FORUM / 2022 / ROČ. XII / Č. 2

PRO KONZERVÁTORY-RESTAURÁTORY
FORUM FOR CONSERVATORS-RESTORERS

2022 / Vol. XII / No. 2
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 acces 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, 2022
ISSN (Online) 2571-4384
ISSN (Print) 1805-0050

TECHNICKÉ MUZEUM V BRNĚ

METODICKÉ CENTRUM KONZERVACE

LUMINOMETR – NÁSTROJ PRO HODNOCENÍ MIKROBIÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ ARCHIVNÍCH FOTOGRAFIÍ?

Hana Sýkorová[1] • Jana Kadavá[1] • Barbora Zapletalová[1]
Michal Ďurovič[2] • Kateřina Demnerová[1]

1 Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha
2 Ústav chemické technologie restaurování památek, VŠCHT Praha

Ing. Hana Sýkorová, Ph.D. – absolventka VŠCHT se v rámci svého působení na Ústavu biochemie a mikrobiologie 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 péči o památky na Ústavu chemické technologie restaurování památek VŠCHT Praha. (sykorovh@vscht.cz)

Monitoring mikrobiální kontaminace hraje jednu z klíčových rolí v preventivní péči o památky. Vedle klasických časově náročných kultivačních metod dnes existují i moderní a rychlé metody, kterými lze posoudit míru mikrobiálního znečištění. Jednou z nich je stanovení adenosintrifosfátu (ATP) pomocí bioluminiscenční reakce. Tato metoda je již rutinně používaným nástrojem, jímž se hodnotí mikrobiologická rizika v řadě odvětví především z oblasti potravinářského průmyslu a zdravotnictví. Do péče o památky však tento postup zatím plošně nepronikl. Příspěvek se zabývá možností hodnocení mikrobiální kontaminace povrchu archivních fotografických materiálů pomocí bioluminiscenčních stěrů. Využití luminometru, na rozdíl od klasického kultivačního stanovení, nepřináší přesné údaje o množství a druhu přítomných mikroorganismů. Získané hodnoty ale mohou být rychlým ukazatelem přítomnosti životaschopných mikroorganismů a dobrým vodítkem v rozhodovacím procesu, zda je nutné daný objekt dezinfikovat, či nikoli.
Klíčová slova: luminometr, ATP, plísně, mycelium, mikrobiální kontaminace, dezinfekce

LUMINOMETER – A TOOL FOR MICROBIAL CONTAMINATION OF ARCHIVAL PHOTOGRAPHS EVALUATING?

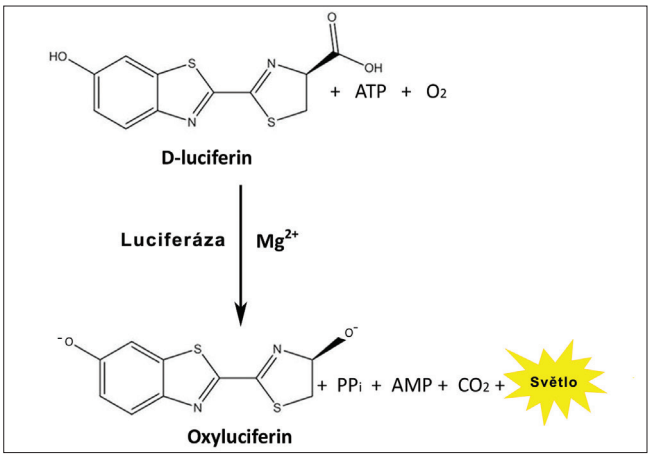
Microbial contamination monitoring plays one of the key roles in preventive monument care. In addition to classical time-consuming cultivation methods, there are now modern and fast methods for assessing the degree of microbial contamination. One of them is the determination of adenosine triphosphate (ATP) by a bioluminescence reaction. This method is already a routinely used tool for microbiological risk assessment in many sectors, especially in the food industry and healthcare. However, this procedure has not yet been commonly involved in monument care. This paper deals with the possibility of evaluating the microbial contamination of the surface of archival photographic materials using bioluminescent swabs. The use of a luminometer, in contrast to the classical culture assay, does not provide accurate data on the amount and group of present microorganisms. The values obtained can be a quick indicator of the presence of viable microorganisms and a good guide in the decision-making process whether it is necessary to disinfect the object or not.
Key words: luminometer, ATP, mould, mycelium, microbial contamination, disinfection

Monitoring mikrobiální kontaminace nejen prostředí archivů a depozitářů, ale i samotných archiválií je nedílnou součástí preventivní péče o historicky cenné archivní fondy. Řada mikroorganismů, především plísní a sporulujících bakterií, může vzhledem k produkci kyselin, pigmentů či hydrolytických extracelulárních enzymů představovat pro uložené archiválie významné riziko [Skorkovský, 1981; Giancarlo, 2009; Lourenço, 2009; Puškárová, 2016]. Neopomenutelný je i zdravotní a hygienický aspekt pro personál manipulující s potenciálně kontaminovaným materiálem [Zahradnický, 1987; Votava, 2005].

Do systému preventivní péče o památky je proto nezbytné zařazovat pravidelný monitoring mikrobiální kontaminace předmětů i ovzduší v daných prostorách [Borrego, 2010; Pasquarella, 2012]. Nejjednodušší metodou mikrobiologické kontroly vzduchu je pasivní sedimentační metoda. Přesnější výsledky pak dává vyšetření vzduchu pomocí aeroskopu, kterým je vzduch aktivně nasáván. V obou případech přítomné mikroorganismy dopadají na agarovou plotnu a po následné kultivaci je možné vyhodnotit míru případného znečištění [Klánová, 2021]. Hodnocení mikrobiální zátěže povrchu samotných archiválií je pak o něco složitější. Nejrozšířenější jsou klasické kultivační metody, kdy jsou vzorky odebírány z povrchu předmětů stěrem. Tady je nutné zvolit takovou metodu, která zachytí dostatečný počet mikroorganismů a zároveň bude šetrná k vlastnímu materiálu. Pro materiály se světlocitlivou vrstvou je nejvhodnější suchý stěr měkkou suchou pěnovou houbičkou [Demnerová, 2020]. U odolnějších materiálů je možné volit stěr zvlhčenými stěrovkami, jelikož je zde záchyt mikroorganismů vyšší. Po kultivaci za vhodných podmínek (správně zvolená teplota a kultivační půda) je možné vyhodnotit míru mikrobiální kontaminace, případně i druh přítomných mikroorganismů. Tradiční kultivační metody vyžadují jednak plně vybavenou mikrobiologickou laboratoř, a jednak zkušenost a zručnost pracovníků. Navíc jsou poměrně časově náročné. Doba od provedení stěru po získání výsledků ve formě narostlých kolonií na plotnách se pohybuje v jednotkách dnů pro bakterie, až po více než týden, jež rostou některé plísně [Abrusci, 2005; Purkrtová, 2022]. Vedle kultivačních metod existuje řada moderních molekulárně-biologických metod založených na izolaci a následné sekvenaci celkové DNA či RNA bez nutnosti kultivace mikroorganismů. Tak je možné zachytit přítomnost i nekultivovatelných či obtížně kultivovatelných mikroorganismů. Tyto metody vyžadují poměrně nákladné laboratorní vybavení a především vyškolené pracovníky. Slouží tak spíše k výzkumným účelům při studiu biodiverzity přítomných mikroorganismů a pro rutinní mikrobiologický monitoring a hodnocení rizika se běžně nevyužívají [Pangallo, 2009; Branyšová, 2021].

