

JUSTYNA ADAMIAK, ANNA OTLEWSKA, BEATA GUTAROWSKA

*Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Politechnika Łódzka
Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź,
E-mail: justyna.adamiak@dokt.p.lodz.pl*

WSPÓŁCZESNE METODY STOSOWANE W ANALIZIE BIODETERIORACJI OBIEKTÓW ZABYTKOWYCH

WSTĘP

Biodeterioracja, czyli niszczący wpływ drobnoustrojów na materiały techniczne, jest naturalnym zjawiskiem wynikającym z ekologii mikroorganizmów, której poznanie jest istotne do opracowania metod zapobiegania procesom mikrobiologicznego rozkładu materiałów (ZYSKA 2005). Niestety aktualna wiedza w zakresie mikrobiologicznej deterioracji okazuje się niewystarczająca. Zidentyfikowano tylko niewielki procent gatunków drobnoustrojów kolonizujących obiekty zabytkowe, a znajomość ich metabolizmu oraz mechanizmu biodeterioracji jest jeszcze mniejsza. Wagę problemu potęgują ogromne straty ekonomiczne wynikające z niszczenia materiałów technicznych, które na świecie wynoszą rocznie 40 miliardów USD (ALLSOPP 2011). Konieczność podejmowania działań,

uzasadniają również nieoszacowane szkody w obszarze naszego dziedzictwa kulturowego. Ochrona zabytków przed skutkami biodeterioracji wymaga wdrożenia odpowiednich strategii opartych zarówno na badaniach *in situ* na obiekcie, jak i w warunkach laboratoryjnych odpowiadających tym, które występują w środowisku bytowania mikroorganizmów. Ocena zjawiska biodeterioracji wymaga zatem podjęcia dwukierunkowych działań. Obejmują one identyfikację mikroorganizmów z zastosowaniem metod hodowlanych, biochemicznych i molekularnych oraz badania mające na celu określenie skutków ich interakcji z materiałem z zastosowaniem technik mikroskopowych, analizy powierzchni, jak również metabolomiki.

IDENTYFIKACJA MIKROORGANIZMÓW

METODY HODOWLANE

Jak podają liczne źródła literaturowe, identyfikacja mikroorganizmów zasiedlających obiekty muzealne do niedawna opierała się wyłącznie na metodach hodowlanych (RIPKA 2005). Błędnie przyjmowano, że rozpowszechnione w naturze gatunki bakterii, m. in. z rodzaju *Bacillus* czy *Micrococcus*, są w pełni odpowiedzialne za biodeteriorację. Okazuje się jednak, że problem ten jest bardziej złożony: obecność mikroorganizmów na obiekcie ulegającym niszczeniu, nieko-

niecznie musi wskazywać na ich udział w biodeterioracji, gdyż może być ona w dużej mierze przypadkowa. Podłoża hodowlane wykorzystywane w celu izolacji mikroorganizmów środowiskowych zawierają sacharydy, białka i witaminy w stężeniach, z jakimi organizm nigdy dotąd nie spotkał się w przyrodzie. Umożliwiają one wzrost szybko rosnących gatunków i produkcję metabolitów, jednakże z drugiej strony, utrudniają rozwój drobnoustrojów funkcjonujących w ekosystemie. Dlatego też liczne publikacje na temat mikrobiologicznego rozkładu zabytków po-

mijają mikroorganizmy wolno rosnące i niehodowalne. Niestety, niewiele ponad 0,1-1% niezwykle zróżnicowanej populacji wszystkich gatunków pochodzących ze środowiska zdolna jest do wzrostu w warunkach laboratoryjnych (SCHABEREITER-GURTNER i współaut. 2001). Pozostała, przeważająca część (około 99%), to komórki w stanie VBNC (ang. viable but non culturable) o ograniczonej aktywności metabolicznej, czyli żywe, ale nie tworzące widocznych kolonii na podłożach mikrobiologicznych (KEER i BIRCH 2003, GONZÁLEZ i SAIZ-JIMÉNEZ 2005, OLIVER 2005). Mikroorganizmy niehodowalne zaliczamy do jednej z trzech grup: (1) obligatoryjne symbionty lub pasożyty niezdolne do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych; (2) znane gatunki, w identyfikacji których metody hodowlane okazują się nieodpowiednie; (3) nieznanne gatunki, które nigdy wcześniej nie były hodowane w związku z brakiem odpowiednich metod (RIPKA 2005).

Tradycyjne metody hodowlane okazują się zatem niewiarygodne, co więcej, wymagają dostarczenia znacznie większej ilości materiału, niż jest to możliwe w przypadku miejsc o charakterze zabytkowym (SCHABEREITER-GURTNER i współaut. 2001). Jednakże zaletami metod hodowlanych, na które warto zwrócić uwagę są: możliwość izolacji czystej kultury oraz badania metabolizmu i fizjologii wyizolowanych szczepów (RIPKA 2005).

METODY MOLEKULARNE

W ciągu ostatnich lat techniki oparte na biologii molekularnej stały się niezwykle cennym narzędziem w badaniu biodeterioracji obiektów muzealnych (Tabela 1). Wiele z nich pozwoliło bowiem na wykrycie gatunków nigdy wcześniej nie opisanych w takim środowisku (SCHABEREITER-GURTNER i współaut. 2001). W zależności od tego, czy uzyskiwana jest kompleksowa, czy też częściowa analiza materiału genetycznego mikroorganizmów, zostały one podzielone na dwie grupy. W pierwszym przypadku rozpatrywany jest cały genom (metagenomika), w drugim zaś tylko wybrane geny, na drodze amplifikacji PCR (RASTOGI i SANI 2011). Obecnie, najczęściej stosowanymi markerami molekularnymi w taksonomii mikrobiologicznej bakterii są geny kodujące małą podjednostkę rybosomalnego RNA (*16S rRNA*), a u grzybów strzępkowych są to wewnętrzne regiony niekodujące ITS (ang. internal transcribed spacer), występujące w dużej liczbie kopii pomiędzy genem kodującym małą podjednost-

kę (18S rDNA) a dużą podjednostkę (28S rDNA) (ATKINS i CLARK 2004, MICHAELSEN i współaut. 2006, DAKAL i ARORA 2012). Obecność u wszystkich organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, niezmiennosc funkcji, wysoka konserwatywność, brak horyzontalnego transferu genów i długość sekwencji wystarczająca do celów bioinformatycznych powodują, że geny te określane są mianem „złotego standardu”, umożliwiając tym samym precyzyjne określenie przynależności diagnostycznej mikroorganizmów odpowiedzialnych za biodeteriorację obiektów zabytkowych (RIPKA 2005, JANDA i ABBOT 2007). Produkty reakcji PCR są następnie analizowane wykorzystując jedno z następujących podejść: (1) konstrukcja bibliotek genów, (2) genetyczny fingerprinting, (3) hybrydyzacja DNA lub (4) połączenie wszystkich tych technik (RASTOGI i SANI 2011).

Konstrukcja bibliotek genów

Typowy schemat doświadczenia badającego bioróżnorodność na drodze konstrukcji bibliotek genów obejmuje: (1) izolację DNA, (2) klonowanie do komórek gospodarza wcześniej amplifikowanych genów *16S rRNA* (region ITS u grzybów strzępkowych) lub przypadkowych fragmentów różnej długości, (3) badanie przesiewowe (skrining) powstałych bibliotek genów (MOCALI i BENEDETTI 2010, RASTOGI i SANI 2011).

