

FORUM / 2021 / ROČ. XI / Č. 1

PRO KONZERVÁTORY-RESTAURÁTORY FORUM FOR CONSERVATORS-RESTORERS

2021 / Vol. XI / No. 1
Peer-reviewed open access journal

Chief editor: Ing. Alena Selucká
Editors: Mgr. Pavla Stöhrová, Mgr. Jana Fricová

Editorial Board:

Ing. Ivo Štěpánek (Head of Editorial Board)
doc. Dr. Ing. Michal Ďurovič
akad. mal. Igor Fogaš
Ing. Pavel Jirásek
Ing. Jan Josef
doc. akad. soch. Petr Kuthan
prof. RNDr. Jiří Příhoda, CSc.
Ing. Radka Šefců
Mgr. Pavla Stöhrová (Secretary)

Open access since 2019 available for free
on <https://mck.technicalmuseum.cz/casopis-fkr/>
The journal is indexed and abstracted in EBSCO.

Published by:

Technické muzeum v Brně
Purkyňova 105, 612 00 Brno, Czech Republic

Contact for communication:

fricova@tmbrno.cz / stohrova@tmbrno.cz / selucka@tmbrno.cz

© Technické muzeum v Brně, 2021
ISSN (Online) 2571-4384
ISSN (Print) 1805-0050



STUDIUM ODOLNOSTI MIKROBIÁLNÍCH IZOLÁTŮ Z FOTOGRAFICKÝCH A FILMOVÝCH MATERIÁLŮ K DEZINFEKČNÍM PROSTŘEDKŮM

Hana Sýkorová¹ • Jana Kadavá¹ • Dana Savická¹ • Michal Ďurovič²
Kateřina Demnerová¹

1 Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

2 Ústav chemické technologie restaurování památek, VŠCHT Praha

Ing. Hana Sýkorová, Ph.D. – absolventka VŠCHT, v rámci svého působení na Ústavu biochemie a mikrobiologie se zabývá především tematikou potravinářské a aplikované mikrobiologie. V posledních letech se podílí také na mikrobiologickém průzkumu archivních fondů a na výuce některých předmětů specializovaných na preventivní památkovou péči na Ústavu chemické technologie restaurování památek. (sykorovh@vscht.cz)

V rámci této komplexní studie byla ověřena účinnost vybraných dezinfekčních prostředků na mikroorganismy, které patří mezi nejčastější kontaminanty fotografických sbírek. Do studie byly zařazeny dezinfekční prostředky obsahující různé účinné látky – kvarterní amoniouvu bázi (Septonex), směs alkoholů (Bacillol®AF) a ethylenoxid (Etoxen). Antimikrobiální účinnost těchto dezinfekčních prostředků byla ověřována na vybraných sbírkových kmenech aplikovaných na modelový materiál. Do spektra cílových mikroorganismů byly zařazeny jak plísně, tak bakterie a bakteriální spory. Příspěvek popisuje také způsob hodnocení fungicidního, baktericidního a sporocidního účinku dezinfekčních prostředků. Jako univerzální dezinfekční postup s mikrobicidním účinkem bylo vyhodnoceno ošetření Etoxenem. Dostatečný potenciál by mohl mít i Septonex ve formě alkoholového roztoku. Nicméně rozhodující pro praktické využití pak bude zhodnocení vlivu dezinfekčních metod na stabilitu světlocitlivé vrstvy fotografických a kinematografických materiálů.

Klíčová slova: světlocitlivá vrstva, mikrobiální kontaminace, dezinfekce, bakterie, bakteriální spory, plísně, mycelium

STUDY OF RESISTANCE OF MICROBIAL ISOLATES FROM PHOTOGRAPHIC AND FILM MATERIALS TO DISINFECTANTS

In this comprehensive study, the effectiveness of selected disinfectants on microorganisms, which are among the most common contaminants in photographic collections, was verified. Disinfectants containing various active substances were included in the study – quaternary ammonium base (Septonex), a mixture of alcohols (Bacillol®AF) and ethylene oxide (Etoxen). The antimicrobial efficacy of these disinfectants was verified on selected collection strains applied to the model material. Both fungi and bacteria and bacterial spores were included in the spectrum of target microorganisms. The paper also describes a method for evaluating the fungicidal, bactericidal, and sporocidal effects of disinfectants. Etoxen treatment was evaluated as a universal disinfection procedure with a microbicidal effect. Septonex in the form of an alcoholic solution could also have sufficient potential. However, the evaluation of the effect of disinfection methods on the stability of the light-sensitive layer of photographic and cinematographic materials will be decisive for practical use.

Keywords: light-sensitive layer, microbial contamination, disinfection, bacteria, bacterial spores, fungi, mycelium

Od svého vynálezu se fotografie stala podstatnou součástí našich kulturních dějin, a proto je nezbytnou povinností archivů, knihoven, muzeí a galerií uchovávat a pečovat o uložené fotografické sbírky. Ve sbírkách a archivních fondech se setkáme jak s negativy (například kalotypie, mokré kolodiové desky, suché želatinové desky, negativy na filmové podložce), tak s pozitivy (slané papíry, pozitivy albuminové, kolodiové 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. Materiály tvořící fotografické sbírky jsou přírodní, semisyntetické nebo syntetické organické látky, které se mohou za určitých podmínek (zejména příhodná teplota a vyšší relativní vlhkost) stát snadným zdrojem organického uhlíku sloužícího jako substrát 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 celulózami) nebo oxidačnímu poškození a vzniku skvrn na povrchu vlivem metabolitů mikroorganismů (organické kyseliny, pigmenty) [Cappitelli, 2005; Giancarlo, 2009; Lourenço, 2009; Puškárová, 2016].

Při výběru vhodného dezinfekčního postupu je vždy nutné najít konsenzus mezi pohledem konzervátora-restaurátora a mikrobiologa. Pro oba je na prvním místě záchrana historicky cenných dokumentů a archiválií. Na jedné straně stojí eliminace rizika možné degradace materiálů činností mikroorganismů, na druhé straně pak možnost poškození materiálů nevhodně zvoleným dezinfekčním zásahem [Tomšová, 2016; Gutarowska, 2016]. Nesmí být však opomenut ještě jeden důležitý aspekt, a tím je ochrana zdraví osob, které s potenciálně napadenými materiály přicházejí do styku.

