

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی بنومیل بر چهار جدایه قارچی در کاغذهای تاریخی

جوهر چعباوی زاده^۱، حسین احمدی^۲، محسن محمدی آچاچلویی^۳ و مهشید شیردوانی^{۴*}

۱- استادیار، عضو هیئت علمی گروه قارچ و انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

۲- دانشیار، عضو هیئت علمی دانشکده مرمت، دانشگاه هنر اصفهان، ایران

۳- استادیار، عضو هیئت علمی دانشکده مرمت، دانشگاه هنر اصفهان، ایران

۴- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترای حفاظت و مرمت اشیاء تاریخی و فرهنگی، دانشگاه هنر اصفهان، ایران

پست الکترونیک: mahshid_shirdavani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۵

چکیده

بخش قابل توجهی از تاریخ و فرهنگ بشر به صورت اسناد و آثار هنری کاغذی ثبت شده است. این مسئله لزوم حفاظت از این آثار را ایجاب می‌کند. تخریب بیولوژیک ناشی از فعالیت قارچ‌ها، از مهمترین عوامل تخریب مواد آلی به‌ویژه آثار کاغذی به‌شمار می‌رود. هدف از این بررسی، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بنومیل برای قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، پنسیلیوم و کلادوسپوریوم جداسازی شده از صفحه‌های کاغذی نسخه‌ها و کتاب‌های خطی آلوده به قارچ است. در این بین جدایه‌های مورد بررسی از نظر حساسیت به بنومیل نیز با یکدیگر مقایسه شده‌اند. شناسایی جنس قارچ‌ها با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی و نیز ویژگی‌های میکروسکوپی به روش slide culture با میکروسکوپ نوری انجام شد. به‌منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی تیمار الکلی بنومیل برای رشد هر یک از جدایه‌ها بر کاغذ، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. طرح آزمایش مورد استفاده برای سنجش مقاومت قارچی کاغذهای تیمار شده بر اساس استاندارد ASTM D 2020-92 انجام گردید. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که همه قارچ‌های مورد آزمون به بنومیل حساس بوده و تیمار الکلی بنومیل مانع رشد جدایه‌های مورد آزمون بر کاغذ شده است. جنس پنسیلیوم کمترین MIC را برابر با ۱۲/۵ppm و جنس آسپرژیلوس بیشترین MIC را برابر با ۱۰۰ppm داشتند. میزان MIC به‌دست‌آمده برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم ۵۰ppm بود. بررسی تفاوت قطر کلنی بین نمونه‌های شاهد، کنترل و تیمار شده نشان داد، در همه جدایه‌ها با افزایش غلظت بنومیل از قطر کلنی در کاغذهای تیمار شده نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاسته شده و درصد بازدارندگی افزایش یافته است. ۱۰۰٪ بازدارندگی و عدم رشد برای پنسیلیوم در کاغذهای تیمار شده با غلظت $\leq 12/5$ ppm، برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم در کاغذهای تیمار شده با غلظت ≤ 50 ppm و برای گونه آسپرژیلوس نایجر در کاغذهای تیمار شده با غلظت ≤ 100 ppm مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ضدقارچ، بنومیل، کاغذ تاریخی و حداقل غلظت بازدارندگی.

مقدمه

آثار کاغذی به عنوان بخش قابل ملاحظه‌ای از میراث فرهنگی و تاریخی بشر، دربرگیرنده ارزش‌های فرهنگی، تاریخی، اسنادی، علمی و هنری هستند. این آثار به دلیل ماهیت و مواد تشکیل‌دهنده آنها (مواد آلی از جمله سلولز کاغذ، پروتئین و نشاسته موجود در بست یا آهار) منبع غذایی مناسبی برای بسیاری از عوامل بیولوژیک محسوب می‌شوند. آسیب‌هایی که در اثر حمله عوامل بیولوژیک در کاغذ ایجاد می‌شود را می‌توان از دسته مهمترین علت‌های تخریب در اسناد و آثار کاغذی به‌شمار آورد. از بین مهمترین عوامل بیولوژیک، قارچ‌ها به دلیل تنوع بسیار زیاد و قدرت تطابق بالا برای زیستن در شرایط مختلف عمده‌ترین و قابل مطالعه‌ترین این عوامل هستند (Ghahri, 2006). تخریب ناشی از آنزیم‌ها و اسیدهای آلی ترشح شده توسط قارچ باعث آسیب شدید و درنهایت، تخریب کامل کاغذ می‌شود (Florian, 2004). پژوهش‌های انجام شده بر قارچ‌های موجود در کتابخانه‌ها و آرشیوهای آثار کاغذی و منابع موجود نشان می‌دهد که تاکنون بیش از ۲۰۰ گونه قارچی عامل تخریب آثار کاغذی شناسایی شده، که بیشتر آنها متعلق به جنس‌های آسپرژیلوس، پنیسیلیوم، کلادوسپوریوم، تریکودرما، کتومیوم، آلترناریا و فوزاریوم است (Cavena et al., 2008; Florian, 2004; Gallo, 2010; Ghahri, 2006; mohammadi achachlouei & kouchakzaei, 2013; Mitchell & McNamara, 2010; Leah Nardi, 2000; Neves et al., 2009; Sequeira et al., 2012).

قارچ‌ها علاوه بر ایجاد آسیب‌ها و تغییرات گوناگون ساختاری و بصری در کاغذ، مشکلات متعددی را برای سلامتی افراد در تماس با این آثار، به وجود می‌آورند. تخریب بیولوژیک قارچ‌ها نه تنها به دلیل آسیب ایجاد شده، بلکه به دلیل فقدان گزینه‌های در دسترس و بی‌خطر در پیشگیری و درمان این آسیب‌ها می‌باشد که مشکل عمده‌ای در حفاظت آثار کاغذی به‌شمار می‌رود. از روش‌های شناخته شده برای جلوگیری از پیدایش و توسعه مشکل

قارچ در اسناد و مجموعه‌ها، می‌توان به کنترل دما و رطوبت نسبی محیط به همراه تهویه مناسب هوا اشاره کرد. با این حال امکان دسترسی به امکانات مناسب برای ایجاد دما، رطوبت و تهویه مناسب برای همه موزه‌ها و مجموعه‌های نگهداری از آثار و اسناد کاغذی فراهم نیست. همچنین بروز شرایط پیش‌بینی نشده تغییرات دمایی و رطوبتی و یا مواردی مانند ورود اشیا آلوده به قارچ به مجموعه، لزوم به‌کارگیری روش‌های درمانی برای آثار را ایجاب می‌کند.

به منظور پیشگیری یا متوقف کردن تخریب بیولوژیکی ایجاد شده توسط قارچ‌ها در حفاظت آثار کاغذی، طیف وسیعی از روش‌های مبارزه با قارچ از سایر علوم اقتباس و تعدیل شده است. این روش‌ها کنترل شرایط محیط، استفاده از مواد شیمیایی و روش‌های فیزیکی را شامل می‌شوند. مواد شیمیایی به‌کاررفته در حفاظت آثار کاغذی، در بیشتر موارد از بین قارچ‌کش‌های رایج در کشاورزی، پزشکی و داروسازی انتخاب شده‌اند (Florian et al., 2004).

