

Tomasz Sawoszczuk
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie

Ocena możliwości zastosowania analizy lotnych związków organicznych do detekcji aktywności mikrobiologicznej na przykładzie badań przeprowadzonych w Muzeum Narodowym w Krakowie*

Streszczenie

W ramach badań lotnych związków organicznych (LZO) w powietrzu wybranych pomieszczeń Muzeum Narodowego w Krakowie przeprowadzono ocenę możliwości zastosowania analizy tych związków do detekcji aktywności mikrobiologicznej grzybów pleśniowych. Podstawnym założeniem przyjętym w tej metodzie jest możliwość wykrycia

* Składam serdeczne podziękowania Głównemu Konserwatorowi Muzeum Narodowego w Krakowie Panu Januszowi Czopowi za udostępnienie pomieszczeń muzeum do przeprowadzenia pomiarów. Wyniki opublikowane w niniejszym artykule, uzyskane z pomiarów lotnych związków organicznych oraz z analiz mikrobiologicznych [Mycoteam 2007], pochodzą z badań wykonanych w Muzeum Narodowym w Krakowie, w ramach projektu Unii Europejskiej A-BIOS (FP6-SME-032192) „An innovative technology, based on UV radiation, to strongly reduce the microbial activity of the air inside the store rooms of the cultural heritage conservation institutes”. Dziękuję również Panu drowi hab. Tomaszowi Łojewskiemu za cenne wskazówki udzielone w trakcie prowadzenia pomiarów.

obecności pleśni w określonym miejscu na podstawie zidentyfikowanych w powietrzu tzw. mikrobiologicznych lotnych związków organicznych (MLZO), które są emitowane przez grzyby do otoczenia. Taka analiza eliminuje potrzebę prowadzenia klasycznych, długotrwałych analiz mikrobiologicznych.

Zestawienie wyników badań LZO oraz analiz mikrobiologicznych w połączeniu z danymi literaturowymi pozwoliło udowodnić, że w przypadku zbadanych pomieszczeń istnieje zależność między zidentyfikowanymi w nich gatunkami pleśni a MLZO obecnymi w powietrzu. Potwierdza to możliwość zastosowania badań tych związków do detekcji aktywności mikrobiologicznej, przy czym metodyka tych badań wymaga dopracowania.

Słowa kluczowe: MLZO, chromatografia gazowa, grzyby pleśniowe, skażenie mikrobiologiczne.

1. Wprowadzenie

Papier, drewno, tkaniny, pergamin, skóra, wosk, tworzywa sztuczne, metale i ich stopy to materiały powszechnie spotykane w obiektach zabytkowych, przechowywanych w różnych muzeach. Obiekty te zagrożone są degradacją, która może być spowodowana działaniem zarówno czynników zewnętrznych – temperatury [Zou, Uesakai i Gurnagul 1996], wilgotności względnej [Barański *et al.* 2001], światła [Haillant, Fromageot i Lemaire 2005], zanieczyszczenia środowiska [Havermans *et al.* 1994], mikroorganizmów [Szostak-Kot i Sygula-Cholewinska 2012], jak i wewnętrznych, w tym głównie skład chemiczny. Większość z wymienionych czynników determinuje fizykochemiczną degradację obiektów zabytkowych, natomiast mikroorganizmy odpowiedzialne są za ich tzw. biodeteriorację. Zadaniem każdego muzeum jest nie tylko ekspozycja zbiorów, ale również ich skrupulatna ochrona przed niszczeniem, które może być konsekwencją zjawisk fizykochemicznych, biodeterioracji bądź obu tych czynników równocześnie. Działania prewencyjne muszą być podejmowane na etapie magazynowania, konserwacji, transportu, ekspozycji i ponownego magazynowania obiektów. W przypadku czynników fizycznych, takich jak: temperatura, wilgotność i światło zabezpieczenie obiektów może być realizowane poprzez zapewnienie odpowiednich warunków mikroklimatycznych dobranych właściwie do specyficznych wymagań, przewidzianych dla obiektów wykonanych z określonego materiału (należy tu zaliczyć także dobór odpowiedniego natężenia światła) [Florian 2002, Camuffo *et al.* 2001, Thomson 1994, ASHRAE 2007]. Bardzo pomocne w opracowaniu właściwych parametrów mikroklimatu, który powinien być utrzymywany w pomieszczeniach muzealnych, mogą być wytyczne przedstawione przez Amerykańskie Stowarzyszenie Inżynierów Ogrzewnictwa Chłodnictwa, Wentylacji i Klimatyzacji [ASHRAE 2007]. Wytyczne te obejmują pięć głównych klas

mikroklimatu AA, A, B, C, D oraz trzy klasy dodatkowe, w tym dwie obejmujące obiekty zagrożone degradacją chemiczną (niskotemperaturowe przechowywanie) i jedna przeznaczona dla obiektów wykonanych z metalu (suche przechowywanie). Prewencja obiektów przed działaniem zanieczyszczeń gazowych środowiska, tj. NO_x , SO_2 , O_3 , lotne kwasy organiczne, może być realizowana poprzez zastosowanie odpowiednich filtrów w systemach wentylacyjnych w muzeach, opracowanie systemów wykorzystujących sorbenty lub poprzez użycie szczelnych gablot z kontrolowaną, modyfikowaną atmosferą. Czynniki wewnętrzne przyczyniające się do degradacji obiektów zabytkowych, jak np. zawartość kwasów, mogą być eliminowane w trakcie zabiegów konserwatorskich. Dużym wyzwaniem dla muzeów jest zabezpieczenie obiektów przed biodeterioracją spowodowaną działalnością bakterii i grzybów.

2. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza w muzeach.

Metody analizy

Mikroorganizmy występujące w powietrzu pomieszczeń muzealnych mogą pochodzić z różnych źródeł. Przedostają się one do powietrza z zainfekowanych obiektów historycznych, z materiałów zastosowanych do konstrukcji gablot wystawienniczych, z zainfekowanych konstrukcji budowlanych. Drobnoustroje są również wprowadzane do wnętrza muzeów poprzez niesprawne, nieczyszczone lub niewłaściwie skonstruowane systemy wentylacji i klimatyzacji, przez okna i drzwi, jak również przez pracowników i zwiedzających. Dla zobrazowania skali zanieczyszczenia powietrza mikroorganizmami warto wspomnieć, że ilość sporów grzybów obecna w 1 g kurzu w powietrzu pomieszczeń zamkniętych wynosi od $6 \cdot 10^3$ do $3,2 \cdot 10^6$ cfu (*cfu* – *colony forming unit*) [Korpi *et al.* 1997]. Niewłaściwie działający system ogrzewania, klimatyzacji czy wentylacji może doprowadzać do gwałtownych skoków wartości temperatury i wilgotności powietrza, stwarzając poważne ryzyko rozwoju tych mikroorganizmów, np. na powierzchni obiektów zabytkowych [Camuffo i in. 2001, Martens 2012]. Podobnie dużym zagrożeniem są znaczące, długo utrzymujące się sezonowe zmiany parametrów mikroklimatu wewnątrz pomieszczeń muzealnych, które również mogą sprzyjać rozwojowi drobnoustrojów. Wskazuje to, jak ważne jest utrzymywanie w muzeach parametrów mikroklimatu opracowanych przez ASHRAE, w celu ograniczenia lub też zatrzymania procesów biodeterioracji obiektów zabytkowych.

Biodeterioracja jest jednym z zasadniczych zagrożeń dla trwałości obiektów zabytkowych. Jest ona spowodowana głównie aktywnością grzybów pleśniowych. Dlatego stworzenie narzędzia wczesnego wykrywania ich obecności w obiektach

jest priorytetowym zadaniem przy projektowaniu systemowej ochrony zbiorów w muzeach.