Mezi nejrozšířenější mikrobiální kontaminanty jak prostředí archivů, tak povrchu samotných archiválií patří vláknité mikromycety, a to především rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Cladosporium* [Borrego, 2010; Sterflinger, 2010]. Plísně se mohou vyskytovat ve formě spor, či ve formě vegetativního mycelia. Tyto dvě fáze životního cyklu plísní se liší především svojí metabolickou aktivitou. Spory plísní jsou prakticky všudypřítomné, charakteristická je jejich nízká metabolická aktivita a pro archiválie nepředstavují přímé riziko. Po aktivaci spor (vlhko, teplo, dostatek živin) však může dojít k jejich vyklíčení a přechodu do metabolicky aktivní růstové fáze. V této fázi pak mohou díky produkci řady extracelulárních enzymů způsobovat rozklad organických materiálů jako je například papír, textil, useň, pergamen, nebo želatina či albumin obsažené ve světlocitlivé vrstvě fotografických materiálů [Bacilková, 2004; Abrusci, 2005; Lourenço, 2009]. Neopomenutelné je i zdravotní riziko způsobené plísněmi. Patogenní druhy mohou způsobovat mykózy tělního povrchu, zasažena může být kůže, vlasy nebo nehty. Spory plísní mohou dráždit dýchací cesty a zvyšovat riziko vzniku astmatu. Drobné spory rodu *Aspergillus* pak mohou pronikat až do plicních sklípků a v extrémním případě pak vyústit v onemocnění respiračního systému zvané aspergilóza [Zahradnický, 1987; Votava, 2005].

Ačkoli se většina publikovaných studií souvisejících s preventivní památkovou péčí zabývá účinností dezinfekčních postupů především na plísně [Bacilková, 2006; Sequeira, 2016; Lucas, 2017; Kubinec, 2020], pro komplexní posouzení míry účinnosti jednotlivých antimikrobiálních látek je vhodné do spektra cílových mikroorganismů začlenit i zástupce gram pozitivních a gram negativních bakterií. Tyto dvě základní skupiny bakterií se od sebe zásadně odlišují stavbou buněčné stěny. S tím pak souvisí i rozdílná citlivost k látkám s antimikrobiálním účinkem [Votava, 2005].

Mezi bakteriemi izolovanými z povrchu archivních materiálů se poměrně často vyskytují sporující gram pozitivní bakterie [Borrego, 2010]. Proto byly do naší studie účinnosti dezinfekčních prostředků zařazeny vedle vegetativních buněk i spory rodu *Bacillus*. Ty v porovnání s vegetativní formou obecně vykazují daleko vyšší míru rezistence k vnějším vlivům, jako je nedostatek živin, vysoká teplota, nízká vodní aktivita, UV záření, účinek alkoholů a povrchově aktivních látek [Setlow, 2014]. Spory mají schopnost přežít stovky až tisíce let [Cano, 1995; Wood, 2015], za vhodných podmínek pak mohou vyklíčit do vegetativní formy. V této metabolicky aktivní formě jsou pak schopné produkovat řadu hydrolytických enzymů [Ranjitha, 2013], jako jsou amylázy (rozklad škrobů), proteázy (rozklad bílkovin), celulázy (rozklad celulózy), které následně způsobují biodeteriaci archivních fotografických a filmových materiálů.

Další skupinou bakterií relativně často se vyskytující na povrchu archiválií jsou gram pozitivní koky z čeledi *Staphylococcaceae* [Borrego, 2010]. Jsou běžnou součástí lidské kožní mikrobioty a povrchu sliznic. Jejich přítomnost je tak většinou dána nevhodnou manipulací s archiváliemi bez ochranných pomůcek. Pro archivní materiály jako takové ale nepředstavují významné riziko [Skorkovský, 1981]. V souvislosti s možným zdravotním rizikem je však nutné na tomto místě zmínit především podmíněně patogenní druh *Staphylococcus aureus* způsobující u citlivějších jedinců po průniku kožní bariérou hnisavá ložiska a sepse [Bednář, 1996].

Gram negativní střevní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae* se na povrchu archiválií vyskytují spíše v menší míře [Borrego, 2010]. Možnost jejich výskytu se ale rapidně zvyšuje především při akutních haváriích, jako jsou záplavy či prasklé odpadní potrubí v budově. Ačkoli na povrchu dlouho nepřežívají a na degradaci archiválií nemají vliv [Skorkovský, 1981], zahrnují řadu patogenních a podmíněně patogenních bakterií (*Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* aj.), a mohou tak představovat značné hygienické riziko [Votava, 2005]. I proto byla do naší studie zařazena *E. coli* jako modelový zástupce této skupiny bakterií.

Tento příspěvek představuje první etapu řady experimentů, které se soustřeďují na možnosti hodnocení antimikrobiálního účinku vybraných dezinfekčních prostředků na širší spektrum mikroorganismů – plísně, bakterie i jejich spory, které se vyskytují na fotografických sbírkách. Výběr druhu a koncentrace dezinfekčních prostředků použitých v prezentované studii vychází z dosud nepublikovaných dat úzce spolupracující vědecké skupiny Ústavu chemické technologie restaurování památek, VŠCHT Praha, která se soustřeďuje na studium vlivu dezinfekčních prostředků na černobílý filmový a fotografický materiál [Đurovič, 2018–2020].

MATERIÁL A METODIKA

Materiál pro inokulaci

Modelovým materiálem pro tuto etapu experimentů byl zvolen filtrační papír, a to především díky možnosti snadné sterilizace, dostupnosti a finančně nenáročnosti při vyšší spotřebě vzorků v průběhu optimalizace postupů, a díky dobré propustnosti jak živin při kultivaci na agarových plotnách, tak dezinfekčních prostředků. V další fázi pak budou tyto postupy ověřeny na reálných fotografických a filmových materiálech, včetně detailního studia jejich vlivu na jednotlivé části světlocitlivé vrstvy.

