

DETEKCE POVRCHOVÉ KONTAMINACE HISTORICKÉHO ZUBNÍHO KAMENE SKENOVACÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPIÍ

Detection of surface contamination in ancient dental calculus by scanning electron microscopy

Chocholová Eva^{1*}, Fialová Dana^{1*},
Skoupý Radim², Drozdová Eva¹, Šín Lukáš³

¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

² Ústav přístrojové techniky, Akademie věd ČR,
Brno, Česká republika

³ Archeologické centrum Olomouc, Olomouc, Česká republika
*Sdílené prvoautorství – autoři k výsledkům i publikaci
přispěli stejným dílem.

Abstract

To detect surface contamination of ancient dental calculus scanning electron microscopy (SEM) was used independently as well as coupled with detector of energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Electron micrographs of samples from four individuals from locality náměstí Svobody, Znojmo (SEM imaging) and from Majetín man (EDX analysis) were taken. Significant contamination with recent fungi (hyphae and spores) and bacteria (not the original part of ancient dental calculus) was found in all samples from náměstí Svobody, Znojmo. In the sample from Majetín man, the permeability of selected elements from the soil was determined, thus confirming the contamination of the external side (in contact with the soil) of the tartar. The inside was not contaminated.

The applied methods can be used non-destructively and to utilise comparative microscopy for ancient dental calculus. Thus, an increased amount of contamination from the external environment can be detected before the following analyses. Further experiments can be modified based on this finding, or samples can be excluded from the research in time before costly destructive (especially molecular) analyses are applied.

Key words: SEM, tartar, dental anthropology, soil, fungi, EDX, elemental composition, contaminant

Úvod

Lidský zubní kámen vzniká kalcifikací zubního plaku, pokud není odstraněn. Vzhledem k hygienickým návykům se tedy do současnosti pro studium historických populací zachoval zubní kámen hojně napříč časem i prostorem. Zejména v posledních letech se stal centrem pozornosti několika výzkumů a přinesl nové možnosti studia minulosti. V jeho struktuře se mohou zachytit částice různého původu (nositelovy, přijaté s potravou, vdechnuté či jinak vpravené do ústní dutiny) a díky kalcifikaci jsou dále uchovány. Identifikovány byly například části rostlinných vláken, fytolity, škrobová zrna, pyl či zvířecí srst (např. Boyadjian, Eggers, & Reinhard, 2007; Buckley, Usai, Jakob, Radini, & Hardy, 2014; Hardy et al., 2012;

Hardy et al., 2009; Henry, Brooks, & Piperno, 2011; Power, Salazar-García, Wittig, & Henry, 2014). Důležitou komponentou jsou kalcifikované bakterie spolu s jejich DNA, která byla v historickém zubním kamenu objevena transmisí elektronovou mikroskopií (TEM) u 4–5 tisíc let starého vzorku teprve v roce 2011 (Preus, Marvik, Selvig, & Bennike). Lze studovat i prvkové složení kamene, a to i v souvislosti se způsobem života (Fialová et al., 2017b; Radini et al., 2019).

Před použitím destruktivních metod, jako jsou ty molekulární, je vhodné o materiálu zjistit maximum nedestruktivně, tedy například skenovací elektronovou mikroskopií (Fialová, Drozdová, Skoupý, Mikulík, & Klíma, 2017a), a to s využitím různých detektorů (Fialová et al., 2017b). Lze tak například odhalit vyšší množství kontaminace, které by mohlo ohrozit věrohodnost molekulárních analýz. U podobných výzkumů se problém v nynější době daří částečně řešit bioinformatickými nástroji. Těmi lze část mikroorganismů, které nejsou ve vzorku původní, odfiltrout *in silico* analýzou (např. porovnáním s databázemi). Následnými analýzami se však nelze zbavit veškeré kontaminace, je třeba ji řešit ještě před experimentem. Včasné odhalení silně znečištěných vzorků tedy může omezit zkreslení způsobené kontaminací, případně tyto vzorky vyloučit z analýz úplně.

Cíl

Cílem výzkumu bylo zjistit možnosti odhalení kontaminace povrchu zubního kamene za pomoci nedestruktivní skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a také v kombinaci s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií (EDX).

Materiál

K výzkumu byly použity vzorky lidského zubního kamene ze hřbitova na náměstí Svobody ve Znojmě (NSZ) a z lokality Majetín.