Pierwszym krokiem rozpoczynającym konstrukcję bibliotek genów jest izolacja DNA. W kolejnej fazie wyizolowane DNA klonowane jest do komórek gospodarza za pośrednictwem systemów wektorowych. Biblioteki genów zawierające krótsze fragmenty (2–3 kbp; najczęściej gen *16S rRNA* oraz region ITS), które są z powodzeniem stosowane w analizie filogenetycznej mikroorganizmów zasiedlających obiekty zabytkowe, zaś dłuższe fragmenty (100–200 kbp) odgrywają kluczową rolę w poznawaniu wielogenowych szlaków biochemicznych (RASTOGI i SANI 2011). Wybór wektora do tworzenia biblioteki jest niezwykle istotny: w konstrukcji banków genów lepiej sprawdzają się duże fragmenty, aby zminimalizować liczbę klonów. W przypadku, gdy wklonowane DNA ma być używane jako matryca w reakcji PCR, większą wagę przywiązuje się do liczby kopii, a nie wielkości wektora. Można zatem wyróżnić biblioteki oparte na: plazmidach bakteryjnych i wektorach bakteriofagowych (zawierają małe fragmenty DNA do 20 kbp), kosmidach i fosmidach (służą do klonowa-

Tabela 1. Perspektywy zastosowania metod molekularnych w analizie biodeterioracji obiektów muzealnych (wg GONZÁLEZ 2002).

Technika	Użycie	Zastosowanie	Wzrost wykorzystania
Analiza DNA	Tak	Identyfikacja mikroorganizmów	S
Analiza RNA	Tak	Ekspresja genów	S
Analiza białek	Rzadkie	Aktywność enzymatyczna	M
PCR	Tak	Amplifikacja DNA	S
Multiplex PCR	Nie	Amplifikacja wielu matryc podczas jednej reakcji	M
Real-time PCR	Rzadkie	Monitorowanie ilości produktu PCR	S
RT-PCR	Rzadkie	Amplifikacja; matrycą jest mRNA	S
DGGE	Tak	Bioróżnorodność	S
TGGE	Tak	Bioróżnorodność	-
ARDRA	Tak	Bioróżnorodność	S
RISA (ARISA)	Tak	Bioróżnorodność	S
SSCP	Tak	Bioróżnorodność	S
T-RFLP	Tak	Bioróżnorodność	S
Konstrukcja bibliotek DNA	Tak	Bioróżnorodność	S
Klonowanie	Tak	Krok poprzedzający sekwencjonowanie	S
Seqwencjonowanie	Tak	Określenie przynależności taksonomicznej	S
FISH	Tak	Detekcja specyficznych gatunków	S
Techniki bioinformatyczne	Tak	Poszukiwanie homologów	S
Bazy danych	Tak	Poszukiwanie homologów	S
Genomika	Nie	Analiza szlaków	L
Proteomika	Rzadkie	Analiza białek	M
Sondy molekularne	Nie	Detekcja produktu PCR	M
Mikromacierze DNA	Nie	Ekspresja genów	M
Inżynieria genetyczna	Rzadkie	Ekspresja genów	S
Geny reporterowe	Nie	Ekspresja genów in situ	S

(S) wzrost wykorzystania w krótkim czasie; (M) wzrost wykorzystania w niezbyt długim czasie; (L) wzrost wykorzystania w długim czasie; (-) wzrost wykorzystania nie jest spodziewany

nia fragmentów o długości 30–45 kbp) oraz sztucznych chromosomach bakteryjnych BAC (odznaczają się bardzo dużą pojemnością). Skryning bibliotek genów odbywa się na drodze jednej z dwóch metod: identyfikacji klonów przenoszących określoną sekwencję lub wykazujących pożądaną funkcję. Pierwsze podejście dotyczy określenia bioróżnorodności poprzez analizę genów *16S rRNA* u bakterii

oraz regionu ITS u grzybów strzępkowych, z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych. Drugie zaś, dotyczące identyfikacji genów kodujących enzymy lub metabolity wtórne, nie wymaga sekwencjonowania (DEJA-SIKORA i współaut. 2007, MOCALI i BENEDETTI 2010). Jak się okazuje, wybór komórki gospodarza nie może być przypadkowy. O ile bakterie *Escherichia coli* sprawdzają się bez zarzutu

w określaniu przynależności diagnostycznej, to ekspresja genów środowiskowych, kodujących cechy biochemiczne, podlega istotnym ograniczeniom (RASTOGI i SANI 2011). Dlatego też coraz częściej w roli gospodarza wykorzystuje się *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. czy *Agrobacterium* sp.

Ogromny potencjał jaki ze sobą niesie ta metoda ma wielkie szanse znacząco usprawnić identyfikację mikroorganizmów dominujących w innych ekosystemach, w tym zasiedlających obiekty muzealne. Jak dotąd konstrukcja bibliotek genów znalazła zastosowanie w badaniach nad populacją grzybów strzępkowych, kolonizujących powierzchnię zabytkowego szkła pochodzącego z okien kościoła Stockkaampen (Niemcy) oraz kościoła w Brakel (Niemcy), jak również w badaniach XIII-wiecznego włoskiego manuskryptu z widocznymi śladami daleko posuniętej biodeterioracji, czy archeologicznego drewna datowanego na 300 r. p.n.e. (Dania) (SCHABEREITER-GURTNER i współaut. 2001, HELMS i współaut. 2004, MICHAELSEN i współaut. 2010).

Genetyczny fingerprinting

Metoda genetycznego fingerprintingu może być z powodzeniem stosowana do identyfikacji gatunkowej lub typowania wewnątrzgatunkowego drobnoustrojów, również w obszarze naszego dziedzictwa kulturowego. Uzyskane w wyniku reakcji PCR amplikony poddaje się rozdzielaniu elektroforetycznemu uzyskując charakterystyczny układ prążków, tzw. fingerprint, porównywany w toku badań z bazami danych. Wśród tej grupy metod na szczególną uwagę zasługują: DGGE/TGGE, ARDRA, T-RFLP, RISA/ARISA oraz SSCP.

DGGE (TGGE) – Elektroforeza w gradencie czynnika denaturującego (ang. denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) jest w ciągu ostatniej dekady najczęściej stosowaną metodą molekularną w ocenie bioróżnorodności, opisującą związek filogenetyczny pomiędzy mikroorganizmami zasiedlającymi obiekty zabytkowe (GAO i TAO 2012). Liczne źródła literaturowe wskazują jej użycie w odniesieniu do malowideł ściennych (jaskinia w Tito Bustillo w Hiszpanii), fresków (Zamek Herberstein w Austrii), dzieł sztuki (barokowy obraz „Cristo de la Paciencia”, Krannert Art Museum w Champaign, USA), witraży (Katedra w Tarragonie, Kościół Santa Maria del Mar w Barcelonie), czy papieru (manuskrypt „Le Stanze del Bandello” w Bibliotece w Mediolanie) (RÖLLEKE i współ-

aut. 1996; SCHABEREITER-GURTNER i współaut. 2001; MICHAELSEN i współaut. 2006, 2009; LÓPEZ-MIRAS i współaut. 2013; PIÑAR i współaut. 2013). W technice tej punkt wyjścia stanowi amplifikacja metodą PCR z zastosowaniem starterów specyficznych dla określonych markerów molekularnych, posiadających długi, 30–50 nukleotydowy łańcuch par GC, który zapobiega całkowitemu rozpadowi DNA do formy jednoniciowej. Otrzymane fragmenty są równej długości, jednak różnice w sekwencjach skutkują odmienną ruchliwością elektroforetyczną w wyniku denaturacji w żelu zawierającym mieszaninę mocznika i formamidu we wzrastającym stężeniu, przy czym struktura jednoniciowa migruje w żelu najszybciej (MUYZER i współaut. 1993, MUYZER 1999, RASTOGI i SANI 2011, DAKAL i ARORA 2012). Wszystkie gatunki mikroorganizmów posiadają charakterystyczne sekwencje amplifikowanego genu, w związku z tym osiągają określoną pozycję w żelu – uzyskuje się tzw. fingerprint, czyli charakterystyczny układ prążków. Po rozdzielaniu elektroforetycznym wybrane prążki mogą zostać wycięte i poddane sekwencjonowaniu, co pozwala na identyfikację mikroorganizmów. Elektroforeza w gradencie temperatury (ang. temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) przebiega analogicznie do DGGE, z tą różnicą, że zamiast chemicznego czynnika denaturującego stosowana jest temperatura. Topnienie dwuniciowej cząsteczki DNA zachodzi domenowo: struktura podwójnej helisy ulega denaturacji i migracja cząsteczki zostanie zatrzymana, gdy domena o najniższej temperaturze topnienia osiągnie ją w określonej pozycji na żelu.