Použité dezinfekční prostředky

- Septonex – kvarterní amonná sůl (karbethodecinium-bromid), používaný ve formě 2% w/w vodného roztoku (Galenica Medical spol. s r. o.)
- roztok Bacillof'AF – směs alkoholů s deklarovaným složením propan-1-ol 450 mg/g, propan-2-ol 250 mg/g, etanol 47 mg/g, (HARTMANN – RICO a. s.)
- Etanol absolutní p. a. (Penta spol. s r. o.)
- Etoxen – směs 10 % EtO a 90 % CO₂ (SIAD Czech spol. s r. o.)

Použité kmeny mikroorganismů

K hodnocení antimikrobiálního účinku vybraných dezinfekčních prostředků byly použity kmeny bakterií a vláknitých hub z České sbírky mikroorganismů (CCM, Masarykova univerzita, Brno, <https://ccm.sci.muni.cz>). Baktericidní a sporocidní účinek byl testován na kulturách: *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Escherichia coli* CCM 3954.

Fungicidní účinek byl testován za použití kultur: *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222, *Cladosporium herbarum* CCM F-455, *Penicillium expansum* CCM F-576.

Kultivační média a podmínky

Plate Count Agar (PCA, Merck) – médium použité pro kultivaci bakterií
 Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) – médium použité pro kultivaci plísní
 Pufrovaná peptonová voda (PPV, HiMedia) – médium použité pro sporulaci *B. subtilis* v poloviční koncentraci živin (½ PPV), tj. na 1 litr poloviční navážka dehydratovaného média než předepsaná výrobcem.

Příprava pracovní kultury a zkušebních suspenzí testovaných mikroorganismů

Bakteriální suspenze

K přípravě zkušebních suspenzí pro cílenou inokulaci modelového materiálu byly použity čisté kultury sbírkových kmenů. Bakteriální kultury byly kultivovány na agarových plotnách s PCA při 37 °C (*S. epidermidis*, *E. coli*) nebo 30 °C (*B. subtilis*). Z 24 hodin kultury byly následně připraveny suspenze odpovídající 1 stupni McFarlandovy zákalové stupnice (1 McF). Tato hodnota u gram pozitivních koků a krátkých gram negativních tyčinek odpovídá přibližně koncentraci buněk 10⁸ KTJ/ml (KTJ – kolonie tvořící jednotky), u sporotvorných tyčinek koncentraci 10⁶ KTJ/ml. Počet buněk v připravených suspenzích byl ověřen kultivačně na půdě PCA [Baron, 2006]. Výchozí suspenze byly naředěny na požadované koncentrace sterilním fyziologickým roztokem (desítkové ředění).

Suspenze spor *B. subtilis*

Po kultivaci kmene *B. subtilis* CCM 1999 (10 dnů při 30 °C v ½ PPV) byly vegetativní buňky inaktivovány záhřevem suspenze (80 °C, 16 min.) ve vodní lázni. Koncentrace spor v takto ošetřené suspenzi pak byla stanovena kultivačně na půdě PCA [Baron, 2006].

Suspenze spor mikromycet

Vybrané kultury mikroskopických hub byly kultivovány na agarových plotnách s PDA při 25 °C. Zkušební suspenze byla připravena z dvou denní kultury přelitím sterilním 0,05% (w/v) vodným roztokem polysorbátu (Tween 80, HiMedia) pro zvýšení smáčivosti, a uvolněna z povrchu skleněnou tyčinkou. Hyfy byly od spor odděleny filtrací přes skleněný filtr. Počet spor ve filtrátu byl zjištěn mikroskopicky Bürkerovou komůrkou a suspenze spor byla naředěna sterilním fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) na koncentraci 10⁶ spor/ml. Počet spor v připravených suspenzích byl ověřen kultivačně na půdě PDA.

Ověření účinné koncentrace a doby působení dezinfekčních prostředků

Postup vychází z modifikované kvalitativní suspenzní metody pro kontrolu dezinfekčních roztoků [AHM, 1985]. Mikrobiální zkušební suspenze byly připraveny dle výše uvedeného postupu a naředěny sterilním fyziologickým roztokem na výchozí koncentraci 10⁶ KTJ/ml. K 1 ml dezinfekčního prostředku bylo přidáno 100 µl mikrobiální suspenze a řádně zhomogenizováno. V daných časových intervalech byly ze směsi odebrány alikvoty o objemu 10 µl (vždy ve dvou paralelách), které byly aplikovány na růstové médium (PCA pro bakterie a PDA pro plísně). Po kultivaci byl kvalitativně zhodnocen nárůst (+/-).

Cílená inokulace modelového materiálu

Bakterie a bakteriální spory


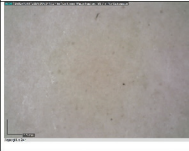
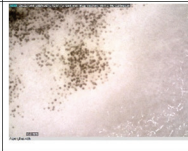




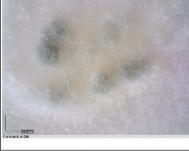
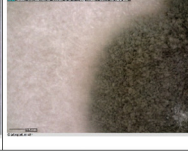
Na sterilní modelový materiál o ploše přibližně 20 cm² bylo pipetou rovnoměrně nanášeno 200 µl bakteriální suspenze či suspenze spor o koncentraci 10⁶ KTJ/ml. Po zaschnutí suspenze byl papír ošetřen příslušným dezinfekčním prostředkem.

Mikromycety

Na sterilní modelový materiál o ploše přibližně 20 cm² bylo do středu nanášeno 10 µl suspenze spor plísní o koncentraci 10⁶ KTJ/ml [Sequeira, 2016]. Účinnost dezinfekčních prostředků byla testována jednak na samotné spory plísní a jednak na vegetativní mycelium.

Spory mikromycet (bez prekulivace) – po nanesení suspenze spor byly vzorky filtračního papíru usušeny a poté podrobeny účinku dezinfekčního prostředku.

