

Ministerstvo kultury, Maltézské náměstí 1, Praha 1,
Odbor výzkumu a vývoje

Č.j. MK 2273/2016 OVV
Sp. Zn. MK-S 530/2011 OVV

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. 79

o uznání uplatněné Certifikované metodiky
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Název metodiky:

Metodika pro stanovení fungicidních účinků par esenciálních olejů a jejich složek na spory plísní v různých substrátech

Autorský kolektiv:

Volejníková A., Nováková J., Neuvirt J.

Příjemce podpory na jejímž základě byla metodika vytvořena:

Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.

Dedikace : Projekt Programu NAKI


Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů

Identifikační kód DF11P01OVV028

Uživatelé metodiky v praxi:

- *instituce, které provádějí kromě rutinní dezinfekce knih i vlastní výzkum a inovace těchto postupů*
- *paměťové instituce*
- *subjekty, zabývající se výzkumem využití esenciálních olejů pro antimikrobiální ochranu v oblastech zemědělství, potravinářského průmyslu*

V Praze dne 14. 1. 2016


.....
Ing. Martina Dvořáková
ředitelka Oboru výzkumu a vývoje



“Metodika stanovení fungicidních účinků
par esenciálních olejů a jejich složek na spory plísni
na různých substrátech”

Autoři metodiky:

Volejníková A., Nováková J., Neuvirt J.

Národní knihovna ČR

Červen 2015

Metodika je výsledkem výzkumné činnosti v projektu NAKI DF11P01OVV028

„Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů“,
řešeném v letech 2011-2015 a financovaném Ministerstvem kultury ČR.

Cíl metodiky

Metodika má za cíl umožnit kvantitativní vyhodnocení dezinfekčního účinku par esenciálních olejů na spory plísni ukotvených na různých druzích substrátů. Knihy ve sbírkách jsou složeny z řady různých materiálů, které ovlivňují účinnost dezinfekčních prostředků, proto nestačí vykonat jednoduché testy na agaru nebo skle.

Certifikovaná metodika je určena pro instituce, které provádějí kromě rutinní dezinfekce knížek i vlastní výzkum a inovace těchto postupů. Metodiku je možné využít pro testování par EO ale i dalších dezinfekčních látek ve formě par nebo aerosolu.

Dále je metodika doporučena k využití subjektům, které se zabývají výzkumem využití esenciálních olejů pro antimikrobiální ochranu v ostatních odvětvích (zemědělství, potravinářský průmysl apod.)

OBSAH:

1	Úvod a literární přehled dané oblasti	4
1.1	Význam ochrany písemných kulturních památek proti mikroorganismům	4
1.2	EO a jejich využití v dalších sektorech, jako je potravinářství nebo ochrana rostlin	4
1.3	Běžné metody testování fungicidního účinku EO	4
1.4	Metody testování fungicidního účinku EO v plynné fázi	5
1.5	Testování fungicidního účinku EO na knihách a jejich aplikace na ochranu písemností	5
2	Testy antimikrobiálního účinku par EO za použití různých nosičů spor	7
2.1	Příprava testovací suspenze spor	7
2.2	Test spor na skleněném nosiči	9
2.3	Základní test spor na papírovém nosiči	11
2.4	Komplexní test spor na papírovém nosiči	15
2.5	Použití základního a komplexního testu spor na různých typech papíru (substrátů)	17
2.6	Použití základního a komplexního testu spor různých druhů plísní	17
2.7	Tvorba prostředí s definovaným obsahem par EO	18
2.7.1	Testy v nasycených parách (statická atmosféra)	18
2.7.2	Testy ve zředěných parách (dynamická atmosféra)	19
2.8	Výsledky vzorového experimentu	21
2.9	Navržený postup při testování antimikrobiálního účinku EO	22
2.10	Seznam použité literatury	23

1. Úvod a literární přehled dané oblasti

1.1 Význam ochrany písemných kulturních památek proti mikroorganismům

Papír je jedním z hlavních nositelů kulturního dědictví lidstva. Při nevhodném skladování může však velice snadno podléhat zkáze. Mezi nejvýznamnější faktory způsobující jeho degradaci patří plísně (Zotti *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2011). Ty mohou kromě degradace papíru způsobovat i zdravotní problémy zaměstnancům archivů, protože archivní materiál, se kterým jsou tyto lidé v dlouhodobém kontaktu, může být kontaminován mikroorganismy, a to i zdraví škodlivými druhy (Haleem Khan and Mohan Karuppaiyil, 2012; Roussel *et al.*, 2012).

K ochraně papírových dokumentů se používá řada dezinfekčních látek, v současné době je to butanol, etylenoxid a jiné. Problémem je, že i tyto látky mohou negativně ovlivňovat zdraví zaměstnanců, jako například tymol a formaldehyd, které jsou již zakázány (Sequeira *et al.*, 2012). Proto se nadále hledají nové metody antimikrobiální ochrany knižních fondů a archiválií, které by nijak nepoškozovaly papír ani další používané materiály, a které by zároveň neměly negativní vliv na lidské zdraví (Florian, 1993). Mezi zkoumané alternativy pro toto použití patří i esenciální oleje (EO) z rostlin (Pibiri *et al.*, 2006; Sequeira *et al.*, 2012), protože některé z nich podle mnoha studií vykazují fungicidní aktivitu (Inouye *et al.*, 2000).

1.2 EO a jejich využití v dalších sektorech, jako je potravinářství nebo ochrana rostlin

EO neboli silice jsou vylučovány rostlinami spolu s dalšími sekundárními metabolity pro vlastní ochranu rostlin před škodlivými mikroorganismy a dalšími nepřáteli (herbivory, hmyzem) nebo také jako atraktanty lákající opylovače. Jedná se o směsi až desítek jednotlivých složek zastoupených v různých poměrech. Konkrétní složení je závislé na mnoha faktorech, mezi které patří kromě genetické výbavy daného rostlinného druhu (variety, odrůdy) i klimatické a geografické podmínky růstu, nebo způsob extrakce EO. Majoritně zastoupená složka bývá zodpovědná za dané působení EO, ale není to pravidlem. Důležitou roli hraje vzájemný synergismus i antagonismus jednotlivých složek, proto mohou být některé kombinace složek účinnější než složky samostatné.

Antimikrobiální působení EO je lidstvu známé odpradáva, bylo a je využíváno v mnoha odvětvích lidského působení, jak shrnuje například rešerše Lang and Buchbauer (2012). V současnosti probíhá mnoho výzkumných projektů, které ověřují působení EO a zdokonalují způsoby jejich aplikace jako konzervanty v potravinářství (Lopéz *et al.*, 2005; Librán *et al.*, 2013; Manso *et al.*, 2013; Melgarejo-Flores *et al.*, 2013; Moro *et al.*, 2013) a farmacii (Mishra *et al.*, 2013) nebo v zemědělství k ochraně skladovaných plodin proti mikrobiální kontaminaci (Mari *et al.*, 2002; Sellamuthu *et al.*, 2013). Použití jednotlivých složek EO namísto kompletních EO je levnější, protože se dají připravovat synteticky za vzniku přírodně identických látek, jsou stabilnější a dají se snáze standardizovat pro použití. Nízká toxicita EO jako celku je ověřena staletími používání v tradičních medicínách, v kulinářství, v hygieně a podobně. I zde ale nalezneme alergeny, a to především u jednotlivých složek EO, ale i u původních přírodních směsí. Proto je na místě obezřetnost a nutnost stanovovat a dodržovat bezpečné koncentrace těchto látek.

