

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja BLATNIK

**PROUČEVANJE MIKROBNIH OKUŽB TEKSTILNIH  
MUZEJSKIH PREDMETOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja BLATNIK

**PROUČEVANJE MIKROBNIH OKUŽB TEKSTILNIH MUZEJSKIH  
PREDMETOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INVESTIGATION OF THE MICROBIAL CONTAMINATION OF  
MUSEUM TEXTILES**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu študijske komisije dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 11. 4. 2016 ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana doc. dr. Polona Zalar in za recenzentko doc. dr. Neža Čadež.

Mentorica: doc. dr. Polona Zalar

Recenzentka: doc. dr. Neža Čadež

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Polona ZALAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja Blatnik

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
 DK UDK 579.69:7.025:579.2.083(043)=163.6  
 KG biodeterioracija/tekstilje/glive/detekcija/izolacija/molekularne tehnike/PCR/  
     ITS/BTB/ACT/DGGE  
 AV BLATNIK, Maja  
 SA ZALAR, Polona (mentorica) / ČADEŽ, Neža (recenzentka)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
     mikrobiologije  
 LI 2016  
 IN PROUČEVANJE MIKROBNIH OKUŽB TEKSTILNIH MUZEJSKIH  
     PREDMETOV  
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
 OP X, 66 str., 32 pregl., 7 sl., 70 vir.  
 IJ SI  
 JI si/en  
 AI V sklopu diplomskega dela smo preverjali potencialno kontaminacijo z glivami pri  
     52 tekstilnih predmetih, shranjenih v štirih različnih slovenskih muzejih (Slovenski  
     etnografski muzej, Pomorski muzej Sergej Mašera, Pokrajinski muzej Maribor in  
     Muzej krščanstva na Slovenskem). Poleg tega smo vzorčili glive na močno  
     poškodovanih in okuženih oljnih slikah na platnu iz različnih slovenskih cerkev, ki  
     so bile shranjene pred restavratorsko-konservatorskimi posegi v depoju  
     Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije. Vzorčeni  
     predmeti so se razlikovali po starosti in sestavi, izvirali so iz različnih geografskih  
     področij. S pomočjo gojivtvenih tehnik smo osamili 121 glivnih izolatov iz 35  
     predmetov. Poleg tega smo glive osamili tudi iz zraka različnih prostorov v muzejih  
     in na ta način dodatno pridobili še 107 izolatov. Identifikacijo gliv smo izvedli  
     molekularno, na osnovi za posamezne rodove uveljavljenih DNA črtnih kod.  
     Ugotovili smo, da prevladujejo glive rodov *Penicillium*, *Aspergillus* in  
*Cladosporium*, ki so se pojavljali tudi v zraku. Poleg kserofilnih vrst omenjenih  
     rodov pa smo izolirali iz predmetov in iz zraka tudi različne mezofilne asko- in  
     bazidiomicetne celulolitične glive. Na izboru 15 predmetov smo analizirali sestavo  
     glivnih združb tudi z uporabo negojitvene molekularne tehnike PCR-DGGE, ki je  
     temeljila na pomnožku ITS2 rRNA operona iz celokupne DNA, ter naknadni ločbi  
     pomnožkov z elektroforezo v denaturirajočem gradientu (DGGE). Na osnovi  
     nukleotidnih zaporedij pomnožkov izrezanih iz gela DGGE in vstavljenih v  
     komercialni plazmid smo glive okvirno identificirali. Na primeru oljnih slik na  
     platnu smo kserofilno vrsto sorodno *Aspergillus conicus* določili z gojtvijo kot tudi  
     nekultivabilno.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn  
 DC UDC 579.69:7.025:579.2.083(043)=163.6  
 CX biodeterioration/museums/textiles/fungi/detection/isolation/molecular techniques/PCR/ITS/BTB/ACT/DGGE  
 AU BLATNIK, Maja  
 AA ZALAR, Polona (supervisor) / ČADEŽ, Neža (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
 PY 2016  
 TI INVESTIGATION OF THE MICROBIAL CONTAMINATION OF MUSEUM TEXTILES  
 DT Graduation thesis (University studies)  
 NO X, 66 p., 32 tab., 7 fig., 70 ref.  
 LA SI  
 AL si/en  
 AB In the frame of the Bachelor degree thesis, 52 textile objects supposedly contaminated by fungi and preserved in four different Slovenian museums (Slovenian Ethnographic Museum, Sergej Mašera Maritime Museum of Piran, Regional Museum Maribor, and Slovene Museum of Christianity) were sampled for fungal contamination. In addition, heavily damaged and contaminated oil paintings on canvas from different Slovenc churches, held for the purpose of restoration – conservation procedures at the depot of the Institute for Protection of Cultural Heritage of Slovenia, Restoration Centre, were sampled as well. The items differed in composition, age, and originated from different geographical areas. By using different culture media 121 fungal isolates were obtained from the 35 contaminated objects and 107 were isolated from the air of museums and depot. Fungal identification based on genus specific DNA barcodes. The prevailing fungi on textile museum objects belonged to the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium*, which were also present in the air of museums. Beside those, we isolated from the items and the air also cellulolytic, mesophilic asco- and basidiomycetes. The composition of fungal communities on 15 selected textile objects was assessed by using the molecular techniques PCR-DGGE, based on amplified ITS2 rRNA operon from total DNA, and the subsequent separation of the amplicons by electrophoresis in denaturing gradient (DGGE). Only in the case of more deteriorated objects, like oil paintings on canvas, the results of cultivable and noncultivable techniques were comparable, since the same xerophytic species related to *Aspergillus conicus* was detected.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN .....	1
1.2 HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 BIORAZGRADNJA MUZEJSKIH TEKSTILNIH PREDMETOV .....	2
2.2 VPLIV OKOLJSKIH POGOJEV NA BIORAZGRADNJO .....	2
2.3 POTEK IN ZNAKI BIORAZGRADNJE .....	3
2.4 GLAVNI POVZROČITELJI BIORAZGRADNJE .....	3
2.5 ANALIZA BIORAZGRADNJE MUZEJSKIH TEKSTILNIH PREDMETOV .....	5
2.5.1 Detekcija in izolacija glivnih sevov .....	5
2.5.2 Identifikacija gliv .....	6
2.5.3 Konserviranje muzejskih tekstilij z namenom omejevanja glivne kontaminacije ter biodegradacije .....	6
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>7</b>
3.1 MATERIAL .....	7
3.1.1 Gojišča .....	7
3.1.2 Raztopine .....	8
3.1.3 Komercialni kompleti in reagenti .....	10
3.1.4 Kemikalije .....	10
3.1.5 Laboratorijska oprema .....	11
3.2 METODE .....	12
3.2.1 Potek vzorčenja in klasične metode gojenja .....	12
3.2.1.1 Vzorčenje .....	12
3.2.1.2 Odvzem brisov s površin predmetov .....	20
3.2.1.3 Odvzem materiala za negoitvene tehnike .....	20
3.2.1.4 Zračna analiza .....	20
3.2.1.5 Gojenje .....	20
3.2.2 Izolacija glivne DNA .....	21
3.2.3 Pomnoževanje glivne DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) .....	21

<b>3.2.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja glivne DNA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.5 Statistična analiza podatkov pridobljenih z gojitvenimi tehnikami .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.6 Izolacija in (čiščenje) celokupne DNA iz vlaken za DGGE .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.8 Gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (DGGE).....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.9 Kloniranje pomnoženih produktov.....</b>	<b>27</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1 DETEKCIJA OKUŽB NA PREDMETIH.....	29
4.2 IZOLACIJA GLIV .....	29
4.3 IDENTIFIKACIJA GLIV.....	32
<b>4.3.1 Izolirani in identificirani sevi .....</b>	<b>32</b>
4.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV PRIDOBLJENIH Z GOJITVENIMI TEHNIKAMI S TEKSTILNIH PREDMETOV IN IZ ZRAKA .....	46
4.5 NEGOJITVENE TEHNIKE (PCR – DGGE) .....	47
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>52</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>59</b>
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>60</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>62</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Seznam uporabljenih kemikalij z njihovimi proizvajalci .....	10
<b>Preglednica 2:</b> Seznam uporabljene laboratorijske opreme s proizvajalci.....	11
<b>Preglednica 3:</b> Seznam proučevanih predmetov iz Slovenskega etnografskega muzeja (SEM) s podatki o sestavi in izvoru .....	12
<b>Preglednica 4:</b> Seznam proučevanih predmetov iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera v Piranu (PPM) s podatki o sestavi in izvoru. ....	15
<b>Preglednica 5:</b> Seznam proučevanih predmetov iz Pokrajinskega muzeja Maribor (PMM) s podatki o sestavi in dataciji.....	16
<b>Preglednica 6:</b> Seznam proučevanih predmetov iz Muzeja krščanstva na Slovenskem (MKS) s podatki o sestavi in dataciji. ....	17
<b>Preglednica 7:</b> Seznam proučevanih predmetov iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije s podatki o sestavi in izvoru. ....	19
<b>Preglednica 8:</b> Uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	22
<b>Preglednica 9:</b> Mešanica PCR reakcije za pomnoževanje črtnih kod glivne DNA čistih kultur.....	22
<b>Preglednica 10:</b> Programi pomnoževanja s polimerazo (PCR) različnih DNA črtnih kod DNA čistih kultur gliv. ....	22
<b>Preglednica 11:</b> Mešanica PCR reakcije za pomnoževanje ITS regije iz celokupne DNA gliv za DGGE analizo.....	25
<b>Preglednica 12:</b> Programa pomnoževanja s polimerazo (PCR) ITS regije DNA gliv iz celokupne DNA izolirane iz vzorca za DGGE analizo. ....	25
<b>Preglednica 13:</b> Mešanica PCR reakcije za pomnoževanje ITS2 regije iz gela izrezanih pomnožkov v namen kloniranja. ....	27
<b>Preglednica 14:</b> Program pomnoževanja s polimerazo (PCR) ITS2 rDNA iz gela izrezanih pomnožkov v namen kloniranja.....	27
<b>Preglednica 15:</b> Mešanica PCR reakcije na osnovi kolonije pomnožene glivne ITS2 rDNA. ....	28
<b>Preglednica 16:</b> Program pomnoževanja s polimerazo (PCR) na osnovi kolonije. ....	28
<b>Preglednica 17:</b> Pogoji hrambe v ustanovah, iz katerih so bili pridobljeni preiskovani predmeti. ....	29
<b>Preglednica 18:</b> Primeri primarnih izolacijskih plošč po nanosu brisov oz. vzorcev po enem tednu inkubacije pri temperaturi 25 °C.....	30
<b>Preglednica 19:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Slovenskega etnografskega muzeja. ....	32
<b>Preglednica 20:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera, Piran.....	34
<b>Preglednica 21:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Pokrajinskega muzeja Maribor. ....	35

<b>Preglednica 22:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Muzeja krščanstva na Slovenskem.....	36
<b>Preglednica 23:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.....	37
<b>Preglednica 24:</b> Število CFU/m <sup>3</sup> po analizi zraka v muzejih SEM, PPM, PMM, MKS in v depoju RCS zraslih na posameznih gojiščih po enem tednu inkubacije.....	39
<b>Preglednica 25:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Slovenskega etnografskega muzeja.....	40
<b>Preglednica 26:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera, Piran.....	41
<b>Preglednica 27:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Pokrajinskega muzeja Maribor.....	42
<b>Preglednica 28:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Muzeja krščanstva na Slovenskem.....	43
<b>Preglednica 29:</b> Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.....	44
<b>Preglednica 30:</b> Zbirna tabela izolatov iz predmetov in zraka različnih muzejev.....	44
<b>Preglednica 31:</b> Bogatost, cenilka vrstne bogatosti in diverzitetni indeksi glivnih združb v zraku in na predmetih iz različnih muzejev (SEM, PPM, PMM, MKS) in depoja restavratorskega centra (RCS).....	46
<b>Preglednica 32:</b> Primerjava med rezultati negojitvene (PCR-DGGE) in gojitvene (kultivacija na agarnih gojiščih) tehnike.....	49

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Preučevani predmeti iz Slovenskega etnografskega muzeja, Ljubljana.....	14
<b>Slika 2:</b> Preučevani predmeti iz Pomorskega muzeja Sergej Mašera, Piran.....	15
<b>Slika 3:</b> Preučevani predmeti iz Pokrajinskega muzeja v Mariboru.....	16
<b>Slika 4:</b> Preučevani predmeti iz Muzeja krščanstva na Slovenskem, Stična.....	18
<b>Slika 5:</b> Preučevane slike iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije, Ljubljana.....	19
<b>Slika 6:</b> Statistična analiza glavnih koordinat osnovana na podobnosti glivnih združb v zraku (rdeče) in na površinah muzejskih predmetov (modra) po Jaccarddu.....	47
<b>Slika 7:</b> DGGE profil ITS2 pomnožkov iz celotne DNA izolirane iz vzorcev minimalne velikosti.....	48

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

aw	vodna aktivnost
BLAST	osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (angl. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
CREA	agar z dodatkom kreatina in saharoze za gojenje gliv (angl. Creatine Sucrose Agar)
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
DG18	agar z dodanim dikloramom in glicerolom (angl. Dichloram Glycerol Agar Base)
DGGE	gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (angl. Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)
dNTP	deoksiribonukleotidi
DRBC	agar z dodanim dikloranom, barvilom Rose Bengal in antibiotikom kloramfenikolom (angl. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar)
EX	Mikrobiološka zbirkna ekstremofilnih mikroorganizmov v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
EXF	oznaka gliv v zbirki Ex
FISH	fluorescenčna <i>in-situ</i> hibridizacija
ITS	notranje prepisuječe regije (angl. Internal Transcribed Spacer)
MEA	sladni ekstrakt agar (angl. Malt Extract Agar)
Milli-Q	deionizirana voda
MKS	Muzej krščanstva na Slovenskem
MY10-12	agar za gojenje gliv iz kvasnega ekstrakta, z dodatkom soli in glukoze (angl. Malt extract, Yeast extract 10 % salt, 12 % glucose agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PMM	Pokrajinski muzej Maribor
PPM	Pomorski muzej Sergej Mašera Piran
RCS	Restavratorski center Slovenije
RNA	ribonukleinska kislina
Rpm	obratov na minuto
SEM	Slovenski etnografski muzej
TAE	pufer iz TRIS-a, ocetne kisline in EDTA (angl. TRIS-acetic acid-EDTA)
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
w/v	teža na volumen

## 1 UVOD

Tekstilni zgodovinski predmeti predstavljajo pomemben del kulturne dediščine, vendar so zaradi sestave iz organskih materialov pogosto tarča mikrobnega napada. Izmed mikroorganizmov največji problem predstavljajo glive, saj imajo velik biodegradacijski potencial. S svojo prisotnostjo lahko povzročijo poškodbe na tekstu, kar zmanjša njegovo vrednost, prav tako pa se zmanjša njegova obstojnost.

Eden izmed glavnih ciljev muzejev je ohranjanje zgodovinskih predmetov. Najboljša praksa za omejevanje kontaminacij je preventivno upoštevanje priporočil pri vzdrževanju stabilnih pogojev hrانjenja predmetov, kot so vzdrževanje primerne temperature in relativne zračne vlage. Nemalokrat pa so pogoji v depojih muzejev neprimerni, okoljski parametri pa nekontrolirani oz. nevzdrževani. Tako lahko posamezen plesniv predmet predstavlja vir okužbe, ki se ob določenih pogojih raznese in razraste po drugih predmetih. Mikroben okužbo je vizualno včasih težko ločiti od različnih madežev, odvzem vzorcev za analizo v laboratoriju pa je le malokrat mogoč. Obravnava in sanacija predmetov poteka po presoji konservatorjev-restavratorjev. Velikokrat predmete čistijo in ščetkajo, brez da bi zaščitili sebe in svoje delovno okolje, saj ni nobenih priporočil glede obravnavanja plesnivih predmetov. Boljša ozaveščenost konservatorjev-restavratorjev, kako prepoznati kontaminirane predmete v zgodnji fazi okužbe, in kako z njimi rokovati, bi lahko pripomogla k preprečevanju širjenja okužb znotraj muzejev.

### 1.1 NAMEN

Namen diplomske naloge je preučiti kontaminacijo muzejskih domnevno plesnivih tekstilnih predmetov z glivami. Poleg tega bomo obravnavali tudi predmete iz depoja restavratorskega centra, ki so poškodovani in potrebni sanacije. Iz neinvazivno odvetih brisov tkanin bomo glive osamili in jih identificirali z molekularnimi tehnikami. Na izbranih tekstilnih predmetih bomo glive detektirali tudi z nekultivabilnimi tehnikami, na osnovi celokupne DNA ekstrahirane iz vzorcev minimalne velikosti, z uporabo z verižno reakcijo s polimerazo pomnoženih regij ITS2 ločenih z gelsko elektroforezo v denaturirajočem gradientu (PCR-DGGE). Poleg omenjenih predmetov bomo proučili tudi prisotnost gliv in njihovo količino v zraku prostorov različnih slovenskih muzejev ter restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.

### 1.2 HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- Iz domnevno plesnivih tekstilnih predmetov bomo izolirali kserofilne glive.
- Med izolati bodo prevladovali predstavniki rodov *Aspergillus* in *Penicillium*.
- Vrste gliv, ki se bodo pojavljale na predmetih, pričakujemo tudi v zraku muzejev.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIORAZGRADNJA MUZEJSKIH TEKSTILNIH PREDMETOV

Zgodovinski tekstil, ki ga ponavadi hranimo v muzejih, je značilen za vse človeške družbe in predstavlja pomemben aspekt kulturne dediščine. Med tovrsten tekstil uvrščamo oblačila, kot tudi dodatke, opremo, tapiserije, dekoracije, itd. (Kavkler in sod., 2014a). Kontaminacije v razstavnih prostorih in depojih so pogoste, tako v starejših muzejskih zgradbah, kot tudi na novo zgrajenih muzejih (Sterflinger, 2010).

Tekstilni predmeti izdelani iz organskih polimerov so izpostavljeni razgradnim procesom, do katerih lahko pride zaradi različnih vplivov: intenzivne uporabe, izpostavljenosti različnim vplivom okolja (vlaga, temperatura, sevanje UV) in dolgotrajni hrambi v neprimernih pogojih (Garside, 2010). Vse to povzroča strukturne spremembe, zaradi katerih se predmeti spreminjajo in razpadajo. Posledica oksidativnih procesov in hidrolize polimerov v naravnih vlaknih je prekinitev molekulskih vezi, ki omogoča vstop mikrobov in njihovih encimov (Tomšič in sod., 2007).

Zaradi biodeterioracijskega potenciala velike težave pri ohranjanju kulturne dediščine povzročajo različni organizmi - bakterije, arheje, glive, lišaji, škodljive žuželke, itd. (Sterflinger in Piñar, 2013). Največ škode na tekstuлу povzročajo mikroorganizmi (Kowalik, 1980). Glede na to, da skorajda ni materiala, ki bi bil varen pred mikrobiološko aktivnostjo, tudi tisti iz sintetičnih vlaken ne (Gu in sod., 2003), ni presenetljivo, da je zgodovinski tekstil, ki sestoji povečini iz organskega materiala še posebej ogrožen.

### 2.2 VPLIV OKOLJSKIH POGOJEV NA BIORAZGRADNJO

Okoljskih faktorjev, ki vplivajo na mikrobno rast in posledično na biodegradacijo je mnogo: vlaga, temperatura, količina kisika in ogljikovega dioksida, pH, svetloba in toksične karakteristike substrata (Florian, 1997). Vendar pa velja izpostaviti predvsem pomen visoke vlage, saj ta v največji meri promovira glivno rast (Vukojević in Ljaljević-Grbić, 2005; Sterflinger, 2010). Poleg vlage je pomemben faktor tudi temperatura. Opazimo torej tesno povezavo s fizikalnimi lastnostmi prostora oz. zgradbe v kateri so tekstilni predmeti hranjeni, še posebej to velja za toplotno izolacijo in težnjo po nastanku kondenza na stenah, ki se nabira zaradi toplega zraka v notranjosti zgradbe in hladnimi zunanjimi zidovi (Camuffo, 1998).

V vlažnih in toplih prostorih, kjer ventilacija ni urejena, se lahko ob prisotnosti razpadajoče organske snovi kontaminacija pojavi že v nekaj dneh in hitro napreduje (Tiano, 2002).

Kontrola muzejskih okoljskih parametrov, še posebej vzpostavitev in ohranjanje primerne temperature (od 16 do 18 °C) in relativne vlažnosti 40-65 % v razstavnih prostorih in

mestih skladiščenja, so efektivni načini, kako preventivno zaščititi tekstil pred glivno kontaminacijo in zmanjšati posledično biodeterioracijo (Kavkler in sod., 2014b). Kljub dejству, da je prah nosilec velikega števila spor in bakterij, ter da lahko služi kot vir hranil za glice, je pomen čiščenja prašnih predmetov še vedno zelo podcenjen (Sterflinger in Piñar, 2013). Vendar pa kontrola okoljskih parametrov lahko glivno rast le omeji, ne more pa je popolnoma preprečiti (Kavkler in sod., 2014b).

