دکتر مسعود آدرنگی*

اثر اتانول روی باکتریها

مقدمه:

اثرات سمی اتانول یا الکل اتیلیک روی باکتریها از زمانهای طولانی شناسائی و مورد بررسی قرار گرفته و یکی از دلایل مصرف الکل اتیلیک بعنوان ضدعفونی‌کننده مربوط به همین اثرات می‌باشد. واژه آنتی سپتیک معمولا در مورد موادی بکار برده می‌شود که هدف از استعمال آن از بین بردن میکروارگانیسم‌های یک نسج زنده باشد، درصورتیکه یک ترکیب Disinfectant به‌منظور از بین بردن میکروب‌های تجهیزات و وسایل گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرد.

* گروه داروسازی صنعتی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

اتانول برای هر دو منظور فوق با موفقیت بکار برده می‌شود.

اتانول (C_2H_5OH) یک مولکول آمفی‌پاتیک است، یعنی در حلالهای مائی و آلی هر دو حل شده و زنجیر کربنه کوتاه آن سبب می‌شود که یک ترکیب قطبی و هیدروفیل به‌حساب آید. در محلولهای مائی، مولکولهای اتانول توسط پیوندهای هیدروژن به یکدیگر متصل هستند.

در گروه الکلها، ارتباط مستقیمی بین ساختمان شیمیائی و اثرات باکتریسیدی وجود دارد بطوریکه هر چه تعداد اتم‌های کربن بیشتر می‌شود بر فعالیت باکتریسید الکل نیز اضافه می‌گردد، ولی اگر تعداد

اتم‌های کربن از ۱۰ تجاوز نماید، الکل مورد نظر نسبت به باکتریها تقریبا بی‌ضرر خواهد بود.

برای بیان غلظت محلولهای اتانول از واحدها یا مقیاس‌های مختلفی نظیر درجه الکلی، مولاریته، درصد وزنی حجمی (W/V) و درصد حجمی حجمی (V/V) استفاده می‌شود. باتوجه به وزن مولکولی و جرم حجمی اتانول، مرتبط نمودن مولاریته به درصد وزنی حجمی و یا حجمی ـ حجمی بسیار آسان بوده ولی ارتباط بین درجه الکلی و سایر واحدهای مرسوم کمی مشکل‌تر محاسبه می‌گردد. به‌منظور پیدا نمودن درصد وزنی ـ حجمی از روی درجه الکلی، از رابطه زیر می‌توان استفاده نمود:

$$P = N.d/D$$

در این رابطه:

P درصد وزنی ـ حجمی اتانول

N درجه الکلی

d جرم حجمی اتانول مطلق

و D جرم حجمی الکل در درجه الکلی مورد نظر می‌باشد.

جهت آگاهی بیشتر بایستی اضافه نمود که درجات الکلی ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۰ و ۹۰ درجه به‌ترتیب تقریبا معادل ۲۴/۷، ۳۷/۹، ۵۲/۲، ۶۲/۴ و ۸۵/۷ درصد وزنی ـ حجمی می‌باشند.

۱ـ اتانول و فیزیولوژی باکتریها:

اثرات سمی الکل اتیلیک روی باکتریها ناشی از مکانیسم‌های مختلفی است که در نهایت سبب تغییر در شرایط زندگی و دینامیسم رشد میکروب‌ها می‌گردد.

۱ـ۱ اثرات اتانول روی ساختمان باکتریها:

مهمترین تغییراتی که در نتیجه تماس الکل اتیلیک با باکتریها ایجاد می‌گردد شامل تغییرات دیواره باکتریها، غشاء سیتوپلاسمی و مواد تشکیل دهنده سیتوپلاسم می‌باشند.

