

ارزیابی تأثیر ضد قارچی تیوفانات متیل بر قارچ‌های مخرب کاغذ و کاربرد آن در حفاظت آثار کاغذی

محبوب عبدالعلی‌زاده^{۱*}، مهرناز آزادی بویاغچی^۲، محسن محمدی آچاچلویی^۳

و محمد محمدی‌پور^۴

*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد مرمت اشیای فرهنگی و تاریخی، تبریز mahboob9067@yahoo.com

۲- استادیار، عضو هیئت‌علمی مرمت اشیای فرهنگی و تاریخی، دانشگاه هنر اصفهان

۳- استادیار، عضو هیئت‌علمی مرمت اشیای فرهنگی و تاریخی، دانشگاه هنر اصفهان

۴- عضو هیئت‌علمی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

چکیده

آثار کاغذی به دلیل ماهیت آلی خود بیشتر مورد حمله عوامل بیولوژیکی مثل قارچ‌ها، باکتری‌ها و حشرات قرار می‌گیرند. در آرشوها معمولاً بیشترین نوع تخریب بیولوژیکی کاغذ، به قارچ‌ها مربوط می‌شود. اهمیت حفاظت آثار کاغذی باعث شده تا روش‌های متفاوتی در قارچ‌زدایی این آثار بکار گرفته شود. روش ضدعفونی شیمیایی یکی از پرکاربردترین شیوه‌های ضدعفونی است. در این پژوهش کاربرد قارچ‌کش تیوفانات متیل بر قارچ‌های مخرب آثار کاغذی مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات آزمایشگاهی انجام شده برای بررسی تأثیرات تیوفانات متیل بر کاغذ و قارچ، شامل پیرسازی تسریعی کاغذ، بررسی میزان تأثیرگذاری قارچ‌کش تیوفانات متیل بر قارچ‌های *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp* و تعیین میزان پایداری قارچ‌کش بعد از پیرسازی تسریعی است. بررسی‌ها نشان داد که تیوفانات متیل در تمامی غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ ppm به‌طور کامل از رشد قارچ *P. sp.* جلوگیری کرد. قارچ *A. flavus* تنها در غلظت ۱۰ ppm مقداری رشد داشت؛ اما در بقیه غلظت‌ها هیچ رشدی از این قارچ دیده نشد. قارچ *A. niger* نیز در غلظت‌های بالای ۱۰۰ ppm توانایی رشد نداشت. بر اساس نتایج، کاغذهای تیمار شده پس از قرارگیری در شرایط پیرسازی تسریعی همچنان توانایی مهار رشد قارچ‌ها را دارد. به‌طورکلی، نتایج حاصل از هاله رشد و هاله عدم رشد، نشانگر آن بود که در غلظت ۲۰۰ ppm هر سه قارچ به‌طور کامل قابل کنترل هستند.

واژه‌های کلیدی: کاغذ، تیوفانات متیل، کشت قارچ، پیرسازی تسریعی، حفاظت و مرمت

مقدمه

کاغذ به قارچ‌ها مربوط می‌شود، زیرا قارچ‌ها تحمل خوبی به تغییرات محیطی نشان می‌دهند (Manente et al., 2012; Fabbri et al., 1997). میکروارگانیسم‌ها باعث ایجاد آسیب‌های جدی مانند تضعیف یا سستی کاغذ و کتاب می‌شوند. کاغذهایی که تحت تأثیر رشد قارچ قرار می‌گیرند، اغلب دچار فاکسینگ (لکه‌های قرمز- قهوه‌ای که در اثر

میکروارگانیسم‌ها مهمترین عوامل زوال بیولوژیکی هستند (Mesquita et al., 2009). میکروارگانیسم‌های اصلی که به کاغذ حمله می‌کنند عبارت‌اند از باکتری‌ها و قارچ‌ها که متعلق به گونه سلولولیتیک و همچنین گونه‌های غیر سلولولیتیک می‌باشند. بیشترین نوع تخریب بیولوژیکی

در مدت زمان زیادی کاغذ را محافظت کنند. هریک از روش‌های مورد استفاده دارای محدودیت‌ها و احیاناً معایب یا مزایای خاص خود هستند. به‌طور کلی، انتخاب کارآمدترین روش‌های درمانی موادی که از کاغذ تشکیل شده‌اند مهم است تا بتواند رشد حشرات و میکروارگانیسم‌ها را مهار کند و یا از رشد آنها جلوگیری کند. انتخاب یک ماده مناسب در آفت‌زدایی آثار کاغذی نیازمند داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد است. از مهمترین این ویژگی‌ها، توانایی از بین بردن تمامی میکروارگانیسم‌ها و مدت زمان پایداری آن ماده است (Velikova et al., 2011).