1.3 Běžné metody testování fungicidního účinku EO

Mezi nejčastěji používané metody ke zjištění antimikrobiálního účinku EO patří diskové difúzní testy (Lopéz *et al.*, 2005; Pawar and Thaker, 2006; Sakr *et al.*, 2012), které se běžně používají k testování citlivosti mikroorganismů vůči antibiotikům. Testy je možné použít u bakterií, kvasinek i plísní. Na živnou agaru ztuženou půdu se zaočkovaným mikroorganismem je přiložen terčík, který obsahuje danou dávku zkoumané látky, která může difundovat agarem do okolí, a sleduje se, jaká je velikost zóny, ve které je potlačen růst mikroorganismu. Jinou možností je postupovat opačně, do agaru s živnou půdou je před ztuhnutím přimíchán EO a sleduje se růst mikroorganismu na takto modifikované půdě (Mishra and Dubey, 1994; Ali, 2007; Camele *et al.*, 2012; Vitoratos *et al.*, 2013). Jednotlivé EO působí na různé mikroorganismy s rozdílnou intenzitou. Pokud je růst plísně potlačen EO (aplikovaným jakýmkoliv způsobem) a po přenosu do prostředí bez EO se začne plíseň znovu

rozmnožovat, má EO pouze fungistatický efekt. Pokud již nedochází k žádnému dalšímu růstu, má EO fungicidní efekt (Inouye *et al.*, 2000; Tullio *et al.*, 2007; Camele *et al.*, 2012). Další jednoduchou alternativou je testování antimikrobiálního účinku v tekuté půdě (bujónu). Při něm je do bujónu přidán EO (často v doprovodu detergentu pro lepší rozpustnost EO v bujónu) a sleduje se, při jaké koncentraci již nevznikne zákal způsobený růstem mikroorganismů (Tullio *et al.*, 2007) nebo kdy již pomocí mikroskopu není pozorováno klíčení spor (Ali, 2007).

Těmito metodami byly nalezeny EO nebo jejich složky, které mají silné antimikrobiální působení proti řadě bakterií i plísní. Jedná se o vhodné screeningové metody. Pro využití v oblasti ochrany písemných památek nejsou vhodné, protože je vyžadován velmi odlišný způsob aplikace EO. Především se jedná o aplikaci EO ve formě plynné fáze, tedy jejich par, jakožto vhodné metody pro ošetření písemných památek.

1.4 Metody testování fungicidního účinku EO v plynné fázi

Metoda „mikroatmosféry“

Nejběžněji uváděný test par EO v literatuře je metoda mikroatmosféry (Lopéz *et al.*, 2005; Ali, 2007; Tullio *et al.*, 2007), kdy je do Petriho misky s mikroorganismem zaočkovaným na agarovém ztuženém půdě uzavřen též kousek filtračního papíru s nakapaným EO, který se do prostoru odpaří. Takto se mohou porovnávat jednotlivé EO, zda v jejich přítomnosti dochází či nedochází k potlačení růstu plísní. U účinných EO často závisí na dávce, jestli bude docíleno efektu fungistatického nebo fungicidního. Někteří autoři stanovují MIC jednotlivých EO tak, že do prostoru misky o známém objemu nakapou určitý objem EO (Tullio *et al.*, 2007). Na základě našich experimentů můžeme říct, že kvantifikace účinné dávky EO je zatížena chybou, a to z několika důvodů.

Prvním z nich je ten, že některé EO jsou schopné, jakožto organické molekuly, postupně procházet většinou plastů a unikat ven. Dále mohou difundovat do přítomného agaru a jejich objem se bude v uzavřené atmosféře opět snižovat, a tím bude zároveň i klesat fungicidní účinek jejich par. Někteří autoři naopak předpokládají, že EO difundovaný do agaru působí na plíseň a přispívá k účinku v plynné fázi. Aby byly oba účinky odděleny, byla v jedné laboratoři vyvinuta speciální cela (Inouye *et al.*, 2000), kde působily páry EO přímo na rostoucí hyfu plísně, která do cely prorůstala odjinud.

V literatuře je řešena otázka, zda jsou EO účinnější ve formě kapalné (bujón, agar s příměsí EO) nebo plynné (páry EO nad vzorkem) (Tyagi and Malik, 2010). Jako účinnější byly v různých studiích vyhodnoceny obě varianty, kapalné EO (Lopéz *et al.*, 2005) ale i EO ve formě par (Tullio *et al.*, 2007; Laird and Phillips, 2012). Důvod je dán pravděpodobně velikou rozmanitostí EO, testovaných mikroorganismů, ale i výše zmíněnými faktory ovlivňujícími testy par EO. Mezi EO patří z chemického hlediska velmi různorodé látky s různými funkčními skupinami, velikostí molekuly i tenzí par. A u některých z nich není doposud znám mechanismus účinku antimikrobiálního působení. Proto je nevhodné některé jevy zobecnit na celou skupinu rostlinných EO (Cavanagh, 2007).

Metoda par působících na neporézní nosič

Postup metody vychází z technických norem pro vyhodnocení účinku chemického dezinfekčního prostředku na mikroorganismy ukotvené na nosiči. Jednou z nich je česká technická norma (ČSN EN 14562), druhou je francouzská norma NF T 72-281 (AFNOR, 1986) určená k dezinfekci povrchů činnidly v plynné fázi. Ta byla použita ve studii zaměřené na čištění vzduchu a ventilačních systémů budov pomocí EO ve studii Pibiri *et al.* (2006). Princip spočívá v tom, že mikrobiální buňky či spory jsou ukotveny na neporézním nosiči (např. hodinové sklo, podložní sklíčko) a jsou vloženy na definovanou dobu do prostředí s EO. Po expozici EO jsou spory smyty sterilním roztokem, a pak je kultivačně zjištěn úbytek živých buněk oproti kontrolnímu vzorku. Limit pro dezinfekční prostředky v české i ve francouzské normě je pokles minimálně o 4 řády u plísní a o 5 řádů u bakterií.

1.5 Testování fungicidního účinku EO na knihách a jejich aplikace na ochranu písemností

Pro dezinfekci reálných předmětů a sledování dezinfekčního účinku par EO působících na ně, byly vyvinuty specializované laboratorní testy. Protože jsou EO zkoumány především v oblasti zemědělství, již dříve vznikly metodiky testování dezinfekčního účinku par EO na zemědělských

produktech, jako je ovoce nebo zelenina a na dalších potravinách (Mari *et al.*, 2002; Melgarejo-Flores *et al.*, 2013; Vitoratos *et al.*, 2013). Obvykle se v principu jednalo o použití boxů, které zajišťovaly požadovanou koncentraci EO, do nichž byly uzavřeny produkty infikované plísní. Poté se srovnával rozvoj plísní s kontrolními vzorky, a to během doby umístění produktů v parách EO a po jejich vyjmutí a umístění do stejného prostředí, ve kterém byly kontrolní vzorky.

Stejný přístup by bylo možné použít i při testech s knihami, ale pouze v případě, že by se knihy během experimentu nebo po vyjmutí z par EO významně zvlhčily. Za běžných laboratorních podmínek mají totiž knihy nízkou vodní aktivitu, která brání růstu plísní. Tento test by mohl simulovat událost, při které došlo k namočení či silnému navlhnutí knih způsobující silnou náchylnost knih k mikrobiální zkáze.

Přímo v oboru ochrany písemných památek byly použity páry EO velmi vzácně. Zabývá se jím především Rakotonirainy and Lavédrine (2005). Kromě metody mikroatmosféry tento tým pracoval i s knihami jako celky. Na ústřížky filtračního papíru byly nanесeny spory plísní. Tyto ústřížky se sporami či již rostoucími plísněmi byly založeny do knihy, která byla vložena do boxu s definovanou koncentrací par EO a relativní vlhkostí vzduchu. Po expozici EO v řádech dní byla ověřována životaschopnost plísní a spor pomocí stěrů. Testy dokázaly, že nejúčinnější ze zde testovaných složek EO, linalool (415 ppm), funguje v plynné fázi spíše jen fungistaticky místo fungicidně, tudíž by mohl být použit hlavně k preventivnímu ošetření písemností v prostorách, kde jsou skladovány.

Takový postup je vhodný pro studium dezinfekce knih a lze jej dále modifikovat. Po vyjmutí papírků z ošetřených knih je možné postupovat různými způsoby a zjišťovat přežívání mikroorganismů – např. výše uvedenými stěry a kultivací. Další možností jsou stěry pro detekci ATP, které je přítomné pouze v živých buňkách, či přenosem papírku na kultivační půdu (Rakotonirainy *et al.*, 2003; Rakotonirainy and Dubar, 2013).

2. Testy antimikrobiálního účinku par EO za použití různých nosičů spor

Většina testů antimikrobiálního účinku par EO se provádí v nasycených parách, při reálné aplikaci se však používají hlavně ředěné páry EO. Proto jsme sestavili laboratorní aparaturu tvořící atmosféru s řízenou koncentrací par EO a vlhkostí vzduchu/plynu, která je popsána v oddíle 2.7. Kromě ní jsou v metodice uvedeny 3 testy pro vyhodnocování fungicidního účinku par EO:

- Test spor na skleněném nosiči (2.2)
- Základní test spor na papírovém nosiči (2.3)
- Komplexní test spor na papírovém nosiči (2.4)

2.1 Příprava testovací suspenze spor plísní

Pro reprodukovatelné testy je nezbytné připravit čerstvé spory plísní podle standardního postupu. Spory se získávají smyvem fyziologickým roztokem obohaceným o detergent Tween 80 z plně vyvinuté plísně kultury.