"متیل ۱- بوتیل آمین بنزیمیدازول-۲- ایل کاربامات" یکی از قارچ‌کش‌های رایج در کشاورزی است. این سم با نام تجاری بنومیل شناخته شده است. طیف فعالیت این ماده وسیع بوده و هم‌زمان به صورت معالجه‌ای و حفاظتی نیز عمل می‌کند. بنومیل، قارچ‌کشی با فعالیت انتخابی، از گروه بنزیمیدازول‌هاست که در تماس با رطوبت به آرامی تجزیه شده و در برخی از حلال‌ها به "کاربندازیم" و بوتیل ایزوسیانات تبدیل می‌شود. در خاک و در شرایط مرطوب انبار نیز به تدریج تجزیه می‌شود، ولی در مقابل تابش نور خورشید مقاومت نشان می‌دهد. بنومیل در حلال‌های آلی ابتدا به متیل ۲- بنزیمیدازول کاربامات و درنهایت به بوتیل آمین تبدیل می‌شود (Magnucka et al., 2007). متیل بنزیمیدازول کاربامات (MBC) در تقسیم سلولی دخالت می‌کند. بنزیمیدازول‌ها تقسیم میتوز را در مرحله متافاز قطع کرده و منجر به مرگ سلول قارچی می‌شوند (Pedregosa et al., 1995).

تیمارها از نظر گروه‌بندی آزمون دانکن با شاهد آلوده در یک گروه قرار گرفتند (Jamali et al., 2006).

Sahab و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر قارچ‌کش بنومیل را بر آنزیم سلولاز و β گلوکزیداز قارچ فوساریوم آگریسپوریوم جداسازی شده از اسناد تاریخی بررسی کردند. نتایج نشان‌دهنده تأثیر بازدارندگی بنومیل بود. همچنین به‌کارگیری این ماده بر نمونه‌های کاغذ پایروس و کاغذ کتان تأثیر مثبتی بر مقاومت این نمونه‌ها در برابر تخریب بیولوژیک ناشی از قارچ فوساریوم داشته است (Sahab et al., 2007). Elnaggar و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر بنومیل و چند قارچ‌کش دیگر را بر نمونه قارچ‌های پنی‌سیلیوم کوریلوفیلیوم^۵، اسپرژیلوس نایجر^۶ و هورموندروم ویرید^۷ جداسازی شده از یک مومیای مورد بررسی قرار دادند. غلظت‌های مختلف بنومیل مانع رشد جدایه‌ها شدند. Sahab و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی بر کاغذهای بانکی آلوده به قارچ، تأثیر قارچ‌کشی بنومیل، روغن رزماری و تیمول را بر سه گونه قارچ جداسازی شده از این اسناد بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که آلترناریا تنوس^۸ در غلظت (Parts per million) ۱۲/۵ ppm بنومیل، پنیسیلیوم و تریکودرما ویرید^۹ در غلظت ۶/۲۵ ppm بنومیل رشد نداشتند.

هدف از این پژوهش ارزیابی اثر بنومیل بر چهار قارچ رایج در آثار کاغذی است. به این منظور تأثیر ضدقارچی تیمار الکلی بنومیل بر چهار جدایه قارچی اسپرژیلوس نایجر، اسپرژیلوس ترئوس، پنیسیلیوم و کلادوسپوریوم، جداسازی شده از کاغذهای تاریخی و نسخ خطی بررسی و حداقل غلظت بازدارندگی بنومیل برای هر یک از جدایه‌ها بر کاغذ تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، پایین‌ترین غلظت ماده ضد میکروبی مورد آزمون است که مانع رشد جدایه قارچی مورد مطالعه شود. حداقل غلظت بازدارندگی یکی از ملاک‌های مهم تشخیص مقاومت یک میکروارگانیسم نسبت به عوامل ضد میکروبی است. MIC یکی از رایج‌ترین مقیاس‌ها در سنجش کارایی یک ماده ضد میکروبی برای میکروارگانیسم‌هاست (Andrews, 2001).

با توجه به اینکه بنومیل از دسته قارچ‌کش‌های رایج در کشاورزی است، بیشتر مطالعات و پژوهش‌های انجام شده بر روی این ماده به بررسی تأثیر آن بر قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان، که در مواردی از قارچ‌های رایج در آثار کاغذی نیز هستند، اختصاص یافته است. در حوزه حفاظت و مرمت آثار نیز تحقیقاتی در زمینه تأثیر این ماده بر قارچ‌های جداسازی شده از آثار تاریخی انجام شده است. از مطالعات انجام شده در این رابطه، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

Shakeri و همکاران (۲۰۰۷) به منظور بررسی و تعیین روش‌های کنترل پوسیدگی میوه انار در انبار، تأثیر شش نوع ماده مختلف ضد عفونی شامل بنومیل ۱/۵ در هزار، محلول کلسیم کلرید ۵٪، سدیم هیپوکلریت به نسبت ۱۰٪، اکسی کلرور مس ۱٪، تیابندازول ۱/۵ در هزار و واکس را بر روی گونه‌های اسپرژیلوس و پنیسیلیوم بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که بنومیل در درجه دوم پس از سدیم هیپوکلریت بیشترین میزان کارایی را در کنترل آلودگی و کاهش پوسیدگی‌های انباری انار داشته است. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر دو قارچ‌کش بنومیل و کاربندازیم در کنترل کپک سبز تریکودرمایی در سالن‌های پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که هر دو قارچ‌کش قابلیت مطلوبی در مهار آلودگی قارچی دارند. همچنین مشخص شد که میزان افزایش عملکرد به هنگام کاربرد قارچ‌کش کاربندازیم در مقایسه با بنومیل اندکی بیشتر است (Shakeri et al., 2007). Jamali و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر جدایه‌هایی از باکتری‌های آنتاگونیست باسیلوس سلبتیلیس^۳ و سودوموناس فلورسنس^۴ و قارچ‌کش بنومیل بر بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی را با عامل فوساریوم آگریسپوریوم مورد مطالعه قرار دادند. در بررسی مربوط به اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر بیماری پژمردگی نخود ایرانی با عامل فوساریوم آگریسپوریوم ملاحظه شد که بیشتر جدایه‌ها موجب کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی شدند ولی تنها جدایه B-120 و قارچ‌کش بنومیل توانستند بر اساس مقایسه میانگین‌ها نسبت به شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری نشان دهند و سایر

