

# Studium účinků par butanolu a jiných alkoholů na plísň

BRONISLAVA BACÍLKOVÁ

## ÚVOD

Alkoholy jsou využívány k dezinfekci již velmi dlouho. Avšak první podrobnou studii účinků ethylalkoholu na čisté bakteriální kultury in vitro byly provedeny v roce 1880. Od počátku 20. století byl etylalkohol doporučován např. k dezinfekci pokožky (např. rukou zdravotnického personálu) nebo k povrchové dezinfekci. Bylo zjištěno, že lepšího účinku je dosaženo použitím zředěného alkoholu (50 až 70 %) než koncentrovaného. V roce 1922 byl prokázán účinek isopropylalkoholu na bakterie na pokožce rukou a od té doby se alkoholy využívají k dezinfekci i přes různé výhrady dodnes.<sup>1</sup>

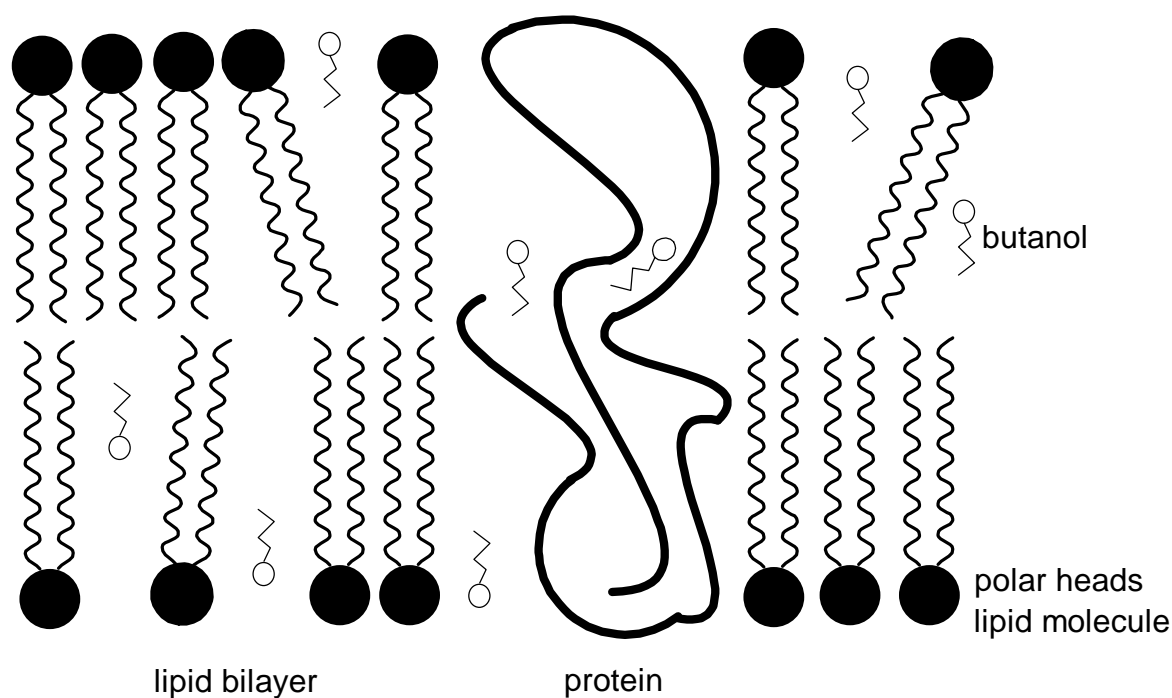
## ÚČINEK ALKOHOLŮ NA MIKROORGANISMY

### *Mechanismus účinku*

Alkoholy jsou obecně považovány za dezinfekční prostředky s nescifickým účinkem kvůli jejich mnohým toxickým efektům. Nejdůležitější antimikrobní účinek je způsoben koagulací a denaturací bílkovin - tento děj však probíhá pouze při určité koncentraci alkoholu, která má svoje hranice a své optimum. Proto vodné roztoky alkoholů vykazují mnohem lepší účinky na mikroorganismy než čistý alkohol. Alkoholy způsobená denaturace může postihnout bílkoviny buněčné stěny, cytoplazmatické membrány i bílkoviny obsažené přímo v cytoplazmě. Účinek alkoholů na bílkoviny bakteriálních spor je většinou nedostatečný – působí inhibiči enzymů potřebných ke germinaci (klíčení), tento vliv je však reversibilní; po odstranění alkoholů z prostředí tedy může ke germinaci dojít.