Použitý materiál, chemikálie a vybavení

Mikrobiální kultury: vláknité houby *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 (ex *A. niger*) a *Penicillium aurantiogriseum* CCM F-389, pocházející z České sbírky mikroorganismů (CCM, Masarykova Univerzita, Brno)

Kultivační půdy: Sabouradův agar, Sladinový agar (HiMedia Laboratories, Čadský-Envitek, Brno)

Sterilní roztoky: Fyziologický roztok s 0,05 % Tween 80 (V/V), (na 1 l destilované vody 9 g NaCl, 0,5 ml Tween 80 (Sigma-Aldrich, Praha))

Destilovaná voda s 0,05 % Tween 80 (V/V)

Sterilní materiál: Centrifugační zkumavky, pipetovací špičky, Petriho misky, zkumavky pro šikmé agary

Laboratorní vybavení: Laminární box, autokláv, biologický termostat, lednice, automatická pipeta, centrifuga, kahan, očkovací klička, volitelně: počítací komůrka (typ Bürker či Cyrus)

Postup

Veškeré operace s plísněmi kulturami a spory jsou prováděny v laminárním boxu, aby byla zajištěna aseptická práce. Alternativou je práce používající plamene kahanu k dosažení aseptických podmínek při manipulaci. Sterilní materiál je připraven parní sterilizací v autoklávu 25 min při 121 °C.

Pracovní kultura plísně je zaočkována na Petriho misku se Sabouradovým agarem ze zásobní kultury skladované v lednici při teplotě 5-8°C na šikmém Sabouradově agaru. Následuje přibližně 5 dní kultivace při 25±1°C a následně dozrávání spor plísně 7 dní v lednici při 5-8°C. Z takto připravené sporující plísně je možné smýt spory. Na Petriho misku se nalije ze zkumavky 10 ml fyziologického roztoku, do kterého byl přidán detergent Tween 80 (0,05%, V/V) pro zvýšení smáčivosti spor. Jemným kýváním se spory uvolní a přelijí v suspenzi zpět do zkumavky. Smyv je možné dvakrát opakovat pro zvýšení výtěžku spor. Při smývání spor je pouze k jemně kýváno s miskou. Aby se zamezilo uvolnění fragmentů hyf do sporové suspenze, tak se nepoužívají žádné nástroje, kterými by se třel povrch plísně. Jinak by bylo nezbytné spory přefiltrovat. Takto připravenou suspenzi spor zchladíme v lednici na 5-8°C, abychom zabránili či oddálili proces klíčení a do 24 h použijeme na přípravu vzorků.

Následně je suspenze spor centrifugací (2000g) zahuštěna na koncentraci na přibližně $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$ KTJ/ ml* (kolonie tvořících jednotek), převedena do destilované vody s detergentem (0,05% Tween 80, V/V) a dvakrát promyta. Přesný počet KTJ je zjištěn rozbořem suspenze kultivační technikou. Při ní je testovaná suspenze naředěna desítkovou ředící řadou, z každého ředění je vyset alikvot suspenze na misku se sladidovým agarem a vložen do termostatu s 25°C. Každých 24 h se misky kontrolují a počítají narostlé kolonie, dokud se jejich počet zvyšuje. Z počtu narostlých kolonií se vypočte KTJ v 1 ml testovací suspenze. Do výpočtu se nezahrnují misky, kde narostlo více než 165 kolonií, protože takto příliš vysoké počty kolonií na jedné misce jsou již zkreslené (ČSN EN 14562). Alternativou je stanovení celkového počtu spor v suspenzi (získaného v počítací komůrce či počítačem buněk) a výpočet pomocí faktoru pro přepočítání celkového počtu spor na počet KTJ (počet spor, které jsou schopny tvořit kolonie) známý z předchozích pokusů.

Takto připravená suspenze spor je ihned použita na testy. Důvodem převodu testovací suspenze z fyziologického roztoku do destilované vody je, že za použití spor ve fyziologickém roztoku při testech na skleněném nosiči zůstávalo opakovaně přibližně 1 % spor uchráněno před vlivem par EO patrně tím, že byly zakryty drobnými krystalky NaCl. Při použití spor v destilované vodě byl tento problém odstraněn. Destilovaná voda je však pro uchovávání spor osmoticky nepříznivé prostředí, proto je třeba neprodleně připravit vzorky.

Poznámka:

** Při manipulacích se sporami v testech dochází k poklesu jejich životaschopnosti a k naředění. Skokový pokles životaschopnosti byl pozorován při vysušení na nosičích a k pozvolnému klesání dochází při dlouhodobých experimentech (týdny). Proto bývá zjištěný počet KTJ v testech u kontrolních vzorků nižší než počet KTJ vypočtený z rozboru testovací suspenze spor.*

K naředění spor u skleněných nosičů dochází tím, že se na nosič aplikuje 50 μ l spor, které se po vytažení z esenci smyjí pomocí 5 ml roztoku.

S tím vším je nutné počítat, aby počet živých spor na nosičích byl během celých experimentů dostatečný. Optimální koncentrace KTJ kontrolních vzorků je 10^5 - 10^6 /ml.

2.2 Test spor na skleněném nosiči

Princip

Přežívání spor, které byly na skleněném nosiči vystaveny působení par EO, se testuje kultivační technikou. Na nosiči je vysušen daný počet spor, které jsou po vytažení z par EO ze skla smyty a naředěny desítkovou ředící řadou. Následně se kultivací zjistí počet přežívajících spor a vypočte se stupeň redukce oproti kontrolnímu vzorku.

Použitý materiál, chemikálie a vybavení

Mikrobiální kultury: testovací suspenze spor (viz 2.1)

Kultivační půdy: Sladinový agar, Sabouradův bujón (HiMedia Laboratories, Čaderský-Envitek, Brno).

Sterilní roztoky: Fyziologický roztok s 0,05 % Tween 80 (V/V), na 1 l destilované vody 9 g NaCl, 0,5 ml Tween 80 (Sigma-Aldrich, Praha)

Destilovaná voda s 0,05 % Tween 80 (V/V)

Sterilní materiál: 500ml Erlenmeyerovy baňky, zkumavky, podložní sklíčka pro mikroskopování, podložka pro přípravu vzorků (např. hliníková fólie), skleněné kuličky o průměru 5 mm, očkovací hokejky, Petriho misky, pipetovací špičky

Laboratorní vybavení: Laminární box, autokláv, biologický termostat, automatická pipeta, třepačka vortex

Postup

Manipulace se sporami se vykonávají v laminárním boxu, aby byla zajištěna aseptická práce. Alternativou je práce používající plamene kahanu k dosažení aseptických podmínek při manipulaci. Sterilní materiál je připraven sterilizací v autoklávu 25 min při 121 °C.

Příprava vzorků

Vhodnými skleněnými nosiči spor jsou vysterilizovaná podložní sklíčka pro mikroskopování. Rozloží se na sterilní podložku (např. hliníková fólie) a nanese se na ně 50 µl testovací suspenze spor. Po vysušení suspenze za laboratorní teploty jsou vzorky připraveny k vložení do testovaného prostředí par EO. U každého vzorku je nezbytné připravit 2-3 opakování.

Zpracování a vyhodnocení vzorků

Vzorky jsou po vytažení z testovaného prostředí par EO minimálně 1 hodinu ponechány na přístupu čistého vzduchu v laminárním boxu. Poté jsou spory ze skleněných nosičů kvantitativně a sterilně smyty 5 ml fyziologického roztoku s přídavkem Tween 80 do 500mL Erlenmayerových baněk. Uplělé zbytky zaschlé suspenze spor jsou setřeny sterilní tyčinkou (očkovací hokejka). Následně je skleněný nosič vhozen do baňky a po přidání skleněných kuliček je intenzivně třepán 2 minuty na třepačce vortex pro dokonalé smytí všech spor ze sklíčka. Poté je připravena desítková ředící řada sporové suspenze, kde je v každém kroku smísen 1 díl sporové suspenze a 9 dílů Sabouradova bujónu. Při manipulaci se sporovou suspenzí je třeba suspenzi před každým pipetováním intenzivně protřepat na třepačce vortex. Z každé koncentrace je nanesen alikvot suspenze na Petriho misku se sladinovým agarem, rozetřen očkovací hokejkou po povrchu a kultivován při 25°C.