Obecnie stosowane techniki detekcji pleśni oparte są głównie na metodach wizualnych lub na klasycznych, długotrwałych testach mikrobiologicznych. W przypadku stosowania obu tych metod wykrycie istniejącego skażenia mikrobiologicznego jest niemożliwe w sytuacji, gdy pleśnie rosną w miejscach trudno dostępnych lub są w początkowej fazie wzrostu, przed okresem sporulacji. Alternatywną metodą detekcji grzybów pleśniowych w tym przypadku jest analiza emitowanych przez nie tzw. mikrobiologicznych lotnych związków organicznych (MLZO). MLZO są produktami metabolizmu m.in. grzybów pleśniowych, emitowanymi we wszystkich etapach ich wzrostu i rozwoju. Związki te mogą dyfundować do otoczenia nawet przez złożone struktury czy powłoki. Dlatego właśnie obecność grzybów pleśniowych może być potwierdzona tą metodą również wtedy, gdy rosną one w miejscach odizolowanych, podczas gdy analiza powietrza prowadzona metodami mikrobiologicznymi wykluczy ich występowanie [Kuske, Romain i Nicolas 2005, Hess-Kosa 2002]. Dodatkowym argumentem za prowadzeniem badań z użyciem MLZO może być fakt, że niektórzy autorzy wykorzystujący klasyczną metodę detekcji mikroorganizmów w pomieszczeniach (hodowla na pożywkach) czasami nie stwierdzają różnic w stężeniu form przetrwalnikowych grzybów w powietrzu pomieszczeń zainfekowanych i niezainfekowanych przez grzyby. Natomiast analiza obecności MLZO pozwala wskazać, które z miejsc jest zainfekowane [Sunesson *et al.* 1996]. Warto podkreślić, że zaproponowana metoda nie wymaga poboru próbek ze skażonego obiektu (bezszykowa metoda niedestrukcyjna), jak również specjalnego przygotowania badanej powierzchni.

Pomimo wielu zalet przypisywanych metodzie detekcji aktywności mikrobiologicznej opartej na analizie MLZO należy również wskazać jej ograniczenia. W pierwszej kolejności trzeba podkreślić, że spośród ponad 300 lotnych związków organicznych wykrywanych w różnych pomieszczeniach tylko pewną część stanowią związki produkowane przez mikroorganizmy [Wilkins, Larsen i Simkus 2000]. Ponadto wśród nich pewną pulę mogą stanowić związki, które są emitowane również z materiałów budowlanych i wykończeniowych. Możliwa jest także sytuacja, że dana grupa lotnych związków organicznych emitowana jest przez więcej niż jeden gatunek pleśni obecny w pomieszczeniu. Dlatego badania pomieszczeń, w których oceniana jest emisja MLZO, muszą zawsze uwzględniać stężenia i skład lotnych związków organicznych (LZO) na zewnątrz budynku oraz w niezainfekowanym przez grzyby pomieszczeniu (jako odniesienie).

Ponadto wykorzystanie analizy MLZO do detekcji aktywności mikrobiologicznej w danym pomieszczeniu wydaje się możliwe dopiero po uprzednim ustaleniu, w warunkach laboratoryjnych, składu lotnych związków organicznych

emitowanych przez różne gatunki pleśni, które hodowane są przy zachowaniu parametrów mikroklimatu najbardziej zbliżonych do panujących w badanym pomieszczeniu i na próbkach o takim samym składzie, jak materiały w nim występujące. Przeprowadzona w ten sposób kalibracja pozwoli zbudować bazę wzorcowych MLZO emitowanych przez zbadany gatunek grzyba.

Prowadząc analizę MLZO, należy wziąć pod uwagę kilka czynników, które mogą mieć istotny wpływ na wynik oznaczenia tych związków:

- ustalony skład MLZO może zależeć od metody poboru próbek [Wilkins i Larsen 1995] oraz od użytej techniki analitycznej. Przeprowadzone badania wykazały, że większość stosowanych technik jest bardziej czuła na związki polarne [Pasanen *et al.* 1998] i to one głównie będą wykrywane;

- dostępne metody poboru próbek są mało uniwersalne i nie pozwalają na pobór niektórych związków, tj. nadtlenków czy produktów reakcji MLZO z ozonem i tlenkami azotu [Wolkoff i Nielsen 2001];

- niektóre lotne związki organiczne produkowane przez mikroorganizmy ulegają w atmosferze szybkiemu utlenieniu [Wilkins, Larsen i Simkus 2000], głównie do alkoholi, aldehydów i ketonów, dlatego ważne jest, jak daleko od źródła emisji (od grzybni) pobierana jest próbka. Im bliżej powierzchni zainfekowanej, tym mniej lotnych związków organicznych występuje w formie utlenionej. W związku z tym, zidentyfikowany w danym pomieszczeniu skład MLZO może różnić się od składu ustalonego dla danego gatunku, rosnącego na tym samym podłożu w warunkach laboratoryjnych.

Skład oraz ilość MLZO emitowanych przez grzyby pleśniowe występujące w danym pomieszczeniu zależy także od ich metabolizmu. W nielicznych przypadkach stwierdzano, że suma stężeń lotnych związków organicznych w pomieszczeniu niezainfekowanym i zaatakowanym przez pleśń była bardzo zbliżona. Szczegółowe pomiary wykazały, że przyczyną tego podobieństwa może być zjawisko znacząco obniżonej emisji aldehydów w pokoju zainfekowanym, spowodowane zatrzymywaniem tych związków w strukturze grzybni [Pasanen *et al.* 1998].

3. Metody poboru próbek oraz techniki analityczne wykorzystywane w badaniach MLZO

Pobór próbek MLZO do badań aktywności mikrobiologicznej może być wykonany różnymi technikami. Najczęściej stosowane są:

- pobór próbek do rurki sorpcyjnej [Sunesson *et al.* 1996, Wilkins, Larsen i Simkus 2000, Wilkins i Larsen 1995, Betancourt *et al.* 2013]. Technika ta polega na adsorpcji oznaczanych związków na złożu sorbentu umieszczonego wewnątrz

stalowej lub szklanej rurki. Często stosowanymi sorbentami są Tenax TA oraz Carbopack B. Próbkę może być pobierana w sposób aktywny – pompowanie powietrza przez złożę sorbentu, lub pasywny – ekspozycja złoża w powietrzu badanego pomieszczenia. Analiza zaadsorbowanych w rurce związków następuje po ich desorpcji w desorberze termicznym, z którego są one następnie przesyłane linią transferową na kolumnę w chromatografii gazowym;

– mikroekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Microextraction* – SPME) [Polizzi *et al.* 2012, Lancker *et al.* 2008, Fiedler, Schütz i Geh 2001, Wady *et al.* 2003, Lavine *et al.* 2012]. Próbkę adsorbowana jest w tym przypadku na niewielkiej ilości sorbentu umieszczonego na końcu stalowej igły. Igła z sorbentem chowana jest przed i po pobraniu próbki w osłonce. Całość nosi nazwę włókno SPME. Pobór związków odbywa się w sposób pasywny – po wysunięciu igły z osłonki sorbent ma kontakt z badaną atmosferą. Zaadsorbowane na nim związki są następnie uwalniane drogą desorpcji termicznej w porcie iniekcyjnym chromatografu gazowego. Zasadniczą zaletą techniki SPME ze względu na niewielki rozmiar włókna jest możliwość poboru próbek lotnych związków organicznych bezpośrednio z powierzchni grzybni rosnącej na materiale poprzez umieszczenie włókna tuż powyżej grzybni. Zastosowanie tej metody w sposób prawie kontaktowy pozwala na zredukowanie wpływu emisji związków z otoczenia oraz uniknięcie zjawiska rozcieńczenia MLZO w wyniku ich dyfuzji do otoczenia. Ponadto technika SPME umożliwia pozyskanie próbki odniesienia prostą metodą poprzez przyłożenie włókna do miejsca niezainfekowanego przez grzyby pleśniowe (układ realny w muzeum) lub do materiału niezaszczepionego pleśnią (układ modelowy w laboratorium).