Kontaminace byla studována pomocí SEM bez EDX na čtyřech jedincích (NSZ 19, NSZ 107, NSZ 116, NSZ 146). Hřbitov na náměstí Svobody ve Znojmě je datován do 13.–16. stol. Záchranný archeologický výzkum vedl Čižmář v letech 2006 a 2007 pod Ústavem archeologické památkové péče Brno. Jedná se o jedince pohřbené u špitálního kostela, kde byla záchovalost koster postižena přestavbami kostela, překrýváním hrobů, pozdější zástavbou a přesuny do osáří (Pechníková, 2008). U všech čtyřech vybraných jedinců však jde o primární pohřeb s drobnými nálezy, jako je keramika nebo kovové předměty. Antropologické zpracování provedla Pechníková (2008). Určené pohlavy a věk jsou uvedeny v tabulce 1. Příklad zubního kamene před odběrem je na obrázku 1.



Obrázek 1. Příklad zubního kamene jedince NSZ 146 před odběrem. Šipkou je označen kámen dále pozorovaný pomocí SEM.

Prvkové složení zubního kamene bylo zkoumáno pomocí SEM s využitím detektoru EDX na vzorku muže ve věku 30–50 let (H 801) nalezeného v obci Majetín. Byla u něj způsobem potvrzena hypotéza, že se pravděpodobně jednalo o napoleonského vojáka (Fialová et al., 2017b; Šín & Vrána, 2014). Podrobnější informace o jedinci i odebraném zubním kameni jsou v tabulce 1. Muž měl specificky opotřebovaný chrup, což bylo způsobeno používáním zubů při otevírání sáčků se střelným prachem a kulkou (Šín & Vrána, 2014). Zmíněnou metodou byla zjištěna přítomnost olova/síry v zubním kameni, což tuto hypotézu potvrdilo (Fialová et al., 2017b). Díky speciální úpravě vzorku zubního kamene (viz metody) řezem a vyleštěním, bylo možné pozorovat kontaminace vzorku prvky pocházejícími z vnějšího prostředí. A zároveň tím rozlišit kontaminaci od vlastních komponovaných prvků.

Tabulka 1. Označení, pohlaví a věk studovaných jedinců, umístění a stupeň rozvoje zubního kamene před odběrem.

Označení jedince	Pohlaví	Věk	Umístění zubního kamene	Stupeň rozvoje
NSZ 19	Muž	25–29 let	36 linguálně	3
NSZ 107	Muž	35–39 let	15 bukálně	3
NSZ 116	Neurčeno	18–19 let	33 mesiálně	1
NSZ 146	Muž	20–25 let	41 labiálně	2
Majetín H 801	Muž	30–50 let	41 labiálně	2

Poznámka. NSZ (náměstí Svobody, Znojmo) (antropologicky Pechníková, 2008). Majetín (antropologicky Šín & Vrána, 2014). Značení typu zubu podle FDI (Fédération Dentaire Internationale – Světová dentální federace). Stupeň rozvoje zubního kamene (Brothwell, 1981) 1 = mírný, 2 = střední, 3 = značný.

Metody

Těsně před odběrem vzorků zubního kamene byl jeho stupeň rozvoje zaznamenán podle Brothwellova schématu (1981). Nejedná se tedy o původní rozsah poškození zubním kamenem při vyzvednutí pozůstatků.

Původní umístění odebraných fragmentů zubního kamene použitého při SEM jsou uvedena v tabulce 1 spolu se stupněm rozvoje. Pro zjednodušení jsou slovní popisy převedeny na číselnou stupnici – mírný stupeň rozvoje = 1, střední = 2 a značný = 3.

Byla použita metodika dříve popsána ve Fialová et al. (2017a). Zubní kámen byl fotograficky zdokumentován a poté sterilně odebrán v laminárním boxu stomatologickým nástrojem (dlátko a škrabadlo) do sterilního uzavíratelného sáčku. Mezi odběrem vzorků od různých jedinců byl laminární box dekontaminován.

Zobrazování pomocí SEM bylo provedeno v mikroskopu Magellan 400L (FEI). Přirozená vodivost vzorků byla dostatečná i k pozorování ve vysokém vakuu, nebylo je tedy nutné nijak povrchově upravovat (naprašovat tenkou vrstvou kovu nebo napařovat uhlík). Vzorky byly připevněny pomocí oboustranné uhlíkové pásky. Zubní kámen byl pozorován vždy z vnitřní strany, tedy té, která před odběrem přiléhala k zubu, kde nebyla předpokládána kontaminace z vnějšího prostředí. V případě jejího zjištění bylo potvrzeno nedokonalé přiléhání kamene k zubu a možnost snížené věrohodnosti dalších výsledků. Vzorky byly pozorovány při proudu elektronového svazku 50 pA a s různým urychlovacím napětím, které je vždy uvedeno na snímku. Vzorek z Majetína byl pozorován s urychlovacím napětím 30 kV.

