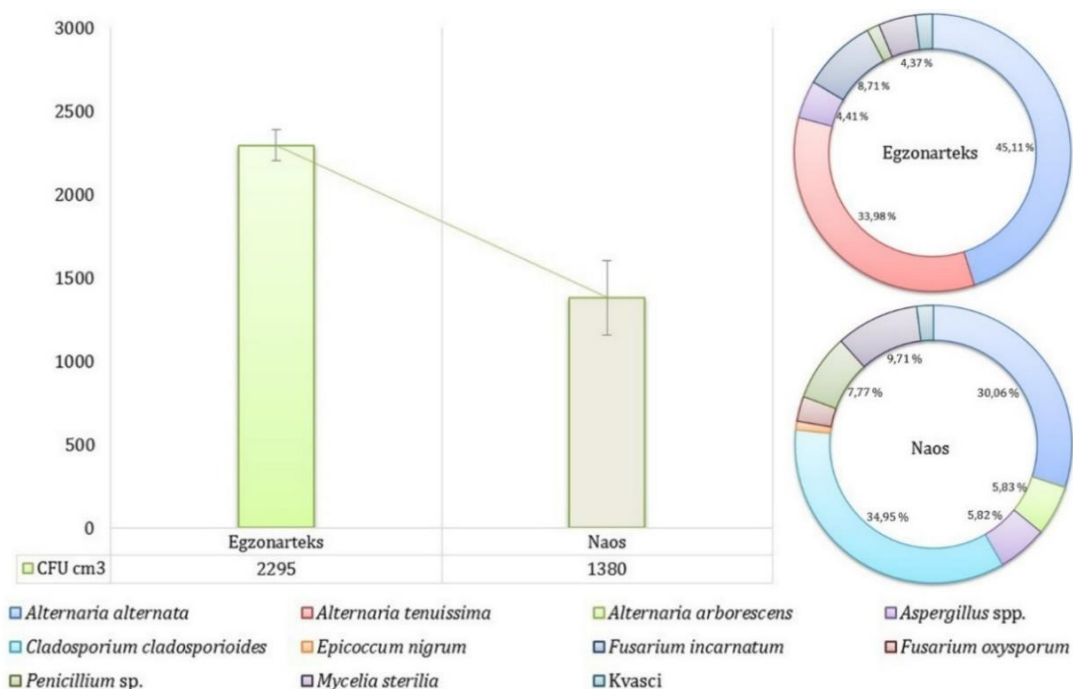
izolata (Slika 68). Vrste rodova *Penicillium* i *Epicoccum*, sa RF vrednostima od 71,43% i 64,29%, su učestale, dok su vrste rodova *Aspergillus* (57,14%) i *Fusarium* (42,86%) česte u vazduhu. Sa RF vrednošću 28,57%, *Sporobolomyces roseus* je jedini predstavnik grupe povremeno zastupljenih izolata. RF vrednosti u opsegu od 0,1 do 20%, prema ovoj skali, svrstavaju preostale rodove u grupu retkih izolata (Slika 68).

U prolećnom periodu, fungálnu bioaerosolnu komponentu crkve činile su propagule 8 filamentoznih gljiva (Slika 69). Metodom po Feller-u procenjena koncentracija spora mikromiceta u vazduhu naosa iznosi $1880 \pm 106,07$ CFU m⁻³. Propagule *C. cladosporioides* apsolutno dominiraju, dok su druge vrste izolovane sa znatno nižom frekvencom (0,5-6,1%). S druge strane, kontaminacija vazduha egzozarteksa procenjena je na $2160 \pm 197,99$ CFU m⁻³. Najveću frekvencu izolovanja su imale *A. alternata* (59,1%) i *C. cladosporioides* (23,3%), dok su ostale vrste zabeležene sa manjom učestalošću (Slika 69).



Slika 69. Koncentracija spora (CFU m⁻³) i relativna gustina taksona mikromiceta (%) u vazduhu naosa i egzozarteksa tokom prolećnog perioda

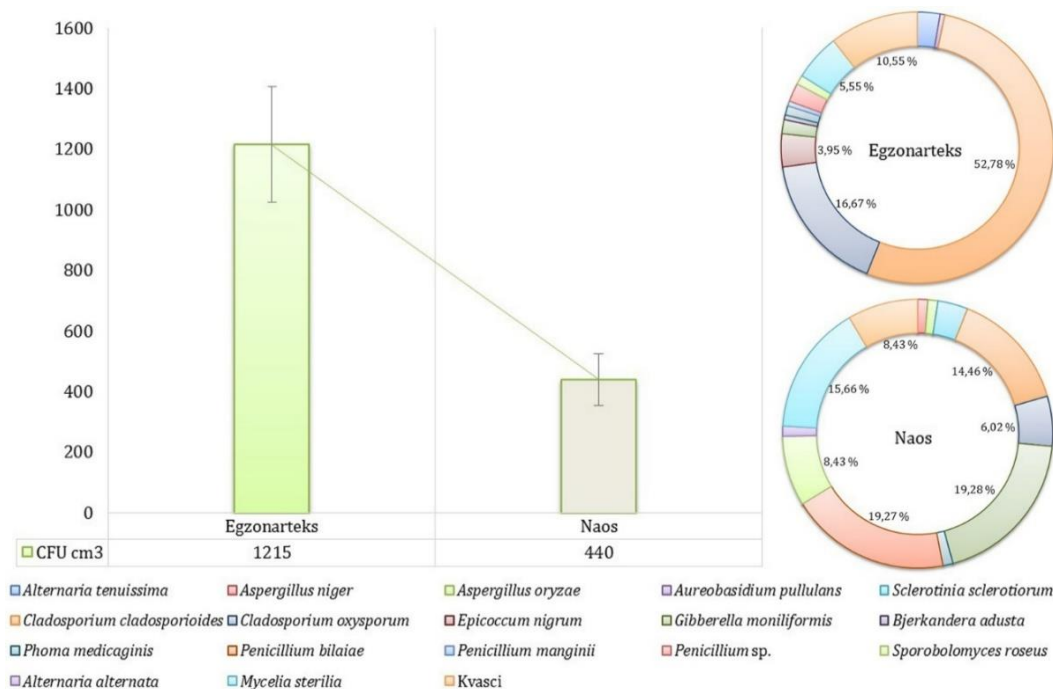
Mikološkom analizom uzoraka vazduha, sakupljenih u toku letnjeg perioda, konstatovano je prisustvo 13 filamentoznih gljiva (Slika 70). Posebno visok diverzitet je zabeležen u rodovima *Alternaria* (*A. arborescens*, *A. alternata*, *A. tenuissima*) i *Aspergillus* (*A. europaeus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ostianus*, *A. pseudoglaucus*). Fungalna kontaminacija vazduha naosa procenjena je na $1380 \pm 226,27$ CFU m⁻³. Od zabeleženih vrsta, *A. alternata* (30,06%) i *C. cladosporioides* (34,95%) su imale najveću frekvencu pojavljivanja. S druge strane, analizom mešovitih kultura iz uzoraka vazduha egzonarteksa, zabeležena je koncentracija spora od $2295 \pm 91,92$ CFU m⁻³. U ovim uzorcima, dve vrste roda *Alternaria*, *A. alternata* i *A. tenuissima*, čine oko 80% mikrobiote.



Slika 70. Koncentracija spora (CFU m⁻³) i relativna gustina taksona mikromiceta (%) u vazduhu naosa i egzonarteksa tokom letnjeg perioda

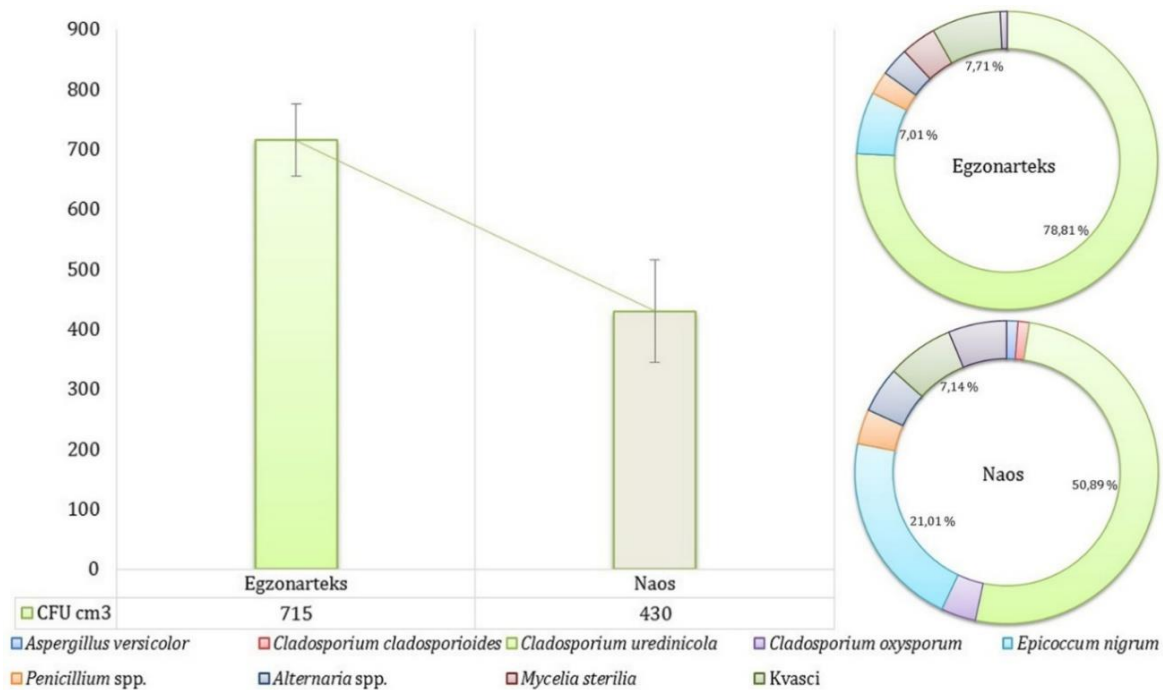
U jesenjem periodu, mešovite kulture iz uzoraka vazduha činilo je 17 filamentoznih gljiva (Slika 71). Koncentracija fungalnih propagula u vazduhu naosa procenjena je na $440 \pm 84,85$ CFU m⁻³, sa dominacijom spora *C. cladosporioides*

(14,46%), *G. moniliformis* (19,28%) i *P. bilaiae* (19,27%). Pored toga, značajan udeo u mešovitim kulturama imala je *M. sterilia* (15,66%). U vazduhu egzonarteksa, kontaminacija propagulama gljiva procenjena je na $1215 \pm 190,92$ CFU m⁻³, sa apsolutnom dominacijom *C. cladosporioides* (52,78%) i *C. oxysporum* (16,67%). Kvasci su takođe bili zastupljeni sa 10,55%.

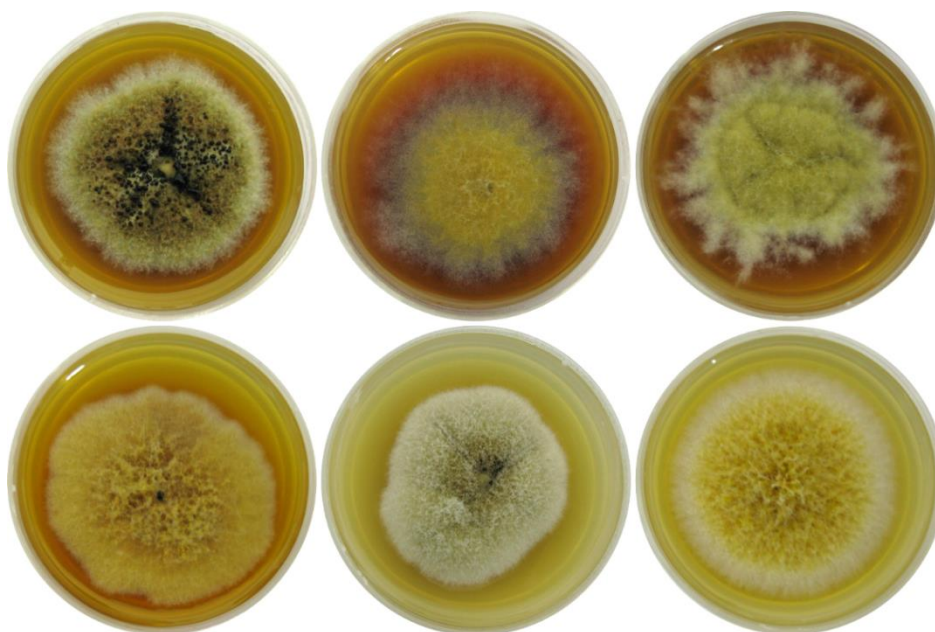


Slika 71. Koncentracija spora (CFU m⁻³) i relativna gustina taksona mikromiceta (%) u vazduhu naosa i egzonarteksa tokom jesenjeg perioda

U vazduhu u toku zimskog perioda konstatovano je 10 filamentoznih gljiva (Slika 72). Koncentracija spora gljiva u vazduhu naosa procenjena je na $430 \pm 84,85$ CFU m⁻³. *C. uredinicola* (50,89%) i *E. nigrum* (21,01%) su dominantne vrste, dok su druge zabeležene sa znatno nižom frekvencom. U egzonarteksu, kontaminacija sporama mikromiceta iznosi $715 \pm 59,62$ CFU m⁻³. Dominantne su spore *C. uredinicola*, dok su *Alternaria*, *Epicoccum* i *Penicillium* vrste imale manju relativnu gustinu. Posebno velika morfološka raznovrsnost karakterisala je izolate *E. nigrum* (Slika 73).

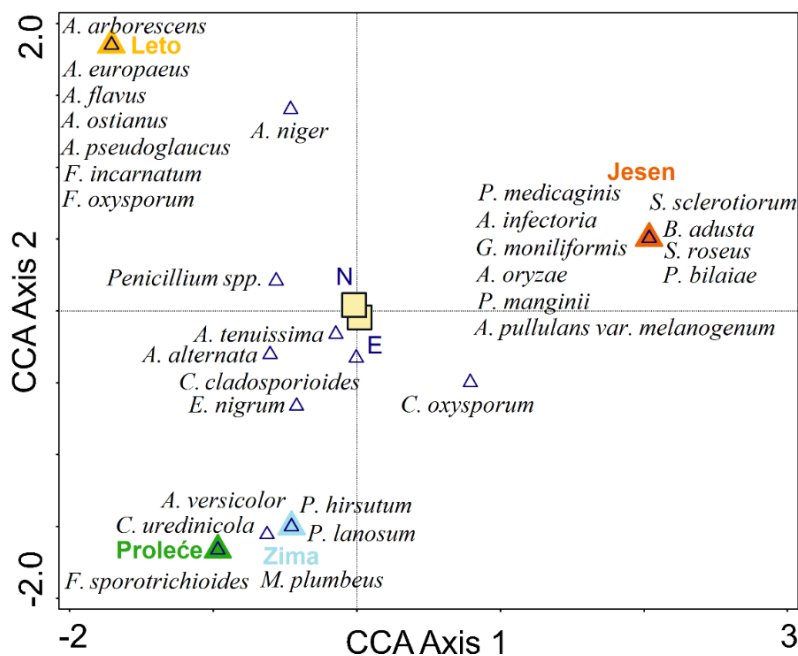


Slika 72. Koncentracija spora (CFU m⁻³) i relativna gustina taksona mikromiceta (%) u vazduhu naosa i egzonarteksa tokom zimskog perioda



Slika 73. *Epicoccum nigrum*, morfološka raznovrsnost izolata iz vazduha naosa i egzonarteksa (14. dan, OA)

CCA analiza je korišćena za utvrđivanje uticaja sezone istraživanja (kao opisne promenljive veličine) na sastav vrsta aeromikrobiote, sa tačkama uzorkovanja u naosu i egzozarteksu korišćenim kao pomoćne promenljive veličine. “Sezona“, kao promenljiva veličina, obrazlaže 53,3% raznovrsnosti podataka ($F=1,5$; $P=0,0028$). Četiri grupe se izdvajaju na CCA ordinacionom dijagramu: I – taksoni zabeleženi samo tokom letnjeg perioda, uglavnom predstavnici roda *Aspergillus*; II – veoma raznovrsna grupa, sa taksonima zabeleženim samo tokom jeseni; III – raznovrsna grupa sačinjena od taksona zabeleženih tokom zimskog i/ili prolećnog perioda; IV – taksoni zabeleženi tokom dve ili više sezona (centralni deo ordinacionog dijagrama) (Slika 74).

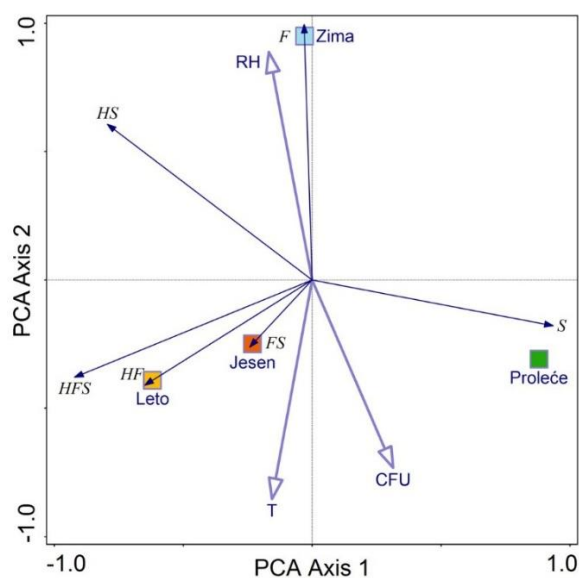


Slika 74. CCA ordinacioni dijagram. \triangle - opisna promenljiva veličina “sezona”; \square - pomoćne promenljive veličine (N – naos, E – egzozarteks)

IV grupa su uglavnom kosmopolitske vrste za koje je poznato da se u regionima sa umereno-kontinentalnom klimom javljaju u vazduhu tokom cele godine (*A. alternata*, *C. cladosporioides*, *C. oxysporum* i *E. nigrum*) (Florian, 2002). Pomoćne promenljive veličine su pozicionirane u centru ordinacionog dijagrama što ukazuje na odsustvo

značajne razlike između egzozonarteksa i naosa. Ovakvi rezultati su i očekivani s obzirom na to da su ulazna vrata, kao i prozori na istočnom i južnom zidu otvoreni, što omogućuje cirkulaciju vazduha između analiziranih prostora.

PCA analiza je bazirana na podacima o podeli zabeleženih taksona mikromiceta, sa upotrebom grupa umesto individualnih taksona i T, RH i CFU parametara kao pomoćnih promenljivih veličina. Podela je zasnovana na ekološkim karakteristikama, sa vrstama smeštenim u nekoliko grupa: F (fitopatogeni), H (humani patogeni), S (saprobi), i prelazne grupe (HF, HS, FS i HFS). S obzirom na to da nijedna od zabeleženih vrsta nije samo humani patogen, H grupa izostaje i na ordinacionom dijagramu se mogu uočiti samo preostalih pet grupa (Slika 75).



Slika 75. PCA ordinacioni dijagram za odnose između ekoloških grupa (F – fitopatogeni, H – humani patogeni, S – saprobi, i prelazne grupe HF, HS, FS i HFS) i pomoćnih promenljivih veličina: sezona, temperature (T), relativne vlažnosti vazduha (RH) i broja kolonija po Petri kutiji (CFU)

F grupa je zabeležena u vazduhu tokom zimskih meseci. S druge strane, HF grupa je isključiva za leto, dok je FS grupa prisutna samo tokom jesenjeg perioda. Ostale grupe

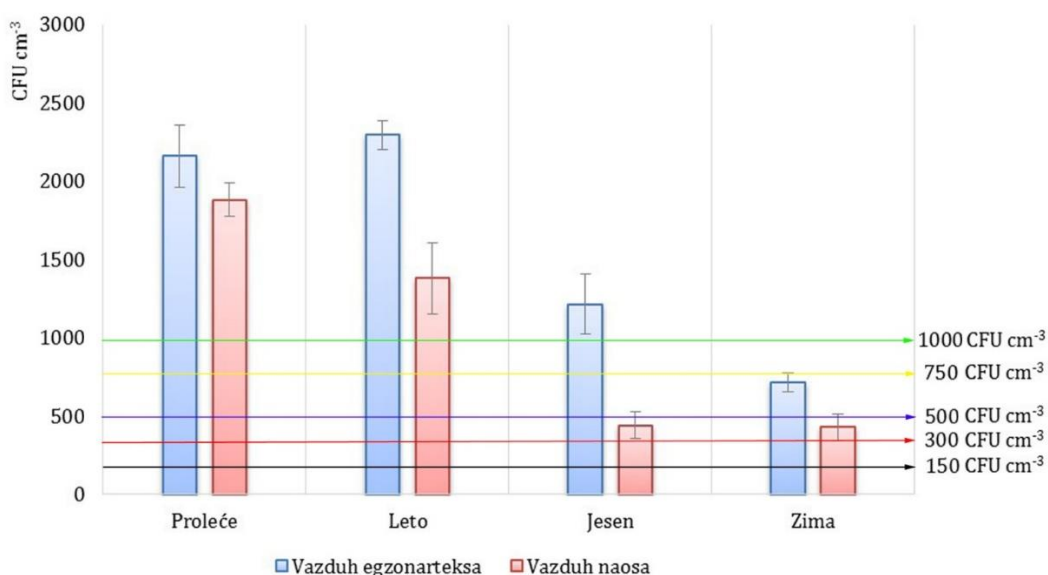
su imale predstavnike tokom dve ili više sezona, sa HS grupom prisutnom tokom svih sezona izuzev proleća i S i HFS grupama prisutnim tokom cele godine.

Aeromikološka analiza pokazala je potpunu dominaciju propagula konidijalnih filamentoznih gljiva. Najveću frekvenciju su imale vrste rodova *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicillium* što se u potpunosti poklapa sa rezultatima mikološke analize zidnih slika istraživane crkve, ali i rezultatima drugih sličnih istraživanja mikrobiote vazduha sakralnih građevina. U vazduhu Sikstinske kapele u Apostolskoj palati (Italija) je konstatovano preko 60 vrsta mikromiceta a sa najvećom frekvencom su izolovani pripadnici rodova *Cladosporium* i *Penicillium* (Montacutelli i dr., 2000). U vazduhu kompleksa Katedrale Santijago de Kompostela u Korunji (Španija) zabeleženo je prisustvo 35 taksona rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* (Aira i dr., 2007). Fungalnu komponentu bioaerosola crkve Sv. Katarine u Velikoj Lomnici (Slovačka) i grobnice crkve Sv. Petra u Peruđi (Italija) primarno čine vrste rodova *Cladosporium*, *Penicillium* i *Aspergillus* (Pangallo i dr., 2012; Ruga i dr. 2015). Veoma sličan sastav mikrobiote vazduha sakralnih objekata širom Evrope posledica je činjenice da su spore vrsta rodova *Alternaria* i *Cladosporium* najzastupljenija bioaresolna komponenta na svim geografskim širinama i u svim klimatskim zonama, dok su spore vrsta rodova *Penicillium* i *Aspergillus* veoma česte, ali je rod *Penicillium* više zastupljen u umerenim klimatskim zonama a rod *Aspergillus* u uslovima vlažne tropske klime (Florian, 2002). Takođe, poznato je da je češće detektovanje vrsta roda *Penicillium* posledica toga što su ove vrste u vazduhu prisutne u vidu dispergovanih fragmenata hifa i spora, dok se vrste roda *Aspergillus* nalaze u formi agregata spora (Nevalainen i dr., 2015). S druge strane, *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* je samo jednom izolovan tokom istraživanja, što je posledica produkcije spora u sluzi. Takođe, vrste roda *Chaetomium* su veoma česte na istraživanim zidnim slikama, ali tokom aeromikološke analize nisu zabeležene, zbog otežanog oslobađanja dosta krupnih askospora iz askokarpa. Apsolutna dominacija konidija filamentoznih konidijalnih gljiva (Deuteromycotina) u bioaerosolu naosa i egzozarteksa crkve je veoma značajna s obzirom da se predstavnici ovog podrzadela

smatraju glavnim uzročnicima procesa deterioracije zidnih slika (Nugari i Roccardi, 2001). Prema ovim autorima, ali i Ruga i dr. (2015), u uslovima odsustva kretanja vazduha, kakvi često vladaju u zatvorenim crkvama, spore veličine preko 2 μm se veoma lako i brzo talože na površinama zidnih slika usled dejstva sile gravitacije.

Aeromikološka analiza je pokazala kontaminaciju vazduha naosa propagulama mikromiceta u rasponu od $430 \pm 84,85$ do $1880 \pm 106,07$ CFU m^{-3} , odnosno vazduha egzozarteksa od $715 \pm 59,62$ do $2295 \pm 91,92$ CFU m^{-3} . Najveće CFU m^{-3} vrednosti su konstatovane tokom prolećnog i letnjeg perioda, dok je kontaminacija vazduha u zimskom periodu najniža, što je u potpunom skladu sa poznatim sezonskim trendovima. U oblastima sa umereno-kontinentalnom klimom se zna da geografski, sezonski i meteorološki faktori uslovljavaju najveću koncentraciju propagula gljiva u letnjem periodu, kada je i relativna vlažnost vazduha najveća, dok su tokom zimskog perioda koncentracije vijabilnih propagula i do tri puta niže (Montacutelli i dr., 2000; Nevalainen i dr., 2015). Zabeležena fungalna kontaminacija vazduha, kao i dokumentovani sezonski trendovi, su u potpunom skladu sa drugim istraživanjima gde je uzorkovanje propagula gljiva u unutrašnjosti manastira i crkava sprovedeno primenom uzorkivača vazduha (Aira i dr., 2007; Pyrri i Kapsanaki-Gotsi, 2007; Ruga i dr., 2015). Međutim, problem interpretiranja rezultata kontaminacije vazduha fungalnim propagulama leži u činjenici da u svetu još uvek ne postoje opšte priznati i prihvaćeni standardi o maksimalnim dozvoljenim koncentracijama spora gljiva u vazduhu kulturnih dobara. Kvantitativni standardi se kreću u rasponu od 100 do 1000 CFU m^{-3} vazduha unutrašnjih prostora (Florian, 2002). Prema Upravi za profesionalnu bezbednost i zdravlje, vrednost CFU m^{-3} bilo kog prostora ne sme da iznosi preko 150 (Ruga i dr., 2015). U praksi se još poštuje preporuka Svetske zdravstvene organizacije (WHO) po kojoj se koncentracija vijabilnih propagula gljiva u vazduhu zatvorenih prostora toleriše ako ne prelazi 1000 CFU m^{-3} (Nevalainen i Morawaska 2009; Nunes i dr., 2013). Prema De Aquino Randler i De Góes (2000) prostori sa vrednostima CFU m^{-3} iznad 750 mogu se smatrati visoko kontaminiranim, dok Kolwzan i dr. (2006) ističu da maksimalna dozvoljena koncentracija ne sme da prelazi 300 CFU m^{-3} . S druge

strane, neki autori, kao što su Cappitelli i dr. (2009b) i Micheluz i dr. (2015), navode da maksimalna CFU m⁻³ ne sme da bude iznad 150. Poređenjem zabeleženih vrednosti CFU m⁻³ sa navedenim standardima i četvorostepenom skalom kontaminacije predloženom od Roussell i dr. (2012) (<170 CFU m⁻³ - niska kontaminacija; 170-560 CFU m⁻³ - umerena kontaminacija; 560-1000 CFU m⁻³ - visoka kontaminacija; >1000 CFU m⁻³ - veoma visoka kontaminacija) može se konstatovati da je tokom većeg dela godine vazduh naosa i egzozarteksa kontaminiran propagulama gljiva i da vrednosti višestruko prevazilaze maksimalne dozvoljene koncentracije po većini standarda (Slika 76).



Slika 76. Koncentracija propagula mikromiceta (CFU m⁻³) u vazduhu naosa i egzozarteksa tokom četiri sezone perioda 2013/14. godine sa naznačenim maksimalnim dozvoljenim koncentracijama propagula prema različitim standardima. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti broja merenja sa standardnim odstupanjem

Veoma bitno je istaći da prisustvo visokih koncentracija propagula gljiva u vazduhu ne podrazumeva obavezno i veliku opasnost od biodeterioracije, s obzirom

na to da nemaju sve mikromicete sposobnost rasta i uzrokovanja oštećenja na zidnim slikama (Eggins i Oxley, 2001). Nugari i Roccardi (2001) navode da u slučaju kulturnih dobara, podaci o brojnosti spora gljiva u vazduhu sami po sebi ne znače mnogo, ukoliko se ne utvrdi i raznovrsnost prisutnih gljiva i ispita njihova sposobnost da uzrokuju oštećenja na kulturnim dobrima. U tom smislu, ističe se da je neophodno formulisati standard o maksimalnim dozvoljenim koncentracijama propagula gljiva poznatih uzročnika procesa deterioracije zidnih slika (Ruga i dr., 2015).

Crkveni prostori sa visoko kontaminiranim vazduhom predstavljaju veoma ozbiljan zdravstveni rizik za posetioce i crkveno osoblje, ali i konzervatore i restauratore. Mnoge zabeležene vrste su uzročnici bolesti respiratornog trakta, od alergijskog rinitisa do astme. Konstantno izlaganje visokim koncentracijama spora vrsta rodova *Alternaria* i *Cladosporium* uzrokuje hroničnu astmu i jake alergijske reakcije (Flanning i dr., 2001). Spore velikog broja vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* sadrže proteinske molekule koji se vezuju za imunoglobulin G (IgG) i izazivaju alergijske reakcije (Schwab i Straus, 2004). *A. versicolor* i *A. niger* su poznati producenti snažnih alergena Asp_v 13, odnosno Asp_n 14 i Asp_n 18 (Knutsen i dr., 2011; Shi i Miller, 2011). Takođe, mnoge od zabeleženih mikromiceta iz rodova *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicillium* su poznati producenti mikotoksina. Do značajnog izlaganja mikotoksinima dolazi putem inhalacije spora i to prvenstveno u slučajevima kada se veliki broj spora i fragmenata micelije oslobodi tokom manipulacije na infestiranim zidnim slikama (Maxim, 2013). U širokom spektru zdravstvenih problema koje mogu izazvati propagule gljiva u bioaerosolu posebnu pažnju privlači sindrom bolesne zgrade (SBS). Propagule *Penicillium* i *Stachybotrys* vrsta dovode se u direktnu vezu sa pojavom simptoma SBS (Cooley i dr., 1998). Prema podacima WHO, mnogi simptomi akutnih zdravstvenih problema – zamaranje, otežano disanje, suvi kašalj, mučnina, loša koncentracija, glavobolja, vrtoglavica, iritacija kože i sluzokože direktno su povezani sa vremenom provedenim u zatvorenom prostoru sa vazduhom kontaminiranim propagulama vrsta roda *Penicillium*. Od navedenih simptoma, svrab, kihanje i zamor su najčešći simptomi

zabeleženi kod biologa, konzervatora i restauratora koji rade u crkvama i drugim kulturnim dobrima sa lošim kvalitetom vazduha (Maxim, 2013). Međutim, prisustvo velikog broja mikromiceta, poznatih alergena, kao i visoka kontaminacija vazduha crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u ovom trenutku ne predstavlja problem s obzirom na to da se zbog postojanja nove crkve stara više ne koristi za obrede. Moguću opasnost po ljudsko zdravlje treba razmotriti kada započnu konzervatorski radovi u crkvi.

5.8. Diverzitet fungálnih propagula i aktivno rastućih mikromiceta na zidnim slikama i fasadi

Prisustvo i diverzitet propagula gljiva, na malteru i bojenom sloju zidnih slika, kao i detektovanje rasta plesni i drugih mikroorganizama unutar bojenog sloja i malterne podloge, proučavani su analizom uzoraka adhezivne trake svetlosnom mikroskopijom i ugljene trake na aluminijumskim cilindrima, skening elektronskom mikroskopijom.

Analize uzoraka adhezivne trake ukazale su na postojanje raznovrsne i kompleksne zajednice mikroorganizama na bojenom sloju zidnih slika, primarno sačinjene od filamentoznih gljiva, a u manjoj meri od lihenizovanih gljiva i algi. U svim analiziranim uzorcima uzetim sa zidnih slika naosa, detektovane su fungalne strukture: fragmenti melanizovanih hifa, hlamidospore i plodonosna tela, kao i veoma širok spektar spora za polno i bespolno razmnožavanje.

Od zabeleženih fungálnih reproduktivnih struktura, u uzorcima sa zidnih slika naosa i egzozarteksa seksualne i aseksualne spore fitopatogenih gljiva, biljnih saproba i potencijalnih humanih patogenata su bile najzastupljenije i najraznovrsnije. Na osnovu mikromoroloških karakteristika spora i drugih reproduktivnih struktura zabeleženih u masi ili pojedinačno, prisutne gljive su determinisane kao vrste rodova: *Alternaria*, *Arthrimum*, *Bispora*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Helminthosporium*, *Tetraplophaeria*,

Trichophyton, *Pleospora*, *Leptosphaeria*, *Ulocladium*; i redova Uredinales i Ustilaginales (Slika 77).



Slika 77. Raznovrsnost seksualnih i aseksualnih spora na bojenom sloju zidnih slika

Pored identifikovanih mikromiceta, na uzorcima adhezivne trake su bile veoma zastupljene i tamno pigmentisane, debelozidne spore, predstavnika Dematiaceae, koje nisu mogle biti identifikovane samo na osnovu građe spora (Slika 78).

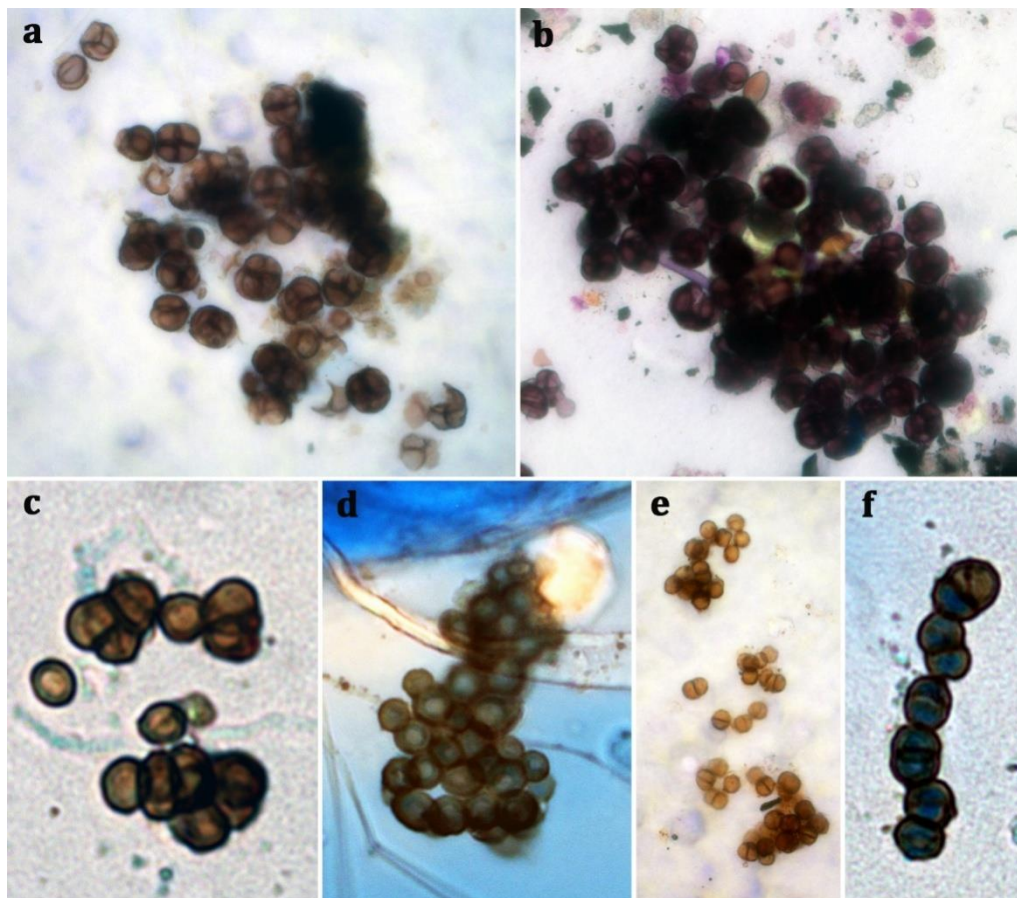


Slika 78. Neidentifikovane, melanizovane polne i bespolne spore (Dematiaceae) deponovane na površini bojenog sloja zidnih slika

Iako dominante, spore fitopatogena svojim prisustvom ne uzrokuju strukturne i estetske promene na zidnim slikama jer nemaju sposobnost klijanja i rasta na bojenom sloju. Njihovo prisustvo se, prema tome, može označiti kao “prolazno” (alohtoni tranzienti), jer kao patogeni biljaka nemaju ulogu u složenom procesu deterioracije zidnih slika. Međutim, prisustvo ovih gljiva je pomoglo da se odredi glavni izvor kontaminacije zidnih slika, tj. zemljište i vegetacija neposredne okoline istraživane crkve, što u potpunosti odgovara rezultatima veoma sličnih istraživanja, a koja su imala za cilj da utvrde diverzitet i poreklo mikrobiote zidnih slika (Garg i dr., 1995; Gorbushina i dr., 2004; Pepe i dr., 2010).

Pored propagula filamentoznih mikromiceta, na zidnim slikama je često zabeležen i porast gljiva u formi kompaktnih sfernih klastera i nerazgranatih lanaca ćelija mikrokolonijalnih gljiva (MCF) (Slika 79). U pojedinim slučajevima, primećeno je i prisustvo pojedinačnih, sfernih, tamno pigmentisanih ćelija, koje verovatno predstavljaju prelaznu fazu meristemskog rasta gljiva ove grupe. MCF su veoma otporne na stresne uslove sredine i poznate su kao dominantni kolonizatori kamenih površina svih klimatskih zona, a naročito su česte u uslovima ekstremnih temperatura, u pustinjama i polarnim zonama (Krumbein, 2003). Endolitske i epilitske vrste rodova *Capnobotryella*, *Coniosporium*, *Exophiala*, *Hortaea*, *Pseudotaeniolina*, *Sarcinomyces* i *Trimmatostroma* meristemskim rastom formiraju sitne, tamno pigmentisane, spororastuće klastere sfernog oblika i bez uočljive micelije, vrlo često u bliskim zajednicama sa talusom lihenizovanih gljiva (Sterflinger, 2005; Zucconi i dr., 2012) što je, takođe, dokumentovano na uzorcima adhezivne trake sa zidnih slika egzonarteksa. MCF su na zidnim slikama, po prvi put, zabeležene sredinom prošlog veka (Tonolo i Giacobini, 1961). Danas je poznato da se gljive iz ove grupe mogu naći kao komponente biofilma na zidnim slikama u pećinama i grobnicama, posebno u uslovima kada se visoka vrednost RH prostora aktivno snižava radi suzbijanja rasta gljiva i algi na zidnim slikama (Saarela i dr., 2004). Prisustvo velike količine soli na zidnim slikama je, takođe, važan faktor za rast s obzirom na to

da se MCF i druge melanizovane mikromicete u prirodi mogu naći u solanama i drugim ekstremnim staništima (Zalar i dr., 1999).



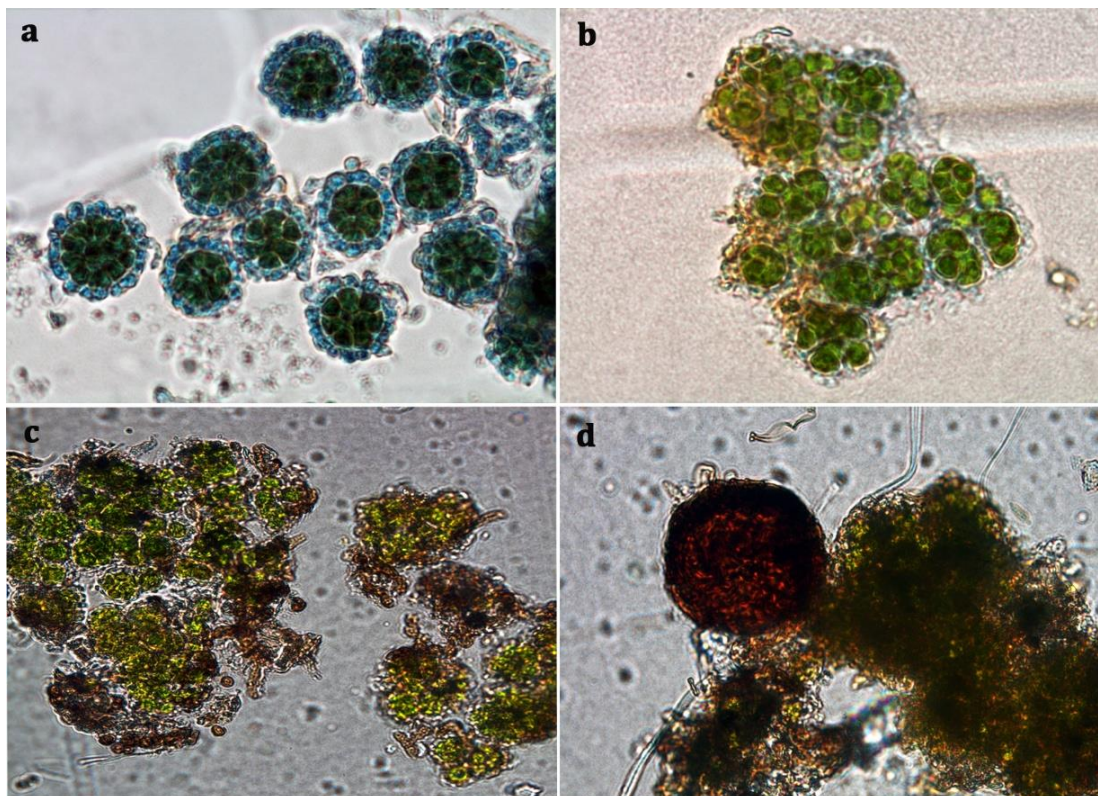
Slika 79. MCF sa površine zidnih slika: **a-c.** kompaktni sferni klasteri; **d-e.** masa jednoćelijskih i višećelijskih melanizovanih propagula; **f.** ngranati lanac ćelija

Uprkos čestim nalazima, MCF još uvek nisu okarakterisane kao tipični stres tolerantni kolonizatori zidnih slika, mada ih Wollenzien i dr. (1995) tretiraju kao primarne kolonizatore površina, a filamentozne gljive samo kao kontaminante. Prema Zucconi i dr. (2012) izražena sposobnost grupe MCF da prouzrokuju oštećenja na zidnim slikama posledica je prisustva višeslojnog ćelijskog zida, bogatog melaninima, čime je povećana mehanička sila neophodna tokom prodiranja klastera u bojeni sloj.

Takođe, mehanička i hemijska aktivnost MCF glavni je uzrok fenomena biopitting, tj. formiranja perforacija u supstratu dubine i širine ne više od 2 cm. EPS i drugi polimeri, sintetisani od strane MCF u velikim količinama, su snažni helacioni agensi i obrazuju stabilne organomineralne komplekse sa jonima metala iz maltera i pigmentata (Perry i dr., 2004). Za konzervatore, pigmentisane kvržice nastale meristemskim rastom na zidnim slikama predstavljaju veliki problem s obzirom na to da se veoma teško mehanički uklanjaju, a visok nivo melanina i mikosporina u ćelijskom zidu, kombinovan sa velikom količinom EPS, čini ih veoma rezistentnim na tretmane biocidima (Ciferri 1999; Sterflinger, 2010).

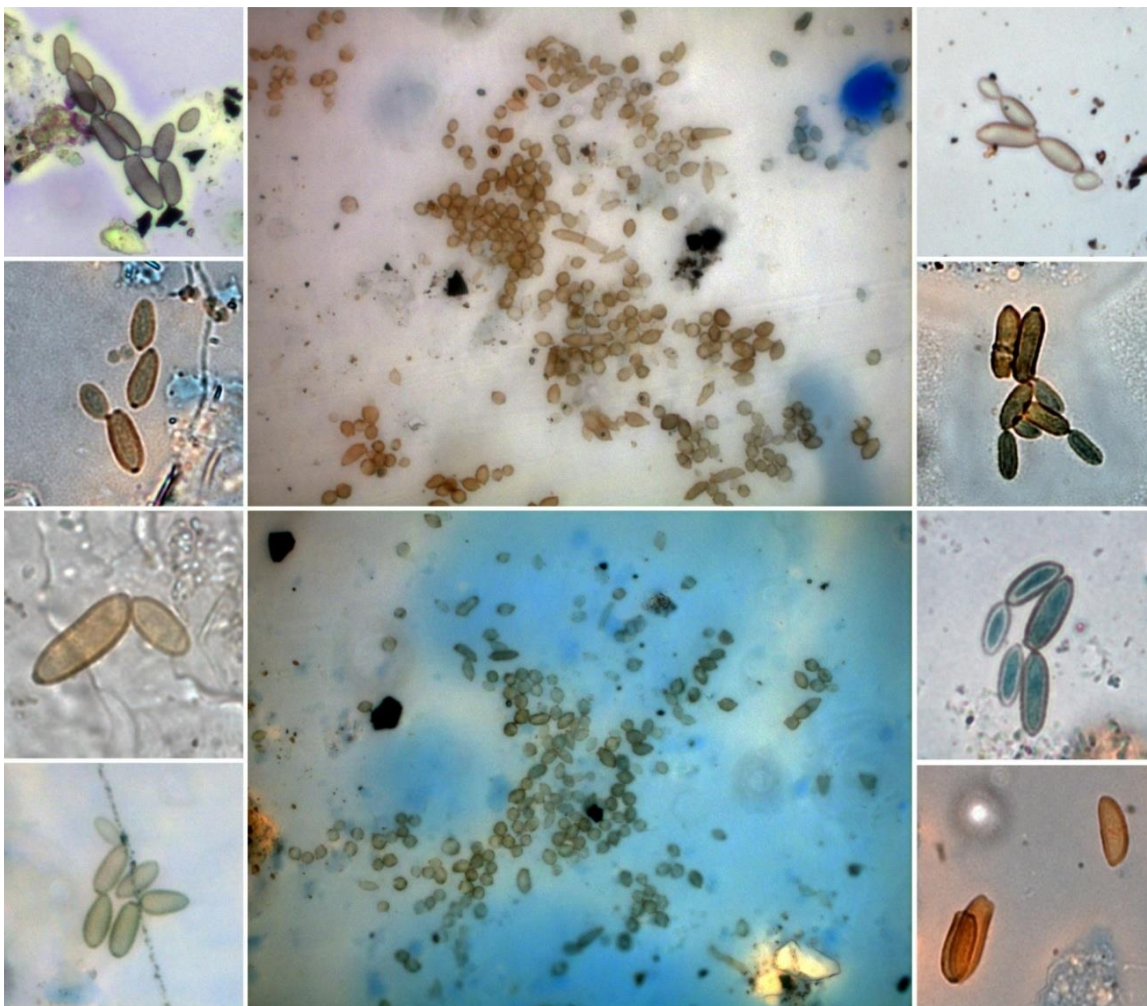
Nasuprot naosu, u uzorcima sa fasade i zidnih slika egzozarkoteksa dominantni su bili fragmenti talusa lihenizovanih gljiva. Najčešće su detektovane strukture za vegetativno razmnožavanje (soredije u masi) i strukturni delovi talusa: fotobiont (zelene alge) i mikobiont (melanizovana micelija i plodonosna tela) (Slika 80). Interesantno je da su fragmenti talusa i soredije, inače prisutne i očekivane na spoljnim površinama, često detektovane na veoma oštećenim delovima zidnih slika naosa, verovatno kao posledica stalnog prodora vazduha kroz prozorsko okno sa napuklim staklom. Biodeterioracija zidnih slika usled rasta lihenizovanih gljiva je do sada retko dokumentovana uglavnom na zidnim slikama fasada. Ipak se smatra da prisustvo propagula lihenizovanih gljiva na zidnim slikama fasada ukazuje na značajnu ulogu ovih organizama u procesu biodeterioracije (Nugari i dr. 2009). Do nastanka mehaničkog oštećenja zidnih slika dolazi usled rasta i prodiranja hifa u bojeni sloj, a Tonolo i Giacobini (1961) navode da glavnu opasnost za zidne slike predstavljaju lihenizovane gljive sa korastim talusom i apotecijama koje mogu da prodru kroz bojeni sloj sve do malterne podloge. Prostor između talusa i površine maltera je zona intenzivne hemijske aktivnosti koja dovodi do nastanka simptoma oštećenja. Struktura i sastav krečnog maltera čine supstrat veoma podložnim naseljavanju kalkeroznih i nitrofilnih vrsta, i određuju sastav zajednice, kao i tip formiranih promena (Arino i Sáiz-Jiménez, 2004). Zbog jako bliske veze sa supstratom, talusi lihenizovanih gljiva se veoma teško uklanjaju sa zidnih slika i jedini

način odstranjivanja podrazumeva primenu snažnih biocida (Karbowska-Berent, 2003).