انتخاب نمونه‌های قارچ

نمونه‌های قارچ استفاده شده در این پژوهش از صفحه‌های کاغذی نسخه‌ها و اسناد کاغذی آلوده به قارچ متعلق به سه مجموعه خصوصی در شهر اصفهان جداسازی شده‌اند. پس از بررسی اسناد از کاغذهای آلوده نمونه‌برداری گردید؛ به این ترتیب که لایه نازکی از کاغذ در محل آلوده به وسیله تیغ و پنس استریل جداسازی شده، در ظرف نمونه‌گیری استریل قرار گرفت و بعد در شرایط کاملاً استریل در آزمایشگاه به محیط کشت ساپرو دکستروز آگار انتقال یافت. پس از ۲۴-۴۸ ساعت نمونه‌ها از نظر تولید کلنی قارچی بررسی شدند و به مدت دو هفته در انکوباتور در دمای 27 ± 3 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ قرار گرفته و هر روز از نظر ایجاد هرگونه تغییر بررسی گردیدند. شناسایی قارچ‌ها با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی از جمله شکل، رنگ و قوام کلنی و نیز بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی به روش تهیه یک لام مستقیم با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو و در نهایت روش *slide culture* با میکروسکوپ نوری عبوری (CTS.Lot No: 29003) انجام شد. به منظور خالص‌سازی نمونه‌های جداسازی و شناسایی شده، هریک از کلنی‌ها بر روی محیط (Potato PDA *dextrose agar*) کشت دوباره داده شدند. برای آلوده کردن کاغذها از این نمونه‌ها سوسپانسیون اسپور با غلظت (*colony-forming unit*) 5×10^5 cfu/ml تهیه شد.

روش ارزیابی مقاومت کاغذهای تیمار شده نسبت به قارچ و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی در این پژوهش به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی تیمار الکلی بنومیل برای هریک از جدایه‌ها، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. طرح آزمایش مورد استفاده برای سنجش مقاومت قارچی کاغذهای تیمار شده بر اساس استاندارد ASTM D 2020-92 (2003) انجام گردید. این آزمون مقاومت کاغذ و مقوا، به ویژه نمونه‌هایی

تأثیر ضدقارچی بنومیل بر جدایه‌های قارچی مورد مطالعه بر کاغذ فیلتر سنجیده شد. به منظور مشابه‌سازی شرایط نمونه‌های کاغذ مورد مطالعه به کاغذهای تاریخی، نمونه‌ها تحت پیرسازی تسریعی قرار گرفتند. سپس کاغذهای پیرسازی شده در آزمون‌های ارزیابی مقاومت قارچی کاغذ و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمون‌ها، از کاغذ فیلتر watman #42 به دلیل درصد بالای سلولز استفاده شد. همچنین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی این کاغذ شناخته شده بوده (جدول ۱) و استفاده از آن در پژوهش‌های مشابه بر روی سایر مواد متداول است (Sequeira et al., 2012). در این پژوهش از بنومیل ۹۵٪ محصول شرکت Shenzhe agroland chemicals و اتانول ۹۶٪ به عنوان حلال استفاده گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های کاغذ watman #42

وزن مخصوص	۱۰۰ g/m ²
مقاومت کششی خیس	۲۵۰ kPa
ضخامت	۰/۱۸ mm
میزان خاکستر	٪ ۰/۰۱

پیرسازی کاغذها

به منظور نزدیک کردن شرایط نمونه‌ها به کاغذهای تاریخی، نمونه‌های کاغذ پیش از تیمار با قارچ‌کش، پیرسازی شدند. پیرسازی تسریعی تحت تأثیر دما و رطوبت بر اساس استاندارد TAPPI T544 sp-03 در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰٪، به مدت ۴۰۰ ساعت بر روی کاغذها انجام گردید. پیرسازی نمونه‌ها در آون Memmert با بیشینه دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

سانتی‌متر حاوی محیط PDA، سه قطعه کاغذ با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر قرار داده و هر کاغذ با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ آلوده شد. نمونه‌ها در دمای ۲۷±۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ قرار داده شد. تمام پلیت‌ها در فواصل زمانی ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفتند و قطر کلنی قارچ در هر پلیت به وسیله کولیس اندازه‌گیری و ثبت شد. در این آزمون یک گروه از کاغذهای تیمار نشده، نمونه‌های تیمار شده با اتانول و کاغذهای تیمار شده با غلظت مشخص بنومیل نیز با هیچ قارچی آلوده نشد و به‌عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

طبق توصیه استاندارد (ASTM D 2020-92 (2003) درصد بازدارندگی (مهاریت) بر اساس قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری شده بر طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{D_c - D_t}{D_c} \quad (\text{رابطه ۱})$$

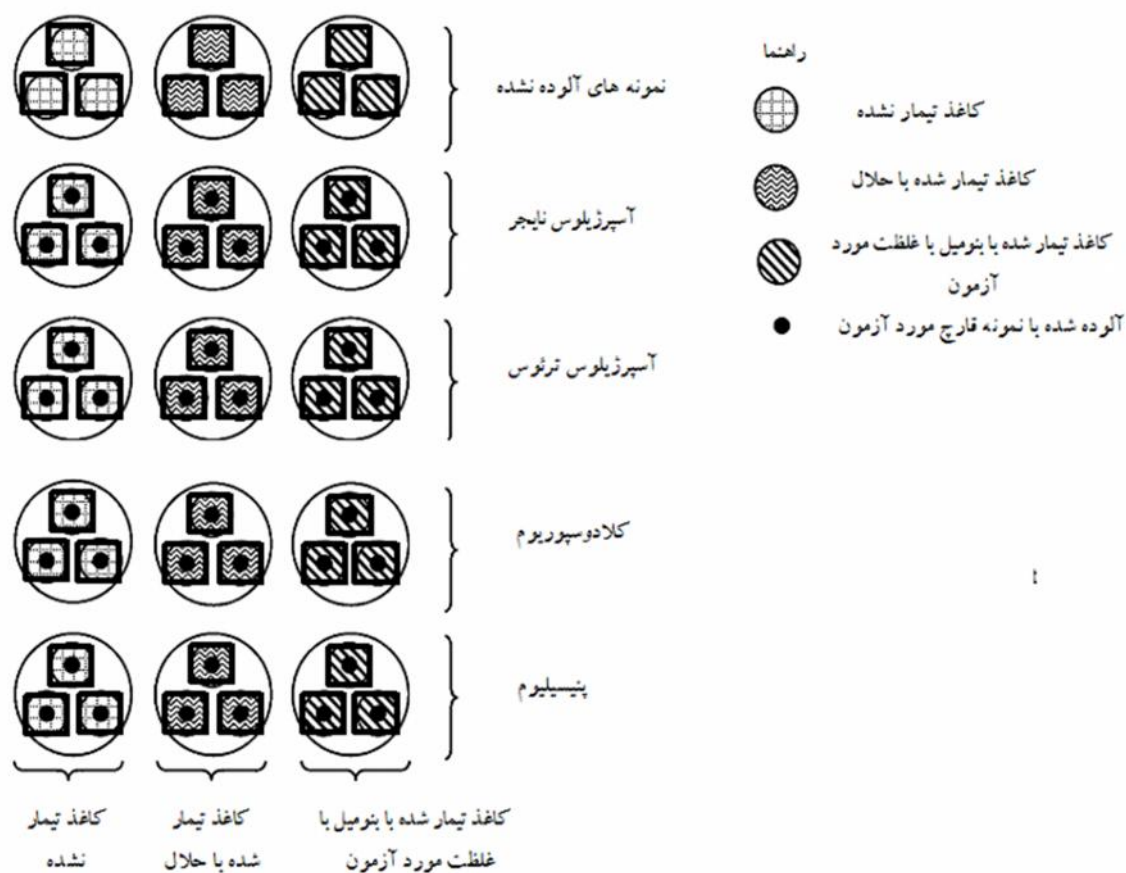
D_c : میانگین قطر کلنی قارچ در نمونه کنترل برحسب سانتی-متر
 D_t : میانگین قطر کلنی در نمونه تیمار شده برحسب سانتی-متر