### 2.3 POTEK IN ZNAKI BIORAZGRADNJE

Glice predstavljajo resno grožnjo za degradacijo tekstilnih predmetov kulturne dediščine, saj so starejši tekstilni predmeti večinoma iz stebelnih vlaken (lan, bombaž), kjer jih celuloza predstavlja relativno dostopen vir hranil, saj so tudi v naravi pomembni razgrajevalci ligno-celuloznih materialov. Glavna tarča encimske razgradnje so naravna celulozna vlakna, vendar pa lahko glice razgrajujojo tudi proteinske komponente, ki so osnova tkaninam iz vlaken živalskega izvora (svila, volna), kot tudi neorganske snovi (Caneva in sod., 2005) in sintetične materiale (Breuker in sod., 2003; Gu, 2003).

Razgradnja tekstila z glivami je rezultat različnih procesov. Degradacija je lahko posledica asimilacijskih procesov, saj vlakna lahko predstavljajo hranila za glivno rast, ali disimilacijskih procesov, kar se kaže kot razgradnja na račun izločenih glivnih metabolitov (Cybulska in sod., 2008).

Poškodbe, ki niso povezane z encimsko aktivnostjo vključujejo predvsem mehanske poškodbe materiala, ki ga glice povzročajo s svojo rastjo in penetracijo hif. Med degradacijskim procesom lahko kserofilne vrste glic, kot naprimer *Penicillium* in *Aspergillus*, zadržujejo vodo, kar poviša vsebnost vode v napadenem materialu. To omogoča sekundarno naselitev z glivami, ki imajo višji biodegradacijski potencial, a za rast potrebujejo nekoliko višjo vlogo (Szostak-Kotowa, 2004).

Glivna deterioracija tekstilnega materiala se kaže v spremembi oksidacijskega stanja, stopnji polimerizacije in rušitve molekularne strukture. Posledično je material manj trden, manj raztegljiv, na splošno manj vzdržljiv, lahko pride do razbarvanja in spremembe njegovega videza (Florian, 1993; Peacock, 1996). Glivna rast na muzejskih tekstilijah poleg same biodegradacije lahko vpliva tudi na estetiko predmetov, saj izločajo številne pigmentne, ki so vidni v obliki madežev in zmanjšujejo vrednost predmetov (Sterflinger in sod., 1999). Problem pa ni le estetski, saj madeži vsebujejo kemične snovi, ki lahko degradirajo tekstil tudi v primeru, ko gliva odmre (Montegut in sod., 1991). Odstranjevanje madežev je zato nujno potrebno.

### 2.4 GLAVNI POVZROČITELJI BIORAZGRADNJE

Biodeterioracijo zgodovinskega tekstila lahko povzroča več vrst organizmov, naprimer glice, bakterije, arheje, lišaji, insekti, itd. (Szostak-Kotowa, 2004). Iz tekstilij so izolirali

tako bakterije (Szostak-Kotowa, 2004; Capodicasa in sod., 2010), kot glive (Abdel-Kareem, 2010a), vendar imajo slednje večji biodeterioracijski potencial, zato se bomo v diplomski nalogi osredotočili izključno na to skupino organizmov.

Glive so povsod prisotni evkariontski organizmi. Uvrščamo jih v svoje kraljestvo, v katerem je bilo do leta 2008, ko je izšel zadnji glivni slovar, ki podaja to število, opisanih cca. 100000 (Kirk in sod., 2008). Nedavna študija Tedersoo in sod. (2014) je na primeru DNA ekstrahirane iz 15000 talnih vzorcev vzorčenih na različnih delih sveta s tehniko sekvenciranja naslednje generacije ugotovil DNA zapise za cca. 45000 glivnih vrst. Na osnovi tega so sklepali, da je predpostavka o obstaju 1,5 (Hawksworth, 2001) in pa celo o oceni 5,1 milijona glivnih vrst (Blackwell, 2011) previsoka.

Ocene števila kultivabilnih gliv so različne. Literatura s področja mikrobiologije v restavratorstvu povzema, da je v primeru gliv celo več kot 70 % kultivabilnih, v nasprotju z bakterijami, kjer se predvideva manj kot 1 % kultivabilnost (Sterflinger, 2010). Slednja objava prav zaradi tega priporoča gojitvene tehnike v primeru glivne kontaminacije. Druge ocene so drastično drugačne, npr. da je nekultivabilnih več kot 80 % gliv (Bridge in Spooner, 2001).

Glive se v muzejske zbirke lahko prenesejo s predmeti, oblačili, ter preko pasivne ali aktivne ventilacije. Glice tako najdemo v notranjih prostorih in v prahu (Andersen in sod., 2011). Analiza 1000 vzorcev prahu temelječa na DNA sekvenciranju naslednje generacije je detektirala 40000 glivnih taksonov (Grantham in sod., 2015).

Katere glivne vrste bodo rasle na določenem materialu, je odvisno predvsem od njegove sestave in vodne aktivnosti ( $a_w$ ). Minimalna vodna aktivnost za njihovo rast je od približno 0,80 do več kot 0,98. Na podlagi tega so uvrstili glive v več skupin (Grant in sod., 1989). Med primarne naseljevalce štejemo kserofile, ki lahko rastejo pri  $a_w$ , ki je nižja ali enaka 0,80. Sekundarni naseljevalci rastejo pri nekoliko višji  $a_w$  in sicer med 0,80 in 0,90. Za terciarne naseljevalce pa je značilna rast pri vrednostih  $a_w$  višjih od 0,90 (WHO, 2009).

Najbolj ugodni pogoji za rast gliv so pri temperaturi 24-30 °C, relativni zračni vlagi nad 65 % in pH vrednost okoli 5,5 (Kowalik, 1980). Temperaturni razpon je lahko še veliko širši, npr. spore v dormantnem stanju lahko preživijo med 0 °C do 70 °C (Montegut in sod., 1991).

Podatki o vrstah gliv, ki jih najdemo na zgodovinskih predmetih po svetu, kažejo na veliko podobnost. Štirje rodovi - *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium* se pojavljajo tako na predmetih, kot tudi v zraku. To tudi potrjuje da do okužb zgodovinskega tekstila po vsej verjetnosti prihaja preko spor v zraku (Florian, 1997).

Glive so v zraku najpogosteje v obliki spor, velikih od 2 do 10 µm, sledijo kvasovke in delci hif. V zraku notranjih prostorov je glivnih spor v primerjavi z zrakom zunaj ponavadi

manj, razmerje med rodovi je podobno. Zaradi specifičnih razmer v notranjih prostorih se glice lahko zelo namnožijo in tudi v večjih količinah sproščajo v zrak; v tem primeru se ponavadi namnoži posamezna vrsta, kar štejemo tudi za indikacijo kontaminacije (Zalar in sod., 2015). V muzejske zbirke lahko spore gliche prenesejo tudi žuželke (Jurado in sod., 2008).

Glice v notranjih prostorih lahko škodljivo vplivajo tudi na človeka. Negativen vpliv na zdravje se lahko kaže v obliki okužb - mikoz, do problemov lahko prihaja tudi zaradi toksičnih učinkov mikotoksinov, ki jih nekatere vrste sproščajo v okolje, ter zaradi preobčutljivostnih reakcij na njihove alergene (Matos in Škamperle, 2015).

## 2.5 ANALIZA BIORAZGRADNJE MUZEJSKIH TEKSTILNIH PREDMETOV

### 2.5.1 Detekcija in izolacija glivnih sevov

Za detekcijo in izolacijo mikroorganizmov iz muzejskih tekstilnih predmetov je priporočljiva uporaba tako klasičnih gojitvenih, kot negojitvenih tehnik. Tako ene, kot druge imajo svoje prednosti in slabosti, z uporabo obojih pa lahko dobimo boljši vpogled v sestavo mikrobne združbe (Sterflinger, 2010). Čeprav je znano, da so najpogosteji povzročitelji okužb kserofilne glice, se še vedno pogosto uporablja za njihovo rast neprilagojena gojišča, kot so splošna mikološka gojišča, npr. MEA, PDA, itd. (Mesquita, 2013).

Veliko detekcijskih tehnik osnovani na DNA temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), s katero lahko pomnožimo gene, ki jih potrebujemo za nadaljnjo analizo (Manter in Vivanco, 2007).

Iz okoljskih vzorcev lahko z uporabo gojitvenih metod detektiramo okoli 70 % vseh prisotnih gliche (Sterflinger, 2010). Drugi ocenjujejo precej drugače: le manj kot 20 % gliche lahko vzgojimo na sintetičnih agarnih gojiščih (Bridge in Spooner, 2001). Za nekatere organizme ne poznamo specifičnih zahtev glede gojenja in potrebnih hranil (Roszak in Colwell, 1987; Pinzari in sod., 2009). Klasični pristopi z gojitvenimi tehnikami so namreč omejeni zgolj na mikroorganizme, ki jih lahko gojimo, obstaja pa veliko takih, ki jih ni moč gojiti, a vendar so v okolju prisotni (Manter in Vivanco, 2007).

V izogib slabostim kultivacijskih metod so se razvile številne molekularne metode, ki temeljijo bodisi na zaporedju DNA, bodisi na drugih molekulah. Slabost negojitvenih tehnik se kaže v tem, da mnogokrat ne moremo detektirati, tistih mikroorganizmov, ki so v obliki spor. Prav tako ne moremo vedeti, ali pomnožena DNA izvira iz živega organizma, ali gre za DNA mrtvega organizma (López-Miras in sod., 2013).

### **2.5.2 Identifikacija gliv**

Identifikacija gliv poteka s klasičnimi gojitvenimi metodami in je nadgrajena s primerjavo nukleotidnih zaporedij ITS regije, ki je uveljavljen filogenetski označevalec za glive (Schoch in sod., 2012). V primeru mnogih rodov, katerih zaporednje ITS regije se med vrstami ne razlikuje, pa se uveljavljajo koncepti uporabe večih markerjev, kot je tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) (Peterson, 2012). Pri rodovih *Penicillium* in *Aspergillus* se zato poleg ITS dodatno primerjajo še nukleotidna zaporedja kodirajočih genov za beta-tubulin oz. kalmodulin (Peterson, 2012; Samson in sod., 2014), v primeru rodu *Cladosporium* pa zaporedja odsekov genov, ki kodirajo aktin in elongacijski faktor 1 alfa (Bensch in sod., 2012). Ker platforme za uporabo večih zaporedij hkrati pri identifikaciji še niso dostopne, je identifikacija v mnogih primerih težavna.

### **2.5.3 Konserviranje muzejskih tekstilij z namenom omejevanja glivne kontaminacije ter biodegradacije**

Smernice za pogoje shranjevanja v muzejih, ki do neke mere zmanjšujejo degradacijski proces, so znane že desetletja, in v današnjem času po kar številnih primerih neuspešno apliciranih poskusov reševanja predmetov kulturne dediščine s kemijskimi sredstvi, prihajajo nazaj v veljavo (Sterflinger, 2010). Pomembno je ohranjanje temperature med 20 in 25 °C in ohranjanje relativne vlage med 45 in 50 % (Montegut in sod., 1991). V mnogih primerih ta dva ukrepa ne zadostujeta, saj nekatere vrste, še posebej kserotolerantne glive uspevajo tudi v manj vlažnem okolju. Znižanje zračne vlage pod 45 % ni priporočljivo, saj se lahko tekstil izsuši in postane krhek (Montegut in sod., 1991).

Za preprečevanje glivne deterioracije tekstila se uporabljam tako kemične kot nekemične metode. Med kemične postopke spada uporaba fungicidov in fumigantov, med nekemične pa uporaba UV žarkov, gama žarkov, topote, snopov elektronov in mikrovalov (Bhatnagar in Mani, 2001). Na žalost je veliko izmed omenjenih metod iz konservatorskega stališča neuporabnih saj lahko škodijo tekstu, povzročijo razbarvanje, izsušitev vlaken in s tem izgubo njihove čvrstosti (Abdel-Kareem, 2010a).

Kleti, kjer se muzejski depoji najpogosteje nahajajo, so velikokrat vlažne, prašne, temne, s slabim kroženjem zraka in zato primerna okolja za razrast plesni. Za povečano relativno zračno vlago oz. kondenzacijo so lahko krivi tudi slaba izolacija stavbe, topotni mostovi ali vdiranje toplega vlažnega zraka od zunaj, ki se v notranjih prostorih kondenzira na hladnih površinah. Zelo na hitro se relativna vlaga v zraku poveča zaradi počenih vodovodnih ali kanalizacijskih cevi, poškodovane strehe, nenadnih ohladitev (npr. odpoved ogrevalnega sistema), odpovedi ventilacijskih ali klimatskih naprav, poplav ipd. (Zalar in sod., 2015).

### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 MATERIAL**

V tem poglavju so navedeni materiali in metode, ki smo jih uporabili tekom našega eksperimentalnega dela.

##### **3.1.1 Gojišča**

Trdna gojišča smo pripravili tako, da smo vse sestavine razen agarja raztopili v polovičnem volumnu destilirane vode in dolili vodo do končnega volumna enega litra. Po potrebi smo uravnali pH gojišča s HCl ali NaOH. Nato smo dodali agar in vsebino steklenice po Erlenmeyerju premešali na mešalu v prisotnosti magnetnega mešala. Gojišče smo nato sterilizirali v avtoklavu 15 min pri 121 °C, ga ohladili na 55 °C in aseptično razlili v sterilne prazne petrijevke. Gojišča smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

V vsa gojišča smo pred avtoklaviranjem dodali 50 mg/l antibiotika kloramfenikol.

Gojišča za izolacijo gliv smo pripravili po sledečih receptih:

**Gojišče z dikloranom in barvilom rose bengal ter kloramfenikolom (DRBC) (King in sod., 1979)**

Pepton	5g
Glukoza	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Bengal rose	0,025 g
Dikloran	0,002 g
Kloramfenikol	0,1 g
Tehnični agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 ml

**Gojišče z dikloranom in glicerolom (DG18) (Hocking in Pitt, 1980)**

Pepton	5 g
Glukoza	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g
CuSO <sub>4</sub>	0,005

Dikloran	0,002 g
Kloramfenikol	0,05 g
Klortetraciklin	0,05 g
Tehnični agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 ml

### **Gojišče iz sladnega ekstrakta (MEA) (Pitt in Hocking, 2009)**

Sladni ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glukoza	20 g
Agar	20 g
Destilirana voda	do 1000 ml

### **MEA + 5 % NaCl (Pitt in Hocking, 2009)**

Osnovnemu gojišču MEA dodamo 50 g NaCl.

### **Gojišče iz sladnega in kvasnega ekstrakta z 10 % soli in 12 % glukoze (MY10-12) (Pitt in Hocking, 2009)**

Sladni ekstrakt	20 g
Kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	100 g
Glukoza	120 g
Agar	20 g
Destilirana voda	do 1000 ml

### **Tekoče gojišče za izolacijo glivne DNA**

Glukoza	2 g
Pepton	0,4 g
Kvasni ekstrakt	0,4 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Destilirana voda	200 ml

### **3.1.2 Raztopine**

#### **CTAB pufer**

Tris baza	2,42 g
NaCl	8,2 g
Na-EDTA	0,74 g

CTAB	2,0 g
Bidestilirana voda	do 100 ml
pH	7,5

**Pufer 1 x TAE**

Tris baza	242,0 g
Ocetna kislina	57, 1 g
EDTA (0,5 M) (pH 8)	100 ml
Destilirana voda	do 1000 ml

**Mešanica silika gela**

Silika gel	30 g
Celit	15 g

**Nanašalni gel**

Agaroza	0,4g
1x TAE pufer	40 ml

**0 % DGGE raztopina**

40 % Akrilamid reagent	20 ml
50x TAE	2 ml
Destilirana voda	do 100 ml

**80 % DGGE raztopina**

40 % Akrilamid reagent	20 ml
50x TAE	2 ml
Urea	33,6 g
Formamid	32 ml
Destilirana voda	do 100 ml

**10 % APS (amonijev persulfat)**

APS	1 g
Destilirana voda	do 10 ml

**Raztopina za fiksiranje**

Etanol	60 ml
Ocetna kislina	3 ml
Destilirana voda	do 600 ml

**Raztopina za barvanje**

AgNO <sub>3</sub>	0,3 g
Raztopina za fiksiranje	300 ml

**Razvijalna raztopina**

NaOH	6 g
Formaldehid	2,7 ml
Destilirana voda	do 200 ml

**3.1.3 Komercialni kompleti in reagenti**

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje komercialne komplete in reagente:

- Komplet za izolacijo celokupne DNA iz vzorcev tal UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio, ZDA)
- Komplet za čiščenje DNA iz gela GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Litva)
- Komplet za kloniranje CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Litva) s plazmidnim vektorjem pJET1.2\_-blunt
- Komplet za transformiranje bakterijskih celic TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas, Litva)
- Komplet za izolacijo plazmidne DNA iz bakterijskih celic GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Litva)

**3.1.4 Kemikalije**

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij z njihovimi proizvajalci.

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC
Agar-agar	Merck, Darmstadt, Nemčija
NaCl	Carlo Erba, Italija
Pepton	Merck, Darmstadt, Nemčija
Sladni ekstrakt	Oxoid, Anglija
Agaroza	Sigma Aldrich, Nemčija
barvilo Sybr Safe	Invitrogen
mešanica dNTP, 10 mM	Applied Biosystems, California, ZDA
Etanol 96 %	Chemo d.d., Ljubljana, Slovenija
10x PCR pufer brez MgCl <sub>2</sub>	Fermentas, Life Sciences, Litva

Lestvica fragm. DNA: "100bp DNA Ladder Plus"  
 Lestvica fragm. DNA: "1 kbp DNA Ladder Plus"  
 polimeraza Taq (5U/µl)  
 Mešanica reagentov za PCR  
 CTAB

Fermentas. Life Sciences, Litva  
 Fermentas. Life Sciences, Litva  
 Fermentas. Life Sciences, Litva  
 Fermentas. Life Sciences, Litva  
 Sigma Aldrich, Nemčija

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 1: Seznam uporabljenih kemikalij z njihovimi proizvajalci.

**KEMIKALIJA****PROIZVAJALEC**

HCl	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Kloroform	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Kloramfenikol	Sigma Aldrich, Nemčija
Glicerol	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Silikagel	Merck, Darmstadt, Nemčija
Celit	Merck, Darmstadt, Nemčija
Ocetna kislina	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Na-EDTA	Merck, Darmstadt, Nemčija
cikloheksimid	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA
saharoza	Acros Organics, new Jersey, ZDA
kvasni ekstrakt	Oxoid, Anglija
fruktoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
voda Milli-Q	Millipore Corporation

**3.1.5 Laboratorijska oprema**

Preglednica 2: Seznam uporabljene laboratorijske opreme s proizvajalci.

**OPREMA****PROIZVAJALEC**

Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvaška
Centrifuga	Eppendorf, Nemčija
Digestorij Variolab Molibien W90	Waldner, Nemčija
Električni transformator za elektroforezo Consort E143	Sigma-Aldrich, ZDA
Elektroforezna banjica BioRad SubCell GT	BioRad, ZDA
Homogenizator MM301	Retsch, Nemčija
Inkubator INNOVA 42	Eppendorf, Nemčija
Laminarij LabCaire SC-R	Fisher Scientific
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Slovenija
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
PCR sistem	Eppendorf, Nemčija
pH meter Metrom 713	Slovenija
Stereomikroskop Steri SV11 z virom svetlobe KL1500 LCD	Zeiss, Nemčija
Tehtnica ET-1111	Tehtnica, Slovenija
Termoblok	Eppendorf, Nemčija
Transiluminator	Syngene G Box
Vodna kopel	Pharmacia Biotech, Švedska
Vrtinčasto mešalo (vortex)	Slovenija
Vzorčevalnik zraka SAS Super 100 Microbial Air Sampler	Bioscience International, ZDA

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Potek vzorčenja in klasične metode gojenja

##### 3.2.1.1 Vzorčenje

Tekstilne predmete kulturne dediščine smo vzorčili na petih različnih lokacijah – v Slovenskem etnografskem muzeju (SEM) v Ljubljani, Pomorskem muzeju Sergej Mašera v Piranu (PPM), Pokrajinskem muzeju Maribor (PMM), Muzeju krščanstva na Slovenskem (MKS) v Stični in v depoju restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije (RCS).

Glavni kriterij za izbiro tekstilnih predmetov je bila vidna kontaminacija z glivami, spremenjena razbarvanost ali obarvanost in/ali vonj po plesnivem. Predmeti so iz različnih materialov (stebelna rastlinska, živalska vlakna), razlikujejo se po svoji namembnosti (uporabni in dekorativni), so iz različnih časovnih obdobjij in izvirajo z različnih geografskih področij. Informacije o vzorčenih tekstilnih predmetih so podane v Preglednici 3 za predmete Slovenskega etnografskega muzeja v Ljubljani, v Preglednici 4 za predmete iz Pomorskega muzeja Sergej Mašera v Piranu, v Preglednici 5 za predmete Pokrajinskega muzeja Maribor, v Preglednici 6 za Muzej krščanstva na Slovenskem in v Preglednici 7 za predmete iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije. Slike predmetov (Slike 1-5) sledijo opisom v preglednicah.

Izolacijo gliv s tekstilnih predmetov smo izvedli na različne načine, odvisno od obsega kontaminacije in možnosti odvzema vzorca za analizo. V vseh primerih je bila uporabljena metoda jemanja brisov, če je bilo možno, pa so bila odvzeta tudi posamezna vlakna, ki smo jih shranili v sterilne stekleničke.