Kromě bílkovin mají alkoholy vliv i na lipidy obsažené v membránách. Pronikají svými lipofilními konci do struktury membrány (zejména alkoholy s delším řetězcem) a v menších koncentracích způsobují změny v její propustnosti, ve vyšších koncentracích membránové lipidy rozpouštějí.<sup>3,4</sup>

Těmito a pravděpodobně ještě dalšími mechanismy dochází k porušení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány (změny struktury, únik intracelulárních látek, např. draselných iontů, fosfátů, aminokyselin, cukrů, nukleotidů, proteinů), buněčné lýze a zhroucení buněčného metabolismu.<sup>6</sup>



Obr. 1: Interakce butanolu s membránovými lipidy a proteiny. Molekuly butanolu pronikají do lipidové dvojvrstvy a způsobují změny konzistence, případně až rozpouštění membrány. U proteinů dochází ke změnám prostorového uspořádání molekul až k jejich denaturaci.

#### *Citlivost mikroorganismů vůči alkoholům*

Alkoholy jsou při dodržení doporučených podmínek účinné proti vegetativním formám bakterií (včetně mykobakterií), virům a plísním; sporný je účinek proti sporulujícím mikroorganismům. Proto nelze považovat alkoholy za látky se sterilizačním účinkem, ale pouze dezinfekčním.<sup>2,5</sup>

Míra rezistence plísní vůči alkoholům je dána především stavbou buněčné stěny (složení, tloušťka, porozita) a cytoplazmatické membrány, jež tvoří více nebo méně účinné bariéry proti poškození. Význam mají i další faktory, například momentální růstová fáze (v době nejintenzivnějšího růstu jsou buňky citlivější), naopak spory v klidové fázi jsou dosti odolné.<sup>5,7</sup> Zajímavým případem jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které obecně nepatří mezi nejodolnější organismy, avšak některé jejich vyšlechtěné kmeny využívající se k fermentaci glukózy při výrobě etylalkoholu jsou adaptovány na takové prostředí a přežívají bez větších problémů koncentraci i 20 %.<sup>3</sup>

#### *Alkoholy používané k dezinfekci a způsob použití*

Nejpoužívanější alkoholy:

etanol	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{OH}$	(velmi rozšířené použití)
propanol	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$	(zejména v Evropě)
isopropanol	$\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CH}_3$	(v Evropě i v Americe)
butanol	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$	(méně časté)

Alkoholy se obecně nejčastěji používají ve formě roztoků – podle konkrétních podmínek se doporučuje koncentrace 50 až 90 %, koncentrace nad 90 % je méně účinná. Účinek značně snižuje přítomnost nečistot, hlavně bílkovin (ty jsou působením alkoholů

rovněž denaturovány, přilnou k povrchovým strukturám a chrání mikroorganismy před dalším účinkem alkoholu). Méně účinná může být rovněž dezinfekce formou otření nebo postřiku, protože alkohol se velmi rychle odpaří a kontakt s mikroorganismy tak může být příliš krátký,<sup>8,10</sup> nedostatečné je také krátkodobé ponoření do roztoků alkoholů (řádově v minutách). Lepších účinků může být dosaženo vložím kontaminovaného materiálu mezi listy filtračního papíru nasyceného roztokem alkoholu a ponecháním v tomto stavu po dobu několika hodin až dní.<sup>10</sup> Dalším faktorem ovlivňujícím míru účinku je charakter ošetřovaného materiálu – nejefektivnější je působení na hladkém kovovém povrchu.