در رابطه با مواد آفت‌کش کاغذ، Roman و همکاران (۲۰۱۳)، به نقش مهم آفت‌کش‌ها اشاره کرده و به شرح آفت‌کش‌های مهم در مرمت و حفاظت آثار کاغذی پرداخته و همچنین نقش این مواد را در امر مرمت و حفاظت پررنگ دانسته‌اند. به طوری که شاید بتوان گفت، بیش از ۵۰ نوع ترکیبات شیمیایی از گروه‌های مختلف تا قبل از سال ۱۹۹۰ در حوزه حفاظت کتاب آزمایش شده است (Velikova et al., 2011). Adelantado و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر دو نوع قارچ‌کش تجاری که به‌عنوان ماده ضد قارچ ثبت و شناخته شده‌اند و ترکیب ۳۰ به ۷۰ آب و الکل را بر رشد قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Penicillium rugulosum* مطالعه کردند. Bacilkova (۲۰۰۶) در مبحث مبارزه با قارچ، بر افزایش اثربخشی الکل‌ها با افزایش طول زنجیره اشاره داشته؛ و بر اساس مطالعه ایشان، ترکیب آب و الکل، اثربخش‌تر از الکل خالی است. Weaver-Meyers و همکاران (۱۹۹۸) دی‌اکسید کلرین را بررسی کردند. نتایج به‌کارگیری دی‌اکسید کلرین به حالت گاز، در کنترل حملات قارچی آثار کاغذی، نشانگر پایین بودن خطرات کاربرد این ماده در درازمدت است. Rakotonirainy و همکاران (۱۹۹۹) مطالعه‌ای در رابطه با تأثیرات چند قارچ‌کش تجاری با نام‌های اکونازول، ارتوفنیل فنل، ایمازلیل و تیابندازول بر روی کاغذ انجام دادند، از میان این مواد، هیچ‌یک به اندازه تیابندازول در قارچ‌زدایی خوب عمل نکرد.

فعالیت قارچ‌ها بر سطح کاغذ ایجاد می‌گردد) شده و تضعیف ساختار و تغییر رنگ در آنها ظاهر می‌شود (Gutarowska, 2012; Arai, 2000). قارچ‌ها به دلیل نداشتن کلروفیل نمی‌توانند دی‌اکسید کربن را به کربوهیدرات‌های مورد نیاز برای رشدشان تبدیل کنند، به همین دلیل به‌طور مستقیم کربوهیدرات را از مواد آلی تهیه می‌کنند (McCleary, 1987). هنگامی که قارچ‌ها به چسب و آهار به‌کاررفته در کاغذ و صحافی (به‌عنوان مثال، نشاسته که هم به‌عنوان چسب در صحافی و هم به‌صورت ماده آهاردهنده کاغذ از زمان‌های قدیم کاربرد داشته است) حمله می‌کنند باعث پوسیدگی این مواد می‌شوند. کپک پس از هضم نشاسته به سلولز حمله کرده و کاغذ را فاسد می‌کند (Ghahri, 2006). قارچ‌ها زمانی که مواد لازم برای رشدشان را متابولیسم می‌کنند، موادی از قبیل اسیدهای سیتریک، اگزالیک، لاکتیک و اسیدهای آلی دیگر را دفع می‌کنند و این مواد باعث تخریب ساختار کاغذ شده و منجر به زوال آن می‌گردد (McCleary, 1987). البته قارچ‌های حساسیت‌زا باعث آسیب رسیدن به انسان نیز می‌شوند. به طوری که باوجود آلودگی میکروبی بیش از اندازه در هوای داخل یک موزه یا کتابخانه، سلامتی اشخاص به‌طور جدی به خطر می‌افتد (Gutarowska, 2012; Zyska, 1997). تعداد زیادی از قارچ‌های آسیب‌رسان به کاغذ، متعلق به جنس‌های *Chaetomium* و *Aspergillus Penicillium* است (Gallo, 1992). برای مقابله با قارچ از روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌توان استفاده کرد (Nitterus, 2000). بیشتر محققان بر این باورند که فاکتور اصلی مورد کنترل در کتابخانه‌ها، رطوبت نسبی هواست (Reis et al., 2011) که از روش‌های فیزیکی در کنترل قارچ محسوب می‌گردد. روش‌های فیزیکی دیگر مانند کنترل دما، محیط‌های کم اکسیژن، اشعه گاما و اشعه فرابنفش نیز از جمله روش‌های کاربردی در مبارزه با کاغذهای آلوده به قارچ هستند. این روش‌ها برای مدت زیاد دوام نمی‌آورند. زیرا اثر فوری داشته و از خود پسماندی در اثر باقی نمی‌گذارند (Sequeira et al., 2012) اما روش‌های شیمیایی می‌توانند

دی‌اکسید تیتانیوم مورد ارزیابی قرار داده‌اند.