Jedním z alternativních způsobů, jak rychle vyhodnotit přítomnost a aktivitu mikroorganismů, a posoudit tak míru rizika, kterému jsou vystaveny archiválie a potažmo i personál, je kvantifikace adenosintrifosfátu (ATP). ATP je makroergická sloučenina produkovaná živými buňkami a slouží jako hlavní přenašeč energie do všech procesů, které

energii spotřebovávají. Jednou z možností jak ATP detekovat jsou techniky založené na bioluminiscenci. Enzym luciferáza, běžně se vyskytující například u světlušek, reaguje v přítomnosti kyslíku, hořečnatých iontů a ATP s organickým substrátem, obecně zvaným luciferin, za vzniku oxyluciferinu, adenosinmonofosfátu (AMP), pyrofosfátu, oxidu uhličitého a určitého množství světla (obr. 1) [Kodíček, 2015]. Množství uvolněného světla je úměrné koncentraci ATP v reakci a tedy i míře mikrobiální nebo jiné biologické zátěže v místě, ze kterého byl proveden odběr. Biomonitoring ATP je pro svou rychlost, robustnost, snadnou proveditelnost a cenovou dostupnost dnes široce používanou metodou především v potravinářství, zdravotnictví a kosmetickém průmyslu [Corbitt, 2000; Osimani, 2014]. Běžně se používá v pravidelném monitoringu nejen mikrobiálního znečištění v potravinářských a nápojářských provozech, ale i pro detekci organické hmoty (zbytky surovin, potravin atd.), která může sloužit jako substrát pro zachycení a růst mikroorganismů, a zvyšovat tak riziko mikrobiální kontaminace. Metoda je využívána i pro monitorování účinnosti sanitačních a dezinfekčních postupů či při kontrole mikrobiologické kvality vody [Costa, 2004; Nante 2017].



Obr. 1 *Princip bioluminiscenčního stanovení ATP. Upraveno podle: Principle of ATP bioluminescence assay. Adapted from: http://www.tebu-bio.com/blog/wp-content/uploads/2016/12/Luciferase-formula.jpg*

Hodnocení biologické zátěže potravinářských produktů a provozů na základě stanovení ATP bylo poprvé využito v 70. letech minulého století [Sharpe, 1970]. Činidla však byla drahá a metodika zahrnující složitější extrakční postupy zdlouhavá [Stannard, 1986]. Od 90. let začaly být bioluminiscenční testy dostupnější a začaly se uplatňovat v běžném systému kontrol kvality hygieny provozů [Griffith, 1997]. Dnes jsou k dispozici lehké a uživatelsky velmi příjemné kompaktní přenosné luminometry různých výrobců. Odběr vzorku se provádí podobně jako běžný mikrobiologický stěr z povrchu kontrolovaného materiálu, reakční směs obsahující vše potřebné je nedílnou součástí balení. Někteří výrobci poskytují k přístrojům různá rozšíření, například sondy pro měření pH, teploty a vlhkosti, a přístroj se tak stává dostupným víceúčelovým nástrojem, kterým lze provádět systematickou kontrolu podmínek prostředí. Také samotný stěrový materiál prochází neustálým vývojem. Na trhu je již celá řada typů stěrovek, takže vedle základních klasických vatových tyčinek jsou dnes dostupné různé kartáčky, které se dostanou i na obtížně dostupná místa, nebo ploché pěnové stěrovky s větší plochou, jež lépe zachycují mikroorganismy. Odběr stěru a jeho následné vyhodnocení zvládne pracovník po krátkém zaškolení. Výsledek měření je pak dostupný do několika vteřin. I když získané výsledky nelze vzájemně porovnávat mezi jednotlivými laboratořemi (naměřené hodnoty závisí na typu přístroje i typu stěrového materiálu), při správně provedeném počátečním screeningu a vhodně nastavených mezích pro hodnocení míry rizika mikrobiální kontaminace může být luminometr užitečným pomocníkem [Whiteley, 2012; Mildenhall, 2020].

Ačkoli je bioluminiscenční metoda v řadě odvětví již rutinně používaným nástrojem, který hodnotí mikrobiologické riziko, do památkové péče tento postup zatím plošně nepronikl. Nicméně i v tomto oboru můžeme najít publikace, které se možností využití stanovení ATP ve vztahu k mikrobiálnímu znečištění detailně zabývají. Práce publikované výzkumnou skupinou Rakotonirainy a kol. se zabývají především možností hodnocení kontaminace archivních papírových dokumentů plísněmi a s tím souvisejícího vzniku skvrn, tzv. foxing [Rakotonirainy, 2003; 2008; 2013]. Další práce se pak zaměřují i na jiné materiály jako je textil [Stupar, 2014], nástěnné malby [Unković, 2015] či dřevo [Antonelli, 2020]. V časopise *Fórum pro konzervátory-restaurátory* již byla také publikována zajímavá studie o možnostech hodnocení přítomnosti plísní na různých historických materiálech pomocí luminometru [Svobodová, 2019]. Naše práce na tento výzkum volně navazuje a hlouběji se zaměřuje především na vyhodnocování mikrobiálního napadení archivních černobílých fotografických materiálů. Cílem našich experimentů bylo posouzení možnosti využití luminometru ke stanovení míry mikrobiální kontaminace, k odlišení přítomnosti plísní v životaschopném stavu od již odumřelého mycelia, a v neposlední řadě také k hodnocení účinnosti dezinfekčních postupů.