Spośród wielu dostępnych metod analitycznych w analizie jakościowej, jak i ilościowej lotnych związków organicznych produkowanych przez mikroorganizmy (MLZO) wykorzystuje się głównie chromatografię gazową [Gutnarowska i Piotrowska 2007, Nielsen 2003, Polizzi *et al.* 2012]. Wybór tej techniki wydaje się zrozumiały, kiedy uwzględnimy stan skupienia analizowanych próbek, a przede wszystkim możliwe do zastosowania metody ich poboru (opisane powyżej). Znacznie rzadziej stosowaną techniką jest chromatografia cieczowa [Nielsen 2003]. Natomiast coraz większą popularność zdobywa obecnie nowa technika analizy lotnych związków organicznych w powietrzu, z wykorzystaniem tzw. nosa elektronicznego (*electronic nose* – E-nose). Według niektórych autorów wydaje się ona szczególnie użyteczna do oznaczania MLZO [Kuske, Romain i Nicolas 2005, Canhoto *et al.* 2004].

Materiały najczęściej wykorzystywane do hodowli grzybów pleśniowych w badaniach MLZO

Do hodowli grzybów pleśniowych w badaniach MLZO są stosowane takie materiały, jak:

- płyta kartonowo gipsowa [Wady *et al.* 2004, Sunesson *et al.* 1996, Pasanen *et al.* 1998],
- wełna mineralna [Wady *et al.* 2004, Sunesson *et al.* 1996, Pasanen *et al.* 1998],
- papier, tapeta [Canhoto *et al.* 2004, Pasanen *et al.* 1998],
- drewno sosnowe [Sunesson *et al.* 1996],
- tektura [Wilkins, Larsen i Simkus 2000],
- drewno brzoźowe [Fiedler, Schütz i Geh 2001],
- płyta wiórowa [Pasanen *et al.* 1998].

Z przedstawionego zestawienia wynika, że najczęściej stosowanymi materiałami, na których prowadzi się hodowle mikroorganizmów, są materiały budowlane i wykończeniowe używane w pomieszczeniach mieszkalnych. Wybór ten podyktowany jest faktem, że wzrost mikroorganizmów wewnątrz budynków bardzo często wiązany jest z problemami zdrowotnymi zamieszkujących je ludzi, tzw. syndrom chorego budynku (*Sick Building Syndrome*). Niewątpliwie w sytuacji zagrożenia zdrowia ludzkiego ważna jest szybka detekcja aktywności mikrobiologicznej. Jest to wyzwanie w przypadku stosowania klasycznego testu mikrobiologicznego (z posiewem sporów pobranych z powietrza, następnie hodowlą i identyfikacją mikroorganizmów), ponieważ jest on długotrwały. Poza tym sposób poboru próbek do tego typu badań nie gwarantuje detekcji mikroorganizmów, które ze względu na miejsce występowania (np. pod tapetami, w szczelinach muru) nie uwalniają spor do otoczenia. Proponowana alternatywna metoda, tj. identyfikacja aktywności mikrobiologicznej na podstawie pomiarów MLZO, jest szybka i zapewnia detekcję mikroorganizmów żyjących w miejscach ukrytych i izolowanych. Dysponując wiedzą, jakie pleśnie odpowiedzialne są za emisję określonych MLZO, można szybko potwierdzić lub wykluczyć ich obecność w badanym miejscu.

Oprócz materiałów budowlanych w badaniach nad wykorzystaniem MLZO do detekcji grzybów pleśniowych stosuje się również inne materiały, np. papier, w analizie aktywności mikrobiologicznej w magazynach zbiorów bibliotecznych [Canhoto *et al.* 2004]. Wyniki tych pomiarów były inspiracją do podjęcia badań, przeprowadzonych w wybranych pomieszczeniach Muzeum Narodowego w Krakowie, dotyczących możliwości zastosowania analizy MLZO do wykrywania aktywności mikrobiologicznej, w miejscach przechowywania lub ekspozycji obiektów zabytkowych.

4. Pomiarы wykonane w Muzeum Narodowym w Krakowie

Charakterystyka próbek oraz zastosowanej metody analitycznej

Próbki powietrza do analizy lotnych związków organicznych, z uwzględnieniem MLZO, pobrano w czterech pomieszczeniach Muzeum Narodowego w Krakowie. Pomiarы przeprowadzono w okresie wiosennym 2007 r. Zbadane pomieszczenia można scharakteryzować w następujący sposób:

– pokój japoński w Domu Józefa Mehoffera (oddział MNK). Pokój nieudostępniony do zwiedzania, możliwość oglądania tylko przez otwarte drzwi. Okna w pomieszczeniu są nieszczelne, zasłonięte prawie przez cały rok. Pomieszczenie ogrzewane w okresie zimowym. Podłoga w pokoju wyłożona klepką drewnianą. W pomieszczeniu znajduje się szafa, kredens japoński z intarsjami, szafka biblioteczna z książkami, stół z politurą, stolik nocny z lampką, krzesło, łóżko; na ścianach obrazy, na stole mosiężna rzeźba;

– pokój Tomickiego w Pałacu Biskupa Erazma Ciołka. Pokój nieudostępniony do zwiedzania, tuż po remoncie, restauracji fresków na ścianach i wymianie podłogi. Pomieszczenia obok w trakcie remontu;

– piwnice Pałacu Biskupa Erazma Ciołka. Wejście do piwnic znajduje się od strony dziedzińca pałacowego. Tuż po wejściu do piwnic uwagę zwraca charakterystyczny stęchły zapach. Piwnice nie są ogrzewane, panuje w nich półmrok (oświetlenie naturalne). Ściany kamienno-ceglane (po oczyszczeniu), podłoga wyłożona klepką terakotową (po wymianie). W piwnicach panuje dość duża wilgotność;

– magazyn w Domu Jana Matejki. Pomieszczenie znajduje się na parterze budynku przy ul. Floriańskiej w Krakowie. Pokój lekko zacieniony stanowi pomieszczenie magazynowe, składowane są w nim ramy, obrazy oraz wiele innych obiektów zabytkowych. W pokoju znajdują się stare meble. Podłoga wyłożona drewnianą klepką.

Metodyka poboru próbek

Pobór próbek wykonywano zgodnie z zaleceniami normy EPA MO T-17 [EPA MO T-17 1999] przy użyciu rurek wypełnionych sorbentem. Łącznie w każdym z badanych pomieszczeń pobrano trzy próby:

- jedną próbę „ślepą” (ekspozycja pasywna rurek z sorbentem przez 5 sekund),
- oraz dwie próby poprzez przepompowanie przez złożę rurek (pobór aktywny), dwa razy po piętnaście litrów powietrza.

Metodyka pomiarów

Aparatura:

- rurki wypełnione sorbentem – Carbopack B, na którym adsorbują się lotne związki organiczne (węglowodory C5 do C12 oraz szeroki zakres LZO),
- pompka do poboru powietrza firmy SKC, model PocketPump, zakres pracy 10–250 ml/min,
- przepływomierz (rotametr),
- desorber termiczny (TD) firmy PerkinElmer, model TurboMatrix 300, służący do desorpcji i transferu analitów z rurki sorpcyjnej do chromatografu,
- chromatograf gazowy (GC) firmy Thermo (rozdziół analizowanych substancji), kolumna Restek Rtx-5MS,
- spektrometr masowy (MS) firmy Thermo (identyfikacja rozdzielonych substancji).

