



Metodický manuál pre hodnotenie a kontrolu mikrobiologickej kontaminácie tradičných nosičov informácií

Elektronický dokument projektu APVV-15-0460 PlasmArt

***Autori:** Barbora Kaliňáková, Ondrej Híreš,
Katarína Vizárová, Radko Tiňo,
Viera Jančovičová*

FCHPT STU Bratislava, 2019

Táto príručka je výstupom výskumnej činnosti, realizovanej v rámci projektu APVV-15-0460 PlasmArt, zameranej na sledovanie mikrobiologickej kontaminácie a hodnotenie účinnosti vyvíjaných procesov dekontaminácie na prírodných organických materiáloch, ktoré sú najčastejšími nosičmi kultúrneho dedičstva. Metodika je určená pre odborné pracoviská pamäťových inštitúcií, výskumné laboratóriá a vzdelávacie inštitúcie, zaoberajúce sa výskumom a kontrolou mikrobiologickej kontaminácie objektov kultúrneho dedičstva na plošných lignocelulóзовých nosičoch, pergamene a fotografiách.

Bratislava, december 2019

Teoretická časť

METÓDY DETEKČIE A IDENTIFIKÁCIE MIKROORGANIZMOV PRI OCHRANE KULTÚRNEHO DEDIČSTVA

1. Úvod

V 80.-tych rokoch 20. storočia sa vo svete všeobecne uznal fakt, že mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri degradácii objektov kultúrneho dedičstva. Tým značne vzrástlo úsilie poznať biodiverzitu mikróflóry prítomnej na materiáloch tvoriacich tieto objekty [1]. Dnes je absolútne nevyhnutné poznať prítomné mikroorganizmy, prípadne ich množstvo z viacerých dôvodov:

- pre hlbšie pochopenie samotného procesu biodeteriorácie a vplyvu mikroorganizmov na daný materiál,
- pre výber najvhodnejšej metódy dekontaminácie,
- pre možnosť monitorovať efekt a účinnosť dekontaminácie,
- pre možnosť vyvinúť alternatívny spôsob dekontaminácie.

2. Metódy detekcie a identifikácie mikroorganizmov

Včasná detekcia mikrobiologickej kontaminácie ešte pred viditeľným a trvalým poškodením je nevyhnutný krok pre predchádzanie negatívnych účinkov mikroorganizmov na materiál (farebné zmeny, zmeny štruktúry a chemického zloženia) [2].

Existuje relatívne veľa metód pre sledovanie mikrobiologickej kontaminácie, ktoré majú využitie vo viacerých oblastiach. Možno ich rozdeliť do niekoľkých skupín:

1. mikroskopické metódy,
2. kultivačné metódy,
3. imunologické metódy,
4. (bio)chemické metódy,
5. molekulárne metódy.

Tieto metódy možno vo všeobecnosti rozdeliť na:

- kvantitatívne, ktoré umožňujú sledovať množstvo prítomných mikroorganizmov,
- kvalitatívne, ktoré umožňujú presnú identifikáciu (rodovú, príp. druhovú) prítomných mikroorganizmov.

V posledných rokoch vzrastá záujem o ochranu kultúrneho dedičstva, a tým v tejto oblasti vzniká veľká potreba nájsť vhodnú techniku pre sledovanie mikrobiologickej kontaminácie, ktorá bude dostatočne efektívna, jednoduchá, nedeštruktívna a bude možné ju využiť priamo v prostredí archívov, knižníc či depozitov múzeí. Mnohé metódy detekcie a identifikácie mikroorganizmov sa uplatňujú v oblasti mikrobiológie potravín, životného prostredia alebo medicíny, no pre ich využitie v oblasti ochrany kultúrneho dedičstva sa realizuje len veľmi malý výskum. Existujú štúdie o využití ATP luminimetrie v oblasti umeleckých diel [3], ďalšie štúdie sa zaoberajú potenciálom využitia tzv. e-

nose technológie [4]. V poslednej dobe dochádza aj k adaptácii metód pôvodne vyvinutých pre inú oblasť, na ich využitie v oblasti sledovania mikrobiologickej kontaminácie zbierkových predmetov [2][5]. V súčasnosti sa v oblasti ochrany objektov kultúrneho dedičstva najviac využívajú klasické kultivačné metódy, ktoré sa však začínajú dopĺňať o ďalšie metódy. V oblasti presnej identifikácie mikrobiologickej kontaminácie sa čoraz viac uplatňujú molekulárne metódy [6]-[9].

Pre odber vzoriek z dôvodu dôkazu prítomnosti mikroorganizmov na predmetoch sa využívajú viaceré metódy, ktoré sa volia podľa cieľa vyšetrovania. Delia sa do piatich skupín [10]:

1. *deštruktívne metódy* – časť plochy sa odstráni a následne sa mikrobiologicky analyzuje,
2. *sterové metódy* – vatovými alebo gázovými tampónmi sa zotiera určený povrch a tampóny sa následne mikrobiologicky analyzujú,
3. *vylietacie metódy* – vyšetrovaná plocha sa preleje príslušnou živnou pôdou a pod ňou vyrastené kolónie sa spočítajú,
4. *výplachové metódy* – vyšetrované nádoby sa znútra opláchnu sterilným fyziologickým roztokom a tento sa mikrobiologicky analyzuje
5. *odtlačkové metódy* – povrch živnej pôdy sa privedie do kontaktu s vyšetrovanou plochou a po inkubácii sa spočíta počet vyrastených kolónií.

2.1. Mikroskopické metódy

Mikroskopické metódy sú metódy, pri ktorých sa detekcia mikroorganizmov uskutočňuje pozorovaním pomocou svetelného, fluorescenčného alebo elektrónového mikroskopu. Tieto metódy umožňujú vizualizáciu mikroorganizmov. Preparáty môžu byť natívne, pri ktorých sa pozoruje morfológia mikroorganizmov v prirodzenom stave alebo farbené. Existujú viaceré postupy farbenia, ktorými je možno uľahčiť identifikáciu prítomných mikroorganizmov – v prípade baktérií ide o farbenie podľa Grama, farbenie acidorezistentných mikroorganizmov, farbenie spór, farbenie puzdier a pod. Huby (vláknité mikromycéty a kvasinky) sa farbja podľa Grocott-Gömöriho, Giemsa alebo Schiffovo farbenie, farbenie bavníkovou modrou, kalkoflu.

2.2. Kultivačné metódy

Princípom kultivačných metód je pomnoženie prítomnej mikroflóry na vhodných kultivačných pôdach za vhodných podmienok do množstva spôsobiacieho makroskopicky viditeľné prejavy. Následne sa pozoruje charakter (fenotypový prejav) vyrastených kolónií podľa rôznych kategórií – veľkosť, tvar, povrch, profil, okraje, konzistencia, farba, zápach a iné [11]. Používajú sa viaceré kultivačné médiá, ktoré možno zaradiť do troch kategórií:

- základné (univerzálne) kultivačné pôdy,
- selektívne kultivačné pôdy, ktoré zvyhodňujú rast určitej cieľovej skupiny mikroorganizmov,
- diagnostické kultivačné pôdy, ktoré identifikujú príslušné mikroorganizmy zviditeľnením určitej najčastejšie biochemickej vlastnosti.

Tieto metódy sú pomerne citlivé i špecifické, ale väčšinou pomalé (kultivácia trvá aj niekoľko dní). Kultivačné metódy detekcie mikroorganizmov možno rozdeliť na dve kategórie:

- kvantitatívne metódy, ktoré určujú počet mikroorganizmov vo vzorke zväčša cez určenie počtu CFU/KTJ (Colony Forming Units/kolónie tvoriacich jednotiek)

- kvalitatívne metódy, ktoré detegujú iba prítomnosť, resp. neprítomnosť mikroorganizmov vo vzorke.

Iba málo selektívnych a diagnostických pôd je úplne špecifických, a preto je kvalitatívna kultivačná analýza náročná. Pre kvalitatívnu mikrobiologickú analýzu sú vhodnejšie iné metódy, najmä imunologické, (bio)chemické a molekulárne [12]. Okrem dlhšieho času potrebného na dosiahnutie výsledkov, je najväčším nedostatkom kultivačných metód neschopnosť detegovať nekultivovateľné mikroorganizmy. Vo všeobecnosti sa uvádza, že použitím kultivačnej metódy je možné kultivovať menej ako 1 % prítomných baktérií, v prípade húb je toto číslo na úrovni 70 % [13]. Komplikácie pri konečnom vyhodnocovaní počtu KTJ môžu nastať v dôsledku bunkovej agregácie. Medzi kvantitatívne kultivačné metódy patrí aj metóda najviac pravdepodobného počtu mikroorganizmov (MPN – Most Probable Number), pri ktorej sa najviac pravdepodobný počet zistí z tabuliek, kde sú štatisticky vypočítané najpravdepodobnejšie hodnoty zodpovedajúce počtu záchyto, t.j. počtu pozitívnych skúmaviek v troch po sebe idúcich sériách riedenia vzorky pre daný počet očkovaných skúmaviek v každej sérii [14].