MATERIÁL A METODIKA

Popis luminometru

Pro měření bioluminiscence byl použit přenosný luminometr (Hygiena, USA) systém EnSURE™ a stěrové testy SuperSnap™ s detekčním limitem 0,1 fmol ATP. Postup měření probíhal dle manuálu výrobce [Hygiena, 2020]. Výsledky měření jsou udávány v jednotkách relativní luminiscence (RLU – Relative Luminiscence Units).

Vzorky

Modelovým materiálem v první etapě experimentů byl zvolen filtrační papír (Whatman, plošná hmotnost 103 g/m^2), a to především díky možnosti snadné sterilizace v autoklávu, dostupnost a finanční nenáročnost při vyšší spotřebě vzorků v průběhu optimalizace postupů. V další fázi pak byly použity archivní černobílé fotografie s různým typem světlocitlivé vrstvy (želatina, albumin, kolodium).

Dezinfekční prostředky

Septonex – kvarterní amonná sůl (karbethopendecinium-bromid), používaný ve formě 2% w/w vodného roztoku (Galenica Medical spol. s r.o.). roztok Bacillol® 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.). 96% v/v vodný roztok butanolu používaný ve formě par (Penta).

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).
Bacillus subtilis CCM 1999, *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222, *Cladosporium herbarum* CCM F-455, *Penicillium expansum* CCM F-576.

Kultivační média

Plate Count Agar (PCA, Merck) – médium použité pro kultivaci bakterií; Malt Extract Agar (MEA, Oxoid) – 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 je předepsaná výrobcem.

Příprava suspenzí testovaných mikroorganismů

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]. Výchozí suspenze pak byla následně ředěna sterilním fyziologickým roztokem na požadovanou koncentraci KTJ/ml (KTJ – kolonie tvořící jednotky).

Suspenze spor mikromycet: vybrané kultury mikroskopických hub byly kultivovány na agarových plotnách s MEA při 25 °C. Zkušební suspenze byla připravena z dvoudenní kultury přelitím sterilním 0,05% (w/v) vodným roztokem polysorbátu (Tween 80, HiMedia), aby se zvýšila smáčivost, a uvolněna z povrchu skleněnou tyčinkou. Hyfy byly od spor odděleny filtrací přes skleněný filtr. Počet spor ve filtrátu byl zjištěn mikroskopicky Bűrkerovou komůrkou a suspenze spor byla naředěna sterilním fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) na koncentraci 10^6 spor/ml. Počet spor v připravených suspenzích byl ověřen kultivačně na půdě MEA.

Cílená inokulace vzorků

Na sterilní vzorek byla pipetou nanesena suspenze spor plísní v požadované koncentraci buď po celé ploše, nebo bodově v závislosti na druhu experimentu.

Spory mikromycet (bez prekultivace) – po nanesení suspenze spor byly vzorky usušeny.

Mycelium (s prekultivací) – po nanesení a zaschnutí suspenze byly vzorky jednotlivě umístěny na povrch MEA a následně kultivovány 24 h při 25 °C. Během této doby docházelo k rozvoji vegetativního mycelia bez fruktifikačních orgánů. Po kultivaci byly vzorky usušeny v laminárním boxu.

Inaktivace plísní

Inaktivace životaschopných spor plísní a mycelia probíhala v autoklávu (121 °C; 101,3 kPa; 15 min). Po inaktivaci byl proveden stěr pro stanovení RLU. Proces inaktivace byl ověřen i kultivačně (MEA).

Dezinfekční postupy

Roztoky Septonex a Bacillol® AF: dezinfekční roztok byl aplikován sterilní pipetou na celý povrch inokulovaného vzorku do jeho úplného smočení. Po 5 min působení v uzavřené Petriho misce byl vzorek ponořen do sterilní destilované vody (odmytí zbytků dezinfekčního roztoku) a následně usušen za pokojové teploty v laminárním boxu.

Páry butanolu: expozice probíhala po dobu 48 h v uzavřeném boxu (objem 10 l) při teplotě 25 °C. Páry byly zajištěny odpařováním 150 ml 96% v/v vodného roztoku butanolu z otevřené nádoby na dně boxu. Inokulované vzorky byly v boxu volně rozloženy, tak aby účinek par mohl být maximální. Po ukončení expozice byly zbytky butanolu ze vzorků odvětrávány po dobu 15 min v laminárním boxu.

Hodnocení dezinfekčního účinku

Luminometrem: po inokulaci a následné dezinfekci byl z jednotlivých vzorků proveden stěr a změřena bioluminiscence v jednotkách RLU dle manuálu [Hygiena, 2020].

Kultivačně: po inokulaci a následné dezinfekci byly jednotlivé vzorky umístěny na povrch MEA a kultivovány při 25 °C. Růst mycelia byl průběžně monitorován v pravidelných intervalech po 24 h po dobu 5 dní. Jako kontrola při hodnocení byly použity inokulované vzorky bez ošetření dezinfekčním prostředkem. Jejich kultivace probíhala za stejných podmínek.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Do testování byly zařazeny rody plísní a bakterií, které se na archivních fotografických materiálech běžně vyskytují a za určitých podmínek mohou potenciálně způsobit poškození materiálů – *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Bacillus* [Branyšová, 2021; Purkrtová, 2022]. Jednotlivé experimenty byly hodnoceny jak s využitím luminometru, tak klasickou kultivační metodou.

Stanovení meze detekce hodnot RLU v suspenzích

V první fázi experimentů byl ověřen detekční limit používaného luminometru proměřením ředicí řady suspenzí jednotlivých mikroorganismů ve fyziologickém roztoku. Koncentrace mikroorganismů se pohybovaly v rozmezí 10^1–10^6 KTJ/ml. Prezentované výsledky jsou průměrem třech biologických replikátů s uvedenou směrodatnou odchylkou (tab. 1). Z výsledků je zřejmé, že detekční limit pro spory plísní v suspenzi je přibližně 10^4 KTJ/ml. Při této koncentraci je odezva luminometru v hodnotách desítek RLU a je zřetelně odlišitelná od pozadí (sterilní fyziologický roztok). Výsledky korelují s dříve publikovanými daty [Svobodová, 2019]. U bakteriálních spor podobná odezva nastává až při koncentraci 10^6 KTJ/ml. Příčinou je skutečnost, že bakteriální spory se nacházejí v tzv. dormantním stavu, nejsou metabolicky aktivní a hodnoty ATP tak prakticky nejsou detekovatelné [Venkateswaran, 2003]. Pro hodnocení mikrobiální kontaminace povrchů bakteriálními sporami je tak luminometr nevhodný. Proto byly z dalších experimentů bakteriální spory vyřazeny a pozornost byla věnována pouze kontaminaci způsobené sporami a myceliem plísní.