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارائه نتایج از نمودار، آمار توصیفی و آمار استنباطی استفاده شده است. برای تحلیل نتایج داده‌های مربوط به بررسی کارایی بنومیل برای مهار آلودگی قارچی در نمونه‌های کاغذ پیرسازی شده، مدل‌های خطی تک متغیره (*GLM. Univariate*) و تحلیل واریانس تک متغیره به کار گرفته شده است. کلیه آزمون‌ها در سطح معناداری ۰/۰۵٪ انجام شد. برای ترسیم نمودارها و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SPSS 15, Excel 2010 استفاده شده است.

را که تحت تیمارهای ضدقارچ قرار گرفته‌اند، در برابر رشد قارچ مشخص می‌کند. ابتدا کشت خالص از هریک از قارچ‌ها بر روی محیط کشت PDA در دمای ۲۷±۳ درجه سانتی‌گراد آماده شد. سپس برای تهیه سوسپانسیون اسپور، از کلنی خالص، کشت‌های تازه (۲۴-۴۸ ساعته) در لوله‌های استریل حاوی محیط کشت PDA تهیه شد. سپس به جدایه‌های رشد کرده در محیط PDA ۵۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل و یک قطره توئین ۲۰ اضافه شد. لوله‌ها را تکان داده تا اسپورها از سطح کلنی جدا شوند. سپس سوسپانسیون موجود در هر لوله به لوله‌های فالكون ۵۰ ml منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. بخش بالایی به‌عنوان سوسپانسیون اسپور برای آلوده کردن کاغذها مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه غلظت مورد نظر از استاندارد نیم مک فارلند که برابر با 5×10^5 cfu/ml بود، استفاده شد. پس از آماده‌سازی استاندارد، سوسپانسیون هریک از جدایه‌ها با نیم استاندارد مک فارلند مطابقت داده شد و میزان جذب نوری برای هر نمونه در طول موج ۶۲۵ nm با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید تا از در محدوده بودن غلظت هریک، اطمینان حاصل شود.

نمونه‌ها در سه گروه کاغذهای تیمار نشده (شاهد)، کاغذهای تیمار شده با حلال اتانول و کاغذهای تیمار شده با غلظت مشخص از بنومیل تهیه گردید (شکل ۱). محلول بنومیل در اتانول در شش غلظت ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ppm آماده شد. کاغذها در ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر برش زده شد. ابتدا کاغذها استریل شده و بعد هریک با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بنومیل در اتانول با غلظت مشخص به روش قلم‌زنی تیمار شدند. در نمونه‌های تیمار شده با حلال نیز هریک از کاغذها به ۱۰۰ میکرولیتر اتانول آغشته شد. پس از خشک شدن، کاغذها روی پلیت‌های حاوی محیط PDA قرار داده شدند. تمام آزمون‌ها در گروه‌های مختلف بر اساس سه بار تکرار انجام شد، به این صورت که در هر پلیت استریل به قطر ۹



شکل ۱- طرح ترسیمی گروه‌های مورد بررسی در هر آزمون (مأخذ: نگارنده)

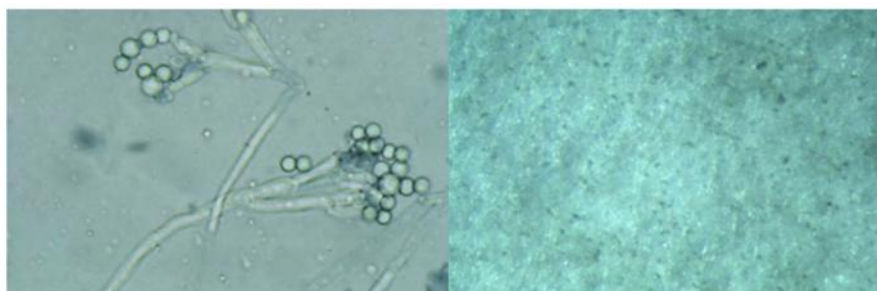
(Cavena *et al.*, 2008; Florian, 2004; Gallo, هستند 2010; Ghahri, 2006; mohammadi achachlouei & kouchakzaei, 2013; Mitchell & McNamara, 2010; Leah Nardi, 1994; Neves *et al.*, 2009; Sequeira *et al.*, 2012) حداقل غلظت بازدارندگی بنومیل برای هر یک از این چهار قارچ تعیین شد.

شناسایی قارچ‌های جداسازی شده از مجموعه‌های آلوده پس از بررسی قارچ‌های جداسازی شده از صفحه‌های کاغذی نسخه‌ها و کتاب‌های آلوده، در بین جدایه‌های بررسی شده، گونه‌های قارچی آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و جنس‌های پنیسیلیوم و کلادوسپوریوم، براساس مشخصات و ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی شناسایی شدند (شکل‌های ۲-۵). گونه‌ها و جنس‌های شناسایی شده، همگی از قارچ‌های شناخته‌شده به‌عنوان عامل تخریب در آثار کاغذی