ARDRA – Analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów DNA (ang. amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) jest kolejną metodą stosowaną w ocenie zjawiska biodeterioracji, wykorzystującą polimorfizm DNA (KIRK i współaut. 2004). Znalazła ona zastosowanie w analizie drobnoustrojów tworzących biofilmy w Świątyniach Angkoru w Kambodży, czy na ścianach „Villa Isabel” w Biarritz we Francji (BERDOLAY i SALVADO 2009, LAN i współaut. 2010). W technice tej produkt PCR (fragment DNA kodujący cząsteczki 16S rRNA lub 18S rRNA) poddawany jest analizie restrykcyjnej przy użyciu endonukleaz rozpoznających czteronukleotydową sekwencję, a otrzymane produkty różnej długości wykrywane są w żelach agarozowych lub poliakrylamidowych. Technika ARDRA dostarcza informacji na te-

mat struktury gatunkowej populacji danego środowiska (KIRK i współaut. 2004, RASTOGI i SANI 2011).

T-RFLP – Technika cechującą się dużym podobieństwem do ARDRA, stanowiącą jednocześnie jej uzupełnienie, jest analiza polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (ang. terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP). Wykorzystano ją m.in. w celu różnicowania szczepów zasiedlających etruski grobowiec w miejscowości Tarquinia we Włoszech i XVI-wiecznym malowidle w kościele San Giacomo Maggiore w Bolonii (SPROCATI i współaut. 2008, CAPODICASA i współaut. 2010). Różnica pomiędzy T-RFLP i ARDRA polega na zastosowaniu w reakcji PCR starterów, spośród których jeden znakowany jest fluorescencyjnie na 5' końcu, przy użyciu barwnika, np. TET. Produkty amplifikacji poddawane są analizie restrykcyjnej (enzymy rozpoznające motywy czteronukleotydomowe), jednakże obraz elektroforetyczny pozwala na detekcję wyłącznie fragmentów terminalnych (KIRK i współaut. 2004, RASTOGI i SANI 2011). Pojedynczy prążek stanowi odrębną jednostkę taksonomiczną, co znacznie upraszcza uzyskany fingerprint (KUMARI i współaut. 2009). Osiągnięcia w dziedzinie bioinformatyki pozwoliły opracować program komputerowy, który ułatwia analizę jakościową badanej populacji mikroorganizmów, poprzez porównanie otrzymanego układu prążków, ze specjalnie skonfigurowanymi bazami danych (RASTOGI i SANI 2011).

RISA (ARISA) – Wśród metod wykorzystywanych w ocenie zróżnicowania gatunkowego blisko spokrewnionych mikroorganizmów pochodzących z różnych środowisk oraz zmian ich struktury gatunkowej w czasie, często stosowana jest analiza długości sekwencji międzygenowej rDNA (ang. ribosomal intergenic spacer analysis / automated ribosomal intergenic spacer analysis, RISA/ARISA). Zastosowano ją w przypadku określania struktury gatunkowej biofilmów na zabytkowych fontannach na terenie Włoch i Hiszpanii (CUZMAN 2009). Podstawą tej techniki jest amplifikacja PCR fragmentu łącznikowego DNA (ang. intergenic spacer region, IGS), znajdującego się pomiędzy małą (16S) a dużą (23S) podjednostką rybosomalną, a następnie rozdział otrzymanych produktów w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (KIRK i współaut. 2004, KUMARI i współaut. 2009, GAO i TAO 2012). Region IGS jest niezwykle cenny w identyfikacji ga-

tunkowej, ponieważ może kodować tRNA, charakteryzuje się również polimorfizmem długości i sekwencji, co stanowi fundament tej metody (FISHER i TRIPLETT 1999). Analiza polimorfizmu w technice RISA jest możliwa poprzez barwienie żeli srebrem. Technika ARISA, będąca jej zautomatyzowaną wersją, wykorzystuje znakowany fluorescencyjnie starter, a otrzymane produkty są wykrywane automatycznie przez detektor laserowy (KIRK i współaut. 2004, RASTOGI i SANI 2011). W zależności od badanych mikroorganizmów wyróżniamy B-ARISA (identyfikacja bakterii) oraz F-ARISA (identyfikacja pleśni), jednakże druga z nich polega na analizie polimorfizmu długości fragmentu składającego się z dwóch regionów ITS oraz 5,8S rRNA (ITS – 5,8S rRNA-ITS2) (RANJARD i współaut. 2001).

SSCP – Kolejnym narzędziem opierającym się na rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji PCR jest analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (ang. single strand conformation polymorphism, SSCP), która została wykorzystana m.in. do potwierdzenia obecności bakterii z rodzaju *Rubrobacter* na ścianach starożytnych budowli Majów w Meksyku, czy w określeniu struktury populacji mikroorganizmów zasiedlających rzymskie katakumby (URZI i współaut. 2003, DAKAL i ARORA 2012). Otrzymane amplikony poddawane są denaturacji w buforze zawierającym mieszaninę formamidu, mocznika lub wodorotlenku sodowego, a uzyskane w ten sposób jednoniciowe fragmenty są rozdzielane na żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych (RASTOGI i SANI 2011). Analiza SSCP bazuje na niewielkich różnicach w sekwencjach nukleotydowych, często nawet dotyczących pojedynczej zasady azotowej. Skutkuje to odmienną konformacją struktury drugorzędowej, co z kolei ma wpływ na różnicę w ruchliwości elektroforetycznej w żelu (zmiana położenia prążka w profilu elektroforetycznym). W przypadku dwuniciowych fragmentów jest ona uzależniona od długości; fragmenty jednoniciowe są podatne na tworzenie wewnętrznych par zasad azotowych w wyniku nawet niewielkich zmian w sekwencji, niezależnie od długości, stąd też wynika ich odmienna konformacja przestrzenna (KUMARI i współaut. 2009).

FISH

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. fluorescence *in situ* hybridization, FISH) cieszy się dużą popularnością w bada-

niach filogenetycznych oraz analizie rozkładu poszczególnych gatunków mikroorganizmów w środowisku. Obecnie coraz częściej stosuje się ją w odniesieniu do obiektów zabytkowych, jak chociażby malowideł ściennych w Zamku Herberstein w Austrii czy katedrze w Mediolanie (CAPITELLI i współaut. 2007). Podstawę tej techniki stanowi 18-30 nukleotydowa sonda molekularna, znakowana fluorescencyjnie na 5' lub 3' końcu, wiążąca się z komórkowym rRNA. Zatem, jest to jedna z metod umożliwiających określenie stanu metabolicznego komórki. Detekcja utworzonego kompleksu sonda-kwas nukleinowy odbywa się przy użyciu mikroskopu epifluorescencyjnego lub cytometrii przepływowej (GONZÁLEZ 2002, RASTOGI i SANI 2011). W połączeniu z mikroskopią skaningową (ang. confocal laser scanning microscopy, CLSM) możliwe jest precyzyjne zlokalizowanie określonego gatunku w strukturze biofilmu (DAKAL i ARORA 2012). Na szczególną uwagę zasługuje także połączenie techniki FISH z mikroautoradiografią (ang. FISH-microautoradiography, FISH/MAR), w której stosowane są substraty znakowane radioizotopowo. Jest to metoda zapewniająca ocenę aktywności mikroorganizmów, co stanowi jej niepodważalną zaletę (GONZÁLEZ 2002).

Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie rybosomalnego DNA stanowi narzędzie w identyfikacji mikroorganizmów oraz ustalaniu stopnia pokrewieństwa pomiędzy szczepami odpowiedzialnymi za biodeteriorację. W ostatnim czasie coraz większą uwagę poświęca się nowej dziedzinie nauki, metagenomice, która w ciągu ostatniej dekady zrewolucjonizowała nauki biologiczne, w tym mikrobiologię. Pod terminem metagenomika rozumiemy badanie materiału genetycznego wyizolowanego bezpośrednio ze środowiska. W metagenomice tworzone są banki fragmentów DNA/RNA, które są bezpośrednio sekwencjonowane, w efekcie czego możliwa jest analiza wszystkich mikroorganizmów pochodzących z badanej próby, również tych niehodowlanych (HANDELSMAN i współaut. 1998, STEELE i STREIT 2005, DEJA-SIKORA i współaut. 2007). W diagnostyce molekularnej bakterii szczególne znaczenie ma gen *16S rRNA*, składający się z wysoce konserwatywnych fragmentów rozdzielonych dziewięcioma regionami V (ang. variable regions) o różnorodnych sekwencjach nukleotydowych w zależności od gatunku bakterii. Spośród nich w bada-

niach filogenetycznych najczęściej informacji dostarczają regiony V2, V3 i V6 (PETROSINO i współaut. 2009, KIM i współaut. 2011, SHAH i współaut. 2011). Markerem molekularnym w identyfikacji grzybów strzępkowych są wspomniane wcześniej wewnętrzne regiony niekodujące ITS. Klasyczną techniką sekwencjonowania jest metoda Sanger, za pośrednictwem której dokładnie określana jest kolejność nukleotydów wchodzących w skład rybosomalnego DNA. Opiera się ona na dobudowywaniu kolejnych deoksynukleotydów dNTP, jak również znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów ddNTP pozbawionych grupy hydroksylowej, co powoduje, że po przyłączeniu się do syntetyzowanej nici uniemożliwiają jej dalsze wydłużenie. W ten sposób uzyskuje się fragmenty DNA różnej długości, które rozdziela się elektroforetycznie i uwidacznia radiograficznie prążki odpowiadające poszczególnym produktom terminacji (HEYRMAN i SWINGS 2003). Precyzyjne określenie sekwencji wykorzystywanych w taksonomii mikroorganizmów (regiony V1-V9) spowodowało, że analiza całości rDNA przestaje być konieczna. Metoda Sanger jest stopniowo zastępowana innymi, nowoczesnymi technikami, ze względu na ich niższy koszt oraz dostarczanie większej ilości danych. Jedną z nich jest pirosekwencjonowanie, które opiera się na detekcji cząsteczki pirofosforanu (PPi), uwalnianej podczas syntezy DNA. Dodawane kolejno dNTP powodują uruchomienie kaskady reakcji enzymatycznych, skutkujących emisją światła, którego intensywność jest uzależniona od ilości wydzielonego pirofosforanu (RONAGHI 2001, PETROSINO i współaut. 2009). Technika ta została z powodzeniem wykorzystana w określeniu przynależności diagnostycznej mikroorganizmów kolonizujących kamienie budowlane zabytkowych budynków w Belfaście (CUTLER i współaut. 2013). Kolejnym przykładem jest sekwencjonowanie metagenomowe (ang. shotgun sequencing), umożliwiające analizę materiału genetycznego wyizolowanego bezpośrednio z populacji mikroorganizmów, a tym samym kompleksową ocenę bioróżnorodności mikroflory zasiedlającej obiekty muzealne (RASTOGI i SANI 2011). Otrzymane sekwencje nukleotydowe porównuje się z sekwencjami dostępnymi w bazach danych. GenBank jest największą bazą danych nukleotydowych, w której zdeponowano ponad 20 milionów sekwencji, w tym 90 000 genu *16S rRNA*. Oznacza to, że jest ich na tyle dużo, aby rzetelnie ziden-

tyfikować badane szczepy. Przyjmuje się, że szczepy wykazujące identyczność w co najmniej 95% należą do tego samego rodzaju, a o 97% stopniu podobieństwa i większym, możemy zaliczyć do tego samego gatunku. Sekwencja genu *16S rRNA* ma długość około 1550 bp. Fragmenty od 500 do 1500 bp mają wystarczającą długość, umożliwiającą ustalenie przynależności taksonomicznej mikroorganizmów (CLARRIDGE 2004).

Mocne i słabe strony metod molekularnych

Konstrukcja bibliotek genów, genetyczny fingerprinting oraz hybrydyzacja DNA to metody użyteczne w identyfikacji mikroflory zasiedlającej różnorodnie powierzchnie zabyt-

kowe, cechujące się przede wszystkim uniwersalnością. Oznacza to, że ułatwiają analizę mikroorganizmów oraz sprawdzają się niezależnie od badanego materiału, gdy konwencjonalne metody zawodzą. Jednakże z drugiej strony, oprócz mnóstwa zalet, posiadają również ograniczenia (Tabela 2).

METODY BIOCHEMICZNE

Rozwój drobnoustrojów na powierzchniach zabytkowych może być potwierdzony również za pośrednictwem metod biochemicznych opartych na wykrywaniu białek (enzymy), fosfolipidów oraz barwników fotosyntetycznych.

Analiza barwników fotosyntetycznych

Tabela 2. Wady i zalety metod molekularnych w analizie biodeterioracji (wg GAO i TAO 2012, KIRK i współaut. 2004, MOREY i współaut. 2013, RASTOGI i SANI 2011)

Technika	Zalety	Wady
Konstrukcja bibliotek genów	“złoty standard” w ocenie bioróżnorodności	duży nakład pracy, czasochłonność,
DGGE/TGGE	możliwość analizy wielu prób jednocześnie, krótki czas analizy, możliwość wycięcia pojedynczych prążków z żelu i ich sekwencjonowanie	analiza krótkiej sekwencji (500 bp), pojedynczy prążek może reprezentować więcej niż jeden gatunek (takie same temperatury topnienia), wykrywanie dominujących gatunków, uzyskanie skomplikowanego profilu (ograniczona liczba) fragmentów możliwa do rozdziału)
ARDRA	detekcja zmian strukturalnych w populacji mikroorganizmów	uzyskanie skomplikowanego profilu (ograniczona liczba fragmentów możliwa do rozdziału)
T-RFLP	wskazywanie różnic w populacji mikroorganizmów, większa liczba próbek, prostszy fingerprint	ograniczona liczba fragmentów możliwa do rozdziału, jednakowe długości fragmentów terminalnych dla różnych gatunków
RISA (ARISA)	możliwość analizy wielu prób jednocześnie, automatyzacja procesu	wymaga dużych ilości DNA, zbyt wysokie oszacowanie różnorodności
SSCP	nie wymaga ogona GC, możliwość wycięcia pojedynczych prążków z żelu i ich sekwencjonowanie, brak gradientu czynnika denaturującego	użyteczność tylko dla krótkich fragmentów (150–400 bp), możliwość przyjęcia więcej niż jednej stabilnej konformacji ssDNA
FISH	analiza in situ, ekstrakcja całości DNA, analiza DNA lub RNA, nie podlega ograniczeniom reakcji PCR	ograniczona czułość, aby sekwencje zostały wykryte, muszą występować w dużej liczbie kopii
Pirosekwencjonowanie	możliwość jednoczesnej analizy wielu próbek, automatyzacja, krótszy czas analizy, niższe koszty, wyższa czułość i wydajność w porównaniu do metody klasycznej	użyteczność tylko dla krótkich fragmentów

W celu identyfikacji bakterii fotosyntetyzujących (sinice) wykorzystuje się rutynową technikę opartą na wykrywaniu chlorofilu, a poprzez porównanie autofluorescencji na drodze cytometrii przepływowej, komórek posiadających ten barwnik lub też wykazujących jego brak (DAKAL i ARORA 2012). W ocenie biodeterioracji obiektów zabytkowych coraz większe znaczenie przypisuje się pomiarowi fluorescencji chlorofilu a, ze względu na szybkość i nieinwazyjność metody oraz możliwość dostarczenia cennych informacji na temat fizjologii organizmów prowadzących fotosyntezę. Zastosowanie jej pozwoliło wykazać obecność mikroflory fotosyntetyzującej na ścianach starożytnych budowli Majów w Meksyku, jak również w sprawdzeniu efektywności działania biocydów na powierzchni kamieni budowlanych (ORTEGA-MORALES i współaut. 2000, TOMASELLI i współaut. 2002).