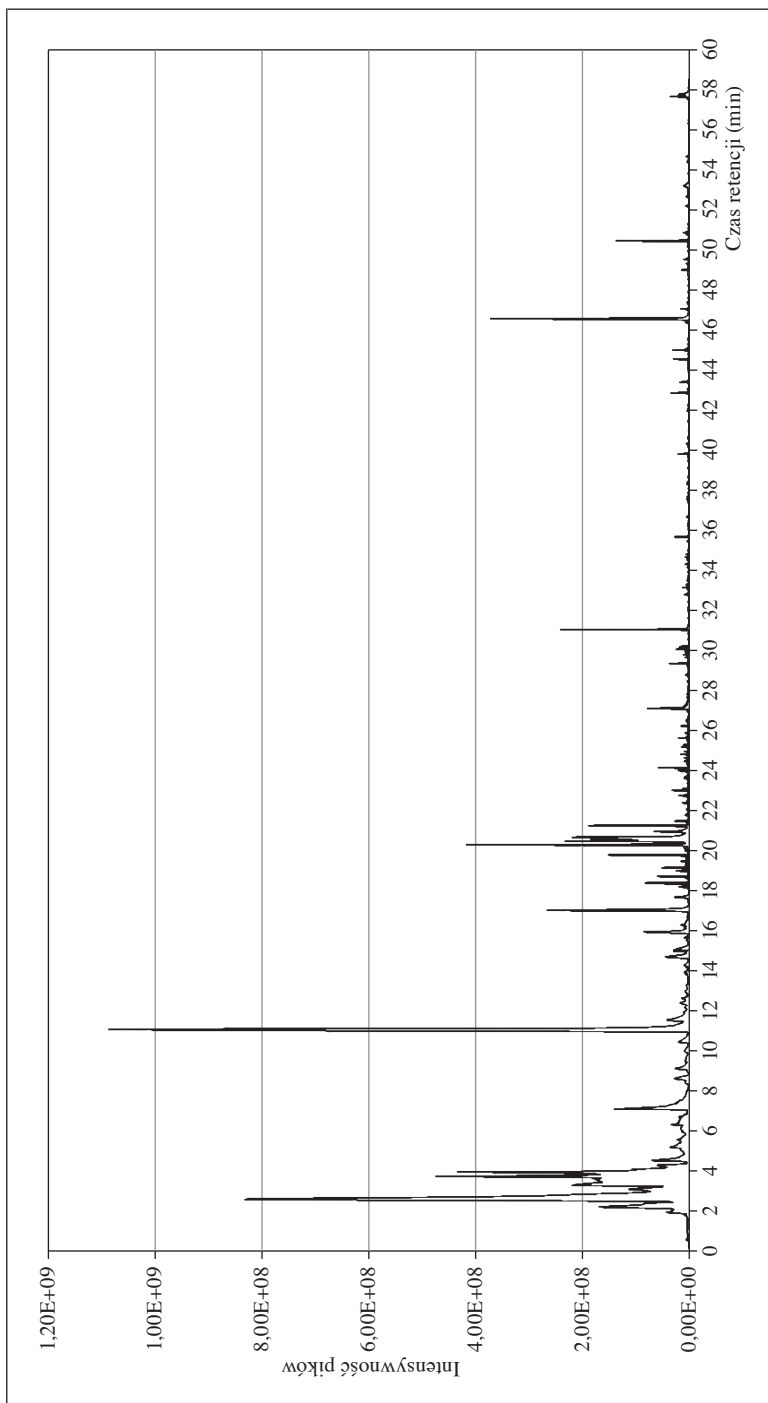
Warunki przeprowadzenia analizy próbek LZO pobranych do rurek sorpcyjnych

Analiza próbek LZO pobranych do rurek sorpcyjnych w każdym z badanych pomieszczeń prowadzona była w zestawie desorber termiczny – chromatograf gazowy – spektrometr masowy (detektor). Program temperaturowy pracy każdego z elementów zestawu w trakcie prowadzenia analizy był następujący:

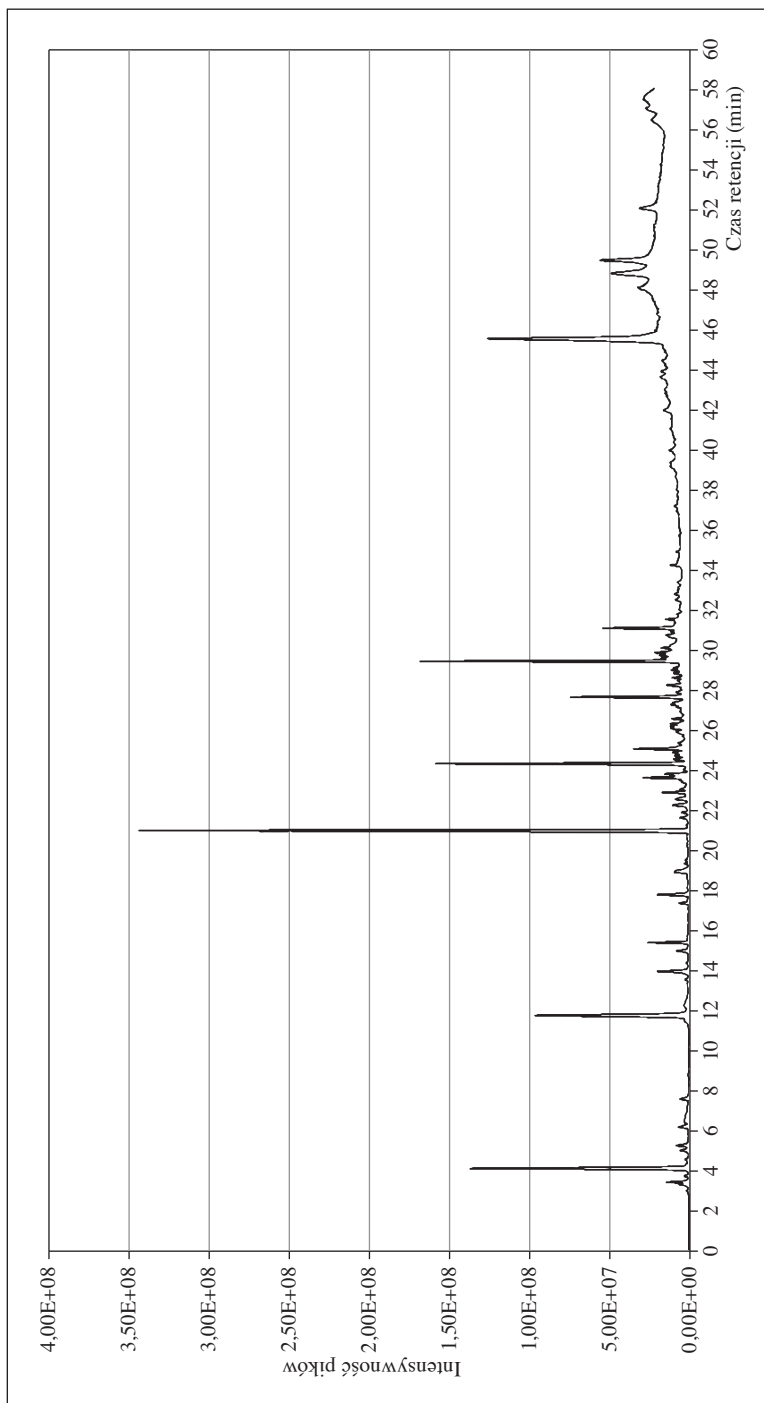
- desorber termiczny – TD: pierwotna desorpcja próbki z rurki sorpcyjnej w 220°C przez 10 min z równoczesną kondensacją analizowanych związków w zimnej pułapce (–30°C), wtórna desorpcja analitów z zimnej pułapki do kolumny chromatograficznej poprzez wygrzanie od –30 do 220°C z prędkością 99°C/s,
- chromatograf gazowy – GC: przez pierwsze 10 min 30°C, wzrost temperatury od 30 do 220°C z prędkością 5°C/min; 220°C utrzymywane przez 10 min, prędkość przepływu helu w kolumnie 1 ml/min,
- spektrometr masowy – MS: temperatura źródła jonów 250°C, energia elektronów 70eV.