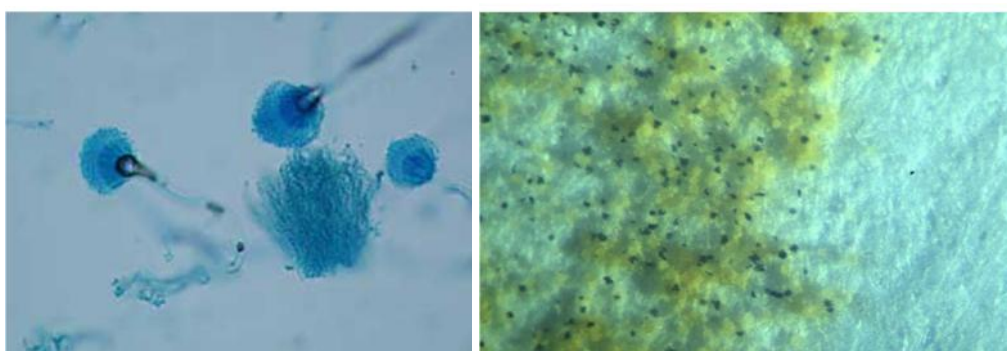


شکل ۲- تصویر میکروسکوپی قارچ کلادوسپوریوم شناسایی شده

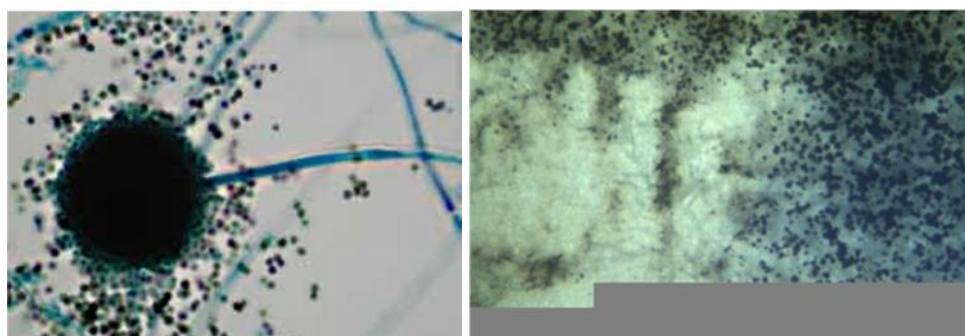
کلنی سبز زیتونی مایل به خاکستری و میسلیم ضخیم، دارای انشعاب و تیغه عرضی است (بزرگنمایی 400x).



شکل ۳- تصویر میکروسکوپی قارچ پنسیلیوم شناسایی شده کلنی قارچ به رنگ سبز تیره و سطح مخملی. میسلیم همراه با دیواره عرضی (بزرگنمایی 400x)



شکل ۴- تصویر میکروسکوپی اسپرژیلوس ترئوس شناسایی شده کلنی کرکی ابتدا سفید بوده و بعد به رنگ خردلی یا قهوه‌ای درمی‌آید. دارای میسلیم همراه با دیواره و کونیدیوفوراست، که کونیدیوفور در انتها به یک وزیکول تقریباً کشیده و گرد ختم می‌شود (بزرگنمایی 400x).



شکل ۵- تصویر میکروسکوپی اسپرژیلوس نیجر شناسایی شده کلنی سیاه رنگ به صورت دانه‌های سیاه رنگ و حالت پودری، وزیکول دایره‌ای، میسلیم شفاف و کونیدیا به شکل کروی با لبه‌های کنگره‌ای شکل و اسپورها تیره رنگ دیده می‌شوند (بزرگنمایی 400x).

غلظت‌های مختلف بنومیل برای هر یک از جدایه‌های قارچی (جدول ۲) نشان داد که تیمار با غلظت‌های مختلفی از بنومیل باعث کاهش معنی‌دار قطر کلونی‌های مختلف قارچی شد. تیمار بنومیل در اتانول در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ سبب کاهش معنادار قطر کلنی قارچ

نتایج آزمون‌های آماری تفاوت قطر کلنی بین کاغذهای شاهد و تیمار

نتایج آزمون‌های تحلیل واریانس تک متغیره انجام شده در سطح معناداری ۰/۰۵٪ به منظور بررسی معناداری تفاوت قطر رشد کلنی بین نمونه‌های شاهد و کاغذهای تیمار شده با

کاغذهای تیمار شده با غلظت ۳/۱۲۵ ppm بنومیل در اتانول اختلاف معنادار مشاهده نشد. درحالی که در قطر کلنی پنسیلیوم بر کاغذهای تیمار شده با این غلظت نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش معنادار مشاهده شد.

آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، کلادوسپوریوم و پنسیلیوم در کاغذهای تیمار شده نسبت به نمونه‌های شاهد شده است. البته بین قطر کلنی قارچ آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم در نمونه‌های شاهد و

جدول ۲- نتایج آزمون‌های آماری تفاوت قطر کلنی قارچ در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های

مختلف تیمار بنومیل در اتانول پس از ۲۱ روز

خطای استاندارد	۱۰۰ ppm	۵۰ ppm	۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۶/۲۵ ppm	۳/۱۲۵ ppm	میانگین	
۰/۰۶۱۶۷	۲/۶۰۶۷	۱/۱۴۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۷۰۳۳	۰/۳۵۳۳	۰/۱۰۳۳	اختلاف‌های دو گروه	آسپرژیلوس نایجر
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۷۰۲	مقدار معناداری	
۰/۰۹۶۷۷	۲/۰۳۰۰	۲/۰۳۰۰	۱/۳۵۳۳	۰/۵۶۷۶	۰/۰۵۶۷	۰/۱۹۳۳	اختلاف‌های دو گروه	آسپرژیلوس ترئوس
۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۶	۰/۵۱۲	مقدار معناداری	
۰/۱۶۹۵۹	۲/۴۶۰۰	۲/۴۶۰۰	۱/۸۶۰۰	۱/۲۳۶۷	۰/۴۴۶۷	۰/۱۳۳۳	اختلاف‌های دو گروه	کلادوسپوریوم
۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۲۱۳	۰/۹۹۲	مقدار معناداری	
۰/۰۴۸۴۲	۲/۴۱۶۷	۲/۴۱۶۷	۲/۴۱۶۷	۲/۴۱۶۷	۰/۹۴۶۷	۰/۴۵۶۷	اختلاف‌های دو گروه	پنسیلیوم
۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۱	مقدار معناداری	