Analiza składników błon komórkowych

Kwasy tłuszczowe występują w biomacie komórkowej w stałych proporcjach, charakterystycznych dla danej jednostki taksonomicznej. Jakikolwiek różnice w profilu tych związków są jednoznaczne ze zmianami występującymi w populacji mikroorganizmów, co pozwala na ich różnicowanie

(KIRK i współaut. 2004, RASTOGI i SANI 2011). Związki te są ekstrahowane z komórki zazwyczaj na drodze saponifikacji, a następnie przeprowadzane do formy lotnej (estry metylowe kwasów tłuszczowych; ang. fatty acid methyl ester, FAME). Wykorzystanie chromatografii gazowej w analizie FAME powoduje uzyskanie charakterystycznego wzoru kwasów tłuszczowych, który w dalszym etapie porównywany jest z bazą danych (RASTOGI i SANI 2011). Technika ta przyniosła wymierne efekty w identyfikacji bakterii heterotroficznych kolonizujących malowidła ściennie w kościele św. Marcina w Greene (Kreinsen, Niemcy) oraz pozwoliła potwierdzić obecność bakterii z rodzaju *Halomonas* we wnętrzu kaplicy św. Katarzyny w Austrii (HEYRMAN i współaut. 2002, GORBUSHINA i współaut. 2004).

Pośrednią metodą wykorzystywaną do oceny zanieczyszczenia materiału grzybami strzępkowymi jest analiza składnika obecnego w każdej komórce pleśni, ergosterolu. Jego detekcja prowadzona jest z udziałem metod chromatografii cieczowej HPLC oraz połączenia chromatografii gazowej ze spektroskopią mas GC-MS (PASANEN i współaut. 1999, GUTAROWSKA i ŻAKOWSKA 2002, DAKAL i ARORA 2012).

INTERAKCJE Z MATERIAŁEM

Wszelkie zmiany estetyczne i strukturalne obiektów muzealnych powstają na skutek procesów życiowych mikroorganizmów. Negatywne oddziaływanie mikroorganizmów na powierzchnie wiąże się nie tylko z procesami odżywiania i oddychania, ale również z wydzielaniem szkodliwych produktów metabolizmu, powodujących korozję materiału. Drobnoustroje heterotroficzne wytwarzają kwasy organiczne, takie jak kwas 2-ketoglutarynowy, cytrynowy, fumarowy, szczawowy i inne, zdolne do deterioracji, osłabienia struktury, odbarwienia czy zaplamienia (STRZELCZYK

2004). Analiza z zastosowaniem metod spektroskopowych XVII-wiecznego malowidła pochodzącego z kościoła Nossa Senhora da Saudaçõ (Portugalia) pozwoliła potwierdzić obecność szczawianów odpowiedzialnych za uszkodzenia głównie zielonego barwnika. Według ROSADO i współaut. (2013) kwas szczawowy produkowany przez bakterie, grzyby strzępkowe, algi i porosty, reaguje z kalcytem obecnym w nawarstwieniach malarskich, powodując powstanie szczawianu wapnia, wywołującego niekorzystne zmiany estetyczne malowideł.

PROTEOMIKA

Pomimo ograniczonej liczby doniesień na temat badań proteomicznych, ta stosunkowo młoda dyscyplina, której rozwój nastąpił wraz z końcem ubiegłego stulecia (połowa

lat 90.), niesie ze sobą ogromny potencjał. Proteomika, w odróżnieniu od metod biochemicznych opartych na identyfikacji pojedynczych białek, umożliwia jednoczesne wy-

krycie setki białek w komórkach. Ich analiza, w porównaniu z innymi biomarkerami, takimi jak lipidy, czy kwasy nukleinowe, pozwala uzyskać wiarygodniejszy obraz funkcji metabolicznych niż funkcjonalne geny (WILMES i BOND 2006, SCHNEIDER i RIEDEL 2010). Obecnie, coraz częściej mówi się o zastosowaniu metaproteomiki, w której zidentyfikowane białka mogą zostać powiązane bezpośrednio z mikroorganizmem cechującym się daną funkcją metaboliczną (RASTOGI i SANI 2011). Proteomika znalazła zastosowanie w badaniach białek produkowanych przez pleśnie brązowej zgnilizny na powierzchni drewna z widocznymi objawami biodeterioracji (wykryto m.in. oksydazę alkoholową, lipooksygenazę i katalazę) oraz w analizie białek występujących w spoiwach malarskich, pochodzących z fragmentów powierzchni renesansowych dzieł sztuki (TOKARSKI i współaut. 2006, KANG i współaut. 2009). Klasyczny eksperyment proteomiczny obejmuje dwie strategie: (1) opartą na elektroforezie 2D-PAGE i analizie z użyciem metod spektroskopowych (ang. matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight, MALDI-TOF) oraz (2) na

chromatografii cieczowej (WILMES i BOND 2006, SCHNEIDER i RIEDEL 2010). Krokiem poprzedzającym identyfikację metodami spektroskopowymi jest hydroliza białek rozdzielonych na żelu przy udziale proteaz, np. trypsyny. Uzyskane peptydy, w odróżnieniu od białek, z łatwością ulegają elucji, a poza tym dostarczają wystarczającą ilość informacji niezbędnych do ich identyfikacji. Odbywa się ona w wyniku jonizacji składników chemicznych w celu uzyskania naładowanych cząstek, a następnie detekcji liczby jonów w funkcji stosunku ich masy do ładunku (m/z) i porównywania uzyskanych wyników z bazami danych (PANDEY i MANN 2000). Oprócz prostej identyfikacji białek i peptydów, technika MALDI-TOF sprawdza się również w identyfikacji mikroorganizmów. W tym celu wykorzystywane są nie tylko białka, ale także kwasy nukleinowe, a nawet całe komórki. W metodzie whole-cell MALDI-TOF, w odróżnieniu od metod klasycznych, analizie poddawane są białka rybosomalne. Stąd też uzyskany wynik jest rozpatrywany jako fingerprint charakterystyczny dla danego mikroorganizmu (KOUBEK i współaut. 2012).