2.3. Imunologické metódy

Imunologické metódy sú založené na reakcii antigénu so špecifickou protilátkou. Ako antigén sa môžu uplatňovať somatické štruktúry mikroorganizmov, ale aj exogénne produkty (napr. toxíny). Reakcia je viditeľná makroskopicky (napr. aglutinácia, latexaglutinácia) alebo je detegovaná ďalšími reakciami (napr. imunofluorescencia, ELISA, Western blot). Väčšinou sú tieto metódy vysoko senzitívne, špecifické a rýchle [12].

2.4. (Bio)chemické metódy

(Bio)chemické metódy sú široká skupina metód, pri ktorých sa sleduje prítomnosť určitej špecifickej chemickej látky charakteristickej pre mikroorganizmov alebo schopnosť mikroorganizmov utilizovať určitú zlúčeninu. Posudzuje sa tak najčastejšie skvasovanie sacharidov, metabolizmus aminokyselín alebo produkcia špecifických enzýmov [11].

Táto špecifická chemická látka môže byť súčasťou stavby mikroorganizmu (napr. mastné a mykolové kyseliny) alebo produkt ich metabolizmu (napr. močovina). Tieto metódy sú senzitívne, špecifické aj relatívne rýchle oproti kultivačným metódam, no ich využitie je obmedzené najmä kvôli prístrojovým nárokom. Ide najčastejšie o potrebu GC-MS, no v posledných rokoch vzrastá potenciál sofistikovanej technológie e-nose (electronic nose), ktorá napodobňuje fungovanie ľudského nosa s rovnakou presnosťou a citlivosťou [41]. Iná metóda sleduje množstvo CO₂ produkované mikroorganizmami s cieľom monitorovania ich aktivity [1]. Pre sledovanie mikrobiologickej aktivity sa použili aj redoxné indikátory, ako napríklad trifenylnitrotetrazoliumchlorid [42].

Mikroorganizmy produkujú množstvo prchavých zlúčenín, najmä alkoholy, aldehydy, ketóny, aromatické zlúčeniny, amíny, terpény, chlórované uhľovodíky alebo zlúčeniny síry [43]. Viaceré baktérie a huby produkujú pre ne charakteristické spektrum prchavých látok [44][45], ktoré môžu byť následne využité pre identifikáciu prítomnej mikroflóry.

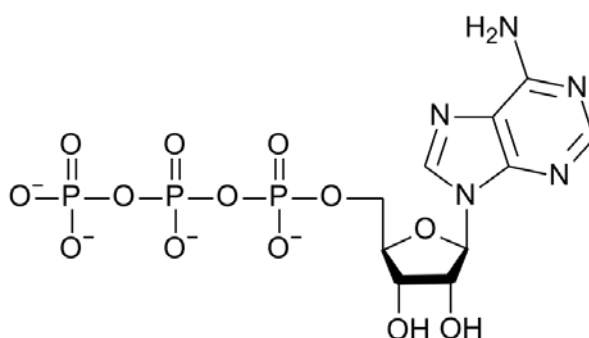
Ako ďalšia metóda na sledovanie mikrobiologickej kontaminácie sa môže využiť stanovenie množstva ergosterolu chromatografickou metódou (TLC, GC-MS, HPLC-MS) [46]. Táto látka sa vyskytuje iba v bunkovej stene húb a niektorých ďalších mikroorganizmov, kde zabezpečuje správnu funkciu lipidickej membrány. Vyskytuje sa tiež v cytosole, kde plní dôležitú funkciu pri procesoch

látkovej výmeny. Ergosterol ako hlavný steroid húb a niektorých mikroorganizmov môže slúžiť nie len, pre ich detekciu, ale čiastočne aj kvantifikáciu [47].

Do tejto skupiny metód možno zaradiť aj metódu ATP luminiscencie a fluorimetrickú metódu sledovania prítomnosti špecifického enzýmu beta-N-acetylhexozaminidázy. Obe tieto metódy majú potenciál pre využitie v oblasti sledovania mikrobiologickej kontaminácie zberkových predmetov.

2.4.1. ATP luminiscencia

Adenozín trifosfát (ATP) je jednou z makroergických zlúčenín (Obr. 1). Vyskytuje sa vo všetkých živých organizmoch, kde má ústrednú úlohu v energetickom režime bunky. Hydrolýzu fosfátových skupín zo štruktúry molekuly ATP sprevádza uvoľnenie energie, a tým ATP slúži ako energetická zásoba pre väčšinu metabolických reakcií vyžadujúcich energiu. Po smrti bunky, už nedochádza k ďalšej tvorbe molekúl ATP a prítomné ATP sa rýchlo štiepia účinkom ATPáz [16]. Z týchto faktov vyplýva, že prítomnosť ATP je vhodným nešpecifickým indikátorom prítomnosti živých mikroorganizmov [17].

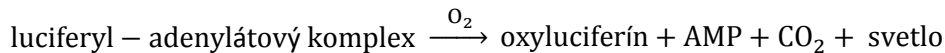
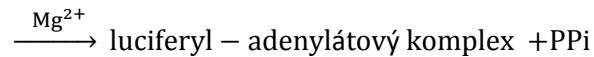


Obr. 1: Štruktúra molekuly ATP.

Obsah ATP v živých bunkách je relatívne konštantný, a preto je možné vytvoriť vzťah medzi obsahom ATP a stupňom kontaminácie [18]. Vegetatívne bunky obsahujú približne 10^{-17} mol ATP, endospóry 10^{-21} mol ATP [19]. Toto tvrdenie nie je presné, pretože na množstvo ATP v bunkách môžu mať vplyv tri faktory. Po prvé, bolo viackrát preukázané, že rôzne bakteriálne druhy môžu mať rôzny obsah ATP [20]-[22]. Ako ďalší faktor treba brať do úvahy rôznu koncentráciu ATP v závislosti od fyziologického stavu mikroorganizmu. Napríklad bunky kultivované v bohatých médiách majú často viac ATP ako bunky kultivované v oligotrofných podmienkach [21]. Okrem toho bunky v exponenciálnej fáze rastu majú viac ATP ako rovnaké bunky v stacionárnej fáze bunkového rastu [23][24]. Tretím faktorom je biomasa alebo bioobjem. Väčšie bunky majú viac ATP ako menšie bunky. Objem bunky by tak mohol aspoň čiastočne vysvetliť dôležitý rozdiel v množstve bakteriálnej ATP medzi rôznymi druhmi a rôznymi fyziologickými podmienkami [25].

ATP je možné stanoviť prostredníctvom bioluminiscenčnej reakcie, pri ktorej sa využíva oxidácia luciferínu za prítomnosti enzýmu luciferázy. Mechanizmus bioluminiscencie je viacstupňový proces, ktorý pozostáva z dvoch hlavných krokov [26][27]. V prvom kroku dochádza účinkom luciferázy na D-luciferín za prítomnosti ATP a horečnatých kationov Mg^{2+} k tvorbe luciferyl-adenylátového komplexu. Ten sa v následnom kroku za prítomnosti kyslíka oxiduje na oxyluciferín. Emisia fotónov je dôsledok náhleho poklesu energie molekuly oxyluciferínu, ktorý prechádza z excitovaného stavu na stabilnejší stav s nižšou energiou. Rozdiel energií sa vyžiarí vo forme svetla s vlnovou dĺžkou 550-570 nm (max. pri 562 nm) a kvantovým výťažkom okolo 90 % [28].

D – luciferín + luciferáza + ATP



Priebeh reakcie je veľmi rýchly (niekoľko sekúnd) a navyše je intenzita emitovaného svetla, vyjadrovaná v jednotkách RLU (Relative Light Unit), priamo závislá od množstva ATP v testovanej vzorke, a tým od množstva biologickej kontaminácie vo vyšetrovanej vzorke [29].

Ako indikátor životaschopnosti bunky sa môže uvádzať hodnota tzv. energetického náboja (EC, angl. Energy Charge). Je to v podstate hodnota metabolickej energie v rovnovážnom stave medzi tromi formami adenylových nukleotidov – ATP, ADP a AMP. Hodnota EC je lepším indikátorom metabolického stavu bunky ako samotný počet molekúl ATP [30]. Hodnota EC sa vypočíta podľa vzťahu [31]:

$$\text{EC} = \frac{[\text{ATP}(\text{ng})] + 1/2 [\text{ADP}(\text{ng})]}{[\text{ATP}(\text{ng})] + [\text{ADP}(\text{ng})] + [\text{AMP}(\text{ng})]}$$

Pri určovaní hodnoty EC je teda potrebné zistiť koncentráciu týchto troch foriem adenylátových nukleotidov.