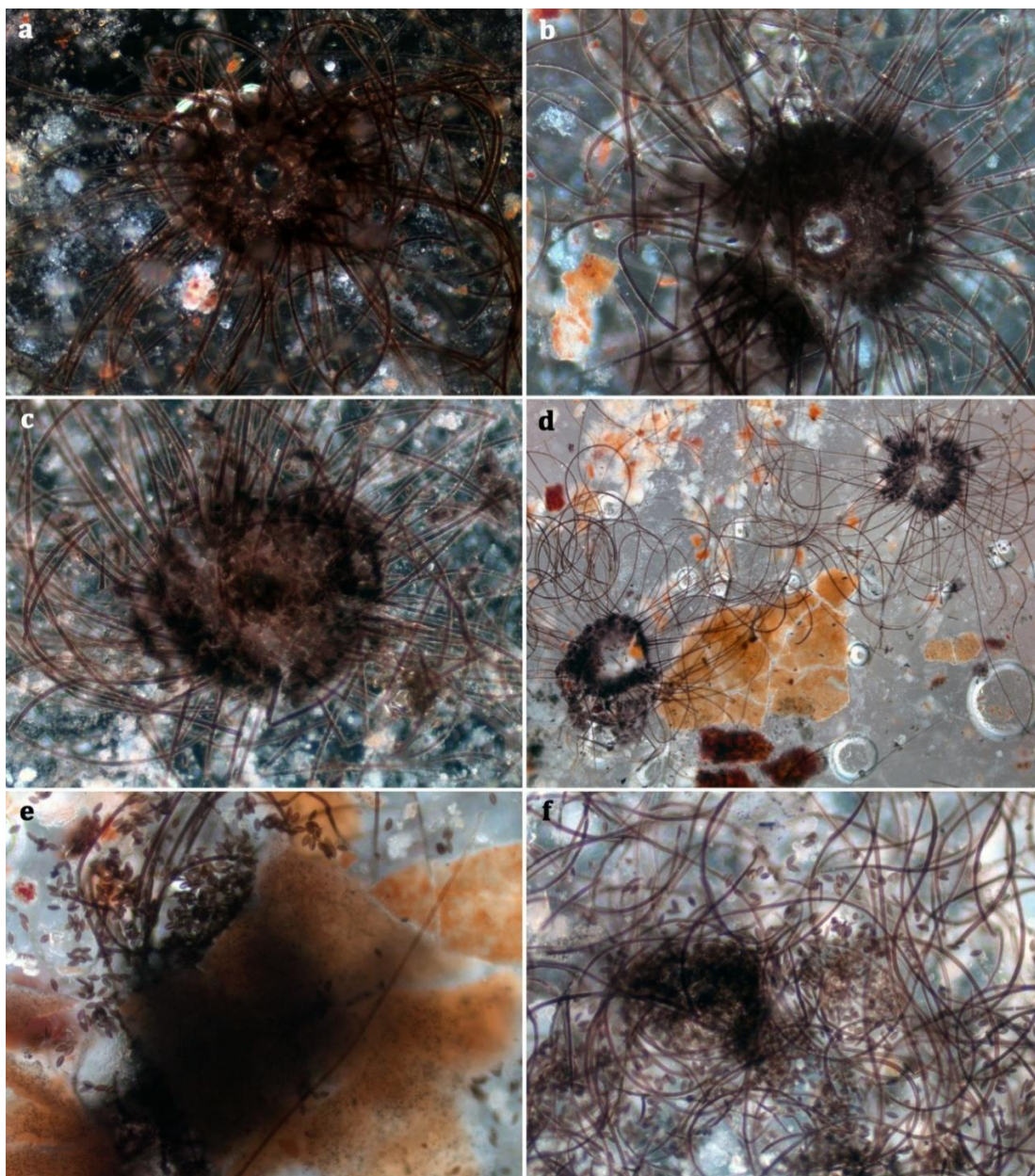
Slika 80. Lihenizovane gljive sa površine bojenog sloja zidnih slika egzarteksa i naosa: **a-b.** sorediye; **c-d.** mikobiont i fotobiont u fragmentima talusa

U analiziranim uzorcima adhezivne trake aktivno rastuće mikromicete identifikovane su kao *Cladosporium* spp. i *Chaetomium* sp. Intenzivan rast vrsta roda *Cladosporium* detektovan je na osnovu prisustva melanizovanih konidiofora sa primarnim i sekundarnim ramokonidijama i masom konidija. U analiziranim uzorcima adhezivne trake sa površina unutrašnjih ili spoljašnjih zidnih slika, porast *Cladosporium* spp. je zabeležen sa visokom frekvencom pojavljivanja (Slika 81).



Slika 81. Primarne i sekundarne konidije i ramokonidije *Cladosporium* spp. u masi na bojenom sloju zidnih slika

U analiziranim uzorcima zidnih slika naosa (tačke 2 i 6, u sve tri visine) zabeleženo je prisustvo plodonosnih tela po tipu peritecije, fragmenati heta i askospora. Na osnovu morfoloških karakteristika reproduktivnih struktura identifikovan je *Chaetomium* sp. (Slika 82). U ovim uzorcima, usled potpune dominacije struktura vrste roda *Chaetomium*, fungalne strukture drugih gljiva nisu zabeležene.



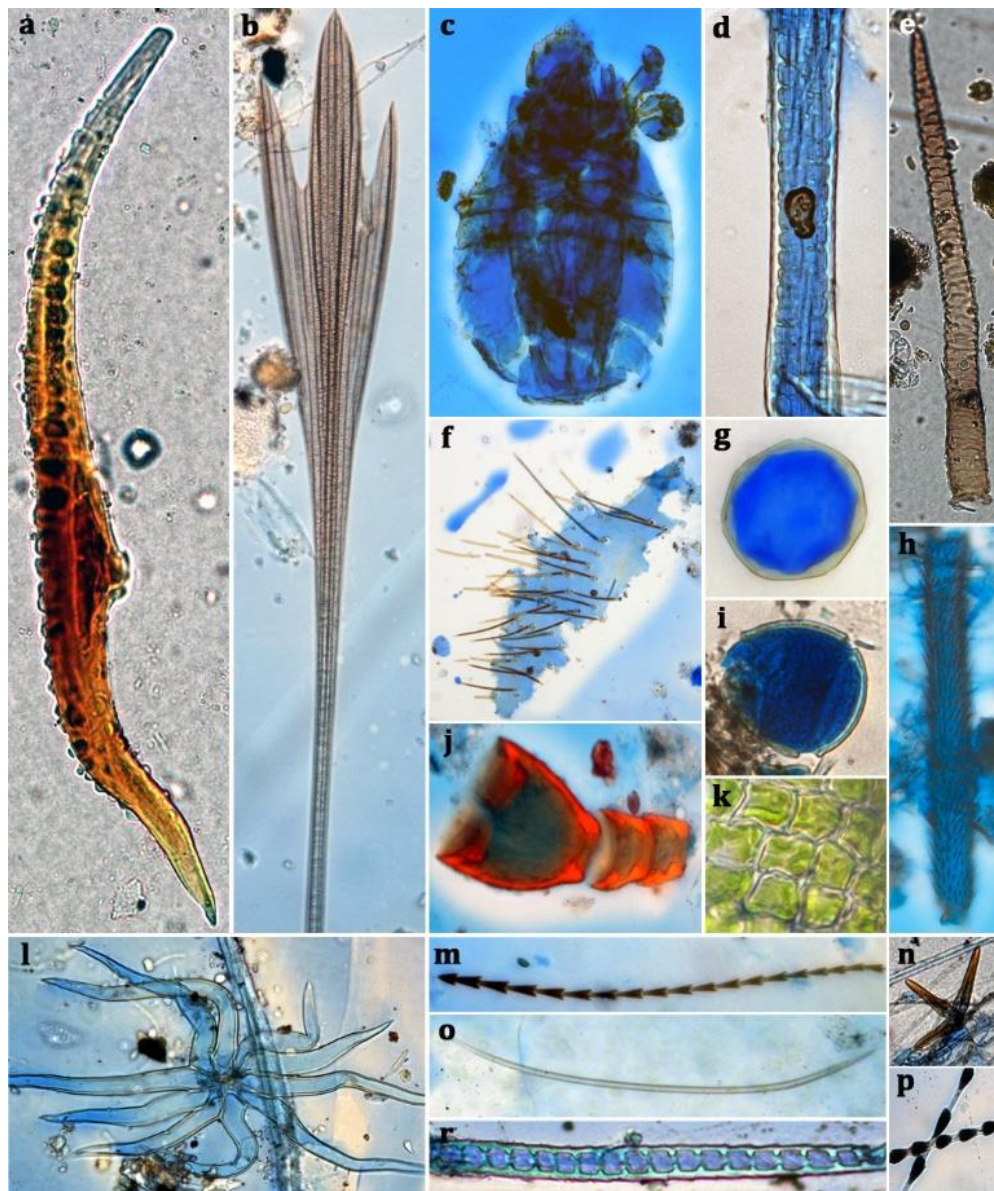
Slika 82. Porast *Chaetomium* sp. na i ispod bojenog sloja zidnih slika: **a-d.** kompaktne i fragmentisane peritecije obrasle hetama; **e-f.** hete i limunolike askospore u masi

Vrste rodova *Cladosporium* i *Chaetomium*, poznate po kosmopolitskom rasprostranjenju, veoma često su zabeležene na zidnim slikama sa simptomima biodeterioracije. Guglielminetti i dr. (1994) su dokumentovali rast ovih gljiva na

veoma oštećenim delovima zidnih slika u manastiru Svetog Damjana (Italija). O ulozi ovih gljiva u procesu biodeterioracije postoje oprečni stavovi, mada većina autora danas podržava mišljenje da se radi o primarnim uzročnicima oštećenja zidnih slika (Sáiz-Jiménez i Samson, 1981a; Giacobini i dr., 1988; Ciferri, 1999). Spororastuće vrste roda *Cladosporium* se često previde, mada veliki broj i raznovrsnost zabeleženih struktura na analiziranim uzorcima samo podržava danas opšte prihvaćeno mišljenje da su vrste ovog roda primarni kolonizatori zidnih slika u podzemnim grobnicama i crkvama zbog veoma visoke otpornosti na promene uslova spoljašnje sredine (Gorbushina i Petersen, 2000). Intenzivan porast *Cladosporium* sp. i *Chaetomium* sp. na zidnim slikama istraživane crkve može se tumačiti prisustvom supstrata koji je bogat celulozom i proteinima i činjenicom da ove gljive poseduju celulolitičke i proteolitičke enzime (Karpovich-Tate i Rebrikova, 1990). Porast navedenih gljiva direktna je posledica unosa celuloznog supstrata sa okolne vegetacije, sa jedne strane, i primene celuloznih kompresa za ekstrakciju soli u ranijim konzervatorskim tretmanima, sa druge strane. S obzirom na to da su delovi zidnih slika rađeni kombinovanom *fresco secco* tehnikom, zabeležene promene na zidnim slikama su posledica rasta i formiranja krupnih plodonosnih tela i korišćenja proteinskog supstrata. Ovo za posledicu ima slabljenje veza između bojenog sloja i podloge i podizanje i ljušpanje bojenog sloja. Sa aspekta uticaja na ljudsko zdravlje, masovna produkcija spora *Cladosporium* i *Chaetomium* vrsta na zidnim slikama je veoma značajna. *Chaetomium* vrste proizvode mikotoksine hetoglobozin A i hetoglobozin C, kada rastu na zidnim površinama (Straus, 2011), dok je za vrste roda *Cladosporium* poznato da sintetišu 2-etilheksanol, cikloheksene i kancerogene benzene (Korpi i dr., 1997; Larsen i dr., 1998). Za mnoge vrste je takođe poznato da izazivaju onihomikoze, feohifomikoze, kutane lezije i peritonitis (Sutton i dr., 1998; Latha i dr., 2010).

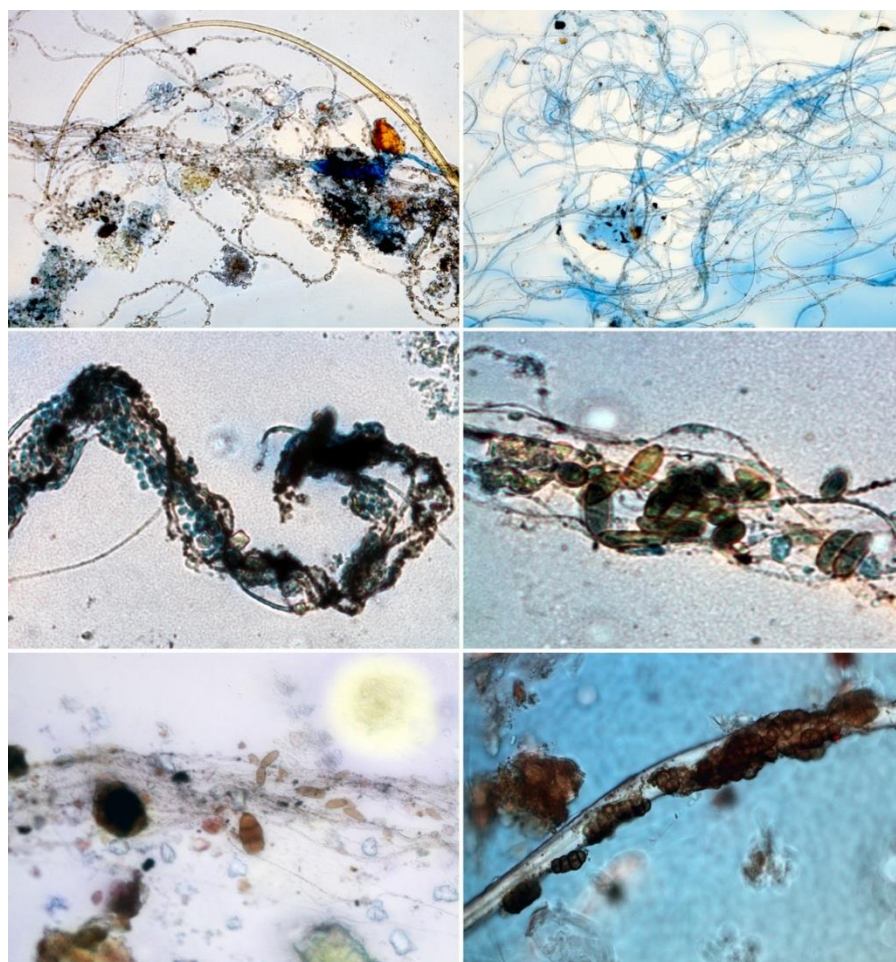
Pored detektovanih propagula mikromiceta na adhezivnoj traci je i zabeleženo prisustvo neorganskih komponenti i struktura biljnog i životinjskog porekla. Ovaj nalaz je od velikog značaja, s obzirom na to da zabeležene strukture biljnog porekla (polenova zrna, fragmenti talusa mahovina, trihome, ahene i delovi biljnog tkiva) i

životinjskog porekla (dlake, paučina, grinje, tardigrade, nematode, peleti, antene i fragmenti egzoskeleta artropoda) (Slika 83) čine izvore nutrijenata za mikromicete.



Slika 83. Strukture biljnog i životinjskog porekla prisutne na površini zidnih slika naosa i egzozarteksa: **a, o.** nematode; **b.** pero ptice; **c.** grinja; **d, r.** biljno tkivo; **e.** dlaka; **f, j, h.** fragmenti egzoskeleta i ekstremiteta zglavkara; **g, i.** polenovno zrno; **k.** talus mahovine; **l.** zvezdasta trihoma; **m, n, p.** fragmenti antena zglavkara

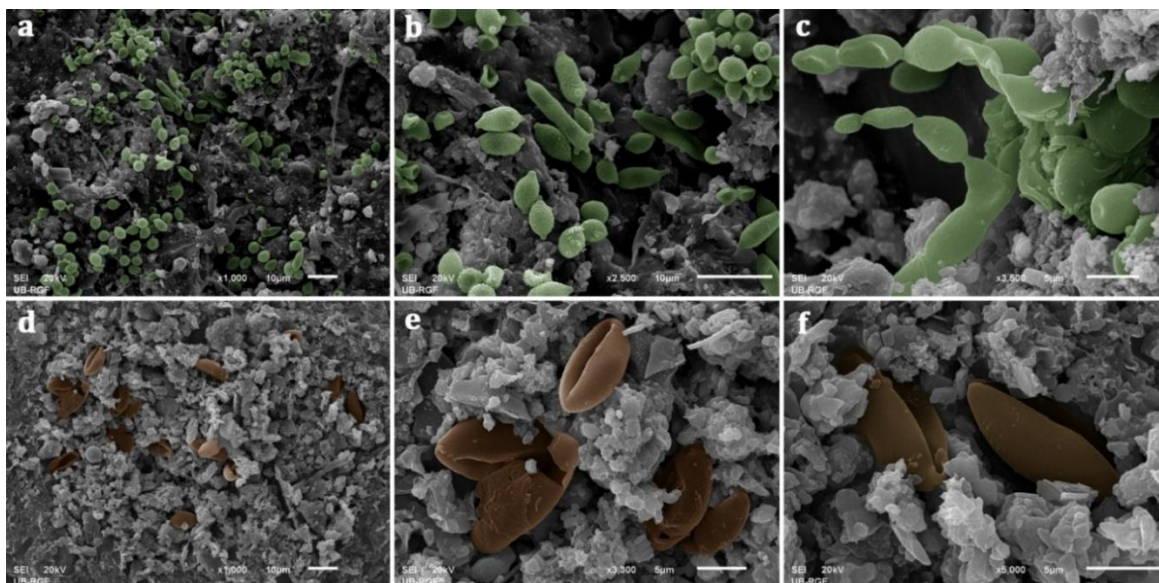
Gljive su poznati razlagači proteinskih, celuloznih i hitinskih supstrata. Sposobnost mnogih gljiva, kolonizatora zidnih slika, da produkuju ekstracelularne enzime i koriste proteinske i hitinske supstrate u ishrani dokazana je od strane Karpovich-Tate i Rebrikova (1990) i Gorbushina i Petersen (2000). Međutim, pored toga što predstavljaju izvore nutrijenata, nematode i zglakvari su takođe izvor i faktor širenja kontaminacije (Gorbushina i Petersen, 2000). Propagule mikromiceta mogu biti zakačene na površinu egzoskeleta, odnosno epidermisa, ili se konidije mogu preneti na nove regione zidnih slika ingestijom. Takođe, veliki broj spora mikromiceta je bio “zakačen” za paučinu i druge strukture deponovane na površinu (Slika 84).



Slika 84. Adhezija velikog broja fungalnih propagula i neorganskog depozita na niti paučine i drugim strukturama deponovanim na površini zidne slike

Sve ovo ukazuje na neophodnost uvođenja osnovnih preventivnih mera. Redovno čišćenje je često zanemareno, uprkos tome što se pouzdano zna da se u slojevima prašine nalazi visoka koncentracija propagula gljiva i organskih materija neophodnih za njihov rast (Sterflinger i Piñar, 2013). U povoljnim uslovima, gljive mogu da prerastu delove zidnih slika u roku od nekoliko dana i postanu inokulum za okolne površine, dok očišćene površine imaju značajno nižu stopu kontaminiranosti sporama, pa su manje podložne rastu plesni (Karbowska-Berent, 2003).

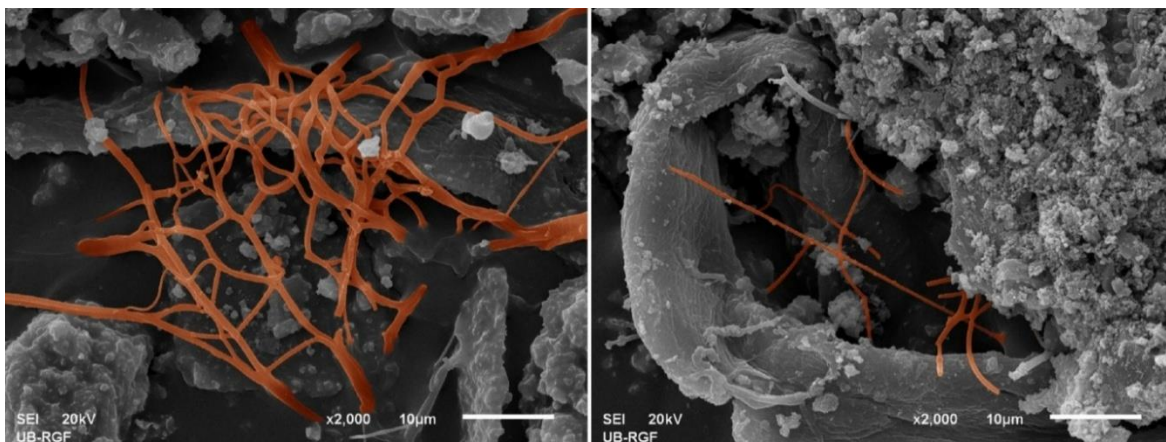
Za SEM analize fragmenti zidnih slika naosa i egzonteksa su uzorkovani primenom ugljene trake na aluminijumskim cilindrima, u cilju procene oštećenja zidnih slika i utvrđivanja prisustva rasta mikroorganizama unutar bojenog sloja, odnosno na prelazu bojenog sloja i malterne podloge. Rezultati SEM analiza su potvrdili nalaze sa svetlosnog mikroskopa, tj. dominantno prisustvo hifa i reproduktivnih struktura vrsta rodova *Cladosporium* i *Chaetomium*, kako na površini, tako i unutar bojenog sloja zidnih slika (Slika 85).



Slika 85. SEM porasta mikromiceta u bojenom sloju i na prelazu bojenog sloja i malterne podloge: **a-c.** konidije *Cladosporium* spp. [-]; **d-f.** askospore *Chaetomium* sp. [-]. Editovano pseudbojama - Photoshop 6.0

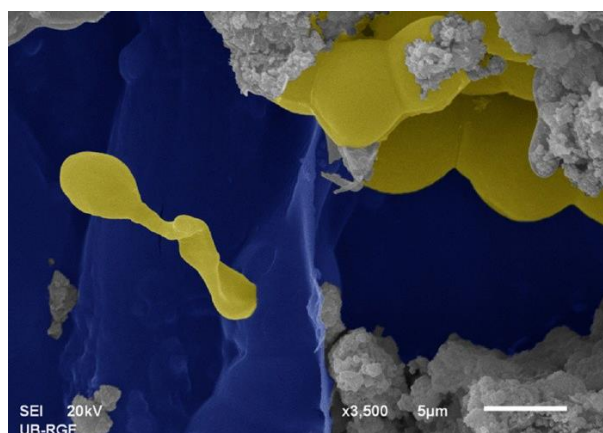
Pored askospora *Chaetomium* sp. i brojnih spora vrsta roda *Cladosporium*, prisustvo tankih, granatih i ornamentisanih filamenata aktinomiceta, čvrsto povezanih za supstrat i u bliskom kontaktu sa sekretovanim EPS, je takođe zabeleženo (Slika 86). Za aktinomicete je poznato da mogu da kolonizuju umetničke predmete i kulturna dobra (Giacobini i dr., 1988), a rast filamenata aktinomiceta na zidnim slikama je već dokumentovan od strane Gorbushina i dr. (2004). Izražen porast aktinomiceta na zidnim slikama neki autori tumače kao posledicu prisustva Fe_2O_3 (pigment pečeni oker) koji je jedan od tri preduslova za uspešan rast aktinomiceta na supstratu (Diaz-Herraiz i dr., 2013). Prisustvo ovog pigmenta detektovano je SEM-EDX analizom uzorka fragmenta bojenog sloja crvene boje. Prema Karbowska-Berent (2003) i Schanchez-Moral i dr. (2004), rast aktinomiceta, pogotovo vrsta roda *Streptomyces*, na zidnim slikama ukazuje na pozne faze deterioracije sa završenim procesom sukcesije i prisutnim stabilnim odnosima između mikroorganizama na bojenom sloju. Uloga aktinomiceta u procesu propadanja umetničkih predmeta prvi put je opisana krajem prošlog veka (Williams, 1985). Slično mikromicetama, aktinomicete tokom rasta proizvode snažne ekstracelularne metabolite, primarno enzime i organske kiseline, koji razgrađuju organske i neorganske komponente zidnih slika. Pored toga, filamenti mehanički prodiru u bojeni sloj i formiraju gustu, isprepletanu mrežu, dovodeći do nastanka perforacija i pukotina, kao i rastvaranja i taloženja minerala (Dornieden i dr., 2000). Aktinomicete imaju sposobnost da talože kristale $CaCO_3$ i deluju sinergistički sa fenomenom rasoljavanja (Diaz-Herraiz i dr., 2013). Svojom aktivnošću u značajnoj meri doprinose mehaničkoj deterioraciji, jer nastanak pukotina usled penetriranja filamenata pomaže rastvaranju i kristalizaciji soli (Sáiz-Jiménez i Laiz, 2000). Formirane soli, zajedno sa rastom filamenata aktinomiceta i hifa mikromiceta, dovode do povećanja unutrašnjeg pritiska, što je sigurno glavni uzrok zabeleženih simptoma pucanja, krunjenja bojenog sloja i gubitka fragmenata zidnih slika. Osim toga, EPS i mikroorganizmi su zajedno formirali biofilm, i time dodatno doprineli nastanku strukturnih i estetskih promena. Utvrđeni mehanizmi dejstva EPS i mikroorganizama su: ubrzanje korozije usled deponovanja čađi; heliranje jona metala iz pigmenata;

oksidoredukcija pigmentata; pružanje mehaničke potpore i stimulisanja porasta mikroorganizama; i favorizovanje odvajanje bojenog sloja od podloge (Ciferri, 1999; Florian, 2002; Milanese i dr., 2006a).



Slika 86. Filamenti aktinomoceta uronjeni u EPS [-]. Editovano pseudbojom - Photoshop 6.0

Još jedna zanimljivost zabeležena SEM-om je učestalo prisustvo delimično ili potpuno dehidriranih i deformisanih hifa i reproduktivnih struktura uronjenih u EPS matriks (Slika 87).



Slika 87. EPS [-] i fungalne strukture [-] u bojenom sloju. Editovano pseudbojama - Photoshop 6.0

Mikroskopskim analizama je dokumentovana raznovrsnost propagula i detektovan porast mikroorganizama na i u bojenom sloju zidnih slika. Mada u osnovi veoma jednostavne, korišćene mikroskopske metode pružaju značajan uvid u to da li mikroorganizmi, zabeleženi kultivacionim metodama, zaista i rastu na supstratu ili su samo posledica taloženja propagula iz vazduha. Na zidnim slikama istraživane crkve, samo minorni deo ukupne mikrobiote (<5%) zabeležene kultivacionim metodama, predstavlja aktivno rastuće forme (MCF i *Cladosporium* spp. i *Chaetomium* sp.).

Za dugotrajno očuvanje zidnih slika presudnu važnost ima precizna analiza diverzitetna komponenti mikrobiote, metabolički aktivne i dormantne, sa posebnim akcentom na detektovanje prisustva mikroorganizama sposobnih da razgrađuju i uzrokuju promene na ovom jedinstvenom tipu supstrata. Za mikologe, restauratore i konzervatore, uključene u proces konzervacije zidnih slika, ovi podaci, zajedno sa informacijama o glavnim izvorima i tokovima kontaminacije i unutrašnjim žarištima ("hotspots"), su od presudne važnosti za optimizovanje metoda monitoringa mikrobijalne zajednice, ali i razvoj adekvatnih mera prevencije i sanacije biodeterioracije zidnih slika.

5.9. Cijanobakterije i alge prisutne na zidnim slikama i fasadi

Detektovanje fototrofnih mikroorganizama, u sastavu biofilma fasade i zidnih slika, sprovedeno je mikroskopskim analizama rehidriranih uzoraka adhezivne trake. Sa deset uzorkovanih mesta, 4 sa fasade i 6 sa zidnih slika egzozarteksa, identifikovana su dva taksona zelenih algi (Chlorophyta): kokalna vrsta *Desmococcus olivaceus* u formi gusto pakovanih agregata ćelija, i trihalna *Trentepohlia umbrina* (Tabela 7). Ova alga je najčešće zabeležena, solitarno ili zajedno sa melanizovanim fungalnim strukturama, u sastavu delimično formiranih primordija lihenizovanih gljiva. S druge strane, na zidnim slikama naosa, na 20 tačaka uzorkovanja, samo je sporadično zabeleženo prisustvo agregata ćelija kokalne zelene alge *Trebouxia* sp., dok je na fasadi severne i istočne strane crkve ova alga dominirala zajedno sa *D. olivaceus*,

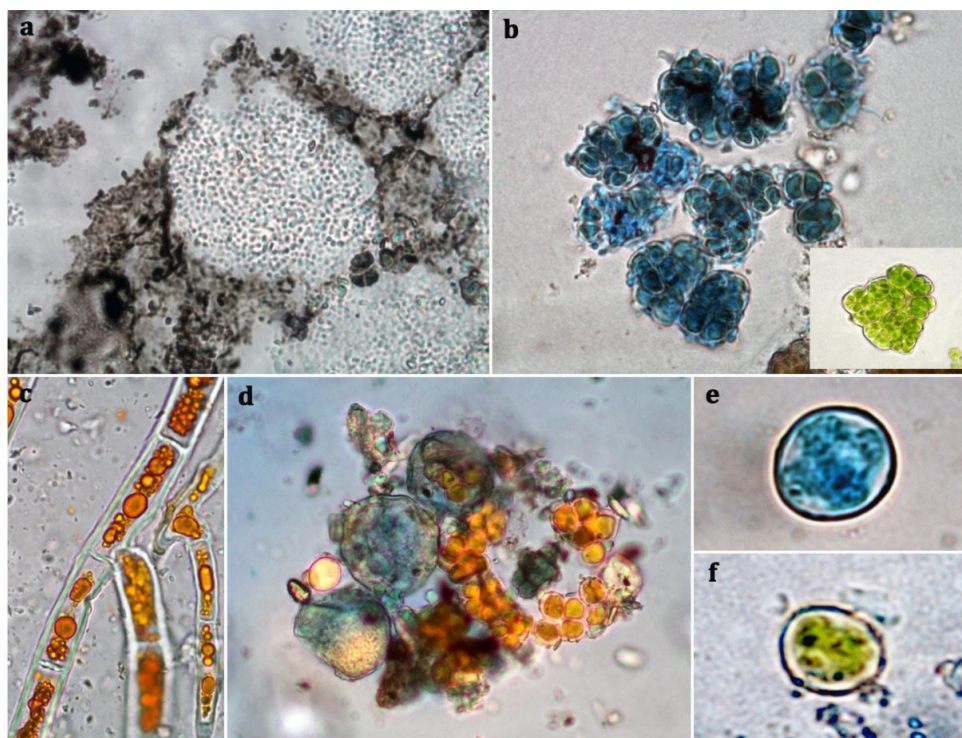
u letnjem periodu. Silikatne alge (Bacillariophyta) su bile prisutne u uzorcima adhezivne trake iz prolećnog perioda, kada su zidne slike severnog zida bile vidno vlažne usled kondenzovanja vodene pare iz toplog vazduha na hladne zidove naosa. Jedina vrsta cijanobakterija (Cyanoprokariota) dokumentovana u zoni tamne patine praškaste teksture, koja prekriva motive zidne slike unutrašnjosti đakonikona južnog zida naosa je *Aphanocapsa fuscolutea* (Slika 88).

Tabela 7. Fototrofni mikroorganizmi iz uzoraka biofilma sa fasade i zidnih slika

Identifikovane alge i cijanobakterije	Proleće	Leto	Jesen	Zima
<i>Aphanocapsa fuscolutea</i> Hansgirg		+		
<i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R. Laundon	+	+		
<i>Trebouxia</i> Puymaly sp.		+		
<i>Trentepohlia umbrina</i> (Kützing) Bornet		+	+	+
Bacillariophyta	+			

Nasuprot mikromicetama, raznovrsnost i zastupljenost fototrofa na fasadi i zidnim slikama istraživane crkve je niska. Sa izuzetkom *A. fuscolutea* zabeležene u masi, svi fototrofi su bili ili sporadično detektovani, ili prisutni tokom većeg dela godine ali u nedovoljnoj biomasi da bi uzrokovali formiranje pigmentisanih prevlaka na površinama. Ovi nalazi se delimično poklapaju sa rezultatima sličnih istraživanja mikrobiote na zidnim slikama i fasadama. Zastupljenost algi i cijanobakterija je mnogo manja od očekivane, mada sastav zabeleženih vrsta u potpunosti odgovara poznatim kolonizatorima zidnih površina u crkvama. Skoro sve zabeležene alge su pripadnici razdela Chlorophyta što je prema Ortega-Calvo i dr. (1993), Arino i dr. (1996) i Karbowska-Berent (2003) i očekivano, ako se radi o regionima sa umereno kontinentalnom klimom (Sarad i Adhikary, 2008). Među detektovanim algama, najveću frekvencu javljanja imala je *T. umbrina*, mada nikada u dovoljnoj biomasi za formiranje za nju karakterističnih crveno-narandžastih patina. Za vrste ovog roda je poznato da poseduju kosmopolitsko rasprostranjenje na ovom tipu supstrata i

zajedno sa zelenim algama rodova *Pleurococcus* i *Stichococcus* spadaju u najčešće kolonizatore zidne slike (Ortega-Calvo i dr., 1993; Arino i dr., 1996). Karakteristična asocijacija *T. umbrina* sa melanizovanim hifama, u primordijama lihenizovanih gljiva, zabeležena na fasadi i zidnim slikama, veoma dobro je poznata za ovu vrstu. U slobodnoj formi i kao fotobiont lihenizovanih gljiva *T. umbrina* je takođe zabeležena na zidnim slikama pećine Svetog Spasitelja (Italija) u 2 forme što može da ukazuje na aktivan proces lihenizacije, što vremenom za posledicu može imati kolonizaciju zidnih slika lihenizovanim gljivama (Zucconi i dr., 2012). Za vrste roda *Trebouxia* se zna da su među glavnim kolonizatorima zidnih površina u zonama umereno kontinentalne klime, retko same, a češće kao fotobionti primordija lihenizovanih gljiva (Sarad i Adhikary, 2008; Macedo i dr., 2009).



Slika 88. Alge i cijanobakterije u sastavu biofilma sa zidnih slika i fasade: **a.** kolonije *Aphanocapsa fuscolutea*; **b.** agregati ćelija *Desmococcus olivaceus* sa hifama gljiva, bojene LCB i nativni; **c-d.** *Trentepohlia umbrina*, trihomi i agregati ćelija; **e-f.** pojedinačna ćelija *Trebouxia* sp., bojena LCB i nativna

Za agregate ćelija *D. olivaceus* poznato je da čine sastavne komponente SAB na kamenim spomenicima (Uher, 2008; Ljaljević Grbić i dr., 2009). Prema dostupnim podacima, *Desmoccocus olivaceus* do sada nije konstatovan na bojenom sloju zidnih slika. Prisustvo silikatnih algi, tokom prolećnog perioda, na vlažnim zidovima naosa nije neuobičajeno, imajući u vidu povoljne uslove sredine. Silikatne alge se generalno retko detektuju na zidnim slikama, mada je poznato preko 25 vrsta koje su kolonizatori bojenog sloja (Karbowska-Berent, 2003).

Jedini zabeleženi fototrof uzročnik vidljivih promena na bojenom sloju zidnih slika je cijanobakterija *A. fuscolutea*. Ova vrsta ne pripada često detektovanim kolonizatorima zidnih slika (*Eucapsis*, *Fischerella*, *Leptolyngbya*, *Scytonema*, *Lyngbya*, *Nostoc* i *Oscillatoria*), mada su vrste ovog roda, primarno *A. muscicola*, detektovane u sastavu SAB na zidnim slikama pećine oblasti Mursija (Španija) i zidova palata Sv. Đorđa i Mihajla (Grčka) (Pantazidou i Theoulakis, 1997; Asencio i Aboal, 2001). Oskudno prisustvo cijanobakterija na zidnim slikama i potpuno odsustvo na fasadi crkve je verovatno posledica klimatskih faktora, s obzirom na to da cijanobakterije, nasuprot zelenim algama, dominiraju na zidnim površinama u toplim regionima, ali su srazmerno retke u zoni umereno kontinentalne klime (Sarad i Adhikary, 2008).

Do danas je sproveden veliki broj istraživanja o potencijalnoj ulozi cijanobakterija i algi u procesu biodeterioracije zidnih slika (Strzelczyk, 1981; Grilli-Caiola i dr., 1987; Albertano i Grilli-Caiola, 1989; Albertano i dr., 1991; Edwards i dr., 1991; Edwards i dr., 1994; Pietrini i dr., 2008; Roccardi i dr., 2008). Navedena istraživanja su pokazala da se u uslovima visoke RH i dostupne dovoljne količine sunčeve svetlosti može formirati biofilm na zidnim slikama fasada. Pored toga, alge i cijanobakterije su u mogućnosti da se prilagode različitim uslovima kvaliteta svetlosti, hromatskom adaptacijom, što im omogućava da nasele površine zidnih slika u prostorima niskog intenziteta svetlosti, kao što su crkve i katakombe (Albertano i dr., 2003; Sterflinger i dr., 2013). Pored zidnih slika egzonarteksa, izloženih suncu tokom većeg dela dana, u naosu prozori istočnog i severnog zida pružaju dovoljno svetlosti za

rast fotosintetičkih mikroorganizama. U ovako povoljnim uslovima sredine, subaeralne i litofilne alge i cijanobakterije mogu rasti na zidnim slikama i uzrokovati oštećenja bojenog sloja i krečnog maltera (Krumbein i Lange, 1978). Usled rasta na zidnim slikama, ovi organizmi primarno uzrokuju promene originalne obojenosti bojenog sloja, kao posledice formiranja praškastih patina i želatinoznih prevlaka, sa bojom koja zavisi od tipa biocenoze, pigmenata prisutnih u dominantnom i drugim mikroorganizmima, i od uslova sredine (Karbowska-Berent, 2003). Mada zelene alge rodova *Desmococcus*, *Trebouxia* i *Trentepohlia* nisu formirale karakteristične biopatine zelene i narandžaste boje, rast ovih algi na zidnim slikama ne treba zanemariti. Pored estetskih promena, alge i cijanobakterije mogu uzrokovati strukturne promene na malteru i bojenom sloju putem sinteze organskih kiselina: acetatne, glikolne, piruvatne, mlečne, oksalne i sukcinatne (Garg i Dhawan, 1994). Pored toga, mogu uzrokovati i mehanička oštećenja povećanjem unutrašnjeg pritiska u porama i to primarno putem širenja i sakupljanja galernog omotača u uslovima visoke, odnosno niske, vlažnosti, i akumuliranja čestica minerala u omotaču (Asencio i Aboal, 2001). Fototrofi su u mogućnosti da izvlače Ca^{2+} jone iz supstrata i talože $CaCO_3$ u prisustvu svetlosti, dok noću, usled promene nivoa ugljenika, ponovo rastvaraju krečnjak čime značajno doprinose formiranju oštećenja na malteru (Crispim i Gaylarde, 2005). Takođe, prema Morton i Surman (1994) kontinuirano ponavljanje ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja algalne biomase, u promenljivim sredinskim uslovima uzrokuje mehaničko oštećenje i značajno doprinosi zadržavanju vlage u zidu, što ima veliku ulogu u procesu deterioracije. Međutim, pored direktnog efekta na integritet zidnih slika, alge produkovanom biomasom i sintezom velikih količina ugljenih hidrata, aminokiselina i faktora rasta stimulišu rast heterotrofnih mikroorganizama posredno doprinoseći nastanku oštećenja na zidnim slikama (Strzelczyk, 1981).

Mada zastupljene sa malim brojem taksona, alge i cijanobakterije na zidnim slikama i fasadi istraživane crkve predstavljaju veliki problem jer su sa aspekta biodeterioracije zabeležene vrste jako potentne, a rast fototrofnih mikroorganizama na zidnim slikama se teže uklanja od porasta plesni, s obzirom na to da sunčeva

svetlost, razlaganje organskih komponenti i isparavanje biocida sa površine zidnih slika mogu da stimulišu rast algi (Garg i Dhawan, 1994). Jedan od veoma delotvornih algicida je BAC, što je i demonstrirano uklanjanjem porasta algi na zidnim slikama crkve Sv. Kristofera u Milanu (Alessandrini i dr., 1984), odnosno cijanobakterija sa zidnih slika katedrale Orvieto (Italija) (Cappitelli i dr., 2009a). Međutim, primena biocida u tretmanu zidnih slika uvek treba da bude poslednja mera i to samo kada su se druge metode pokazale kao neadekvatne, ili iz nekog razloga nisu primenljive u datom slučaju. Poznato je da alge i cijanobakterije često ne rastu na određenim zonama zidnih slika, živopisanih bojama sa teškim metalima u pigmentima. Ova činjenica može da predstavlja rešenje u eliminaciji fototrofa izborom pigmenata tokom konzervatorsko-restauratorskih tretmana čime bi se sprečile naknadne rekolonizacije očišćenih i restauriranih površina zidnih slika.

5.10. Stepen kontaminacije bojenog sloja zidnih slika naosa („Zona čistoće”)

Za direktnu procenu stepena kontaminacije površine zidnih slika naosa mikroorganizmima i organskim depozitom korišćena je metoda ATP bioluminiscencije primenom Lightning MVP instrumenta. Preko 60% uzoraka, uzetih tokom 4 sezone, nakon očitavanja Lightning MVP instrumentom imalo je vrednosti preko 3,0, što prema preporučenoj skali predstavlja zonu opasnosti (Tabela 8). Ostatak analiziranih uzoraka pokazivao je vrednosti u opsegu od 1,0 do 3,0, što spada u domen čiste zone (0-2,5) i zone opreza (2,5-3,0). Preračunavanjem srednje vrednosti „Zona čistoće“ za 4 sezone, procenat uzorkovanih površina zidnih slika u zoni opasnosti (>3,0) iznosi 75%, što se na mozaičnom grafikonu uočava kao dominacija crveno obojene površine (Slika 89).