Po 2 a 3 dnech růstu je spočítán počet narostlých kolonií, dále jsou misky kontrolovány každých dalších 24 hodin, dokud se nepřestane zvyšovat počet narostlých kolonií. U spor poškozených parami EO může být kultivační doba delší než u kontrolního vzorku. Následně je vypočten počet přežívajících

spor vzorků a porovnán s kontrolními vzorky. Ty jsou zpracovány stejně s jediným rozdílem, že nebyly vystaveny působení esencí*. Výsledkem výpočtu je, o kolik řádů se snížila koncentrace živých spor působením esencí. Pokud je pokles o 4 a více řádů, jedná se u plísňových spor o účinný dezinfekční postup (ČSN EN 14562).

Poznámka:

** Není možné vztahovat počet přežilých spor vzorku k počtu KTJ testovací suspenze, protože příprava a zpracování vzorku poškodí životaschopnost některých spor. Ještě větší chybou by bylo vztahování k celkovému počtu spor testovací suspenze zjištěnému jinou než kultivační technikou (např. v Bürkerově počítací komůrce), protože všechny spory ve výchozí suspenzi nejsou schopny vyklíčit a dát vzniknout kolonii.*

Během dlouhodobých experimentů (týdny) dochází také k samovolnému odumírání spor v kontrolním vzorku, proto je nezbytné používat k výpočtu kontrolní vzorek stejného stáří. Pouze v případě, že během sledovaného období přežívání kontrolního vzorku neklesá, je možné vypočítat průměrnou hodnotu přežívání kontrolního vzorku a k té měření vztahovat.

2.3 Základní test spor na papírovém nosiči

Princip

Na papírovém nosiči je vysušen daný počet spor. Po vytažení z par EO jsou nosiče sterilně přeneseny na živnou půdu a růst spor na nich je porovnán s růstem kontrolního vzorku. Uvedený postup byl zaveden pro filtrační papír a při použití nosiče z jiného papírového materiálu je nezbytné postup podle potřeb adaptovat (viz níže, 2.5). Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu pro testování účinnosti par EO.

Použitý materiál, chemikálie a vybavení

Mikrobiální kultury: Testovací suspenze spor (viz 2.1)

Kultivační půdy: Sladinový agar (HiMedia Laboratories, Čadský-Envitek, Brno).

Sterilní roztoky: Destilovaná voda s 0,05 % Tween 80 (V/V)

Sterilní materiál: Zkumavky, podložka pro přípravu vzorků (např. hliníková fólie), Petriho misky dělené na čtvrtiny, pipetovací špičky, podložky pro nosiče (např. skleněné kádinky či misky)

Laboratorní vybavení: Laminární box, autokláv, biologický termostat, automatická pipeta, třepačka vortex, kahan, pinzeta, ethanol

Postup

Manipulace se sporami se vykonávají v laminárním boxu, aby byla zajištěna aseptická práce. Alternativou je práce používající plamene kahanu k dosažení aseptických podmínek při manipulaci. Sterilní materiál je připraven parní sterilizací v autoklávu 25 min při 121 °C.

Příprava vzorků

Nejprve jsou připraveny papírové nosiče. List filtračního papíru je nařezán na kousky o velikosti maximálně 2,5 x 2,5 cm. Použití jiného substrátu než filtračního papíru je popsáno v kapitole 2.5. Nosiče jsou vysterilizovány v autoklávu a po vychladnutí je na ně možné aplikovat spory. Testovací suspenze spor je naředěna 10x tak, aby měla koncentraci přibližně 10^6 KTJ/ ml. Na každý nosič je nakapáno 20 μ l suspenze. Po vysušení jsou vzorky na sterilní podložce vloženy do testovacího prostředí. Jako podložka slouží skleněná kádinka, Petriho miska nebo pro větší soubor vzorků stojan na barvení sklíček s mikroskopickými preparáty, do kterého byly vloženy papírové nosiče do mezery mezi sklíčky (obr. 1 a 2). Další možností je založit vzorky mezi listy knihy, kde se zohlední vliv penetrace par EO na fungicidní účinnost uvnitř knihy.



Obr. 1 Umístění vzorků spor na papírových nosičích (na filtračním papíře a lepence) v kádinkách a stojácích pro test par EO

Zpracování a vyhodnocení vzorků

Po vytažení z par EO jsou vzorky asi 3 h ponechány v laminárním boxu k odvětrání sorbovaných EO a poté se ověřuje přežívání spor. Pro tento účel jsou spory i se svým papírovým nosičem vloženy do optimálního prostředí pro růst tedy položeny na sladidlový agar a vloženy do termostatu s $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Ke kultivaci je vhodné používat Petriho misky dělené na čtvrtiny, na kterých je možné kultivovat několik nezávislých vzorků.

Po 1, 2 a 3 dnech kultivace je sledován a vyhodnocen relativní stupeň růstu plísně podle „vizuální stupnice růstu“. Hlavní vyhodnocení probíhá po 3 dnech kultivace, kdy jsou nepoškozené plísně již dostatečně vyvinuté. Nenarostlé vzorky se kultivují a sledují dalších 7 dní pro ověření, zda nedojde k nárůstu dosud negativních vzorků.

Vývojové fáze (*P. aurantiogriseum* a *A. brasiliensis*), na základě kterých byla navržena vizuální stupnice růstu:

Období, kdy rostou vegetativní hyfy:

1. Začíná se objevovat bílý nárůst hyf (mycelium) v oblasti nakapaných spor
2. Dobře viditelný bílý nárůst hyf vystupující výrazně nad podložku, kterou plně zakrývá v oblasti nakapaných spor

Období, kdy se začínou tvořit spory:

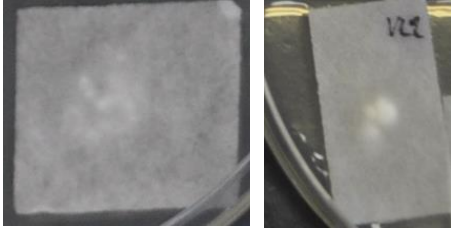
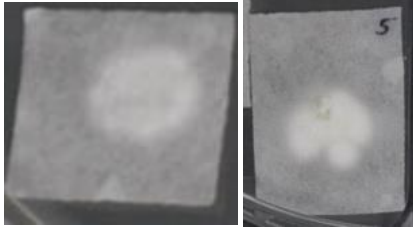
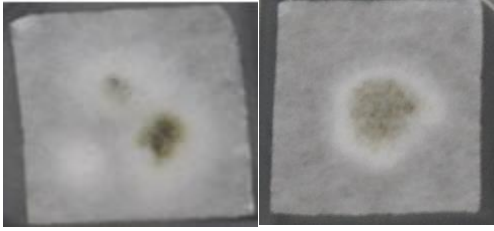
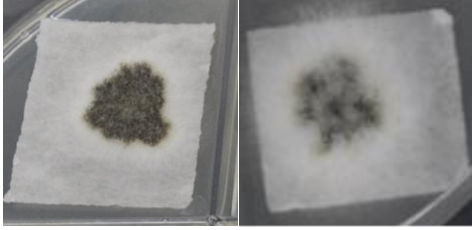
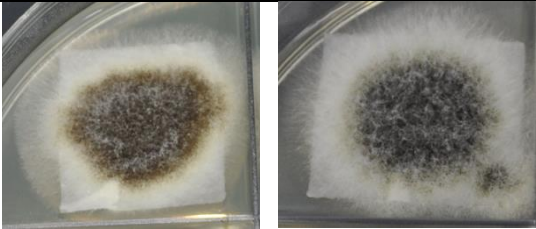

3. Začínají se tvořit první spory, mycelium se díky jejich pigmentům slabě zabarvuje
4. Mnoho spor způsobuje tmavé zabarvení mycelia, na ploše o průřezu do 1 cm
5. Mnoho spor způsobuje tmavé zabarvení mycelia, na ploše 1,5 cm
6. Plíseň přesahuje z papírového nosiče, roste až do okrajů misky