TECHNIKI MIKROSKOPOWE I ANALIZA POWIERZCHNI MATERIAŁU

Adhezja drobnoustrojów do powierzchni materiałów stanowi bardzo poważny problem w ochronie zasobów dziedzictwa kulturowego (ZYSKA 2001). Terminem biofilm określamy złożoną strukturę, na którą składają się komórki mikroorganizmów otoczone warstwą produktów ich metabolizmu, czyli pozakomórkowych polimerów (EPS) i osadów nieorganicznych, wykazujące zdolność adhezji do powierzchni biologicznych i abiotycznych (BEECH 2004, CZACZYK i MYSZKA 2007). Egzopolisacharydy ułatwiają adhezję innych komórek, niekiedy wykazujących większy potencjał do rozkładu materiału. Powszechnie uznawanymi producentami EPS są bakterie i pleśnie, jednakże zdolność taką posiadają również sinice oraz glony (GAYLARDE i współaut. 2011). Zastosowanie metod mikroskopowych oraz różnorodnych technik analizy powierzchni pozwala znaleźć odpowiedź na pytanie jaką rolę biofilmy odgrywają w biodeterioracji miejsc historycznych.

MIKROSKOPIA

Obserwacje mikroskopowe pozwalają nie tylko określić morfologię mikroorgani-

zmów kolonizujących obiekty muzealne, ale dostarczają cennych informacji dotyczących struktury materiału (krystaliczna czy amorficzna), rozmieszczenia drobnoustrojów na powierzchni, występowania egzopolisacharydów (EPS) oraz zmian w mikrostrukturze po usunięciu biofilmu (BEECH 2004). Warte podkreślenia są przede wszystkim: skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. scanning electron microscopy, SEM) oraz mikroskopia konfokalna (ang. confocal laser scanning microscopy, CSLM) wykorzystywana do zwiększania kontrastu obrazów i obserwacji trójwymiarowych struktur obiektów. Techniki te były wielokrotnie stosowane m.in. w analizie biodeterioracji XVIII-wiecznych fresków, w których stwierdzono adhezję mikrobiologiczną i wyraźne oznaki rozkładu, zabytkowych fotografii i map pochodzących z archiwum muzeum w Argentynie oraz historycznego szkła w celu kontroli procesu tworzenia biofilmów, czy malowideł ściennych w grobowcach maltańskich, aby śledzić wytwarzanie kalcytu (MÜLLER i współaut. 2001, MILANESI i współaut. 2006, GUIAMET i współaut. 2011, ZAMMIT i współaut. 2011).

Podstawą działania SEM jest skanowanie badanej powierzchni zogniskowaną wiązką elektronów wzdłuż kolejnych równoległych linii. W efekcie następuje emisja elektronów wtórnych i promieniowania elektromagnetycznego, które trafiają do detektora. CSLM polega zaś na barwieniu wybranych struktur, widocznych na skutek wzbudzenia fluorescencji barwnika. Dzięki zastosowaniu przesłony konfokalnej przepuszczającej jedynie światło z warstwy, w której powstaje obraz o najlepszych parametrach optycznych, możliwa jest dokładna obserwacja struktury badanej próby oraz trójwymiarowa rekonstrukcja obrazu (HERRERA i VIDELA 2009, KORCZYŃSKI 2013).

ANALIZA POWIERZCHNI

Określenie mechanizmu korozji biologicznej oraz zrozumienie reakcji elektrochemicznych, które wówczas zachodzą, zapewniają różne sposoby analizy powierzchni, spośród których dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (ang. X-ray diffraction, XRD), mikroanaliza rentgenowska (ang. energy dispersive X-ray analysis, EDX) oraz spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) znalazły zastosowanie w odniesieniu do miejsc o charakterze historycznym (BEECH 2004). Technika XRD została użyta m.in. w odniesieniu do zabytkowych fontann w Granadzie (Hiszpania) w celu ustalenia produktów korozyjnych oraz składu mineralnego materiału, a także, aby przeprowadzić analizę chemiczną powierzchni katedry w Mediolanie, przy czym w obu przypadkach w przeważającej ilości prób stwierdzono obecność kalcytu (SARRÓ i współaut. 2006, CAPITELLI i współaut. 2007). Freski pochodzące z XVIII w. były natomiast poddane mikro-

analizie rentgenowskiej EDX, która pozwoliła określić skład pierwiastkowy fragmentów z widocznymi objawami rozkładu mikrobiologicznego (MILANESI i współaut. 2006). W celu ustalenia składu chemicznego zabytkowego papieru, a w konsekwencji potwierdzenia obecności w nim grzybów strzępkowych, przeprowadzono analizę opartą na spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ZOTTI i współaut. 2008).

Analiza XRD stanowi użyteczne narzędzie w identyfikacji oraz ustaleniu struktury związków chemicznych, przy czym każda struktura krystaliczna reprezentowana jest przez unikatowy wzór dyfrakcyjny (HERRERA i VIDELA 2009). EDX jest analizą chemiczną małej części próbki, w której wykorzystywane jest emitowane przez próbkę promieniowanie rentgenowskie, jednakże związki występujące w niewielkich stężeniach, np. pigmenty nie nadają się do badań w oparciu o tę metodę (DAKAL i ARORA 2012). FTIR jest z kolei metodą umożliwiającą ustalenie składu chemicznego skomplikowanych związków chemicznych, w wyniku identyfikacji poszczególnych wiązań w cząsteczce. Technika ta sprawdza się także w identyfikacji mikroorganizmów – może być zastosowana bez względu na gatunek, a co ważne, nie wymaga dostarczenia dużej ilości biomasy. Pomimo licznych zalet, takich jak czułość czy prosty sposób przygotowania próbki, interpretacja widm FTIR może okazać się kłopotliwa, np. ze względu na podobieństwa pomiędzy związkami występującymi w komórkach grzybów strzępkowych (polisacharydy, lipidy, białka) a substancjami spotykanymi w papierze (SANTOS i współaut. 2010, GAYLARDE i współaut. 2011, ZOTTI i współaut. 2011).

WYZWANIA I PROGNOZY NA PRZYSZŁOŚĆ

Obecny stan wiedzy nie pozwala jednoznacznie wyłonić dominującej mikroflory kolonizującej miejsca o charakterze historycznym, jak również precyzyjnie ustalić mechanizm biodeterioracji. Stąd też tak istotne jest wdrożenie metod, które pozwolą nie tylko zidentyfikować drobnoustroje, ale przede wszystkim pozwolą znaleźć brakujące ogniwo łączące dany gatunek z rolą, jaką odgrywa w procesie biodeterioracji, a także ustalić jego źródło. W prawidłowej konserwacji obiektów muzealnych niezbędne jest szerokie spojrzenie na problem

biodeterioracji. Każda z metod z osobna (techniki biologii molekularnej, wykrywanie biomolekuł i metabolitów drobnoustrojów oraz mikroskopia i analiza powierzchni materiałów) doskonale sprawdza się w określonym obszarze, ale może okazać się niewystarczająca w pełnej interpretacji tego zjawiska. Wyjście z sytuacji stanowi połączenie opisanych metod oraz znalezienie związku pomiędzy nimi, stanowiącego fundament zjawiska biodeterioracji, a jednocześnie punkt wyjścia dla prac konserwatorskich i renowacji zabytków.

WSPÓŁCZESNE METODY STOSOWANE W ANALIZIE BIODETERIORACJI OBIEKTÓW ZABYTKOWYCH

Streszczenie

Interpretacja zjawiska biodeterioracji obiektów muzealnych wymaga podjęcia działań obejmujących identyfikację dominujących gatunków mikroorganizmów oraz ustalenie związku pomiędzy cechami metabolicznymi zidentyfikowanych mikroorganizmów a właściwościami chemicznymi badanych materiałów. Z tego powodu konieczność opracowywania i wdrażania nowych metod badawczych wydaje się nieodzowna. Do precyzyjnego określenia przynależności taksonomicznej drobnoustrojów pochodzących z badanej próby, również tych niehodowlanych w warunkach laboratoryjnych, przyczynił się rozwój metod molekularnych: genetycznego fingerprintingu

(m.in. DGGE/TGGE, T-RFLP, SSCP, ARISA, ARDRA), sekwencjonowania rRNA, narzędzi bioinformatycznych, czy metagenomiki. Oznaczenie określonych biomolekuł na powierzchniach zabytkowych, będących następstwem rozwoju drobnoustrojów, oparte jest na stosunkowo młodej dyscyplinie, metabolomice. Całość dopełniają metody analityczne (takie jak np. SEM, EDX, XRD, FTIR), dzięki którym można określić skutki interakcji drobnoustrojów z materiałem zabytkowym oraz mechanizm biodeterioracji.