ماده‌ای که در این پژوهش بررسی شد تیوفانات متیل نام دارد. این ماده به صورت بلورهای بی‌رنگ است (ISIRI 2014, 18443) و معمولاً به حالت یودر یا غبار بکار می‌رود. تیوفانات متیل (*Thiophanate methyl*) با نام تجاری توپسین ام (*Topsin M*) و از گروه قارچ‌کش‌های بنزیمیدازول است که جزو قوی‌ترین مواد قارچ‌کش به ثبت رسیده است (Gisi et al., 2005). فرمول شیمیایی آن $C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$ است که قابلیت حل شدن در استون، سیکلوهگزانون، متانول، استونیتریل و اتیل استات را دارد (Krieger, 2010). قارچ‌کش تیوفانات متیل از سال ۱۹۶۰ به عنوان ماده قارچ‌کش در قارچ‌زدایی مورد استفاده قرار گرفت (Hirschfeld et al., 2010). بر اساس دسته‌بندی سازمان بهداشت جهانی^۱ تیوفانات متیل دارای کلاس خطر U (در صورت استفاده در شرایط معمولی، سمیت حاد ندارد) و بر اساس دسته‌بندی آژانس حفاظت از محیط‌زیست^۲ در کلاس IV قرار گرفته است (استاندارد ملی ایران به شماره ۱۸۴۴۳). این ماده از طریق رشد ساختارهای میکروسکوپی لوله مانند^۳ مضر در سلول‌های قارچی عمل کرده، در نتیجه از تقسیم سلولی صحیح جلوگیری می‌کند (Nauha et al., 2009). با توجه به مطالب گفته‌شده، می‌باید مبارزه با قارچ‌های مخرب کاغذ یکی از مهمترین مواردی است که موزه‌ها و کتابخانه‌ها با آن درگیر هستند؛ بنابراین، این پژوهش سعی بر آن دارد تا با بررسی تأثیر تیوفانات متیل بر قارچ‌های مخرب کاغذ، قدرت این ماده را در مبارزه با قارچ سنجیده و امکان حفاظت آثار کاغذی توسط این ماده ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ

برای ارزیابی و بررسی تأثیر قارچ‌کش در این

Fabbri و همکاران (۱۹۹۷)، تأثیرات ضد قارچی مواد آنتی‌بیوتیک، ضد قارچ‌های آزولی و بازدارنده‌های سنتزی کیتین را مورد بررسی قرار دادند. با توجه به نتیجه حاصل‌شده، بیشترین اثربخشی مربوط به گروه ضدقارچ آزولی بود. استفاده از داروهای هومیوپاتیک به عنوان عامل ضد قارچ در حفاظت کتاب و مواد کاغذی، تحقیق جدیدی است که برای اولین بار توانسته نقش و توانمندی داروهای هومیو را در حفاظت کاغذ در برابر قارچ‌ها بررسی کند. شش نوع داروی هومیو با توانایی مختلف مورد آزمایش قرار داده شد که از میان آنها دو نوع دارو با نام‌های *Petroleum 30* و *Sulphur Iodatum 1000 (1M)* بیشتری را نشان دادند. این داروها بی‌خطر بوده و اثرات زیان‌آوری در کتاب ایجاد نمی‌کند (Garg, 1995).

مشکلات موجود در بخش ضد عفونی و درمان آثار کاغذی که مورد حمله عوامل بیولوژیکی قرار گرفته‌اند، همواره موجب به‌کارگیری فنون جدید شده است؛ و متخصصان حوزه مرمت و حفاظت آثار تاریخی از سایر علوم در این زمینه کمک می‌گیرند. مطالعه نانو مواد در جلوگیری از حمله قارچ به آثار کاغذی از جمله فنون جدید به‌شمار می‌رود؛ اما مطالعات گسترده و کامل در این زمینه انجام نشده و در حال حاضر این تحقیقات ادامه دارد. Eimani و همکاران (۲۰۱۱) به کاربرد نانو ساختارهای اکسید روی در حفاظت آثار کاغذی پرداخته‌اند. تأثیر این ماده بر ویژگی‌های کاغذ و نیز نقش آن در جلوگیری از قارچ مورد مطالعه قرار گرفته است. Hadadi و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی اثر حفاظتی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در محفظه‌های نگهداری و نمایش آثار کاغذی پرداخته‌اند. بر این اساس لایه‌نشانی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر روی محفظه نگهداری کاغذ نتایج قابل توجهی داشته است. Aryafar و همکاران (۲۰۱۵) به بهینه‌سازی کربوکسی متیل سلولز (CMC) (یکی از مهمترین مواد مورد استفاده در حفاظت و مرمت آثار کاغذی) در برابر عوامل میکروارگانیسم به کمک نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم پرداخته و ارتقاء کیفیت پلیمر CMC را توسط نانو ذرات