Najdôležitejším krokom pre úspešnú detekciu biologickej kontaminácie metódou ATP bioluminiscencie je extrakcia molekúl ATP z buniek. Tento krok je kritický a zásadne vplyva na spoľahlivosť metódy [32]. Extrakcia:

- musí zabezpečiť úplné uvoľnenie ATP z buniek,
- nesmie degradovať ATP,
- musí zabezpečiť rýchlu, úplnú a ireverzibilnú inaktiváciu všetkých intra- a extracelulárnych enzýmových systémov, ktoré by mohli viesť k degradácii ATP,
- nesmie interagovať s reakciou luciferázy.

Je známych vyše 40 rôznych metód extrakcie, ktoré sa líšia v podmienkach i extrakčných činidlách (TAE, NaHCO₃, ARb, DMSO, TCA, etanol a i.). Väčšina z nich bola vyvinutá pre baktérie a kvasinky, no niektoré sú vhodné aj pre vláknité huby [16].

Samotné meranie intenzity bioluminiscencie prebieha pomocou luminometra. V súčasnosti je dostupný značný sortiment prístrojov a ATP bioluminiscenčných kitov pre uskutočnenie tejto metódy. V posledných rokoch sa na trhu objavili aj luminometre vo forme ručných prístrojov, ktoré nedosahujú citlivosť stolových luminometrov, no ich veľká výhoda je ľahká manipulácia a jednoduché a rýchle uskutočnenie samotnej analýzy. Nemožno však s nimi zistiť hodnotu EC. Relatívne nedávny pokrok v oblasti detekcie svetla na analytické účely viedol k vzniku tzv. low-light technológií. Zariadenia využívajúce túto technológiu sú založené na snímaní svetla vysoko citlivými kamerami s vysokým rozlíšením. Tieto zobrazovacie zariadenia, tiež známe aj ako luminografy, umožňujú okrem merania intenzity svetla na úrovni jedného fotónu aj vyhodnotenie plošnej distribúcie sledovaného povrchu [17].

Citlivosť detekcie metódou ATP bioluminiscencie závisí na viacerých faktoroch, ale v princípe na dvoch hlavných - na vplyve pozadia a zloženia vzorky. Prvý faktor vyplýva z faktu, že emisia fotónov nemusí byť viazaná len na prirodzený zdroj svetla, ale fotóny môžu samovoľne vyžarovať aj niektoré materiály. Jedná sa najmä o plastové materiály na jedno použitie, ktoré boli sterilizované účinkom vysokej energie, napríklad gama žiarením. Druhý faktor súvisí s tým, že maximum vlnových

dĺžok pre luciferín-luciferázovú reakciu je citlivé na pH s optimom pri pH = 7,75.

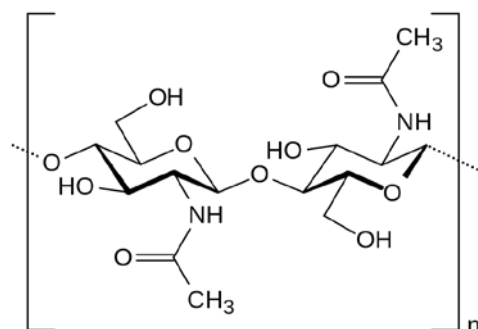
V kyslej oblasti sa maximum vlnovej dĺžky luminiscencie 562 nm (žlto-zelená oblasť) posúva k dlhším vlnovým dĺžkam (červená oblasť) a v zásaditej oblasti sa intenzita vyžarovaného svetla značne znižuje. Ďalšie nepresnosti, ktoré vedú k skresľovaniu signálu môžu vznikáť prítomnosťou iného zdroja fotónov vo vzorke ako je luciferín-luciferázová reakcia [18].

Metóda ATP bioluminiscencie má v súčasnej dobe relatívne široké uplatnenie vo viacerých oblastiach. Využíva sa pri monitorovaní čistoty vzduchu, vody, povrchov a kvalite produktov najmä v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle [33]. Obsah ATP môže byť využitý ako parameter mikrobiálnej biomasy na stanovenie rastovej krivky v bakteriálnych kultúrach, pre kontrolu účinnosti čistenia prostredia napríklad vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle, na stanovenie citlivosti mikroorganizmu voči antibiotikám, na stanovenie účinnosti biocídnych látok, na stanovenie toxicity vzoriek a za určitých podmienok ako parameter mikrobiálnej biomasy v prirodzených vzorkách - voda alebo pôda [29]. Existuje veľký potenciál pre využitie ATP bioluminiscencie aj v oblasti konzervačnej vedy, no zatiaľ zostáva toto využitie viazané len na prostredie laboratórií [34]. Parameter EC je vhodný identifikátor pre určenie životaschopnosti mikroorganizmov (vrátane spór) a užitočný nástroj pre rýchlu detekciu kontaminácie archívnych dokumentov [34].

Z podstaty tejto metódy vyplýva, že množstvom ATP príp. hodnotou EC poskytuje len relatívne hrubú informáciu o biologickej kontaminácii [1]. V niektorých prípadoch môžu byť tieto výsledky zavádzajúce a teda z nich môžu plynúť nesprávne závery [2]. Táto metóda poskytuje informáciu o množstve živých buniek prítomných vo vyšetrovanej vzorke, no nehovorí nič o miere poškodenia materiálu bunkami. Môže sa stať, že danou metódou sa stanoví vysoký počet prítomných živých buniek, no v skutočnosti nebudú predstavovať reálne riziko pre daný materiál.

2.4.2. Fluorimetrická metóda sledovania prítomnosti beta-N-acetylhexozaminidázy

Chitín je vo svojej podstate biopolymér *N*-acetyl-beta-*D*-glukóзамín (NAG), ktorý sa nachádza v bunkových stenách húb, ale aj v organizme mnohých bezstavovcov – hlavne hmyzu a niektorých morských živočíchov. Tento polymér musia huby pri svojom raste nepretržite štiepiť enzýmom *N*-acetyl-beta-*D*-glukóзамinidázou (EC 3.2.1.52) (NAGáza, *N*-acetyl-beta-*D*-hexóзамinidáza; staršie EC číslovanie 3.2.1.30) a následne pretvárať [5]. Tento enzým je jedným z trojice chitináz (*N*-acetyl-beta-*D*-glukóзамinidáza, chitobiozidáza a endochitináza), ktoré degradujú chitín. NAGáza je extracelulárny enzým, ktorý sa v prípade húb podieľa na raste hýf a ich vetvení, na tvorbe priehradok (septum) a na klíčení [35]. Úloha tohto enzýmu spočíva v katalyzovaní reakcie hydrolýzy molekuly *N*-acetyl-beta-*D*-glukóзамínu z terminálneho neredukujúceho konca chitooligosacharidov. Reakcia prebieha acidobázickým reakčným mechanizmom, kde glutamát 540 slúži ako katalytická kyselina (donor H⁺) [35].



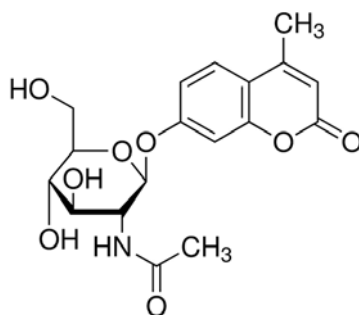
Obr. 2: Štruktúrna jednotka chitínu.

Princíp sledovania prítomnosti *N*-acetyl-beta-*D*-glukóزامinidázy je vo väčšine prípadoch založený na stanovení aglykónu uvoľneného po reakcii daného enzýmu so špecifickým substrátom. V princípe sa môžu využiť tri druhy substrátov – chromogénny, fluorimetrický alebo chemiluminiscenčný substrát.

4-Metylbelliferol (MUF) naviazaný na *N*-acetyl-beta-*D*-glukóزامín (NAG), tvorí fluorescenčne aktívnu látku 4-metylbelliferyl-*N*-acetyl-beta-*D*-glukóزامín (MUF-NAG) (Obr. 3), ktorá môže byť využitá ako substrát pre detekciu NAGázovej aktivity húb. Molekuly MUF odštiepené z MUF-NAG fungálnou NAGázou produkujú detekovateľné množstvo fluorescence [5].

Táto metóda bola prvotne vyvinutá pre analýzu fungálnej biomasy v pôdach [36], ale môže byť adaptovaná a má značný potenciál pre rýchlu detekciu a kvantifikáciu mikrobiologickej kontaminácie spôsobenej hubami aj pre objekty kultúrneho dedičstva [2].

Samotná analýza trvá menej ako 60 min, vyžaduje relatívne základné laboratórne zručnosti a zariadenie. Môže sa uskutočniť aj *in-situ* v prípade použitia prenosného fluorimetra. Výsledky NAGázovej aktivity sú výrazne v korelácii s inými fungálnymi detekčnými metódami (stanovenie obsahu fosfolipidov, ergosterolu a pod.) [37]. Citlivosť metódy detegovať fungálnu kontamináciu na papieri je rovnaká alebo prevyšuje úroveň dosiahnuteľnú ATP luminometriou alebo meraním obsahu ergosterolu [38].