W artykule przedstawiono i scharakteryzowano współczesne techniki pozwalające ocenić zjawisko biodeterioracji materiałów zabytkowych.

CURRENT RESEARCH TECHNIQUES FOR STUDIES ON BIODETERIORATION OF HISTORICAL OBJECTS

Summary

Incomplete knowledge of agents responsible for biodeterioration of the museum objects prevents from introducing effective restoration strategies. For proper conservation approaches it is necessary to identify complete microbial consortium inhabiting a given object, as well as, to find connections between products of microbial metabolism and chemical features of the material the object is made of. Therefore, development and application new methods for the study of biodeterioration of historical objects seems to be indispensable. To precisely de-

termine the taxonomic position of microorganisms inhabiting museum objects, the evaluation of different existing molecular techniques is necessary, for instance genetic fingerprinting, ribosomal RNA gene sequencing, bioinformatics or metagenomics. Identification of microbial metabolic products is possible with the help of recently emerged approach, metabolomics. In this paper some current research techniques in use for the evaluation of biodeterioration of historical objects are presented.

LITERATURA

- ALLSOPP D., 2011. *Worldwide wastage: the economics of biodeterioration*. Microbiol. Today 38, 150–153.
- ATKINS S. D., CLARK I. M., 2004. *Fungal molecular diagnostics: a mini review*. J. Appl. Genet. 45, 3–15.
- BEECH I. B., 2004. *Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understanding and state-of-the art methods of study*. Int. Biodeter. Biodegrad. 53, 177–183.
- BERDOULAY M., SALVADO J. C., 2009. *Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones*. Lett. Appl. Microbiol. 49, 311–316.
- CAPITELLI F., PRINCIPI P., PEDRAZZANI R., TONIOLO L., SORLINI C., 2007. *Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins*. Sci. Total Environ. 385, 172–181.
- CAPODICASA S., FEDI S., PORCELLI A. M., ZENNONI D., 2010. *The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting*. Int. Biodeter. Biodegrad. 64, 727–733.
- CLARRIDGE J. E., 2004. *Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases*. Clin. Microbiol. Rev. 17, 840–862.
- CUTLER N. A., OLIVER A. E., VILESA H. A., AHMADA S., WHITELEY A. S., 2013. *The characterisation of eukaryotic microbial communities on sandstone buildings in Belfast, UK, using T-RFLP and 454 pyrosequencing*. Int. Biodeter. Biodegrad. 82, 124–133.
- CUZMAN O. A., 2009. *Biofilms on exposed monumental stones: mechanism of formation and development of new control methods*. Praca doktorska, Uniwersytet Boloński, Bolonia.
- CZACZYK K., MYSZKA K., 2007. *Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation*. Pol. J. Environ. Stud. 16, 799–806.
- DAKAL T. C., ARORA P. K., 2012. *Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 11, 71–104.
- DEJA-SIKORA E., SIKORA M., GOŁĘBIEWSKI M., TRETYN A., 2007. *Biblioteki metagenomowe jako źródło genów przydatnych w biotechnologii*. Biotechnologia 4, 125–139.
- FISHER M. M., TRIPLETT E. W., 1999. *Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4630–4636.
- GAO D., TAO Y., 2012. *Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community*. Front. Environ. Sci. Engineer. 6, 82–97.
- GAYLARDE C. C., MORTON L. H. G., LOH K., SHIRAKAWA M. A., 2011. *Biodeterioration of external archi-*

- tectural paint films – a review. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 65, 1189-1198.
- GONZÁLEZ J. M., 2002. *Overview on existing molecular techniques with potential interest in cultural heritage.* *Coalition* 5, 4-7.
- GONZÁLEZ J. M., SAIZ-JIMÉNEZ C., 2005. *Unknown microbial communities on rock art painting. Consequences for conservation and future perspectives.* *Coalition* 10, 4-7.
- GORBUSHINA A. A., HEYRMAN J., DORNIEDEN T., GONZALES-DELVALLE M., KRUMBEIN W. E., LAIZ L., PETERSEN K., SAIZ-JIMÉNEZ C., SWINGS J., 2004. *Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greenee – Kreiensen, Germany).* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 53, 13-24.
- GUIAMET P., BORREGO S., LAVIN P., PERDOMO I., GÓMEZ DE SARAVIA S., 2011. *Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentine and the National Archive of the Republic of Cuba.* *Colloids Surfaces B: Biointerfac.* 85, 229-234.
- GUTAROWSKA B., ZAKOWSKA Z., 2002. *Elaboration and application of mathematical model for estimation of mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 49, 299-305.
- HANDELSMAN J., RONDON J., BRADY M. R., CLARDY S. F., GOODMAN R. M., 1998. *Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products.* *Chem. Biol.* 5, 245-249.
- HELMS A. C., MARTINY A. C., HOFMAN-BANG J., AHRING B. K., KILSTRUP M., 2004. *Identification of bacterial cultures from archeological wood using molecular biological techniques.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 53, 79-88.
- HERRERA L. K., VIDELA H. A., 2009. *Surface analysis and material characterization for the study of biodeterioration and weathering effects on cultural property.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 63, 813-822.
- HEYRMAN J., SWINGS J., 2003. *Modern diagnostic techniques on isolates.* *Coalition* 6, 9-13.
- HEYRMAN J., BALCAEN A., DE VOS P., SWINGS J., 2002. *Halomonas muralis* sp. nov., isolated from microbial biofilms colonizing the walls and murals of the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *Int. J. Systemat. Evolut. Microbiol.* 52, 2049-2054.
- JANDA J. M., ABBOT S. L., 2007. *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls.* *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761-2764.
- KANG Y. M., PREWITT M. L., DIEHL S. V., 2009. *Proteomics for biodeterioration of wood (Pinus taeda L.): Challenging analysis by 2-D PAGE and MALDI-TOF/MS.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 63, 1036-1044.
- KEER J. T., BIRCH L., 2003. *Molecular methods for the assessment of bacterial viability.* *J. Microbiol. Meth.* 53, 175-183.
- KIM M., MORRISON M., YU Z., 2011. *Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes.* *J. Microbiol. Meth.* 84, 81-87.
- KIRK J. L., BEAUDETTE L. A., HART M., MOUTOGLIS P., KLIRONOMOS J. N., LEE H., TREVORS J. T., 2004. *Methods of studying soil microbial diversity.* *J. Microbiol. Meth.* 58, 169-188.
- KORCZYŃSKI J., 2013. *Nowy wymiar mikroskopii – skanujący laserowy mikroskop konfokalny.* *Kosmos* 62, 149-160.
- KOUBEK J., UHLIK O., JECNA K., JUNKOVA P., VRKOSLAVOVA J., LIPOV J., KURZAWOVA V., MACEK T., MACKOVA M., 2012. *Whole-cell MALDI-TOF: rapid screening method in environmental microbiology.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 69, 82-86.
- KUMARI N., SRIVASTAVA A. K., BHARGAVA P., RAI L. C., 2009. *Molecular approaches towards assessment of cyanobacterial biodiversity.* *Afr. J. Biotechnol.* 18, 4284-4298.
- LAN W., HUI L. H., WANG W. D., KATAYAMA Y., GU J. D., 2010. *Microbial community analysis of fresh and old microbial biofilms on Bayon temple sandstone of Angkor Thom, Cambodia.* *Microb. Ecol.* 60, 105-115.
- LÓPEZ-MIRAS M., PIÑAR G., ROMERO-NOGUERA J., BOLÍVAR-GALIANO F. C., ETTENAUER J., STERFLINGER K., MARTÍN-SÁNCHEZ I., 2013. *Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential.* *Aerobiologia* 29, 301-314.
- MICHAELSEN A., PINZARI F., RIPKA K., LUBITZ W., PIAR G., 2006. *Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonizing paper material.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 58, 133-141.
- MICHAELSEN A., PIÑAR G., MONTANARI M., PINZARI F., 2009. *Biodeterioration and restoration of a 16th – century book using a combination of conventional and molecular techniques: a case study.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 63, 161-168.
- MICHAELSEN A., PIÑAR G., PINZARI F., 2010. *Molecular and microscopical investigation of the microflora inhabiting a deteriorated Italian manuscript dated from thirteenth century.* *Microb. Ecol.* 60, 69-80.
- MILANESI C., BALDI F., BORIN S., VIGNANI R., CIAMPOLINI F., FALERI C., CRESTI M., 2006. *Biodeterioration of fresco by biofilm forming bacteria.* *Int. Biodeter. Biodegrad.* 57, 168-173.
- MOCALI S., BENEDETTI A., 2010. *Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology.* *Res. Microbiol.* 161, 497-505.
- MOREY M., FERNANDEZ-MARMIESSE A., CASTIÑEIRAS D., FRAGA J. M., COUCE M. L., COCHO J. A., 2013. *A glimpse into past, present, and future DNA sequencing.* *Mol. Genet. Metabol.* 110, 3-24.
- MUYZER G., 1999. *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.* *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317-322.
- MUYZER G., WALL E. C., UITTERLINDEN A. G., 1993. *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA.* *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- MÜLLER E., DREWELLO U., DREWELLO R., WEISSMANN R., WUERTZ S., 2001. *In situ analysis of biofilms on historic window glass using confocal laser scanning microscopy.* *J. Cult. Herit.* 2, 31-42.
- OLIVER J. D., 2005. *The viable but nonculturable state in bacteria.* *J. Microbiol.* 43, 93-100.
- ORTEGA-MORALES O., GUEZENNEC J., HERNÁNDEZ-DUQUE G., GAYLARDE C. C., GAYLARDE P. M., 2000. *Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico.* *Curr. Microbiol.* 40, 81-85.
- PANDEY A., MANN M., 2000. *Proteomics to study genes and genomes.* *Nature* 405, 837-846.
- PASANEN A. L., YLI-PIETILÄ K., PASANEN P., KALLIOKOSKI P., TARHANEN J., 1999. *Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials.* *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 138-142.
- PETROSINO J. F., HIGHLANDER S., LUNA R. A., GIBBS R. A., VERSALOVIC J., 2009. *Metagenomic pyrosequencing and microbial identification.* *Clin. Chem.* 55, 856-866.

