VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Metodika odběru a izolace bakterií, kvasinek a plísní z fotografických materiálů

prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.
Ing. J. Kadavá
Ing. S. Purkrtová, Ph.D.
Ing. D. Savická
Ing. H. Sýkorová, Ph.D.
doc. Dr. Ing. Michal Ďurovič
Ing. Barbora Benetková
Ing. Kateřina Hricková
Ing. Lucie Koukalová
Ing. Martina Nováková

Praha 2020

Obsah

Úvod

1. Metoda odběru mikroorganismů

2. Metody izolace bakterií, kvasinek a plísní

2.1 Postup izolace bakterií

2.1.1 Použitá kultivační média

2.1.2 Metodika izolace bakterií

2.2 Izolace mikroskopických vláknitých hub

2.2.1 Izolační média

2.2.2 Metodika mikroskopických vláknitých hub

3. Seznam publikací předcházejících metodice

4. Výběr použité související literatury

Příloha 1

Příloha 2

Úvod

Od svého vynálezu v r. 1831 se obor fotografie stal podstatnou součástí kulturních dějin lidstva a je proto nezbytnou povinností archivů, knihoven, muzeí a galerií uchovávat v nich uložené fotografické sbírky budoucím generacím. Historicky starší část těchto sbírek tvoří četné typy černobílých fotografických materiálů vzniklých různými historickými technikami jako výsledek přímých (jednostupňových) fotografických procesů nebo nepřímých (dvoustupňových) procesů na principu negativ-pozitiv. Ve sbírkách se proto setkáme jak s negativy (např. kalotypie, mokré kolódiové desky, suché želatinové desky, negativy na filmové podložce), tak s pozitivy (slané papíry, pozitivy albuminové, kolódiové nebo želatinové přímo kopírující a vyvolávací na podložce z barytového nebo RC papíru), ale také s diapozitivy (nejčastěji na skleněné či filmové podložce) a ušlechtilými tisky; ve 20. století se ke zmíněným fotografickým materiálům přidávají i kinematografické filmy. Z výše uvedeného výčtu materiálů tvořících fotografické fondy a sbírky je zřejmé, že jejich hlavními složkami jsou přírodní, semi-syntetické nebo syntetické organické látky, které se mohou za určitých podmínek (zejména příhodná teplota a vyšší relativní vlhkost vzduchu) stát snadným substrátem pro růst mikroorganismů (plísní, bakterií, kvasinek). Mikroorganismy mohou přitom způsobit sbírkám vážná poškození: dochází k enzymatickému štěpení polymerního řetězce substrátu (proteiny jsou štěpeny proteinázami, celulóza a její deriváty celulázami) nebo oxidačnímu poškození a vzniku skvrn na povrchu vlivem metabolitů mikroorganismů (organické kyseliny, pigmenty). Proto je nutné výskytu mikroorganismů na fotografických sbírkách předcházet jejich uložením ve vhodných klimatických podmínkách. V případě, že sbírky jsou již kontaminovány mikroorganismy, je nutné je identifikovat, zahubit a následně odstranit.

Uvedená metodika navrhuje optimální odběrový materiál a techniku odběru vzorku pro mikrobiologickou analýzu fotografických materiálů, která by v první řadě nepoškodila jejich povrch citlivý především na mechanické poškození, a zároveň vykazuje dostatečný záchyt mikroorganismů z povrchu. Metodika je rozdělena na výběr vhodné a šetrné odběrové metody mikroorganismů ve vztahu k světlocitlivé vrstvě jednotlivých materiálů, a následně na výběr optimální metody pro izolaci bakterií, kvasinek a plísní.

1. Metoda odběru mikroorganismů

Pro správný odběr mikroorganismů je nezbytné použít vhodný nástroj, který bude splňovat následující obecně platná kritéria: dosáhne cílové oblasti odběru vzorku; odebírá vzorek asepticky; neobsahuje biocidy; zachovává životaschopnost buněk; nepoškozuje stíraný materiál. Z výsledků uvedených v *Příloze 1* vyplývá, že nejvhodnějším nástrojem pro odběr mikroorganismů z materiálů se světlocitlivou vrstvou je stěr sterilní suchou houbičkou z PUR pěny. Tyto pěnové houbičky vykazují oproti běžným vatovým stěrovkám měkčí povrch, který je protkán póry. Díky charakteru materiálu jsou mikroorganismy ze stíraného povrchu na houbičce zachyceny ve vyšší míře, než je tomu u jiných stěrových materiálů. Tak je alespoň částečně

kompenzována skutečnost, že vzhledem k světlocitlivé vrstvě stíraných fotografických materiálů nelze použít zvlhčené stěrovky, u nichž je záchyt mikroorganismů přece jen o něco vyšší než u stěrů suchých. Také srovnání výtěžnosti stěrů z neporézních i porézních materiálů (plast, dřevo, textil) různými typy stěrovek jednoznačně hovoří ve prospěch použití polyuretanových pěnových stěrovek.

Vlastní stěr se provádí pomalým valivým pohybem houbičky po povrchu fotografického materiálu. Na houbičku je vyvíjen jemný tlak. V žádném případě se nesmí jednat o pohyb stěrovky smykem, kdy by případná přítomnost prachových částic mohla způsobit poškrábání světlocitlivé vrstvy na archivních materiálech (Obr. 1).

Obr. 1 Suchý stěr PUR houbičkou

Pro reprezentativní průkaz mikroorganismů by celková vzorkovaná plocha měla být co největší (pokud je přístupná), aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu mikroorganismů. Obecně je doporučeno vzorkovat plochu alespoň 100 cm^2.

U filmových kotoučů je nutné provést stěr nejen z horní strany svitku, ale i z části odmotaného filmového pásku. Po stěru vybrané plochy testovaného materiálu je stěrovka uzavřena do přiložené sterilní plastové (PS) zkumavky. Takto získané vzorky jsou zpracovány v laboratoři ideálně do 24 hodin, vzorky je případně možné uchovávat chlazené maximálně 48 hodin od vzorkování.