Preglednica 3: Seznam proučevanih predmetov iz Slovenskega etnografskega muzeja (SEM) s podatki o sestavi in izvoru.

Zapor. št. predmeta	Oznaka vzorca/podvzorci	SEM evidenčna št.	Opis predmeta	Material	Izvor predmeta
1	SEM-10	-	brezrokavnik	bombaž	Afrika, Nigerija
2	SEM-11	-	moško ogrinjalo, obleka	svila	Afrika, Nigerija, Togo
3	SEM-12	S114	okrasni tekstil	bombaž	Afrika, Mali
4	SEM-13	2244-B	ogrinjalo za ženske (modro-bež)	bombaž	Afrika
5	SEM-14	-	pahljača	bambus	neznan
		SEM-14A			
		SEM-14B			

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 3: Seznam proučevanih predmetov iz Slovenskega etnografskega muzeja (SEM) s podatki o sestavi in izvoru.

Zapor. št. predmeta	Oznaka vzorca/podvzorci	SEM evidenčna št.	Opis predmeta	Material	Izvor predmeta
6	SEM-15	EM 15369	črn predpasnik	svila	Slovenija
7	SEM-16	15356/189	rjava ruta s potiskom	stebelno vlakno	
8	SEM-17A	EM 975	usnjene hlače z laneno podlogo	usnje, lan	Slovenija
	SEM-17A			usnje	
	SEM-17B			lan	
9	SEM-18	EM 16502	temno moder ženski klobuček	svila	neznan
10	SEM-19	EM 15633	črn klobuk	bombaž	
11	SEM-20	2005-075/20	bele dolge moške spodnje hlače, nenošene	bombaž	
12	SEM-21	EM 13755	rjav moški plašč	živalska dlaka	
13	SEM-22	2878	torbica za tobak (Baragova)	bombaž	S. Amerika, Indijanci
14	SEM-23	BP 47	kip vrača	les, živalske dlake, tkanina, vrvi, školkje, rogovi	Afrika, Mali
	SEM-23A			bombaž	
	SEM-23B			živalska dlaka	
	SEM-23C			bombaž	
	SEM-23D			bombaž	
	SEM-23E			les, živalske dlake, tkanina, vrvi, školkje, rogovi	
15	SEM-24	DM-18	maska	bombaž	Afrika, Mali
16	SEM-25	BM-71	maska	les, bombaž, usnje	Afrika, Mali
	SEM-25A			usnje	
	SEM-25B			bombaž	
	SEM-25C			les	
17	SEM-26	RM-99	maska	les, bombaž	Afrika, Mali
	SEM-26A			bombaž	
	SEM-26B	RM-99	maska	bombaž	



Slika 1: Preučevani predmeti iz Slovenskega etnografskega muzeja, Ljubljana.

Legenda: (1) brezrokavnik SEM10; moško ogrinjalo SEM11; (3) okrasni tekstil SEM12; (4) ogrinjalo za ženske SEM13; (5) pahljača SEM14; (6) črn predpasnik SEM15; (7) rjava ruta s potiskom SEM16; (8) usnjene hlače z laneno podlogo SEM17; (9) ženski klobuček SEM18; (10) črn klobuk SEM19; (11) nenošene dolge moške spodnje hlače SEM20; (12) rjav moški plašč SEM21; (13) torbica za tobak SEM22, (14) kip vrača SEM23; (15) maska SEM24; (16) maska SEM25; (17) maska SEM26.

Preglednica 4: Seznam proučevanih predmetov iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera v Piranu (PPM) s podatki o sestavi in izvoru.

Zapor. št. predmeta	Oznaka vzorca	PPM evidenčna št.	Opis predmeta	Material	Datacija, izvor
1	PPM1	-	rdeča tkanina (1,5x1m)	volna	-
2	PPM2	4400	rdeč žalni trak za prof. glasbe	svila	1897, Piran
3	PPM3	P4251 2638	paradni epolet	bombaž	1929-1943, Kraljevina Jugoslavija
4	PPM4	3930 P3038	paradni epolet	svila	1929-1943, Kraljevina Jugoslavija
5	PPM5	2978 P9126	navadni epolet	bombaž	1963-1992, SFRJ
6	PPM6	2631 P3541	trak za mornarsko kapo	svila	1867-1918, Avstro-Ogrska
7	PPM7	2664 P6313	trak za mornarsko kapo	svila	1929-1943, Kraljevina Jugoslavija
8	PPM8	2871 P5145	usnje na kapi	usnje	1963-1992, SFRJ
9	PPM9	3101 P9573	plašč kapetana ital. vojaške mornarice	bombaž	1918-1939
10	PPM10	4666	črn kamižot (istrska noša)	lan	19-20 stol., Istra



Slika 2: Preučevani predmeti iz Pomorskega muzeja Sergej Mašera, Piran.

Legenda: (1) rdeč žalni trak PPM2; (2) paradni epolet PPM3; (3) paradni epolet PPM4; (4) navadni epolet PPM5; (5) trak za mornarsko kapo PPM6; (6) trak za mornarsko kapo PPM7.

Preglednica 5: Seznam proučevanih predmetov iz Pokrajinskega muzeja Maribor (PMM) s podatki o sestavi in dataciji.

Zapor. št. predmeta	Oznaka vzorca	PMM evidenčna št.	Opis predmeta	Material	Datacija
1	PMM-1	N. 10858	ženski klobuk	konoplja	ok. 1926
2	PMM-2	N. 6531	ženska bluza	bombaž	19. stol.
3	PMM-3	N.12608/A	ženska bluza	volna	19. stol.
4	PMM-4	N. 5980	vojaška čelada (tropska)	bombaž	zač. 20. stol.
5	PMM-5	N. 8892	oficirska čapka	bombaž	1/2 20. stol.
6	PMM-6	N. 9676	suknjič uniforme	bombaž	po 1945
7	PMM-7	N. 11309/1	ženska bluza	bombaž, svila	sr. 19. stol.
	PMM-7_1			bombaž	
	PMM-7_2			svila	
8	PMM-8		Titova uniforma	volna	70. leta 20. stol.



Slika 3: Preučevani predmeti iz Pokrajinskega muzeja v Mariboru.

Legenda: (1) ženski klobuk PMM1; (2) ženska bluza PMM2; (3) ženska bluza PMM3; (4) tropska vojaška čelada PMM4; (5) oficirska čapka PMM5; (6) suknnič uniforme PMM6; (7) ženska bluza PMM7; (8) Titova uniforma PMM8.

Preglednica 6: Seznam proučevanih predmetov iz Muzeja krščanstva na Slovenskem (MKS) s podatki o sestavi in dataciji.

Zapor. št. predmeta	Oznaka vzorca	MKS evidenčna št.	Opis predmeta	Material	Datacija
1	MKS-9	K-1357	plesniva zofa	bombaž	prva polovica 19. stol.
2	MKS-10	S 320	grb stiške opatiјe	bombaž	neznano
3	MKS-11	SVM 1493	narokovnik - manipelj	lan	neznano
4	MKS-12	SVM 688	bandera	bombaž	neznano
5	MKS-13	6523	hišni oltarček	bombaž	konec 19. stol.
6	MKS-14	SVM 2962	antependij	merceriziran bombaž	19. stol.
	MKS-14A			bombaž	
7	MKS-15	ŠLU 164	kratek mašni plašč	lan	
8	MKS-17	SVM 3081	kazula (pregrinjalo)	bombaž	
9	MKS-18	SVM 3079	pluvial (mašni plašč)	svila	
10	MKS-19		manipelj, ki paše skupaj z mašnim plaščem MKS-20	lan	
11	MKS-20	ŽJ 10	mašni plašč	lan	začetek 17. stol.
12	MKS-21	ŽJ 39	bursa	bombaž	18/19. stol.

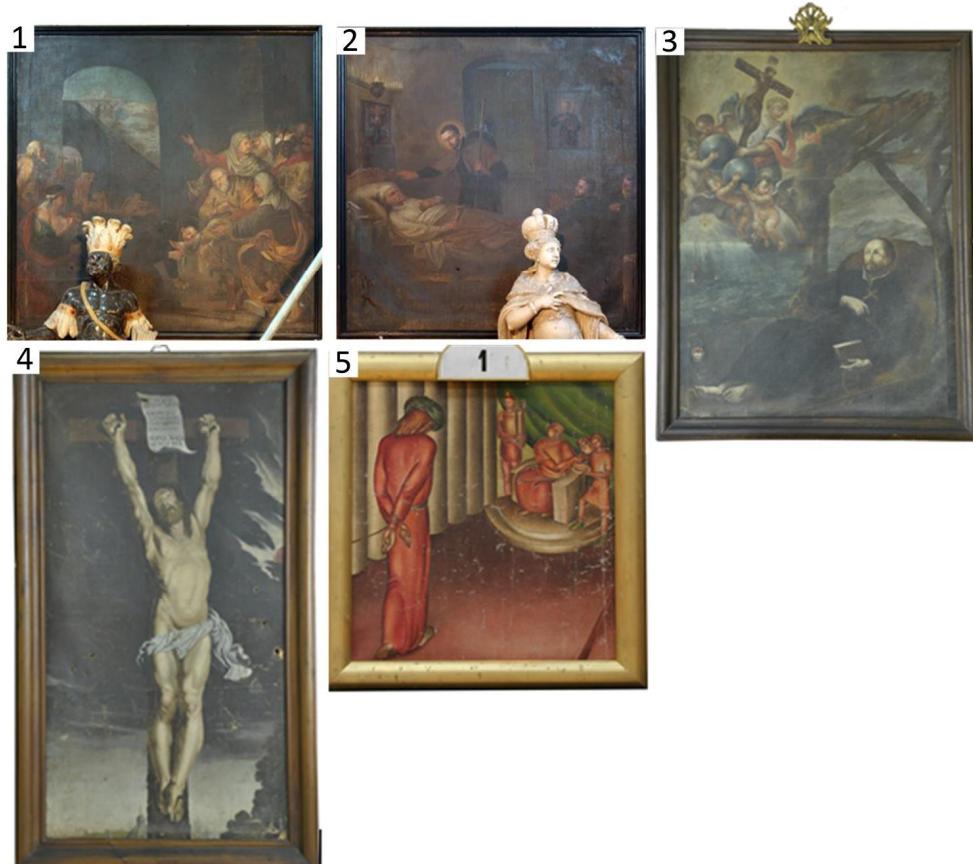


Slika 4: Preučevani predmeti iz Muzeja krščanstva na Slovenskem, Stična.

Legenda: (1) plesniva zofa MKS9; (2) grb stiške opatijske MKS10; (3) narokovnik – manipelj MKS11; (4) bandera MKS12; (5) hišni oltarček MKS13; (6) antependij MKS14; (7) mašni plašč MKS15; (8) kazula (pregrinjalo) MKS17; (9) pluvial (mašni plašč) MKS18; (10) manipelj MKS19; (11) mašni plašč MKS20; (12) bursa MKS21.

Preglednica 7: Seznam proučevanih predmetov iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije s podatki o sestavi in izvoru.

Zapor. št. predmeta	Oznaka vzorca	Opis predmeta	Material	Izvor
1	RCS-15	Olje na platnu; 3. prizor iz življenja sv. Frančiška	lan	Kapela sv. Jakoba, Ljubljana
2	RCS-16	Olje na platnu; 4. prizor iz življenja sv. Frančiška	lan	Kapela sv. Jakoba, Ljubljana
3	RCS-17	Olje na platnu (neznani avtor); sveti Frančišek Ksaverij	konoplja	Cerkev sv. Nikolaja, Novo mesto
4	RCS-18	Olje na platnu (neznani avtor); Križanje	stebelno vlakno	Stolnica sv. Nikolaja, Novo mesto
5	RCS-19	Tempera na platnu; Tone Kralj, 1931	lan	Podružnični center Matere Božje, Mengore, 1. postaja



Slika 5: Preučevane slike iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije, Ljubljana.

Legenda: (1) slika »3. prizor iz življenja sv. Frančiška« RCS15 ; (2) slika »Marijina zaroka« RCS16; (3) slika »Sv. Frančišek Ksaverij« RCS17; (4) slika »Križani« RCS18; (5) slika »Križev pot« RCS19.

### 3.2.1.2 Odvzem brisov s površin predmetov

Brise smo jemali s sterilno vatenko, ki smo jo prej omočili v fiziološki raztopini (0,9 % [w/v] NaCl), z namenom nanosa na gojišča za izolacijo. Brise smo odvzeli s cca. 2 cm<sup>2</sup> kontaminirane površine, nato pa smo vatenke shranili v epruveto ter jih do nacepitve na gojišča hranili pri 4 °C.

Brise smo v laboratoriju nanesli na naslednja agarna gojišča za izolacijo: MEA + Ch, DG18 + Ch, MY10-12 + Ch, MEA + 5 % NaCl + Ch. V primeru Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije tudi DRBC + Ch.

### 3.2.1.3 Odvzem materiala za negoitvene tehnike

Z namenom izolacije celotne DNA in kasneje DGGE, smo iz predmetov odvzeli tudi posamezna vlakna. S sterilno pinceto in skalpelom smo previdno odvzeli minimalne količine materiala v obliki niti na robovih predmetov. Material smo do izolacije DNA shranili v mikrocentrifugirkah po Eppendorfu pri temperaturi -80 °C.

### 3.2.1.4 Zračna analiza

Za preučevanje prisotnosti gliv v zraku muzejev smo uporabili vzorčevalnik zraka SAS Super Iso 100 (Bioscience International). Na gojišča za izolacijo gliv smo prefiltrirali po 100 l, 200 l, 500 l ali 1000 l zraka. Glavni poudarek je bil na vzorčenju v prostorih, kjer smo vzorčili tekstilne predmete, za primerjavo pa smo vzorčili zrak tudi v predprostoru.

V primeru Slovenskega etnografskega muzeja smo zrak vzorčili tudi v enem izmed razstavnih prostorov. V namen pridobitve podatka o prisotnosti gliv v drugih mikronišah znotraj muzeja smo vzorčili tudi zrak, ki je prihajal iz filtracijskega sistema.

### 3.2.1.5 Gojenje

Nacepljena gojišča v petrijevkah smo ovili s parafilmom in inkubirali pri temperaturi 25 °C. Rast kolonij smo spremljali vsak teden, do enega meseca, ter rast dokumentirali s fotoaparatom. Iz posamezne plošče smo izbrali različne morfologije kolonij in jih osamili v čisti kulturi na gojišču DG18.

Čiste kulture gliv smo nato nacepili na poševno gojišče DG18 in MEA. Poševnike smo inkubirali od 1 do 2 tedna pri temperaturi 25 °C. Po končani inkubaciji smo jih prestavili v zbirkovo Ex, mikrobiološko zbirkovo ekstremofilnih organizmov, ki deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

### 3.2.2 Izolacija glivne DNA

DNA glivnih kultur smo izolirali iz kultur na agarnem gojišču DG18 ali v tekočem gojišču za izolacijo glivne DNA. Za izolacijo smo uporabili postopek izolacije DNA z mehansko lizo, po protokolu, ki sta ga objavila Van den Ende in de Hoog (1999). V 2 ml mikrocentrifugirko po Eppendorfu, ki je vsebovala silikagelno mešanico, smo odpipetirali 0,5 ml pufra CTAB in dodali kovinsko kroglico. S sterilno spatulo smo nato v pufer prenesli micelij zrasel na površini tekočega gojišča, ali 1 cm<sup>2</sup> micelija vzgojenega na agarnem gojišču. Micelij smo homogenizirali s homogenizatorjem 1 minuto pri frekvenci 30 s<sup>-1</sup>. Homogeniziran micelij smo nato inkubirali približno 30 min v vodni kopeli pri 65 °C. Po končani inkubaciji smo nato v digestoriju v mikrocentrifugirko po Eppendorfu dodali 500 µl kloroforma in 2 s mešali na vibracijskem mešalu. Mešanico smo centrifugirali 5 min pri 14000 rpm. Zgornjo fazo (supernatant) smo odpipetirali v sterilno 1-5 ml mikrocentrifugirko, v digestoriju ponovili postopek in dodali 500 µl kloroforma in pomešali na vibracijskem mešalu ter centrifugirali 5 min pri 14000 rpm. Supernatant smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko in mu dodali 800 µl ohlajenega 96 % etanola ter mešanico ročno premešali in jo inukubirali pri –20 °C čez noč. Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje 5 minut pri 14000 rpm, nato smo odstranili supernatant in pelet sprali s 500 µl 70 % etanola. Znova smo centrifugirali pri enakih pogojih. Etanol smo previdno odstranili in pelet sušili na zraku 10 minut pri 37 °C. Pelet smo nadalje resuspendirali v 50 µl pufra TE in ga inkubirali med 5 in 10 minut pri 37 °C, da se je raztopil. Vzorce smo nato shranili pri –20 °C do njihove uporabe.

### 3.2.3 Pomnoževanje glivne DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Koncentracijo izolirane DNA smo pred izvajanjem verižne reakcije s polimerazo pomerili s spektrofotometrom NanoDrop 1000. Koncentracija izolirane DNA je bila med 2,13 in 20,29 ng/µl.

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli tako, da smo izbranim sevom pomnožili notranjo prepisujčo regijo ITS1 in ITS2, z vključujočo 5,8S rDNA. Pri tem smo uporabili oligonukleotidna začetnika ITS4 in ITS5.

Za natančnejšo identifikacijo do ravni vrste, smo pri sevih, za katere se je izkazalo da pripadajo rodu *Cladosporium*, pomnožili še del gena, ki kodira aktin (*Act*), pri sevih iz rodov *Penicillium* in *Aspergillus* pa nukleotidna zaporedja gena za beta-tubulin (*BetaA*). Pri prvi reakciji smo uporabili oligonukleotidna začetnika BT2a in BT2b, pri drugi pa ACT-512F in ACT-783R. Vse reakcije smo izvajali v mikrocentrifugirkah po Eppendorfu z volumnom 0,2 ml. V vsako smo dodali 34 µl mešanice reagentov za PCR in 1 µl vzorčne DNA. Za negativno kontrolo smo namesto matrične DNA odpipetirali vodo Milli-Q.

Zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov so v Preglednici 8, v Preglednici 9 je navedena sestava PCR mešanic, v Preglednici 10 pa so programi za pomnoževanje tarčnih odsekov DNA.

Preglednica 8: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

IME	ZAPOREDJE 5' -> 3'	AVTOR
ITS1F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	(Gardes in Bruns, 1993)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	(White in sod., 1990)
ITS3GC	CGCCCGGGCGCGCCCCGGCGGGGGGGCATCGATGA AGAACGCAGC	(Nikolcheva in sod., 2003)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White in sod., 1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(White in sod., 1990)
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	(Glass in Donaldson, 1995)
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC	(Glass in Donaldson, 1995)
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	(Carbone in Kohn, 1999)
ACT-783R	TACGAGTCCTCTGGCCCAT	(Carbone in Kohn, 1999)

Preglednica 9: Mešanica PCR reakcije za pomnoževanje črtnih kod glivne DNA čistih kultur.

Reagent	Volumen
Voda Milli-Q	26,82 µl
Pufer za Taq polimerazo (10x)	3,5 µl
dNTP (AB) (10 mM)	0,7 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	1,4 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	1,4 µl
Polimeraza Dream Taq (5 U/µl)	0,18 µl
Matrična DNA	1 µl
<b>Vsota</b>	<b>35 µl</b>

Preglednica 10: Programi pomnoževanja s polimerazo (PCR) različnih DNA črtnih kod DNA čistih kultur gliv.

Faza pomnoževanja	Program pomnoževanja za ITS/BenA, Act
	<b>oligonukl. začetnika za ITS: ITS4in ITS5</b>
	<b>oligonukl. začetnika za BenA: Bt2a, Bt2b</b>
Začetna denaturacija	94 °C, 5 min
Št. ciklov	35x
Denaturacija	94 °C, 30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	52 °C, 30 s / 55 °C, 45 s
Elongacija	72 °C, 45 s

Končna elongacija

72 °C, 7 min

Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 10: Programi pomnoževanja s polimerazo (PCR) različnih DNA črtnih kod DNA čistih kultur gliv.

Faza pomnoževanja	Program pomnoževanja za <i>Act</i> oligonukl. začetnika: ACT-512F, ACT-783R
Začetna denaturacija	95 °C, 2 min
Št. ciklov	30x
Denaturacija	95 °C, 45 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	54 °C, 30 s
Elongacija	72 °C, 2 min
Končna elongacija	72 °C, 4 min

Prisotnost in dolžino fragmentov, ki smo jih pridobili pri PCR reakciji, smo preverili z gelsko elektroforezo. Pripravili smo agarozni gel iz 1 % agaroze v 1x pufru TAE. Poskrbeli smo, da je bil gel ohlajen, a še vedno tekoč in mu dodali barvilo SYBR Safe (na 10 ml gela 1 µl barvila) in ga previdno vlili v nosilec. V strjen gel smo kot standard dodali 2 µl lestvice DNA fragmentov znanih velikosti (Gene Ladder 100, Fermentas) in vzorce pomnožene DNA iz 4 µl produkta PCR in 2 µl 5x nanašalnega pufra. Elektroforeza je potekala 20 minut v 1x pufru TAE pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV-transluminatorjem in ga fotografirali z računalniškim programom GeneSnap.