1- WHO

2- EPA

3- Microtubule

تعیین غلظت مؤثر تیوفانات متیل

هدف از اجرای این آزمون، میزان تأثیرگذاری قارچ-کش تیوفانات متیل بر روی قارچ‌های آسیب‌رسان به کاغذ و تعیین غلظت‌های مؤثر بر قارچ‌های موردنظر و مشاهده کنترل یا عدم کنترل رشد قارچ توسط این ماده است. برای بررسی میزان تأثیر محلول تیوفانات متیل بر سه نوع قارچ *A. niger*، *A. flavus* و *P. sp*، از روش هاله رشد استفاده شد. برای بررسی میزان تأثیر قارچ‌کش، غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ ppm از ماده تیوفانات متیل انتخاب شد تا میزان تأثیر از کمترین غلظت تا بیشترین غلظت مورد بررسی قرار گیرد. بعد از اتمام کار، پتری‌دیش‌ها در داخل انکوباتور به مدت سه هفته در دمای 27 ± 3 و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شدند. با گذشت زمان نمونه‌ها به صورت مداوم و مرتب کنترل گردید و در هر کنترل، هاله رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا محیط کشت تهیه شده و استریل گردید و بعد در آب مقطر (pH= ۶/۶۸) استریل شده در اتوکلاو، غلظت پایه از تیوفانات متیل تهیه شد. برای آماده‌سازی غلظت‌های انتخاب شده، از غلظت پایه، مقدار موردنظر برداشته شد و با محیط کشت به حجم رسید. به عبارت دیگر قارچ‌کش تیوفانات متیل با محیط کشت ترکیب شد. بعد از آماده‌سازی محیط آغشته به ماده قارچ‌کش، از هر سه قارچ موردبررسی که قبلاً در پتری‌دیش‌های جداگانه تکثیر شده بود، با یک دیسک نیم سانتیمتری برش داده و در داخل پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت آغشته به ماده قارچ‌کش با ۵ تکرار قرار داده شد تا میزان رشد آنها با گذشت زمان نسبت به نمونه شاهد (منظور از نمونه شاهد عبارت است از پتری‌دیش حاوی محیط کشت استریل شده و بدون هیچ‌گونه افزودنی که هر سه قارچ موردنظر در داخل آن کشت داده شده تا بتوان میزان رشد نمونه‌های دیگر را نسبت به نمونه شاهد (سنجید) مورد مقایسه قرار گیرد.

پژوهش، سه نوع قارچ *Aspergillus niger* (IBRC-M 30064)، *Aspergillus flavus* (IBRC-M 30054) و *Penicillium sp* (IBRC-M 30030) به دلیل قرارگیری این قارچ‌ها در جزو قارچ‌های مخرب آثار کاغذی انتخاب گردید. به طوری که در زوال‌های بیولوژیکی آثار کاغذی این قارچ‌ها عمدتاً نقش به‌سزایی دارند. قارچ‌های ذکر شده به صورت کشت تازه تهیه شدند. برای کشت قارچ از روش کشت در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) براساس شیوه پیشنهادی شرکت تولیدکننده (شرکت Merck آلمان)، ۳۹ گرم در لیتر، استفاده شد. پیش از کشت، ابزار و محل نمونه‌برداری با استفاده از آب‌زاول، اتانول و اشعه UV استریل گردید. برای حصول اطمینان از استریل، ابزار یکبار دیگر به همراه محیط کشت آماده‌شده در اتوکلاو با دمای 121°C و فشار ۲۰ psi به مدت ۲۰ دقیقه، ضدعفونی و استریل شدند. لازم به ذکر است که در محیط کشت قارچ از اصول ارائه شده در استانداردهای ملی ایران (ISIRI) به شماره‌های ۳۱۹۴، ۹۴۸۸ و ۹۸۹۹ استفاده شد. قارچ‌های تهیه شده بلافاصله هریک در سه پتری‌دیش تکثیر داده شد تا در مواقع نیاز استفاده گردد.

