

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daniela Daša GRAF

**PROUČEVANJE MIKROBNIH OKUŽB  
UMETNIŠKIH SLIK**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daniela Daša GRAF

**PROUČEVANJE MIKROBNIH OKUŽB UMETNIŠKIH SLIK**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**INVESTIGATION OF THE MICROBIAL CONTAMINATION OF  
ART PAINTINGS**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Polono Zalar, za somentorico doc. dr. Martino Turk in za recenzentko doc. dr. Nežo Čadež.

Mentorica: doc. dr. Polona Zalar

Somentorica: doc. dr. Martina Turk

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. Martina TURK

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 naloga 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.

Daniela Daša Graf

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.69:75.025:579.2.083(043)=163.6
KG	biodeterioracija/umetniške slike/glive/bakterije/detekcija/izolacija/filogenija/ ITS/BTB/CMD/taksonomija/morfologija/molekularne tehnike/dekontaminacija
AV	GRAF, Daniela Daša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	ZALAR, Polona (mentorica)/TURK, Martina (somentorica)/ ČADEŽ, Neža (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	PROUČEVANJE MIKROBNIH OKUŽB UMETNIŠKIH SLIK
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XII, 75 str., 17 pregl., 27 sl., 2 pril., 69 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Zaznavanje in odkrivanje glivnih ter bakterijskih vrst, ki naseljujejo predmete kulturne dediščine, je ključnega pomena za njihovo ohranjanje. V muzejih prevladujejo predstavniki kserofilnih in kserotolerantnih gliv in bakterij, ki so lahko potencialno nevarni za shranjene predmete. V sklopu magistrskega dela smo obravnavali osem umetniških oljnih slik na platnu, starih 300–400 let. Izvirajo iz različnih slovenskih cerkva, trenutno so shranjene v Restavratorskem centru Zavoda za varovanje kulturne dediščine Slovenije. S slik smo osamili in z molekularnimi tehnikami, temelječimi na nukleotidnem zaporedju glivne ITS rDNA regije, gena za beta tubulin in kamodulin, ter bakterijske 16S rDNA, identificirali 88 glivnih in 22 bakterijskih izolatov. Izmed teh so kontaminacijo vseh slik povzročale kserofilne glavičaste plesni rodu <i>Aspergillus</i> , od katerih smo 6 od 14-ih vrst prepoznali kot za znanost nove vrste. Izmed bakterij se na slikah pojavljajo rodovi firmikutov <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> ter <i>Virgibacillus</i> , proteobakterija <i>Sphingomonas melonis</i> ter <i>Brachybacterium sacelii</i> iz debla aktinobakterij. V primerjavi z metagenomsko analizo 16S rDNA in ITS2 rDNA, pomnoženih iz vzorca DNA ene slike z uporabo sekvenciranja naslednje generacije smo ugotovili, da tehniki ne dajeta enakih rezultatov. Za zanesljivejše in celostne rezultate je priporočljiva kombinacija kultivabilnih in nekultivabilnih tehnik. Morfološke analize izbranih sevov rodu <i>Aspergillus</i> so potrdile razlike v nukleotidnem zaporedju med prepozanimi vrstami. Testirani izolati so kserofilni, saj ne rastejo na gojiščih brez dodatnih topljencev, z njihovim dodatkom pa kar do vodne aktivnosti $a_w$ 0,75.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDC 579.69:75.025:579.2.083(043)=163.6  
CX biodeterioration/paintings/fungi/bacteria/detection/isolation/phlogeny/ITS/BTB/  
CMD/taxonomy/morphology/molecular techniques/decontamination  
AU GRAF, Daniela Daša  
AA ZALAR, Polona (supervisor)/TURK, Martina (co-advisor)/ČADEŽ, Neža  
(reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2016  
TY INVESTIGATION OF THE MICROBIAL CONTAMINATION OF ART  
PAINTINGS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)  
NO XII, 75 p., 17 tab., 27 fig., 2 ann., 69 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB Detection, isolation and identification of fungal and bacterial species, colonizing in musea preserved objects of cultural heritage, is essential step for their successful preservation and conservation. In musea there are common xerophytic and xerotolerant fungi and bacteria, potentially presenting threat to the objects. In this master thesis we processed 8 oil paintings from 300 to 400 years old. They originate from various slovene churches and are currently stored in Restoration Centre for the Protection of Cultural Heritage of Slovenia (ZVKDS). We isolated and by molecular, sequence-based microbial identification techniques with fungal ITS rDNA region, beta-tubuline and calmodulin gene and bacterial 16S rDNA identified 88 fungal and 22 bacterial isolates from paintings. The main contaminants of the oil paintings were xerophilic species from the genus *Aspergillus*. Among 14 isolated *Aspergillus* species, 6 were considered new species. Among bacterial isolates we identified firmicutes from the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Virgibacillus*; a proteobacterium *Spingomonas melonis* and an actinobacterium *Brachybacterium sacelii*. The metagenomic analysis of fungal ITS region and bacterial 16S rDNA with next generation sequencing sample from a single oil painting did not show the same results as cultivation techniques. For optimal results it is necessary to combine both types of techniques. For the selected isolated *Aspergillus* strains their molecular identification was confirmed by the analysis of morphological characters. The fact, that they can grow only in the presence of solutes in culture media, and can still thrive in conditions of water activity  $a_w$  0,75, is supporting their existence in museum environment.

## 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 SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN	1
1.2 HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 BIODETERIORACIJA OLJNIH UMETNIŠKIH SLIK NA PLATNU	3
2.2 VPLIV OKOLJSKIH POGOJEV NA BIODETERIORACIJO	3
2.3 POTEK IN ZNAKI BIODETERIORACIJE	5
2.4 GLAVNI POVZROČITELJI BIODETERIORACIJE	7
2.4.1 Glive	8
2.4.2 Bakterije	10
2.5 ANALIZA BIODETERIORACIJE UMETNIŠKIH SLIK	10
2.5.1 Detekcija in izolacija glivnih in bakterijskih sevov	10
2.5.2 Analiza poškodb celuloznih vlaken zaradi biodeterioracije in določitev biodeterioracijskega potenciala za izbrane seve	12
2.5.3 Konzerviranje umetniških slik z namenom omejevanja glivne in bakterijske kontaminacije ter biodegradacije	13
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Gojišča	14
3.1.2 Raztopine	19
3.1.3 Komercialni kompleti in reagenti	20
3.1.4 Kemikalije	21
3.1.5 Laboratorijska oprema	22
3.2 METODE	23
3.2.1 Potek vzorčenja in klasične metode gojenja	23
3.2.2 Izolacija glivne DNA	25
3.2.3 Izolacija bakterijske DNA	26
3.2.4 Pomnoževanje glivne DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	26
3.2.5 Pomnoževanje bakterijske DNA	28
3.2.6 Anotacija nukleotidnega zaporedja glivne DNA	29

<b>3.2.7 Anotacija nukleotidnega zaporedja bakterijske DNA</b>	<b>29</b>
<b>3.2.8 Metagenomska analiza vzorca RCS 22</b>	<b>29</b>
<b>3.2.9 Taksonomska uvrstitev glivnih izolatov s pomočjo morfoloških in molekularnih tehnik</b>	<b>30</b>
<b>3.2.10 Določevanje optimalnih in mejnih fizikalno-kemijskih pogojev</b>	<b>31</b>
<b>3.2.11 Testiranje učinkovitosti aplikacije 70 % etanola in izpostavljenosti dušikovi atmosferi za uničevanje izbranih izolatov</b>	<b>31</b>
3.2.11.1 Test inkubacije v dušikovi atmosferi .....	32
3.2.11.2 Test tretiranja s 70 % etanolom .....	32
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 DETEKCIJA OKUŽB NA PREDMETIH</b>	<b>33</b>
<b>4.2 IZOLACIJA GLIV IN BAKTERIJ</b>	<b>38</b>
<b>4.3 IDENTIFIKACIJA GLIV</b>	<b>41</b>
<b>4.3.1 Izolirani sevi</b>	<b>41</b>
<b>4.3.2 Filogenetska drevesa</b>	<b>44</b>
<b>4.3.3 Makromorfološke in fiziološke analize izbranih sevov</b>	<b>49</b>
4.3.3.1 Rast na gojiščih za identifikacijo .....	49
4.3.3.2 Rast na gojiščih z različnimi vodnimi aktivnostmi .....	51
4.3.3.3 Mikromorfologija .....	52
4.3.3.4 Živost spor izbranega glivnega seva .....	58
<b>4.4 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ</b>	<b>58</b>
<b>4.4.1 Izolati, pridobljeni z gojitvenimi metodami</b>	<b>58</b>
<b>4.5 NEGOJITVENE TEHNIKE – METAGENOMIKA</b>	<b>59</b>
<b>4.5.1 Analiza metagenoma gliv</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2 Analiza metagenoma bakterij</b>	<b>60</b>
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>61</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>68</b>
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>69</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>71</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Proučevana slika RCS 15: »3. Prizor iz življenja sv. Frančiška« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A–C</b> ), poškodb na hrbtni strani platna ter detektirana glivna okužba ( <b>D, E</b> ) .....	34
Slika 2: Proučevana slika RCS 20: »Marijina zaroka« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ), poškodb na barvni plasti ( <b>B, C</b> ) ter detektirana glivna okužba ( <b>F, G</b> ).....	34
Slika 3: Proučevana slika RCS 21: »Sv. Janez Nepomuk« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ), poškodb na barvni ( <b>B, D</b> ) in hrbtni strani ( <b>C, E</b> ) ter detektirana glivna okužba na barvni ( <b>F</b> ) in hrbtni ( <b>G</b> ) strani. ....	35
Slika 4: Proučevana slika RCS 22: »Rožnovenska Mati Božja« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ), poškodb na barvni ( <b>B–D, F–H</b> ) in hrbtni strani ( <b>E, I</b> ) ter detektirana glivna okužba ( <b>J–M</b> ). ....	35
Slika 5: Proučevana slika RCS 23: »Sv. Barbara in sv. Ahac s svetniki« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ), poškodb na barvni ( <b>B–D, F–H</b> ) in hrbtni strani ( <b>D, I</b> ) ter detektirana glivna okužba ( <b>J–M</b> ). ....	36
Slika 6: Proučevana slika RCS 24: »Čaščenje sv. Križa« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ) in poškodb na barvni strani ( <b>B, C, E, F</b> ) ter detektirana glivna okužba ( <b>G–I</b> ). ....	36
Slika 7: Proučevana slika RCS 25 : »5. prizor iz življenja sv. Frančiška« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ), poškodb na barvni ( <b>B, C, E, F</b> ) in hrbtni ( <b>D, G</b> ) strani ter detektirana glivna okužba ( <b>H–J</b> ). ....	37
Slika 8: Proučevana slika RCS 26 : »2. prizor iz življenja sv. Frančiška« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest ( <b>A</b> ), poškodb na barvni plasti ( <b>B–E</b> ) ter detektirana glivna okužba ( <b>F–H</b> ). ....	37
Slika 9: Vzorčena stena v depaju Restavratorskega centra ( <b>A–D</b> ), kjer so bile slike shranjene.....	38
Slika 10: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 22.....	40
Slika 11: Število zraslih kolonij po analizi zraka na posameznih gojiščih pred in po vzorčenju v depaju Restavratorskega centra ter v referenčnem prostoru po dveh tednih inkubacije. ....	41
Slika 12: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij izbranih regij notranjih distančnikov ribosomske DNA ( <b>ITS rDNA</b> ) sevov <i>Aspergillus penicillioides</i> , izdelano s programom MEGA z uporabo substitucijskega modela Tamura 3. Zunanja skupina: <i>A. conicus</i> NRRL 149. Statistične podpore vej so izračunane z metodo vezanja.....	45
Slika 13: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij izbranih regij notranjih distančnikov ribosomske DNA ( <b>ITS rDNA</b> ) sevov <i>Aspergillus restrictus</i> , <i>A. conicus</i> in <i>A. vitricola</i> , izdelano s programom MEGA z	

uporabo substitucijskega modela Tamura 3. Zunanja skupina: <i>A. penicillioides</i> NRRL 4548. Statistične podpore vej so izračunane z metodo vezanja.....	46
Slika 14: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevonukleotidnih zaporedij dela gena, ki kodira beta-tubulin ( <b>BenA</b> ), izbranih sevov <i>A. penicillioides</i> in <i>A. vitricola</i> , dolžine 534 nukleotidov, izdelano s programom MEGA z uporabo substitucijskega modela Kimura 2 in gama distribucijo. Zunanja skupina je bila <i>A. vitricola</i> .....	47
Slika 15: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij dela gena, ki kodira beta-tubulin ( <b>BenA</b> ), izbranih sevov <i>A. restrictus</i> in <i>A. conicus</i> , dolžine 528 nukleotidov, izdelano s programom MEGA z algoritmom Kimura 2 in gama distribucijo. Zunanja skupina je bila <i>A. restrictus</i> NRRL 148. ....	47
Slika 16: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij gena, ki kodira kalmodulin ( <b>CaM</b> ), izbranih sevov <i>A. restrictus</i> , <i>A. conicus</i> in <i>A. penicillioides</i> , dolžine 529 nukleotidov, izdelano s programom MEGA z algoritmom Kimura 2. Zunanja skupina je bila <i>A. jensenii</i> .....	48
Slika 17: Kolonije seva <i>A. penicillioides</i> (EXF-10425) na gojiščih za identifikacijo po dveh tednih inkubacije.....	49
Slika 18: Izbrani sevi na gojiščih z različnimi vodnimi aktivnostmi. ....	52
Slika 19: Mikromorfologija vrste <i>A. penicillioides</i> ; EXF-10425 (RCS 24B). ....	54
Slika 20: <i>A. penicillioides</i> sp. 1; EXF-10431 (RCS 25C). ....	55
Slika 21: <i>A. penicillioides</i> sp. 2; EXF-10353 (RCS 24A). ....	55
Slika 22: <i>A. penicillioides</i> sp. 3; EXF-10401 (RCS 22C). ....	56
Slika 23: <i>A. vitricola</i> ; EXF-10378 (RCS 21A). ....	56
Slika 24: <i>A. restrictus</i> sp. 2; EXF-10379 (RCS 22A).....	57
Slika 25: <i>A. versicolor</i> ; EXF-10409 (RCS 15C). ....	57
Slika 26: Taksonomska sestava metagenoma bakterij v vzorcu RCS 22. ....	60
Slika 27: Sekcija <i>Restricti</i> po delitvi rodu <i>Aspergillus</i> na podrodove in sekcijs (Peterson in sod., 2008). .....	63

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij z njihovimi proizvajalci.....	21
Preglednica 2: Seznam uporabljene laboratorijske opreme s proizvajalci .....	22
Preglednica 3: Seznam proučevanih oljnih slik s podatki.....	23
Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi .....	26
Preglednica 5: Mešanica PCR za 1 reakcijo pomnoževanja glivne DNA.....	27
Preglednica 6: Programi pomnoževanja glivne DNA glede na različne oligonukleotidne začetnike.....	27
Preglednica 7: Mešanica PCR za 1 reakcijo pomnoževanja bakterijske DNA.....	28
Preglednica 8: Program pomnoževanja bakterijske DNA.....	29
Preglednica 9: Izbrani sevi za nadaljne morfološke in fizikalno-kemijske preiskave.....	30
Preglednica 10: Število glivnih in bakterijskih izolatov, osamljenih z različnih gojišč po 14-ih dneh. Prva št. pomeni št. glivnih izolatov, druga pa št. bakterijskih izolatov.....	39
Preglednica 11: Podatki o izoliranih glivnih sevih.....	42
Preglednica 12: Morfološke lastnosti izbranih sevov po dveh tednih inkubacije .....	50
Preglednica 13: Premer kolonij in prisotnost sporulacije izbranih sevov na različnih agarnih gojiščih.....	51
Preglednica 14: Mikromorfološke lastnosti (konidioforji, vezikli) izbranih sevov.....	53
Preglednica 15: Mikromorfološke lastnosti (fialide, konidiji) izbranih sevov.....	53
Preglednica 16: Št. kolonijskih enot (CFU/ml), zraslih na gojiščih, po obdelavi z etanolom in inkubaciji v dušikovi atmosferi .....	58
Preglednica 17: Podatki o izoliranih bakterijskih sevih.....	59

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Primarne izolacijske plošče vzorcev, slikane po dveh tednih inkubacije.

Priloga B: Kolonije izbranih sevov na gojiščih za identifikacijo, slikane po dveh tednih inkubacije.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	amonijev molibdat
16S rRNA	16S ribosomska ribonukleinska kislina
$a_w$	vodna aktivnost
BLAST	osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (angl. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
BT oz. BenA	gen za beta tubulin
$\text{CaCl}_2$	kalcijev klorid
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
Ch	kloramfenikol
CMD oz. CaM	gen za kalmodulin
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	kobaltov klorid
CREA	agar z dodatkom kreatina in saharoze za gojenje gliv (angl. Creatine Sucrose Agar)
CTAB	cetyltrimetilamonijev bromid
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	bakov sulfat (modra galica)
Cy	cikloheksimid
CY40	agar iz koncentrata po Czapeku in kvasnega ekstrakta (CYA), z dodatkom saharoze (angl. Czapek Yeast extract Agar with 40 % sucrose)
CYA	agar za gojenje gliv iz koncentrata po Czapeku in kvasnega ekstrakta (angl. Czapek Yeast extract Agar)
DG18	agar z dodanim dikloramom in glicerolom za gojenje gliv (angl. Dichloram Glycerol Agar Base)
DGGE	gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (angl. Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)
dNTP	deoksiribonukleotidi
DRBC	agar z dodanim dikloranom, barvilm Rose Bengal in antibiotikom kloramfenikolom (angl. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar)
EDX	energijska disperzijska analiza rentgenskih žarkov (angl. Energy diffraction analysis of X-rays)
ESEM	vrstična elektronska mikroskopija (angl. Environmental scanning electron microscope)
EX	mikrobiološka zbirka ekstremofilnih mikroorganizmov v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
$\text{FeSO}_4$	železov (II) sulfat
FISH	fluorescenčna <i>in-situ</i> hibridizacija
FTIR	Fourier transformacijska infrardeča spektroskopija
Glc	glukoza
$\text{H}_3\text{BO}_3$	borova kislina
HCl	klorovodikova kislina

IR	infrardeča svetloba
ITS	regija notranjih distančnikov ribosomske DNA (angl. Internal transcribed spacer)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dikalijev hidrogen fosfat
kb	kilo-bazni pari
KCl	kalijev klorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen fosfat
M40	agar s sladnim ekstraktom (MEA), z dodano saharozo (angl. Malt extract agar with 40 % sucrose)
M9	minimalno gojišče za izolacijo bakterij (angl. Minimal medium)
MgSO <sub>4</sub>	magnezijev sulfat
Milli-Q	deionizirana voda
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	manganov klorid, tetrahidrat
MY10-12	Agar za gojenje gliv iz kvasnega ekstrakta, z dodatkom soli in glukoze (angl. Malt extract, Yeast extract 10 % salt, 12 % glucose agar)
MY50G	Agar s sladnim ekstraktom in glukozo (angl. Malt Extract 50 % Glucose)
MY70GF	Agar s sladnim in kvasnim ekstraktom, z dodatkom glukoze ali fruktoze (angl. Malt Yeast extract 70 % Glucose/Fructose)
N <sub>2</sub>	atmosferski dušik
NA oz. HA	hranilni agar (angl. Nutrient agar)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dinatrijev-hidrogen fosfat
NaCl	natrijev klorid
NaNO <sub>3</sub>	natrijev nitrat
NaOH	natrijev hidroksid
NH <sub>4</sub> Cl	amonijev klorid
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
RCS	Restavratorski center Slovenije
rDNA	zapis DNA, ki kodira rRNA
RNA	ribonukleinska kislina
RPB2	druga največja podenota RNA polimeraze II
SSS	raztopina za oprijem glivnih spor in pripravo suspenzije spor iz agarja in emulgatorja Tween 80 (angl. Spore Suspension Solute)
TAE	pufer iz TRIS-a, ocetne kisline in EDTA (angl. TRIS-acetic acid-EDTA)
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
Tween 80	emulgator in stabilizator (sinonim: Polisorbat 80)
VBNC	viabilna, nekultivabilna oblika bakterij (angl. Viable but nonculturable)
w/v	teža na volumen
ZnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	cinkov sulfat heptahidrat

## 1 UVOD

Plesni in bakterije so pogosto kontaminante umetniških slik, posebej tistih, ki so shranjene ob neustreznih pogojih. Sčasoma lahko spremenijo njihov videz in povzročijo poškodbe z razgrajevanjem različnih vrst pigmentov, veziv ali nosilcev (platno, les, papir). S tovrstno degradacijo in deterioracijo se posledično zmanjšata vrednost in obstoj umetnin. Za ohranjanje kulturne dediščine in omejevanje rasti kontaminant sta zato bistvenega pomena predvsem detekcija plesni in poznavanje njihovih lastnosti ter fizioloških mej. Na podlagi poznavanja fizioloških mej so znanstveniki izoblikovali priporočila za ohranjanje stabilne klime v prostoru hranjenih slik, kar je trenutno najboljša preventivna opcija za omejevanje glivne kontaminacije. V tem kontekstu sta najpomembnejša parametra predvsem temperatura in relativna zračna vlažnost. Z namenom omejevanja glivne kontaminacije so vedno bolj v uporabi tudi HEPA filtri, ki se vgradijo v ventilacijski sistem. Vektor prenosa spor in vegetativnih celic gliv ter bakterij je namreč zrak.

Včasih pa tudi kljub preventivi pride do obsežne razrasti plesni. V tem primeru se restavratorji z namenom mikrobiološke dekontaminacije poslužujejo uporabe različnih tehnik, kot so fizična odstranitev spremenjenih delov slik ali glivnih hif, anoksi metoda, obsevanje z gama žarki in aplikacija fungicidov. Izbor ustrezne tehnike je vse prej kot enostaven, saj lahko njihova uporaba na predmetih pusti resne posledice.

### 1.1 NAMEN

Namen magistrske naloge je analiza umetniških slik: detektirati, osamiti in taksonomsko, z morfološkimi in molekularnimi tehnikami uvrstiti glice ter bakterije, ki rastejo na umetniških oljnih slikah. Eni izmed slik bomo določili mikrobeno združbo gliv in bakterij iz vzorca celokupne DNA z negoitvenimi tehnikami.

Med vsemi izolati gliv bomo izbrali najbolj zastopane predstavnike, katerim bomo določili optimalne in mejne fizikalno kemiske pogoje (temperatura, vodna aktivnost) za razrast. Z namenom uničenja glivnih spor bomo testirali učinkovitost anoksi metode in metode z aplikacijo 70 % etanola na izbranih izolatih.

## 1.2 HIPOTEZE

Naše delovne hipoteze so:

- Na umetniških slikah tehnike olje na platnu so prisotne kserofilne glive, sposobne rasti pri nizkih vodnih aktivnostih ( $a_w = 0,7\text{--}0,85$ ), ki jih bomo lahko izolirali s klasičnimi gojitvenimi tehnikami.
- Najbolj zastopani predstavniki gliv so pripadniki rodov *Aspergillus* in *Penicillium*.
- Na umetniških slikah je prisotno bistveno večje število gliv v primerjavi z bakterijami, saj večina bakterijskih vrst za rast potrebuje višjo vodno aktivnost ( $a_w 0,9\text{--}1,0$ ).
- Prisotne so bakterije, ki pripadajo deblom *Firmicutes* (natančneje vrste rodu *Bacillus* in njim sorodne), *Actinobacteria* in *Proteobacteria*.
- Izolirane plesni so različno občutljive na odsotnost kisika.
- Preživetje spor in vegetativnih celic po aplikaciji 70 % etanola je odvisno od kontaktnega časa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIODETERIORACIJA OLJNIH UMETNIŠKIH SLIK NA PLATNU

Človek že od nekdaj izkorišča raznovrstne vire surovin in materialov v različne namene. Prav vsi objekti (vključno z umetniškimi predmeti) se starajo, izsušujejo, oksidirajo, se spreminjajo tudi na račun kemijskih transformacij, ki jih povzročajo živi organizmi s svojo rastjo in vitalnim delovanjem. V kolikor je ta proces delovanja mikrobov za človeka neželen, ga imenujemo biodeterioracija (Hueck, 2001). Vanj so vpleteni različni organizmi, kot so bakterije, arheje, glive, lišaji, žuželke, itd., ki zaradi svojega biodeterioracijskega potenciala povzročajo težave pri ohranjanju kulturne dediščine (Sterflinger, 2013). Razgrajujejo lahko širok spekter različnih vrst materialov organskega ali anorganskega izvora.

Umetniške oljne slike na platnu so sestavljene iz kombinacije organskih in anorganskih materialov, in sicer iz celulognega podpornega platna (nosilca), ki je v preteklosti lahko bilo laneno, konopljino ali bombažno. Na površino nosilca je nanesena plast apna ali gipsa z dodatkom živalskega ali rastlinskega lepila. Na tak način so zgladili in pripravili površino platna za nanos enega ali več barvnih slojev. Barvni sloj je sestavljen iz mešanice pigmentov in olja, običajno lanenega, ki veže pigmente. Z namenom zaščite posušene barvne plasti premažejo s prosojnim lakom (Tiano, 2002; Strzelczyk, 2004; Cappitelli in sod., 2005).

Vir hranil za mikroorganizme ne predstavljajo le materiali kot sestavní deli slik, pač pa tudi plasti prahu, umazanje in drugih okoljskih kontaminantov ter živih ali mrtvih celic, ki se sčasoma naberejo na predmetih (Wainwright in sod., 1993; Fleming, 1998; Ciferri, 1999).

### 2.2 VPLIV OKOLJSKIH POGOJEV NA BIODETERIORACIJO

Glede na kemijsko naravo materiala, se na sliki lahko razvijejo kemoorganotrofni in/ali kemolitotrofni ter fotolitotrofni organizmi (Capodicasa in sod., 2008), vendar do biološkega napada pride le v ugodnih okoljskih pogojih, t.j. ob visoki zračni vlažnosti in optimalni temperaturi. V kolikor ti okoljski parametri v cerkvah, muzejih ali depojih niso nadzorovani, obstaja visoka možnost dodatne kontaminacije kot tudi biodeterioracije umetniških slik (Tiano, 2002). Z ugodnimi pogoji se namreč rast in razširjanje mikroorganizmov pospešita, s tem pa proces biodeterioracije prične potekati bistveno hitreje (Strzelczyk, 2004).

Na pričetek, potek in hitrost biodegradacije imajo največji vpliv delež vlage v substratu, relativna zračna vlažnost in temperatura okolja. V vlažnih in toplih prostorih brez ventilacije se lahko ob prisotnosti razpadajoče organske snovi mikrobiološki napad

pojavi že v nekaj dneh in poteka relativno hitro. Na makroskopskem nivoju tako glivni micelij, zrasel iz kaleče spore, lahko postane viden že v nekaj dneh (Tiano, 2002).

Priporočena temperatura za omejevanje glivne kontaminacije in biodeterioracije v muzejih znaša 16–18 °C, relativna vlažnost pa 40–65 % (Kavkler in sod., 2014). Kljub temu pa so omenjeni pogoji vseeno lahko ugodni za razvoj in rast ožjega spektra vrst gliv ter bakterij, ki imajo manjše zahteve po vodi in so sposobni kolonizirati materiale z zelo nizko vodno aktivnostjo (Williams in Hallsworth, 2009). Pri ekstremno suhih pogojih in nizkih temperaturah sicer hife postopoma odmrejo, vendar večina glivnih spor kljub temu ostane viabilnih. Ob ponovnem dvigu temperature in/ali stopnje vlažnosti se iz njih lahko ponovno razvijejo vegetativne celice (Strzelzyk, 2004; Ayerst, 1969).

Na biološko tveganje za kontaminacijo in biodeterioracijo umetniških slik poleg temperature in relativne vlažnosti pomembno vplivajo ostali dejavniki, kot so narava materiala, dostopnost hranič iz atmosfere, sestava in sinergija mikrobne združbe ter fizikalne lastnosti stavbe, kot je na primer topotna izolacija (Camuffo, 1998).

Pri kontaminaciji in biodegradaciji celuloznega platna je zelo pomembno, kakšne so kemijske in fizikalne lastnosti platna, od stopnje polimerizacije in kristaliničnosti celuloze, do stopnje obdelave ter po-obdelave v procesu pridobivanja platna. V kolikor so platnu dodani organski materiali (npr. živalsko lepilo, ki je vir proteinov), se dovzetnost predmeta za mikrobnou degradacijo poveča. Nasprotno pa dodatek nekaterih kovin, pigmentov in lužil dovzetnost zmanjša (Tiano, 2002; Tomšič, 2007; Warscheid, 2000).

Restavratorji/konservatorji pri čiščenju in obnovi umetnin uporabljajo materiale, kot so različna lepila, belila, čistilna sredstva, dodano podložno platno itd.. Ti so sveži in vsebujejo večjo količino vode (Tiano, 2002). Tako se na mestih slike, kjer je bilo platno v preteklosti zamenjano ali dolepljeno, v primerjavi z nesaniranimi deli nahaja više število mikroorganizmov (Capodicasa in sod., 2010).

Za ohranjanje kulturne dediščine v restavratorstvu je najpomembnejša naloga kontroliranje in ohranjanje ustreznih okoljskih parametrov, kot sta relativna zračna vлага in temperatura prostora, pa tudi urejen ventilacijski sistem ter redno čiščenje, saj se na tak način s površine slik odstranijo vegetativne hife in prah ter umazanija (Kavkler in sod., 2014).

## 2.3 POTEK IN ZNAKI BIODETERIORACIJE

Spremembe na zgodovinskih objektih povzročajo različni mehanizmi delovanja mikroorganizmov, ki pa so med seboj lahko težje ločljivi, saj pogosto potekajo hkrati. Razvoj gliv na površini slike vključuje tako estetski, kot tudi mehanski in biokemijski razpad slike. Posledice so lahko vidne na sprednji in zadnji strani slike v obliki prekritja vzorcev na barvni površini slike zaradi rasti micelija, delovanje encimov in izločeni mikrobeni produkti pa povzročijo obarvanje, razbarvanje, izgubo strukturne moči ter odpadanje materiala. V prostoru je lahko prisoten močan vonj po plesnivem zaradi produkcije hlapnih organskih spojin (Tiano, 2002; Allsop in sod., 2004; Strzelczyk, 2004). Glavni mehanizmi biodeterioracije na umetniških slikah so naslednji:

(i) prekritje površine in izmaličenje predmeta zaradi rasti in gibanja mikroorganizmov: Kadar mikroorganizmi materiala ne uporabljamjo kot vir hrani, ga pa s svojo rastjo oziroma gibanjem motijo ali izkriviljajo, govorimo o fizični ali mehanski biodeterioraciji. Kadar je površina objekta prekrita s plastmi živih (npr. biofilm ali razrasel glivni micelij) ali mrtvih organizmov, njihovimi izločki ali metabolnimi produkti, gre za estetsko biodeterioracijo. Pri tem mehanizmu mikroorganizmi za vir hrani uporabljamjo površinsko umazanijo. Predmet sicer ostane nepoškodovan, vendar pa je njegov izgled vseeno prizadet, njegova vrednost pa posledično nižja.

(ii) razgradnja materiala in z mikrobnim metabolizmom povezana encimatska aktivnost: (Bio)kemična asimilatorna biodeterioracija, ki se nanaša na z encimi povzročeno mikrobeno razgradnjo materiala kot vira hrani (Allsop in sod., 2004). Še posebej glive, zmožne rasti pri nižjih  $a_w$  vrednostih (npr. *Aspergillus* in *Penicillium*, ki rasteta na substratih s 7–8 % vlažnosti in pri relativni vlažnosti nižji od 62 %), lahko izločajo večje količine širšega spektra eksoencimov, kot so celulaze, glukanaze in lakaze, pa tudi esteraze, fosfataze ter amilaze (Sterflinger, 2010). Esteraze razgrajujejo predvsem oljna veziva v barvni plasti (npr. laneno olje), amilaze pa razgrajujejo škrob, ki je umetniškim slikam dodan kot polnilo ali lepilo. Celulaze izločajo predvsem pripadniki skupine *Deuteromycetes* in debla *Ascomycetes*, kot so na primer rodovi *Aspergillus*, *Penicillium* in *Cladosporium* (Cybulska in sod., 2008; Kavkler in sod., 2014; Lopez-Miras in sod., 2013b). Ti imajo dobro izraženo beta-glukozidazno aktivnost, ki je ključnega pomena v zadnji fazi razgradnje celuloze. Mehanizem degradacije celuloznih vlaken v celoti sicer še ni razložen (Zotti in sod., 2008), vendar pa naj bi po glivni micelij po kalitvi spor penetriral v lumen vlaken skozi razpoke sten ali na odrezanih koncех vlaken, kar naj bi povzročilo razpad in nastanek majhnih kosov fragmentiranih celuloznih vlaken (Szostak-Kotova, 2004). Zaradi izločenih kislin in encimov gliv v vlažnih pogojih prihaja do kisele hidrolize celuloznih vlaken (Strzelczyk, 2004). Znano je, da so celulolitični mikroorganizmi sposobni vzpostaviti sinergistične odnose z necelulolitičnimi vrstami, z namenom razgradnje celuloze. Hidroliza poteka na beta-1,4-glikozidnih vezeh. Pri razgradnji celuloze sodelujejo trije kompleksi encimov, in sicer

endoglukanaze, eksoglukanaze oz. celobiohidrolaze in beta-glukozidaze. Endoglukanaze sprožijo napad naključno na amorfnih regijah celuloznih vlaken, kar omogoči nadaljnji napad eksocelulazam. Eksocelulaze so specializirane za razgradnjo težje dostopnih, kristaliničnih regij celuloze (lateralne vodikove povezave med molekulami), pri čemer odcepijo disaharidne enote (celobioza) z nereducirajočega konca molekule. Encimi beta-glukozidaze nato v zadnji fazi razgradnje celuloze hidrolizirajo celobiozo v glukozo (Szostak-Kotowa, 2004; Sanchez, 2008).

Vsi celulozni materiali niso enako dovzetni za delovanje glivnih encimov, zelo pomembna je namreč njihova sestava in lastnost absorpcije vlage ter morebitni dodani materiali. Tako na primer različni voski in lignin znijo občutljivost, medtem ko pektin in hemiceluloza povisata občutljivost tekstila za degradacijo. Naravna bombažna vlakna v primerjavi z lanom vsebujejo manj teh ne-celuloznih substanc in so tako manj občutljiva za biodegradacijo. Manj dovzetna je tudi kristalinična struktura celuloze (Szostak-Kotova, 2004; Chen in Jakes, 2001; Kavkler, 2011).

V študiji Lopez-Miras in sod. (2013b) so ugotovili, da nekateri sevi gliv ob pomanjkanju hrani v okolju izločajo N-acetyl- $\beta$ -glukozaminidazo, ki hidrolizira vezi v polisaharidni verigi bakterijskega peptidoglikana.