Mycelium (s prekulivací) – po nanesení a zaschnutí suspenze byly vzorky filtračního papíru jednotlivě umístěny na povrch PDA a následně kultivovány 24 hodin při 25 °C. Během této doby docházelo k rozvoji vegetativního mycelia bez fruktifikačních orgánů (Obr. 1). Po usušení byly takto připravené vzorky podrobeny účinku dezinfekčního prostředku.

Vývoj růstu vybraných mikromycet, doba kultivace			
	0 h	24 h	48 h
<i>A. brasiliensis</i>			
<i>P. expansum</i>			
<i>C. herbarum</i>			

Obr. 1 Růst vybraných mikromycet na cíleně inokulovaném filtračním papíru, kultivace na PDA při 25 °C. V čase 0 hodin byly vzorky inokulovány suspenzí spor mikromycet; po 24 hodinách inkubace je patrné počáteční stádium růstu mycelia; po 48 hodinách inkubace již plně rozvinuté mycelium s pigmentovanými fruktifikačními orgány / *Growth of selected micromycetes on targeted inoculated filter paper, cultivation on PDA at 25 °C. At 0 h the samples were inoculated with a spore suspension of micromycetes; after 24 h of incubation the initial stage of mycelial growth is evident; after 48 h of incubation already fully developed mycelium with pigmented fructification organs*

Dezinfekční postupy

Roztoky Septonex a Bacillo^lAF

500 µl dezinfekčního prostředku bylo aplikováno sterilní pipetou na celý povrch inokulovaného modelového materiálu. V případě plísní se dezinfekční prostředek nanášel od kraje směrem ke středu tak, aby nedošlo k rozmytí spor po ploše vzorku filtračního papíru. Po 5 minutách působení v uzavřené Petriho misce byl přebytečný roztok odsát pipetou a papír usušen za pokojové teploty v laminárním boxu.

Sterilizace ethylenoxidem

K dezinfekci ethylenoxidem bylo využito postupu užívaného v Národním archivu Praha: vzorky papíru byly v otevřených petriho miskách uloženy do dezinfekční komory MATACHANA (typ 1.3100 LGE-2) o celkovém objemu 6,4 m³. K samotné dezinfekci byl použit plyn Etoxen, tj. směs 10% EtO a 90% CO₂. Dezinfekce vzorků probíhala 6 hodin při teplotě 30 °C a tlaku 220 kPa. Poté byly vzorky odvětrávány po dobu 6 dní v odvětrávacím tunelu protiproudem vzduchu zahřátého na 30 °C. Na závěr celého cyklu byla ve vzduchotěsných komorách měřena zbytková koncentrace EtO plynovou chromatografií po dobu 24 hodin.

Hodnocení fungicidního účinku

Po inokulaci modelového materiálu sporami plísní a následném ošetření dezinfekčním prostředkem byly jednotlivé vzorky filtračního papíru umístěny na povrch PDA a kultivovány při 25 °C. Růst mycelia byl průběžně monitorován v pravidelných intervalech po 24 hodinách po dobu pěti dní. V případě nulového nárůstu byla kultivace prodloužena až na 10 dní. Jako kontrola při hodnocení byly použity inokulované vzorky filtračního papíru bez ošetření dezinfekčním prostředkem. Jejich kultivace probíhala za stejných podmínek.

Hodnocení baktericidního a sporocidního účinku

Kvalitativní hodnocení účinnosti pomocí otiskové metody

Filtrační papíry byly jemně celou plochou přitisknuty na předsušené agarové plotny (PCA). Po pěti minutách inkubace byl filtrační papír odstraněn a plotna standardně kultivována (24 hodin, při 30 °C nebo 37 °C dle druhu mikroorganismu). Nárůst na jednotlivých petriho miskách byl srovnán s kontrolním vzorkem (inokulovaný filtrační papír bez ošetření dezinfekčním prostředkem).

Kvantitativní hodnocení účinnosti pomocí výtřepků

Filtrační papíry byly po dezinfekci a usušení vytřepány ve zkumavce s 10 ml sterilního fyziologického roztoku. Vytřepání bylo provedeno pomocí míchadla Vortex do rozvolnění vláken papíru, tak aby se do roztoku uvolnilo maximální možné množství mikroorganismů. Získaný výtřepok byl desitkovým způsobem naředěn a vyset na plotny s PCA [Baron, 2006]. Po kultivaci (24 hodin, při 30 °C nebo 37 °C dle druhu mikroorganismu) byly spočítány kolonie vyrostlé na povrchu média. Kontrolní hodnotou byly KTJ získané vytřepáním shodně inokulovaného vzorku filtračního papíru bez ošetření dezinfekčním prostředkem. Účinnost dezinfekce byla následně číselně vyjádřena tzv. hodnotou log redukce (LRV – Log Reduction Value). Tato hodnota vyjadřuje relativní počet mikroorganismů eliminovaných daným dezinfekčním prostředkem v hodnotách řádů [Microchem Laboratory, 2015]. Například: 1 LRV je snížení o jeden řád, a odpovídá tedy 90 % inhibičnímu účinku; 2 LRV 99 % účinku; 3 LRV 99,9 % účinku atd. Výpočet se provádí dle vzorce:

$$LRV = \log_{10} (Z_0/Z)$$

kde Z₀ je počet KTJ před ošetřením, a Z počet KTJ po ošetření.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Prezentované výsledky jednotlivých experimentů jsou průměrem minimálně čtyř biologických replikátů ze dvou nezávislých experimentů. Cílem první fáze experimentů bylo ověření účinnosti navržených koncentrací dezinfekčních prostředků (2% w/w vodný roztok Septonex a koncentrovaný roztok Bacillo^lAF) a stanovení potřebné doby působení potřebné k eliminaci širšího spektra mikroorganismů – bakterií, bakteriálních spor a plísní. K testovaným roztokům Septonex a Bacillo^lAF byl v tomto screeningovém stanovení pro srovnání přiřazen navíc etanol, který se v mikrobiologické praxi používá jako jeden z nejběžnějších dezinfekčních roztoků. Etanol byl použit v čistotě p. a., aby se vyloučil účinek případných příměsí. Každý prostředek byl testován ve třech koncentracích, doba působení jednotlivých roztoků se pohybovala v rozmezí 5–30 minut. Výsledky shrnuje Tab. 1.