آزمایش بیولوژیکی کاغذ

برای اطمینان از اینکه کاغذ مورد استفاده در این پژوهش، عاری از هرگونه ماده قارچ‌زدا است، آزمایش بیولوژیکی بر روی آن انجام شد. قارچ‌ها به روش تلقیح و به تعداد 10^5 اسپور (شمارش شده به وسیله لام هماسیتومتر) در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون، از هر سه قارچ شمارش شده و در پلیت‌های استریل حاوی محیط کشت PDA افزوده شد. سپس کاغذهای گرد با قطر ۵ میلی‌متر به تعداد ۵ عدد در داخل پلیت قرار گرفت. بعد از قرارگیری پلیت‌ها در دمای 27 ± 3 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد به مدت ۳۵ روز در داخل انکوباتور، نتایج مشاهده شد.

تعیین میزان پایداری تیوفانات متیل

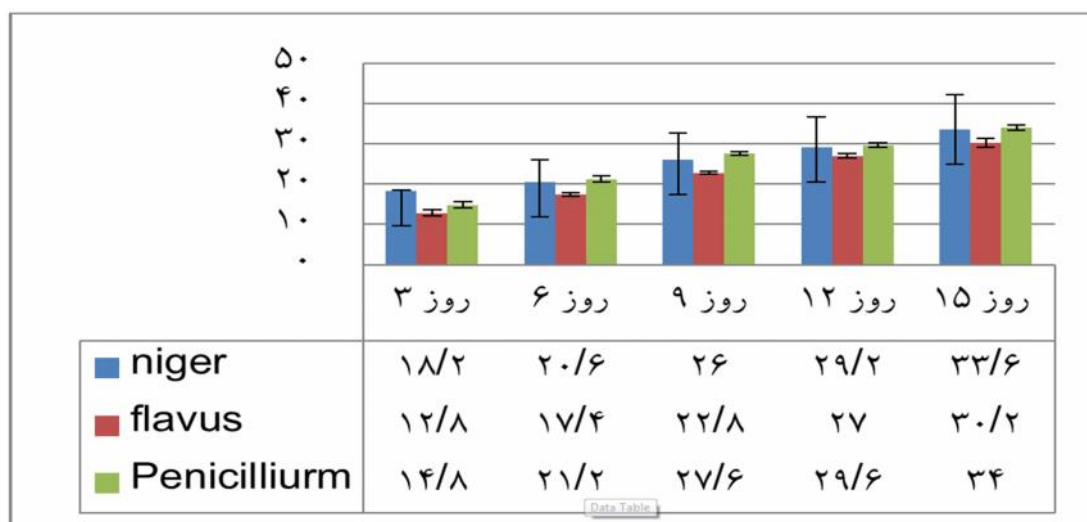
مواد در شرایط مختلف می‌توانند دچار تغییر شوند. شرایط محیطی مختلف در مواد تأثیر گذاشته و در خصوصیات آن تغییراتی احتمالی حاصل می‌گردد. هدف از تعیین پایداری، تعیین میزان ابقای خاصیت قارچ‌کشی تیوفانات متیل بعد از پیرسازی تسریعی دما-رطوبت است. روش آزمون بدین صورت بوده که ابتدا تعدادی کاغذ فیلتر MN ساخت شرکت مونکتل آلمان، با محلول تیوفانات متیل در متانول ساخت شرکت مرک آلمان با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm به روش اسیری بر سطح کاغذ، تیمار شدند. کاغذهای تهیه شده، طبق استاندارد ISIRI (استاندارد ملی ایران) به شماره ۴۷۰۶ به مدت ۲۸۸ ساعت برای پیرسازی به داخل محفظه پیرسازی انتقال داده شدند. طبق استاندارد ذکر شده، عملیات پیرسازی نمونه‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد انجام شد. نمونه‌ها بعد از خشک شدن، در پاکت‌های استریل نگهداری شده و به آزمایشگاه قارچ‌شناسی انتقال یافتند. با رعایت اصول و با دقت کافی نمونه‌ها در اندازه‌های نیم سانتیمتری برش خورده (به صورت گرد و با قطر نیم سانتیمتر) و در محیط استریل قرار گرفت. محیط کشت استریل شده به مقدار کافی در پتری‌دیش‌ها ریخته شد و قارچ‌ها به روش تلقیح^۱ و به تعداد ۱۰^۵ اسپور (شمارش شده به وسیله‌ی لام هماسیتومتر) در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون، به داخل پتری‌دیش افزوده شدند. در نهایت کاغذهای تهیه شده به همراه نمونه‌های شاهد خود به طور مجزا و هریک با ۵ تکرار به روی محیط کشت قرار گرفت و بعد پتری‌دیش‌ها به داخل انکوباتور منتقل شد. با گذشت زمان نمونه‌ها به صورت مداوم مشاهده و کنترل شدند و هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد.