Bakterijski sevi proizvajajo predvsem encima esterazo in esterazno lipazo, ki hidrolizirata lipide v lanenem olju. Bakterije s celulolitično aktivnostjo pripadajo rodovom *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Microspora*, *Sporocytophagamyxococcoides*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Spirillum* in drugim. Degradacija tekstila, izpostavljenega zunanjemu okolju je povezana z vrstami rodov *Myxomycetes* in *Actinomycetes*. Skupina *Actinomycetes* ima pri biodeterioraciji oljnih slik in zgodovinskih objektov na splošno pomembnejšo vlogo zaradi številnih encimskih aktivnosti (med drugim celulazne) (Tiano, 2002).

Bakterije naj bi sicer v primerjavi z glivami imele manjšo vlogo v procesu biodeterioracije umetniških slik (Tiano, 2002).

(iii) V okolje izločeni agresivni metabolni produkti:

V okolje izločeni mikrobeni produkti, kot so sekundarni metaboliti, pigmenti in kisline, povzročajo (bio)kemično disimilatorno biodeterioracijo, pri kateri gre za izgubo stabilnosti in oblike materiala (Ciferri, 1999; Allsop in sod., 2004). Zaradi izločenih glivnih pigmentov in pigmetiranega micelija ter spor, nastajajo na prizadetem materialu madeži vseh barv. Glive lahko pigmente izločajo že v delno neugodnih pogojih za rast in počasnejši metabolni aktivnosti. Intenziteta in obseg barvnega madeža sta odvisna od barve in lastnosti prizadetega materiala (pH, vsebnost kovin, sestava), ostalih okoljskih pogojev za rast in od vrste organizma. Madeži so recimo pogosto podobne barve kot spore, ki jih izloči gliva. Med bakterijami pa na primer večina običajno povzroča madeže svetlejše in manj intenzivne barve, vezane samo na napredno fazo razgradnje.

Intenzivnejših barv so npr. barvila aktinomicet, izločena v okolje ali skladiščena v micelijih in sporah. Veliko aktinomicetnih barvil ima lastnost antibiotičnega delovanja, kar je na prizadetih objektih vidno v obliki bistrih krogov.

Kserofilne aktinomicete na barvni plasti slike povzročajo majhne razpršene pike videza rje, v angleškem jeziku t.i. »foxing« pojav. Značilen je predvsem za slike, ki so bile dalj časa neprimerno skladiščene. Mehanizem nastanka ni povsem jasen, čeprav nekatere študije namigujejo, da gre za posledico Millardove reakcije oksidacije polisaharidov (Allsop in sod., 2004; Strzelczyk, 2004).

Pogosto se tudi zgodi, da barvne nečistoče, tesno vezane na celulozna vlakna na zadnjem delu slike, zamenjamo za rast gliv, kar naknadno ovrže podrobnejši mikroskopski pregled (Kavkler in sod., 2014).

V metabolnih procesih izločene organske kisline (npr. citrat, sukcinat, fumarat, oksalacetat,...) povzročijo znižanje pH vrednosti substrata in s tem kompetitivno prednost drugih mikroorganizmov, kar imenujemo sekundarna okužba (Tiano, 2002).

Biodeterioracijski proces je lahko omejen na določen del slike (bodisi na celulozno platno bodisi na barvno plast) ali pa zajema vse njene komponente. Najpogosteje je napadena zadnja stran slike s celuloznim nosilcem, iz katerega štrlico polimeri, in z živalskim lepilom, ki je bogato s proteini in zato dodatno poveča občutljivost tekstila (Tiano, 2002; Kavkler in sod., 2014). Biodeteriogeni mikroorganizmi sprva vstopijo v notranjost celuloznih vlaken na zadnji strani slike, nato pa nadaljujejo pot do temeljnega in barvnega sloja, ki zaradi hidrolize celuloznih vlaken popokata in pričneta odstopati od platna (Strzelczyk, 2004).

Manj pogost je napad s sprednje strani slike, kjer je v stiku z zrakom barvna plast. Za lažje razgradljivo komponento barvnega sloja sicer velja laneno olje, vendar pa je odvisno predvsem od narave pigmentov, ali, in v kolikšni meri, bo do napada prišlo. Prisotnost težkih kovin (npr. cink, krom, svinec) v barvnih pigmentih lahko precej zmanjša verjetnost mikrobnega napada na barvno plast (Tiano, 2002).

## 2.4 GLAVNI POVZROČITELJI BIODETERIORACIJE

V proces biodeterioracije je vključenih več različnih vrst organizmov, kot so glive, bakterije, arheje, lišaji, škodljivi insekti itd. (WHO, 2009). Umetniške slike so najpogosteje tarča gliv in bakterij, zato smo se v tej magistrski nalogi osredotočili izključno na ti dve skupini biodeteriorativnih mikroorganizmov.

### 2.4.1 Glive

Glive spadajo med ubikvitarne evkarionte. V stavbe se prenesejo na površini novih materialov, z oblačili ter z zrakom. Nahajajo se v prahu in na praktično vseh stavbnih površinah. Kakor hitro se nahajajo na katerikoli površini v notranjem prostoru, se prične njihova rast v prisotnosti vlage. Od vodne aktivnosti (dostopnosti vode;  $a_w$ ) substrata je odvisno, katere vrste gliv bodo rasle na njem in na podlagi tega uvrstimo glive v več skupin (Grant in sod., 1989):

- primarni naseljevalci (t.i. kserofili) lahko rastejo pri vrednosti  $a_w$ , nižji ali enaki 0,80 (= 80 % relativna vlažnost): *Aspergillus*, *Eurotium*, *Wallemia*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Paecilomyces*. Razvite imajo posebne fiziološke mehanizme za prilagoditev nizkim vrednostim  $a_w$ , kot je npr. kopičenje kompatibilnega topljenca glicerola znotraj celice, ko osmosenzorji v membrani zaznajo padec vlage v okolju. Kompatibilni topljenci tako uravnovesijo zunanji in notranji ozmotski pritisk (Leong in sod., 2011; WHO, 2009).
- sekundarni naseljevalci rastejo pri vrednosti  $a_w$  0,80–0,90: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*.
- terciarni naseljevalci rastejo pri vrednostih  $a_w$ , ki presegajo 0,90: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Exophiala*, *Phoma*, *Phialophora*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Urocladium* (WHO, 2009).

Kar se tiče hrani, potrebujejo glive ogljikove hidrate, proteine in lipide. Spekter hraničnih virov je širok in raznolik (rastlinska in živalska snov, hišni prah, gradbeni materiali, hrana, barve, lepila, les, papir, itd). Hranila torej za razliko od vode niso omejujoči dejavnik za rast gliv v notranjem prostoru, prav tako ne temperatura prostora, saj večina gliv v zaprtih prostorih raste pri temperaturi med 10 in 35 °C. Vseeno pa vplivata na stopnjo rasti in produkcijo določenih alergenov ter metabolitov (Nielsen in sod., 1999).

Glive v notranjem prostoru lahko s svojim delovanjem negativno vplivajo na človekovo zdravje. Producirajo namreč več različnih vrst alergenov (tipa I, II, III, IV, Asp f I in III, Alt a I in II,...), določene glivne rodove (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* in *Alternaria*) povezujejo z nastankom alergijskih respiratornih bolezni (npr. astma in preobčutljivostni pneumonitis). Večina glivnih alergenov je glikopeptidov z encimatsko aktivnostjo. Nahajajo se v sporah, hifah in fragmentih gliv, vendar se v procesu germinacije in rasti micelija izločijo v večjih količinah v okolje. Spore so torej pomemben faktor pri pojavu alergij. Ne-viabilne spore in glivni fragmenti kopičijo tudi nekatere druge potencialno škodljive spojine, kot npr. (1→3)- $\beta$ -D-glukane (komponenta celične stene večine gliv, nekaterih bakterij in veliko nižjih rastlin) in mikotoksine (WHO, 2009).

Mikotoksi so glivni toksini z relativno nizko molekulske maso, različnimi kemijskimi strukturami in funkcionalnimi skupinami, kot so sekundarni amini, hidroksilne ali fenolne skupine, laktami, karboksilne kisline, amini. Znano je, da zavirajo sintezo RNA in povzročajo poškodbe DNA, imajo antibiotične lastnosti (penicilin), karcinogene (aflatoksi) in imunotoksične. V plesnih prostorih težave povzročajo predvsem toksi vrst *Stachybotrys chartarum* in *Aspergillus versicolor* (makrociklični trihotekeni, trihodermin, sterigmatocistin, satratoksin), ni pa znano, ali je nivo mikotoksinov, prisotnih v zraku notranjega prostora, dovolj visok, da bi povzročal zdravstvene težave (WHO, 2009).

Glivne hlapne organske spojine, kot so alkoholi, aldehydi, ketoni, terpeni, estri, aromati, amino in žveplove spojine, se nabirajo v zraku notranjega prostora in so ravno tako lahko razlog za draženje dihalnih poti (v obliki kihanja, kašljanja) (WHO, 2009).

Veliko gliv se razmnožuje s proizvajanjem spor, v velikosti 2–10 µm, ki so dobro prilagojene na prenašanje po zraku. V 1 m<sup>3</sup> zunanjega zraka se lahko nahaja od 10<sup>2</sup>–10<sup>5</sup> spor, v 1 m<sup>3</sup> notranjega zraka pa nekaj do nekaj tisoč kolonijskih enot (CFU). V 1 g prahu se nahaja 10<sup>3</sup>–10<sup>7</sup> spor. Koncentracija gliv v zraku se spreminja in je odvisna od vremena in letnih časov, vrste glive, ventilacije in pa od konstrukcije, starosti ter uporabe stavbe (WHO, 2009).

Iz zdrobljenih glivnih spor ali hif nastajajo fragmenti gliv. Fragmenti, imenovani submikronski delci, so manjši od 1 µm, večji fragmenti gliv pa presegajo velikost 1 µm. Prenašajo se po zraku in prav tako izločajo barvila in ostale produkte in so tako potencialno škodljivi za človeka (WHO, 2009).

Na splošno so glive v primerjavi z bakterijami pogosteje prisotne v muzejih in vpletene v proces biodeterioracije, predvsem zaradi zmožnosti preživetja pri nizjih vodnih aktivnostih in uporabi vode v kondenzirani obliki (Tiano, 2002). Glede na analize muzejskih mikrobnih združb, se načeloma pojavljajo eni in isti glivni rodovi, kar kaže na obstoj neke »muzejske mikrobiote« (Kavkler in sod., 2014). V kolikor so pomembni okoljski parametri v muzeju ustrezni, kar pomeni, da vlaga ne presega 70 %, je glivna biodiverziteta po analizah študij omejena na le nekaj kserofilnih in kserotolerantnih rodov, kot so *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Wallemia*, itd.. Te glive spadajo med dominantne predstavnike muzejske mikrobiote. Kadar pa stopnja vlažnosti več tednov ali celo mesecev presega 70 %, se diverziteta gliv poveča tudi na manj kserofilne predstavnike (Sterflinger, 2010). Z uporabo negoitvenih metod, natančneje z DGGE, so detektirali predvsem glive iz reda *Pleosporales* in *Saccharomycetales* (Lopez-Miras in sod., 2013a).

## 2.4.2 Bakterije

Bakterije so ubikitarni enocelični prokarioti. Prav tako kot glive jih lahko najdemo v zraku in površinah vsake stavbe. Poleg že obstoječih bakterij v notranjem prostoru, nove vstopijo z zrakom, ljudmi, insekti (Jurado in sod., 2008; Trovão, 2013) in prinesenimi materiali. Bakterije, ki rastejo v notranjem prostoru, sicer lahko vplivajo na zdravje ljudi na primer s produkcijo endotoksinov po Gramu negativnih bakterij in lipopolisaharidov po Gramu pozitivnih bakterij, vendar to področje še ni dovolj dobro raziskano.

Kritični faktor za rast bakterij je voda, pri tem, da bakterije (tudi kserofilne) za svojo rast zahtevajo nekoliko višje vodne aktivnosti v primerjavi z glivami. Temperatura in hranila v notranjih prostorih bakterijam na splošno ne delajo bistvenih težav (WHO, 2009).

V povezavi s plesnijo v prostoru in hišnim prahom se velikokrat pojavljajo po Gramu pozitivne, sporulirajoče bakterije rodu *Streptomyces* (Actinobacteria). Producirajo več vrst metabolitov (npr. toksini). Problematične znajo biti tudi mikobakterije, ki so visoko imunogene. Koncentracija viabilnih bakterij variira med  $10^1$  in  $10^3$  CFU/m<sup>3</sup> (WHO, 2009).

Dominantni bakterijski sevi, izolirani z umetniških slik z gojitvenimi metodami, pripadajo deblom *Firmicutes* (po Gramu pozitivne bakterije, natančneje sporulirajoče bakterije, kot sta *Bacillus* sp., *Paenisporosarcina* sp., ...), *Actinobacteria* (po Gramu pozitivne, nesporulirajoče bakterije) in *Proteobacteria* (po Gramu negativne, nesporulirajoče bakterije, primer *Stenotrophomonas* sp.). Z negojitvenimi metodami, natančneje z DGGE, so doslej na umetniških slikah detektirali predvsem predstavnike debel *Actinobacteria* in *Proteobacteria* (Lopez-Miras in sod., 2013a, 2013b). Omenjene bakterije se prenašajo po zraku, s katerega popadajo na površino slike in jo kolonizirajo (Lopez-Miras in sod., 2013a, 2013b).

## 2.5 ANALIZA BIODETERIORACIJE UMETNIŠKIH SLIK

### 2.5.1 Detekcija in izolacija glivnih in bakterijskih sevov

Z gojitvenimi tehnikami lahko detektiramo le približno 1 % vseh bakterij in 70 % vseh gliv, prisotnih v okoljskih vzorcih (Sterflinger, 2010). Detekcija je otežena predvsem zaradi bogate biodiverzitete gliv in bakterij, ki se lahko pojavljajo v okoljskih vzorcih in morebitne nizke številčnosti vegetativnih celic, ki so lahko posledično pod mejo detekcije. Vplivata pa tudi izbira metode vzorčenja (destruktivna, nedestruktivna) in različne, včasih zelo specifične zahteve glede hranič ter načina gojenja (Roszak in Colwell, 1987; Pinzari in sod., 2009). Iz tega razloga se za detekcijo in izolacijo

mikrobne združbe, ki naseljuje umetniške slike, najbolj priporoča kombinacijo klasičnih gojitvenih in negojitvenih tehnik (Lopez-Miras in sod., 2013a; Amann, 1995; Anderson, 2003). S kombiniranjem teh dveh principov lahko dobimo veliko širši vpogled v sestavo mikrobne združbe. Pri detekciji bakterij na umetniških slikah na primer lahko povzročajo težave firmikuti in proteobakterije. Firmikute lažje detektiramo z gojitvenim pristopom, saj se na slikah večinoma pojavljajo v obliki spor, redkeje v obliki vegetativnih celic (Laiz in sod., 2003; Kavkler in sod., 2014), proteobakterije pa zaradi zmožnosti prestopa v viabilno, a negojojlivo obliko (VBNC) z negojitvenimi metodami lažje detektiramo.

Poleg tega je dobro poznati lastnosti in zahteve glede hrani in gojenja tistih mikroorganizmov, ki so značilni za določeno okolje in jih pričakujemo v vzorcu. Na umetniških oljnih slikah na platnu se pogosto pojavlja *Eurotium* sp., vendar je izolacija DNA ob prisotnosti konidijev namesto micelija lahko neuspešna (Schabereiter-Gurtner in sod., 2001; Machaeluz in sod., 2015).

Gojitvene metode za detekcijo in izolacijo gliv in bakterij z umetniških slik temeljijo na odvzetju mokrih ali suhih brisov vzorcev, ki jih v mikrobiološkem laboratoriju nanesemo na gojišča z različnimi lastnostmi in vodnimi aktivnostmi, z dodatkom antibiotika kloramfenikola za preprečevanje rasti bakterij ali cikloheksimida za preprečevanje rasti gliv.

Z negojitvenimi metodami lahko detektiramo mikroorganizme, za katere ne vemo, kakšne potrebe imajo glede hrani in pogojev gojenja, oz. jih iz kakršnega koli drugega razloga (npr. VBNC stanje) ne moremo vzgojiti na gojiščih. Negativna stran negojitvenih metod je, da v kolikor so mikroorganizmi v vzorcu prisotni na primer v obliki spor, jih ne moremo detektirati, prav tako pa ne moremo ločiti, ali pomnožena DNA izvira iz žive celice ali pa gre za prosto DNA mrtvega organizma (Lopez-Miras in sod., 2013b). Sestavo celotne mikrobne združbe lahko ugotovimo z uporabo denaturirajoče gradientne gelske elektroforeze (DGGE), ki temelji na izolaciji celokupne DNA iz vzorca in PCR pomnožkih gensko-specifičnih označevalcev (npr. bakterijska 16S rDNA in glivna ITS regija). V procesu elektroforeze DGGE se s pomočjo kemijskega gradiента denaturanta, ki vsebuje ureo in formaldehid, DNA različnih sevov preseje. Pri tem nastanejo različni fragmenti DNA, ki jih nato posekvenciramo (Lupan in Popescu, 2012; Lopez-Miras in sod., 2013a).

Druga negojitvena metoda, ki se uporablja za ugotavljanje sestave mikrobne združbe na površini objekta, je fluorescenčna *in-situ* hibridizacija (FISH). Metoda je nedestruktivna, kar je njena prednost. Pomanjkljivost uporabe DNA sond je, da v glivno celico zaradi rigidne celične stene težje vstopijo. Iz tega razloga jih vse bolj nadomešča uporaba sintetičnih peptidnih PNA (peptide nucleic acid) sond, ki zaradi nevtralnega naboja lažje vstopijo skozi celično steno in se lažje vežejo na negativno nabito tarčno DNA (Stender in sod., 2002; Teerstra in sod., 2004; Sterflinger, 2010).

Tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (angl. Next generation sequencing, NGS) omogočajo hitro in poceni sekvenciranje genomskih regij ali celotnega genoma, tudi bakterij v stanju VBNC, kar raziskovalci ocenjujejo kot obetavno tehniko tudi za detekcijo mikrobnega napada zgodovinskih predmetov (Escalante in sod., 2014). Bolje bi lahko razumeli interakcije med mikrobi ter mikrobi in zgodovinskimi materiali, njihova uporaba pa bi doprinesla tudi pri izvajanju monitoringa učinkov biocidov. Tehnologije NGS, kot sta SOLID, Ion-Torrent in druge, se med seboj sicer razlikujejo glede natančnosti, trajanja, obsega in principa sekvenciranja, pa tudi postopka priprave knjižnice. Tehnologija Ion-Torrent je ena izmed bolj razširjenih. Temelji na uporabi čipov, sestavljenih iz več milijonov vdolbin, v vsaki vdolbini je prostora za eno pomnoženo sekvenco iz knjižnice, pridobljeno z emulzijskim PCR. Vdolbine so prevlečene s plastjo, občutljivo za ione in ionskim senzorjem, ki zazna minimalne spremembe v voltih. Električni impulzi nastajajo zaradi ionov, izpuščenih med dodajanjem nukleotidov v procesu sekvenciranja s sintezo (Escalante in sod., 2014). V zadnjem času se v molekularnih študijah vedno več uporablja tudi molekularne metode, ki temeljijo na analizi molekul RNA, kot je uporaba kvantitativne reakcije s polimerazo (qPCR), s katerimi poleg prisotnosti in zastopanosti mikrobnih vrst lahko določimo tudi njihovo metabolno aktivnost. Znano je namreč, da raven molekul RNA v celici korelira s celično potrebo po sintezi proteinov za presnovo (Sterflinger, 2010).

### **2.5.2 Analiza poškodb celuloznih vlaken zaradi biodeterioracije in določitev biodeterioracijskega potenciala za izbrane seve**

Za seve, ki so izkazali biodeterioracijsko encimsko aktivnost, so ugotavljali biodegradacijski potencial na testnem vzorcu slike na platnu, ki simulira strukturo originalne slike, in je narejen s pomočjo stratigrafske analize prečnega prereza izvirne slike. Površino testne slike so inokulirali z želenim bakterijskim ali glivnim sevom, po inkubaciji pa so na podlagi poškodb, izmerjenih s Fourier transformacijsko infrardečo spektroskopijo (FTIR) ali vrstično elektronsko mikroskopijo in energijsko disperzijsko analizo rentgenskih x-žarkov (ESEM/EDX), določili biodegradacijski potencial. Na ta način so primerjali biodegradacijski potencial seva bakterije *Arthrobacter* sp. in glive *Penicillium* sp. (Lopez-Miras in sod., 2013a). Ugotovili so, da noben izmed teh dveh sevov v čisti kulturi ni zmožen povzročati kemijskih sprememb na materialih. Ko pa so ju inokulirali skupaj, sta delovala sinergistično in povzročila degradacijo, kar so zaznali s FTIR-om v obliki spremenjene lege signala na spektru. Prednost FTIR je zmožnost analize tako organskih kot tudi anorganskih materialov (Manso in Carvalho, 2009). Izboljšana verzija FTIR spektroskopije je micro-FTIR, učinkovita nedestruktivna površinska tehnika, ki ne zahteva predobdelave vzorca in omogoča identifikacijo mešanih spojin (Capodicasa in sod., 2010).

Analitični metodi, ki se uporabljata za kvalitativno analizo degradacije sintetičnih polimerov, sta infrardeča (IR) in Raman sprektroskopija. Učinkoviti sta pri ugotavljanju

razlik med nepoškodovanimi in biodegradiranimi umetnimi vlakni (Cappitelli in sod., 2005; Cappitelli in sod., 2005). Obstaja tudi foto-akustična IR spektroskopija, ki je uporabna pri študiju kompleksnih pigmentov, kot so na primer melanini (Cappitelli in sod., 2005).

### **2.5.3 Konzerviranje umetniških slik z namenom omejevanja glivne in bakterijske kontaminacije ter biodegradacije**

Z namenom preprečevanja in omejevanja poškodb ter uničenja materialov ali predmetov zaradi procesa biodeterioracije je priporočljivo, da muzeji v svojih prostorih kontrolirajo pogoje in konstantno zagotavljajo stabilne okoljske parametre v prostoru, še posebej vlažnost pod 65 % in temperaturo pod 18 °C v prostoru (Micheluz in sod., 2015).

Tako muzeji poleg biodeterioracije omejijo tudi mikrobeno obremenjenost zraka v notranjih prostorih, ter s tem kontaminacijo shranjenih predmetov. S tem zagotovijo tudi primerno okolje za muzejske delavce in obiskovalce, saj visoka koncentracija mikroorganizmov v zraku lahko povzroča zdravstvene težave (Micheluz in sod., 2015). Kontaminacija predmetov z glivami namreč s prenosom celic in spor po zraku, produkcijo hlapnih organskih spojin in z biodegradacijo materialov, vpliva tudi na kvaliteto zraka, s tem pa posledično na zdravje ljudi. Zdravstvene težave, povezane s plesnimi, se najpogosteje pokažejo v obliki pojavov alergij in astme ter respiratornih simptomov, kot so kašljanje, kihanje in smrkanje (WHO, 2009; Kavkler in sod., 2014). Veliko novejših muzejev je zato opremljenih s filtrirnimi sistemi (filtri HEPA) znotraj klimatskih naprav, z namenom preprečitve invazije glivnih spor, ki se prenašajo ravno s tokom in izmenjavo zraka, ter delcev umazanije.

Znano je, da plasti prahu na predmetih vsebujejo visoko število spor gliv in bakterij ter hranil za njihovo preživetje, zato je enostavno čiščenje prostorov, vključno z brisanjem prahu, bistvenega pomena (Sterflinger in Piňar, 2013).

Ena izmed možnih fizičnih metod uničevanja gliv na shranjenih predmetih je uporaba gama žarkov. Pomanjkljivost te metode je, da gama žarki negativno vplivajo na kemijsko zgradbo celuloze, zato mora biti njihova uporaba premišljena, predvsem na slikah na platnu. Prav tako je, tudi zaradi negativnih učinkov na zdravje človeka, potrebno paziti pri uporabi različnih kemičnih dezinfektantov, kot so formaldehid, amonij, peroksidi, glutaraldehid, izotiazolin, etilen oksid, metilbromid, etilbromid in težke kovine. V zadnjih nekaj letih se zaradi svojih protimikrobnih lastnosti uporablajo predvsem nanodelci srebra (Sterflinger, 2010; Gutarowska in sod., 2011). Zelo razširjena je tudi uporaba fenolov in 70 % etanola, ki ima učinek na glice le, če je čas izpostavljenosti etanolu daljši od 2–3 minut. Pri izbiri metode za zatiranje plesni in bakterij je treba poznati materialne karakteristike predmeta in naravo čistila (Sterflinger, 2010).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

Navedeni so vsi uporabljeni materiali, kot so gojišča, raztopine ter laboratorijska oprema.

##### 3.1.1 Gojišča

Pri pripravi gojišč smo v erlenmajerico ali čašo natehtali sestavine po receptu, z izjemo agarja. Dodali smo polovičen volumen vode. Vsebino erlenmajerice smo nato premešali na mešalu (ob prisotnosti mešalnega magneta). S pH metrom smo izmerili pH in ga po potrebi uravnali s 1 M HCl ali 1 M NaOH ter umerili gojišče na končni volumen. Nato smo dodali agar, znova premešali in gojišče sterilizirali v avtoklavu. Sterilizacija je potekala 15 min pri temperaturi 121 °C. Gojišče smo nato ohladili v vodni kopeli do temperature, ki znaša približno 55 °C in ga aseptično razlili v sterilne prazne petrijevke. Pri gojiščih, ki vsebujejo višjo vsebnost soli ali sladkorja, smo topljenec dodajali postopoma v manjših količinah in ga raztopljal na mešalu s hkratnim mešanjem in segrevanjem.

Za izolacijo mikroorganizmov smo uporabili v nadaljevanju navedena gojišča. V namen izolacije gliv smo v vsa gojišča pred avtoklaviranjem dodali 50 mg/l antibiotika kloramfenikola, v namen izolacije bakterij pa smo po avtoklavirajujočem gojišču dodali 1 ml/l sterilno prefiltrirane raztopine antibiotika cikloheksimida (koncentracije 50 g/l). Glivni gojišči DRBC ( $a_w$  0,997) in DG18 ( $a_w$  0,955) smo pripravili iz predpripravljenih mešanic po recepturah.

Gojišča za izolacijo gliv, navedena v nadaljevanju, smo pripravili po sledečih receptih:

##### MY10-12 (Agar iz sladnega in kvasnega ekstrakta z 10 % soli in 12 % glukoze) ( $a_w$ 0,93) (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

**MY50G (Agar iz sladnega ekstrakta s 50 % glukoze) ( $a_w$  0,89) (Pitt in Hocking, 2009)**

Glukoza	500 g
Sladni ekstrakt (Difco)	10 g
Kvasni ekstrakt (Oxoid)	2,5 g
Agar (Merck)	10 g
Destilirana voda	do 500 ml
pH = 5,3	

Za izolacijo bakterij smo uporabili naslednja gojišča s pripisanimi recepturami:

**HA (Hranilni Agar)**

Hranilni bujon	8 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 ml

**HA s 5 % NaCl**

K 1000 ml osnovnega gojišča HA dodamo pred avtoklaviranjem 50 g NaCl.

**MINIMALNO GOJIŠČE M9 (La Vallie in sod., 2000)**

**Makroelementi:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NaCl	5 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
Voda Milli-Q	do 1000 ml
pH 7,4	

**1 M raztopina MgSO<sub>4</sub>:**

MgSO <sub>4</sub> (1 M)	12,04 g
Voda Milli-Q	do 100 ml

### 1 M raztopina CaCl<sub>2</sub>

CaCl <sub>2</sub> (1 M)	11,1 g
Voda Milli-Q	do 100 ml

### 5 mM raztopina FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O:

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (5 mM)	139 mg
Voda Milli-Q	do 100 ml

### Mikroelementi:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	371 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (400 mM)	2,473 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (30 mM)	714 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O (10 mM)	250 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O (80 mM)	1,583 g
ZnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (10 mM)	288 mg
Voda Milli-Q	do 100 ml

### Raztopina 40-odstotne glukoze:

Sterilna glukoza (40 %)	40 g
Voda Milli-Q	do 100 ml

### Priprava gojišča M9:

V erlenmajerico smo odpipetirali 100 ml raztopine makroelementov in 200 ml vode Milli-Q. V drugo erlenmajerico smo zatehtali 15 g agarja in dodali 693 ml vode Milli-Q. Sterilizirali smo z avtoklaviranjem, po avtoklaviranju smo obe raztopini takoj zmešali skupaj. Nato smo gojišče ohladili na 55 °C in mu dodali še:

Mikroelementi	1 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 mM)	100 µl
FeSO <sub>4</sub> (5 mM)	200 µl

Vse raztopine in mikroelemente smo avtoklavirali s filtracijo.

Za gojenje glivnih izolatov smo uporabili trdni gojišči DG18 in MY50G ter tekoče gojišče za izolacijo glivne DNA, za bakterije pa HA.

#### **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

#### **Tekoče gojišče za izolacijo glivne DNA z 18 % glicerola**

K 200 ml osnovnega tekočega gojišča za izolacijo glivne DNA dodamo 36 g glicerola.

Za makromorfološko in mikromorfološko identifikacijo gliv smo uporabili gojišče DG18 in naslednja gojišča:

#### **CYA (Agar po Czapeku s kvasnim ekstraktom) (a<sub>w</sub> 0,99)**

Czapek koncentrat	17,5 ml
Raztopina kovin v sledovih	1 ml
Kvasni ekstrakt	2,5 g
Agar	7,5 g
Destilirana voda	500 ml
pH = 7	

#### **Koncentrat po Czapeku**

Saharoza	15 g
NaNO <sub>3</sub>	1,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (5mM)	0,005 g

#### **CY40 (Agar s Czapek koncentratom in kvasnim ekstraktom ter 40 % saharoze)**

K 500 ml osnovnega gojišča CYA dodamo 185 g saharoze.

#### **M40 (Agar s sladnim ekstraktom in 40 % saharoze)**

Osnovnemu gojišču MEA smo dodali 400 g saharoze.

### **CREA (Agar s kreatiom in saharozo)**

Kreatin	1,5 g
Saharoza	15 g
Bromkrezol vijolično (1 %)	2,5 g
Agar	7,5 g
Mineralna raztopina	10 ml
Raztopina kovin v sledovih	1 ml
Destilirana voda	500 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,79 g
pH = 8	

Za ugotavljanje rasti na gojiščih z različno vodno aktivnostjo smo uporabili gojišče MY50G in naslednja gojišča:

### **MEA (Agar iz sladnega ekstrakta) (Pitt in Hocking, 2009) ( $a_w$ 0,998) (Gams s sod., 1998)**

Sladni ekstrakt (Dicfo)	20 g
Pepton (Merck)	1 g
Glukoza (Kemika)	20 g
Agar (Merck)	20 g
Destilirana voda	do 1000 ml
pH = 5,6	

### **MEA + 10 oz. 30 % NaCl ( $a_w$ 0,935 oz. 0,756) (Pitt in Hocking, 2009)**

Osnovnemu gojišču MEA dodamo 100 g oziroma 300 g NaCl.

### **MEA + 35 % glukoze ( $a_w$ 0,957)**

Osnovnemu MEA gojišču dodamo 350 g glukoze.

### **MY70GF (Malt Yeast extract 70 % Glucose/Fructose) ( $a_w$ 0,76) (Pitt in Hocking, 2009)**

Sladni ekstrakt (Dicfo)	6 g
Kvasni ekstrakt (Oxoid)	1,5 g
Agar (Merck)	6 g
Destilirana voda	do 300 ml
Glukoza (Kemika)	350 g
Fruktoza (Kemika)	350 g

### 3.1.2 Raztopine

#### CTAB

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	

#### TE

Tris	0,12 g
Na-EDTA	0,04 g
Bidestilirana voda	do 100 ml
pH = 8	

#### 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

#### 5x nanašalni pufer

Bromtimol modro	0,25 g
Ksilen cianol	0,25 g
Glicerol	30 ml
Destilirana voda	do 100 ml

#### SSS (Raztopina za pripravo suspenzije spor)

Tween 80	0,5 g
Agar	0,5 g
Destilirana voda	do 1000 ml

#### Mešanica silika gela

Silika gel	30 g
Celit	15 g

**30 % raztopina glukoze**

Glukoza	300 g
Destilirana voda	do 1000 ml

**70 % etanol**

Etanol	700 g
Destilirana voda	do 1000 ml

**Anilinsko modriло v mlečni kislini**

Mlečna kislina	20 g
Glicerol	40 g
Destilirana voda	20 ml
Anilinsko modriло	noževa konica

### 3.1.3 Komercialni kompleti in reagenti

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje komercialne komplete in reagente:

- PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent, Life Technologies, ZDA
- Power SYBR Green PCR Master Mix, Life Technologies, ZDA
- GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit, Thermo Fisher Scientific, ZDA.

### 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 (Malt extract)	Oxoid, Anglija
Glukoza (D-glukoza)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
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"	Fermentas. Life Sciences, Litva
Lestvica fragm. DNA: "1 kbp DNA Ladder Plus"	Fermentas. Life Sciences, Litva
polimeraza Taq (5U/µl)	Fermentas. Life Sciences, Litva
Mešanica reagentov za PCR	Fermentas. Life Sciences, Litva
CTAB	Sigma Aldrich, Nemčija
HCl	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Kloroform	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Kloramfenikol	Sigma Aldrich, Nemčija
Glicerol	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Silikagel	Merck, Darmstadt, Nemčija
Celit	Merck, Darmstadt, Nemčija
Tween 80	ICI Americas, Inc., Wilmington, ZDA
Ksilen cianol	Sigma Aldrich, Nemčija
Ocetna kislina	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Na-EDTA	Merck, Darmstadt, Nemčija
DG18	Merck, Darmstadt, Nemčija
DRBC	Oxoid, Anglija
cikloheksimid	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA
kloramfenikol	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA
saharoza	Acros Organics, new Jersey, ZDA
bromkrezol vijolično	Sigma Aldrich, Nemčija
kvasni ekstrakt	Oxoid, Anglija
fruktoza	Kemika, Zagreb, Hrvatska
glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvatska
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, Hrvatska
Centrifuga	Eppendorf, Nemčija
Vakuumska črpalka	ASF Thomas ,Nemčija
Digestorij Variolab Molibien W90	Waldner, Nemčija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Japonska
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	Tehnica, 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
Tehnica ET-1111	Tehnica, 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

##### Vzorčeni predmeti

V depoju Restavratorskega centra (RC) Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije, nahajajočega se na Poljanski cesti 40 v Ljubljani, smo vzorčili 8 umetniških oljnih slik na platnu (RCS 15, RCS 20, RCS 21, RCS 22, RCS 23, RCS 24, RCS 25, RCS 26). Informacije o slikah so podane v Preglednici 3. Slike za vzorčenje, kot tudi mesta vzorčenja, smo izbrali glede na vidne poškodbe na površini sprednjega oz. hrbtnega dela slik, kot so razbarvanje, obarvanje, razrasle miceliju podobne strukture.