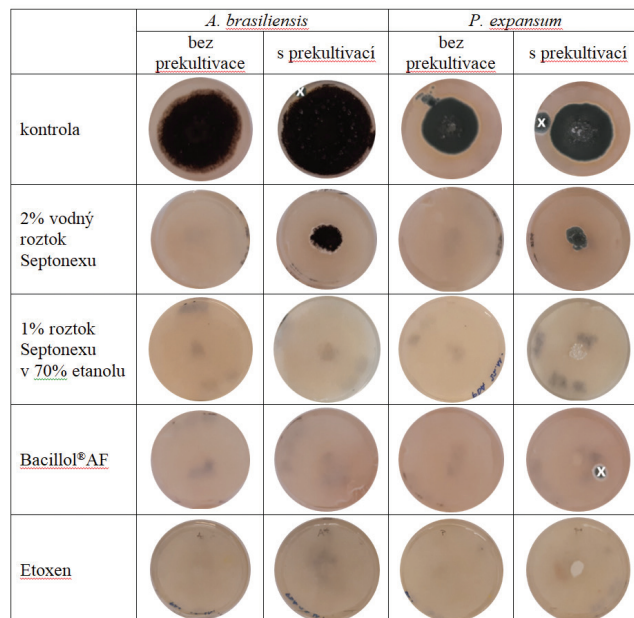
Tab. 1 Stanovení účinné koncentrace a doby působení dezinfekčních prostředků. Kvalitativní hodnocení účinku: nárůst mikroorganismů po působení daného dezinfekčního prostředku v dané koncentraci po danou dobu +/- / *Determination of effective concentration and length of exposure of disinfectants. Qualitative evaluation of the effect: growth of microorganisms after the exposure to the given disinfectant at the given concentration for the given time +/-*

	Nárůst mikroorganismů po působení dezinfekčního prostředku									
	čas (min)	Septonex			Bacillof AF			Etanol p.a.		
		5%	2%	1%	100%	70%	50%	100%	70%	50%
<i>E. coli</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis; spory</i>	5	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	10	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	15	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	20	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	25	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	5	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. herbarum</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Obecně vzato, téměř všechny roztoky dezinfekčních prostředků v testovaných koncentracích vykazovaly mikrobicidní účinek již po pěti minutách působení na vybrané vegetativní formy bakterií i na spory plísní. Výjimkou jsou spory rodu *A. brasiliensis*, u kterých se projevil fungicidní účinek 50% roztoku Bacillof AF až po době působení 20 minut a 50% etanolu po 10 minutách. Na bakteriální spory *B. subtilis* neúčinkoval roztok Bacillof AF v žádné koncentraci ani po 30 minutách. Naproti tomu jak vodný roztok Septonex, tak etanol vykazaly 100% sporocidní účinek i v nejnižší testované koncentraci již po 5 minutách. Na základě získaných výsledků lze potvrdit, že testované dezinfekční prostředky v navrhovaných koncentracích (2% Septonex a Bacillof AF) jsou dostatečně účinné již po 5 minutách působení. Srovnatelného efektu lze docílit i při nižší koncentraci účinné látky. Tyto výsledky dávají však jen základní představu o účinnosti jednotlivých látek a o době potřebné k dosažení účinku. Je potřeba si uvědomit, že v tomto případě jsou mikroorganismy rovnoměrně rozptýlené v suspenzi, a jednotlivé buňky tak mají s dezinfekčním prostředkem maximální možný kontakt. V běžné praxi pak může být koncentrace i doba působení nutná pro dosažení maximálního dezinfekčního účinku odlišná.

Účinnost dezinfekčních prostředků na vybrané plísně

V další fázi experimentů bylo přistoupeno k testování účinnosti dezinfekčních prostředků na vybrané mikromycety, a to ve formě spor aplikovaných na modelový materiál, a ve formě vegetativního mycelia (s 24hodinovou prekultivací inokulovaných vzorků na PDA). Rozvoj mycelia u vybraných plísní po ošetření dezinfekčními prostředky je zachycen na fotografiích (Obr. 2).



Obr. 2 Rozvoj mycelia u vybraných plísní po ošetření dezinfekčními prostředky; doba kultivace na PDA 5 dní při 25 °C. Křížky označují mycelium vzniklé druhotnou kontaminací. / *Mycelial growth of selected fungi after disinfectant treatment; cultivation time 5 days on PDA at 25 °C. Crosses indicate mycelium caused by secondary contamination*

Získané výsledky pak uceleně shrnuje Tab. 2. Z uvedeného vyplývá, že jak Bacillof AF, tak Etoxen vykazují 100% fungicidní účinek jak na spory plísní, tak na jejich vegetativní mycelium. V případě ošetření Etoxenem neměla nutná časová prodleva mezi inokulací a zapracováním modelových vzorků (6–7 dní) na hodnocení výsledků vliv. Všechny testované mikromycety si po tuto dobu na kontrolních vzorcích uchovaly dostatečnou životaschopnost. Septonex aplikovaný jako 2% vodný roztok eliminoval růst plísní pouze ve formě spor. Na plísně v růstové fázi byl již jeho účinek prokazatelně nižší. Příčinou může být horší smáčivost povrchu hyf a nedostatečný kontakt dezinfekčního prostředku s cílovým mikroorganismem. Lepšího kontaktu mycelia s roztokem by bylo možné docílit rovnoměrnou aplikací postřikem [Bacilková, 2004]. Dezinfekční účinek kvarterních amoniálních solí je možné zvýšit přidáním alkoholu [Du, 2010]. Proto byl do testování zařazen vedle vodného roztoku také 1% w/w Septonex v 70% etanolu. Koncentrace účinné látky Septonexu byla tedy snížena na polovinu, což z pohledu ochrany archiválií představuje příznivější složení, neboť kvarterní amoniové soli mohou ovlivňovat mechanické vlastnosti některých materiálů [Bacilková, 2004]. Výsledky v tomto případě ukázaly 100% fungicidní účinek alkoholového roztoku Septonex jak na spory, tak na vegetativní mycelium. Dezinfekční účinek samotného ethanolu testován nebyl a bude zařazen do další fáze experimentů.