Následné měření objektů ze snímků SEM bylo provedeno v programu ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

Vzorek zubního kamene odebraného od muže z Majetína (H 801) byl speciálně upraven pro zobrazení plošného rozložení prvků v příčném řezu (Fialová et al., 2017b). Pro tuto analýzu byl využit detektor ED APOLLO X Silicon Drift Detector (EDAX). Úprava vzorku spočívala v jeho zapuštění spolu s ocelovými pružinami do bloku z epoxidové pryskyřice použitím EpoFix kit (Struers), kde pro vakuovou impregnaci (proti vzniku porozity) bylo použito speciálně vyrobené zařízení. Poté byl tento blok opatrně zbroušen a vyleštěn do konečné podoby použitím 1 µm diamantové suspenze přístrojem Struers Tegramin. Řez byl proveden tak, aby na snímku bylo možné vidět případné přírůstky kamene a zároveň vnější strana (vlevo), která byla v kontaktu s vnějším prostředím (půdou). EDX spektrum půdy z okolí hrobu již bylo provedeno v předchozí publikaci Fialové et al. (2017b).

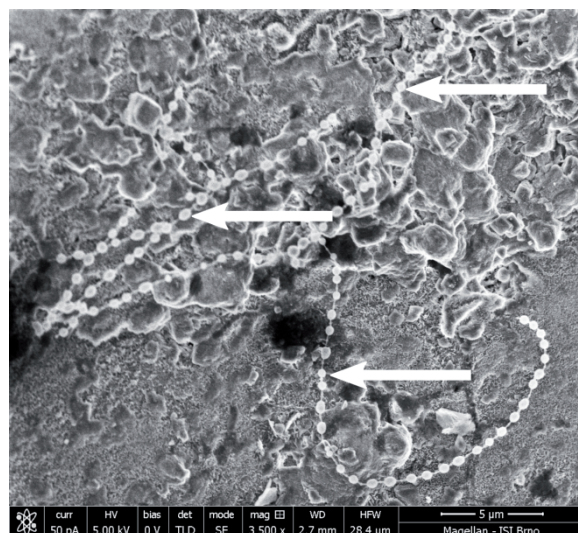
Výsledky

U všech čtyř jedinců z náměstí Svobody, ze Znojma (NSZ 19, NSZ 107, NSZ 116, NSZ 146) byla pomocí SEM nalezena kontaminace na vnitřní straně zubního kamene (Obrázek 2–6), tedy na straně původně přiléhající k zubu. V tabulce 2 je zobrazen přehled všech kontaminujících látek u jednotlivých hrobů. Na obrázku 2 lze vidět kontaminaci řetízky s kokoidními útvary o velikosti od 0,2 do 0,7 µm a na obrázcích 3, 4 a 5 plísní. Dále lze na obrázku 6 pozorovat přítomnost recentní (kontaminující) bakterie o délce asi 2,3 µm a šířce přibližně 1 µm. Šířka hyf plísní (Obrázek 3 a 4) byla velmi variabilní v závislosti na pokrývaném povrchu. Spory plísní (Obrázek 5) měly průměr od 0,8 do 1,2 µm, tloušťku asi od 0,2 do 0,5 µm. Pro srovnání jsou na obrázku 7 otisky bakterií, které byly původní součástí zubního kamene, tedy ústního mikrobiomu jedince. Délka vybrané z nich je 1 µm a šířka 0,3–0,5 µm.

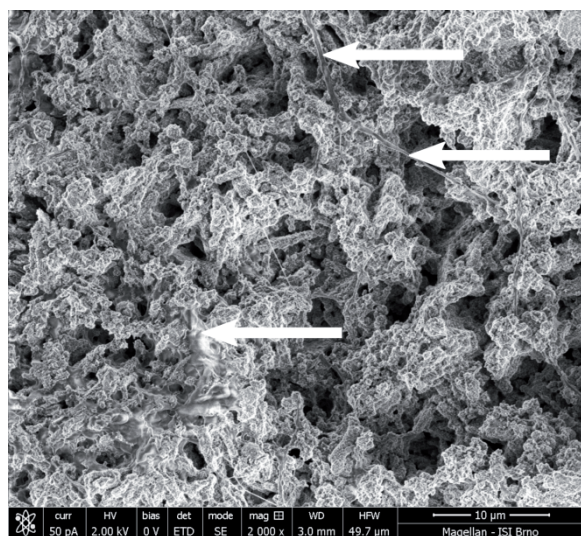
Tabulka 2. Přehled kontaminant na povrchu historického zubního kamene u zkoumaných jedinců z lokality náměstí Svobody, Znojmo (NSZ).