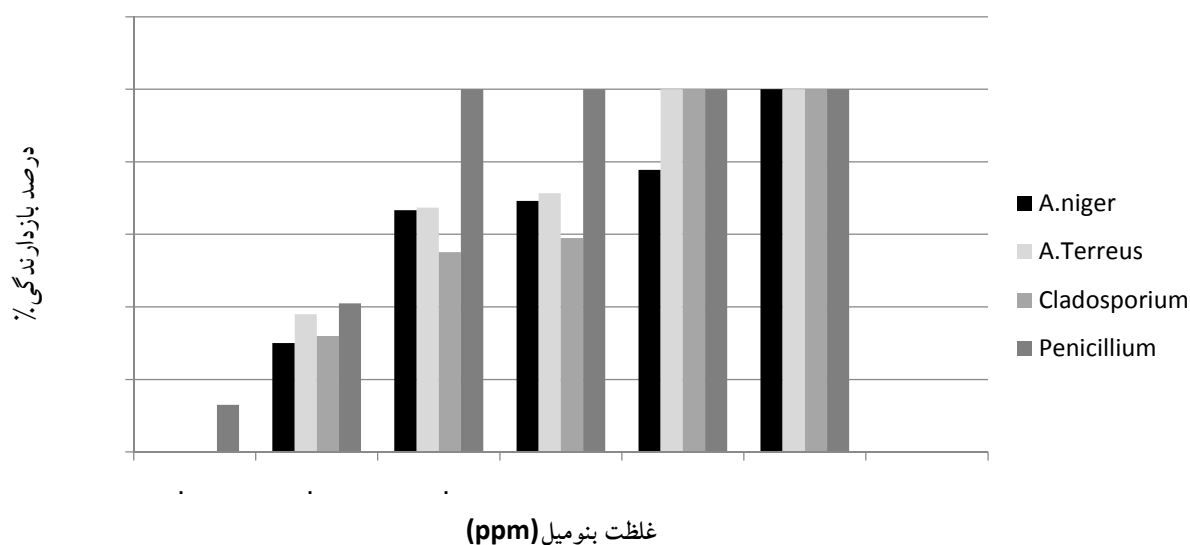
درصد بازدارندگی تیمار بنومیل در اتانول

پنسیلیوم بر کاغذ را کاهش داده و درصد بازدارندگی آن ۱۳٪ بوده است. در غلظت‌های بالاتر در همه جدایه‌ها با افزایش غلظت بنومیل از قطر رشد کلنی در کاغذهای تیمار شده نسبت به نمونه شاهد کاسته شده و درصد بازدارندگی افزایش یافته است. بازدارندگی غلظت ۱۰۰ ppm برای همه جدایه‌های قارچی مورد مطالعه ۱۰۰٪ بود و رشد هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی بر کاغذ مشاهده نشد.

بر اساس فرمول پیشنهادی استاندارد-ASTM D 2020 92، درصد بازدارندگی غلظت‌های تیمار الکلی بنومیل برای هر قارچ در کاغذ محاسبه گردید (جدول ۳ و شکل ۶). همان‌طور که در نتایج دیده می‌شود غلظت ۳/۱۲۵ppm بنومیل در اتانول در رشد آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم بر کاغذ هیچ تأثیری نداشته و درصد بازدارندگی آن صفر بوده است. درحالی که رشد

جدول ۳- نتایج درصد بازدارندگی رشد قارچ‌ها بر کاغذهای تیمار شده پس از ۲۱ روز برای غلظت‌های مختلف بنومیل

غلظت						نوع قارچ
۱۰۰ ppm	۵۰ ppm	۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۶/۲۵ Ppm	۳/۱۲۵ ppm	
۱۰۰	۷۷/۸	۶۹/۲	۶۶/۷	۳۰	۰	آسپرژیلوس نایجر
۱۰۰	۱۰۰	۷۱/۳	۶۷/۴	۳۸	۰	آسپرژیلوس ترئوس
۱۰۰	۱۰۰	۵۹	۵۵	۳۲	۰	کلادوسپوریوم
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۱	۱۳	پنیسیلیوم



شکل ۶- نمودار درصد بازدارندگی رشد قارچ‌ها پس از ۲۱ روز برای غلظت‌های مختلف بنومیل

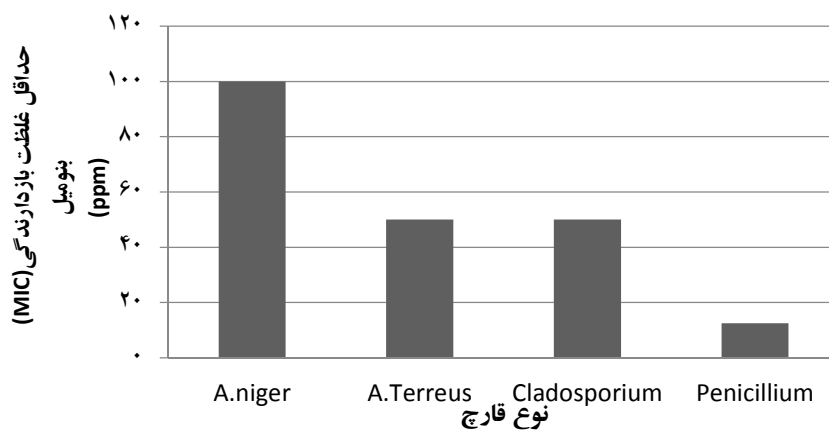
گونه آسپرژیلوس نایجر بیشترین MIC را برابر با ۱۰۰ ppm داشتند. میزان MIC به دست آمده برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم ۵۰ ppm بود (جدول ۵ و شکل ۷). آسپرژیلوس نایجر کمترین حساسیت را در بین نمونه‌های مورد آزمون از خود نشان داد و پنیسیلیوم نسبت به سایر نمونه‌ها حساسیت بیشتری داشت.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تیمار بنومیل در اتانول در کاغذ نتایج حاصل از بررسی رشد قارچ‌ها بر کاغذ پس از ۲۱ روز (جدول ۴، شکل ۸ تا ۱۱) نشان می‌دهد که همه قارچ‌های مورد آزمون نسبت به بنومیل حساس بوده و در غلظت ۱۰۰ ppm رشد هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. جنس پنیسیلیوم کمترین MIC را برابر با ۱۲/۵ ppm و

جدول ۴- نتایج رشد قارچ‌ها بر روی کاغذ پس از ۲۱ روز در غلظت‌های مختلف

غلظت	۳/۱۲۵ ppm	۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۲۵ ppm	۵۰ ppm	۱۰۰ ppm	کنترل مثبت	کنترل منفی	نوع قارچ
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	+	+	-	+	-	
آسپرژیلوس ترئوس	+	+	+	+	-	-	+	-	
کلادوسپوریوم	+	+	+	+	-	-	+	-	
پنیسیلیوم	+	+	-	-	-	-	+	-	

(+) مشاهده رشد قارچ
 (-) عدم مشاهده رشد قارچ
 کنترل مثبت: محیط کشت + سوسپانسیون اسپور
 کنترل منفی: محیط کشت بدون تلقیح سوسپانسیون اسپور



شکل ۷- نمودار نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بنومیل براری نمونه‌های قارچ مورد آزمون



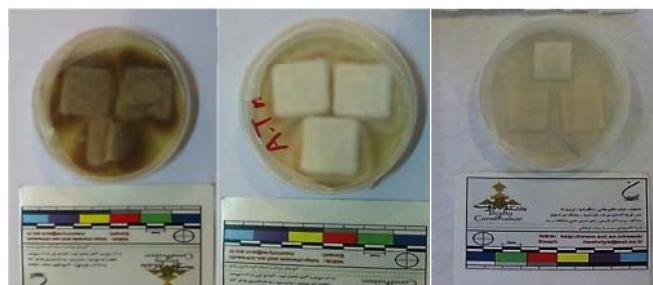
شکل ۸- میزان رشد پنیسیلیوم بر کاغذ پس از ۲۱ روز: الف- کاغذ تیمار شده با غلظت ۲۵ ppm بنومیل، ب- کاغذ تیمار شده با اتانول، ج- کاغذ تیمار نشده



شکل ۹- میزان رشد آسپرژیلوس نایجر بر کاغذ پس از ۲۱ روز: الف- کاغذ تیمار شده با غلظت ۱۰۰ ppm بنومیل، ب- تیمار شده با اتانول، ج- تیمار نشده