Pro dezinfekci knih a archiválií byl několikrát zkoušen účinek alkoholů v podobě par, protože tato aplikační forma je vůči ošetřovanému materiálu velmi šetrná. Bylo zjištěno, že při dodržení určitých podmínek (hermeticky uzavřený prostor, 96 % roztok butanolu, doba působení 48 hodin, teplota 25 °C)<sup>9</sup> dochází k usmrcení nejen vegetativních forem plísní, ale i jejich spor. Při experimentech na vzorcích pergamenu byla zkoušena účinnost par butanolu jednak na sbírkové kmeny plísní (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium commune*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Myrothecium verrucaria*, *Paecilomyces varioti*, *Fusarium chlamydosporum*, *Trichoderma viride*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Chaetomium globosum*, *Verticillium tenerum*), jednak na kmeny plísní izolované z historického materiálu (*Aspergillus wentii*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium resinae*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus candidus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Penicillium albidum*). Ve všech případech byly páry butanolu účinné.<sup>11</sup>

#### *Vliv na archivní materiál*

Schopnost alkoholů ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti papíru byla dosud zkoušena zejména formou přímého namočení. V tomto případě vznikají určité změny vlastností - ty jsou však menší než změny vyvolané vlivem destilované vody. Při porovnání jednotlivých alkoholů navzájem (např. metanolu, etanolu a isopropanolu) lze pozorovat, že větší změny vyvolávají alkoholy s kratším řetězcem. Přitom je třeba brát v úvahu, že určitou roli zde hraje i použitá metodika, protože pravděpodobně dochází i k vyplavení některých rozpustných látek obsažených v papíru během namočení.<sup>12</sup> Přímým působením alkoholů může docházet také k některým dalším změnám, např. ztrátě lesku papíru, vzrůstu opacity, mírným deformacím apod., zejména u transparentních papírů, které jsou vlivem speciálního zpracování více citlivé.<sup>13</sup> Lze však předpokládat, že při ošetření papíru alkoholy v podobě par budou vzniklé změny mnohem menší.

Při pokusném ošetření knih z 17. až 18. století parami butanolu (koncentrace 94-100 %, doba působení 18-24 hodin, teplota 55-60 °C; na začátku procesu evakuace prostoru) nebyly zaznamenány žádné podstatné změny papíru, adheziv ani inkoustů. Změny pH se pohybovaly v rozmezí -0,5 až +0,2 jednotek pH, změny bělosti byly minimální. V dalších pokusech byly zkoušeny různé typy barevných vrstev - v tomto případě byla u některých barviv a pigmentů na tenkém cigaretovém papíru pozorována difúze do okolí.<sup>2</sup>

Součástí archivních a knihovních sbírek však mohou být materiály, které jsou mnohem více citlivé vůči působení alkoholů, mezi ně patří například voskové pečeti. Bylo experimentálně ověřeno, že páry metanolu, etanolu, isopropanolu i butanolu ve větší nebo menší míře ovlivňují vlastnosti šelaku, kalafuny a včelího vosku. Nejagresivněji působí metanolové páry, a to zejména na šelak a kalafunu. Již po dvou hodinách dochází ke slinutí kalafunového prachu a po 6 hodinách šelakových šupinek. V průběhu 24 hodin se obě látky

začínají pomalu rozpouštět. Povrch je změklý a zbotnalý, dochází ke změnám tvaru a penetraci rozpuštěné látky do podložky. Včelí vosk naproti tomu není téměř narušován. Po 7 dnech je tvar a povrch nezměněn, dochází pouze k jeho mírnému zvláčnění a změkčení. Etanolové a isopropanolové páry působí podobným způsobem, avšak poněkud pomaleji. Nejpomalejší účinek má butanol, kdy působení na kalafunu začíná být patrné po 3 hodinách, po 1 dni vzniká spojitá, elastická masivní hmota s naleptaným povrchem a začínající penetrací do podložky. Menší je účinek na šelak - po jednodenní expozici dochází k mírnému spojení šupinek v místech dotyku a omezení sypkosti vzorku. Tento stav se dále prohlubuje a po 7 dnech dojde ke slinutí vzorku a jeho částečnému přilepení k podložce. Tvar povrchu je nezměněn, ale dochází ke změkčení šupinek šelaku. Nejmenší je i účinek na včelí vosk, kdy po sedmidenní expozici nedoznává tvar povrchu změny. Mírně se pouze zvyšuje ohebnost a lepivost povrchu.<sup>14</sup>

Dalším materiálem, u kterého je třeba dbát zvýšené opatrnosti, jsou dokumenty s inkousty, inkoustovými tužkami, razítky, kolorované mapy, plány apod. U některých typů psacích látek může dojít k rozpíjení textu, případně až k difúzi na rub papíru.

