

Zastosowanie testów luminometrycznych (ATP/AMP) w badaniach mikrobiologicznych obiektów w Bibliotece Narodowej

DOI: 10.36155/NK.21.00002

Bogdan Filip Zerek, Jakub Piechal

<https://orcid.org/0000-0003-4248-8991> <https://orcid.org/0000-0001-6982-6271>

notes 21_2019
konserwatorski

Summary: Bogdan Filip Zerek, Jakub Piechal, *Use of luminometric assays (ATM/AMP) in microbial examination of the National Library of Poland's collections*

The text describes the performance and results of ad hoc experiments that made it possible to introduce procedures used in the Conservation Laboratory of the National Library of Poland that aim at a microbial evaluation of its collections with the use of disposable dry luminometric swabs and the Kikkoman PD-20 luminometer. Despite its limitations, luminometry is a valuable alternative to traditional cultivation techniques that only yield results after about 10 days. Owing to the procedures we have introduced, that is dampening of the swab in the test tube, this waiting time becomes reduced and the results can be read after 2 hours from sampling.

The article shows the outcome of the experiments conducted on different surfaces, including mould fungi, and the results of testing objects from the National Library of Poland's collections. The authors present their conclusions together with a discussion (also based on the available literature on the use of luminometric assays for microbial evaluation of historical objects), and they provide ready-to-use procedures.

1. Krótki opis metody

Kontrola mikrobiologiczna obiektów bibliotecznych jest stałym elementem ochrony zbiorów i prac konserwatorskich w Bibliotece Narodowej, zwłaszcza przy wpływie nowych materiałów, nie pochodzących bezpośrednio od wydawcy (darowizny, zakupy, spuścizny).

Badania kontaktowe wykonywane są metodą odcisku sterylnych arkuszy biuły Whatman na dwa podłoża (MEA oraz Czapek-Dox bez cukru) albo suchego wymazu z powierzchni 5×5 cm (po przygotowaniu odpowiednich roztworów są one wysiewane na podłoże MEA). Obie metody przedstawiono szczegółowo, wzbogacając opis ilustracjami kolejnych czynności, w publikacji B. F. Zerka *The Preservation and Protection of Library Collections. A Practical Guide to Microbiological Controls*¹.

Metody te umożliwiają identyfikację izolowanego czynnika mikrobiologicznego. Zazwyczaj grzyby pleśniowe identyfikowane są w Laboratorium Konserwatorskim Zbiorów Bibliotecznych BN (LKZB) co do rodzaju, natomiast w przypadku organizmów drożdżopodobnych i bakteryjnych odnotowywana jest jedynie ich obecność. Podejście takie uzasadnione jest wyższymi wymaganiami tych dwóch ostatnich grup odnośnie aktywności wody w podłożu niezbędnej do ich wzrostu. W praktyce oznacza to, że głównym zagrożeniem dla zbiorów są grzyby pleśniowe².

Wadą albo raczej „niedogodnością” obu metod jest konieczność pracy z szalkami z podłożem mikrobiologicznym, ze wszystkimi tego konsekwencjami (przygotowanie podłoża, hodowla, utylizacja). Dodatkowo, jeśli chodzi o same warunki pracy, to dochodzi „potencjalny kontakt z materiałem mikrobiologicznym”, co zwiększa wymagania wobec pracowników i samego miejsca

¹ B. Zerek, *The Preservation and Protection of Library Collections. A Practical Guide to Microbiological Controls*, Chandos Publishing, 2014, s. 291–324.

² Szczegółowe wyjaśnienie w pierwszym akapicie podrozdziału 2.1. *Pomiary „powierzchni referencyjnych” Procedurą Producenta (PPD-20)*.

pracy. Na koniec, na wyniki czekamy od około 10 do 14 dni, co wydłuża pobyt obiektów w LKZB³.

W procesach przemysłowych (spożywczych, farmaceutycznych, medycznych, kosmetycznych) do badania stanu higienicznego powierzchni produkcyjnych stosuje się luminometrię. Polega ona na wykrywaniu i ilościowym oznaczeniu adenozynotrifosforanu (ATP) występującego we wszystkich organizmach żywych. Na skutek reakcji enzymatycznej lucyferyny z lucyferazą, której przebieg jest uzależniony od obecności jonów Mg^{2+} oraz ATP jako kofaktora, powstaje oksylucyferyna. Emisja fotonów światła następuje w wyniku przejścia oksylucyferyny ze wzbudzonego stanu elektronowego do podstawowego. Ilość ATP jest wprost proporcjonalna do emitowanej ilości światła (wyrażanej w jednostkach porównawczych Relative Light Units [RLU])⁴. W praktyce oznacza to, że odczytywana wartość RLU jest wprost proporcjonalna do ilości potencjalnie aktywnych jednostek tworzących kolonie mikroorganizmów na badanej powierzchni. Na tej podstawie formułuje się wnioski dotyczące „czystości mikrobiologicznej”.

Próby pobierane są jednorazowymi suchymi wymazówkami z badanej powierzchni i odczytywane w luminimetrze (o niewielkich rozmiarach – $65 \times 175 \times 32$ mm, masa 235 g bez baterii)⁵.

Koszt luminometru to około 3000 PLN netto, koszt jednej wymazówki to około 10 PLN netto. Dla porównania, według aktualnego cennika BN koszt jednej próby odciskowej to 30 PLN netto, a wymazowej 50 PLN netto, przy czym wykonanie próby odciskowej oferowane jest jedynie w Laboratorium Konserwatorskim Zbiorów Bibliotecznych w siedzibie BN⁶.

³ B. Zerek, *The Preservation and Protection of Library Collections...*, wyd. cyt.

⁴ A. Rygała, D. Kręgiel, *Luminometria w przemyśle spożywczym*, <https://www.kierunekspozywczy.pl/magazyn,luminometria-w-przemysle-spozywczym.html> [dostęp: lipiec 2020].

⁵ Instrukcja obsługi luminometru Kikkoman PD-20 na stronie jednego z dostawców: https://hyserve.com/files/PD20_polish.pdf [dostęp: lipiec 2020].

⁶ <https://bn.org.pl/download/document/1456844756.pdf> [dostęp: wrzesień 2020].

Technologia umożliwiająca szybkie (kilkanaście sekund od pobrania próby) uzyskanie informacji o stanie higienicznym badanej powierzchni wydaje się niezwykle atrakcyjna, nasuwa się jednak pytanie, jaką naprawdę informację otrzymujemy (co zmierzylismy) i jak się to ma do rzeczywistego stanu mikrobiologicznego obiektu.

Luminometryczne testy ATP nie pozwalają na identyfikację czynnika mikrobiologicznego, a jedynie na stwierdzenie jego obecności i to pod warunkiem, że jest aktywny. Pomiar ATP były już stosowane w ochronie dziedzictwa, nie opracowano jednak sprawdzonej procedury, a doniesienia ich dotyczące są nieliczne. Dostępne są m.in. wyniki badań na konkretnych obiektach zabytkowych: tkaninach⁷, książkach⁸ i negatywach szklanych⁹ oraz wyniki eksperymentu z zastosowaniem metody niszczącej (wycinanie fragmentów papieru z książki)¹⁰ i poprzedzającego go eksperymentu z „pobieraniem szpatułką” materiału mikrobiologicznego konkretnych szczepów wyhodowanych na papierowych krążkach¹¹.