دیواره باکتریهای گرم مثبت، ساختمان ساده‌تری نسبت به انواع گرم منفی دارد. ترکیب اصلی دیواره سلولی که سبب استحکام آن می‌گردد. پپتیدو گلی‌کان است. ساختمان این غشاء به گونه‌ای است که مولکولهای بزرگ نظیر آنزیم‌های آمیداز با وزن مولکولی ۳۵۰۰۰ و یا گلوکزیداز با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰ می‌توانند از آن عبور نموده و بنابراین، اتانول با وزن مولکولی ۴۶، در عبور از این جدار با اشکال عمده‌ای مواجه نمی‌گردد. این پدیده را با رنگ‌آمیزی گرم (Gram) می‌توان ثابت نمود. در مورد پاره‌ای از میکروارگانیسم‌ها نظیر اشرشیاکلی، غلظت‌های پائین اتانول (۱/۶ تا ۴ درصد وزنی ـ حجمی) در عرض ۳ الی ۴ ساعت منجر به لیز سلولی، که ناشی از

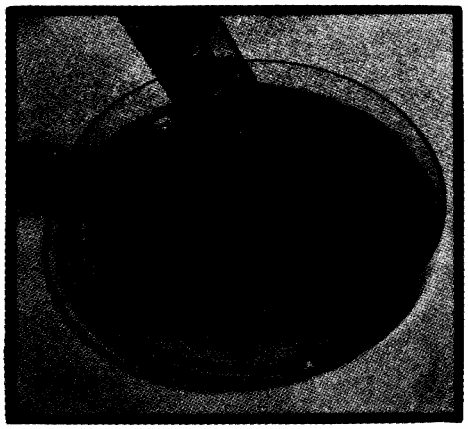
○ در گروه الکلها، ارتباط مستقیمی بین ساختمان شیمیایی و اثرات باکتریسیدی وجود دارد بطوریکه هرچه تعداد اتم‌های کربن بیشتر میشود بر فعالیت باکتریسید الکل نیز اضافه میگردد، ولی اگر تعداد اتم‌های کربن از ۱۰ تجاوز نماید، الکل مورد نظر نسبت به باکتریها تقریبا بی‌ضرر خواهد بود.

تاثیر الکل روی مجموعه پپتیدو گلی‌کان است گردیده ولی مکانیسم دقیق این پدیده هنوز بخوبی معلوم نمی‌باشد .

غشاء سیتوپلاسمی باکتریها عمدتا متشکل از ۳۰ الی ۴۰ درصد لیپیدها و ۵۰ تا ۷۰ درصد پروتئین‌ها می‌باشد . لیپیدهای غشاء در درجه اول از انواع گلیسروفسفو-لیپیدها هستند که ترکیب آنها بسته به نوع باکتری و مرحله رشد آن متفاوت می‌باشد . بغیر از فسفولیپیدها ، مقادیری از گلی-کولیپیدها ، هیدروکربورها ، کینون‌ها و الکل‌های ایزوپرن را نیز می‌توان در ترکیب این غشاء پیدا نمود . اسیدهای چربی که در ترکیب فسفولیپیدها و گلی‌کولیپیدها شرکت می‌نمایند معمولا بین ۱۲ الی ۲۴ اتم کربن داشته و بین آنها ، اسیدهای ۱۶ و ۱۸ کربنی از وفور بیشتری برخوردار هستند . این اسیدها ممکن است از نوع اشباع شده نظیر اسید پالمیتیک و یا غیر-اشباع نظیر اسید اولئیک بوده و درصورتیکه در ساختمان خود دارای بند مضاعف باشند ، در اکثر موارد ، اسید چرب از نوع ایزومر سیس (cis) می‌باشد . صرفنظر از انواع لیپیدها ، همگی آنها دارای یک قسمت

○ چنین به‌نظر میرسد که الکل‌هائیکه زنجیر کربنه کوتاه‌تری دارند بیشتر از بقیه سبب برهم زدن نظم غشاء سیتوپلاسمی میشوند.

هیدروفیل و یک قسمت هیدروفوب هستند . قسمت هیدروفیل در مورد فسفوگلیسریدها شامل عامل الکلی فسفوریله ، و در مورد گلی‌کولیپیدها شامل بقایای قند می‌باشد . قسمت هیدروفوب شامل زنجیر هیدروکربنه است . در محیط مائی ، مولکولهای فسفو-لیپید و گلیکولیپید توسط پیوندهای غیر-کووالانت به همدیگر مرتبط شده و یک لایه **مزدوج** به ضخامت یک میلیون نانومتر را