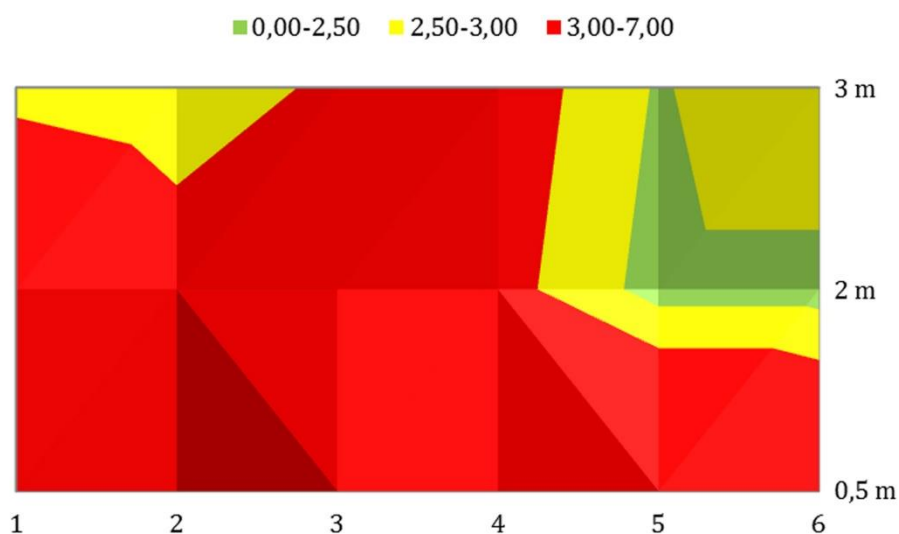
Tabela 8. Vrednosti „Zona čistoće“ i broja kolonija po kontaktnom slajdu (CFU cm⁻²) za zidne slike naosa

Tačke uzorkovanja	Sezona uzorkovanja							
	Proleće		Leto		Jesen		Zima	
	G+B	„Zona čistoće“	G+B	„Zona čistoće“	G+B	„Zona čistoće“	G+B	„Zona čistoće“
1.1	36+3	4,0	58+0	4,0	118+21	4,7	53+20	4,3
1.2	82+100	5,3	247+0	3,3	131+100	4,6	60+9	3,4
1.3	45+1	3,6	140+1	2,0	45+100	2,8	173+0	2,8
2.1	5+30	3,0	10+6	4,7	26+15	1,3	6+20	4,0
2.2	23+10	4,4	23+8	1,0	45+13	4,2	43+13	4,3
2.3	53+12	2,1	11+2	2,3	26+33	2,9	11+0	2,9
3.1	3+10	4,2	2+11	5,0	110+5	4,8	24+4	4,8
3.2	17+5	4,6	6+8	4,3	89+24	2,0	38+10	3,9
3.3	10+100	3,9	13+17	4,5	104+34	1,0	6+100	3,2
4.1	8+8	4,9	13+61	3,8	52+8	4,2	14+5	3,9
4.2	21+4	3,9	7+0	3,6	13+10	3,2	26+1	2,2
4.3	12+100	3,8	8+8	3,7	25+16	4,0	18+0	2,0
5.1	5+30	5,0	12+50	5,1	188+26	4,1	9+100	4,6
5.2	41+28	3,1	20+2	1,0	42+41	2,2	37+25	2,9
5.3	82+19	2,5	13+100	2,5	57+119	2,4	22+1	2,4
6.1	32+100	4,4	42+11	4,0	105+29	4,7	86+100	4,1
6.2	40+14	1,0	32+9	2,9	92+48	3,4	98+20	1,9
6.3	126+0	4,1	95+5	2,2	64+23	3,4	87+0	2,2
7.0*	46+14	3,1	107+12	2,8	187+58	3,0	102+100	4,0

G: broj formiranih kolonija mikromiceta; B: broj formiranih kolonija bakterija; *: kontrolna tačka (ogoljen malter); - : zona opasnosti; - : zona opreza; - : čista zona;

Nasuprot vrednostima „Zona čistoće“, zbirne vrednosti CFU cm⁻² za bakterije i gljive su bile u rasponu od 7 do 247 (Tabela 8). Analizom najviših i najnižih vrednosti CFU cm⁻² zabeleženih na kontaktnim slajdovima inkubiranim na 25±2 °C tokom 7 dana nikakve značajnije razlike u broju bakterija i gljiva među sezonama nisu uočene (p < 0,05). Međutim, tokom 4 sezone, na većini tačaka uzorkovanja izolovan je veći broj mikromiceta nego bakterija, što je najverovatnije posledica inkubiranja slajdova na suboptimalnoj temperaturi za rast bakterija. Poređenjem vrednosti „Zona čistoće“ sa vrednostima CFU cm⁻² uzorkovane površine, u brojnim slučajevima se mogla uočiti jasna korelacija. Ipak, često nikakva primetna korelacija nije mogla biti uspostavljena,

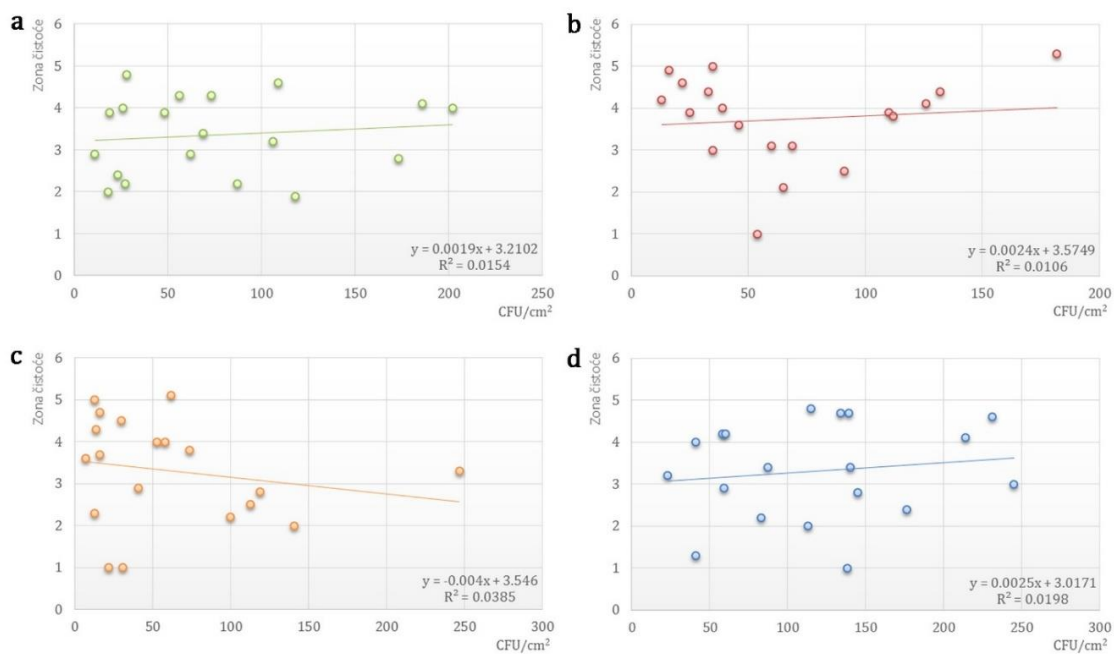
što je naročito očigledno na tačkama na kojima su zabeležene visoke vrednosti „Zona čistoće“, a niske CFU cm⁻² vrednosti i obratno. Ovakvi nalazi su od velikog značaja jer u praksi konzervacije predmeta i kulturnih dobara, slučajevi kada se zabeleže niske CFU cm⁻² vrednosti nasuprot visokim vrednostima „Zona čistoće“ predstavljene kao RLU, smatraju se značajnijim nego kada se zabeleži visoka brojnost mikroorganizama a manje ATP molekula na testiranim površinama (Ranilli i dr., 2003). U prvom slučaju, visoke vrednosti „Zona čistoće“ mogu nastati kao posledica metabolizma manjeg broja veoma aktivnih mikroorganizama, dok u drugom slučaju, površine su verovatno preopterećene dormantnim sporama. To je problem jer sa pojavom povoljnih uslova sredine spore mogu klijati što kao posledicu može imati brz i dalekosežan porast mikroorganizama na površini i unutar bojenog sloja.



Slika 89. Mozaični prikaz raspodele „Zona čistoće“ na zidnim slikama naosa

Statistička analiza je pokazala slabu korelaciju između broja kultivisanih mikroorganizama i vrednosti ATP što se ogleda u veoma malim koeficijentima determinacije (R^2) (0,0106 do 0,0385) (Slika 90). Dobijeni opseg R^2 vrednosti nije u skladu sa velikim brojem istraživanja sprovedenih u različitim sredinama koja pružaju dokaze o postojanju relativno visokog stepena korelacije (70-80%) (Griffiths, 1996;

Chollet i dr., 2012). Međutim, Shama i Malik (2013) navode da su takvi rezultati sasvim sigurno posledica preduzimanja određenih mera, poput tretmana površina biocidima, koje imaju snažan uticaj na brojnost mikroorganizama i izmeren nivo ATP. To posledično i dovodi do produkovanja visokih R^2 vrednosti. Prema ovim autorima, visoke R^2 vrednosti se mogu uzeti kao pouzdane samo onda kada se tačno zna da je usled tretmana biocidom došlo do smanjenja raznovrsnosti i da se trenutna brojnost mikroorganizama može približno tačno utvrditi primenom standardnih kultivacionih metoda. S obzirom na to da na zidnim slikama istraživane crkve nikada nisu sprovedeni bilo kakvi hemijski tretmani, ustanovljena niska korelacija je očekivana. Nesklad u odnosu broja mikroorganizama i ATP je takođe posledica toga što strukture biljnog i životinjskog porekla, deponovane na mernim površinama, sadrže ATP. S druge strane, intracelularni sadržaj ATP kod mikroorganizama generalno predstavlja samo mali udeo ukupne izmerene ATP vrednosti (Lundin, 2000).



Slika 90. Grafikoni rasipanja za odnos vrednosti „Zona čistoće“ i broja kolonija po kontaktnom slajdu (CFU cm⁻²): **a.** proleće ($R^2 = 0,0154$); **b.** leto ($R^2 = 0,0106$); **c.** jesen ($R^2 = 0,0385$); **d.** zima ($R^2 = 0,0198$)

Mada ne pruža preciznu procenu stepena kontaminacije, propagulama mikroorganizama, *in situ* određivanje „Zona čistoće“ je korisno jer ukazuje na postojanje pogodnih uslova za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Samim tim, merenje nivoa ATP, uz pravilno sprovedenu korelacionu analizu, može da se koristi kao dobar pokazatelj uspešnosti tretmana biocidima. Savremene metode bazirane na analizama genske aktivnosti bi pružile sveobuhvatan uvid u trenutno metaboličko stanje mikroorganizama, a ne samo grubu procenu prisustva organskog depozita i mikroorganizama (Sterflinger i Piñar, 2013). Kako autori navode, molekularne analize se koriste samo u naučne svrhe dok se u konzervatorskoj praksi primenjuju retko pre svega zbog visokih cena. U tom pogledu, usled niske cene i veoma jednostavne primene, metoda ATP bioluminiscencije je pogodna kao prvi korak višestepenog procesa proučavanja biodeterioracije zidnih slika za mapiranje žarišta („hotspots“) koje dodatno treba istražiti upotrebom drugih metoda. Imajući u vidu da zidne slike zauzimaju velike površine, a rast mikroorganizama nije uvek očigledan, ova metoda pruža mogućnost da se brzo i precizno mapiraju žarišta. Takođe, određivanje „Zona čistoće“ na zidnim slikama predstavlja metodu izbora za procenu efikasnosti tretmana biocidima.

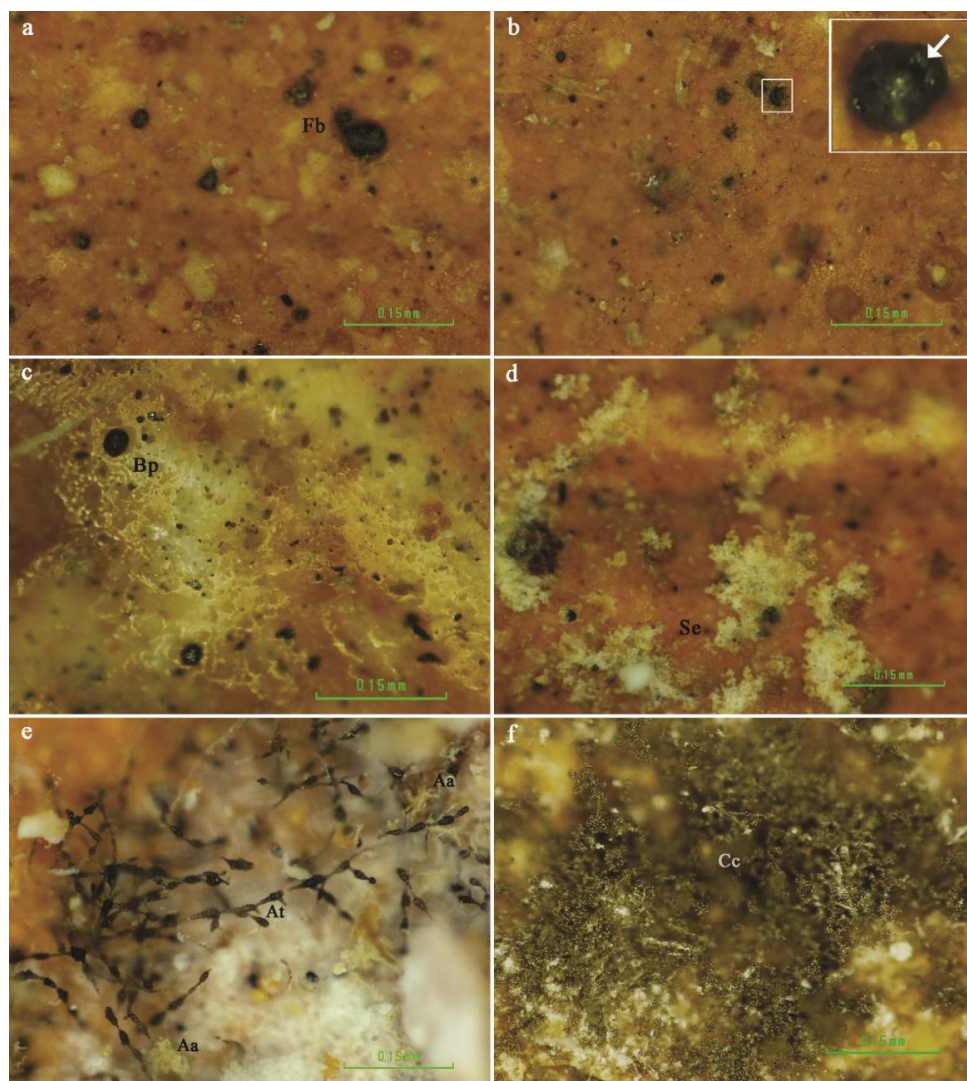
Ova metoda ima i nekoliko nedostataka koji se moraju uzeti u obzir prilikom njenog odabira za monitoring stepena kontaminacije zidnih slika. Prema Fajardo-Cavazos i dr. (2008) enzimi neophodni u procesu konverzije adenzin-5'-monofosfata (AMP) i adenzin-5'-difosfata (ADP) u ATP su prisutni i u nevijabilnim propagulama. Usled toga, pri merenju nivoa ATP može doći do direktnog indukovanja enzimske aktivnosti u sporama i porasta nivoa zabeleženog ATP. Posledica može biti pojavljivanje lažno pozitivnog rezultat. Posebna pažnja se mora posvetiti i odabiru adekvatnog biocida za tretman zidnih slika s obzirom na to da primena neisparljivih agenasa, kao što su jedinjenja na bazi QAC soli, za posledicu ima prisustvo tragova korišćenog biocida na tretiranim površinama. Ostaci biocida na bojenom sloju mogu biti pokupljeni ATP brisevima, što dovodi do nastanka smetnji tokom očitavanja svetlosnog signala. Efekat velikog broja antimikrobnih agenasa proučavan je na četiri

komercijalno dostupna ATP testa (Omidbakhsh i dr., 2014). Svi testirani agensi su imali značajan uticaj na rezultate merenja ATP, uglavnom putem smanjenja ili, u ređem slučaju, povećanja zabeleženog svetlosnog signala. To se objašnjava razgradnjom ili maskiranjem luciferin/luciferaza enzimskog sistema i/ili ATP molekula pod uticajem testiranog agensa. Sa izuzetkom agenasa na bazi fenola (Sporicidin), svi testirani agensi na bazi vodonik peroksida (Accel PREvention RTU, Accel TB, Clorox Hydrogen Peroxide Wipes, Virox 5 RTU), izopropil alkohola (IPA, 70%) i QAC soli (BTC 50, CaviCide, Sani-Cloth plus) su danas u nekom obliku u upotrebi za kontrolu rasta gljiva na zidnim slikama (Sterflinger i Sert 2006; Diaz-Herraiz i dr., 2013). Ovo ukazuje na veoma veliki značaj odabira metode za određivanje stepena kontaminacije kao i biocida određene hemijske prirode. Imajući u vidu da je mali broj konzervatora i restauratora upoznat sa ovom problematikom, ovde naročito dolazi do izražaja neophodnost uključivanja mikrobiologa i hemičara u prve faze konzervacije. Pored toga, da bi se metoda uspešno i rutinski koristila u integrisanom sistemu konzervacije zidnih slika, odgovarajući standardi o maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji organskih kontaminanata na površini bojenog sloja moraju da budi formulisani. Od prve primene 1947. godine, sa napretkom reagensne hemije i elektronike, omogućena je portabilnost testova i velika jednostavnost primene metode ATP bioluminiscencije. Međutim, određivanje stepena kontaminacije površina ovom metodom je često samo u monitoringu kvaliteta proizvoda prehrambene i farmaceutske industrije (Engelmann i Rogers, 1995; Chollet i dr., 2012). S druge strane, brza *in situ* procena stepena kontaminacije predmeta i kulturnih dobara je sprovedena samo sporadično i to na kamenim građevinama i spomenicima (Tiano i dr., 1989; Oriol i dr., 2009; Sirt, 2011), papirnim (Rakotonirainy i Arnold, 2008; Rakotonirainy i Dubar, 2013) i tekstilnim artefaktima (Ljaljević Grbić i dr., 2014). Što se tiče primene ove metode u konzervaciji zidnih slika, korišćena je samo kao sredstvo za *in situ* praćenje vijabilnosti i aktivnosti *Pseudomonas stutzeri*, u procesu uklanjanja azotnih jedinjenja sa površine zidnih slika crkve Santos Juanes (Španija) (Roig i dr., 2013).

5.11. Fungalna kolonizacija i deterioracija modela zidne slike u eksperimentalnim uslovima

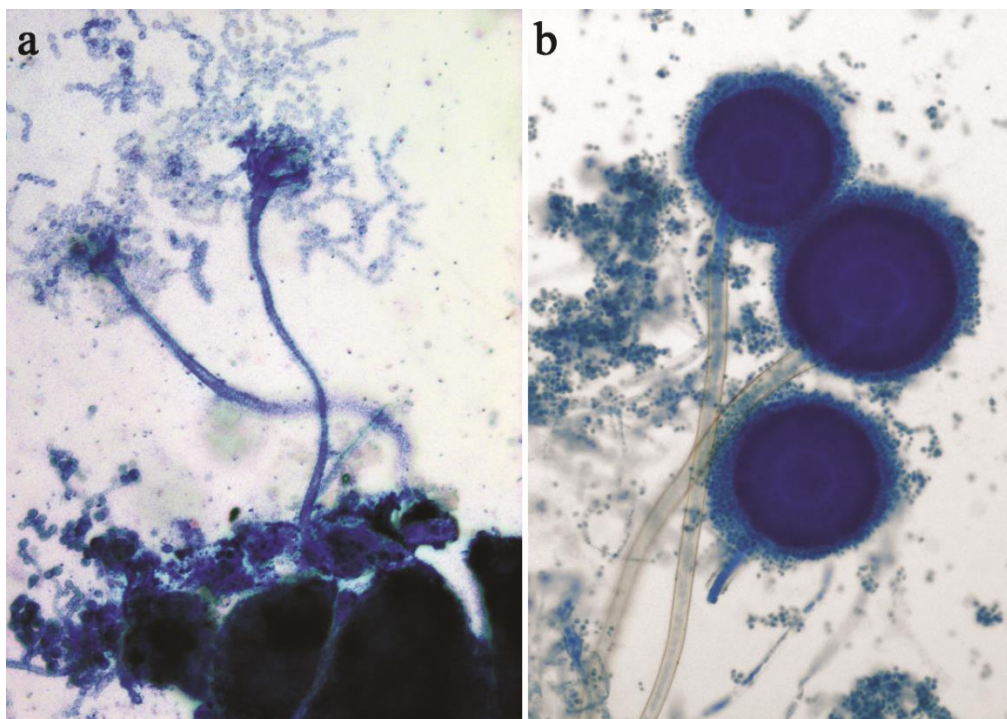
Monitoring indukovane i spontane kolonizacije površine bojenog sloja zidnih slika, u kontrolisanim eksperimentalnim uslovima, sprovedeno je na modelu zidne slike pripremljenom prema recepturama opisanim u starim slikarskim priručnicima (Medić, 2002). U eksperimentu su primenjena četiri tipa veziva (belance, linokopija, murdent i tutkalo) pri homogenizaciji pigmenta Zlatni oker. Nakon inkubacionog perioda vidljiv porast plesni nije zabeležen ni u jednoj deonici. Opservacijom mikroskopom ShuttlePix P-400R na deonicima sa vezivima životinjskog porekla, belancetom i tutkalom, konstatovane su dve promene: obilno rasoljavanje i brojne sitne perforacije, 10-100 μm u prečniku, često sa manjim, čvrstim, tamnim i konusim plodonosnim telima u unutrašnjosti (Slika 91a-d). Plodonosna tela, veličine od 10 do 75 μm u prečniku, na osnovu morfologije identifikovana su kao peritecije lihenizovanih gljive, veoma slične predstavnicima roda *Verrucaria*. Dodatno, mikroskopskim analizama je utvrđeno da su plodonosna tela sterilna, sa formiranom peridijom ali bez himenije sa askusima i askosporama. Činjenica da su vrste ovog roda poznati kolonizatori kamenih supstrata i da se u početnim fazama formiranja talusa odlikuju obrazovanjem velikog broja sitnih i sterilnih plodonosnih tela tipa peritecije potvrđuje identifikaciju (Nascimbene i dr., 2009). Poznato je da lihenizovane gljive mogu mehanički da penetritaju u supstrat, kao i da proizvode organske kiseline koje razlažu krečnjački supstrat, što objašnjava prisustvo velikog broja perforacija u kojima su ova tela smeštena. Sporadično su zabeleženi i sferoidni klasteri ćelija, veličine u opsegu od 15 do 20 μm , koji po morfologiji odgovaraju grozdastim strukturama MCF. Za ove gljive je poznato da naseljavaju površine zidnih slika u katakombama i da se mogu često naći blisko udružene sa talusom i propagulama lihenizovanih gljiva (Zalar i dr., 1999; Saarela i dr., 2004). Mehanička i biohemijska aktivnost MCF navode se kao glavni uzrok nastanka fenomena „biopitting“ (Sterflinger i Piñar, 2013). Polazeći od nastalih simptoma deterioracije i identifikovanih

Verrucaria sp. i MCF konstatovano je da su ovi organizmi uzročnici biodeterioracije bojenog sloja formulisanog modela zidne slike, a posebno fenomena „biopitting“.



Slika 91. Fungalna kolonizacija i deterioracija modela zidne slike u eksperimentalnim uslovima (**a-d** veziva životinjskog porekla, **e-f** veziva biljnog porekla): **a-b.** plodonosna tela (Fb) *Verrucaria* sp. na površini bojenog sloja, strelica pokazuje na terminalni ostiolum; **c.** perforacije (Bp) formirane u neposrednoj blizini plodonosnih tela; **d.** rasoljavanje (Se); **e.** granati lanci diktiospora *Alternaria tenuissima* (At) sa okolnim porastom *Aspergillus pallidofulvus* (Aa); **f.** porast *Cladosporium cladosporioides* (Cc)

U dve deonice, gde je tokom pripreme pigment Zlatni oker vezan biljnim vezivima murdentom i linokopijom tokom prvih 6 meseci inkubacionog perioda uočena su samo plodonosna tela *Verrucaria* sp. Prebacivanjem modela u uslove vlažne komore porast gljiva sa pratećim simptomima biodeterioracije postao je vidljiv nakon 7 dana. Direktnom mikroskopijom površine bojenog sloja uočeno je da su mnogobrojni regioni analiziranih deonica obrasli mikromicetama, da je porast poreklom od inokulisane suspenzije konidija (*Cladosporium cladosporioides*) ali i posledica prirodnog toka kolonizacije (*Alternaria tenuissima* i *Aspergillus pallidofulvus*) (Slika 91e-f). Rast *C. cladosporioides* se manifestovao u formi gustog sloja micelije sa brojnim reproduktivnim strukturama, dok je *A. tenuissima* obrazovala granate lance melanizovanih diktijspora. *A. pallidofulvus* je pokazivao specifičan rast u vidu pojedinačnih, aberantnih formi koje se direktno uzdižu sa površine bojenog sloja, bez formiranja tipičnog porasta plesni. Izolat *A. pallidofulvus* dobijen inokulacijom aberantnih struktura sa modela zidne slike na MEA pokazivao je tipične osobine karakteristične za vrstu. Mikroskopskom analizom utvrđene su razlike između aberantnih i tipičnih formi. Aberanta forma se karakteriše nepotpuno formiranim glavicama, deformisanim vazikulama sa kolabiranim fialidama i masom produkovanih spora (Slika 92). Imajući u vidu veoma velike razlike u izgledu konidiogenog aparata *in situ* i u kulturi, u cilju potvrde identifikacije urađeno je sekvenciranje ITS i β -tubulin genskih regiona, čime je i potvrđeno da je glavni kolonizator bojenog sloja modela zidne slike *Aspergillus pallidofulvus* TN-43 [KX610755] / CCF 1893 [FR775365] (99,6/99,4%).



Slika 92. *Aspergillus pallidofulvus*: **a.** aberantne reproduktivne strukture na površini bojenog sloja modela zidne slike; **b.** tipične reproduktivne strukture u kulturi (7. dan, MEA)

Na mestima indukovane i spontane kolonizacije konstatovani su simptomi deterioracije u vidu pucanje i ljušpanja bojenog sloja i malterne podloge. Ove promene posledica su novonastale krtosti bojenog sloja usled strukturnih promena izazvanih dejstvom identifikovanih organizama. Uzorci adhezivne trake, uzeti nakon inkubacionog perioda, pokazuju prisustvo velikog broja neklijalih spora, poreklom iz inokuluma ili deponovanih iz vazduha.

Do danas je konstruisano nekoliko *in vitro* modela namenjenih za proučavanje složenog procesa fungalne deterioracije predmeta i kulturnih dobara. Na taj način, omogućeno je da se u strogo kontrolisanim eksperimentalnim uslovima i bez opasnosti po oštećenje originalnih umetničkih dela prati tok kolonizacije supstrata mikromicetama, sukcesija mikrobiote, ali i omogući jasno razdvajanje vrsta sa

potencijalom deterioracije specifičnih supstrata i gljiva prisutnih u zajednici ali koje ne doprinose nastanku strukturnih promena (Seves i dr., 1996). Pored toga, omogućeno je i detaljno proučavanje mehanizama biodeterioracije umetničkih predmeta, kao i utvrđivanje potencijalnih interakcija neorganskih i organskih komponenti umetničkih dela sa biocidima korišćenim u konzervatorsko-restauratorskim tretmanima. Međutim, uprkos veoma velikom značaju ovakvih istraživanja, krajem prošlog i početkom ovog veka, svega nekoliko modela je formulisano i to primarno da imitiraju uljane slike na platnu (Wazny i Rudniewski 1972; O'Neill, 1988; Seves i dr., 1999; Chen i Xie, 2002; Paner, 2012; López-Miras del Mar i dr., 2013) i tekstilne artefakte (Seves i dr., 2000). Prikazani rezultati predstavljaju pionirsko istraživanje kolonizacije i biodeterioracije na *in vitro* modelu zidne slike koji će implementirani u sistem konzervacije pružiti pomoć pri odabiru odgovarajućeg veziva i umanjiti intenzitet rekolonizacije zidnih slika nakon tretmana.

5.12. Potencijal deterioracije odabranih mikromiceta *in vitro*

Istraživanja potencijala deterioracije mikromiceta predstavljaju nadogradnju na osnovna istraživanja diverziteta mikrobiote zidnih slika i vazduha istraživane crkve. Na ovaj način može se utvrditi koji deo ukupne mikrobiote aktivno utiče u procesima biodeterioracije. Odabrani originalni izolati (Tabela 9) (33 vrste iz 14 rodova) su gajeni na setu podloga (MCZA, MCZB, B4, CN i CaCO₃ glukozni agar) za testiranje sposobnosti produkcije štetnih metabolita (kiseline i baze, i pigmenti) i razlaganja neorganskih (kalcijum karbonat) i organskih (kazein) komponenti zidnih slika.

Tabela 9. Izolati mikromiceta korišćeni u eksperimentima

Test izolati	AB	AE	AF	SM	VP	TK	RK	RP	SP	SK
<i>Alternaria alternata</i> BEOFB 211m						+	+	+	+	+
<i>Alternaria alternata</i> BEOFB 212m						+	+	+	+	+
<i>Alternaria infectoria</i> BEOFB 221m						+	+	+	+	+

- REZULTATI I DISKUSIJA -

<i>Aspergillus aureolatus</i> BEOFB 361m					+	+	+	+	+
<i>Aspergillus creber</i> BEOFB 371m					+	+	+	+	+
<i>Aspergillus europaeus</i> BEOFB 381m	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavipes</i> BEOFB 391m	+				+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i> BEOFB 313m	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> BEOFB 321m	+								
<i>Aspergillus nidulans</i> BEOFB 331m	+				+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i> BEOFB 343m	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i> BEOFB 3101m	+				+	+	+	+	+
<i>Aspergillus ostianus</i> BEOFB 351m					+	+	+	+	+
<i>Aspergillus pallidofulvus</i> BEOFB 3111m					+	+	+	+	+
<i>Aspergillus parasiticus</i> BEOFB 3121m				+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus terreus</i> BEOFB 351m	+								
<i>Aspergillus versicolor</i> BEOFB 3131m					+	+	+	+	+
<i>Bionectria byssicola</i> BEOFB 401m					+	+	+	+	+
<i>Bjerkandera adusta</i> BEOFB 1601					+	+	+	+	+
<i>Chaetomium ancistrocladum</i> BEOFB 711m					+	+	+	+	+
<i>Chaetomium murorum</i> BEOFB 721m					+	+	+	+	+
<i>Chaetomium murorum</i> BEOFB 722m					+	+	+	+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> BEOFB 1821m		+		+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium oxysporum</i> BEOFB 1831m				+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium uredinicola</i> BEOFB 1841m		+		+	+	+	+	+	+
<i>Curvularia australiensis</i> BEOFB 2501m				+					
<i>Epicoccum nigrum</i> BEOFB 1701m					+	+	+	+	+
<i>Epicoccum nigrum</i> BEOFB 1702m					+	+	+	+	+

- REZULTATI I DISKUSIJA -

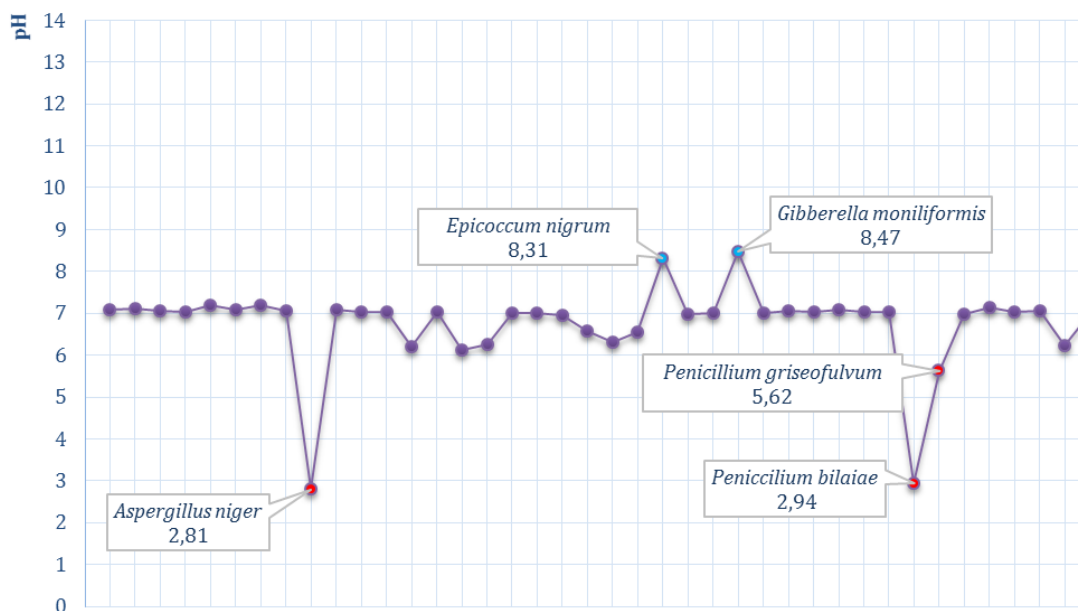
<i>Gibberella moniliformis</i> BEOFB 2501m				+	+	+	+	+
<i>Penicillium bilaiae</i> BEOFB 1131m	+		+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium commune</i> BEOFB 1141m				+	+	+	+	+
<i>Penicillium griseofulvum</i> BEOFB 1151m				+	+	+	+	+
<i>Penicillium lanosum</i> BEOFB 1161m				+	+	+	+	+
<i>Penicillium lanosum</i> BEOFB 1162m	+	+						
<i>Penicillium manginii</i> BEOFB 1171m	+			+	+	+	+	+
<i>Penicillium rubens</i> BEOFB 1181m				+	+	+	+	+
<i>Phaeosphaeria avenaria</i> BEOFB 2001m				+	+	+	+	+
<i>Phoma medicaginis</i> BEOFB 2101m				+	+	+	+	+
<i>Phoma medicaginis</i> BEOFB 2102m				+	+	+	+	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> BEOFB 2201m				+	+	+	+	+
<i>Seimatosporium lichenicola</i> BEOFB 2301m				+	+	+	+	+
<i>Thanatephorus cucumeris</i> BEOFB 2401m				+	+	+	+	+

AB: test antifungalne aktivnosti sintetičkih biocida; AE: test antifungalne aktivnosti etarskih ulja; AF: test antifungalne aktivnosti dima tamjana; SM: test sinteze mikotoksina; VP: test na modelu zidne slike; TK: test biogeneze mikogenih minerala; RK: test rastvaranja krečnjaka; RP: test razgradnje kazeina; SP: test sinteze fungalnih pigmenata; SK: test produkcije kiselih i baznih metabolita.

5.12.1. Produkcija kiselih i baznih metabolita

Sposobnost izolovanih mikromiceta da uzrokuju oštećenja zidnih slika produkcijom kiselih i/ili baznih metabolita testirana je njihovom kultivacijom u tečnoj podlozi MCZB. Nakon trodnevnog inkubacionog perioda, određivana je pH vrednost MCZB. Od ukupno 38 izolata gljiva, 7 su uzrokovali umerenu promenu pH vrednosti (6,11-6,58), dok je u kulturama 5 izolata detektovana značajna promena pH (2,81-5,62; odnosno 8,31-8,47) (Slika 93). Najniže izmerene pH vrednosti su bile u kulturama *Aspergillus niger* (2,81) i *Penicillium bilaiae* (2,94), praćene vrstom *P.*

griseofulvum (5,62). Samo 2 od 38 izolata, *Gibberella moniliformis* i *Epicoccum nigrum*, su rastom i metabolizmom prouzrokovale povećanje baznosti medijuma, gde su izmerene pH vrednosti bile od 8,31 do 8,47. Kod preostala 26 izolata zabeležene su veoma male promene koncentracije vodonikovih jona u podlozi, u rasponu od 6,95 do 7,19.



Slika 93. Produkcija kiselih i baznih metabolita u tečnim kulturama (3. dan, MCZB)

Za mnogobrojne vrste gljiva je dobro poznato da metabolisanjem organskih i neorganskih komponenti supstrata produkuju organske kiseline kao međuprodukte oksidativnog metabolizam, u spoljašnju sredinu. Međutim, do sinteze kiselina dolazi samo ukoliko je supstrat bogat šećerima. Usled intenzivnog rasta produkuje se višak organskih kiselina koji se sekretuju u supstrat u formi sekundarnih metabolita (Florian, 2002). Rast u uslovima nedostatka izvora ugljenika i azota, kakvi su vladali u kulturama tokom testiranja *in vitro*, pokazao je da veoma mali broj izolata, jedan iz roda *Aspergillus* i dva iz roda *Penicillium*, produkuju organske kiseline i dovode do značajnog zakišeljavanja sredine. Ovo se danas smatra glavnim uzrokom nastanka

oštećenja kulturnih dobara. Za veliki broj vrsta ova dva roda je dokazano da su značajni producenti kiselina, tu se posebno ističe *A. niger* kao jedan od najjačih producenata oksalne, glukonske i limunske kiseline (De la Torre i dr., 1991; Schrickx i dr., 1995; Znad i dr., 2004). Snažan producent oksalne i limunske kiseline je i *P. bilaiae*, dok se za *P. griseofulvum* zna da produkuje dve kiseline: gentizinsku i šikiminsku (Simonart i Wiaux, 1960; Cunningham i Kuiack, 1992). Mnogi od testiranih izolata nisu doveli do promene pH medijuma, uprkos tome što literaturni podaci govore u prilog tome da su producenti kiselina. Od 38 izolata poreklom sa zidnih slika i iz vazduha istraživane crkve, veliki broj je već testiran u drugim, sličnim istraživanjima na predmetima i kulturnim dobrima gde je pokazano je da su mnoge vrste iz rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* potentni producenti kiselina (De la Torre i dr., 1991, 1993; De la Torre i Gómez, 1994; Petersen i Hammer, 1992; Petersen i dr., 1995; Borrego i dr., 2010; Rojas i dr., 2012). S obzirom na to da su sva navedena istraživanja rađena sa podlogama bogatim glukozom, dostupnost izvora ugljenika predstavlja veoma bitan faktor u procesu sinteze kiselina. Takođe neki od izolata već poznati kao producenti kiselina, su u našem eksperimentu snižavali pH vrednost (6,11 do 6,58), ali se na osnovu tako umerene promene pH ne može sa sigurnošću zaključiti da je došlo do produkcije kiselina bez analize tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom. S druge strane u kulturama *E. nigrum* i *G. moniliformis* je došlo do porasta pH vrednosti tečne podloge, što je zabeleženo i u kulturama *F. proliferatum* i *P. crustosum* poreklom sa antičke stele i gajenim u istim uslovima (Savković i dr., 2016).

Produkcija organskih i neorganskih kiselina u supstrat jedan je od primarnih mehanizama putem kojeg su mikromicete uključene u procese deterioracije predmeta i kulturnih dobara (Dakal i Cameotra, 2012). Gljive uglavnom produkuju organske kiseline, tokom Krebsovog ciklusa, ali su u mogućnosti da sintetišu i luče jače, neorganske kiseline. Najčešće organske kiseline sintetisane od strane gljiva su: limunska, oksalna, sukcinatna, glutaminska, glukonska, sirćetna, fumarna, jabučna, mravlja, glioksilna i tartarna (Sterflinger, 2000; Hanson, 2008). Mada tip produkovane

kiseline pokazuje inter- i intraspecijsku varijabilnost, u velikoj meri zavisi i od dostupnog izvora ugljenika, a neretko je produkcija kiselina indukovana prisustvom jona metala u pigmentima bojenog sloja zidnih slika (Sayer i Gadd, 2001). Razorno dejstvo kiselina na zidne slike, ogleda se u rastvaranju katjona i heliranju jona metala prisutnih u podlozi i pigmentima. Usled toga, formiraju se stabilni kompleksi sa metalnim katjonima, a kristalizacija nastalih soli u bojenom sloju i podlozi dovodi do porasta unutrašnjeg pritiska što za posledicu ima pucanje i ljuštanje boje i gubitak fragmenata bojenog sloja i podloge (Wiktor i dr., 2007; Piñar i dr., 2009). Pored toga, kiseline dovode i do snižavanja pH vrednosti supstrata čime se stimuliše rast većine gljiva i ubrzava proces hemijske disimilacione biodeterioracije kroz oksidaciju, redukciju i transformaciju jona metala iz pigmenata (Urzi i Realini, 1998; Gorbushina i dr., 2004; Wiktor i dr., 2007). Predstavljeni mehanizam oštećenja zidnih slika nije jedinstven samo za gljive već može nastati i usled rasta drugih mikroorganizama, mada se mikromicete zbog izražene sposobnosti produkcije kiselina smatraju glavnim uzročnicima oštećenja mineralnih supstrata (Warscheid i Braams, 2000).

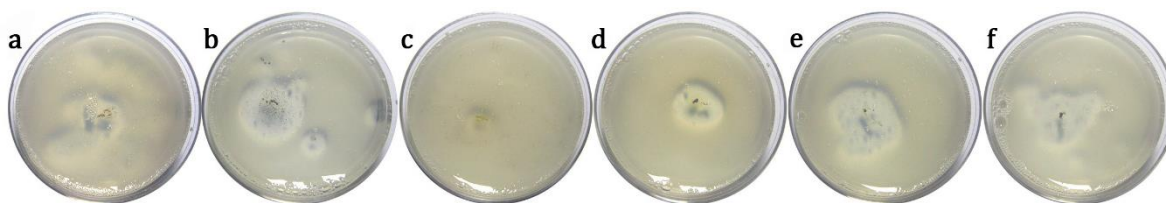
U kulturama *E. nigrum* i *G. moniliformis* dokumentovano je povećavanje pH vrednosti tečne podloge kao posledica produkcije baznih metabolita. Ovakvi slučajevi do sada nisu zabeleženi u sličnim testovima, uglavnom se kod izolata roda *Fusarium* uočava sniženje pH vrednosti kroz produkciju oksalne, fumarne i sukcinatne kiseline (De la Torre i dr., 1991). Mada se kiseline navode kao razorni metaboliti, poznato je da u baznoj sredini razgradnja azotnih kompleksa i soli natrijuma može indukovati nastanak simptoma biodeterioracije (Berthelin, 1983).

5.12.2. Sposobnost rastvaranja krečnog maltera

Sposobnost gljiva da rastvaraju kalcijum karbonat testirana je gajenjem izolata na CaCO_3 glukoznom agaru. Tokom inkubacionog perioda od 21 dan posmatrana je pojava transparentne zone oko formiranih kolonija, nastale kao posledica rastvaranja CaCO_3 u sastavu podloge. Od ukupno 38 testiranih izolata gljiva, rastvaranje CaCO_3 je

zabeleženo u kulturama 6 vrsta (15,81%): 3 poreklom sa zidnih slika (*Penicillium lanosum*, *Aspergillus niger* i *A. europaeus*) i 3 iz vazduha istraživane crkve (*P. bilaiae*, *P. rubens* i *P. commune*) (Slika 94). Među *Aspergillus* vrstama, samo 16,67% izolata je imalo transparentnu zonu u kulturi, nasuprot rodu *Penicillium*, gde je sposobnost rastvaranja kalcijum karbonata zabeležena kod većine izolata (4/6; 66,66%). Transparentna zona je uočena već trećeg dana inkubacije.

Rast izolata se karakterisao oskudnom supstratnom micelijom, a jedino se kod *A. niger* pojavila i konidijacija slabog intenziteta (Slika 94b). Na osnovu prečnika transparentne zone, *A. europaeus* i *P. bilaiae* su demonstrirali najmanju sposobnost rastvaranja kalcijum karbonata (Slika 94c, d).



Slika 94. Rastvaranje kalcijum karbonata u kulturama (21. dan, CaCO₃ glukozni agar):
a. *Penicillium lanosum*; **b.** *Aspergillus niger*; **c.** *A. europaeus*; **d.** *P. bilaiae*; **e.** *P. rubens*; **f.** *P. commune*

Rastvaranje krečnjaka i krečnog maltera, indukovano mikromiceta, je dobro poznat ali slabo proučen fenomen, naročito u kontekstu oštećenja krečnjačkog supstrata spomenika kulture (Sterflinger, 2000). Rastvaranje krečnjaka i posledično taloženje sekundarnih karbonata, indukovano mikroorganizmima, je glavni uzrok nastanka strukturnih promena u krečnjačkom supstratu (Albertano i Urzi, 1999). Kultivacijom mikromiceta izolovanih sa kamenih spomenika, umetničkih dela, zidnih slika i iz vazduha, na CaCO₃ glukoznom agaru je pokazano da mnogobrojne vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* rastvaraju kalcijum karbonat (Pangallo i dr., 2009; 2012). Eksperimentalni dokaz rastvaranja kalcijum karbonata dodatog u MEA, od strane *A. niger*, su pružili i Sayer i dr. (1997). Najveća sposobnost rastvaranja kalcijum

karbonata u prisustvu *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta, u našem istraživanju, podudara se sa navedenim literaturnim podacima. Međutim, postoje i primeri koji govore o odsustvu sposobnosti rastvaranja karbonata navedenih vrsta. Primenom CaCO_3 glukoznog agara Albertano i Urzi (1999) su testirali gljive izolovane iz katakombi Svetog Kalista i Priscile (Italija) i pokazali da od velikog broja izolata samo *Doratomyces* sp. i *Paecilomyces* sp. imaju sposobnost rastvaranja kalcijum karbonata, dok izolati rodova *Aspergillus* i *Penicillium* nisu imali tu sposobnosti. Mogućnost rastvaranja kalcijum karbonata izolatima gljiva poreklom sa Majanskih spomenika Čičen Ice (Meksiko) gajenjem na CMEA i CR2A-A podlogama pokazano je da čak 59% izolata ima tu sposobnost (Ortega-Morales i dr., 2016). U poređenju sa našim istraživanjima ovako visok procenat zastupljenosti izolata sa velikom sposobnošću rastvaranja kalcijum karbonata je posledica primene CMEA i CR2A-A medijuma koji se po sastavu veoma razlikuju od CaCO_3 glukoznog agara. Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da rastvaranje CaCO_3 u kulturi zavisi od osobina testiranog soja, sastava podloge i uslova kultivacije.

Mehanizam rastvaranja krečnjaka i krečnjačkih supstrata kulturnih dobara se, po većini autora, bazira na sintezi i lučenju organskih kiselina (Sterflinger, 2010). Mikromicete, kolonizatori kamenih spomenika, koriste organske produkte fototrofnih mikroorganizama za sintezu organskih kiselina koje rastvaraju CaCO_3 iz supstrata (Albertano i Urzi, 1999). U većini slučajeva, gljive proizvode jaku oksalnu kiselinu ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) (Ortega-Morales i dr., 2016). Organske kiseline se sintetisu tokom primarnog metabolizma gljiva, pa se pojava transparentne zone rastvaranja kalcijum karbonata može detektovati već tokom prve nedelje inkubacionog perioda (Pangallo i dr., 2009, 2012; Ortega-Morales i dr., 2016). Konstatacija transparentne zone trećeg dana inkubacionog perioda kod svih testiranih izolata je u skladu sa navedenim podacima. Pored sinteze organskih kiselina, drugi mogući mehanizmi rastvaranja krečnjaka podrazumevaju dejstvo liganada i oksido-redukcione procese redoks-osetljivih elemenata (Jones i Pemberton, 1987). Pored toga, enzim karbonska anhidraza (karbonatna dehidrataza) ubrzava hemijsku reakciju:



čime se ubrzava rastvaranje krečnjake putem ubrzanja hidratacije CO₂ oslobođenog u toku respiratornog metabolizma mikromiceta (Sterflinger, 2000). Ako se ima u vidu da je samo u kulturama *A. niger* i *P. bilaiae* zabeležena produkcija kiselina, može se pretpostaviti da rastvaranje kalcijum karbonata kod preostalih izolata nije izazvano dejstvom produkovanih kiselina već preko nekog drugog navedenog mehanizama.

5.12.3. Sposobnost formiranja sekundarnih mikogenih minerala

Skrining sposobnosti 38 testiranih izolata da indukuju formiranje sekundarnih mikogenih minerala sproveden je gajenjem gljiva na agarizovanoj B4 podlozi uz analize nastalih mineralnih faza primenom mikroskopskih (svetlosna i SEM-EDX mikroskopija) i analitičkih (XRPD) metoda. Od svih testiranih izolata, 31 su formirali minerale na B4 podlozi tokom kultivacionog perioda od 21 dan, što predstavlja 81,59% analiziranih izolata (Tabela 10).