2. Metody izolace bakterií, kvasinek a plísní

Na základě výsledků dosažených v předcházejícím výzkumu byla pro další testování kontaminace filmových materiálů použita metoda stěru suchou polyuretanovou houbičkou valivým pohybem. V laboratoři byly stěrové houbičky lehce zvlhčeny fyziologickým roztokem a dále byly zpracovány dvěma způsoby:

1. Do zkumavky ke stěrovce byly přidány 3 ml sterilního fyziologického roztoku. Po homogenizaci na vortexu byl výtřepek v množství 200 µl aplikován na povrch příslušné agarové půdy a za sterilních podmínek rozetřen (skleněnou hokejkou) po povrchu tří agarových půd Malt extract agar (MEA), Dichloran-Glycerol Agar Base (DG18) a Plate Count Agar (PCA).

2. Přímá inokulace stěrovkou metodou křížovým roztěrem po celé ploše agarové půdy na misce s médii MEA, DG18, PCA.

Kultivace následně probíhala na médiích MEA a DG18 při laboratorní teplotě po dobu 7–10 dnů (izolace kvasinek a mikroskopických vláknitých hub) a na médiu PCA při teplotě 30 °C po dobu 3–5 dnů (izolace bakterií). Ze získaných výsledků (odečet kolonií) vyplynulo, že metoda č. 1 – inokulace výtřepku – neposkytuje relevantní výsledky, nárůsty mikroorganismů byly negativní nebo velmi nízké. Při aplikaci metody č. 2 – přímá inokulace stěrovkou – byly získány reprodukovatelné výsledky, pozitivní vyšší nárůsty jak bakterií, tak i mikroskopických vláknitých hub. Z uvedených výsledků vyplývá, že vhodným postupem pro přenos mikroorganismů ze stěrovek na kultivační média je přímý křížový roztěr stěrovkou po povrchu plotny.

2.1 Postup izolace bakterií

2.1.1 Použitá kultivační média

Plate Count Agar (PCA)

PCA je bohaté médium vhodné pro růst všech kultivovatelných druhů bakterií a kvasinek.
Složení (1 litr): pepton 5 g; kvasničný extrakt 2,5 g; glukóza 1,0 g; na ztužení 15–18 g agaru v závislosti na ztužující schopnosti agaru. Vyšší obsah agaru v médiu zaručuje jeho dostatečnou pevnost pro důkladný přenos zachycených mikroorganismů ze stěrovky. pH po sterilizaci 7,0 ± 0,2 při 25 °C.

Krevní agar Columbia

Tento agar představuje univerzální médium umožňující růst velkého spektra mikroorganismů. Přídavek ovčí krve snižuje negativní efekt kyslíku a navíc umožňuje detekci případné hemolýzy. Rozočkování kolonií na neselektivní *Columbii* vede k produkci dostatečného množství čisté monokultury, která může být následně použita pro konfirmaci a druhovou specifikaci.
Složení (1 litr): enzymatický hydrolyzát živočišných tkání 23 g; NaCl 5 g; škrob 1 g; agar 8–18 g v závislosti na ztužovací schopnosti agaru. pH po sterilizaci 7,3 ± 0,2 při 25 °C.
Po sterilizaci se do média ochlazeného na 47–50 °C asepticky přidává 50 ml sterilní defibrinované ovčí krve.

2.1.2 Metodika izolace bakterií

Pěnová stěrovka se stěrem z archivního materiálu se lehce zvlhčí sterilním fyziologickým roztokem. Následně se provede křížový roztěr po povrchu plotny s PCA agarem. Při tom je nutné dbát na důkladné otření stěrovky ze všech stran. S výhodou je možné použít též valivý pohyb stěrovky po kultivačním agaru. Inkubace zaočkovaných ploten probíhá 3–5 dní při teplotě 30 °C. V průběhu kultivace je vhodné misky průběžně kontrolovat, aby nedošlo k případnému masivnímu pokrytí povrchu plotny potenciálně přítomnými sporulujícími bakteriemi. Narostlé kolonie jsou následně zhodnoceny na základě morfologických znaků (velikost, tvar, povrch a barva kolonií) a mikroskopických znaků (Gramovo barvení). Jednotlivé druhy kolonií jsou pak přeočkovány na krevní agar. Po zkontrolování čistoty jsou tyto izoláty připraveny na hlubší identifikaci (například biochemické testy, MALDI-TOF MS, sekvenace genu pro 16S-rRNA).

2.2 Izolace mikroskopických vláknitých hub a kvasinek

2.2.1 Izolační média

Agar s dichloranem a 18 % glycerolu (DG18 - Dichloran-Glycerol Agar Base, OXOID)

Toto selektivní ztužené médium se obecně používá pro stanovení počtu kvasinek a plísní u výrobků s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,95. Médium potlačuje růst bakterií a redukuje velikost plísní. Přídavek glycerolu snižuje vodní aktivitu média z přibližně 0,99 na 0,95, čímž se médium stává vhodným i pro kultivaci xerofilních plísní, které se vyskytují v sušených a polosušených potravinách. Vzhledem k „suchému“ charakteru archivních materiálů, bylo pro izolaci zvoleno prioritně právě toto médium.

Složení (1 litr): pepton 5 g, glukosa 10 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4$ 0,5 g, dichloran 0,002 g, agar 15 g.

Sladinový agar (MEA - Malt extract agar)

Jedná se o běžný živný agar pro stanovení kvasinek a plísní.

Složení (1 litr): Malt extract 30 g, mykologický pepton 5 g, agar 15 g.

2.2.2 Metodika izolace mikroskopických hub a kvasinek

Filmový materiál byl opatrně setřen za pomoci sterilního pěnového PUR tamponu, který byl zpět umístěn do sterilního plastového (PS) obalu. V laboratoři byly tentýž den pěnovým tamponem inokulovány misky s izolačními médii (DG18, MEA).