### *Toxicita alkoholů a bezpečnostní údaje*

Jednomocné alifatické alkoholy se vyznačují narkotickým a dráždivým účinkem, který vzrůstá se stoupající molekulovou hmotností (výjimku tvoří první člen řady, metanol, který má výrazný účinek na zrak). Při práci s alkoholy je tedy třeba dodržovat hygienické zásady platné pro tyto chemické látky a používat pracovní ochranné pomůcky. Dalším rizikem při využívání par alkoholů je tvorba výbušných směsí se vzduchem:

Meze výbušnosti	etanolu:	3,5 - 15 % (v/v)
	isopropanolu:	2 - 12,7 % (v/v)
	butanolu:	1,4 - 11,3 % (v/v).

Proto je nutné pracovat v dobře větratelných místnostech, nejlépe pokud jsou vybaveny odsáváním.

## PRAKTICKÁ ČÁST

Pro důkladné prověření účinků alkoholů na mikroorganismy v archivech a knihovnách i na některé rizikové typy materiálů byla provedena řada experimentů, ve kterých byla sledována závislost antifungálního účinku alkoholů (etanol, isopropanol a butanol) na podmínkách (koncentrace alkoholů, teplota, doba působení). Ve druhé části byla provedena orientační zkouška vlivu par alkoholů na některé rizikovější psací látky.

### *Materiál a metodika*

K pokusům byly použity spory plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium notatum* ze sbírky Národního archivu v Praze.

Pokusy byly prováděny tak, aby se co nejvíce podobaly reálným podmínkám; proto nebyly využity standardní metodiky hodnocení fungicidní a fungistatické účinnosti chemických látek.<sup>15, 16</sup> Spory plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium notatum* byly naneseny na čtverečky filtračního papíru (po třech vzorcích od každého druhu), celkové množství spor na jednom čtverečku papíru bylo  $10^4$ . Vzorky byly poté zavěšeny do exsikátoru, ve kterém byla předem umístěna miska s příslušným roztokem alkoholu. Uvnitř byly ponechány 1 den, 2 dny, 3 dny nebo 6 dní při teplotě 18, 23 nebo 28 °C (v případě etanolu a isopropanolu byly zkoušky prováděny pouze při teplotě 23 °C, protože z hlediska použití k dezinfekci se jedná

o méně perspektivní látky). Pak byly vzorky vyjmuty a ponechány 7 dní v aseptickém prostředí tak, aby byly odvětrány páry alkoholů. Dále byly vzorky asepticky přeneseny na povrch sladidového živného agaru (malt extract agar, Merck) a byl vyhodnocen případný nárůst plísní. Inkubace probíhala při teplotě  $24 \pm 4$  °C po dobu až 4 týdny, aby byl zachycen i případný opožděný nárůst.

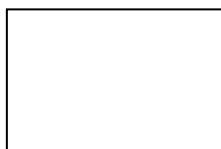
Výsledky jsou shrnuty do tabulek (Tab. 1 až 5). Přitom čísla 0 až 100 v tabulkách udávají množství vzorků, na kterých mikroorganismy přežily dezinfekční zásah a rostly, vyjádřené v procentech.

Pro zkoušky psacích látek byly použity čtverečky bílého kartónu o tloušťce 0,2 mm, na který byly nanесeny vzorky běžného modrého inkoustu do plnicích per (Jollypen, B+U 7300/14), modré propisovací tužky (Koh-i-noor Hardmuth 4401), fialové inkoustové tužky (Koh-i-noor Hardmuth 1561 medium) a černé fixy (Centropen 0,3 liner 2811), vše v podobě trojitě čáry. Na další sadu čtverečků kartónu byla otisknuta černá razítková barva (Trodat 6/4911 D1). Protože se jednalo poze o orientační zkoušku, nebylo zjišťováno přesné složení jednotlivých psacích látek a razítkové barvy. Všechny vzorky byly zavěšeny do exsikátorů s roztoky alkoholů (etanol, isopropanol a butanol v koncentraci 95 %) a pro kontrolu i se samotnou vodou. Během 2 dnů byly pozorovány změny vzhledu čar.