Tabela 10. Formiranje kalcita i vedelita u kulturama gljiva na agarizovanoj B4 podlozi

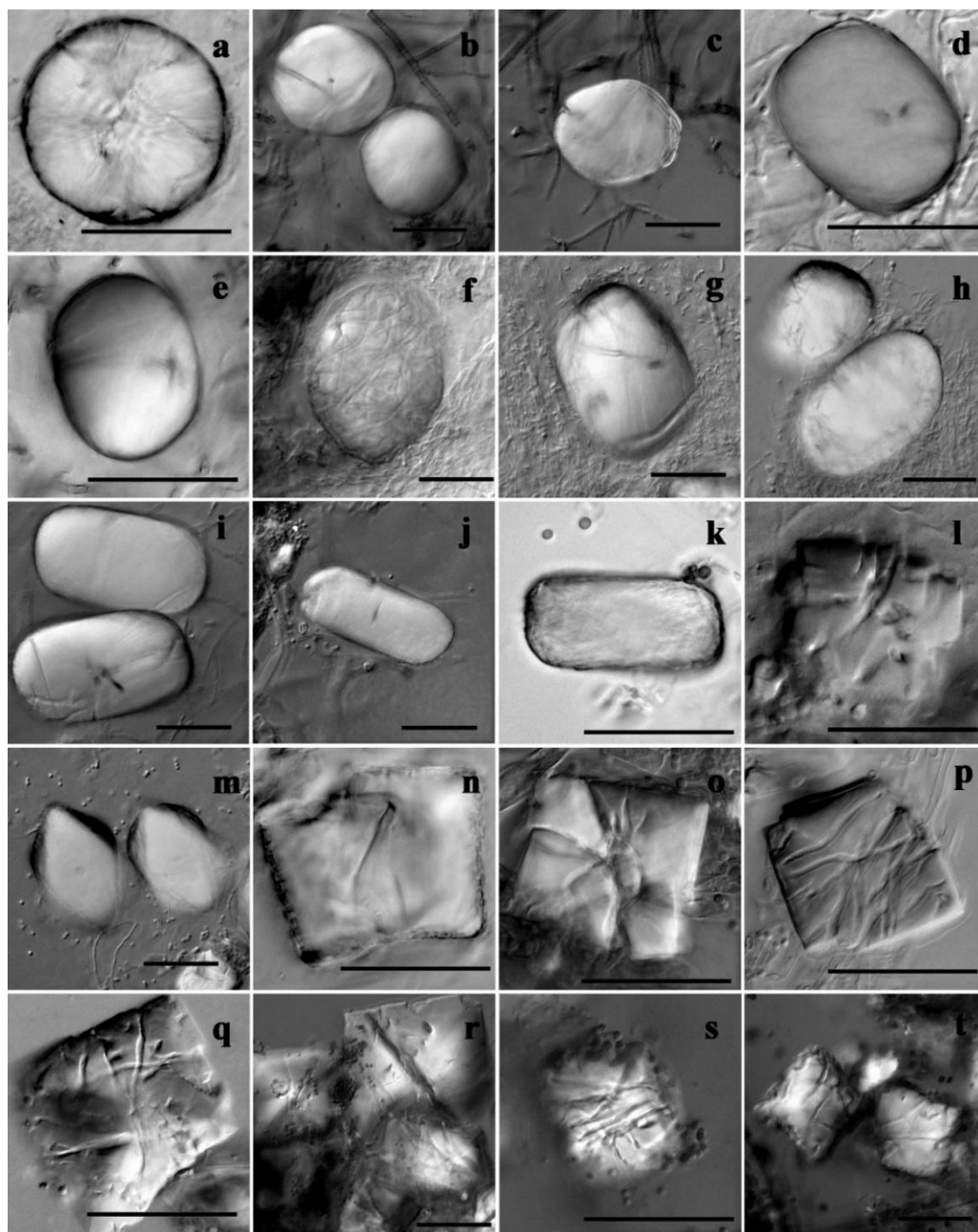
Br. izolata	Testirani izolati	Poreklo	Mineralna faza
1	<i>Alternaria alternata</i> BEOFB 211m	zidna slika	-
2	<i>Alternaria alternata</i> BEOFB 212m	vazduh	+
3	<i>Alternaria infectoria</i> BEOFB 221m	vazduh	+
4	<i>Aspergillus aureolatus</i> BEOFB 361m	zidna slika	Cc
5	<i>Aspergillus creber</i> BEOFB 371m	zidna slika	-
6	<i>Aspergillus europaeus</i> BEOFB 381m	zidna slika	+
7	<i>Aspergillus flavipes</i> BEOFB 391m	zidna slika	+
8	<i>Aspergillus flavus</i> BEOFB 313m	zidna slika	Cc, Wd
9	<i>Aspergillus niger</i> BEOFB 343m	zidna slika	+
10	<i>Aspergillus oryzae</i> BEOFB 3101m	zidna slika	-
11	<i>Aspergillus ostianus</i> BEOFB 351m	zidna slika	Cc, Wd
12	<i>Aspergillus pallidofulvus</i> BEOFB 3111m	zidna slika	Cc

- REZULTATI I DISKUSIJA -

13	<i>Aspergillus parasiticus</i> BEOFB 3121m	zidna slika	Cc, Wd
14	<i>Aspergillus versicolor</i> BEOFB 3131m	vazduh	-
15	<i>Bionectria byssicola</i> BEOFB 401m	vazduh	-
16	<i>Bjerkandera adusta</i> BEOFB 1601	vazduh	-
17	<i>Chaetomium ancistrocladum</i> BEOFB 711m	zidna slika	+
18	<i>Chaetomium murorum</i> BEOFB 721m	zidna slika	+
19	<i>Chaetomium murorum</i> BEOFB 722m	zidna slika	Cc
20	<i>Cladosporium cladosporioides</i> BEOFB 1821m	zidna slika	+
21	<i>Cladosporium oxysporum</i> BEOFB 1831m	vazduh	Cc, Wd
22	<i>Cladosporium uredinicola</i> BEOFB 1841m	zidna slika	Cc
23	<i>Epicoccum nigrum</i> BEOFB 1701m	zidna slika	Cc, Wd
24	<i>Epicoccum nigrum</i> BEOFB 1702m	vazduh	Cc
25	<i>Gibberella moniliformis</i> BEOFB 2501m	vazduh	Cc
26	<i>Penicillium bilaiae</i> BEOFB 1131m	vazduh	Cc, Wd
27	<i>Penicillium commune</i> BEOFB 1141m	vazduh	Cc, Wd
28	<i>Penicillium griseofulvum</i> BEOFB 1151m	zidna slika	+
29	<i>Penicillium lanosum</i> BEOFB 1161m	vazduh	Cc, Wd
30	<i>Penicillium lanosum</i> BEOFB 1162m	zidna slika	+
31	<i>Penicillium manginii</i> BEOFB 1171m	vazduh	Cc, Wd
32	<i>Penicillium rubens</i> BEOFB 1181m	vazduh	+
33	<i>Phaeosphaeria avenaria</i> BEOFB 2001m	vazduh	Cc
34	<i>Phoma medicaginis</i> BEOFB 2101m	zidna slika	+
35	<i>Phoma medicaginis</i> BEOFB 2102m	zidna slika	Cc
36	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> BEOFB 2201m	vazduh	Cc, Wd
37	<i>Seimatosporium lichenicola</i> BEOFB 2301m	zidna slika	-
38	<i>Thanatephorus cucumeris</i> BEOFB 2401m	zidna slika	+

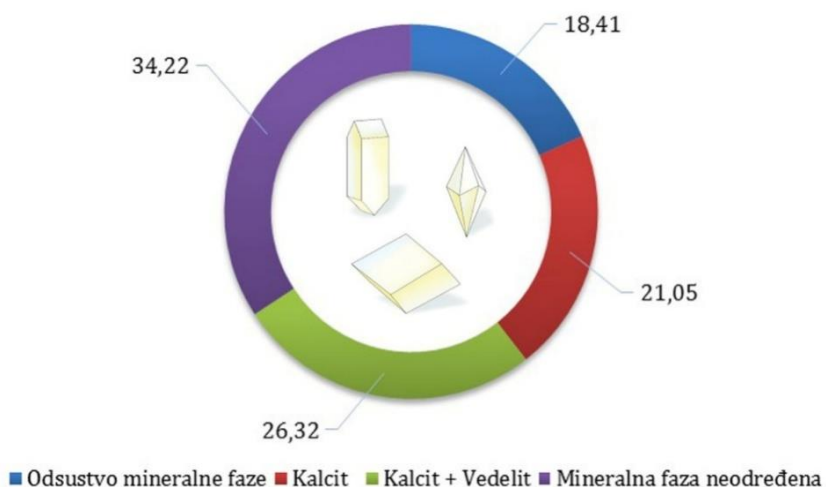
Cc: kalcit; Wd: vedelit; +: mineralna faza neodređena; -: odsustvo mineralne faze;

Od testiranih mikromiceta, svi izolati rodova *Penicillium* (7), *Chaetomium* (3) i *Cladosporium* (3), kao i većina *Aspergillus* izolata (8 od 11), su formirali minerale. U kulturama izolata rodova *Bionectria*, *Bjerkandera* i *Seimatosporium* nikakve kristalne forme nisu detektovane. Do formiranja mineralnih faza je došlo tokom prvih sedam dana inkubacionog perioda. Posmatrane svetlosnim mikroskopom, kristalne forme su bile veoma različitog oblika i veličine (Slika 95).



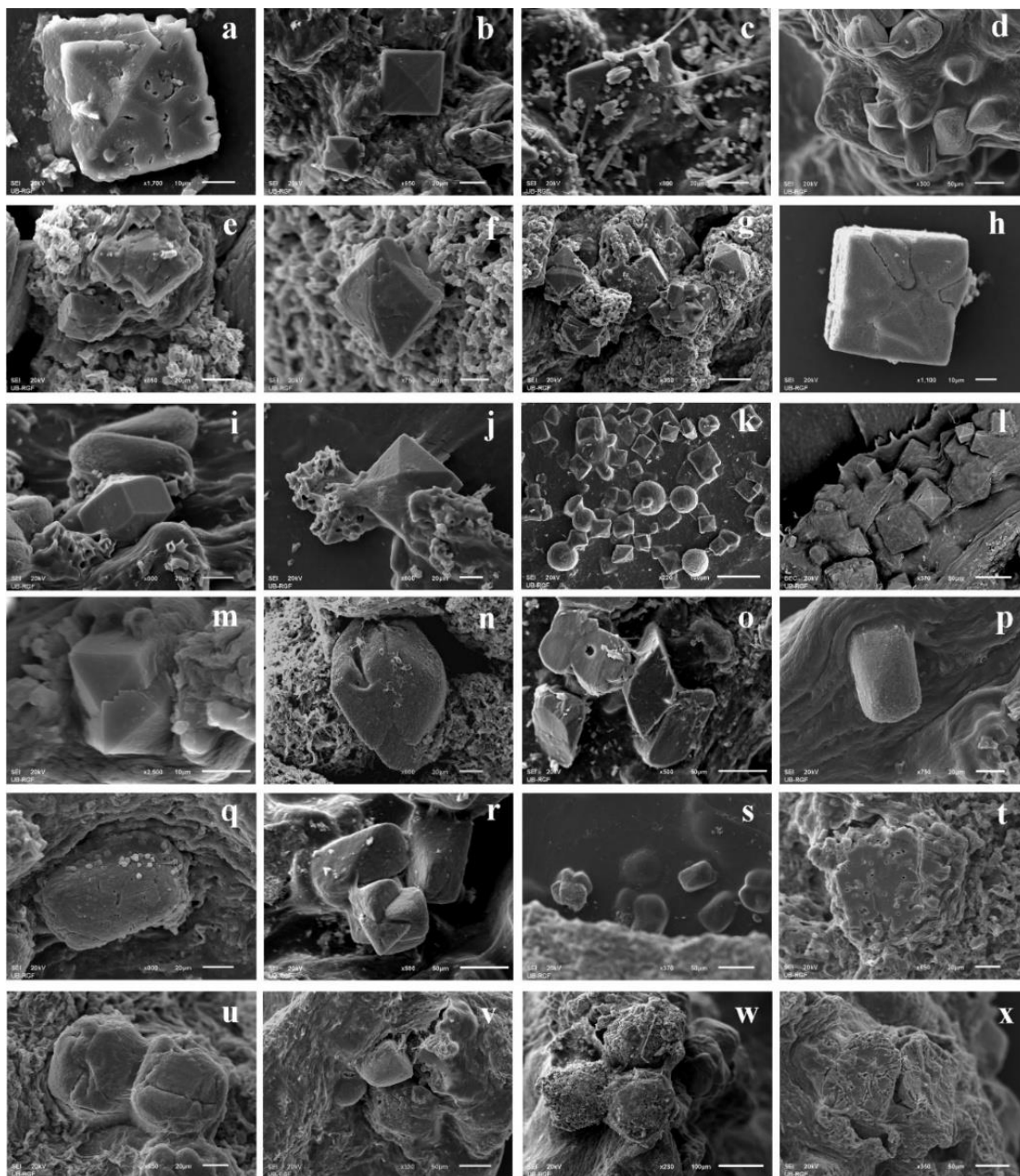
Slika 95. Morfologija kristala (B4, svetlosna mikroskopija): **a.** *Chaetomium murorum*; **b.** *Cladosporium cladosporioides*; **c.** *C. uredinicola*; **d, i.** *Epicoccum nigrum*; **e.** *C. oxysporum*; **f.** *Phoma medicaginis*; **g.** *Gibberella moniliformis*; **h.** *Aspergillus aureolatus*; **j.** *A. pallidofulvus*; **k.** *A. flavus*; **l.** *Penicillium manginii*; **m, s, q.** *P. lanosum*; **n.** *Sclerotinia sclerotiorum*; **o.** *A. europaeus*; **p.** *P. griseofulvum*; **r.** *P. commune*; **t.** *P. bilaiae*; **u.** *A. flavipes* (metrić = 50 μm)

Morfološka i hemijska analiza kristalnih faza testiranih uzoraka ukazala je na prisustvo 2 tipa minerala: kalcita i vedelita. Kalcit je detektovan u 21,05% uzoraka, dok je u 26,32% uzoraka pored kalcita prisutan i mineral vedelit (Slika 96).



Slika 96. Zastupljenost (%) sekundarnih mikogenih minerala u kulturama izolata

U slučaju kalcita (CaCO_3), kristali su imali formu izduženih i spljoštenih romboedra (Slika 97n), romboedra u kombinaciji sa bazalnim pinakoidom (97o-q), ili kristala blizanaca (97r, s). Veličina kristala je bila nešto iznad $50 \mu\text{m}$. U kulturama *A. pallidofulvus*, *C. murorum*, *E. nigrum*, *G. moniliformis* i *P. medicaginis* nedovoljno pravilne forme, kao što su sfere i nepravilni poliedri, su bile učestale (Slika 97t-x). Semi-kvantitativna SEM-EDX analiza potvrdila je prisustvo elemenata iz sastava kalcita (Tabela 11). Nasuprot kalcitu, koji je bio jedina prisutna mineralna faza u 8 uzoraka, vedelit ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) je uvek bio asociiran sa kalcitom tj. nikad nije kristalizovao samostalno. Zabeležen je u različitim kristalnim formama kao što su tetragonalna bipiramida (97a-d) ili kombinacija prizme i bipiramide (Slika 97e-l). Formirane prizme su uglavnom bile kratke, sa izuzetkom kulture *A. flavus* gde su bile izdužene (Slika 97m). Među bipiramidama dominirale su forme poravnate duž Z ose. Veličina kristala je bila relativno uniformna, u opsegu od 40 do $50 \mu\text{m}$, dok su sitnozrnasti kristali, prečnika 10 do $20 \mu\text{m}$, bili veoma retki.



Slika 97. Morfologija kristala (B4, SEM): **a.** *Penicillium commune*; **b, o.** *P. manginii*; **c.** *Aspergillus ostianus*; **d, p, u.** *Epicoccum nigrum*; **e.** *P. lanosum*; **f.** *A. parasiticus*; **g-h.** *Sclerotinia sclerotiorum*; **i, j, q.** *A. pallidofulvus*; **k-l.** *P. griseofulvum*; **m.** *A. flavus*; **n.** *Cladosporium uredinicola*; **r.** *Phaeosphaeria avenaria*; **s-t.** *A. niger*; **v.** *Gibberella moniliformis*; **w.** *Chaetomium murorum*; **x.** *Phoma medicaginis*

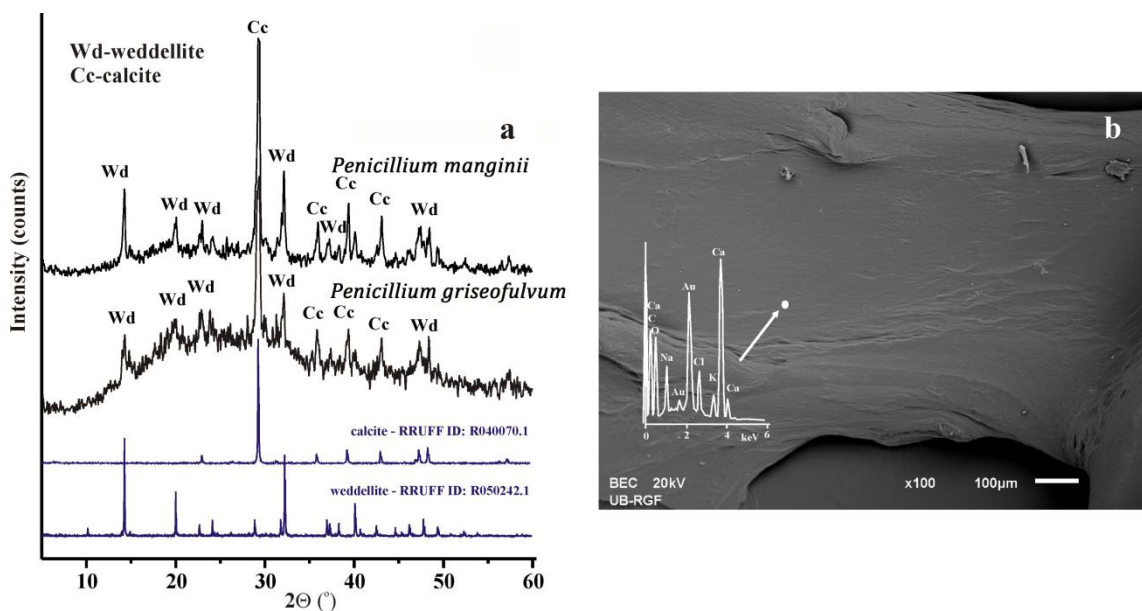
Hemijski sastav vedelita predstavljen je u Tabeli 11. Istaložene kristalne faze kalcita i vedelita, posmatrane putem svetlosne i SEM mikroskopije, su se takođe, u par slučajeva, karakterisale prisustvom površinskih ožiljaka nastalih rastom hifa preko površine minerala što je dovelo do formiranja "hifalnih otisaka" (Slika 97f, n, o, p, q, r, s, t i 101a, e, f, q, t, x).

Tabela 11. Elementarni sastav istraživanih mineralnih faza i kontrolne B4 podloge, predstavljen u težinskim procentima (wt %) i normalizovan na 100%

Elementi (wt %)	Broj uzorka										Kontrolna B4 podloga
	8	9	20	24	26	8	9	20	24	26	
	Vedelit					Kalcit					
Ca	29,1	25,9	29,7	28,4	29,3	40,6	40,3	48,4	41,9	42,3	14,0
C	18,6	18,9	16,3	16,3	18,2	11,5	14,2	10,7	13,2	13,0	31,8
O	52,3	55,2	54,0	55,3	52,5	47,9	45,5	40,9	45,0	44,7	45,1
Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6
Cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0
Σ	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

8: *Penicillium manginii*; 9: *Phaeosphaeria avenaria*; 20: *Epicoccum nigrum*; 24: *Aspergillus pallidofulvus*; 26: *P. griseofulvum*.

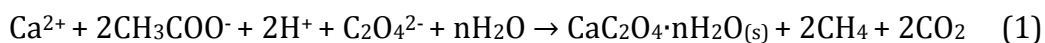
XRPD analiza uzoraka iz kultura *P. griseofulvum* i *P. manginii* potvrdila je prisustvo minerala kalcita i vedelita (Slika 98a). Na osnovu EDX spektra i SEM snimka neinokulisane B4 podloge (Slika 98b), jasno se može videti da supstrat, bez rasta gljiva, predstavlja samo homogenu masu bez prisutnih istaloženih kristala. Čista B4 podloga se razlikuje po hemijskom sastavu od kalcita i vedelita, s obzirom na znatno manju količinu Ca a veću C, kao i prisustvo Na, K i Cl u tragovima (Tabela 11). Prisustvo ovih elemenata je verovatno posledica nečistoća iz agara ili ekstrakta kvasca korišćenih za pripremu podloge. Elementarni sastav mineralnih faza i B4 podloge, određen SEM-EDX analizom, izražen u težinskim procentima i normalizovan na 100%, predstavljen je u Tabeli 11.



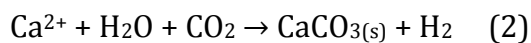
Slika 98. Hemijska analiza inokulisane i neinokulisane B4 podloge: **a.** XRPD difraktogram sa determinisanim mineralnim fazama (Wd – vedelit; Cc – kalcit) u kulturama *Penicillium griseofulvum* i *P. manginii*; **b.** SEM snimak neinokulisane B4 podloge sa EDX spektrom

U kulturama sa istaloženim vedelitom i kalcitom, mineralne faze su verovatno formirane sledećim mehanizmima:

1. Vedelit je verovatno nastao delovanjem oksalne kiseline na Ca-acetat (1):



2. Kalcit je formiran reakcijom ugljene kiseline (nastale rastvaranjem CO_2) i jona Ca^{2+} (2):



B4 podloga se standardno koristi za *in vitro* proučavanje minerala formiranih kao posledica metaboličke aktivnosti bakterija (Marvasi i dr., 2011). Do sada na ovoj podlozi nije zabeležene produkcija minerala u kulturama mikromiceta. Gljive

izolovane iz katakombi Svetog Kalista i Priscile (Italija) nisu pokazale sposobnost formiranja minerala na B4 podlozi. Do istih rezultata došli su i drugi autori koji su zaključili da je B4 podloga neadekvatna za testiranje sposobnosti mikromiceta da vrše biomineralizaciju i da su drugi testovi neophodni kako bi se ovaj fenomen proučavao kod gljiva (Pangallo i dr., 2009). Nosilac Ca^{2+} jona u B4 medijumu je Ca-acetat, komponenta za koju je poznato da u visokim koncentracijama inhibira rast micelije, ali stimuliše produkciju oksalne kiseline koja predstavlja veoma snažan helacioni agens i anjon koji Ca^{2+} taloži u nerastvorni kalcijum oksalat (Pinna i Salvadori, 2008). Imajuću u vidu navedeno, sa jedne strane, i naše rezultate sa druge strane, konstatujemo da je na B4 podlozi moguće dokazati produkciju sekundarnih mikogenih minerala.

Ca-oksalat, najčešća forma oksalata u živim organizmima, kristališe u tri različita oblika: Ca-oksalat monohidrat (monoklinični vevelit, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), najčešća forma Ca-oksalata u prirodi; Ca-oksalat dihidrat (tetragonalni vedelit, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ređi oblik u poređenju sa vevelitom i Ca-oksalat trihidrat (triklinični koksit, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), veoma retka mineralna forma (Echigo i dr., 2005; Akyol i Öner, 2014; Conti i dr., 2014). U navedenim formama, Ca-oksalat je detektovan na hifama, rizomorfima i micelarnim vrpčama, kao i plodonosnim telima, talusu lihenizovanih gljiva i korenovom sistemu mikoriznih biljaka Minerali Ca-oksalata u formi patine su često detektovati i na stenama i infestiranim spomenicima od mermera, krečnjaka, peščara, granita i maltera, ali i na zidnim i pećinskim slikama i skulpturama (Gadd i dr., 2014). Danas, još uvek, se vodi nerešena debata u vezi sa poreklom, a posebno uticajem oksalatnih patina na umetnička dela. Od strane većine autora generalno je prihvaćen stav da formiranje oksalata predstavlja jedan od najvažnijih procesa odgovornih za nastanak oštećenja spomenika i drugih kulturnih dobara (Del Monte i dr., 1987; Gadd i dr., 2014). Do skoro, većina autora je smatrala da formiranje patina od Ca-oksalata na zidnim slikama predstavlja direktnu posledicu produkcije oksalne kiseline od strane lihenizovanih gljiva. Međutim, samo su u malom broju slučajeva potvrđeni primarni uzročnici nastanka Ca-oksalata (Di Bonaventura i dr., 1999). Takođe, formiranje patina se dovodi u vezu sa negativnim uticajem antropogenog

zagađivanja i oksidativnim razlaganjem prevlaka nanetih u restauratorskim tretmanima u cilju očuvanja i zaštite bojenih površina (Lluveras i dr., 2008). Nesimbiotske mikromicete nikada nisu razmatrane kao glavni izvor oksalatnih patina na zidnim slikama, što je neobično ako se uzme u obzir značaj uloge gljiva u oksalatno-karbonatnom putu biogeohemijskog procesa kao i činjenice da se smatraju glavnim uzročnicima biodeterioracije kulturnih dobara (Sterflinger, 2000; 2010). Formiranje oksalata je svojstvo danas poznato kod nekoliko vrsta filamentoznih gljiva iz podrazdela Zygomycotina, Ascomycotina i Basidiomycotina (Urbanus i dr., 1986; Whitney i Arnott, 1987a, b; Di Bonaventura i dr., 1999; Monte, 2003a, b). Smatra se da formiranje oksalata predstavlja odbrambeni mehanizam za borbu sa povećanim koncentracijama Ca^{2+} jona u supstratu (Pinna, 1993). Da bi održale jonski balans mikromicete eliminišu višak Ca^{2+} jona putem formiranja stabilnih i netoksičnih Ca-oksalata. Mehanizam formiranja Ca-oksalata na zidnim slikama bazira se na produkciji oksalne kiseline koja rastvara kalcit i mineralne pigmente i reaguje sa slobodnim Ca^{2+} jonima formirajući Ca-oksalate (Sterflinger, 2000). Za mnoge gljive je dobro poznato da sintetišu oksalnu kiselinu, među njima i veliki broj vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Del Monte i dr., 1987). U kulturi *A. niger* je eksperimentalno dokazano da interaguje sa Ca^{2+} jonima i CaCO_3 što ima za posledicu obrazovanje Ca-oksalata (Sayer i dr., 1997). Poređenjem svega iznetog sa našim rezultatima, može se zaključiti da nesimbiotske mikromicete nesumnjivo imaju mnogo veću ulogu u procesu taloženja Ca-oksalata na zidnim slikama nego što se prethodno smatralo.

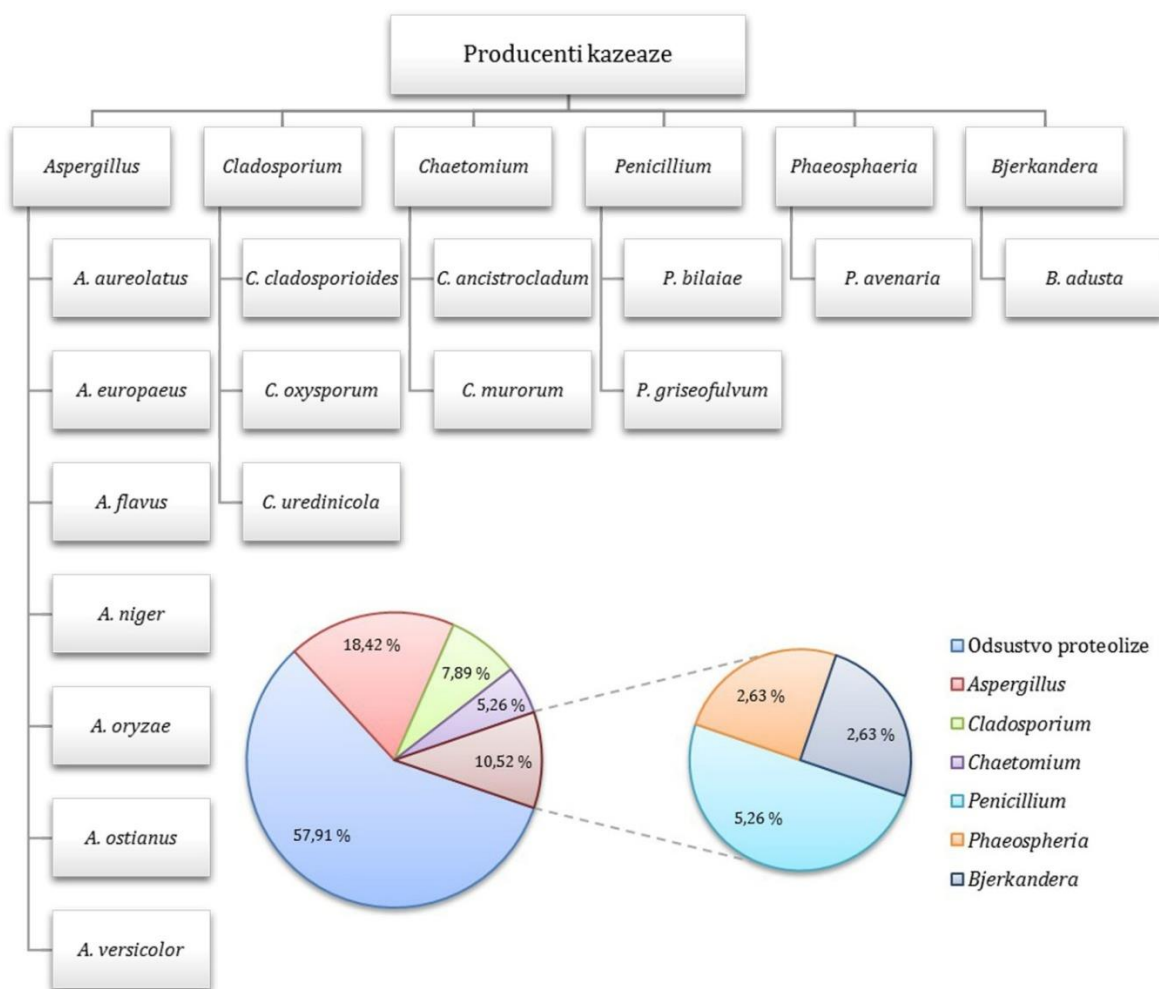
Velike količine Ca-oksalata, u formi dihidratnog vedelita, se gotovo uvek mogu uočiti na infestiranim zonama zidnih slika oštećenih rastom i metabolizmom gljiva. Kao posledica formiranja Ca-oksalata nastaju simptomi deterioracije kao što su pucanje i ljušpanje bojenog sloja, rasoljavanje i promene originalne obojenosti pigmenata, što je zabeleženo u velikom broju istraživanja (Pérez-Alonso i dr., 2004; Nevin i dr., 2008; Sarmiento i dr., 2008; Rosado i dr., 2013a, b). Rezultati našeg istraživanja su u potpunoj saglasnosti sa prethodnim nalazima.

Veza Ca-oksalata i kalcita već je poznata kao veoma važna i često se formira kao posledica aktivnosti mikrobiote u terestričnom okruženju (Verrecchia i dr., 2003). Ova pojava je zabeležena na površini krečnjaka infestiranog *Cephalotrichum* sp. (Burford i dr., 2006). Ca-oksalat čini osnovnu gradivnu komponentu narandžasto-smeđe patine "*scialbatura*" koja se često javlja na spomenicima od krečnjaka i mermera (Del Monte i dr., 1987). Oksalna kiselina, izlučena od strane mikromiceta, rastvara kalcit i formira Ca-oksalat. Razgradnjom Ca-oksalat pod uticajem bakterija, kao i oksidacijom i uticajem visoke pH na Ca-oksalat, formira se sekundarni kalcit (Del Monte i dr., 1987; Lazzarini i Salvadori, 1989; Lengeler i dr., 1999; Martin i dr., 2012).

Morfologija kristala je predložena kao značajan taksonomski karakter, mada Gadd i dr. (2014) smatraju da je diskutabilno korišćenje karaktera koji zavisi od pH sredine i izvora nutrijenata. Naše istraživanje je pokazalo morfološku sličnost kristala formiranih od strane vrsta istog roda.

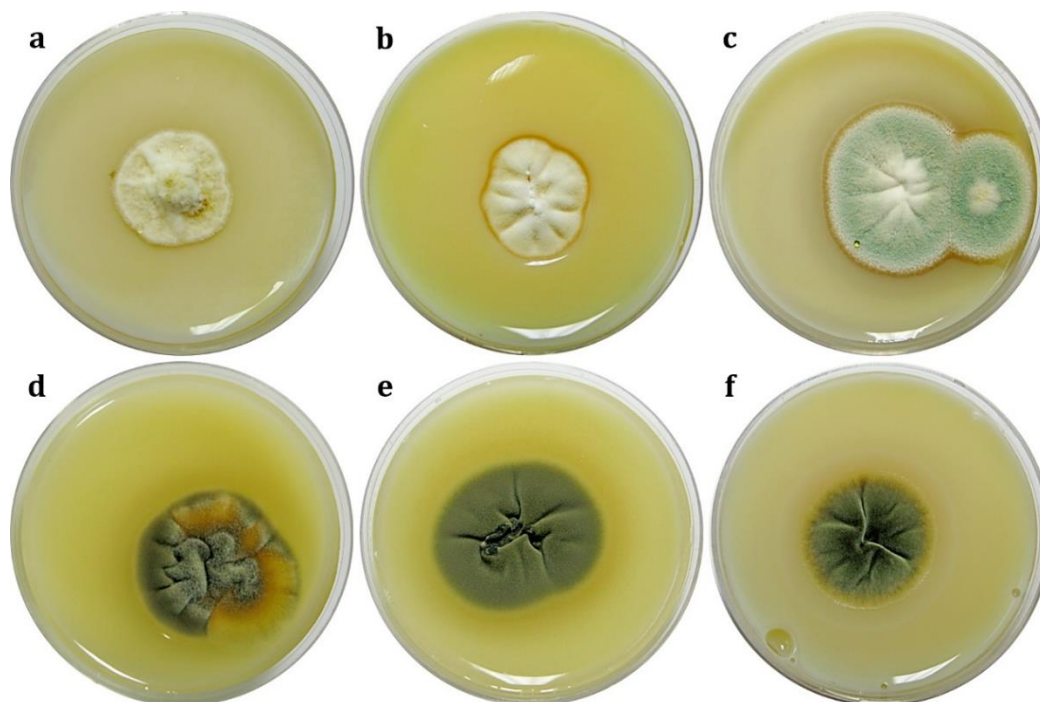
5.12.4. Sposobnost proteolize kazeina

Za detektovanje sposobnosti izolovanih gljiva da sintetišu ekstracelularne proteaze i razgrađuju proteinska veziva bojenog sloja izolati su kultivisani na CN podlozi. Od ukupno 38 izolata gljiva, transparentni oreol oko zone rasta kolonije zabeležen je kod 16 izolata (42,11%) (Slika 99). Najveći broj izolata su pripadnici roda *Aspergillus* (7; 18,42%), dok je manji broj vrsta sa sposobnošću hidrolize kazeina zabeležen kod rodova *Cladosporium* (3; 7,89%), *Chaetomium* i *Penicillium* (2; 5,26%). Transparentni oreol je zabeležen i u kulturama *Bjerkandera adusta* i *Phaeosphaeria avenaria*.



Slika 99. Pregled izolata mikromiceta, producenata kazeaze, i zastupljenost (%) sposobnosti hidrolize kazeina po rodovima

Na osnovu prečnika transparentne zone, testirane vrste roda *Cladosporium* su označene kao izolati sa najvećom proteolitičkom aktivnošću (Slika 100).



Slika 100. Transparentne zone hidrolize kazeina (7. dan, CN): **a.** *Aspergillus europaeus*; **b.** *A. versicolor*; **c.** *Penicillium griseofulvum*; **d.** *Cladosporium cladosporioides*; **e.** *C. uredinicola*; **f.** *C. oxysporum*

Za pouzdanu i brzu procenu proteolitičke aktivnosti izolata mikroorganizama, poreklom sa umetničkih predmeta, CN podloga je prvi put primenjena relativno skoro (Pangallo i dr., 2012). Pošlo se od pretpostavke da gljive producenti ekstracelularnog enzima kazeaze razgrađuju kazein na polipeptide, peptide i aminokiseline čime oni postaju dostupni za usvajanje. Ova razgradnja ima za posledicu gubitak bele boje kazeina i nastanak transparentne zone oko kolonije. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da veliki broj izolata rodova *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium* i u nešto manjoj meri *Penicillium*, pokazuju proteolitičku aktivnost. Testirana je proteolitička sposobnost gljiva izolovanih sa zidnih slika i iz vazduha crkve Svete Katarine u Velikoj Lomnici (Slovačka), gde je od 53 izolata 13 hidrolizovalo kazein, i to izolati iz rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* (Pangallo i dr., 2012). Među analiziranim vrstama su bili i *A. flavus* i *A. versicolor* koji su demonstrirali sposobnost hidrolize

kazeina i u našem istraživanju. Da veliki broj vrsta rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* poseduju proteolitičku aktivnost su potvrdila i istraživanja Rojas i dr. (2012) i Shivani i Kumar (2015) gde su na CN podlozi gajeni izolati mikromiceta sa umetničkih dela izloženih i deponovanih unutar sedam institucija kulture u Havani (Kuba), odnosno izolati gljiva sa kamenih površina palate Kaliadeš (Indija). U oba istraživanja, svi testirani izolati navedenih rodova su hidrolizovali kazein, uključujući *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* i *C. oxysporum*. Međutim, nekoliko vrsta roda *Aspergillus*, poreklom sa zidnih slika istraživane crkve, nije pokazalo sposobnost hidrolize kazeina iako literaturni podaci govore u prilog tome da su producenti kazeaze. Na osnovu toga se može zaključiti da uslovi sredine imaju značaju ulogu na ekspresiju gena i/ili aktivnost fungálnih proteaza. Molitoris i dr. (2000) navode da salinitet podloge i temperatura generalno imaju veoma mali uticaj na aktivnost kazeaze, dok Rojas i dr. (2012) smatraju da su neslaganja u detektovanju aktivnosti kazeaze kod izolata istih vrsta posledica uticaja pH vrednosti supstrata i da će izolati pre proizvoditi kazeazu na supstratima sa nižim pH nego na baznim podlogama. Takođe je istaknuto da su neke vrste, kao što su *A. niger* i *A. flavus*, veoma tolerantne i da mogu proizvoditi enzime u širokom dijapazonu koncentracije vodonikovih jona u podlozi. S obzirom da kazein agar ima približno neutralnu pH vrednost ($6,8 \pm 0,2$), odsustvo hidrolize molekula kazeina kod poznatih producenata, kao što su *A. oryzae* ili *A. nidulans*, nije neočekivana pojava. U okviru roda *Chaetomium*, testirane vrste *C. ancistrocladum* i *C. murorum* su razgradile protein mleka što je u skladu sa opšte prihvaćenim stavom da ovaj rod obuhvata ogroman broj vrsta koje su snažni producenti proteolitičkih enzima (Abdel-Azeem i dr., 2016).

Prečnik transparentne zone hidrolize kazeina CN podloge ukazuje na količinu proizvodjene kazeaze. Mada se procena ne može smatrati preciznom bez direktnog merenja količine proizvodjene kazeaze, veliki broj autora smatra da je ova metoda dobra za sticanje generalnog uvida u proteolitičke kapacitete testiranih izolata mikromiceta (Vermelho i dr., 1996). Uzimajući ovo u obzir, vrste roda *Cladosporium*, sa najvećim prečnicima zona hidrolize kazeina, karakterišu se najvećom

proteolitičkom aktivnošću i uzročnici su razlaganja proteinskih komponenti bojenog sloja zidnih slika istraživane crkve.

Odabir CN podloge, odnosno kazeina kao proteinskog supstrata za skrining sposobnosti gljiva da hidrolizuju proteine, baziran je na podatku da se u prošlosti kazein često koristio kao vezivo prirodnog porekla za vezivanje čestica mineralnih pigmenata tokom pripreme boja u *al secco* tehnici freskoslikarstva (Ciferri, 1999; Sterflinger, 2010). Kazein se takođe nalazi kao komponenta platnene tkanine koja se koristi za pojačanje na poledini fresaka (Ranalli i dr., 2005). Pored toga, kazein se, čak i danas, koristi za popravke zidnih slika tokom restauratorskih tretmana i ponekad dodaje kao krečni konsolidant u malter (Allsopp i dr., 2004). Na našim prostorima, konsolidant u upotrebi, nazvan kazeinsko-akrilno vezivo ili konsolidant na bazi krečnog veziva sa aditivima, sastoji se od 55% krečnog veziva, 27% kazeina, 14% punioca i 4% koncentrovanog akrilnog veziva (Žikić, 2014). Ovo je veoma značajno ako se uzme u obzir da kazein ne predstavlja samo izvor nutrijenata za rast gljiva već je i aktivator klijanja spora (Florian, 2002). Na primerima fresaka zamka Herberštajn i Kapele Svetog Virgilija (Austrija), predstavljene su negativne posledice primene kazeina za restauraciju zidnih slika (Ripka, 2005). Tokom restauratorskog tretmana zidne slike su tretirane smešom kazein-voda (1:10) i kazein je dodat kao konsolidant u malter. Tretman kazeinom je ponavljan nekoliko puta bez obzira što je izazivao vidljiv porast plesni. Ovo je još jedan od primera koji ukazuje da je saradnja mikologa i konzervatora neophodna.

5.12.5. Sposobnost produkcije fungalnih pigmenata

Sposobnost gljiva da produkuju pigmente u supstrat praćena je gajenjem izolovanih mikromiceta na MCZA 21 dan. Obojenost transparentne podloge smatrana je dokazom produkcije fungalnih pigmenata. Od 38 testiranih izolata, obojenost podloge je zabeležena u 14 kultura (36,84%) (Tabela 12). Među producentima

pigmenata, većina su pripadnici rodova *Aspergillus* (28,57%) i *Penicillium* (21,43%), dok je među drugim rodovima sposobnost sinteze pigmenata sporadično zabeležena.

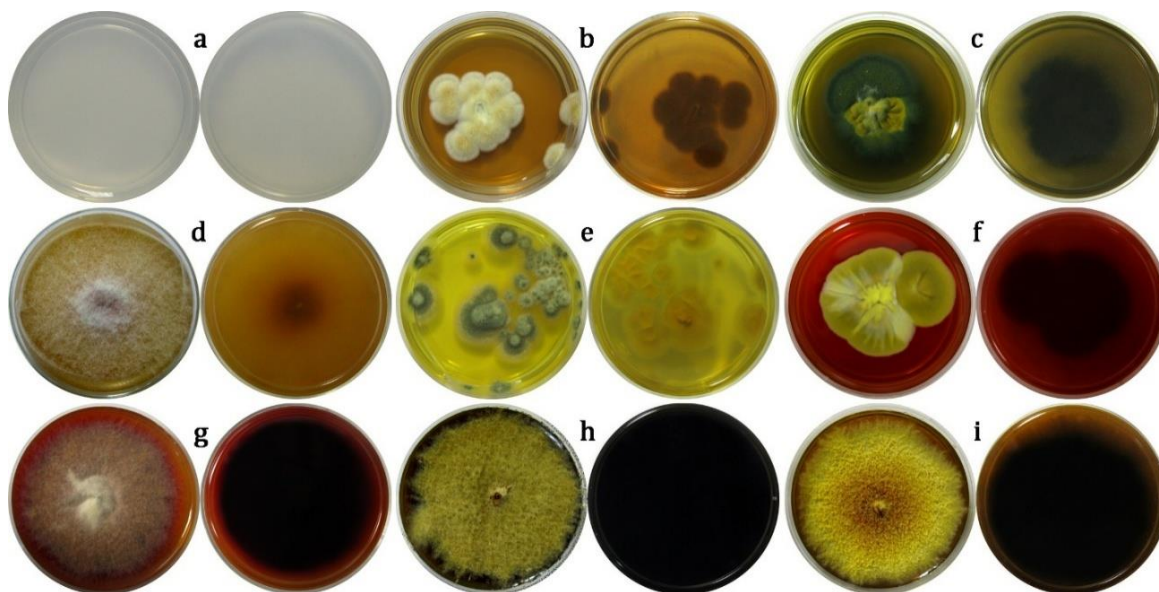
Tabela 12. Pigmenti produkovani u kulturama test mikromiceta

Testirani izolati	Poreklo	Pigmenti (ISCC-NBS)
<i>Aspergillus aureolatus</i> BEOFB 361m	zidna slika	s.YG
<i>Aspergillus creber</i> BEOFB 371m	zidna slika	s.O
<i>Aspergillus flavipes</i> BEOFB 391m	zidna slika	l.OY
<i>Aspergillus versicolor</i> BEOFB 3131m	vazduh	deep rO
<i>Chaetomium murorum</i> BEOFB 721m	zidna slika	s.P
<i>Chaetomium ancistrocladum</i> BEOFB 711m	zidna slika	m.YG
<i>Cladosporium uredinicola</i> BEOFB 1841m	zidna slika	m.OIG
<i>Epicoccum nigrum</i> BEOFB 1701m/ BEOFB 1702m	zidna slika/vazduh	v.rO/deep O
<i>Gibberella moniliformis</i> BEOFB 2501m	vazduh	l.OY
<i>Penicillium bilaiae</i> BEOFB 1131m	vazduh	brill.Y
<i>Penicillium lanosum</i> BEOFB 1161m	zidna slika/vazduh	brill.OY/brill.OY
<i>Penicillium manginii</i> BEOFB 1171m	vazduh	v.R

Produkovani pigmenti su označeni kategorijom iz ISCC-NBS palete boja. s.YG: izrazito žutozelena; s.O: izrazito narandžasta; l.OY: svetlo narandžastožuta; deep rO: duboko crvenkastonarandžasta; m.YG: umereno žutozelena; s.P: izrazito ljubičasta; m.OIG: umereno maslinasto zelena; v.rO: intenzivno crvenkastonarandžasta; deep O: duboko narandžasta; l.OY: svetlo narandžastožuta; brill.Y: jarko žuta; brill.OY: jarko narandžastožuto; v.R: intenzivno crvena;

Pigmenti produkovani u MCZA podlogu su bili veoma heterogeni (Slika 101). Velika većina izolata je obojila podlogu u različitim nijansama narandžaste boje, dok su pigmenti zelene i crvene boje bili prisutni kod po 3 izolata. *Chaetomium murorum* i *P. bilaiae* su jedini izolati sa pigmentom ljubičaste, odnosno jarko žute boje. Najveća raznovrsnost u bojama produkovanih pigmenata, među različitim izolatima iste vrste, dokumentovana je kod *E. nigrum* (Slika 101g-i). Čak 13 od 14 izolata su proizveli dovoljnu količinu pigmenata da u potpunosti oboje MCZA podlogu, mada je u

kulturama spororastućih vrsta, *A. creber*, *A. versicolor* i *P. manginii*, taj proces teкао sporo i potpuno obojenje se moglo uočiti tek pred kraj inkubacionog perioda.

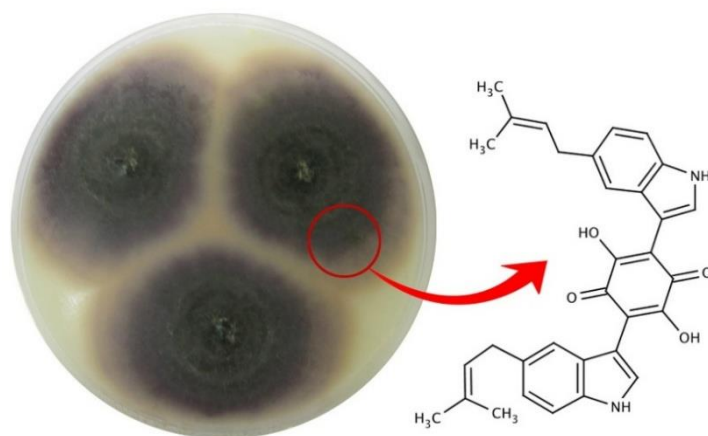


Slika 101. Produkcija fungalnih pigmenata u kulturama (21. dan, MCZA): **a.** kontrola; **b.** *Aspergillus flavipes*; **c.** *Aspergillus aureolatus*; **d.** *Gibberella moniliformis*; **e.** *Penicillium bilaiae*; **f.** *P. manginii*; **g-i.** *Epicoccum nigrum*

Mikromicete su poznati producenti velikog broja pigmenata, širokog spektra boja, strukture i sastava. Produkcija pigmenata zavisi od vrste, mada je process sinteze pod uticajem velikog broja faktora sredine (dostupnost nutrijenata, metala, svetlosti, i drugih faktora rasta) (Florian, 2002). Proučavanjem izolata poreklom sa velikog broja predmeta kulturne baštine, pokazano je da sve testirane vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* produkuju pigmente uglavnom žute boje. Takođe je utvrđeno da sojevi poreklom sa različitih supstrata, mogu da produkuju pigmente različite boje, ali i da sinteza pigmenata može u potpunosti da izostane (Rojas i dr., 2012). Vrste roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* izolovani sa papira (Borrego i dr., 2010) i rodova *Chaetomium* i *Fusarium*, izolovane sa fresaka, su demonstrirale sposobnost

sinteze pigmenata (Karbowska-Berent, 2003) što je u saglasnosti sa našim istraživanjima.