Hodnocení míry kontaminace a odlišení aktivní a neaktivní kontaminace

Abychom mohli relevantně vyhodnotit rizika mikrobiálního napadení povrchu materiálů, je nezbytné odlišit aktivní kontaminaci, kde za určitých podmínek hrozí riziko poškození cenných archivních sbírek, od kontaminace neaktivní. Za běžných okolností je velmi obtížné odlišit životaschopné mycelium od již odumřelého pouhým vizuálním zhodnocením. Na řadu pak přichází časově náročnější klasické kultivační postupy. V případě potvrzení přítomnosti životaschopných mikroorganismů pak může být navržen vhodný dezinfekční postup. V této fázi experimentů jsme se soustředili na možnost odlišení aktivní a neaktivní kontaminace na modelových vzorcích s využitím luminometru. Vzorky byly v této sérii experimentů inokulovány po celé ploše vzorku ve třech koncentračních úrovních. Úroveň výchozí kontaminace byla ověřena kultivačně růstem na MEA (obr. 2).

Při plošné kontaminaci byla pro stanovení hodnot RLU stírána plocha 4 cm^2 (2 × 2 cm) [Svobodová, 2019]. Běžně je výrobci luminometrů doporučována velikost plochy pro stěr 100 cm^2 (10 × 10 cm), kdy se vlastní stěr provádí ve dvou na sebe kolmých směrech z celé definované plochy [Mildenhall, 2020]. Výsledky uvedené v tabulce 2 ukazují, že i stěr z mnohem menší plochy může být k hodnocení dostačující. To je v případě potenciálního využití pro stěry z historických materiálů vzhledem k nutnosti dodržení maximální míry šetrnosti pozitivní zjištění. Hodnocena byla jak kontaminace sporami plísní, tak vegetativním myceliem. Luminiscenční stěry spor byly provedeny bezprostředně po inokulaci vzorků, stěry mycelií pak po 24 h kultivace, kdy byl nárůst mycelia pozorovatelný pouhým okem víceméně jen u vzorků s nejvyšší mírou kontaminace, tj. při výchozí koncentraci v řádu 10^4 spor/cm^2 (obr. 2, první sloupec).

Tab. 1 *Luminiscence v jednotkách RLU pro různé koncentrace suspenzí uvedených mikroorganismů. Hodnota pozadí (sterilní fyziologický roztok) = 0,0 ± 0,0 RLU / Luminescence in RLU units for different concentrations of specified microorganism suspensions. Background value (sterile saline solution) = 0.0 ± 0.0 RLU*

Koncentrace suspenze (KTJ/ml)	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
	Naměřené jednotky RLU					
P. expansum	1,0 ± 0,8	1,3 ± 1,2	1,3 ± 1,3	28,0 ± 6,7	450,3 ± 71,3	5176,7 ± 857,7
C. herbarum	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,8	2,3 ± 1,9	47,7 ± 20,9	609,7 ± 176,6	6277,7 ± 733,7
A. brasiliensis	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	1,7 ± 0,9	25,3 ± 9,7	503,7 ± 154,3	4068,3 ± 1759,6
B. subtilis (spory)	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	10 ± 0,8	1,3 ± 1,3	3,0 ± 2,2	49,7 ± 27,3

Obr. 2 *Postupný růst mycelia na inokulovaných modelových vzorcích. Výchozí koncentrace spor před kultivací: 10^0/cm²; 10^2/cm²; 10^4/cm² / Gradual mycelial growth on inoculated model samples. Initial concentration of spores before cultivation: 10^0/cm²; 10^2/cm²; 10^4/cm²*

Aktivní mycelium je luminometrem detekovatelné již při nízké úrovni kontaminace (výchozí koncentrace před kultivací v řádu jednotek spor/cm²), hodnoty RLU se pohybují nad průměrem zjištěných hodnot RLU pro pozadí (tab. 3). Při střední úrovni kontaminace (výchozí koncentrace před kultivací v řádu 10^2 spor/cm²) jsou zjištěné hodnoty RLU již řádově vyšší než pozadí. Aktivní kontaminace sporami plísní je spolehlivě detekovatelná až při nejvyšší úrovni kontaminace (výchozí koncentrace v řádu 10^4 spor/cm²). Výsledky také ukazují, že pomocí luminometru lze spolehlivě odlišit aktivní mycelium od neaktivního (tab. 2). Hodnoty RLU po inaktivaci řádově klesají, také u životaschopných spor plísní dochází k výraznému poklesu hodnot RLU.

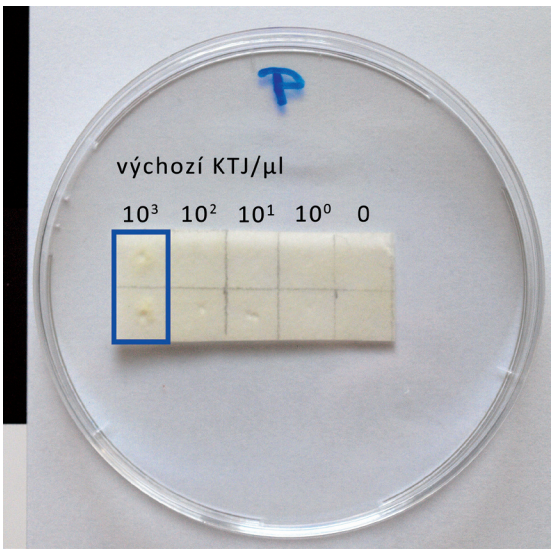
Tab. 2 *Luminiscence (v jednotkách RLU) stěrů modelových vzorků 2 × 2 cm s různou úrovní plošné kontaminace. a – aktivní spory/mycelium; n – neaktivní spory/mycelium; * hodnoty nad rozsah přístroje. Výsledky jsou průměrem ze dvou nezávislých stanovení / Luminescence (in RLU units) of 2 × 2 cm swabs from model samples with different levels of surface contamination. a – active spores / mycelium; n – inactive spores / mycelium; * values above the luminometer range. The results are the average of two independent assays*

Výchozí koncentrace spor	10^0/cm²				10^2/cm²				10^4/cm²			
	spory		mycelium		spory		mycelium		spory		mycelium	
aktivní/neaktivní	a	n	a	n	a	n	a	n	a	n	a	n
P. expansum	1	1	510	1	5	1	9999*	4	1611	6	9999*	31
C. herbarum	1	1	435	1	2	1	5749	3	2399	5	9999*	26
A. brasiliensis	0	1	1571	2	4	2	9999*	2	1238	4	9999*	76