Preglednica 3: Seznam proučevanih oljnih slik s podatki.

Oznaka vzorca	Ime slike; avtor; datacija	Mere; izvor; mesto hrambe
RCS 15	»3. prizor iz življenja sv. Frančiška«; neznan avtor; 18. st.	V: 220 cm/ Š: 210 cm; izvor in hramba: RKC-Kapela sv. Frančiška v Cerkvi sv. Jakoba v Ljubljani, nato RC
RCS 20	»Marijina zaroka«; neznan avtor in datacija	V: 238,5 cm/ Š: 149,5 cm/ G 5,5 cm; izvor: Župnijski urad Idrija; hramba: Narodna galerija, od l. 2010 RC
RCS 21	»Sv. Janez Nepomuk«; neznan avtor, 18. st.	V: 201 cm/ Š: 133 cm/ G: 6 cm; izvor: Kapucinski samostan sv. Frančiška Ajdovščina; hramba: Narodna galerija, od l. 2010 RC
RCS 22	»Rožnovenska Mati Božja«; neznan avtor, 17. st.	V: 179,5 cm/ Š: 129 cm/ G 5 cm; izvor: Kapucinski samostan sv. Frančiška Ajdovščina; hramba: Narodna galerija, od l. 2010 RC
RCS 23	»Sv. Barbara in sv. Ahac s svetniki«; neznan avtor in datacija	V: 316,5 cm/ Š: 160,5 cm/ G: 6,5 cm; izvor: Župnijski urad Idrija; hramba: Narodna galerija, od l. 2010 RC
RCS 24	»Čaščenje sv. Križa«; Matej Ingoli, neznana datacija	V: 327 cm/ Š: 160 cm; izvor: Stoljni župnijski urad Marijinega vnebovzetja Izola; hramba: Narodna galerija, od l. 2010 RS
RCS 25	»5. prizor (iz življenja sv. Frančiška)«; neznan avtor in datacija	mere neznane; izvor: RKC; hramba: Kapela sv. Frančiška (Cerkev sv. Jakoba Ljubljana), nato RC
RCS 26	»2. prizor (iz življenja sv. Frančiška)«; neznan avtor in datacija	mere neznane; izvor: RKC; hramba: Kapela sv. Frančiška (Cerkev sv. Jakoba Ljubljana), nato RC

Legenda: (V) višina; (Š) širina; (G) globina; (l.) leto; (RKC) Rimskokatoliška cerkev, (RC) Restavratorski center.

## Odvzeti vzorci

Odvzeli smo naslednje vzorce: odtis z lepilnim trakom za direktno opazovanje pod mikroskopom in bris z vatenko, omočeno v fiziološko raztopino (0,9 % raztopina NaCl), za nanos na gojišča za izolacijo. Poškodbe smo dokumentirali s fotoparatom Olympus ter USB digitalno mikroskopsko kamero Dino-Lite Pro.

**Odtis z lepilnim trakom** smo izvedli tako, da smo odrezali 6–7 cm lepilnega traku, ki smo ga zvili tako, da je lepljiva stran gledala navzven in zlepili en konec lepilnega traku z drugim. Z lepljivo stranjo smo lepilni trak nežno prislonili na kontaminiran del slike, in ga shranili v prazno petrijevko. Mikroskopske preparate smo v laboratoriju pripravili tako, da smo na objektno steklo kanili kapljico barvila anilinsko modrilo v mlečni kislini, ki obarva citoplazmo glivnih celic. Približno 1 cm<sup>2</sup> odtisnjenega lepilnega traku smo namestili v kapljico barvila, dodali še eno kapljico barvila in preparat pokrili s krovnim stekлом. Preparat smo pogledali z optičnim mikroskopom, opremljenim z optiko za diferencialno interferenčno mikroskopijo (DIC) pri povečavah 100x in 400x.

**Brise slik** smo odvzeli s sterilno vatenko, pomočeno v fiziološko raztopino (0,9 % [w/v] NaCl), s cca. 2 cm<sup>2</sup> površine. Brise smo takoj po vzorčenju odnesli v laboratorij in jih do nacepitve na izbrana gojišča shranili pri 4 °C.

Brise smo v laboratoriju nanesli na agarna gojišča za izolacijo v naslednjem vrstnem redu: **(1)** DRBC + Ch, **(2)** DG18 + Ch, **(3)** MY10-12 + Ch, **(4)** MY50G + Ch, **(5)** M9 + Cy, **(6)** HA + Cy, **(7)** HA + 5 % NaCl + Cy. Prva 4 so namenjena izolaciji plesni, zadnja 3 pa bakterij.

Z izbrane slike (RCS 15) smo s pomočjo vatenke pobrali pajčevino in bris prav tako nanesli na zgoraj omenjena gojišča.

**Odvzem materiala za metagenomsko analizo:** S slike RCS 22 smo s sterilno pinceto in skalpelom odvzeli material za izolacijo celotne DNA, in sicer: nit iz desnega spodnjega kota, nit z barvo iz sredine slike (masa skupaj: 0,108 g). Na navedenih mestih in dodatno še na zadnjem delu slike v desnem spodnjem kotu smo odvzeli tudi brise. Material smo do izolacije DNA shranili v mikrocetrifugirkah pri –80 °C.

**Vzorčenje stene:** Z vatenko smo odvzeli tudi bris z ene izmed sten, ki je bila kontaminirana. Bris smo prav tako nanesli na zgoraj omenjena gojišča, v enakem vrstnem redu.

**Zračna analiza:** V namen pridobitve podatkov o prisotnosti glivnih skupin še v zraku smo v prostoru vzorčenja pred in po vzorčenju slik opravili analizo zraka z vzorčevalnikom zraka SAS Super Iso 100 (Bioscience International), in sicer smo na

gojišča za izolacijo gliv (z izjemo MY50G in HA) prefiltrirali po 100 l zraka. Za primerjavo smo enako analizo opravili še v predprostoru.

### **Gojenje**

Nacepljena gojišča smo ovili s parafilmom in inkubirali pri temperaturi 25 °C. Rast kolonij smo spremljali vsak teden do 4 tedne in jo dokumentirali s fotoaparatom. Iz posamezne plošče smo izbrali različne morfologije kolonij in jih osamili v čisti kulturi na gojišču DG18 (glive) oziroma HA ali HA + 5 % NaCl (bakterije).

Plošče smo zavili s parafilmom ter inkubirali 1–2 tedna pri temperaturi 25 °C.

Čiste kulture gliv smo nacepili na poševno gojišče DG18 in MEA. Poševnike smo inkubirali 1–2 tedna pri temperaturi 25 °C, nato smo jih prestavili v zbirkovo Ex, ki je del Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRIC UL), deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Čiste kulture bakterij smo tudi shranili v zgoraj omenjeno zbirkovo Ex, v kriovialah sistema Microbank (Pro-Lab Diagnostic, VB) smo jih zamrznili pri –80 °C.

#### **3.2.2 Izolacija glivne DNA**

Glivno DNA smo izolirali iz čistih kultur sevov, vzgojenih na agarnem gojišču DG18 ali v tekočem gojišču za izolacijo glivne DNA.

Uporabili smo postopek izolacije DNA z mehansko lizo (Gerrits van der Ende in de Hoog, 1999). V sterilno 2 ml mikrocentrifugirko po Eppendorfu smo dodali prav tako sterilno mešanico silika gela/celita (razmerje 2:1), kovinsko kroglico ter 0,5 ml pufra CTAB. Nato smo vanjo s sterilno spatulo prenesli micelij, zrasel na površini tekočega gojišča ali pa 1 cm<sup>2</sup> micelija, vzgojenega na agarnem gojišču. Micelij smo strli s homogenizatorjem Mixer Mill MM 400 (Retsch, Nemčija), in sicer 1 minuto pri 30 obratih na sekundo. Homogenizat smo nato približno 30 minut inkubirali pri temperaturi 65 °C. Po inkubaciji smo v digestoriju v mikrocentrifugirko dodali 500 µl kloroform za precipitacijo proteinov. Mikrocentrifugirko z dodanim kloroformom smo 1–2 sekundi mešali na vibracijskem mešalu, nato centrifugirali 5 minut pri 16.873 × g in sobni temperaturi. Supernatant (vodna faza) smo odpipetirali v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko, mu dodali 500 µl kloroform, premešali na mešalu in centrifugirali 5 min pri 20.000 × g in sobni temperaturi. Supernatant smo prenesli v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko, mu dodali 800 µl ledenega 96 % etanola, ročno premešali in jo inkubirali pri –20 °C čez noč. Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje 5 minut pri 20.000 × g in sobni temperaturi, nato smo odstranili supernatant in pelet sprali s 500 µl 70 % etanola. Znova smo centrifugirali pri enakih pogojih, previdno odstranili etanol ter pelet

sušili na zraku pri 37 °C 10 minut. Nato smo pelet resuspendirali v 50 µl pufra TE, inkubirali 5–10 minut pri 37 °C, da se je raztopil ter vzorce shranili pri –20 °C do uporabe.

### 3.2.3 Izolacija bakterijske DNA

V sterilno 2 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali 60 µl komercialnega reagenta PrepMan® Ultra Sample Preparation. S sterilno ezo smo z gojišča postrgali bakterijsko kolonijo, jo dodali v mikrocentrifugirko in kuhalo 10 minut pri 100 °C. Mikrocentrifugirko smo nato centrifugirali 5 minut pri 16.873 × g in sobni temperaturi. Supernatant smo odpipetirali v sterilno 1,5 ml centrifugirko in nadaljevali s čiščenjem izolirane bakterijske DNA s pomočjo komercialnega kompleta reagentov Gene JET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit. Čiščenje smo izvedli po navodilih proizvajalca. Mikrocentrifugirko z izolirano in očiščeno DNA pa shranili pri temperaturi –20 °C.

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

Koncentracijo izolirane glivne DNA smo pred izvedbo verižne reakcije s polimerazo pomerili s spektrofotometrom NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, ZDA), ki je pokazal, da je koncentracija izolirane DNA med 500 in 600 ng/µl. DNA smo zato 10x redčili s pufrom TE.

Za identifikacijo gliv smo z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili nukleotidno zaporedje molekularnega označevalca za glive, regijo ITS rDNA (ITS 1 in ITS 2 ter vključujočo 5,8S rDNA) z oligonukleotidnimi začetniki ITS4 in ITS5. Izbranim sevom rodov *Aspergillus* in *Penicillium* smo nato za natančnejšo identifikacijo do ravni vrste pomnožili še nukleotidna zaporedja gena za beta-tubulin (oligonukleotidna začetnika BT2a in BT2b) in gena za kalmodulin (oligonukleotidna začetnika CMD5 in CMD6). V Preglednici 4 so navedena zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

IME	ZAPOREDJE 5' --> 3'	AVTOR
<b>ITS4</b>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(White in sod., 1990)
<b>ITS5</b>	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	(White in sod., 1990)
<b>BT2A</b>	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	(Glas in Donaldson, 1995)
<b>BT2B</b>	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	(Glas in Donaldson, 1995)
<b>CMD5</b>	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	(Hong in sod., 2006)
<b>CMD6</b>	CCGATAGAGGTATAACGTGG	(Hong in sod., 2006)
<b>27F</b>	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	(Frank in sod., 2008)
<b>1492R</b>	TAC CTT GTT ACG ACT T GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	(Frank in sod., 2008)

Reakcije PCR smo izvedli v 0,2 ml mikrocentrifugirkah. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 34 µl mešanice PCR (Preglednica 5) in 1 µl matrične DNA. Za negativno kontrolo smo namesto matrične DNA dodali vodo Milli-Q. Reakcijsko mešanico smo nato dali v aparaturo za PCR in pomnožili tarčno DNA po programih, navedenih v Preglednici 6.

Preglednica 5: Mešanica PCR za 1 reakcijo pomnoževanja glivne DNA.

<b>Reagent</b>	<b>Volumen</b>
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 6: Programi pomnoževanja glivne DNA glede na različne oligonukleotidne začetnike.

<b>Faza pomnoževanja</b>	<b>Program pomnoževanja</b>		
	<b>ITS4/ ITS5</b>		
Začetna denaturacija		95 °C, 2 min	
Št. ciklov		30x	
Denaturacija		95 °C, 45 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov		52 °C, 30 s	
Elongacija		72 °C, 120 s	
Končna elongacija		72 °C, 4 min	
	<b>BT2a/ BT2b</b>		
Začetna denaturacija		95 °C, 2 min	
Št. ciklov		35x	
Denaturacija		95 °C, 45 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov		55 °C, 45 s	
Elongacija		72 °C, 90 s	
Končna elongacija		72 °C, 4 min	
	<b>CMD5/ CMD6</b>		
Začetna denaturacija			
Št. ciklov	5x	35x	
Denaturacija	94 °C, 60 s	94 °C, 60 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov	58 °C, 45 s	52 °C, 45 s	
Elongacija	72 °C, 90 s	72 °C, 90 s	
Končna elongacija			

Po pomnoževanju smo prisotnost in dolžino fragmentov preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili iz 1 % agaroze v 1x pufru TAE. Rahlo ohlajenemu, a še tekočemu gelu smo dodali barvilo SYBR Safe (na 10 ml gela dodamo 1 µl barvila), ki obarva DNA fragmente in ga vlili v nosilec. V strjen gel smo kot standard dodali 2 µl lestvice DNA fragmentov znanih velikosti (Gene Ladder 100, Fermentas; 0,1–2 kbp) in posamezne vzorce pomnožene DNA, ki so bili sestavljeni iz 4 µl produkta PCR in 2 µl 5x nanašalnega pufra. Elektroforeza je potekala v 1x pufru TAE pri napetosti 100 V, 20 minut. Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV-transluminatorjem in ga fotografirali z računalniškim programom GeneSnap. Velikost pomnožene DNA smo določili primerjalno s fragmenti DNA znanih velikosti.

### 3.2.5 Pomnoževanje bakterijske DNA

Bakterijsko 16S rDNA smo pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma 27F in 1492r (Preglednica 4). Pomnoževanje bakterijske DNA smo izvedli po enakem principu kot pomnoževanje glivne DNA, s to razliko, da smo v PCR mešanico dodali 0,5 µl matrične DNA, 34,5 µl mešanice pa so sestavljali reagenti. Priprava in potek agarozne gelske elektroforeze sta enaka kot za glivno DNA.

Preglednica 7: Mešanica PCR za 1 reakcijo pomnoževanja bakterijske DNA.

<b>Reagent</b>	<b>Volumen</b>
Pufer za Taq polimerazo z MgCl <sub>2</sub> (10x)	3,5 µl
dNTP (AB) (10 mM)	0,35 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	0,35 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	0,35 µl
Voda Milli-Q	29,86 µl
Polimeraza Dream Taq (5 U/µl)	0,09 µl
Matrična DNA	0,5 µl
<b>Skupaj</b>	<b>35 µl</b>

Preglednica 8: Program pomnoževanja bakterijske DNA.

Faza pomnoževanja	Program pomnoževanja (27F/1492r)		
Začetna denaturacija	95 °C, 5 min		
Št. ciklov	5x	5x	30x
Denaturacija	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	60 °C, 30 s	55 °C, 30 s	50 °C, 30 s
Elongacija	72 °C, 60 s	72 °C, 60 s	72 °C, 60 s
Končna elongacija			72 °C, 7 min

### 3.2.6 Anotacija nukleotidnega zaporedja glivne DNA

Uspele pomnožke PCR smo poslali na določevanje nukleotidnega zaporedja v podjetje Microsynth. Kvaliteto pridobljenih nukleotidnih zaporedij v obliki elektroferograma smo nato preverili v računalniškem programu FinchTV. S pomočjo spletnega programa BLAST (NCBI) smo v spletni bazi podatkov GeneBank (NCBI) poiskali najSORODNEJŠA zaporedja (Samson in sod., 2014).

Nukleotidna zaporedja smo vnesli in poravnali z računalniškim programom MEGA6, kjer smo nato tudi izrisali filogenetska drevesa na podlagi metode združevanja najbližnjega soseda (angl. Neighbor Joining Tree) in tako identificirali glive.

### 3.2.7 Anotacija nukleotidnega zaporedja bakterijske DNA

Nukleotidno zaporednje uspelih bakterijskih pomnožkov PCR so prav tako določili v podjetju Microsynth. Kvaliteto pridobljenih nukleotidnih zaporedij v obliki elektroferograma smo nato preverili v računalniškem programu FinchTV. S spletno bazo Ribosomal database project II (RDP) smo na podlagi odstotka ujemanja, pogostosti pojavljanja določene vrste in informacij o izolaciji identificirali naš sev.

### 3.2.8 Metagenomska analiza vzorca RCS 22

Iz izolirane DNA vzorca RCS 22 so v podjetju OMEGA d.o.o. Ljubljana pridobili dele pomnožkov 16S rDNA za bakterijski (Ion 16S Metagenomics Kit, Thermo Fischer Scientific) in ITS2 (oligonukleotidni začetniki ITS1f in fITS7 po Ihrmark s sod., 2012) za glivni metagenom s tehnologijo Ion Torrent (Ion Plus Fragment Library Kit, Life Technologies). Metagenomsko analizo bakterijske diverzitete smo izvedli s programom QIIME v okviru 16S Metagenomics Workflow in na podlagi primerjave s podatkovnimi zbirkami GreenGenes in MicroSeq ID 16S (Ion Reporter™ Software). Metagenomsko

analizo glivne diverzitete smo izvedli programom QIIME in uporabo algoritma "open\_reference", ki zaporedja združuje v grozde/gruče na podlagi zbirke referenčnih zaporedij Unite.

### **3.2.9 Taksonomska uvrstitev glivnih izolatov s pomočjo morfoloških in molekularnih tehnik**

Na podlagi filogenetskih analiz smo iz vsake večje skupine gliv izbrali po enega pripadnika in ga morfološko opredelili. Izbor sevov je naveden v Preglednici 9.

Preglednica 9: Izbrani sevi za nadaljne morfološke in fizikalno-kemijske preiskave.

SEV	EXF ŠT.	VZOREC
<i>A. penicillioides</i>	10425	RCS 24B
<i>A. penicillioides</i> sp. 1	10431	RCS 25C
<i>A. penicillioides</i> sp. 2	10353	RCS 24A
<i>A. penicillioides</i> sp. 3	10401	RCS 22C
<i>A. vitricola</i>	10378	RCS 21A
<i>A. restrictus</i> sp. 2	10379	RCS 22A
<i>A. versicolor</i>	10409	RCS 15C

Izbrane seve smo tri-točkovno nacepili na izbrana gojišča CYA (2x), CY40, DG18, M40 in CREA.

Nacepljena gojišča smo oblepili s parafilmom in jih inkubirali pri 25 °C, z izjemo enega CYA gojišča, ki smo ga inkubirali pri 37 °C (Samson in sod., 2014). Po tednu in dveh smo plošče fotografirali, izmerili premer kolonij in kolonije morfološko opisali (barva micelija, barva konidijev, reverz, eksudat). Za mikromorfološko analizo smo s plošče, na kateri je sev najhitreje in najbolj sporuliral (uporaba stereomikroskopa), pripravili mikroskopski preparat, in sicer v 60 % mlečni kislini po spiranju s 70 % etanolom. Preparate smo pregledali pod svetlobnim mikroskopom (uporaba tehnike diferencialnega interferenčnega kontrasta), pri 100x, 400x in 1000x povečavi, pri čemer smo merili predvsem dolžino in širino konidioforjev, dolžino in širino veziklov, metul, fialid, konidijev, opredelili smo površino konidijev, število fialid na metulah in obarvanost struktur (Samson in sod., 2014). Merjenje struktur pod mikroskopom smo izvajali s pomočjo računalniškega programa Cell Sens (Olympus).

### **3.2.10 Določevanje optimalnih in mejnih fizikalno-kemijskih pogojev**

Sevom, navedenim v Preglednici 9, smo določili optimalne in mejne fizikalno-kemijske pogoje (temperatura, vodna aktivnost). Seve smo tri-točkovno nacepili na gojišča z različno vodno aktivnostjo: MEA, MEA s 35 % glukoze, MEA z 10 % NaCl, MEA s 30 % NaCl, MY50G in MY50GF.

Plošče, zlepiljene s parafilmom, smo gojili pri temperaturi 25 °C. Za določitev rasti pri temperaturi 37 °C smo uporabili CYA gojišče.

Po tednu in dveh inkubacije smo izmerili premer kolonij in pod stereomikroskopom določili, ali sev na posameznem gojišču sporulira.

### **3.2.11 Testiranje učinkovitosti aplikacije 70 % etanola in izpostavljenosti dušikovi atmosferi za uničevanje izbranih izolatov**

Sporam izolatov, navedenih v Preglednici 9, smo preverili občutljivost na 70 % etanol ter na N<sub>2</sub> v odvisnosti od časa izpostavitve.

Delo je potekalo v aseptičnih pogojih- v laminariju, ob gorilniku, vsa oprema je bila sterilna. Kulturo na poševniku smo zalili z 10 ml 35 % raztopine glukoze z 0,01 % detergenta Tween in s sterilno ezo drgnili po gojišču, da se je v raztopino razpustilo čim več spor. Vsebino smo prelili čez lij s fino staničevino iz rajonsko-poliestrskeh vlaken z akrilnim vezivom, velikosti por 22–25 µm (Miracloth 475855, Cal Biochem), s čimer smo selektivno sfiltrirali spore in se znebili večjih delcev micelija. Staničevino smo zavrgli, v erlenmajerico pa smo dodali še 10 ml 35 % raztopine glukoze, jo zaprli in stresli, da so se spore razpustile in ločile iz morebitnih skupkov. Pod mikroskopom smo prešteli glivne spore v Neubauer-jevi komori in preračunali število spor v enem mililitru raztopine.

Suspenzijo spor smo nato v erlenmajerici redčili do končne koncentracije celic 10<sup>3</sup> in 10<sup>2</sup> celic na mililiter.

### 3.2.11.1 Test inkubacije v dušikovi atmosferi

Za en sev smo porabili 10 (5 filterov za redčitev  $10^3$  in 5 za redčitev  $10^2$  celic/ml) ALBET filterov v velikosti 7 cm. Po en filter smo ob gorilniku s sterilno pinceto položili v prazno petrijevko in jo ustrezno označili. V laminariju smo nato na vsak filter enakovorno odpipetirali po 0,5 ml ustrezno redčene suspenzije spor.

- Prvi filter je služil kot pozitivna kontrola. Tako po navlažitvi s suspenzijo spor smo ga v laminariju posušili na zraku.
- Drugi filter smo inkubirali v  $N_2$  atmosferi dva tedna.
- Tretji filter je služil kot kontrola drugemu filtru, in sicer smo ga dva tedna inkubirali na zraku pri temperaturi  $25^\circ C$ .
- Četrти filter smo inkubirali v  $N_2$  atmosferi en mesec.
- Peti filter je služil kot kontrola četrtemu filtru in smo ga inkubirali en mesec na zraku, pri temperaturi  $25^\circ C$ .

Dušikovo atmosfero smo vzpostavili tako, da smo anaerobni lonec prepihali z  $N_2$ .

Filtre smo po inkubaciji odtisnili na gojišče DG18, inkubirali pri temperaturi  $25^\circ C$ , nato pa prešteli število kolonij, ki so se razvile iz preživelih spor.

### 3.2.11.2 Test tretiranja s 70 % etanolom:

Preverjali smo preživelost spor po tretiranju s 70 % etanolom za 1 minuto, 5 minut in 10 minut.

Ob gorilniku smo sestavili sterilen filtrirni sistem in ga povezali z vakuumsko črpalko. Na filtrirni sistem smo namestili sterilen filter s premerom por  $1,2 \mu m$ .

Za kontrolo smo na filter odpipetirali z 1 ml suspenzije spor in položili filter na gojišče DG18. Pri izpostavitvi spor etanolu za 1 minuto ter 5 in 10 minut, smo na filter najprej odpipetirali 1 ml suspenzije spor (spore ostanejo na filtru, tekočina steče skozi filter). Nato smo dodali 70 % etanol in s štoparico merili čas (1 minuto, 5 minut, 10 minut), potem pa ga odfiltrirali čez filter z vakuumsko črpalko. Filter s sporami smo sprali z 20 ml 35 % raztopine glukoze z 0,01 % detergenta Tween. Spet smo odfiltrirali z vakuumsko črpalko, nato pa filter aseptično položili na sveže gojišče DG18.

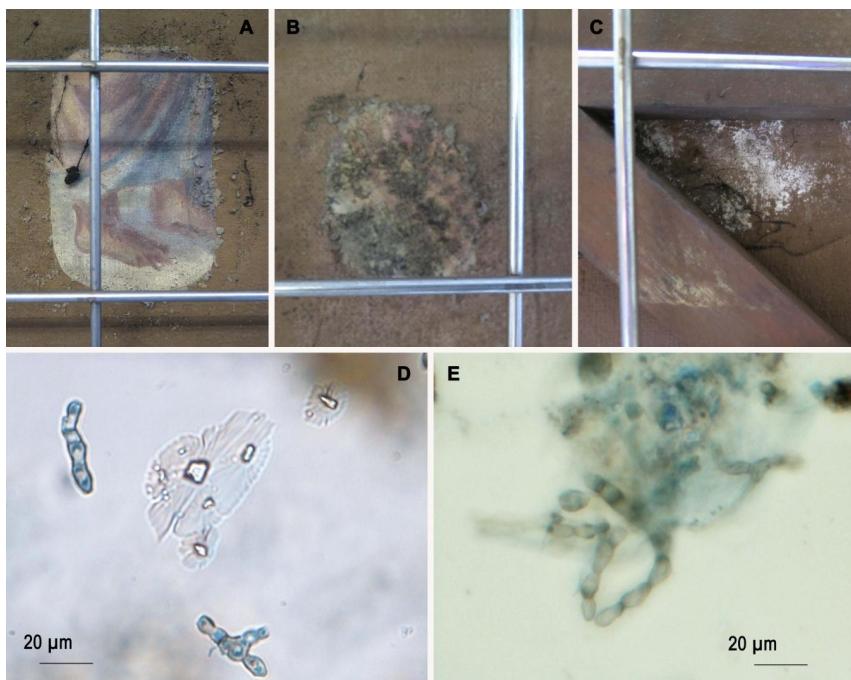
Vsa gojišča s filteri smo zlepili s parafilmom in inkubirali 2 tedna v inkubatorju pri temperaturi  $25^\circ C$ . Nato smo prešteli iz spor razvite kolonije in izračunali preživelost spor.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DETEKCIJA OKUŽB NA PREDMETIH

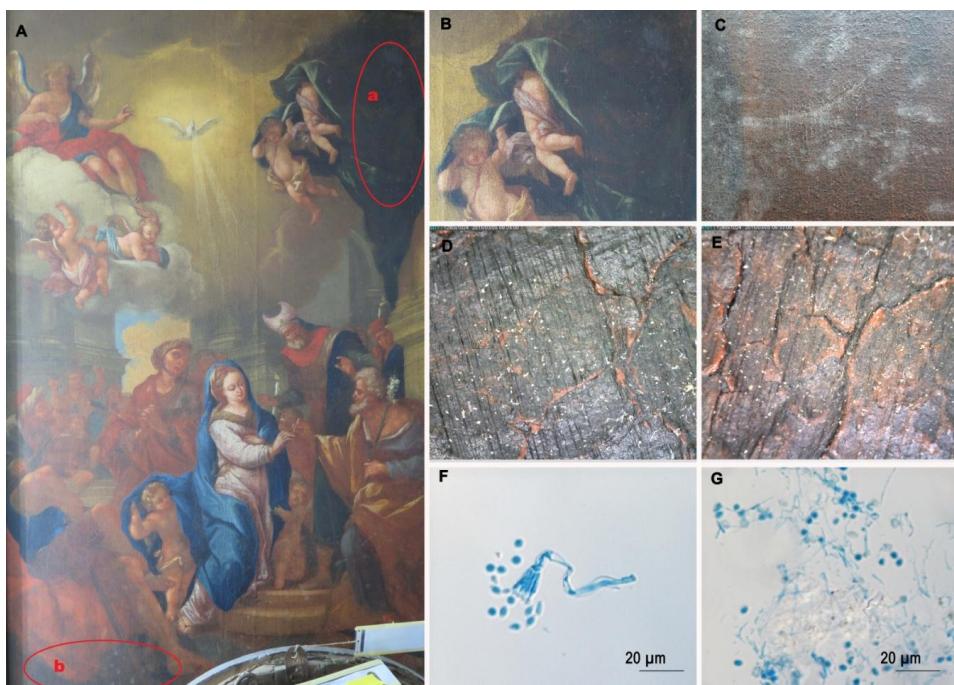
Vse vzorčene slike so bile shranjene v depoju Restavratorskega centra Zavoda za varstvo kulturne dediščine Slovenije. Tam na visečih panojih shranjujejo slike, ki jih sčasoma restavrirajo in vrnejo lastnikom. Vzorčene slike so v depoju hranjene približno 6 let, za nekatere tega podatka nimamo. Meritve temperature in relativne zračne vlažnosti izvajajo vsake 3 do 4 dni. Povprečna temperatura v depoju, merjena in izračunana za obdobje 4 let (2012–2016), znaša  $17,3 \pm 3,1^{\circ}\text{C}$ . Relativna vlažnost je za isto obdobje v povprečju znašala  $63,9 \pm 8,5\%$ . Iz izračuna povprečij meritev je razvidno, da se oba parametra nahajata znotraj priporočenih vrednosti, seveda z nekaj prekoračitvami in tudi ekstremnimi vrednostmi. V 4-letnjem obdobju meritev je namreč temperatura 6x znašala nekaj čez  $23^{\circ}\text{C}$ . Leta 2014 je bilo izmerjenih tudi več ekstremov relativne zračne vlažnosti. Ta je od junija do oktobra presegala 80 %, najvišji ekstrem je dosegla v juniju, ko je znašala 86,6 %.

Mikrobno rast smo opazili na vseh slikah, posebej na hrbtnem delu, kjer je bilo prisotno belo obarvanje v obliki prahu (Slika 1), ter na mestih, kjer so poškodovano platno podlepili z novim (Slika 1, Slika 2a, b; Slika 4d). V kotih se zbira pajčevina, na teh delih je vidna močnejša glivna razrast (Slika 2c). Na barvni plasti slike so večinoma vidni sivkasti madeži (Slika 5) in bele pikice na temni podlagi (Slika 3, Slika 4, Slika 6). Na večini slik je barvni sloj razpokan, se lušči in odpada bodisi ob robovih ali na sredini slike ob kakšnih mehanskih poškodbah (Slika 3, Slika 4, Slika 5, Slika 6, Slika 7). Med razpokami so vidni beli zapletki (Slika 4, Slika 5, Slika 6 in Slika 7). Na nekaterih slikah je barvni sloj deformiran v smislu nagubanja (Slika 4, Slika 8) in vdrtosti (Slika 5). V primeru Slike 6, katere površina je bila v preteklosti z namenom zaščite povoskana, smo opazili sive madeže. Na vzorčeni steni v depoju so bili vidni temnejši madeži in pikice (Slika 9).



Slika 1: Proučevana slika RCS 15: »3. Prizor iz življenja sv. Frančiška« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A–C), poškodb na hrbitni strani platna ter detektirana glivna okužba (D, E).

Legenda: Prikazi hrbitne strani slike; vzorec dolepljenega platna (B); bel prah (C); mikrografiji odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (D, E).



Slika 2: Proučevana slika RCS 20: »Marijina zaroka« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A), poškodb na barvni plasti (B, C) ter detektirana glivna okužba (F, G).

Legenda: Prikaz barvne strani slike (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 20A (Aa, B, D, F) ter RCS 20B (Ab, C, E, G); mikrografiji odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (F, G).



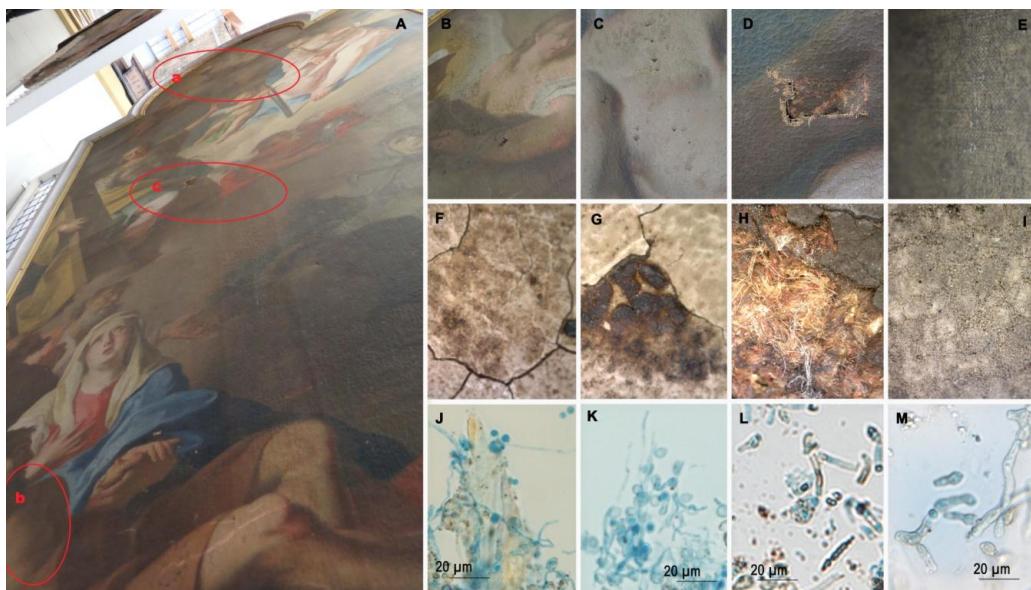
Slika 3: Proučevana slika RCS 21: »Sv. Janez Nepomuk« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A), poškodb na barvni (B, D) in hrbtni strani (C, E) ter detektirana glivna okužba na barvni (F) in hrbtni (G) strani.

Legenda: Prikaz barvne strani slike (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 21A (Aa, B, D, F) in RCS 21B (C, E, G); mikrografiji odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (F, G).



Slika 4: Proučevana slika RCS 22: »Rožnovenska Mati Božja« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A), poškodb na barvni (B–D, F–H) in hrbtni strani (E, I) ter detektirana glivna okužba (J–M).

Legenda: Prikaz vzorčene slike (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 22A (Aa, B, F, J), RCS 22B (Ab, C, G, K), RCS 22C (Ac, D, H, L) in RCS 22D s hrbne strani (E, I, M); mikrografije odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (J–M).