7 M. Ljaljević Grbić et al., *Implementation of ATP Bioluminescence Method in the Study of the Fungal Deterioration of Textile Artefacts*, <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-aa522723-c136-43b3-8c03-7419aeob41d9> [dostęp: wrzesień 2020].

8 J. Karbowska-Berent, J. Jarmilko, *Jakość mikrobiologiczna powietrza w magazynach i poziołach ATP na obiektach – nowe metody oceny warunków przechowywania zbiorów i stanu ich zachowania*, „Notes Konserwatorski” 2012, nr 15, s. 83–96, Warszawa, <https://ksiegarnia.bn.org.pl/pdf/Notes%20konserwatorski%2015.pdf> [dostęp: lipiec 2020].

9 M. Kwiatkowska et al., *Fungi as deterioration agents of historic glass plate negatives of Brandys family collection*, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516302530> [dostęp: wrzesień 2020].

10 M. S. Rakotonirainy, P. Dubar, *Application of bioluminescence ATP measurement for evaluation of fungal viability of foxing spots on old documents*, https://www.researchgate.net/publication/225305327_Application_of_bioluminescence_ATP_measurement_for_evaluation_of_fungal_viability_of_foxing_spots_on_old_documents [dostęp: wrzesień 2020].

11 M. S. Rakotonirainy et al., *Detection of fungi and control of disinfection by ATP-bioluminescence assay*, https://www.researchgate.net/publication/285888062_Detection_of_fungi_and_control_of_disinfection_by_ATP-bioluminescence_assay [dostęp: wrzesień 2020].

W pierwszym przypadku próby pobierano z powierzchni obiektów jedwabnych, jednak nie określono precyzyjnie powierzchni, z jakiej pobrano wymazy, ani nie podjęto prób jej ścisłego zdefiniowania. Badanie miało charakter towarzyszący procesowi konserwatorskiemu i nie było elementem polityki ochrony zbiorów.

Cenniejsze jest drugie z wymienionych opracowań, dotyczące badań książek z Wyższego Seminarium Duchownego w Pelplinie i z Biblioteki Elbląskiej. Próby wymazowe do testów ATP pobierano z powierzchni 3×3 cm, przy czym wykonywano również próby z tzw. tła, czyli miejsc niezdradzających oznak zniszczeń mikrobiologicznych. Nie podano jednak całkowitej liczby pobranych prób i statystyki wszystkich wyników, a jedynie „wyniki przykładowe”. Brak opisu szczegółowej procedury pozwala się jedynie domyślać, że po pobraniu wymazów odczyt wykonano według instrukcji obsługi bioluminometru Merck, bez precyzyjnego określenia modelu.

Zwraca uwagę fragment:

„Największe ilości ATP znajdowały się w próbkach jasnego nalotu na powierzchniach opraw licznych książek przechowywanych w obu magazynach Biblioteki WSD w Pelplinie. Ilości ATP były na nich tak duże, że niekiedy powstała w trakcie reakcji w bioluminometrze ilość światła była zbyt duża, aby aparat mógł ją odczytać. Odczyt wyniku liczbowego, który wynosił zazwyczaj kilkadziesiąt tysięcy RLU, był możliwy po kilku, a nawet kilkunastu minutach, kiedy intensywność powstającego światła powoli spadała”.

Zatem i w tym przypadku, mimo prezentacji wyników i sugestii w dyskusji („Z naszych obserwacji wynika, że poziom ATP na »zdrowym« i czystym papierze, nawet kilkusetletnim, nie przekracza 30–50 RLU”), nie zaproponowano procedury zastosowania bioluminometru do oceny stanu mikrobiologicznego książek.

Trzecia publikacja podaje przykład zastosowania testów luminometrycznych jako pomocniczej i „potwierdzonej eksperymentalnie” metody, jednak prezentowane wyniki prób luminometrycznych są raczej skąpe, a sam eksperyment nie został w niej opisany.

Oba przywoływane wyżej eksperymenty charakteryzowały się rozbudowaną częścią prac laboratoryjnych i również nie dostarczyły prostej procedury, którą można stosować w codziennej praktyce.

Testy luminometryczne były też stosowane do badań skuteczności dodatków fungistatycznych do papieru na bazie nanosrebra¹² przy zastosowaniu badania punktowego.

Najbliższa potrzebom Laboratorium metodyka została zastosowana przy badaniach ścian baraków byłego obozu koncentracyjnego Auschwitz II-Birkenau¹³: próby pobierano z wewnętrznych powierzchni budynków z powierzchni 25 cm² (trzykrotnie z każdego miejsca) i zawieszano pobrany materiał w 0,85% roztworze NaCl, a następnie badano luminometrycznie przy użyciu systemu HyLite firmy Merck. Nie zaprezentowano jednak szczegółowo uzyskanych wartości, ograniczając się do wykresu (s. 806) przedstawiającego „poziomy ATP” na badanych powierzchniach (od wartości bliskich zeru do niemal 60 000) oraz informacji, że poziomy uznane za wysokie (powyżej 10 000 RLU) odnotowywano na ścianach przy podłodze oraz na wysokości między 100 a 250 cm nad podłogą.

Zarysowuje się zatem tendencja do stosowania pomocniczo metod luminometrycznych w projektach badawczych na obiektach zabytkowych oraz wykonywania złożonych eksperymentów laboratoryjnych dotyczących całkowicie lub częściowo luminometrii. Pomijany jest natomiast wariant zastosowania testów ATP/AMP w postaci maksymalnie uproszczonej procedury do szybkiego określania stanu mikrobiologicznego obiektów o charakterze zabytkowym przy ciągłej pracy na rzecz ochrony zbiorów. Idealem byłaby możliwość wykonania pomiarów/badań kontrolnych podczas przeglądów zbiorów w pomieszczeniach

¹² R. J. Jedrzejczyk et al., *Antimicrobial Properties of Silver Cations Substituted to Faujasite Mineral*, https://www.researchgate.net/publication/319306945_Antimicrobial_Properties_of_Silver_Cations_Substituted_to_Faujasite_Mineral [dostęp: wrzesień 2020].

¹³ K. Rajkowska et al., *Assessment of biological colonization of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp*, <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-013-0716-8> [dostęp: wrzesień 2020].

komórki merytorycznej (przechowującej zbiory) lub pobranie prób podczas przeglądów i odczytanie ich tego samego dnia w laboratorium.

Prezentacja urządzenia Kikkoman PD-20 przez dystrybutora została w LKZB oceniona pozytywnie, jako dająca perspektywy zaadaptowania go do działań w BN.

2. Opracowanie własnych procedur zastosowania testów luminometrycznych

Po zakupie urządzenia Kikkoman PD-20 w wariancie luminometrii z równoległym pomiarem ATP i jego produktu rozpadu AMP (adenozyno monofosforanu) w LKZB wykonano szereg pomiarów i testów mających na celu określenie możliwości zaadaptowania luminometrii do procesu oceny stanu zachowania obiektów pod kątem mikrobiologicznym.