Tab. 3 *Hodnoty luminiscence pozadí modelových vzorků v různých úpravách pro jednotlivé experimenty / Background luminescence values of model samples with various modifications for individual experiments*

Popis materiálu	Hodnoty RLU	
	plošný stěr 2 × 2 cm	bodový stěr (průměr cca 5 mm)
papír (suchý)	0	0
papír + fyziol. roztok	0	0
papír + Bacillol	3	0
papír + 2% Septonex	1	0
papír po 48h v parách butanolu	1	0
papír + MEA	252	12
papír + MEA + autokláv	4	1

Vedle výše popsaných stěrů z plochy 4 cm² byla otestována možnost hodnocení kontaminace jen cíleným stěrem z minimální plochy. Stěr byl proveden jen špičkou stěrovky (ploška zhruba o průměru 5 mm). Tento typ stěru se maximálně možně přibližuje reálné situaci, kdy je potřeba z archivního materiálu odebrat stěr z konkrétního místa, kde je podezření na růst plísní, například pigmentované skvrny, skvrny s jinou strukturou povrchu apod. Modelové vzorky byly v tomto případě inokulovány formou jednotlivých kapek (objem 2 µl) suspenzí různé koncentrace. Stejně jako u plošné kontaminace byla luminometrem hodnocena kontaminace sporami i myceliem, v obou případech jak v aktivní, tak neaktivní formě. Po 24 h kultivace bylo okem patrné mycelium všech třech druhů plísní jen při nejvyšší výchozí koncentraci, tj. aplikace 2 µl suspenze v koncentraci 10^3 KTJ/µl (obr. 3).



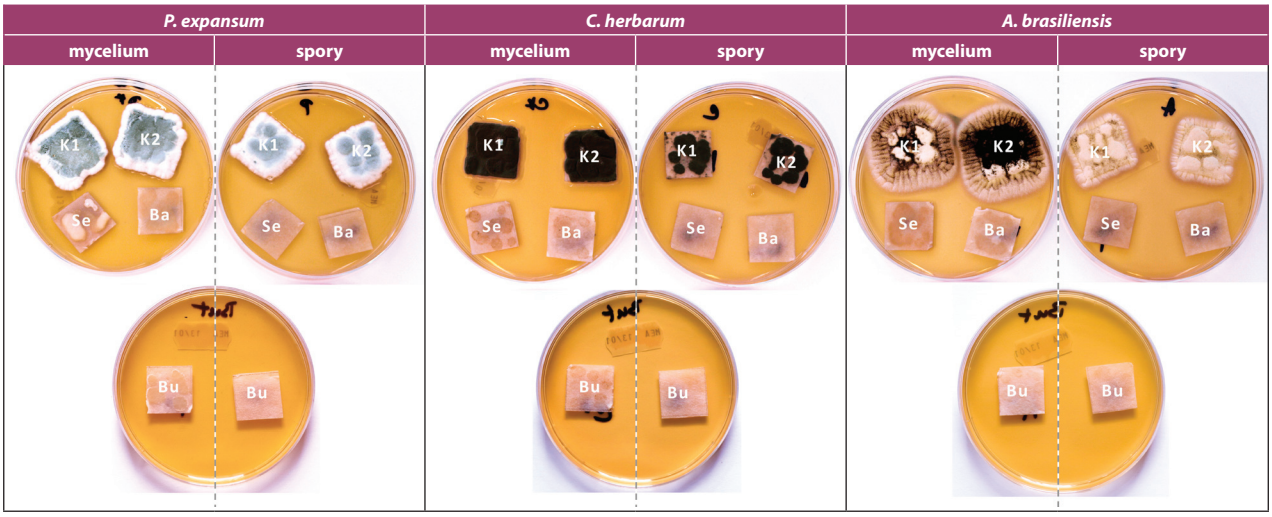
Obr. 3 *Nárůst mycelia P. expansum na bodově inokulovaném modelovém vzorku po 24 h kultivace (25 °C; MEA). V modrém rámečku označen okem viditelný nárůst mycelia / P. expansum mycelial growth on spot inoculated model sample after 24 hours of cultivation (25 °C; MEA). In the blue box, there is a growth of the mycelium visible to the naked eye*

Hodnocení účinnosti dezinfekčních postupů s využitím luminometru

Podstatou této fáze experimentů bylo ověření možnosti využití luminometru pro hodnocení účinnosti dezinfekčních prostředků na vybrané mikromycety, a to jak ve formě spor aplikovaných na modelový materiál, tak ve formě vegetativního mycelia (s 24 h prekultivací inokulovaných vzorků na MEA). Vzorky o rozměru 2 × 2 cm byly inokulovány suspenzí spor, výsledná koncentrace se pohybovala v řádu 10^4 KTJ/cm^2. Po dezinfekci byla účinnost daného dezinfekčního postupu hodnocena jednak pomocí luminometru (stěr z celé plochy 4 cm^2) a jednak kultivačně (tab. 5, obr. 4). Výsledky kultivačního stanovení korespondují s dříve publikovanými daty, kdy byl potvrzen antifungální účinek vybraných dezinfekčních postupů [Sýkorová, 2021]. Možnost využití luminometru pro hodnocení účinnosti není ale zcela jednoznačná. Bezprostředně po aplikaci dezinfekčních roztoků dochází k výraznému zvýšení naměřených hodnot RLU (viz hodnoty Bacillol$_0$, Septonex$_0$) oproti kontrole (tab. 5). Tato skutečnost je patrně způsobena poškozením buněk, uvolněním ATP do prostředí a jeho následnou detekcí ve vyšší míře [Venkateswaran, 2003]. Proto byly paralelně připravené vzorky proměřeny také po 24 h od doby aplikace dezinfekčních roztoků. V tomto případě již byly hodnoty RLU řádově nižší než kontrola (Bacillol$_{24}$, Septonex$_{24}$). V případě dezinfekce v parách butanolu přechodné zvýšení RLU nebylo detekováno. Důvodem je pravděpodobně dlouhý časový interval samotného ošetření (48 h), během kterého je uvolněný ATP degradován. Závěrem lze tedy konstatovat, že účinnost provedené dezinfekce je možné potvrdit s využitím luminometru, v případě roztoků je však nutné dodržet jistý časový odstup mezi aplikací dezinfekce a provedením stěru.

