

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

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

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. 80

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

Název metodiky:

Metodika dezinfekce knih napadených plísněmi

Autorský kolektiv:

Volejníková A., Nováková J., Neuvirt J.

Příjemce podpory, na jejímž základě byla metodika vytvořena:

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

Dedikace : Projekt Programu NAKI


Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů

Identifikační kód DF11P01OVV028

Uživatelé metodiky v praxi:

- **Národní knihovna ČR**

V Praze dne 14. 1. 2016


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



Metodika dezinfekce knih napadených plísněmi

Autoři metodiky:

Volejníková A., Nováková J., Neuvirt J.

Národní knihovna ČR

Srpen 2015

Metodika je výsledkem výzkumné činnosti v projektu NAKI DF11P01OVV028
„Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů“
řešeného v letech 2011-2015 financovaném Ministerstvem kultury ČR

Obsah:

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1 Literární úvod a dosud získané znalosti.....	4
2.2 Výběr účinných složek EO	11
2.3 Výběr podmínek ošetření	13
2.4 Sledování účinnosti dezinfekce pomocí signální knihy	18
2.5 Popis zařízení	19
2.6 Dezinfekční postup	21
2.7. Výsledky dezinfekce.....	222
3. Srovnání novosti postupů oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou, neznámou metodiku, srovnání s postupy v zahraničí	26
4. Popis uplatnění Certifikované metodiky, informace, pro koho je určena, subjekty s kterými bude uzavřena smlouva o využití výsledku a jakým způsobem bude uplatněna	26
5. Seznam použité související literatury	26
6. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány (pokud existují), případně výstupy z originální práce.....	29

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je návod a postup dezinfekce knih v komoře NK za použití složek esenciálních olejů a tedy poskytnout alternativu k dezinfekčnímu postupu za použití činidla ethylenoxidu, který je zdraví škodlivý (mutagen, karcinogen) a proto je jeho použití přísně regulováno a umožněno jen ve speciálních zařízeních.

Použití rostlinných esenciálních olejů a jejich složek je mnohem šetrnější k lidskému zdraví (pouze ve výjimečných případech způsobují alergické reakce a dýchací obtíže), zjednodušila by se proto manipulace s knihami po dezinfekci.

Metodika dále poskytuje hlediska, kterými se řídí výběr složek esenciálních olejů a podmínek dezinfekce a umožní tak další vývoj této ekologicky a zdravotně šetrné dezinfekční metody.

2. Vlastní popis metodiky

2.1 Literární úvod a dosud získané znalosti

Problematika ochrany písemných kulturních památek proti mikroorganismům

Papír je jedním z hlavních nositelů kulturního dědictví lidstva. Při nevhodném skladování však může velice snadno podléhat zkáze. Mezi nejvýznamnější faktory způsobující jeho degradaci patří plísně (Zotti, 2008; Pinheiro, 2011), Kromě degradace papíru mohou způsobovat i zdravotní problémy zaměstnancům archívů. Materiál, se kterým jsou tito lidé v dlouhodobém kontaktu, může být kontaminován i zdraví škodlivými druhy plísní (Haleem Khan, 2012; Roussel, 2012). Napadení knih plísněmi nastává po náhlé nehodě nebo při skladování v nevhodných podmínkách. Pokud do depozitáře pronikne voda (srážková, z poškozené vodoinstalace apod.) a závada není ihned odhalena a knihy vysušeny, můžou být během několika dní zcela napadeny plísněmi a nenávratně poškozeny.

Druhou velmi obvyklou příčinou je dlouhodobé skladování knih v nevhodných prostorech. Některé depozitáře nemají klimatizaci, která by udržovala vhodnou teplotu, relativní vlhkost vzduchu a proudění vzduchu, a dochází v nich sezonně k výkyvům relativní vlhkosti vzduchu. Pokud se navíc nacházejí v suterénu budovy, je poměrně velké riziko, že se na špatně větraném místě s vyšší vlhkostí vzduchu objeví slabě zřetelný nárůst plísně. Takovéto plísně přečkávají období sucha a při zvýšení vlhkosti jsou schopné se rychle rozrůst a napadnout i okolní knihy. Při přesunu knih do nových prostor je proto nezbytné knihy zkontrolovat a v případě potřeby očistit a vydezinfikovat.

K ošetření papírových dokumentů se používá řada dezinfekčních látek, v současné době je to butanol, ethylenoxid a jiné. Problémem je, že i tyto látky mohou negativně ovlivňovat zdraví zaměstnanců, jako například tymol a formaldehyd, které jsou již zakázány (Sequeira, 2012). Proto se nadále hledají nové metody antimikrobiální ochrany knižních fondů a archiválií, které by nijak nepoškozovaly papír ani další materiály, a které by zároveň neměly negativní vliv na lidské zdraví. Mezi zkoumané alternativy patří i páry rostlinných esenciálních olejů (EO) (Inouye, 2000; Pibiri, 2006; Sequeira, 2012).

EO a jejich využití v potravinářství a dalších sektorech

EO neboli silice jsou vylučovány rostlinami spolu s dalšími sekundárními metabolity pro vlastní ochranu rostlin před škodlivými mikroorganismy a dalšími nepřáteli (herbivory, hmyzem) nebo jako

atraktanty lákající opylovače. Jedná se o směsi až desítek složek zastoupených v různých poměrech. Konkrétní složení jednoho esenciálního oleje je proměnlivé (Pitarokili, 2002) a závislé na mnoha faktorech, mezi které patří kromě genetické výbavy daného druhu (variety, odrůdy) i klimatické a geografické podmínky růstu, nebo způsob extrakce EO. Majoritně zastoupená složka bývá zodpovědná za působení EO, ale to není pravidlem. Důležitou roli totiž hraje vzájemný synergismus i antagonismus jednotlivých složek.

Antimikrobiální působení EO je lidstvu známé odpradávná, bylo a je využíváno v mnoha odvětvích lidského působení, jak shrnuje například rešerše (Lang, 2012). V současnosti ve světě probíhá mnoho výzkumných projektů, které ověřují působení EO a zdokonalují způsoby jejich aplikace jako konzervanty v potravinářství (Lopéz, 2005; Manso, 2013) a v zemědělství k ochraně skladovaných plodin (Melgarejo-Flores, 2013; Mishra, 2013; Sellamuthu, 2013). K těmto účelům je snaha použít kombinace vhodných složek EO místo kompletních EO. Výhodou je nižší cena, díky možnosti syntetické přípravy za vzniku přírodně identických látek, a stabilní složení.

Nízká toxicita EO jako celku je ověřena staletými používání v tradiční medicíně, v kulinářství, v hygieně a podobně. I zde však nalezneme alergeny, a to především u složek EO, ale i u původních přírodních směsí olejů. Proto je na místě obezřetnost a nutnost stanovovat a dodržovat bezpečné koncentrace těchto látek.

Aplikace par EO a jejich využití na ochranu a dezinfekci knih

Většina testů dezinfekčního účinku par EO bývá prováděna metodou mikroatmosféry v Petriho misce (Inouye, 2000; Lopéz, 2005; Rakotonirainy, 2005), kde je uzavřena na agaru naočkovaná plíseň spolu s terčíkem napuštěným EO, ze kterého se uvolňují páry EO. Toto uspořádání je velmi vzdálené reálnému prostředí. Dezinfekční účinek na knihách bývá testován velmi vzácně (Rakotonirainy, 2005). V jejich testech byly do knihy založeny kusy papíru s vysušenými sporama a rostoucí plísní. Kniha byla následně uzavřena do skleněného boxu s parami EO odpařenými po nakapání na z filtrační papír a nastavenou relativní vlhkostí vzduchu pomocí nasycených roztoků solí. Výsledkem bylo zjištění, že použitá složka EO (linalool) měla spíše fungistatický než fungicidní účinek.

V komerční sféře existuje pouze jedna společnost, která již páry EO aplikuje za účelem dezinfekce knih. Jedná se o firmu Biomist Technology z Jižní Koreje (Biomist_Technology), která vlastní národní patent na systém komory, ve které je uvolňována směs látek z rostlinných extraktů s antimikrobiálním účinkem a insekticidního pyrethrinu. Kromě dezinfekčních komor vyrábí i dezinfekční a insekticidní spreje a zařízení pro zmlžování těchto směsí ve velkých prostorech, např. v depozitářích (Biomist_katalog).

Dále v podobné oblasti působila již zaniklá francouzská firma Air Pharma Labo, která aplikovala do klimatizačních a ventilačních systémů aerosol směsi EO k zamezení šíření patogenních mikroorganismů a plísní (Air_Pharma_Labo). Směsi EO byly navrhovány podle typu prostředí, kde měly působit. Pro knihovny a archivy se používaly směsi z těchto rostlin: citronella, eukalyptus, pelargónie, levandule, borovice, šalvěj a tymián.

V těchto oblastech aplikace zatím nejsou známy žádné další společnosti.

Výběr a podmínky aplikace par složek EO na ochranu knih

Při aplikaci par EO na ochranu či dezinfekci knih hraje roli několik faktorů, které zásadně ovlivní účinnost zásahu. Mezi ně patří volba EO nebo jeho složky, použitá koncentrace, teplota, relativní vlhkost, způsob aplikace do daného prostoru, rozložení knih během procesu a případné ovlivňování vlastností papíru.

Zodpovědět, jaký je nejlepší způsob aplikace par EO, je komplikované. Pro dezinfekci malého objektu uzavřeného v nádobě s nasycenými parami je možné použít kádinky s EO, ze které se postupně odpařují. Pro sycení většího prostoru je nezbytná cirkulace atmosféry a zvětšení povrchu, ze kterého se EO odpařují, což proces urychlí. Pokud použitý EO či složka EO podléhá oxidaci, je nutné pamatovat na to, že kapalná fáze může během procesu zhoustnout a bude nutné ji vyměnit za čerstvou, či učinit opatření, která oxidaci minimalizují.

Při volbě EO je nutné uvážit rozdíly v účinnosti EO na jednotlivé mikroorganismy (Camele, 2012; Vitoratos, 2013) a četnost jejich výskytu v depozitářích knihoven. Mezi druhy environmentálních plísní nejčastěji se vyskytujícími v archívech patří rody *Penicillium* (Zyska, 1997; Zotti, 2008) *Aspergillus*, *Chaetomium* a *Cladosporium*, přičemž rod *Aspergillus* je považován za jeden z nejdolnějších rodů. Z hlediska reprodukovatelnosti procesu je lepší pracovat s vyráběnými přesně definovanými složkami EO než s kompletními EO získanými z rostlin, které mají variabilní složení. Výzkum, který předcházel tvorbě této metodiky, bylo nalezení kombinace složek EO, jejichž páry mají největší fungicidní účinek. Výsledkem je směs citral + linalylacetát (1:1), jak je dokumentováno v dalším textu.