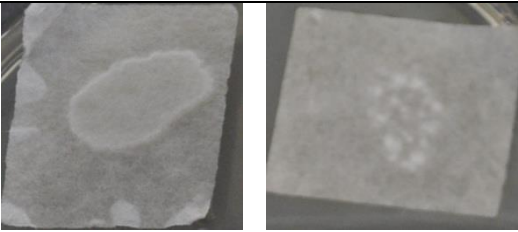
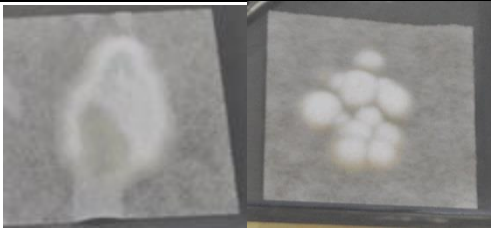
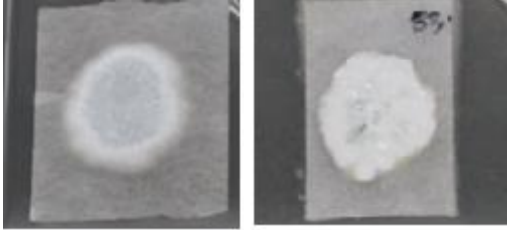
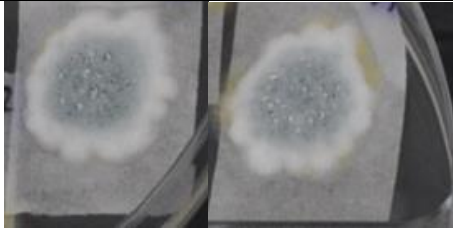
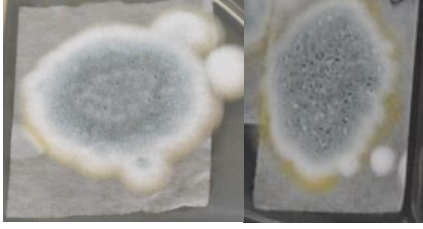
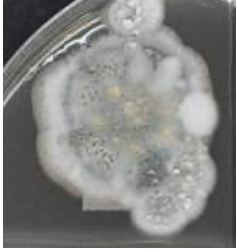
Pokud je pozorovaný růst mezi dvěma stupni, je možné ho hodnotit po polovinách stupně. Protože existuje určitá variabilita mezi vzorky, je nezbytné pro každý vzorek vypočítat průměr ze 2-3 opakování.

Stupnice byla vytvořena na základě vývoje kontrolních vzorků a je závislá na použitých druzích plísní, kultivačním médiu, době a teplotě kultivace. I malá změna kultivačních podmínek může ovlivnit vývoj plísní, proto je nezbytné pro použití stupnice v nových podmínkách ji ověřit a případně upravit.

Poznámka:

I přes použití vizuální stupnice pro hodnocení působení par EO je jednoznačný výsledek pouze „růst negativní (stupeň 0)“ a „růst bez negativního vlivu EO (stupeň 5-6)“. U částečného růstu lze označit míru dezinfekčního účinku slovy jako slabou, částečnou či silnou, ale to je velice nepřesné. Proto jsme zavedli testování se sadou papírků s různým množstvím spor (viz komplexní test spor na papírovém nosiči 2.4). Koncentrace spor používaná u základního testu (10^6 spor/ml) odpovídá 1. ředění v komplexním testu.

Vizuální stupnice růstu plísně <i>Aspergillus brasiliensis</i> na nosiči z filtračního papíru položeném na sladivém agaru, při 25°C			
0	Nejsou pozorovány žádné známky růstu		
1	Slabě viditelný nárůst bílých hyf v oblasti nakapaných spor / Několik drobných kolonií v místě nakapaných spor		Tvorba hyf
2	Dobře viditelný bílý nárůst hustě propletených hyf (mycelium) vystupující do prostoru nad podložku, která plně zakrývá oblast nakapaných spor		
3	Mycelium začíná tvořit první tmavě zbarvené spory v několika místech nebo řídce po celém povrchu		Tvorba spor
4	Intenzivní produkce spor, která způsobuje tmavé zbarvení mycelia na ploše o průřezu 0,5 – 1 cm		
5	Intenzivní produkce spor, která způsobuje tmavé zbarvení mycelia na ploše o průřezu okolo 1,5 cm		
6	Plíseň pokrytá sporami přesahuje z papírového nosiče, roste až do krajů misky		

Vizuální stupnice růstu plísně <i>Penicillium aurantiigriseum</i> na nosiči z filtračního papíru položeném na sladidlovém agaru, při 25°C			
0	Nejsou pozorovány žádné známky růstu		
1	Slabě viditelný nárůst bílých hyf v oblasti nakapaných spor/ Několik drobných kolonií v místě nakapaných spor		Tvorba hyf
2	Dobře viditelný bílý nárůst hustě propletených hyf (mycelium) vystupující do prostoru nad podložku, která zakrývá oblast nakapaných spor		
3	Mycelium začíná tvořit první modro-zeleně zabarvené spory v několika místech nebo řídce po celém povrchu		Tvorba spor
4	Intenzivní produkce spor, která způsobuje tmavé zabarvení mycelia na ploše o průřezu 0,5 – 1 cm		
5	Intenzivní produkce spor, která způsobuje tmavé zabarvení mycelia na ploše o průřezu okolo 1,5 cm		
6	Plíseň přesahuje z papírového nosiče, může růst až do okrajů misky (u penicillia do 3 dnů kultivace nenastává)		

2.4 Komplexní test spor na papírovém nosiči

Princip

Výsledky komplexního testu udávají, o kolik řádů klesl počet životaschopných spor vzorku. Ve zkumavkách je připravena desítková ředící řada. Z každého ředění je na samostatný nosič nanesen stejný objem suspenze spor. Po vytažení z prostředí EO jsou nosiče sterilně přeneseny na živnou půdu, je vyhodnocen jejich růst a porovná se s kontrolním vzorkem, na kterém stupni ředění se ještě udržely životaschopné spory.

Použitý materiál, chemikálie a vybavení

Mikrobiální kultury: Testovací suspenze spor (viz 2.1)

Kultivační půdy: Sladinový agar, (HiMedia Laboratories, Čaderský-Envitek, Brno).

Sterilní roztoky: Destilovaná voda s 0,05 % Tween 80 (V/V)

Sterilní materiál: Zkumavky, podložka pro přípravu vzorků (např. hliníková fólie), Petriho misky dělené na čtvrtiny, pipetovací špičky, podložky pro nosiče (např. skleněná nádoba na barvení mikroskopických preparátů, skleněné kádinky či misky)

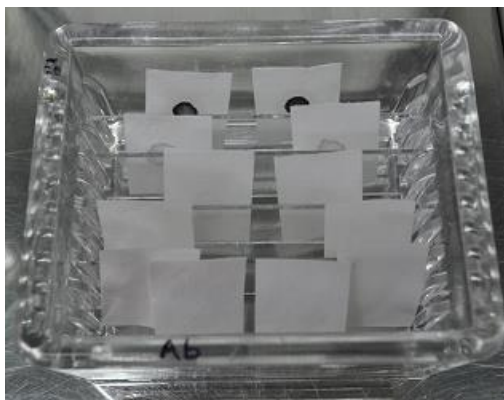
Laboratorní vybavení: Laminární box, autokláv, biologický termostat, automatická pipeta, třepačka vortex, kahan, pinzeta, ethanol

Postup

Manipulace se sporami se vykonávají v laminárním boxu, aby byla zajištěna aseptická práce. Alternativou je práce používající plamene kahanu k dosažení aseptických podmínek při manipulaci. Sterilní materiál je připraven parní sterilizací v autoklávu 25 min při 121 °C.

Příprava vzorků

Testovací suspenze spor o koncentraci přibližně 10^7 KTJ je naředěna v pěti postupných krocích do zkumavek desítkovou ředící řadou (např. 1 ml suspenze + 9 ml vody). Těchto 6 různých koncentrací spor (testovací suspenze spor a pět dalších ředění) je nanášeno na suché a sterilní nosiče z filtračního papíru (příprava viz oddíl Základní test na papírovém nosiči 2.3) po 20 μ l suspenze. Do testovaného prostředí vkládáme sadu nosičů vytvořených z různých koncentrací spor, a to nejméně ve 2 opakováních. Pro zajištění homogenity rozmístění většího množství vzorků a zabránění jejich vzájemnému fyzickému kontaktu doporučujeme použití např. skleněné nádoby na barvení mikroskopických preparátů, kterou lze vysterilizovat, a která nijak nepohlcuje EO (obr. 2). Dále se s nosiči se sporami pracuje stejným způsobem jako v základním testu papírových nosičů.