شکل ۱۰- تصویر میزان رشد کلادوسپوریوم بر کاغذ پس از ۲۱ روز: الف- کاغذ تیمار شده با غلظت ۵۰ ppm بنومیل، ب- تیمار شده با اتانول، ج- تیمار نشده



شکل ۱۱- تصویر میزان رشد آسپرژیلوس ترئوس بر کاغذ پس از ۲۱ روز: الف- کاغذ تیمار شده با غلظت ۵۰ ppm بنومیل، ب- کاغذ تیمار شده با اتانول، ج- کاغذ تیمار نشده

بحث

بنزیمیدازولها پژوهش‌های زیادی انجام شده است. تکنیک‌های بیولوژی مولکولی به‌کاررفته در تحقیقات، بتاتوبولین را به‌عنوان جایگاه هدف تأیید کرده است. در میکروتوبولها به‌طور متناوب ماریپچ‌های آلفا و بتاتوبولین وجود دارد که بخش ضروری از ساختمان سلولی را تشکیل داده و در تشکیل دوک و جدا شدن کروموزومها در تقسیم سلولی فعال هستند. بنزیمیدازولها تقسیم میتوز را در مرحله

ماده انتخاب شده در این پژوهش (بنومیل) قارچ‌کشی از گروه بنزیمیدازولها است که فعالیت انتخابی دارد و تاکنون روی بسیاری از پاتوژن‌های قارچی کارایی مطلوبی نشان داده است. بنومیل در مهار رشد باکتری‌ها کارایی بالایی نداشته و سبب ایجاد آلرژی، اختلالات کبدی و سرطان در پستانداران می‌شود (Rahmen, 1992). درباره مکانیزم تأثیر

آسپرژیلوس نایجر بیشترین MIC را برابر با ۱۰۰ ppm داشتند. میزان MIC به دست آمده برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم ۵۰ ppm بود. با توجه به این نتایج می توان گفت که آسپرژیلوس نایجر کمترین حساسیت را در بین جدایه های قارچی مورد آزمون از خود نشان داد و پنسیلیوم نسبت به سایر نمونه ها حساسیت بیشتری داشت.

MIC به دست آمده برای آسپرژیلوس نایجر ۱۰۰ ppm بود که مشابه نتیجه به دست آمده توسط Elnaggar و همکاران (۲۰۱۰) برای نمونه آسپرژیلوس نایجر جداسازی شده از یک مومیایی مصری است. در این پژوهش تأثیر بنومیل و چند قارچ کش دیگر بر نمونه قارچ های جداسازی شده از یک مومیایی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که پنی-سیلیوم کوریلوفیلیوم در غلظت ۶/۲۵ ppm بنومیل و آسپرژیلوس نایجر و هورموندروم ویرید در غلظت ۱۰۰ ppm بنومیل رشد نداشتند (Elnaggar, 2010). نتایج به دست آمده توسط وی در تعیین حداقل غلظت بازدارندگی بنومیل برای آسپرژیلوس نایجر با این مطالعه همسو می باشد.

در این پژوهش MIC به دست آمده برای پنسیلیوم ۱۲/۵ ppm بود. این در حالی است که در پژوهش های دیگر انجام شده غلظت های به دست آمده از بنومیل برای کنترل رشد این نمونه متفاوت بوده است. در پژوهشی به منظور بررسی و تعیین روش های کنترل پوسیدگی میوه انار در انبار، تأثیر شش نوع ماده مختلف ضد عفونی شامل بنومیل، محلول کلسیم کلرید، سدیم هیپوکلریت، اکسی کلرور مس، تیابندازول و واکس را بر روی گونه های آسپرژیلوس و پنسیلیوم بررسی کردند. نتایج نشان داد که بنومیل در درجه دوم پس از سدیم هیپوکلریت بیشترین میزان کارایی را در کنترل آلودگی و کاهش پوسیدگی های انباری انار داشته است. این ماده در غلظت ۱۵ ppm مانع رشد پنسیلیوم شده بود (Shakeri, 2007). نتایج به دست آمده توسط وی با نتایج به دست آمده در این پژوهش هم خوانی دارد. در پژوهش Elnaggar و همکاران (۲۰۱۰) پنی سیلیوم کوریلوفیلیوم در غلظت ۶/۲۵ ppm از بنومیل رشد نداشته است. Sahab و همکارانش (۲۰۱۲) نیز در پژوهشی بر کاغذ های بانکی

متافاز قطع می کنند. دوک میتوزی از شکل طبیعی خارج شده و هسته های دختری از هم جدا نمی شوند، در نتیجه سلول می میرد. با وجود مقدار زیاد بتا-توبولین در همه موجودات یوکاریوت، بنزیمیدازول ها دارای خاصیت انتخابی بالایی هستند. اساس انتخابی بودن فعالیت آنها شناخته شده نیست ولی ممکن است به تفاوت های ساختمانی در جایگاه های ترکیبی میکروتوبول ها وابسته باشد (Pedregosa et al., 1995).

در این پژوهش مقاومت قارچی کاغذ های تیمار شده با غلظت های مختلف بنومیل نسبت به چهار جدایه قارچی رایج به عنوان عامل تخریب در آثار کاغذی بررسی شد. قارچ های مورد بررسی از صفحه های کاغذی نسخه ها و کتاب های آلوده جداسازی و شناسایی شدند. درصد بازدارندگی غلظت های مختلف بنومیل برای رشد جدایه های قارچی بر کاغذ های تیمار شده و حداقل غلظت بازدارندگی برای هر قارچ بر کاغذ تعیین شد.

نتایج آزمون بازدارندگی رشد برای کاغذ های تیمار شده با غلظت های مختلف بنومیل نشان داد که تیمار کاغذ با محلول بنومیل در اتانول با غلظت ۳/۱۲۵ ppm در مهار رشد آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم بر کاغذ هیچ تأثیری نداشته و درصد بازدارندگی آن صفر بوده است. در حالی که رشد پنسیلیوم بر کاغذ را کاهش داده و درصد بازدارندگی آن ۱۳٪ بوده است. در غلظت های بالاتر در همه جدایه ها با افزایش غلظت بنومیل از قطر رشد کلنی در کاغذ های تیمار شده نسبت به نمونه شاهد کاسته شده و درصد بازدارندگی افزایش یافته است. بازدارندگی رشد محلول بنومیل در اتانول با غلظت ۱۰۰ ppm برای همه جدایه های قارچی مورد مطالعه ۱۰۰٪ بود و در کاغذ های تیمار شده با این غلظت، رشد هیچ یک از جدایه های قارچی مشاهده نشد.