Při výběru je třeba zvážit stabilitu a další fyzikálně-chemické parametry EO, zdravotní nezávadnost a možnou alergenicitu. Některé složky EO se sice běžně přidávají do potravin, ale při rozšíření jejich využití například v oblasti parfumerie, mohou způsobovat určité části populace zdravotní obtíže (Lalko, 2008; Wu, 2012). Je nutné stanovit a používat takovou koncentraci v daném prostředí, která bude dostatečně účinná proti plísním a zároveň bude tak nízká, aby nezpůsobovala změny vlastností knihy ani zdravotní komplikace lidem, kteří s parami budou přicházet do kontaktu. Pokud jde o vybrané složky citral a linalylacetát, jsou k dispozici následující údaje.

Citral je součástí EO, které vykazují antifungální aktivitu proti výše zmíněným rodům plísní (Inouye, 2000; Pawar, 2006; Phillips, 2012) a tato aktivita byla prokázána i u složky samotné (Luo, 2004; Camele, 2012; Saddiq, 2010). Při testech nasycených par předcházejících této metodice měl nejvyšší fungicidní aktivitu a byl proto použit do dezinfekční směsi.

Citral je na vzduchu nestabilní, oxiduje na epoxidové deriváty, které ale vykazují ještě silnější fungicidní aktivitu (Saddiq, 2010).

V případě jeho aplikace na ochranu knih hraje významnou roli jeho možná toxicita (Lalko, 2008). Databáze chemických látek (Databáze_OECD_SIDS_Citral) uvádí, že citral je látka, která se dobře vstřebává kůží i v gastrointestinálním traktu, je rychle metabolizována a vyloučena. Akutní toxicita citralu u hlodavců je nízká (LD50 >1000 mg/kg), může vyvolat podráždění kůže, ale nedráždí oči. Látka se běžně používá jako ochucovadlo potravin i jako složka kosmetických produktů.

Linalylacetát je druhou složkou ve směsi použité v této metodice. Nachází se ve významném množství například v EO z levandule a šalvěje (*Salvia sclarea*), u kterých byla pozorována antimikrobiální aktivita (Dzamic, 2008; Tullio, 2007; Pitarokili, 2002). Jeho role ve směsi použité v metodice je podpůrná, způsobuje zpomalení oxidace citralu. Podle databáze chemických látek

(Databáze_OECD_SIDS_Linalylacetát) vykazuje linalylacetát nízkou inhalační toxicitu (LD50 >2740 mg/m³), dráždivost lidské pokožky je nízká a údaje o dráždivost očí nejsou dohledatelné.

Vliv na mechanické a optické vlastnosti knižních materiálů

Další podmínka, kterou EO musí splnit, je to, že významně neovlivňují mechanické a optické vlastnosti ošetřovaného materiálu. Další materiály kromě papíru, které jsou součástí knih, jsou látky použité na knižní vazbu, kde vedle papírenských lepenek se ve větší míře uplatňují zejména plátno, vazební usně a PVC folie.

Papír

Pokud jde o vliv vybraných složek EO (cital + linalylacetát) na vlastnosti různých papírů byly na Univerzitě Pardubice (Michalcová, 2015) provedeny testy urychleného stárnutí po předchozím uložení 30 dní v prostředí s relativní vlhkostí 75%, teplotou 37°C u „neošetřených“ vzorků. U „ošetřených“ vzorků je toto prostředí nasyceno parami EO. Stárnuté „neošetřené“ a „ošetřené“ vzorky jsou porovnány s původním vzorkem uloženým při laboratorní teplotě a relativní vlhkosti 75%. Vliv na barevnou změnu ΔE viz Tabulka 1. Pevnost v tahu a protažení při přetržení jsou uvedeny v následující tabulce. Výsledky jsou vyjádřeny jako koeficient změny ve srovnání s původním vzorkem (neošetřeným a nestárnutým). Pokud jde o změnu barevnosti, s výjimkou ručního papíru předchozí ošetření EO snížilo její změnu po stárnutí, což je příznivé zjištění. U mechanických vlastností je u pevnosti v tahu s výjimkou sulfitového papíru rozdíl mezi ošetřeným a neošetřeným vzorkem zanedbatelný a u protažení při přetržení dochází u ošetřeného vzorku k mírnému zhoršení, u sulfitového papíru toto zhoršení vybočuje a činí 25%.

Tabulka 1: Změny barevnosti neošetřených a v EO ošetřených papírů po stárnutí

Druh papíru	Barevná změna ΔE po stárnutí	
	Neošetřený	Ošetřený EO
Dřevitý	9,52	6,72
Historický 1909	10,47	7,50
Ruční papír (bavlna+len)	8,71	11,26
Sulfátový jehličnanový	10,72	7,80
Sulfátový listnáčový	10,90	8,82
Sulfitový	8,02	8,21

Tabulka 2: Změny pevnostních vlastností po stárnutí různých papírů ošetřených a neošetřených pomocí EO

Druh papíru	Koeficient změny pevnosti		Koeficient změny protažení	
	Neošetřený	Ošetřený EO	Neošetřený	Ošetřený EO
Dřevitý	1,14	1,05	1,02	0,96
Historický 1909 (podél)	0,82	0,82	0,79	0,69

Historický 1909 (napříč)	0,79	0,95	0,69	0,80
Ruční papír (bavlna+len)	0,96	0,92	0,98	0,90
Sulfátový jehličnanový	0,89	0,88	1,00	0,85
Sulfátový listnáčový	0,96	0,92	0,95	0,83
Sulfitový	0,97	0,86	1,03	0,75

Plátno

Hlavní složkou materiálu pláten jsou rostlinná vlákna na bázi kvalitní celulózy, a proto lze předpokládat, že plátno v prostředí par EO bude ovlivněno stejně jako papír.

Kůže a pergamen

Pokud jde o kolagenní materiály, testy provedené v Národní knihovně v rámci tohoto projektu ukázaly, že vliv EO na jejich pevnostní vlastnosti je velmi závislý na směru působení síly vzhledem k orientaci vzorku vůči hřbetu zvířete. V následujících tabulkách (tab.3 až 6) jsou shrnuty změny pevnostních vlastností a změny barevnosti novodobého pergamenu a tříslučiněné usně po 250 dnech uložení v parách směsi linalylacetát + citral (1:1) a dále po urychleném stárnutí (24 h při 120 °C + střídání vlhkostí 20%/80%RH při 40 °C v intervalu 2-3 dny celkem 3x). Koncentrace par odpovídala 50% nasycení a relativní vlhkost byla 75%.

Tab. 3 Změna pevnosti v tahu a tažnosti novodobého pergamenu po ošetření EO a stárnutí.

	pevnost v tahu		tažnost	
	N/mm ²		%	
	podél	napříč	podél	napříč
Bez EO	91,2	60,2	13,5	12
EO	61,2	76,7	14,7	11,3
Koeficient změny	0,67	1,27	1,09	0,94
Bez EO +stárnutí	74,9	47,5	12,7	12,3
EO +stárnutí	61,9	58,7	10,7	12,1
Koeficient změny	0,83	1,24	0,84	0,98

Červená čísla označují významnou změnu měřené vlastnosti.

Tab. 4: Změna pevnosti v tahu a tažnosti novodobé tříslučiněné usně po ošetření EO a stárnutí. .

	pevnost v tahu		tažnost	
	N/mm ²		%	
	podél	napříč	podél	napříč
Bez EO	21,2	41,6	29,1	23
EO	15,9	45,5	26,8	21,1
Koeficient změny	0,75	1,09	0,92	0,92
Bez EO +stárnutí	29,7	35,2	24,8	26,4

EO +stárnutí	26	35,8	22,8	21,1
Koeficient změny	0,88	1,02	0,92	0,80

Červená čísla označují významnou změnu měřené vlastnosti.

U pergamenu bylo zjištěno snížení pevnosti v tahu ve směru podél po ošetření EO, a to bez stárnutí i po stárnutí, a ve směru napříč po stárnutí (Tab. 3). Tažnost pergamenu nebyla aplikovanými EO ovlivněna.

U tříslučiněné usně bylo zjištěno snížení pevnosti v tahu ve směru podél po ošetření EO a snížení tažnosti ve směru napříč po ošetření EO a následném stárnutí (Tab. 4).

Tab. 5: Změna barevnosti novodobého pergamenu po ošetření EO a stárnutí

	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
EO	-0,2	-0,12	0,88	0,91
EO + stárnutí	-4,22	0,82	14,14	14,78
Bez EO	-0,29	-0,09	0,14	0,33
Bez EO + stárnutí	-2,91	-0,4	10,25	10,66

Tab. 6: Změna barevnosti novodobé tříslučiněné usně po ošetření EO a stárnutí

	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
EO	-5,3	3,27	9,46	11,33
EO + stárnutí	-13,94	6,36	10,03	18,31
Bez EO	-1,65	1,13	0,61	2,09
Bez EO + stárnutí	-7,79	3,86	2,52	9,05

Shrnutí vlivu EO na kolagenní materiály (Závěrečná zpráva řešení projektu 2015)

Pergameny

- Provedeným ošetřením směsí linalylacetátu a citralu 1:1 v koncentraci 50% nasycených par ve směsi se vzduchem nebyla ovlivněna rozměrová stabilita pergamenu.
- Pergamen přijímá EO v menším množství než činěné vazební usně (1x-6x méně).
- Ošetření EO způsobuje změnu barevnosti pergamenů, zvláště jeho zežloutnutí a ztmavnutí.
- Po aplikaci EO bylo pozorováno snížení pevnosti v tahu pergamenu. Tažnost nebyla ovlivněna.
- Kyselost pergamenu vyjádřená v pH nebyla působením EO ovlivněna.
- Teplota smrštění novodobého ani historického pergamenu nebyla aplikací EO ovlivněna.

Tříslučiněné vazební usně

- Provedeným ošetřením EO nebyla ovlivněna rozměrová stabilita tříslučiněné vazební usně.