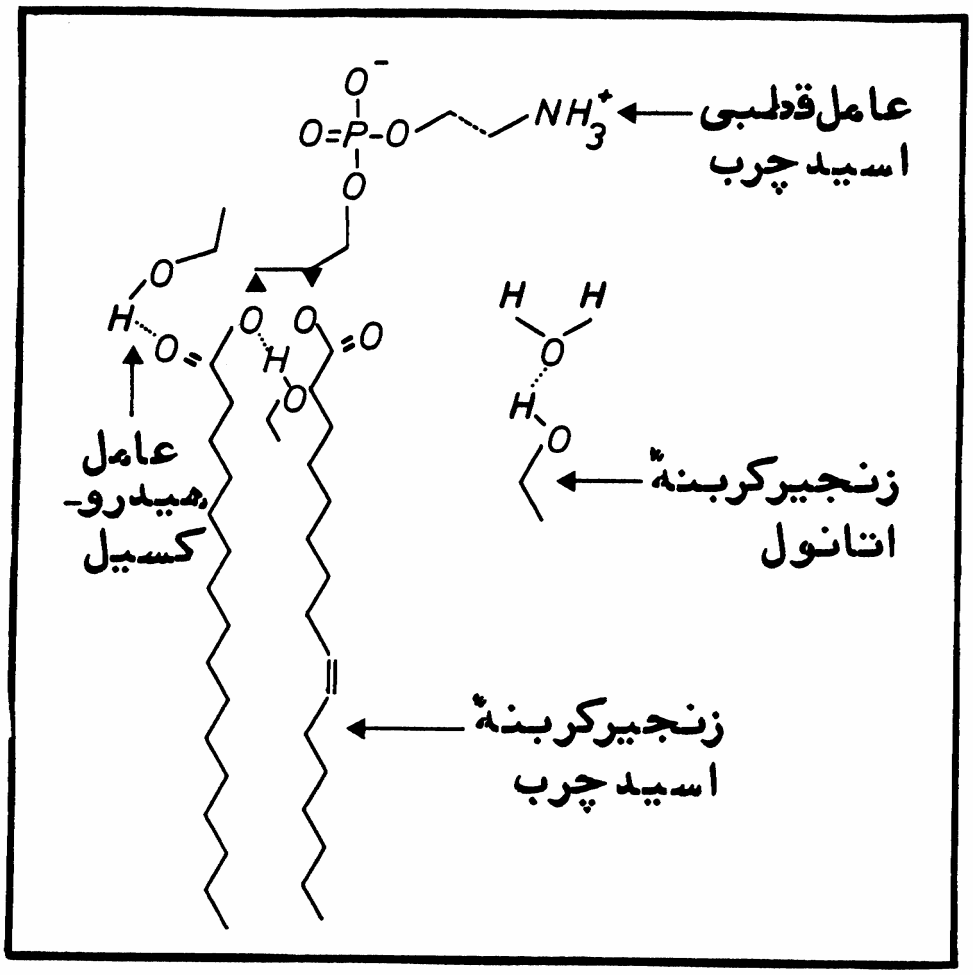


بوجود می‌آورند . در این لایه ، **قسمتهای** هیدروفوب به سمت داخل متمایل گردیده‌اند . مجموعه این سیستم ، نسبت به یونها و بسیاری از مولکولهای قطبی غیرقابل نفوذ می‌باشد .

پروتئین‌های اختصاصی سبب برقراری اعمال و وظایف اصلی غشاء نظیر تنفس سلولی ، بیوسنتز لیپیدهای جدار سلولی ، ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک و غیره می‌گردند . این پروتئین‌ها یا در داخل لایه لیپیدی قرار گرفته و یا شامل پروتئین‌های محیطی می‌باشند . روانی (Fluidity) و استحکام (Rigidity) غشاء بستگی به نوع اسیدهای چرب و آرایش مولکولی آنها دارد ، بطوریکه افزایش طول زنجیره هیدروکربنه ، کاهش نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع و وضعیت ترانس ، سبب استحکام این غشا ، و درجه حرارت و فشار سبب نرمی و سیالیت آن می‌گردند .