Tab. 2 Vyhodnocení účinku dezinfekčních prostředků na vybrané mikromycety na základě vizuálního hodnocení rozvoje mycelia po 5 dnech od ošetření: +++ nárůst srovnatelný s kontrolou (žádný dezinfekční účinek); ++ mírně inhibovaný rozvoj mycelia; + silně inhibovaný rozvoj mycelia; - bez dalšího rozvoje mycelia (100% dezinfekční účinek) / *Disinfectant effect evaluation on selected micromycetes based on visual evaluation of mycelial development 5 days after treatment: +++ mycelial growth comparable to the control sample (no disinfection effect); ++ slightly inhibited mycelial growth; + strongly inhibited mycelial growth; - no further mycelial growth (100% disinfecting effect)*

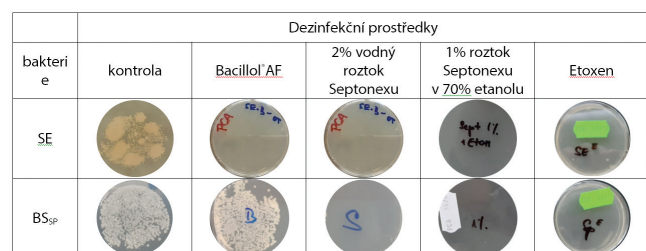
Dezinfekční prostředek	<i>A. brasiliensis</i>		<i>P. expansum</i>		<i>C. herbarum</i>	
	prekultivace		prekultivace		prekultivace	
	ne	ano	ne	ano	ne	ano
Bacillof'AF	-	-	-	-	-	-
2% vodný roztok Septonexu	-	+/++	-	+	-	+
1% roztok Septonexu v 70% etanolu	-	-	-	-	-	-
Etoxen	-	-	-	-	-	-

Účinnost dezinfekčních prostředků na vybrané bakterie

Po ověření antifungálního účinku vybraných dezinfekčních prostředků, byla jejich účinnost testována i na reprezentativní zástupce základních skupin bakterií. Pro hodnocení antibakteriálního účinku byly zvoleny dvě metody.

Kvalitativní hodnocení účinnosti pomocí otiskové metody

Nárůst na jednotlivých agarových plotnách byl srovnán s kontrolou a kvalitativně hodnocen čtyřmi stupni růstu. Ilustrační výsledky jsou demonstrovány na Obr. 3.



Obr. 3 Účinek dezinfekčních prostředků na vybrané bakterie – otisk inokulovaného a následně ošetřeného modelového materiálu na misky s kulturačním médiem PCA, nárůst po 24 h kultivaci. SE – *Staphylococcus epidermidis*; BS_{sp} – *Bacillus subtilis* inokulovaný na modelový materiál ve formě spor / *Disinfectant effect on selected bacteria - imprint of inoculated and subsequently treated model material on plates with PCA culture medium, growth after 24 h of cultivation. SE - Staphylococcus epidermidis; BS_{sp} - Bacillus subtilis inoculated on model material in the form of spores*

Výhodou tohoto postupu je především jeho nenáročnost. I když se u otiskové metody obecně uvádí pouze velmi nízký záchyt mikroorganismů [Ismail, 2013], z uvedených výsledků je patrné, že pro vyhodnocování většího počtu vzorků je metoda pro screening dostačující a dezinfekční efekt použitých prostředků lze orientačně velmi dobře zhodnotit (Tab. 3).

Tab. 3 Kvalitativní vyhodnocení účinku dezinfekčních prostředků na vybrané bakterie na základě srovnání otisků inokulovaného a následně ošetřeného modelového materiálu na misky s kulturačním médiem PCA, nárůst po 24 h kultivaci. Hodnocení nárůstu po 24 h na PCA: +++ nárůst srovnatelný s kontrolou (tj. žádný dezinfekční účinek); ++ mírná inhibice; + ojedinelé kolonie; - bez nárůstu (100% dezinfekční účinek); N nelze hodnotit / *Qualitative evaluation of the effect of disinfectants on selected bacteria based on comparison of imprints of inoculated and subsequently treated model material on PCA plates; microbial growth after 24 hours of cultivation. Evaluation of microbial growth after 24 hours on PCA: +++ growth comparable to the control sample (no disinfection effect); ++ slight inhibition; + isolated colonies; - no growth (100% disinfectant effect); N cannot be evaluated*

Dezinfekční prostředek	Bakterie			
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> spory
Bacillof'AF	-	-	-	+++
2% vodný roztok Septonexu	-	-	-	-
1% roztok Septonexu v 70% etanolu	-	-	-	-
Etoxen	N	N	N	-

Z výsledků uvedených v Tab. 3 vyplývá, že univerzální antibakteriální účinek, tj. účinek jak na gramnegativní, tak na grampozitivní bakterie i jejich spory, vykazuje Septonex, a to jak ve formě 2% vodného roztoku, tak ve formě 1% roztoku v 70% etanolu. Bacillof'AF eliminoval růst gramnegativních i grampozitivních bakterií, ale nevykazoval žádný sporocidní účinek. Působení Etoxenu nelze bohužel zcela objektivně zhodnotit. Časová prodleva mezi inokulací a následným zpracováním vzorků je díky nutnosti odvětrání po dezinfekci minimálně sedm dní. Během této doby dochází k samovolnému poklesu životaschopných vegetativních buněk bakterií, což se projevilo na kontrolních vzorcích poklesem KTJ až o čtyři řády. Velmi pozitivně lze ale hodnotit účinek Etoxenu na spory *B. subtilis* které si po uvedené dobu životaschopnost udržují, a jejich úbytek tak lze jednoznačně přičíst účinku Etoxenu. Po ošetření došlo v tomto případě k úplné inaktivaci všech spor na vzorku. Pro přesnější kvantitativní hodnocení účinku však otisková metoda není dostačující. S ohledem na nehomogenost inokulace a následnou nemožnost odečítat jednotlivé kolonie narostlé na plotnách po otisku byl vyzkoušen časově i procesně náročnější, ale přesnější způsob hodnocení účinnosti dezinfekčních prostředků pomocí výtřepků.