Obr. 3: 4-metylbelliferyl-*N*-acetyl-beta-*D*-glukóزامín (MUF-NAG).

Postup analýzy je relatívne jednoduchý. K vzorke sa pridá fluorescenčný substrát a nechá sa inkubovať za stabilných podmienok 30 min. Následne sa reakcia ukončí prídavkom EtOH, upraví sa pH a meria intenzita fluorescence pri excitačnej vlnovej dĺžke 377 nm a emisnej 446 nm [5].

Existuje možnosť interferencie bakteriálnej NAGázy, ale prítomnosť týchto enzýmov je viazaná iba na limitovaný počet bakteriálnych druhov [36]. Nepresnosti pri meraní môžu vzniknúť vplyvom autofluorescencie niektorých látok prítomných v sledovanom materiáli (latex, plátno, papier) [5]. Vplyv bakteriálnej kontaminácie, prachu, špiny a kolísania environmentálnych podmienok na NAGázovú aktivitu v komplexnom fungálnom prostredí zostáva neznámy [5].

Šipošová sa vo svojej práci zaoberala reprodukovateľnosťou metódy stanovenia prítomnosti biomasy vláknitých húb sledovaním intenzity odozvy v závislosti od rodu vláknitých húb pre rody *Aspergillus niger*, *Fusarium nivale* a *Cladosporium herbarum* [39]. Zistila, že vegetatívne štádium húb (mycélium), nevykazuje rozdiely medzi zvolenými rodmi vláknitých húb a prítomnosť špecifického enzýmu N-acetyl-beta-D-glukózaminidázy je približne rovnaká. V ďalšej práci sa venovala stanoveniu rozdielu odozvy medzi vegetatívnou formou mikroorganizmov (forma mycélia) a dormantnou formou (forma konídií) [40]. Nezistili sa významné rozdiely, a teda nie je rozdiel v odozve metódy, keď je biomasa tvorená konídiami alebo mycéliom. Ďalej vo svojej práci študovala citlivosť metódy aj na mŕtve bunky usmrtené horúcou parou (autoklávaním). Z výsledkov vyplýva, že metóda má odozvu aj pri usmrtenej forme biomasy, hoci usmrtená forma má oveľa nižší detekčný limit ako vitálna forma a to o jeden až dva poriadky – 1 000 µg.

2.5. Molekulárne metódy

Táto skupina zahrňuje množstvo metód pre identifikáciu mikroorganizmov a charakterizáciu ich biologických vlastností. Do tejto skupiny metód patrí:

- plazmidová analýza,
- metóda sledovanie obsahu G+C,
- amplifikačné techniky (PCR) a sekvenovanie nukleotidov DNA a RNA,
- separačné techniky (PFGE, DGGE),
- metódy založené na hybridizácii nukleových kyselín (FISH).

2.5.1. Plazmidová analýza

Analýza sa uskutočňuje prostredníctvom štúdia veľkosti a počtu plazmidov v bunkách.

2.5.2. Metóda sledovania obsahu G+C

Metóda sledovania obsahu dusíkatých báz guanínu (G) a cytozínu (C) je staršia, dnes už prakticky nepoužívaná metóda, ktorá je založená na sledovaní energie potrebnej na štiepenie GC párov nukleových kyselín.

2.5.3. Amplifikačné techniky a sekvenovanie nukleotidov DNA a RNA

Ďalšou skupinou molekulárnych metód sú amplifikačné techniky. Sú to metódy, ktoré slúžia na amplifikáciu (zmnoženie) molekúl DNA, resp. RNA v laboratórnych podmienkach. Najviac využívaná technika, ktorá si pomaly nachádza svoje uplatnenie aj v oblasti identifikácie mikroflóry prítomnej na objektoch kultúrneho dedičstva [6][7], je technika polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Táto metóda umožňuje efektívne amplifikovať špecifické úseky DNA ohraničené dvoma oligonukleotidovými primermi v podmienkach *in vitro*. Amplifikácia DNA metódou PCR sa uskutočňuje v cyklickom procese, pričom každý cyklus pozostáva z troch základných krokov – denaturácia, anelácia a polymerizácia.

Konkrétne podmienky (teplota a čas) závisia od zvoleného postupu analýzy. Prvým krokom je zohriatie reakčnej zmesi templátovej dvojvláknovej DNA (obyčajne na teplotu 95 °C), čo spôsobí tepelnú denaturáciu vlákien, čím sa jednotlivé vlákna v pôvodne dvojvláknovej nukleovej kyseline od seba oddelia. Druhým krokom je anelácia (naviazanie) primerov na jednovláknovú templátovú DNA, pričom je dvojica primerov navrhnutá tak, aby nasadali na obe vlákna (vždy jeden z dvojice na jedno

vlákno). V treťom kroku sa účinkom DNA polymerázy syntetizuje druhé vlákno DNA komplementárnym pripájaním nukleotidov na koniec primerov (optimálna teplota reakcie je 72 °C, no závisí najmä od druhu použitej DNA polymerázy) [51]. Uvedené kroky sa cyklicky 20-40x opakujú a výsledkom je syntéza mnohých kópií ($\geq 10^7$) fragmentu DNA, ktorý sa analyzuje [48]. Množstvo DNA sa v každom cykle zdvojnásobí (teoreticky), keďže produkt predchádzajúceho cyklu sa stáva po denaturácii templátom pre nasledujúci cyklus. Pomocou PCR možno zo stopového množstva DNA získať stovky ng až jednotky μg DNA [52]. Vďaka tomu postačuje na analýzu len minimálne množstvo vzorky.

Po získaní PCR produktov nasleduje ich analýza, ktorá sa uskutočňuje viacerými postupmi. Najčastejšie sa produkt PCR analyzuje pomocou elektroforetickej separácie v agarozovom géli po zafarbení etídiom bromidom a vizualizácii v UV svetle, tzv. ELFO analýza. Ďalšia používaná analýza PCR produktov je analýza štiepením reštrikčnými enzýmami, hybridizácia - Southern analýza alebo sekvenovanie PCR produktov a ich porovnávanie so sekvenciami deponovanými v databáze [52].

Sekvenovanie nukleotidov je veľmi zdĺhavá plne automatizovaná metóda pre úplnú genotypickú identifikáciu mikroorganizmov. Špecifickým typom sekvenovania je identifikácia pôvodcu DNA analýzou tzv. ITS regiónov. ITS (Internal Transcribed Spacer) sú úseky DNA nachádzajúce sa medzi štruktúrnymi génmi pre rRNA. Porovnanie ITS oblastí jednotlivých mikroorganizmov je bežný spôsob v taxonómii. Práca s ITS má niekoľko výhod:

- a) vďaka vysokému počtu opakovaní (až 30 000 na bunku) je možné amplifikovať aj nepatrné množstvá DNA,
- b) malá veľkosť (600-700 bp),
- c) vysoký stupeň variácií i medzi blízkymi kmeňmi, ktoré sú spôsobené rýchlym vývojom a skutočnosťou, že ITS nekódujú žiadne dôležité gény.

Metóda PCR má využitie v mnohých oblastiach. Štandardne sa používa v molekulárnej biológii, genetike, mikrobiológii, fyziológii, medicíne ako aj v mnohých iných oblastiach biologického výskumu. Podľa účelu použitia sa prispôbujú konkrétne podmienky, a preto existuje mnoho variácií a modifikácií PCR protokolu. Medzi najznámejšie patrí nested PCR, multiplex PCR, real-time PCR (kvantitatívna PCR), RT-PCR, hot-start PCR a iné [48].

Viaceré modifikácie PCR majú štandardné a rutinné využitie v rôznych oblastiach, no ich využitie v oblasti sledovania mikrobiologickej kontaminácie objektov kultúrneho dedičstva je stále len zriedkavé. Je to zapríčinené najmä tým, že v súčasnosti sú náklady spojené s využitím molekulárnych techník stále vysoké v porovnaní s celkovými nákladmi, ktoré sú zvyčajne k dispozícii pre účely konzervovania a reštaurovania.

2.5.4. Separačné techniky

Pomocou pulznej gélovej elektroforézy (PFGE) sa dosiahne separácia chromozómov daného mikroorganizmu o veľkosti až niekoľko Mb (10^6 báz), následne sa určuje ich veľkosť a počet (tzv. karyotyp). Vytvárajú sa genetické mapy, na základe ktorých sa zisťuje príbuznosť medzi jednotlivými druhmi a kmeňmi. Na druhej strane denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE) je metóda, ktorá deteguje už jednonukleotidové zámery v molekule DNA s rovnakou, či podobnou veľkosťou (do 1000 bp) [48].