مطالعات انجام یافته نشان می‌دهند که اتانول نمی‌تواند به میزان قابل توجهی در غشاهای بیولوژیک حل گردد، بطوریکه فقط ۱۰ درصد از الکل موجود در محیط سلولی را می‌توان در غشا سیتوپلاسمیک پیدا نمود. امکان عبور اتانول از خلال غشاء کپک‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته و چنین به‌نظر می‌رسد که این الکل توانائی عبور از غشاء سیتوپلاسمی را دارا باشد.

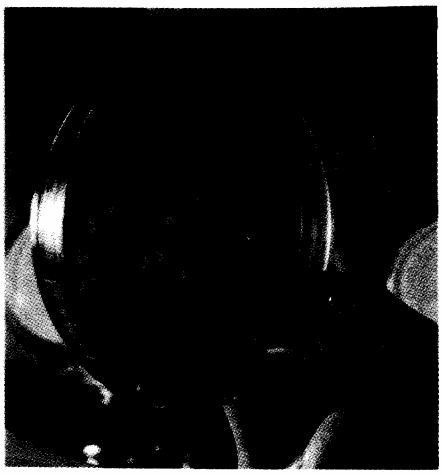
الکل اتیلیک می‌تواند با محتویات غشاء سیتوپلاسمی تداخل نماید و شکل (۱) مدل پیشنهاد شده در سال ۱۹۸۴ را در مورد تداخل فسفولیپیدهای غشاء نشان می‌دهد.



شکل ۱ــ واکنش الکل اتیلیک با فسفولیپیدهای غشاء سیتوپلاسمی

مطالعه شکل (۱) نشان می‌دهد که اتانول در محیط مائی سلولی تجمع یافته و به قسمت هیدروکربنه سطحی غشا نفوذ می‌کند. بدین ترتیب بعلت قطبی بودن عامل هیدروکسیل، این عامل به سمت

خارج غشاء متمایل شده و توسط پیوندهای هیدروژنی به عوامل استر و بقایای اسیدها متصل می‌گردد. پیوندهای هیدروژنی در مورد کربن شماره ۲ نیز امکان‌پذیر بوده و بالاخره زنجیر هیدروکربنه به سمت مرکزی



متمایل می‌گردد. تداخل الکل در ناحیه هیدروکربنه سبب بهم خوردن ساختمان لیپیدی گردیده و واکنش آن با محتویات غشا باعث کاهش نیروی تداخلی در مورد ساختمان غشاء شده و اختلالاتی را در آن ایجاد می‌نماید. چنین به‌نظر می‌رسد که الکل‌هائی که زنجیر کربنه کوتاه‌تری دارند بیشتر از بقیه سبب برهم زدن نظم غشاء سیتوپلاسمی می‌شوند.

اتانول سبب لیز پروتوپلاسم گردیده و این عمل در یک غلظت بحرانی معین، یعنی ۴/۰۲ مول و فشاری معادل ۳۴ دین بر سانتی‌متر مربع سطح غشاء بوقوع می‌پیوندد. در غلظت‌های پائین‌تر، تغییراتی در ترکیب اسیدهای چرب فسفولیپیدها و پروتئین‌های غشاء سیتوپلاسمی ایجاد شده و نسبت لیپید ـ پروتئین نیز دستخوش نوساناتی می‌گردد. بعنوان مثال، در مورد اشرشیاکلی درصد تام اسیدهای چرب اعم از اشباع و غیراشباع کاهش می‌یابد. این پدیده سبب افزایش نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیراشباع می‌گردد زیرا کاهش اسیدهای چرب اشباع در مجاورت اتانول چشم‌گیرتر می‌باشد. در مورد همین میکروارگانیسم‌ها، الکل اتیلیک سبب کاهش سنتز فسفولیپیدها و مهار سنتز فسفاتیدیل اتانول آمین نیز می‌گردد. علاوه‌بر این، اتانول سبب کاهش فسفولیپیدها در باسیلوس‌سوبتیلیس‌گردیده و از میزان سنتز فسفاتیدیل گلیسرول و لیزوفسفاتیدیل گلیسرول تا حدود ۵۰ درصد، و از مقدار فسفاتیدیل اتانول آمین در حدود ۱۷ درصد کاسته می‌شود.