Označení jedince	NSZ 19	NSZ 107	NSZ 116	NSZ 146
Řetízky s kokoidními útvary	–	–	+	–
Bakterie	+	–	+	+
Hyfy plísní	+	+	+	+
Spory plísní	+	–	–	+

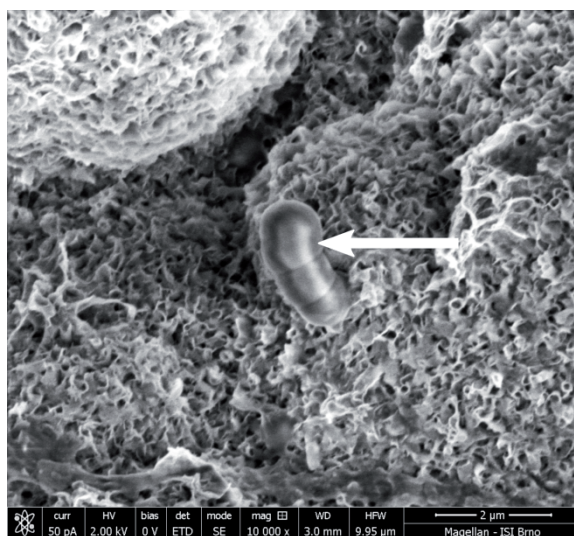
Poznámka. Nalezená kontaminanta +, nenalezená –.



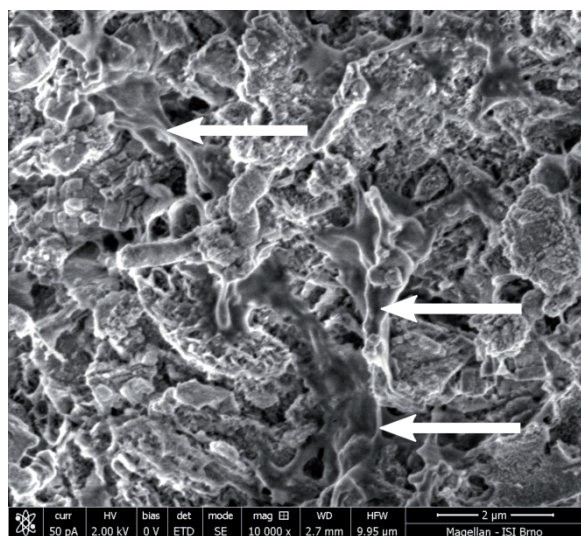
Obrázek 2. Snímek vzorku NSZ 116. Šipkami je označena kontaminace z vnějšího prostředí. V okolí se nachází krystaly, které jsou součástí zubního kamene.



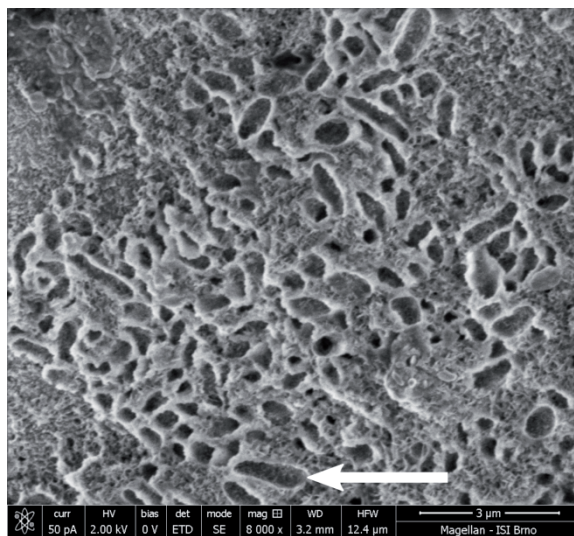
Obrázek 3. Snímek vzorku NSZ 107. Šipkami je označena kontaminace (hyfy plísni).



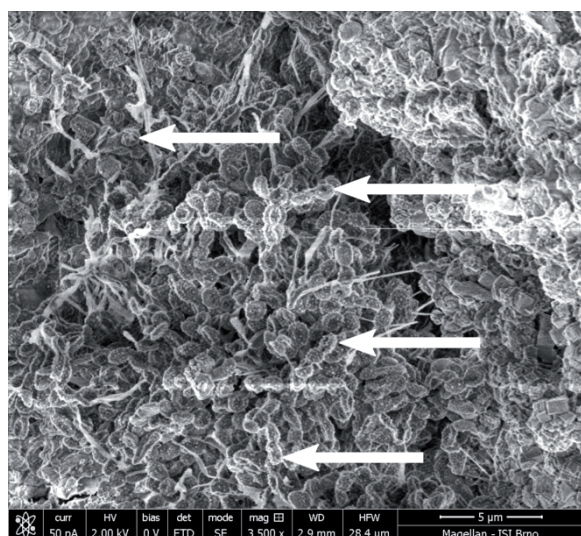
Obrázek 6. Snímek vzorku NSZ 19. Šipkou je označena kontaminace, pravděpodobně bakterie.