### 3.2.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja glivne DNA

Nukleotidna zaporedja pomnoženega dela DNA so določili (sekvencirali) v podjetjuu Macrogen Inc., Koreja. Na podlagi nukleotidnega zaporedja smo s spletnim orodjem BLAST (NCBI) sevom posikali najSORODNEJŠA zaporedja. Seve smo identificirali na osnovi primerjave z zaporedji tipskih in drugih izbranih referenčnih sevov.

### 3.2.5 Statistična analiza podatkov pridobljenih z gojitvenimi tehnikami

Po končanem delu smo podatke o prisotnosti vseh glivnih rodov osamljenih z vseh predmetov in iz zraka zbrali v tabeli, kjer smo opredelili število izolatov posameznega rodu iz predmetov posameznega muzeja (Preglednica 30).

Izračun indeksov za kvantificiranje pestrosti taksonov:

Pestrost gliv zajemajoč številčnost in raznovrstnost, smo ocenili z dominanco (D), Simpsonovim (1-D) in Shannonovim indeksom.

Dominanca (D) meri verjetnost, da dva naključno izbrana individuumata pripadata istem taksonu. Pri tem 0 predstavlja neskončno raznolikost in 1 nobene raznolikosti. To pomeni, da večja kot je vrednost D, manjša je raznolikost.

Izračun dominance:

$$D = \sum_i \left( \frac{n_i}{n} \right)^2 \quad \dots(1)$$

kjer je  $n_i$  število individuumov taksona  $i$ .

Simpsonov indeks (1-D) predstavlja verjetnost, da dva naključno izbrana osebka v skupnosti spadata v različne taksone. Meri nevariabilnost združbe, vrednosti so od 0 do 1.

Shannonov indeks je diverzitetni indeks, ki upošteva tako število individuumov kot tudi število taksonov. Variira od 0 za združbe z enim samim taksonom, do višjih številk za združbe z veliko taksoni, ki jih predstavlja več individuumov.

Izračun Shannonovega indeksa:

$$H = -\sum_i \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n} \quad \dots(2)$$

kjer je  $n_i$  število individuumov taksona  $i$ .

Primerljivost (»Equitability«, J) je Shannova raznolikost deljena z logaritmom števila taksonov. Meri enakost porazdelitev individuumov med taksone.

Dodatno smo za določanje pestrosti vrst v vzorcih uporabili neparametrično cenilko Chao 1 (Magurran, 2004). Chao je preprosta cenilka absolutnega pričakovanega števila taksonov v združbi. Temelji na številu redko zastopanih taksonov v vzorcu.

$$S_{Chao1} = S_{obs} + (F_1^2 / 2 F_2) \quad \dots(3)$$

kjer je  $S_{obs}$  = število opaženih taksonov v vzorcu,  $F_1$  = število opaženih taksonov, ki so zastopani z le enim osebkom (angl. singleton);  $F_2$  = število opaženih taksonov, ki so zastopani z dvema osebkoma (angl. doubleton).

Za oceno prispevka posamezne vrste k odstopanju (različnosti) glivnih skupnosti, smo izvedli analizo odstotka podobnosti (SIMPER) (Clarke in Warwick, 2001). Ta metoda poda pomembnost taksonov odgovornih za opaženo razliko med skupinami vzorcev.

Za preverjanje morebitnih dejavnikov, ki oblikujejo glivne skupnosti med vzorci, smo izvedli statistično analizo glavnih koordinat (angl. Principal coordinate analysis) osnovano na Jaccardovi podobnosti binarnih matrik (prisotnost/odsotnost taksona). Končni rezultat te analize so glavne koordinate. Pari glavnih koordinat, ki niso dejansko vnešeni podatki, niti niso v linearni povezavi med komponentami, so predstavljeni tako, da nakazujejo podobnost med vzorci (Ramette, 2007). Poleg grafičnega prikaza so podatki v programu Past podani tudi tabelarično, in sicer lastne vrednosti in % različnosti, ki so razloženi za vsako glavno koordinato (Hammer in sod., 2001).

### 3.2.6 Izolacija in (čiščenje) celokupne DNA iz vlaken za DGGE

Celotno genomsko DNA iz vlaken smo izolirali s pomočjo izolacijskega kompleta (MoBio, ZDA), po navodilih proizvajalca.

### 3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo

Izvedli smo dve zaporedni PCR reakciji z mešanico reagentov navedeno v Preglednici 11. Pomnožke, ki smo jih pridobili v prvi reakciji smo uporabili v drugi PCR reakciji (Preglednica 12). Pri prvi smo pomnožili celoten odsek ITS in uporabili oligonukleotidna začetnika ITS1F in ITS4, pri drugi pa smo pomnožili le del regije ITS znotraj večjega odseka ITS regije ter uporabili oligonukleotidne začetnike ITS3 z dodanimi GC sponama (angl. GC clamp).

Zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov so navedena v Preglednici 8, v Preglednici 11 sestava PCR mešanice, v Preglednici 12 pa so navedeni programi za pomnoževanje tarčnih odsekov DNA glede na različne oligonukleotidne začetnike.

Preglednica 11: Mešanica PCR reakcije za pomnoževanje ITS regije iz celokupne DNA gliv za DGGE analizo.

Reagent	Volumen
Voda Milli-Q	18,35 µl
Pufer za Taq polimerazo (10x)	2,5 µl
dNTP (AB) (10 mM)	0,5 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	1,25 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	1,25 µl
Polimeraza Dream Taq (5 U/µl)	0,15 µl
Matrična DNA	1 µl
<b>Vsota</b>	<b>25 µl</b>

Preglednica 12: Programa pomnoževanja s polimerazo (PCR) ITS regije DNA gliv iz celokupne DNA izolirane iz vzorca za DGGE analizo.

Faza pomnoževanja	Program pomnoževanja
-------------------	----------------------

<b>oligonukl. začetnika: ITS1F, ITS4</b>	
Začetna denaturacija	94 °C, 2 min
Št. ciklov	30x
Denaturacija	94 °C, 30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	58 °C, 30 s
Elongacija	72 °C, 60 s
Končna elongacija	72 °C, 7 min

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 12: Programa pomnoževanja s polimerazo (PCR) ITS regije DNA gliv iz celokupne DNA izolirane iz vzorca za DGGE analizo.

<b>Faza pomnoževanja</b>	<b>Program pomnoževanja</b>
<b>oligonukl. začetnika: ITS3GC, ITS4</b>	
Začetna denaturacija	94 °C, 2 min
Št. ciklov	35x
Denaturacija	94 °C, 35 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	58 °C, 55 s
Elongacija	72 °C, 45 s
Končna elongacija	72 °C, 5 min

Z gelsko elektrofrezo smo na 1 % agaroznem gelu v 1x pufri TAE z dodanim barvilkom SYBR safe preverili dolžino fragmentov.

PCR pomnožke druge PCR reakcije (vgnezdene PCR reakcije), smo uporabili v analizi z gelsko elektroforezo z denaturacijskim gradientom (DGGE).

### 3.2.8 Gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (DGGE)

V pripravljen in očiščen nosilec smo najprej nanesli čepni gel (angl. plug gel). Pripravili smo ga iz 3 ml 80 % DGGE raztopine, 3 µl TEMED ter 30 µl 10 % APS. Ko se je čepni gel strdil, smo pripravili glavni gradientni gel (angl. main gel), ki sestoji iz dveh gelov z različnim deležem akrilamida (60 % gel smo pripravili iz 9 ml 80 % DGGE raztopine, 3 ml 0 % DGGE raztopine, 60 µl 10 % APS in 6 µl TEMED. 20 % gel pa iz 3 ml 80 % DGGE raztopine, 9 ml 0 % DGGE raztopine, 60 µl v 10 % APS in 6 µl TEMED). Oba gela smo s črpalko in konstantnim mešanjem gradientno nanesli na nosilec, v katerem je že bil čepni gel. Glavni gel smo nato za obtežitev zalili s 3 ml butanola. Po 45 minutah, ko se je glavni gradientni gel strdil, smo odstranili butanol s pomočjo filter papirjev in pripravili še sklopitveni gel (angl. stacker gel). Le-tega smo pripravili iz 3 ml 0 % DGGE raztopine, 3 µl TEMED in 30 µl 10 % APS. Pred nanosom sklopitvenega gela v nosilec, smo v nosilec vstavili še glavnicek z jamicami za nanašanje vzorcev. Ko se je sklopitveni gel strdil, smo glavnicek odstranili in jamice sprali z 1x TAE pufrom ter nanesli lestvico in vzorce.

Za ločevanje pomnožkov smo uporabili sistem D-GENETM (BioRad, ZDA). Za nanos pomnožkov smo uporabili nanašalni pufer. DGGE elektroforeza je potekala 16 ur v 1x pufru TAE pri 60 °C in 70 V.

Gel smo nato barvali s srebrovim nitratom. Po elektroforezi smo gel 30 min fiksirali v raztopini za fiksiranje. Po končanem fiksiranju smo gel prelili z raztopino za barvanje in barvali 20 min. Gel smo sprali z destilirano vodo in ga prelili z razvijalno raztopino. Ko je pričel rumeneti, smo raztopino odlili in ga prelili z raztopino za fiksiranje, ki smo jo shranili po koncu prvega koraka.

### 3.2.9 Kloniranje pomnoženih produktov

Iz DGGE gela je sledilo izrezovanje lis, ki smo jih očistili in izolirali DNA s pomočjo komercialnega kompleta reagentov GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas, Litva). Sledila je PCR reakcija mešanice reagentov navedene v Preglednici 13, in sicer po programu opisanem v Preglednici 14. PCR pomnožek smo nato dodatno očistili s kompletom GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Litva), koncentracijo pa preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1 % gelu v 1x pufru TAE.

Preglednica 13: Mešanica PCR reakcije za pomnoževanje ITS2 regije iz gela izrezanih pomnožkov v namen kloniranja.

Reagent	Volumen
Voda Milli-Q	17,35 µl
Pufer za Taq polimerazo (10x)	2,5 µl
dNTP (AB) (10 mM)	0,5 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	1,25 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	1,25 µl
Polimeraza Dream Taq (5 U/µl)	0,15 µl
Matrična DNA	2 µl
<b>Vsota</b>	<b>25 µl</b>

Preglednica 14: Program pomnoževanja s polimerazo (PCR) ITS2 rDNA iz gela izrezanih pomnožkov v namen kloniranja.

Faza pomnoževanja	Program pomnoževanja
	<b>oligonukl. začetnika: ITS3, ITS4</b>
Začetna denaturacija	94 °C, 2 min
Št. ciklov	35x
Denaturacija	94 °C, 35 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	56 °C, 55 s
Elongacija	72 °C, 45 s
Končna elongacija	72 °C, 5 min

Iz kemikalij kompleta CloneJet (Fermentas, Litva) smo v mikrocentrifugirki po Eppendorfu pripravili ligacijsko mešanico. Ligacijsko mešanico smo inkubirali pri 70 °C 5 min, nato ohladili na ledu. Dodali smo še odprt vektor pJET1.2 blunt in ligazo in pri sobni temperaturi inkubirali 5 min.

Ligacijsko mešanico smo transformirali v kemično kompetentne celice *Escherichia coli* XL1\_Blue MRF (Invitrogen), ki smo jih pripravili s kompletom TransformAid™ (Fermentas, Litva). Transformacijsko mešanico smo s spatulo drigalski razmazali po površini gojišča LB Ap in inkubirali čez noč pri 37 °C.

Nato smo preverili velikost kloniranega inserta z metodo PCR na osnovi kolonije, in sicer v mešanici reagentov navedeni v Preglednici 15, po programu opisanem v Preglednici 16, velikost pomnožka pa preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1 % gelu v 1x pufru TAE. Klone z ustreznim vključkom smo aseptično prepikirali v 100 µl tekočega gojišča LB Ap v mikrotitrsko ploščo in inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo v vsako luknjico dodali 100 µl 80 % glicerola in mikrotitrsko ploščico poslali v podjetje Macrogen Inc. (Koreja), kjer so izolirali plazmidno DNA in sekvencirali kloniran vključek.

Preglednica 15: Mešanica PCR reakcije na osnovi kolonije pomnožene glivne ITS2 rDNA.

<b>Reagent</b>	<b>Volumen</b>
Voda Milli-Q	16,1 µl
Master mix	5 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	0,2 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	0,2 µl
<b>Vsota</b>	<b>35 µl</b>

Preglednica 16: Program pomnoževanja s polimerazo (PCR) na osnovi kolonije.

<b>Faza pomnoževanja</b>	<b>Program pomnoževanja</b>
<b>JETF/JETR</b>	
Začetna denaturacija	94 °C, 3 min
Št. ciklov	35x
Denaturacija	94 °C, 30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	60 °C, 30 s
Elongacija	72 °C, 45 s
Končna elongacija	72 °C, 1 min

## 4 REZULTATI

### 4.1 DETEKCIJA OKUŽB NA PREDMETIH

Vzorčeni predmeti so bili shranjeni v različnih depojih po Sloveniji (depo Slovenskega etnografskega muzeja - SEM, depo Pomorskega muzeja Sergej Mašera Piran - PPM, depo Pokrajinskega muzeja Maribor - PMM, depo Muzeja krščanstva na Slovenskem - MKS in depo restavrorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije - RCS). Pogoji hrambe na posameznih lokacijah se med seboj zelo razlikujejo. Podatki o temperaturi in relativni zračni vlagi za posamezne muzeje so navedeni v Preglednici 17. Z izjemo relativne zračne vlage v Slovenskem etnografskem muzeju pogoji v depojih niso nadzorovani, kar pomeni, da se spreminja glede na zunanje okoljske parametre. V primeru Muzeja krščanstva na Slovenskem je del depoja kar na podstrešju stavbe, kjer prihaja do ekstremnih nihanj vlage in temperature – v času vzorčenja (pozimi) je bila temperatura v depaju -1 °C.

Preglednica 17: Pogoji hrambe v ustanovah, iz katerih so bili pridobljeni preiskovani predmeti.

<b>Ustanova</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Relativna vlažnost [%]</b>
Slovenski etnografski muzej	ni kontrolirana	do leta 2006 ni kontrolirana; nato med 40 in 60
Pomorski muzej Sergej Mašera Piran	ni kontrolirana	ni kontrolirana
Pokrajinski muzej Maribor	ni kontrolirana	ni kontrolirana
Muzej krščanstva na Slovenskem	ni kontrolirana; med -1 in 30	ni kontrolirana; pozimi od 70-85, poleti med 55 in 60
Restavrorski center Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije	ni kontrolirana; med 14 in 20	med 65 do 81

### 4.2 IZOLACIJA GLIV

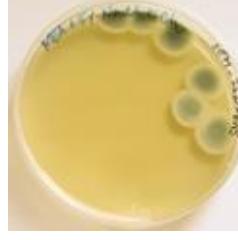
V preglednici 18 se nahajajo slike primarnih izolacijskih gojišč, s katerih smo nadalje pridobili glivne izolate.

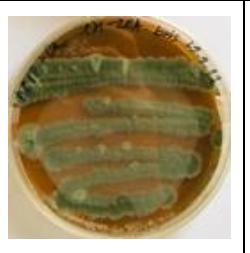
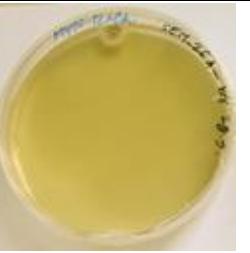
Preglednica 18: Primeri primarnih izolacijskih plošč po nanosu brisov oz. vzorcev po enem tednu inkubacije pri temperaturi 25 °C.

	MEA	MEA + 5 % NaCl	DG18	MY10-12
SEM14A bris				

se nadaljuje

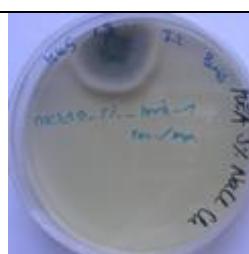
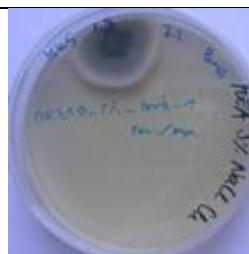
Nadaljevanje Preglednice 18: Primeri primarnih izolacijskih plošč po nanosu brisov oz. vzorcev po enem tednu inkubacije pri temperaturi 25 °C.

	MEA	MEA + 5 % NaCl	DG18	MY10-12
SEM14B bris				
SEM25B bris			ni rasti	
SEM25C nit	ni rasti		ni rasti	

SEM26B bris				
PPM10 bris	ni rasti	ni rasti		

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 18: Primeri primarnih izolacijskih plošč po nanosu brisov oz. vzorcev po enim tednu inkubacije pri temperaturi 25 °C.

	MEA	MEA + 5 % NaCl	DG18	MY10-12
MKS19 bris	ni rasti		ni rasti	
MKS20 bris			ni rasti	ni rasti
MKS19 bris	ni rasti		ni rasti	

## 4.3 IDENTIFIKACIJA GLIV

### 4.3.1 Izolirani in identificirani sevi

Glive smo identificirali na podlagi nukleotidnih zaporedij, filogenetskih označevalcev za posamezen rod. V Preglednici 19, 20, 21, 22 in 23 so navedeni vsi izolati in njihove identifikacije, ter filogenetski označevalci, na osnovi katerega smo jih identificirali. Če je bilo med BLAST rezultati z zaporedji tipskih sevov več različnih zadetkov z istim % sorodnosti, so v tabeli navedene vse vrste z najvišjo sorodnostjo.

Gledano v celoti, med izolati prevladujejo vrste rodov *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium*, predstavniki le-teh rodov se pojavljajo tudi v zraku prostorov muzejev. V sklopu posameznih rodov so se pojavljale različne vrste, najpogosteje osamjena pa je bila *Aspergillus conicus*, *Cladosporium allicinum* in *Penicillium humuli*. Te vrste so v primeru *Cladosporium allicinum* pojavljale tudi v zraku, v primeru *Aspergillus nidulans* in *Penicillium humuli*, pa ne. Največja raznovrstnost je bila na predmetih v Pomorskem muzeju v Piranu in Muzeju krščanstva v Stični, kjer so se pogosto pojavljale tako asko-, kot tudi bazidiomicetne glive, ki sicer naseljujejo les.

S sedemnajstih predmetov Slovenskega etnografskega muzeja smo osamili 37 izolatov, kot najbolj okužene so se izkazale maske s tekstilnimi elementi (SEM24-26) in pletena pahljača (SEM14).

Preglednica 19: Podatki o izoliranih givnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Slovenskega etnografskega muzeja.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
SEM10	7533	MY 10-12	ITS	<i>Aspergillus nidulans</i>	100
SEM11	7422	MEA 5 % NaCl		-	
SEM14A	7538	MEA	ITS	<i>Alternaria destruens</i> , <i>A. cerealis</i> , <i>A. arborescens</i> ...	99
	7434	MEA	ACT	<i>Eppicoccum nigrum</i>	98
	7539	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100
	7415	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100
	7416	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	99
	7436	MEA		-	
	7537	MEA 5 % NaCl		-	
	7540	MEA 5 % NaCl		-	
SEM14B	7433	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100
	7432	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Penicillium harmonense</i>	100
SEM18	7534	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium</i>	99

<i>brevicompactum</i>					
SEM22	7410	DG18	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	98
SEM23B	7409	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	100
SEM23C	7413	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
SEM24A	7411	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	100
	7535	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus vitricola</i>	100
	7412	MEA	ITS	<i>Penicillium corylophilum, P. coeruleoviride, P. rubefaciens</i>	100
SEM25A	7420	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	100
	7536	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus vitricola</i>	99
	7414	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
	7430	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>	99
	7427	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium echinulatum, P. crustosum, P. caseiflavum...</i>	98

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 19: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Slovenskega etnografskega muzeja.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
SEM25A	7418	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100
	7424	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium humuli</i>	99
SEM25B	7421	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Penicillium humuli</i>	99
	7417	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium humuli</i>	99
	7426	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium humuli</i>	99
SEM25C	7431	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	100
	7435	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	98
SEM26A	7429	DG18	<i>BenA</i>	<i>Cryptosporiopsis caliginosal, Raffaelea tritirachium, Thielavia arenaria...</i>	100
	7428	MY 10-12	ITS	<i>Penicillium commune, P. solitum, P. crustosum...</i>	98
	7419	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium humuli</i>	99
	7425	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium spinulosum</i>	100
SEM26B	7408	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	100
	7423	MEA	ITS	<i>Chaetomium spirochaete, C. subglobosum, C. angustispirale...</i>	99

Z devetih predmetov Pomorskega muzeja Sergeja Mašera smo osamili 21 izolatov, kot najbolj okužena se kažeta vzorčena traka za mornarsko kapo (PPM6 in PPM7).