2.1. Pomiary „powierzchni referencyjnych” Procedurą Producenta (PPD-20)

Istotne jest, że w praktyce konserwatorskiej oprócz obiektów bezpośrednio po zalaniu spotykamy na suchych obiektach wyłącznie suche pozostałości kolonii grzybów bądź działalności mikrobiologicznej. Wiąże się to z wymaganiami środowiskowymi grzybów pleśniowych, konkretnie z aktywnością wody¹⁴ w podłożu,

¹⁴ „Aktywność wody (a_w) w żywności jest definiowana jako stosunek ciśnienia pary wodnej nad żywnością do ciśnienia pary wodnej nad czystą wodą w tej samej temperaturze. Wartość tę przyjęto w celu dokładniejszego określenia zapotrzebowania drobnoustrojów na wodę. Czysta chemicznie woda ma aktywność $a_w = 1$. Ze wzrostem stężenia związków rozpuszczalnych aktywność wody spada poniżej wartości 1. Większość drobnoustrojów może rosnąć w środowiskach, których aktywność wody wynosi powyżej 0,95, jakkolwiek wzrost niektórych z nich można stwierdzić w środowiskach o aktywności wody wynoszącej 0,6”, za: *Słownik Bezpieczeństwa Zdrowotnego*: https://cbr.gov.pl/slownik_bezp_zywn/index.php/Aktywno%C5%9B%C4%87_wody [dostęp: wrzesień 2020]. Te same zasady, co do żywności, stosuje się w stosunku do innych materiałów higroskopijnych (papier, drewno, skóra), które mogą zostać rozłożone mikrobiologicznie. Aktywność powiązana jest z wilgotnością względną stanu równowagi (powietrza z materiałem higroskopijnym), czyli ERH; zależność jest następująca: $a_w = ERH/100$, <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspectiontechnical-guides/water-activity-aw-foods> [dostęp: wrzesień 2020].

która musi wynosić co najmniej 0,65, aby wzrost grzybów był możliwy¹⁵. Można zatem przyjąć, że kolonia pleśni na wyschniętym podłożu odpowiada kolonii na suchym obiekcie zabytkowym pod względem obecności suchych jednostek tworzących kolonię (jtk).

Ważny jest tu termin „suchy”. Testy ATP (ATP/AMP) zostały zaprojektowane do badań poziomu higieny w procesach przemysłowych i są domyślnie przeznaczone do wykrywania aktywnej flory bakteryjnej, która ze względu na wymogi środowiskowe (aktywność wody w podłożu powyżej 0,9) nie jest postrzegana jako zagrożenie dla suchych obiektów dziedzictwa narodowego. Testy te nie są przeznaczone dla badań poziomu skażenia przez suche jednostki tworzące kolonie grzybów pleśniowych, co wykazał prosty eksperyment.

Założono, że przy dużej ilości jednostek tworzących kolonie kolejne pomiary nie będą powtarzalne ze względu na osypywanie się materiału biologicznego z wymazówki przy próbach z powierzchni 5×5 cm. Dodatkowo niewiele grzybów nawet przy hodowli monokultur tworzy kolonie o średnicy umożliwiającej pobranie materiału z 25 cm². Natomiast przy badaniu obiektów zabytkowych pobieranie prób wymazowych z obszaru 5×5 cm jest przyjętą praktyką¹⁶. Aby wyniki z obiektów były porównywalne z wynikami z kolonii grzybów pleśniowych, przyjęto zasadę punktowych badań na obiektach, zwłaszcza że często występują w nich zniszczenia w postaci śladów aktywności wody albo aktywności mikrobiologicznej o powierzchni mniejszej niż 25 cm² (fot. 1).

Metodyka Procedury Producenta (PPD-20)

Przedmiotem badań w celu określenia poziomów odniesienia były książki z księgozbioru podręcznego w Laboratorium, powierzchnia zakurzonego pudła oraz dwa obiekty książkowe z Zakładu Zbiorów Ikonograficznych.

¹⁵ K. Sedlbauer, *Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components*, Fraunhofer Institute for Building Physics, https://www.ibp.fraunhofer.de/content/dam/ibp/en/documents/ks_dissertation_etcm1021-30729.pdf [dostęp: lipiec 2020].

¹⁶ B. Zerek, *The Preservation and Protection of Library Collections...*, wyd. cyt.

Procedurę przeprowadzano w następujący sposób:

1. Wyjęcie próbki z wymazówką luminometryczną z lodówki.
 2. Odstawienie próbki z wymazówką luminometryczną na 20 minut w temperaturze pokojowej w celu ogrzania enzymów.
 3. Pobranie próby wymazówką przez dotyk prostopadle do testowanego obszaru.
 4. Umieszczenie wymazówki w oryginalnej próbce, dociśnięcie jej do oporu ostatniego ogranicznika i wytrząsanie.
 5. Umieszczenie próbki z wymazówką w luminometrze i odczyt wyniku.
- Próby pobierano z miejsc bez śladów aktywności wody ani działalności mikrobiologicznej. Dodatkowo pobrano 3 próby z widocznych okiem nieuzbrojonym kolonii grzybów pleśniowych. Wyniki prezentuje tabela 1.

Wyniki dla Procedury Producenta (PPD-20) i dyskusja

Tab. 1. Wyniki badań punktowych Procedurą Producenta (PPD-20)

Lp.	Opis obiektu	Wartość RLU
1.	O. Fassatiowa, <i>Mikrobiologia techniczna*</i>	915
2.	K. H. Domsch, W. Gams, T-H. Anderson, <i>Compendium of soil Fungi</i>	87
3.	B. Zyska, <i>Mikrobiologiczna korozja materiałów</i>	2
4.	A. 3775 (płótno oprawy)	657
5.	A. 3775 (i kolejne – karta bloku)	6
6.	A. 3775	17
7.	A. 3775	5
8.	A. 3775	0
9.	A. 673 (okładka tylna, pergamin)	561
10.	A. 673 (i kolejne – karta bloku)	585
11.	A. 673	668
12.	A. 673	183
13.	A. 673	31
14.	Aktywna kolonia <i>Cladosporium</i> sp. na podłożu MEA	15 782
15.	Stara kolonia <i>Penicillium</i> sp. na bibule Whatman	408 063
16.	Stara kolonia <i>Aspergillus</i> sp. na bibule Whatman	49

* Obiekt po odkwaszeniu w systemie Bookkeeper, co powoduje efekt lekkiego zapylenia powierzchni.

Wykonywane tą procedurą badania punktowe na „powierzchniach referencyjnych”, głównie książek z księgozbioru podręcznego LKZB, bez historii zawilgocenia bądź zalania, dawały wyniki poniżej 800 RLU. Badania punktowe żywych kolonii grzybów z rodzajów *Penicillium* i *Cladosporium* na wilgotnym podłożu dawały wyniki rzędu (odpowiednio) 15 000 RLU i 400 000 RLU.

O ile zrozumiałe były wyniki dla obiektów z księgozbioru podręcznego i obu obiektów z Zakładu Zbiorów Ikonograficznych oraz kolonii grzybów z rodzajów *Cladosporium* i *Penicillium*, to co najmniej zastanawiający był wynik dla kolonii grzyba z rodzaju *Aspergillus*. W takiej sytuacji po dyskusji postanowiono sprawdzić najbardziej prawdopodobną przyczynę tak niskiego wyniku – całkowite wysuszenie kolonii.