Obrázek 4. Snímek vzorku NSZ 146. Šipkami je označena kontaminace (hyfy plísni).

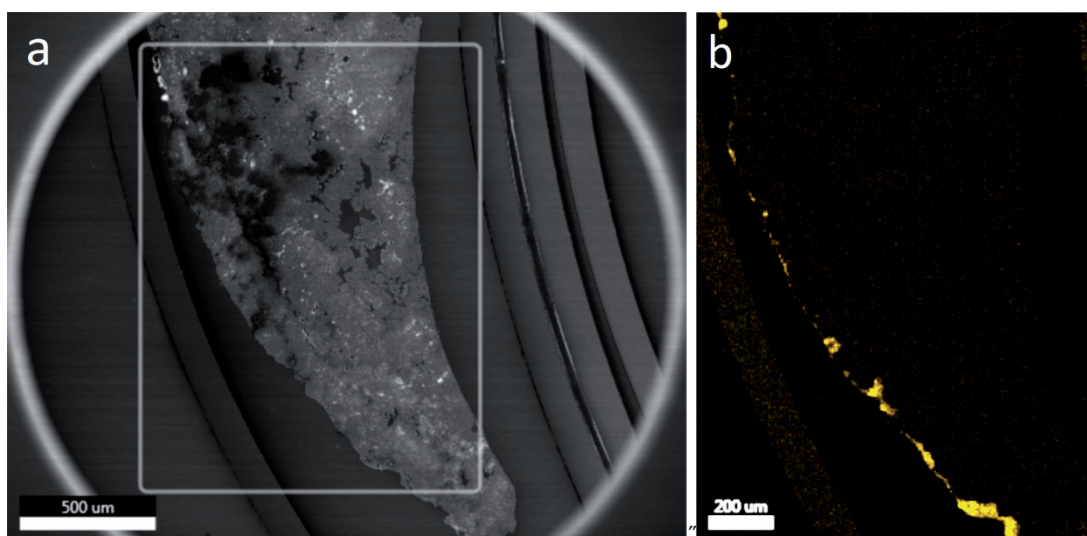


Obrázek 7. Snímek vzorku NSZ 19. Šipkou je označen příklad otisku bakterie, která byla původní v zubním kameni.

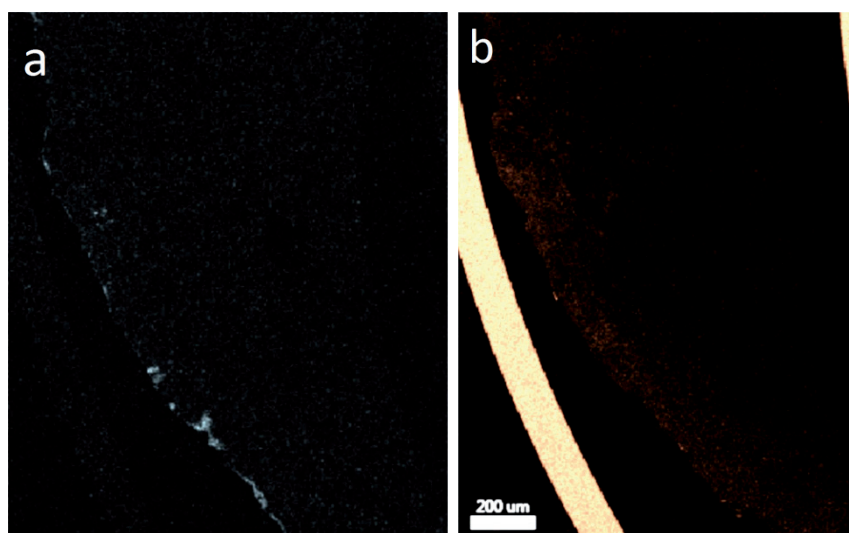


Obrázek 5. Snímek vzorku NSZ 146. Šipkami je označena kontaminace (spory plísni).