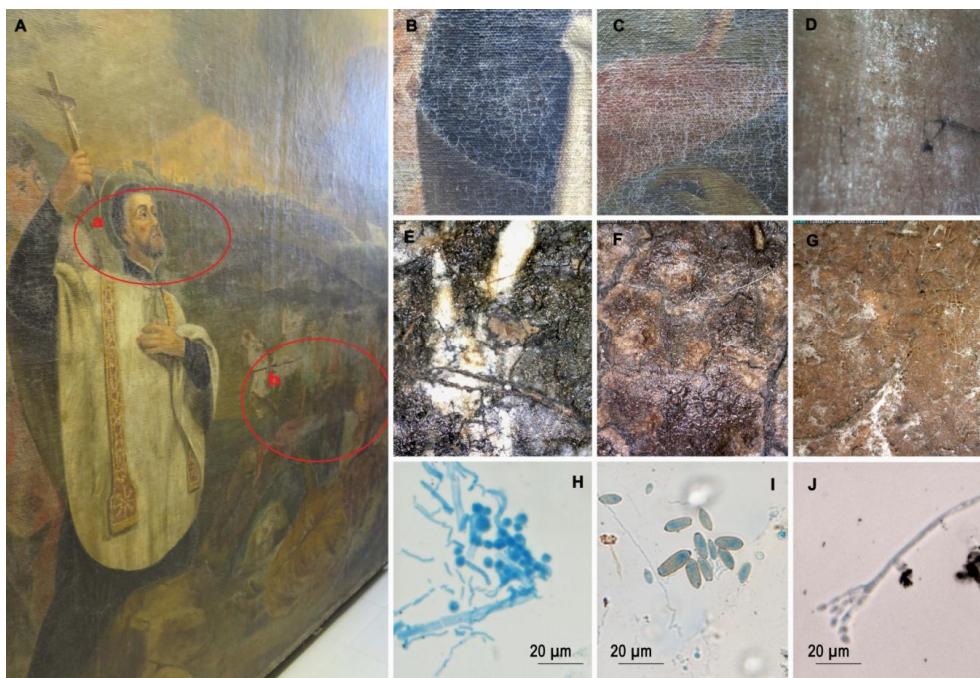
Slika 5: Proučevana slika RCS 23: »Sv. Barbara in sv. Ahac s svetniki« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A), poškodb na barvni (B–D, F–H) in hrbtni strani (D, I) ter detektirana glivna okužba (J–M).

Legenda: Vzorčena slika (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 23A (Aa, B, F, J), RCS 23B (Ab, C, G, K), RCS 23C (Ac, D, H, L) in RCS 23D s hrbtne strani slike (E, I, M); mikrografije odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (J–M).



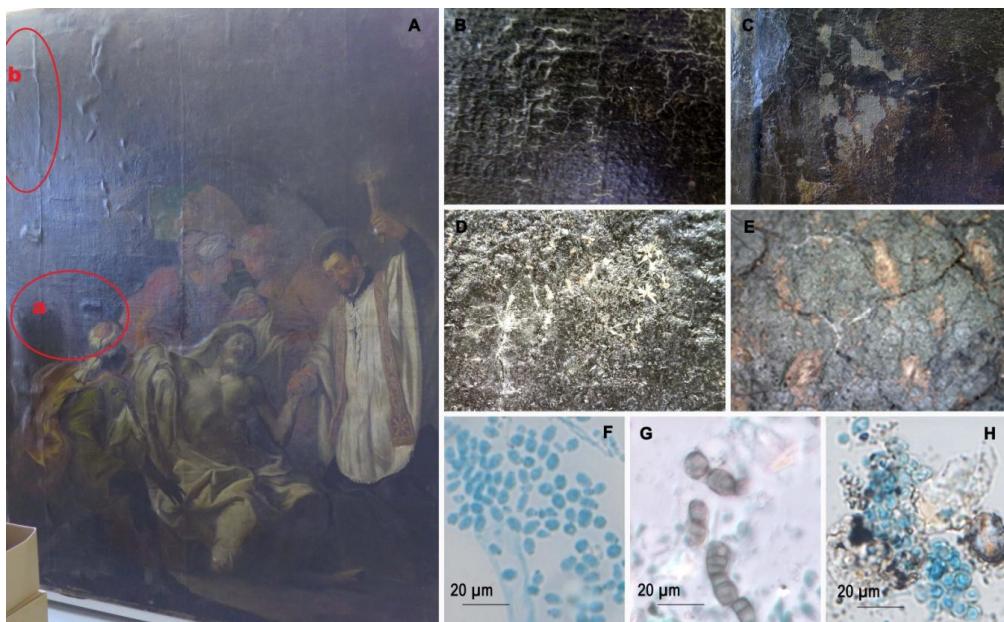
Slika 6: Proučevana slika RCS 24: »Čaščenje sv. Križa« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A) in poškodb na barvni strani (B, C, E, F) ter detektirana glivna okužba (G–I).

Legenda: Prikaz vzorčene slike (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 24A (Aa, B, E, G), RCS 24B (Ab, C, F, H) in RCS 24C s hrbtne strani slike (D, I); mikrografije odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (J–M).



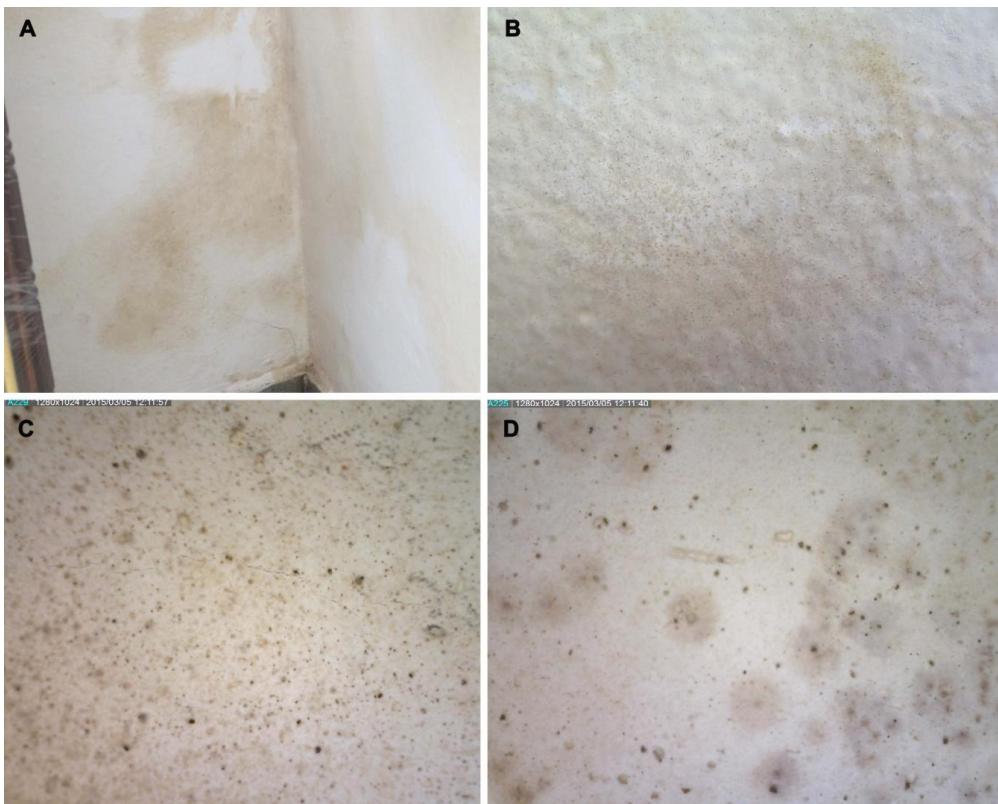
Slika 7: Proučevana slika RCS 25 : »5. prizor iz življenja sv. Frančiška« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A), poškodb na barvni (B, C, E, F) in hrbtne strani ter detektirana glivna okužba (H–J).

Legenda: Vzorčena slika (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 25A (Aa, E, H), RCS 25B (Ab, C, F, I) ter RCS 25C s hrbtne strani slike (D, G, J); mikrografije odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (H–J).



Slika 8: Proučevana slika RCS 26 : »2. prizor iz življenja sv. Frančiška« (olje na platnu) s prikazom vzorčenih mest (A), poškodbe na barvni plasti (B–E) ter detektirana glivna okužba (F–H).

Legenda: Prikaz vzorčene slike (A); poškodbe in detektirana glivna okužba vzorčnih mest RCS 26A (Aa, B, D, F), RCS 26B (Ab, C, E, G); (B, D, F) in RCS 26C (H); mikrografije odtisov z lepilnim trakom (povečava 400x) (F–H).



Slika 9: Vzorčena stena v depoju Restavratorskega centra (A–D), kjer so bile slike shranjene.

Legenda: Posnetek s fotoaparatom (A, B); posnetek z USB kamero pri povečavi med 200 in 250x (C, D).

#### 4.2 IZOLACIJA GLIV IN BAKTERIJ

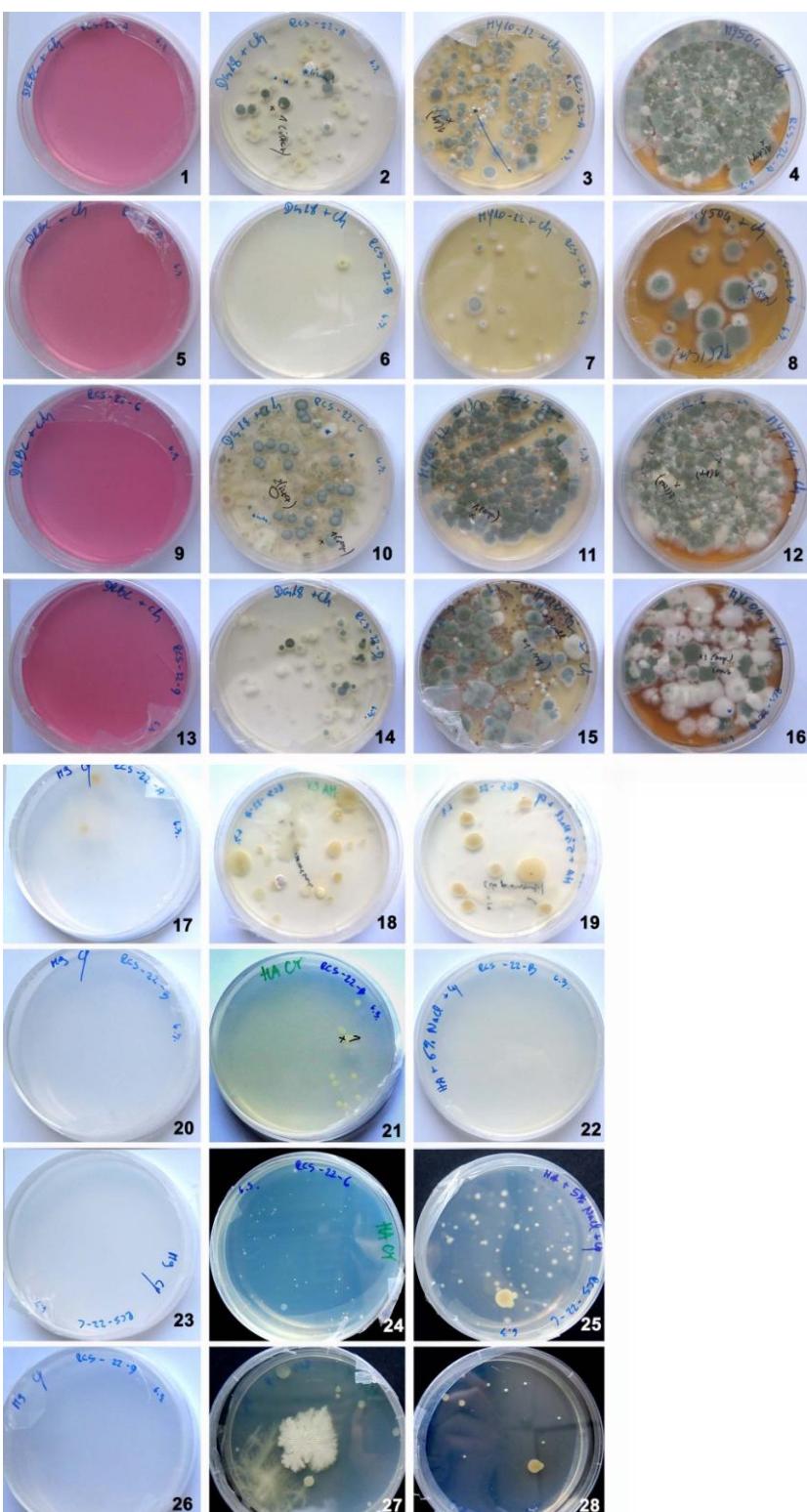
V Preglednici 10 so prikazani vzorci in gojišča, s katerih smo pridobili glivne in bakterijske izolate. Vzorec RCS 22 je bil izmed vseh vzorcev najbolj kontaminiran, z njega smo pridobili največje število glivnih in bakterijskih izolatov. Sledi mu vzorec RCS 21, pri katerem največje število glivnih izolatov izvira s hrbtni strani slike (RCS 21B). Z vzorca RCS 23 nismo dobili nobenega izolata.

Iz vseh vidno okuženih slik so na primarnih izolacijskih ploščah zrasle številne kserofilne/kserotolerantne glive, v nekaterih primerih tudi bakterije. Primer vrstno raznolikega vzorca je RCS 22, prikazan na Sliki 10, primarne izolacijske plošče drugih vzorcev in vzorca stene pa so podane v prilogah (Priloga A1 do A9). Slikane so bile po 14-ih dneh inkubacije pri 25 °C. Iz Preglednice 10 in slik primarnih izolacijskih plošč iz Priloge A je razvidno, da so bile plošče gojišča DRBC ( $a_w$  okrog 1) večinoma prazne, največje število glivnih kolonij in pridobljenih izolatov je izviralo z gojišč z znižanimi vodnimi aktivnostmi, DG18, MY10-12 in MY50G. Največje število kolonij in

pridobljenih izolatov bakterij je izviralo z bogatih gojišč HA in HA + 5 % NaCl z znižano vodno aktivnostjo.

Preglednica 10: Število glivnih in bakterijskih izolatov, osamljenih z različnih gojišč po 14-ih dneh. Prva št. pomeni št. glivnih izolatov, druga pa št. bakterijskih izolatov.

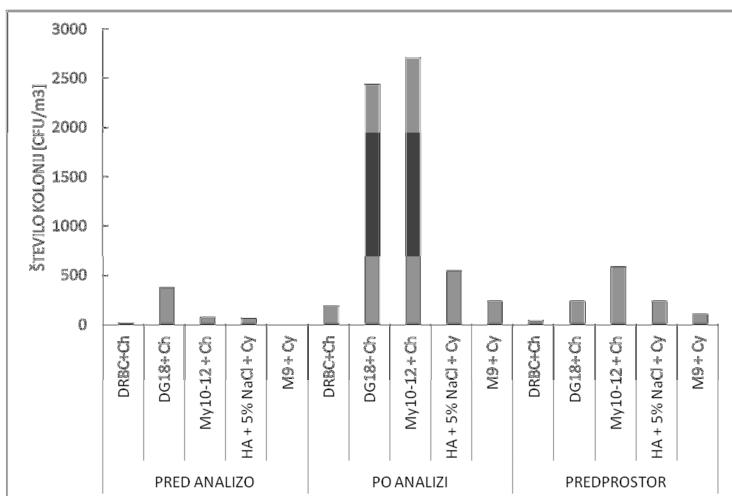
VZOREC	OZNAKA	GOJIŠČE						SKUPAJ NA VZOREC
		DRBC + Ch	DG18 + Ch	MY10-12 + Ch	MY50G + Ch	M9 + Cy	HA + Cy	
<b>RCS 15</b>		1/0	3/0	1/0	1/0	1/0	2/2	<b>9/2</b>
<b>RCS 20</b>	<b>B</b>				1/0			<b>1/0</b>
<b>RCS 21</b>	<b>A</b>		2/0	2/0	4/0			<b>21/0</b>
	<b>B</b>		4/0	4/0	5/0			
<b>RCS 22</b>	<b>A</b>		5/0	2/0	1/0	0/1	0/1	<b>25/7</b>
	<b>B</b>			1/0	1/0		0/1	
	<b>C</b>		4/0	2/0	2/0			
	<b>D</b>		3/0	2/0	2/0	0/3	0/1	
<b>RCS 24</b>	<b>A</b>		3/0	1/0	1/0			<b>17/0</b>
	<b>B</b>		1/0	4/0	1/0	1/0		
	<b>C</b>		3/0	1/0	1/0			
<b>RCS 25</b>	<b>A</b>		2/0	2/0	4/0		1/1	<b>18/1</b>
	<b>B</b>		1/0	2/0	1/0			
	<b>C</b>		1/0	1/0	1/0		2/0	
<b>RCS 26</b>	<b>A</b>		1/0		1/0			<b>8/6</b>
	<b>B</b>				1/1	0/1	0/1	
	<b>C</b>		1/0	2/0	2/0	0/1	0/1	
<b>RCS STENA</b>			1/0			0/3	0/2	<b>1/5</b>
<b>RCS ZRAK:</b>								
<b>PRED ANALIZO</b>		1/0	1/0	2/0				<b>9/1</b>
<b>PO ANALIZI</b>			3/0	2/0			0/1	
<b>SKUPAJ NA GOJIŠČE</b>		<b>2/0</b>	<b>39/0</b>	<b>31/0</b>	<b>30/1</b>	<b>1/2</b>	<b>0/10</b>	<b>5/9</b>



Slika 10: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 22.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv z dodatkom kloramfenikola: DRBC (1, 5, 9, 13), DG18 (2, 6, 10, 14), MY10-12 (3, 7, 11, 15), MY50G (4, 8, 12, 16). Plošče za izolacijo bakterij z dodanim cikloheksimidom: M9 (17, 20, 23, 26), HA (18, 21, 24, 27), HA + 5 % NaCl (19, 22, 25, 28). RCS 22A: 1–4, 17–19; RCS 22B: 5–8, 20–22; RCS 22C: 9–12, 23–25; RCS 22D: 13–16, 26–28.

Primarne izolacijske plošče vzorcev zraka, prefiltiranega pred in po vzorčenju slik ter v referenčnem prostoru, se nahajajo v Prilogi A9. Slikali smo jih po 14-ih dneh inkubacije pri 25 °C. Spodnji graf (Slika 11) prikazuje število kolonij na posameznem gojišču. Na gojiščih so večinoma zrasle kolonije gliv, bakterijske kolonije v manjšem številu. Pred analizo slik je bilo v zraku do 500 CFU/m<sup>3</sup>, največ na gojišču DG18. Po analizi slik se je število kolonij na vseh gojiščih precej povečalo v primerjavi s številom kolonij na enakem gojišču pred analizo. Največ kolonijskih enot, kar čez 2500 na m<sup>3</sup>, je zraslo na plošči MY10-12, po obremenjenosti ji je sledilo gojišče DG18. Število kolonij, zraslih v referenčnem prostoru je bilo nekoliko višje kot število kolonij na ploščah z vzorčenim zrakom pred analizo slik, razen v primeru gojišča DG18.



Slika 11: Število zraslih kolonij po analizi zraka na posameznih gojiščih pred in po vzorčenju v depoju Restavratorskega centra ter v referenčnem prostoru po dveh tednih inkubacije.

## 4.3 IDENTIFIKACIJA GLIV

### 4.3.1 Izolirani sevi

S sedmih slik od skupno osmih vzorčenih, smo osamili 109 sevov, od teh jih je 74 pripadalo rodu *Aspergillus*, po trije izolati rodovoma *Penicillium* in *Wallemia*, dva rodu *Cladosporium*, po en izolat rodovoma *Aureobasidium*, *Kabatina* in *Thielavia*. Dva izolata sta pripadala kvasnemu rodu *Meyerozyma*. Izmed sevov rodu *Aspergillus* jih je 39 pripadalo vrsti *A. penicillioides*, 15 *A. restrictus*, 7 *A. conicus*, 6 *A. vitricola*, 4 *A. versicolor*, po en izolat pa vrstam *A. fumigatus*, *A. acidus* in *A. jensenii*. Sevi, osamljeni iz zraka, nakazujejo na večjo diverziteto glivnih vrst v primerjavi s sevi s slik, ki so večinoma pripadali rodu *Aspergillus*. Vse seve smo okvirno identificirali s pomočjo podatkovne baze GenBank (NCBI, Blast algoritem), pripravili poravnave nukleotidnih zaporedij skupin sevov ter jih obdelali s filogenetskimi orodji. Rezultati izolacije in identifikacije sevov so podani v Preglednici 11. Nekateri izolati so ostali neidentificirani po večkratnih neuspelih poskusih pomnožitve DNA.

Preglednica 11: Podatki o izoliranih glivnih sevih.

VZOREC	PODVZOREC	EXF ŠTEVILKA	KONČNA IDENTIFIKACIJA	OSNOVA IDENTIFIKACIJE	IZOLACIJSKO GOJIŠČE
<b>RCS 15</b>	<b>C</b>	10407	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10409	<i>A. versicolor</i>	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10410	<i>A. versicolor</i>	ITS	DRBC Ch
		10413	<i>A. fumigatus</i>	ITS	HA 5% NaCl Cy
		10412	<i>A. versicolor</i>	ITS	HA 5% NaCl Cy
		10405	<i>A. jensenii</i>	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	MY50G Ch
		10338	Neidentificiran izolat		M9 Cy
		10406	Neidentificiran izolat		MY10-12 Ch
		10408	Neidentificiran izolat		DG18 Ch
<b>RCS 20</b>	<b>B</b>	10389	Neidentificiran izolat		MY50G Ch
<b>RCS 21</b>	<b>A</b>	10339	<i>A. penicillioides</i> sp. 3	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10377	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	DG18 Ch
		10421	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10340	<i>A. penicillioides</i> tipska sk.	ITS	MY10-12 Ch
		10341	<i>A. penicillioides</i> tipska sk.	ITS	MY50G Ch
		10378	<i>A. vitricola</i> tipska sk.	ITS, morfologija	MY50G Ch
		10425	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY50G Ch
		10423	Neidentificiran izolat		MY50G Ch
		10381	<i>A. penicillioides</i> sp. 3	ITS	DG18 Ch
<b>B</b>	<b>B</b>	10342	<i>Wallemia sebi</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10375	<i>A. vitricola</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10382	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10452	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10383	<i>A. penicillioides</i> sp. 3	ITS	MY50G Ch
		10429	<i>A. penicillioides</i> sp. 3	ITS	MY50G Ch
		10385	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY50G Ch
		10376	Neidentificiran izolat	ITS	DG18 Ch
		10380	Neidentificiran izolat	ITS	DG18 Ch
		10384	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
		10386	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
		10451	Neidentificiran izolat	ITS	DG18 Ch
<b>RCS 22</b>	<b>A</b>	10388	<i>A. restrictus</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10379	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10387	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	DG18 Ch
		10453	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10454	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10427	<i>A. vitricola</i> tipska sk.	ITS	MY10-12 Ch
		10343	<i>P. commune</i>	ITS	MY50G Ch
		10419	Neidentificiran izolat	ITS	DG18 Ch

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 11: Podatki o izoliranih glivnih sevih.

VZOREC	PODVZOREC	EXF ŠTEVILKA	KONČNA IDENTIFIKACIJA	OSNOVA IDENTIFIKACIJE	IZOLACIJSKO GOJIŠČE
<b>B</b>		10416	<i>A. vitricola</i> tipska sk.	ITS	MY10-12 Ch
		10430	<i>P. chrysogenum</i>	ITS	MY50G Ch
<b>C</b>		10346	<i>A. penicillioides</i> tipska sk.	ITS	DG18 Ch
		10401	<i>A. penicillioides</i> sp. 3	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	DG18 Ch
		10402	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10400	<i>A. vitricola</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10347	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	MY10-12 Ch
		10428	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10345	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY50G Ch
		10344	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS	MY50G Ch
<b>D</b>		10350	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10349	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS	DG18 Ch
		10351	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10399	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10397	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ITS	MY50G Ch
		10398	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY50G Ch
		10348	Neidentificiran izolat	ITS	MY10-12 Ch
<b>RCS 24</b>	<b>A</b>	10352	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10395	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS	DG18 Ch
		10396	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10353	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	MY10-12 Ch
		10354	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS, beta-tubulin	MY50G Ch
<b>B</b>		10422	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10449	<i>Thielavia hyalocarpa</i>	ITS	M9 CY
		10425	<i>A. penicillioides</i> tipska sk.	ITS	MY10-12 Ch
		10462	<i>A. conicus</i>	ITS, beta-tubulin	MY10-12 Ch
		10394	<i>A. acidus</i>	ITS, beta-tubulin, kalmodulin	MY10-12 Ch
		10355	<i>A. penicillioides</i> tipska sk.	ITS	MY50G Ch
<b>C</b>		10357	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS	DG18 Ch
		10414	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS	DG18 Ch
		10358	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10356	<i>A. penicillioides</i> sp. 2	ITS	MY50G Ch
<b>RCS 25</b>	<b>A</b>	10359	<i>A. conicus</i>	ITS	DG18 Ch
		10455	<i>A. conicus</i>	ITS	DG18 Ch
		10450	<i>A. penicillioides</i>	ITS	HA 5% NaCl Cy
		10360	<i>A. restrictus</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10393	<i>A. restrictus</i> sp. 1	ITS	MY10-12 Ch
		10361	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	MY50G Ch
		10424	Neidentificiran izolat	ITS	MY10-12 Ch
		10461	Neidentificiran izolat	ITS	DG18 Ch

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 11: Podatki o izoliranih glivnih sevih.

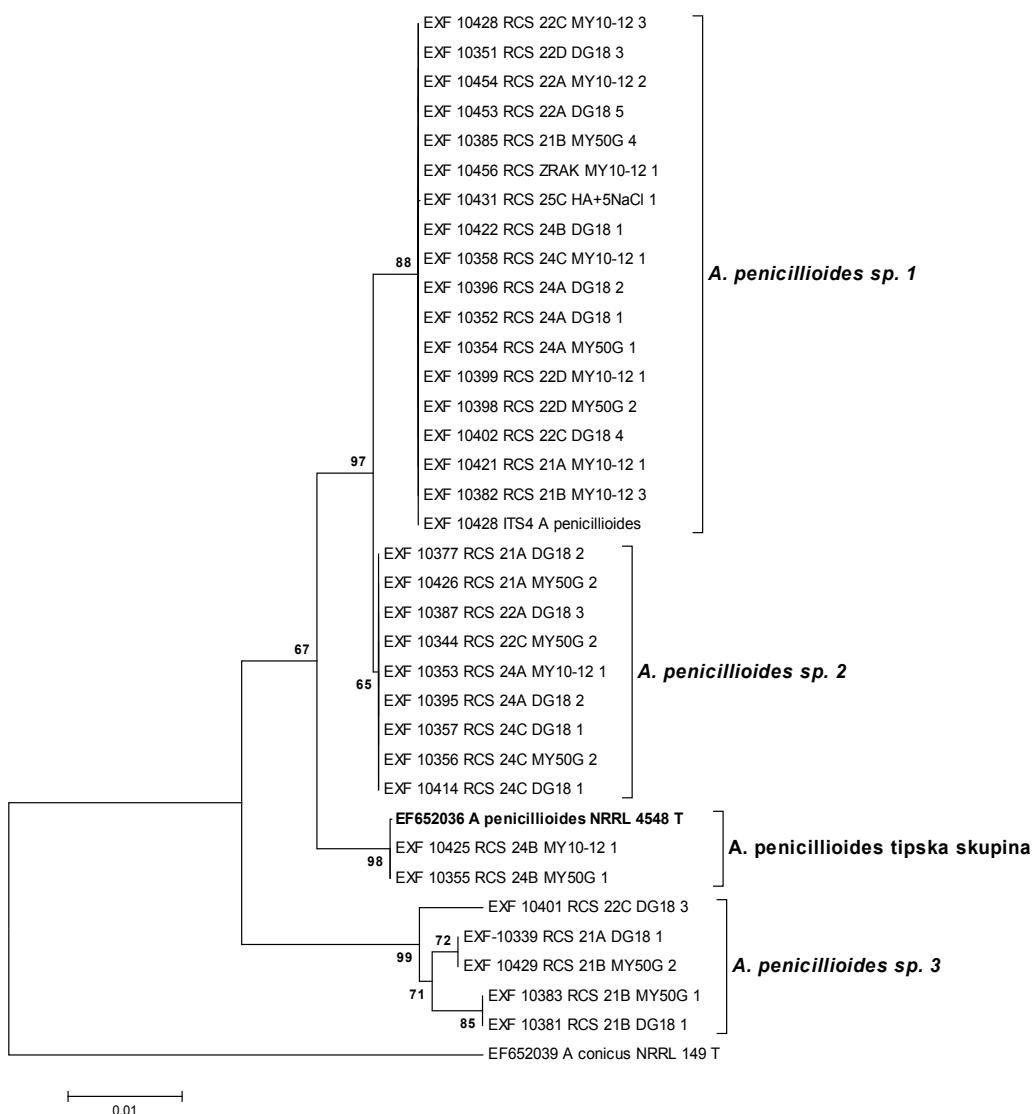
VZOREC	PODVZOREC	EXF ŠTEVILKA	KONČNA IDENTIFIKACIJA	OSNOVA IDENTIFIKACIJE	IZOLACIJSKO GOJIŠČE
<b>B</b>		10364	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10457	<i>Meyerozyma caribbica</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10365	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS	MY10-12 Ch
		10362	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
		10418	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
<b>C</b>		10366	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10431	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS, beta-tubulin	HA 5% NaCl Cy
		10464	<i>A. conicus</i>	ITS	HA 5% NaCl Cy
		10392	<i>A. conicus</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10391	<i>A. restrictus</i> sp. 1	ITS	MY50G Ch
<b>RCS 26</b>	<b>A</b>	10390	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	DG18 Ch
		10367	<i>A. conicus</i>	ITS	MY50G Ch
	<b>B</b>	10368	<i>P. commune</i>	ITS	MY50G Ch
	<b>C</b>	10411	<i>A. restrictus</i> sp. 1	ITS	DG18 Ch
		10369	<i>A. conicus</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10370	<i>A. restrictus</i> sp. 2	ITS, beta-tubulin	MY50G Ch
		10420	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
		10363	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
<b>RCS STENA</b>		10371	<i>A. versicolor</i>	ITS	DG18 Ch
<b>RCS ZRAK:</b>					
<b>PRED ANALIZO</b>		10372	<i>Aureobasidium pullulans</i>	ITS	DG18 Ch
		10415	<i>A. vitricola</i>	ITS	DRBC Ch
		10460	<i>Kabatina thujae</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10417	Neidentificiran izolat	ITS	MY50G Ch
<b>PO ANALIZI</b>		10373	<i>Wallemia muriae</i>	ITS	DG18 Ch
		10404	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ITS	DG18 Ch
		10456	<i>A. penicillioides</i> sp. 1	ITS, beta-tubulin	MY10-12 Ch
		10374	<i>Wallemia muriae</i>	ITS	MY10-12 Ch
		10463	Neidentificiran izolat	ITS	MY10-12 Ch
		10458	Neidentificiran izolat	ITS	MY10-12 Ch
		10403	Neidentificiran izolat	ITS	DG18 Ch

Legenda: (osenčene celice) Izolati ne pripadajo rodu *Aspergillus*; (tipska sk.) pomnoženo nukleotidno zaporedje je identično zaporedju tipskega seva.

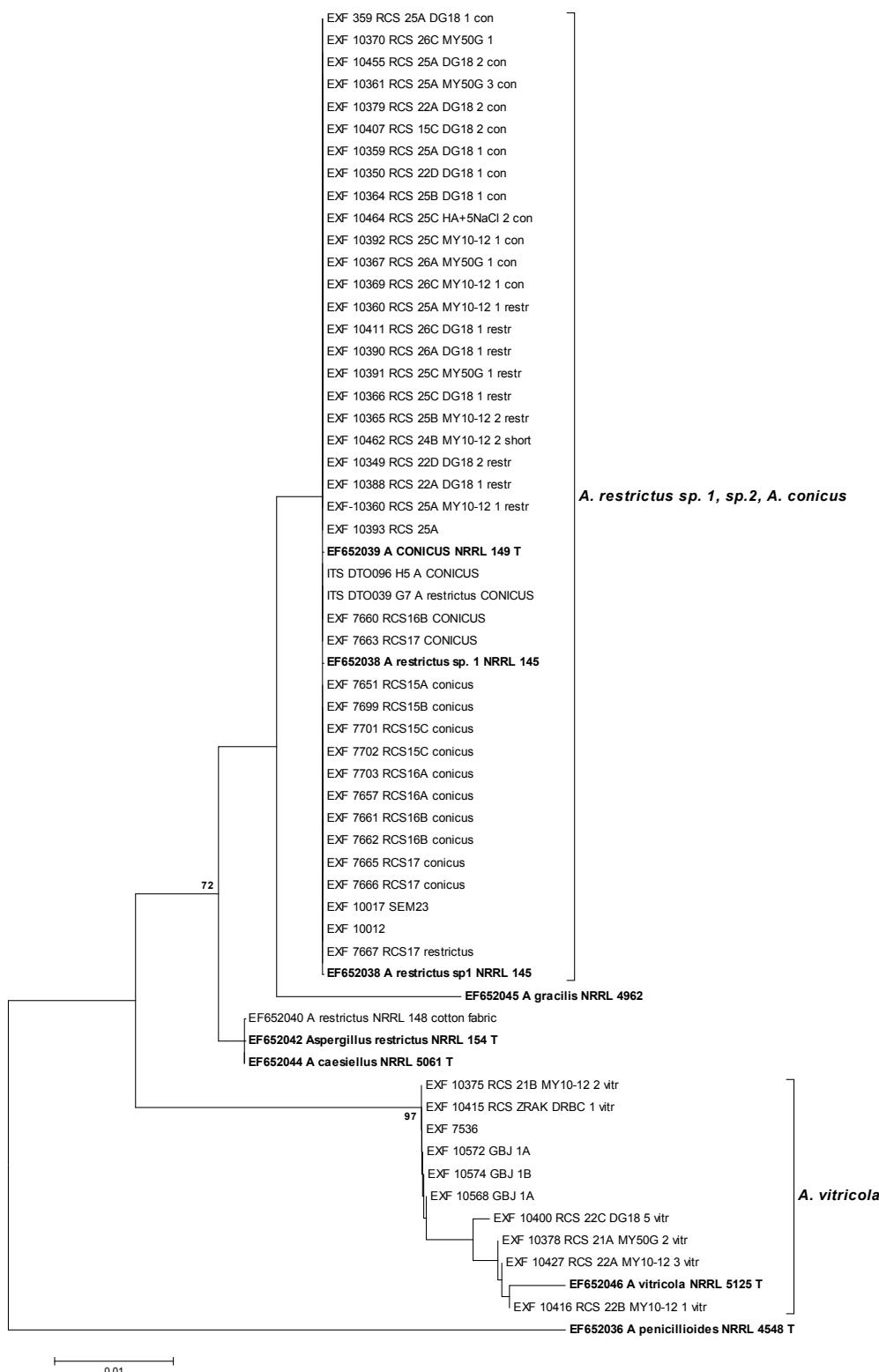
#### 4.3.2 Filogenetska drevesa

Na podlagi nukleotidnih zaporedij regije ITS rDNA se sevi, ki smo jih po primerjavi z zaporedji v podatkovni bazi GenBank (z algoritmom Blast) identificirali kot *Aspergillus penicillioides*, grupirajo v 4 skupine, od tega sta zaporedji ITS le dveh izolatov skoraj identični zaporedju tipskega seva te vrste, medtem ko ostali sevi predstavljajo samostojne skupine, ki so najverjetneje nove vrste (Slika 12). Primerjano zaporedje ITS

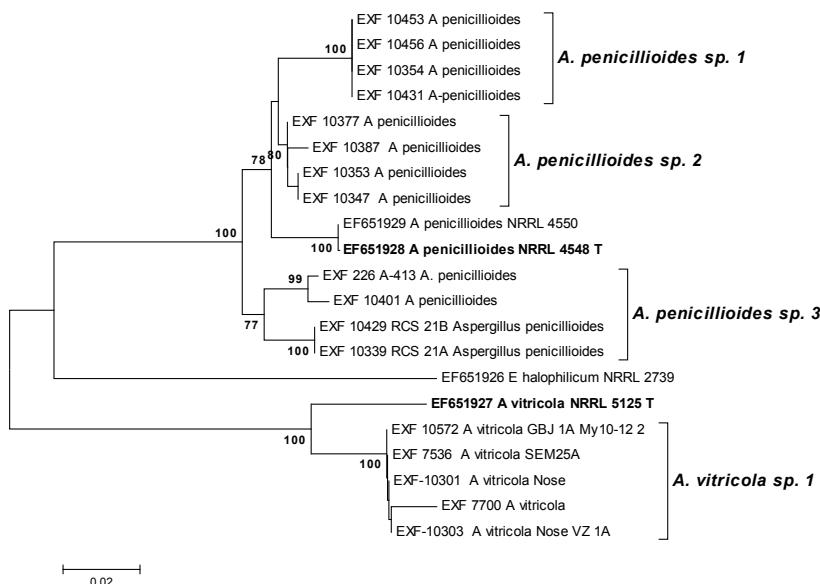
je bilo dolgo 560 bp. Regija ITS ne razlikuje med določenimi vrstami rodu *Aspergillus*, zato smo pri identifikaciji dodatno pomnožili gen za beta-tubulin in gen za kalmodulin. Tako je iz Slike 13 razvidno, da regija ITS ne razlikuje med sevi *A. restrictus* in *A. conicus*, Sliki 15 in 16 pa jasno prikazujeta ločenost teh dveh skupin na podlagi zaporedij genov za beta tubulin in kalmodulin. Sliki 15 in 16 prikazujeta tudi oddaljenost tipskega seva *A. restrictus* od samostojnih skupin *A. restrictus* sp. 1 in *A. restrictus* sp. 2, ki sta najverjetneje novi vrsti. Slika 14 prikazuje oddaljenost tipskega seva *A. vitricola* od skupine *A. vitricola* sp. 1, ki je najverjetneje tudi nova vrsta. Označevalec ITS za razliko od gena za beta tubulin in gena za kalmodulin med omenjenima skupinama ne razlikuje (Slika 13).