نتایج

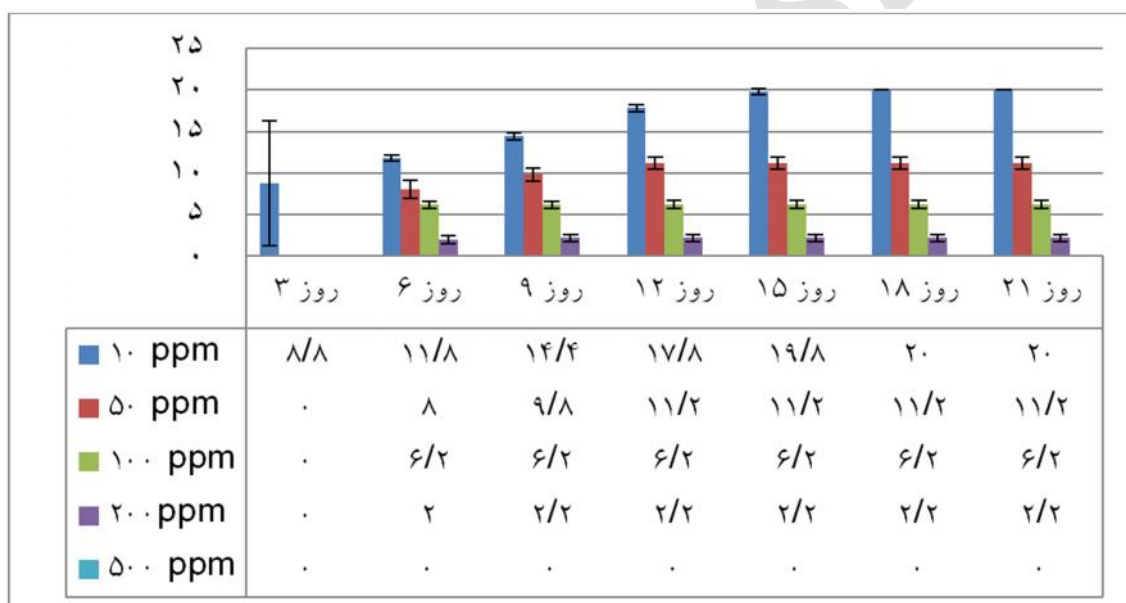
تأثیرگذاری تیوفانات متیل بر رشد قارچ نتایج به دست آمده از میانگین رشد قارچ‌های

آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فلاووس و پنسیلیوم اس پی، در محیط‌های حاوی ماده‌ی تیوفانات متیل، در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ ppm در مدت زمان ۲۱ روز و نیز میزان رشدشان در محیط عاری از ماده‌ی تیوفانات متیل نمونه‌ی شاهد در طول ۱۵ روز، در شکل ۱ نشان داده شده است. این نمودار، بیانگر میانگین رشد قارچ‌های شاهد در هر سه نوع قارچ مورد مطالعه است که داده‌های این نمودار، در واقع رشد نرمال قارچ‌ها را در دمای 27 ± 3 و رطوبت نسبی ۷۵ درصد برحسب میلی‌متر نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، سرعت رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس نسبت به دو نوع دیگر کندتر بوده اما برخلاف *A. niger* و *P. sp* نسبتاً سریع‌تر رشد کرده‌اند. از آنجایی که این آزمون در سه تکرار انجام شد، سرعت رشد قارچ‌ها در هر سه آزمون نتیجه‌ی مشابهی داشت. به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده، نمونه‌های شاهد بدون هیچ‌گونه عاملی که منجر به توقف رشد باشد، به رشد خود ادامه داده و بعد از گذشت ۱۵ روز پتری‌دیش‌های مورد آزمون در هر سه قارچ به بیشترین حد رشد رسیده است.

میزان رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر در محیط‌های آغشته به ماده‌ی قارچ‌کش (شکل ۲)، در غلظت‌های مورد مطالعه نشان داد که قدرت رشد و تکثیر قارچ در اثر تیوفانات متیل کاهش پیدا کرده و نسبت به رشد شاهد (شکل ۱) در همه‌ی غلظت‌ها، رشد آهسته‌تری دارد. در بازه‌ی زمانی ۰ تا ۱۵ روز، قارچ آسپرژیلوس نیجر قادر به رشد بوده اما این مقدار رشد در مقایسه با رشد شاهد بسیار کندتر اتفاق افتاده است. به طوری که بعد از گذشت ۱۵ روز، رشد قارچ کاملاً متوقف شده است. با توجه به نتایج، با افزایش غلظت، تأثیر قارچ‌کش تیوفانات متیل بر قارچ آسپرژیلوس نیجر بیشتر شده و به میزان بیشتری رشد این قارچ را مهار کرده است.