Interesantan nalaz predstavlja pigment ljubičaste boje, dokumentovan u kulturi *Chaetomium murorum* gajenoj na OA podlozi. Pigment je produkovan u uskoj zoni, oblika oreola, oko kolonija (Slika 102). Poznato je da *C. cochliodes* i *C. globosum* kada se kultivišu na različitim medijumima produkuju veoma male količine ljubičastog pigmenta kohliodinola ($C_{32}H_{32}N_2O_4$) za koga je dokazano da ima snažnu antimikrobnu aktivnost (Brewer i dr., 1968).



Slika 102. Produkcija ljubičastog pigmenata (kohliodinola?) u kulturi *Chaetomium murorum* (21. dan, OA)

Sa aspekta očuvanja estetskog integriteta predmeta i kulturnih dobara, produkcija pigmenata u supstrat je veoma značajna. Fungalni pigmenti, iz grupe melanina, mikosporina, kvinona, hidrokiantrakinona i karotenoida interaguju sa komponentama supstrata, što dovodi do nastanka neželjenih promena u osobinama i kvalitetu materijala umetničkih dela (Dornieden i dr., 2000; Sayer i Gadd, 2001; Sterflinger, 2010). To se uglavnom manifestuje kao promena originalne obojenosti supstrata, a boje formiranih fleka ne zavise samo od boje pigmenta već i seta drugih faktora kao što su hemijski sastav supstrata, interakcije pigmenata sa komponentama

supstrata i uslova sredine (Garg i dr., 1995; Florian, 2002). Dodatni problem predstavlja činjenica da tretman biocidom uklanja samo prisutan porast plesni, dok veoma stabilni organski pigmenti ostaju i onda kada su producenti u potpunosti eliminisani, što čini uklanjanje ovih fleka veoma komplikovanim (Ettenauer i dr., 2014). Problem se usložnjava činjenicom da pigmenti mogu biti sekretovani u supstrat, vezani unutar protoplazme hifa ili inkorporirani u sastav ćelijskog zida hifa i spora, što je neophodno odrediti pre odabira metode uklanjanje pigmenta (Florian, 2002). Obojene spore, prisutne u masi, ne boje površinu supstrata i mogu se ukloniti prostim usisavanjem kontaminiranih površina (Florian, 2002). Uklanjanje pigmenata iz supstrata zahteva poznavanje njihove rastvorljivosti za šta je neophodno poznavanje hemijske prirode pigmenta. Test sposobnost produkcije fungálnih pigmenata pruža uvid u raznovrsnost pigmenata koji mogu biti sintetisani od strane mikromiceta, što u kombinaciji sa hemijskom analizom pigmenata daje neophodne informacije o sastavu i rastvorljivosti. Na taj način je omogućen odabir adekvatnog rastvarača za uklanjanje nastalih fleka, čime bi se eliminisala potreba za primenom 1M KOH, 5% NaOCl, 30% H₂O₂, mešavine H₂O₂/Cu²⁺, UVA zračenja i povećanja pH što sve predstavljaju veoma agresivne metode i potpuno neprihvatljive za primenu u procesu konzervacije zidnih slika (Florian, 2002).

5.13. Antifungalna aktivnost biocida i etarskih ulja

U cilju pronalaženja adekvatnog biocida za tretmane infestiranih zidnih slika i prečišćavanje vazduha kontaminiranog fungálnim propagulama, testirana je *in vitro* antifungalna aktivnost agenasa sintetičkog i biološkog porekla na originalne izolate gljiva sa zidnih slika i iz vazduha istraživane crkve. Testirani agensi su:

- ✚ Novosintetisani BAC/FNP nanokompozit;
- ✚ Etarska ulja izolovana iz tamjana (smola tamjan drveta - *Boswellia carteri*) i smirne (smola balzamovog drveta - *Commiphora myrrha*);
- ✚ Dim nastao paljenjem tamjana.

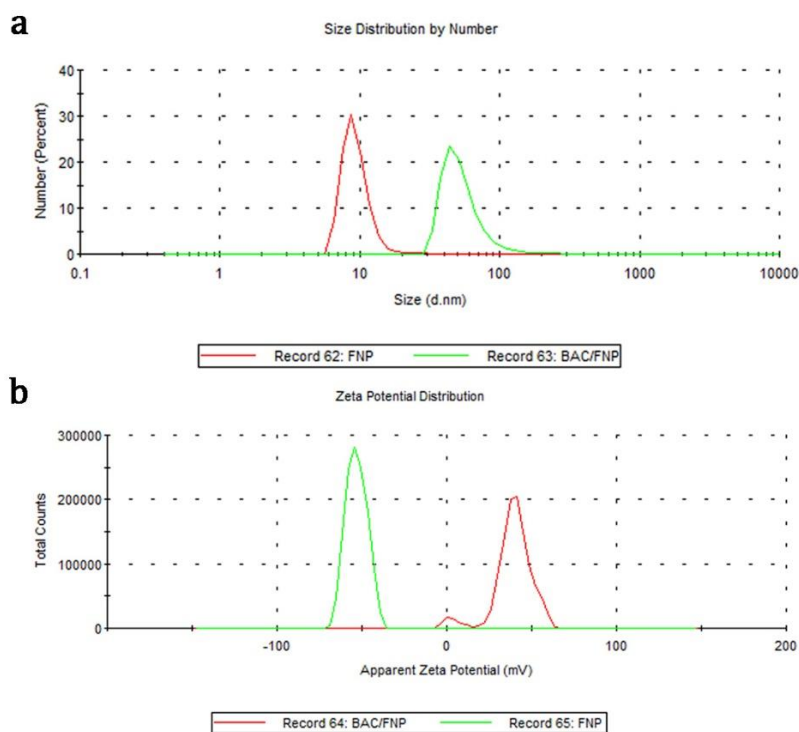
5.13.1. Antifungalna aktivnost BAC/FNP nanokompozita

Uporedna analiza antifungalne aktivnosti BAC/FNP nanokompozita i biocida BAC je sprovedena na 8 vrsta roda *Aspergillus*, kako bi se utvrdio uticaj fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ na fungistatsku i fungicidnu aktivnost biocida BAC. Odabir nanočestica fulerenola kao nosača za BAC u nanokompozitu je izvršen na osnovu osobine samoorganizovanja FNP u stabilne polianjonske nano-aglomerate i formiranja jonskih veza između katjonskog molekula BAC u intra- i ekstra čestičnom prostoru FNP. Sintetisan BAC/FNP nanokompozit je okarakterisan i praćen je uticaj BAC/FNP i BAC na germinaciju konidija i rast micelije *in vitro*.

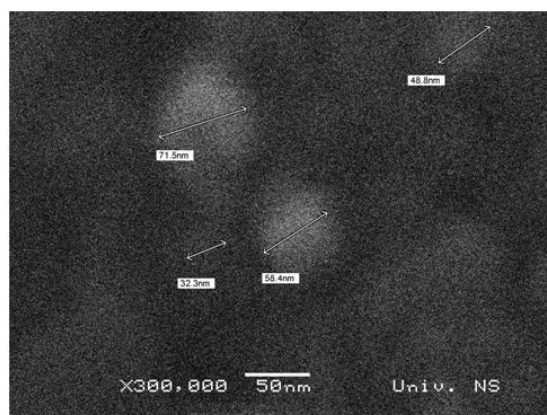
5.13.1.1. Fizičko-hemijska karakterizacija nanokompozita

Fizičko-hemijska karakterizacija nanočestica FNP i BAC/FNP nanokompozita je izvršena dinamičkim rasejavanjem svetlosti i primenom SEM i AFM. Rezultati raspodele FNP i BAC/FNP po broju i naelektrisanju su prikazani na Slici 103. Rezultati raspodele po veličini ukazuju na veliku nehomogenost uzoraka tj. analizirani uzorci su polidisperzni. U slučaju FNP, veličina čestica se kretala u opsegu od 6 do 16 nm, sa najvećim brojem čestica (30%) veličine 8,7 nm, dok se BAC/FNP karakterisao česticama veličine od 30 do 143 nm i najvećim brojem čestica veličine 44 nm (23%). Čestice veličine 32,3; 48,8; 58,4; i 71,5 nm su izmerene posmatranjem BAC/FNP na SEM (Slika 104) što u potpunosti korespondira rezultatima DLS merenja raspodele nanočestica BAC/FNP po broju (Slika 103a). Rastvor BAC/FNP je nehomogen, sačinjen pretežno od nanočestica veličine u opsegu od 30 do 90 nm i sa većim česticama formiranim aglomeracijom manjih (Slika 105). Ovo, takođe, potpuno odgovara rezultatima DLS i SEM merenja. Vremenski zavisna aglomeracija nanočestica nije zabeležena ni u jednom od analiziranih rastvora. Pored veličine nanočestica BAC/FNP i FNP mereno je i naelektrisanje a izmereni zeta potencijal za FNP je iznosio $-53,3$ mV, dok je kod BAC/FNP naelektrisanje iznosilo $+37,4$ mV (Slika 103b). Rezultati karakterizacije nanočestica fulerenola i nanokompozita u potpunosti odgovaraju

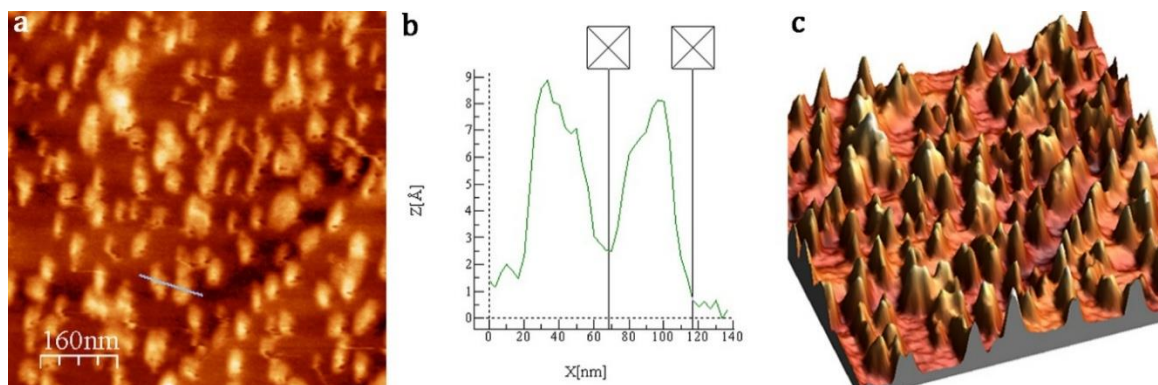
objavljenim rezultatima o raspodeli nanočestica fulerenola po naelektrisanju i broju (Vileno i dr., 2006; Brant i dr., 2007). Okarakterisan BAC/FNP se pokazao stabilnim 30 dana na 40 °C i pogodnim za testiranje antifungalne aktivnosti tokom tog perioda.



Slika 103. Raspodela nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ i BAC/FNP nanokompozita po: **a.** veličini; **b.** zeta potencijalu



Slika 104. Čestice BAC/FNP nanokompozita posmatrane SEM



Slika 105. Vodeni rastvor BAC/FNP nanokompozita: **a.** AFM slika u velikoj razmeri, $810 \times 810 \text{ nm}^2$; **b.** poprečni presek sa dve nanočestice, 50 nm i 48 nm, i maksimalnim pikovima za nanokompozit, 9 nm i 8 nm; **c.** 3D prikaz nanokompozita na HOPG površini

5.13.1.2. Antifungalna aktivnost nanokompozita

Mikrodilucionom metodom je praćen uticaj BAC/FNP na konidije odabranih vrsta roda *Aspergillus*. Testirane koncentracije BAC/FNP bile su u opsegu $0,03/0,05$ do $20,1/34,84 \mu\text{g ml}^{-1}$, dok su za kontrolni biocid BAC korišćene koncentracije raspona $0,03$ do $20,1 \mu\text{g ml}^{-1}$. MIC i MFC vrednosti nanokompozita i biocida su određene za sve testirane izolate (Tabela 13). U oba slučaja, zabeležene su veoma niske MIC ($0,08/0,045$ do $0,52/0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ za BAC/FNP i $0,03$ do $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$ za BAC) i MFC vrednosti ($0,13/0,075$ do $0,52/0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ za BAC/FNP i $0,075$ do $0,45 \mu\text{g ml}^{-1}$ za BAC). Više MIC vrednosti su zabeležene za nanokompozit, u poređenju sa biocidom BAC, sa izuzetkom *A. flavipes*, dok su MFC vrednosti kod tri od 8 izolata (*A. flavipes*, *A. flavus* i *A. oryzae*) više za BAC. Rast *A. flavipes* je bio u potpunosti inhibiran sa $0,13/0,075 \mu\text{g ml}^{-1}$ BAC/FNP, dok je čak pet izolata pokazalo isti, visok nivo rezistentnosti (MFC $0,52/0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$) ka tretmanu nanokompozitom. S druge strane, *A. nidulans*, *A. europaeus* i *A. terreus* su bile najosetljivije na tretman biocidom BAC sa fungicidnim efektom postignutim već pri $0,075 \mu\text{g ml}^{-1}$, dok je sa MFC vrednošću od $0,45 \mu\text{g ml}^{-1}$ najveću otpornost imao *A. oryzae*. Veoma niske MIC i MFC vrednosti, dokumentovane

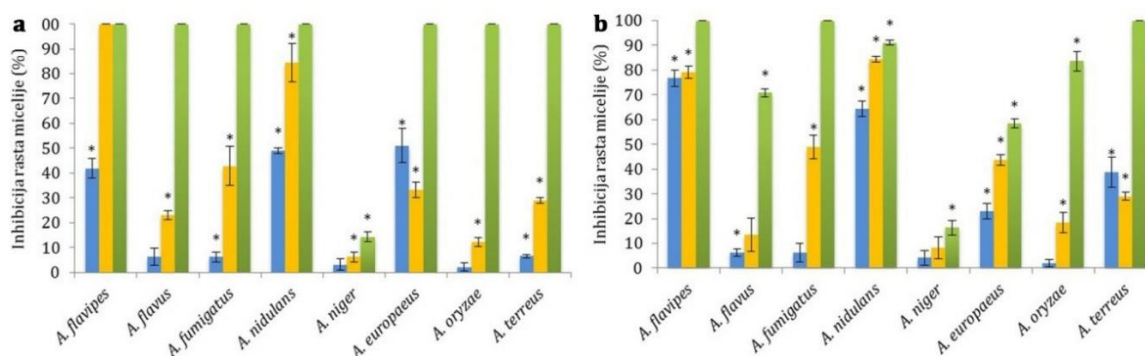
za BAC/FNP i BAC sugerišu veliki potencijal testiranih agenasa da ometaju početnu fazu u životnom ciklusu gljiva, tj. germinaciju konidija.

Tabela 13. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC) za BAC/FNP nanokompozit i biocid BAC određene mikrodilucionom metodom

Izolati	Testirana supstanca			
	BAC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		BAC/FNP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus europaeus</i>	0,075	0,075	0,3/0,52	0,3/0,52
<i>Aspergillus flavipes</i>	0,045	0,15	0,045/0,08	0,075/0,13
<i>Aspergillus flavus</i>	0,075	0,15	0,15/0,26	0,15/0,26
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,15	0,15	0,3/0,52	0,3/0,52
<i>Aspergillus nidulans</i>	0,075	0,075	0,15/0,26	0,15/0,26
<i>Aspergillus niger</i>	0,15	0,15	0,3/0,52	0,3/0,52
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,15	0,45	0,3/0,52	0,3/0,52
<i>Aspergillus terreus</i>	0,03	0,075	0,3/0,52	0,3/0,52

Makrodilucionom metodom testiran je uticaj BAC/FNP nanokompozita i BAC na rast micelije 8 izabranih *Aspergillus* vrsta merenjem prečnika kolonija 7., 14. i 21. dana inkubacionog perioda. Testirane koncentracije BAC/FNP iznosile su 0,03/0,05; 0,15/0,26; i 0,6/1,04 $\mu\text{g ml}^{-1}$, dok su za biocid BAC korišćene koncentracije 0,03; 0,15; i 0,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Inhibicija rasta micelije praćena je poređenjem prečnika kolonija koje su rasle sa BAC/FNP i BAC dodatim podlozi, sa prečnikom kolonija kontrolnih kultura starosti 7, 14 i 21 dan. Micelija testiranih vrsta roda *Aspergillus* je pokazala različiti nivo osetljivosti na BAC/FNP i BAC (Slika 106a, b). U oba tretmana, najrezistentniji izolat je bio *A. niger*, sa inhibicijom rasta micelije u opsegu od 3,06±2,22% do 14,29±1,86% u slučaju BAC/FNP, odnosno između 4,08±2,97% i 16,33±2,97% pri dodatku čistog biocida BAC u podlogu. U poređenju sa čistom biocidom BAC, nanokompozit je pokazao veću potentnost, sa fungicidnim efektom pri koncentraciji od 1,04/0,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ zabeleženim kod svih izolata sa izuzetkom *A. niger*. S druge strane, proporcionalna koncentracija čistog BAC je pokazala fungicidnu aktivnost kod tri

vrste: *A. flavipes*, *A. fumigatus* i *A. terreus*. Među tretiranim izolatima, *A. flavipes* je bio najpodložniji dejstvu nanokompozita sa potpunom inhibicijom rasta micelije postignutom pri koncentraciji od 0,26/0,15 $\mu\text{g ml}^{-1}$.



Slika 106. Inhibicija rasta micelije (%) u kulturama *Aspergillus* vrsta (21. dan, MEA) tretiranim: **a.** BAC/FNP koncentracija 0,05/0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [-], 0,26/0,15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [-] i 1,04/0,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [-]; **b.** BAC koncentracija 0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [-], 0,15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [-] i 0,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [-]. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti broja merenja sa standardnom greškom

Kod svih izolata povećanje koncentracije testiranog agensa je rezultovalo u povećanju procenta inhibicije rasta micelije. Međutim, bez obzira na koncentraciju, u većini slučajeva, zabeleženo je postepeno smanjenje inhibitornog efekta tokom proticanja 3 nedelje inkubacionog perioda (Tabela 14 i 15). Konstantna inhibicija rasta micelije tokom 3 nedelje je zabeležena samo za *A. flavus* (0,05/0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ FNP/BAC, odnosno 6,25±1,39% i 6,25±0,79% na 0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BAC) i *A. oryzae* (2,04±1,43% na 0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BAC). Nasuprot BAC/FNP i BAC, u kontrolnim kulturama tretiranim samo sa nanočesticama fulerenola, nikakve morfo-fiziološke ili promene u intenzitetu rasta micelije nisu uočene.

Tabela 14. Efekat BAC/FNP nanokompozita na rast micelije *Aspergillus* vrsta određen makrodilucionom metodom

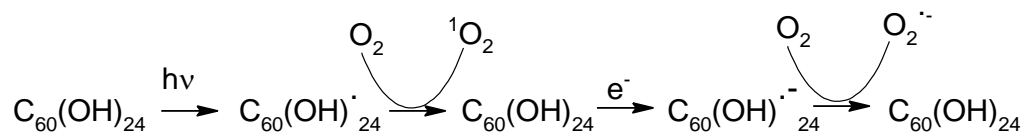
Izolati	Inhibicija rasta micelije (%)								
	0,03/0,05 µg ml ⁻¹			0,15/0,26 µg ml ⁻¹			0,6/1,04 µg ml ⁻¹		
	7.	14.	21.	7.	14.	21.	7.	14.	21.
<i>Aspergillus europaeus</i>	63,04	51,09	51,04	76,09	52,17	33,33	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus flavipes</i>	54,17	51,25	41,86	100	100	100	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus flavus</i>	6,25	6,25	6,25	39,58	31,25	22,92	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus fumigatus</i>	16,33	8,16	6,12	71,43	57,14	42,86	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus nidulans</i>	79,07	61,11	48,89	88,37	86,67	84,44	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus niger</i>	6,12	4,08	3,06	10,19	8,16	6,12	67,35	16,33	14,29
<i>Aspergillus oryzae</i>	6,12	4,08	2,04	26,53	16,33	12,24	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus terreus</i>	42,86	6,91	6,45	85,71	62,07	29,03	100,00	100,00	100,00

Tabela 15. Efekat benzalkonijum hlorida na rast micelije *Aspergillus* vrsta određen makrodilucionom metodom

Izolati	Inhibicija rasta micelije (%)								
	0,03 µg ml ⁻¹			0,15 µg ml ⁻¹			0,6 µg ml ⁻¹		
	7.	14.	21.	7.	14.	21.	7.	14.	21.
<i>Aspergillus europaeus</i>	65,22	34,78	22,92	76,09	54,35	43,75	86,96	63,04	58,33
<i>Aspergillus flavipes</i>	79,16	78,85	76,74	88,24	81,25	79,07	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus flavus</i>	6,25	6,25	6,25	39,58	13,54	13,54	89,58	77,08	70,83
<i>Aspergillus fumigatus</i>	28,57	8,16	6,12	75,51	59,18	48,98	100,00	100,00	100,00
<i>Aspergillus nidulans</i>	86,04	71,11	64,44	90,71	86,67	84,44	93,02	91,11	91,11
<i>Aspergillus niger</i>	6,12	6,12	4,08	10,19	8,16	8,16	85,71	26,53	16,33
<i>Aspergillus oryzae</i>	2,04	2,04	2,04	32,65	22,45	18,37	91,84	87,75	83,67
<i>Aspergillus terreus</i>	46,43	41,38	38,71	78,57	65,52	29,03	100,00	100,00	100,00

Male koncentracije BAC/FNP nanokompozita i biocida BAC mogu u visokom procentu inhibirati rast micelije. Proporcionalne koncentracije BAC/FNP (0,6 µg ml⁻¹ BAC vezanog za 1,04 µg ml⁻¹ FNP) i BAC (0,6 µg ml⁻¹) su sa različitim intenzitetom

uticale na rast micelije. BAC/FNP je imao fungicidnu aktivnost kod svih izolata, sa izuzetkom *A. niger*, dok je BAC samo inhibirao rast micelije. Uzrok veće inhibitorne aktivnosti BAC/FNP se prema Isaković i dr. (2006) bazira na C₆₀(OH)_x-indukovanom procesu programirane ćelijske smrti, kaspaza-zavisne apoptoze, koja se karakteriše kondenzacijom hromatina, aktivacijom kaspaza i fragmentacijom DNK bez raspada membrane. Pored toga, u prisustvu vidljive ili UV svetlosti fulerenol C₆₀(OH)₂₄ se veoma lako ekscituje i u seriji sukcesivnih reakcija produkuje singlet kiseonik (¹O₂) i superoksid anjon radikal (O₂⁻) (Slika 107) (Nielsen i dr., 2008). ¹O₂ može da indukuje lančane reakcije u kojima se proizvode mnogo reaktivnije vrste kiseonika koje dovode do oštećenja ćelija, prekida u DNK lancima i ćelijske smrti (Bogdanović i dr., 1996).



Slika 107. Fotoekscitacija C₆₀(OH)₂₄ i produkcija ¹O₂ i O₂⁻ radikala

Kada se tretiraju subfungicidnim koncentracijama BAC/FNP i BAC, potpun fungistatski efekat je postignut samo kod *A. flavus* i *A. oryzae*, dok se kod drugih testiranih izolata rast micelije nastavio tokom celog inkubacionog perioda, ali znatno sporijim tempom.

5.13.1.3. Morfo-fiziološke promene indukovane dejstvom BAC/FNP nanokompozita i biocida BAC

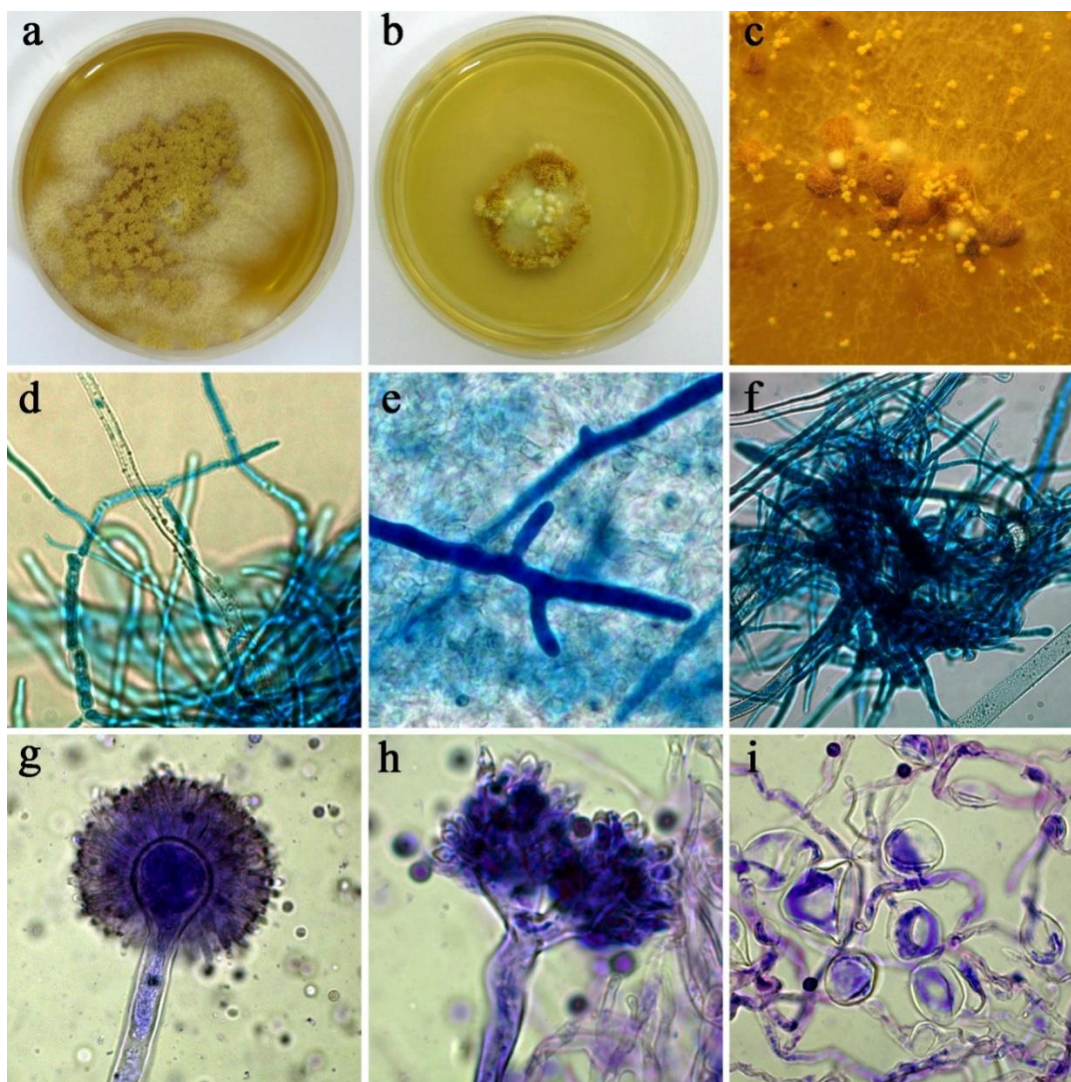
U kulturama *A. niger* i *A. flavipes*, gajenim u prisustvu subinhibitornih koncentracija BAC/FNP od 0,13/0,075 µg ml⁻¹, odnosno 0,1/0,06 µg ml⁻¹, zabeležene su morfološke promene u formi depigmentacije konidija (Slika 108) i pojave retkih hijalinih konidiofora (albino fenotip). Praćenjem porasta tokom perioda od dve

nedelje zabeležena je pojava postepene pigmentacije konidija do crne, odnosno oker boje. Reinokulacijom tretiranih hijalinih konidija, na MEA, dobijene su kolonije tipičnog fenotipa, što ukazuje da su nastale morfo-fiziološke promene reverzibilne prirode. Poznato je da nanočestice fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ uzrokuju depigmentaciju konidiogenog aparata *A. niger* (Unković i dr., 2012). Melanin ima značajnu ulogu u preživljavanju gljiva pri nepovoljnim uslovima sredine (Butler i Day, 1998) i predstavlja faktor virulencije patogenih gljiva sa ulogom u slabljenju imunskog odgovora domaćina (Pooja i dr., 2012). Mada nije neophodan za rast, kada je prisutan, melanin povećava rezistentnost patogena na antimikrobne agense domaćina i tretmane biocidima (Polak, 1999). Depigmentacija i formiranje albino fenotipa kod *A. niger* i *A. flavipes*, u kulturama tretiranim subinhibitornim koncentracijama nanokompozita, je posledica inhibicije sinteze melanina.



Slika 108. Depigmentacija konidiogenog aparata u kulturi *Aspergillus flavipes* (3. dan, MEB): **a.** kontrolna kultura; **b.** albino fenotip

U kulturi *A. europaeus*, gajenoj u prisustvu $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$ biocida BAC, takođe su zabeležene značajne morfološke promene (Slika 109).



Slika 109. Morfo-fiziološke promene u kulturi *Aspergillus europaeus* (21. dan, MEA):
a. kontrolna kultura; **b.** kolonija izmenjene morfologije; **c.** sklerocije *in situ*;
d. hife tipične morfologije (kontrola); **e.** "crvolike" hife u masi; **f.** početna faza formiranja sklerocija, u formi klupka od fragmentisanih i debelozidnih hifa; **g.** normalna konidijska glavica (kontrola); **h.** granati konidiofor sa aberantnim konidijskim glavicama; **i.** hife sa nepravilnim terminalnim i interkalarnim bubrenjima

Tretirane kolonije su se odlikovale centralnim sterilnim zonama i perifernom sporulacijom (Slika 109b). Promene na hifama su predstavljale razvoj voluminoznih,

debelozidnih, cenocitičnih, granatih i “crvolikih” hifa (Slika 109e). Mreža hifa sa nepravilnim terminalnim i interkalarnim bubrenjima je bila naročito česta u sterilnoj zoni (Slika 109i). Razvoj aberantnih konidiogenih aparata sa jasnim “dvočlavinim” konidioforima i kolabiranim, nepravilno elipsoidnim, vezikulama koje nose slabo razvijene fjalide sa konusnim vrhovima i uvećanim sporama su, takođe, bile učestala pojava (Slika 109h). Pored toga, početna faza u formiranju sklerocija, tj. klupko od fragmentisanih i debelozidnih hifa, kao i potpuno formirane oker, sferne sklerocije različite veličine i delimično prekrivene vazdušnom micelijom su takođe uočene (Slike 109c, f). Promene u somatskim i reproduktivnim strukturama mogu biti rezultat delimičnog razdvajanja fosfolipidnih slojeva ćelijske membrane izazvanog poremećajem u međumolekulskim interakcijama ili usled denaturacije ili inaktivacije strukturnih proteina i enzima pod uticajem biocida BAC (Fredell i dr., 1994; Gilbert i Moore, 2005; Ioannou i dr., 2007). Razvoj debelozidnih “crvolikih” hifa i sklerocija, kao i formiranje konidiofora sa više konidijskih glavica, verovatno predstavlja adaptaciju na nepovoljne uslove izazvane biocidom BAC.

U kontekstu odabira agensa za tretmane zidnih slika BAC je dobro poznato sredstvo i biocid izbora preporučen od strane BDP kao ekološki bezbedan, razgradiv i netoksičan biocid sa produženim efektom i minimalnim uticajem po strukturni i estetski integritet zidnih slika (Cooke, 2002; Diaz-Herraiz i dr., 2013; Rajkowska i dr., 2015). Tretman zidnih slika iz perioda gornjeg Paleolita pećine Lasko (Francuska) infestiranim kompleksom vrste *Fusarium solani*, biocidom BAC se pokazao veoma uspešnim (Dupont i dr., 2007; Bastian i Alabouvette, 2009). Međutim, primećeno je da je aktivnost biocida bila niža u poređenju sa rezultatima testiranja *in vitro*, što je verovatno posledica udruživanja gljiva sa bakterijama i obrazovanja površinskog biofilma čime su postale manje podložne dejstvu biocida (Bastian i Alabouvette, 2009). Osim toga, pri temperaturnom opsegu od 0 do 40 °C, a u prisustvu nitrita, BAC podleže nukleofilnoj supstituciji i transformiše se u alkil dimetilamin. Bastian i dr. (2010) navode da je upravo upotreba međuprodukata raspada biocida, kao izvora ugljenika i azota, moguć razlog za iznenadni nastanak i širenje tamno pigmentisanih

mrlja na zidnim slikama, nastalih intenzivnim rastom patogene gljive *Ochroconis tshawytschae*, nakon tretmana biocidom na bazi BAC (Vitalub QC 50). Prilikom odabira biocida BAC za tretmane zidnih površina mora se u obzir uzeti i to da je aktivnost BAC redukovana u prisustvu intenzivnog rasoljavanja ili visokih koncentracija proteina, a da prekomerna upotreba može dovesti do pojave rezistentnosti kod gljiva i drugih mikroorganizama (Sterflinger, 2010). Poznato je da Gram-negativne bakterije, kao i vrste roda *Pseudomonas*, su rezistentne na BAC i da nakon primene ovog biocida može doći do rekolonizacije tretiranih površina ovim bakterijama (Langsrud i dr., 2003). Imajući u vidu da se pojava rezistentnosti na BAC sve češće beleži, u zadnje vreme sve više se vrše promene osnovne formule benzalkonijum hlorida u cilju prevazilaženja pojave rezistentnosti i povećanja antimikrobne aktivnosti biocida (To i dr., 2002; Langsrud i dr., 2003; Brycki i dr., 2011). U tom pogledu, nanočestice sve više predstavljaju predmet istraživanja usled prednosti nad konvencionalnim česticama, kao što su veća aktivna površina i hemijska aktivnost. U eksperimentima sprovedenim od strane Ditaranto i dr. (2011) i Ruffolo i dr. (2010) pokazano je da rastvori mešavina nanočestica ZnO, ZnTiO₃ i polimera, odnosno CuNP i voodootpornog silikonskog gela, su veoma potentni antimikrobni agensi u tretmanu kamena. Međutim, slična istraživanja na ugljenikovim nanočesticama nisu vršena do sada i ovo istraživanje predstavlja prvi dokumentovani pokušaj sinteze stabilnog nanokompozita primenom dobro poznatog biocida i vodorastvornog polihidroksilovanog derivata fulerena, fulerenola C₆₀(OH)₂₄, u formi polianjonskih nanočestica. Sve šira upotreba ovih nanočestica kao vektora lekova, antioksidanasa i antimikrobnih agenasa, uz vrlo širok spektar efekata zabeležen tokom tretiranja filamentoznih gljiva i kvasaca potvrđuju odabir baš ovih nanočestica za formiranje nanokompozita (Aoshima i dr., 2009; Hadduck i dr., 2010; Gao i dr., 2011; Djordjević i dr., 2015). Testiranjem antifungalne aktivnosti potvrđena je dobro poznata aktivnost biocida BAC i utvrđeno da je sintetisan nanokompozit mnogo veće efikasnosti u sprečavanju rasta micelije u odnosu na reproduktivnu fazu, gde je uticaj na germinaciju konidija izazvan inhibicijom sinteze melanina.

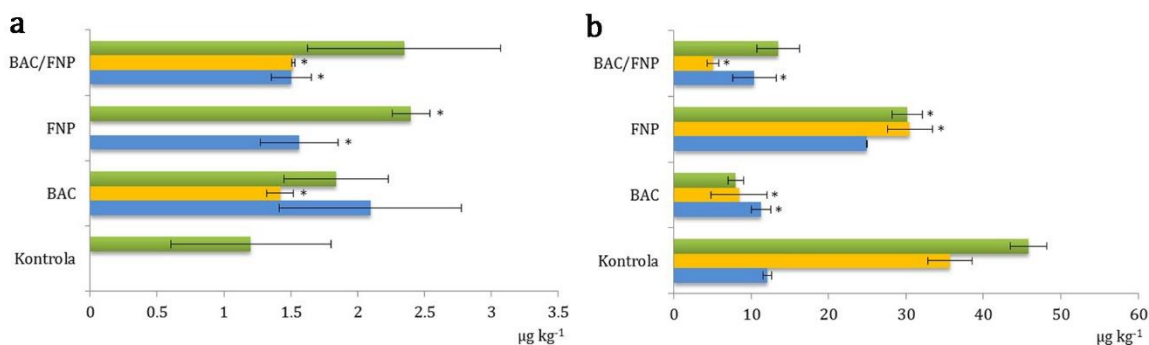
5.13.2. Efekat BAC/FNP nanokompozita na sintezu mikotoksina

Uticaja BAC/FNP nanokompozita na sintezu mikotoksina 3 poznata producenta, *Aspergillus flavus*, *A. europaeus* i *A. oryzae*, ispitivan je ELISA imunoenzimskim testovima za kvantitativnu analizu AFB1 i OTA mikotoksina. Testiran je uticaj koncentracije od 0,003/0,0052 $\mu\text{g ml}^{-1}$, dok su za kontrole BAC i FNP korišćene koncentracije od 0,003 $\mu\text{g ml}^{-1}$, odnosno 0,0052 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Uporedo sa praćenjem sinteze AFB1 i OTA, određivan je i prinos biomase u tečnim kulturama obogaćenim testiranim supstancama.

Kvantitativna analiza AFB1 u kontrolnim kulturama *A. flavus* i *A. europaeus* ukazala je na odsustvo mikotoksina, ili na koncentracije AFB1 koje su ispod mernog opsega ELISA testa ($<1 \mu\text{g kg}^{-1}$), dok je u kulturi *A. oryzae* izmeren nivo aflatoksina B1 iznosio $1,201 \pm 0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Slika 110a). Svi testirani agensi su u manjoj ili većoj meri stimulisali produkciju AFB1, sa izuzetkom FNP u kulturi *A. europaeus*. Da nanočestice fulerenola zaista nemaju efekat na sintezu aflatoksina B1 kod *A. europaeus* potvrđeno je jako sličnim koncentracijama AFB1 izmerenim u kulturi tretiranoj biocidom BAC ($1,422 \pm 0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) i BAC/FNP nanokompozitom ($1,518 \pm 0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$). U kulturi *A. oryzae*, FNP i BAC/FNP su indukovali dvostruku produkciju AFB1 ($2,399 \pm 0,14$ i $2,347 \pm 0,72 \mu\text{g kg}^{-1}$) u poređenju sa kontrolom i 30% više u odnosu na BAC. Nasuprot *A. oryzae*, u kulturi *A. flavus* BAC se pokazao kao najefikasniji inducer produkcije AFB1 ($2,095 \pm 0,68 \mu\text{g kg}^{-1}$), dok su koncentracije mikotoksina u kulturama tretiranim sa BAC/FNP i FNP bile niže i gotovo identične ($1,505 \pm 0,15$ i $1,562 \pm 0,29 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Za razliku od aflatoksina B1, ohratoksin A je zabeležen u svim kontrolnim uzorcima u opsegu od $12,08 \pm 0,58$ do $45,85 \pm 2,35 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Slika 110b). Takođe, nasuprot AFB1, u kulturama *A. oryzae* i *A. europaeus*, obogaćenim testiranim agensima, uočeno je značajno smanjenje koncentracije OTA. U kulturi *A. europaeus* tretiranoj FNP zabeleženo je neznatno sniženje koncentracije OTA, dok su BAC i BAC/FNP u značajnoj meri inhibirali sintezu ovog toksina ($8,43 \pm 3,58$ i $5,09 \pm 0,77 \mu\text{g}$

kg⁻¹). Veoma slični rezultati, sa FNP kao slabim, a BAC i BAC/FNP kao jakim inhibitorima sinteze OTA su zabeleženi za *A. oryzae*. U kulturi *A. flavus*, tretiranoj BAC i BAC/FNP, koncentracije OTA su bile u nivou kontrolne kulture, ukazujući na odsustvo efekta testiranih agenasa na sintezu OTA. Međutim, tretman sa FNP nije za posledicu imao inhibiciju, već dvostruko povećanje produkcije OTA (24,95±0,05 µg kg⁻¹).



Slika 110. Produkcija mikotoksina u kulturama *Aspergillus oryzae* [-], *A. flavus* [-] i *A. europaeus* [-] obogaćenim benzalkonijum hloridom (BAC), nanočesticama fulerenola C₆₀(OH)₂₄ (FNP) i BAC/FNP nanokompozitom: **a.** Aflatoksin B1; **b.** Ochratoxin A. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti broja merenja sa standardnom greškom

Biomasa kontrolnih kultura se kretala u opsegu od 0,851±0,06 do 1,291±0,04 g suve mase micelije, dok su svi tretmani u velikoj meri redukovali količinu produkovane biomase (Tabela 16). Od korišćenih agenasa, BAC/FNP je demonstrirao bolju aktivnost u poređenju sa BAC i FNP. Svi izolati su bili podjednako podložni efektu BAC/FNP, sa prosečnim prinosom biomase od 0,001±0,00 g suve mase micelije. Među testiranim izolatima, *A. europaeus* se pokazao kao najviše osetljiv na FNP, dok je *A. oryzae* karakterisala najveća rezistentnost ka tretmanu BAC.

Tabela 16. Prinos biomase mikromiceta formiran u kulturama pod uticajem nanočestica fulerenola C₆₀(OH)₂₄ (FNP), benzalkonijum hlorida (BAC) i BAC/FNP nanokompozita

Izolat	Suva masa micelije (g)			
	Kontrola	FNP	BAC	BAC/FNP
<i>Aspergillus europaeus</i>	0,851 ± 0,06	0,010 ± 0,01	0,001 ± 0,00	0,001 ± 0,00
<i>Aspergillus flavus</i>	1,291 ± 0,04	0,294 ± 0,03	0,001 ± 0,00	0,001 ± 0,00
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,031 ± 0,12	0,229 ± 0,05	0,003 ± 0,00	0,001 ± 0,00

Veliki broj istraživanja je do danas sproveden kako bi se utvrdila uloga faktora stresa na sintezu mikotoksina kod filamentoznih gljiva (Schmidt-Heydt i dr., 2008). U tom pogledu, precizno određivanje fungistatske i fungicidne aktivnosti testiranog agensa je od velikog značaja jer pogrešna procena i primena subinhibitornih koncentracija biocida za posledicu imaju ne samo preživljavanje gljiva, već i stimulisanu produkciju mikotoksina (Magan i dr., 2002). Međutim, rast mikromiceta i sinteza mikotoksina nisu uvek uzajamno isključivi procesi (Hope i dr., 2002). U kulturama toksikogenih vrsta roda *Aspergillus*, gajenih u GPK medijumu, prinos biomase je bio značajno redukovan pod uticajem BAC/FNP i BAC. Međutim, zabeležena je povećana produkcija aflatoksina B1. Testirane koncentracije nanokompozita i biocida, mada 25 do 100 puta niže u poređenju sa MIC vrednostima, su ipak delovale stresogeno na gljive, stimulišući produkciju AFB1 kao odbrambeni odgovor na nastale uslove stresa. Ovi rezultati su u potpunom skladu sa istraživanjima gde je pokazano da niske koncentracije fungicida dovode do pojačane sinteze mikotoksina vomitoksina i nivalenola kod vrsta roda *Fusarium*, kao i aflatoksina B1 i G1 kod *A. parasiticus* (Badii i Moss, 1988; Gareis i Ceynowa, 1994; Magan i dr., 2002). S druge strane, tretmani sa BAC/FNP i BAC su doveli do smanjenja koncentracije OTA kod *A. oryzae* i *A. europaeus*, dok u kulturi *A. flavus* nisu zabeležene značajne razlike u poređenju sa kontrolnim uzorkom.

Na osnovu svega iznetog, može se zaključiti da nanokompozit i čist biocid deluju kao veoma snažni aktivatori ili inhibitori sinteze AFB1 i OTA mikotoksina, što varira u zavisnosti od testirane vrste i analiziranog mikotoksina. Ove razlike su verovatno posledica kompleksnih interakcija testiranih agenasa sa izolatima, kao i ekoloških i razvojnih faktora koji deluju na transkripcionom nivou, pojačavajući ili smanjujući ekspresiju gena koji imaju ključnu ulogu u biosintezi mikotoksina. Pošto sinergističko dejstvo raznovrsnih faktora može uticati na sintezu i prisustvo mikotoksina, procena rizika od izloženosti je veoma diskutabilna. Rast toksikogenih mikromiceta na zidnim slikama, malteru i drugim površinama unutar crkve, nakon neadekvatnog tretmana fungicidima, može stimulisati sintezu nekih mikotoksina sa širokim spektrom bioloških aktivnosti, od inflamatorne i imunosupresivne, preko citotoksične, do teratogene i kancerogene (Tola i Kebede, 2016). U tom pogledu, pojačana sinteza AFB1, indukovana niskim koncentracijama biocida, je veoma nepoželjna jer AFB1 predstavlja veoma potentnu kancerogenu, mutagenu i teratogenu supstancu biološkog porekla (Conner, 1993). Skoro je utvrđeno da je koža čoveka manje permeabilna za AFB1, u poređenju sa OTA, ali da izlaganje kože putem kontaminiranih površina predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik koji se mora po svaku cenu izbegavati (Boonen i dr., 2012). Shodno tome, mada su BAC/FNP i BAC sa jako niskim MIC i MFC vrednostima, zabeleženim tokom testova *in vitro*, pokazali veliki potencijal za primenu *in situ*, precizan proračun neophodnih koncentracija biocida za tretmane zidnih slika je neophodan da bi se sprčila povećana produkcija AFB1 kao posledica efekta subinhibitornih koncentracija BAC/FNP i BAC.

5.13.3. Antifungalna aktivnost etarskih ulja tamjana i smirne

Etarska ulja čija je antifungalna aktivnost testirana dobijena su iz tamjana (smola tamjan drveta - *Boswellia carteri*) i smirne (smola balzamovog drveta - *Commiphora myrrha*).

5.13.3.1. Antifungalna aktivnost etarskog ulja tamjana

5.13.3.1.1. Hemijski sastav

Etarsko ulje tamjana (prinos 2,28% w/w) je transparentno i jakog mirisa. U ulju je detektovano 57 komponenti i identifikovano 55, što predstavlja 98,99% (Tabela 17). Deset komponenti je zabeleženo u tragovima. Monoterpenski ugljovodonici su dominantni u ulju sa 87,51%. Dominantna komponenta je α -pinen zastupljena sa 38,41%. Druge komponente ulja prisutne u značajnom procentu su: mircen (15,21%), sabinen (12,13%) i limonen (6,24%) (Slika 111).