2.5.5. Metódy založené na hybridizácii nukleových kyselín

Hybridizácia nukleových kyselín predstavuje jeden z najpoužívanejších nástrojov molekulárnej biológie. Základom hybridizačnej techniky je značená molekula jednovláknovej nukleovej kyseliny, tzv. hybridizačná sonda (próba), ktorá sa používa na detekciu príbuzných molekúl DNA alebo RNA. Táto sonda rozlišuje v zmesi nukleových kyselín len také molekuly, ktoré sú k nej komplementárne a vizualizuje ich. Využívajú sa rádioaktívne (izotopovo) značené DNA sondy a nerádioaktívne značené DNA sondy, najčastejšie fluorescenčné [48]. Jednou z techník využívajúcich hybridizáciu nukleových kyselín je technika FISH (fluorescence *in situ* hybridisation). Táto metóda bola aplikovaná aj v oblasti ochrany objektov dedičstva na štúdium mikroorganizmov podieľajúcich sa na biodeteriorácii povrchov [49]. Použitie danej nedeštruktívnej metódy umožňuje „in situ“ identifikáciu prítomnosti mikroorganizmov a ich distribúciu na sledovanom povrchu. Taktiež umožňuje sledovať výskyt špecifických mikroorganizmov v celom komplexnom biofilme [50].

3. Stanovenie účinnosti dekontaminačných procesov

Stanovenie účinnosti dekontaminačných procesov je neoddeliteľnou činnosťou v procese rutínnej kontroly procesov sterilizácie a dezinfekcie. Významnú úlohu zohráva aj pri monitorovaní efektu a účinnosti alternatívnych spôsobov dekontaminácie. Samotné stanovenie účinnosti sa môže vykonávať rôznymi metódami:

- fyzikálnymi,
- chemickými,
- biologickými.

Pri fyzikálnych a chemických metódach kontroly účinnosti dekontaminácie sa sleduje, či boli, resp. neboli dodržané podmienky, za ktorých je garantovaný dekontaminačný proces. Pri biologických metódach sa sleduje, či biologický model (najčastejšie ide o bakteriálne endospóry, ktoré patria medzi najodolnejšie formy mikroorganizmov) prežil, resp. neprežil podmienky dekontaminácie.

3.1. Fyzikálne metódy

Kontrola účinnosti dekontaminačných procesov (najmä sterilizácie) fyzikálnymi metódami sa uskutočňuje sledovaním fyzikálnych veličín, najmä teploty, vlhkosti a tlaku. Vykonáva sa priebežne so zameraním na kontrolu správnosti zabudovaných meracích prístrojov.

3.2. Chemické metódy

Princíp testu spočíva v zmene farby alebo posunom vo farebnej škále chemického činidla naneseného na nosiči v dôsledku styku s jedným alebo viacerými parametrami sledovaného procesu dekontaminácie [53]. Do tejto skupiny patrí Bowie-Dick test pre hodnotenie odstránenia vzduchu a prieniku pary; procesové indikátory slúžiace k odlišeniu sterilizovaného a nesterilizovaného materiálu napr. vo forme lepiacej pásky; jedno a mnohoparametrové indikátory, ktoré reagujú na jeden alebo viac parametrov a udávajú vystavenie sterilizačného cyklu pri stanovenej hodnote zvolených parametrov.

Ich použitie však nie je univerzálne. Problémom stanovenia účinnosti dekontaminačných procesov pomocou chemických indikátorov napr. pri ošetrovaní objektov kultúrneho dedičstva je fakt, že pri

etylénoxidovej sterilizácii objektov kultúrneho dedičstva sa používajú miernejšie podmienky ako je tomu pri využití etylénoxidovej sterilizácie v medicíne (Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Porovnanie podmienok etylénoxidovej sterilizácie.

podmienky	etylénoxidová sterilizácia	
	v medicíne	v ochrane kultúrneho dedičstva
koncentrácia etylénoxidu	800 - 1000 mg/l	
doba sterilizácie	60 - 360 min	420 - 720 min
teplota	55 - 60 °C	25 - 40 °C
tlak		1,8 - 3,2 bar
vlhkosť	40 - 60 %	50 - 55 %

Chemický indikátor vhodný pre využitie v medicíne, sa nedá použiť pri hodnotení sterilizácii objektov kultúrneho dedičstva, pretože sterilizáciu vyhodnotí ako neúčinnú. Chemický indikátor nadimenzovaný pre miernejšie podmienky sterilizácie, ktorá sa využíva pri sterilizácii objektov kultúrneho dedičstva, v súčasnosti nie je na trhu dostupný.

3.3. Biologické metódy

Princíp stanovenie účinnosti sterilizačných procesov biologickými metódami spočíva v usmrtení nepatogénnych bakteriálnych spór v dôsledku vystavenia sterilizačnému procesu. Používajú sa nasledovné kmene bakteriálnych spór:

- *Geobacillus stearothermophilus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre parnú sterilizáciu,
- *Geobacillus stearothermophilus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre formaldehydovú sterilizáciu,
- *Geobacillus stearothermophilus*, hustota suspenzie $2,3 \times 10^6$ /ml pre plazmovú sterilizáciu,
- *Bacillus atrophaeus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre horúcovzduchovú sterilizáciu,
- *Bacillus atrophaeus*, hustota suspenzie 1×10^6 /ml pre etylénoxidovú sterilizáciu [53].

Suspenzie spór sú nanosené na papierovom nosiči a zabalené v primárnom obale priepustnom pre príslušné sterilizačné médium. Biologické indikátory s označením „non self-contained“ sa musia po vystavení sterilizačnému procesu asepticky preniesť do príslušného kultivačného média. V indikátoroch s označením „self-contained“ je suspenzia bakteriálnych spór na nosiči zabalená spolu s ampulkou kultivačnej pôdy. Po skončení sterilizačného cyklu sa tlakom na ampulku obsah spojí a bez ďalšej manipulácie sa dáva kultivovať, čím je vylúčená sekundárna kontaminácia. Kultivácia sa po vystavení sterilizačnému procesu vykonáva v predpísanej kultivačnej pôde pri 37 °C pre *B. atrophaeus*, pri 55°C pre *G. stearothermophilus* [53].

3.3.1. Kontrola sterility materiálu

Za účelom kontroly sterility materiálu prípadne kontroly účinnosti dekontaminačného procesu sa môže vykonávať odber vzoriek za aseptických podmienok, a to rôznymi metódami - **sterovou**, **oplachovou**, **odtlačkovou** (metódy sú spomenuté tiež v kap. 2 Metódy detekcie a identifikácie mikroorganizmov) a **pod**. Treba si uvedomiť, že takáto kontrola je často skôr hodnotením manipulácie s ošetrovaným materiálom ako hodnotením účinnosti samotného dekontaminačného

procesu [53]. Odobrané vzorky sa po spracovaní kultivujú pri predpísaných podmienkach a výsledok sa vyhodnocuje prostredníctvom počtu KTJ prípadne určením efektívnej dávky, napr. hodnoty ED_{90} . Táto hodnota predstavuje efektívnu dávku dekontaminačného procesu, ktorá redukuje rast modelového druhu mikroorganizmu o 90 %.

4. Praktická časť

4.1. Detekcia a identifikácia mikroflóry na objektoch kultúrneho dedičstva

4.1.1. Postup získania izolátov

Na odber je vhodné zvoliť niekoľko miest, ktoré pri bližšom makroskopickom zhodnotení by mohli vykazovať optické známky mikrobiologickej kontaminácie. Je možné odobrať vzorky aj z rubovej, aj z lícovej strany (pergamenu, fotografie). Z každého zvoleného odberného miesta je potrebné pomocou vhodnej metódy odobrať vzorky povrchovej nečistoty, preniesť ju do Petriho misky s viacerými živnými médiami, napr. – CzDA, PDA, SGA a SLA. Odbery je možné realizovali **sterom pomocou vatového tampónu navlhčeného** v 0,01% roztoku Tweenu 80. Tampón sa následne otrie o povrch živných médií. Použitý tampón sa nechá kultivovať na SLA. Tiež je možné použiť špeciálnu **dermálnu pásku**. Páska sa prilepí na vybrané miesto na pergamene alebo fotografii, opatrne sa odlepí, rozstrihne na niekoľko častí a každá časť sa položí na živné médium. Poslednou metódou odberu je odber pomocou **skalpela**. Skalpelom sa šetrne zoškrabe časť vrchnej vrstvy pergamenu alebo fotografie a prenesie sa na živné médium. Všetky odbery sa vykonávajú za podmienok aseptической práce. Kultúry sa kultivujú sedem dní pri laboratórnej teplote a svetelnom režime deň/noc. Po skončení kultivácie sa jednotlivé vyrastené kultúry označia. Pre izoláty, sa použijú na ich rozlíšenie písmená aj číslice. Následne sa izoláty pomocou ihly a mikrobiologického očka preočkujú na čerstvé živné média – MHA pre baktérie a SLA pre vlákňité huby.

4.1.2. Určenie izolátov pomocou morfológických znakov

Po izolácii čistých kultúr sa pozorujú makroskopické vlastnosti jednotlivých kolónií pri raste na stužených živných médiách – MHA pre baktérie a SLA pre vlákňité huby.