Wyniki

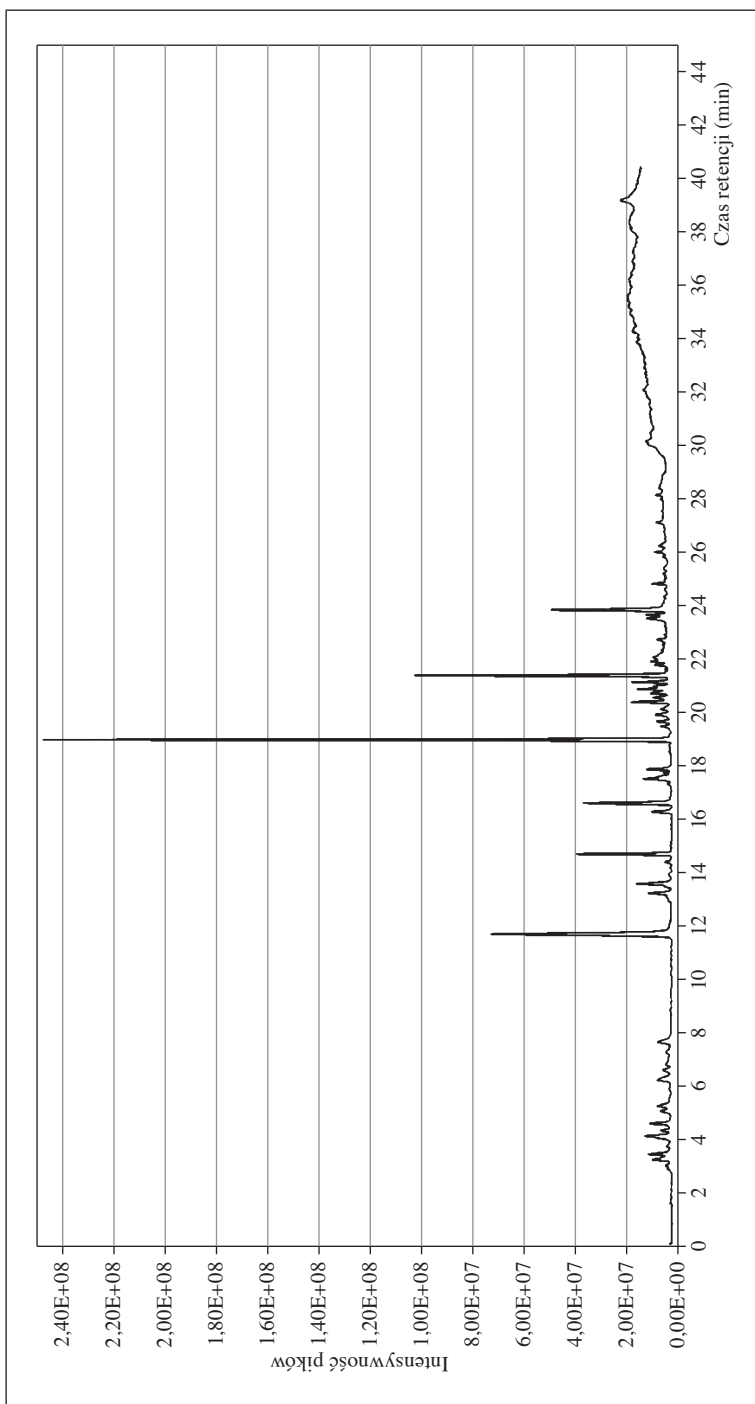
Jako wynik analizy próbek lotnych związków organicznych, prowadzonej w układzie desorber termiczny – chromatograf gazowy – spektrometr masowy, uzyskano chromatogramy odpowiednio dla każdego zbadanego pomieszczenia (rys. 1–4). Poszczególne chromatogramy poddano analizie jakościowej na podstawie widm masowych zarejestrowanych dla każdego z pików otrzymanych na chromatogramie. Widma masowe uzyskano dla wszystkich związków rozdzielonych w chromatografii gazowej, jako efekt ich analizy zachodzącej w detektorze masowym (MS), sprzężonym z chromatografem.



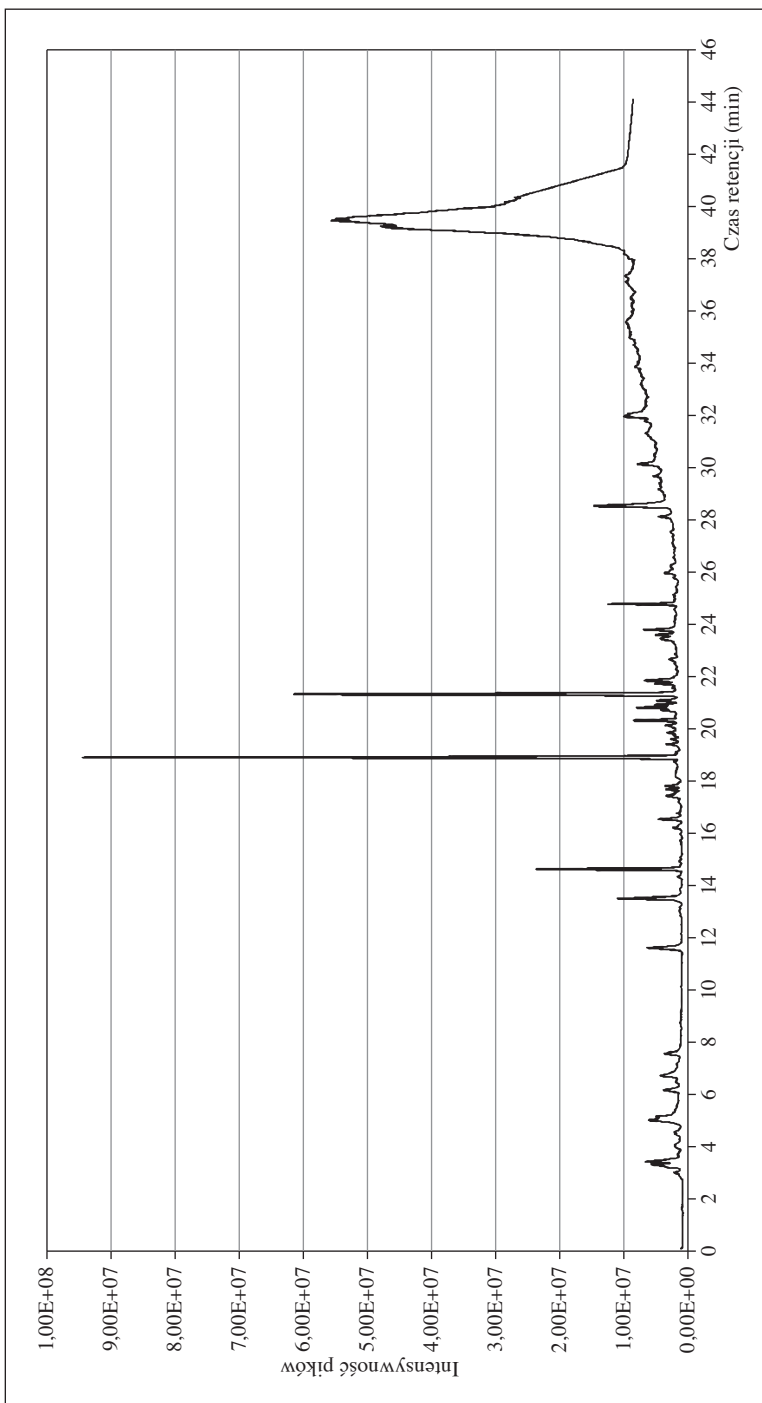
Rys. 1. Chromatogram uzyskany dla próbki pierwszej pobranej w pokoju japońskim w Domu Józefa Mehoffera
Źródło: opracowanie własne.



Rys. 2. Chromatogram uzyskany dla próbki pierwsze, pobranej w pokoju Tomickiego w Pałacu Biskupa Erazma Ciołka
Źródło: opracowanie własne.