یکی دیگر از تغییرات فیزیولوژیک میکروارگانیسم‌ها درنتیجه تماس با اتانول، تغییر نسبت لیپید ـ پروتئین بوده و همزمان با این امر از عملکرد بسیاری از آنزیم‌های غشا نیز جلوگیری می‌شود. این مکانیسم

○ تماس الکل اتیلیک با میکروارگانیسم‌ها سبب ایجاد اختلالاتی در قابلیت نفوذ غشأ گردیده و در نتیجه این مکانیسم، نوکلئوتیدها بیرون رانده شده و از فعالیت حیاتی گروه کثیری از میکروب‌ها و بخصوص اشریشیاکلی کاسته می‌گردد.

در مورد میکروارگانیسم‌هائی نظیر اشرشیاکلی و زیموموناس موبیلیس به‌ثبوت رسیده است. در مورد اشرشیا نسبت لیپید ـ پروتئین که در شرایط طبیعی برابر ۰/۵۱ میکرومول از

فسفولیپید در هر میلی‌گرم پروتئین می‌باشد، درنتیجه تماس با اتانول ۳/۲ درصد وزنی ـ حجمی به ۰/۲۲ کاهش می‌یابد. در غلظتهائی معادل ۳۰/۸ درصد، الکل

○ درمورد اتانول نیز نظیر سایر مواد آنتی‌سپتیک، مدت تماس نقش تعیین‌کننده‌ای داشته و یک عامل کلیدی محسوب می‌شود.

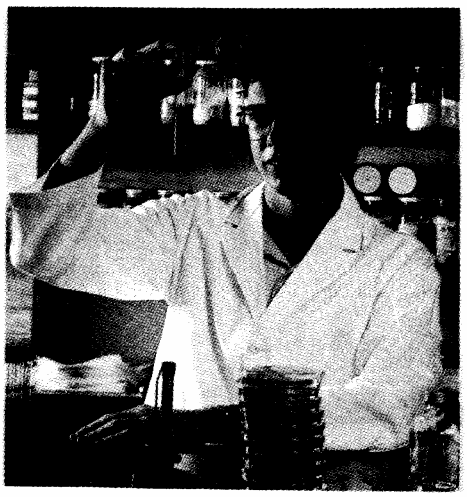
اتیلیک نمی‌تواند بطور محسوسی سبب مهار ATPase گردیده و روی NADH اکسیداز و یا D-lactate اکسیداز نیز تاثیری نمی‌نماید. اگر چنانچه غلظت الکل به ۷۸/۲ درصد برسد در حدود ۲۰ درصد از اعمال آنزیم‌های فوق مهار می‌گردد و بهر صورت ATPase نسبت به تاثیر اتانول مقاوم‌تر از بقیه انواع می‌باشد.

تماس الکل اتیلیک با میکروارگانیسم‌ها سبب ایجاد اختلالاتی در قابلیت نفوذ غشاء گردیده و درنتیجه این مکانیسم، نوکلئوتیدها بیرون رانده شده و از فعالیت حیاتی گروه کثیری از میکروب‌ها و بخصوص اشرشیا کاسته می‌گردد و اگر چنانچه به‌منظور ترمیم قابلیت نفوذ غشا، در محیط کشت اسید اولئیک و منیزیوم اضافه شود، بر فعالیت حیاتی این میکروارگانیسم افزوده می‌گردد. علاوه‌بر خروج نوکلئوتیدها، اتانول سبب افزایش روند خروج یونهای Na^+ و K^+ درمورد پسودوموناس‌آئروژینوزا می‌شود.

بالاخره، یکی دیگر از تغییرات مهم فیزیولوژیک باکتریها درنتیجه تاثیر اتانول تغییر ماهیت سیتوپلاسم و پلاسمولیز می‌باشد.

۲ـ۱ اتانول، آنابولیسم و کاتابولیسم:

علی‌رغم سمی بودن اتانول برای باکتریها، همین الکل توسط پاره‌ای از میکروارگانیسم‌ها بعنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار گرفته و توسط گروه دیگری از انواع میکروبها در جریان تخمیر تشکیل می‌شود، بطوریکه در مورد آسینتوباکتر کالکوآستیکوس در حدود ۰/۱ درصد وزنی ـ حجمی، و در مورد پسودوموناس در حدود ۱ درصد وزنی ـ حجمی از اتانول را می‌توان در محیط پیدا نمود.