Kvantifikace účinnosti pomocí výtřepků

Po kultivaci desítkově naředěného výtřepku modelových vzorků byly jednotlivé narostlé kolonie spolehlivě odečitatelné. Následně tak mohla být vypočtena hodnota účinnosti dezinfekčního prostředku. Výsledky ze dvou nezávislých stanovení jsou shrnuty v Tab. 4. Získané hodnoty potvrzují předchozí zjištění, že pro vybrané bakterie, s výjimkou spor *B. subtilis*, je neúčinnější aplikace roztoku Septonex či Bacillof'AF. V obou případech dochází ke snížení přítomných KTJ minimálně o čtyři řády. Účinek Etoxenu nelze z důvodu nízké životaschopnosti vegetativních forem bakterií na kontrolních vzorcích ani v tomto případě objektivně zhodnotit.

V případě spor *B. subtilis* se jako velmi účinné ukázalo ošetření roztoky Septonexu a dezinfekce Etoxenem. V obou případech došlo ke snížení výchozího počtu KTJ o pět řádů. Aplikace roztoku Bacillof'AF vedla pouze k zhruba 50% snížení počtu bakteriálních spor v porovnání s kontrolou.

Tab. 4 Kvantitativní zhodnocení účinku dezinfekčních prostředků na vybrané bakterie / *Quantitative evaluation of the disinfectant effect on selected bacteria*

	KTJ/ ml ^a	LRV ^b	účinnost dezinf. prostředku (%) ^c
<i>Escherichia coli</i>			
kontrola	3,9.10 ⁴	-	-
Bacillof [®] AF	0	4,6	99,997
2% Septonex	0	4,6	99,997
1% Septonex v 70% etanolu	0	4,6	99,997
Etoxen	N	N	N
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
kontrola	3,6.10 ⁴	-	-
Bacillof [®] AF	0	4,6	99,997
2% Septonex	0	4,6	99,997
1% Septonex v 70% EtOH	0	4,6	99,997
Etoxen	N	N	N
<i>Bacillus subtilis</i> – vegetativní forma			
kontrola	8,1.10 ⁴	-	-
Bacillof [®] AF	0	4,9	99,999
2% Septonex	0	4,9	99,999
1% Septonex v 70% EtOH	0	4,9	99,999
Etoxen	N	N	N
<i>Bacillus subtilis</i> – spory			
kontrola	1,8.10 ⁵	-	-
Bacillof [®] AF	8,3.10 ⁴	0,34	53,9
2% Septonex	0	5,3	99,999
1% Septonex v 70% EtOH	0	5,3	99,999
Etoxen	0	5,3	99,999

^a Počet KTJ v 1 ml výtěrku

^b LRV – hodnota log redukce = $\log_{10}(Z_0/Z)$, kde Z_0 je počet KTJ před ošetřením, a Z počet KTJ po ošetření.

^c účinnost (%) = $(1-10^{-LRV}) * 100$ %

N – nelze hodnotit

^a Number of CFU in 1 ml of suspension

^b LRV – log reduction value = $\log_{10}(Z_0/Z)$, where Z_0 is the number of CFU before treatment, and Z is the number of CFU after treatment.

^c efficiency (%) = $(1-10^{-LRV}) * 100$ %

N – cannot be evaluated

ZÁVĚR

Septonex ve formě 2% vodného roztoku účinkuje na všechny testované bakterie (grampozitivní i gramnegativní), a to včetně spor *Bacillus subtilis* a snižuje jejich počet o čtyři až pět řádů. 100% inhibiční účinek byl zjištěn i u testovaných druhů plísní, nicméně jen ve formě jejich spor. V případě vegetativního mycelia je fungicidní účinek Septonexu již prokazatelně nižší. Aplikace Septonexu ve formě 1% roztoku v 70% etanolu pak měla spolehlivý účinek jak na bakterie i jejich spory, tak na všechny testované plísně ve fázi spor i vegetativního mycelia. Spojením dvou účinných látek – kvarterní amoniové báze a alkoholu – tak lze získat roztok s širokým spektrem dezinfekčního účinku.

Bacillof[®]AF velmi dobře potlačuje růst všech testovaných vegetativních forem bakterií (grampozitivních i gramnegativních). Spory *Bacillus subtilis* jsou však vůči jeho účinku odolné. 100% fungicidní účinek roztoku Bacillof[®]AF byl zaznamenán u všech testovaných druhů plísní, a to jak ve formě spor, tak v případě vegetativního mycelia.

Z důvodu nízké životaschopnosti testovaných bakterií na povrchu vzorků papíru nelze účinek **Etoxenu** ve všech případech objektivně hodnotit. Nicméně vzhledem k vysoké účinnosti na bakteriální spory i na všechny testované plísně lze předpokládat, že Etoxen účinkuje i na méně odolné formy bakterií jako jsou gramnegativní tyčinky *Escherichia coli*, vegetativní forma grampozitivních tyčinek *Bacillus subtilis* a grampozitivní koky *Staphylococcus epidermidis*. Za tohoto předpokladu lze tedy ošetření Etoxem považovat za univerzální dezinfekční prostředek s baktericidním, sporicidním i fungicidním účinkem.

Uvedené dezinfekční prostředky, doplněné navíc o účinky par některých alkoholů a dezinfekční roztok kombinující Septonex a alkohol, budou v další fázi experimentů ověřovány na izolátech mikromycet i bakterií z reálných odběrů z povrchu archivních fotografických a filmových materiálů. Stejně tak bude sledován vlivu účinných dezinfekčních prostředků na stabilitu světlocitlivé vrstvy.