Tab. 4 *Luminiscence (v jednotkách RLU) stěrů modelových vzorků s různou úrovní bodové kontaminace a – aktivní spory / mycelium; n – neaktivní spory / mycelium; * hodnoty nad rozsah přístroje. Výsledky jsou průměrem ze dvou nezávislých stanovení / Luminescence (in RLU units)of swabs from model samples with different levels of spot contamination a – active spores / mycelium; n – inactive spores / mycelium; * values above the luminometer range. The results are the average of two independent assays*

Výchozí koncentrace suspenze (aplikovány 2 µl)	10^0 KTJ / µl		10^1 KTJ / µl		10^2 KTJ / µl		10^3 KTJ / µl	
aktivní/neaktivní	a	n	a	n	a	n	a	n
	spory							
P. expansum	0	0	1	0	2	0	147	0
C. herbarum	0	0	2	0	2	0	143	0
A. brasiliensis	0	0	0	0	3	0	197	0
	mycelium (po kultivaci na MEA 24 h)							
P. expansum	2226	0	9999*	2	9999*	1	9999*	77
C. herbarum	1359	3	7142	5	9999*	1	9999*	35
A. brasiliensis	6124	1	9999*	7	9999*	7	9999*	49



Obr. 4 *Inhibice růstu mycelia na modelových vzorcích po dezinfekci; doba kultivace na MEA 48 h při 25 °C. K1 – kontrolní vzorek bez dezinfekce; K2 – kontrolní vzorek jen s oplachem ve sterilní destilované vodě; Se – vzorek ošetřený 2% vodným roztokem Septonex; Ba – vzorek ošetřený roztokem Bacillol; Bu – vzorek ošetřený parami butanolu / Inhibition of mycelial growth on model samples after disinfection; cultivation time on MEA 48 h at 25 °C. K1 - control sample without disinfection; K2 - control sample only with rinsing in sterile distilled water; Se - sample treated with 2% aqueous Septonex solution; Ba - sample treated with Bacillol solution; Bu - sample treated with butanol vapor*

Reálné fotografické materiály

Jak již bylo uvedeno, v běžné praxi je monitoring mikrobiální zátěže na základě stanovení ATP pomocí luminometru široce používán především v potravinářství a zdravotnictví. V těchto provozech převažují inertní materiály s hladkým povrchem, jako je nerezová ocel, plast, sklo či keramická dlažba. Pokud jsou tyto materiály čisté, vykazují stěry z jejich povrchu prakticky nulové hodnoty RLU. Snadno tak lze nastavit meze RLU, které jsou ještě přípustné a které již znamenají jasné riziko mikrobiálního znečištění [Mildenhall, 2020]. Pro námi používaný luminometr Hygiena EnSURE™ je přednastavenou limitní hodnotou 30 RLU [Hygiena, 2020]. V případě organických materiálů je však nezbytné vyhodnotit také příspěvek samotného materiálu k celkové hodnotě RLU [Svobodová, 2019]. Teprve po stanovení běžné hodnoty luminiscence pozadí daných materiálů je možné nastavit vhodné limity ukazující míru znečištění a s tím souvisejícího rizika. Pro určení hodnot RLU pozadí archivních fotografických materiálů byly použity stěry fotografií s různou světlocitlivou vrstvou – želatina, albumin a kolodium. Pro každý typ bylo vybráno pět exemplářů reálných fotografií. Z každého exempláře byly provedeny dva luminiscenční stěry v různých místech (z plochy 2 × 2 cm). Přítomnost případné mikrobiální kontaminace byla ověřena i kultivačně, taktéž stěrem ze dvou míst o ploše 2 × 2 cm. Fotografie byly suché, v dobrém stavu a při vizuálním hodnocení nebylo patrné žádné poškození způsobené mikroorganismy. Naměřené hodnoty RLU pozadí pro reálné vzorky a výsledky kultivačního stanovení jsou shrnuty v tabulce 6. Vzhledem k poměrně velkému rozptylu hodnot jsou pak pro přehlednost na obrázku 5 srovnány průměrné hodnoty. Jasná korelace mezi hodnotami RLU a KTJ nebyla nalezena. Příčinou je pravděpodobně skutečnost, že kontaminace není nikdy homogenně rozptýlená po celém povrchu fotografie a velmi záleží, z jakého místa je odběr proveden. Nejnižší průměrná hodnota RLU byla zaznamenána u želatinových fotografií, nejvyšší pak u fotografií se světlocitlivou vrstvou na bázi albuminu (obr. 5). Rozdíly však nejsou nijak markantní. Kultivační stanovení neprokázalo přítomnost plísní ani na jednom vzorku. U některých vzorků byla v malé míře zjištěna přítomnost bakterií, a to především grampozitivních koků, které většinou souvisejí s lidskou kožní mikroflórou a na povrch fotografií se dostávají především při neodborné manipulaci bez rukavic. V biodegradaci materiálů ale prakticky nehrají žádnou roli [Skorkovský, 1981]. Stanovena byla i přítomnost několika KTJ sporulujících grampozitivních tyčinek. Ty se však na suchém povrchu fotografií nacházejí v dormantním stavu a luminometrem nemohou být detekovány [Venkateswaran, 2003]. Celkové počty zachycených kolonií po kultivačním stanovení se pohybují v řádu jednotek, získané hodnoty RLU lze tedy považovat za hodnoty víceméně mikrobiologicky „čistého" fotografického materiálu.

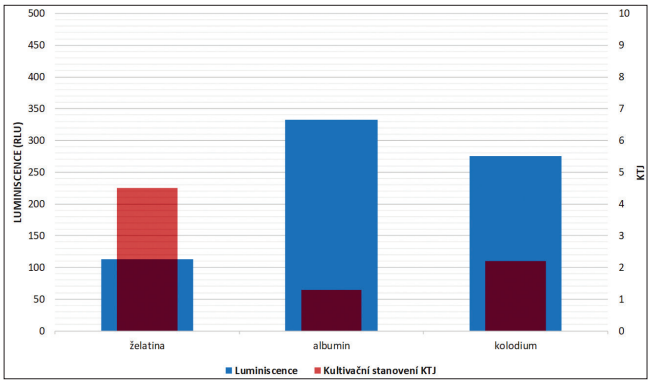
Na základě získaných výsledků z předchozích experimentů na reálných i modelových vzorcích lze navrhnout orientační meze hodnot RLU, díky nimž je možné posoudit míru rizika mikrobiální kontaminace archivních fotografických materiálů (tab. 7). Tyto hodnoty však nelze považovat za obecně platné, jsou závislé na typu přístroje, typu stěrovek a způsobu provedení stěru.