2.2. Procedura Piechala (PP)

W celu aktywowania suchego materiału biologicznego wprowadzono proces nawilżania przez przeniesienie wymazówki po pobraniu próby do probówki ze sterylną wodą destylowaną. Po czasie nawilżania 2 i 6 godzin wykonano odczyty luminometryczne. Na podstawie wyników eksperymentu metodą podaną przez producenta i jej wariantem z nawilżaniem przyjęto pierwszą tzw. Procedurę Piechala (od nazwiska pracownika LKZB Jakuba Piechala, który przedstawił propozycję wykonania, a następnie przeprowadził część eksperymentalną).

Metodyka Procedury Piechala (PP)

1. Pobranie próby punktowo od góry prostopadle do podłoża (fot. 1).
2. Przeniesienie wymazówki do sterylnej probówki zawierającej 100 µl sterylnej wody destylowanej w celu nawilżenia pobranego materiału.
3. Odstawienie pierwotnej plastikowej probówki luminotestu na 1 godzinę i 40 minut do lodówki.
4. Wyjęcie pierwotnej plastikowej probówki luminotestu i pozostawienie w temperaturze pokojowej przez 20 minut (odpowiada to wskazanemu przez instrukcję czasowi ogrzania luminotestu do temperatury pokojowej).

5. Przeniesienie wymazówki do pierwotnej plastikowej próbówki lumino-
testu i wykonanie odczytu według instrukcji.

Wyniki dla Procedury Piechala (PP) i dyskusja

Przy procedurze producenta, podczas badania wyschniętej kolonii grzyba z ro-
dzaju *Aspergillus* (z przyporządkowaniem do grupy *Aspergillus niger*) z trzech
powtórzeń otrzymano średnią wartość 55,3 RLU (tab. 2). Potwierdziło się przy-
puszczenie, że ma to związek z zawartością wody w materiale biologicznym,
który był badany, i jego aktywnością biologiczną w momencie badania, która
została oceniona jako znikoma, ponieważ badano suche zarodniki.

Po zastosowaniu Procedury Piechala w wersji standardowej uzyskano wy-
niki (średnia z 3 pomiarów) 7522,5 RLU po 2 godzinach nawilżania i 119 083 RLU
po 6 godzinach nawilżania (tab. 2). Czas 6 godzin nawilżania uzyskano przez
wydłużenie czasu punktu 3 procedury do 5 godzin i 40 minut. Celem było sprawd-
zenie, jakie wyniki zostaną uzyskane przy maksymalnie długim nawilżaniu
możliwym podczas dnia roboczego.

Tab. 2. Pierwsze testy (średnia z trzech powtórzeń) na kolonii grzyba z rodzaju *Aspergillus*.
Wyniki w RLU

Czas nawilżania	0 h	2 h	6 h
RLU	55,33	7522,5	119 083

Wykonane w 2014 roku badania punktowe pasteli Procedurą Piechala w Ka-
tedrze Konserwacji i Restauracji Starych Druków i Grafiki WKiRDS ASP w War-
szawie dały wyniki poniżej 500 RLU w partiach bez widocznych śladów infekcji
i około 11 000 RLU dla widocznej na obiekcie kolonii grzyba.

Wykonano również badanie dłoni autora (BFZ) artykułu. Punktowe bada-
nie wnętrza dłoni dało wynik 3241 RLU, natomiast prawidłowe badania pod ką-
tem higieny przemysłowej (wnętrze dłoni, powierzchnia co najmniej 5×5 cm,
wierzch dłoni (jw.) oraz „powierzchnia równikowa” – brzegi dłoni wzdłuż jej
długości i wszystkich palców) dało wynik rzędu 56 000 RLU.

W latach 2014–2019 punktowe testy ATP/AMP według Procedury Piechala stały się elementem „szybkiej kontroli mikrobiologicznej” w LKZB, ze sztywnym zastrzeżeniem, że są stosowane wyłącznie do sprawdzenia „miejsc podejrzanych” na obiektach, w celu podjęcia decyzji, czy warto je badać metodą odciskową wymagająca hodowli.

W miarę wykonywania testów (łącznie 1300 do października 2019 roku) przyjęto założenie, że wynik poniżej 1000 RLU dla pomiaru punktowego według Procedury Piechala oznacza „obiekt stabilny mikrobiologicznie bez wskazań do (hodowlanych) badań mikrobiologicznych lub dezynfekcji”.

Tab. 3. Wyniki badań punktowych Procedurą Piechala kart rękopisów ze zbiorów BN z maja 2018

Lp.	Opis obiektu	Wartość RLU
1.	BOZ 908	103
2.	BOZ 908	459
3.	BOZ 839	581
4.	BOZ 839	299
5.	BOZ 1111	848
6.	BOZ 1111	259
7.	BOZ 1111	86
8.	BOZ 1111	543
9.	BOZ 12155	209
10.	BOZ 12155	314
11.	BOZ 12155	365
12.	III 12630	167
13.	III 12630	155
14.	III 12630	379
15.	BOZ 58	89
16.	BOZ 58	155
17.	BOZ 58	99
18.	Akc. 13320	221
19.	Akc. 13320	191
20.	Akc. 13320	113

W praktyce dla miejsc „bez widocznych śladów działalności mikrobiologicznej” rzadko przekraczana jest wartość 500 RLU. Tabela 3 prezentuje wybrane wyniki pomiarów wykonywanych Procedurą Piechala na obiektach BN. Próby pobierano z miejsc, w przypadku których podejrzewano, że oddziaływała na nie woda lub mikroorganizmy; wszystkie obiekty uznano za „stabilne mikrobiologicznie, brak wskazań do dalszych badań lub dezynfekcji, zwrot obiektów” według klasyfikacji stosowanej w Laboratorium BN¹⁷.

2.3. Procedura Piechala–Zerka (PPZ)

Szybka (w porównaniu do metod hodowlanych wymagających co najmniej 10 dni inkubacji) Procedura Piechala posiada znaczące utrudnienie, wymaga mianowicie użycia sterylnych probówek (zamykanych korkami z aluminium albo plastiku), odpipetowania 100 µl sterylnej wody destylowanej oraz zabezpieczenia sterylnymi korkami gumowymi oryginalnej probówki luminotestu na czas, kiedy wymazówka znajduje się w szklanej probówce. Dodatkowo niezbędne jest opisanie wymazówek (na niewielkiej powierzchni zakończenia wymazówki) oraz probówek.

Jesienią 2019 roku w LKZB BN zaproponowano i przetestowano tzw. Procedurę Piechala–Zerka, polegającą na użyciu surfaktantu z przedziału za pierwszą membraną oryginalnej wymazówki luminotestu do nawilżenia materiału obecnego na wymazówce po pobraniu próby z obiektu.