U muže z Majetína (H 801) byla zvolena metoda detekce prvkové kontaminace pomocí SEM s EDX detektorem. Labiolingválním řezem by bylo možné pozorovat přírůstky zubního kamene v čase (Obrázek 8a). V našem případě tím bylo možné vysledovat i chování jednotlivých prvků pocházejících z půdy (půda náležala původně vlevo). V půdě byly potvrzeny tyto prvky (seřazené dle množství od nejvíce zastoupeného): kyslík, křemík, uhlík, hliník, sodík, železo, hořčík, draslík, vápník, fosfor (Fialová et al., 2017b). Snímky pořízené pomocí EDX detektoru (Obrázek 8b a 9a, b) ukazují distribuci jednotlivých prvků ve vzorku zubního kamene v řezu. Na obrázku 8b je patrná jasná povrchová kontaminace křemíkem z vnějšího prostředí (z půdy), stejně tak hliníkem na obrázku 9a. Na obrázku 9b je zobrazena distribuce železa, u kterého je zřetelný gradient prostupu tohoto prvku z vnějšího prostředí (jasná železná čára vlevo je ocelová výztuha). U zmíněných prvků pocházejících z půdy byl gradient znatelný pouze u železa, což je pravděpodobně dáno jeho rozpustností. Křemík a hliník byl zřetelný pouze na povrchu vzorku bez tendence prostupovat. Proto se tyto dva prvky zdají být vhodným ukazatelem případné vnitřní kontaminace, která se u našeho vzorku ale nevyskytla.



Obrázek 8. Snímek vzorku zubního kamene muže z Majetína v řezu z skenovacího elektronového mikroskopu (a) (Fialová et al., 2017b) a distribuce křemíku (b) v řezu pomocí EDX detektoru.



Obrázek 9. Distribuce hliníku (a) a železa (b) v řezu pomocí EDX detektoru.

Diskuze

Plísně jsou kontaminací, kterou lze očekávat v historických vzorcích, a komplikují další analýzy. Kontaminace kokoidními útvary na řetízku nalezená u vzorku NSZ 116 (Obrázek 2) je shodná s kontaminací popsanou v publikaci autorů Rollo, La Marca, & Amici (1987). V daném výzkumu korelovala s přítomností kontaminace DNA hub a bakterií, která poskytovala falešně pozitivní výsledek testu přítomnosti aDNA ve vzorku. Hyfy plísni mohou podrůstát i neodchlípnutý zubní kámen. Jejich přítomnost může pocházet nejen z půdy, ale i z doby skladování po vyzvednutí. Zejména nápadné to je u naleziště náměstí Svobody, ve Znojmě, kde byla kontaminace pozorována u všech 4 studovaných jedinců. Snímky s hyfami plísni a sporami byly srovnány se snímky v odborných publikacích (Heikkilä, Kotimaa, Tuomi, Salmi, & Louhelainen, 1988; Mahmood et al., 2017; Priyamvada et al., 2017; Xue et al., 2014) a odpovídají svými rozměry i tvarem. Spory svou velikostí přibližně spadají do rozmezí spor *Actinomyces* sp. (Heikkilä et al., 1988), a je tedy možné, že patří k tomuto či příbuznému druhu.

Mikroskopicky lze kontaminaci poměrně snadno odlišit od částecek inkorporovaných do zubního kamene a tudíž původních. Původní bakterie se do struktury kamene zanořují, jsou pokryty krystaly, na lomu u nich lze vidět vnitřní krystalickou

strukturu a zanechávají v kameni otisky. Příklad otisků původních bakterií je na obrázku 7. Bakterie z kontaminace je na obrázku 6 a lze na ní vidět výrazně odlišný povrch a zachycení na povrchu kamene jen malou ploškou oproti bakteriím původním, které je možné porovnat s publikací Fialové et al. (2017a). Na obrázku 5 je viditelná dutinka v kameni vyplněná sporami plísni, které také nejsou součástí kamene.

U pozorovaných vzorků z náměstí Svobody, ze Znojma byly nalezeny jasné důkazy přítomnosti kontaminace, a to bakteriální i houbové. Kontaminace se týká všech 4 vzorků z jednoho hřbitova, které prošly stejnými podmínkami v půdě i později během skladování. Lze tedy říci, že jejím zdrojem je pravděpodobně půda či následující zacházení a skladování až do umístění v depozitáři. Další vzorky v daném depozitáři, které pocházejí z odlišných pohřebišť, nejsou kontaminovány vůbec nebo jen v malém měřítku. Zjištění nepůvodních mikroorganismů na straně zubního kamene přiléhající k zubu je výstrahou pro další analýzy, zejména ty molekulární, a je nutné s ní počítat při návrhu i vyhodnocování následujících experimentů. Takto je možné odhalit kontaminaci nedestruktivní metodou a na základě výsledků rozhodnout o dalším zpracování.