- Novodobé tříslučiněné usně, které ještě nebyly knihařsky zpracované, přijímají EO ve vyšší míře, než usně již použité na knižní vazbu.
- Ošetření EO způsobuje změnu barevnosti činěných usní, jejich zežloutnutí a ztmavnutí, které tvoří vyšší podíl na změně barevnosti, než jak to bylo pozorováno u pergamenu.
- Po aplikaci EO bylo pozorováno částečné snížení pevnosti v tahu a tažnosti.
- Kyselost tříslučiněné usně vyjádřená v pH nebyla působením EO ovlivněna.
- Teplota smrštění novodobé tříslučiněné usně se po aplikaci EO a stárnutí snížila. Vliv EO na teplotu smrštění historických tříslučiněných usní nelze jednoznačně stanovit.

Vlivem odlišné prostorové struktury a uzavřenosti povrchu pergamenu v porovnání s činěnými usněmi jsou sledované vlastnosti u pergamenu méně ovlivněny působením EO. S tímto poznatkem souhlasí i menší změny teploty smrštění u vzorků usní z knižních vazeb, jejichž struktura a povrch byly během knihařského zpracování částečně uzavřeny, v porovnání s novodobými tříslučiněnými usněmi. Na druhé straně bylo u pergamenu pozorováno výraznější snížení pevnosti v tahu po působení EO.

K větší změně barevnosti u tříslučiněných usní přispívá přítomnost tříslovin a jejich migrace k povrchu usní během ošetření EO a stárnutí.

Folie z PVC

EO absorbované v materiálech z PVC se chovají jako změkčovadla. To znamená, že snižují pevnost v tahu, ale zvyšují tažnost. U starších materiálů, které již ztratily vlastní změkčovadlo a staly se křehkými, to lze považovat za **pozitivní vliv**. V následujících tabulkách 7 a 8 je ukázán vliv různých EO na pevnostní vlastnosti PVC folií exponovaných 30 dní v nasycených parách EO. Testy byly provedeny na Univerzitě Pardubice v rámci tohoto projektu. Snížení pevnosti nepřesahuje 20% a zvýšení tažnosti se pohybuje do 10%

Tab. 7: Změna indexu přetržení PVC folie po ošetření EO z tymiánu (11) a skořice (12)

Materiál	PVC hnědé			
	Doba expozice (dny)	Index přetržení [N.m/g]	95% IS dolní mez	95% IS horní mez
Esence 11				
0	11,925	11,392	12,457	0,961
30	10,054	9,997	10,416	0,293
Koef. změny	0,843			
Esence 12				
0	11,925	11,392	12,457	0,961
30	11,413	11,032	11,721	0,513
Koef. změny	0,957			

Tab. 8: Změna pevnostních vlastností PVC folie po 30 dnech pobytu v nasycených parách složek EO (eukalyptol, limonen, ocimen)

PVC	Pevnost v tahu [MPa]	Prodloužení [%]	TEAI [J/g]	TI [N.m/g]
<i>průměr SR</i>	20,95	190,91	20,29	16,34
<i>var.koef. %</i>	3,4	3,2	6,9	3,4
<i>95% IS dolní mez</i>	20,513	186,788	19,446	16,004
<i>95% IS horní mez</i>	21,386	195,030	21,143	16,685
<i>průměr SR30</i>	18,39	190,73	22,72	14,17
<i>var.koef. %</i>	8,5	6,9	7,1	8,1
<i>95% IS dolní mez</i>	17,333	182,329	21,642	13,357
<i>95% IS horní mez</i>	19,443	199,140	23,797	14,990
<i>poměr průměrů¹</i>	0,88	1,00	1,12	0,87
<i>průměr eukalyptol</i>	17,51	208,70	18,44	13,72
<i>var.koef. %</i>	6,0	7,5	8,0	6,1
<i>95% IS dolní mez</i>	16,837	198,149	17,383	13,153
<i>95% IS horní mez</i>	18,177	219,259	19,498	14,279
<i>poměr průměrů</i>	0,84	1,09	0,91	0,84
<i>průměr limonen</i>	18,17	209,68	20,02	14,17
<i>var.koef. %</i>	8,1	10,7	8,7	8,1
<i>95% IS dolní mez</i>	17,120	195,474	18,683	13,357
<i>95% IS horní mez</i>	19,214	223,876	21,360	14,990
<i>poměr průměrů</i>	0,87	1,10	0,99	0,87
<i>průměr ocimen</i>	20,73	183,26	19,05	16,18
<i>var.koef. %</i>	6,8	7,1	9,3	6,8
<i>95% IS dolní mez</i>	19,784	173,967	17,686	15,435
<i>95% IS horní mez</i>	21,686	192,553	20,416	16,919
<i>poměr průměrů</i>	0,99	0,96	0,94	0,99

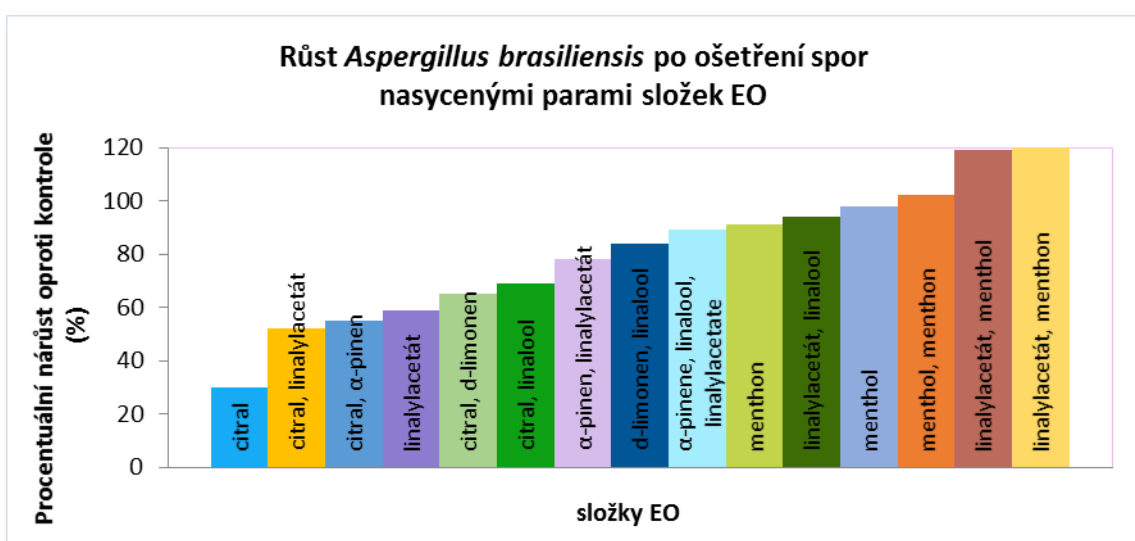
2.2 Výběr účinných složek EO pro dezinfekci

Výběr vhodných složek esenciálních olejů pro dezinfekci knih proběhlo v několika krocích. V rámci projektu NAKI „Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů“, DF11P01OVV028 bylo testováno nejprve 15 rostlinných EO, u kterých se předpokládala antifungální aktivita. Testy proběhly v nasycených parách proti skupině modelových mikroorganismů (Křůmal, 2015) ve Státním zdravotním ústavu. V těchto testech měly nejvyšší aktivitu EO z levandule, limetky a máty.

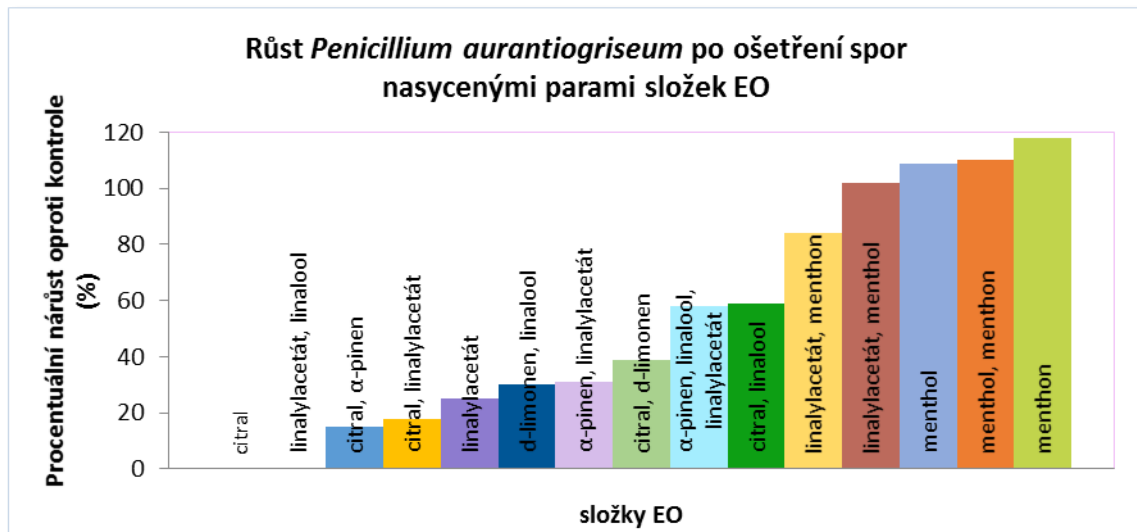
Na základě analýzy těchto 3 EO (Křůmal, 2015) bylo vybráno 7 jejich složek, které patřily mezi dostatečně těkavé majoritně zastoupené složky, u nichž se předpokládalo, že jsou zodpovědné za antimikrobiální aktivitu par EO.

Tyto složky byly zakoupeny jako samostatné chemicky čisté látky (Sigma-Aldrich) a porovnávali jsme jejich aktivitu proti plísním *Aspergillus brasiliensis* a *Penicillium aurantiogriseum* v nasycených parách při 75 % relativní vlhkosti vzduchu (Obr. 1, Obr. 2). V testech byly použity složky samostatně i v různých kombinacích.

Při výběru nejvhodnější látky byla zohledněna tato kritéria: fungicidní účinek složky, nežádoucí působení na plasty, míra oxidace a houštnutí při styku s kyslíkem. Byla vybrána směs citral – linalylacetát (1:1), která patřila proti oběma plísním mezi nejúčinnější, ale na rozdíl od samotného citralu nepodléhala tak rychle oxidaci a nezpůsobovala leptání plastů jako α -pinen.