Metodyka Procedury Piechala–Zerka (PPZ)

1. Pobranie próby punktowo od góry prostopadle do podłoża.
2. Przeniesienie wymazówki do oryginalnej probówki luminotestu.
3. Przebicie wymazówką pierwszej przegrody i dotknięcie końcem wymazówki lustra cieczy (surfaktantu) i natychmiastowe cofnięcie wymazówki, tak aby zwilżyć wymazówkę, jednak bez wchłonięcia całej cieczy (co uniemożliwiłoby późniejszy odczyt). W praktyce pierwotny poziom około 4–5 mm

¹⁷ B. F. Zerek, *The Preservation and Protection of Library Collections...*, wyd. cyt., s. 180–181.

cieczy powinien po zwilżeniu wymazówki obniżyć się o około 1 mm, natomiast samą wymazówkę należy cofnąć do poziomu pierwszej przegrody (powinna przechodzić około połowy watomanej końcówki wymazówki). Koniec wymazówki powinien znajdować się 3–4 mm nad lustrem cieczy (surfaktantu) (fot. 2, 3 i 4).

4. Ustabilizowanie próbówki z wymazówką w pozycji maksymalnie zbliżonej do pionu (polecamy stojak do próbek) i umieszczenie w lodówce na czas 1 godziny 40 minut.

5. Po tym czasie próbówkę z wymazówką należy wyjąć z lodówki i ogrzać w temperaturze pokojowej przez około 20 minut.

6. Powrót do oryginalnej procedury według instrukcji obsługi: przebicie wymazówką drugiej przegrody (wymazówka wprowadzona w próbówkę do końca), wytrząsanie, pomiar.

Wyniki dla Procedury Piechala–Zerka (PPZ) i dyskusja

Tabele 4 i 5 poniżej prezentują zestawienie wyników wykonanych równoległe testów według instrukcji obsługi (PPD-20), Procedurą Piechala (PP) i Procedurą Piechala–Zerka (PPZ).

Tab. 4. Test na starej kolonii *Aspergillus* sp. (z grupy *Aspergillus niger*) na wyschniętym podłożu – szalka około 3 lat. Test punktowy od góry. Wyniki w RLU

Numer powtórzenia	Według instrukcji PD-20	Procedura Piechala	Procedura Piechala–Zerka
1	46	52	183
2	40	76	297
3	22	116	296
4	13	95	217
5	38	129	160
Średnia	31,8	93,6	230,6
Odchylenie standardowe	13,75	30,81	63,48

Tab. 5. Test na świeżej kolonii *Cladosporium* sp. na wilgotnym podłożu MEA (10 dni).
Test punktowy od góry. Wyniki w RLU

Numer powtórzeń	Według instrukcji PD-20	Procedura Piechala	Procedura Piechala-Zerka
1	92 594	66 749	71 077
2	87 040	33 834	81 340
3	89 491	40 768	61 092
4	115 341	27 884	105 772
5	94 333	16 081	68 042
Średnia	96 300	37 063	77 455
Odchylenie standardowe	11 301	18 907	17 421

Na podstawie wyników, zwłaszcza w przypadku badań starych i suchych kolonii grzybów pleśniowych, można przyjąć, że Procedura Piechala-Zerka jest co najmniej równie wiarygodna jak Procedura Piechala, jednak znacznie prostsza w stosowaniu (nie wymaga dodatkowej probówki, pipetowania i sterylnej wody destylowanej).

Dysponując wynikami punktowych pomiarów kolonii grzybów pleśniowych wykonaliśmy praktyczne testy na rzeczywistych powierzchniach: punktowo i suchy wymaz z powierzchni 5×5 cm PPZ (Procedura Piechala-Zerka):

- „czysty papier” – strona książki z księgozbioru podręcznego bez historii zalań, zawilgoceń itp. (tab. 6)
- zakurzona bibuła Whatman, „ekspozycja” na szafie w pomieszczeniu biurowym przez około 6 miesięcy (tab. 7)
- zakurzony wierzch szafy w pomieszczeniu biurowym (tab. 8).

Tab. 6. Papier bez śladów skażenia ani aktywności wody, „fizycznie czysty”, książka z księgozbioru podręcznego. Wyniki w RLU, Procedura Piechala-Zerka

Numer pomiaru	Punktowo	Powierzchnia 5×5 cm
1	10	23
2	14	15
3	7	13
4	8	10
5	8	18
Średnia	9,4	15,8
Odchylenie standardowe	2,79	4,97

Iloraz (punktowo/5×5): 1,68

Tab. 7. Bibuła Whatman zakurzona (arkusz pozostawiony na szafie). Wyniki w RLU, Procedura Piechala-Zerka

Numer pomiaru	Punktowo	Powierzchnia 5×5 cm
1	1038	22 256
2	850	19 885
3	1526	19 758
4	1315	23 003
5	2269	24 904
Średnia	1399,6	18 009,6
Odchylenie standardowe	550	2179

Iloraz (punktowo/5×5): 12,87

Tab. 8. Zakurzona stalowa szafa (górną powierzchnia, gładka, pomalowana). Wyniki w RLU, Procedura Piechala-Zerka

Numer pomiaru	Punktowo	Powierzchnia 5×5 cm
1	2121	10 529
2	2733	16 423
3	3259	17 923
4	3299	11 882
5	4587	14 692
Średnia	3199,8	14 289,8
Odchylenie standardowe	911	3079

Iloraz (punktowo/5×5): 4,46

Najistotniejsze dla kontroli mikrobiologicznej zbiorów są wartości dla zakurzonej bibuły Whatman oraz stosunek wartości z prostopadłego pomiaru punktowego do wartości dla wymazu z powierzchni 5×5 cm.

Ma to znaczenie, gdyż nie z każdego obiektu można pobrać wymaz 5×5 cm. Do takich obiektów należą: pastele, obiekty z uszkodzoną warstwą przedstawiennią (zdelaminowana i odpadająca emulsja fotograficzna), obiekty silnie zabrudzone mechanicznie (pobranym materiałem będzie się osypywał).

W celu oszacowania wielkości powierzchni badanej punktowo przez odcisk prostopadły, wymazówkę 20 razy zwilżano punktowo tuszem z wkładu pieczątki biurowej i odciskano na papierze milimetrowym. W 14 z 20 odcisków średnica obszaru zabarwionego wyniosła 4 mm, średnia z 20 odcisków wyniosła 3,97 mm. Daje to powierzchnię badaną około $12,6 \text{ mm}^2$. Przez podzielenie powierzchni wymazu 5×5 cm (2500 mm^2) przez powierzchnię badania punktowego ($12,6 \text{ mm}^2$) uzyskano wielokrotność około 200 (198,9).

Wynika z tego, że czysto arytmetycznie przy progu 1000 RLU dla badania punktowego, próg dla wymazu 5×5 cm powinien wynosić 200 razy więcej, a więc 200 000 RLU. Jednak wielokrotność (wartość średnia z powierzchni 5×5 cm przez wartość średnią dla pomiaru punktowego) dla badania zakurzonej bibuły Whatman wyniosła około 12,9.

Na podstawie tych wyników przyjęto następujące progi wartości wskazujące na konieczność badań hodowlanych miejsc na obiekcie ze śladami aktywności mikrobiologicznej, aktywności wody bądź zanieczyszczeń fizycznych:

- dla prostopadłych pomiarów punktowych Procedurą Piechala-Zerka: 1000 RLU
- dla wymazów z powierzchni 5×5 cm Procedurą Piechala-Zerka: 12 000 RLU.