Tab. 6 *Hodnocení míry kontaminace reálných archivních fotografických materiálů pomocí luminometru (RLU) a kultivačně (KTJ). Z každého vzorku byly provedeny dva luminiscenční stěry a dva stěry pro kultivační stanovení, vždy z plochy 2 × 2 cm / Degree of contamination of real archival photographic materials evaluation using a luminometer (RLU) and cultivation (KTJ). Two luminescent swabs and two swabs for cultivation were made from each sample, each from an area of 2 × 2 cm*

Materiál	Vzorek	RLU 1	RLU 2	KTJ 1	KTJ 2
želatina	1	190	222	2	7
	2	53	105	5	8
	3	183	97	6	1
	4	45	51	3	4
	5	64	117	5	4
albumin	1	128	223	4	0
	2	345	369	0	0
	3	405	354	1	0
	4	318	401	3	3
	5	396	387	2	0
kolodium	1	140	203	2	2
	2	498	356	2	1
	3	199	312	2	4
	4	183	245	3	3
	5	430	187	3	0

Tab. 5 *Luminiscence (v jednotkách RLU) stěrů modelových vzorků. Výchozí inokulace 10^4 KTJ/cm^2. Kontrola 1 – kontrolní vzorek bez dezinfekce; kontrola 2 – kontrolní vzorek jen s oplachem ve sterilní destilované vodě; dezinfekce$_0$ / dezinfekce$_{24}$ – stěr bezprostředně po dezinfekci respektive po 24 h; * hodnoty nad rozsah přístroje. Výsledky jsou průměrem dvou nezávislých stanovení / Luminescence (in RLU units) of model sample swabs. Initial inoculation 10^4 KTJ/cm^2. Kontrola 1 – control sample without disinfection; kontrol 2 – control sample only with rinsing in sterile distilled water; disinfection$_0$ / disinfection$_{24}$ – swab immediately after disinfection or after 24 h respectively; * values above the luminometer range. The results are the average of two independent assays*

	spory						
	kontrola 1	kontrola 2	Bacillol$_0$	Bacillol24	Septonex$_0$	Septonex$_{24}$	butanol
P. expansum	420	522	7825	49	1223	15	38
C. herbarum	235	123	1121	11	174	54	95
A. brasiliensis	674	426	2591	63	772	27	32
	mycelium (po kultivaci na MEA 24 h)						
	kontrola 1	kontrola 2	Bacillol$_0$	Bacillol$_{24}$	Septonex$_0$	Septonex$_{24}$	butanol
P. expansum	9999*	9999*	9999*	107	8852	255	88
C. herbarum	9999*	9999*	9999*	115	7883	272	122
A. brasiliensis	9999*	9999*	9999*	87	9999*	168	96



Obr. 5 *Srovnání průměrných hodnot luminiscence (RLU) a kultivačně stanovených KTJ pro jednotlivé druhy fotografií (viz tabulka 6) / Comparison of average luminescence values (RLU) and colony-forming units (CFU) determined by cultivation for individual types of photographs (see table 6)*

Tab. 7 *Navržené mezní hodnoty RLU, díky nimž je možné posoudit míru rizika mikrobiální kontaminace archivních fotografických materiálů (stěr z plochy 2 × 2 cm) / Proposed RLU limit values for the degree of microbial contamination risk of archival photographic materials assessment (swab of area 2 × 2 cm)*

Hodnoty RLU	do 500	500–1000	nad 1000
Hodnocení	bez rizika	střední riziko, v případě výskytu pigmentových skvrn či jiných vizuálních změn doporučeno kultivační stanovení	aktivní napadení, nutná dezinfekce

ZÁVĚR

Výsledky naší práce potvrzují, že pomocí luminometru lze velmi dobře detekovat rizikové napadení fotografického materiálu plísněmi v metabolicky aktivním stavu. Míru kontaminace bakteriálními sporami na základě stanovení ATP není možné vzhledem k jejich nízké metabolické aktivitě hodnotit. Nutnou podmínkou bioluminiscenčního monitoringu mikrobiální kontaminace na organických materiálech je ale stanovení příspěvku pozadí těchto materiálů k hodnotám RLU.

S tím pak souvisí vhodné nastavení mezních hodnot RLU pro posouzení míry rizika mikrobiální kontaminace, které jsou značně odlišné od základního nastavení daného výrobcem. Ačkoli využití luminometru na rozdíl od klasického kultivačního stanovení nepřináší přesné údaje o množství a druhu přítomných mikroorganismů, získané hodnoty mohou být dobrým ukazatelem v rozhodovacím procesu, zda je nutné daný objekt dezinfikovat či nikoli. Samotné zpracování a vyhodnocení stěru je velmi jednoduché, rychlé, může probíhat přímo v terénu a výsledky jsou známy do několika vteřin. Přenosný luminometr tak může být za určitých podmínek užitečným pomocníkem v péči o památky.