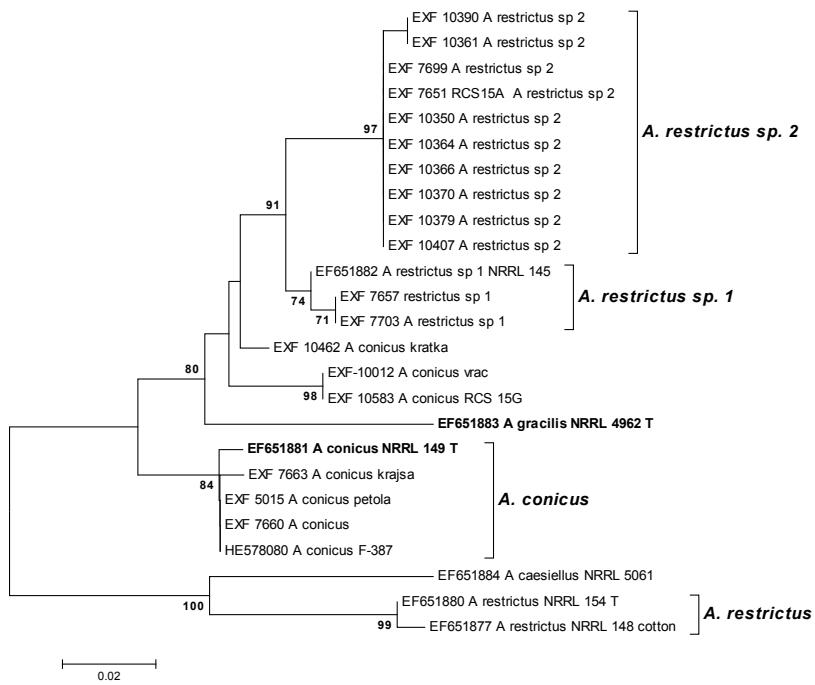
Slika 12: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij izbranih regij notranjih distančnikov ribosomske DNA (**ITS rDNA**) sevov *Aspergillus penicillioides*, izdelano s programom MEGA z uporabo substitucijskega modela Tamura 3. Zunanja skupina: *A. conicus* NRRL 149. Statistične podpore vej so izračunane z metodo vezanja.



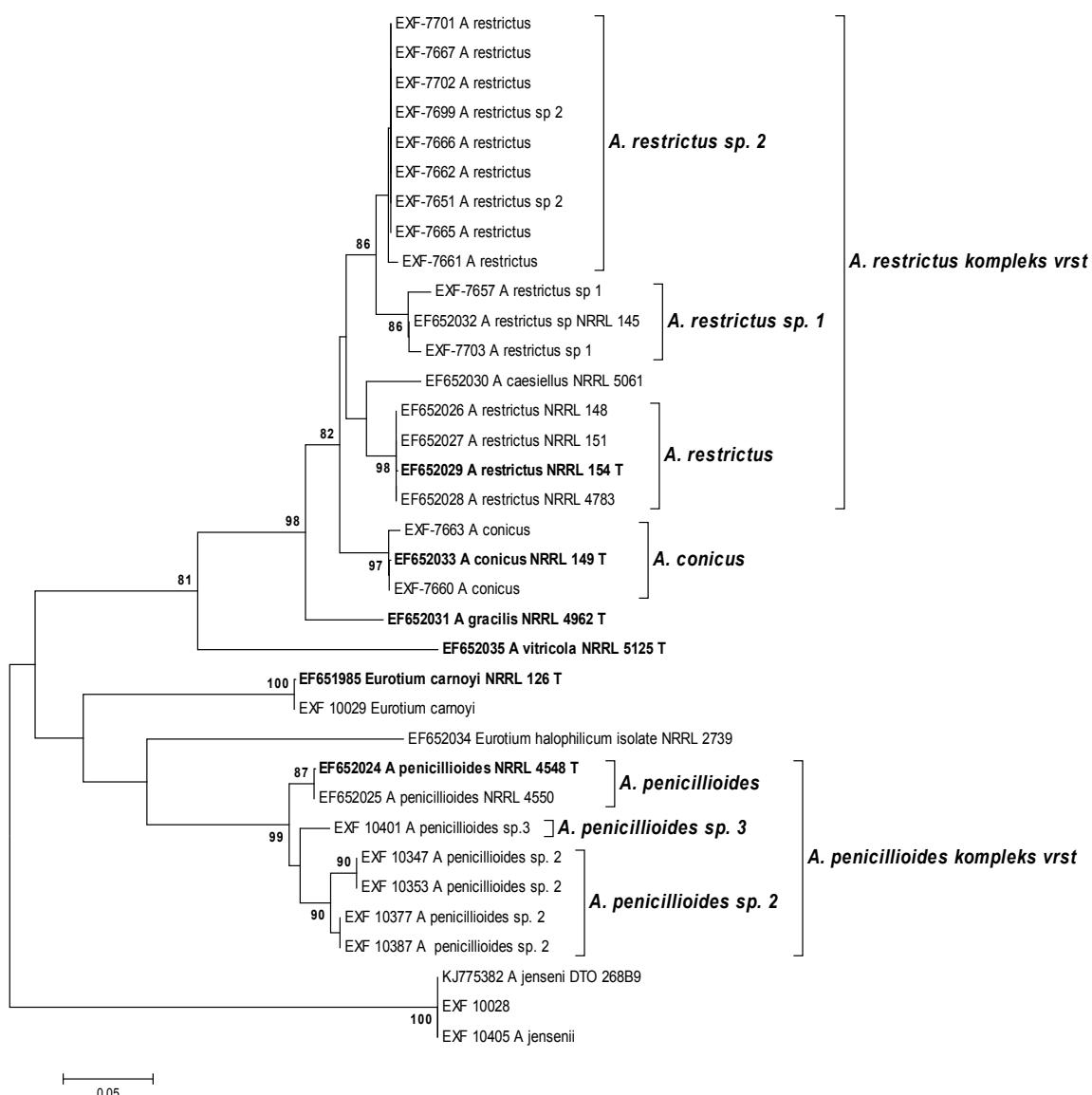
Slika 13: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo izdelano na podlagi nukleotidnih zaporedij izbranih regij notranjih distančnikov ribosomske DNA (**ITS rDNA**) sevov *Aspergillus restrictus*, *A. conicus* in *A. vitricola*, izdelano s programom MEGA z uporabo substitucijskega modela Tamura 3. Zunanja skupina: *A. penicillioides* NRRL 4548. Statistične podpore vej so izračunane z metodo vezanja.



Slika 14: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevonukleotidnih zaporedij dela gena, ki kodira beta-tubulin (**BenA**), izbranih sevov *A. penicillioides* in *A. vitricola*, dolžine 534 nukleotidov, izdelano s programom MEGA z uporabo substitucijskega modela Kimura 2 in gama distribucijo. Zunanja skupina je bila *A. vitricola*.



Slika 15: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij dela gena, ki kodira beta-tubulin (**BenA**), izbranih sevov *A. restrictus* in *A. conicus*, dolžine 528 nukleotidov, izdelano s programom MEGA z algoritem Kimura 2 in gama distribucijo. Zunanja skupina je bila *A. restrictus* NRRL 148.

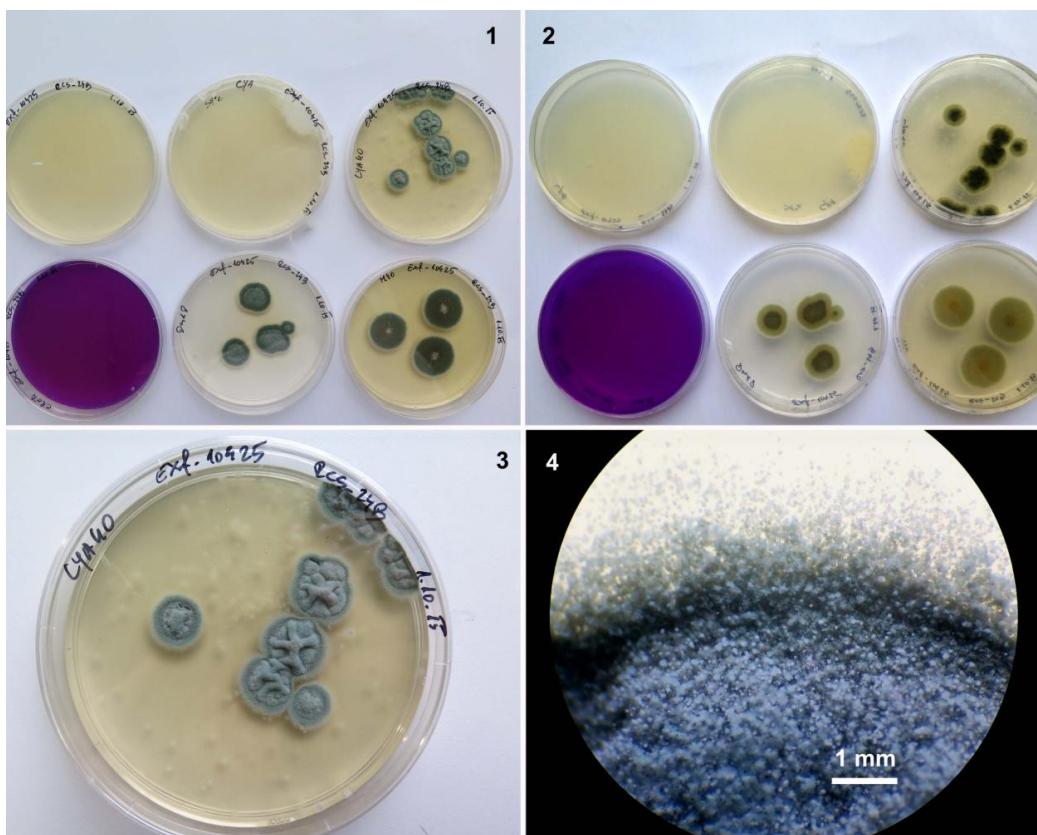


Slika 16: Sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij gena, ki kodira kalmodulin (**CaM**), izbranih sevov *A. restrictus*, *A. conicus* in *A. penicillioides*, dolžine 529 nukleotidov, izdelano s programom MEGA z algoritmom Kimura 2. Zunanjia skupina je bila *A. jensenii*.

### 4.3.3 Makromorfološke in fiziološke analize izbranih sevov

#### 4.3.3.1 Rast na gojiščih za identifikacijo

Pri rodu *Aspergillus* je morfologija kolonij kot tudi mikromorfologija izrednega pomena za identifikacijo. Glede na podatke nukleotidnih zaporedij, ki nakazujejo odkritje novih vrst, smo izbrali po en sev pomembnejših skupin in seve primerjali na makro- in mikromorfološkem nivoju. To smo naredili na klasičnih gojiščih, priporočljivih za rod *Aspergillus*, kot so CYA, CY40, CREA, DG18 in M40. Izgled kolonij na omenjenih gojiščih za sev *A. penicillioides* (EXF-10425) je prikazan na Sliki 17. Morfologije kolonij za ostale seve pa so podane v Prilogi B. Kulture smo podrobno pregledali in morfološke znake podali v Preglednici 12. Primerjani sevi so se razlikovali predvsem v rasti na gojiščih CYA in CREA, barvi reverza ter v premeru kolonij glede na različno vodno aktivnost izbranih gojišč. Po obliku in barvi kolonij ter prisotnosti in premeru kolonij na gojiščih CYA in CREA se od ostalih najbolj razlikuje izolat EXF-10409, *A. versicolor*.



Slika 17: Kolonije seva *A. penicillioides* (EXF-10425) na gojiščih za identifikacijo po dveh tednih inkubacije.

Legenda: Kulture seva *A. penicillioides* (EXF-10425) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).

Preglednica 12: Morfološke lastnosti izbranih sevov po dveh tednih inkubacije.

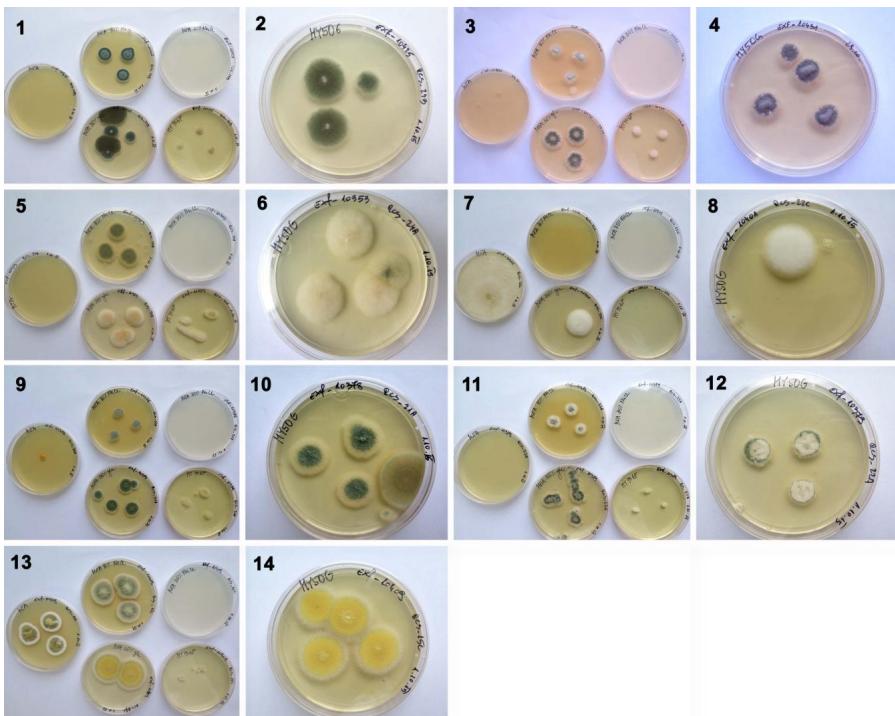
SEV	CYA	CYA 37°C	CY40	DG18	M40	CREA
<i>A. penicilliodes</i> ; EXF-10425						
<b>Premer kolonije (cm)</b>			1,5	2,0	2,2	
<b>Barva micelija</b>			bež	bež	bež	
<b>Barva konidijev</b>	ni rasti	ni rasti	zelena	zelena	zelena	ni rasti
<b>Eksudat (da/ne)</b>			ne	da	da	
<b>Reverz</b>			zelen	zeleno-rjav	zeleno-rumen	
<i>A. penicilliodes</i> sp. 1; EXF-10431						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	0,7		2,0	1,7	1,9	0,5
<b>Barva micelija</b>	bela		bela	bela	bela	prozorna
<b>Barva konidijev</b>	zelena	ni rasti	zelena	zelena	zelena	jih ni
<b>Eksudat (da/ne)</b>	ne		ne	ne	ne	ne
<b>Reverz</b>	rumen		rumeno-zelen	rumen	rumeno-zelen	roza-bež
<i>A. penicilliodessp. 2</i> ; EXF-10353						
<b>Premer kolonije (cm)</b>			2,9	3,5	2,5	0,5
<b>Barva micelija</b>			bež	bež	bež	prozorna
<b>Barva konidijev</b>	ni rasti	ni rasti	zelena	zelena	zelena	jih ni
<b>Eksudat (da/ne)</b>			ne	da	ne	ne
<b>Reverz</b>			oranžno-rjav	rumen	rdečkast	prozorna
<i>A. penicilliodessp. 3</i> ; EXF-10401						
<b>Premer kolonije (cm)</b>			3,1			
<b>Barva micelija</b>			bež			
<b>Barva konidijev</b>	ni rasti	ni rasti	rumena	ni rasti	ni rasti	ni rasti
<b>Eksudat (da/ne)</b>			da			
<b>Reverz</b>			rumen			
<i>A. vitricola</i> ; EXF-10378						
<b>Premer kolonije (cm)</b>			1,5	1,3	1,5	
<b>Barva micelija</b>			bež	bež	bež	
<b>Barva konidijev</b>	ni rasti	ni rasti	zelena	zelena	zelena	ni rasti
<b>Eksudat (da/ne)</b>			da	da	da	
<b>Reverz</b>			zelen	rumen	rumen	
<i>A. restrictus</i> sp. 2; EXF-10379						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	0,7		1,5	1,8	1,4	0,8
<b>Barva micelija</b>	bež		bež	bež	bež	bež
<b>Barva konidijev</b>	zelena	ni rasti	zelena	zelena	zelena	jih ni
<b>Eksudat (da/ne)</b>	da		ne	ne	ne	ne
<b>Reverz</b>	bež		rjavkast	rumen	rumen	bež
<i>A. versicolor</i> ; EXF-10409						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	3,1		3,5	2,6	3,0	2,5
<b>Barva micelija</b>	bež		bež	bež	bež	bež
<b>Barva konidijev</b>	zelena	ni rasti	zelena	zelena	zelena	zelena
<b>Eksudat (da/ne)</b>	da		da	da	ne	da
<b>Reverz</b>	rjav		rumen	rumen	rumen	vijoličen

#### 4.3.3.2 Rast na gojiščih z različnimi vodnimi aktivnostmi

Preverjanje rasti na gojiščih z različno vodno aktivnostjo z namenom določitve optimalnih in mejnih fizikalno-kemijskih dejavnikov je prav tako pomembno za identifikacijo rodu *Aspergillus*. Rast izbranih sevov rodu *Aspergillus* na gojiščih z različno vodno aktivnostjo smo preverjali na gojišču MEA in gojiščih z dodatki, kot so MEA z 10 % NaCl, MEA s 35 % glukoze, MEA s 30 % NaCl in MY70F. Izgled kolonij izbranih sevov je prikazan na Sliki 18. Kolonijam smo po 14-ih dneh inkubacije izmerili premer in preverili prisotnost sporulacije, podatke smo uredili v Preglednici 13. Premeri kolonij izbranih sevov na gojiščih s primerljivimi vodnimi aktivnostmi so se razlikovali glede na dodatek sladkorja ozziroma soli v gojišču. Na gojišču MEA ( $a_w$  okrog 1) so vsi sevi, razen *A. versicolor*, rasli slabše ali pa sploh ne. Medtem, ko so na gojišču MEA z 10 % NaCl sevi še rasli, na gojišču MEA s 30 % NaCl pa več ne. Na gojišču MY70GF, ki je po  $a_w$  primerljivo gojišču MEA + 30 % NaCl, so sevi rasli. Sevi rastejo približno enako dobro v primeru gojišč MEA s 35% glukoze in MEA z 10 % NaCl, ki sta med seboj primerljivi po vodni aktivnosti. Glede na premer kolonij sevi na gojišču MY50G rastejo boljše kot na gojišču MY70GF, ki sicer vsebuje več sladkorja kot MY50G in ima nižjo vodno aktivnost.

Preglednica 13: Premer kolonij in prisotnost sporulacije izbranih sevov na različnih agarnih gojiščih.

SEV	MEA	MEA 10% NaCl	MEA 30% NaCl	MEA 35% glc	MY70GF	MY50G
<i>A. penicilliooides</i> ; EXF-10425						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	ni rasti	1,6	ni rasti	1,5	0,8	2,5
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	da		da	da	da	da
<i>A. penicilliooides</i> sp. 1; EXF-10431						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	0,5	1,5	ni rasti	2,8	1,5	1,2
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	ne	da		da	da	ne
<i>A. penicilliooidessp. 2</i> ; EXF-10353						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	0,1	2,9	ni rasti	2,4	1,3	2,5
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	ne	da		da	ne	da
<i>A. penicilliooidessp. 3</i> ; EXF-10401						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	kontaminacija!		ni rasti	3,4	3,1	
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	ne	ni rasti		ne	ni rasti	ne
<i>A. vitricola</i> ; EXF-10378						
<b>Premer kolonije (cm)</b>			1,5	ni rasti	1,7	1,0
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	ni rasti	da		da	da	da
<i>A. restrictus</i> sp. 2; EXF-10379						
<b>Premer kolonije (cm)</b>			1,6	ni rasti	2,6	1,0
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	ni rasti	da		da	ne	da
<i>A. versicolor</i> ; EXF-10409						
<b>Premer kolonije (cm)</b>	2,7	2,8	ni rasti	4,0	0,8	2,6
<b>Sporulacija (da/ne)</b>	da	da		da	ne	da



Slika 18: Izbrani sevi na gojiščih z različnimi vodnimi aktivnostmi.

Legenda: *A. penicilliodes* EXF-10425 (1, 2); *A. penicilliodes* sp. 1 EXF- 10431 (3, 4); *A. penicilliodes* sp. 2 EXF-10353 (5, 6); *A. penicilliodes* sp. 3 EXF-10401 (7, 8); *A. vitricola* EXF-10378 (9, 10); *A. restrictus* sp. 2 EXF-10379 (11, 12); *A. versicolor* EXF-10409 (13, 14); rast na gojišču MY50G (**soda št.**); rast na gojišču MEA (prva plošča od leve proti desni), MEA 10 % NaCl (prvi stolpec zgoraj), MEA s 35 % glukoze (prvi stolpec spodaj), MEA 30% NaCl (drugi stolpec zgoraj) in MY70F (drugi stolpec spodaj) (**liha št.**).

#### 4.3.3.3 Mikromorfologija

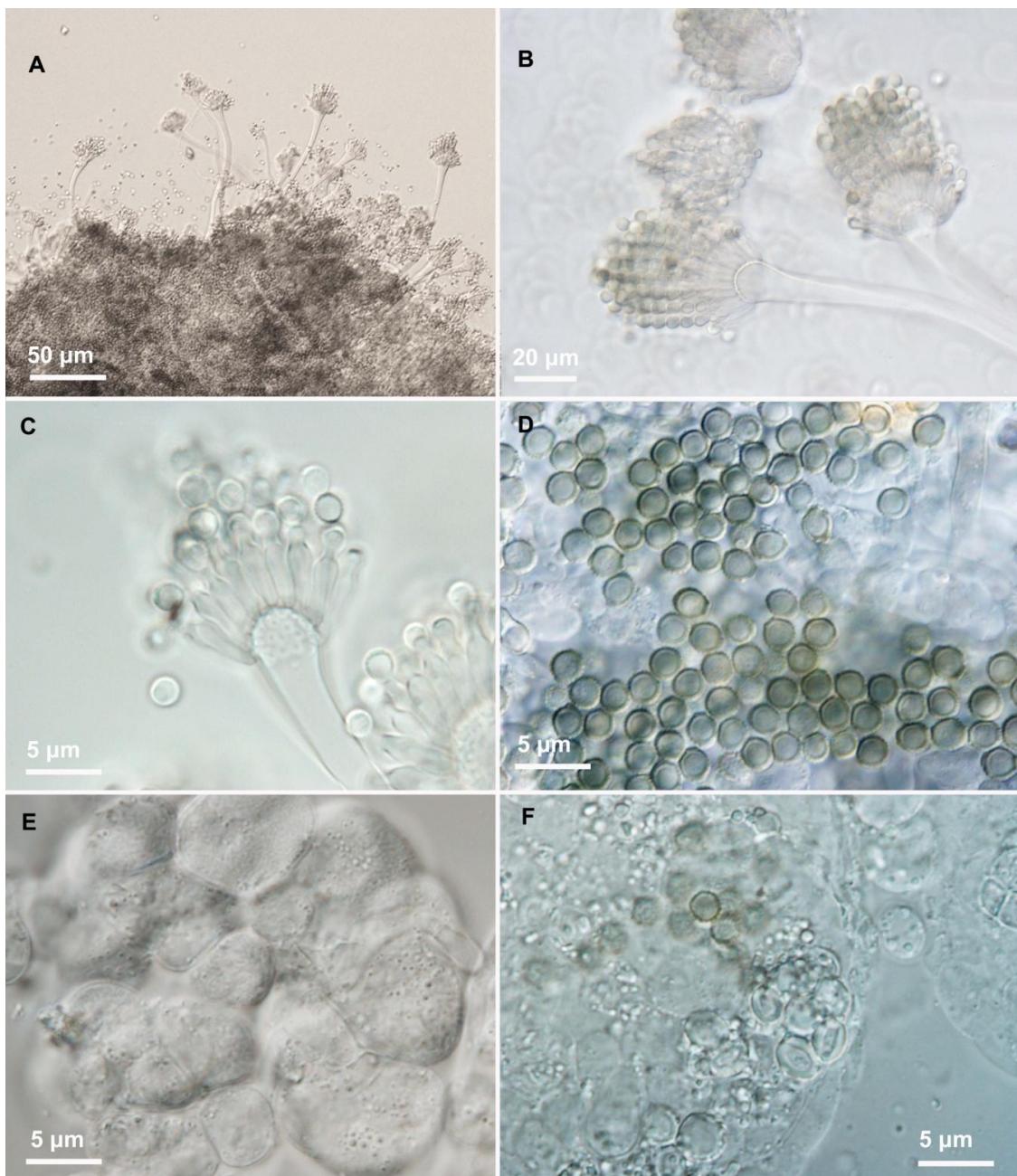
Preparat za mikromorfološko identifikacijo izbranih sevov smo pripravili iz vzorca kolonije, zrasle na gojišču CY40. Izmerili smo strukture sevov pod mikroskopom in jih prikazali v Preglednici 14 in 15. Fotografije struktur pod mikroskopom so prikazane na Slikah 19–25. Konidioforji *A. penicilliodes*, *A. vitricola*, *A. versicolor* so si med seboj podobni po zeleni obarvanosti, ostali so brezbarvni. Metule so prisotne le pri *A. versicolor* (Slika 25), in sicer so v povprečju dolge 6,5 µm (od 5,1 do 7,3) ter široke 4,0 µm (od 2,9 do 5,2). Fialide so pri vseh izolatih zelene, razen pri *A. restrictus* sp. 2, kjer so brezbarvne. Površina konidijev je pri vseh izbranih izolatih nagubana. Izolata *A. penicilliodes* sp. 2 in sp. 3 imata na konidijih bodice, ki jih pod mikroskopom nismo mogli izmeriti, ker so izredno majhne. Bodičaste konidije imata tudi *A. restrictus* sp. 2 (dolžina bodic cca. 0,77 µm) in *A. versicolor* (dolžina cca. 60 µm). V primeru seva *A. penicilliodes*, EXF-10425, smo na preparatih, pripravljenih po štirih tednih inkubacije, pod mikroskopom opazili kleistotecije (Slika 19), ki predstavljajo spolno fazo.

Preglednica 14: Mikromorfološke lastnosti (konidioforji, vezikli) izbranih sevov.

IZOLAT	KONIDIOFOR				VEZIKEL			
	vrsta	širina (µm)	dolžina (µm)		širina (µm)	dolžina (µm)		
		od—do	$\bar{x}$	>	od—do	$\bar{x}$	od—do	$\bar{x}$
<i>A. penicillioides; EXF-10425</i>		5,8—7,2	6,4	183	9,9—13,7	12,2	17,2—38,5	30,3
<i>A. penicillioides sp. 1; EXF-10431</i>		2,2—4,6	3,8	108	9,4—11,9	9,6	21,8—34,9	27,5
<i>A. penicillioides sp. 2; EXF-10353</i>		4,9—7,1	6,5	332	13,2—16,7	16,4	26,3—53,5	50,6
<i>A. penicillioides sp. 3; EXF-10401</i>		6,1—7,3	7,0	505	13,3—16,5	15,9	20,4—44,9	39,6
<i>A. vitricola; EXF-10378</i>		5,5—7,1	6,4	208	11,9—14,7	14,1	30,1—47,8	38,6
<i>A. restrictus sp. 2; EXF-10379</i>		3,3—5,0	4,3	193	7,6—9,7	8,4	18,3—29,2	25,6
<i>A. versicolor; EXF-10409</i>		2,2—4,1	2,8	126	8,8—9,7	9,3	19,2—26,0	23,2

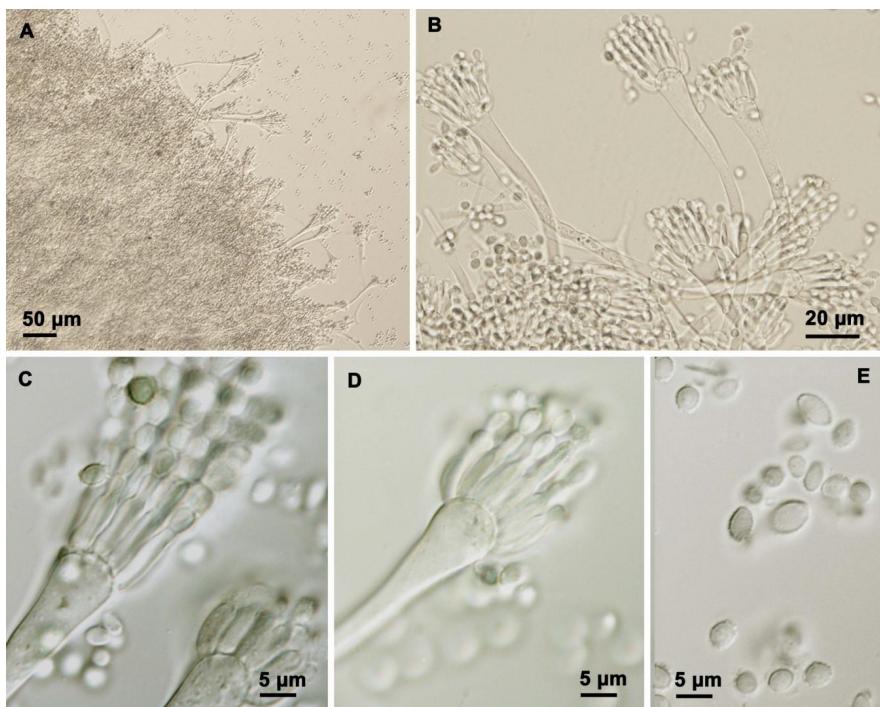
Preglednica 15: Mikromorfološke lastnosti (fialide, konidiji) izbranih sevov.