Po inokulaci byly misky inkubovány při laboratorní teplotě (cca 22 °C) a na světle po dobu jednoho měsíce. První kontrola nárůstu proběhla po 7 dnech, dále po 14 dnech a nakonec po 30 dnech kultivace. Kvasinky vytváří matné nebo lesklé okrouhlé kolonie obvykle s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem. Plísně tvoří ploché nebo chmýřovité propagule/zárodky nebo kolonie často se zbarvenými plodícími nebo sporulujícími strukturami. Narostlé kolonie byly označeny a přeočkovány na některé z identifikačních médií – buď na

bramborovo-mrkvový agar, nebo na nový sladinový agar (MEA). Takto získané čisté kultury byly připraveny k následné identifikaci.

Poděkování
Metodika vznikla v rámci řešení grantového výzkumného projektu Ministerstva kultury ČR NAKI II *„Biodiverzita černobílých fotografických a kinematografických materiálů v archivních fondech a metody jejich dezinfekce“* (DG18P02OVV062).

3. Seznam publikací předcházejících metodice

Nováková, M.; Benetková, B.; Hricková, K.; Ďurovič, M., Sýkorová, H.; Kadavá, J.; Savická, D.; Demnerová, K.; Borýsková, Š; Hnulíková, B. Vliv metod odběru mikroorganismů na světlocitlivou vrstvu fotografických a filmových materiálů, Konference konzervátorů-restaurátorů, Mikulov, 11.–13. září 2018. (poster)

Hricková, K.; Benetková, B.; Nováková, M.; Ďurovič, M.; Knotek, V.; Sýkorová, H.; Kadavá, J.; Savická, D.; Demnerová, K. Optimization of Microbiological Sampling Methods for Light Sensitive Layer of Historical Photographic and Film Materials. The Plastic Heritage Congress, 29.–31. 5. 2019, Lisabon, 2019. (poster)

Hricková, K.; Nováková, M.; Ďurovič, M.; Benetková, B.; Sýkorová, H.; Kadavá, J.; Savická, D.; Demnerová, K.; Hnulíková, B.; Borýsková, Š. Využití PUR houbičky při mikrobiologickém průzkumu fotografických a filmových archivních fondů. XVII. Seminář restaurátorů a historiků, 18.–21. 11. 2019, Jihlava, 2019. (poster)

Purkrtová, S.; Shulha, Y.; Kováčová, N.; Savická, D.; Benetková, B.; Sýkorová, H.; Kadavá, J.; Ďurovič, M.; Demnerová, K. Microbial Contamination of Photographic and Cinematographic Materials in Archival Funds. 8th Congress of European Microbiologists, Edinburgh, 2019. (poster)

4. Výběr použité související literatury

ČSN EN ISO 18593:2019 Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metody specifikující techniky vzorkování z povrchů.

ČSN EN ISO 4833 Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovatelných při 30 °C. Norma specifikuje horizontální metodu stanovení počtu mikroorganismů počítáním kolonií vyrostlých na pevné půdě po aerobní kultivaci při 30 °C.

Valentine, N. B. et al. Evaluation of sampling tools for environmental sampling of bacterial endospores from porous and nonporous surfaces. J. Appl. Microbiol. 105, 1107, 2008.

Daley, E. F. et al. The inhibitory properties of various sponges on *Listeria* spp. Letter Appl. Microbiol. 20(4), 195, 1995.

Probst, A. J. et al. Validation of a nylon-flocked-swab protocol for efficient recovery of bacterial spores from smooth and rough surfaces. Appl Environ. Microbiol. 76 15, 5148–5158, 2010.

Ismaïl, R. et al. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. Int J Environ Res Public Health. 10(11), 6169–6183, 2013.

Ďurovič Michal a kol. Restaurování a konzervování archiválií a knih, Paseka, Litomyšl-Praha 2002.

Bacílková B. Poškození mikroorganismy (v: Závěrečná zpráva grantového úkolu – ochrana archivních materiálů před živelnými pohromami v síti archivů České republiky), Praha 2004.

Bacílková B. Mikrobiální kontaminace prostředí vybraných archivních a knihovních depozitářů (v: Sborník Workshopu projektu NAKI DF11P010VV020), Praha 2015.

Fassatiová O. Micromycetes in archives and book depositories in the Czech Republic, Czech Mycol. 48 (1), 1995.

Gallo, F. Biological factors in deterioration of paper. Roma: ICCROM, 151 p., 1985.

Odvárková J., Bacílková B. Mikrobiologická kontaminace rukopisů a vzácných tisků a jejich kontrola, 7. odborná konference Olomouc, 1998.

Sterflinger K., Piňar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art, Appl Microbiol Biotechnol, 97, 9637–9646, 2013.

Šimůnek J. a kol. Mykologické vyšetření knih a prostředí knihovny benediktinského kláštera v Rajhradě, Masarykova univerzita Brno, 2015.

Příloha 1

Výběr vhodné metody odběru mikroorganismů

V této části výzkumu byl testován vliv různých odběrových metod na různé typy fotografií a filmů. Zájem byl soustředěn především na světlocitlivou vrstvu těchto materiálů, která bývá jejich nejméně odolnou částí: je náchylná k mechanickému poškození nebo jí hrozí riziko botnání ve vodném prostředí.