۲ـ اثرات ضدباکتری اتانول:

درنتیجه اثرات سمی الکل اتیلیک، دینامیسم رشد باکتریها مختل‌شده و این اختلال به خاصیت ضدباکتری و تغییرات مورفولوژیک منتهی می‌شود.

۲ـ۱ تاثیر اتانول روی رشد و شرایط زندگی میکروارگانیسم‌ها:

مهمترین عواملی که در روند رشد میکروارگانیسم‌ها دخالت می‌نمایند شامل نوع سوش میکروبی، مدت تماس، غلظت اتانول و pH محیط می‌باشد.

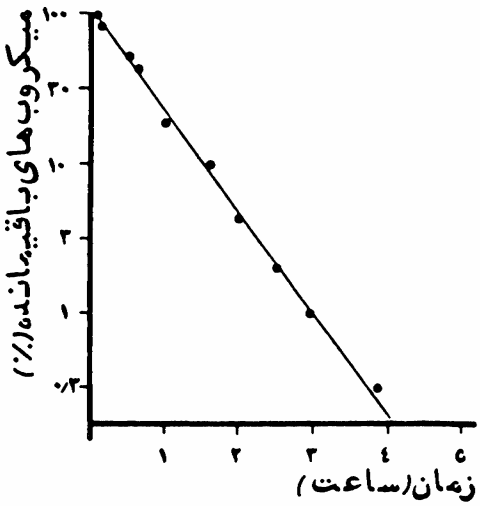
انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها مقاومت یکسانی نسبت به اتانول نشان نداده و از این میان، لاکتوباسیلوس هتروشیوشی و هوموشیوشی مقاوم‌تر از بقیه می‌باشند.

نظیر سایر مواد آنتی‌سپتیک، در مورد اتانول نیز مدت تماس نقش تعیین‌کننده‌ای داشته و یک عامل کلیدی محسوب می‌شود.

بطورکلی فعالیت ضدباکتری یک آنتی‌سپتیک رابطه مستقیم با زمان تماس دارد و بعنوان مثال در مورد استافیلوکوک طلائی بعد از یک ثانیه تماس با الکل اتیلیک ۶۰ درصد، در حدود ۱۱ درصد میکروارگانیسم‌ها به زندگی خود ادامه می‌دهند. درصورتیکه بعد از ۱۰ دقیقه تماس، این رقم از ۱/۲ درصد تجاوز نمی‌نماید. در مورد سایر میکروارگانیسم‌ها نیز این پدیده با شدت و ضعف نسبی صادق می‌باشد، بطوریکه در شرایط معین رابطه مستقیم خطی بین زمان تماس و از بین رفتن اشریشیاها مشاهده می‌گردد (شکل ۲).

○ تقریبا تمامی مؤلفین بر این باور هستند که اتانول بین ۶۰ تا ۸۰ درصد وزنی ـ حجمی، دارای خواص باکتریسید می‌باشد.

از نقطه نظر تاثیر درجه الکلی روی خواص باکتریسید اتانول باتوجه به عوامل متعددی نظیر مدت تماس، نوع سوش میکروبی و غیره، نتایج بدست آمده تطابق کاملی با همدیگر ندارند. مطالعات انجام یافته روی ۲۴ نوع از میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند که در غلظت‌های پائین‌تر از ۱/۶ درصد وزنی ـ حجمی، اثرات سمی اتانول روی میکروارگانیسم‌ها تقریبا صرفنظر کردنی