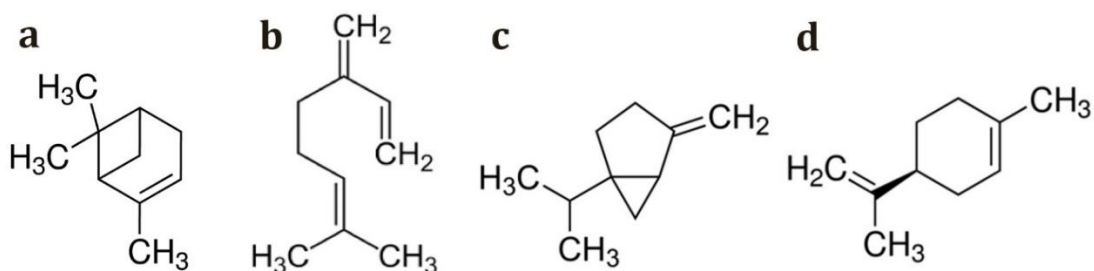
Tabela 17. Sastav etarskog ulja tamjana

Broj	RI ^a	Naziv i klasa jedinjenja	Sadržaj (%) ^b
1	920	Ni	1,22
2	923	Triciklen	tr
3	926	α -Tujen	3,07
4	935	α -Pinen	38,41
5	945	Kampfen	0,34
6	953	Tuja-2,4(10)-dien	0,15
7	974	Sabinen	12,13
8	977	β -Pinen	1,71
9	992	Mircen	15,21
10	1006	α -Felandren	3,03
11	1011	δ -3-Karen	0,81
12	1017	α -Terpinen	0,40
13	1024	<i>p</i> -Cimen	2,09
14	1028	Limonen	6,26
15	1030	1,8-Cineol	0,58
16	1036	(<i>Z</i>)- β -Ocimen	1,88
17	1046	(<i>E</i>)- β -Ocimen	0,49
18	1058	γ -Terpinen	0,72
19	1089	Terpinolen	0,21
20	1100	Linalol	0,26
21	1103	Perilen	0,11
22	1125	α -Kamfolenal	0,17
23	1129	Ni	0,15
24	1137	<i>trans</i> -Pinokarveol	0,21
25	1140	<i>cis</i> -Verbenol	tr

- REZULTATI I DISKUSIJA -

26	1143	<i>trans</i> -Verbenol	0,26
27	1165	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	0,22
28	1175	Terpinen-4-ol	0,65
29	1189	α -Terpineol	0,12
30	1194	Mirtenol	0,11
31	1207	Verbenon	0,11
32	1210	Oktanol acetat	0,12
33	1284	Bornil acetat	0,11
34	1338	δ -Elemen	tr
35	1349	α -Kubeben	0,13
36	1376	α -Kopen	0,42
37	1385	β -Burbonen	0,69
38	1393	β -Elemen	1,13
39	1410	Sibiren	tr
40	1420	(<i>E</i>)-Kariofilen	1,31
41	1429	β -Kopen	tr
42	1439	Premnaspriodien	tr
43	1444	6,9-Guaiadien	0,31
44	1450	<i>cis</i> -Murola-3,5-dien	tr
45	1454	α -Humulen	0,23
46	1462	Alo-Aromadendren	0,13
47	1479	γ -Murolen	0,24
48	1484	Germakren D	0,74
49	1488	β -Selinen	0,37
50	1493	<i>trans</i> -Murola-4(14),5-dien	tr
51	1497	α -Selinen	0,23
52	1498	Biciklogermakren	0,44
53	1502	α -Murolen	tr
54	1509	Germakren A	0,16
55	1515	γ -Kadinen	0,24
56	1525	δ -Kadinen	0,32
57	1642	τ -Kadinol	tr
Ukupni monoterpeni			90,04
		Monoterpenski ugljovodonici	87,51
		Oksidovani monoterpeni	2,54
Ukupni seskviterpeni			7,58
		Seskviterpenski ugljovodonici	7,53
		Oksidovani seskviterpeni	0,05
Nepoznato			1,37
UKUPNO			98,99

^a RI: Kovačev retenconci indeks na DB-5 koloni dobijen upotrebom alkana; ^b Relativni procenat dobijen analizom odgovarajućih GC-FID pikova; Ni: neidentifikovano; tr: tragovi;



Slika 111. Strukturne formule dominantnih komponenti etarskog ulja tamjana: **a.** α -pinen; **b.** mircen; **c.** sabinen; **d.** limonen

Dominantna grupa jedinjenja etarskog ulja tamjana poreklom iz Etiopije i Somalije su monoterpeni ugljovodonici (Baser i dr., 2003; Camarda i dr., 2007). Etarsko ulje tamjana iz Somalije odlikuje prisustvo dominantnih komponenti: α -pinen, sabinen i limonen (Abdulwahab i dr., 1987; Chiavari i dr., 1991). Rezultati našeg istraživanja sastava etarskog ulja tamjana, poreklom iz Somalije, su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima.

5.13.3.1.2. Antifungalna aktivnost

Antifungalna aktivnost etarskog ulja tamjana testirana je mikrodilucionom metodom na po 3 *Aspergillus* i *Penicillium* vrste, i na 2 vrste roda *Cladosporium*. Svi testirani izolati gljiva vode poreklo iz vazduha i sa oštećenih zidnih slika istraživane crkve. Testirane koncentracije etarskog ulja i biocida BAC, korišćenog kao pozitivna kontrola, bile su u opsegu od 0,1 do 200 mg ml⁻¹. Vrednosti MIC i MFC za etarsko ulje i biocid određene su kod svih izolata, i iznose od 10 do 120 mg ml⁻¹ za etarsko ulje, odnosno 0,15 do 0,75 mg ml⁻¹ za biocid (Tabela 18). *C. uredinicola* (MIC i MFC 10 mg ml⁻¹), *C. cladosporioides* i *P. lanosum* (MIC 10 mg ml⁻¹ i MFC 30 mg ml⁻¹) su bili najosetljiviji na testirano ulje. Najveću rezistenciju pokazao je izolat *A. flavus* (MIC i MFC 120 mg ml⁻¹). Biocid BAC je imao značajno veću aktivnost u poređenju sa etarskim uljem *B. carteri*, sa MIC i MFC vrednostima u opsegu od 0,15 do 0,75 mg ml⁻¹ (Tabela 18). *A. niger* i *P. lanosum* su bili najosetljiviji, sa fungicidnim efektom

postignutim već pri koncentraciji od 0,15 mg ml⁻¹, dok su najrezistentniji izolati bili *A. europaeus* i *A. flavus* (MIC i MFC 0,75 mg ml⁻¹).

Tabela 18. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) etarskog ulja tamjana i biocida benzalkonijum hlorida (BAC) određene mikrodilucionom metodom

Testirane mikromicete	Etarsko ulje tamjana (mg ml ⁻¹)		BAC (mg ml ⁻¹)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus flavus</i>	120,0	120,0	0,75	0,75
<i>Aspergillus niger</i>	50,0	50,0	0,15	0,15
<i>Aspergillus europaeus</i>	10,0	30,0	0,75	0,75
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10,0	30,0	0,25	0,25
<i>Cladosporium uredinicola</i>	10,0	10,0	0,25	0,25
<i>Penicillium bilaiae</i>	30,0	90,0	0,65	0,65
<i>Penicillium lanosum</i>	10,0	50,0	0,15	0,15
<i>Penicillium manginii</i>	20,0	50,0	0,25	0,25

Istraživanja antifungalne aktivnosti etarskog ulja tamjana uglavnom su se bazirala na testiranju osjetljivosti kvasaca, a u mnogo manjoj meri filamentoznih mikromiceta. Određivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja iz smola nekoliko vrsta roda *Boswellia* pokazalo je da etarsko ulje iz tamjana ima najjače inhibitorno dejstvo na *Candida albicans* i *C. tropicalis* (Camarda i dr., 2007). U istraživanju Mohamed i dr. (2015) izolat *C. albicans* je bio najrezistentniji, dok je testirano ulje kod izolata *Saccharomyces cerevisiae* izazvalo fungicidni efekat pri niskim koncentracijama ulja. Klinički izolati *Candida* spp., poreklom iz usne duplje čoveka, i ATCC sojevi *C. albicans* i *C. tropicalis* su pokazali najveću osjetljivost na komercijalno etarsko ulje *B. carteri* u odnosu na druga testirana ulja predstavnika porodice Burseraceae (Nikolić i dr., 2016). Devet komercijalnih etarskih ulja *B. carteri* su pokazala umerenu do slabu antifungalnu aktivnost na *C. albicans* (Van Vuuren i dr., 2010). Velika osjetljivost kvasaca na tretman etarskim uljima je direktna posledica strukturnih i funkcionalnih oštećenja ćelijske membrane pod uticajem komponenti ulja (Mohamed i dr., 2015). Uticaj etarskog ulja tamjana na filamentozne gljive istraživan je sporadično. Etarsko

ulje *B. carteri*, pri koncentracijama od 1,75 mg ml⁻¹ i 1,25 mg ml⁻¹, inhibira rast micelije i sintezu aflatoksina u kulturi *A. flavus* (Prakash i dr., 2014). Komponente etarskog ulja za koje je dokazana antifungalna aktivnost su limonen, linalol i α -terpineol (Carson i Riley, 1995; Pattnaik i dr., 1997; Aggarwal i dr., 2002). Navedene komponente su takođe identifikovane u našem istraživanju. Zabeležene MIC i MFC vrednosti, u našem istraživanju, višestruko prevazilaze ranije publikovane rezultate. Daleko veća rezistencija originalnih nepasažiranih testiranih sojeva poreklom sa zidnih slika i iz vazduha istraživane crkve može se tumačiti adaptabilnim karakteristikama izolata poreklom iz ekstremnog mikrostaništa. Interesantno je istaći da su izolati roda *Cladosporium* pokazali najveću osetljivost na testirano ulje. Ovo je značajno zbog toga što su navedene *Cladosporium* vrste detektovane kao aktivno rastuće u bojenom sloju zidnih slika (Unković i dr., 2015; 2016). Nesumnjivo, ovaj primer pokazuje neophodnost testiranja osetljivosti originalnih sojeva sa zidnih slika u cilju potencijalne *in situ* primene alternativnih agenasa biološkog porekla.

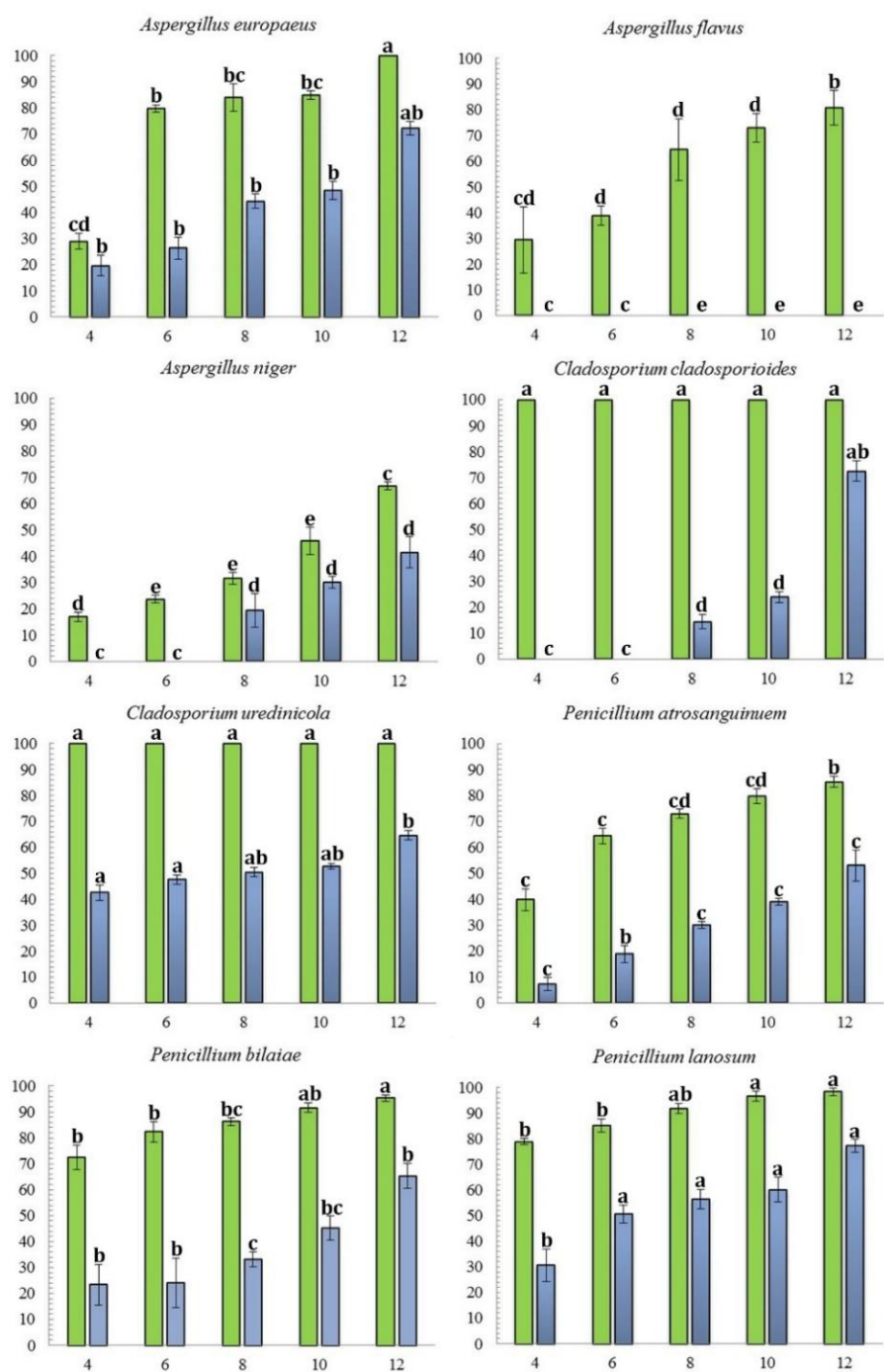
Zabeležena snažna antifungalna aktivnost biocida BAC se poklapa sa literaturnim podacima (Tortorano i dr., 2005; Vijayakumar i dr., 2012; Xu i dr., 2013). Fungistatičko i fungicidno dejstvo, potvrđeno i u prethodnom eksperimentu sa BAC/FNP nanokompozitom, opravdava korišćenje ovog biocida u prevenciji i sanaciji infestacija kulturnih dobara.

5.13.3.1.3. Antifungalna aktivnost isparljive faze

Za testiranje antifungalnog efekta isparljive faze (volatilna frakcija) etarskog ulja tamjana korišćena je modifikovana metoda mikroatmosfera. Kako su fungalne propagule u vazduhu jedan od glavnih izvora kontaminacije zidnih slika, odlučeno je da se testira uticaj isparenja etarskog ulja (u opsegu koncentracija 4 do 12 mg cm⁻³) samo na klijanje konidija istog seta izolata mikromiceta korišćenih u mikrodilucionoj metodi. Inhibicija germinacije konidija (%) indukovana volatilnom frakcijom etarskog ulja tamjana predstavljena je na Slici 112. Razlike između srednjih vrednosti inhibicije

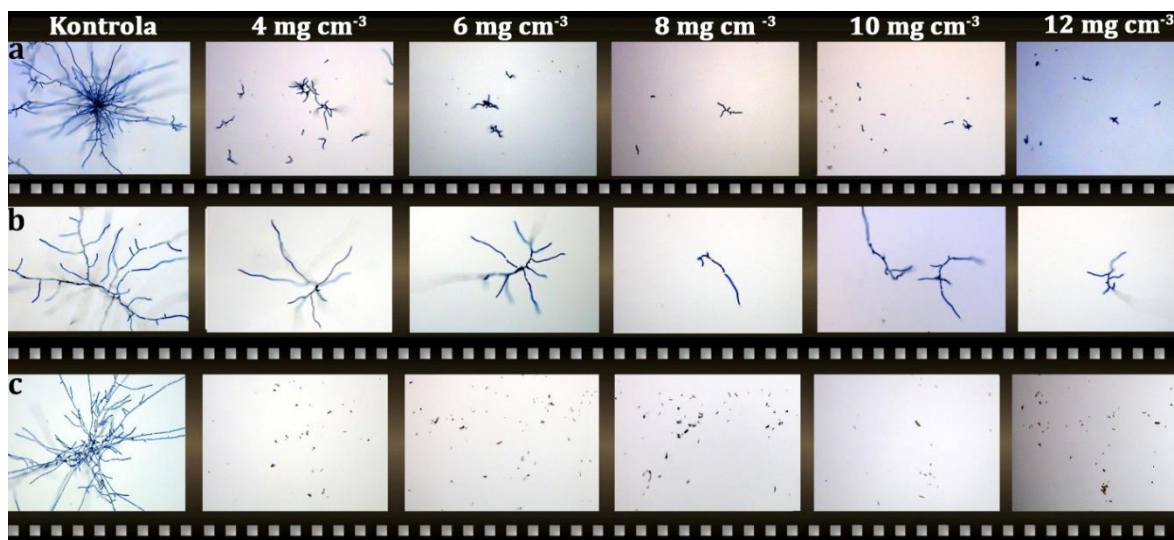
u okviru svake testirane koncentracije praćene između istih oznaka nisu statistički značajne (Takijev test, $p < 0,05$). Eksperiment je pokazao da su konidije testiranih vrsta izuzetno osetljive na tretman isparljivom fazom etarskog ulja. Potpuna inhibicija germinacije ($100\% \pm 0,0$), pri svim testiranim koncentracijama ulja, zabeležena je kod *C. cladosporioides* i *C. uredinicola*, čime je dodatno potvrđena velika osetljivost u mikrodilucionoj metodi za ova 2 izolata, aktivno rastuća u bojenom sloju zidnih slika. Visok stepen inhibicije germinacije, bez statističke značajnosti, je zabeležen kod *P. lanosum* ($98,38 \pm 1,6\%$), *P. bilaiae* ($95,37 \pm 1,24\%$) i *A. europaeus* ($100\% \pm 0,0$) na maksimalnoj testiranoj koncentraciji ulja. S druge strane, najmanji stepen inhibicije germinacije je zabeležen kod *A. niger* ($66,71 \pm 1,51\%$) i *A. flavus* ($80,82 \pm 6,71\%$) pri svim koncentracijama, ali je pri maksimalnoj koncentraciji inhibicija statistički značajna.

Isparavanje biocida BAC je izazvalo mnogo manji procenat inhibicije germinacije konidija u odnosu na testirano etarsko ulje. Potpuna inhibicija nije zabeležena ni kod jednog od testiranih izolata, dok je *A. flavus* ($0,0 \pm 0,0$) pokazao potpunu rezistentnost pri svim testiranim koncentracijama (Slika 112). *A. niger* i *C. cladosporioides* su bili potpuno rezistentni pri najnižim testiranim koncentracijama (4 i 6 mg cm^{-3}). Najveći stepen inhibicije je zabeležen kod *P. lanosum* ($77,27 \pm 2,59\%$), *A. europaeus* ($72,32 \pm 2,57\%$) i *C. cladosporioides* ($72,43 \pm 3,93\%$) pri maksimalnoj koncentraciji ulja. Statistički značajna aktivnost je zabeležena na 12 mg cm^{-3} ulja za *C. uredinicola* i *P. bilaiae*. Značajno manja antifungalna aktivnosti biocida zabeležena u ovoj metodi, u poređenju sa mikrodilucionom, je verovatno posledica manje stopa isparavanja biocida BAC na sobnoj temperaturi i odsustva kontakta biocida sa konidijama.



Slika 112. Inhibicija germinacije konidija (%) indukovana isparljivom fazom etarskog ulja tamjana [-] i biocida benzalkonijum hlorida [-] u različitim koncentracijama (4-12 mg cm^{-3}). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti broja merenja sa standardnom greškom

Uticaj isparljive faze testiranog ulja na germinaciju konidija ilustrovan je mikrosnimcima datim na Slici 113. Odsustvo klijanja konidija *C. cladosporioides* konstatovano je već pri najnižoj testiranoj koncentraciji ulja (Slika 113c). Germinativne cevčice najmanje dužine zabeležene su za *P. bilaiae* (Slika 113a), dok je najveća rezistencija, tj. formirane hife, konstatovana kod izolata *A. flavus*.



Slika 113. Mikroskopski snimci germinacije konidija pod uticajem isparljive faze etarskog ulja tamjana (24 h, MEA): **a.** *Penicillium bilaiae*; **b.** *Aspergillus flavus*; **c.** *Cladosporium cladosporioides*

Prema literaturnim podacima, testiranje antifungalnog dejstva isparljive faze etarskih ulja, metodom mikroatmosfera, ali na germinaciju konidija nije rađeno. Umerena antifungalna aktivnost isparljive faze komercijalnog etarskog ulja *B. carteri* testirana je istom metodom ali na rast micelije gljiva izolovanih sa predmeta i kulturnih dobara (Stupar i dr., 2016). Takođe je ispitivan i kontaktni efekat etarskog ulja *B. carteri*, mikrodilucionom metodom, na germinaciju konidija kod gljiva kontaminanata hrane (Udomsilp i dr., 2009). Isparljiva faza etarskih ulja poseduje mnogo jači antifungalni potencijal, u poređenju sa samim uljem, s obzirom na jaču aktivnost pri nižim koncentracijama (Laird i Phillips, 2011). Kod ulja koja u sastavu

imaju alkohole, ketone, estre, okside i ugljene hidrate, glavni inhibitorni efekat na rast mikromiceta zasniva se na isparljivosti i aktivnosti isparljivih komponenti (Inouye i dr., 2006). Veća aktivnost isparljive faze ulja je posledica toga što isparljive komponente u vazduhu mogu slobodno da se vežu i ugrade u strukturu lipidnih delova plazma membrane čime se narušava njena funkcija, dok se lipofilni molekuli u ulju udružuju, što dovodi do nastanka micela i sprečavanje vezivanja ulja za organizam (Inouye i dr., 2000; 2003). U poređenju sa antifungalnom aktivnošću ulja, isparljiva faza pokazuje mnogo jaču antifungalnu aktivnost prema izolatima sa zidnih slika i iz vazduha, što podržava generalni stav o većem antifungalnom potencijal isparljive faze etarskih ulja.

5.13.3.2. Antifungalna aktivnost etarskog ulja smirne

5.13.3.2.1. Hemijski sastav

Etarsko ulje izolovano iz smirne sa prinosom od 0,32% (w/w) je bezbojno i jakog mirisa. U ulju je detektovano 40 i identifikovano 33 komponente, što čini 98,99%. Komponente etarskog ulja smirne su predstavljene u Tabeli 19. Dve komponente su zabeležene u tragovima. U ulju su dominantni seskviterpenski ugljovodonici sa 58,47%. Glavna komponenta ulja je RI 1631; 17,65%. Komponente prisutne u značajnom procentu su kurzeren (12,97%), β -elemen (12,70%), germakren B (12,15%), germakren D (9,13%), germakren A (5,87%) i komponenta RI 1636 (5,34%) (Slika 114).

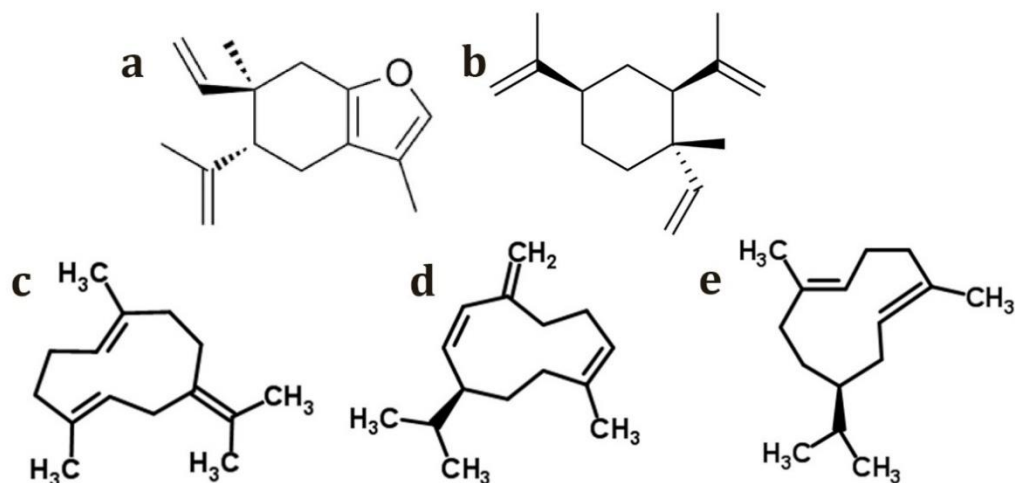
Tabela 19. Sastav etarskog ulja smirne

Broj	RI ^a	Naziv i klasa jedinjenja	Sadržaj (%) ^b
1	935	α -Pinen	tr
2	992	Mircen	0,22
3	1028	Limonen	0,12
4	1338	δ -Elemen	3,00
5	1349	α -Kubeben	0,12

- REZULTATI I DISKUSIJA -

6	1376	α -Kopen	0,43
7	1385	β -Burbanon	2,08
8	1393	β -Elemen	12,70
9	1420	(<i>E</i>)-Kariofilen	2,63
10	1429	β -Kopen	0,57
11	1434	γ -Elemen	0,72
12	1445	<i>trans</i> -Murola-3,5-dien	0,60
13	1450	<i>cis</i> -Murola-3,5-dien	0,19
14	1454	α -Humulen	1,26
15	1459	(<i>E</i>)- β -Farbesen	0,32
16	1462	Alo-Aromadendren	0,15
17	1468	<i>cis</i> -Kadina-1(6),4-dien	0,51
18	1471	Ni	0,29
19	1474	Ni	0,38
20	1479	γ -Murolen	0,89
21	1484	Germacren D	9,13
22	1488	β -Selinen	1,77
23	1493	<i>trans</i> -Murola-4(14),5-dien	0,41
24	1497	α -Selinen	1,58
25	1502	Kurzeren	12,97
26	1504	α -Murolen	0,40
27	1509	Germakren A	5,87
28	1515	γ -Kadinen	0,18
29	1525	δ -Kadinen	0,69
30	1543	Selina-3,7(11)-dien	0,11
31	1552	Hedikariol	0,13
32	1561	Germakren B	12,15
33	1579	3,9-Epoksi-p-menta-3,8-dien	0,84
34	1631	Ni	17,65
35	1636	Ni	5,34
36	1642	τ -Kadinol	tr
37	1680	Ni	0,11
38	1695	Ni	2,05
39	1698	Germakron	0,11
40	1721	Ni	0,19
Ukupni monoterpeni			0,40
Monoterpenski ugljovodonici			0,40
Ukupni seskviterpeni			73,79
Seskviterpenski ugljovodonici			58,47
Oksidovani seskviterpeni			15,32
Drugi			0,84
Nepoznato			23,97
UKUPNO			98,99

^a RI: Kovačev retenconi indeks na DB-5 koloni dobijen upotrebom alkana; ^b Relativni procenat dobijen analizom odgovarajućih GC-FID pikova; Ni: neidentifikovano; tr: tragovi;



Slika 114. Strukturne formule dominantnih komponenti etarskog ulja smirne: **a.** kurzeren; **b.** β -elemen; **c.** germakren B; **d.** germakren D; **e.** germakren A

Sastav etarskog ulja smirne pokazao je visok sadržaj seskviterpenskih ugljovodonika i oksidovanih seskviterpena, uz potpuno odsustvo monoterpenskih ugljovodonika (Abegaz i dr., 1989). U analizama etarskog ulja smirne kao dominantne komponente često su detektovani kurzeren, δ -elemen i germakren D (Baser i dr., 2003; Morteza-Semnani i Saedi, 2003; Marongiu i dr., 2005). Rezultati našeg istraživanja sastava etarskog ulja smirne u potpunosti se slažu sa navedenim podacima.

5.13.3.2.2. Antifungalna aktivnost

Antifungalna aktivnost etarskog ulja smirne je testirana mikrodilucionom metodom na 8 izolata vrsta rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*. Testirane koncentracije etarskog ulja i biocida BAC, korišćenog kao pozitivna kontrola, iznosile su od 0,1 do 200 mg ml⁻¹. Vrednosti MIC i MFC za etarsko ulje i biocid određene su za sve testirane izolate (Tabela 20). Ulje smirne je pokazalo slabu antifungalnu aktivnost, u poređenju sa etarskim uljem tamjana i biocidom BAC, što se može zaključiti na

osnovu veoma visokih MIC (12,5 do 150 mg ml⁻¹) i MFC (25 do 185,5 mg ml⁻¹) vrednosti. Od testiranih izolata, *A. europaeus* je najosetljiviji, sa rastom potpuno inhibiranim već pri koncentraciji od 25 mg ml⁻¹. S druge strane, *P. bilaiae* je pokazao najveću rezistentnost (MIC 75 mg ml⁻¹ i MFC 185,5 mg ml⁻¹).

Značajne razlike u MIC i MFC vrednostima između testiranih etarskih ulja tamjana i smirne postoje kod većine izolata, ali su posebno izražene u slučaju *C. cladosporioides* i *C. uredinicola* gde je zabeležena osetljivost ovih izolata prema ulju tamjana veća 10 puta. S druge strane, *A. europaeus*, *P. lanosum* i *P. manginii* su pokazali veću osetljivost prema tretmanu etarskim uljem smirne .

Tabela 20. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) etarskog ulja smirne i biocida benzalkonijum hlorida (BAC) određene mikrodilucionom metodom

Testirane mikromicete	Etarsko ulje smirne (mg ml ⁻¹)		BAC (mg ml ⁻¹)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus flavus</i>	125,0	150,0	0,75	0,75
<i>Aspergillus niger</i>	150,0	150,0	0,15	0,15
<i>Aspergillus europaeus</i>	12,5	25,0	0,75	0,75
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	112,5	125,0	0,25	0,25
<i>Cladosporium uredinicola</i>	112,5	112,5	0,25	0,25
<i>Penicillium bilaiae</i>	75,0	187,5	0,65	0,65
<i>Penicillium lanosum</i>	12,5	37,5	0,15	0,15
<i>Penicillium manginii</i>	12,5	125,0	0,25	0,25

Jako mali broj istraživanja se bavio procenom antifungalne aktivnosti etarskog ulja smirne. Sprovedena istraživanja uglavnom su se fokusirala na testiranje efikasnosti ulja na kliničke izolate kvasaca *C. albicans*, *C. neoformans* i *S. cerevisiae* (De Rapper i dr., 2012; Mohamed i dr., 2014). Komercijalno ulje je pokazalo slabo dejstvo na izolate *Candida* spp., poreklom iz usne duplje čoveka, i ATCC sojeve *C. albicans* i *C. tropicalis* (Nikolić i dr., 2016). Samo su Prakash i dr. (2012) testirali uticaj etarskog ulja smirne na filamentozne gljive, kontaminante hrane. Među korišćenim izolatima

nalaze se i vrste testirane u ovom istraživanju (*A. flavus*, *A. niger* i *C. cladosporioides*). Za sve izolate gljiva, MIC vrednosti, određene mikrodilucionom metodom, bile se u opsegu od 2,5 do 3,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$. U poređenju sa navedenim literaturnim podacima, testirano ulje u našem eksperimentu je pokazalo slabiju antifungalnu aktivnost.

5.13.3.3. Antifungalna aktivnost smeše etarskih ulja tamjana i smirne

Kako bi se ispitalo sinergističko dejstvo etarskih ulja tamjana i smirne, često korišćenih zajedno u religioznim obredima, testirana je antifungalna aktivnost smeše ulja u odnosu 3:1 (tamjan : smirna). Kao i u slučaju pojedinačnih ulja, korišćena je mikrodiluciona metoda a koncentracije smeše bile su u opsegu od 0,1 do 200 mg ml^{-1} . MIC i MFC vrednosti smeše etarskih ulja, u opsegu od 4 do 100 mg ml^{-1} , određene su za sve testirane izolate gljiva (Tabela 21). U poređenju sa pojedinačnim uljima, smeša je pokazala najveću antifungalnu aktivnost, sa prisutnim sinergističkim dejstvom ulja i bez zabeleženog antagonizma. Sa MIC i MFC vrednošću od 4 mg ml^{-1} *C. uredinicola* je bio najpodložniji delovanju ulja, praćen sa *C. cladosporioides* (MIC 4 mg ml^{-1} i MFC 10 mg ml^{-1}) i *A. europaeus* (MIC 4 mg ml^{-1} i MFC 20 mg ml^{-1}). S druge strane, *A. flavus* je demonstrirao najveću otpornost ka smeši ulja (MIC i MFC 100 mg ml^{-1}).

Tabela 21. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) smeše etarskih ulja tamjana i smirne, i biocida benzalkonijum hlorida (BAC) određene mikrodilucionom metodom

Testirane mikromicete	Smeša etarskih ulja tamjana i smirne (3:1) (mg ml^{-1})		BAC (mg ml^{-1})	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus flavus</i>	100,0	100,0	0,75	0,75
<i>Aspergillus niger</i>	40,0	40,0	0,15	0,15
<i>Aspergillus europaeus</i>	4,0	20,0	0,75	0,75
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4,0	10,0	0,25	0,25
<i>Cladosporium uredinicola</i>	4,0	4,0	0,25	0,25
<i>Penicillium bilaiae</i>	20,0	20,0	0,65	0,65
<i>Penicillium lanosum</i>	10,0	40,0	0,15	0,15
<i>Penicillium manginii</i>	20,0	30,0	0,25	0,25

Primena etarskih ulja tamjana i smirne u smeši poznata je još iz 1550. godine p.n.e., kada je zabeležena u Ebersovom papirusu (*Papyrus Ebers*), drevnom egipatskom svitku iz Tebe kao lek za površinske rane i osip. Međutim, tek u istraživanju De Rapper i dr. (2012) po prvi put je potvrđena veća antifungalna aktivnost smeše ulja u poređenju sa pojedinačnim uljima. Mada ni u jednoj od testiranih smeša nije korišćeno etarsko ulje iz smole *B. carteri*, autori su potvrdili da smeše etarskih ulja izolovanih iz smola mnogih *Boswellia* i *Commiphora* vrsta zaista poseduju bolju antifungalnu aktivnost. Od svih testiranih smeša, kombinacija tarskih ulja iz smola *B. papyrifera* i *C. myrrha* je pokazala najbolju aktivnost na *Cryptococcus neoformans*. Uprkos dobrim rezultatima testiranja antifungalne aktivnosti smeše ulja tamjana i smirne, dobijenim u našem istraživanju, veoma mali prinos etarskog ulja smirne, čini ovu smešu neekonomičnom za primenu *in situ*.

5.13.4. Antifungalna aktivnost dima tamjana

5.13.4.1. Sastav dima i čađi

Kako je etarsko ulje tamjana pokazalo antifungalnu aktivnost, određen je i sastav dima i čađi posle paljenja tamjana, i testiran uticaj dima na rast micelije i germinaciju konidija odabranih izolata mikromiceta, polazeći od pretpostavke da je antifungalno svojstvo prisutno i u dimu i čađi zapaljenog tamjana. U dimu i čađi, nastalim paljenjem tamjana na ugljenom briketu detektovano je ukupno 34 komponente, od kojih je u dimu identifikovano 12 komponenti što predstavlja 100%, dok su 22 komponente (99,9%) identifikovane u čađi. Komponente dima i čađi su predstavljene u Tabeli 22. U spaljenom ugljenom briketu, korišćenom kao pozitivna kontrola i analiziranom pod istim uslovima, nisu zabeležene organske komponente.

Tabela 22. Sastav dima i isparljivih komponenti čađi tamjana

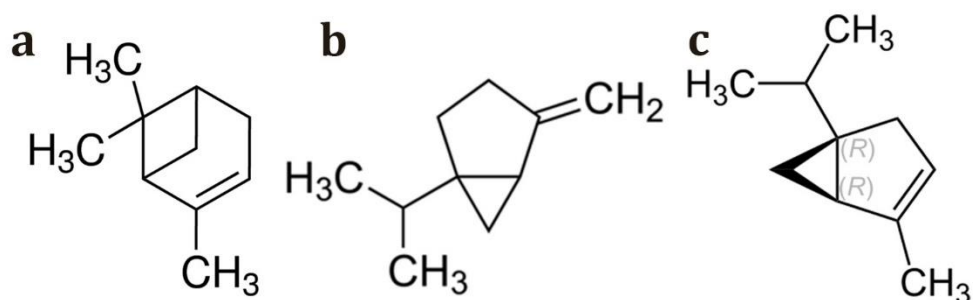
Br.	RI ^a	Jedinjenje	Dim (%) ^b	Čađ (%) ^b	Najobilniji fragmentacioni joni <i>m/z</i> (int ^{0/00}) ^c
1	877	<i>p</i> -Ksilen	0,6	-	-
2	926	Triciklen	2,6	-	-
3	930	α -Tujen	7,0	-	-
4	938	α -Pinen	68,6	-	-
5	952	Kampfen	0,8	-	-
6	954	Tuja-2,4(10)-dien	1,1	-	-
7	977	Sabinen	9,9	-	-
8	981	β -Pinen	3,6	-	-
9	995	Mircen	1,7	-	-
10	1008	α -Felandren	0,1	-	-
11	1027	<i>p</i> -Cimen	0,8	-	-
12	1031	Limonen	3,2	-	-
13	1141	<i>trans</i> -Verbenol	-	1,3	-
14	1204	Verbenon	-	0,7	-
15	1381	β -Burbonen	-	1,4	-
16	1388	β -Elemen	-	0,9	-
17	1415	(<i>E</i>)-Kariofilen	-	1,5	-
18	1440	6,9-Guaiadien	-	0,7	-
19	1483	β -Selinen	-	0,9	-
20	1511	γ -Kadinen	-	1,8	-
21	1578	Kariofilen oksid	-	0,9	-
22	1663	τ -Kadinol	-	2,8	-
23	1957	(3 <i>Z</i>)-Cembren A	-	2,5	-
24	2003	Ni	-	0,9	121(1000), 93(741), 136(693), 272(358), 91(329), 68(257), 67(250), 107(250), 79(246), 41(229)
25	2006	Ni	-	2,0	133(1000), 257(851), 135(680), 121(649), 134(645), 93(624), 119(619), 107(594), 91(587), 41(580)
26	2145	Neocembren	-	5,7	-
27	2161	Incensol	-	28,6	-
28	2163	Abienol	-	18,7	-
29	2971	Ni	-	1,3	392(1000), 255(872), 161(676), 95(640), 119(626), 81(558), 105(558), 69(530),

- REZULTATI I DISKUSIJA -

					107(529), 55(518)
30	3025	Ni	-	6,4	392(1000), 255(821), 95(412), 119(376), 105(346), 44(329), 393(319), 159(315), 55(306), 41(289)
31	3040	Ni	-	4,9	218(1000), 203(502), 95(191), 219(185), 105(169), 107(161), 93(160), 119(158), 175(151), 81(143)
32	3083	Ni	-	9,1	218(1000), 95(257), 107(253), 93(230), 203(230), 119(228), 175(226), 105(215), 122(214), 189(202)
33	3334	Ni	-	3,6	232(1000), 218(723), 135(481), 203(445), 95(378), 105(366), 55(336), 91(319), 107(318), 119(317)
34	3378	α -Amirin	-	3,3	-
Ukupni monoterpeni			99,4	2,0	
		Monoterpeni ugljovodonici	99,4	-	
		Oksidovani monoterpeni	-	2,0	
Ukupni seskviterpeni			-	10,9	
		Seskviterpeni ugljovodonici	-	7,2	
		Oksidovani seskviterpeni	-	3,7	
Ukupni diterpeni			-	55,5	
		Diterpeni ugljovodonici	-	8,2	
		Oksidovani diterpeni	-	47,3	
Ukupni triterpeni			-	3,3	
		Oksidovani triterpeni	-	3,3	
Drugi			0,6	-	
Nepoznato			-	28,2	
UKUPNO			100,0	99,9	

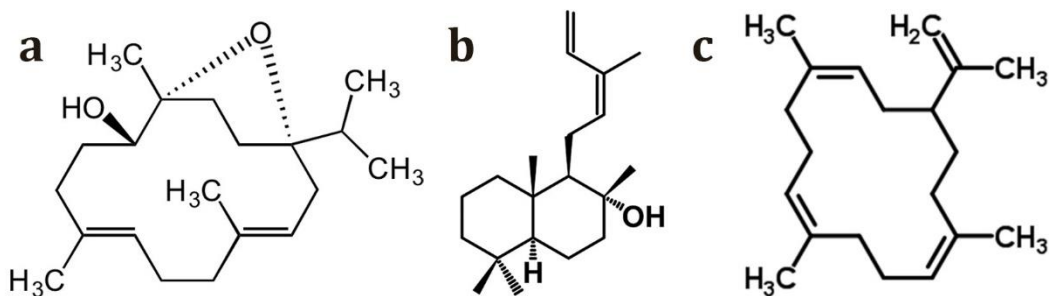
^a RI: Kovačev retenconi indeks na DB-5 koloni dobijen upotrebom alkana; ^b Relativni procenat dobijen analizom odgovarajućih GC-FID pikova; ^c Maksimalni intenzitet jona na m/z 1000; Ni: neidentifikovano;

Dominantna jedinjenja u dimu tamjana su monoterpeni ugljovodonici (99,4%). Dominantna komponenta dima je α -pinen (68,6%), a u značajnom procentu su prisutni i sabinen (9,9%) i α -tujen (7,0%) (Slika 115). Kao dominantna komponenta, α -pinen, je takođe identifikovan i u etarskom ulju tamjana, ali u manjem procentu (38,41%). Druga komponenta dima prisutna u značajnom procentu, sabinen, je prisutna i u ulju u nešto većem procentu (12,13%).



Slika 115. Strukturne formule dominantnih komponenti dima tamjana: **a.** α -pinen; **b.** sabinen; **c.** α -tujen

U čađi su dominantna jedinjenja oksidovani diterpeni (47,3%), diterpenski ugljovodonici (8,2%) i seskviterpenski ugljovodonici (7,2%). Dominantna komponenta čađi je incensol (28,6%) (Slika 116a). U značajnom procentu zastupljene su i abienol (18,7%) i neocembren (5,7%). Dominantne komponente čađi, oksidovani diterpeni, u potpunosti izostaju kod etarskog ulja i dima jer su manje isparljivi.

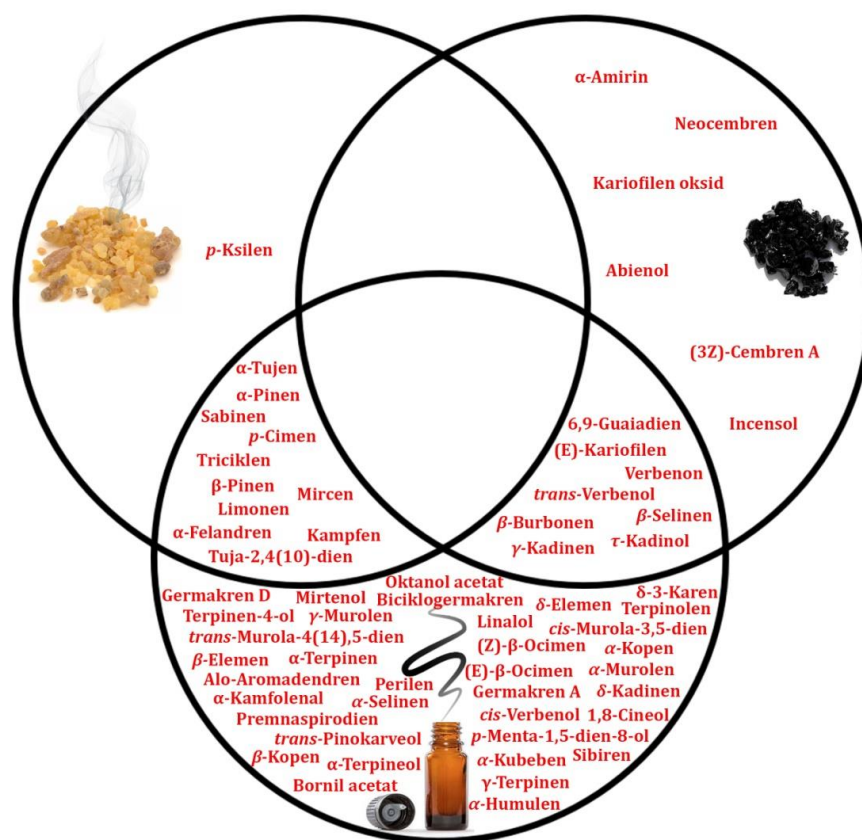


Slika 116. Strukturne formule dominantnih komponenti čađi tamjana: **a.** incensol; **b.** abienol; **c.** neocembren

Do danas, samo su se dva rada bavila analizom dima tamjana, dok je hemijski sastav čađi određen po prvi put. Pailer i dr. (1981a, b, c). su analizirali dim sakupljen vakuum destilacijom iz etarskog ekstrakta tamjana što nije poredivo sa našim istraživanjima jer se dim dobijen na ovaj način veoma razlikuje od paljenja tamjana u svakodnevnim crkvenim obredima. U drugom istraživanju, u dimu nastalom paljenjem

tamjana na tradicionalan način identifikovane su komponente: incensol (22,8%), incensil acetat (15,5%), oktil acetat (10,0%), verticil-4(20),7,11-trien (9,3%), 1-oktanol (4,0%), cembren A (3,7%) i cembren C (1,5%) (Basar, 2005). Komponente incensol (28,6%) i cembren A (2,5%) koje su identifikovane u ovom istraživanju u dimu u našem istraživanju identifikovane su u čađi.

Zajedničke komponente etarskog ulja, dima i čađi šematski su predstavljene na Slici 117. Najveći broj komponenti detektovan je etarskom ulju. U etarskom ulju i dimu tamjana konstatovano je 11 zajedničkih komponente, dok je za čađ i etarskog ulje zajedničko 7. Preklapanjem sastava ulja, dima i čađi uočava se odsustvo zajedničkih komponente, kao i između dima i čađi.