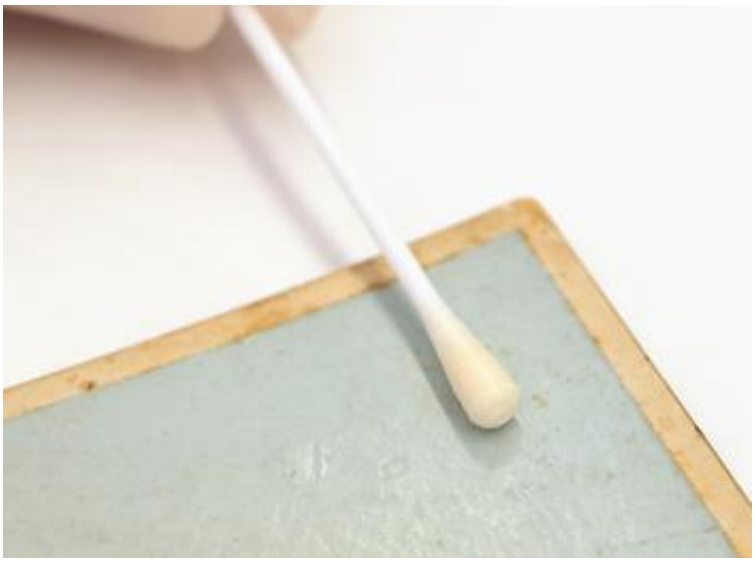
Zkoumané materiály

K účelu tohoto výzkumu byly nakoupeny historické vzorky následujících fotografických technik, odpovídající nejčastěji se vyskytujícím technikám v archivních a knihovních sbírkách: albuminové papíry, kolódiové papíry matné, kolódiové papíry lesklé, želatinové barytové papíry, želatinové RC papíry, želatinové skleněné negativy, nitrátové želatinové filmy, triacetátové želatinové filmy, PET želatinové filmy.

Pro upřesnění a potvrzení identifikace všech materiálů, probíhající přímo při nákupu za odborného dohledu restaurátorek fotografií, byly tyto dále podrobeny měření IČ spektroskopií.

Metody odběru mikroorganismů

Vybrány byly následující metody odběru mikroorganismů: suchý stěr vatovou tyčinkou (a), suchý stěr štětcem (b), suchý stěr houbičkou (c), otisk filtračním papírem (d), otisk sametem (e) a otisk kultivačním médiem *Hygicult* (f):



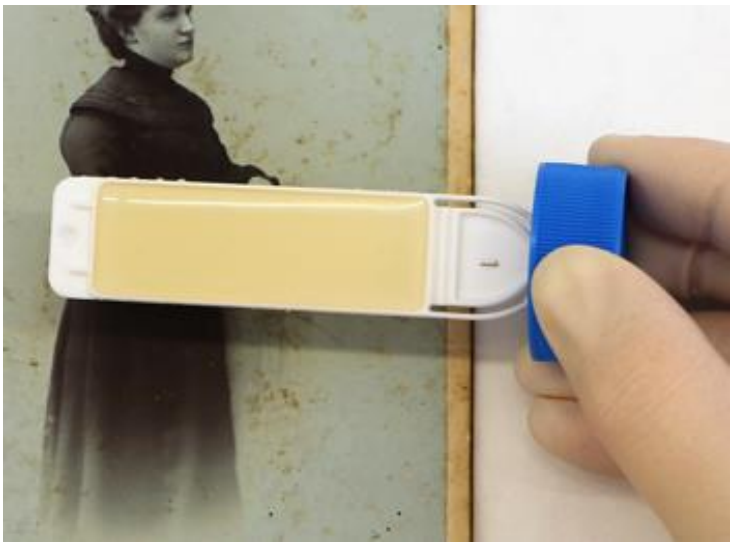
Suchý stěr vatovou tyčinkou (a)

Suchý stěr štětcem (b)

Suchý stěr houbičkou (c)

Otisk filtračním papírem (d)

Otisk sametem (e)



Otisk kultivačním médiem *Hygicult* (f)

Suchý stěr vatovou tyčinkou je v praxi nejvíce rozšířen. Suchá vatová tyčinka je jemně otírána po povrchu vzorku a posléze na živné médium zainokulována buď přímo, nebo skrze vytřepání ve fyziologickém roztoku. Na stejném principu funguje suchý stěr štětcem z PES vláken. Odběr houbičkou z PUR pěny se provádí valivým pohybem (nikoli otěrem). Při metodě otisku filtračním papírem je čtverec filtračního papíru otisknut do živného média, poté lehce přitlačen na vzorek a následně opět přenesen a otisknut na živné médium ke kultivaci. Otisk sametem oproti tomu využívá suchý sametový čtverec, který je na vzorek jemně přitlačen a následně otisknut na živné médium. Při otisku kultivačním médiem *Hygicult* dochází k otisku vzorku přímo na živné médium nanesené na destičce. Systém je možné ihned uzavřít a kultivovat.

Metody průzkumu

Vzorky historických fotografií a filmů byly rozřezány na malé čtverečky velikosti 2 x 2 cm (pro odběry a, b, c, d) a 2,5 x 2,5 cm (pro odběry e) a obdélníčky velikosti 2 x 5 cm (pro odběry f). Pro každou metodu odběru mikroorganismu byly zároveň hodnoceny tři nezávislé vzorky; pokud to bylo možné s ohledem na charakter dostupného historického materiálu, zahrnovala tato trojice vzorků různé optické denzity fotografického a filmového materiálu.

Průzkum byl zahájen optickou mikroskopií (OM) povrchu všech vzorků na stereomikroskopu Olympus SZX 9, polarizačním mikroskopu Olympus BX 60 (ve vrchním a bočním dopadajícím světle) a digitálním optickém mikroskopu Keyence VHX 6000 S (v dopadajícím světle s možností zvolení konkrétního úhlu pozorování). U vybraných vzorků, kde byly pomocí optické mikroskopie zjištěny rozdíly ve vzhledu po aplikaci mikrobiologických odběrových metod, byly tyto rozdíly detailněji zkoumány pomocí skenovací elektronové

mikroskopie (SEM) pomocí přístroje Tescan Vega 3LMU, SE. Přítomnost a hloubka případných rýh byla zjišťována pomocí profilometrie (P) měřené na výše zmíněném digitálním optickém mikroskopu Keyence VHX 6000 S. Případná rezidua kultivačního média byla zjišťovana IČ spektroskopií na mikrospektroskopu Nicolet iN10 pomocí techniky ATR s Ge krystalem v režimu mapování.