Další možností, jak identifikovat kontaminaci zubního kamene zevním prostředím, je použití detektoru EDX. U vzorku

zubního kamene muže z Majetína se nacházela pouze na povrchu, nikoliv uvnitř ani z vnitřní strany původně přiléhající k zubu. Tato možnost zjištění znečištění byla před předkládanou studií využita pouze ve studii Warinner et al. (2014), kde byl na povrchu kamene a částečně i uvnitř identifikován křemík. Ostatní námi pozorované prvky (hliník a železo) byly v literatuře doposud opomíjené. Před analýzou vlastního vzorku je totiž nutné identifikovat prvky pocházející z prostředí, v našem případě z půdy. Pro tento účel byla analýza pomocí EDX provedena i na vzorcích půdy obklopující jedince. Pro základní identifikaci kontaminujících prvků lze tedy kromě řezu (destruktivní analýzy, která odhalí případné vnitřní znečištění) využít bodové EDX analýzy tak, že jsou zjištěny prvky z prostředí (půdy) z vnější a vnitřní strany vzorku zubního kamene tak, jak to provedla Fialová (2018) u vzorku z velkomoravské lokality Kopčany. Lze zde tedy využít námi zjištěného poznatku ověřeného na popsáném vzorku, že hliník a křemík nemají tendenci prostupovat vzorkem, na rozdíl od železa. Do budoucna by bylo vhodné tento poznatek ověřit na dalších vzorcích.

Závěr

V rámci této studie byla dokázána přítomnost kontaminace na povrchu zubního kamene pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) i její kombinací s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií (EDX). Výrazně kontaminované na vnitřní straně byly všechny čtyři zkoumané vzorky ze hřbitova na náměstí Svobody ve Znojme. Byly pozorovány cizorodé bakterie, plísňe a neznámá kontaminace.

Pomocí EDX analýzy bylo možné pozorovat na řezu vzorku kamene od muže z Majetína pouze povrchové kontaminace prvky z půdy, a to konkrétně křemíkem, hliníkem a železem. Bylo zjištěno, že křemík a hliník neprostupují vzorkem, na rozdíl od železa. Tohoto poznatku lze využít při nedestruktivní bodové EDX analýze pro zjištění prvků z prostředí (půdy) tak, že jsou z vnější a vnitřní strany vzorku zubního kamene srovnány.

Témto nedestruktivními metodami tedy lze odhalit možné komplikace při následujících molekulárních analýzách a dále odpovídajícím způsobem upravit návrh experimentu. Kontaminace totiž mohou ohrozit věrohodnost molekulárních analýz, což se nyní částečně řeší bioinformatickými nástroji. Vysoký podíl DNA bakterií a plísní z půdy ale mění poměry zastoupených mikroorganismů při metagenomických analýzách. Dochází tak k falešně pozitivním výsledkům i při kvalitativním výzkumu zastoupených mikroorganismů. V případě včasného odhalení kontaminace je umožněn výběr vhodných metod zkoumání vzorků i nástrojů pro analýzu dat, které pomohou omezit zkrácení způsobené kontaminací. Lze se také úplně vyhnout dalším nákladným analýzám silně znečištěných vzorků.

Poděkování

Výzkum byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (projekt GA17-15451S), Programem rektora Grantové agentury MU (projekt MUNI/C/1717/2016) a Podporou výzkumné činnosti studentů molekulární biologie a genetiky 7 (projekt MUNI/A/0958/2018). Děkujeme Ústavu archeologické památkové péče Brno, v. v. i.

Souhrn

K detekci povrchové kontaminace historického zubního kamene byla využita skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a také její kombinace s detektorem energiově disperzní rentgenové spektroskopie (EDX). Snímky byly pořízeny ze vzorků od čtyř jedinců ze hřbitova na náměstí Svobody ve Znojme (užitím SEM) a muže z Majetína (užitím SEM-EDX). U všech vzorků z náměstí Svobody ze Znojma byla nalezena výrazná kontaminace recentními plísněmi (hyfami i sporymi)

a bakteriemi, které nejsou původní součástí historického zubního kamene. U muže z Majetína byla stanovena prostupnost vybraných prvků z půdy, a tím byla potvrzena kontaminace vnější strany (v kontaktu s půdou) zubního kamene. Vnitřní strana nebyla znečištěna.

Použité metody lze aplikovat nedestruktivně a využít tak i komparativní mikroskopii na historický zubní kámen. Může tak být odhaleno zvýšené množství kontaminace z vnějšího prostředí před následujícími analýzami. Další experimenty lze na základě tohoto zjištění přizpůsobit či vzorky včas vyloučit z výzkumu ještě před aplikací nákladných destruktivních (především molekulárních) analýz.