2.4. *Procedura Piechala-Zerka wariant Dydy (PPZwD), tzw. „Szybki wariant Magdaleny Dydy”*
LKZB BN współpracuje z firmą RDLS Sp. z o.o., powstałą w 2014 roku przy Uniwersytecie Warszawskim (UW) jako inicjatywa naukowców Wydziału Biologii UW. Biolog Magdalena Dyda, realizująca w RDLS liczne projekty z zakresu kontroli mikrobiologicznej i warunków przechowywania zbiorów w instytucjach

kultury, zasugerowała, że być może nie jest konieczny czas nawilżania wynoszący łącznie 2 godziny, a wystarczy jedynie 20 minut w temperaturze pokojowej, które i tak jest wymagane przez instrukcję obsługi.

Metodyka Procedury Piechala–Zerka wariantem Dydy (PPZWD)

1. Pobranie próby punktowo od góry prostopadle do podłoża.
2. Przeniesienie wymazówki do oryginalnej probówki luminotestu.
3. Przebicie wymazówką pierwszej przegrody i dotknięcie końcem wymazówki lustra cieczy (surfaktantu) i natychmiastowe cofnięcie wymazówki, tak aby zwilżyć wymazówkę, jednak bez wchłonięcia całej cieczy (co uniemożliwiłoby późniejszy odczyt). W praktyce pierwotny poziom około 4–5 mm cieczy powinien po zwilżeniu wymazówki obniżyć się o około 1 mm, natomiast samą wymazówkę należy cofnąć do poziomu pierwszej przegrody (powinna przechodzić około połowy watomanej końcówki wymazówki). Koniec wymazówki powinien znajdować się 3–4 mm nad lustrem cieczy (surfaktantu) (fot. 2, 3 i 4).
4. Ustabilizowanie probówki z wymazówką w pozycji maksymalnie zbliżonej do pionu (polecamy stojak do probówek) i umieszczenie w temperaturze pokojowej na około 20 minut (*w podstawowej PPZ: w lodówce na czas 1 godziny 40 minut*).
5. Powrót do oryginalnej procedury według instrukcji obsługi: przebicie wymazówką drugiej przegrody (wymazówka wprowadzona w probówkę do końca), wytrząsanie, pomiar (*w podstawowej PPZ przed tym punktem był jeszcze punkt: probówkę z wymazówką należy wyjąć z lodówki i ogrzać w temperaturze pokojowej przez około 20 minut*).

Wyniki dla Procedury Piechala–Zerka wariant Dydy (PPZWD) i dyskusja

LKZB wykonało już podobne badania przy badaniu progów odczytów w przypadku Procedury Piechala–Zerka dla pomiarów punktowych i powierzchni 5×5 cm. Badano punktowo kolonię grzyba z rodzaju *Cladosporium* Procedurą Piechala–Zerka. Wykonano 5 prób i odczytano je po 40, 60, 80, 100 i 120 minutach. Wyniki prezentuje tabela 9.

Tab. 9. Sprawdzenie wpływu ciepła na enzym (inkubacja w temperaturze pokojowej).
Wyniki w RLU, Procedura Piechala–Zerka

Numer pomiaru	Kolejne wymazówki	Czas w T pokojowej [minuty]
1	57 223	40
2	44 320	60
3	46 573	80
4	35 669	100
5	49 224	120

Wyniki te (niewystępowanie znaczących różnic wartości) mogłyby sugerować brak potrzeby inkubacji w lodówce (kolejne ułatwienie procedury, do zastosowania np. przy badaniach poza siedzibą z laboratorium).

3. Porównanie wypracowanych procedur stosowania testów luminometrycznych

Biorąc pod uwagę własne doświadczenia i sugestie Magdaleny Dydy (RDLS) wykonano eksperyment polegający na równoległym badaniu tych samych obiektów Procedurą Piechala–Zerka i Procedurą Piechala–Zerka wariantem Dydy oraz Procedurą Producenta:

Metodyka:

- badano punktowo stare kolonie grzybów z rodzajów *Aspergillus* i *Cladosporium* (jw.), pobierając próby bezpośrednio po wyjęciu testów z lodówki, a następnie modyfikując Procedurę Piechala–Zerka przez pozostawienie próbek z wymazówkami przez 20 minut w temperaturze pokojowej do odczytu (Procedura Piechala–Zerka wariant Dydy),
- badano punktowo stare kolonie grzybów z rodzajów *Aspergillus* i *Cladosporium* (jw.) zwykłą Procedurą Piechala–Zerka (1 h 40' w lodówce, 20' w temperaturze pokojowej przed odczytem),

- badano wymazem 5×5 cm miejscowe zalanie w starym druku XVII.4.9481 t. XV z Zakładu Starych Druków BN (karta „ajj” recto, [22 cm, 2 cm] licząc od lewego dolnego wierzchołka karty) Procedurą Piechala–Zerka wariantem Dydy (fot. 5),
 - badano wymazem 5×5 cm miejscowe zalanie w starym druku XVII.4.9481 t. XV z Zakładu Starych Druków BN (karta „ajj” recto, [22 cm, 2 cm] licząc od lewego dolnego wierzchołka karty) zwykłą Procedurą Piechala–Zerka,
 - badano wymazem 5×5 cm miejscowe zalanie w starym druku XVII.4.9481 t. XV z Zakładu Starych Druków BN (karta „ajj” recto, [22 cm, 2 cm] licząc od lewego dolnego wierzchołka karty) według instrukcji obsługi,
 - badano punktowo stare kolonie grzybów z rodzajów *Aspergillus* i *Cladosporium* (jw.) według instrukcji obsługi (bez etapu nawilżania) dla weryfikacji zasadności etapu nawilżania.

Wyniki i dyskusja

Uzyskano następujące wyniki:

Tab. 10. Stara kolonia *Aspergillus* – pomiar punktowy, według PPD-20, PPZ, PPZwD.
Wyniki w RLU

Numer powtórzenia	Według instrukcji PD-20	Piechal–Zerek	Piechal–Zerek wariant Dydy
1	115	910	565
2	76	680	635
3	62	692	812
4	156	586	527
5	127	446	603
Średnia	107,2	662,8	628,4
Odchylenie standardowe	38,25	169,67	110,34

Tab. 11. Stara kolonia *Cladosporium* – pomiar punktowy, według PPD-20, PPZ, PPZwD.
Wyniki w RLU

Numer powtórzenia	Według instrukcji PD-20	Piechal-Zerek	Piechal-Zerek wariant Dydy
1	345	3259	8706
2	592	14 512	9206
3	1259	9050	8835
4	313	10 583	5075
5	226	6442	10 304
Średnia	547	8769,2	8425,2
Odchylenie standardowe	421	4246	1975

Tab. 12. SD XVII.49481 XV – wymaz 5×5 cm, według PPD-20, PPZ, PPZwD. Wyniki w RLU

Numer powtórzenia	Według instrukcji PD-20	Piechal-Zerek	Piechal-Zerek wariant Dydy
1	391	615	330
2	11	660	259
3	224	589	278
4	389	1316	412
5	273	848	270
Średnia	257,6	805,6	309,8
Odchylenie standardowe	155,92	302,8	63,30

Średnie wartości z pięciu pomiarów w serii dla starych kolonii grzybów z rodzajów *Aspergillus* i *Cladosporium* były dla obu wariantów Procedury Piechala-Zerka (z nawilżaniem przez 2 godziny oraz przez 20 minut w wariacie Dydy) zbliżone i wyraźnie wyższe od wyników uzyskanych według instrukcji obsługi.