Výsledky

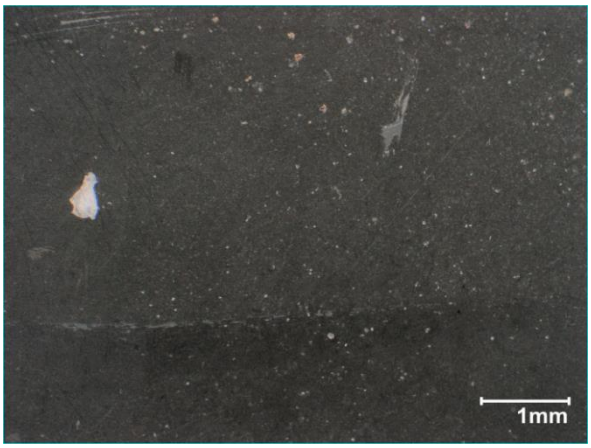
Výsledky všech pozorování jsou shrnuty v Tab. 1. Z tabulky výsledků je patrné, že nejodolnějšími fotografickými technikami vůči všem metodám odběru mikroorganismů jsou albuminové a lesklé i matné kolódiové papíry. Všechny tyto fotografie byly adjustovány na podložním kartonu; přítomnost takové adjustace tedy do jisté míry zvyšuje odolnost vůči celkovému mechanickému poškození. Naproti tomu nejméně odolným materiálem byly PET želatinové filmy, ale také želatinové RC papíry a skleněné negativy.

Tab. 1 Shrnutí výsledků vlivu odběru mikroorganismů na historické fotografické a filmové materiály

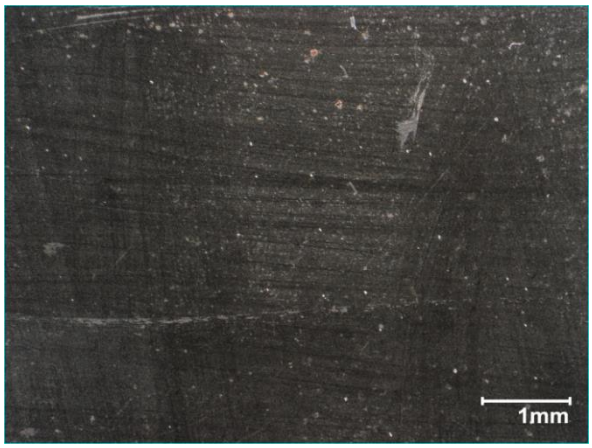
	Albuminové papíry	Kolódiové papíry matné	Kolódiové papíry lesklé	Želatinové barytové papíry	Želatinové RC papíry	Želatinové skleněné negativy	Nitrátové želatinové filmy	Triacetátové želatinové filmy	PET želatinové filmy
Suchý stěr vatovou tyčinkou	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗
Suchý stěr štětcem	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗
Suchý stěr houbičkou	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Otisk filtračním papírem	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✗
Otisk sametem	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✗
Otisk Hygicultem	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗

Suchý stěr vatovou tyčinkou a suchý stěr štětcem způsobovaly škrábance na pozitivech i negativech s želatinovou světlocitlivou vrstvou a dále na triacetátových a PET želatinových filmech; tyto škrábance byly zřetelně pozorovatelné pomocí optické i skenovací elektronové mikroskopie (Obr. 1–4), pomocí profilometrie bylo ale zjištěno, že jejich hloubka je přibližně 1 µm (Obr. 5), stejně tak i u všech ostatních pozorovaných škrábanců). Otisk filtračním papírem zanechával rezidua vláken (želatinové skleněné negativy) nebo živného média (PET filmy, Obr. 6

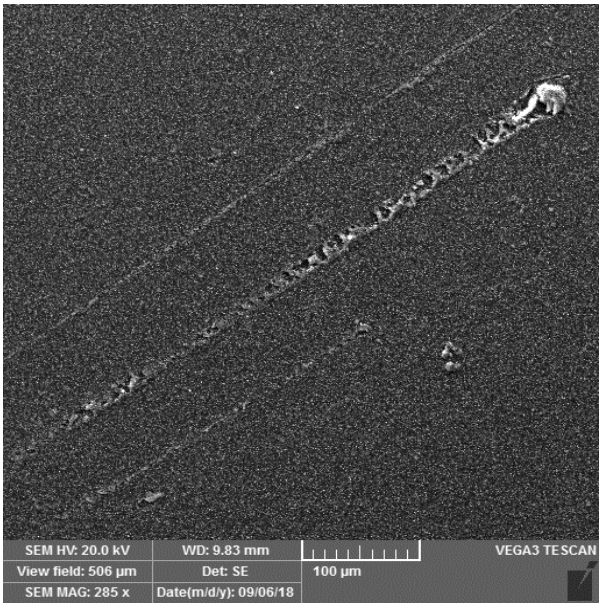
a 7). Stejně tak otisk sametem zanechával rezidua vláken (želatinové RC papíry) a navíc způsoboval i málo zřetelné škrábance (PET filmy). Otisk kultivačního média *Hygicult* zanechával četná rezidua živného média (želatinové RC papíry, želatinové skleněné negativy, PET filmy) a způsoboval kroucení nitrátových filmů. **Suchý stěr houbičkou nezpůsoboval na žádném z testovaných vzorků pozorovatelné změny.**



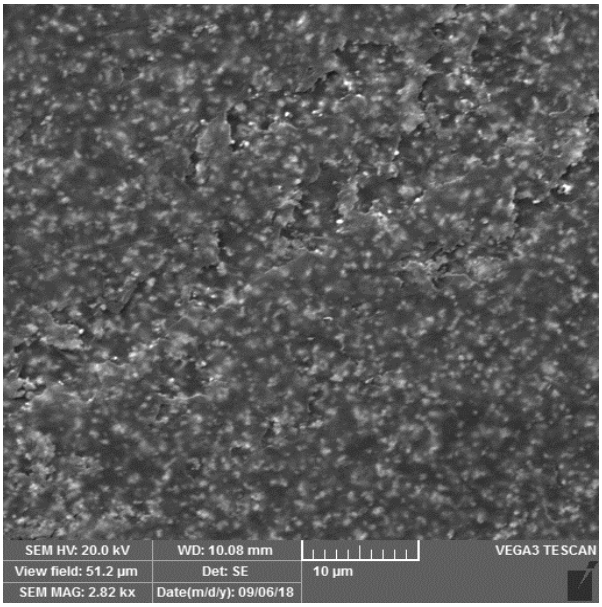
Obr. 1 Želatinový skleněný negativ (vz. 1), povrch před zkouškami, digitální optický mikroskop