Klíčová slova: SEM, zubní kámen, dentální antropologie, půda, houby, EDX, prvkové složení, kontaminanta

Literatura

- Boyadjian, C. H. C., Eggers, S., & Reinhard, K. (2007). Dental wash: a problematic method for extracting microfossils from teeth. *Journal of Archaeological Science*, 34, 1622–1628.
- Buckley, S., Usai, D., Jakob, T., Radini, A., & Hardy, K. (2014). Dental calculus reveals unique insights into food items, cooking and plant processing in prehistoric central Sudan. *Plos One*, 9(7), e100808–e100808.
- Brothwell, D. R. (1981) *Digging Up Bones: The Excavation, Treatment and Study of Human Skeletal Remains*. British Museum (Natural History).
- Fialová D. (2018) *Faktory ovlivňující predispozice ke vzniku zubního kazu u slovanské populace na území Velké Moravy*. Dizertační práce. Brno: Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.
- Fialová, D., Drozdová, E., Skoupý, R., Mikulík, P., & Klíma, B. (2017a). Scanning Electron Microscopy of Dental Calculus from the Great Moravian Necropolis Znojmo-Hradiště. *Anthropologie: International Journal of the Science of Man*, 55(3), 343–351.
- Fialová, D., Skoupý, R., Drozdová, E., Paták, A., Piños, J., Šín, L., ... Klíma, B. (2017b). The Application of Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX) in Ancient Dental Calculus for the Reconstruction of Human Habits. *Microscopy And Microanalysis: The Official Journal Of Microscopy Society Of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society Of Canada*, 23(6), 1207–1213.
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M. J., Brothwell, D., Estalrich, A., García-Tabernero, A., ... Cortés, Á. F. (2012). Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617–626.
- Hardy, K., Blakeney, T., Copeland, L., Kirkham, J., Wrangham, R., & Collins, M. (2009). Starch granules, dental calculus and new perspectives on ancient diet. *Journal of Archaeological Science*, 36(2), 248–255.
- Heikkilä, P., Kotimaa, M., Tuomi, T., Salmi, T., & Louhelainen, K. (1988). Identification and counting of fungal spores by scanning electron microscope. *The Annals of Occupational Hygiene*, 32(2), 241–248.
- Henry, A. G., Brooks, A. S., & Piperno, D. R. (2011). Microfossils in calculus demonstrate consumption of plants and cooked foods in Neanderthal diets (Shanidar III, Iraq; Spy I and II, Belgium). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2), 486.
- Mahmood, Z. A., Shaheen, N., Tasleem, F., Imam, S., Abidi, S., & Azhar, I. (2017). Detection of Aflatoxins and Use of Scanning Electron Microscope for the Identification of Fungal species in Some Commonly Used Spices. *Asian Journal of Plant Science & Research*, 7(5).

- Pechníková, M. (2008). *Antropologická analýza kosterních pozůstatků ze Znojma nám. Svobody*. Diplomová práce. Brno: Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.
- Power, R. C., Salazar-García, D. C., Wittig, R. M., & Henry, A. G. (2014). Assessing use and suitability of scanning electron microscopy in the analysis of micro remains in dental calculus. *Journal of Archaeological Science*, 49, 160–169.
- Preus, H. R., Marvik, O. J., Selvig, K. A., & Bennike, P. (2011). Ancient bacterial DNA (aDNA) in dental calculus from archaeological human remains. *Journal of Archaeological Science*, 38, 1827–1831.
- Priyamvada, H., Akila, M., Singh, R. K., Ravikrishna, R., Verma, R. S., Philip, L., ... Gunthe, S. S. (2017). Terrestrial Macro-fungal Diversity from the Tropical Dry Evergreen Biome of Southern India and Its Potential Role in Aerobiology. *PLOS ONE*, 12(1), e0169333.
- Radini, A., Tromp, M., Beach, A., Tong, E., Speller, C., McCormick, M., ... Warinner, C. (2019). Medieval women's early involvement in manuscript production suggested by lapis lazuli identification in dental calculus. *Science Advances*, 5(1), eaau7126.
- Rollo, F., La Marca, A., & Amici, A. (1987). Nucleic acids in mummified plant seeds: screening of twelve specimens by gel-electrophoresis, molecular hybridization and DNA cloning. *Theoretical and Applied Genetics*, 73(4), 501–505.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Šín, L., & Vrána, J. (2014). Character of the funerary ritual as an image of the events of the nineteenth century in Central Moravia. *Cesky Lid*, 101(2), 149–169.
- Warinner, C., Rodrigues, J. F. M., Vyas, R., Trachsel, C., Shved, N., Grossmann, J., ... Barkow-Oesterreicher, S. (2014). Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics*, 46(4), 336–344.
- Xue, J., Luo, Z., Li, P., Ding, Y., Cui, Y., & Wu, Q. (2014). A residue-free green synergistic antifungal nanotechnology for pesticide thiram by ZnO nanoparticles. *Scientific Reports*, 4, 5408.