U baktérií sa posudzujú:

- tvar a veľkosť kolónií
- pigmentácia

Pri vlákňitých hubách sa hodnotí:

- výška a hustota vzdušného mycélia
- pigmentácia vrchnej spórotvornej vrstvy, spodnej vrstvy
- produkciu pigmentov do média
- prípadne tvorbu kvapôčok a iných štruktúr

Mikroskopické morfológické znaky baktérií aj vlákňitých húb sa pozorujú v nativných preparátoch.

Ďalšie vlastnosti bakteriálnych izolátov sa určujú pomocou negatívneho zobrazenia, Gramovo farbenia a farbenia bakteriálnych endospór.

Pri baktériách sa sleduje aktívny pohyb, tvar a usporiadanie buniek, príslušnosť podľa Grama a produkcia a umiestnenie endospór. Identifikácia vlákňitých húb sa robí na základe vzhľadu fruktifikačných štruktúr.

Natívny preparát

Pomocou mikrobiologického očka (ihly) sa z vybranej kolónie mikroorganizmov odoberie malé množstvo kultúry a rozsuspenduje sa v kvapke vody – baktérie, (laktofenolu – vláknité huby) na čistom podložnom sklíčku. Suspenzia sa prikryje krycím sklíčkom tak, aby sa nevytvorili bubliny.

Fixácia buniek

Do kvapky destilovanej vody na podložnom sklíčku sa pripraví suspenzia baktérií. Suspenzia sa pomocou očka rozotrie do tenkej vrstvy a nechá sa vysušiť na vzduchu. Podložné sklíčka s vysušenými preparátmi sa trikrát rýchlo pretiahnu cez najhorúcejšiu časť plameňa.

Negatívne zobrazenie

Do kvapky farbiva 2% roztoku kongo červene na podložnom sklíčku sa pomocou bakteriologického očka asepticky rozsuspenduje malé množstvo kultúry baktérií. Drôtom očka sa ťahom urobí tenký náter na podložnom sklíčku. Náter sa nechá vysušiť pri laboratórnej teplote. Následne sa preparát ponorí na sekundu do roztoku 1% HCl.

Gramovo farbenie

Fixované preparáty sa prevrstvia kryštálovou violeťou a farbivo sa nechá pôsobiť 60 s. Potom sa prevrstvia Lugolovým roztokom, ktorý sa nechá pôsobiť 30 s. Následne sa prevrství alkoholom a nechá sa pôsobiť maximálne 10 s. Preparáty sa opláchnu vodou a ďalej sa prevrstvia safranínom, ktorý sa nechá pôsobiť 60 s. Nakoniec sa znova opláchnu vodou. Všetky kvapaliny sa pridávajú a zlievajú z podložného sklíčka jedným smerom.

Farbenie bakteriálnych endospór

Fixované preparáty sa prevrstvia malachitovou zelenou a umiestnia sa na horúcu platňu. Po dobu päť minút sa zahrievajú a dopĺňa sa farbivo, aby preparáty neuschli. Potom sa opláchnu vodou a následne sa prevrstvia safranínom a farbivo sa nechá pôsobiť 60 s. Nakoniec sa preparáty znova opláchnu vodou.

Všetky pripravené preparáty sa po ich vysušení pozorujú pomocou svetelného mikroskopu.

5. Sledovanie účinnosti dekontaminácie v laboratórnych podmienkach

5.1. Metodika sledovania účinnosti dekontaminácie na papieri.

5.1.1. Príprava vzoriek z papiera

Z papiera sa vystrihnú štvorce veľkosti 5 x 5 cm, uložia sa do prázdnych sklenených Petriho misiek (priemer 60 mm) po jednom a sterilizujú sa v autokláve pri 120 °C počas 20 min.

5.1.2. Príprava spórového inokula

Ku kultúram vláknitých húb vyrastených na SLA v Petriho miske sa pridal 0,1% vodný roztok Tweenu 80 a pomocou hokejky sa uvoľnia spóry. Získaná suspenzia sa preniesie do skúmavky, dôkladne sa premieša a prefiltruje cez nylonovú tkaninu upevnenú vo filtračnom zariadení, na ktorom je napojená striekačka. Koncentrácia spór sa určí pomocou Bürkerovej komôrky. Spórové inokulum sa následne riedi podľa potreby sterilnou vodou na požadovanú koncentráciu 1000 konídií/ml.

5.1.3. Počítanie konídií v Bürkerovej komôrke

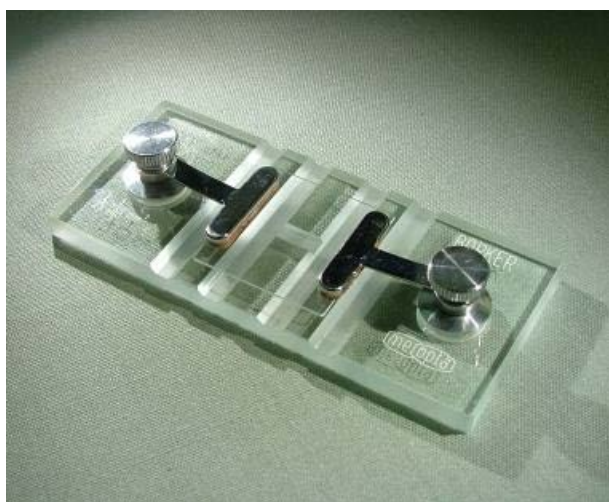
Táto metóda je najjednoduchšou metódou určovania počtu konídií v suspenzii. Bürkerova komôrka je 50 mm hrubým sklom, na ktorom sú dva počítacie priestory tvorené ohraňenými štvorcami vyryté v skle. Princípom metódy je spočítanie všetkých konídií v známom objeme suspenzie [54].

Počet konídií sa potom stanoví podľa vzťahu:

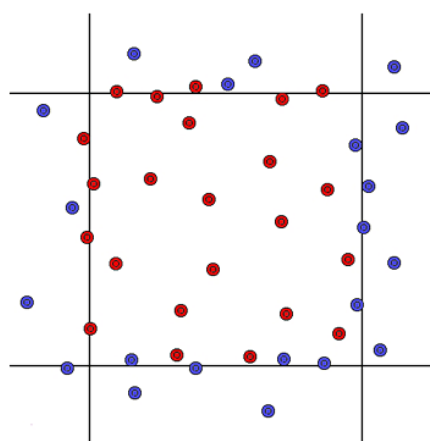
$$\text{Počet konídií} = X * 250\,000 * R$$

X = aritmetický priemer počtu spočítaných konídií na ploche štvorcov

R = riedenie



Obr. 4 Bürkerova komôrka



Obr. 5 Schéma počítania konídií – červeno označené sa započítavajú, modro označené nie

5.1.4. Príprava inokulovaných papierových vzoriek

Papiere v Petriho miskách sa následne inokulujú rovnomerne po celom povrchu papiera 1 ml spórovej suspenzie vláknitých húb obsahujúcej 1 000 spór a nechajú schnúť počas 24 hodín.

5.1.5. Ošetrovanie papierových vzoriek plazmou

Ošetrovanie inokulovaných papierových vzoriek pomocou NTP ADRE plazmy v prítomnosti pracovných plynov (kyslík, dusík, oxid uhličitý, vzduch, resp. argón) v komore prebieha za podmienok: prietok

plynu = 1-6 l/min. ; čas expozície = 5 – 15 min. ; výkon plazmovej aparatúry = 0,6 – 1,24 J.s⁻¹ ; frekvencia = 2 kHz; tlak plynu = atmosférický. Konkrétne podmienky sa stanovujú individuálne podľa stupňa poškodenia objektu, stupňa kontaminácie, stupňa znečistenia, materiálu, z ktorého je objekt vytvorený a typu čistiacej operácie.

5.1.6. Stanovenie účinnosti dekontaminácie

Vzorky papierov sa po ošetrení nízkoteplotnou atmosférickou plazmou prenesú na čerstvé agarové platne s agarom so sladínovým extraktom (SLA) a kultivujú sa pri laboratórnej teplote. Po 48 hodinách sa spočíta počet kolónie tvoriacich jednotiek (KTJ). Z počtu KTJ jednotlivých vzoriek a referenčnej (neošetrenej) vzorky sa určí viabilita (%).

5.1.7. Vyhodnotenie dekontaminačného účinku/Stanovenie efektívnej dávky

Efektívnosť plazmovej úpravy sa vyhodnotí pomocou hodnoty ED₉₀. Táto hodnota predstavuje efektívnu dávku plazmy, ktorá redukuje rast modelového druhu vláknitej huby o 90%. Zostrojí sa sigmoidálna krivka, popísaná rovnicou

$$V = \frac{100}{\left(1 + \frac{t}{C}\right)^B}$$

kde V je viabilita v % a t je čas ošetrenia, B a C sú parametre.