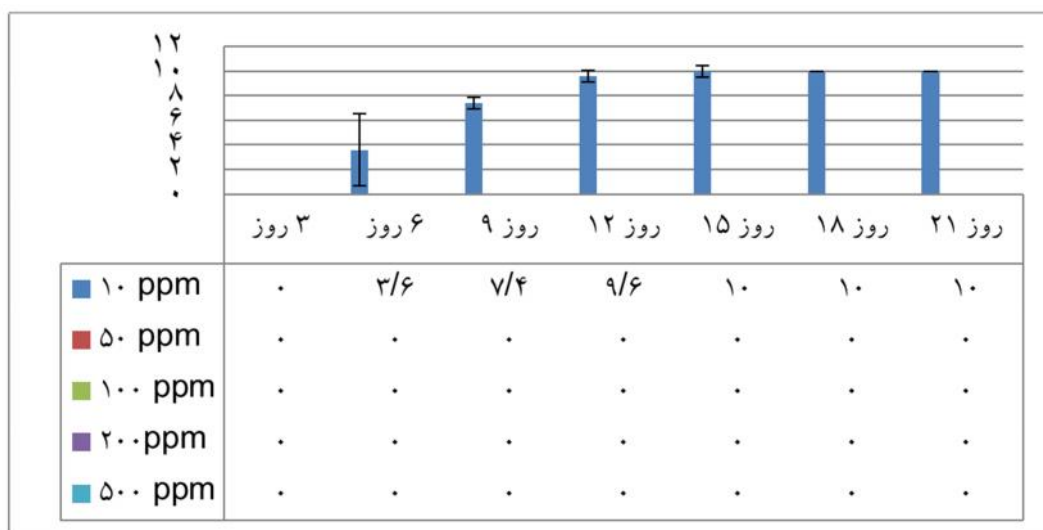
شکل ۱- میانگین رشد قارچ‌های شاهد



شکل ۲- میانگین رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر (برحسب میلی‌متر)

A. flavus در مقایسه با رشد شاهد خود رشد کندتری داشته و بعد از گذشت ۱۵ روز، رشد قارچ کاملاً متوقف شده است. در غلظت‌های ۱۰ ppm و بالاتر، قارچ‌کش تیوفانات متیل قادر است تا به‌طور کامل از رشد قارچ *A. flavus* جلوگیری کند.

نتایج به‌دست آمده برای قارچ‌های *A. flavus* و *P. sp* متفاوت‌تر از *A. niger* بود. به‌طوری‌که بعد از گذشت ۲۱ روز از کشت، قارچ *A. flavus* تنها در غلظت ۱۰ ppm رشد داشت (شکل ۳). در بقیه‌ی غلظت‌ها هیچ‌گونه رشدی از این قارچ مشاهده نشد. در غلظت ۱۰ ppm نیز

شکل ۳- میانگین رشد قارچ *A. flavus* (برحسب میلی‌متر)

در پتری‌دیش‌ها دیده نشد. لازم به ذکر است که نتایج در هر سه تکرار یکسان بوده و در هر سه تکرار رشدی از این قارچ در تمامی غلظت‌ها مشاهده نشد.

قارچ‌کش تیوفانات متیل در تمامی غلظت‌های موردبررسی قادر به کنترل کامل *P. sp* بود. با توجه به جدول ۱ بعد از گذشت ۲۱ روز از کشت هیچ‌گونه رشدی

جدول ۱- میانگین هاله رشد قارچ *P. sp* (برحسب میلی‌متر)

غلظت	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲	روز ۱۵	روز ۱۸	روز ۲۱
10ppm	-	-	-	-	-	-	-
50ppm	-	-	-	-	-	-	-
100ppm	-	-	-	-	-	-	-
200ppm	-	-	-	-	-	-	-
500ppm	-	-	-	-	-	-	-

هیچ‌گونه رشدی وجود ندارد.

۶۶ درصد است؛ اما در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ ppm توانسته رشد قارچ *A. flavus* را به‌طور کامل کنترل کند. در قارچ *P. sp* نیز رشد قارچ به‌طور کامل کنترل شده و در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه، قارچ‌کش تیوفانات متیل، رشد قارچ *P. sp* را متوقف کرده است. با توجه به جدول ۲، تیوفانات متیل در تمامی غلظت‌ها، ۱۰۰ درصد بازدارنده‌ی رشد قارچ *P. sp* است.