IZOLAT	FIALIDA				KONIDIJ				
	vrsta	širina (µm)	dolžina (µm)		širina (µm)	dolžina (µm)			
		od—do	$\bar{x}$	od—do	$\bar{x}$	od—do	$\bar{x}$	od—do	
<i>A. penicillioides; EXF-10425</i>		2,1—3,4	2,9	8,9—10,7	10,0	3,4—4,1	3,9	4,4—5,2	4,8
<i>A. penicillioides sp. 1; EXF-10431</i>		2,4—3,2	2,7	9,2—10,8	10,4	2,6—3,4	3,0	3,9—4,7	4,3
<i>A. penicillioides sp. 2; EXF-10353</i>		2,1—3,2	2,8	6,5—7,5	7,3	2,5—3,3	3,1	3,5—4,6	4,2
<i>A. penicillioides sp. 3; EXF-10401</i>		1,7—3,1	2,5	7,0—8,3	7,9	1,7—2,5	2,1	3,1—4,2	3,6
<i>A. vitricola; EXF-10378</i>		2,1—3,5	2,8	7,7—8,5	8,2	3,0—3,9	3,7	3,6—5,2	4,7
<i>A. restrictus sp. 2; EXF-10379</i>		2,4—3,3	2,9	7,6—8,4	8,1	3,3—4,1	3,7	4,3—5,1	4,6
<i>A. versicolor; EXF-10409</i>		1,9—3,1	2,5	4,4—5,9	5,5	2,5—3,6	2,7	2,5—3,4	3,1



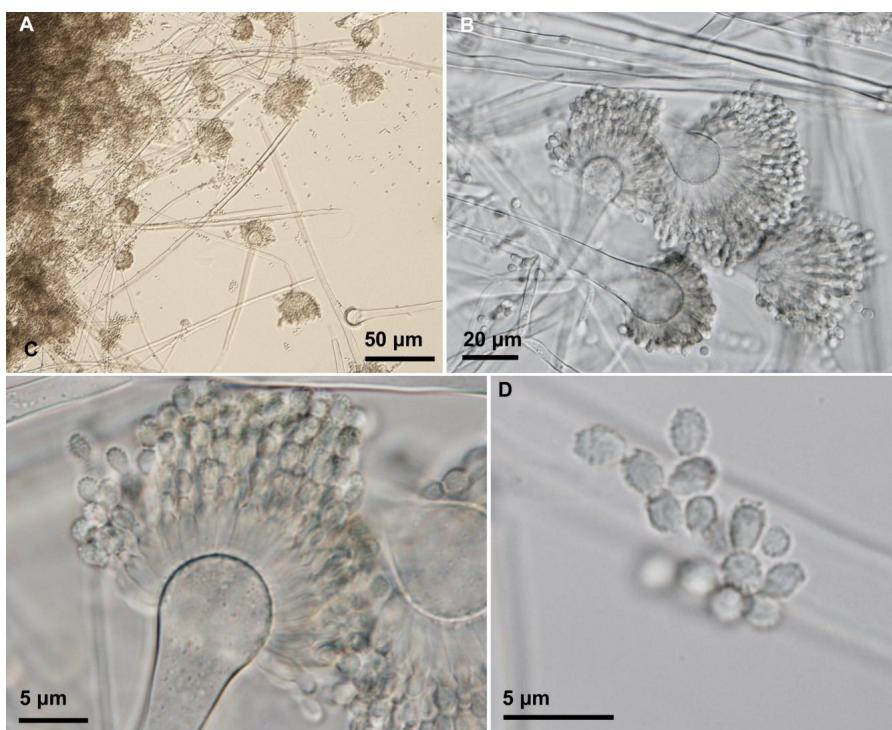
Slika 19: Mikromorfologija vrste *A. penicillioides*; EXF-10425 (RCS 24B).

Legenda: Konidioforji (A: 100x povečava; B: 400x pov., C: 1000x pov.); konidiji (D: 1000x pov.); spolne strukture– plodišča kleistoteciji in aski (E, F: 1000x pov.).



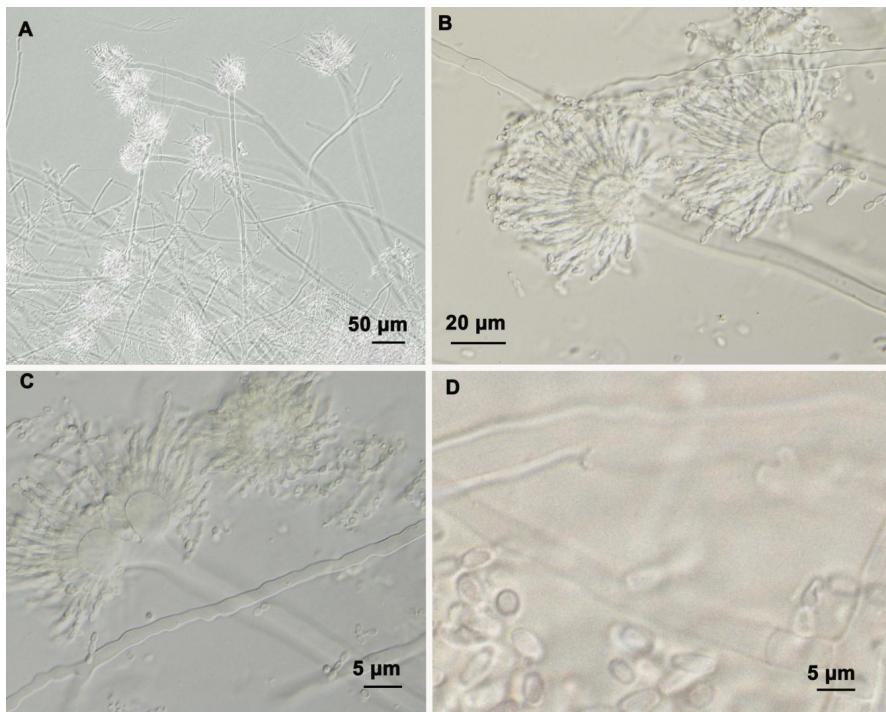
Slika 20: *A. penicillioides* sp. 1; EXF-10431 (RCS 25C).

Legenda: Konidioforji (A: 100x povečava; B: 400x pov., C in D: 1000x pov.); konidiji (E: 1000x pov.).



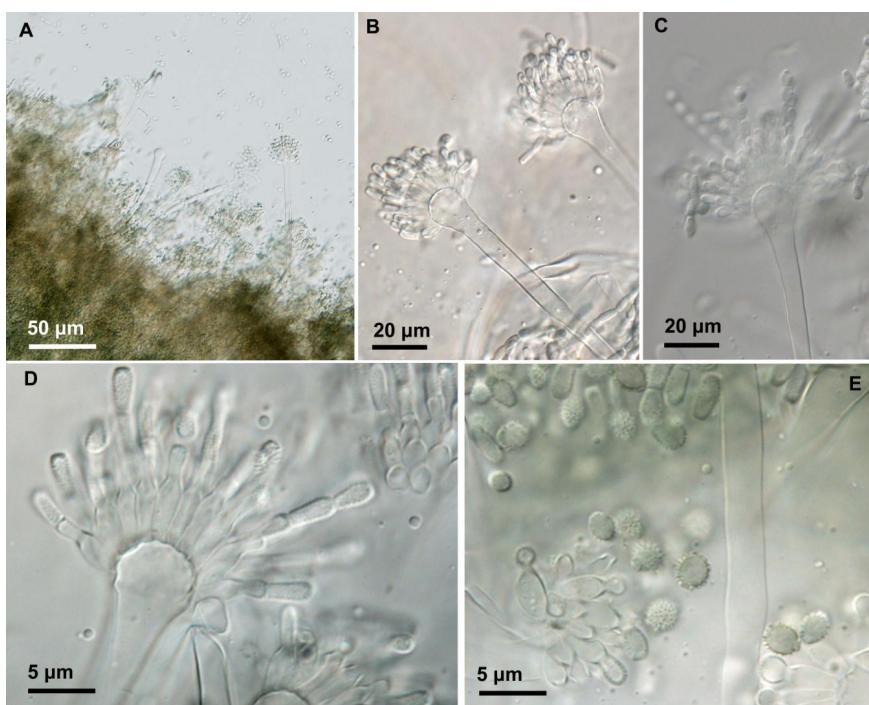
Slika 21: *A. penicillioides* sp. 2; EXF-10353 (RCS 24A).

Legenda: Konidioforji (A: 100x povečava; B: 400x pov., C: 1000x pov.); konidiji (D: 1000x pov.).



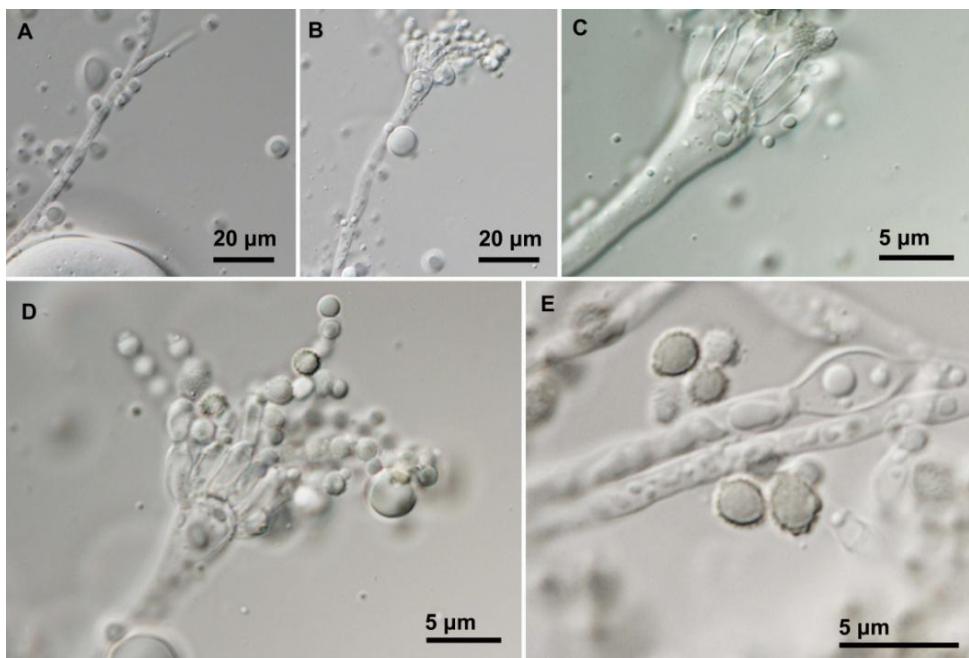
Slika 22: *A. penicillioides* sp. 3; EXF-10401 (RCS 22C).

Legenda: Konidioforji (A: 100x povečava; B: 400x pov., C: 1000x pov.); konidiji (D: 1000x pov.).



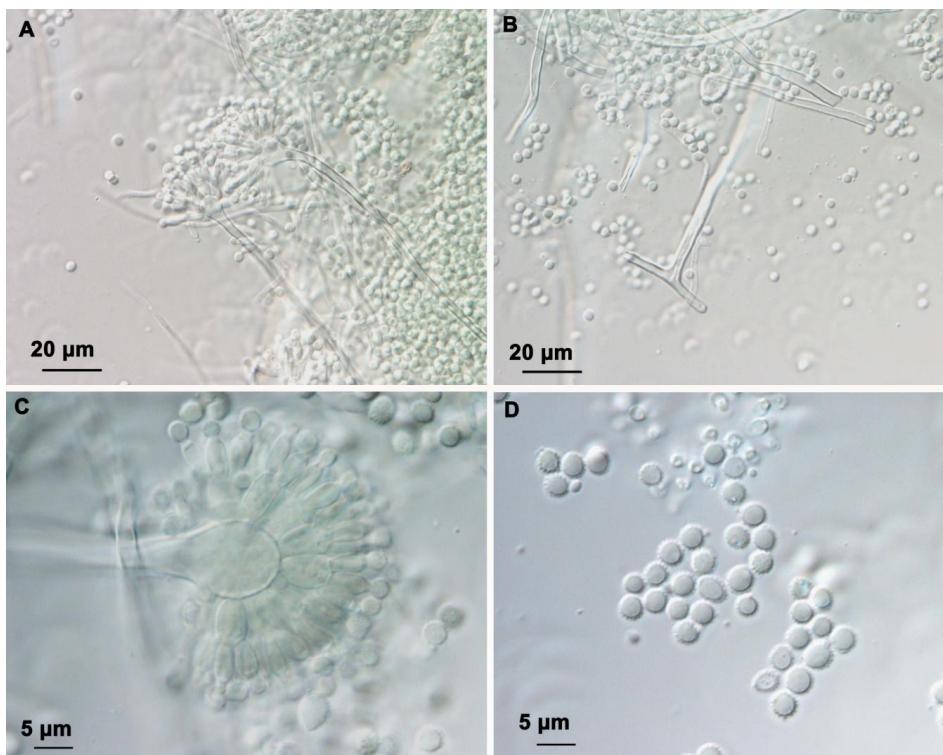
Slika 23: *A. vitricola*; EXF-10378 (RCS 21A).

Legenda: Konidioforji (A: 100x povečava; B in C: 400x pov., D: 1000x pov.); konidiji (E: 1000x pov.).



Slika 24: *A. restrictus* sp. 2; EXF-10379 (RCS 22A).

Legenda: Konidioforji (**A** in **B**: 400x pov., **C** in **D**: 1000x pov.); konidiji (**E**: 1000x pov.).



Slika 25: *A. versicolor*; EXF-10409 (RCS 15C).

Legenda: Konidioforji (**A** in **B**: 400x pov., **C**: 1000x pov.); metule (**C**); konidiji (**D**: 1000x pov.).

#### 4.3.3.4 Živost spor izbranega glivnega seva

S testoma obdelave glivnih spor z etanolom in dušikom smo preverjali občutljivost oz. odpornost spor na kemične uničevalce, kar je zelo pomemben podatek za restavratorstvo in ohranjanje umetniških slik. V Preglednici 16 so predstavljeni rezultati testa na izolatu EXF-10431. Pri testu z etanolom smo uporabili filtre, ki zadržijo glivne spore. Pri tem poskusu je na plošči z neobdelanimi sporami (kontrola) zraslo  $1,6 \times 10^6$  CFU/ml. Na ploščah s sporami, obdelanimi z etanolom se kolonije niso razvile ne po enem, kot tudi ne po dveh tednih inkubacije, čeprav so na plošči po 1-minutni obdelavi z etanolom pod filtrom bili vidni zametki kolonij v obliki dvignjenega filtra. Pri testu z dušikom kolonije niso rasle. Pri obeh testih smo imeli velike težave s kontaminacijami.

Preglednica 16: Št. kolonijskih enot (CFU/ml), zraslih na gojiščih, po obdelavi z etanolom in inkubaciji v dušikovi atmosferi.

Izolat	TEST Z ETANOLOM				TEST Z DUŠIKOM				
	Čas izpostavljenosti EtOH				Filter				
	0 min	1 min	5min	10 min	1.	2.	3.	4.	5.
<b>EXF-10431</b>	$1,6 \times 10^6$	/	/	/	/	/	/	/	/

Legenda: (/) kolonije niso zrasle; (EtOH) etanol.

## 4.4 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

### 4.4.1 Izolati, pridobljeni z gojitvenimi metodami

S pomočjo kultivacijskih metod smo izolirali in identificirali le nekaj predstavnikov bakterijskih vrst, in sicer največje število iz debla *Firmicutes*, nekaj pa tudi iz debel *Actinobacteria* in *Proteobacteria*. Rodovi pridobljenih izolatov s podrobnostmi so predstavljeni v Preglednici 17. Izmed izolatov aktinobakterij smo bakterijo *Micrococcus luteus* pridobili le iz vzorca zraka, *Brevibacterium* sp. pa le iz vzorca stene. Aktinobakterijo *Brachybacterium sacelli* smo osamili tako s stene kot tudi z barvne in hrbtnje strani vzorcev slik. Proteobakterija *Sphingomonas melonis* je bila značilna predvsem za vzorec RCS 26, osamili pa smo jo tudi s slike RCS 22. Izolate, ki pripadajo deblu *Firmicutes* smo osamili iz vzorca RCS 22. Z barvne plasti smo namreč pridobili *Paenibacillus lautus*, izolate *Bacillus foraminis*, *Bacillus cereus* in *Virgibacillus* sp. pa le s hrbtnje strani.

Preglednica 17: Podatki o izoliranih bakterijskih sevih.

VZOREC	PODVZOREC	EXB ŠT.	KONČNA IDENTIFIKACIJA	OSNOVA IDENTIFIKACIJE	IZOLACIJSKO GOJIŠČE
RCS 15	C	L-1741	<i>Brachybacterium sacelli</i>	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
		L-1742	<i>Brachybacterium sacelli</i>	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
RCS 22	A	L-1679	<i>Paenibacillus lautus</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1681	<i>Paenibacillus lautus</i>	16S rDNA	M9 Ch
RCS 22	B	L-1680	<i>Sphingomonas melonis</i>	16S rDNA	HA Ch
	D	L-1683	<i>Bacillus foraminis</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1684	<i>Bacillus cereus</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1685	<i>Bacillus foraminis / horneckiae</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1682	<i>Virgibacillus</i> sp.	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
RCS 25	A	L-1686	<i>Brachybacterium sacelli</i>	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
RCS 26	B	L-1687	<i>Sphingomonas melonis</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1690	neidentificiran izolat	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
		L-1691	neidentificiran izolat	16S rDNA	M9 Ch
		L-1692	<i>Sphingomonas melonis</i>	16S rDNA	MY50G Cy
	C	L-1688	<i>Sphingomonas melonis</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1689	neidentificiran izolat	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
RCS STENA		L-1676	<i>Brevibacterium</i> sp.	16S rDNA	HA Ch
		L-1739	<i>Brachybacterium sacelli</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1740	<i>Brachybacterium sacelli</i>	16S rDNA	HA Ch
		L-1677	<i>Brevibacterium</i> sp.	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
		L-1693	<i>Brachybacterium sacelli</i>	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch
RCS ZRAK	PO ANALIZI	L-1678	<i>Micrococcus luteus</i>	16S rDNA	HA + 5% NaCl Ch

#### 4.5 NEGOJITVENE TEHNIKE – METAGENOMIKA

Za širši vpogled v sestavo in diverzitetu glivne ter bakterijske združbe umetniških slik smo določili nukleotidna zaporedja po pomnožitvi odseka ITS2 regije za glive in odsekov 16S rDNA za bakterije, in sicer iz vzorca izolirane celotne DNA s slike z oznako RCS 22. Uporabili smo tehnologijo Ion Torrent.

##### 4.5.1 Analiza metagenoma gliv

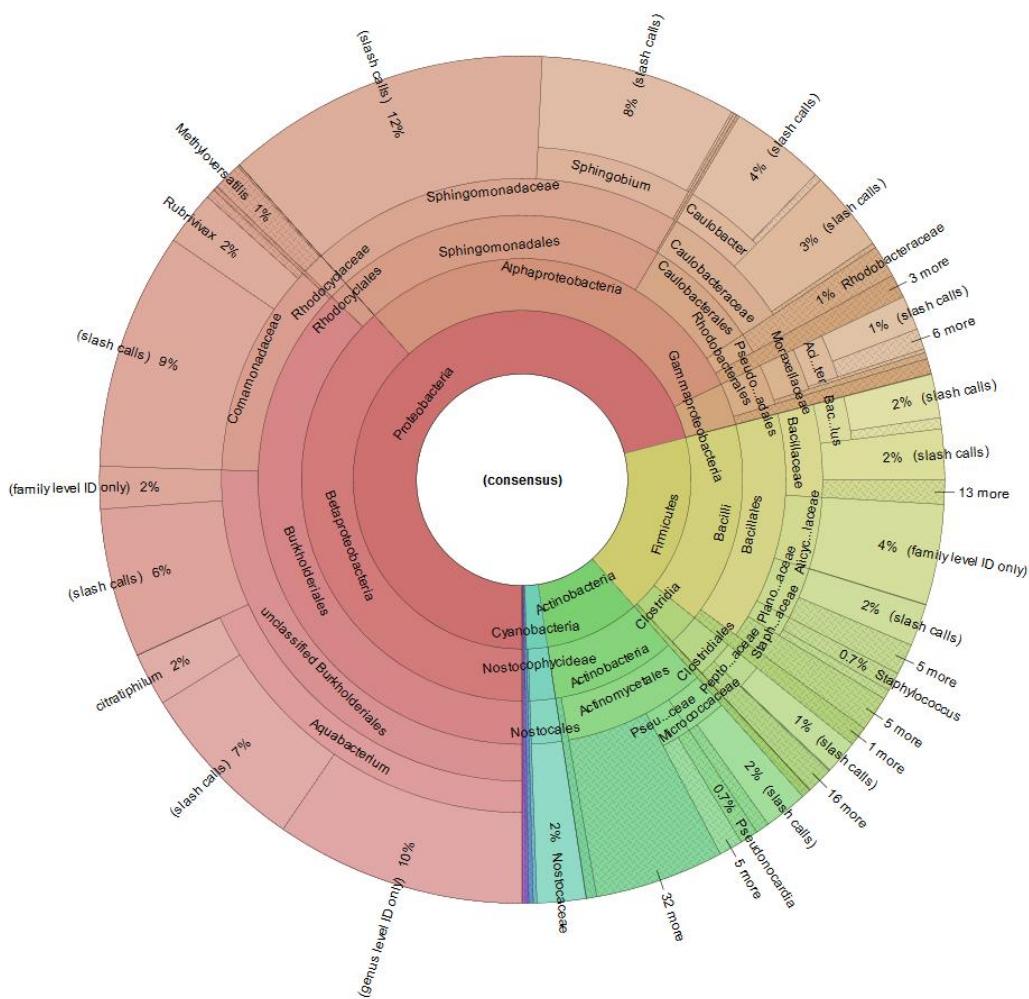
Število identificiranih sekvenc je znašalo 1503, od teh jih je kar 90 % pripadalo vrsti *Wallemia sebi*. Ostalim vrstam rodu *Wallemia* je pripadalo cca. 10 % sekvenc. Zastopanost preostalih identificiranih vrst, kot so *Chrysosporium carmichaelii*, *Arachnotheca glomerata*, *Clonostachys* sp. in druge, je bila manjša od 5 %. Manj kot 1 % vseh identificiranih sekvenc je pripadal tudi vrsti *A. penicillioides* in vrstam *Phaeosphaeriopsis obtusispora*, *Capnodiales* sp., *Phaeosphaeriopsis* sp., *Auxarthron thaxteri*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Auriculariales* sp., *Peniophorella praetermissa*.

Zaradi nizkega števila identificiranih sekvenc ITS so podatki zelo nezanesljivi.

#### **4.5.2 Analiza metagenoma bakterija**

Število zaporedij, primernih za analizo, je bilo 588 984. Od tega jih je bilo identificiranih 383 681, ostalo so bila zaporedja s številom kopij, manjšim od 10 in pa zaporedja, ki se jih ni dalo identificirati.

Sestava metagenoma bakterij v vzorcu RCS 22 je predstavljena na sliki 26. Največji delež bakterijskih predstavnikov v padajočem zaporedju predstavljajo beta-, alfa- in gama-proteobakterije. Proteobakterijam po deležu sledijo firmikuti, in sicer predstavniki redov *Bacillales* in *Clostridiales*. V manjšem deležu se nahajajo še aktinomicete ter cianobakterije, in sicer predstavniki reda *Nostocales*.



Slika 26: Taksonomska sestava metagenoma bakterij v vzorcu RCS 22.

## 5 RAZPRAVA

Obseg kontaminacije, hitrost ter potek biodeterioracije in sestava mikrobne združbe umetniških slik olje na platnu določajo predvsem okoljski pogoji. Poleg narave materialov, ki gradijo sliko, imata najpomembnejšo vlogo pri tem relativna vlažnost in temperatura prostora (Tiano, 2002, Strzelczyk, 2004). Biodeterioracija se na slikah kaže v obliki prekritja vzorcev,obarvanja ter razbarvanja zaradi izločenih encimov in metabolnih produktov, ter odpada barvne plasti zaradi prodora mikroorganizmov z zadnje strani slike (Tiano, 2002, Allsop in sod., 2004; Strzelczyk, 2004), kar smo opazili tudi na vzorčenih slikah. Za mikrobne vrste detektirane na obeh straneh iste slike sklepamo, da so se prebile preko zadnje strani platna do barvne in imajo celulolitično aktivnost (Strzelczyk, 2004). Tak primer je *A. restrictus* sp. 2 z vzorca RCS 25.

Kontaminacija je bila močnejša v primerih saniranih slik (prelepljeno platno v primeru vzorca RCS 22, povoskana površina na vzorcu RCS 24), najverjetneje zaradi uporabe svežih materialov, ki ob sanaciji vsebujejo višjo vsebnost vode in/ali dlje časa trajajoče izpostavljenosti neustreznim pogojem (Capodicasa in sod., 2010). Relativna zračna vlažnost v depaju je v letu 2014 za časovno obdobje 5 mesecev konstantno presegala 80 %, po trenutnih priporočilih za ohranjanje slik sicer ne sme presegati 65 % (Kavkler in sod., 2014). V primerjavi z barvno stranjo slik je bila hrbtna stran močnejše kontaminirana, s te strani naj bi se okužba običajno tudi pričela zaradi izpostavljenosti celuloznih polimerov platna zraku in morebitni vsebnosti težkih kovin v sestavi barvnih pigmentov (Tiano, 2002).

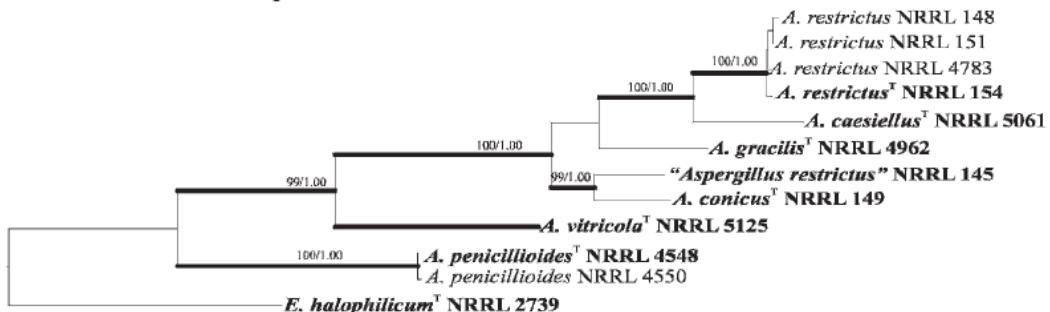
V raziskavi smo ugotovili, da je mikrobiota depaja RS sestavljena iz osmofilnih, kserotolerantnih in kserofilnih gliv ter v manjšem številu bakterij. Največ glivnih kolonij je zraslo ravno na identifikacijskih gojiščih za kserofile: DG18 ( $a_w$  0,95) ter MY10-12 ( $a_w$  0,93) in MY50G ( $a_w$  0,89). Večje število kolonij na gojišču DRBC ( $a_w$  cca. 1) je zraslo le v primeru brisa stene, kar nakazuje na višjo vsebnost vode na steni kot posledico morebitne kondenzacije vode iz zraka (WHO, 2009). Največ bakterijskih kolonij je zraslo na gojišču HA s 15 % NaCl. V muzejih ob ustreznih pogojih obstaja posebna muzejska mikrobiota, omejena na zgolj nekaj vrst gliv in bakterij, ki so zmožne rasti pri nizkih in ekstremno nizkih  $a_w$  (Kavkler in sod, 2014; Sterflinger, 2010). Identifikacija gliv s pomočjo regije ITS ter gena za beta-tubulin in kalmodulin je pokazala, da na slikah in v prostoru depaja prevladujejo predvsem vrste rodu *Aspergillus*. Rod je glede na predhodne študije pomembnejši predstavnik tipične muzejske mikrobiote (Kavkler in sod, 2014; Sterflinger, 2010). Izmed 14-ih izoliranih vrst rodu *Aspergillus* smo jih 6 prepoznali kot potencialno nove vrste, kar smo kasneje preverjali še s pomočjo morfološke identifikacije. Domnevno novi vrsti *A. penicillioides* sp. 1 in sp. 2 smo izolirali s kar šestih izmed osmih vzorčenih slik, *A. penicillioides* in domnevno novi vrsti *A. restrictus* sp. 1 ter sp. 2 pa s štirih izmed vseh

vzorčenih slik. Z dveh slik smo izolirali vrsto *A. vitricola* in domnevno novi vrsti *A. vitricola* sp. 1 ter *A. penicillioides*. Vrsta *A. versicolor* se je nahajala na eni izmed vseh slik. Poškodbe na slikah je težko povezati z določeno vrsto gliv, saj se je na slikah hkrati pojavljajo več različnih vrst. V manjšem številu so v vzorcih slik prisotne tudi ozmofilne kvasovke. Med seboj sorodni izolirani kvasovki *M. guillemontii* in *M. caribbica* sta znani po antagonističnih lastnostih ter pomembnih encimih, kot so na primer hitinaze, in beta-1,3-glukanaze (Wahengbam in sod., 2013; Bautista-Rosales in Calderon-Santoyo, 2013).

Rod *Aspergillus* spada med ubikvitarne gline zaprtotrosnice (deblo *Ascomycetes*, red *Eurotiales*, družina *Trichocomaceae*), ki so izjemno tolerantne do povisanih temperatur in znižane vodne aktivnosti (t.i. kserofili) (Gubka in sod., 2013). So heterotrofi, ki izrabljajo tako žive kot mrtve organizme in na splošno širok spekter substratov, ki vsebujejo ogljik. Glede hrani takoj nimajo posebnih zahtev, zato so poleg rodu *Penicillium* med najbolj razširjenimi glivami na svetu, vendar za razliko od penicilijev prevladujejo v tropskih in subtropskih območjih. So pomembni kvarljivci ter razgrajevalci hrane in ostalih organskih in anorganskih materialov. Večina izoliranih vrst iz te raziskave je, sodeč po literaturi, sposobnih napada dobrin rastlinskega izvora, ki vsebujejo zelo malo vode, kot so npr. žitarice ali bombaž. Omenjena lastnost je posebej poudarjena za vrsto *A. penicillioides* (Samson in Houbraken). Poleg tega se *A. penicillioides* nahaja tudi v zraku notranjih prostorov, hišnem prahu v povezavi s pršicami, raznih arhivih (Samson in Houbraken, 2010) in celo na barvanem steklu z zgodovinsko vrednostjo (Carmona in sod., 2006). Na barvanem steklu so našli tudi *A. restrictus* (Carmona in sod., 2006), ki se sicer pogosto nahaja na žitaricah in v zraku notranjih prostorov. Vrsta *A. versicolor* je pogosto prisotna na siru, žitaricah, v tleh, na oreščkih, začimbah, izdelkih iz suhega mesa (Samson in Houbraken, 2010). Najdena pa je bila tudi v knjižnicah na knjigah (Micheluz in sod., 2015), na stenskih poslikavah (Jurado in sod., 2008) in umetniških slikah različnih tehnik (Sterflinger, 2010). Literature o ekologiji vrste *A. vitricola* nismo našli.

V rodu *Aspergillus* so poznane različne spolne oblike, ki so jih raziskovalci po načelih Mednarodnega kodeksa poimenovanja rastlin do 1. 2011 uvrščali v devet teleomorfnih rodov: *Eurotium*, *Chaertosartorya*, *Emericella*, *Fennellia*, *Hemicarpenteles*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Sclero cleista* in *Stilbothamnium* (Samson in sod., 2014), medtem ko so nespolne oblike poimenovali kot *Aspergillus* spp. Po novem Mednarodnem kodeksu poimenovanja alg, gliv in rastlin (2011) dvojno poimenovanje vrst ni več možno. Raziskovalci so se odločili ohraniti anamorfno ime *Aspergillus*, ohranili pa so tudi delitev skupin aspergilov v podrodove in sekcije (Houbraken in sod., 2014).

Klasifikacija in identifikacija aspergilov na podlagi morfologije se je v zadnjih desetletjih zaradi veče zanesljivosti razširila na molekularne in kmetotaksonomske raziskave. Molekularne filogenetske analize uradno temeljijo na nukleotidnem zaporedju regije ITS rRNA, vendar ta lokus ni dovolj variabilen in natančen za zanesljivo identifikacijo vseh vrst znotraj rodu *Aspergillus*. Razlikovati ni možno predvsem med vrstama *A. restrictus* in *A. conicus* ter sorodnimi (Samson in sod., 2014), kar smo ugotovili tudi v naši raziskavi. Za večjo natančnost se predлага uporaba sekundarnega označevalca, ki mora biti univerzalen, variabilen, enostaven za pomnoževanje. Najprimernejša sta gena za kalmodulin (CaM) in beta-tubulin (BenA) (Samson in sod., 2014). Z naših vzorcev smo osamili in identificirali večinoma vrste rodu *Aspergillus* iz sekcije *Restricti* in *Nidulantes* (*A. versicolor*) (Slika 27), pri čemer smo s pomočjo uporabe sekundarnih označevalcev CaM in BenA najverjetneje odkrili nove vrste, sorodne *A. penicillioides*, *A. restrictus* in *A. vitricola*.



Slika 27: Sekcija *Restricti* po delitvi rodu *Aspergillus* na podrobove in sekcije (Peterson in sod., 2008).

Točnost identifikacije z molekularnimi označevalci smo podkrepili še z morfološko identifikacijo na identifikacijskih gojiščih. Gojišče CREA izboljša morebitno producijo kislin, ki se kaže kot rumena cona okrog kolonij (Pitt in Hocking, 2009; Samson in Houbraken, 2010). Izbrani sevi na tem gojišču niso producirali kislin, zato sklepamo, da tudi na slikah na ta račun ne povzročajo barvnih madežev. Na gojišču CYA, inkubiranem pri 37 °C, sevi niso zrasli. Rast pri tej temperaturi je lahko pomemben taksonomski znak, odsotnost rasti pa pomeni tudi, da za človeka niso patogeni (Samson in sod., 2014), sicer pa lahko predstavljajo alergene (WHO, 2009). Izolati so na gojiščih z višjo  $a_w$ , kot sta CYA in MEA slabo, ali sploh niso rasli, z izjemo *A. versicolor*, katere optimum za rast kolonij se nahaja pri temperaturi 27 °C in  $a_w$  0,98 (Pitt in Hocking, 2009). Za ostale izolate, kot sta *A. penicillioides* in *A. restrictus* tudi literatura omenja slabo rast na teh dveh vrstah gojišč (Samson in Houbraken, 2010). Na gojišču CYA, ki izboljša producijo sekundarnih metabolitov in eksudatov (Dupont, 2009), so se po dveh tednih inkubacije na kolonijah izolata *A. versicolor* pojavile rožnate kapljice, okrog kolonij pa rjavi v agarju topni pigmenti. Tovrstno obarvanje bi lahko bilo razlog za obarvanje na slikah oz. v našem primeru za rjavkaste madeže na steni, od koder smo osamili omenjen izolat. Na gojišču MEA s 30

% NaCl ( $a_w$  0,76) sevi niso rasli, medtem ko je večina rastla na gojišču s 70 % glukoze/fruktoze (MY70F) s primerljivo vodno aktivnostjo. Prav tako na gojišču MEA z 10 % NaCl, na podlagi česar sklepamo, da sevi bolje tolerirajo dodatek sladkorja kot pa soli. Za *A. penicillioides* je sicer znano, da na gojiščih z dodanim NaCl rast limitira  $a_w$  0,75, na gojiščih z dodano glukozo pa 0,73 (Pitt in Hocking, 2009). Z nižanjem  $a_w$  na gojiščih so se manjšali tudi premeri kolonij, kar je vidno v primerih MY50G in MY70GF ter MEA 30 % NaCl. Izolat *A. versicolor* na gojiščih MY70GF in MEA 30 % NaCl sploh ni rastel, kar se sklada z zapisi (Samson in Houbraken, 2010), da minimalna  $a_w$  vrednost za rast vrste *A. versicolor* znaša med 0,78 in 0,80 pri temperaturi 25 °C.

Makromorfološke razlike med izbranimi sevi so bile predvsem v barvi kolonij in reverza, pa tudi v konsistenci ter obliku kolonij ter hitrosti rasti. Mikromorfološke pa v barvi, obliku, dolžini in širini konidioforjev, veziklov, fialid, konidijev in morebitnih metul.