Z krivky sa určia hodnoty ED₉₀ podľa vzťahu:

$$ED_{90} = C \times \left(\left(\frac{100}{100 - 90} \right)^{\frac{1}{B}} - 1 \right)$$

Analogicky je možné určiť ED₅₀, podľa vzťahu:

$$ED_{50} = C \times \left(\left(\frac{100}{100 - 50} \right)^{\frac{1}{B}} - 1 \right)$$

5.2. Metodika sledovania účinnosti dekontaminácie na fotografickom papieri

5.2.1. Príprava vzoriek na fotografickom papieri

Na prípravu vzoriek sa používa neexponovaný **fotografický papier** FomaBrom N112 ustálený klasickým spôsobom. Na zábranie krútenia fotopapiera vplyvom vlhkosti sa používajú diarámččky o rozmere 6x6 cm, ktoré sa skladajú z kovovej a plastovej časti (56).

1. Do Petriho misiek (priemer 140 mm) sa na dno vystrihne filtračný papier, misky sa zabalia do alobalu a dajú vysterilizovať v autokláve.
2. Plastové rámpččky sa dajú sterilizovať do 80 % etanolu na 24 hodín.
3. Fotopapier vo veľkosti 6x6cm sa vloží do kovových rámpčekov a označí sa ceruzkou strana so želatínou. Papiere sa zabalia do alobalu a dajú sterilizovať v autokláve.

4. Vysterilizované plastové rámiky sa dajú do sterilných Petriho misiek v laminárnom boxe pomocou sterilných pinziet.
5. Do rámečkov sa pomocou sterilnej pinzety vložia fotopapiere a plastové rámčeky sa zaistia vysterilizovanými potravinárskymi gumičkami (pinzetami).
6. Pripravené vzorky sa nechajú 2 dni inkubovať aby sa zistilo, či sa v niektorom bode prípravy nekontaminovali.

5.2.2. Príprava spórovej suspenzie/ spórového inokula

Do Petriho misky s kultúrou vláknitej huby sa pridá roztok 0,1% Tween 80 a pomocou sterilnej hokejky sa uvoľnia spóry. Získaná suspenzia sa prepipetuje do skúmavky a premieša sa pomocou vortexu a potom sa prefiltruje cez sterilnú striekačku s filtračným zariadením do skúmavky. Pomocou Burkerovej komôrky sa zistí koncentrácia suspenzie.

Podľa vypočítanej koncentrácie sa roztok nariedi sterilnou vodou tak, aby bolo 100 konídií v 400 μ l.

5.2.3. Príprava inokulovaných fotografických vzoriek

Suspenzia sa nanáša na spracované fotopapiere v objeme 400 μ l, a na filtračný papier na dne Petriho misky sa pridá 1000 μ l sterilnej vody.

Naočkované vzorky sa nechajú kultivovať cca 3 dni. Pravidelne sa kontroluje či narástli kolónie, a na filtračný papier sa každý deň pridá sterilná voda aby sa udržal vlhký. Vzorky sa odfotia.

5.2.4. Ošetrovanie fotografií plazmou

Vzorky fotografií sa vystavia účinku NTP plazmy. Režim ošetrovania sa určuje podľa druhu fotografie, stupňa poškodenia a intenzity mikrobiálnej kontaminácie.

5.2.5. Vyhodnotenie dekontaminačného účinku/Stanovenie efektívnej dávky

Po ošetrovaní plazmou sa vzorky nechajú ďalej kultivovať niekoľko dní. Po skončení kultivácie sa porovnávajú jednotlivé kolónie. Kolónie, ktoré počas ostatnej kultivácie nenarástli, sa považujú za devitalizované. Kolónie, ktoré narástli, devitalizované neboli. Z počtu jednotlivých kolónií sa určí viabilita (%) ako percentuálny podiel viabilných kolónií k celkovému počtu kolónií.

Efektívnosť je možné určiť pomocou ED50, resp. ED90 ako v predchádzajúcom prípade.

5.3. Metodika sledovania účinnosti dekontaminácie na historickom pergamente

5.3.1. Stanovenie účinnosti dekontaminácie vzoriek pergamentu

Vzorky pergamentu sa po dekontaminácii uchovávajú v sterilných Petriho miskách (55). Vzorky sa po diagonále prestrihnú na dve polovice, z ktorých jedna sa uchová na budúce spracovanie, a druhá sa znova prestrihne na dve časti, ktoré sa prenesú do sterilných kónických skúmaviek obsahujúcich 2 ml sterilného 0,1% vodného roztoku Tweenu 20. Každá kónická skúmavka s dvoma kúskami jednej vzorky pergamentu sa 10 minút odstreďuje, aby sa bunky zachytené na pergamente uvoľnili do roztoku. Vzniknutá suspenzia sa odpipetuje na štyri pripravené Petriho misky (\varnothing 9 cm) s SLA fortifikovaným a dva kúsky vzorky sa prenesú na menšiu Petriho misku s rovnakým živným médiom. Všetky štyri vzorky sa spracujú rovnakým postupom a kultivujú sa päť dní pri laboratórnej teplote.

6. Živné média a roztoky

Živné média

CzDA – Czapek-Doxov agar

Zloženie: sacharóza 30 g/L, dusičnan sodný (NaNO₃) 2 g/L, hydrogénfosforečnan draselný (K₂HPO₄) 1 g/L, síran horečnatý (MgSO₄) 0,5 g/L, chlorid draselný (KCl) 0,5 g/L, síran železnatý (FeSO₄) 0,01 g/L, agar 15 g/L

Na prípravu média sa naváži 4,9 g prípravku na 100 ml deionizovanej vody; pH 7,2.

MHA – Mueller Hintonov agar

Zloženie: hovädzí extrakt 2 g/L, kazeínový hydrolyzát 17,5 g/L, škrob 1,5 g/L, agar 17 g/L

Na prípravu média sa naváži 3,8 g prípravku na 100 ml deionizovanej vody, pH 7,3.

PDA – zemiakovo-glukózový agar

Zloženie: zemiakový extrakt 5g/L, glukóza 20 g/L, agar 17 g/L

Na prípravu média sa naváži 4,2 g na 100 ml deionizovanej vody; pH 6,4 - 6,6.

SGA – Sabouraudov agar

Na prípravu sa naváži 2 g glukózy a 1 g peptónu na 100 ml deionizovanej vody; pH 6,4.

SLA – agar so sladínovým extraktom

Zloženie: maltóza 12,5 g/L, dextrín 2,5 g/L, glycerol 1 g/L, peptokomplex 2,6 g/L, agar 17 g/L
a prípravu média sa naváži 3,56 g prípravku na 100 ml deionizovanej vody; pH 6,4 – 6,6.

SLA fortifikované glukózou

Zloženie: maltóza 12,5 g/L, dextrín 2,5 g/L, glycerol 1 g/L, peptokomplex 2,6 g/L, agar 17 g/L,
glukóza 5 g/L

Na prípravu média sa naváži 3,56 g prípravku a 0,5 g glukózy na 100 ml deionizovanej vody;
pH 6,4 – 6,6.

Všetky pripravené živné médiá sa sterilizujú pri teplote 120 °C po čas 20 minút.

Roztoky

Karbolfuchsin (koncentrovaný)

Fuchsin bázičský 1 g, etanol (96%) 10 ml, 5% roztok fenolu 100 ml

Fuchsin rozotrieme v porcelánovej miske s etanolom a ku zmesi pridáme vodný roztok fenolu. Necháme stáť do druhého dňa a potom farbivo filtrujeme. Uchováваме v zábrusovej fľaši.

Kongo červeň

Kongo červeň 3 g, amoniak (NH₃) 2 ml, deionizovaná voda 100 ml

Kryštalová violet'

Roztok A: kryštalová violet' 5 g, etanol (96%) 200 ml

Roztok B: 1% šťaveľan amónny

Zmiešame 20 ml roztoku A s 80 ml roztoku B a sfiltrujeme.

Laktofenol s bavlíkovou modrou

Kryštalický fenol 20 g, kyselina mliečna (50%) 20 g, glycerol 40 g, deionizovaná voda 20 ml
Fenol najprv zahrejeme s vodou a po rozpustení pridáme kyselinu mliečnu a glycerol. Na 10 g laktofenolu pridáme 0,05 g bavlíkovej modrej. Po 24 h prefiltrujeme. Uchováame v tmavej fľaši.

Lugolov roztok

Jód (I₂) 1 g, jodid draselný (KI) 2 g, deionizovaná voda 300 ml
Jód s jodidom draselným dobre rozotrieme v 10 ml deionizovanej vody v trecej miske a doplníme zvyškom vody na 300 ml. Roztok uchováame v tmavých fľašiach.

Malachitová zelená

Malachitová zelená 0,5 g, deionizovaná voda 100ml

Safranín

Safranín 0,25 g, etanol (96%) 10 ml
Safranín rozpustíme v etanole a po rozpustení pridáme 100 ml deionizovanej vody.