PODĚKOVÁNÍ

Předložená práce vznikla s finanční podporou Ministerstva kultury ČR v rámci projektu NAKI II DG18P02OVV062 – Biodiverzita černobílých fotografických a kinematografických materiálů v archivních fondech a metody jejich dezinfekce.

LITERATURA

- ABRUSCI, C. – MARTÍN-GONZÁLEZ, A. – DEL AMO, A. – CATALINA, F. – COLLADO, J. – PLATAS, G. Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, vol. 56 (1), s. 58–68.
- AHM (Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica) příloha 1: *Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek*. 1985.
- BACÍLKOVÁ, B. *Ochrana archivních materiálů před živelními pohromami v síti archivů České republiky – část Poškození mikroorganismy a dezinfekce*. Závěrečná zpráva grantového úkolu. 2004. [cit. 18. 3. 2021]. Dostupné z: https://www.nacr.cz/wp-content/uploads/2019/06/zivelnipohromy_opt1.pdf.
- BACÍLKOVÁ, B. Study on the Effect of Butanol Vapours and other Alcohols on Fungi. *Restaurator. International Journal for the Preservation of Library and Archival Material*, 2006, vol. 27. s. 186–199.
- BARON, F. – COCHET M., – ABLAIN, W. – GROSSET, N. – MADEC, M. et al. Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Le Lait*, INRA Editions, 2006, vol. 86 (3), s. 251–257.
- BEDNÁŘ, M. – FRÁNKOVÁ, V. – SCHINDLER, J. – SOUČEK, A. – VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- BORREGO, S. – GUIAMET, P. – GOMÉZ DE SARAVIA, S. – BATISTINI, P. – GARCIA, M. – LAVIN, P. – PERDOMO, I. The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, vol. 64 (2), s. 139–145.
- CANO, R.J. – BORUCKI, M.K. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, 1995, vol. 268, s. 1060–1064.
- CAPPITELLI, F. – SORLINI, C. From Papyrus to Compact Disc: The Microbial Deterioration of Documentary Heritage. *Critical Reviews in Microbiology*, 2005, vol. 31, s. 1–10.
- DU, W.X. – DANYLUK, M.D. – HARRIS, L.J.: Efficacy of aqueous and alcohol-based quaternary ammonium sanitizers for reducing *Salmonella* in dusts generated in almond hulling and shelling facilities. *Journal of Food Science*, 2010, vol. 75 (1), s. M7–13.
- ĎUROVIČ, M. – DEMNEROVÁ, K. a kol. Biodiverzita černobílých fotografických a kinematografických materiálů v archivních fondech a metody jejich dezinfekce. Dílčí zpráva projektu NAKI II DG18P02OVV062. 2018–2020.
- GIANCARLO, R. – ZANARDINI, E. – SORLINI, C.: *Encyclopedia of Microbiology*. 3. vyd. *Biodeterioration – Including Cultural Heritage*, 2009, s. 191–205.
- GUTAROWSKA, B. – PIETRZAK, K. – MACHNOWSKI, W. – MILCZAREK, J. Historical textiles – a review of microbial deterioration analysis and disinfection methods. *Textile Research Journal*, 2016, vol. 87, s. 2388–2406.
- ISMAÏL, R. – AVIAT, F. – MICHEL, V. – LE BAYON, I. – GAY-PERRET, P. – KUTNIK, M. – FÉDÉRIGHI, M. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the

- literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2013, vol. 10 (11), s. 6169–6183.
- KUBINEC, R. – BLAŠKO, J. – GALBAVÁ, P. – JURDÁKOVÁ, H. – SÁDECKÁ, J. – PANGALLO, D. – BUČKOVÁ, M. – PUŠKÁROVÁ, A. The antifungal activity of vapour phase of odourless thymol derivate. *PeerJ*, 2020, vol. 8, n. pag.
 - LOURENÇO, M.J.L. – SAMPAIO, J.P. Microbial deterioration of gelatin emulsion photographs: Differences of susceptibility between black and white and colour materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, vol. 63, s. 496–502.
 - LUCAS, C. – DÉNIEL, F. – DANTIGNY, P. Ethanol as an antifungal treatment for silver gelatin prints: implementation methods evaluation. *Restaurator. International Journal for the Preservation of Library and Archival Material*, 2017, vol. 38, s. 235–248.
 - MICROCHEM LABORATORY *Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing*. 2015. [cit. 11. 3. 2021]. Dostupné z: www.microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing.
 - PUŠKÁROVÁ, A. – BUČKOVÁ, M. – HABALOVÁ, B. – KRAKOVÁ, L. – MAKOVÁ, A. – PANGALLO, D. Microbial communities affecting albumen photography heritage: a methodological survey. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, n. pag.
 - RANJITHA, J. – VIJAYALAKSHMI, S. – RAJESWARI, V.D. Enzyme production ability by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* – a comparative study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2013, vol. 6, s. 29–32.
 - SEQUEIRA, S. – CABRITA, E. – MACEDO, M.F. Antifungals on paper conservation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, vol. 74, s. 67–86.
 - SETLOW, P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, 2014, vol. 196(7), s. 1297–1305.
 - SKORKOVSKÝ, B. Mikroorganismy jako původci degradace archíválií. Praha: TEPS, 1981.
 - STERFLINGER, K. Fungi: Their Role in Deterioration of Cultural Heritage. *Fungal Biology Reviews*, 2010, vol. 24, s. 47–55.
 - TOMŠOVÁ, K. – ĎUROVIČ, M. – DRÁBKOVÁ, K. The effect of disinfection methods on the stability of photographic gelatin. *Polymer Degradation and Stability*, 20016, vol. 129, s. 1–6.
 - VOTAVA, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. 2005. ISBN 80-86850-00-5.
 - WOOD, J.P. – MEYER, K.M. – KELLY, T.J. Environmental persistence of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* spores. *PLoS One*, 2015, vol. 10 (9), n. pag.
 - ZAHRADNICKÝ, J. a kol. *Mikrobiologie a epidemiologie*. 1. vydání. Praha, Avicenum, 1987.