- PIÑAR G., GARCIA-VALLES M., GIMENTO-TORRENTE D., FERNANDEZ-TURIEL J. L., ETTENAUER J., STERFLINGER K., 2013. *Microscopic, chemical and molecular – biological investigation of the decayed medieval stained window glasses of two Catalanian churches*. Int. Biodeter. Biodegrad. 84, 388–400.
- RANJARD L., POLY F., LATA J. C., MOUGEL C., THIOULOUSE J., NAZARET S., 2001. *Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4479–4487.
- RASTOGI G., SANI K., 2011. *Molecular techniques to assess microbial community structure, function and dynamics in the environment*. [W:] *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. AHMAD I., AHMAD F., PICHTEL J. (red). Springer, New York, 29–57.
- RIPKA K., 2005. *Identification of microorganisms on stone and mural paintings using molecular methods*. Praca magisterska, Uniwersytet Wiedeński, Wiedeń.
- RONAGHI M., 2001. *Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing*. Gen. Res. 11, 3–11.
- RÖLLEKE S., MUYZER G., WAWER C., WANNER G., LUBITZ W., 1996. *Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2059–2065.
- ROSADO T., GIL M., MIRÃO J., CANDEIAS A., CALDERIA A. T., 2013. *Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms – a comprehensive study*. Int. Biodeter. Biodegrad. 85, 1–7.
- SANTOS C., FRAGA M. E., KOZAKIEWICZ Z., LIMA N., 2010. *Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts*. Res. Microbiol. 161, 168–175.
- SARRÓ M. I., GARCÍA A. M., RIVALTA V. M., MORENO D. A., ARROYO I., 2006. *Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain)*. Build. Environ. 41, 1811–1820.
- SCHABEREITER-GURTNER C., PIÑAR G., LUBITZ W., RÖLLEKE S., 2001. *An advanced strategy to identify bacterial communities on art objects*. J. Microbiol. Meth. 45, 77–87.
- SCHNEIDER T., RIEDEL K., 2010. *Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities*. Proteomics 10, 785–798.
- SHAH N., TANG H., DOAK T. G., YE Y., 2011. *Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA*. Pacific Symposium on Biocomputing, 165–176.
- SPROCATI A. R., ALISI C., TASSO F., VEDOVATO E., BARBABIETOLA N., CREMISINI C., 2008. *A microbiological survey of the Etruscan mercareccia tomb (Italy): contribution of microorganisms to deterioration and restoration*. [W:] *Materiaty konferencyjne, 9th International Conference on NDT of Art*. Jerozolima, Izrael, 1–9.
- STEELE H. L., STREIT W. R., 2005. *Metagenomics: advances in ecology and biotechnology*. FEMS Microbiol. Lett. 247, 105–111.
- STRZELCZYK A. B., 2004. *Observations on aesthetic and structural changes induced in Polish historic objects by microorganisms*. Int. Biodeter. Biodegrad. 53, 151–156.
- TOKARSKI C., MARTIN E., ROLANDO C., CREN-OLIVÉ C., 2006. *Identification of proteins in renaissance paintings by proteomics*. Analyt. Chem. 78, 1494–1502.
- TOMASELLI L., LAMENTI G., TIANO P., 2002. *Chlorophyll fluorescence for evaluating biocide treatments against phototrophic biodeteriogens*. Ann. Microbiol. 52, 197–206.
- URZI C., DE LEO F., DONATO P., LA CONO V., 2003. *Study of microbial communities colonizing hypogean monument surfaces using nondestructive and destructive sampling methods*. [W:] *Art, biology and conservation: biodeterioration of works of art*. KOESTLER R. J., KOESTLER V. H., CHAROLA A. L., NIETO-FERNANDEZ F. E. (red.). The Metropolitan Museum of Art, Nowy Jork, 316–327.
- WILMES P., BOND P. L., 2006. *Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems*. Trend Microbiol. 14, 92–97.
- ZAMMIT G., SÁNCHEZ-MORAL S., ALBERTANO P., 2011. *Bacterially mediated mineralization processes lead to biodeterioration of artworks in Maltese catacombs*. Sci. Total Environ. 409, 2773–2782.
- ZOTTI M., FERRONI A., CALVINI P., 2008. *Microfungal biodeterioration of historic paper: preliminary FTIR and microbiological analysis*. Int. Biodeter. Biodegrad. 62, 186–194.
- ZOTTI M., FERRONI A., CALVINI P., 2011. *Mycological and FTIR analysis of biotic foxing on paper substrates*. Int. Biodeter. Biodegrad. 65, 569–578.
- ZYSKA B., 2001. *Budynki stare i nowe*. [W:] *Katastrofy, awarie i zagrożenia mikrobiologiczne w przemyśle i budownictwie*. ZYSKA B. (red.). Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 132–194.
- ZYSKA B., 2005. *Biologia drobnosutrojów*. [W:] *Mikrobiologia materiałów*. ZYSKA B., ŻAKOWSKA Z. (red.). Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 15–88.