Obr. 1



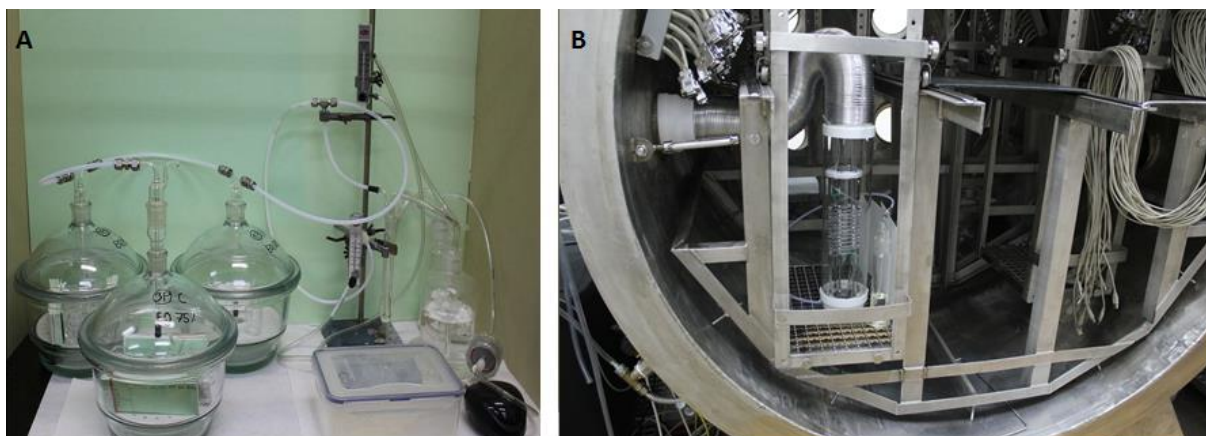
Obr. 2

2.3 Výběr podmínek ošetření knih parami směsi citral + linalylacetát (1 : 1)

Metodika byla vypracována na základě testů účinku par směsi citralu a linalylacetátu (budou nadále označovány jako „páry EO“) za různých podmínek (relativní vlhkost, obsah kyslíku v atmosféře, dezinfikovaný materiál) a v různém experimentálním uspořádání:

- V exsikátorech s nasycenými parami EO
- V testovací lince s exsikátory a řaděnými parami EO (Obr. 3A)
- Ve víceúčelové vakuové komoře, která je použita pro tuto metodiku, s koncentrací par EO blízko nasycení (Obr. 3B)

Na základě těchto testů byly nalezeny klíčové podmínky dezinfekce, které jsou schopny výrazně ovlivnit nezbytnou dobu dezinfekce



Obr. 3

K testům byly použity modelové plísňe *A. brasiliensis* a *P. aurantiogriseum* z České sbírky mikroorganismů (Masarykova univerzita, Brno) a to ve formě spor na různých typech substrátu i ve formě rostoucí plísňe na papíru či lepence. Nezbytný čas na dezinfekci je silně závislý na substrátu. Obvykle je nejkratší na skle, delší na filtračním papíře a nejdelší na lepence bez ohledu na podmínky

experimentu. Pro porovnání různých podmínek je potřeba přesný a robustní postup, k čemuž sloužily vzorky s vysušenými spory na sklíčkách. U nich je definovaný počet životaschopných spor na skle vložen do testovaného prostředí a po vytažení z dezinfekčního prostředí jsou spory smyty, naředěny a kultivační technikou se zjistí jejich úbytek oproti kontrolnímu vzorku. Vzorky na sklíčkách byly využity jako indikátor dezinfekčního účinku par EO za různých podmínek (viz následující kapitoly). Testy se vzorky plísní na papírových nosičích byly prováděny zároveň s nimi.

Princip testování antimikrobiálního účinku par EO je blíže popsán v metodice “Metodika stanovení fungicidních účinků par esenciálních olejů a jejich složek na spory plísní na různých substrátech”, která je v současné době (srpen 2015) v recenzním řízení.

Koncentrace par EO

Se stoupající koncentrací par EO se snižuje doba nezbytná k dezinfekci.

Nejlepších výsledků je dosahováno s nasycenými parami – u vzorků spor na skle v exsikátoru byla dostatečná doba za optimálních podmínek kratší než 24h.

Velmi dobře též působí nasycené páry EO ředěné 1:1 se vzduchem v dezinfekční lince, za optimálních podmínek bylo dezinfekčního účinku na skle dosaženo již po 3 dnech.

Minimální doba dezinfekce vzorků na skle byla v předchozích případech pravděpodobně ještě kratší, ale nemělo smysl se snažit minimalizovat tuto dobu po příliš krátkých úsecích (hodiny, resp. jednotlivé dny), protože byl hledán dostatečně robustní dezinfekční postup, při kterém dochází k dezinfekci spor na různorodých substrátech.

Velmi ředěné páry EO (1:5 a více) mají slabý dezinfekční účinek a k zahubení či částečné redukci počtu živých spor referenčních vzorků došlo v rádech týdnů. Takovéto koncentrace jsou vhodnější k preventivnímu ošetřování knih.

Ve víceúčelové vakuové komoře byly pro tuto metodiku použity vysoké koncentrace par EO blízké nasycení.

Způsob aplikace par EO

Způsob aplikace par EO se liší podle velikosti prostoru, který je potřeba sytit parami.

Malá vzduchotěsná nádoba o objemu několika litrů může být nasycena parami EO odparem z hladiny EO v otevřené nádobě. Pro objemy nad 0,1 m³ je tento postup nevhodný, protože přirozené odpařování a šíření par EO difuzí je příliš pomalé.

V testovací lince bylo použito probublávání kapalně směsi složek EO v impingeru nosným plynem, který se nasytí parami EO a je dále veden do testovací nádoby (exsikátor). Průtok plynu přes EO je kolem 40 ml/min, takže je tento postup vhodný opět pro malé nádoby.

Ve vakuové komoře a modelovém depozitáři byl použit generátor par EO, zkonstruovaný v tomto projektu, a který je chráněn jako užitečný vzor. V principu jde o to, že pomocí malého čerpadla cirkuluje kapalná směs složek EO ze zásobníku skrz tenkou hadičku z měkčeného PVC, navinutou na válcové drátěné kleci, zpět do zásobníku. EO mají organický charakter a jsou schopny difundovat přes stěnu hadičky na její povrch, kolem kterého díky ventilátoru proudí okolní atmosféra a urychluje odpařování EO z povrchu hadičky. Tato ventilace zároveň zajišťuje rovnoměrné rozptýlení EO v prostoru. Pokud

je odpařování rychlejší než difúze, je cirkulující EO chráněn před oxidací a stačí zásobník s EO doplňovat.

Složení atmosféry použité k dezinfekci

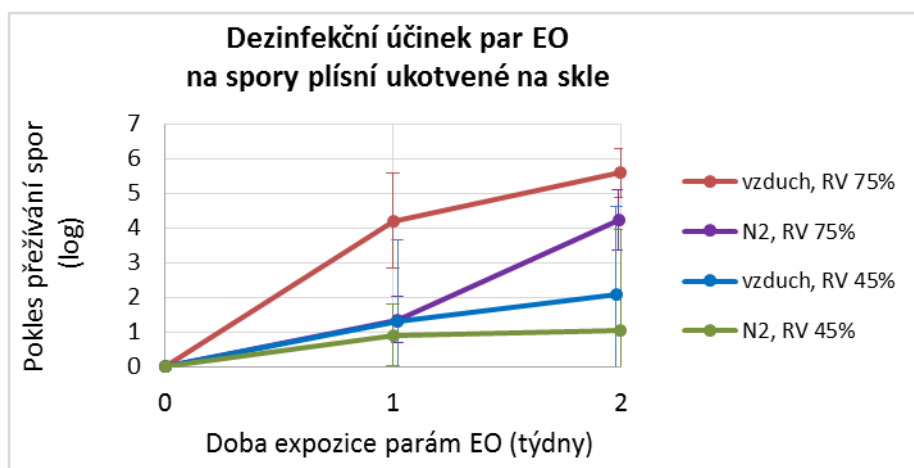
Bylo testováno použití vzduchu, dusíku a vakua. Nejlepší výsledky poskytovala dezinfekce na vzduchu (Obr. 4).

Vzduch je nejsnáze dostupné médium, do kterého je možné odpařovat páry EO. Nevýhodou je, že citral podléhá za přístupu vzduchu oxidaci doprovázené změnou konzistence a barvy, která se ještě urychluje probubláváním či ofukováním. Proto je nezbytné v zařízení pro tvorbu par pravidelně měnit náplň (EO) či prvky tohoto zařízení. Ve vakuové komoře byl použit generátor par EO popsáný v kapitole 2.5. Pro snížení hromadění oxidačních produktů byly EO v hadičce cirkulovány za použití čerpadla.

Dusíková atmosféra byla vytvořena přívodem plynu z tlakové nádoby. Při použití dusíku nedocházelo k nežádoucí oxidaci citralu.

Vakuum bylo použito pouze jako jeden z kroků experimentu. Posloužilo k urychlení transportu molekul vody a EO do struktury papíru. Nebyl prováděn žádný experiment, kdy by bylo po celou dobu udržováno vakuum, protože za těchto podmínek není možné ventilovat atmosféru obsahující páry EO. Ty by mohly mít sníženou koncentraci v bezprostřední blízkosti knih, kterými jsou pohlcovány (hmotnostní podíl v papírovém materiálu kolem jednotek promile). Taktéž odpařování EO z generátoru by bylo závislé na difuzi.

Výsledky sady testů v komoře a testovací lince ukázaly, že použití dusíkové atmosféry dezinfekci prodloužilo. V některých případech u papírových nosičů nebyl pozorován významný dezinfekční účinek v období do 6 týdnů.



Obr. 4: Porovnání různých podmínek experimentu v testovací lince

Relativní vlhkost vzduchu (dusíku)

Byly testovány především dvě zvolené relativní vlhkosti vzduchu (dusíkové atmosféry) – „suchý vzduch“ o relativní vlhkosti přibližně 45% a „vlhký vzduch“ o vlhkosti 75%. Vlhké prostředí výrazně urychlovalo dezinfekci ve vzduchu i v dusíku.