Tweenová voda

Tween 80 0,01 ml, deionizovaná voda 100 ml
Pripravený roztok sterilizujeme 20 minút pri teplote 120 °C

Použitá literatúra

1. Sterflinger, K. a Piñar, G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills? In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97.
2. Konkol, N.R., a iní. Early detection of fungal biomass on library materials. In: *Journal of Cultural Heritage*. 2012, 13, s. 115-119.
3. Rakotonirainy, M.S., Héraud, C. a Lavédrine, B. 2003. Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*. 2003, 18, s. 113-121.
4. Canhoto, O., a iní. 2004. Application of electronic nose technology for the detection of fungal contamination in library paper. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2004, 54, s. 303-309.
5. Konkol, N., McNamara, Ch.J. a Mitchell, R. 2010. Fluorometric detection and estimation of fungal biomass on cultural heritage materials. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, 80, s. 178-182.
6. Rolleke, S., a iní. 1996. Identification of Bacteria in a Biodegraded Wall Painting by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62.
7. Michaelsena, A., a iní. 2006. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2006, 58, s. 133-141.
8. Michaelsen, A., a iní. 2009. Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: A case study. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009, 63, s. 161-168.

9. Kraková, L., a iní. 2012. A multiphasic approach for investigation of the microbial diversity and its biodegradative abilities in historical paper and parchment documents. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2012, 70, s. 117-125.
10. Katuščák, S., a iní. 2009. *Záchrana, stabilizácia a konzervovanie tradičných nosičov informácií v Slovenskej republike (KNIHA SK)*. 2009.
11. Perďochová, Ľ. 2005. *Detekcia kontaminácie*. KNIŽNICA. 2005, roč. 6, č. 3.
12. Votava, M. 2001. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Podolí : Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.
13. Sterflinger, K. 2010. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal biology reviews*. 2010, 24, s. 47-55.
14. Hirsh, P., Echhardt, F.E.W. a Palmer, R.J. 1995. Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms - A mini review. *Microbiological Methods*. 1995, 23, s. 143-167.
15. Koestler, R.J., Warscheid, T. a Nieto, F. 1997. *Biodeterioration: risk factors and their management. Saving our Architectural Heritage: The Conservation of Historic Stone & Structures*. 1997, s. 25-36.
16. Rakotonirainy, M.S., Héraud, C. a Lavédrine, B. 2003. Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*. 2003, 18, s. 113-121.
17. Ranalli, G., a iní. 2003. Rapid biodeteriogen and biocide diagnosis on artwork: a bioluminescent low-light imaging technique. *Annals of Microbiology*. 2003, 53.
18. Ceresa, L. a Ball, P. 2009. Using ATP bioluminescence for microbiological measurements in pharmaceutical manufacturing. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. 2009.
19. Kodaka, H., a iní. 1996. Adenosine triphosphate content of microorganisms related with food spoilage. *Food Microbiology*. 1996, 13, s. 29-34.
20. Karl, D.M. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiological Reviews*. 1980, 44 (4), s. 739-796.
21. Wilson, C.A., Stevenson, L.H. a Chrzanowski, T.H. 1981. The contribution of bacteria to the total adenosine triphosphate extracted from the microbiota in the water of a salt-marsh creek. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1981, 50, s. 183-195.
22. Webster, J.J., a iní. 1985. Determination of microbial cell numbers in subsurface samples. *Ground Water*. 1985, 23, s. 17-25.
23. Schneider, D. A. a Gourse, R.L. 2004. Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279.
24. Siebel, E., a iní. 2008. Correlations between total cell concentration, total adenosine triphosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drinking Water Engineering and Science (Discussions)*. 2008, 1, s. 71-86.
25. Wang, Y., a iní. 2009. Cultivation, isolation and characterization of low nucleic acid (LNA) content bacteria from various freshwater environments. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 2009, 3, s. 889-902.
26. DeLuca, M. a McElroy, W. D. 1974. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry*. 1974, 13, s. 921-925.
27. McElroy, W. D. 1951. Properties of the reaction utilizing adenosinetriphosphate for bioluminescence. *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 191, s. 547-557.
28. Seliger, H. H. 1989. Some reflections on McElroy and bioluminescence. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 1989, 4(1), s. 26-28.

29. Prokšová, M., Horváthová, G. a Tóthová, L. 2012. ATP – indikátor mikrobiálneho znečistenia vody. *Hydrochémia*. 2012.
30. Hansen, H.O. a Karl, D.M. 1978. Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples. *Methods Enzymol.* 1978, 57, s. 73-85.
31. Atkinson. 1968. The energy charge of the adenylta pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifier. *Biochemistry*. 1968, 7, s. 4030-4034.
32. Selan, L., a iní. 1992. Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, 30, s. 1739-1742.
33. Chollet, R. a Ribault, S. 2012. Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System. *Bioluminescence*. 2012.
34. Rakotonirainy, M.S. a Arnold, S. 2008. Development of a new procedure based on the energy charge measurement using ATP bioluminescence assay for the detection of living mould from graphic documents. *Luminescence*. 2008, 23, s. 182-186.
35. Troiano, F., a iní. 2012. Early detection of fungal infections on paper: on site test based on beta-N-acetylhexosaminidase activity. 2012.
36. Miller, M., a iní. 1998. The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Applied Environmental Microbiology*. 1998, 64, s. 613-617.
37. Reeslev, M., Miller, M. a Nielson, K.F. 2003. Quantifying mold biomass on gypsum board: comparison of ergosterol and Beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters. *Applied Environmental Microbiology*. 2003, 69, s. 3996-3998.
38. Fabbri, A.A., a iní. 1997. Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1997, 39, s. 61-65.
39. Šipošová, N. Metódy testovania biologickej kontaminácie lignocelulóзовých materiálov. Technologický projekt. STU v Bratislave. Bratislava. 2015.
40. Šipošová, N. Testovanie biologickej kontaminácie objektov kultúrneho dedičstva. Bakalárska práca. STU v Bratislave. Bratislava. 2015.
41. Bastos, C.A. a Magan, N. 2006. Potential of an electronic nose for the early detection and differentiation between *Streptomyces* in potable water. *Sensors and Actuators B*. 2006, 116, s. 151-155.
42. Warscheid, T. 1990. Untersuchungen zur Biodeterioration von Sandsteinen unter besonderer Berücksichtigung der chemoorganotrophen Bakterien. Technical dissertation 2275. 1990.
43. Korpi, A., a iní. 1997. Microbial growth and metabolism in house dust. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1997, 40, s. 19-27.
44. Magan, M. a Evans, P. 2000. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*. 2000, 36, s. 319-340.
45. Tothill, I.E. a Magan, N. 2003. Rapid detection methods for microbial contaminants. Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance. 2003, s. 136-160.
46. Porep, J.U., a iní. 2014. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food control*. 2014, 37, s. 77-84.
47. Dohnal, V., Ježková, A. a Skládanka, J. 2008. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Popularizace vědy*. 2008, 10.
48. Rao, S. 2008. *Molecular techniques in clinical microbiology*. 2008.

49. Urzi, C., a iní. 2003. Fluorescent in situ hybridization (FISH) to study biodeterioration. *Molecular Biology and Cultural Heritage*. 2003, s. 55-60.
50. La Cono, V. a Urzi, C. 2003. Fluorescent in situ hybridization applied on samples taken with adhesive tape strips. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, 55, s. 65-71.
51. Kraková, L., a iní. 2010. Analýza pergamenu: štúdium kontaminujúcich mikroorganizmov a molekulárna identifikácia jeho pôvodu. *Knižnica*. 2010, 11(2-3), s. 76-83.
52. Javorský, P. 2003. Amplifikačné metódy. PCR: stratégia a celkové požiadavky. 2003.
53. Štefkovičová, Mária et al. 2007. Dezinfekcia a sterilizácia - teória a prax II. Žilina : Vrana, 2007.
54. Neubert, T. 2012. Hematologický analyzátor. Tímový projekt. České vysoké učení technické. Praha
55. Urbanová, P. 2019. Mikrobiologická dekontaminácia originálneho historického pergamenu nízkoteplotnou plazmou. Vedúca: doc. Ing. Katarína Vizárová, PhD., FCHPT STU v Bratislave. Bakalárska práca
56. Kazánová, K. 2019. Mikrobiologická kontaminácia fotografických materiálov. Bakalárska práca, FCHPT STU Bratislava vedúca: doc. Ing. Viera Jančovičová, PhD.
57. Šípošová, N. 2017. Sledovanie dezinfekčných účinkov nízkoteplotnej atmosférickej plazmy na papierové nosiče informácií a dedičstva. Vedúca: doc. Ing. Katarína Vizárová, PhD., FCHPT STU v Bratislave. Diplomová práca
58. Špacírová, Z. 2018. Biologická dekontaminácia papierových nosičov informácií nízkoteplotnou atmosférickou plazmou. Vedúca: doc. Ing. Katarína Vizárová, PhD., FCHPT STU v Bratislave. Diplomová práca