### *Hodnocení*

U butanolu byly zkoušeny roztoky v rozmezí 80 až 100 % (při nižších koncentracích je butanol s vodou omezeně mísitelný). Páry butanolu byly účinné v rozmezí 80 až 96 %, přitom za ideálních laboratorních podmínek stačí i teplota 18 °C a doba působení 1 den – při vyšších teplotách a delší době působení se účinek zvyšoval jen mírně. U etanolu a isopropanolu byl účinek proti zkoušeným plísním spolehlivý v rozmezí koncentrací 30 až 90 %, nejvhodnější doba působení 2 dny. Po delší době působení jsou změny účinku u všech alkoholů již velmi malé a naopak materiál je zbytečně vystavován působení par alkoholů. Je však třeba brát v úvahu, že pokus probíhal za definovaných podmínek, kdy papír byl kontaminován pouze na povrchu a pouze dvěma druhy mikroorganismů, nebyly přítomny žádné znečištění a další látky, které by mohly účinek snížit.

U psacích látek bylo ve všech případech pozorováno již během prvního dne postupné rozpíjení čar propisovací tužky, fixy i inkoustové tužky; druhý den byla změna již jen minimální. Nelze jednoznačně určit, který z alkoholů měl největší negativní účinek, protože rozdíl byly jen minimální. Při porovnání jednotlivých typů psacích látek se jako nejcitlivější jevila propisovací tužka a inkoustová tužka, kde došlo k silné difúzi barev až na rubovou stranu papíru. Inkoust z plnicího pera zůstal nerozpít, pouze u isopropanolu se mírně změnil barevný odstín (zesvětlení). U razítek došlo jen k nepatrnému rozostření kontur písmen, k částečné difúzi barev na rubovou stranu došlo pouze u isopropanolu. Naproti tomu ani po dvoudenním působení samotné vodní páry nedošlo u inkoustů i u razítek k žádným viditelným změnám.



Obr. 2: Vliv alkoholů na psací látky. Vzhled lícové a rubové strany vzorků po jednodenním, dvoudenním a tří denním působení (označeno jako 1, 2, 3) par alkoholů. Na každém vzorku jsou psací látky nanášeny v podobě trojitě čáry v pořadí (shora dolů): propisovací tužka, fixa, inkoust do plnicích per, inkoustová tužka.

### *Závěr*

Pro použití k dezinfekci archiválií v podobě par se ze zkoušených alkoholů jeví jako nejvýhodnější vodný roztok butanolu v koncentraci 80 až 96 %, ale nejsou vyloučeny ani roztoky ostatních alkoholů. Musí být však bezpodmínečně dodržena podmínka dokonalého hermetického uzavření komory v průběhu ošetření. Dále je třeba počítat s tím, že účinek zcela určitě nebude dostatečný při příliš silné vrstvě materiálu (nerozevřené knihy). Účinek také rozhodujícím způsobem omezuje přítomnost nečistot, jako tomu bylo například u knih a archiválií postižených záplavami.

Při případném použití této metody k dezinfekci listin s pečeti je rovněž nejvýhodnější použití par butanolu, avšak pro jistotu je lépe chránit pečeť například pomocí polyetylenového sáčku (a to i u těch, které jsou zhotoveny z včelího vosku, protože nelze vyloučit přítomnost například kalafuny). Ještě rizikovější je dezinfekce šelakových pečeti - v tomto případě nelze metodu doporučit vůbec.

Zvýšenou pozornost je rovněž nutné věnovat archiváliím s rukopisnými poznámkami, razítky, případně s jinými barevnými vrstvami. Rozpustnost v alkoholech je třeba předem vyzkoušet a i v případě, kdy se zdá barvivo nerozpustné, je třeba dezinfikovaný předmět sledovat. Z těchto důvodů jsou nejvhodnější komory s průhledným okénkem nebo polyetylenové pytle.