Średnie wartości z pięciu pomiarów w serii dla wymazu 5×5 cm z miejscowego zalania w starym druku XVII.4.9481 t. XV z Zakładu Starych Druków BN (karta składki „aij” *recto*, [22 cm, 2 cm] licząc od lewego dolnego wierzchołka

karty) były w standardowej Procedurze Piechala–Zerka niemal trzykrotnie wyższe w porównaniu z wariantem Dydy. Z kolei wyniki wariantu Dydy były zbliżone do tych uzyskanych przy odczycie według instrukcji obsługi (bez nawilżania), jednak warto zwrócić uwagę, że najniższa wartość przy procedurze bez nawilżania (11) była o rząd wielkości niższa od najniższej wartości uzyskanej wariantem Dydy (259). Może mieć to znaczenie, gdy z podejrzanych miejsc na obiekcie pobierana jest tylko jedna próba, a nie jak w przypadku opisywanych badań laboratoryjnych 5 powtórzeń.

Stosowanie testów luminometrycznych ATP/AMP i urządzenia Kikkoman PD-20 (obecnie dostępna jest jego nowa wersja PD-30) można uznać za przydatne narzędzie do wstępnej oceny stanu zachowania obiektów pod kątem mikrobiologicznym. Należy je stosować jako element podejmowania decyzji w sytuacji, gdy podczas oceny stanu zachowania obiektu stwierdzamy widoczne okiem nieuzbrojonym ślady aktywności mikrobiologicznej albo ślady aktywności wody. Wykonanie testu luminometrycznego daje w takim przypadku odpowiedź, czy należy z podejrzanego miejsca pobrać próby kontaktowe (wymazowe lub odciskowe). Zasadniczo przy wartościach przekraczających założone progi (1000 RLU dla pomiaru punktowego i 12 000 RLU dla pomiaru wymazu 5×5 cm) należy pobierać kontaktowe próby hodowlane w celu określenia czynnika mikrobiologicznego potencjalnie zagrażającego obiektowi. Jego identyfikacja, choćby do rodzaju, będzie miała kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa obiektu, konserwatora i użytkowników obiektu.

Wprowadzenie etapu nawilżania wymazówki między pobraniem próby a odczytem okazało się skutecznym rozwiązaniem, zaś wariant skrócenia tego etapu z 2 godzin do 20 minut w określonych sytuacjach można uznać za dopuszczalny. Badania pokazują, że przy oczekiwanych dużych wartościach RLU (próby z kolonii grzybów pleśniowych) wyniki są niemal identyczne, natomiast przy powierzchniach bez zanieczyszczeń fizycznych, takich jak brud, pył, kurz, dwugodzinny czas nawilżania daje wyniki dwukrotnie większe niż wariant z nawilżaniem przez 20 minut, którego wyniki są zbliżone do tych bez nawilżania w ogóle.

4. Proponowana procedura oceny stanu zachowania obiektów pod kątem mikrobiologicznym z zastosowaniem testów luminometrycznych (ATP/AMP)

Na podstawie wniosków z przeprowadzonych eksperymentów proponujemy następującą procedurę:

1. Wizualna ocena stanu zachowania.
2. Jeżeli na obiekcie występują widoczne okiem nieuzbrojonym ślady działalności mikrobiologicznej lub aktywności wody – wykonanie testów luminometrycznych Procedurą Piechala-Zerka:
 - a) przy silnym zanieczyszczeniu fizycznym – testy punktowe, dopuszczalny wariant o skróconym do 20 minut nawilżaniu (choć zalecane są 2 godziny).
 - b) przy braku zanieczyszczeń fizycznych – testy wymazowe z powierzchni 5×5 cm i nawilżanie przez 2 godziny.
3. Wartości powyżej 1000 RLU dla badań punktowych i powyżej 12 000 RLU dla wymazów z powierzchni 5×5 cm oznaczają obecność na obiekcie jednostek tworzących kolonie w ilości, która może być niebezpieczna dla obiektu (jeśli jego wilgotność wzrośnie powyżej aktywności wody $a_w = 0,65$) i użytkowników.
4. Przekroczenie powyższych progów jest wskazaniem do pobrania z miejsc podejrzanych kontaktowych prób hodowlanych w celu identyfikacji czynnika mikrobiologicznego.
5. Jeżeli w wyniku badań hodowlanych zostanie podjęta decyzja o dezynfekcji obiektów, dopuszczalne jest potwierdzenie jej skuteczności testami luminometrycznymi, jednak zalecane jest potwierdzenie jej skuteczności również metodami hodowlanymi.
6. Wariant z dezynfekcją i bez prób hodowlanych o przebiegu: testy luminometryczne – dezynfekcja – testy luminometryczne należy stosować wyłącznie w ostateczności.

5. Podsumowanie

Już pierwsza Procedura Piechala (przykładowe wyniki w tab. 3) znacznie przyspieszyła prace LKZB w zakresie kontroli mikrobiologicznej obiektów Biblioteki Narodowej, a także do niej wpływających. Procedura Piechala-Zerka otworzyła możliwość wykonania doraźnych badań obiektów w komórkach merytorycznych w Pałacu Rzeczypospolitej oddalonym o około 5 km od LKZB znajdującego się w gmachu głównym BN, bez konieczności transportu obiektów, szalek do prób kontaktowych, czy stosowania suchej wymazówki i posiewów (w LKZB oznacza to sześć szalek z podłożem MEA dla jednej próby).

Ciekawym wariantem jest opcja przewozu wymazówek luminometrycznych w pojemniku izotermicznym, pobrania prób i umieszczenia wymazówek z powrotem w probówce w pozycji pierwotnej, to znaczy bez przebijania pierwszej przegrody. Pomiar następuje po powrocie do laboratorium. Procedura ta w trybie pilnym została już raz zastosowana w 2019 roku.

Autorzy są świadomi, że prezentowane wyniki wykonanych eksperymentów są jedynie podstawą do dalszych rozbudowanych badań, które jednak wymagają ujęcia ich w formę projektu realizowanego wspólnie z innymi instytucjami i placówkami. Prace wykonano równolegle do bieżącej działalności LKZB, projektując liczbę badanych powierzchni, powtórzeń i wariantów procedur tak, aby nie zakłóciły systematycznej pracy. Już na poziomie liczby powtórzeń pomiarów (5) uzyskano (zwłaszcza przy badanym starym druku XVII.4.9481 t. XV) informacje nieporównywalne jakościowo i ilościowo z wynikami badań uzyskiwanymi domyślną hodowlaną metodą odciskową, która pozostaje główną metodą stosowaną w LKZB. Praktyka LKZB pozwala na pobranie jednego pomiaru/próby (odcisk, wymaz, próba punktowa wymazówką) z jednego miejsca wytypowanego do badania. Biorąc pod uwagę fakt, że próba odciskowa pobiera z powierzchni papieru (testowana była bibuła filtracyjna Whatman) od około 10^{-2} do około 10^{-3} materiału biologicznego, który jest tam obecny (został naniesiony), a próba suchą wymazówką

z powierzchni 5×5 cm od około 10^{-1} do około 10^{-2} materiału¹⁸, opracowanie procedury, która jednocześnie jest szybka i zmniejsza rozrzut wyników poniżej rzędu wielkości, można uznać za sukces.