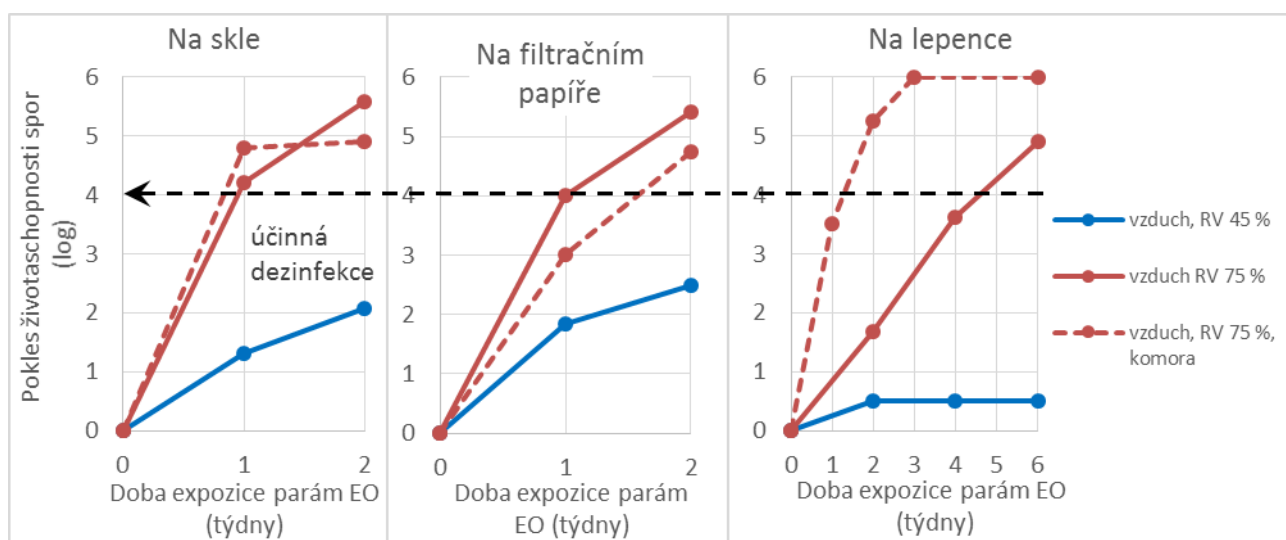
Účinek par EO nasycených z 50% ve vzduchu a v dusíku byl výrazně závislý na relativní vlhkosti. (Obr. 4, Obr. 5), po dvou týdnech působení na sklíčkách byl při 75 % více než dvojnásobný oproti 45%.

Teplota

Testy dezinfekce byly prováděny za laboratorní teploty 20-25°C. Pouze testy ve víceúčelové vakuové komoře byly prováděny za vyšší teploty a to v dvou intervalech 25-30°C a 35-40°C, což umožnilo vyšší koncentraci par EO v atmosféře a tím i urychlení procesu.

Množství a charakter dezinfikovaného materiálu

Za stejných podmínek dochází k zahubení stejného počtu spor ukotvených na různých substrátech v různých časech (Obr. 5). V testovací lince bylo nejrychlejší zahubení spor na skle, delší čas byl potřebný na filtračním papíře a nejdéle to trvalo na lepence, kde jsou EO sorbovány. V komoře, kde je vyšší koncentrace EO, teplota a důkladná cirkulace vzduchu byly rozdíly mezi vzorky menší. (za nejvhodnějších podmínek do 2 týdnů).

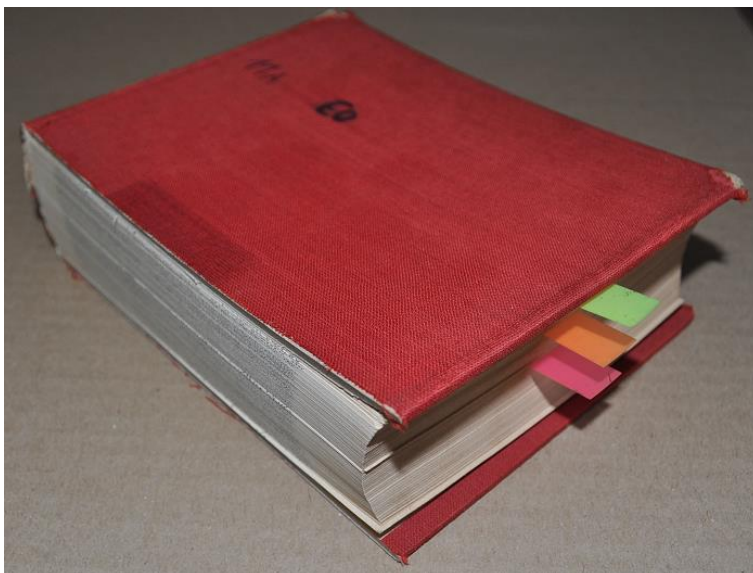


Obr. 5: Porovnání dezinfekčního účinku par EO na různých substrátech v testovací lince (plná čára) a víceúčelové vakuové komoře (přerušovaná čára)

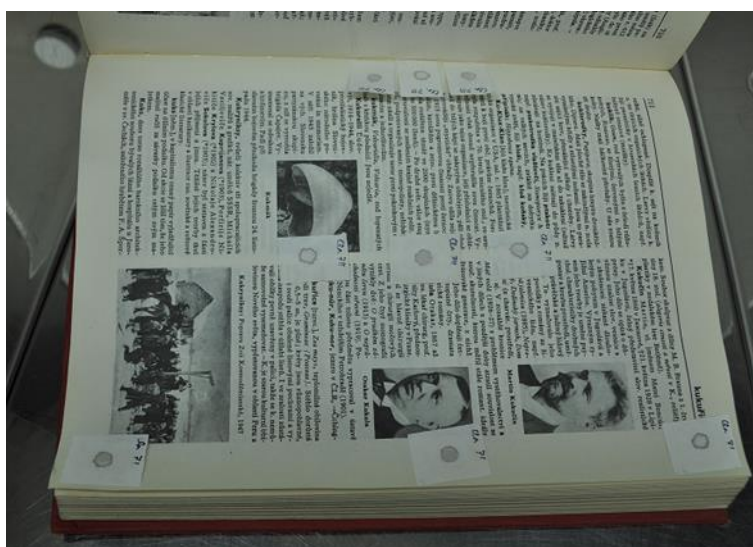
Dále jsme zkoumali pronikání par EO dovnitř knihy, do které jsme do různých pozic vložili vzorky (papírky se spory, papírky s rostoucí plísní, spory nakapané přímo na list knihy) (Obr. 6, Obr. 7). Testovali jsme pozice ve třech různých hloubkách knihy na kraji stránky, uprostřed a u hřbetu.

U výsledků byl pozorovatelný lehký rozdíl mezi listy u desek a středu knihy i v rámci jednoho listu, ale celkově potřebovaly tyto vzorky delší čas k dezinfekci oproti volně loženým (přibližně 2 týdny).

Vše samozřejmě závisí na materiálu, rozměrech knihy a testovanému druhu plísň. Pro dezinfekci je nutné rovnoměrné rozložení knih a proložení knih separačními deskami, aby byl co nejlepší přístup par EO.



Obr. 6: Zkušební kniha pro testování průniku par do knižního bloku



Obr. 7: Rozložení vzorků ve zkušební knize

Přítomné mikroorganismy

Z biologického pohledu velmi záleží na tom, se kterými mikroorganismy se dostala kniha do styku či kterými byla napadena. Některé druhy jsou dobře citlivé k tomuto dezinfekčnímu postupu (např. *P. aurantiogriseum*) a k zahubení dojde za kratší čas bez výrazného vlivu materiálu dezinfikovaného objektu a formy plísně. Naopak *A. brasiliensis* je představitelem velmi odolných druhů a během dezinfekčního procesu může dojít za stejnou dobu pouze k redukci počtu živých buněk.

Testované vzorky s mikroorganismy obsahovaly čisté spory nebo rostoucí plíseň. Výhoda použití spor je, že lze kvantitativně vyhodnotit dezinfekční účinek. U rostoucí plísně lze posoudit, zda došlo k jejímu zahubení či slovně popsat jaké změny nastaly. Vzorky rostoucí plísně obsahovaly též spory, které byly naočkovány na podložku, aby daly vzniknout po vyklíčení rostoucí plísni, a pokud byly vzorky kultivovány déle, tak i nově vyprodukované spory.

2.4 Sledování účinnosti dezinfekce pomocí signální knihy

Vzhledem k tomu, že účinnost dezinfekce je ovlivněna přístupností dezinfikovaného prostoru pro páry EO, používáme signální knihy, do kterých vkládáme na různá místa vzorky filtračního papíru inokulované sporamí plísně *Aspergillus brasiliensis*, a po otevření komory na nich sledujeme účinnost proběhlé dezinfekce standardním postupem. Tato plíseň byla zvolena kvůli své vysoké odolnosti vůči dezinfekčnímu postupu pomocí EO (Křůmal, 2015).

Rozmístění vzorků je podobné jako ve zkušební knize (Obr. 7). Signální kniha by měla patřit mezi největší dezinfikované svazky a měla by materiálově odpovídat většině knih.

Princip testování je založen na metodice (Volejníková A., 2015). Připravíme testovací suspenzi spor o koncentraci přibližně 10^7 spor/ml a naředíme ji desítkovým ředícím krokem pomocí fyziologického roztoku obohaceného o 0,05% Tween-80 (Sigma-Aldrich) na minimálně 6 různých koncentrací (označované 0., 1., 2., 3., 4. a 5. ředění). Z každé koncentrace nakapeme na malé sterilní čtverečky filtračního papíru 20 μ l suspenze a necháme je vysušit. Takovéto vzorky jsou připraveny k založení do knihy, do které zakládáme vzorky připravené z 0., 2. a 4. ředění. Pro srovnávací sadu bez působení EO si připravíme vzorky ze všech šesti ředění.

Pro vyhodnocení životaschopnosti spor přeneseme papírky se sporamí pomocí sterilní pinzety (ožeh plamenem) na Petriho misku se sladinovým agarem, nejvhodnější jsou dělené misky na čtvrtiny, kde je možné do každého oddílu vložit jeden vzorek. Vzorky kultivujeme při 25°C. Každých 24h je vyhodnocen nárůst plísně. Dobře životaschopný vzorek naroste u většiny plísní již do druhého dne.

U takto připravených vzorků by měla u kontrolní sady vyrůst plíseň na všech šesti ředěních a u vzorků z komory podle účinnosti dezinfekce. Pokud u vzorku z komory nenaroste ředění 4, je dezinfekce spor účinná z 2 a více řádů (99 % spor zahubeno), pokud nenaroste ředění 2, tak je dezinfekce účinná ze 4 a více řádů (99,99%) a pokud nenaroste ani ředění 0, tak došlo k totálnímu zahubení spor vzorku o 6 a více řádů (tedy 99,9999%).