Preglednica 20: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera, Piran.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
PPM2	7542	DG18	ITS	<i>Antennariella placitae</i>	98
PPM4	7447	MEA	ITS	<i>Baeospora myosura</i>	100
PPM5	7549	DG18	ITS	<i>Penicillium pseudocasei</i>	100
	7544	MEA	ITS	<i>Hymenochaete tropica, H. huangshanensis, H. parmastoi...</i>	99
PPM6	7451	MEA	ITS	<i>Ceriporiopsis gilvescens</i>	100
	7541	DG18	ITS	<i>Peroneutypa scoparia, Eutypella scoparia</i>	100

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 20: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera, Piran.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
PPM6	7543	DG18	ITS	<i>Cladosporium funiculosum, C.. austroafricanum, C. angustiterminale...</i>	99
	7550	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium cosmopolitanum</i>	99
PPM7	7439	MEA 5 % NaCl	ITS in <i>BenA</i>	<i>Aspergillus chevalier</i>	100
	7441	MEA	ITS	<i>Infundichalara microchona</i>	97
	7442	MEA	ITS	<i>Chalara holubovae</i>	99
	7552	DG18	ITS	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99
PPM8	7438	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	100
	7443	MEA	ITS	<i>Cladosporium austroafricanum, C. phaenocomiae, C. subuliforme...</i>	99
	7546	DG18	ITS	<i>Phlebia acerina, P. radiata, P. rufa</i>	99
PPM9	7548	MEA	ITS	<i>Baeospora myosura</i>	99
PPM10	7547	MEA 5 % NaCl	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium pseudocladosporioide s</i>	99
	7551	MY 10-12	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i>	99

PPM10A	7437	MEA	ITS	<i>Rhodonia placenta</i>	100
PPM10B	7440	MEA	ITS in <i>ACT</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i>	99

S sedmih predmetov Pokrajinskega muzeja Maribor smo osamili 13 izolatov, kot najbolj okužen predmet se je izkazala Titova uniforma iz volne (PMM8).

Preglednica 21: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Pokrajinskega muzeja Maribor.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
PMM1	7452	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium allicinum</i>	99
	7453	MEA 5 % NaCl	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium bruhnei, C. allicinum</i>	98
PMM4	7505	MEA	ITS	<i>Baeospora myosura</i>	99
PMM5	7507	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium allicinum</i>	99
	7508	MEA	ITS	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	99

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 21: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Pokrajinskega muzeja Maribor.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
PMM6	7461	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium allicinum</i>	99
PMM7	7450	MEA	ITS	<i>Cladosporium subuliforme, C. silenes, C. austroafricanum...</i>	99
	7506	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium pseudocladosporioide s, C. cladosporioides, C. halotolerans...</i>	99
PMM7A	7459	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus neoellipticus</i>	100
	7460	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium allicinum</i>	99
PMM8	7462	DG18	ITS	<i>Alternaria alternata</i>	100
	7509	DG18	ITS	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	99
	7510	DG18	ITS	<i>Alternaria arborescens, A. cerealis</i>	100
	7458	DG18		-	

Z osmih predmetov Muzeja krščanstva na Slovenskem smo osamili 27 izolatov, po številu izoliranih sevov prednjači plesniva zofa iz bombaža (MKS9), s katere smo uspeli osamiti kar 15 glivnih izolatov.

Preglednica 22: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Muzeja krščanstva na Slovenskem.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
MKS09	7589	MEA	ITS	<i>Aspergillus fumigatus,</i> <i>A. oerlinghausensis,</i> <i>A. lentulus...</i>	99
	7590	MEA	ITS	<i>Penicillium</i> <i>minioluteum, P.</i> <i>purpurogenum, P.</i> <i>samsonii...</i>	99
	7591	MEA	ITS	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97
	7592	MEA	ITS	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum, P.</i> <i>aethiopicum, P.</i> <i>gladioli...</i>	99
	7593	MEA	ITS	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum, P.</i> <i>rubens, P. goetzi...</i>	99

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 22: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Muzeja krščanstva na Slovenskem.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
	7594	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus</i> <i>montevidensis</i>	100
	7595	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium</i> <i>harmonense</i>	99
	7596	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium</i> <i>harmonense</i>	100
	7597	DG18	ITS	<i>Paecilomyces variotii,</i> <i>Phialophora alba</i>	100
	7598	DG18	ACT	<i>Cladosporium</i> <i>allicinum</i>	100
	7599	MY 10-12	ITS	<i>Aspergillus glaucus</i>	100
	7600	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Penicillium</i> <i>harmonense</i>	100
	7601	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Leptosphaerulina</i> <i>chartarum,</i> <i>Pithomyces chartarum</i>	100
	7602	MEA	ITS	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum, P.</i> <i>flavigenum, P.</i> <i>vanlykii...</i>	99
	7603	MEA	ITS	<i>Cladosporium</i> <i>austroafricanum, C.</i> <i>angustiterminale, C.</i> <i>phaenocomae...</i>	100

MKS10	7604	MEA	ACT	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	99
MKS14	7605	MEA	ITS	<i>Baeospora myosura</i>	99
	7606	MEA	ITS	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	99
MKS15	7607	MY 10-12	ITS	<i>Penicillium commune, P. solitum, P. chrysogenum...</i>	99
MKS18	7608	MEA	ITS	<i>Penicillium minioluteum, Talaromyces minioluteus</i>	99
	7611	MEA	<i>BenA</i>	<i>Cryptosporiopsis caliginosa, Raffaelea tritirachium, Thielavia arenaria...</i>	100
	7609	MEA		-	
	7610	MEA		-	
MKS19	7612	MY 10-12	ITS	<i>Wallemia canadensis</i>	99
	7613	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Cryptosporiopsis caliginosa, Raffaelea tritirachium, Thielavia arenaria...</i>	100

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 22: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov pridobljenih iz Muzeja krščanstva na Slovenskem.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
MKS20	7616	MEA		<i>Bjerkandera adusta</i>	99*
	7617	MEA		<i>Aspergillus fumigatus</i>	99
	7618	MEA		<i>Talaromyces columbinus</i>	100
	7614	MEA		-	
	7615	MEA		-	
MKS21	7619	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Penicillium commune, P. solitum, P. chrysogenum</i>	99

\*Zaporedje najsorodnejšega seva, ki ni tipski

S petih predmetov Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije smo osamili 33 izolatov, po številu izolatov glede na posamezne vzorce so rezultati primerljivi.

Preglednica 23: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.

VZOREC	EXF	IZOLACIJSKO	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	%
--------	-----	-------------	------------	----------------	---

št.	GOJIŠČE			SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
RCS15	7650	MEA	ITS in <i>BenA</i>	<i>Penicillium corylophilum</i> 99
RCS15A	7651	DG18	ITS in <i>BenA</i>	<i>Aspergillus conicus</i> 99
RCS15B	7699	MEA 5 % NaCl	ITS in <i>BenA</i>	<i>Aspergillus conicus</i> 99
	7700	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus vitricola</i> 98
RCS15C	7652	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus jensenii, A. cyjetkovicii, A. creber...</i> 99
	7653	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> 99
	7654	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus jensenii</i> 100
	7701	DG18	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99
	7702	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99
RCS16	7655	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium humuli</i> 99
RCS16A	7656	DG18	-	
	7703	DG18	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99
	7657	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99
	7658	MEA	ITS	<i>Chaetomium spirochaete, C. subglobosum, C. angustispirale...</i> 99
	7659	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i> 100
RCS16B	7660	MEA 5 % NaCl	ITS in <i>BenA</i>	<i>Aspergillus conicus</i> 99
	7661	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99
	7662	DG18	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 23: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz predmetov iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.

VZOREC	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
RCS17	7663	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus conicus</i>	100
	7664	MEA 5 % NaCl	-		
	7665	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99	
	7666	DG18	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99	
	7667	DG18	ITS	<i>Aspergillus conicus</i> 99	
	7668	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus puulaauensis</i> 100	
RCS18	7690	MEA	ITS	<i>Chaetomium spirochaete, C. angustispirale, C. subglobosum...</i>	99
	7691	MEA	ITS	<i>Chaetomium afropilosum, C. pseudoglobosum, C. tenu...</i>	99
	7692	MEA	ITS	<i>Chaetomium piluliferum, C. murorum, Aspergillus fumigatus</i>	99
	7693	MEA	ITS	<i>Chaetomium spirochaete, C. angustispirale, C. subglobosum...</i>	99
RCS18A	7669	MEA	ITS	<i>Chaetomium</i>	99

			<i>spirochaete, C. subglobosum, C. angustispirale...</i>	
	7670	DG18	ITS	<i>Chaetomium spirochaete, C. angustispirale, C. subglobosum...</i>
RCS19A	7671	MY 10-12		-
	7672	DG18	ITS	<i>Aspergillus jensenii, A. cvjetkovicii, A. creber...</i>
	7673	MEA	ITS	<i>Aspergillus jensenii, A. cvjetkovicii, A. creber...</i>
RCS19B	7674	MY 10-12		-
	7675	MEA 5 % NaCl		-
	7676	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>
	7677	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>
	7678	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus puulaauensis, A. cvjetkovicii</i>

Iz zraka zgoraj navedenih muzejev smo osamili 107 glivnih izolatov, jih uvrstili v 22 rodov in 46 vrst. Na splošno so bile vrednosti CFU/m<sup>3</sup> zraka dokaj nizke v primeru muzeja SEM, kjer je klima kontrolirana (med 8 in 26 CFU/m<sup>3</sup>). Nekoliko višje vrednosti CFU so v primeru razstavnega prostora PMM, v primerjavi z depojem v isti ustanovi. Povišane vrednosti opazimo v delavnici MKS muzeja, nad mejo detekcije z vzorčevalnikom pa so v depaju RCS-ja, kjer je vrednost spor v zraku večja od meje detekcije z danimi parametri. V primeru muzeja PPM kontrolna analiza ni bila opravljena, zaradi gradbenih del v zgradbi.

Preglednica 24: Število CFU/m<sup>3</sup> po analizi zraka v muzejih SEM, PPM, PMM, MKS in v depaju RCS zraslih na posameznih gojiščih po enem tednu inkubacije.

<b>USTANOVA/MESTO VZORČEANJA ZRAKA</b>		<b>IZOLACIJSKO GOJIŠČE</b>		
<b>SEM</b>		<b>DRBC (CFU/m<sup>3</sup>)</b>	<b>DG18 (CFU/m<sup>3</sup>)</b>	<b>MEA (CFU/m<sup>3</sup>)</b>
	depo za tekstil	10	14	8
	Afro-Ameriški depo	12	12	8
	razstavni prostor	26	12	10
	hodnik	92	-	-
<b>PPM</b>		<b>DRBC (CFU/m<sup>3</sup>)</b>	<b>DG18 (CFU/m<sup>3</sup>)</b>	<b>MEA (CFU/m<sup>3</sup>)</b>
začasni depo		26	16	34
<b>PMM</b>		<b>DRBC (CFU/m<sup>3</sup>)</b>	<b>DG18 (CFU/m<sup>3</sup>)</b>	<b>MEA (CFU/m<sup>3</sup>)</b>
depo		44	30	28
depo omara		30	30	34
razstavni prostor		126	124	124
hodnik		38	-	-

MKS	DRBC (CFU/m <sup>3</sup> )	DG18 (CFU/m <sup>3</sup> )	MEA (CFU/m <sup>3</sup> )
priročni depo	36	50	preraščeno
depo podstreže	36	74	30
delavnica	190	196	200
RCS	DRBC (CFU/m <sup>3</sup> )	DG18 (CFU/m <sup>3</sup> )	MEA (CFU/m <sup>3</sup> )
depo	> 340	>340	>340
kontrola skladišče	>60	122	12

V Preglednici 25, 26, 27, 28 in 29 so navedeni vsi izolati iz zraka in njihove identifikacije, ter molekularni označevalci, na osnovi katerega smo jih identificirali. Če je bilo med BLAST rezultati z zaporedji tipskih sevov več različnih zadetkov z istim % sorodnosti, so v tabeli navedene vse vrste z najvišjo sorodnostjo.

Preglednica 25: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Slovenskega etnografskega muzeja.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
depo	7555	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium harmonense</i>	100
	7563	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100
	7557	DRBC	ITS	<i>Cephalotheca sulfurea</i>	99
	7573	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	99
	7574	DRBC	ITS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
	7569	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	100
	7570	DG18	ITS	<i>Mucor plumbeus</i>	100
	7577	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium sp.</i>	96
	7581	DRBC	<i>ACT</i>	<i>Ochroconis robusta</i>	100
	7582	MEA	ITS	<i>Aspergillus neoellipticus</i>	100
depo za tekstil	7553	DG18	-	-	-
	7456	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium tardochrysogenum</i>	99
depo za tekstil - prezračevalni sistem izstop zraka	7446	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus jensenii, A. cyjetkovicii</i>	99
	7455	MEA 5 % NaCl	-	-	-
	7448	DRBC	ITS	<i>Aspergillus neoellipticus</i>	100
	7445	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Chaetomium erectum</i>	99
	7579	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum, P. adametzii</i>	99
	7580	MEA 5 % NaCl	ITS	<i>Engyodontium album</i>	100
razstavni prostor	7566	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
	7567	DG18	ITS	<i>Aspergillus fumigatus, A. oerlinghausensis, Neosartorya fischeri...</i>	99
	7568	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	99
	7572	DG18	ITS in <i>BenA</i>	<i>Aspergillus jensenii</i>	100
	7575	DG18	ITS in <i>BenA</i>	<i>Penicillium expansum</i>	100

	7576	DG18	<i>benA</i>	<i>Penicillium roseopurpureum</i>	100
	7571	DG18		-	
	7556	DG18	ITS	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99
	7558	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium expansum</i>	99
	7559	MEA	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i>	99
	7561	DG18	ITS	<i>Cladosporium austroafricanum, C. angustiterminale, C. phaenocoma...</i>	99
	7562	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100
	7565	MEA	<i>BenA</i>	<i>Talaromyces radicus</i>	97
	7554	DG18	ITS in <i>BenA</i>	<i>Talaromyces columbinus</i>	100
	7560	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium lanosum</i>	99
	7564	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium tardochrysogenum</i>	99
vratarnica	7454	DRBC	<i>ACT</i>	<i>Ochroconis robusta, Phaeoacremonium sphinctrophorum</i>	100
	7578	DRBC	ITS	<i>Rhizoctonia solani, Thanatephorus cucumeris</i>	100
	7444	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Talaromyces variabilis, T. wortmannii</i>	99
	7449	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium gorlenkoanum</i>	99
	7457	DRBC	ITS in <i>BenA</i>	<i>Penicillium bialowiezense</i>	100

Preglednica 26: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Pomorskega muzeja Sergeja Mašera, Piran.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
začasni depo	7511	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium toxicarium</i>	100
	7519	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium harmonense</i>	100
	7525	DRBC		-	
	7527	DRBC	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium pseudocladosporioides, C. cladosporioides, C. halotolerans</i>	99
	7531	DRBC	<i>ACT</i>	<i>Septoria citricola</i>	100
	7529	DRBC		-	
	7526	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium tardochrysogenum</i>	99
	7515	MEA		-	
	7512	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	100
	7532	MEA	<i>ACT</i>	<i>Ochroconis robusta</i>	100
	7518	MEA	<i>BenA</i>	<i>Alternaria arborescens, A. rhadina, A. destruens...</i>	99
	7522	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium chrysogenum, P. harmonense</i>	99
	7523	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
	7524	MEA		-	
	7528	MEA		-	
	7530	MEA	<i>ACT</i>	<i>Ochroconis robusta, Phaeoacremonium rubrigenum</i>	100
	7513	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	100

7514	DG18	ITS	<i>Aspergillus versicolor, A.jensenii, A. cyjetkovicii...</i>	99
7516	DG18	ITS	<i>Rhodotorula kratochvilovae, R. araucariae</i>	99
7517	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium harmonense</i>	99
7520	DG18		<i>Cladosporium ramotetenellum</i>	99

Preglednica 27: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Pokrajinskega muzeja Maribor.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
depo	7521	MEA	ITS	<i>Filobasidium oeireNSE, Cryptococcus magnus, C. magnus...</i>	99
	7469	MEA	ITS	<i>Trametes versicolor</i>	100
	7504	MEA	ITS	<i>Heterobasidion parviporum, Heterobasidion abietinum</i>	100

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 27: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Pokrajinskega muzeja Maribor.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
depo	7480	MEA	ITS	<i>Cladosporium austroafricanum, C. angustiterminale, C. phaenocomae...</i>	99
	7489	MEA	ITS	<i>Cladosporium austroafricanum, C. angustiterminale, C. phaenocomae...</i>	99
	7473	MEA	ITS	<i>Cylindrobasidium evolvens</i>	100
	7493	MEA	ITS in <i>BenA</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	99
	7475	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium expansum</i>	99
	7501	MEA	ITS	<i>Coprinellus micaceus</i>	99
	7463	DG18	<i>ACT</i>	<i>Ochroconis robusta</i>	98
	7467	DG18	ITS	<i>Cladosporium pseudochalastosporoides, C. ipereniae, C. varians...</i>	99
	7468	DG18	<i>ACT</i>	<i>Paracremonium inflatum, Ochroconis robusta, Phoma boeremae...</i>	100
	7465	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
	7474	DG18	ITS	<i>Alternaria alternata</i>	100
	7477	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	100
	7479	DG18	ITS	<i>Pseudocercosporaella fraxini</i>	99
	7492	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium panoctinium</i>	100
	7500	DG18	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
	7502	DG18	ITS	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	100
	7485	DRBC	ITS	<i>Cryptococcus heimaeyensis</i>	99
	7487	DRBC	ITS	<i>Chalara holuboviae</i>	99

7486	DRBC	ITS	<i>Aspergillus fumigatus, A. oerlinghausensis, A. neoellipticus...</i>	99
7498	DRBC	ACT	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	99
7470	DRBC	ITS	<i>Cladosporium funiculosum, C. austroafricanum, C. angustiterminale...</i>	100
7476	DRBC	ITS	<i>Cladosporium pseudochalastosporioides, C. ipereniae, C. varians...</i>	99
7464	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	99
7503	DRBC		-	
7499	MEA		-	
Depo omara	7478	DRBC	ITS <i>Heterobasidion annosum, H. parviporum, H. annosum</i>	100
	7481	MEA	ITS <i>Bjerkandera adusta, Thanatephorus cucumeris</i>	100
	7482	DG18	<i>BenA</i> <i>Penicillium biourgeianum</i>	100 se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 27: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Pokrajinskega muzeja Maribor.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
	7484	DG18	ITS	<i>Cladosporium funiculosum, C. austroafricanum, C. angustiterminale...</i>	99
	7491	DRBC	ITS	<i>Cladosporium austroafricanum, C. angustiterminale, C. phaenocoma...</i>	99
	7494	MEA	ITS	<i>Coprinellus radians, C. xanthothrix, C. domesticus...</i>	99
	7496	DG18	ITS	<i>Sporobolomyces roseus</i>	100
	7497	DG18	ACT	<i>Cladosporium allicinum</i>	100
hodnik	7471	DRBC	ACT	<i>Cladosporium allicinum</i>	99
	7483	DRBC	ACT	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	99
	7490	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium expansum</i>	99
	7472	DRBC	ITS	<i>Bjerkandera adusta, Thanatephorus cucumeris, Rhizoctonia solani</i>	99
	7495	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	100
	7488	DRBC		-	
	7466	DRBC		-	

Preglednica 28: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Muzeja krščanstva na Slovenskem.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
delavnice	7586	MEA	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99
	7587	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99

7588	DG18	ITS in <i>BenA</i>	<i>Penicillium buchwaldii</i>	100
Depo podstreže	7585	DG18	<i>ITS</i>	<i>Wallemia muriae</i>
Priročni depo	7583	DG18	<i>ITS</i>	<i>Wallemia muriae</i>
	7584	DRBC	<i>ACT</i>	<i>Cladosporium langeronii</i>

Preglednica 29: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
depo	7686	DG18	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus puulaauensis</i>	100
	7687	DRBC	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus creber</i>	100
	7688	DG18	ITS	<i>Aspergillus jensenii,A. cyjetkovicii, A. tennesseensis</i>	99
	7689	DG18	ITS	<i>Aspergillus versicolor, A. jensenii, A. cyjetkovicii</i>	99

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 29: Podatki o izoliranih glivnih sevih iz zraka iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije.

MESTO VZORČENJA	EXF št.	IZOLACIJSKO GOJIŠČE	ČRTNA KODA	IDENTIFIKACIJA	% SORODNOSTI TIPSKEMU SEVU
depo zrak	7683	MEA	ITS	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	99
	7684	MEA	ITS	<i>Aspergillus jensenii,A. cyjetkovicii, A. tennesseensi</i>	99
	7685	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus puulaauensis</i>	100
	7694	DRBC	ITS	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100
depo bris stene	7679	MEA	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus puulaauensis</i>	100
	7680	MY 10-12	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus puulaauensis</i>	100
	7681	DG18	ITS	<i>Aspergillus jensenii, A. cyjetkovicii, A. creber...</i>	99
	7682	MEA 5 % NaCl	<i>BenA</i>	<i>Aspergillus jensenii, A. cyjetkovicii</i>	99

Preglednica 30 predstavlja zbirno tabelo izolatov iz predmetov in zraka po posameznih muzejih in restavratorskega centra, ki smo jo kasneje uporabili pri statistični analizi.

Preglednica 30: Zbirna tabela izolatov iz predmetov in zraka različnih muzejev.