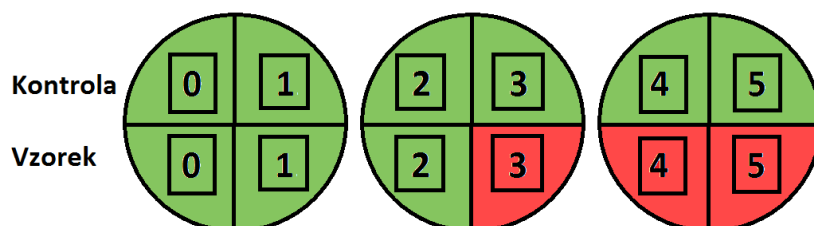


Obr. 2 Stojánek s nosiči z filtračního papíru v komplexním testu. Na nosiče v horní řadě byl nanesena nejvyšší koncentrace spor (černá skvrna).

Zpracování a vyhodnocení vzorků

Po vytažení z par EO jsou vzorky asi 3 h ponechány v laminárním boxu k odvětrání sorbovaných EO. Poté jsou přeneseny na Petriho misky dělené na čtvrtiny se sladivým agarem a vloženy do termostatu s $25\pm 1^\circ\text{C}$. Po 3 dnech je vyhodnocen růst následovně - je porovnána sada papírků vzorku se sadou kontroly (obr. 3) – na kolika stupních ředění zůstaly nějaké životaschopné spory, ze kterých vyrostla plíseň. Výsledkem je přibližný počet řádů, o který poklesl počet živých spor u vzorku, na který působily páry EO, podobně jako to bylo vyhodnocováno u sklíček.

Po dalších 7 dnech kultivace je zkontrolováno, zda nedošlo k nárůstu dosud negativních vzorků.



Obr. 3 Schéma kultivace vzorků po vytažení z EO a zpracování výsledků v komplexním testu na papírovém nosiči. Na dělené Petriho misky byly rozmístěny papírové nosiče se šesti různými aplikovanými koncentracemi spor (1. řádek kontrola, 2. řádek vzorek z par EO). Číslo udává, kolikrát byla sporová suspenze ředěna v poměru 1:9. před aplikací na papírový nosič. Barvy znázorňují, zda došlo k přežití spor a následnému růstu plísně (zeleně – růst pozitivní) nebo k potlačení růstu (červeně – růst negativní). V ilustračním případě došlo podle námi zavedeného testu k poklesu počtu životaschopných spor o 3 řády.

Tento nově zavedený komplexní test na papírových nosičích přináší nejbližší možné přiblížení testu na skleněných nosičích.

2.5 Použití základního a komplexního testu spor na různých typech papírových nosičů (substrátů)

Výše uvedené testy byly vyvinuty za použití nosičů z filtračního papíru. U testů lze pracovat s různými typy papírových nosičů včetně lepenky, ale pokud nosiče svými vlastnostmi ovlivňují růst plísně při kultivaci, je nezbytné podmínky adaptovat (např. smočít nosič po položení na agar, aby došlo k rychlé aktivaci spor kontaktem s vlhkostí, modifikovat stupnice růstu či prodloužit dobu kultivace).

Příklad nosiče: Lepenka potažená plátnem, tloušťka 1,75 mm

Lepenku je možné zpracovat stejným způsobem jako filtrační papír s těmito výjimkami

- Lepenku je nutné po přenosu na agar z boku (aby nedošlo k rozmytí spor) zvlhčit sterilní destilovanou vodou nebo Sabouradovým bujónem, aby se podpořil růst plísně a nevysušil agar pod lepenkou. Pokud by ke zvlhčení nedošlo, opozdil by se počátek růstu plísně a závisel by na vlhkosti agaru. Jednotlivé Petriho misky s agarem by se mohly lišit. Na 1 g lepenky bylo použito 0,5 ml tekutiny.
- Další odlišnost je, že plíseň má na lepence jiný charakter růstu, proto je nutné modifikovat vizuální stupnici růstu a prodloužit dobu kultivace, neboť tlustá lepenka tvoří bariéru mezi plísní a agarem a zpomaluje její růst. Růst na lepence se vyhodnocoval po 2, 3 a 7 dnech kultivace. Pro kontrolu růstu negativních vzorků je lepenka kultivována dalších 7 dní.

2.6 Použití základního a komplexního testu u spor různých druhů plísní

Při použití jiné plísně je nezbytné projít důkladně všechny kroky testů a ověřit si, zda nedochází k odchylkám v růstu nově použité plísně. Plíseň je třeba po vytažení z testovaného prostředí kultivovat v co nejvhodnějších podmínkách, proto je možné změnit:

- Dobu kultivace, některé druhy plísní rostou pomaleji
- Teplotu kultivace – některé druhy mají jinou optimální teplotu
- Kultivační půdu – některé druhy mají odlišné nároky na živiny

Některé druhy plísní na tlustém celulosovém substrátu nerostou, ani když je položený na agaru, proto není možné dělat testy na lepenkách u všech druhů.

Pro základní test je nutné upravit vizuální stupnici růstu pro každý druh plísně. Páry EO ve výše uvedených postupech způsobily zahubení části nebo všech spor a opožďovaly vývoj mycelia, ale může nastat, že plíseň po vystavení parám EO poroste, ale ztratí schopnost sporulace nebo změní charakter růstu.

2.7 Testovací linka a nastavení podmínek

2.7.1 Testy v nasycených parách (statická atmosféra)

Tento test se provádí pro rychlé zjištění fungicidního účinku par EO za zvolené relativní vlhkosti vzduchu. V uzavřeném prostoru (exsikátor) je umístěna otevřená nádobka s testovanou esencí, otevřená nádobka s nasyceným roztokem anorganické soli pro zajištění požadované relativní vlhkosti vzduchu a testovaný vzorek plísně. V následující tabulce jsou uvedeny příklady používaných solí a relativní vlhkost nad jejich nasycenými roztoky.

Sůl	Teplota (°C)	Rel. vlhkost (%)
KNO ₃	22	95
NaCl	23	75
K ₂ CO ₃	23	43
LiCl·1H ₂ O	20	15

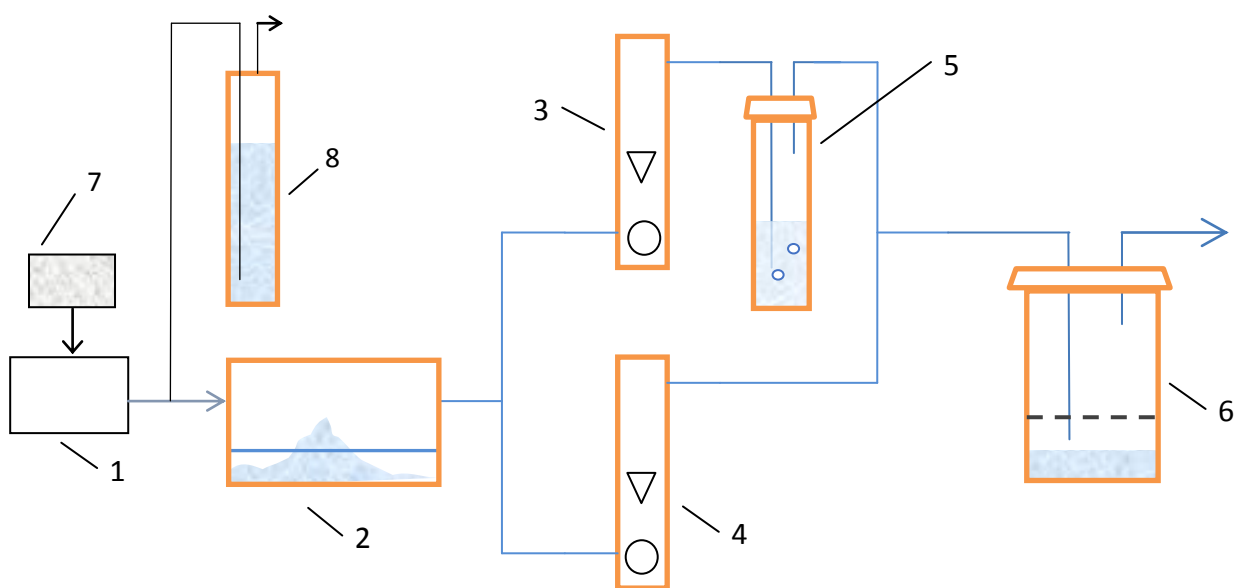
2.7.2. Testy ve zředěných parách (dynamická atmosféra)

Skladba linky, která umožní sledovat účinnost ředěných par EO za různých podmínek, je schematicky uvedena na obrázku 4.