Testovací suspenze spor je připravena smyvem spor nárůstu plísně ze sbírkové kultury (*Aspergillus brasiliensis* nebo plíseň ze stejného rodu, která byla identifikována na kontaminovaných knížkách).

Alternativou těchto testů je testování přežívajících plísňových spor pomocí stěrových tamponů. V klasické metodě jsou přeneseny spory tamponem na kultivační půdu a následně kultivovány 3-5 dní (u aspergillu) při $25\pm 1^\circ\text{C}$, což je časově velice náročné. Proto je možné použít stěrové tampony určené k detekci ATP v živých buňkách (PocketSwab Plus, Charm Sciences, USA). Metoda je založena na poznatku, že mrtvé buňky již neobsahují ATP. Uvnitř tamponu zreaguje ATP z živých spor s reakční směsí obsahující enzym luciferasu a výsledný světelný signál je zaznamenán v luminometru (Firefly 2, Charm Sciences, USA).

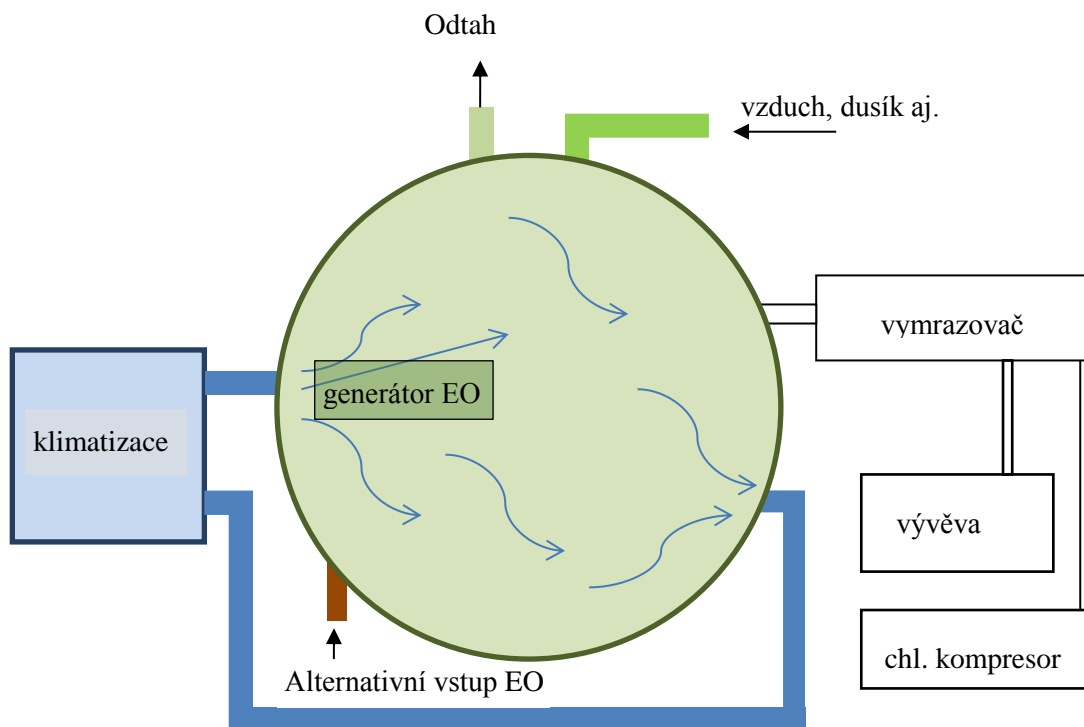
Spory se setřou z kontrolního a ošetřeného vzorku a porovnají se jejich hodnoty. Pro správné porovnání je nezbytné porovnat stejné množství spor, což je zajištěno tím, že je setřen stejný počet (2-3) vysušených kapek (50 μl) testovací suspenze spor. Tyto kapky je možné aplikovat přímo na desky či listy knihy nebo na vzorky papíru založené mezi listy knihy, ale u těchto materiálů při stěru velmi záleží na porozitě, proto je kvantitativně přesnější kapky spor aplikovat na tenká krycí sklíčka. Ta je možno stejně jako papírky založit mezi listy signální knihy. Luminiscenční signál kontrolního vzorku by se měl pohybovat v řádech 10^5 či 10^6 , zatímco signál získaný setřením běžného čistého ale ne sterilního předmětu se pohybuje obvykle do 10 000. Pozor, intenzita luminiscenčního signálu není přímo úměrná koncentraci spor, nelze proto úbytek kvantifikovat, pouze porovnat s empiricky získanými daty.

2.5 Popis zařízení

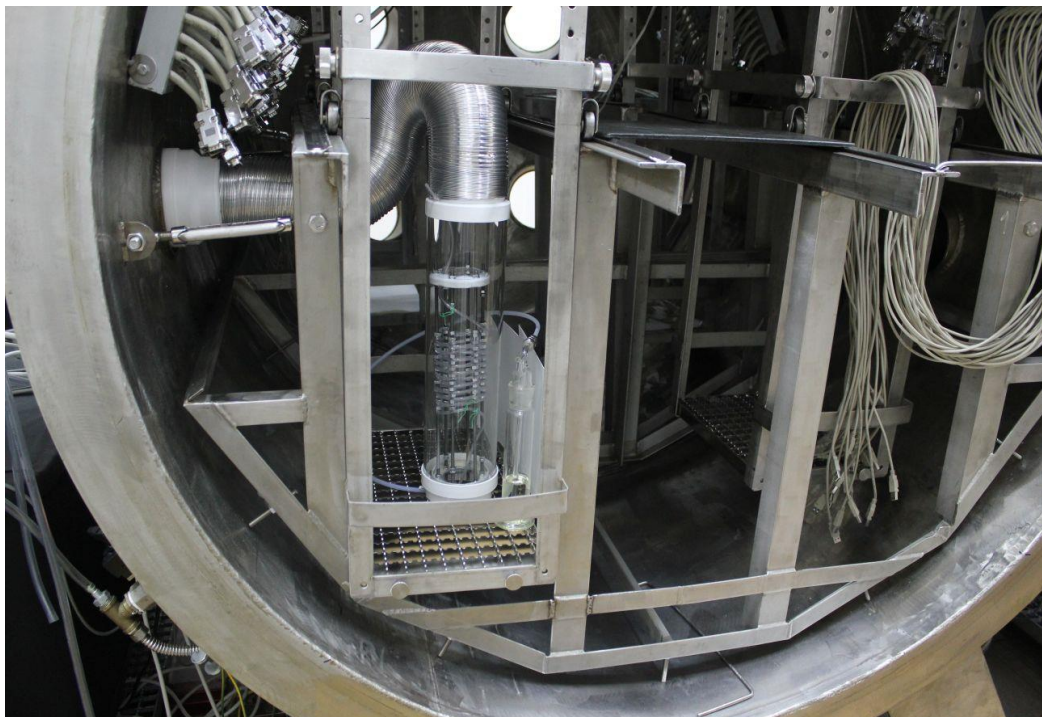
Dezinfekce se provádí ve víceúčelové vakuové komoře (VVK) postavené v Národní knihovně po povodních v roce 2002 na sušení vzácných dokumentů a knih (Neuvirt, 2010). K dezinfekčním účelům byla vybavena generátorem par složek esenciálních olejů (Neuvirt, 2015), hermeticky těsným klimatizačním okruhem a systémem prokladů knih ve sloupcích fixovaných v kontejnerech (Neuvirt). Počet kontejnerů, které lze vložit do komory, je podle velikosti 10 až 15. Každý kontejner může v závislosti na tloušťce knih pojmout kolem 10 až 15 knih. Skladba VVK pro účely dezinfekce je schematicky znázorněna na Obr. 8. Pohled do komory s vloženým generátorem par složek EO je na Obr. 9. Uspořádání sloupce knih s proklady v kontejneru je na Obr. 10.

V zařízení jsou parametry dezinfekčního procesu, jejich sled a časový průběh nezávisle nastavitelné v následujících mezích: teplota ($28 - 60^\circ\text{C}$), tlak (1 – 1000 mbar), relativní vlhkost (20 – 95%), koncentrace par složek EO (při dané teplotě se blíží nasycení), složení vnitřní atmosféry (vzduch, dusík, oxid uhličitý a jejich směsi). V průběhu dezinfekce lze sledovat tlak, teplotu a relativní vlhkost atmosféry v komoře a teplotu a relativní vlhkost uvnitř knih.

Detailní popis zařízení je uveden v Periodické zprávě za rok 2014 projektu NAKI č. 63, DF11P01OVV28, MK ČR „Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů“, v příloze F2.2: Měření koncentrace a funkční vzorky zařízení na dezinfekci knih parami EO.



Obr. 8: Schéma vakuové komory upravené pro dezinfekci knih



Obr. 9: Pohled do komory s generátorem par EO



Obr. 10: Kontejner s knihami

2.6 Dezinfekční postup

K dezinfekci knih ve víceúčelové vakuové komoře byl navržen následující postup (viz body a-m). Je vhodný k dezinfekci knih kontaminovaných prachem s velkým množstvím spor případně dalšími mikroorganismy, jako jsou bakterie. Pokud jsou knihy silně znečištěny, je vhodné předřadit mechanickou očistu knih.

Při dezinfekci knih porostlých živými plísněmi je nezbytné mít na paměti, že aplikace par EO za těchto podmínek má velmi rychlý fungistatický efekt, ale zejména u odolných druhů (např. *Aspergillus brasiliensis*) dosáhneme v prakticky akceptovatelné době jen částečného nikoliv totálního fungicidního efektu.

- a) Knihy určené k dezinfekci vložíme podle velikosti do příslušného kontejneru, proložíme separačními deskami a umístíme do komory.
- b) Ke knihám přidáme signální knihu, která je inokulována spory a slouží k posouzení účinnosti dezinfekce.
- c) Generátor par EO naplníme dezinfekční směsí (citral + linalylacetát 1:1 obj.).
- d) Na topnou dlaždicí na dně komory umístíme nádobu s nasyceným roztokem NaCl jako zdroj vodní páry k dosažení a udržení požadované relativní vlhkosti 75%.
- e) Po uzavření komory a klimatizační okruh evakuujeme na tlak 35 mbar a poté klimatizační okruh odpojíme. Tento krok je důležitý pro rychlé dosažení nastavené relativní vlhkosti nejen ve vnitřní atmosféře komory ale i v knihách. Stejným mechanismem se urychlí nasycení vnitřního prostoru komory a hmoty knih parami složek EO.