Kolonije vrste *A. penicillioides* naj bi bile na gojišču M40 sodeč po opisih rastoče v zrak in zelene barve, enake barve naj bi bil tudi reverz (Samson in Houbraken, 2010). S temi opisi se sklada morfologija kolonij izbranega izolata *A. penicillioides*, po zaporedju podobnega tipskemu sevu. Kolonije domnevno nove vrste *A. penicillioides* sp. 2 so bile na gojišču DG18 oranžne in na M40 bele barve, reverz kolonij je vseboval tudi rdečkaste tone. Reverz domnevno nove vrste *A. penicillioides* sp. 1 je bil svetle barve, kolonije na gojišču CY40 pa so zažete, kar pa glede na opis v literaturi naj ne bi bila lastnost vrste *A. penicillioides* (Samson in Hocking, 2010). Sev *A. penicillioides* sp. 3 na večini identifikacijskih gojišč ni rastel (niti na DG18, s katerega smo ga izolirali). Konidiofori izbranih sevov *A. penicillioides* so bili hialini ali rahlo zeleno pigmentirani, širine 3–7 µm, kar se sklada z opisi (Samson in Houbraken, 2010). Izmed treh domnevno novih vrst, sorodnih *A. penicillioides*, se izolat vrste *A. penicillioides* sp. 1 (Slika 20) razlikuje od izolata *A. penicillioides* v ožjem veziklu in izrazito stebričasti postavitevi fialid. Vezikli *A. penicillioides* sp. 1 so bili fertilni le na zgornji polovici, kar je sicer lastnost *A. restrictus*, medtem ko so vezikli *A. penicillioides* fertilni čez več kot 2/3 površine (Samson in Houbraken, 2010). Bolj podobni med seboj sta si vrsti *A. penicillioides* sp. 2 (Slika 21) in sp. 3 (Slika 23), in sicer v širini in okrogli obliku vezikla ter razporeditvi fialid, kar rezultira v kroglastih glavicah. Konidiji vseh izbranih sevov *A. penicillioides* so imeli hrapavo površino, *A. penicillioides* sp. 2 in sp. 3 sta na konidijih imela bodice, oboje je v skladu z literaturo (Samson in Houbraken, 2010). V primeru izbranega seva *A. penicillioides* smo po 4 tednih inkubacije ob pregledu mikroskopskega preparata z gojišč M40 in MY50G odkrili domnevna plodišča (kleistotecije) z askosporami (Slika 19). Teleomorf za to vrsto sicer ni znan (Samson in sod., 2010). Na podlagi morfoloških znakov ocenujemo, da se izolati *A. penicillioides* sp. 1, sp. 2 in sp. 3 razlikujejo od vrste *A. penicillioides*. V primeru domnevno nove vrste *A. restrictus* sp. 2 so kolonije na gojišču CY40 dobro sporulirale po enem tednu

inkubacije, po opisih naj bi *A. restrictus* rastel počasi in pričel sporulirati šele po dveh tednih. Skladno z opisom vrste *A. restrictus* so konidiofori temno zeleni (Samson in Houbraken, 2010). Kolonije so bile zažete, po čemer naj bi se *A. restrictus* makromorfološko razlikoval od *A. penicilliodes* (Samson in Hocking, 2010). Konidiofori *A. restrictus* sp. 2 so bili hialini, gladkih sten, kar ustreza opisom iz literature. Prav tako ustreza tudi izgled, ter dolžina in širina veziklov, fialid in konidijev. Sodeč po morfoloških rezultatih in primerjavi z opisi ocenjujemo, da izolat *A. restrictus* sp. 2 spada v vrsto *A. restrictus*, raznolikost v DNA zaporedjih pa je lahko rezultat znotrajvrstne variabilnosti. Literatura za makromorfološko in mikromorfološko karakterizacijo vrste *A. vitricola* ni dostopna, zato dobljenih rezultatov ni bilo mogoče primerjati in o njih razpravljati. Mikromorfološki znaki našega izolata *A. versicolor* se ujemajo z opisom mikromorfoloških v literaturi, saj se izgled struktur in njihova velikost, ujemajo z opisi iz literature (Samson in Houbraken, 2010).

S kultivacijo smo izolirali in identificirali le nekaj bakterijskih sevov. Bakterije so na umetniških slikah prisotne v manjšem številu v primerjavi z glivami, ki so zmožne rasti pri nižjih vodnih aktivnostih in uporabi vode v kondenzirani obliki (Tiano, 2002). Sevi so pripadali vrstam debel *Firmicutes*, *Proteobacteria* in *Actinobacteria*. O dominanci omenjenih bakterijskih debel poročajo tudi ostale študije (Lopez-Miras in sod., 2013a in 2013b).

Trenutno najbolj razširjeni negoitveni metodi določevanja sestave mikrobne združbe sta DGGE in FISH, v zadnjem času tudi uporaba molekularnih metod na podlagi analize molekul RNA, s katerimi se hkrati lahko določa še metabolna aktivnost (Sterflinger, 2010). Uporaba negoitvenih metod v preteklih študijah (Lopez-Miras in sod., 2013a) je razkrila dominanco gliv redov *Pleosporales* in *Saccharomycetales* ter dominanco aktinobakterij in proteobakterij (Sterflinger, 2010; Lopez-Miras in sod., 2013b). Z analizo metagenoma vzorca RCS 22, odvetega z oljne slike na platnu, smo ugotovili, da izmed identificiranih glivnih vrst dominira *Wallemia sebi*, vendar pa so dobljeni rezultati precej nezanesljivi, saj je število identificiranih sekvenc bilo prenizko. Razlog temu je najbrž ta, da tehnika z uporabljenimi oligonukleotidni začetniki ni dovolj optimizirana, namreč z izvedbo kapilarne gelske elektroforeze smo ugotovili, da so se vse sekvene, daljše od 400 bp, izgubile. V primerjavi s temi rezultati smo s klasičnimi metodami z iste slike osamili 8 različnih vrst, med njimi tudi *A. penicilliodes*. Analiza metagenoma bakterij je pokazala dominanco predstavnikov debla proteobakterij, katerim sledijo firmikuti (družini *Bacilliaceae* in *Clostridiaceae*), kar je ravno obratno od naših rezultatov, pridobljenih s kultivabilnimi metodami. Razlog za razlike je najbrž nezmožnost detekcije proteobakterij s kultivacijo, kadar so v stanju VBNC ter nezmožnost detekcije firmikutov v obliki spor z nekultivabilnimi metodami (Kavkler in sod., 2014). Za celostne rezultate je priporočljiva kombinacija gojitvenih in negoitvenih tehnik, saj naj bi z gojitvenimi tehnikami detektirali le del bakterij in gliv v okoljskih

vzorcih (Sterflinger, 2010). V naši raziskavi smo se odločili izvesti analizo metagenoma na enem izmed vzorcev z uporabo tehnologij NGS, ki zaenkrat še velja za novost na področju analiz metagenomike umetniških slik. Na to temo doslej ni bilo moč zaslediti nobene študije. Analiza metagenoma je v manjšem deležu pokazala prisotnost bakterij debla *Actinobacteria* in cianobakterij družine *Nostocaceae*. Cianobakterije naj bi v prisotnosti svetlobe prav tako povzročale poškodbe na zgodovinskih artefaktih. Sicer dušik fiksirajoče cianobakterije rodu *Nostoc* v odsotnosti dušika prizvajajo organsko snov, ki jo za svojo rast izkoriščajo heterotrofi (Cifferi, 1999). Za izolacijo cianobakterij bi morali uporabiti bogatitvena gojišča za fotoavtotrofe ter podaljšati čas gojenja (Nugari in sod., 2009).

Test viabilnosti spor in vegetativnih celic po aplikaciji 70 % etanola je pokazal, da je učinkovitost delovanja etanola na spore odvisna od kontaktnega časa, ki naj bo enak ali daljši od 3 minut. Študije sicer priporočajo stik, daljši od 2 minut (Sterflinger, 2010). Pri preverjanju učinka dušika na spore smo imeli večje težave s filteri, ki so se med inkubacijo najbrž preveč posušili, kar je povzročilo odmrtje spor. V tem poskusu zato učinka dušika na spore nismo dokazali.

V restavratorstvu obstaja v zadnjem času trend zagotovitve stabilnih okoljskih parametrov (vlaga) z namenom omejevanja glivne kontaminacije in biodeterioracije. Za uničenje plesni uporabljajo gama žarke, tekoča ali uplinjena kemična sredstva, inkubacijo v anoksični atmosferi z dušikom ali argonom. Pri izbiri metode za zatiranje je treba v izogib poškodbam ali celo uničenju umetnine dobro poznavati prednosti in slabosti same metode ter materialne karakteristike predmeta (Sterflinger, 2010). Zaradi morebitne obremenjenosti zraka v muzeju s plesnimi je priporočljiva uporaba filtrov HEPA znotraj klimatskih naprav (Sterflinger in Pinar, 2013). Analiza zraka v depaju RC je pokazala srednjo stopnjo obremenjenosti s plesnimi, saj znaša okrog 500 CFU/m<sup>3</sup> (Zalar in sod., 2015). Po vzorčenju slik se je št. CFU v prostoru 5x povečalo, kar pripisujemo kroženju zraka v prostoru zaradi gibanja po prostoru, premikanja vrat in slik ter jemanja vzorcev.

Detektiranje in odkrivanje glivnih ter bakterijskih vrst, ki kolonizirajo in uničujejo različne materiale ob prisotnosti različnih okoljskih dejavnikov, je ključnega pomena za konzerviranje umetniških slik. V naši raziskavi smo detektirali kserofilne vrste, o katerih so že poročali, odkrili pa smo tudi nekaj novih. Pri tem smo uporabili gojišča z nižjimi vodnimi aktivnostmi in sekundarne filogenetske označevalce, kar lahko koristi pri nadaljnjih študijah s tega področja. Ob dobrem poznavanju vrst in odnosov med organizmi lahko proces biodeterioracije bolje razumemo in razvijemo ustreznejše ter učinkovitejše metode omejevanja kontaminacije in/ali biodeterioracije. Za širšo sliko in razumevanje delovanja mikrobnih združb v povezavi z biodeterioracijo umetniških slik bi bilo treba dodelati ali spremeniti nekatere teste naše raziskave, na primer princip in

potek testa z anoksi metodo. Za širšo sliko bi bilo dobro preveriti poškodbe vlaken (FTIR, ESEM/EDX, IR, Raman), encimsko aktivnost sevov (API ZYM) in njihov biodeterioracijski potencial, nato pa testirati uspešnost fungicidnih sredstev. To bi omogočilo povezavo naših dobljenih rezultatov z zgradbo slik in komponentami oljnih barv. Prav tako nam za boljše razumevanje obširnejše kontaminacije nekaterih slik manjkajo podatki o pogojih hranjenja na prejšnjih lokacijah ter morebitnih nesrečah (morebitne poplave itd.).

## 6 SKLEPI

- Od skupno osmih oljnih slik na platnu, starih od 300 do 400 let, smo s sedmih osamili 109 glivnih izolatov, od katerih smo jih identificirali 88 in jih uvrstili v 24 vrst. Osamili smo tudi 22 bakterijskih izolatov, ki smo jih uvrstili v 8 vrst.
- Izolati so kserotolerantni in kserofilni, saj na gojiščih brez dodanih topljencev rastejo slabo ali pa sploh ne.
- Na hrbtni strani oljnih slik na platnu se nahaja večje število plesni in bakterij v primerjavi z barvno stranjo slike. Sklepamo, da se plesni primarno naselijo na hrbtni strani slike ter prodrejo skozi celulozno platno do barvne plasti in se tam lahko razrastejo, kar pa se odraža v obliki razpok.
- Na mestih predhodnih restavratorsko-konservatorskih posegov na slikah, kot so podlepljena platna, se nahaja večje število mikroorganizmov. Kontaminacija je obsežnejša v primerjavi z ostalimi, nesaniranimi, predeli slike.
- Uporaba klasičnih gojitvenih tehnik omogoča detekcijo in izolacijo večinoma kserofilnih gliv z umetniških oljnih slik na platnu, sposobnih rasti pri nizkih vodnih aktivnostih ( $a_w$  0,7–0,85).
- Izmed detektiranih in identificiranih vrst med glivami dominira rod *Aspergillus*, ki je eden izmed najpomembnejših predstavnikov muzejske mikrobiote. Sklepamo, da smo s pomočjo sekundarnih filogentskih označevalcev, t.j. gena za beta-tubulin in kalmodulin, odkrili nove vrste rodu *Aspergillus*.
- Drugi pomembnejši glivni rod muzejske mikrobiote, *Penicillium*, je v primeru depoja RC precej manj razširjen od rodu *Aspergillus*.
- Na analiziranih umetniških slikah tehnike olje na platnu se nahaja bistveno večje število gliv v primerjavi z bakterijami. Bakterije, detektirane z uporabo gojitvenih metod, so kserotolerantne in kserofilne, sposobne rasti pri nižjih  $a_w$ . Identificirane vrste pripadajo deblom *Firmicutes*, *Actinobacteria* in *Proteobacteria*.
- Gojitvene metode v primeru raziskav kontaminacije umetniških slik ne dajejo celostnih rezultatov. Za celostne rezultate je potrebna kombinacija gojitvenih in negojitvenih metod.
- Preživetje spor in vegetativnih celic po aplikaciji 70 % etanola je odvisno od kontaktnega časa.

## 7 POVZETEK

Zaznavanje in odkrivanje glivnih ter bakterijskih vrst, ki naseljujejo in uničujejo muzejske predmete kulturne dediščine, je ključnega pomena za njihovo ohranjanje. V muzejih obstaja posebna »muzejska mikrobiota«, v kateri prevladujejo predstavniki kserofilnih in kserotolerantnih gliv, med katerimi sta najpogostejša rodova *Aspergillus* in *Penicillium*, pa tudi bakterij debel *Proteobacteria*, *Actinobacteria* in *Firmicutes*. Vsi ti mikrobi lahko predstavljajo potencialno grožnjo predmetom, saj lahko povzročajo spremenjen videz, npr. obarvanje oz. razbarvanje, lahko pa tudi razgrajujejo materiale. Današnji trendi v konservatorstvu/restavratorstvu so omejevanje rasti mikrobov z ustvarjanjem za njih neugodnih dejavnikov okolja, večinoma nizke relativne zračne vlage, in sicer od 40 do 65 %, ter temperature 16–18 °C.

V sklopu magistrskega dela smo obravnavali osem umetniških oljnih slik na platnu, starih 300–400 let. Izvirajo iz različnih slovenskih cerkva, trenutno pa so shranjene v Restavratorskem centru Zavoda za varovanje kulturne dediščine Slovenije. S slik smo osamili in z molekularnimi tehnikami, temelječimi na nukleotidnem zaporedju glivne ITS rDNA regije, gena za beta tubulin in kamodulin, ter bakterijske 16S rDNA, identificirali 88 glivnih in 22 bakterijskih izolatov. Ugotovili smo, da kontaminacijo vseh slik povzročajo kserofilne glavičaste plesni rodu *Aspergillus*, sekcija *Restricti*, od katerih smo 6 od 14-ih vrst prepoznali kot za znanost nove vrste. Za zanesljivejšo molekularno identifikacijo med vrstami znotraj rodu *Aspergillus* smo uporabili sekundarna označevalca, nukleotidno zaporedje odsekov genov, ki kodirata beta-tubulin in kalmodulin. Izmed bakterij, ki smo jih identificirali na podlagi nukleotidnih zaporedij 16S rRNA, se na slikah pojavljajo rodovi firmikutov *Bacillus*, *Paenibacillus* ter *Virgibacillus*, proteobakterija *Sphingomonas melonis* ter *Brachybacterium sacellii* iz debla aktinobakterij. V primerjavi z opravljeno metagenomsko analizo vzorca DNA ene slike smo ugotovili, da tehniki ne dajeta enakih rezultatov. S pomočjo negoitvenih tehnik namreč lahko detektiramo bakterije, nahajajoče v VBNC stanju, ne moremo pa detektirati bakterij, ki se nahajajo v obliki spor. Za zanesljivejše in celostne rezultate priporočljiva kombinacija gojitvenih in negoitvenih.

Rezultati morfoloških analiz izbranih sevov kserofilnih gliv so potrdili nekatere razlike med z molekularnimi markerji prepoznanimi vrstami, in sicer v pomembnih morfoloških znakih, kot so velikost in oblika veziklov ter konidijev. V primeru vrste *A. penicillioides* smo odkrili v literaturi doslej še neopisano teleomorfno fazo. Testiranje izolatov izbranih vrst na agarnih gojiščih različnih vodnih aktivnosti je potrdilo njihovo kserofilno naravo, saj ne rastejo na gojiščih brez dodatnih topljencev, z njihovim dodatkom pa kar do vodne aktivnosti  $a_w$  0,75, kar odraža prilagojenost teh izolatov na relativno sušno, muzejsko okolje.

Ker je glede na priporočila vzdrževanja relativne zračne vlage od 40 do 65 % deaktivacija metabolizma kserofilnih gliv vprašljiva, smo poskušali tudi druge pristope. Eno od uporabljenih priporočenih razkužil, katerega uporaba na oljnih slikah na platnu je lahko sicer vprašljiva, je 70 % etanol. Ugotovili smo, da je metoda potencialno uporabna, vendar pa je preživelost spor odvisna od kontaktnega časa.

Za širšo sliko in razumevanje delovanja mikrobnih združb v povezavi z biodeterioracijo umetniških slik bi bilo potrebno preveriti tudi poškodbe vlaken, encimsko aktivnost sevov in s tem njihov biodeterioracijski potencial. Na ta način bi lahko dobljene rezultate povezali tudi z zgradbo slik in komponentami oljnih barv, to pa bi lahko imelo pomen pri razvijanju ustreznih novih pristopov ohranjanja umetnin.

## 8 VIRI

- Allsopp D., Seral K., Gaylarde C. 2004. Introduction to biodeterioration. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, Cambridge University Press: 237 str.
- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143–169.
- Anderson I. C., Campbell C. D., Prosser J. I. 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, 5: 36–47.
- Ayerst G. 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research*, 5: 127–141.
- Bautista-Rosales P. U., Calderon-Santoyo M., Servín-Villegas R., Ochoa-Álvarez N. A., Ragazzo-Sánchez J. A. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control*, 65, 3: 293–301.
- Camuffo D. 1998. Microclimate for cultural heritage. Amsterdam, Elsevier: 415 str.
- Capodicasa S., Fedia S., Porcellia A. M., Zannoni D. 2010. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 727–733.
- Cappitelli F., Vicini S., Piaggio P., Abbruscato P., Princi E., Casadevall A., Nosanchuk J. D., Zanardini E. 2005. Investigation of fungal deterioration of synthetic paint binders using vibrational spectroscopic techniques. *Macromolecular Bioscience*, 5: 49–57.
- Carmona N., Laiz L., Gonzalez J. M., Garcia-Heras M., Villegas M.A., Saiz-Jimenez C. 2006. Biodeterioration of historic stained glasses from the Cartuja de Miraflores (Spain). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 155–161.
- 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.
- Ciferri O. 1999. Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 879–885.
- 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 & Textiles in Eastern Europe*, 16: 67–73.
- Dupont J. 2009. *Penicillium*. V: Molecular detection of foodborne pathogens. Dongyou L. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 593–602.
- Escalante A. E., Jardon Barbolla L., Ramirez-Barahona S., Eguiarte L. E. 2014. The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 1249–1264.

- Fleming H.C. 1998. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer Degradation and Stability*, 59: 309–315.
- Frank J. A., Reich C. I., Sharma S., Weisbaum J. S., Wilson B. A., Olsen G. J. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2461–2470.
- Gerrits van den Ende A. H. G., de Hoog G. S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 43: 151–162.
- 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.
- 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.
- Gutarowska B., Skora J., Zduniak K., Rembisz D. 2011. Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 68: 7–17.
- Hong S., Cho H., Shin H., Frisvad J., Samson R. 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2: 477–486.
- Houbraken J., de Vries R.P., Samson R. A. 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*, 86: 199–249.
- Hubka V., Kubátová A., Peterson S.W. 2013. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia*, 105, 4: 912–937.
- Hueck H. J. 2001. The biodeterioration of materials— an appraisal. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 48, 1–4: 5–11.
- Ihrmark K., Bödeker I., Cruz-Martinez K., Friberg H., Kubartova A., Schenck J., Strid Y., Stenlid J., Brandström-Durling M., Clemmensen K., Lindahl B. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82: 666–677.
- Jurado V., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. 2008. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 4: 325–330.
- Kavkler K. 2015. Podatki o umetninah. Ljubljana, Zavod za varstvo kulturne dediščine Slovenije (ZVKDS) (izpis iz baze podatkov, 5.3.2015).
- Kavkler K., Gunde Cimerman N., Zalar P., Demšar A. 2011. FTIR spectroscopy of biodegraded historical textiles. *Polymer Degradation and Stability*, 69: 574–580.
- Kavkler K., Gunde-Cimerman N., Zalar P., Demšar A. 2014. Fungal contamination of texture objects preserved in Slovene museums and religious institutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97: 51–59.

- La Vallie E., Lu Z., Diblasio-Smith E.A., Collins-Racie L.A., McCoy J. M. 2000. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *E. coli*. V: Applications of chimeric genes and hybrid proteins- part A. Thorner J., Emr S. D., Abelson J. N. (ur.). San Diego, Academic Press: 322–340.
- Laiz L., Piñar G., Lubitz W., Saiz-Jimenez C. 2003. Monitoring the colonisation of monuments by bacteria: cultivation versus molecular methods. Environmental Microbiology, 5: 72–74.
- López-Miras M. dM., Martín-Sánchez I., Yebra-Rodríguez Á., Romero-Noguera J., Bolívar-Galiano F. 2013a. Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration. PLoS ONE, 8, 11: e80198, doi: 10.1371/journal.pone.0080198: 13 str.
- López-Miras M., Piñar G., Romero-Noguera J., Bolívar-Galiano F. C., Ettenauer J., Sterflinger K., Martín-Sánchez I. 2013b. 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.
- Manso M., Carvalho M. L. 2009. Application of spectroscopic techniques for the study of paper documents. Spectrochimica Acta Part B, 64: 482–490.
- Michaelsen A., Piñar G., Pinzari F. 2010. Molecular and microscopical investigation of the microflora inhabiting a deteriorated Italian manuscript dated from the thirteenth century. Microbial Ecology, 60, 1: 69–80.
- Micheluz A., Manente S., Tigini V., Prigione V., Pinzari F., Ravagnan G., Varese G. C. 2015. The extreme environment of a library: Xerophilic fungi inhabiting indoor niches. International Biodeterioration & Biodegradation, 99: 1–7.
- NCBI. 2015a. GenBank. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: baza podatkov. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (februar 2016).
- NCBI. 2015b. Basic Local Alignment Searchtool (BLAST). Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: programska oprema. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (februar 2016).
- Nugari M. P., Pietrini A.M., Caneva G., Imperi F., Visca P. 2009. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). International Biodeterioration & Biodegradation, 63, 6: 705–711.
- Peterson S.W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia. 100, 2: 205–226.
- Pettersson O. V., Leong S. L., Lantz H., Rice T., Dijksterhuis J., Houbraken J., Samson R. A., Schnürer J. 2011. Phylogeny and intraspecific variation of the extreme xerophile, *Xeromyces bisporus*. Fungal Biology, 115, 11: 1100–1111.

- 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 & Business Media: 519 str.
- Roszak D. B., Colwell R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environments. *Microbiological Reviews*, 51: 365–379.
- Samson R. A., Houbraken J., Thrane U., Frisvald J. C., Andersen B. 2010. Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series 2. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre: 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.
- Sánchez C. 2008. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 2: 185–194.
- Schabereiter-Gurtner C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. 2001. Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 345–354.
- Stender H., Fiandaca M., Hyldig-Nielsen J. J., Coull J. 2002. PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 48, 1: 1–17.
- 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.
- Strzelczyk A. B. 2004. Observations on aesthetic and structural changes induced in polish historic objects by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: 151–156.
- Szostak-Kotowa J. 2004. Biodeterioration of textiles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: 165–170.
- Teertstra W. R., Lugones L. G., Wosten H. A. B. 2004. *In situ* hybridization in filamentous fungi using peptide nucleic acid probes. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 12: 1099–1103.
- Tiano P. 2002. Biodegradation of cultural heritage: Decay mechanisms and control methods. Firenze, CNR: 37 str.  
[www.arcchip.cz/w09/w09\\_tiano.pdf](http://www.arcchip.cz/w09/w09_tiano.pdf) (februar 2016).
- Tomšič B., Simončič B., Vince J., Orel B., Vilčnik A., Fir M., Šurca Vuk A., Jovanovski V. 2007. The use of ATR IR spectroscopy in the study of structural changes of the cellulose fibres. *Tekstilec*, 50: 3–15.

- Trovão J., Mesquita N., Paiva D.S., Paiva de Carvalho H., Avelar L., Portugal A. 2013. Can arthropods act as vectors of fungal dispersion in heritage collections? A case study on the archive of the University of Coimbra, Portugal. International Biodeterioration & Biodegradation, 79: 49–55.
- Vinnere Pettersson O. Leong S. L.. 2011. Fungal xerophiles (osmophiles). V: eLS- Encyclopedia of life sciences. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: doi: 10.1002/9780470015902.a0000376.
- Wahengbam R., Santosh K., Giasuddin A., Kumaraswamy J. 2013. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. BMC Microbiology, 14: 52, doi: 10.1186/1471-2180-14-52: 10 str.
- Wainwright M., Tasneem A. A., Barakah F. 1993. A review of the role of oligotrophic microorganisms in biodeterioration. International Biodeterioration & Biodegradation, 31: 1–13.
- Warscheid T. 2000. Of microbes and art: Integrated concepts for the protection of cultural artifacts against biodeterioration. New York, Springer US: 250 str.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR protocols- A guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sininsky J. J., White T. J. (ur.). San Diego, Academic Press: 282–287.
- WHO. 2009. WHO guidelines for indoor air quality: Dampness and mould. Copenhagen, World Health Organization: 228 str.
- Williams J. P., Hallsworth J. E. 2009. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? Environmental Microbiology, 11, 12: 3292–3308.
- Zalar P., Kavkler K., Motnikar A., Demšar A., Tavzes Č., Gunde – Cimerman N. 2015. Mikrobiološko napadeni tekstil. V: Priročnik: muzejska konzervatorska in restavratorska dejavnost. Ljubljana, Skupnost muzejev Slovenije: 19 str.
- Zotti M., Ferroni A., Calvini P. 2008. Microfungal biodeterioration of historic paper: preliminary FTIR and microbiological analyses. International Biodeterioration & Biodegradation, 62: 186–194.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Poloni Zalar in somentorici doc. dr. Martini Turk za vso pomoč, odgovorjena vprašanja, predvsem pa za njuno potrpežljivost. Za pomoč pri izrisu filogenteskih dreves se posebej zahvaljujem mentorici Poloni Zalar.

Za hitro in korektno popravo naloge se zahvaljujem doc. dr. Neži Čadež.

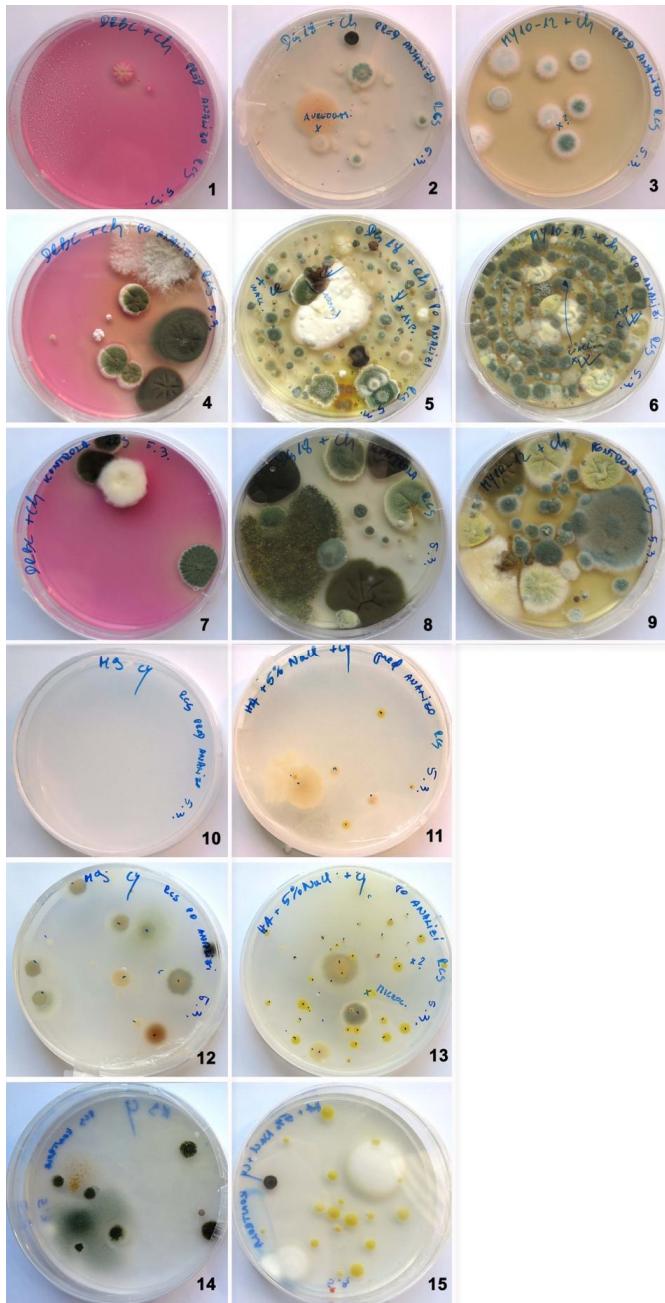
Ogromna zahvala gre tudi tehničnima sodelavkama Barbari Kastelic-Bokal in Mojci Šere ter vsem ostalim zaposlenim, ki so nesebično priskočili na pomoč, kadar je bilo treba.

Iskrena hvala vsem, ki so mi na tej poti kakorkoli pomagali in stali ob strani, posebej ožjim prijateljem in družini, sploh za zadnjih nekaj mesecev potrpljenja in razumevanja.

Izjemno hvaležna sem življenju za to izkušnjo in sebi za moč ter vztrajnost.

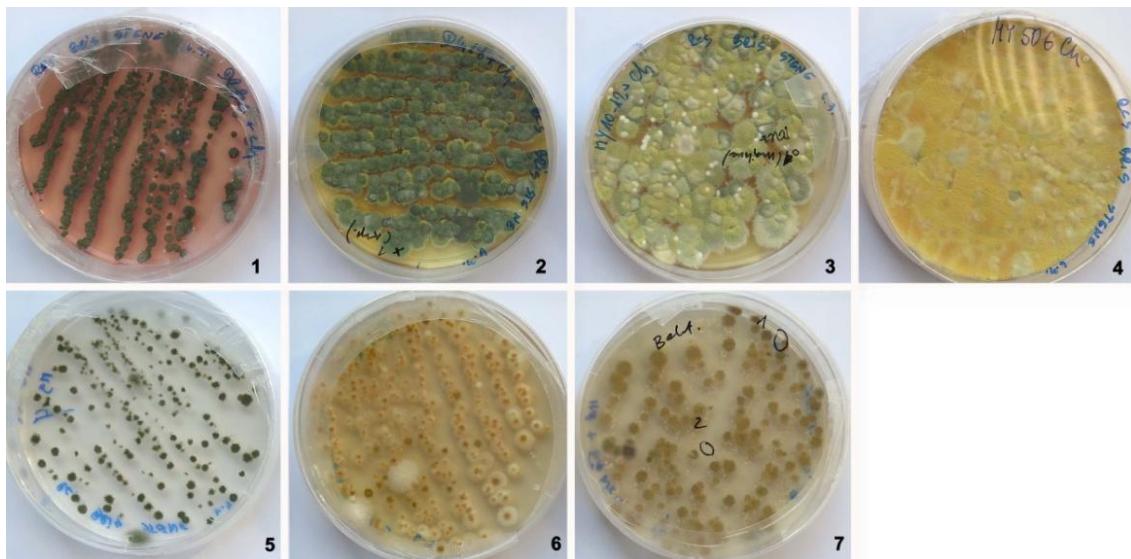
## PRILOGE

Priloga A: Primarne izolacijske plošče vzorcev, slikane po dveh tednih inkubacije.



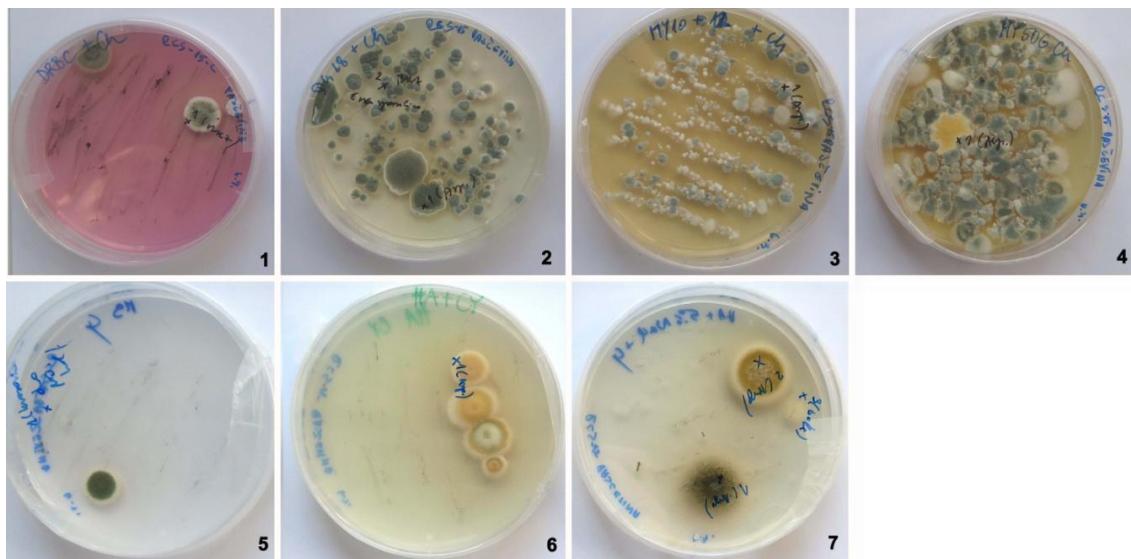
Priloga A1: Primarne izolacijske plošče vzorcev zraka pred in po vzorčenju slik ter v referenčnem prostoru, na katere je bilo prefiltriranih po 100 l zraka.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv z dodanim kloramfenikolom: DRBC (1, 4, 7), DG18 (2, 5, 8), MY10-12 (3, 6, 9). Plošče za izolacijo bakterij z dodanim cikloheksimidom: M9 (10, 12, 14), HA + 5 % NaCl (11, 13, 15). Zrak pred analizo: 1–3, 10–11; zrak po analizi: 4–6, 12–13; kontrola (zrak v predprostoru): 7–9, 1–15.