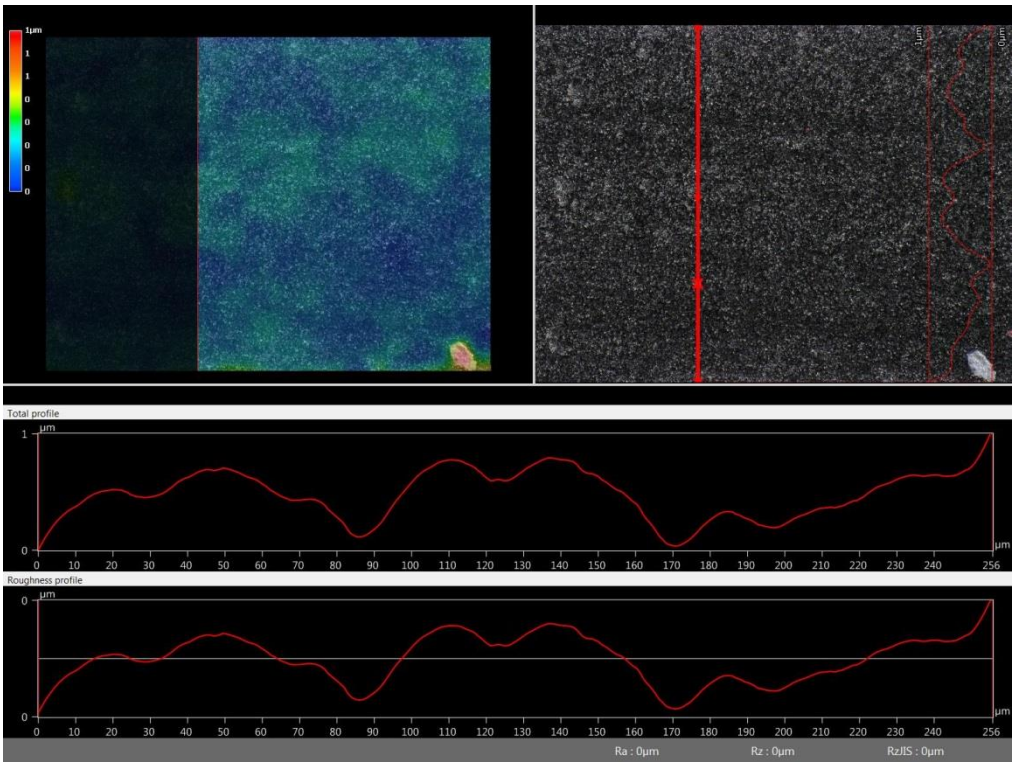
Obr. 2 Želatinový skleněný negativ (vz. 1), povrch po zkouškách – škrábance, digitální optický mikroskop



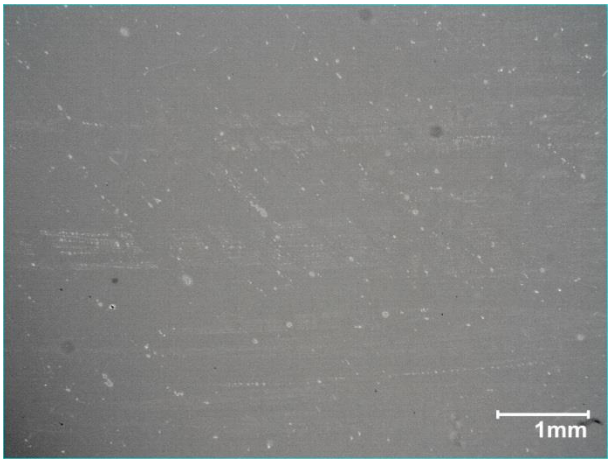
Obr. 3 Želatinový skleněný negativ (vz. 1), povrch po zkouškách – škrábance způsobené zatřením přítomných prachových částic do světlocitlivé vrstvy, sken. el. mikroskop



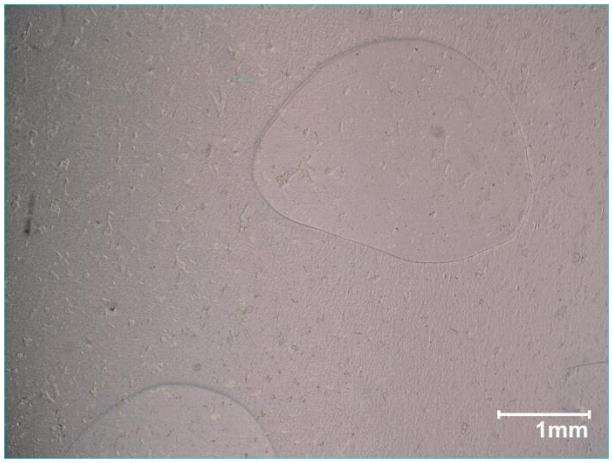
Obr. 4 Želatinový skleněný negativ (vz. 1), povrch po zkouškách – škrábance způsobené samotným suchým otěrem světlocitlivé vrstvy vatovou tyčinkou, sken. el. mikroskop



Obr. 5 Želatinový skleněný negativ (vz. 1), povrch po zkouškách – profil rýhy, digitální optický mikroskop



Obr. 6 PET želatinový film (vz. 1), povrch před zkouškami, digitální optický mikroskop



Obr. 7 PET želatinový film (vz. 1), povrch po zkouškách – rezidua živného média, digitální optický mikroskop

IČ spektroskopií se kvůli obdobné chemické podstatě kultivačního média a želatinové světlocitlivé vrstvy nepodařilo potvrdit přítomnost reziduí kultivačních médií; ty byly nicméně dobře pozorovatelné již optickou mikroskopií (otisk *Hygicultem* na PET filmu byl pozorovatelný v procházejícím světle i pouhým okem).