št. vzorčenih predmetov/prostorov	vzoreci					zrak				
	17	10	9	13	5	5	1	3	3	3
Rodovi oz. vrste (glivno deblo)	SEM	PPM	PMM	MKS	RCS	SEM	PPM	PMM	MKS	RCS
Glive debla Ascomycota										
<i>Alternaria</i> spp.	1		2					1		
<i>Antennariella placitae</i>		1								
<i>Aspergillus</i> spp.	8	1	1	5	22	8		3		11
<i>Cephalotheca sulfurea</i>						1				
<i>Chaetomium</i> spp.	1				7	1				
<i>Cladosporium</i> spp.	1	5	7	3		3	2	11	1	

<i>Cryptosporiopsis caliginosal</i>	1			2							
<i>Debaryomyces hansenii</i>											1
<i>Diaporthe phaseolorum</i>		1									
<i>Engyodontium album</i>						1					
<i>Eppicoccum</i> sp.	1								1		
<i>Fimetariella rabenhorstii</i>											
<i>Infundichalara microchona,</i> <i>Chalara holubovae</i>		2							1		
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>				1							
<i>Ochroconis robusta</i>						2	1	2			
<i>Paecilomyces variotii</i>				1							

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 30: Zbirna tabela izolatov iz predmetov in zraka različnih muzejev.

št. vzorčenih predmetov/prostorov	vzoreci					zrak				
	17	10	9	13	5	5	1	3	3	3
Rodovi oz. vrste (glivno deblo)	SEM	PPM	PMM	MKS	RCS	SEM	PPM	PMM	MKS	RCS
<b>Glive debla Ascomycota</b>										
<i>Penicillium</i> spp.	19	4		12	3	17	7	7	3	
<i>Peroneutypa scoparia</i>		1								
<i>Pseudocercosporella fraxini</i>										
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						1				
<i>Septoria citricola</i>						1				
<b>Glive debla Basidiomycota</b>										
<i>Baeospora myosura</i>		2	1	1						
<i>Bjerkandera adusta</i>				1				2		
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i>		1								
<i>Coprinellus</i> sp.							2			
<i>Cryptococcus</i> sp.							2			
<i>Cylindrobasidium evolvens</i>								1		
<i>Heterobasidion</i>								1		
<i>Heterobasidion annosum</i>								1		
<i>Hymenochaete</i>		1								
<i>Phlebia radiata</i>		1								
<i>Rhizoctonia solani</i>						1				
<i>Rhodonia placenta</i>		1								
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>							1			
<i>Sistotrema brinkmannii</i>			2							
<i>Sporobolomyces</i> sp.								1		
<i>Trametes versicolor</i>								1		
<i>Wallemia</i> spp.				1					2	

Glive debla Zygomycota										
<i>Mucor plumbeus</i>						1				
<i>Syncephalastrum</i>	1									
neidentificirane	4	0	1	4	6	3		4		
št. izolatov	37	21	14	31	38	40	11	41	6	12

#### 4.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV PRIDOBILJENIH Z GOJITVENIMI TEHNIKAMI S TEKSTILNIH PREDMETOV IN IZ ZRAKA

Rezultati statistične analize podatkov zbranih v preglednici 30 so zbrani v preglednici 31.

Največje število različnih rodov je bilo na predmetih PPM (12) in v zraku PMM (16) (Preglednica 31). S statistično analizo smo ocenili, da je bilo pri velikem številu vzorcev ocenjeno število taksonov višje od izoliranega števila taksonov, kar nakazuje, da bi lahko izolirali več taksonov, če bi vzorce podrobnejše analizirali. To smo dokazali z Cenilko bogatosti Chao 1, ki je na primer pokazala, da je pričakovano število taksonov s s predmetov iz SEM muzeja 23, za razliko od 8-ih osamljenih.

Na podlagi indeksa raznolikosti, po Simpsonu in Shannonu, je bila najvišja raznolikost dokazana pri predmetih iz PPM in v zraku PMM (Preglednica 31). Nizko bogatost in raznolikost zaznano v vzorcih RCS (predmeti in zrak) lahko razložimo z visoko vrednostjo dominance (D) in nizko primerljivostjo (J), ki jo najdemo v teh vzorcih, še posebno za vzorce zraka iz RCS, pri katerih so bile najvišje vrednosti ( $D = 0,85$  in  $J = 0,41$ ). Vzrok za visoko dominanco v teh vzorcih je prevlada vrst rodu *Aspergillus*.

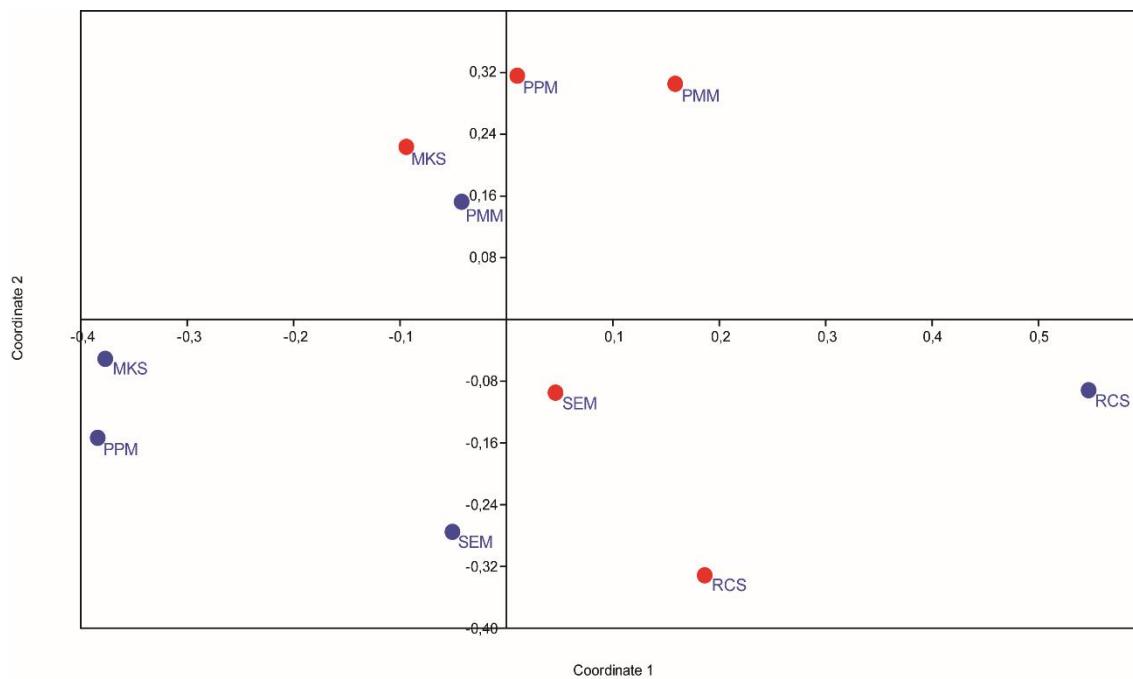
Preglednica 31: Bogatost, cenilka vrstne bogatosti in diverzitetni indeksi glivnih združb v zraku in na predmetih iz različnih muzejev (SEM, PPM, PMM, MKS) in depoja restavratorskega centra (RCS).

	predmeti						zrak			
	SEM	PPM	PMM	MKS	RCS	SEM	PPM	PMM	MKS	RCS
št. različnih taksonov	8	12	5	10	3	11	4	16	3	2
Cenilka Chao 1	23	21.33	5.33	17.5	3	21.5	4.5	23.2	3	2
Indeks Dominanca (D)	0.4	0.13	0.35	0.24	0.53	0.27	0.45	0.14	0.39	0.85
Indeks po Simpsonu (1-D)	0.60	0.87	0.65	0.76	0.47	0.73	0.55	0.86	0.61	0.15
Indeks po Shannonu (H)	1.3	2.27	1.3	1.81	0.81	1.73	1.03	2.35	1.01	0.29
Primerljivost (J)	0.62	0.91	0.81	0.79	0.74	0.72	0.75	0.85	0.92	0.41

Statistična analiza glavnih koordinat prikazuje strukturo glivnih skupnosti v muzeju. Koordinati 1 in 2 skupaj razložita približno 37,6 % distribucije glivnih skupnosti. Glivne skupnosti so se združile glede na zrak in na predmete, kar je razvidno iz grupacije glede na koordinato 1: zrak (rdeče pike) na desni strani koordinate in predmeti (modre pike) na levi strani koordinate, z dvema izjemama: vzorci RCS (modra oznaka) in zrak MKS (rdeča oznaka). Slednji oznaki sta se razporedili na drugo stran koordinate 1 v primerjavi z

ostalimi. Ti rezultati prikazujejo, da se glivne skupnosti prisotne v zraku in na predmetih razlikujejo in nakazujejo na to, da zrak ni edini povzročitelj kontaminacije v muzejih.

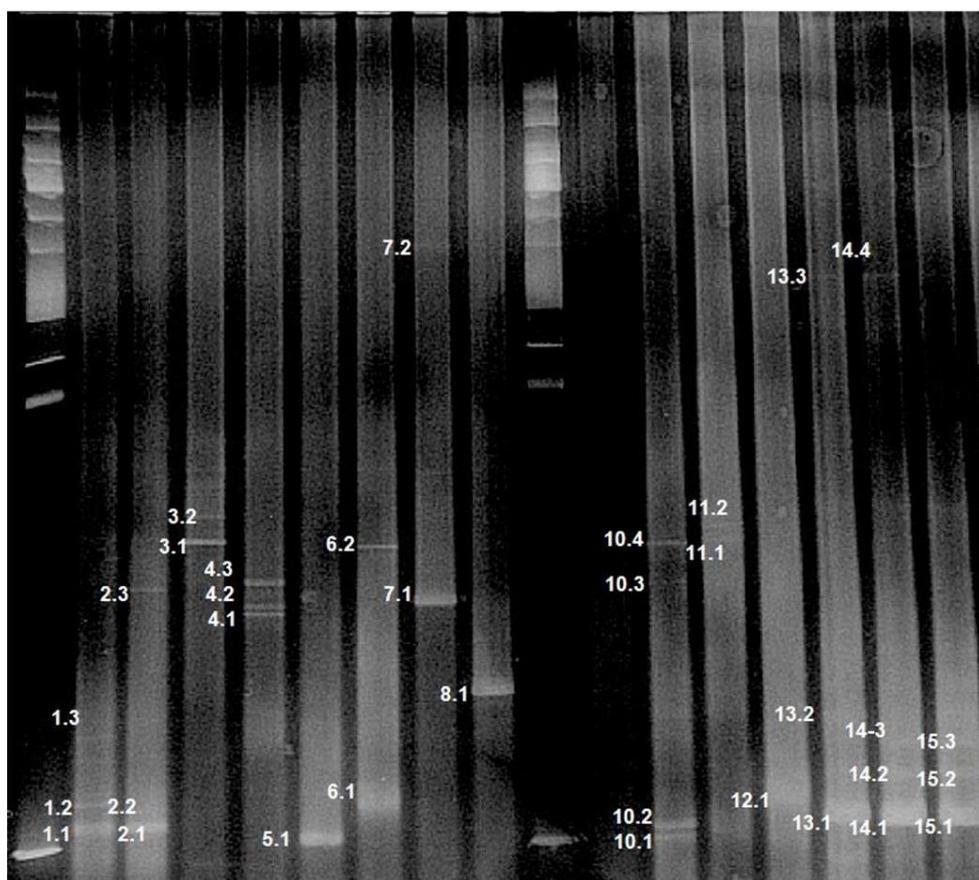
Glede na analizo odstotka podobnosti (Similarity Percentage analysis – SIMPER) so odstopanja (razlike) med zrakom in predmeti 69,32 %. Vrste gliv, ki najbolj vplivajo na te razlike so *Aspergillus* spp. (23,31 % od skupnih odstopanj), *Penicillium* spp (23,22 %) in *Cladosporium* spp. (13 %).



Slika 6: Statistična analiza glavnih koordinat osnovana na podobnosti glivnih združb v zraku (rdeče) in na površinah muzejskih predmetov (modra) po Jaccardu.

#### 4.5 NEGOJITVENE TEHNIKE (PCR – DGGE)

Iz vzorcev minimalne velikosti, vlaken odvzetih na robu predmetov (mase od 14 – 56 mg), smo izolirali celokupno DNA (od 4 do 9 ng/ul) in pomnožili regijo ITS. Že prvi PCR je bil v mnogih primerih neuspešen. Po vgnezdjeni PCR z uporabo nukleotidnih začetnikov z zanko GC smo pridobili pomnožke ITS2 regije, ki smo jih nanesli na poliakrilamidni gel in izvedli elektroforezo v denaturirajočem gelskem gradientu (DGGE). Slika 7 prikazuje sliko barvanega gela po elektroforezi.



Slika 7: DGGE profil ITS2 pomnožkov iz celotne DNA izolirane iz vzorcev minimalne velikosti.

Z leve proti desni si sledijo vzorci PPM1 (lise 1.1-1.3), PPM2 (lise 2.1-2.3), PPM6 (lisi 3.1, 3.2), PPM7 (lise 4.1-4.3), PPM8 (lisa 5.1), PPM9 (lisi 6.1, 6.2), PPM10 (lisi 7.1, 7.2), PMM2 (lisa 8.1), PMM3 (ni vidnih lis), PMM4 (lise 10.1-10.4), PMM5 (lisi 11.1, 11.2), PMM7 (lisa 12.1), RCS15 (lise 13.1-13.3), RCS16 (lise 14.1-14.4), RCS18, (lise 15.1-15.3).

Iz gela smo izrezali posamezne lise, očitstili DNA in ITS2 ponovno pomnožili s PCR, pomnožke pa klonirali in sekvencirali. V preglednici 32 so navedeni rezultati primerjave nukleotidnih zaporedij z deponiranimi zaporedji v svetovni spletni bazi GenBank, hkrati pa preglednica prikazuje tudi primerjavo z identificiranimi izolati po kultivaciji iz istih vzorcev. Zaporedja kloniranih pomnožkov ITS2 so bili dolgi od 96 do 196 baz in v nekaterih primerih nismo dobili zadetkov z visoko stopnjo homologije nobene glive. Zaporedja različnih klonov pridobljena iz tistih pomnožkov so bila večinoma identična, v več primerih smo iz različnih lis pridobili zaporedja podobnih (istih) taksonov (primer RCS15).

Preglednica 32: Primerjava med rezultati negojitvene (PCR-DGGE) in gojitvene (kultivacija na agarnih gojiščih) tehnike.

Vzorec	Oznaka lise/oznaka klena	Identifikacija klonov iz DGGE gela (% sorodnosti nukleotidnim zaporedjem v bazi GenBank)	Izolati (kultivacija)
<b>PPM1</b>	1_1/A1	A1_3: <i>Phaeosphaeria</i> sp. (93 %); <i>Alternaria</i> sp. (93 %); <i>Pleosporales</i> sp. (93 %)	ni izolatov
	1_2/A2	A2_2: <i>Pyrenophaeta</i> , <i>Phaeosphaeria</i> , <i>Alternaria</i> (88 %) A2_3: <i>Phaeosphaeria</i> sp. (91 %) A2_4: <i>Aspergillus</i> sp. (92 %)	
	1_3/A3	kloniranje ni bilo uspešno	
	2_1/A4	kloniranje ni bilo uspešno	
<b>PPM2</b>	2_2/A5	A5_1: <i>Phaeosphaeria</i> sp. (96 %) A5_4: <i>Penicillium</i> sp. (88 %)	- <i>Acephala applanata</i>
	2_3/A6	A6_2: <i>Phaeosphaeria</i> sp. (91 %)	
	3_1/A7	kloniranje ni bilo uspešno	
<b>PPM6</b>	3_2/A8	kloniranje ni bilo uspešno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Ceriporiopsis gilvescens</i></li> <li>- <i>Peroneutypa scoparia</i>, <i>Eutypella scoparia</i></li> <li>- <i>Cladosporium funiculosum</i>, <i>C. austroafricanum</i>, <i>C. angustiterminale</i>...</li> <li>- <i>Penicillium cosmopolitanum</i></li> </ul>
	4_1/B1	kloniranje ni bilo uspešno	
	4_2/B2	kloniranje ni bilo uspešno	
<b>PPM7</b>	4_3/B3	ni zadetkov	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aspergillus chevalier</i></li> <li>- <i>Infundichalara microchona</i></li> <li>- <i>Chalara holbovae</i></li> <li>- <i>Diaporthe phaseolorum</i></li> </ul>
	5_1/B4	B4_4: <i>Aspergillus flavus</i> (93 %)	
	6_1/B5	ni zadetkov	
<b>PPM9</b>	6_2/B6	B6_4: <i>Udeniomyces pyricola</i> (99 %)	- <i>Baeospora myosura</i>
	7_1/B7	B7_1: <i>Aureobasidium pullulans</i> (78 %) B7_3: <i>Aureobasidium pullulans</i> (94 %)	
	7_2/B8	B8_4: <i>Wallemia ichthyophaga</i> (92 %)	
<b>PMM2</b>	8_1/C1	kloniranje ni bilo uspešno	ni izolatov
<b>PMM3</b>	ni vidnih lis		ni izolatov
<b>PMM4</b>	10_1/C2	kloniranje ni bilo uspešno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Baeospora myosura</i></li> </ul>
	10_2/C3	C3_1: <i>Phaeosphaeria</i> sp. (97 %)	
		C3_2: <i>Phaeosphaeria</i> sp. (98 %)	
	10_3/C4	C4_1: ni zadetkov (le 96 nukleotidov)	
		C4_2: <i>Pyrenophaeta</i> , <i>Phaeosphaeria</i> , <i>Alternaria</i> (74 %)	
	10_4/C5	C4_4: <i>Phanerochaete</i> sp. (87 %)	
		kloniranje ni bilo uspešno	

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 32: Primerjava med rezultati negoitvene (PCR-DGGE) in gojitvene (kultivacija na agarnih gojiščih) tehnike.

Vzorec	Oznaka lise/oznaka klonova	Identifikacija klonov iz DGGE gela (% sorodnosti nukleotidnim zaporedjem v bazi GenBank)	- Izolati (kultivacija)
<b>PMM5</b>	11_1/C6	C6_3: <i>Lophiostoma</i> sp. (85 %) C6_4: <i>Lophiostoma</i> sp. (84 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cladosporium allicinum</i></li> <li>- <i>Sistotrema brinkmannii</i></li> </ul>
	11_2/C7	ni zadetkov	
<b>PMM7</b>	12_1/C8	C8_2: <i>Hortaea werneckii</i> (90 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>, <i>C. cladosporioides</i>, <i>C. halotolerans</i>...</li> <li>- <i>Aspergillus neoellipticus</i></li> </ul>
		C8_3: <i>Hortaea werneckii</i> (80 %)	
		C8_4: <i>Hortaea werneckii</i> (94 %)	
<b>RCS15</b>	13_1/D1	D1_1: <i>Aspergillus conicus</i> (91 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Penicillium corylophilum</i></li> <li>- <b><i>Aspergillus conicus</i></b></li> <li>- <i>Aspergillus vitricola</i></li> <li>- <i>Aspergillus jensenii</i></li> <li>- <i>Penicillium tardochrysogenum</i></li> <li>- <i>Aspergillus jensenii</i>, <i>A. cyjetkovicii</i>, <i>A. creber</i>...</li> </ul>
		D1_2: <i>Aspergillus conicus</i> (80 %)	
		D1_3: <i>Aspergillus conicus</i> (88 %)	
	13_2/D2	D2_2: <i>Aspergillus conicus</i> (83 %)	
		D2_4: <i>Aspergillus conicus</i> (78 %)	
	13_3/D3	D3_1: <i>Aspergillus conicus</i> (70 %)	
<b>RCS16</b>	14_1/D4	D4_1: <i>Aspergillus conicus</i> (85 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Penicillium humuli</i></li> <li>- <b><i>Aspergillus conicus</i></b></li> <li>- <i>Chaetomium spirochaete</i>, <i>C. subglobosum</i>, <i>C. angustispirale</i>...</li> </ul>
		D4_2: <i>Aspergillus conicus</i> (95 %)	
		D4_4: <i>Aspergillus conicus</i> (95 %)	
	14_2/D5	D5_1: <i>Aspergillus conicus</i> (95 %)	
		D5_2: <i>Aspergillus conicus</i> (87 %)	
		D5_4: <i>Aspergillus conicus</i> (79 %)	
	14_3/D6	D6_1: <i>Penicillium humicoloides</i> (89 %)	
		D6_2: <i>Aspergillus conicus</i> (93 %)	
		D6_5: <i>Aspergillus conicus</i> (89 %)	
	14_4/D7	D7_1: <i>Aspergillus conicus</i> (92 %)	
		D7_4: <i>Aspergillus conicus</i> (80 %)	
		D7_5: <i>Aspergillus conicus</i> (88 %)	
<b>RCS18</b>	15_1/D8	D8_1: <i>Aspergillus conicus</i> (86 %)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Chaetomium</i> sp. 1</li> <li>- <i>Chaetomium</i> sp. 2</li> <li>- <i>Chaetomium</i> sp. 3</li> </ul>
		D8_2: <i>Aspergillus conicus</i> (89 %)	
		D8_3: <i>Aspergillus conicus</i> (87 %)	
	15_2/E1	E1_1: <i>Aspergillus conicus</i> (91 %)	
		E1_2: <i>Aspergillus conicus</i> (86 %)	
	15_3/E2	E2_3: <i>Aspergillus conicus</i> (87 %)	

Primerjava med obema vrstama tehnik kaže, da se rezultati pridobljeni z obema metodama v večini ne skladajo, razen v primeru vrste *Aspergillus conicus*, ki smo jo izolirali iz predmetov RCS. V nekaterih primerih smo s kultivacijo pridobili več različnih vrst, medtem ko pridobitev nukleotidnih zaporedij po kloniranju lis PCR-DGGE ni bilo uspešno. Tak primer je vzorec PPM6 in PPM7. V številnih primerih pa smo sicer glive detektirali z obema tehnikama, vendar se rezultati niso skladali (primer PPM8). Rezultati so skladni le v primeru dveh oljnih slik na platnu, RCS 15 in 16. V dveh primerih smo zaznali tudi okužbo pri negoitveni tehniki, saj smo detektirali glive, s katerimi se je sicer

delalo v laboratoriju, iz vzorcev pa jih nismo nikoli osamili (primer PPM10, *Wallemia ichthyophaga*, in PMM7, *Hortaea werneckii*).