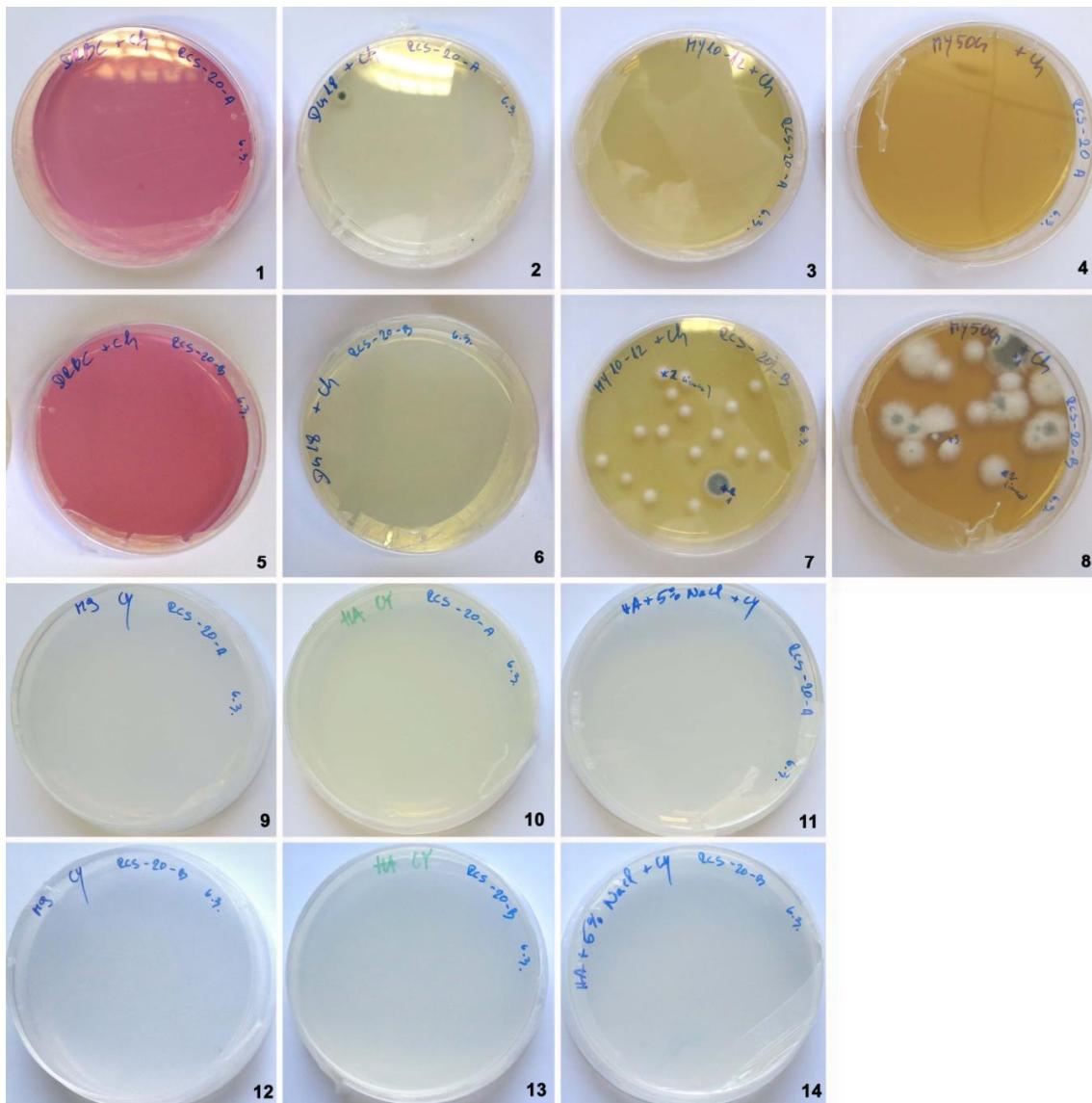
Priloga A2: Primarne izolacijske plošče iz vzorca stene v depoju.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv z dodanim kloramfenikolom: DRBC (1), DG18 (2), MY10-12 (3), MY50G (4). Plošče za izolacijo bakterij z dodanim cikloheksimidom: M9 (5), HA (6), HA + 5 % NaCl (7).



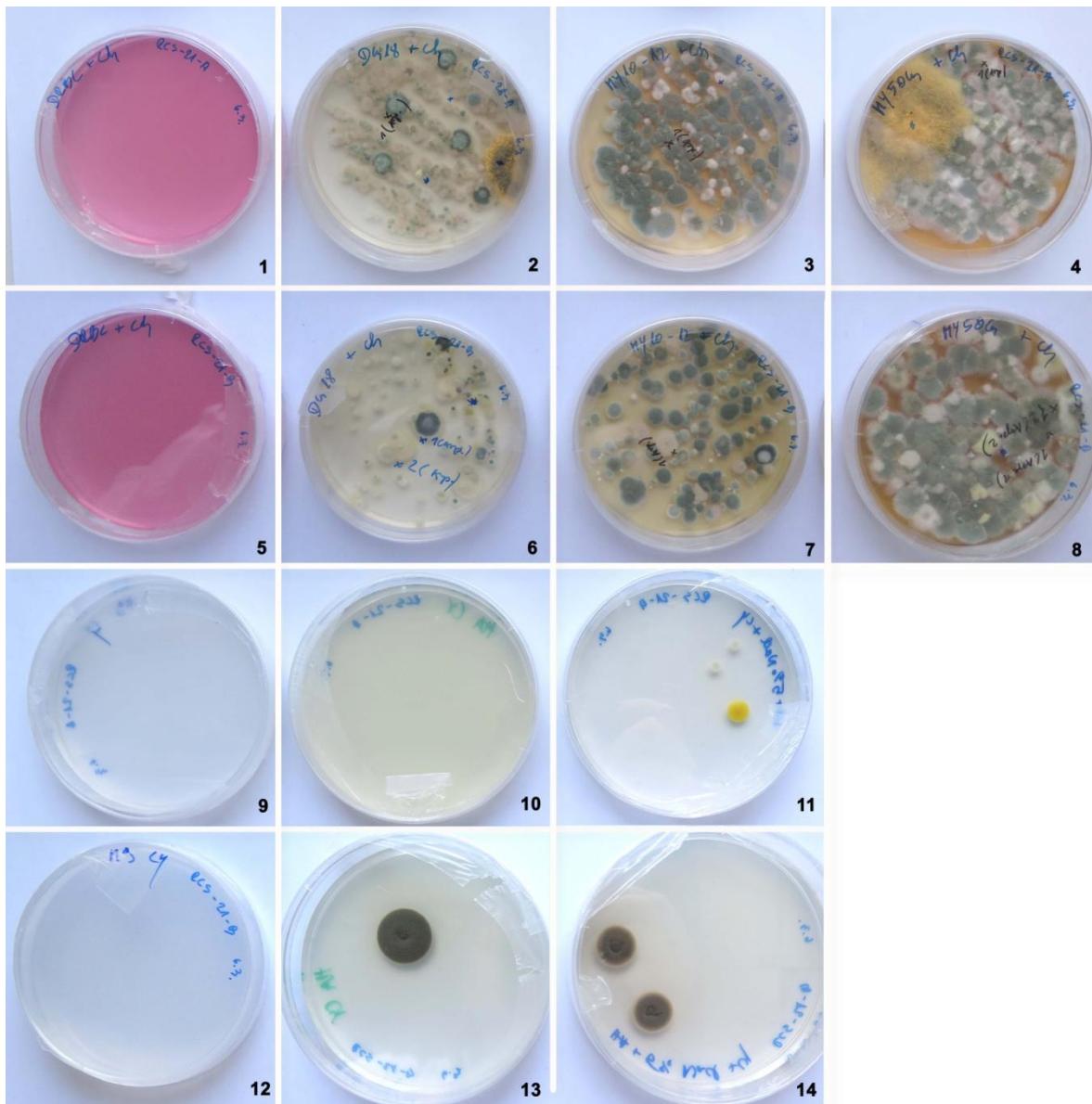
Priloga A3: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 15.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1), DG18 (2), MY10-12 (3), MY50G (4). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (5), HA (6), HA + 5 % NaCl (7).



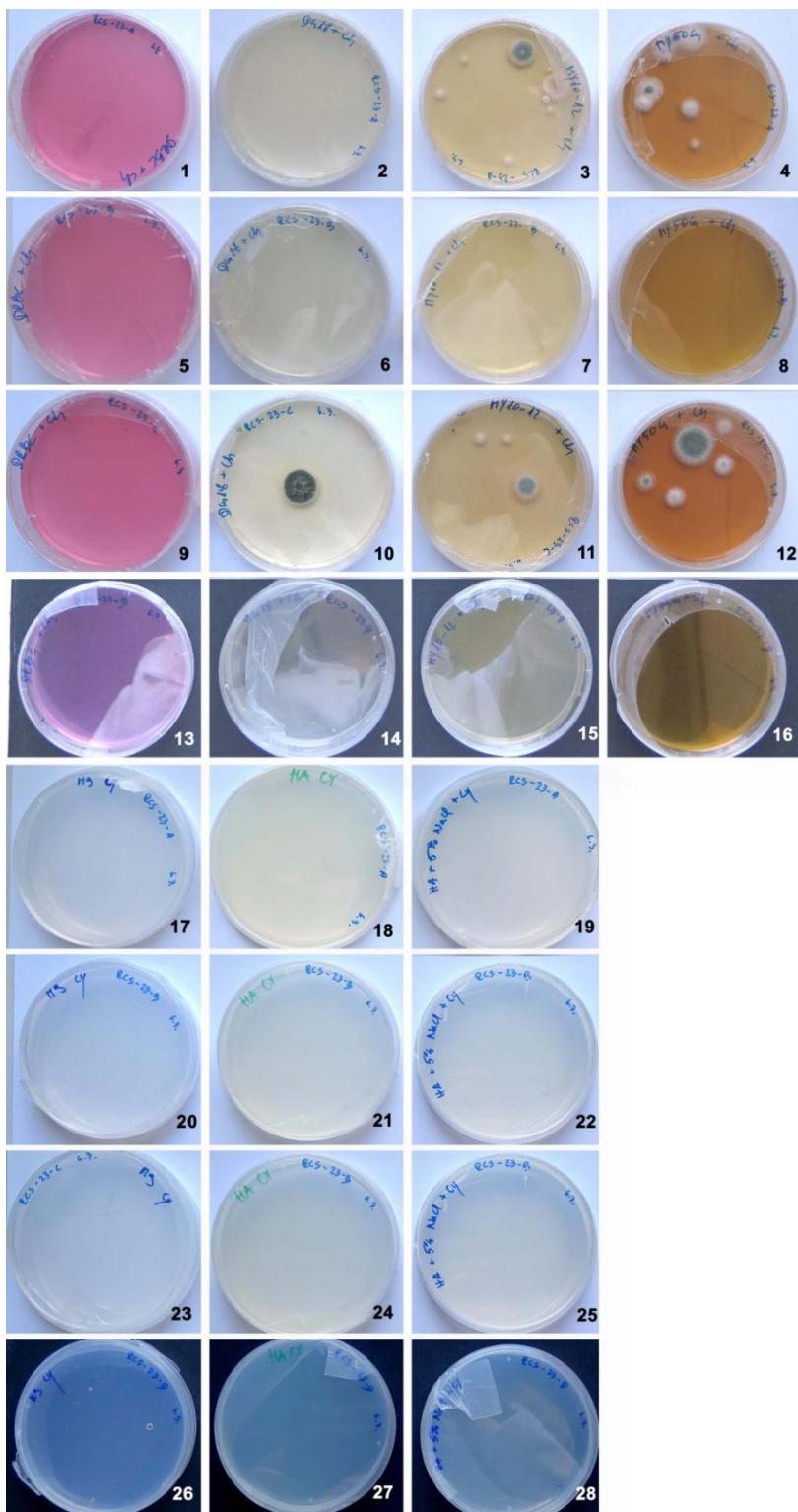
Priloga A4: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 20.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1, 5), DG18 (2, 6), MY10-12 (3, 7), MY50G (4, 8). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (9, 12), HA (10, 13), HA + 5 % NaCl (11, 14). RCS 20A: 1–4, 9–11; RCS 20B: 5–8, 12–14.



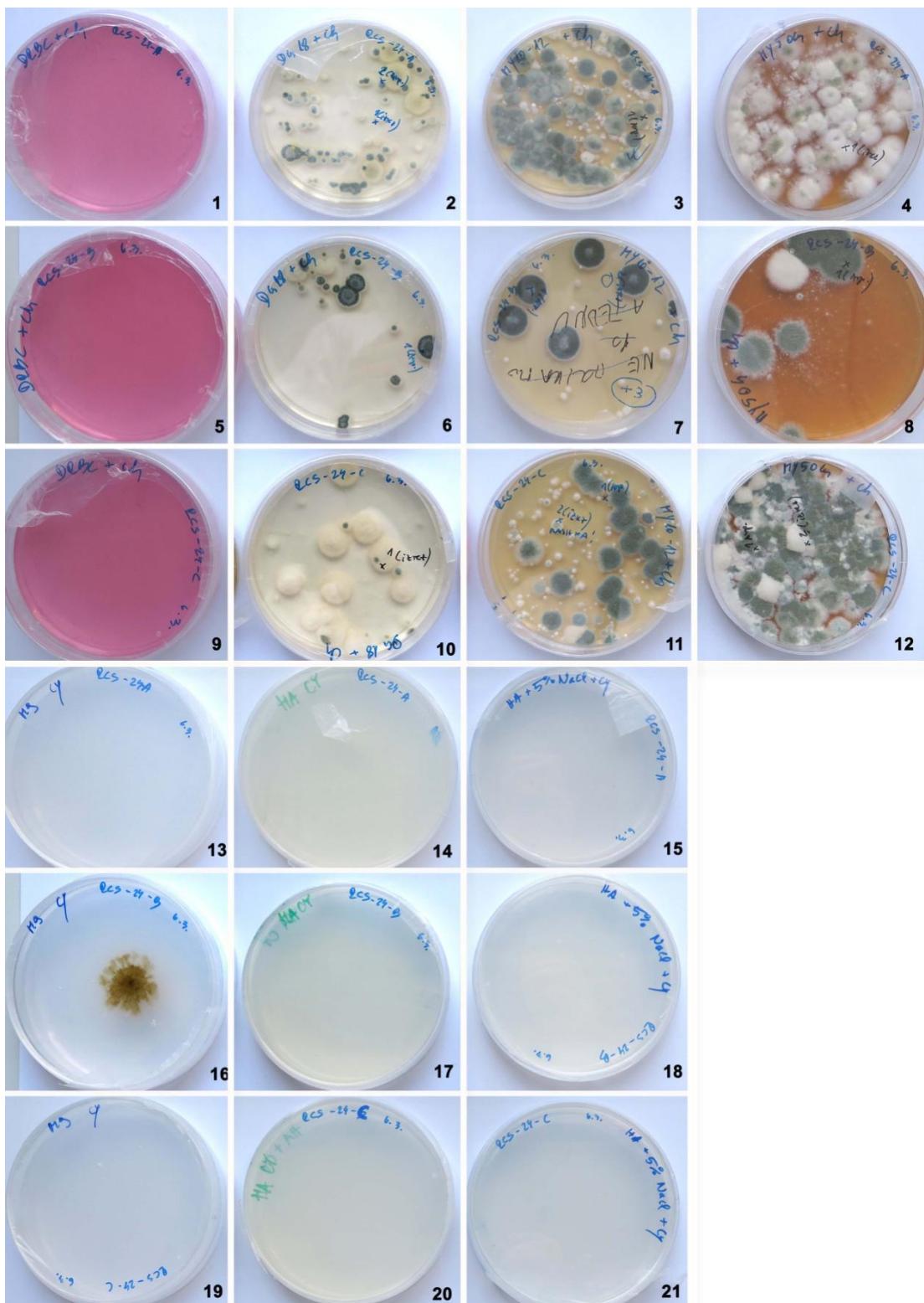
Priloga A5: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 21.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1, 5), DG18 (2, 6), MY10-12 (3, 7), MY50G (4, 8). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (9, 12), HA (10, 13), HA + 5 % NaCl (11, 14). RCS 21A: 1–4, 9–11; RCS 21B: 5–8, 12–14.



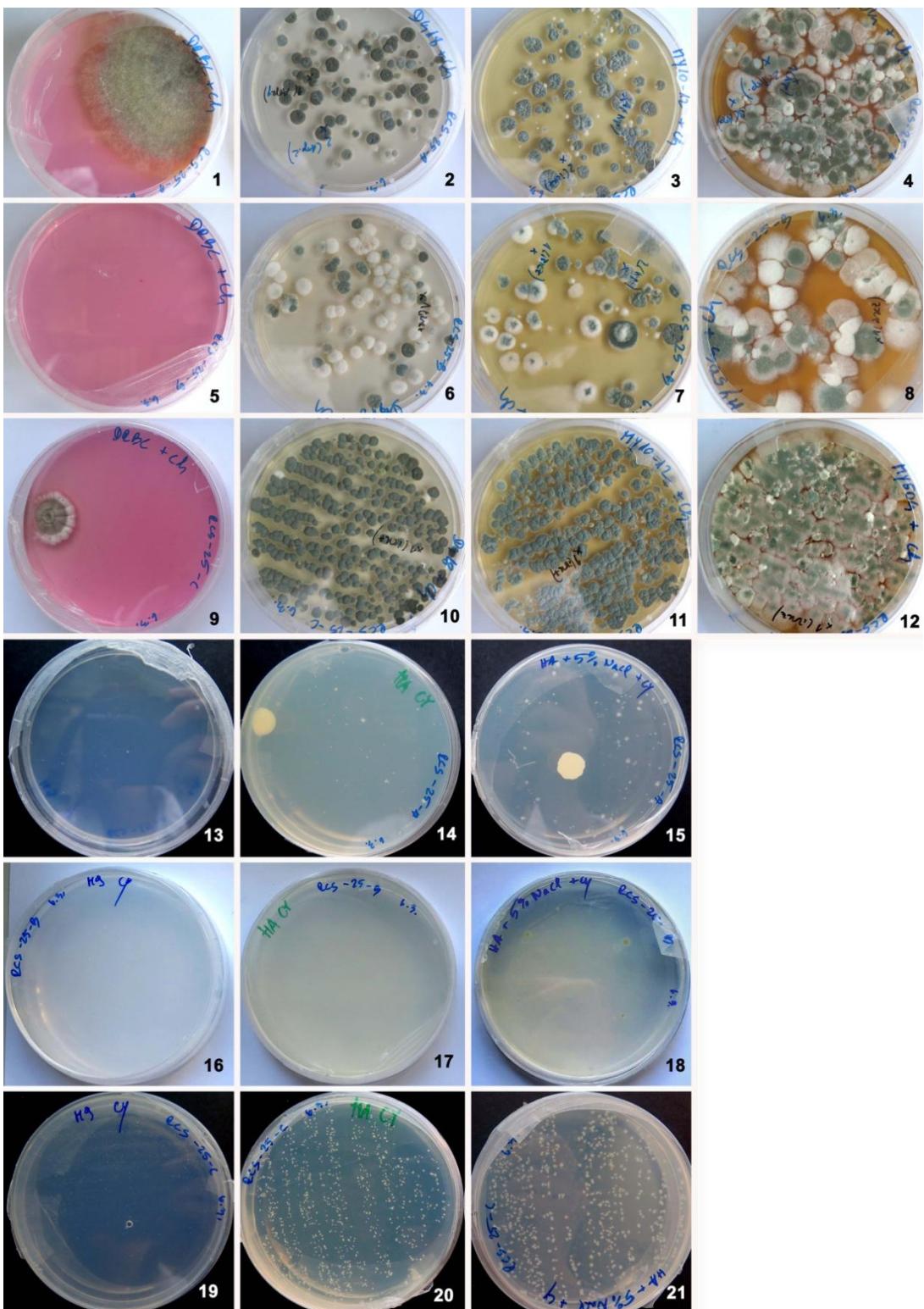
Priloga A6: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 23.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1, 5, 9, 13), DG18 (2, 6, 10, 14), MY10-12 (3, 7, 11, 15), MY50G (4, 8, 12, 16). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (17, 20, 23, 26), HA (18, 21, 24, 27), HA + 5 % NaCl (19, 22, 25, 28). RCS 23A: 1–4, 17–19; RCS 23B: 5–8, 20–22; RCS 23C: 9–12, 23–25; RCS 23D: 13–16, 26–28.



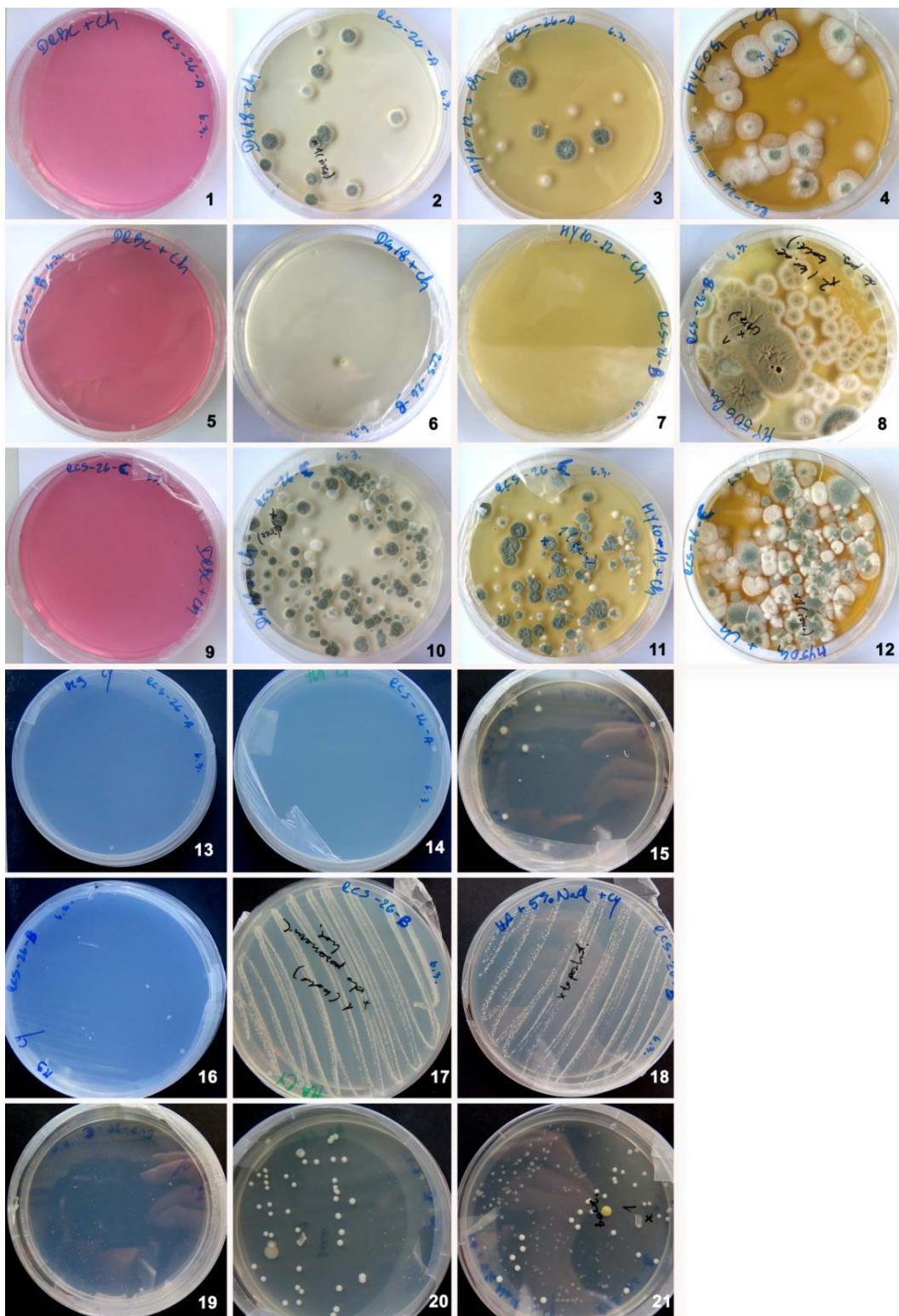
Priloga A7: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 24.

Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1, 5, 9), DG18 (2, 6, 10), MY10-12 (3, 7, 11), MY50G (4, 8, 12). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (13, 16, 19), HA (14, 17, 20), HA + 5 % NaCl (15, 18, 21). RCS 24A: 1–4, 13–15; RCS 24B: 5–8, 16–18; RCS 24C: 9–12, 19–21.



Priloga A8: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 25.

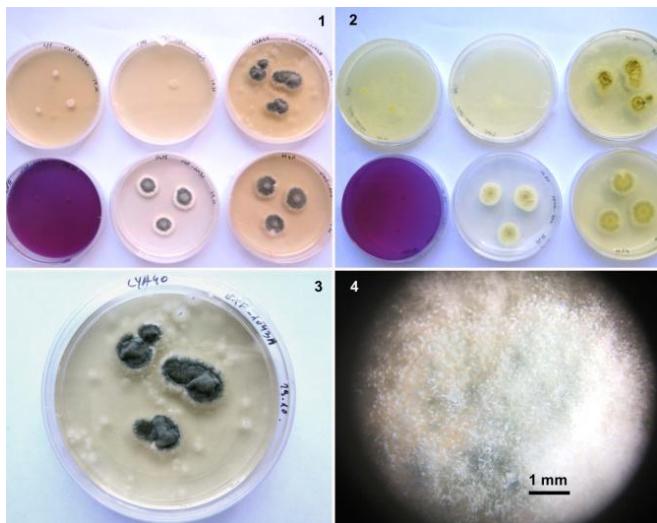
Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1, 5, 9), DG18 (2, 6, 10), MY10-12 (3, 7, 11), MY50G (4, 8, 12). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (13, 16, 19), HA (14, 17, 20), HA + 5 % NaCl (15, 18, 21). RCS 25A: 1–4, 13–15; RCS 25B: 5–8, 16–18; RCS 25C: 9–12, 19–21.



Priloga A9: Primarne izolacijske plošče vzorca RCS 26.

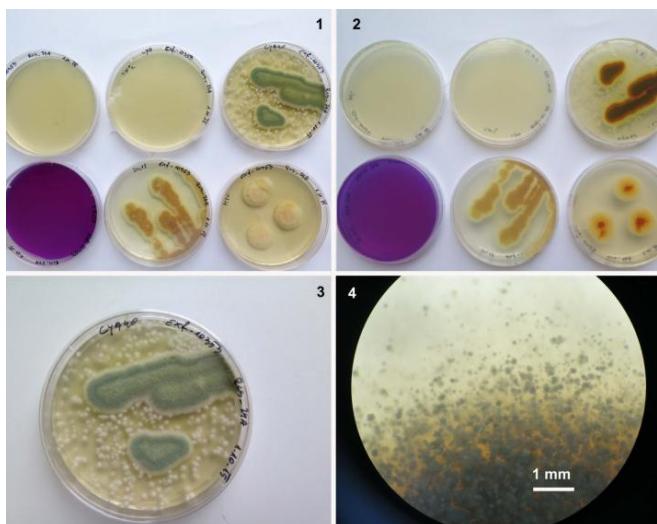
Legenda: Plošče za izolacijo gliv (z dodanim kloramfenikolom): DRBC (1, 5, 9), DG18 (2, 6, 10), MY10-12 (3, 7, 11), MY50G (4, 8, 12). Plošče za izolacijo bakterij (z dodanim cikloheksimidom): M9 (13, 16, 19), HA (14, 17, 20), HA + 5 % NaCl (15, 18, 21). RCS 26A: 1–4, 13–15; RCS 26B: 5–8, 16–18; RCS 26C: 9–12, 19–21.

Priloga B: Kolonije izbranih sevov na gojiščih za identifikacijo, slikane po dveh tednih inkubacije.



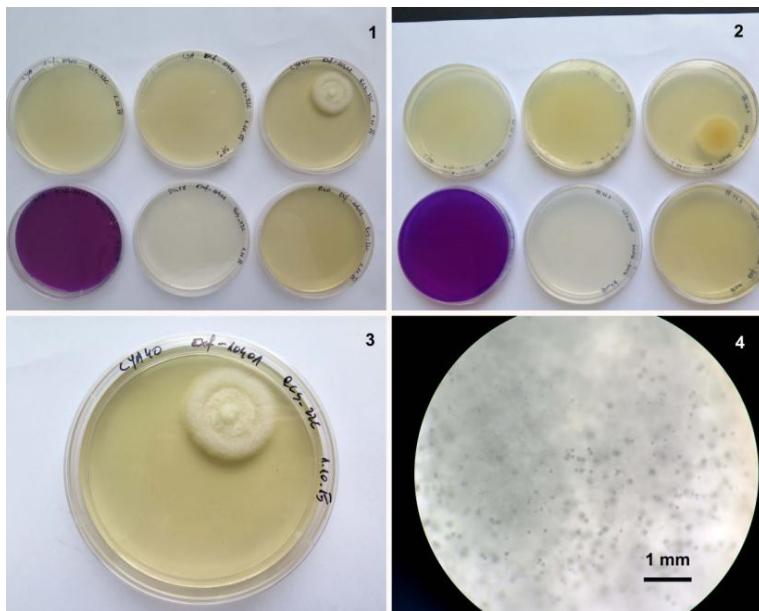
Priloga B1: Kolonije seva *A. penicillioides* sp. 1 (EXF-10431) na gojiščih za identifikacijo.

Legenda: Kulture seva *A. penicillioides* sp. 1 (EXF-10431) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).



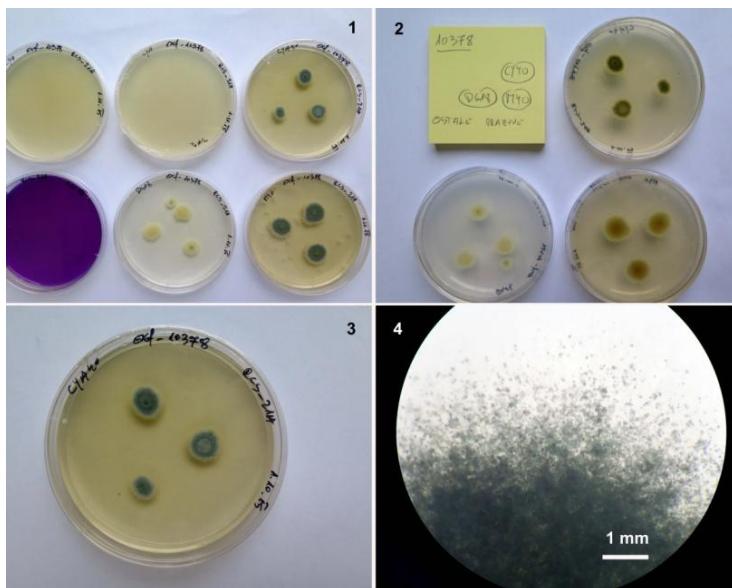
Priloga B2: Kolonije seva *A. penicillioides* sp. 2 (EXF-10353) na gojiščih za identifikacijo.

Legenda: Kulture seva *A. penicillioides* sp. 2 (EXF-10353) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).



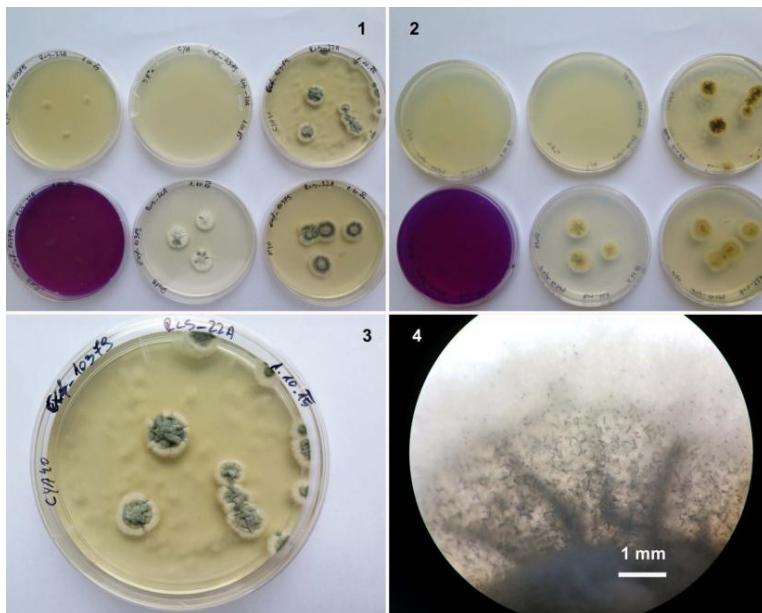
Priloga B3: Kolonije seva *A. penicillioides* sp. 3 (EXF-10401) na gojiščih za identifikacijo.

Legenda: Kulture seva *A. penicillioides* sp. 3 (EXF-10401) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).



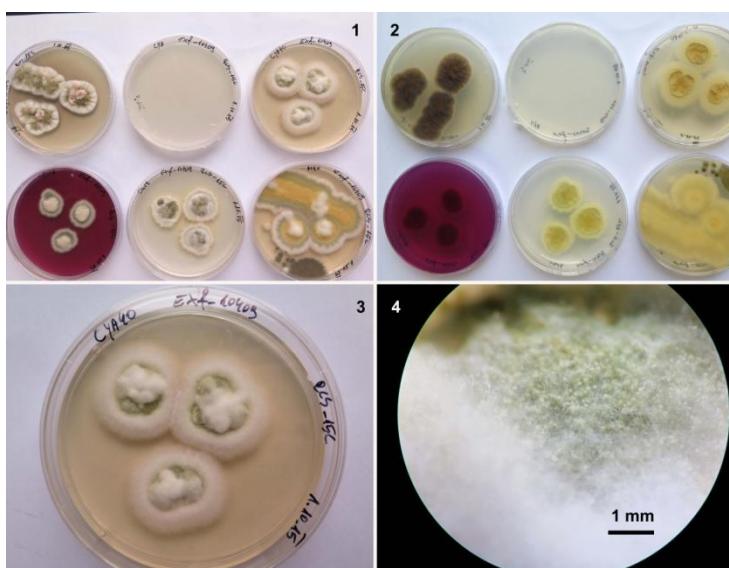
Priloga B4: Kolonije seva *A. vitricola* (EXF-10378) na gojiščih za identifikacijo.

Legenda: Kulture seva *A. penicillioides* sp. 3 (EXF-10401) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).



Priloga B5: Kolonije seva *A. restrictus* sp. 2 (EXF-10379) na gojiščih za identifikacijo.

Legenda: Kulture seva *A. restrictus* sp. 2 (EXF-10401) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).



Priloga B6: Kolonije seva *A. versicolor* (EXF-10409) na gojiščih za identifikacijo.

Legenda: Kulture seva *A. versicolor* (EXF-10409) na gojiščih za identifikacijo (1): zg. vrsta: CYA, CYA 37 °C, CY40, spodnja vrsta: CREA, DG18, M40; reverzi kultur v enakem vrstnem redu (2); gojišče za pripravo preparata CYA40 (3); morfologija konidijskih glavic na CYA40 (4).