Rys. 3. Chromatogram uzyskany dla próbki pierwsze, pobranej w piwnicach Pałacu Biskupa Erazma Ciołka
Źródło: opracowanie własne.



Rys. 4. Chromatogram uzyskany dla próbki pierwszej pobranej w magazynie na terenie Domu Jana Matejki
Źródło: opracowanie własne.

W trakcie analizy jakościowej prowadzonej dla poszczególnych chromatogramów zwrócono szczególną uwagę na związki, które są referowane w literaturze jako mikrobiologiczne lotne związki organiczne emitowane przez różne gatunki grzybów pleśniowych rosnących na różnych podłożach. W poniższych tabelach zamieszczono wykaz potencjalnych MLZO, które zostały zidentyfikowane w powietrzu badanych pomieszczeń (tabela 1–4). Przy czym przy identyfikacji założono, że analizie poddawane są tylko związki, dla których wyliczony automatycznie w programie stosunek sygnału (wysokość pików) do szumu wynosi co najmniej 5:1 (stężenie powyżej poziomu detekcji) oraz dla których prawdopodobieństwo identyfikacji na bazie widm masowych związków chemicznych przypisanej do detektora masowego wynosi powyżej 70%.

Tabela 1. MLZO zidentyfikowane w pokoju japońskim w Domu Józefa Mehoffera

Czas retencji (min)	Procentowy udział pola powierzchni pod pikiem w stosunku do sumy pól powierzchni pod wszystkimi pikami w chromatogramie	Nazwa
3,86	5,0	1-butanol
4,20	0,4	3-metylo-2-butanon
14,61	0,8	cykloheksanol
14,91	0,2	cykloheksanon
15,84	1,1	2-butoksy etanol
16,94	2,9	α -pinen
21,16	1,0	d-limonen
24,04	0,2	Nonanal
27,00	0,7	terpineol
50,35	0,7	ester butylowy kwasu dodekanowego

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 2. MLZO zidentyfikowane w pokoju Tomickiego w Pałacu Biskupa Ciołka

Czas retencji (min)	Procentowy udział pola powierzchni pod pikiem w stosunku do sumy pól powierzchni pod wszystkimi pikami w chromatogramie	Nazwa
4,08	8,9	ester metylowy kwasu 2-propylo-propanowego
7,55	0,4	3-metylobutanal
13,93	1,4	heksanal

cd. tabeli 2

Czas retencji (min)	Procentowy udział pola powierzchni pod pikiem w stosunku do sumy pól powierzchni pod wszystkimi pikami w chromatogramie	Nazwa
18,89	1,1	α -pinen
20,95	20,0	1R- α -pinen
24,29	8,8	terpen
25,02	3,2	limonen

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 3. MLZO zidentyfikowane w piwnicach Pałacu Biskupa Ciołka

Czas retencji (min)	Procentowy udział pola powierzchni pod pikiem w stosunku do sumy pól powierzchni pod wszystkimi pikami w chromatogramie	Nazwa
3,40	2,2	aceton
4,06	1,8	2,3-dimetylobutan
4,28	0,5	3-metylopentan
5,19	1,2	metylocyklopentan
13,16	1,6	2,4-dimetylo-3-pentanon
13,52	2,2	heksanal
17,81	1,4	heptanal
18,90	25,9	α -pinen
19,58	0,7	2-etyloheksanal
21,07	1,4	oktanal
23,77	5,2	nonanal

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 4. MLZO zidentyfikowane w magazynie znajdującym się w Domu Jana Matejki

Czas retencji (min)	Procentowy udział pola powierzchni pod pikiem w stosunku do sumy pól powierzchni pod wszystkimi pikami w chromatogramie	Nazwa
3,24	1,4	2-metylobutan
7,49	0,7	3-metylobutanal
13,44	2,2	heksanal
17,61	0,3	nonan
17,77	0,5	pirydyna

cd. tabeli 4

Czas retencji (min)	Procentowy udział pola powierzchni pod pikami w stosunku do sumy pól powierzchni pod wszystkimi pikami w chromatogramie	Nazwa
18,84	14,1	α -pinen
21,01	0,6	oktanal
21,27	9,4	karen
21,66	0,6	cymen
21,78	1,5	myrcen
23,73	0,9	nonanal

Źródło: opracowanie własne.

Pozostałe zidentyfikowane w chromatogramach lotne związki organiczne to głównie gazowe zanieczyszczenia powietrza, w tym związki należące do grupy BTEX, WWA oraz substancje chemiczne będące składnikami środków czystości stosowanych w badanych pomieszczeniach. Poza tym wśród oznaczonych LZO można wymienić związki, które ze względu na budowę chemiczną oraz określone wykorzystanie mogą być emitowane z materiałów budowlanych i wykończonych w badanych pomieszczeniach oraz z przechowywanych w nich obiektów zabytkowych.

5. Identyfikacja MLZO w zbadanych próbkach powietrza

Analizując zawartość przedstawionych powyżej tabel można stwierdzić, że w każdym z badanych pomieszczeń wykryto lotne związki organiczne, które mogą być emitowane przez grzyby pleśniowe. Porównując ze sobą listy tych związków, można zauważyć, że różnią się one w sposób jakościowy i ilościowy między zbadanymi miejscami, jednak jeden ze związków, α -pinen, wykryto we wszystkich pomieszczeniach. W dodatku występował on w dość znacznym stężeniu. Należy przy tym zaznaczyć, że α -pinen może być emitowany również z drewna drzew iglastych, dlatego gdy jest ono materiałem konstrukcyjnym w danym pomieszczeniu (podłogi, meble, sufit), mierzone w tym miejscu całkowite stężenie α -pinenu będzie sumą wynikającą z emisji z pleśni oraz z drewna.

Dane literaturowe wskazują, że MLZO emitowane przez grzyby pleśniowe mogą być zaklasyfikowane do kilku grup związków organicznych: węglowodory alifatyczne (np. heptan, izopren), węglowodory aromatyczne (np. styren, benzen), alkohole (np. 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 3-metyl-1-butanol), aldehydy, ketony, kwasy organiczne, etery, estry, mono-, di-terpeny, lotne związki organiczne siarki

i fosforu [Lancker *et al.* 2008, Polizzi *et al.* 2012, Kuske, Romain i Nicolas 2005, Matysik, Herbarth i Mueller 2008]. Przy czym większość autorów podaje, że najczęściej wśród związków emitowanych przez różne gatunki grzybów dominują alkohole (wymienione powyżej), aldehydy oraz terpeny (jak pinen) [Kuske, Romain i Nicolas 2005, Fiedler, Schütz i Geh 2001]. Grupy tych związków są najczęściej wykrywane w czasie analizy MLZO ponieważ, jak wspomniano we wstępie, niektóre lotne związki organiczne produkowane przez mikroorganizmy ulegają w atmosferze szybkiemu utlenieniu [Wilkins, Larsen i Simkus 2000], głównie do alkoholi, aldehydów i ketonów. Dlatego ważne jest, jak daleko od źródła emisji (od grzybni) pobierana jest próbka. W przypadku analiz powietrza przeprowadzonych dla wybranych pomieszczeń MNK próbki do badań pobierano nie w pobliżu miejsc ewentualnego występowania pleśni, a w punkcie środkowym każdego pomieszczenia, na wysokości 1 m, zgodnie z wytycznymi EPA 17 [EPA MO T-17 1999]. Wśród LZO, które wykryto w badanych pomieszczeniach i które mogą być emitowane przez grzyby pleśniowe (tabele 1–4), dominowały właśnie aldehydy i pinen, co zgodnie z cytowanymi danymi literaturowymi może potwierdzać obecności grzybów pleśniowych w tych pomieszczeniach. W celu potwierdzenia lub odrzucenia tej tezy wyniki analizy LZO wykonanej dla próbek powietrza w pokoju Tomickiego oraz w piwnicach Pałacu Biskupa Erazma Ciołka zestawiono z wynikami analiz mikrobiologicznych powietrza przeprowadzonych w tych miejscach.