Planowane jest dalsze udoskonalenie procedury, z naciskiem na sprawdzenie jej dokładności i powtarzalności, przy zwiększonej do 10 liczbie powtórzeń dla jednego rodzaju pomiarów (w pojedynczym układzie np. grzyb–papier–procedura). Obecnie realizowany jest eksperyment polegający na wykonywaniu prób luminometrycznych równoległe z próbami odciskowymi przy pracy bieżącej.

¹⁸ Wyniki jeszcze nieopublikowane. Opis tego eksperymentu i jego wyników był częścią referatu B. F. Zerek et al. (PL), *Microbiological sampling of library objects: Comparison of impress, dry swab and ATP methods* na IADA XIII Congress w Berlinie, 2015.

Bibliografia:

- Instrukcja obsługi luminometru Kikkoman PD-20 na stronie jednego z dostawców, https://hyserve.com/files/PD20_polish.pdf [dostęp: lipiec 2020].
- Drzejczyk R. J., Turnau K., Jodłowski P. J., Chlebda D. K., Łojewski T., Łojewska J., *Antimicrobial Properties of Silver Cations Substituted to Faujasite Mineral*, „Nanomaterials” 2017, vol. 7, issue 9, https://www.researchgate.net/publication/319306945_Antimicrobial_Properties_of_Silver_Cations_Substituted_to_Faujasite_Mineral [dostęp: wrzesień 2020].
- Karbowska-Berent J., Jarmilko J., *Jakość mikrobiologiczna powietrza w magazynach i poziom ATP na obiektach – nowe metody oceny warunków przechowywania zbiorów i stanu ich zachowania*, „Notes Konserwatorski” 2012, nr 15, s. 83, <https://ksiegarnia.bn.org.pl/pdf/Notes%20konserwatorski%2015.pdf> [dostęp: lipiec 2020].
- Kwiatkowska M., Ważny R., Turnau K., Wójcik A., *Fungi as deterioration agents of historic glass plate negatives of Brandys family collection*, „International Biodeterioration & Biodegradation” November 2016, vol. 115, s. 133–140, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516302530> [dostęp: wrzesień 2020].
- Ljaljević Grbić M., Unković N., Stupar M., Vukojević J., Nedeljković T., *Implementation of ATP Bioluminescence Method in the Study of the Fungal Deterioration of Textile Artefacts*, „FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe” 2014, 6(108), s. 132–136, <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-aa522723-c136-43b3-8c03-7419aeb41d9> [dostęp: wrzesień 2020].
- Rajkowska K., Otlewska A., Koziróg A., Piotrowska M., Nowicka-Krawczyk P., Hachulka M., Wolski G. J., Kunicka-Styczyńska A., Gutarowska B., Żydzik-Białek A., *Assessment of biological colonization of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp*, „Annals of Microbiology” 2014, 64(2): 799–808, <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-013-0716-8> [dostęp: wrzesień 2020].
- Rakotonirainy M. S., Dubar P., *Application of bioluminescence ATP measurement for evaluation of fungal viability of foxing spots on old documents*, „Luminescence” 2013, 28: 308–312 (online: 2012), https://www.researchgate.net/publication/225305327_Application_of_bioluminescence_ATP_measurement_for_evaluation_of_fungal_viability_of_foxing_spots_on_old_documents [dostęp: wrzesień 2020].

- Rakotonirainy M. S., Hanus J., Bonassies-Termes S., Heraud C., *Detection of fungi and control of disinfection by ATP-bioluminescence assay*, „AICCM Bulletin” December 2003, https://www.researchgate.net/publication/285888062_Detection_of_fungi_and_control_of_disinfection_by_ATP-bioluminescence_assay [dostęp: wrzesień 2020].
- Rygała A., Kręgiel D., *Luminometria w przemyśle spożywczym*, „Kierunek Spożywczy” 2/2016, <https://www.kierunekspozyczy.pl/magazyn,luminometria-w-przemysle-spozywczym.html> [dostęp: lipiec 2020].
- Sedlbauer K., *Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components*, Fraunhofer Institute for Building Physics, 2001, https://www.ibp.fraunhofer.de/content/dam/ibp/en/documents/ks_dissertation_etcm1021-30729.pdf [dostęp: lipiec 2020].
- Słownik Bezpieczeństwa Zdrowotnego Żywności*, https://cbr.gov.pl/slownik_bezp_zywn/index.php/Aktywno%C5%9B%C4%87_wody [dostęp: wrzesień 2020].
- Water Activity (aw) in Foods*, <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/water-activity-aw-foods> [dostęp: wrzesień 2020].
- Zerek B., *The Preservation and Protection of Library Collections A Practical Guide to Microbiological Controls*, Chandos Publishing, 2014.



Fot. 1.

Pobieranie próby luminometrycznej punktowo i prostopadle od góry ze starego druku.
Obok obiektu widoczny luminometr.



Fot. 2.

Ogólny widok wymazówki luminometrycznej (stan fabryczny). Pierwszą przegrodę oznaczono kropką i cyfrą 1, drugą przegrodę oznaczono kropką i cyfrą 2. Nad pierwszą przegrodą znajduje się sucha sterylna wymazówka (sterylność zapewniają tarcze na trzpieniu wymazówki). Komora poniżej pierwszej przegrody zawiera ciecz (surfaktant), komora poniżej drugiej przegrody zawiera enzymy i substancje niezbędne do przeprowadzenia reakcji, w postaci suchego proszku.



Fot. 3.

Zbliżenie na koniec wymazówki w Procedurze Piechala–Zerka po jej nawilżeniu cieczą (surfaktantem). Po dotknięciu wymazówką cieczy (po przebicium pierwszej przegrody), jej poziom obniżył się o około 1 mm. Istotne jest, aby czas dotknięcia cieczy był minimalny i nie spowodował wsiąknięcia całej cieczy w wymazówkę.



Fot. 4.

Zbliżenie na koniec wymazówki w Procedurze Piechala–Zerka po jej cofnięciu do wysokości pierwszej przegrody. Istotne jest zachowanie odstępu około 3 mm, aby przy przechyleniu próbki po umieszczeniu w statywie koniec wymazówki nie dotykał cieczy.



Fot. 5.

Miejsce zalanie w starym druku XVII.4.9481 t. XV z Zakładu Starych Druków BN (karta „ajj” recto, [22 cm, 2 cm] licząc od lewego dolnego wierzchołka karty). Wymaz pobrano z powierzchni 5×5 cm, prawa i dolna krawędź obszaru pobrania próby pokrywają się z obcięciem i dolnym brzegiem karty.