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, 56 (1), s. 58–68.
- ANTONELLI, F. – BARTOLINI, M. – PLISSONNIER, M. – ESPOSITO, A. – GALOTTA, G. – RICCI, S. – DAVIDDE, B. – PEDONE, C. – GIOVANNI, A. – PIAZZA, S. – GUERRIERI, F. – ROMAGNOLI, M.: Essential Oils as Alternative Biocides for the Preservation of Waterlogged Archaeological Wood. *Microorganisms*, 2020, 8, s. 2015.
- BORREGO, S. – GUIAMET P, GOMEZ DE SARAVIA, S. – BATISTINI, P. – GARCIA, M. – LAVIN, P. – PERDOMO I.: The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. *Int Biodeter & Biodegr*, 2010, 64, s. 139–145.
- BRANYSOVA, T. – KRACMAROVA, M. – DUROVIC, M. – DEMNEROVA, K. – STIBOROVA, H.: Factors Influencing the Fungal Diversity on Audio-Visual Materials. *Microorganisms*, 2021, 9, s. 2497.
- CORBITT, A.J. – BENNION, N. – FORSYTHE, S.J.: Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygienemonitoring in the food and beverage industry. *Lett. Appl. Microbiol*. 2000, 30, s. 443–447.
- COSTA, P.D. – ANDRADE, N.J. – PASSOS, F.J.V. – BRANDÃO, S.C.C. – RODRIGUES, C.G.F.: ATP-bioluminescence as atechnique to evaluate the microbiological quality of water in food industry. *Brazilian Arch. Biol. Technol*. 2004, 47, s. 399–405.
- DEMNEROVÁ, K. – PURKRTOVÁ, S. – SAVICKÁ, D. – SÝKOROVÁ, H. – ĎUROVIČ, M. – BENETKOVÁ, B. – HRICKOVÁ, K. – KOUKALOVÁ, L. – NOVÁKOVÁ, M.: Metodika odběru a izolace bakterií, kvasinek a plísní z fotografických materiálů; dostupné z http://www.nusl.cz /ntk/nusl-432347. 2020.
- GIANCARLO, R. – ZANARDINI, E. – SORLINI, C.: Encyclopedia of Microbiology. 3. vyd. *Biodeterioration – Including Cultural Heritage*, 2009, s. 191–205.
- GRIFFITH, C.J. – DAVIDSON C.A. – PETERS A.C. – FIELDING L.M.: Towards a strategic cleaning assessment programme: hygiene monitoring and ATP luminometry, an options appraisal. *Food Sci. Technol.*, 1997, s. 15– 24.
- HYGIENA: Setting up program test points and pass/fail limits. *In SystemSURE Plus and EnSURE™ Operator Manual V5*.0 [online]. Dostupné z: https://www.hygiena.com/food-safety-solutions/atp-monitoring/ensure/.
- KLÁNOVÁ, K. – VRKOSLAVOVÁ, J.: Standardní operační postupy pro vyšetřování vnitřního prostředí. *Acta Hyg Epidemiol Microbiol*, 2021, 4, s. 1–22.
- KODÍČEK, M. – VALENTOVÁ, O. – HYNEK, R.: *Biochemie, chemický pohled na biologický svět*. 1. vydání. VŠCHT v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- 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, 63, s. 496–502.
- MILDENHALL, K.B. – RANKIN, S.A.: Implications of Adenylate Metabolism in Hygiene Assessment: a Review. *J Food Prot*, 2020, 83 (9), s. 1619–1631.
- NANTE, N. – CERIALE, E. – MESSINA, G. – LENZI, D. – MANZI, P.: Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review. *J Prev Med Hyg*. 2017, 58(2), s. 177–183.
- OSIMANI, A. – GAROFALO, C. – CLEMENTI, F. – TAVOLETTI, S. – AQUILANTI, L.: Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *Int J Environ Res Public Health*. 2014, 11(10), s. 10 824–10 837.
- PANGALLO, D. – CHOVANOVÁ, K. – SIMONOVICOVÁ, A. – FERIANC P.: Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. *Can J Microbiol*. 2009, 55(3), s. 277–87.
- PASQUARELLA, C. – SACCANI, E. – SANSEBASTIANO, G. E. – UGOLOTTI, M. – PASQUARIELLO, G. – ALBERTINI, R.: Proposal for a biological environmental monitoring approach to be used in libraries and archives. *Ann Agric Environ Med.*, 2012, 19(2), s. 209–212.
- PURKRTOVA, S. – SAVICKA, D. – KADAVA, J. – SYKOROVA, H. – KOVACOVA, N. – KALISOVA, D. – NESPOROVA, T. – NOVAKOVA, M. – MASEK BENETKOVA, B. – KOUKALOVA, L. – BORYSKOVA, S. – HNULIKOVA, B. – DUROVIC, M. – DEMNEROVA, K.: Microbial Contamination of Photographic and Cinematographic Materials in Archival Funds in the Czech Republic. *Microorganisms*, 2022, 10, s. 155.
- PUŠKÁROVÁ, A. – BUČKOVÁ, M. – HABALOVÁ, B. – KRAKOVÁ, L. – MAKOVÁ, A. – PANGALLO, D.: Microbial communities affecting albumen photography heritage: a methodological survey. *Scientific Reports*, 2016, 6, n. pag.
- RAKOTONIRAINY, M. – DUBAR, P.: Application of bioluminescence ATP measurement for evaluation of fungal viability of foxing spots on old documents. *Luminescence*, 2013, 28, 308–312.
- RAKOTONIRAINY, M. – HÉRAUD, C. – LAVÉDRINE, B.: 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(2), s. 113–121.
- RAKOTONIRAINY, M.S. – ARNOLD, S.: 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(3), s. 182–186.
- SHARPE, A.N. – WOODROW, M.N. – JACKSON, A.K.: Adenosine-triphosphate (ATP) levels in foods contaminated by bacteria. *J. Appl. Bacteriol*, 1970, 33, s. 758–767.
- SKORKOVSKÝ, Bohuslav. Mikroorganismy jako původci degradace archiválií. Praha: TEPS, 1981.
- STANNARD, C.J. – GIBBS, P.A.: Rapid microbiology: applications of bioluminescence in the food industry – a review. *J. Biolumin. Chemilumin*, 1986, s. 3–10.
- STUPAR, M. – GRBIĆ, M. – UNKOVIĆ, N. – VUKOJEVIC, J. – NEDELJKOVIĆ, T.: Implementation of ATP Biolumenescence Method in the Study of the Fungal Deterioration of Textile Artefacts. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 2014, 108, s. 132–136.
- SVOBODOVÁ, E. – SÝKOROVÁ, H. – KADAVÁ, J. – KOPECKÁ, I.: Využití luminometru pro ověření přítomnosti plísní. *Fórum pro konzervátory-restaurátory*, 2019, s. 81–86.
- SÝKOROVÁ, H. – KADAVÁ, J. – SAVICKÁ, D. – ĎUROVIČ, M. – DEMNEROVÁ, K.: Studium odolnosti mikrobiálních izolátů z fotografických a filmových materiálů k desinfekčním prostředkům. *Fórum pro konzervátory-restaurátory*, 2021, s. 110–116.
- UNKOVIĆ, N. – GRBIĆ, M. – STUPAR, M. – VUKOJEVIC, J. – SUBAKOV, G. – JELIKIĆ, A. – STANOJEVIĆ, D.: ATP bioluminescence method: tool for rapid screening of organic and microbial contaminants on dete riorated mural paintings. *Natural Product Research*, 2015, s. 1061–1069.
- VENKATESWARAN, K. – HATTORI, N. – KERN, R.: ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J. Microbiol. Meth.*, 2003, 52, s. 367–377.
- VOTAVA, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- WHITELEY, G.S. – DERRY, C. – GLASBEY, T.: The comparative performance of three brands of portable ATP-bioluminometer intended for use in hospital infection control. *Healthcare Infection*, 2012, 17, s. 91–97.
- ZAHRADNICKÝ, J. a kol.: *Mikrobiologie a epidemiologie*. 1. vydání. Praha, Avicenum, 1987.