شکل ۲ـ اثرات باکتریسید اتانول ۷/۴ درصد نسبت به اشریشیاکلی

بوده و انواع مختلفی نظیر پسودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک طلائی، پروتئوس و آنتروباکترها می‌توانند این غلظت‌ها را بخوبی تحمل نمایند. مطالعات بعدی نشان می‌دهند که اشریشیاکلی وزیموموناس‌میبلیس غلظت‌هائی از اتانول تا حوالی ۱۵ درصد را تحمل نموده و در مورد لاکتوباسیلوس هتروشیوشی این غلظت به ۲۰ درصد نیز می‌رسد. در مورد الکل ۶۲/۴ درصد وزنی ـ حجمی، سیتروباکتر، پسودوموناس و استافیلوکوک طلائی مقاومت بیشتری را از خود نشان داده و پروتئوس کلبسیلا پنومونی و سالمونلا از مقاومت کمتری برخوردار می‌باشند. حتی در پاره‌ای موارد آلودگی

الکل ۸۵ درصد به باسیلوس سوبتیلیس گزارش گردیده است.

همانطوریکه اشاره گردید در بررسی تاثیر غلظت اتانول، عوامل گوناگونی نظیر مدت

○ اتانول سبب تغییرات محسوسی در شکل میکروارگانیسمها میگردد.

تماس، انواع میکروارگانیسم، روش مورد استفاده و غیره را بایستی درنظر گرفت. روش‌های ارزیابی یا در شرایط in Vitro و یا in Vivo، نظیر مطالعه اثرات اتانول روی فلور میکروبی پوست انجام می‌گیرند. بعنوان مثال نتایج بدست آمده در مورد استافیلوکوک طلائی بعد از تماس الکل به‌مدت ۵ دقیقه نشان می‌دهد که:

الف ــ بین غلظت صفر تا ۲۴/۷ درصد وزنی ــ حجمی، اتانول فاقد اثرات باکتریسید می‌باشد.

ب ــ بین ۲۴/۷ الی ۶۰ درصد، نظریات متفاوتی ابراز شده است بطوریکه بنا به عقیده برخی از مولفین، اتانول فاقد اثرات باکتریسید بوده ولی بنا به‌نظر گروهی دیگر باکتریسید می‌باشد.

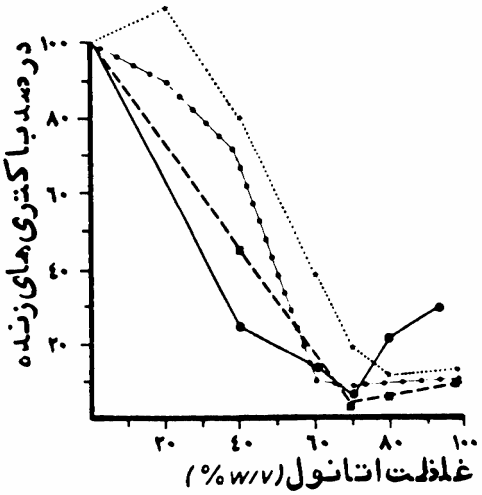
پ ــ بین ۶۰ تا ۸۰ درصد وزنی ــ حجمی، تقریبا تمامی مولفین بر این باور هستند که اتانول دارای خواص باکتریسید می‌باشد.

ت ــ در غلظت‌هائی بین ۸۰ تا ۹۲ درصد، مطابق نظریات پاره‌ای از مولفین، اتانول باکتریسید نبوده ولی برخی دیگر، اثرات باکتریسید برای آن قائل هستند.

ث ــ در غلظت‌های بالاتر از ۹۲ درصد، غالب مولفین اتانول را فاقد خواص باکتریسید قلمداد می‌نمایند.

برمبنای همین نتایج است که مناسب‌ترین درجه الکلی برای بروز خواص باکتریسید و آنتی سپتیک ۷۰ درجه (در حدود ۶۲/۴ درصد وزنی ــ حجمی) درنظر گرفته می‌شود.

در شرایط in Vivo میزان تاثیر اتانول، بستگی به نوع میکروارگانیسم داشته و باتوجه به نوسانات بین فردی در فلور پوست افراد، یک نتیجه‌گیری جامع بسیار مشکل می‌نماید. شکل ۳ تاثیر غلظت اتانول روی کاهش فلور میکروبی پوست در افراد داوطلب و سالم را نشان می‌دهد.



شکل ۳ــ کاهش فلور میکروبی دست‌ها و بازوها درنتیجه شستشو با محلول‌های اتانول بمدت ۲ دقیقه در چهار فرد داوطلب و سالم.