Obr. 3: Jednoduchá dezinfekční komora s průhlednými stěnami a snímatelným víkem. Je vybavena vlhkoměrem a rámy se síťovým výpletem, které slouží k uložení dezinfikovaných předmětů. Nad komorou je umístěno výkonné odsávací zařízení.







## SOUHRN

### *Studium účinků par butanolu a jiných alkoholů na plísně*

Alkoholy jsou dezinfekční prostředky, které účinkují na mikroorganismy s různou intenzitou. Jedním z faktorů, ovlivňujících tento účinek, je i způsob aplikace přípravku. K experimentu byla zvolena dezinfekce pomocí par alkoholů, což je metoda, která je poměrně šetrná k většině archiválií. Byla ověřena účinnost par etanolu, isopropanolu a butanolu na spory plísni *Penicillium notatum* a *Aspergillus niger* při různě dlouhé době působení (1 až 6 dní), různých teplotách (18, 23 a 28 °C) a koncentracích roztoků alkoholů. V další části byl pouze orientačně vyzkoušen účinek jmenovaných alkoholů na některé novodobé psací látky, kde existuje riziko jejich rozpíjení. Při dodržení podmínek experimentu (zejména dokonale hermeticky uzavřený prostor komory) byl v určitém rozmezí koncentrací alkoholů účinek na mikroorganismy uspokojivý.

1. Boyce, J. M.: *Using alcohol for hand antiseptics – dispelling old myths*. Infection Control and Hospital Epidemiology. 21, 7, 2000, 438-441
2. Belkova, L., Chernova, D., Hrol, J.: *Effect of butanol vapours upon ageing and properties produced in the 17<sup>th</sup> - 18<sup>th</sup> centuries*. Sborník: Chemická technológia dreva, celulózy a papiera, Bratislava 1998, Slovenská technická univerzita v Bratislave
3. Ingram, L. O., Buttke, T. M.: *Effects of alcohols on micro-organisms*. Advances in Microbial Physiology 25 (1984): 253-300
4. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova biochemie*. 2. české vydání, H&H Praha 1998
5. McDonnell, G., Russell, A. D.: *Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance*. Clinical Microbiology Reviews 12 (1999): 147-179
6. Denyer, S. P.: *Mechanisms of action of antibacterial biocides*. International Biodeterioration & Biodegradation 36 (1995): 227-245
7. Russell, A. D.: *Mechanisms of bacterial resistance to biocides*. International biodeterioration & Biodegradation 36 (1995): 247-265
8. Nittérus, M.: *Ethanol as fungal sanitizer in paper conservation*. Restaurator 21 (2000): 101-115
9. Orlita, A.: *Vypařovací biocidy v restaurátorské a konzervátorské praxi*. Sborník: 6. semináře restaurátorů a historiků, Bratislava 1985, Státní ústřední archiv v Praze 1985
10. Orlita, A.: *Biodeterioration of leather materials especially book-leather bindings and parchments*. In: Garg, K. L., Garg, N., Mukejri, K. G. (Eds.), Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation, Vol. I, Naya Prokash, Calcutta, India: 259-299
11. Orlita, A.: *Nový systém devitalizace plísní na historických písemnostech*. Sborník 8. semináře restaurátorů a historiků, Železná Ruda - Špičák, Státní ústřední archiv v Praze 1991
12. Denderová, M.: *Problematika novodobých psacích prostředků a jejich fixace*. Diplomová práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 1996
13. Reyden, D.; Hofman, C.; Baker, M.: *Some effects of solvents on transparent papers*. Conference papers, The Institute of Paper Conservation, Manchester 1992
14. Široký, M.: *Vliv alkoholových par na voskové pečeti*. Sborník 8. semináře restaurátorů a historiků, Železná Ruda - Špičák, Státní ústřední archiv v Praze 1991
15. Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Walsh, T. J.; Chaturvedi, V.; Espinel-Ingroff, A.; Ghannoum, M. A.; Gosey, L. L.; Odds, F. C.; Rinaldi, M. G.; Sheehan, D. J.; Warnock, D. W.: *Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges*. Clinical microbiology reviews 14 (2001): 643-658
16. Pfaller, M. A.; Sheehan, D. J., Rex, J. H.: *Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: Lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization*. Clinical Microbiology Reviews 17 (2004): 268-280