## 5 RAZPRAVA

### Proučevanje muzejskega tekstila

V muzejih hranjeni predmeti kulturne dediščine so zaradi starosti že sami po sebi načeti, saj so še preden pridejo v muzejske zbirke že dolgo časa izpostavljeni različnim fizikalnim, kemijskim in biološkim faktorjem. Slednje predstavljajo predvsem mikroorganizmi, pa tudi nekatere žuželke (Sterflinger and Piñar, 2013). Predvsem za izdelke iz celuloznih vlaken, kot je papir, glice izmed mikroorganizmov predstavljajo glavni problem (Michaelsen in sod., 2013). Glice so porajajoča problematična skupina mikroorganizmov v arhivih in muzejih, zato študije na to temo predstavljajo izziv restavratorjem, kuratorjem in znanstvenikom (Sterflinger, 2010).

### Muzejska mikrobiota

V muzejih obstaja posebna muzejska mikrobiota, omejena na nekaj vrst gliv, ki so zmožne rasti pri nizki vodni aktivnosti  $a_w$  (Kavkler in sod, 2014b; Sterflinger, 2010). Številčno so najbolj dominantni predstavniki rodov *Aspergillus* in *Penicillium*. Tudi sicer sta zelo pomembna, saj med njimi lahko najdemo vrste, ki so sposobne rasti pri precej nižji vlagi v substratu, kot ostale celulolitične glice. Če so pogoji hranjenja slabí, lahko z metabolnimi produkti povišajo vsebnost vlage v materialu, kar pa lahko omogoči razrast vrst z visokim biodegradacijskim potencialom (Szostak-Kotova, 2004; Abdel-Kareem, 2010a).

Namen naše raziskave je bil s klasično kultivacijo pridobiti vpogled v okužbo tekstilnih predmetov, shranjenih v slovenskih muzejih. Podobna raziskava je bila opravljena na manjšem številu predmetov (Kavkler in sod., 2014b). V raziskavi smo se omejili na glice. Namen je bil uporabiti tehnike vzorčenja, ki bi minimalno poškodovale, oz. vplivale na izgled vzorčenega predmeta. To je bila tehnika brisa z namenom gojenja. Da bi primerjali kultivabilno tehniko z nekultivabilno, na DNA temelječo tehniko, smo na vzorcih 15. izbranih predmetov opravili DGGE analizo pomnožkov ITS2 regije jedrne DNA. Poleg tega smo želeli preveriti, ali so glice na predmetih prisotne tudi v zraku muzejev.

V štirih slovenskih muzejih in v depaju restavratorskega centra smo povzorčili 52 različnih muzejskih predmetov, ki so bili tekstilni ali so vsebovali tekstil, in iz njih osamili 121 glivnih izolatov, ki smo jih uvrstili v 41 rodov in 111 vrst. Izbor predmetov so naredili restavratorji, velikokrat so se madeži, zaradi katerih so bili predmeti obravnavani v analizi, izkazali za bodisi ne-mikrobnega nastanka (primer predmetov SEM15, SEM16, SEM17, SEM19, SEM20, SEM21, PPM3, PMM2, PMM3, ter MKS13), ali pa so bile glice na njih mrtve oz. nekultivabilne.

Pri izolaciji gliv smo poleg splošnih gojišč, kot so gojišče s sladnim ekstraktom (MEA) ter gojišče z dikloranom in barvilom rose bengal (DRBC), uporabili tudi različna gojišča z znižanimi vodnimi aktivnostmi, na katerih uspevajo kserofili. Splošna gojišča imajo

vrednosti  $a_w$  cca. 1. Za zniževanje  $a_w$  pa smo uporabili 5 % NaCl pri gojišču MEA, kombinacijo 10 % soli in 12 % sladkorja v primeru gojišča MY10-12 ( $a_w$  0,93), ter v primeru gojišča DG18 glicerol, ki zniža  $a_w$  medija iz 0,99 do približno 0,95, kar nam je pri številnih predmetih omogočilo detekcijo kontaminant.

Prevladujoče glivne kontaminante, ki se pojavljajo na muzejskih tekstilnih predmetih naše raziskave, detektirane z gojitvenimi tehnikami in identificirane z uporabo rodovno specifičnih genskih označevalcev, v večini pripadajo rodovom *Penicillium*, *Aspergillus* in *Cladosporium*, (vse Ascomycota). Rodova *Penicillium* in *Aspergillus*, dandanes poleg različnih morfoloških znakov, ki so manj zanesljivi, ločujemo na osnovi nukleotidnih zaporedij delov dveh gospodinjskih genov, ki kodirata kalmodulin in beta tubulin (Samson in sod., 2014). V naši raziskavi smo uporabili filogenetski označevalec gena za beta tubulin. Rod *Cladosporium* je morfološko lahko prepozнат po temno zelenih kolonijah, za uvrstitev do vrstnega nivoja pa potrebujemo nukleotidna zaporedja kar treh različnih lokusov (Bensch in sod., 2012). Ostali rodovi se po različnih muzejih pojavljajo povečini posamično, z izjemo rodu *Chaetomium* (Ascomycota, razred Sordariomycetes), ki se pojavlja na več oljnih slikah na platnu v Restavratorskem centru Slovenije. Vsekakor pa smo z identifikacijo izolatov z muzejskih tekstilnih predmetov pokazali, da se v največji meri na njih pojavljajo predvsem vrste rodu *Aspergillus* in *Penicillium*. Rodova sta glede na predhodne študije pomembnejša predstavnika tipične muzejske mikrobiote (Kavkler in sod., 2014b). V veliko primerih se je izkazalo, da bi bilo za nedvomno identifikacijo nekaterih gliv do nivoja vrst potrebno uporabiti še nekatere dodatne molekularne označevalce. Prav tako pa težavo predstavlja tudi dejstvo, da dokaj pogosto naletimo na še neopisane taksone.

### Zakaj so glive problematične?

Glive so primarno naseljevalci rastlin, v /na katerih lahko nastopajo kot saprofiti ali patogeni. V obeh primerih so sposobne razgradnje celuloznih vlaken, ki so lahko osnovni gradniki muzejskega tektila (lan, konoplja, bombaž).

Glive rastejo na substratih v obliki micelija, sposobne pa so tvorbe spor, tako spolnih, kot tudi nespolnih. Ravno to jim daje prednost pri razširjanju, po drugi strani pa so to strukture, ki so dormantine in lahko preživijo daljša časovna obdobja brez hranil in potrebnih drugih fizikalno kemijskih dejavnikov okolja, tudi v pogojih zelo nizke relativne zračne vlage. Spolne spore so v tem kontekstu bolj dolgožive v primerjavi z nespolnimi, saj je sestava njihove celične stene drugačna, posledično pa je tudi njihovo uničenje težje (Michaelsen in sod., 2013).

Poleg različnih vrst *Aspergillus* in *Penicillium*, ki sicer tvorita enormne kličine nespolnih spor, smo med detektiranimi glivami na muzejskih predmetih opazili tudi micelije, domnevno rastoče iz spolnih spor, ki pripadajo višjim glivam, npr. *Bjerkandera adusta*,

*Baeospora myosura*, *Hymenochaete* sp., *Ceriporiopsis gilvescens*, *Phlebia radiata*, *Rhodonia placenta*, *Sistotrema brinkmannii*. Sicer smo lesne bazidiomicete, kot so *Heterobasidion annosum*, *Coprinellus micaceus*, *Cylindrobasidium evolvens*, *Heterobasidion annosum*, *Trametes versicolor*, izolirali tudi iz zraka, kar pa ni presenetljivo, saj lahko spore v muzej prinesajo tudi obiskovalci in zaposleni, prav tako pa lahko v stavbe vstopajo preko zraka (WHO, 2009). Le-te pa niso zanemarljive, saj se ob pogojih visoke zračne vlage oz. vlage na substratu lahko razvijejo v micelije, ti pa so, kot glive bele in rjave trohnobe, sposobni razgradnje celuloze, saj so primarni naseljevalci ligno-celuloznih substratov v naravi.

Prav tako problematične so glive iz rodov *Chaetomium*, ki so pogoste kontaminante rastlinskih vlaken. Zaskrbljujoče je dejstvo, da so pripadniki tega rodu proizvajalci različnih celulolitičnih encimov (Longoni in sod., 2012). Poleg tega pa je v tem rodu poznano le spolno razmnoževanje, spolne spore pa so bolj rezistentne na skrajne okoljske parametre, kot so suša in ekstremne temperature (Samson in sod., 2000). Vrste rodu *Alternaria* lahko najdemo na živečih rastlinah in spadajo med resne rastlinske patogene (Zhang in sod., 2009). Naseljujejo širok spekter habitatov, od semen, rastlin, zemlje, itd. Najbolj pogosta vrsta je *Alternaria alternata*, ki smo jo v naši raziskavi uspeli identificirati dvakrat – enkrat v primeru vzorca PMM8, drugič pa v zraku depoja Pomorskega muzeja Sergeja Mašera v Piranu. Vrste tega rodu so problematične tudi zaradi zmožnosti produkcije sekundarnih metabolitov (Logrieco in sod., 2009). Prav tako so kot rastlinski patogeni poznane askomicetne vrste, ki smo jih izolirali s predmetov, kot so *Cryptosporiopsis caliginosa*, *Diaporthe phaseolorum* in *Antennariella placitae*. Te glive bi lahko izvirale iz stebelnih vlaken (lan, konoplja) oz. semenskih vlaken (bombaž). S predmetov smo izolirali tudi celulolitične askomicete *Peroneutypa scoparia*, *Infundichalara microchona* in *Chalara holuboviae*. Edina entomopatogena askomiceta, ki smo jo izolirali, je bila *Paecilomyces variotii*, ta bi lahko bila povezana z insekti, ki so sicer lahko problematični v muzejskih zbirkah.

### **Vpliv zraka na kontaminacijo muzejskih predmetov**

Glive se nahajajo v zraku v različnih oblikah, najpogosteje v obliki spor, sledijo kvasovke in fragmenti hif. Pojav gliv v zunanjem zraku je sezonski, njihovo število je največje v jesenskem času. V zraku notranjih prostorov je ponavadi gliv manj, s podobnim razmerjem med rodovi kot v zunanjem zraku (normalno stanje), lahko pa se zaradi specifičnih pogojev v notranjih prostorih glive namnožijo in tudi v večji količini sproščajo v zrak (indikacija kontaminacije). Rodovi, ki so prisotnih v zraku in hkrati vsebujejo tudi alergene vrste, so *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium*. Referenčni podatki za prisotnost gliv v zraku po svetovni zdravstveni organizaciji WHO (2009) so naslednji: v zunanjem zraku je od 50 do 1500 CFU/m<sup>3</sup>, v zraku notranjih prostorov pa se kot normalno smatra do 500 CFU/m<sup>3</sup> (Zalar in sod., 2015).

Zaradi specifične pojavnosti so določeni taksoni indikatorji vlage. Med njih štejemo: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium* spp., *Sporobolomyces* spp., *Stachybotrys chartarum*, *Memnoniella echinata*, *Tritirachium oryzae*, *Ulocladium botrytis*, *U. chartarum*, *Chromelosporium* spp., and *Chaetomium* spp. Prav tako pa moramo upoštevati dejstvo, da so našteci taksoni lahko v zgradbo prišli tudi od zunaj. V primeru *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus niger*, je zelo verjetno da gre ravno za prenos spor iz zunanjosti. Tudi *Penicillium oxalicum*, *P. thomii*, in nekateri drugi predstavniki rodu *Penicillium*, se pogosto pojavljajo v zunanjem zraku. Enako velja za glive iz rodu *Cladosporium*, vendar pa lahko zelo dobro uspevajo tudi v notranjih prostorih, na izolaciji iz steklenih vlaken, na površinah z visoko relativno vlago, ali na mestih, kjer se pojavlja občasna kondenzacija (Mahooti-Brooks, 2010).

Iz zraka istih muzejev smo osamili 107 izolatov gliv, jih uvrstili v 22 rodov in 46 vrst. Na splošno so bile vrednosti CFU/m<sup>3</sup> zraka dokaj nizke v primeru muzeja SEM, kjer je klima kontrolirana (med 8 in 26 CFU/m<sup>3</sup>). Povišane vrednosti pa so bile v delavnici MKS muzeja, nad mejo detekcije z vzorcevalnikom pa so v depozitu RCS-ja, kjer je vrednost spor v zraku večja od meje detekcije z danimi parametri.

Tako v zraku, kot na vseh muzejskih objektih, se po vsem svetu pojavljajo predvsem širje rodovi: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium* (Abdel-Kareem, 2010b). V naši raziskavi smo dobili podobne rezultate, z izjemo rodu *Alternaria*, ki smo ga zaznali le v primeru Pokrajinskega muzeja Maribor. Primerjava prisotnosti gliv na predmetih in v zraku potrjuje, da se predmeti kulturne dediščine lahko okužijo preko zraka - preko spor ali delcev hif, bodisi že v procesu predelave materiala ali kasneje, med uporabo predmetov in njihovo hrambo (Florian, 1997).

Statistična analiza glavnih koordinat, narejena na podatkih prisotnosti/odsotnosti glivnih rodov na predmetih in v zraku je v večini primerov pokazala, da se taksoni na preiskovanih predmetih razlikujejo od tistih v zraku, kar nakazuje, da zrak ne predstavlja edinega vira okužbe preiskovanih predmetov. Opravili smo jo le na podatkih o prisotnih rodovih, kar bi lahko izboljšali tako, da bi upoštevali vse izolirane vrste.

### Vpliv tipa materiala na kontaminacijo

Na stopnjo razgradnje oz. zmožnost kontaminacije z različnimi glivami vpliva tip materiala (rastlinska, živalska vlakna), in pa tudi zgradba materiala, struktura tkanin, kot je debelina tkanine, gostota tkanja, itd. Ti faktorji določajo ranljivejša mesta za mikrobeno razrast. Tudi dodane substance, na primer veziva, barvila, lahko vplivajo na proces biodeterioracije (Szostak-Kotova, 2004). To se v naši raziskavi kaže predvsem v primeru močno kontaminiranih umetniških slik deponiranih v Restavratorskeem centru Slovenije, kjer so platnom dodane različne organske substance, kot so živalske maščobe in lepila, ki so lahko potencialni vir hrani.

Večina proučevanih muzejskih predmetov je bila iz rastlinskih celuloznih vlaken, med njimi pa so prevladovali predmeti iz bombaža. V literaturi navajajo, da najpogostejši razgrajevalci celuloznih vlaken pripadaju rodovom *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Memnionella*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Stachybotris*, in *Trichoderma* (Cybulska in sod., 2008). Naši rezultati so s to domnevo skladni v primeru Slovenskega etnografskega muzeja, v primeru ostalih institucij, pa smo uspeli osamiti tudi predstavnike nekaterih drugih rodov.

V primeru predmetov iz bombaža se v muzeju SEM ter MKS kaže podobno stanje, najbolj števični so pripadniki rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, medtem ko smo v PPM in PMM uspeli identificirati le enega predstavnika iz rodu *Penicillium*, ostale identificirane glice pa pripadajo rodovom *Cladosporium*, *Baeospora*, *Sistotrema* ter *Fimetariella*. Slednji trije rodovi združujejo lesne gobe, katerih spore so se nahajale na vzorčenih predmetih in vzklile na agarnih gojiščih. V primeru visoke zračne vlage, ki jo te glice potrebujejo za razrast, kot bi bila npr. poplava, bi lahko predmetom predstavljal potencialno nevarnost.

Na lanenih predmetih obstaja velika raznolikost med identificiranimi rodovi pri predmetih iz PPM in MKS, medtem ko je pri RCS opaziti ravno obraten trend, tako z gojitvenimi tehnikami kot metodo DGGE smo dobili zelo podobno sliko – številčno prevladuje rod *Aspergillus*, v primeru vzorcev RCS15 in RCS16 pa smo z obema metodama uspeli dokazati prisotnost gliv *Aspergillus conicus*. Tudi v primeru platna, ki je iz konoplje (RCS17), smo z gojitvenimi metodami osamili in identificirali *Aspergillus conicus*.

Kristalinična celuloza je najmanj dovetna za celulolitične encime (Chen in Jakes, 2001). Ligin in voski v celuloznih vlaknih zmanjšujejo razgradljivost, medtem ko ogljikovi hidrati, kot so hemiceluloze, pektini in pentoze, povečajo dovetnost za razgradljivost materiala. Naraven bombaž vsebuje manj neceluloznih substanc (približno 5 %), kot naprimer lan (približno 15 %), zato je nekoliko manj doveten za biodeterioracijo.

Tudi preiskovani predmeti iz proteinskih vlaken so kontaminirani, tako volneni, kot tudi svileni. Čeprav so proteinska vlakna načeloma manj razgradljiva od celuloznih, lahko prisotnost nečistoč poveča njihovo dovetnost za glivno razgradnjo (Tiano, 2002). V poizkušu smo v primeru volnenih tekstilij izolirali nekoliko drugačne vrste gliv, kot jih sicer navajajo v literaturi (*Aspergillus*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Ctenomyces*, *Fusarium*, *Penicillium* in *Rhizopus*), in sicer smo iz vzorca PMM8 osamili vrsto rodu *Alternaria*. Čeprav se na volni lahko pojavljajo tudi vrste rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, niso keratinofilne (Sommro, 2000). V primeru volenih predmetov iz vseh muzejev ni opaziti podobnosti med pojavljajočimi se glivnimi rodovi, saj smo skoraj v vseh primerih identificirali rodove, ki na predmetih pojavljajo posamično.

Na dveh vzorčenih predmetih iz usnja se v primeru vzorca SEM25A kaže majhna raznolikost med izoliranimi sevi, pojavljata se le rodova *Penicillium* in *Aspergillus*,

medtem ko smo na usnjenem traku mornarske kape poleg rodu *Penicillium* uspeli izolirati tudi predstavnika rodov *Cladosporium* ter *Phlebia*.

### **Vpliv okoljskih pogojev na kontaminacijo v muzejih**

Stopnjo glivne kontaminacije težko direktno povežemo z neprimerno kontrolo okoljskih parametrov, saj smo glive zaznali tako v primeru tistih muzejev, ki imajo okoljske parametre pod nadzorom (SEM), kot tudi tam, kjer le-ti niso kontrolirani (vsi ostali). Ob ekstremnih suhih pogojih ter pri nizki temperaturi lahko hife eventuelno odmrejo, vendar pa lahko večina glivnih spor ostane viabilna, na račun njihove visoke odpornosti na neugodne pogoje, kar seveda lahko povzroča nadaljnjo kontaminacijo, tudi v primeru, da so nekateri okoljski parametri pod optimalno mejo za glivno rast. Med kserotolerantnimi predstavniki rodov *Aspergillus* in *Penicillium* igrajo okoljski pogoji manjšo vlogo, saj te glive za svojo rast ne potrebujejo visoke relativne vlage (Kavkler in sod., 2014b).

### **Detekcija glivnih okužb na muzejskih predmetih**

V večjih muzejih je splošna praksa, da v namen razumevanja delovanja mikroorganizmov, le-te osamijo in identificirajo. V drugem koraku je potrebno proučiti dejanski obseg okužbe, aktivnost in metabolno stanje mikroorganizmov in njihove vloge v procesu biorazgradnje. V tretji fazi le-te informacije uporabijo s končnim namenom konserviranja in varovanja muzejskih predmetov (González in Saiz-Jimenez, 2005). Z osamitvijo in identifikacijo mikrobov pridobimo mikrobne seve, na katerih lahko opravljamo nadaljne fiziološke poskuse. Prav tako pa gojitvene tehnike omogočajo kvantifikacijo okužbe, npr. s štetjem kolonijskih enot (CFU) na selekcijskih gojiščih.

Slabost gojitvenih metod je povezana s potrebo po odvzemu vzorca, časovni potrati in manjšem številu kultivabilnih mikrobov napram nekultivabilnim. Predvsem zaradi slednjega lahko okužbo podcenimo. V zadnjem desetletju so z razvojem mikrobioloških metod tudi v restavratorstvo uvajali tehnike, ki temeljijo na DNA analizi združb. Aplicirali in adaptirali so različne genetske tehnike, večinoma na PCR reakciji temelječe tehnike proučevanja mikrobnih združb, s čimer so premostili probleme v zaznavanju negoljivih mikrobov. Slednje so aplicirali predvsem specifično za detekcijo arhej in bakterij. Glavna od na DNA temelječih analiz je bila PCR-DGGE analiza (Ettenauer in sod., 2014).