Badania mikrobiologiczne zostały wykonane przez norweską grupę badawczą Mycoteam [Mycoteam 2007]. Obejmowały one pokój Tomickiego, piwnice oraz dziedziniec na terenie Pałacu Biskupa Erazma Ciołka. We wnioskach końcowych z wykonanych pomiarów autorzy stwierdzają, że stężenie grzybów pleśniowych wyznaczone na zewnątrz budynku (5359 ± 111 cfu/m³) jest znacząco większe od stężenia w powietrzu w pokoju Tomickiego (283 ± 30 cfu/m³) i w piwnicach (583 ± 4 cfu/m³).

Porównując wyniki badań prowadzonych w pokoju Tomickiego i w piwnicach, można stwierdzić, że większe stężenie mikroorganizmów zostało wyznaczone w powietrzu w piwnicach. Rezultat ten jest przeciwstawny do wyników analiz chromatograficznych wykonanych dla tych samych pomieszczeń (rys. 2 i 3), bowiem suma pól powierzchni pod pikami, odpowiadająca całkowitemu stężeniu LZO wykrytych w powietrzu, wynosi $9,1 \cdot 10^9$ dla pokoju Tomickiego i $3,8 \cdot 10^9$ dla piwnic (wartości bezwymiarowe, całkowity prąd jonowy zmierzony w trakcie analizy przez detektor masowy, TIC – *total ion current*). Niezgodność tę można wytłumaczyć, uwzględniając różnicę warunków występujących w obu badanych pomieszczeniach. W piwnicach panują umiarkowane temperatury i duża wilgotność względna, co sprzyja rozwojowi grzybów pleśniowych (duża ilość sporów znajduje się w powietrzu), ale jednocześnie utrudnia detekcję związków

organicznych, ponieważ obniżona temperatura zmniejsza ich lotność. W pokoju Tomickiego temperatura jest znacznie wyższa, przy wyraźnie niższej wilgotności względnej powietrza. Warunki te bardzo ograniczają wzrost pleśni (głównie niska wilgotność), ale powodują dość wysoką emisję lotnych związków organicznych.

Grupa Mycoteam przeprowadziła również oznaczenie gatunków grzybów pleśniowych wykrytych w powietrzu w pokoju Tomickiego oraz w piwnicach [Mycoteam 2007]. Znając skład LZO zidentyfikowanych w obu badanych pomieszczeniach oraz skład gatunkowy pleśni w nich występujących, na podstawie danych literaturowych przypisano scharakteryzowane MLZO (tabele 2 i 3) poszczególnym gatunkom grzybów (tabela 5). Była to próba potwierdzenia możliwości zastosowania analizy MLZO do detekcji aktywności mikrobiologicznej w pomieszczeniach.

Tabela 5. Proponowane markery aktywności mikrobiologicznej w dwóch zbadanych pomieszczeniach Pałacu Biskupa Erazma Ciołka

Pomieszczenie	Mikroorganizm zidentyfikowany przez Mycoteam [2007]	Lotny związek organiczny emitowany do otoczenia ^a	Źródło literaturowe potwierdzające emisję związku przez dany gatunek pleśni
Pokój Tomickiego	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	limonen	[Fiedler, Schütz i Geh 2001]
		α -pinen terpen	[Korpi <i>et al.</i> 1997] [Matysik, Herbarth i Mueller 2008]
Piwnice	<i>Cladosporium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	kamfen	[Korpi <i>et al.</i> 1997]
		aceton	[Fiedler, Schütz i Geh 2001]
		α -pinen	[Korpi <i>et al.</i> 1997]
		oktanal	[Korpi <i>et al.</i> 1997]
		nonanal	[Korpi <i>et al.</i> 1997]
heptanal	[Pasanen <i>et al.</i> 1998]		

^a wykryty w analizie LZO w pokoju Tomickiego lub w piwnicach. W zacytowanych pozycjach literaturowych znajduje się wskazanie, że jest on emitowany przez dany gatunek pleśni.

Źródło: opracowanie własne.

Przedstawione w powyższej tabeli lotne związki organiczne można uznać za markery aktywności mikrobiologicznej wymienionych gatunków pleśni. Wniosek ten wydaje się słuszny, gdy uwzględni się dane literaturowe dotyczące podobnych badań [Wilkins, Larsen i Simkus 2000, Wady *et al.* 2003, Lancker *et al.* 2008]. Obecność określonych lotnych związków organicznych w powietrzu badanych pomieszczeń mogła być skorelowana z występowaniem w nich określonych gatunków pleśni. Dzięki temu wyniki otrzymane przez grupę Mycoteam i z badań chromatograficznych wzajemnie się uzupełniają. W badaniach MLZO

należy jednak zawsze wziąć pod uwagę fakt, że niektóre zidentyfikowane mikrobiologiczne lotne związki organiczne mogą być emitowane ze źródeł innych niż grzyby pleśniowe, np. z niektórych materiałów konstrukcyjnych zastosowanych w badanych miejscach. Uwaga ta jest zgodna z doniesieniami literaturowymi: „Bardzo ważne jest, żeby rozpatrzeć inne możliwe źródła obecności związków w powietrzu pomieszczeń. Związki, które można odnaleźć, na przykład w farbie albo w detergentach, będą miały ograniczone znaczenie jako wskaźnik wzrostu mikroorganizmów” [Sunesson *et al.* 1996]

6. Podsumowanie

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w wybranych pomieszczeniach Muzeum Narodowego w Krakowie można potwierdzić możliwość zastosowania analizy lotnych związków organicznych w detekcji aktywności mikrobiologicznej grzybów pleśniowych. Oznacza to, że pomiary MLZO mogą być cennym narzędziem szybkiego wykrywania obecności pleśni w danym miejscu. Metoda ta nie jest jednak bez wad, a poprawność wyników uzyskanych dzięki takim badaniom zależy od wielu czynników, m.in. od sposobu i warunków poboru próbki, od techniki analitycznej wykorzystanej do identyfikacji MLZO [Wolkoff i Nielsen 2001], czy też od liczby gatunków mikroorganizmów, które występują w danym pomieszczeniu. Oznacza to, że wymaga ona dopracowania, szczególnie w obszarze stosowania badań MLZO do detekcji aktywności grzybów pleśniowych powodujących biodeteriorację obiektów zabytkowych. Dodatkowym argumentem potwierdzającym tę potrzebę niech będzie fakt, że dostępne dane literaturowe dotyczą prawie wyłącznie badań materiałów budowlanych i wykończeniowych, nie zaś zabytkowych. Było to podstawą do rozpoczęcia projektu: „Badania biodeterioracji obiektów zabytkowych na podstawie analizy lotnych związków organicznych emitowanych przez grzyby pleśniowe”, przyznanego przez NCN w ramach programu OPUS na lata 2013 – 2015. Spodziewany efekt końcowy projektu to ustalenie składu tzw. markerowych mikrobiologicznych lotnych związków organicznych, które będą związkami charakterystycznymi, emitowanymi przez określony gatunek grzyba pleśniowego, który zaszczerpiono na określonym materiale wzorcowym. Dla potrzeb projektu przyjęto, że materiałami wzorcowymi będą: papier o ustalonym składzie (celuloza), pergamin (kolagen), jedwab (fibroina), wełna (keratyna). Warto zaznaczyć, że po ustaleniu składu tzw. markerowych MLZO (wśród nich związków emitowanych w największej ilości przez pleśnię) możliwe będzie przygotowanie łatwego w użyciu, taniego, powszechnie dostępnego testu pozwalającego wykryć obecność pleśni.