.

Příloha 2

Výběr optimálních metod izolace bakterií, kvasinek a plísní

Úspěšná izolace mikroorganismů závisí na řadě faktorů – výběr vhodného kultivačního média, vhodné kultivační teploty, správné vyhodnocení atd. Avšak na počátku celého procesu izolace stojí zcela zásadní krok, kterým je odběr vzorku. Pro správný odběr mikroorganismů je nezbytné použít vhodný nástroj, který bude splňovat následující obecně platná kritéria: dosáhne cílové oblasti odběru vzorku; odebírá vzorek asepticky; neobsahuje biocidy; zachovává životaschopnost buněk; nepoškozuje stíraný materiál. Nevhodně zvolený stěrový materiál v kombinaci s nesprávným provedením vlastního stěru může v důsledku vést ke zcela nerelevantním, většinou silně podhodnoceným, výsledkům.

1. Volba stěrového materiálu

Postup testování různých stěrových materiálů a vyhodnocení jejich vlivu na světlocitlivou vrstvu detailně popisuje příloha 1. Na základě uvedených výsledků byly pro další práci zvoleny stěrovky z polyuretanové pěny, které nezpůsobovaly na žádném z testovaných vzorků pozorovatelné změny.

Pro vyšší výtěžnost stěrů se obecně využívají zvlhčené stěrovky. Zvlhčení může být provedeno buď sterilním fyziologickým roztokem, nebo speciálními médii. Výhodou použití takových médií je prokazatelné zvýšení životaschopnosti buněk až po dobu 72 hodin. Dalším zajímavým benefitem je i neutralizace zbytkových desinfekčních prostředků potenciálně přítomných na testovaných površích. Tímto postupem je možné výrazně snížit riziko falešně negativních záchytů. Ovšem v případě testování mikrobiologické zátěže u citlivých archivních materiálů je možnost stěru zvlhčenou stěrovkou zcela vyloučena. Jedinou možnou volbou je tedy suchý stěr i za cenu mírně podhodnocených výsledků.

2. Způsob odběru vzorku

V běžné praxi se stěr provádí důkladným setřením kontrolované plochy. Podle charakteru a velikosti stírané plochy se volí vhodné odběrové soupravy (houbičky, stěrové tampóny, stěrové plachetky). Standardní postupy jsou specifikovány v normě ČSN ISO

18593:2019: Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metody specifikující techniky vzorkování z povrchů.

Obecně se doporučuje použít sterilní stěrovku/výtěrovku pro těžko dostupná úzká místa a místa o ploše < 100 cm^2. Pro vzorkování ploch > 100 cm^2 je doporučeno použít stěrovou plachetku/houbičku. Pro průkaz (či zjištění diverzity) mikroorganismů by celková vzorkovaná plocha měla být co největší (pokud je přístupná), aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu mikroorganismů. Je doporučeno vzorkovat plochu mezi 1000 cm^2 – 3000 cm^2. Pro stanovení počtu mikroorganismů postačí stěr plochy do 100 cm^2 (vymezeno šablonou).

Vzhledem ke skutečnosti, že povrch archivních materiálů může být zanesen prachovými částicemi, je nutno věnovat zvýšenou pozornost i samotné technice odběru. Nešetrný odběr může ve spojení s ostrými prachovými částicemi způsobit na světlocitlivé vrstvě nevratné změny (viz například Obr. 3 v příloze 1). Při odběru vzorků z běžných materiálů je kladen důraz zejména na důkladné setření testované plochy, na stěrovku je potřeba vyvinout dostatečný tlak, samotný stěr se provádí v několika různých směrech, tak aby záchyt mikroorganismů byl maximální. Tento postup je z výše uvedených důvodů pro materiály se světlocitlivou vrstvou zcela nevhodný. Stěr je nutno provádět citlivě, stěrovku po povrchu nesmýkat, ale vést ji pozvolným pomalým valivým pohybem s jemným přítlakem. Stěr provedený tímto způsobem nezpůsobuje na archivních materiálech žádné viditelné poškození (viz Příloha 1).

3. Výtěžnost stěrů

Na základě výše uvedených poznatků byla jako nejvhodnější metoda odběru vzorků z materiálů se světlocitlivou vrstvou pro zjištění mikrobiální diverzity zvolena metoda suchého stěru pěnovou polyuretanovou houbičkou. Od standardních postupů se tento liší v několika bodech shrnutých v Tab. 1.

Tab. 1 Porovnání doporučeného způsobu stěrů pro mikrobiologickou analýzu z běžných a citlivých materiálů

	Běžné odolné materiály (kov, plast, sklo, PVC, dřevo…)	Archivní materiály se světlocitlivou vrstvou
cíl stěru – priorita	maximální záchyt mikroorganismů	minimální poškození světlocitlivé vrstvy
materiál stěrovky	bavlna, celulóza, PUR, PES,…	PUR pěna
povrch stěrovky	zvlhčený	suchý
pohyb stěrovkou	smykem v několika směrech	valivý
tlak na stěrovku	maximální možný	jemný přítlak

Pro zjištění jak velký vliv má doporučená modifikovaná technika stěru na záchyt mikroorganismů, byla provedena série modelových testů pro určení výtěžnosti. Pro testy byly zvoleny sbírkové kmeny *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 (zástupce bakterií) a *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 (zástupce vláknitých mikromycet).

3.1 Pracovní postup

Příprava výchozí suspenze spor mikromycet

K přípravě modelové suspenze byla použita čistá kultura sbírkového kmene *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222. Kultura narostlá na Petriho misce (půda PDA – Potato Dextrose Agar) byla přelita polysorbátem (zvýšení smáčivosti) a uvolněna z povrchu s použitím skleněné tyčinky. Hyfy byly od spor odděleny filtrací přes skleněný filtr. Ze získaného filtrátu byla za použití Bűrkerovy počítací komůrky připravena suspenze o koncentraci 10^6 spór/ml. Jako ředicí médium byl použit sterilní fyziologický roztok (0,9% NaCl). Počáteční množství buněk v suspenzi bylo následně zkontrolováno i kultivačně (výsev na pevné médium PDA s následnou kultivací při 25 °C) a řádově odpovídalo požadované koncentraci 10^6 KTJ/ml. Z této výchozí suspenze byly za použití desítkového ředění sterilním fyziologickým roztokem připraveny pracovní suspenze o koncentraci 10^4 a 10^3 spór/ml.