در مورد تاثیر pH محیط روی خواص باکتریسید اتانول، نتایج در خور توجهی ارائه شده‌اند. بعنوان مثال در pH = ۷، استافیلوکوک طلائی را حتی بعد از ۷۲ ساعت تماس با اتانول ۲۴/۷ درصد وزنی ــ حجمی می‌توان در محیط پیدا نمود،

درصورتیکه این امر در pH= ۵/۵ و یا ۸/۵ =pH صدق نمی‌کند. همین مطالعات نشان می‌دهند که در مورد باسیلوس سوبتیلیس، اثرات باکتریسید اتانول ۸۵/۷ در pH = ۷ ، بیشتر از اتانول ۵۲/۲ درصد در محیط قلیائی نمی‌باشد. برعکس در مورد استافیلوکوک طلائی، اتانول ۵۲/۲ درصد صرفنظر از pH محیط و با مدت تماسی در حدود ۱۲ دقیقه دارای خواص باکتریسید بوده و در این حالت نیز مدت تماس اهمیت بیشتری نسبت به غلظت الکل دارد.

۲-۲ تغییرات مورفولوژیک باکتریها :

در مورد بسیاری از باکتریها و بخصوص اشریشیاکلی غلظت‌های پائین‌تر از غلظت کشنده اتانول سبب کاهش رشد میکروبها و وقفه تکثیر سلولی گردیده و مطالعات میکروسکپی حاکی از این امر هستند که میکروارگانیسم‌ها، ازنظر شکل ظاهری آماده برای تقسیم سلولی بوده ولی این تقسیم تحقق نیافته است: بعبارت دیگر، اتانول سبب تغییرات محسوسی در شکل ظاهری میکروارگانیسم‌ها می‌گردد.

۳- نتیجه:

الکل اتیلیک با مکانیسم‌های پیچیده‌ای روی دیواره سلولی، غشاء سیتوپلاسمی و مواد متشکله سیتوپلاسم سبب بروز اثرات سمی نسبت به میکروارگانیسم‌ها گردیده و این اثرات تا خواص باکتریسید نیز ادامه می‌یابند. اثرات باکتریسید اتانول بستگی به مدت تماس، نوع میکروارگانیسم، غلظت اتانول و شرایط محیط نظیر pH دارد. درحال‌حاضر، مطالعه منابع نمی‌تواند به برتری اتانول ۷۰ درجه نسبت به ۹۰ درجه دلالت نماید زیرا:

۱- در بررسی‌های in Vitro گروه معدودی از میکروارگانیسم‌ها مورد مطالعه قرار گرفته و روش مطالعه نیز در تمامی موارد یکسان نمی‌باشد.

۲- عامل تعیین کننده در اثرات ضدباکتری اتانول مربوط به‌مدت تماس بوده و نقش غلظت در درجه دوم اهمیت قرار دارد.

نتایج بدست آمده در شرایط in Vitro الزاما در شرایط in Vivo نیز صادق نبوده و بنابراین شرایط مناسب مصرف اتانول، بایستی در هر موردی بطور دقیق روشن گردد.

مآخذ:

1. BEVERIDGE T.J. and DAVIES J.A., Cellular responses of Bacillus subtilis and Escherichia coli to the Gram stain, J.Bacteriol., 156, 846-858, 1983.
2. BLECH M.F., PAQUIN J.L. et HARTMAN P., Etude de l'efficacite de savons non antiseptiques et de l'ethanol pour le lavage des mains, Med. Mal. Inf., 14,54-59, 1984.
3. CASEY G.P. and INGLEDEW W.M., Ethanol tolerance in yeasts, Crit. Rev. Microbiol., 13219-280, 1986.
4. KOSHIRO A. and OIE S., Bactericidal activity of ethanol against non-fermentative Gram-negative bacilli, Microbios, 40,33-40, 1984.
5. LEPAUX D.J., Action de l'ethanol sur les bacteries, J.Pharm. Clin., 8,124-133, 1989.
6. LEPAUX D.J. et BLECH M.F., Etude de la survie de Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus dans l'ethanol en fonction du titre alcoolique et du pH, Med. Mal. Inf., 1,9-16, 1988.