نتایج حاصل از بررسی رشد قارچ ها پس از ۲۱ روز نشان داد که همه قارچ های مورد آزمون نسبت به بنومیل حساس بودند. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد برای جدایه های قارچی مورد آزمون بر کاغذ متفاوت بود. جنس پنسیلیوم کمترین MIC را برابر با ۱۲/۵ ppm و گونه

- Deterioration. e-conservation magazine, 16: 39-49.
- Gallo, F., 2010. Aerobiological research and problems in libraries: 61-74. In: Mitchell, R. and McNamara, C., (Eds). Cultural Heritage Microbiology. Washington, DC.
- Ghahri, M., 2006. A review of the paper destructive fungi, pathology and ways to prevent and cope. Marammat & pazhouesh, 1: 27-41.
- Leah Nardi, A., Vandom, F., 2000. Guide the preservation, conservation and restoration of paper: Sarvghad moghadam, A., (Trns). Islamic Research Foundation of Astan Quds Razavi, Mashhad.
- Magnucka, E.G., Suzuki, Y., Pietr, S.J., Kozubek, A., Zarnowski, R., 2007. Action of benzimidazol fungicide on resocinolic lipid metabolism in rye seedling depends on thermal and light growth conditions. *pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 219-225.
- Mitchell, R., McNamara, C., 2010. *Fundamental Studies in Conservation Science*. ASM Press, Washington DC.
- Mohammadi achachlouei, M., Kouchakzaei, A., 2013. Characterization of fungi and their effect on documents and manuscripts in the archive of Malek national library and museum institution. *Ganjineh Asnad*, 23(4): 126-145.
- Neves, E. R., Schofer, S., Phillips, A., Canejo, J., Macedo, M. F., 2009. antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 267-272.
- Pedregosa, A., Rios, S., Monistrol, F., laborda, F., 1995. Effect of the microtubule inhibitor methyl benzimidazol-2-yl carbamat (MBC) on protein secretion and microtubule distribution in *cladosporium cucumerinum*. *Mycol. Reseach*, 99(1): 43-48.
- Rahmen, A., 1992. Effect of fungicide benomyl on cell wall degradation by some fungi. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 147(5): 329-339.
- Sequeira, S., cabrita, E., Macedo, M., 2012. Antifungals on paper conservation: an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74: 67-86.
- Shakeri, M., Hoseini, M., Dehghani, F., 2007. Determine the pomegranate fruit rot control methods in stock. *Zeraat & Baghbani*. 74: 166-171.
- آلوده به قارچ، تأثیر قارچ‌کشی بنومیل، روغن رزماری و تیمول را بر سه گونه قارچ جداسازی شده از این اسناد بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که آلترناریا تنوس در غلظت ۱۲/۵ ppm، پنسیلیوم و تریکودرما ویرید در غلظت ۶/۲۵ ppm رشد نداشتند. نتایج این دو اختلاف معناداری با نتایج این مطالعه دارد. این تفاوت در میزان حساسیت را می‌توان ناشی از تفاوت در ناحیه جغرافیایی، روش آزمون، شرایط محیطی مانند دما، رطوبت، pH، غلظت گازهای موجود، بیوتایپ‌های متفاوت، موتاسیون‌های انجام شده در مراحل رشد و ... دانست.
- نتایج حاصل از آزمون‌ها نشان می‌دهد که "متیل ۱- بوتیل آمین بنزیمیدازول-۲-۲-ایل کاربامات" که با نام تجاری بنومیل شناخته شده است در غلظت ۱۰۰ ppm در اتانول قابلیت مهار رشد جنس‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و گونه‌های پنسیلیوم و کلادوسپوریوم را در کاغذ دارد. با توجه به نتایج به دست آمده، همچنین طیف فعالیت گسترده بنومیل، تأثیر همزمان به صورت معالجه‌ای و حفاظتی، در دسترس و کم‌هزینه بودن و سمیت ضعیف برای انسان و دام می‌تواند بنومیل را به عنوان یک ضدقارچ مناسب در حفاظت آثار کاغذی معرفی کرد.

منابع مورد استفاده

- ASTM D2020-92, 2003. Standard Test Methods for Mildew (Fungus) Resistance of Paper and Paperboard.
- Andrews, J., 2001. determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1): 5-16.
- Cavena, G., Nugari, M. and Salvadori, O., 2008. *Plant Biology for Cultural Heritage: Biodeterioration and Conservation*. Getty, Los Angeles.
- Florian, E., 2004. *Fungal Facts, solving fungal problems in heritage collections*. Archetype publication, london.
- Elnaggar, A., Sahab, A., Ismail, S., Mahgoub G. and Abdelhady, M., 2010. Microbial Study of Egyptian Mummies: an Assessment of Enzyme Activity, Fungicides and Some Mummification Materials for the Inhibition of Microbial

The minimum inhibitory concentration of benomyl for four fungal species on historical papers

J. Chabavizadeh¹, H. Ahmadi², M. Mohammadi achachlouei³
and M. shirdavani^{4*}

1-Assitant Professor, Scientific board in Isfahan University of Medical Sciences, Department of Mycology and Parasitology, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Scientific board in Faculty of conservation and restoration, Art university of Isfahan, Iran

3-Assitant Professor, Scientific board in Faculty of conservation and restoration, Art university of Isfahan.

4*-Corresponding author: PhD. student in conservation and restoration of cultural heritage, Art university of Isfahan, Iran, E-mail: mahshid_shirdavani@yahoo.com

Received: June, 2016

Accepted: Dec., 2016

Abstract

Paper relics have historical, artistic and scientific values in the human cultural heritage viewpoint. Given the importance of this material, its preservation is a matter of great interest. Bio-organisms and specially fungi are one of main decaying factors of cellulose structure of paper. The aim of this study was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of Benomyl for *Aspergillus niger*, *Aspergillus Terreus*, *Penicillium* and *Cladosporium* isolated from infected papers and manuscripts. Isolates were tested for sensitivity to benomyl and also have been compared with each other. Fungal genera were identified based on macroscopic and microscopic characteristics of isolated samples by using slide culture method and optical microscope. In order to determine the minimum inhibitory concentration of Benomyl alcohol treatments on paper followed by disk diffusion method. ASTM D 2020-92 Standard Test Methods for Mildew were used to assess fungal resistance of treated paper. These test methods cover the qualitative determination of mildew (fungus) resistance of paper and paperboard, particularly those types which have been given a fungus resistant treatment. The results showed that all tested fungi are sensitive to Benomyl and Benomyl alcohol treatment and such treatment prevents the growth of isolates on paper. *Penicillium* has the least MIC 12/5 ppm, and the highest MIC, 100 ppm, belong to *Aspergillus niger*. MIC obtained for *Aspergillus terreus* and *Cladosporium* was 50 ppm. In all isolates exposed to increasing concentration of ethanolic solution of Benomyl the diameter of colonies in comparison with the control group, decreased and the percentage inhibition of fungal growth on paper increased. The results demonstrated that the 100 ppm concentration of Benomyl in ethanol can be the lowest concentration necessary to provide efficient antifungal action.

Keyword: Antifungal, benomyl, paper relics, MIC.