- f) Po dosažení relativní vlhkosti uvnitř knih vyšší než 65 %, připojíme klimatizační okruh a v systému zvýšíme tlak na hodnotu vnějšího tlaku připuštěním vzduchu (nebo jiného plynu podle budoucího vývoje metody).
- g) Spustíme cirkulaci vnitřní atmosféry.
- h) Nastavíme teplotu, při které bude probíhat dezinfekce (30 nebo 38°C – vyšší teplota zkracuje potřebnou dobu na dezinfekci).
- i) Po uplynutí dezinfekční doby (u plísní 14 dní) komoru otevřeme, odebereme vzorky ze signální knihy a knihu vrátíme do komory a komoru zavřeme.
- j) Standardním postupem stanovíme účinnost dezinfekce (kapitola 2.4).
- k) V případě, že by dezinfekce byla nedostatečná, je nutné v ní pokračovat od bodu g) po dobu odhadnutou na základě výsledku získaného v bodě j).
- l) Je-li dezinfekce účinná, odstraníme z komory nádobu s nasyceným roztokem NaCl a generátor par EO a komoru přes vymrazovač evakuujeme. Tím dojde k odvětrání absorbovaných esencí a vlhkosti.
- m) Po dosažení požadované rovnovážné relativní vlhkosti atmosféry uvnitř knih (obvykle pod 50%), komoru zavzdušníme a knihy vyjmeme.

2.7 Výsledky dezinfekce

Následující příklady dokumentují účinek dezinfekce provedené podle této metodiky.

Příklad 1

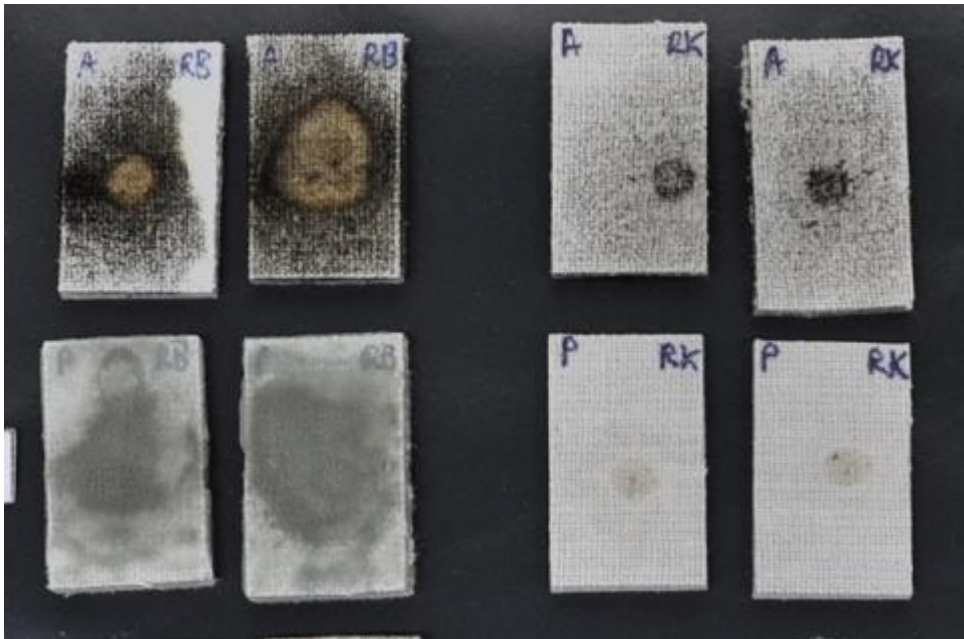
V pokusu byly sledovány čtyři typy vzorků (spory na skle, papírku, deskách knihy a rostoucí plíseň na papírku), jejichž životaschopnost byla sledována kultivačně nebo pomocí stěrů k detekci ATP.

Dezinfekční účinek par EO ve víceúčelové vakuové komoře

vzorek		kultivace	kultivace	ATP	ATP
		pokles životaschopnosti spor na skle	pokles životaschopnosti spor na papírku	spory na deskách knihy	rostoucí plíseň na papírku
<i>A. brasiliensis</i>	kontrola	x	x	112000	840000
<i>A. brasiliensis</i>	test	3,2 řádu	2 řády	15000	54000
<i>P. aurantiogriseum</i>	kontrola	x	x	22000	1150000
<i>P. aurantiogriseum</i>	test	5,5 řádů	6 řádů	5000	20500

Příklad 2 (Obr. 11)

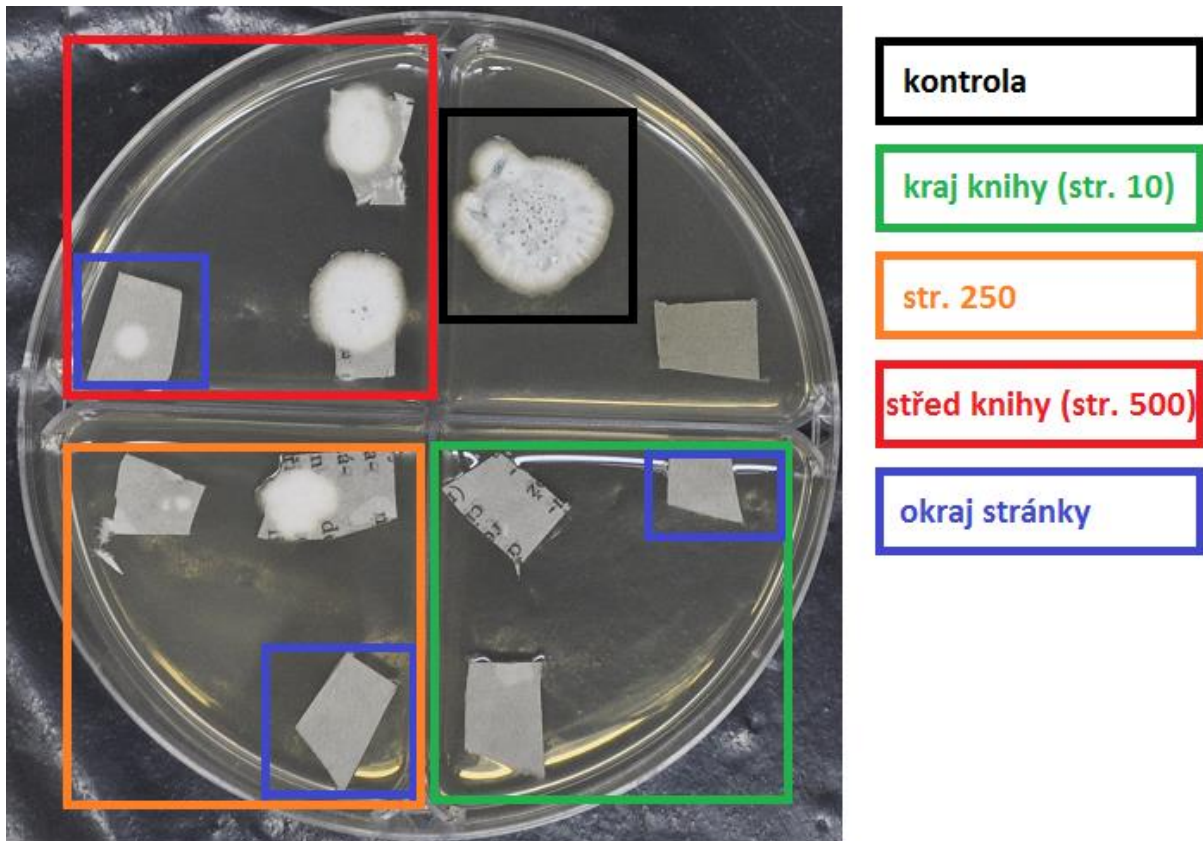
Spory aspergillu (1. řádek) a penicillia (2. řádek) byly aplikovány na nosiče z lepenky a po přidání malého množství živin byly nechány ve vlhkém prostředí vyklíčit. Poté byly 14 dní dezinfikovány ve VVK a následně 14 dní kultivovány při 100% relativní vlhkosti vzduchu a 25°C. Snímek zobrazuje rozdíl nárůstu plísně u kontrolních vzorků (levý sloupec) a dezinfikovaných vzorků (pravý sloupec). U aspergillu došlo k částečné likvidaci plísně a omezení jejího růstu zatímco u penicillia došlo k totálnímu zahubení.



Obr. 11: Dezinfekce rostoucí plísně

Příklad 3 (Obr. 12)

Pronikání par EO do knihy bylo ověřeno umístěním vzorků spor do různých pozic. Kniha měla cca 1000 stran. Nejrychleji byly zahubeny spory na kraji knihy (stránky blízko desek knihy) – vzorky ze stránky 10 leží v zeleném rámečku. Vzorky ze stránky 250 leží v oranžovém rámečku a vzorky ze stránky 500 leží v červeném rámečku. Na každé zmíněné stránce jsou testovány tři vzorky v různé vzdálenosti od ořízky. Z nich vzorek, který je nejbližší k ořízce, je v modrém rámečku. V černém rámečku je umístěn srovnávací vzorek, který nebyl ošetřen EO.



Obr. 12: Dezinfekce spor *P. aurantiogriseum* nakapaných na různé pozice v knize (viz kapitola 2.3)

Příklad 4 (Obr. 13)

Knihy byly rozříznuty na dvě části. Jedna polovina byla vydezinfikována v komoře podle uvedeného postupu, druhá byla nechána stranou. Následně byly vzorky namočené a dány do prostředí 100% relativní vlhkosti vzduchu a přibližně 25°C. Po týdnu je zdokumentován nárůst plísní pocházející z přirozené kontaminace knihy (Vlevo je ošetřená polovina, vpravo kontrolní polovina).



Obr. 13: Porovnání kontrolní a dezinfikované poloviny jedné knihy

3. Srovnání novosti postupů oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou, neznámou metodiku, a jejich srovnání s postupy v zahraničí

Toto je nová metodika, která používá k dezinfekci knih nové látky s antimikrobiálním účinkem (citral, linalylacetát). V České Republice se k dezinfekci knih používá nyní ethylenoxid a alkoholy.