Wymierną korzyścią dla społeczeństwa osiągniętą z badań przeprowadzonych w zaproponowanym wymiarze będzie stworzenie instrumentu ochrony dziedzictwa kulturowego, który będzie odpowiednio wcześniej ostrzegał o występowaniu skażenia mikrobiologicznego obiektów i pomieszczeń muzealnych. Uzyskane w projekcie wyniki dadzą możliwość wykorzystania markerowych MLZO oraz kompleksowo opracowanej techniki analitycznej do detekcji zagrożeń mikrobiologicznych w pomieszczeniach dotkniętych tzw. syndromem chorego budynku, zwłaszcza że proponowana technika pomiarowa pozwala wykryć nawet bardzo niskie stężenia związków lotnych. Będzie to również cenne narzędzie nie tylko dla kustoszy muzeów, ale także dla producentów, hurtowników i właścicieli magazynów różnego typu towarów, w tym żywnościowych, i materiałów opakowaniowych, pozwoli ono bowiem na szybką detekcję występującego skażenia mikrobiologicznego.

Literatura

- ASHRAE [2007], *Museums, Libraries and Archives* (chapter 21), in 2007 ASHRAE handbook: Heating, Ventilating, and Air-conditioning Applications, SI ed., American Society of Heating, Refrigerating and Air-conditioning Engineers, Inc.
- Barański A. *et al.* [2001], *Effect of Relative Humidity on the Degradation Rate of Cellulose. The Methodology Studies*, Proceedings from Symposium „Degradation of Paper and Cellulose”, EMRS Spring Meeting, Strasbourg.
- Betancourt D.A. *et al.* [2013], *Microbial Volatile Organic Compound Emissions from Stachybotrys Chartarum Growing on Gypsum Wallboard and Ceiling Tile*, „BMC Microbiology”, vol. 13.
- Camuffo D. *et al.* [2001], *Environmental Monitoring in Four European Museums*, „Atmospheric Environment”, vol. 35.
- Canhoto O. *et al.* [2004], *Application of Electronic Nose Technology for the Detection of Fungal Contamination in Library Paper*, „International Biodeterioration and Biodegradation”, vol. 54.
- EPA MO T-17 [1999], *Compendium Method TO-17, Determination of Volatile Organic Compounds in Ambient Air Using Active Sampling Onto Sorbent Tubes*, Center for Environmental Research, Information Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268.
- Fiedler K., Schütz E., Geh S. [2001], *Detection of Microbial Volatile Organic Compounds (MVOCs) Produced by Moulds on Various Materials*, „International Journal of Hygiene and Environmental Health”, vol. 204.
- Florian M.L. [2002], *Fungal Problem Assessment, Monitoring Methods, and Interpretation of Result Pertaining to Air Quality and Potential Contamination of Collections* [w:] *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*, eds. R.J. Koestler *et al.*, Metropolitan Museum of Art Series, New York.
- Gutnarowska B., Piotrowska M. [2007], *Methods of Mycological Analysis in Buildings*, „Building and Environment”, vol. 42.

- Haillant O., Fromageot D., Lemaire J. [2005], *Experimental Techniques in Studies of Photo-stability* [w:] *Ageing and Stabilization of Paper*, eds. M. Strlič, J. Kolar, Lubiana.
- Havermans J. [1994], *The Effects of Air Pollutants on the Accelerated Ageing of Cellulose Containing Materials – Paper*, STEP PROJECT CT 90-0100, Final Report. TNO/EC DG XII, Delft.
- Hess-Kosa K. [2002], *Indoor Air Quality – Sampling Methodologies*, Lewis Publisher, Boca Raton, FL.
- Korpi A. et al. [1997], *Microbial Growth and Metabolism in House Dust*, „International Biodeterioration and Biodegradation”, vol. 40.
- Kuske M., Romain A.C., Nicolas J. [2005], *Microbial Volatile Organic Compounds as Indicators of Fungi. Can an Electronic Nose Detect Fungi in Indoor Environments?*, „Building and Environment”, vol. 40.
- Lancker F. et al. [2008], *Use of Headspace SPME-GC-MS for the Analysis of the Volatiles Produced by Indoor Molds Grown on Different Substrates*, „Journal of Environmental Monitoring”, vol. 10.
- Lavine B.K. [2012], *Prediction of Mold Contamination from Microbial Volatile Organic Compound Profiles using Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography/mass Spectrometry*, „Microchemical Journal”, vol. 103.
- Martens M. [2012], *Climate Risk Assessment in Museums: Degradation Risks Determined from Temperature and Relative Humidity Data*, PhD thesis, Technische Universiteit Eindhoven.
- Matysik S., Herbarth O., Mueller A. [2008], *Determination of Volatile Metabolites Originating from Mould Growth on Wall Paper and Synthetic Media*, „Journal of Microbiological Methods”, vol. 75.
- Mycoteam [2007], Raport dostarczony drogą elektroniczną przez Mycoteam i udostępniony przez pracowników LABNOZ – Muzeum Narodowe w Krakowie.
- Nielsen K.F. [2003], *Mycotoxin Production by Indoor Molds*, „Fungal Genetics and Biology”, vol. 39.
- Pasanen A.L. et al. [1998], *Critical Aspects on the Significance of Microbial Volatile Metabolites as Indoor Air Pollutants*, „Environmental International”, vol. 24, nr 7.
- Pluschke P. [2004], *Indoor Air Pollution, The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer.
- Polizzi V. et al. [2012], *Influence of Various Growth Parameters on Fungal Growth and Volatile Metabolite Production by Indoor Molds*, „Science of the Total Environment”, vol. 414.
- Sunesson A.L. et al. [1996], *Volatile Metabolites Produced by Two Fungal Species Cultivated on Building Materials*, *The Annals of Occupational Hygiene*, vol. 40, nr 4.
- Szostak-Kot J., Sygula-Cholewinska J. [2010], *Microbial Risks for Museum Objects During Storage*, 18th IGWT Symposium, Accademia Italiana di Scienze Merceologiche – AISME, Proceedings from Symposium, Roma.
- Thomson G. [1994], *The Museum Environment*, eds. A. Oddy, D. Lintrum, 2nd ed., Butterworth-Heinemann series in conservation and museology, Oxford.
- Wady L. et al. [2003], *Use of Gas Chromatography – Mass Spectrometry/solid Phase Microextraction for the Identification of MVOCs from Moldy Building Materials*, „Journal of Microbiological Methods”, vol. 52(3).

- Wilkins K., Larsen K. [1995], *Variation of Volatile Organic Compound Patterns of Mold Species from Damp Buildings*, „Chemosphere”, vol. 31, nr 5,
- Wilkins K., Larsen K., Simkus M. [2000], *Volatile Metabolites from Mold Growth on Building Materials and Synthetic Media*, „Chemosphere”, vol. 41, nr 3.
- Wolkoff P., Nielsen G.D. [2001], *Organic Compounds in Indoor Air – their Relevance for Perceived Indoor Air Quality*, „Atmospheric Environment”, vol. 35(26).
- Zou X., Uesaka T., Gurnagul N. [1996], *Prediction of Paper Permanence by Accelerated Aging I. Kinetic Analysis of the Aging Process*, „Cellulose”, vol. 3.

An Assessment of the Possibilities for Using Volatile Organic Compounds to Detect Microbiological Activity – the Example of Research Done at the National Museum in Cracow

An evaluation of the viability of using volatile organic compound (VOC) measurements to detect mould was part of a VOC analysis carried out on the indoor air in selected rooms at the National Museum in Cracow. The simple assumption in this method is that moulds can be detected in any given place based on the identification of microbial volatile organic compounds (MVOCs) that they emit into their surroundings. This mould detection procedure provides an alternative to the much more time-consuming traditional microbiological tests. Combining the results of VOC and microbial analysis with data from the literature shows that, in the rooms investigated, there is a correlation between the mould species identified and MVOCs. This suggests that the use of MVOC measurements to detect mould is possible but the method still needs to be developed, especially for museums and historical buildings.

Keywords: MVOCs, gas chromatography, mould, microbial infestation.