Za pridobivanje podatka o sestavi mikrobne združbe, smo uporabili metodo DGGE, ki je poleg metode FISH pogosto uporabljená (Sterflinger, 2010).

V naši raziskavi smo z metodo DGGE pridobili podatke o sestavi celotne mikrobne združbe. Ta je temeljila na izolaciji celotne DNA iz vzorca, v našem primeru na osnovi ITS2 pomnožka. V procesu elektroforeze DGGE se s pomočjo kemijskega gradiента denaturanta ločijo različna nukleotidna zaporedja v obliki lis. Pri tem nastanejo različni

fragmenti DNA, ki jih nato posekvenciramo (Lupan in Popescu, 2012; López-Miras in sod., 2013).

V primeru klena A2 (Preglednica 27), smo po sekvenciranju ugotovili, da sta se v isti lisi nahajali zaporedji kar dveh organizmov in sicer *Phaeosphaeria* sp. ter *Aspergillus* sp., kar je v skladu s teorijo, da se na istem mestu v gelu lahko ustavi DNA, ki za denaturacijo in zaustavitev na določenem mestu potrebuje enake pogoje, ni pa nujno da je enaka po nukleotidnem zaporedju.

Detektirali smo tudi dva organizma (*Wallemia ichthyophaga* in *Hortaea werneckii*), ki sta bila po vsej verjetnosti rezultat kontaminacije v laboratoriju. Do okužbe je najverjetneje prišlo med pripravo vzorcev.

### **Primerjava rezultatov gojitvenih in negojitvenih tehnik**

Uporabljene kultivacijske metode so v primerjavi s PCR-DGGE analizo podale primerljive rezultate v primeru predmetov iz Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije, saj smo z obema metodama identificirali vrsto sorodno *Aspergillus conicus*. V ostalih primerih rezultati niso bili primerljivi. Razlog lahko pripisemo dejству, da nismo vedno vzorčili na istem mestu, in da je bila količina glivnega materiala v primeru domnevno manj okuženih vzorcev premajhna.

Pri pomnoževanju celotne DNA iz minimalne količine vzorca, ki smo ga imeli na razpolago, smo bili le delno uspešni. Na osnovi pridobljenih nukleotidnih zaporedij iz klonov DGGE ločenih pomnožkov lahko glive identificiramo le približno, saj je le ITS2 regija prekratka za zanesljivejšo identifikacijo. Iz DGGE profila ne moremo sklepati o živosti mikrobov na predmetih, kar lahko pa lahko s pomočjo gojenja. Z gojitvenimi tehnikami lahko pridobimo izolate, ki nam lahko služijo za testiranja deterioracijskega potenciala in eventualnih biocidnih tehnik.

Skupaj z razvojem mikrobioloških metod je napredovala tudi tehnika pri identifikaciji zgodovinskih tekstilnih predmetov. Poleg kultivabilnih se uporablajo tudi nekultivabilne tehnike, ki temeljijo na izolaciji celotne DNA (Di Bonaventura in sod., 2003). Pred začetkom restavratorskih del je pomembno, da imamo tudi informacijo o aktivnih glivnih kulturah, skupaj z njihovim biodegradacijskim potencialom, kot je npr. encimski profil (Kavkler in sod., 2014a). Z uporabo molekularnih metod, ki temeljijo na analizi molekul RNA, bi lahko poleg same sestave mikrobne združbe hkrati določili tudi metabolno aktivnost (Sterflinger, 2010), vendar je velikokrat količina materiala, ki ga imamo na razpolago za analizo premajhna že za DNA, kaj šele za RNA analizo.

## 6 SKLEPI

- Izolirane glive z muzejskih tekstilnih predmetov smo večinoma uvrstili med kserotolerantne/kserofilne vrste askomicet iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Cladosporium*, med njimi pa so se sporadično pojavljale tudi mezofilne asko- in bazidiomicetne glive, ki jih sicer povezujemo z rastlinami oz. lahko razgrajujejo les.
- Statistična analiza glavnih koordinat na osnovi podatkov o izoliranih rodovih s predmetov in iz zraka je v večini primerov pokazala, da se taksoni na predmetih razlikujejo od tistih v zraku.
- V primeru minimalno kontaminiranih predmetov se rezultati gojitvenih tehnik v primerjavi z negojitvenimi ne skladajo, se pa dopolnjujejo. Pri negojitvenih tehnikah je glavna omejitev majhna razpoložljivost materiala za vzorčenje in posledično premajhna količina DNA za nadaljne analize.
- Na vidno kontaminiranih poškodovanih predmetih, kot so bile oljne slike na platnu, smo glavnega povzročitelja okužbe, vrsto sorodno *Aspergillus conicus*, detektirali z gojitvenimi in negojitvenimi tehnikami. Večjo raznovrstnost gliv na predmetu pa smo zaznali z gojitvenimi tehnikami.

## 7 POVZETEK

V sklopu diplomskega dela smo obravnavali 52 tekstilnih predmetov (v celoti iz teksta ali le delno), ki jih hranijo v štirih različnih slovenskih muzejih (Slovenski etnografski muzej, Pomorski muzej Sergej Mašera, Pokrajinski muzej Maribor in Muzej krščanstva na Slovenskem). Poleg tega smo vzorčili močno poškodovane in okužene oljne slike na platnu, ki so bile shranjene v namen restavriranja v depoju Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije. Vzorčeni predmeti so izvirali z različnih geografskih področij (Slovenija, Afrika) in se med seboj razlikovali tudi po svoji starosti (od 17. do 20. stoletja) in sestavi (rastlinska, živalska vlakna). Identifikacija gliv je potekala s klasičnimi gojitvenimi metodami in je nadgrajena s primerjavo nukleotidnih zaporedij regije ITS. S predmetov smo osamili 121 glivnih izolatov in jih identificirali na osnovi nukleotidnih zaporedij ITS regije in drugih, rodovno specifičnih DNA črtnih kod. Prevladujoče glive na muzejskih tekstilnih predmetih naše raziskave v večini pripadajo rodovom *Penicillium*, *Aspergillus* in *Cladosporium*. Vse tri rodove uvrščamo v deblo Ascomycota, predstavljajo pa v večini nespolne, v določenih primerih pa tudi spolne stadije. Poleg omenjenih taksonov smo detektirali in osamili tudi nekatere glive iz debel Asco- in Basidiomycota, ki lahko v primeru pogojev visoke zračne vlage predstavljajo problem zaradi možne razrasti in sposobnosti razgradnje celuloze. V namen izogiba zračnim kontaminantom v poskusu, smo preučili tudi prisotnost in količino gliv v zraku. Iz zraka smo osamili 107 glivnih izolatov in jih identificirali po enakih postopkih, kot kontaminante s tekstilnih predmetov. Izračun cenilke vrstne bogatosti Chao 1 je pokazal, da je predvideno število taksonov večje kot število dejansko osamljenih. Statistična analiza glavnih koordinat, narejena na podatkih prisotnosti/odsotnosti glivnih rodov je v večini primerov pokazala, da se taksoni na preiskovanih predmetih razlikujejo od tistih v zraku, kar nakazuje, da zrak ne predstavlja vira okužbe preiskovanih predmetov.

Sestavo glivne združbe smo na 15-ih tekstilnih predmetih detektirali tudi z uporabo molekularne tehnike PCR-DGGE, s katero smo neposredno določili sestavo mikrobne združbe brez kultivacije. Ta je temeljila na izolaciji celokupne DNA in pomnožitve ITS2 rRNA operona, ter naknadne ločbe pomnožkov z elektroforezo v denaturirajočem gradientu (DGGE). Pri pomnoževanju celokupne DNA smo bili uspešni le v nekaterih primerih. Na osnovi nukleotidnih zaporedij pomnožkov izrezanih iz gela DGGE in vstavljenih v komercialni plazmid, smo lahko glive okvirno identificirali. Le v primeru oljnih slik na platnu je bilo mogoče primerjati rezultate kultivabilnih in nekultivabilnih tehnik, saj smo domnevno isti takson, kserofilno vrsto sorodno *Aspergillus conicus*, detektirali z uporabo obeh metod.

Na muzejskih vzorcih so kultivabilne tehnike v primerjavi z nekultivabilnimi tehnikami lažje izvedljive, glavna omejitev je velikost materiala, ki ga imamo na razpolago za vzorčenje. V primeru obširnejše kontaminiranih predmetov lahko genetski pristopi, kot je bila v našem primeru PCR-DGGE, predstavljajo uporaben pristop. Pridobitev sevov je

nujno potrebna v namen natančnejše opredelitve degradacijskega potenciala posameznih vrst, saj lahko le na ta način kontaminanto natančno identificiramo in nadalje preučimo. Pri manj kontaminiranih vzorcih, pa so nujni postopki optimizacije, od faze izolacije DNA naprej.

## 8 VIRI

- Abdel-Kareem O., 2010a. Fungal deterioration of historical textiles and approaches for their control in Egypt. e-PreservationScience, 7: 40-47  
<http://www.morana-rtd.com/e-preservationscience/2010/Abdel-Kareem-15-01-2010.pdf> (september 2016)
- Abdel-Kareem O., 2010b. Monitoring, controlling and prevention of the fungal deterioration of textile artifacts in the museum of Jordanian heritage. Mediterranean Archaeology and Archaeometry, 10: 85-96
- Andersen B., Frisvad J.C., Søndergaard I., Rasmussen I.S., Larsen L.S. 2011. Associations between fungal species and water-damaged building materials. Applied and Environmental Microbiology, 77, 12: 4180-4188
- Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z., Crous P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology, 72: 1–401
- Bhatnagar I.K., Mani M. 2001. Requisites of an effective fungicide for works of art. V: Studies in biodeterioration of materials. Agrawal O.P., Dhawan S., Pathak R. (eds.). Lucknow, Intach: 89-96
- Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? American Journal of Botany, 98: 936–948
- Breuker M., McNamara C., Young L., Perry T., Young A., Mitchell, R. 2003. Fungal growth on synthetic cloth from apollo spacesuits. Annals of Microbiology, 53: 47-54
- Bridge P., Spooner B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. Plant Soil, 232: 147–154
- Camuffo D. 1998. Microclimate for cultural heritage. Amsterdam, Elsevier: 415 str.
- Caneva G., Nugari M.P., Salvadori O. 2005. La biologia vegetale per i beni culturali. Florence, Nardini Editore: 400 str.
- Capodicasa S., Fedia S., Porcellia A.M., Zannoni D. 2010. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16<sup>th</sup> century painting. International Biodeterioration and Biodegradation, 64: 727–733
- Carbone I., Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91: 553-556
- Chen R., Jakes K.A. 2001. Cellulolytic biodegradation of cotton fibers from a deep ocean environment. Journal of the American Institute for Conservation, 40, 2: 91–103
- Clarke K.R., Warwick R.M., 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2<sup>nd</sup> ed. Plymouth, Primer-E: 1 zv. [loč. pag.]
- Cybulská M., Jedraszek-Bomba A., Kuberski S., Wrzosek H. 2008. Methods of chemical and physicochemical analysis in the identification of archaeological and historical textiles. Fibres and Textiles in Eastern Europe, 16: 67–73
- Di Bonaventura M.P., DeSalle R., Eveleigh D.E., Baldwin A.M., Koestler R.J. 2003. Studies of fungal infestations of Tiffany's drawings: limits and advantages of

- classical and molecular techniques. V: Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. New York, Metropolitan Museum of Art: 95-109
- Ettenauer J. D., Jurando V., Piñar G., Miller A. Z., Santener M., Saiz-Jimenez C., 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, doi: 10.1371/journal.pone.0103844: 13 str.
- Florian M.L. 1993. Conidial fungi (mould, mildew) biology: a basis for logical prevention, eradication and treatment for museum and archival collections. *Leather Conservation News*, 10: 1-26
- Florian M.L. 1997. Heritage eaters, insects and fungi in heritage collections. London, James and James Ltd: 111-153
- Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118
- Garside P. 2010. Biodegradation and characterization of water-degraded archeological textiles created for conservation research. V: Cultural heritage microbiology: fundamental studies and conservation science. Mitchell R., Mcnamara C.J. (eds.). Washington, ASM Press: 97-110
- Glass N. L., Donaldson G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330
- Gonzalez J.M., Saiz-Jimenez C. 2005. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles*, 9: 75–79
- Grant C., Hunter C.A., Flannigan B., Bravery A.F. 1989. Water requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 25: 259–284
- Grantham N.S., Reich B.J., Pacifici K., Laber E.B., Menninger H.L. Henley J.B., Barberán A., Leff J.W., Fierer N., Dunn R.R. 2015. Fungi identify the geographic origin of dust samples. *PLoS ONE*, 10, 4: e0122605, doi: 10.1371/journal.pone.0122605: 13 str.
- Gu J. 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52: 69-91
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1-9
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422-1432
- Hocking A. D., Pitt J. I. 1980. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 39: 488-492

- Jurado V., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. 2008. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage. International Biodeterioration and Biodegradation, 62, 4: 325–330
- Kavkler K., Gunde-Cimerman N., Zalar P., Demšar A. 2014a. Fungal deterioration of aged textiles. V: Textiles, History, properties and performance and applications. Mondal I. H. (ed.). New York, Nova Science Publishers: 315-336
- Kavkler K., Gunde-Cimerman N., Zalar P., Demšar A. 2014b. Fungal contamination of texture objects preserved in Slovene museums and religious institutions. International Biodeterioration and Biodegradation, 97: 51–59
- King A. D., Hocking A. D., Pitt J. I. 1979. Dichloran-rose bengal medium for the enumeration and isolation of molds from foods. Applied and Environmental Microbiology, 37: 959-964
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Staples J.A. 2008. Dictionary of the fungi. 10<sup>th</sup> ed. Wallingford, CAB International: 640 str.
- Kowalik R. 1980. Microbiodeterioration of library materials. Part 2. Restaurator, 4: 135–219
- Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M. 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal, 2: 129–140
- López-Miras M., Piñar G., Romero-Noguera J., Bolívar-Galiano F. C., Ettenauer J., Sterflinger K., Martín-Sánchez I. 2013. Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. Aerobiologia, 29, 2: 301–314
- Lupan I., Popescu O. 2012. Metagenomics and future perspectives for biodeterioration and biodegradation studies. Annals of the Romanian Society for Cell Biology 17, 2: 37–42
- Longoni P., Rodolfi M., Pantaleoni L., Doria E., Concia L., Picco A.M., Cella R. 2012. Degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate: a functional analysis. Applied Environmental Microbiology, 78: 3693–3705
- Magurran A.E. 2004. Measuring biological diversity. Oxford, Blackwell Science: 256 str.
- Mahooti-Brooks N., Storey E., Yang C., Simcox N.J., Turner W., Hodgson M. 2004. Characterization of mold and moisture indicators in the home. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 12: 826-39
- Manter D. K., Vivanco J. M. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and lenght heterogeneity analysis. Journal of Microbiological Methods, 71: 7-14
- Matos T., Škamperle M. 2015. Prisotnosti gliv v prostorih knjižnic in arhivov ter njihov vpliv na počutje in zdravje ljudi. V: Tehnični in vsebinski problemi klasičnega in elektronskega arhiviranja, Radenci, 15. – 17. april 2015. Fras I., Gostenčnik N. (ur.). Maribor, Pokrajinski arhiv Maribor: 17-28

- Mesquita N. 2013. Identification and control of fungal contamination in ancient heritage documents. Doktorska disertacija. Coimbra, Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Botânica, Centro de Ecologia Funcional: 174 str.
- Michaelsen A., Pinzari F., Barbabietola N., Piñar G. 2013. Monitoring of the effects of different conservation treatments on paper infecting fungi. International Biodeterioration Biodegradation, 84: 333–341
- Montegut D., Indictor N., Kostler R.J. 1991. Fungal deterioration of cellulosic textiles: a review. International Biodeterioration Bulletin, 28, 1: 209-226
- Nikolcheva L. G., Cockshutt A. M., Bärlocher F. 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. Applied and Environmental Microbiology, 69: 2548-2554
- Peacock E.E. 1996. Biodegradation and characterization of water-degraded archaeological textiles created for conservation research. International Biodeterioration and Biodegradation, 38, 1: 49-59
- Peterson S.W. 2012. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MILST? Applied Microbiology and Biotechnology, 95, 2: 339-334
- Pinzari F., Montanari M., Michaelsen A., Piñar G. 2009. Analytical protocols for the assessment of biological damage in historical documents. Coalition, 19: 6–13
- Pitt J. I., Hocking A. D. 2009. Fungi and food spoilage. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Springer Science and Business Media: 519 str.
- Ramette A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology, 62: 142–160
- Roszak D. B., Colwell R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environments. Microbiological Reviews, 51: 365–379
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109: 6241–6246
- Samson R. A., Houbraken J., Thrane U., Frisvald J. C., Andersen B. 2000. Food and indoor fungi. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 390 str.
- Samson R. A., Visagie C. M., Houbraken J., Hong S.-B., Hubka V., Klaassen C. H. W., Frisvad J. C., Perrone G., Seifert K. A., Susca A., Tanney J. B., Varga J., Kocsimbé S., Szigeti G., Yaguchi T. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, 78: 141–173
- Sommro I.H. 2000. Keratinophilic fungi: the destroyer of the wool fibres. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3: 1323-1325
- Sterflinger K., Krumbein W.E., Rullkötter J. 1999. Patination of marble sandstone and granite by microbial communities. Zeitschrift der Deutschen Geologischen Gesellschaft, 150: 299–311

- Sterflinger K. 2010. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24: 47–55
- Sterflinger K., Piñar G. 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art – tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9637–9646
- Szostak-Kotowa J. 2004. Biodeterioration of textiles. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 53: 165–170
- Tedersoo L., Bahram M., Polme S., Koljalg U., Yorou N. S., Wijesundera R., Ruiz L. V., Vasco-Palacios A. M., Thu P. Q., Suija A., Smith M. E., Sharp C., Saluveer E., Saitta A., Rosas M., Riit T., Ratkowsky D., Pritsch K., Poldmaa K., Piepenbring M., Phosri C., Peterson M., Parts K., Partel K., Otsing E., Nouhra E., Njouonkou A. L., Nilsson R. H., Morgado L. N., Mayor J., May T. W., Majuakim L., Lodge D. J., Lee S. S., Larsson K.-H., Kohout P., Hosaka K., Hiiesalu I., Henkel T. W., Harend H., Guo L.-d., Greslebin A., Grelet G., Geml J., Gates G., Dunstan W., Dunk C., Drenkhan R., Dearnaley J., De Kesel A., Dang T., Chen X., Buegger F., Brearley F. Q., Bonito G., Anslan S., Abell S., Abarenkov K. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346, 6213:1256688
- Tiano P. 2002. Biodegradation of cultural heritage: decay mechanisms and control methods. Firenze, CNR: 37 str.
- Tomšič B., Simončič B., Orel B., Vilčnik A., Spreizer H. 2007. Biodegradability of cellulose fabric modified by imidazolidinone. *Carbohydrate Polymers*, 69, 3: 478–488
- Van den Ende A. H. G. G., De Hoog G. S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 43: 151–162
- Vukojević J.B., Ljaljević-Grbić M.V. 2005. Moulds on paintings. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 109: 175–179
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols*. Innis M. (ed.). San Diego, Academic Press: 315–322
- WHO. 2009. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen, World Health Organization: 228 str.
- Zalar P., Kavkler K., Motnikar A., Demšar A., Tavzes Č., Gunde – Cimerman N. 2015. Mikrobiološko napadeni tekstili. V: *Priročnik: muzejska konzervatorska in restavratorska dejavnost*. Ljubljana, Skupnost muzejev Slovenije: 19 str.
- Zhang Y., Schoch C.L., Fournier J., Crous P.W., de Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Hirayama K., Tanaka K., Pointing S.B., Spatafora J.W., Hyde K.D. 2009. Multi-locus phylogeny of *Pleosporales*: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology*, 64: 85–102



## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Poloni Zalar za vso pomoč in čas, ki mi ga je namenila tekom pisanja te diplomske naloge. Za odgovore na vsa vprašanja in hitro ukrepanje, kadarkoli je bilo to potrebno. Predvsem pa hvala za potrpežljivost in razumevanje. Še enkrat iskrena hvala, brez Vas mi ne bi uspelo.

Za recenzijo naloge se zahvaljujem doc. dr. Neži Čadež.

Ogromna zahvala gre tudi tehničnima sodelavkama Barbari Kastelic-Bokal in Mojci Šere ter vsem ostalim zaposlenim, ki so mi kakorkoli pomagali tekom laboratorijskega dela.

Zahvaljujem se Tássio Brito de Oliveira, za izdelavo statistične analize.

Zahvaljujem se tudi ge. Barbari Slemenik za hiter temeljit pregled diplomskega dela.

Rožle, hvala. Hvala, hvala in še enkrat hvala. Večno ti bom hvaležna. Vem, da je to obrabljena fraza, ampak si ne morem pomagati: hvala za vse – v dobrem in v slabem.

Tanja, hvala za ves tvoj trud.

Hvala vsem domačim, ki so me tekom študija in pisanja diplomske naloge podpirali in verjeli vame. Nimam besed, draga moja starša, s katerimi bi lahko izrazila hvaležnost za vse kar sta mi dala. Predvsem pa, da nad mano nikoli nista obupala.

Iskrena hvala tudi vsem mojim prijateljicam. Punce, hvala za vso podporo!