Příprava výchozí bakteriální suspenze

K přípravě modelové suspenze byla použita čistá kultura sbírkového kmene *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418. Z kultury narostlé na půdě PCA (Plate Count Agar) byla připravena suspenze odpovídající 1 stupni McFarlandovy zákalové stupnice (1 McF). Tato hodnota u drobných grampozitivních koků odpovádá zhruba koncentraci buněk 10^8 KTJ/ml. Počáteční množství buněk v suspenzi bylo následně zkontrolováno i kultivačně (výsev na pevné médium PCA s následnou kultivací při 30 °C) a řádově odpovídalo požadované koncentraci 10^8 KTJ/ml. Z této výchozí suspenze byly za použití desítkového ředění fyziologickým roztokem připraveny pracovní suspenze o koncentraci 10^4 a 10^3 KTJ/ml.

Cílená kontaminace modelových vzorků (materiálů) a zpětný stěr

Na jednotlivých materiálech (historické černobílé fotografie) byly vyznačeny testovací plochy o velikosti 10 x 10 cm (tj. 100 cm^2). Na tuto plochu bylo aplikováno 500 µl suspenze mikroorganismů (bakterie nebo spóry mikromycet) dané koncentrace. Suspenze byla rovnoměrně rozetřena ve dvou směrech sterilní špičkou po celé vytyčené ploše. Výsledný stupeň kontaminace materiálů je uveden v Tab. 2.

Tab. 2 Stupeň kontaminace vzorových materiálů

Koncentrace výchozí suspenze	**10^4 KTJ/ml**	**10^3 KTJ/ml**
Aplikovaný objem	500 µl	500 µl
Plocha pro kontaminace a následný stěr	100 cm^2	100 cm^2
Výsledná kontaminace na vytyčené ploše	**$5 \cdot 10^3$ KTJ/100 cm^2**	**$5 \cdot 10^2$ KTJ/100 cm^2**

Po aplikaci se nechala suspenze na daném materiálu zaschnout. Následně byl proveden zpětný stěr celé vytyčené plochy suchou pěnovou stěrovkou doporučovaným pomalým valivým pohybem s jemným tlakem. Stěrovky pak byly uzavřeny do přiložených sterilních plastových zkumavek a ponechány 5 hodin v pokojové teplotě (simulace prodlevy mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním).

Zpracování zpětného stěru

Do zkumavek se stěrovkami bylo přidáno 5 ml sterilního fyziologického roztoku a obsah byl důkladně protřepán na vortexu. Část výtřepku (500 µl) pak byla rovnoměrně rozetřena

skleněnou hokejkou na příslušné předsušené pevné médium a následně kultivována (misky s PCA pro bakterie při 30 °C 2 dny; misky s PDA pro mikromycety při 25 °C 5 dní).

Pro stanovení pozadí (možná počáteční kontaminace) byl u každého materiálu ještě před cílenou kontaminací proveden suchý stěr z vytyčené plochy.

3.2 Výsledky

Po kultivaci byly na miskách spočteny narostlé kolonie. Výsledky byly porovnány s teoretickým počtem KTJ, který by odpovídal úrovni cílené kontaminace (viz tabulka 3). Výtěžnost stěrů doporučovanou metodou (suchá polyuretanová houbička, valivý pohyb) se pohybovala mezi 36–76 %. Tento výsledek odpovídá obecně udávaným hodnotám výtěžnosti stěrů z různých materiálů různými technikami. V literatuře se setkáváme s hodnotami výtěžnosti mikrobiologických stěrů v rozmezí 20–80 % v závislosti na typu stíraného materiálu, na zvoleném stěrovém materiálu, na technice stěru, a v neposlední řadě i v závislosti na cílovém mikroorganismu. Je třeba si uvědomit, že vypočtené hodnoty výtěžnosti jsou samy o sobě zatíženy poměrně velkou chybou – již samotná hodnota KTJ ve výchozí suspenzi je pouze orientační, další příspěvky k nejistotě pak přináší ředění, pipetování atd. V každém případě při stěrové metodě vyšetřování povrchů je nutné brát v potaz skutečnost, že výsledky jsou vždy více či méně podhodnocené.

Tab. 3 Výtěžnost zpětných stěrů z kontaminovaných materiálů

	Staphylococcus epidermidis		*Aspergillus brasiliensis*	
předpokládaná kontaminace na dané ploše (KTJ/100cm^2)	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$
teoretický počet kolonií na pevném médiu*	500 KTJ	50 KTJ	500 KTJ	50 KTJ
reálný počet kolonií na pevném médiu+	378 KTJ	23 KTJ	296 KTJ	18 KTJ
výtěžnost **	**76 %**	**46 %**	**59 %**	**36 %**

* teoretická hodnota za ideálních podmínek – 100% životaschopnost mikroorganismů, 100% záchyt stěrovkou, 100% uvolnění mikroorganismů do výtřepku

\+ průměrný výsledek ze třech nezávislých stěrů, každý výtřepek rozetřen na dvě paralelní misky

** výtěžnost je počítána jako poměr nalezeného počtu KTJ k teoretickému počtu KTJ

4. Závěr

Stěr suchou polyuretanovou houbičkou provedený pomalým valivým pohybem nezpůsobuje žádné viditelné poškození archivních materiálů se světlocitlivou vrstvou (viz Příloha 1). Zároveň z mikrobiologického hlediska je záchyt mikroorganismů a jejich následné uvolnění pro kultivaci dostatečné a vyhovující.