Není nám známo, že by v současné době v Evropě existoval subjekt, který by se zabýval dezinfekcí knih esenciálními oleji. Jediná takováto firma působí v Jižní Koreji (Biomist_Technology), zabývá se dezinfekcí knih a vlastní národní patent na systém komory a kombinované dezinfekční a dezinfekční směsi vyrobené z rostlinných extraktů. Výrobce uvádí, že 24 hodin působení dezinfekčních plynů, zahubí plísně *Aspergillus niger* a *Eurotium herbariorum* z 99,90 %, tedy o tři řády (Biomist_katalog). Podrobnosti nejsou uvedeny a patří do know-how firmy.

V minulosti působila ve Francii firma Air Pharma Labo (Air_Pharma_Labo), která se nabízela klimatizační systémy obohacené o aerosol směsi esenciální olejů, které byly svým složením navrženy pro různá prostředí, aby zamezily šíření patogenních mikroorganismů včetně plísní. Jedním z cílových prostředí byly i depozitáře i knihovny, kam byly aplikovány směsi z těchto rostlin: citronella, eukalyptus, pelargonie, levandule, borovice, šalvěj a tymián.

4. Popis uplatnění Certifikované metodiky, informace, pro koho je určena, subjekty s kterými bude uzavřena smlouva o využití výsledku a jakým způsobem bude uplatněna

Metodika byla vyvinuta pro dezinfekci ve víceúčelové vakuové komoře Národní knihovny České Republiky a je určena pro toto unikátní zařízení, které umožňuje regulovat teplotu, relativní vlhkost, tlak, složení a cirkulaci atmosféry. Metodika bude využívána pro potřeby Národní knihovny i jako placená služba pro externí zájemce.

5. Seznam použité související literatury

Air_Pharma_Labo. [Online] [Citace: 20. Únor 2013.] <http://www.airpharma-labo.com>.

Biomist_katalog. [Online] [Citace: 25. Srpen 2015.] <http://www.sentios.lt/upload/files/Catalog%20Biomist.pdf>.

Biomist_Technology. [Online] [Citace: 25. srpen 2015.] <http://biomist.en.ec21.com/>.

Camele, I., Altieri, L., de Martino, L., de Feo, V., Mancini, E. and Rana, G.L. 2012. In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, Sv. 13, stránky 2290–2300.

Databáze_OECD_SIDS_Citral. [Online] [Citace: 25. srpen 2015.] http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD_SIDS/5392-40-5.pdf.

Databáze_OECD_SIDS_Linalylacetát. [Online] [Citace: 25. srpen 2015.]
<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEIDS/115957.pdf>.

Dzamic, A., Sokovic, M., Ristic, M., Grujivic-Jovanovic, S., Vukojevic, J. and Marin, P. D. 2008. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. *Arch. Biol. Sci.* 2008, Sv. 60, stránky 233-237.

Haleem Khan, a. a. and Mohan Karuppaiyl, S. 2012. Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi J. Biol. Sci.* 2012, Sv. 19, stránky 405–426.

Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M. and Yamaguchi, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses.* 2000, Sv. 23, stránky 17-23.

Křůmal, K., Kubátková, N., Večeřa, Z., Mikuška, P. 2015. Antimicrobial properties and chemical composition of liquid and gaseous phases of essential oils. *Chemical Papers.* 2015, Sv. 69, stránky 1084-1092.

Lalko, J. and Api, A. M. 2008. Citral: Identifying a threshold for induction of dermal sensitization. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008, Sv. 52, stránky 62-73.

Lang, G. and Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 2012, Sv. 27, stránky 13-39.

Lopéz, P., Sánchez, C., Batlle, R. and Nerín, C. 2005. Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils : Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005, Sv. 53, stránky 6939-6946.

Luo, M., Jiang, L.-K., Huang, Y.-X., Xiao, M., Li, B. and Zou, G.-L. 2004. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2004, Sv. 36, stránky 277-283.

Manso, S., Cacho-Nerín, F., Becerril, R. and Nerín, C. 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control.* 2013, Sv. 30, stránky 370-378.

Mari, M., Leoni, O., Iori, R. and Cembali, T. 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathol.*, 51: 231–236.

Melgarejo-Flores, B.G., Ortega-Ramírez, L., Silva-Espinoza, B., González-Aguilar, G., Miranda, M.R. and Ayala-Zavala, J.F. 2013. Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaves. *Postharvest Biology and Technology.* 2013, Sv. 86, stránky 321-328.

Michalcová, B. 2015. Vliv zvýšené teploty a působení složek esenciálního oleje na vybrané vlastnosti lignocelulózových materiálů. *Diplomová práce, Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická.* 2015.

Mishra, P.K., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A., Dubey, N.K. and Chanotiya, C.S. 2013. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013, Sv. 80, stránky 16-21.

Neuvirt, J. 2010. Universal drying chamber for flood-damaged paper objects. *Restaurator* . 2010, Sv. 31, stránky 222-245.

Neuvirt, J., Volejníková, A. Funkční vzorek zařízení na dezinfekci knih v parách složek esenciálních olejů. [Online] [Citace: 20. Srpen 2015.]
http://www.nkp.cz/soubory/ostatni/zarizeni_dezinfekce_knih.docx.

Neuvirt, Jiří. 2015. *Zařízení na řízení dávkování par složek esenciálních olejů odpařovaných z kapalně fáze do uzavřených prostorů k testování jejich desinfekční účinnosti.* 27761 Česká republika, 2. únor 2015. Užité vzor.

Pawar, V.C. and Thaker, V.S. 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses.*, 2006, Sv. 49, stránky 316-323.

Phillips, C. a., Laird, K. and Allen, S.C. 2012. The use of Citri-VTM® - An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. *Food Res. Int.* 2012, Sv. 47, stránky 310-314.

Pibiri, M.C., Goel, A., Vahekeni, N. and Roulet, C. A. 2006. Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *Int. J. Aromather.* 2006, Sv. 16, stránky 149–153.

Pinheiro, a. C., Macedo, M.F., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., Viegas, C., Brandão, J., et al. 2011. Mould and yeast identification in archival settings: Preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 2011, Sv. 65, stránky 619-627.

Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N. and Tzakou, O. 2002. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 2002, Sv. 50, stránky 6688-6691.

Rakotonirainy, M.S. and Lavédrine, B. 2005. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2005, Sv. 55, stránky 141-147.

Rothenborg, H.W., Menné, T. and Sjolín, K.E. 1977. Temperature dependent primary irritant dermatitis from lemon perfume. *Contact Dermatitis.*, 1977, Sv. 3, stránky 37-48.

Roussel, S., Reboux, G., Millon, L., Parchas, M.D., Boudih, S., Skana, F., et al. 2012. . 2012. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air.* 2012, Sv. 22, stránky 514-522.

Saddiq, A. and Khayyat, S. 2010. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2010, Sv. 98, stránky 89-93.

Sellamuthu, P.S., Sivakumar, D. and Soundy, P. 2013. Antifungal Activity and Chemical Composition of Thyme, Peppermint and Citronella Oils in Vapor Phase against Avocado and Peach Postharvest Pathogens. *J. Food Saf.* 2013, stránky 86-93.

Sequeira, S., Cabrita, E.J. and Macedo, M.F. 2012. Antifungals on paper conservation: An overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2012, Sv. 74, stránky 67-86.

Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M. A., Cuffini, A. M., Alonzo V. and Carlone N. A. J. 2007. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, Sv. 102, stránky 1544-1550.

Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A. and Efthimiadou, A. 2013. *Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against Botrytis cinerea, Penicillium italicum and Penicillium digitatum*. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*. 2013, Sv. 41, stránky 86–92.

Volejníková A., Nováková J., Neuvirt J. 2015. Stanovení fungicidních účinků par esenciálních olejů a jejich složek na spory plísní na různých substrátech. *Metodika k certifikaci*. 2015.

Wu, Y., Zhang, Y., Xie, G., Zhao, A., Pan, X., Chen, T., et al. 2012. The Metabolic Responses to Aerial Diffusion of Essential Oils. *Plos One*, 7. 2012, Sv. 7.

Zotti, M., Ferroni, A., and Calvini, P. 2008. Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 2008, Sv. 62, stránky 186–194.

Zyska, B. 1997. Fungi Isolated from Library Materials: A Review of the Literature. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 1997, Sv. 40, stránky 43-51.

6. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány (pokud existují), případně výstupy z originální práce

Publikace:

- **Křůmal, K., Kubátková, N., Večeřa, Z., Mikuška, P. 2015** Antimicrobial properties and chemical composition of liquid and gaseous phases of essential oils. *Chemical Papers*, **69**: 1084-1092.

Konference:

- **Nováková, J., Neuvirt, J., Palánková, L., Večeřa, Z., Křůmal, K., Melicherčíková, V., Urban, J.** Sporocidal effect of volatile components of essential oils on book contaminant fungi, Sborník abstraktů: International Symposium on Essential oils, 8-12/9/2013, Budapešť, Maďarsko (abstrakt BA 17).
- **Volejníková, A., Nováková, J., Neuvirt, J.** Protection of books and documents by application of essential oils, 1st International Conference on Science and Engineering in Arts, Heritage and Archeology (SEAHA), 14-15/7/2015, Londýn, Velká Británie.

Závěrečné zprávy:

- **Večeřa Z. a kol.:** *Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů*, Periodická zpráva o plnění úkolů v projektu NAKI č.63, DF11P01OVV028, MK ČR, Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, listopad **2011**
- **Večeřa Z. a kol.:** *Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů*, Periodická zpráva o plnění úkolů v projektu NAKI č.63, DF11P01OVV028, MK ČR, Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, listopad **2012**
- **Večeřa Z. a kol.:** *Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů*, Periodická zpráva o plnění úkolů v projektu NAKI č.63, DF11P01OVV028, MK ČR, Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, listopad **2013**
- **Večeřa Z. a kol.:** *Ochrana knižního fondu a dokumentů aplikací esenciálních olejů*, Periodická zpráva o plnění úkolů v projektu NAKI č.63, DF11P01OVV028, MK ČR, Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, listopad **2014**

Ostatní výstupy:

- **Neuvirt, J., Volejníková, A.** Funkční vzorek zařízení na dezinfekci knih v parách složek esenciálních olejů. [Online] [Citace: 20. Srpen 2015.]
http://www.nkp.cz/soubory/ostatni/zarizeni_dezinfekce_knih.docx.
- **Neuvirt, Jiří. 2015.** *Zařízení na řízení dávkování par složek esenciálních olejů odpařovaných z kapalně fáze do uzavřených prostorů k testování jejich desinfekční účinnosti.* 27761 Česká republika, 2. únor 2015. Užitný vzor.