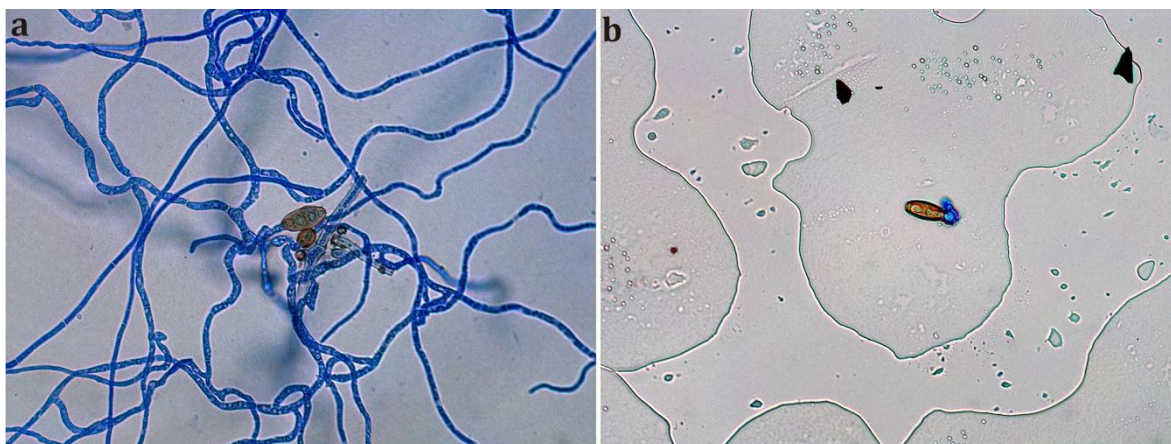
Slika 117. Dijagram prisutnosti komponenti etarskog ulja, dima i čađi tamjana

5.13.4.2. Antifungalna aktivnost dima *in vitro*

Za određivanje uticaja dima, nastalog paljenjem smole tamjana, na rast micelije i germinaciju konidija odabranih izolata *in vitro*, primenjena je modifikovana metoda aromatične komore. Uticaj dima je testiran na dva izolata: *Penicillium lanosum*, sa sitnim sferičnim konidijama, i *Curvularia australiensis*, kao predstavnika gljiva sa krupnim, melanizovanim i septiranim konidijama. U oba slučaja, micelija i konidije *P. lanosum* i *C. australiensis* su tretirane 30 minuta dimom nastalim paljenjem 5 g smole tamjana, na užarenom ugljenom briketu, nakon čega je određivana inhibicija rasta micelije i rađen test germinacije konidija.

Micelija oba tretirana izolata je pokazala približno isti stepen osetljivosti na dim tamjana, sa inhibicijom rasta micelije u opsegu od $44,75 \pm 1,51\%$ (*C. australiensis*) do $47,27 \pm 2,29\%$ (*P. lanosum*). Sa izuzetkom vidno manjeg dijametra kolonija, nikakve morfo-fiziološke promene nisu zabeležene u kulturama tretiranih izolata.

U slučaju *P. lanosum* zabeležena je potpuna inhibicija germinacije konidija ($100,0 \pm 0,0\%$) nakon polučasovnog tretmana dimom tamjana. Visok stepen inhibicije germinacije konidija *C. australiensis* ($92,65 \pm 1,56\%$) odlikovao se formiranjem kratkih germinativnih cevčica, $10,78 \pm 2,13 \mu\text{m}$ dužine. Formiranje germinativnih cevčica i rast hifa inhibirani su mehaničkim i hemijskim delovanjem tankog, prozirnog voštanog sloja, deponovanog iz dima na površinu hranljive podloge (Slika 118). Krupne konidije sa terminalnim klijanjem i robusnim hifama, kakve su prisutne kod *C. australiensis*, bile su idealne za praćenje uticaja dima tamjana na inhibiciju procesa germinacije konidija. Ovi rezultati ukazuju na to da i dim tamjana sadrži komponente sa antifungalnom aktivnošću. Kao što je pokazano rezultatima hemijske analize i prikazano na Slici 117, prisustvo α -pinena kao dominantne komponente u ulju i dimu može se dovesti u vezu sa njihovom aktivnošću, tako da bi trebalo izolovati i odrediti antifungalnu aktivnost α -pinena kao pojedinačne komponente.



Slika 118. Uticaj komponenti dima tamjana na germinaciju konidija *Curvularia australiensis* (24 h, MEA): **a.** germinacija konidija sa formiranom mrežom hifa, u kontroli; **b.** inhibicija germinacije konidija indukovana tankim, prozirnim voštanim slojem

5.13.5. Antifungalna aktivnost dima i etarskog ulja tamjana, *in situ*

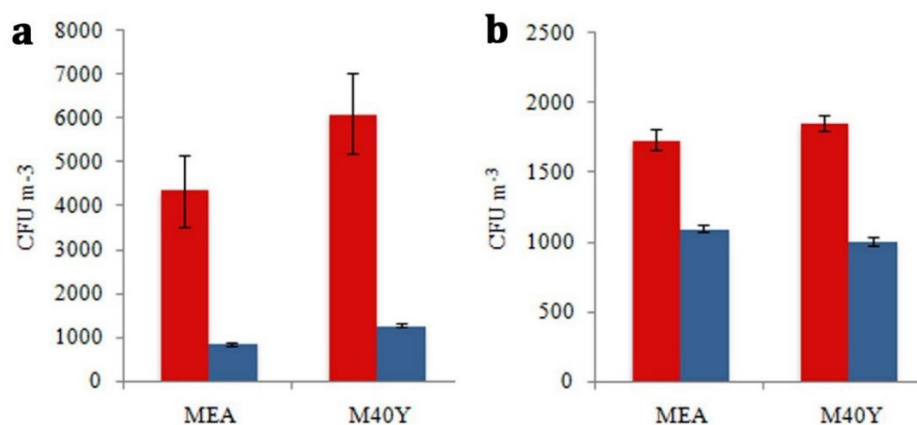
5.13.5.1. Antifungalna aktivnost dima

Polazeći od rezultata da dim tamjana poseduje antifungalno dejstvo, ispitana je i antifungalna aktivnost dima *in situ*, u naosu istraživane crkve. Aeromikološka analiza sprovedena pre tretmana dimom pokazala je veoma visok stepen kontaminacije vazduha naosa propagulama mikromiceta (Slika 119a). Zabeležene CFU m⁻³ vrednosti su veoma visoke (4798,94±512,42 (M40Y) i 6103,13±914,86 CFU m⁻³ (MEA)) i višestruko prevazilaze dozvoljene koncentracije propagula gljiva prema svim ranije navedenim standardima. Nakon sprovedenog tretmana dimom urađena je kontrolna aeromikološka analiza koja je pokazala drastično smanjenje broja vijabilnih propagula gljiva sa vrednostima: 78,95±1,87% (M40Y) i 80,43±2,07% (Slika 119a).

U prošlosti, pored obrednog paljenja u hramovima i drugim sakralnim objektima, tamjan se takođe palio s ciljem eliminacije neprijatnih mirisa i za smanjenja infekcija i epidemija ("zaraze") verovatno kroz prečišćavanje vazduha (Michie i

Cooper, 1991). Uzimajući u obzir rezultate dobijene *in situ* tretmanom u naosu istraživane crkve, na osnovu značajnog smanjenja broja vijabilnih propagula gljiva u vazduhu, može se zaključiti da se pretpostavlja “prečišćavajuće” svojstvo dima tamjana delom bazira na jakom antifungalnom efektu. Dodatno, dim tamjana u istim eksperimentalnim uslovima pokazao je i snažno antibakterijsko dejstvo. Naime, nakon tretmana vazduha zabeleženo je smanjenje broja bakterija za $53,33 \pm 1,86\%$ (MHA) , odnosno $91,43 \pm 1,26\%$ (MHA+N) (Ljaljević Grbić i dr., 2018; neobjavljeni rezultati).

Dokazano fungicidno i baktericidno dejstvo dima tamjana direktno implicira mogućnost uvođenja novog tretmana za prevenciju i sanaciju fungalnih infestacija na zidnim slikama i održavanje kvaliteta vazduha u sakralnim objektima u skladu sa savremenim standardima.



Slika 119. CFU m⁻³ vrednosti pre [-] i posle [-] tretmana vazduha naosa i đakonikona:
a. dimom tamjana; **b.** etarskim uljem tamjana

5.13.5.2. Antifungalna aktivnost etarskog ulja

Kontaminacija vazduha u đakonikonu, pre tretmana, iznosila je $1455,17 \pm 37,69$ (M40Y) i $2198,92 \pm 67,49$ (Slika 119b) (MEA). Tretman vazduha đakonikona isparavanjem 2 ml etarskog ulja tamjana doveo je smanjenja broja vijabilnih propagula mikromiceta za $45,39 \pm 2,83\%$ (M40Y) i $35,61 \pm 2,12\%$ (MEA) (Slika 119b).

Prema literaturnim podacima, primena etarskog ulja tamjana *in situ* do sada nije zabeležena tako da se rezultati ovog istraživanja mogu komentarisati samo u odnosu na opšte podatke o načinima primene etarskih ulja. U tom smislu, zagrevanje ulja, povećava stopu isparavanja, ali menja antifungalnu aktivnost jer su mnoge komponente termolabilne (Su i dr., 2007). S druge strane, korišćenje rasprskivača nije adekvatno zbog veoma slabe rastvorljivosti fenolnih komponenti u vodi i smanjene isparljivosti komponenti sa hidroksil grupama, dok je primena aroma lampe nepodesna zbog promene isparljivih monoterpenskih ugljovodonika u slabo isparljive monoterenske alkohole i seskviterpene (Oberhofer i dr., 1999; Sato i dr., 2006). Zbog svega navedenog, odlučeno je da se tretman vazduha đakonikona sprovede isparavanjem ulja na sobnoj temperaturi. Vreme tretmana od 30 minuta određeno je prema iskustvu Su i dr. (2007) koji su pokazali da se najveće oslobađanje volatilnih komponenti ulja, odgovornih za anitfungalnu aktivnost, dešava tokom prvih pola sata od početka isparavanja.

Kao i u slučaju tretmana dimom tamjana, i isparavanje etarskog ulja tamjana je demonstriralo snažan antibakterijski efekat. Komponente isparljive faze sa baktericidnim efektom tokom tridesetominutnog tretmana izazvale su smanjenje broja bakterija za $51,21 \pm 3,47\%$ (MHA), odnosno $67,56 \pm 3,12\%$ (MHA+N) (Ljaljević Grbić i dr., 2018; neobjavljeni rezultati).

5.14. Značaj i implementacija primenjenih metoda i rezultata u proces konzervacije zidnih slika u Srbiji

Kulturno dobro - stara crkva Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru zatečena je u narušenom stanju, sa izraženim simptomima biodeterioracije zidnih slika naosa i egzonarteksa, što je posledica decenijske zapuštenosti i nebrige, kao i brojnih neadekvatnih intervencija na objektu.

Rezultati multidisciplinarnog istraživanja sprovedenog na kulturnom dobru imaju višestruk značaj i mogu se direktno uključiti u složeni sistem konzervacije i

restauracije zidnih slika, kao i ostalih kulturnih dobara u Srbiji. Dosadašnja konzervatorska praksa bila je većinom fokusirana na intervencije koje su se sprovodile radi zaustavljanja uzroka oštećenja i propadanja kulturnih dobara ili ispravljanja štete koja je nanata usled različitih istorijskih okolnosti. Međutim, aktuelna paradigma konzervacije kulturnih dobara fokusirana je na razvoj proaktivnih i preventivnih mera zaštite, čiji je primarni cilj smanjenje rizika koji uzrokuju oštećenja, kao i uključivanje mera koje mogu preduprediti povrede na samim kulturnim dobrima. Procena rizika se smatra primarnim uslovom za izbor tretmana bilo da je reč o arhitekturi, zidnim slikama ili pokretnim nalazima. Identifikovanje funkcija opasnosti i uzroka ranjivosti, uzročno posledičnih odnosa i analiza potencijalnih uticaja na vrednosti kulturnog dobra, smatraju se primarnim uslovima u filozofiji konzervacije. U tom pogledu multidisciplinarni pristup u ispitivanju fizičke ugroženosti, biološka istraživanja svrstava među najznačajnija u sistemu preventivne konzervacije. Uzorkovanje biološkog materijala i precizno definisanje stepena kontaminacije, identifikacija prisutnih organizama koji utiču na pojavu biodeterioracije, iziskuju ispitivanje najadekvatnijih metoda koje će doneti rezultate bitne za tumačenje prisutnih strukturnih, a često i vizuelnih promena na samom dobru.

U konkretnom slučaju na zidnom slikarstvu u staroj crkvi Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru, mnoge metode po prvi put su primenjene u cilju: **(1)** detekcije simptoma i uzročnika deterioracije zidnih slika, *in situ* (metoda snimanja prenosnim mikroskopom ShuttlePix P-400R); **(2)** određivanja stepena kontaminacije površine zidnih slika mikroorganizmima i organskim depozitom (metoda ATP bioluminiscencije); **(3)** izolacije i identifikacije filamentoznih mikromiceta, kvasaca i bakterija sa površine zidnih slika (metoda kontaktnog slajda). Takođe, **(4)** formulisan je model zidne slike na kome je praćena indukovana i spontana kolonizacija površine bojenog sloja mikromicetama, u kontrolisanim eksperimentalnim uslovima. Konačno, **(5)** na osnovu rezultata dobijenih u *in vitro* testovima, izvršen je tretman vazduha u crkvi etarskim uljem i dimom tamjana, *in situ*.

(1) Rezultati naših istraživanja nameću da primena *in situ* mikroskopije treba da predstavlja prvi korak u detekciji simptoma i uzročnika deterioracije i sledi nakon inicijalne opservacije makroskopskih promena zidnih slika. Naime, primena *in situ* mikroskopije u budućim istraživanjima procesa biodeterioracije zidnih slika u Srbiji treba da postane sastavni deo protokola istraživanja koja prethode konzervatorsko-restauratorskim tretmanima u cilju brze detekcije oštećenja bojenog sloja i malterne podloge, kao i otkrivanja skrivenih žarišta kontaminacije biološkim agensima ("hotspots"). Metoda je brza, egzaktna, neagresivna, a može biti i ekonomski isplativa.

(2) Pored *in situ* mikroskopije, dodatna metoda za detekciju žarišta je i *in situ* procena stepena kontaminacije metodom bioluminiscencije koja se bazira na merenju količine ATP u depozitu na zidnim slikama. Dakle, određena „Zona čistoće“ u korespodenciji sa detektovanim simptomima deterioracije, *in situ* mikroskopijom, precizno će locirati žarište na kome će biti sprovedena dodatna istraživanja. Međutim, primena ove metode, koja se inače koristi u prehrambenim, farmaceutskim i zdravstvenim ustanovama, mora pretrpeti modifikacije obzirom na specifičnosti prirode i namene kulturnih dobara u smislu revidiranja skale „Zona čistoće“.

(3) Za dugotrajno očuvanje zidnih slika presudnu važnost ima precizna analiza diverzitet mikrobiote, metabolički aktivne i dormantne, sa posebnim akcentom na detekciju prisustva mikromiceta koje imaju sposobnost razgradnje različitih supstrata bojenog sloja i malterne podloge. Sa markiranih žarišta metodom kontaktnog slajda se brzo i lako uzimaju uzorci iz kojih se nakon kultivacije dobijaju očigledni rezultati u formi „fungalnog otiska“. Termin „fungalni otisak“ je po prvi put uveden i definiše gustinu i prostorni raspored vijabilnih propagula gljiva na jedinici površine. Stoga, „fungalni otisak“ odražava potencijalnu ali ne i realnu opasnost od pojave fungalne infestacije zidnih slika obzirom da svi konstituenti otiska ne moraju biti metabolički aktivni. Ova konstatacija nalaže da je metoda kontaktnog slajda preporučljiva za rapidnu detekciju vijabilne mikrobiote koja može predstavljati potencijalnu opasnost pri postizanju optimalnih uslova za razvoj mikromiceta. Međutim, za kompletiranje

slike realne ugroženosti od fungalnih infekcija pored novoprimenjene metode kontaktnog slajda neophodno je primeniti i druge metode u cilju identifikacije totalne mikrobiote sa posebnim akcentom na aktivno rastuće mikromicete na zidnim slikama:

(3.1) metoda uzimanja uzoraka adhezivnom trakom za detekciju reproduktivnih struktura koje potvrđuju aktivni rast gljiva na zidnim slikama;

(3.2) metoda uzimanja uzoraka ugljenom trakom na aluminijumskim cilindrima za SEM za potvrdu rezultata sa adhezivne trake i dobijanje dodatnih informacija o deterioraciji bojenog sloja i malterne podloge (pozicija aktivno rastućih gljiva u odnosu na sloj, dominantne reproduktivne strukture, EDX analiza supstrata u okruženju infekcije itd.);

(3.3) metoda reizolacije za dobijanje akseničnih kultura i identifikacije na morfološkom i molekularnom nivou;

(3.4) metode testiranja potencijala deterioracije originalnih izolata (produkcija kiselina i baza, rastvaranje kalcijum karbonata, sposobnost formiranja sekundarnih mikogenih minerala, produkcija fungalnih pigmenata itd.);

(3.5) metode za određivanje osetljivosti izolata na tretmane biocidima čijom se primenom dobijaju minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije prirodnih i sintetičkih biocida.

Paralelno, formulisanjem modela zidne slike **(4)**, kombinacijom različitih pigmenata i veziva, u zavisnosti od istraživanog kulturnog dobra, može se pratiti indukovana kolonizacija originalnim sojevima mikromiceta što će dodatno obogatiti znanje o potencijalu deterioracije na konkretnom supstratu. Na modelu je, takođe, moguće pratiti i proces spontane kolonizacije.

Primenjenim setom metoda može se precizirati uzročnik kao i njegove sposobnosti za deterioraciju što dalje usmerava proces konzervacije u smislu odabira specifičnih tretmana i vrste biocida. Na osnovu *in vitro* i *in situ* istraživanja

antifungalnog efekta dima tamjana **(5)** ovaj tretman se može uključiti u sistem preventive fungalnih infekcija zidnih slika, indirektno, drastičnim smanjivanjem broja vijabilnih propagula mikromiceta u vazduhu crkve. Tretman je efikasan, neagresivan i autentičan.

Na osnovu svega iznetog, navedeni protokol je neophodno implementirati u istraživačku fazu, analiziranjem faktora koji utiču na stepen ugroženosti, stopu mogućeg gubitka vrednosti, integriteta i autentičnosti, koja prethodni izboru metodoloških postupaka u konzervaciji, u cilju dugoročnog eliminisanja izvora rizika, uspostavljanja barijere ili delovanja na agens rizika, što dovodi do prevencije i sanacije fungalnih infestacija zidnih slika, kao i drugih kulturnih dobara u Srbiji. Ovakav pristup predstavlja značajan doprinos u razumevanju uzroka propadanja i nastanka oštećenja na kulturnim dobrima, smanjenju prepoznatih rizika, a posebno u unapređenju metodologije preventivne konzervacije i zaštite kulturnih dobara.

6. ZAKLJUČCI

- ❖ Opservacijom opšteg stanja i zidnog slikarstva stare crkve Svetog Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru konstatovan je veoma narušen status kulturnog dobra sa visokim stepenom deterioracije zidnih slika;
- ❖ Mikroskopiranjem zidnih slika *in situ* konstatovane su promene u strukturi bojenog sloja i maltera, rasoljavanje i prisustvo reproduktivnih struktura lihenizovanih gljiva;
- ❖ Prosečne vrednosti T i RH, i EMC vrednosti zida tokom većeg dela godine bile su optimalne za rast mikromiceta;
- ❖ SEM-EDX analizom fragmenata bojenog sloja detektovani su pigmenti korišćeni tokom živopisanja zidnih slika: ugljena crna, zelena zemlja, pečeni oker i oker/cinabarit mešavina;
- ❖ Hemijskom analizom soli iz regiona intenzivnog rasoljavanja bojenog sloja utvrđeno je prisustvo anhidrovanog kalcijum sulfata;
- ❖ Na zidnim slikama, ogoljenom malteru i fasadi, prisutna je mikrobiota od 46 taksona, od kojih 43 čine mikrobiotu zidnih slika sa dominacijom *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* vrsta;
- ❖ Sezonska dinamika mikromiceta na zidnim slikama može se prikazati sledećim nizom: Leto (25) > Zima (18) > Jesen (16) > Proleće (13). *Aalternaria alternata*, *Chaetomium murorum*, *Cladosporium uredinicola* i *Epicoccum nigrum* zabeleženi su u sve 4 sezone;
- ❖ Na osnovu "fungalnih otisaka", intenzitet kontaminacije zidnih slika može se predstaviti sledećim nizom: Zima > Leto > Jesen > Proleće;

- ❖ Kultivacijom izolata *E. nigrum* i *Aspergillus aureolatus* detektovan je meristemski rast i mikrociklična konidijacija kao posledica porekla izolata iz ekstremnih uslova staništa;
- ❖ Fungalnu komponentu bioaerosola naosa i egzonarteksa čine 23, odnosno 22 taksona, sa 13 preklapajućih;
- ❖ Poređenjem mikrobiote zidnih slika i vazduha konstatovano je 12 zajedničkih vrsta;
- ❖ Zastupljenost propagula dominantnih rodova predstavljena je sledećim nizom: *Penicillium* (23,55%) > *Aspergillus* (20,58%) > *Alternaria* (14,71%) > *Fusarium* (11,76%) > *Cladosporium* (8,82%);
- ❖ Kontaminacija vazduha naosa se kreće od $430 \pm 84,85$ do $1880 \pm 106,07$ CFU m⁻³, a vazduha egzonarteksa od $715 \pm 59,62$ do $2295 \pm 91,92$ CFU m⁻³, što višestruko prevazilazi maksimalne dozvoljene koncentracije po svim standardima;
- ❖ Biofilm bojenog sloja zidnih slika primarno je sačinjen od fungalnih propagula i aktivno rastućih: filamentoznih gljiva (*Cladosporium* spp. i *Chaetomium* sp.), mikrokolonijalnih i lihenizovanih gljiva, aktinomiceta, algi i cijanobakterija;
- ❖ 75% istraživanih površina zidnih slika pripada "Zoni opasnosti". Statistička analiza ukazuje na odsustvo korelacije između broja mikroorganizama i vrednosti „Zona čistoće“;
- ❖ Na modelu zidne slike konstatovano je da „biopitting“ izazivaju *Verrucaria* sp. i MCF, dok je rast *A. tenuissima*, *C. cladosporioides* i aberantne forme *Aspergillus pallidofulvus* izazvao pucanje i ljušpanje bojenog sloja deonica sa vezivima biljnog porekla;
- ❖ Od 38 testiranih izolata gljiva, u testovima produkcije kiselina i baza i fungalnih pigmenata, razgradnje kazeina, rastvaranja kalcijum karbonata i formiranja

sekundarnih mikogenih minerala većina izolata gljiva je pokazala bar jednu aktivnost, dok je *P. bilaiae* pokazao potencijal deterioracije u svim testovima;

- ❖ Novosintetisani BAC/FNP nanokompozit pokazao je bolji antifungalni efekat na rast micelije, konidije su bile osetljivije na biocid BAC, a oba testirana agensa su izazvala morfo-fiziološke promene na testiranim *Aspergillus* vrstama;
- ❖ Subinhibitorne koncentracije BAC/FNP i BAC značajno su smanjile produkciju biomase, stimulisale sintezu aflatoksina B1 i inhibirale sintezu ohratoksina A;
- ❖ Dominantne komponente etarskog ulja tamjana su α -pinen (38,41%), mircen (15,21%), sabinen (12,13%) i limonen (6,24%), dima tamjana α -pinen (68,6%), sabinen (9,9%) i α -tujen (7,0%), dok se čađ nastala paljenjem tamjana karakteriše prisustvom incensola (28,6%), abienola (18,7%) i neocembrena (5,7%) kao dominantnih komponenti;
- ❖ Glavne komponente etarskog ulja smirne su komponenta RI 1631 (17,65%), kurzeren (12,97%), β -elemen (12,70%), germakren B (12,15%), germakren D (9,13%), germakren A (5,87%) i komponenta RI 1636 (5,34%);
- ❖ Etarsko ulje tamjana poseduje jaču antifungalnu aktivnost u poređenju sa etarskim uljem smirne, ali nižu u poređenju sa smešom ulja i biocidom BAC;
- ❖ Isparljiva faza etarskog ulja tamjana poseduje bolju antifungalnu aktivnost u odnosu na biocid BAC i dovodi do potpune inhibicije germinacije konidija kod *Cladosporium* vrsta i visokog stepena inhibicije kod drugih mikromiceta;
- ❖ Fungicidan i fungistatski efekat dima tamjana na miceliju i konidije *Penicillium lanosum* i *Curvularia australiensis* je posledica mehaničkog i hemijskog delovanja tankog, prozirnog voštanog sloja deponovanog iz dima;
- ❖ Tretman dimom tamjana *in situ* znatno efikasnije redukuje nivo kontaminacije vazduha propagulama gljive, u odnosu na tretman etarskim uljem;

7. LITERATURA

- Abd El-Tawab, N., Mahran, A. and Gad, K. (2014): Conservation of the mural paintings of the Greek orthodox church dome of Saint George, Old Cairo-Egypt. *European Scientific Journal*, 10: 324-354.
- Abdel-Azeem, A.M., Gherbawy, Y.A. and Sabry, A.M. (2016): Enzyme profiles and genotyping of *Chaetomium globosum* isolates from various substrates. *Plant Biosystems*, 3: 420-428.
- Abdulwahab, S.M., Aboutalb, E.A., El-Zalabani, S.M., Fouad, H.A., De Pooter, H.L. and El-Fallaha. (1987): The essential oil of *Olibanum*. *Planta medica*, 53: 382-384.
- Abegaz, V., Dagne, E., Bates, C. and Waterman, P.G. (1989): Chemistry of the Burseaceae Part 12, monoterpene-rich resins from two Ethiopian species of *Commiphora*. *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 99-101.
- Adan, O. (1994): On the fungal defacement of interior finishes. Doctoral dissertation. Technical university of Eindhoven, the Netherlands.
- Aghamiri, R. and Schwartzman, D.W. (2002): Weathering rates of bedrock by lichens: A mini watershed study. *Chemical Geology*, 188: 249-259.
- Aggarwal, K.K., Khanujia, S.P.S., Ahmed, A., Kumar, T.R.S., Gupta, V. and Kumar, S. (2002): Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 59-63.
- Agrawal, O.P., Dhawan, S. and Garg, K.L. (1989): Microbial deterioration of paintings - a review. Intach Conservation Centre, India.
- Ahearn, D.G., Price, D., Simmons, R.B., Mayo, A., Zhang, S.T. and Crow Jr., S.A. (2007): Microcycle conidiation and medusa head conidiophores of aspergilli on indoor construction materials and air filters from hospitals. *Mycologia*, 99: 1-6.

- Aira, M.J., Jato, V., Stchigel, A.M., Rodríguez-Rajo, F.J. and Piontelli, E. (2007): Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60: 231-237.
- Akyol, E. and Öner, M. (2014): Controlling of morphology and polymorph of calcium oxalate crystals by using polyelectrolytes. *Journal of Crystal Growth*, 401: 260-265.
- Albertano, P. and Grilli-Caiola, M. (1989): A hypogean algal association. *Braun Blanquetia*, 3: 1872-1892.
- Albertano, P., Luongo, L. and Grilli-Caiola, M. (1991): Ultrastructural investigations on algae deteriorating Roman frescoes. In: *Science, Technology and European Cultural Heritage*. Baer, N.S., Sabbioni, C. and Sors, A.I. (Eds.). Butterworth-Heinemann Ltd., UK. pp. 501-504.
- Albertano, P. and Urzì, C. (1999): Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microbial Ecology*, 38: 244-252.
- Albertano, P., Moscone, D., Palleschi, G., Hermosin, B., Sáiz-Jiménez, C., Sanchez-Moral, S., Hernandez-Marine, M., Urzì, C., Groth, I., Schroeckh, V., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Gallon, J.R., Graziottin, F., Bisconti, F. and Giuliani, R. (2003): Cyanobacteria attack rocks (CATS): control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman hypogean monuments. In: *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Sáiz-Jiménez, C. (Ed.). Balkema Publishers, the Netherlands, pp. 151-162.
- Alessandrini, G., Dassu, G., Zanolini, P., Bassi, M., Barbieri, N. and Bonecchi, R. (1984): St. Christopher church in Milan; 1) chemical and physical analyses and restoration; 2) biological investigations. *Arte Lombarda*, 68-69: 1-12.
- Allsopp, D. (2011): Worldwide wastage: the economics of biodeterioration. *Microbiology Today*, 38: 150-153.

- Allsopp, D., Seal, K. and Gaylarde, C. (2004): Introduction to biodeterioration. Cambridge University Press, UK.
- Amadori, M.L., Barcelli, S., Poldi, G., Ferrucci, F., Andreotti, A., Baraldi, P. and Colombini, M.P. (2015): Invasive and non-invasive analyses for knowledge and conservation of Roman wall paintings of the Villa of the Papyri in Herculaneum. *Microchemical Journal*, 118: 183-192.
- Aoshima, H., Kokubo, K., Shirakawa, S., Ito, M., Yamana, S. and Oshima, T. (2009): Antimicrobial activity of Fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol Science*, 14: 69-72.
- Arino, X., Hernandez-Marine, M. and Sáiz-Jiménez, C. (1996): *Ctenocladus circinnatus* (Chlorophyta) in stuccos from archeological sites of southern Spain. *Phycologia*, 35: 183-189.
- Arino, X. and Sáiz-Jiménez, C. (2004): Lichens of different mortars at archaeological sites in southern Spain. In: *Biodeterioration of Stone Surfaces. Lichens and Biofilms as Weathering Agents of Rocks and Cultural Heritage*. St. Clair, L.L. and Seaward, M.R.D. (Eds.). Springer, the Netherlands. pp. 165-179.
- Asencio, A.D. and Aboal, M. (2001): Biodeterioration of wall paintings in caves of Murcia (SE Spain) by epilithic and chasmoendolithic microalgae. *Algological Studies*, 103: 131-142.
- Badii, F. and Moss, M.O. (1988): The effect of fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 37-39.
- Basar, S. (2005): Phytochemical investigations on *Boswellia* species: Comparative Studies on the Essential Oils, Pyrolysates and Boswellic Acids of *Boswellia carterii* Birdw., *Boswellia serrata* Roxb., *Boswellia frereana* Birdw., *Boswellia neglecta* S. Moore and *Boswellia rivae* Engl. Doctoral dissertation. University of Hamburg, Germany.

- Baser, K.H.C., Demirci, B., Dekebo, A. and Dagne, E. (2003): Essential oils of some *Boswellia* ssp., myrrh and opopanax. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 153-156.
- Bassi, M. and Giacobini, C. (2001): Scanning electron microscopy: A new technique in the study of the microbiology of works of art. *International Biodeterioration Bulletin*, 9: 57-68.
- Bastian, F. and Alabouvette, C. (2009): Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: The case of Lascaux Cave. *International Journal of Speleology*, 38: 55-60.
- Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A., Alabouvette, C. and Sáiz-Jiménez, C. (2010): The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, 156: 644-652.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. (2012): The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72: 1-401.
- Bernardi, A., Todorov, V. and Hristova, J. (2000): Microclimatic analysis in St. Stephan's church, Nessebar, Bulgaria, after interventions for the conservations of frescoes. *Journal of Cultural Heritage*, 1: 281-286.
- Berner, M., Wanner, G. and 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. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40: 53-61.
- Berthelin, J. (1983): Microbial weathering processes. In: *Microbial Geochemistry*. Krumbein, W.E. (Ed.). Blackwell Scientific Publications, UK. pp. 223-262.
- BioControl Systems. (2009): Lightning MVP system guide. BioControl Systems Inc., USA.
- Blackwell, M. (2011): The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98: 426-438.

- Bogdanović, G., Vojinović-Miloradov, M., Kojić, V., Djordjević, A., Čanadi, J., Koruga, Đ., Baltić, V. and Tabš, D. (1996): Biological activity of water-soluble fullerene: C₆₀(OH)₂₄. *Archive of Oncology*, 5: 147-149.
- Boonen, J., Malysheva, S.V., Taevernier, L., di Mavungu, J.D., De Saeger, S. and de Spiegeleer, B. (2012): Human skin penetration of selected modelmycotoxins. *Toxicology*, 301: 21-32.
- Booth, C. (1971): The fungal culture media. In: *Methods in Microbiology*. Booth, C. (Ed.). Academic Press, UK. pp. 49-94.
- Borrego, S., Guiamet, P., de Saravia Gómez, S., Batistini, P., Garcia, M., Lavin, P. and Perdomo, I. (2010): The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 139-145.
- Bouquet, E., Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A. (1973): Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 246: 527-529.
- Brant, J.A., Labille, J., Robichaud, C.O. and Wiesner, M. (2007): Fullerol cluster formation in aqueous solutions: implications for environmental release. *Journal of Colloid and Interface Science*, 314: 281-288.
- Brewer, D., Jerram, W.A. and Taylor, A. (1968): The production of cochliodinol and a related metabolite by *Chaetomium* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 14: 861-866.
- Broström, T. (2004): Preventive conservation by climate control. In: *Proceedings of the seminar "Indoor Climate in Churches - Problems and Solutions"*. Riga, Sweden. pp. 29-37.
- Brycki, B., Kowalczyk, I. and Kozirog, A. (2011): Synthesis, molecular structure, spectral properties and antifungal activity of polymethylene- α,ω -bis(n,n-dimethyl-n-dodecyloammonium bromides). *Molecules*, 16: 319-335.

- Burford, E.P., Hillier, S. and Gadd, G.M. (2006): Biomineralization of fungal hyphae with calcite (CaCO₃) and calcium oxalate mono- and dihydrate in carboniferous limestone microcosms. *Geomicrobiology Journal*, 23: 599-611.
- Butler, M.J. and Day, A.W. (1998): Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 1115-1136.
- Camarda, L., Dayton, T., di Stefano, V., Pitonzo, R. and Schillaci, D. (2007): Chemical composition and antimicrobial activity of some oleogum resin essential oils from *Boswellia* spp. (Burseraceae). *Annali di Chimica*, 97: 837-844.
- Cappitelli, F., Abbruscato, P., Foladori, P., Zanardini, E., Ranalli, G., Principi, P., Villa, F., Polo, A. and Sorlini, C. (2009a): Detection and elimination of cyanobacteria from frescoes: the case of the St. Brizio Chapel (Orvieto Cathedral, Italy). *Microbial Ecology*, 57: 633-639.
- Cappitelli, F., Fermo, P., Vecchi, R., Piazzalunga, A., Valli, G., Zanardini, E. and Sorlini, C. (2009b): Chemical-physical and microbiological measurements for indoor air quality assessment at the Ca' Granada Historical Archive, Milan (Italy). *Water, Air, & Soil Pollution*, 201: 109-120.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1995): Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 264-269.
- Chen, Y. and Xie, Y. (2002): The causes of foxing on the Chinese painting. *Sciences of conservation and archaeology*, 14: 63-76.
- Chiavari, G., Galletti, G.C., Piccagali, R. and Mohammed, M.A. (1991): Differential between resins of *Boswellia carteri* and *Boswellia frereana* (Frankincense of Somali origin). *Journal of Essential Oil Research*, 3: 185-186.
- Chollet, R., Kukuczka, M., Halter, N., Romieux, M., Marc, F., Meder, H., Beguin, V. and Ribault, S. (2012): Rapid detection and enumeration of contaminants by ATP bioluminescence using The Milliflex Rapid Microbiology Detection and

- Enumeration system. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 16: 256-272.
- Ciferri, O. (1999): Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 879-885.
- Conner, D.E. (1993): Naturally occurring compounds. In: *Antimicrobials in Foods*. Davidson, P.M., Sofos, J.N. and Branen, A.L. (Eds.). CRC Press, USA. pp. 441-486.
- Conti, C., Casati, M., Colombo, C., Realini, M., Brambilla, L. and Zerbi, G. (2014): Phase transformation of calcium oxalate dihydrate-monohydrate: Effects of relative humidity and new spectroscopic data. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128: 413-419.
- Cooke, M. (2002): European review of biocides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1: 48-50.
- Cooley, J.D., Wong, W.C., Jumper, C.A. and Straus, D.C. (1998): Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, 55: 579-584.
- Crispim, C.A. and Gaylarde, C.C. (2005): Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microbial Ecology*, 49: 1-9.
- Cunningham, J.E. and C. Kuiack. (1992): Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1451-1458.
- Dakal, T.C. and Arora, P.K. (2012): Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11: 71-104.
- Dakal, T.C. and Cameotra, S.S. (2012): Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Environmental Sciences Europe*, 24: 1-13.

- Dambis, J. (2004): Recommendations on climate control in historical churches. In: Proceedings of the seminar "Indoor Climate in Churches - Problems and Solutions". Riga, Sweden. p. 5.
- Daniilia, S., Tsakalof, A., Bairachtari, K. and Chryssoulakis, Y. (2007): The Byzantine wall paintings from the Protaton Church on Mount Athos, Greece: tradition and science. *Journal of Archaeological Science*, 34: 1971-1984.
- De Aquino Radler, F. and De Góes, L.F. (2000): Guidelines for indoor air quality in offices in Brazil. *Proceedings of Healthy Buildings*, 4: 549-553.
- Del Monte, M., Sabbioni, C. and Zappia, G. (1987): The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. *Science of the Total Environment*, 67: 17-39.
- De la Torre, M.A., Gómez-Alarcón, G., Melgarejo, P. and Sáiz-Jiménez, C. (1991): Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *The Science of the Total Environment*, 107: 159-168.
- De la Torre, M.A., Gómez, G., Viscaíno, C. and García, T.M. (1993): Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry*, 19: 129-147.
- De la Torre, M.A. and Gómez, G. (1994): Manganese and iron oxidation by fungi isolated from building stone. *Microbial Ecology*, 27: 117-180.
- De Lima Fávaro, L.C., de Melo, F.L., Aguilar-Vildoso, C.I. and Araújo, W.L. (2011): Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE*, 6: e14828.
- De los Rios, A. and Ascaso, C. (2005): Contributions of *in situ* microscopy to the current understanding of stone biodeterioration. *International Microbiology*, 8: 181-188.
- De Rapper, S., Van Vuuren, S.F., Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M. and Dagne, E. (2012): The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and

- myrrh oils - a combination from the pharaonic pharmacopoeia. *Letters in Applied Microbiology*, 54: 352-358.
- Di Bonaventura, M.P., del Gallo, M., Cacchio, P., Ercole, C. and Lepidi, A. (1999): Microbial formation of oxalate films on monument surfaces: bioprotection or biodeterioration? *Geomicrobiology Journal*, 16: 55-64.
- Ditaranto, N., Loperfido, S., van der Werf, I., Mangone, A., Cioffi, N. and Sabbatini, L. (2011): Synthesis and analytical characterisation of copper-based nanocoatings for bioactive stone artworks treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399: 473-481.
- Deljanin, B. (1995): Crkva Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru, zaštitni radovi. *Glasnik DKS*, 19: 143-146.
- Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral, S. and Sáiz-Jiménez, C. (2013): The actinobacterial colonization of Etruscan paintings. *Scientific Reports*, 3:1440.
- Dornieden, T., Gorbushina, A.A. and Krumbein, W.E. (2000): Biodecay of cultural heritage a space/time-related ecological situation - an evaluation of a series of studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 261-270.
- Dupont, J., Jacquet, C., Denetière, B., Lacoste, S., Bousta, F., Oriol, G., Cruaud, C., Couloux, A. and Roquebert, M.F. (2007): Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by the members of *Fusarium solani* complex. *Mycologia*, 99: 526-533.
- Djordjević, A., Vojinović-Miloradov, M., Petranović, N., Devečerski, A., Lazar, D. and Ribar, B. (1998): Catalytic preparation and characterization of C₆₀Br₂₄. *Fullerenes Sciences & Technology*, 6: 689-694.
- Djordjević, A., Srđenović, B., Seke, M., Petrović, D., Injac, R. and Mrđanović, J. (2015): Review of synthesis and antioxidant potential of fullereneol nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, Article ID 565638.

- Echigo, T., Kimata, M., Kyono, A., Shimizu, M. and Hatta, T. (2005): Re-investigation of the crystal structure of whewellite $[\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}]$ and the dehydration mechanism of caoxite $[\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$. *Mineralogical Magazine*, 69: 77-88.
- Edwards, H.G.M., Farwell, D.W., Seaward, M.R.D. and Giacobini, C. (1991): Preliminary Raman microscopic analyses of lichen encrustation involved in the biodeterioration of renaissance frescoes in central Italy. *International Biodeterioration*, 27: 1-9.
- Edwards, H.G.M., Edwards, K.A.E., Farwell, D.W., Lewis, I.R. and Seaward, M.R.D. (1994): An approach to stone and fresco lichen biodeterioration through fourier transform raman microscopic investigation of tallus-substratum encrustations. *Journal of Raman Spectroscopy*, 25: 99-103.
- Eggins, H.O.W. and Oxley, T.A. (2001): Biodeterioration and biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48: 12-15.
- Ellis, M.B. (1971): Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, UK.
- Ellis, M.B. (1976): More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, UK.
- Ellis, M.B. and Ellis, P.J. (1997): Microfungi on land plants. An identification handbook. The Richmond Publishing Co. Ltd., UK.
- Engelmann, W.H. and Rogers, K.R. (1995): A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere*, 30: 2155-2197.
- Escorteganha, M.R., Santiago, A.G., Magosso, H.A., Richter, F.A. and Costa, T.G. (2013): Conservation state of mural paintings from a historical house in Florianopolis-SC, Brazile, A Multidisciplinary approach. *International Journal of Conservation Science*, 4: 13-24.

- Esquivel, P.P., Mangiaterra, M., Giusuiano, G. and Sosa, M.A. (2003): Microhongos anemófilos en ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. *Boletín Micológico*, 701: 21-28.
- Estaugh, N., Walsh, V., Chaplin, T. and Siddal, R. (2008): *Pigment compendium: A dictionary and optical microscopy of historical pigments*. Butterworth-Heinemann, UK.
- Ettenauer J.D., Jurado, V., Piñar, G., Miller, A.Z., Santner, M., Sáiz-Jiménez, C. and Sterflinger, K. (2014): Halophilic microorganisms are responsible for the rosy discolouration of saline environments in three historical buildings with mural paintings. *PLoS ONE*, 9: e103844.
- European Pharmacopoeia 6th Edition (2007). Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg.
- Fajardo-Cavazos, P., Schuerger, A.C. and Nicholson, W.L. (2008): Persistence of biomarker ATP and ATP-generating capability in bacterial cells and spores contaminating spacecraft materials under earth conditions and in a simulated martian environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5159-5167.
- Feller, W. (1950): *An introduction to probability theory and its applications*, Vol. 1. Wiley, USA.
- Flanning, B., Samson, R.A. and Miller, D.J. (2001): *Microorganisms in home and indoor work environments. Diversity, health impacts, investigation and control*. CRC Press, UK.
- Florian, M.L.E. (2002): *Fungal facts: Solving fungal problems in heritage collections*. Archetype Publications Ltd., UK.
- Fredell, D.L. (1994): Biological properties and applications of cationic surfactants. In: *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation*. Cross, J. and Singer, E.J. (Eds.). CRC Press, USA. pp. 31-60.

- Gadd, G.M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y.J., Wei, Z., Fomina, M. and Liang, X. (2014): Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biology Reviews*, 28: 36-55.
- Gao, J., Wang, Y., Folta, K.M., Krishna, V., Bai, W., Indeglia, P., Georgieva, A., Nakamura, H., Koopman, B. and Moudgil, B. (2011): Polyhydroxy Fullerenes (Fullerols or Fullerlenols): Beneficial effects on growth and lifespan in diverse biological models. *PLoS ONE*, 6: e19976.
- Gareis, M. and Ceynowa, J. (1994): Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum* Z. *Lebensm-Unters. Forsch*, 198: 244-248.
- Garg, K.L. and Dhawan, S. (1994): Biodeterioration of wall paintings: the Indian experience. In: *Building Mycology*. Singh, J. (Ed.). Chapman & Hall, UK. pp. 239-259.
- Garg, K.L., Kamal, K.J. and Mishra, A.K. (1995): Role of fungi in the deterioration of wall paintings. *The Science of the Total Environment*, 167: 255-271.
- Garg, K.L., Mishra, A.K. and Mukerji, K.G. (2010): Fungal fouling of historical wall paintings. In: *Taxonomy and Ecology of Indian Fungi*. Mukerji, K.G. and Manoharachary, C. (Eds.). IK International Publishing House, India. pp. 263-288.
- Gaylarde, P.M. and Gaylarde, C.C. (1998): A rapid method for the detection of algae and cyanobacteria on the external surfaces of buildings. In: *3rd Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium*. Gaylarde, C.C., Barbosa T.C.P. and Gabilan, N.H. (Eds.). The British Phycological Society, UK.
- Gettens, R.J., Pease, M. & Stout, G.I. (1941): The problem of mold growth in paintings. *Technical Studies in the Fine Arts*, 9: 127-143.
- Giacobini, C., de Cicco, M.A., Tiglie, I. and Accardo, G. (1988): Actinomycetes and biodeterioration in the field of fine art. In: *Biodeterioration*. Houghton, D.R., Smith, R.N. and Eggins, H.O.W. (Eds.). Elsevier Applied Science, USA. pp.418-423.

- Giacobini, C., Pedica, M. and Spinucci, M. (1991): Problems and future projects on the study of biodeterioration: mural and canvas paintings. In: Proceedings of the 1st International Conference on the Biodeterioration of Cultural Property. New Delhi, India. pp. 275-286.
- Gil, M., Martins, M.R., Carvalho, M.L., Souto, C., Longelin, S., Cardoso, A., Mirão, J. and Candeias, A.E. (2015): Microscopy and microanalysis of an extreme case of salt and biodegradation in 17th century wall paintings. *Microscopy and Microanalysis*, 21: 606-616.
- Gilbert, P. and Moore, L.E. (2005): Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 703-715.
- Giullitte, O. (1995): Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment*, 167: 215-220.
- Giustetto, R., Gonella, D., Bianciotto, V., Lumini, E., Voyron, S., Costa, E. and Diana, E. (2015): Transfiguring biodegradation of frescoes in the Beata Vergine del Pilone Sanctuary (Italy): Microbial analysis and minero-chemical aspects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 98: 6-18.
- Gorbushina, A.A. and Petersen, K. (2000): Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 277-284.
- Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W.E., Laiz, L., Petersen, K., Sáiz-Jiménez, C. and Swings, J. (2004): Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: 13-24.
- Gorbushina, AA. and Broughton W.J. (2009): Microbiology of atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annual Review of Microbiology*, 63: 431-550.