Ze zdroje testované atmosféry, kterým je v případě plynu tlakový zásobník a v případě vzduchu malý kompresor (1) (např. vzduchovací kompresor pro akvária), jde plyn do nádoby (2) s nasyceným roztokem anorganické soli k dosažení potřebné relativní vlhkosti. Poté se proud plynu dělí do dvou větví opatřených rotametrem (3, 4) s regulací průtoku. Proud z rotametru (3) vstupuje do impingeru (probublávačky) (5) se zkoumanou esencí, kde se nasýtí jejími parami. Druhou větví prochází proud ředícího plynu, jehož průtok se reguluje rotametrem (4).

Naředěné páry esencí, u kterých je ředící poměr dán údaji rotametru (3) a (4), vstupují do testovací nádoby - exsikátoru (6), kde jsou na zvoleném substrátu umístěny vzorky plísni. Exsikátoru (6) může být v lince více za sebou, pak je vhodné, aby při vyšších vlhkostech byla na dně druhého a dalšího exsikátoru nádobka s roztokem příslušné soli stejné jako v nádobě (2). Důvodem je nutnost pokrýt úbytek vody v proudící atmosféře v důsledku její absorpce vloženými substráty. Při zařazení více exsikátorů za sebou je nutné počítat s lehce se snižující koncentrací par EO.

V případě použití vzduchu jako nosného plynu je linka rozšířena o filtr (7) a manostat (8). Filtr (7) (buď HEPA filtr nebo ručně vytvořený filtr, ve kterém vzduch prochází skrz několik vrstev buničiny a gázy) je umístěn na vstupu vzduchu do kompresoru (1) a brání kontaminaci prostředí v lince mikroorganismy. Manostat (8) slouží k zajištění konstantního tlaku vstupní atmosféry a je umístěn v lince za kompresorem (1). Je tvořen probublávačkou s definovanou výškou vodní hladiny, která určuje tlak v lince. Přebytný plyn odchází výstupem manostatu. K propojení objektů v lince byly použity teflonové hadičky, které nejlépe odolávají prostupu a tedy ztrátám par EO.



Obr. 4. Schéma testovací linky

1. Vzduchovací kompresor nebo stlačený plyn
2. Uzavřená nádoba s nasyceným vodním roztokem soli k nastavení požadované relativní vlhkosti
3. Rotametr s regulací průtoku vzduchu k nasycení složkami EO
4. Rotametr s regulací průtoku vzduchu k ředění nasycených par složek EO
5. Impinger (probublávačka) k syčení proudu vzduchu parami složek EO
6. Testovací exsikátor na vzorky s naočkovanými plísněmi
7. Filtr
8. Manostat

Pokud nalezneme v literatuře údaje o závislosti tenze par použitých esencí na teplotě, můžeme stanovit jejich koncentrace v proudící atmosféře linky při dané teplotě.

Příklad: Pro citral a linalylacetát

Tenze par z Antoineovy rovnice: $\log P = A - (B/T)$. Použity údaje z knihy Dykyj J. (1984)

Sloučenina	Koeficient A	Koeficient B	Tenze nasycených par při 23°C (Pa)	Teplotní rozsah platnosti
Citral	8,568	3184	6,56	10 – 60°C
Linalylacetát	8,254	3019	11,48	8 – 44°C

Za předpokladu ideálního chování lze z tenze nasycených par vypočítat koncentraci esence v nasycených parách v g/m^3 a tento údaj použít pro výpočty množství esencí protékající testovací linkou. Pro citral je při 23°C tato hodnota $0,406 \text{ g/m}^3$ a pro linalylacetát $0,916 \text{ g/m}^3$.

Při zjišťování, kolik esence se absorbuje v čase z testovací atmosféry do 26 g lepenky uložené v exsikátoru (6), je do linky dávkován vzduch nasycený parami směsí citral + linalylacetát (1 : 1) v množství 100 ml/min, tj. 6 l/hod. K proudu nasycených par je dále přidáno stejné množství čistého vzduchu, aby koncentrace par EO odpovídala 50% nasycení. Množství esencí ve směsi v plynné fázi odhadneme z údajů pro čisté složky. V případě poměru složek 1:1 jako průměrnou hodnotu koncentrací čistých složek. V případě jiného poměru jako vážený průměr. Viz následující tabulka.

Esence	teplota °C	průtok m^3/hod	konc. g/m^3	Proteklé množství esencí			
				g/hod	g/4 dny	g/7 dní	g/10 dní
Citral	23	0.006	0.406	0.00244	0.234	0.409	0.585
LA	23	0.006	0.916	0.00550	0.528	0.923	1.319
Cit + LA (odhad)	23	0.006	0.661	0.00397	0.381	0.666	0.952

Absorpce EO v lepence:

Období	Prošlé množství EO exsikátorem (g)	Přírůstek obsahu EO v 26 g lepenky* (g)	Přírůstek obsahu EO v 26 g lepenky vztahený na prošlé množství EO exsikátorem (%)
1. až 4. den	0.381	0.059	15.5
4. až 7. den	0.286	0.01	3.5
7. až 10. den	0.286	0.016	5.6

*) Analýza byla provedena v Ústavu analytické chemie ČAV Brno v rámci řešení tohoto projektu.

Z výsledku je patrné, že v prvních fázích působení esencí je proudící atmosféra o esence značně ochuzována zejména u povrchu porézní fáze, jakou je lepenka.

Z čísel vyplývá, že pokud by v exsikátoru (6) bylo kolem 169 g lepenky s dobře přístupným povrchem, prakticky veškerý vstupující EO by byl v ní v počáteční fázi absorbován. Tím si vysvětlujeme významné zpomalení účinku esencí na spory na porézních substrátech ve srovnání se skleněným povrchem, včetně zpomalení účinku na spory na skleněném povrchu v případě, že je ve společném prostoru současně přítomno větší množství porézního substrátu. Dále je možné odhadnout, že po 10 dnech za uvedených podmínek bude 1 kg knih absorbovat 3 až 4 g EO.

2.8 Výsledky vzorového experimentu

Podmínky testů:

Testovaná plíseň:	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
Testované EO (složky):	směs 1:1 citral a linalyl acetát, nasycené páry ředěny v poměru 1:1 se vzduchem
Teplota:	22°C
Atmosféra:	vzduch
Relativní vlhkost vzduchu:	45 %, 75 %
Koncentrace testovací suspenze zjištěná rozborem:	$1,1 \cdot 10^8$ spor/ml

Výsledky testů:

Výsledky testu na skleněném nosiči:

Počet živých spor v 1 ml suspenze smyté ze skleněného nosiče je uvedena v tabulce:

vzorek	doba působení EO (dny)		
	3	7	14
kontrola	$7,4 \cdot 10^4$	$7,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$
EO, 45%	$3,5 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$
EO, 75%	$1,6 \cdot 10^3$	0	0

Výsledky základního testu na papírovém nosiči:

Růst plísně na papírovém nosiči vyhodnocený podle vizuální stupnice růstu je uveden v tabulce:

vzorek	doba působení EO (dny)		
	3	7	14
kontrola	5	5	4,5
EO, 45%	5	4,5	4,5
EO, 75%	5	4	0

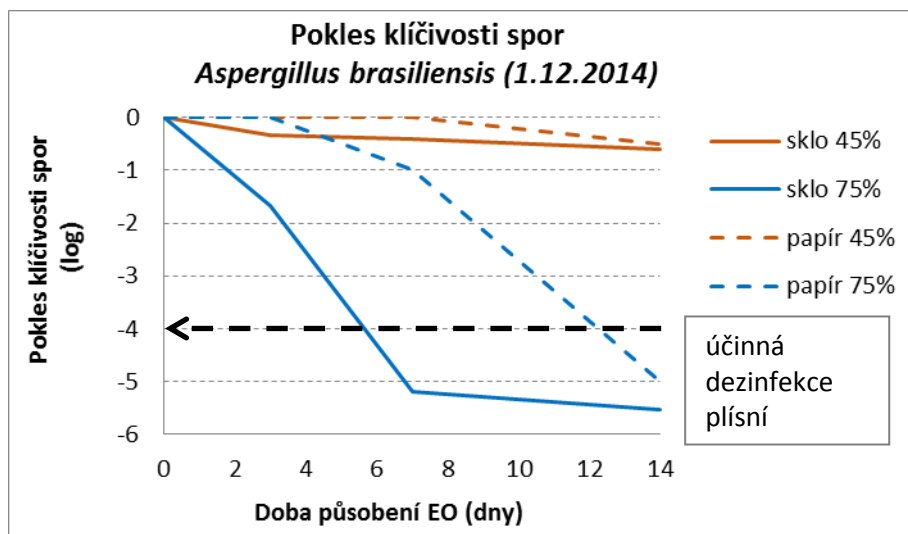
Výsledky komplexního testu na papírovém nosiči:

Počet papírových nosičů s různými koncentracemi spor získanými desítkovým ředěním, na kterých vyrostla plíseň, je uveden v tabulce:

vzorek	doba působení EO (dny)		
	3	7	14
kontrola	6*	6	6
EO, 45%	6	6	5,5 (pokles o 0,5 řádu)
EO, 75%	6	5 (pokles o 1 řád)	1** (pokles o 5 řádů)

*) Vyrostlo všech 6 koncentrací spor, **) Vyrostla pouze nejvyšší koncentrace spor

Graficky znázorněné výsledky testu spor na skleněném nosiči a komplexního testu spor na papírovém nosiči, které udávají, o kolik řádů poklesla životaschopnost spor ve vzorcích vystavených parami EO. Podle norem pro dezinfekci (ČSN EN 14562, AFNOR 1986) je u plísni nutný pokles alespoň o 4 řády.



Závěr: Při vyhodnocování účinku par EO po 14 dnech působení byla dosažena účinná dezinfekce při 75% relativní vlhkosti vzduchu, naopak při 45% relativní vlhkosti vzduchu byly podmínky neúčinné to na obou typech nosičů.

2.9 Návrh postupu při testování antimikrobiálního účinku EO

Pro hledání esencí použitelných jako dezinfekční látky a stanovování jejich antimikrobiální účinnosti navrhuje postup s těmito kroky:

- 1) **Výběr mikroorganismů** – použít 2 druhy plísní použité v metodice (*A. brasiliensis* a *P. aurantiogriseum*) a k nim připojit další z běžných mikrobiálních kontaminant daného prostředí včetně zástupce odolných druhů
- 2) **Výběr esenciálních olejů a jejich složek** – vybrat EO, u nichž byla pozorována antimikrobiální aktivita proti cílovým mikroorganismům či u kterých tuto aktivitu předpokládáme
- 3) **Výběr materiálů nosičů, které budou testovány**
- 4) **Pilotní testy v nasycených parách EO (2.7.1)** – test na skleněném nosiči (2.2), základní test na papírovém nosiči (2.3)
- 5) **Sestavení testovací linky (2.7.2) a nastavení podmínek** (koncentrace par, relativní vlhkost, složení atmosféry, rozmístění vzorků) – test na skleněném nosiči (2.2), základní test na papírovém nosiči (2.3)
- 6) **Testování mikroorganismů na různých nosičích (2.5), které se budou v daném prostředí vyskytovat** – základní a komplexní testy na papírovém nosiči (2.3, 2.4)

2.10 Seznam použité literatury

- AFNOR. NF T72-281. 1986. Procédes de desinfection des surfaces par voie aerienne. Francie.
- Ali, B.Z. 2007. Evaluation of Myrrh (Commiphora Molmol) Essential Oil Activity Against Some Storage Fungi. *J. Al-Nahrain Univ.*, **10**: 107–111.
- Camele, I., Altieri, L., de Martino, L., de Feo, V., Mancini, E. and Rana, G.L. 2012. In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**: 2290–2300.
- Cavanagh, H.M.A. 2007. Antifungal Activity of the Volatile Phase of Essential Oils: A Brief Review. *Nat. Prod. Commun.*, **2**: 1297–1302.
- ČSN EN 14562. 2006. Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška na nosiči ke stanovení fungicidního účinku nebo účinku proti kvasinkám pro lékařské nástroje – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/stupeň 2).
- Dykyj, J., Repáš, M., Svoboda, J. 1984. Tlak nasýtenej pary organických zlúčenín, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied.
- Florian, M. 1993. Conidial Fungi (Mould) Activity on Artifact Materials – A New Look at Prevention, Control, and Eradication. In: *ICOM Committee for Conservation*, pp. 868–874.
- Haleem Khan, a. a. and Mohan Karuppaiyil, S. 2012. Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi J. Biol. Sci.*, **19**: 405–426. King Saud University.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M. and Yamaguchi, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. **23**: 17–23.
- Laird, K. and Phillips, C. 2012. Vapour phase: A potential future use for essential oils as antimicrobials. *Lett. Appl. Microbiol.*, **54**: 169–174.
- Lang, G. and Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.*, **27**: 13–39.
- Librán, C.M., Moro, a., Zalacain, a., Molina, a., Carmona, M. and Berruga, M.I. 2013. Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **29**: 1179–1188.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. and Nerín, C. 2005. Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils : Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils : Susceptibility of Selected Foodborne Bacteria. *Society*, **53**: 6939–6946.
- Manso, S., Cacho-Nerín, F., Becerril, R. and Nerín, C. 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, **30**: 370–378. Elsevier Ltd.
- Mari, M., Leoni, O., Iori, R. and Cembali, T. 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathol.*, **51**: 231–236.
- Melgarejo-Flores, B.G., Ortega-Ramírez, L., Silva-Espinoza, B., González-Aguilar, G., Miranda, M.R. and Ayala-Zavala, J.F. 2013. Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil. *Postharvest Biol. Technol.*, **86**: 321–328. Elsevier B.V.
- Mishra, A.K. and Dubey, N.K. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1101–1105.
- Mishra, P.K., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A., Dubey, N.K. and Chanotiya, C.S. 2013. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **80**: 16–21. Elsevier Ltd.

- Moro, A., Librán, C.M., Berruga, M.I., Zalacain, A. and Carmona, M. 2013. Mycotoxicogenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. *J. Sci. Food Agric.*, **93**: 1112–1118.
- Pawar, V.C. and Thaker, V.S. 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, **49**: 316–323.
- Pibiri, M.C., Goel, a., Vahekeni, N. and Roulet, C. a. 2006. Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *Int. J. Aromather.*, **16**: 149–153.
- Pinheiro, a. C., Macedo, M.F., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., Viegas, C., Brandão, J., *et al.* 2011. Mould and yeast identification in archival settings: Preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **65**: 619–627. Elsevier Ltd.
- Rakotonirainy, M.S. and Dubar, P. 2013. Application of bioluminescence ATP measurement for evaluation of fungal viability of foxing spots on old documents. *Luminescence*, **28**: 308–312.
- Rakotonirainy, M.S., Héraud, C. and Lavédrine, B. 2003. Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*, **18**: 113–121.
- Rakotonirainy, M.S. and Lavédrine, B. 2005. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **55**: 141–147.
- Roussel, S., Reboux, G., Millon, L., Parchas, M.D., Boudih, S., Skana, F., *et al.* 2012. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air*, **22**: 514–522.
- Sakr, A.A., Ghaly, M.F. and Abdel-Haliem, M.E.S.F. 2012. The efficacy of specific essential oils on yeasts isolated from the royal tomb paintings at Tanis, Egypt. *Int. J. Conserv. Sci.*, **3**: 87–92.
- Sellamuthu, P.S., Sivakumar, D. and Soundy, P. 2013. Antifungal Activity and Chemical Composition of Thyme, Peppermint and Citronella Oils in Vapor Phase against Avocado and Peach Postharvest Pathogens. *J. Food Saf.*, **33**: 86–93.
- Sequeira, S., Cabrita, E.J. and Macedo, M.F. 2012. Antifungals on paper conservation: An overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **74**: 67–86. Elsevier Ltd.
- Tullio, V., Nostro, a., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M. a., *et al.* 2007. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J. Appl. Microbiol.*, **102**: 1544–1550.
- Tyagi, A.K. and Malik, A. 2010. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement. Altern. Med.*, **10**: 65.
- Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A. and Efthimiadou, A. 2013. Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, **41**: 86–92.
- Zotti, M., Ferroni, a. and Calvini, P. 2008. Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **62**: 186–194.