- Griffiths, M.W. (1996): The role of ATP bioluminescence in the food industry: New light on old problems. *Food Technology*, 50: 62-72.
- Grilli-Caiola, M., Forni, C. and Albertano, P. (1987): Characterization of the algal flora growing on ancient roman frescoes. *Phycologia*, 26: 387-390.
- Guglielminetti, M., De Giuli, C., Radaelli, A., Bistini, F., Carruba, G., Spera, G. and Caretta, G. (1994): Mycological and ultrastuctural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescos of the Monastery of St. Damian in Assisi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 33: 269-283.
- Hadduck, A.N., Hindagolla, V., Contreras, A.E., Li, Q. and Bakalinsky, A.T. (2010): Does aqueous Fullerene inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* or *Escherichia coli*? *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 8239-8242.
- Han, K., Lee, S. and Lee, H. (2013): Study of the painting methods of mural paintings in ancient tombs of Gogureyeo using scanning electron microscope. *Microscopy and Microanalysis*, 19: 157-161.
- Hanel, H. and 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, UK.
- Hawksworth, D.L. and Rossman, A.Y. (1997): Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, 87: 888-891.
- Helmi, M.F., Elmitwalli, R.H., Rizk, A.M. and Hagrassy, F.A. (2011): Antibiotic extraction as a recent biocontrol method for *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* fungi in ancient Egyptian mural paintings. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 11: 1-7.
- Heyn, C., Petersen, K. and Krumbein, W.E. (1995): Investigation of microbial degradation of synthetic polymers used in the conservation and restoration of art

- objects. In: Biodeterioration and Biodegradation. Bousher, A., Chandra, M., and Edyvean, R., (Eds.). IChemE, UK. pp. 73-79.
- Hope, R., Jestoi, M. and Magan, N. (2002): Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oil and antioxidant. In: Advances in Stored Product Protection. Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M. and Highley, E. CABI, UK. pp. 486-492.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y. and Yamaguchi, H. (2000): Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43: 17-23.
- Inouye, S., Abe, S., Yamaguchi, H. and Asakura, M. (2003): Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *International Journal of Aromatherapy*, 13: 33-41.
- Inouye, S., Uchida, K., Maruyama, N., Yamaguchi, H. and Abe, S. (2006): A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 47: 91-98.
- Iordanidis, A., Garcia-Guinea, J., Strati, A., Gkimourtzina, A. and Papoulidou, A. (2011): Byzantine wall paintings from Kastoria, northern Greece: Spectroscopic study of pigments and efflorescing salts. *Spectrochimica Acta Part A*, 78: 874-887.
- Ioannou, C.J., Hanlon, G.W. and Denyer, S.P. (2007): Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 296-306.
- Isaković, A., Marković, Z., Todorović-Marković, B., Nikolić, N., Vranješ-Đurić, S., Mirković, M., Dramicanin, M., Harhaji, L., Raičević, N., Nikolić, Z. and Trajković V. (2006): Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicological Sciences*, 91: 173-183.

- Ishii, H. (1995): Monitoring of fungicide resistance in fungi: biological to biochemical approaches. In: Molecular methods in plant pathology. Singh, S.U. and Singh, P.R. (Eds.). Lewis Publisher, UK. pp. 483-495.
- Jajić, I.M., Bočarov-Stančić, A.S. and Bijelić, M.B. (2007): Investigations of the capability of *Fusarium* isolates from corn for biosynthesis of fusariotoxins. Zbornik Matice srpske, 113: 125-133.
- John, D.M., Whitton, B.A. and Brook, A.J. (2003): The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. University Press, UK.
- Jones, B. and Pemberton, S.G. (1987): The role of fungi in the diagenetic alteration of spar calcite. Canadian Journal of Earth Sciences, 24: 903-914.
- Jurado, V., Sanchez-Moral, S. and Sáiz-Jiménez, C. (2008): Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. International Biodeterioration & Biodegradation, 62: 325-330.
- Karbowska-Berent, J. (2003): Microbiodeterioration of mural paintings: a review. In: Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art. Koestler, R.J., Koestler, V.H., Charola, A.E. and Nieto-Fernandez, F.E. (Eds.). The Metropolitan Museum of Art, USA. pp. 266-301.
- Karpovich-Tate, N. and Rebrikova, N.L. (1990): Microbial communities on damaged frescoes and building materials in the Cathedral of the Nativity of the Virgin in the Pafnutii-Borovskii Monastery, Russia. International Biodeterioration, 27: 281-296.
- Kigawa, R., Sano, C., Ishizaki, T., Miura, S. and Sugiyama, J. (2006): Biological issues in the conservation of mural paintings of Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan. In: The Object in Context: Crossing Conservation Boundaries: Contributions to the Munich Congress. Saunders, D., Townsend, J. and Woodcock, S. (Eds.). International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, UK. pp. 43-50.

- Kim, J.J., Kim, S.H., Lee, S. and Breuil, C. (2003): Distinguishing *Ophiostoma ips* and *O. montium* two bark beetle-associated sapstain fungi. FEMS Microbiology Letters, 222: 187-192.
- Knutsen, A.P., Bush, R.K, Demain, J.G., Denning, D.W., Dixit, A., Fairs, A., Greenberger, P.A., Kariuki, B., Kita, H., Kurup, V.P., Moss, R.B., Niven, R.M., Pashley, C.H., Slavin, R.G., Vijay, H.M. and Wardlaw, A.J. (2011): Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 129: 280-291.
- Kolwzan, B., Adamiak, W., Grabas, K. and Pawełczyk, A. (2006): Introduction to Environmental Microbiology. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Poland.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1998): Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 19/1. Spektrum Akademischer Verlag, Germany.
- Komarov, A.A. (1989): Freska. In: Tekhnologiiia materialov stenopisi. Komarov, A.A. (Ed.). Izobrazitelnoe iskusstvo, Moskva. pp. 50-66.
- Korpi, A., Pasanen, A.L., Pasanen, P. and Kalliokoski, P. (1997): Micobial growth and metabolism in house dust. International Biodeterioration & Biodegradation, 40: 19-27.
- Kotulanová, E., Schweigstilllová, J., Švarcová, S., Hradil, D., Bezdička, P. and Grygar, T. (2009): Wall painting damage by salts: causes and mechanisms. Acta Research Reports, 18: 27-31.
- Krumbein, W.E. (2003): Patina and cultural heritage - a geomicrobiologist's perspective. In: Proceedings of the 5th EC conference "Cultural heritage research: a pan-european challenge". Krakow, Poland. pp. 39-47.
- Krumbein, W.E. and Lange, C. (1978): Decay of plaster paintings and wall material of the interior of buildings via microbial activity. In: Environmental Biogeochemistry and Beomicrobiology. Proceedings of the 3rd International Symposium on

- Environmental Biogeochemistry. Arbor, A. (Ed.). Science Publishers, Inc. USA. pp. 687-697.
- Laird, K. and Phillips, C. (2011): Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology*, 54: 169-174.
- Langsrud, S., Sundheim, G. and Borgmann-Strahsen, R. (2003): Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 874-882.
- Larsen, F.O., Clementsen, P., Hansen, M., Maltbaek, N., Ostfeldt-Larsen, T., Nielsen, K.F., Gravesen, S., Skov, P.S. and Norn, S. (1998): Volatile organic compounds from the indoor mould *Trichoderma viridae* cause histamine release from human bronchoalveolar cells. *Inflammation Research*, 47: S5-S6.
- Latha, R., Sasikala, R., Muruganandam, N. and Shiva Prakash, M.R. (2010): Onychomycosis due to ascomycete *Chaetomium globosum*: a case report. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53:556-557.
- Lazzarini, L. and Salvadori, O. (1989): A reassessment of the formation of the patina called Scialbatura. *Studies in Conservation*, 34: 20-26.
- Lengeler, J.W., Drews, G. and Schlegel, H.G. (1999): *Biology of the Prokaryotes*. Wiley-Blackwell, USA.
- Lliveras, A., Boularand, S., Roqué, J., Cotte, M., Giráldez, P. and Vendrell-Saz, M. (2008): Weathering of gilding decorations investigated by SR: development and distribution of calcium oxalates in the case of Sant Benet de Bages (Barcelona, Spain). *Applied Physics A*, 90: 23-33.
- López-Miras del Mar, M., Piñar, G., Romero-Noguera, J., Bolívar-Galiano, F.C., Ettenauer, J., Sterflinger, K. and Martínez-Sánchez, I. (2012): Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. *Aerobiologia*, 29: 301-314.

- López-Miras del Mar, M., Martín-Sánchez, I., Yebra-Rodríguez, Á., Romero-Noguera, J., Bolívar-Galiano, F., Ettenauer, J., Sterflinger, K. and Piñar, G. (2013): Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration. *PLoS ONE*, 8: e80198.
- Lundin, A. (2000): Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods in Enzymology*, 305: 346-371.
- Ljaljević Grbić, M., Subakov Simić, G., Krizmanić, J. and Ladić, V. (2009): Cyanobacterial, algal and fungal biofilm on sandstone substrata of Eiffel's Lock in Bečej (Serbia). *Botanica Serbica*, 33: 101-105.
- Ljaljević Grbić, M., Unković, N., Stupar, M., Vukojević, J. and Nedeljković, T. (2014): Implementation of ATP bioluminescence method in the study of the fungal deterioration of textile artefacts. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 108: 132-136.
- Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionísio, A. and Sáiz-Jiménez, C. (2009): Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology*, 155: 3476-3490.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A. and Baxter, E.S. (2002): Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 685-690.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S. and Scorciapino, A. (2005): Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extract of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. and of *Acorus calamus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7939-7943.
- Martens, M. (2012): Climate risk assessment in museums: degradation risks determined from temperature and relative humidity data. Doctoral dissertation. Technical University of Eindhoven, the Netherlands.

- Martin, G., Guggiari, M., Bravo, D., Zopfi, J., Cailleau, G., Aragno, M., Job, D., Verrecchia, E. and Junier, P. (2012): Fungi and bacteria and soil pH: the oxalate-carbonate pathway as a model for metabolic interaction. *Environmental Microbiology*, 14: 2960-2970.
- Maruzella, J.C. and Sicurella, N.A. (1960): Antibacterial activity of essential oil vapors. *Journal of American Pharmacists Association*, 49: 692-694.
- Marvasi, M., Gallagher, K.L., Martinez, L.C., Molina Pagan, W.C., Rodríguez Santiago, R.E., Castilloveitía Vega, G. and Visscher, P.T. (2011): Importance of B4 Medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. *Geomicrobiology Journal*, 29: 916-924.
- Maxim, D. (2013): Health effects of exposure to indoor fungi. Case study - The restorers of mural paintings. *European Journal of Science and Theology*, 9: 149-157.
- McCarthy, B.J. (1989): Use of rapid methods in early detection and quantification of biodeterioration, part 2. *Biodeterioration Abstracts*, 3: 109-116.
- Medić, M. (2002): *Stari slikarski priručnici II*. Republički zavod za zaštitu spomenika, Srbija.
- Mentu, S. (2004): Demands on climate according to the Finish experience. In: *Proceedings of the seminar "Indoor Climate in Churches - Problems and Solutions"*. Riga, Sweden. pp. 14-15.
- Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz W. and Piñar, G. (2006): Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 133-141.
- Micheluz, A., Manente, S., Tigini, V., Prigione, V., Pinzari, F., Ravagnan, G. and Varese, G.C. (2015): The extreme environment of a library: xerophilic fungi inhabiting indoor niches. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99: 1-7.

- Michie, C.A. and Cooper, E. (1991): Frankincense and myrrh as remedies in children. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 84: 602-605.
- Milanesi, C., Baldi, F., Borin, S., Vignani, R., Ciampolini, F., Faleri, C. and Cresti, M. (2006a): Biodeterioration of a fresco by biofilm forming bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 168-173.
- Milanesi, C., Baldi, F., Borin, S., Vignani, R., Ciampolini, F., Faleri, C. and Cresti, M. (2006b): Fungal deterioration of medieval wall fresco determined by analysing small fragments containing copper. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 7-13.
- Miličić, Lj. (2014): Aditivi krečnih maltera. Zbornik radova Seminara i radionice „Kreč kao istorijski materijal”. Sopoćani, Srbija. pp. 89-92.
- Mirkov, S., Djordjević, A., Andrić, N., Andrić, S., Kostić, T., Bogdanović, G., Vojinović-Miloradov, M. and Kovačević, R. (2004): Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C₆₀(OH)₂₄. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 11: 201-207.
- Mohamed, A.A., Ali, S.I., El-Baz, F.K., Hegazy, A.K. and Kord, M.A. (2014): Chemical composition of essential oil and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin. *Industrial Crops and Products*, 57: 10-16.
- Mohamed, A.A., Ali, S.I., Kabil, H.F., Hegazy, A.K., Kord, M.A. and El-Baz, F.K. (2015): Assessment of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of *Boswellia carteri* resin. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7: 502-509.
- Molitoris, H.P., Buchalo, A.S., Kurchenko, I., Nevo, E., Rawal, B.S., Wasser, S.P. and Oren, A. (2000): Physiological diversity of the first filamentous fungi isolated from the hypersaline Dead Sea. *Fungal Diversity*, 5: 55-70.

- Montacutelli, R., Maggi, O., Tarsitani, G. and Gabrielli, N. (2000): Aerobiological monitoring of the "Sistine Chapel": airborne bacteria and microfungi trends. *Aerobiologia*, 16: 441-448.
- Monte, M. (2003a): Oxalate film formation on marble specimens caused by fungus. *Journal of Cultural Heritage*, 4: 255-258.
- Monte, M. (2003b): Biogenesis of oxalate patinas on marble specimens in fungal culture. *Aerobiologia*, 19: 271-275.
- Mora, P., Mora, L., and Philipot, P. (1984): Conservation of Wall Painting. Butterworths, UK.
- Morteza-Semnani, K. and Saeedi, M. (2003): Constituents of the essential oil of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. var. *molmol*. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 50-51.
- Morton, L.H.G. and Surman, S.B. (1994): Biofilms in biodeterioration - a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 34: 203-221.
- Nag Raj, T.R. (1993): Coelomycetous Anamorphs with Appendage Bearing Conidia. Mycologue Publications, Belgium.
- Nascimbene, J., Thüs, H., Marini, L. and Nimis, P.L. (2009): Early colonization of stone by freshwater lichens of restored habitats: A case study in northern Italy. *Science of the Total Environment*, 407: 5001-5006.
- Nevalainen, A. and Morawaska, L. (2009): Biological agents in indoor environments. Assessment of health risks. Work conducted by a WHO Expert Group between 2000-2003. Queensland University of Technology, Australia.
- Nevalainen, A., Täubel, M. and Hyvärinen, A. (2015): Indoor fungi: companions and contaminants. *Indoor Air*, 25: 125-156.
- Nevin, A., Melia, J.L., Osticioli, I., Gautier, G. and Colombini, M.P. (2008): The identification of copper oxalates in a 16th century Cypriot exterior wall painting

- using micro FTIR, micro Raman spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cultural Heritage*, 9: 154-161.
- Nielsen, G.D., Roursgaard, M., Jensen, K.A., Poulsen, S.S. and Larsen S.T. (2008): *In vivo* biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103: 197-208.
- Nikolić, M., Smiljković, M., Marković, T., Ćirić, A., Glamočlija, J., Marković, D. and Soković, M. (2016): Sensitivity of clinical isolates of *Candida* to essential oils from Burseraceae family. *EXCLI Journal*, 15: 280-289.
- Nugari, M.P., Realini, M. and Roccardi, A. (1993): Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores. *Aerobiologia*, 9: 131-139.
- Nugari, M.P. and Roccardi, A. (2001): Aerobiological investigations applied to the conservation of cultural heritage. *Aerobiologia*, 17: 215-223.
- Nugari, M.P., Pietrini, A.M., Caneva, G., Imperi, F. and Visca, P. (2009): Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 705-711.
- Nunes, I., Mesquita, N., Cabo Verde, S., Bandeira, A.M.L., Carolino, A.M., Portugal, A. and Botelho, M.L. (2013): Characterization of an airborne microbial community: a case study in the archive of the University of Coimbra, Portugal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79: 36-41.
- Oberhofer, B., Nikiforov, A., Buchbauer, G., Jirovetz, L. and Bicchi, C. (1999): Investigation of the alteration of the composition of various essential oils used in aroma lamp applications. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 293-299.
- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 103-116.
- O'Neill, T.B. (1988): Succession and interrelationships of microorganisms on painted surfaces. *International Biodeterioration*, 24: 373-379.

- Omelyansky, V.L. (1940): Manual in Microbiology. USSR Academy of Sciences, Russia.
- Omidbakhsh, N., Ahmadpour, F. and Kenny, N. (2014): How reliable are ATP bioluminescence meters in assessing decontamination of environmental surfaces in healthcare settings? PLoS ONE, 9: e99951.
- Orial, G., Boust, F. and Francois, A. (2009): Lascaux cave: monitoring of microbiological activities. In: Proceedings of the 31st International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property. Tokyo, Japan. pp. 31-41.
- Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M. and Sáiz-Jiménez, C. (1993): Cyanobacteria and algae on historic buildings and monuments. In: Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation vol. I. Garg, K.L., Garg, N. and Mukerji, K.G. (Eds.). Naya Prokash, India. pp. 173-203.
- Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J., Reyes-Estebanez, M., Quintana, P., del C. de la Rosa-García, S., Bullen, H., Gómez-Cornelio, S. and Chan-Bacab, M.J. (2016): Bioweathering potential of cultivable fungi associated with semi-Arid surface microhabitats of Mayan buildings. *Frontiers in Microbiology*, 7: 201.
- Ospitali, F., Rattazzi, A., Colombini, M.P., Andreotti, A. and di Lonardo, G. (2007): XVI century wall paintings in the “Messer Filippo” cell of the tower of Spilamberto: Microanalyses and monitoring. *Journal of Cultural Heritage*, 8: 323-327.
- Pailer, M., Scheidl, O., Gutwillinger, H., Klein, E. and Obermann, H. (1981a): Über die Zusammensetzung des Pyrolysates von Weihrauch „Aden“, dem Gummiharz von *Boswellia carteri* Birdw.,1. *Mitt. Monatshefte für Chemie*, 112: 341-358.
- Pailer, M., Scheidl, O., Gutwillinger, H., Klein, E. and Obermann, H. (1981b): Über die Zusammensetzung des Pyrolysates von Weihrauch „Aden“, dem Gummiharz von *Boswellia carteri* Birdw.,2. *Mitt. Monatshefte für Chemie*, 112: 595-603.
- Pailer, M., Scheidl, O., Gutwillinger, H., Klein, E. and Obermann, H. (1981c): Über die Zusammensetzung des Pyrolysates von Weihrauch „Aden“, dem Gummiharz von *Boswellia carteri* Birdw.,3. *Mitt. Monatshefte für Chemie*, 112: 987-1006.

- Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D. and Dixit, S.N. (1982): Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. *Zeit Pflanzkrankh Pflanzensch*, 89: 344-349.
- Paner, C.M. (2012): Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the University of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences. *Prime Journal of Microbiology Research*, 2: 114-120.
- Pangallo, D., Chovanová, K, Šimonovičová, A. and Ferianc, P. (2009): Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 277-287.
- Pangallo, D., Kraková, L., Chovanová, K., Šimonovičová, A., de Leo, F. and Urzì, C. (2012): Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 2015-2027.
- Pangallo, D., Bučková, M., Kraková, L., Puškárová, A., Šaková, N., Grivalský, T., Chovanová, K. and Zemánková, M. (2014): Biodeterioration of epoxy resin: a microbial survey through culture-independent and culture-dependent approaches. *Environmental Microbiology*, 17: 462-479.
- Pantazidou, A. and Theoulakis, P. (1997): Cyanophytes and associated flora at the neoclassical Palace of Sts George and Michael in Corfu (Greece). Aspects of cleaning procedures. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin*. Moropoulou, A., Zezza, F., Kollias, E. and Papachistodoulou, I. (Eds.). Rhodes: Technical Chamber of Greece, Greece. pp. 355-368.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. and Kole, C.R. (1997): Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89: 39-46.

- Pauli, O. (1972): Paint fungicides, a review. In: *Biodeterioration of Materials*. Walters, A.H. and Hueck-van-der Plas, E.H. (Eds.). Elsevier Applied Science, UK. pp. 355-359.
- Pepe, O., Sannino, L., Palomba, S., Anastasio, M., Blaiotta, G., Villani, F. and Moschetti, G. (2010): Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches. *Microbiological Research*, 165: 21-32.
- Pepe, O., Palomba, S., Sannino, L., Blaiotta, G., Ventorino, V., Moschetti, G. and Villani, F. (2011): Characterization in the archaeological excavation site of heterotrophic bacteria and fungi of deteriorated wall painting of Herculaneum in Italy. *Journal of Environmental Biology*, 32: 241-250.
- Pérez-Alonso, M., Castro, K., Álvarez, M. and Madariaga, J.M. (2004): Scientific analysis versus restorer's expertise for diagnosis prior to a restoration process: the case of Santa Maria Church (Herme, Asturias, North of Spain). *Analytica Chimica Acta*, 524: 379-389.
- Perry, R.S., Gorbushina, A.A., Engel, M.H., Kolb, V.M., Krumbein, W.E. and Staley, J.T. (2004): Accumulation and deposition of inorganic and organic compounds by microcolonial fungi. In: *Proceedings of 3rd European Workshop on Exo/Astrobiology, Mars: the Search for Life*. Madrid, Spain. pp. 55-58.
- Petersen, K. and Hammer, I. (1992): Biodeterioration of romanesque wall paintings under salt stress in the Nonnberg Abbey, Salzburg, Austria. In: *International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property. Conservation and Restoration of Mural Paintings*. Emoto, Y. and Miura, S. (Eds.). Tokyo National Research Institute for Cultural Property, Japan. pp. 263-277.
- Petersen, K., Yun, Y. and Krumbein, W.E. (1995): On the occurrence of alkalitolerant and alkaliphilic microorganisms on wall paintings and their interaction in restoration/consolidation. In: *Proceedings of 3rd International Congress on Biodeterioration of Cultural Property*. Bangkok, Thailand. pp. 371-385.

- Pietrini, A.M., Ricci, S. and Nugari, M.P. (2008): Churches and crypts. In: Plant Biology for Cultural Heritage. Biodeterioration and Conservation. Caneva, G., Nugari, M.P. and Salvadori, O. (Eds.). Getty Conservation Institute, USA. pp. 179-183.
- Piñar, G., Ripka, K., Weber, J. and Sterflinger, K. (2009): The micro-biota of a sub-surface monument the medieval chapel of St. Virgil (Vienna, Austria). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 851-859.
- Pinna, D. (1993): Fungal physiology and the formation of calcium oxalate films on stone monuments. *Aerobiologia*, 9: 157-167.
- Pinna, D. and Salvadori, O. (2008): Processes of biodeterioration: general mechanisms. In: Plant Biology for Cultural Heritage. Biodeterioration and Conservation. Caneva, G., Nugari, M.P. and Salvadori, O. (Eds.). The Getty Conservation Institute, USA. pp. 15-35.
- Piqué, F., Baglioni, P., Dei, L. and Ferroni, E. (1992): Physicochemical aspects of the deliquescence of calcium nitrate and its implications in wall painting conservation. *Studies in Conservation*, 37: 217-227.
- Pitt, J.I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic state *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, UK.
- Polak, A. (1999): The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycosis*, 42: 355-370.
- Pooja, V., Sanwal, H., Bhatnagar, S. and Srivastava, A.K. (2012): Targeting virulence: novel effect of *Myristica fragrans* on melanisation and conidiation of *Aspergillus niger*. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 2: 32-39.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. and Dubey, N.K. (2012): Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Research International*, 49: 201-208.
- Prakash, B., Kumar Mishra, P., Kedia, A. and Dubey, N.K. (2014): Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia*

- carterii* Birdw. essential oil and its *in vivo* practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 56: 240-247.
- Price, C.A. (1996): *Stone Conservation: An Overview of Current Research*. Getty Conservation Institute, USA.
- Pyrri, I. and Kapsanaki-Gotsi, E. (2007): A comparative study on the airborne fungi in Athens, Greece, by viable and non-viable sampling methods. *Aerobiologia*, 23: 3-15.
- Rajkowska, K., Koziróg, A., Otlewska, A., Piotrowska, M., Nowicka-Krawczyk, P., Brycki, B., Kunicka-Styczyńska, A. and Gutarowska, B. (2015): Quaternary ammonium biocides as antimicrobial agents protecting historical wood and brick. *Acta Biochimica Polonica*, 63: 152-159.
- Rakotonirainy, M.S. and Arnold, S. (2008): Development of a new procedure based on the energy charge measurement using ATP bioluminescence assay for the detection of living mould from graphic documents. *Luminescence*, 23: 182-186.
- Rakotonirainy, M.S. and Dubar, P. (2013): Application of bioluminescence ATP measurement for evaluation of fungal viability of foxing spots on old documents. *Luminescence*, 28: 308-312.
- Ramírez, J.L., Santana, M.A., Galindo-Castro, I. and Gonzalez, A. (2005): The role of biotechnology in art preservation. *TRENDS in Biotechnology*, 23: 584-588.
- Ranalli, G., Alfano, G., Belli, C., Lustrato, G., Colombini, M., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P., Cappitelli, F. and Sorlini, C. (2005): Biotechnology applied to cultural heritage: Biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 73-83.
- Ranilli, G., Zanardini, E., Pasini, P. and Roda, A. (2003): Rapid biodeteriogen and biocide diagnosis on artwork: a bioluminescent low-light imaging technique. *Annals of Microbiology*, 53: 1-13.

- Raper, B.K. and Fennel, D.I. (1965): The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, USA.
- Raschle, P. (2001): Microbiology of our cultural heritage. CHIMIA International Journal for Chemistry, 55: 990-995.
- Ravikumar, H.R., Rao, S.S. and Karigar, C.S. (2012): Biodegradation of paints: a current status. Indian Journal of Science and Technology, 5: 1977-1987.
- Ripka, K. (2005): Identification of microorganisms on stone and mural paintings using molecular methods. Master thesis. Faculty of Natural Sciences, Austria.
- Roccardi, A., Ricci, S. and Pietrini, A.M. (2008): Semienclosed environments. In: Plant Biology for Cultural Heritage. Biodeterioration and Conservation. Caneva, G., Nugari, M.P., and Salvadori, O. (Eds.). Getty Conservation Institute, USA. pp. 206-210.
- Roe, A.D., Rice, A.V., Bromilow, S.E., Cooke, J.E. and Sperling, F.A. (2010): Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle. Molecular Ecology Resources, 10: 946-959.
- Roig, P.B., Ros, J.L.R. and Estellés, R.M. (2013): Biocleaning of nitrate alterations on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. International Biodeterioration & Biodegradation, 84: 266-274.
- Rojas, T.I., Aira, M.J., Batista, A., Cruz, I.L. and González, S. (2012): Fungal biodeterioration in historic buildings of Havana (Cuba). Grana, 51: 44-51.
- Roldán, M., Clavero, E. and Hernández-Mariné, M. (2003): Aerophytic biofilms in dim habitats. In: Molecular Biology and Cultural Heritage. Sáiz-Jiménez, C. (Ed.). Swets & Zeitlinger, the Netherlands. pp. 163-169.
- Rosado, T., Candeias, A., Caldeira, A.T., Mirão, J. and Gil, M. (2013a): Evaluation of mural paintings biodeterioration by oxalate formation. In: Science and

- Technology for the Conservation of Cultural Heritage. Rogerio-Candelera, M.A., Lazzari, M. and Cano, E. (Eds.). Taylor & Francis Group, UK. pp. 147-150.
- Rosado, T., Gil, M., Mirão, J., Candeias, A. and Caldeira, A.T. (2013b): Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms - A comprehensive study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85: 1-7.
- Rosado, T., Martins, M.R., Pires, M., Mirão, J., Candeias, A. and Caldeira, A.T. (2013c): Enzymatic monitorization of mural paintings biodegradation and biodeterioration. *International Journal of Conservation Science*, 4: 603-612.
- Roussel, S., Reboux, G., Millon, L., Parchas, M.D., Boudih, S., Skana, F., Delaforge, M. and Rakotonirainy, M.S. (2012): Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air*, 22: 514-522.
- Ruffolo, S.A., La Russa, M.F., Malagodi, M., Rossi, C.O., Palermo, A.M. and Crisci, G.M. (2010): ZnO and ZnTiO₃ nanopowders for antimicrobial stone coating. *Applied Physics A - Materials Science & Processing*, 100: 829-834.
- Ruga, L., Orlandi, F., Romano, B. and Fornaciari, M. (2015): The assessment of fungal bioaerosols in the crypt of St. Peter in Perugia (Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 98: 121-130.
- Saarela, M., Alakomi, H.L., Siuhko, M.L., Maunuksela, L., Raaska, L. and Mattila-Sandholm, T. (2004): Heterotrophic microorganisms in air and biofilm samples from roman catacomb, with special emphasis on actinobacteria and fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54: 27-37.
- Sáiz-Jiménez, C. and Samson, R.A. (1981a): Biodegradacion de obras de arte. Hongos implicados en la degradacion de los frescos del monasterio de la Rabida (Huelva). *Botánica Macaronésica*, 8-9: 255-264.
- Sáiz-Jiménez, C. and Samson, R.A. (1981b): Microorganisms and environmental pollution as deteriorating agents of the frescoes of the monastery "Santa Maria de la Rabida", Huelva, Spain. In: *Proceedings of the 6th Triennial Meeting of the*

- International Council of Museums Committee for Conservation. Ottawa, Canada. pp. 1-14.
- Sáiz-Jiménez, C. and Laiz, L. (2000): Occurance of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 319-326.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. (2004): Introduction to food- and airborne fungi. Ponse & Looyen, the Netherlands.
- Samson, R.A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. and Andersen, B. (2010): Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, the Netherlands.
- Sarad, L.K. and Adhikary, S.P. (2008): Diversity of micro-algae and cyanobacteria on building facades and monuments in India. *Algae*, 23: 91-114.
- Saran, S., Isar, J. and Saxena, R.K. (2007): A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 697-699.
- Sarmiento, A., Maguregui, M., Martinez-Arkarazo, I., Angulo, M., Castro, K., Olazábal, M.A., Fernández, L.A., Rodríguez-Laso, M.D., Mujika, A.M., Gómez, J. and Madariaga, J.M. (2008): Raman spectroscopy as a tool to diagnose the impacts of combustion and greenhouse acid gases on properties of built heritage. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39: 1042-1049.
- Sato, K., Krist, S. and Buchbauer, G. (2006): Antimicrobial effect of trans-cinnamaldehyde, (-)-perillaldehyde, (-)-citronellal, citral, eugenol and carvacrol on airborne microbes using an airwasher. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 2292-2294.
- Savković, Ž., Unković, N., Stupar, M., Franković, M., Jovanović, M., Erić, S., Šarić, K., Stanković, S., Dimkić, I., Vukojević, J. and Ljaljević Grbić, M. (2016): Diversity and biodeteriorative potential of fungal dwellers on ancient stone stela. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 115: 212-223.

- Sayer, J.A., Kierans, M. and Gadd, G.M. (1997): Solubilisation of some naturally occurring metal-bearing minerals, limescale and lead phosphate by *Aspergillus niger*. FEMS Microbiology Letters, 154: 29-35.
- Sayer, J.A. and 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. Mycological Research, 105: 1261-1267.
- Schanchez-Moral, S., Luque, L., Canaveras, J., Laiz, L., Jurado, V., Hermossin, B., Sáiz-Jiménez, C. (2004): Bioinduced barium precipitation in St. Callixtus and Domitilla catacombs. Annals of Microbiology, 54: 1-12.
- Schipper, M.A.A. (1976): On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. Studies in Mycology, 12: 1-40.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N. and Geisen, R. (2008): Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. FEMS Microbiology Letters, 284: 142-149.
- Schricks, J.M., Raedts, M.J., Stouthamer, A.H. and van Verseveld, H.W. (1995): Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzed by capillary electrophoresis. Analytical Biochemistry, 231:175-181.
- Schwab, C.J. and Straus, D.C. (2004): The roles of *Penicillium* and *Aspergillus* in sick building syndrome. Advances in Applied Microbiology, 55: 215-238.
- Seves, A.M., Sora, S. and Ciferri, O. (1996): The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation. International Biodeterioration & Biodegradation, 37: 215-224.
- Seves, A.M., Sora, S., Scicolone, G., Testa, G., Bonfatti, A.M., Rossi, E. and Seves, A. (1999): Effect of thermal accelerated ageing on the structural properties of model canvas paintings. Journal of Cultural Heritage, 3: 315-322.
- Seves, A.M., Romanò, M., Maifreni, T., Seves, A., Scicolone, G., Sora, S. and Ciferri, O. (2000): A laboratory investigation of the microbial degradation of cultural heritage. In: Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the

- Degradation and Protection of Cultural Heritage. Ciferri, O., Tiano, P. and Mastromei, G. (Eds.). Springer, USA. pp. 121-133.
- Shama, G. and Malik, D.J. (2013): The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216: 115-125.
- Shi, C. and Miller, J.D. (2011): Characterization of the 41 kDa allergen AspV13, a subtilisin-like serine protease from *Aspergillus versicolor*. *Molecular Immunology*, 48: 1827-1834.
- Shirakawa, M.A., Gaylarde, C.C., Gaylarde, P.M., Vanderley, J. and Gambale, W. (2002): Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 165-173.
- Shivani, D. and Kumar, J.S. (2015): Extracellular enzymatic profile of fungal deteriogens of historical Palace of Ujjain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 122-132.
- Silva, H.E. and Henriques, F.M.A. (2014): Microclimatic analysis of historic buildings: A new methodology for temperate climates. *Building and Environment*, 82: 381-387.
- Simonart, P. and Wiaux, A. (1960): Production of shikimic acid by *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Nature*, 186: 78-79.
- Sirt, E. (2011): Evaluation of biodeterioration in Nemrut Mount Monument and temple of Augustus by using various techniques. Master thesis. The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Turkey.
- Six, D.L., De Beer, Z.W., Duong, T.A., Carroll, A.L. and Wingfield, M.J. (2011): Fungal associates of the lodgepole pine beetle, *Dendroctonus murrayanae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100: 231-244.
- Slavić, M., Djordjević, A., Radojičić, R., Milovanović, S., Oreščanin-Dušić, Z., Rakočević, Z., Spasić, M.B. and Blagojević, D. (2013): Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles

- decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction. *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1650.
- Smith, G. (1980): *Ecology and Field Biology*, 2nd ed. Harper & Row, USA.
- Smith, J.E., Deans, S.G., Anderson, J.G. and Davis, B. (1977): The nature of fungal sporulation. In: *Biotechnology and fungal differentiation*. Meyrath, J. and Bu'lock, J.D. (Eds.). Academic Press, USA. pp. 17-41.
- Stanojević, D. (2014): Kreč kao istorijski materijal. Zbornik radova Seminara i radionice "Kreč kao istorijski materijal". Sopoćani, Srbija. pp. 3-13.
- Stanojlović, M. (2014): Kreč kao polazni materijal za slikanje *al fresco*. Zbornik radova Seminara i radionice "Kreč kao istorijski materijal". Sopoćani, Srbija. pp. 3-13.
- Starmach, K. (1972): Chlorophyta III flora flodkowodna polski. Tom 10. Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, Poland.
- Sterflinger, K. (2000): Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal*, 17: 97-124.
- Sterflinger, K. (2005): Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: *Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, vol. 1. Rosa, C. and Gabor, P. (Eds.). Springer, USA. pp. 501-514.
- Sterflinger, K. (2010): Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24: 47-55.
- Sterflinger, K. and Krumbein, W.E. (1995): Multiple stress factors affecting growth of rock-inhabiting fungi. *Botanica Acta*, 108: 490-496.
- Sterflinger, K. and Sert, H. (2006): Biodeterioration and practice of restoration. In: *The materials of the cultural heritage in their environment*. Lefèvre, R.A. (Ed.). Edipuglia, Italy. pp. 157-166.
- Sterflinger, K. and Piñar, G. (2013): Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9637-9646.

- Straus, D.C. (2011): The possible role of fungal contamination in sick building syndrome. *Frontiers in Bioscience*, 3: 562-580.
- Strzelczyk, A. (1981): Paintings and sculptures. In: *Microbial Biodeterioration*. Rose, A.H. (Ed.). Academic Press, UK. pp. 203-234.
- Stupar, M., Kostić, M., Savković, Ž., Unković, N., Vukojević, J. and Ljaljević Grbić, M. (2016): Susceptibility of some fungi to *Boswellia careteri* Birdw. essential oil. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 130: 19-27.
- Su, H.J., Chao, C.J., Chang, H.Y., and Wu, P.C. (2007): The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. *Atmospheric Environment*, 41: 1230-1236.
- Sutton, B.C. (1980a): The coelomycetes I. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, UK.
- Sutton, B.C. (1980b): The coelomycetes II. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, UK.
- Sutton, D.A., Fothergill, A.W. and Rinaldi, M.G. (1998): Guide to clinically significant fungi. Williams & Wilkins, USA.
- Tabunschikov, Y. and Brodatch, M. (2004): Indoor air climate requirements for Russian churches and cathedrals. *Indoor Air*, 14:168-174.
- Ter Braak, C.J.F. and Šmilauer, P. (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca.
- Tiano, P., Tomaselli, L. and Orlando, C. (1989): The ATP-bioluminescence method for a rapid evaluation of the microbial activity in the stone materials of monuments. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 3: 213-216.
- To, M.S., Favrin, S., Romanova, N. and Griffiths, M.W. (2002): Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5258-5264.

- Tola, M. and Kebede, B. (2016): Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2: 1191103.
- Tonolo, A. and Giacobini, C. (1961): Microbiological changes on frescoes. In: Recent advances in conservation. Thompson, G. (Ed.). Butterworths, UK. pp. 62-64.
- Tortorano, A.M., Viviani, M.A., Biraghi, E., Rigoni, A.L., Pritigano, A., Grillot, R. and EBGA Network. (2005): *In vitro* testing of fungicidal activity of biocides against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 955-957.
- Tripković, T. (2014): Novi materijali na bazi kreča - nanokreč. Zbornik radova Seminara i radionice "Kreč kao istorijski materijal". Sopoćani, Srbija. pp. 115-125.
- Trovão, J., Mesquita, N., Paiva, D.S., Paiva de Carvalho, H., Avelar, L. and Portugal, A. (2013): Can arthropods act as vectors of fungal dispersion in heritage collections? A case study on the archive of the University of Coimbra, Portugal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79: 49-55.
- Udomsilp, J., Piyo, A., Khang-Khun, P. and Thobunluepop, P. (2009): Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, S24-S30.
- Uher, B. (2008): Spatial distribution of cyanobacteria and algae from the tombstone in a historic cemetery in Bratislava, Slovakia. *Fottea*, 9: 81-92.
- Ulloa, M. and Hanlin, R.T. (2000): *Illustrated dictionary of mycology*. APS Press, USA.
- Unković, N., Stupar, M., Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J., Seke, M., Jović, D. and Djordjević, A. (2012): Effects of fullereneol nano particles C₆₀(OH)₂₄ on filamentous fungus *Aspergillus niger* Tiegh. In: The 11th young researchers' conference: Material, Science and Engineering and the 1st European early stage researchers' conference on hydrogen storage. Belgrade, Serbia. p. 43.
- Unković, N., Ljaljević Grbić, M., Subakov Simić, G., Stupar, M., Vukojević, J., Jelikić, A. and Stanojević, D. (2015): Biodeteriogenic and toxigenic agents on 17th century

- mural paintings and facade of the old church of the Holy Ascension (Veliki Krčimir, Serbia). *Indoor and Built Environment*, 25: 826-837.
- Unković, N., Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Savković, Ž., Jelikić, A., Stanojević, D. and Vukojević, J. (2016): Fungal-induced deterioration of mural paintings: *in situ* and mock-model microscopy analyses. *Microscopy and Microanalysis*, 22: 410-421.
- Urzi, C. and Realini, M. (1998): Color changes of Noto's calcareous sandstone as related to its colonisation by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42: 45-54.
- Urbanus, J.F.L.M., van den Ende, H. and Koch, B. (1986): Calcium oxalate crystals in the wall of *Mucor mucedo*. *Mycologia*, 70: 829-842.
- Urzi, C. and de Leo, F. (2001): Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 1-11.
- Vazari, Đ. (1961): *Životi slavnih slikara, vajara i arhitekata*. Liberto, Srbija.
- Van Vuuren, S.F., Kamatou, G.P.P. and Viljoen, A.M. (2010): Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African Journal of Botany*, 76: 686-691.
- Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A. and Roques, C. (2014): A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. *Building and Environment*, 80: 136-149.
- Vermelho, A.B., Meirelles, M.N.L., Lopes, A., Petinate, S.D.G., Chaia, A.A. and Branquinha, M.H. (1996): Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 755-760.
- Verrecchia, E.P., Loisy, C., Braissan, O. and Gorbushina, A.A. (2003): The role of fungal biofilm and networks in the terrestrial calcium carbonate cycle. In: *Fossil and Recent Biofilms: A Natural History of Life on Earth*. Krumbein, W.E., Paterson, D.M.

- and Zavarzin, G.A. (Eds.). Springer Science + Business Media B.V., the Netherlands. pp. 363-370.
- Vileno, B., Marcoux, P.R., Lekka, M., Sienkiewicz, A., Fehér, T. and Forró, L. (2006): Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C₆₀ fullerol. *Advanced Functional Materials*, 16: 120-128.
- Vijayakumar, R., Kannan, V.V., Sandle, T. and Manoharan, C. (2012): *In vitro* antifungal efficacy of biguanides and quaternary ammonium compounds against cleanroom fungal isolates. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 66: 236-242.
- Vukojević, J. (2012): *Praktikum iz mikologije i lihenologije*. NNK International, Srbija.
- Vučković, V. (2008): *Crkva Sv. Vaznesenja Gospodnjeg u Velikom Krčimiru (1169-1950) eparhija Niška*. Sven, Srbija.
- Warscheid, T. (2003): The evaluation of biodeterioration processes on cultural objects and approaches for their effective control. In: *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*. Koestler, R.J., Koestler, V.H., Charola, A.E. and Nieto-Fernandez, F.E. (Eds.). The Metropolitan Museum of Art, USA. pp. 14-27.
- Warscheid, T. and Braams, J. (2000): Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 343-368.
- Watanabe, T. (2002): *Pictorial Atlas to Soil and Seed Fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC press, UK.
- Wazny, J. and Rudniewski, P. (1972): The biodeterioration of binding materials used in artistic painting. *Material und Organismen*, 7: 81-92.
- Weirich, G. (1989): *Untersuchungen fiber Mikroorganismen von Wandmalereien*. *Material und Organismen*, 24: 139-159.
- Weiss, A. (2004): Measuring climate in churches - occasions, demands and results. In: *Proceedings of the seminar "Indoor Climate in Churches - Problems and Solutions"*. Riga, Sweden. pp. 10-13.

- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). Academic Press, USA.
- Whitney, K.D. and Arnott, H.J. (1987a): Calcium oxalate crystal morphology and development in *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 79: 180-187.
- Whitney, K.D. and Arnott, H.J. (1987b): The effect of calcium on mycelial growth and calcium oxalate crystal formation in *Gilbertella persicaria* (Mucorales). *Mycologia*, 80: 707-715.
- Wiktor, V., Grosseau, P., Guyonnet, R. and Garcia-Diaz, E. (2007): Biodeterioration of cementitious matrix by fungi. Proceedings of 5th International Conference on Concrete under Severe Conditions: Environment and Loading. Tours, France. pp. 521-528.
- Williams, S.T. (1985): Streptomycetes in biodeterioration, their relevance, detection and identification. *International Biodeterioration*, 21: 201-209.
- Wollenzien, U., de Hoog, G.S., Krumbein, W.E. and Urzì, C. (1995): On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *The Science of the Total Environment*, 167: 287-294.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. and Crous, P.W. (2013): *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171-212.
- Xu, Y., He, Y., Li, X., Gao, C., Zhou, L., Sun, S. and Pang, G. (2013): Antifungal effect of ophthalmic preservatives phenylmercuric nitrate and benzalkonium chloride on ocular pathogenic filamentous fungi. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75: 64-67.
- Zalar, P., de Hoog, G.S. and Gunde-Cimerman, N. (1999): Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 43: 38-48.

- Zehnder, K. (2006): Long-term monitoring of wall paintings affected by soluble salts. *Environmental Geology*, 52: 353-367.
- Zehnder, K. and Arnold, A. (1989): Crystal growth in salt efflorescence. *Journal of Crystal Growth*, 97: 513-521.
- Znad, H., Markoš, J. and Baleš, V. (2004): Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions. *Process Biochemistry*, 39: 1341-1345.
- Zorba, T., Pavlidou, E., Stanojlović, M., Bikiaris, D., Paraskevopoulos, K. and Nikolić, V. (2006): Technique and palette of XIIIth century painting in the monastery Mileševa. *Applied Physics A*, 83: 719-725.
- Zucconi, L., Gagliardi, M., Isola, D., Onofri, S., Andaloro, M.C., Pelosi, C., Pogliani, P. and Selbmann, L. (2012): Biodeterioration agents dwelling in or on the wall paintings of the Holy Saviour's cave (Vallerano, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70: 40-46.
- Žikić, R. (2014): Kreč u konzervaciji zidnih slika. Zbornik radova Seminara i radionice "Kreč kao istorijski materijal". Sopoćani, Srbija. pp. 105-114.

BIOGRAFIJA

Nikola D. Unković je rođen 06.08.1988. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu "Popinski borci" završio je 2003. godine u Vrnjačkoj Banji. Srednju medicinsku školu, smer Farmaceutski tehničar, završio je sa odličnim uspehom u Kraljevu 2007. godine. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Opšta biologija, upisuje 2007. godine, a 2010. godine završava osnovne akademske studije i upisuje master studije na modulu Biologija gljiva. Fakultet je završio sa prosečnom ocenom 9,42 u redovnom roku odbranom master rada pod nazivom: "Uticaj nanočestica fulerenola na rast micelije i germinaciju spora odabranih vrsta mikromiceta". Za vreme osnovnih i master studija bio je stipendista Vlade Republike Srbije.

Doktorske studije upisao je 2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Eksperimentalna mikologija. U periodu od 2013. do 2016. godine bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije angažovan na projektu "Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida" (OI173032) sa 0 istraživačkih meseci. 2014. godine izabran je u zvanje Istraživač pripravnik, a naredne godine napreduje u zvanje Istraživač saradnik. Od 2016. godine zaposlen je kao Istraživač saradnik na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Od 2014. godine član je Internacionalnog društva za biodeterioraciju i biodegradaciju (International Biodeterioration and Biodegradation Society - IBBS).

Autor je 17 naučnih radova i imao je 12 saopštenja na skupovima od domaćeg i međunarodnog značaja (Hrvatska, Makedonija, Poljska i Srbija).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: **Никола. Д. Унковић**

број индекса: **Б3003/2012**

Изјављујем

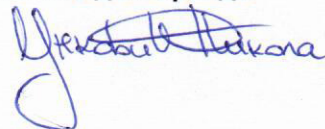
да је докторска дисертација под насловом:

„Диверзитет и улога микромицета у процесу биодетериорације зидних слика цркве светог Вазнесења Господњег у Великом Крчимиру“

- 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.

У Београду, 01.02.2018.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Никола Д. Унковић**

Број индекса: **Б3003/2012**

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

Наслов рада: **„Диверзитет и улога микромицета у процесу биодетериорације
зидних слика цркве светог Вазнесења Господњег у Великом Крчимиру“**

Ментори: **др Милица Љаљевић Грбић, ванредни професор**
др Јелена Вукојевић, редовни професор

Потписани **Никола Д. Унковић**

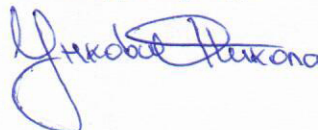
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, 01.02.2018.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Диверзитет и улога микромицета у процесу биодетериорације зидних слика цркве светог Вазнесења Господњег у Великом Крчмиру“

која је моје ауторско дело.

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

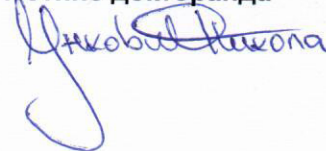
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

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).

У Београду, 01.02.2018.

Потпис докторанда



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.