درصد بازدارندگی تیوفانات متیل

درصد بازدارندگی تیوفانات متیل در قارچ *A. niger* در غلظت‌های مختلف نشان داد که با افزایش غلظت، درصد بازدارندگی نیز افزایش پیدا می‌کند. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰ ppm درصد بازدارندگی ۴۱ درصد است اما در ۵۰۰ ppm این مقدار به ۱۰۰ درصد رسیده است. در غلظت ۲۰۰ ppm نیز ۹۳ درصد بازدارندگی داشته است. درصد بازدارندگی تیوفانات متیل در غلظت ۱۰ ppm در *A. flavus*

جدول ۲- درصد بازدارندگی قارچ کش تیوفانات متیل

غلظت	۱۰ ppm	۵۰ ppm	۱۰۰ ppm	۲۰۰ ppm	۵۰۰ ppm
<i>Aspergillus niger</i>	۴۱	۵۰	۸۱	۹۳	۱۰۰
<i>Aspergillus flavus</i>	۶۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
<i>Penicillium sp</i>	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

آزمایش بیولوژیکی کاغذ

برای اطمینان از اینکه کاغذ مورد استفاده در این پژوهش، عاری از هرگونه ماده‌ی قارچ‌زدا است، آزمایش بیولوژیکی بر روی آن انجام شد. با افزودن تعداد معین 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون از هر سه قارچ، در پلیت‌های حاوی محیط کشت و قرار دادن نمونه‌های کاغذ در داخل پلیت و بعد از قرارگیری پلیت‌ها در دمای ۲۷ درجه‌ی

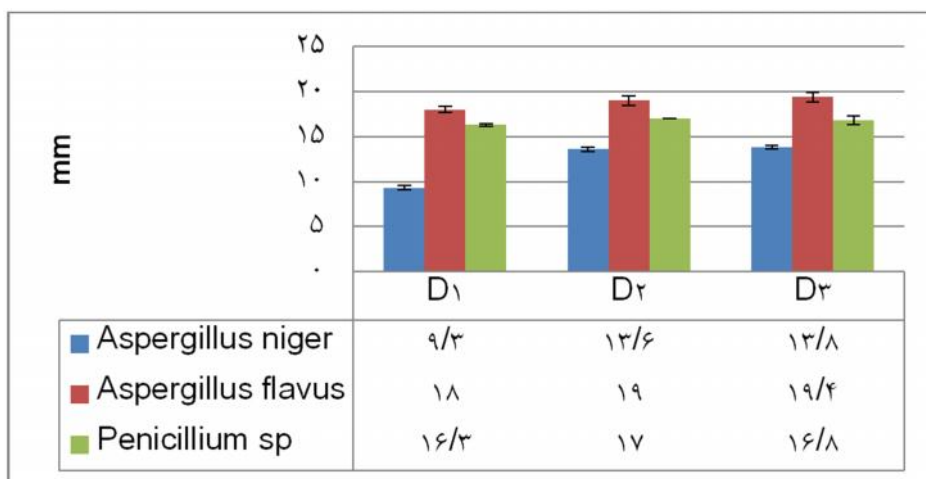
سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد به مدت ۳۵ روز در داخل انکوباتور، مشاهده شد که قارچ‌ها به کاغذ حمله کرده و سطح کاغذ را پوشانده‌اند. از این‌رو نتیجه این شد که کاغذ مورد استفاده عاری از هرگونه ماده‌ی ضد قارچ است. با توجه به شکل ۴، در هر سه نوع قارچ مورد مطالعه، کاغذ-های قرار گرفته در داخل پلیت مورد حمله‌ی قارچ‌ها قرار گرفته‌اند.

شکل ۴- تأثیر قارچ آسپرژیلوس فلاوس (راست)، *P. sp* (وسط) و *A. niger* (چپ) بر کاغذ بدون تیمار بعد از ۳۵ روز

تعیین میزان پایداری قارچ کش

منظور از تعیین میزان پایداری، در واقع مشاهده‌ی میزان تأثیر قارچ‌کش تیوفانات متیل بر روی قارچ‌های *A. niger* و *A. flavus* بعد از پیرسازی تسریعی دما-رطوبت است. هاله‌ی عدم رشد در نمونه‌های شاهد رشد شکل ۵ قابل مشاهده است. این نمودار، بعد از گذشت ۲۱ روز از کشت، نتایج را برحسب میلی‌متر نشان می‌دهد. در نمونه‌های $D1=50\text{ ppm}$ ، $D2=100\text{ ppm}$ و $D3=200\text{ ppm}$ هاله‌ی عدم رشدی به قطر $9/3$ ، $13/6$ و $138/8$ میلی‌متر دارد (شکل ۶). نمونه‌های $D1$ ، $D2$ و $D3$ در ظرف‌های حاوی قارچ *A. flavus* به ترتیب دارای

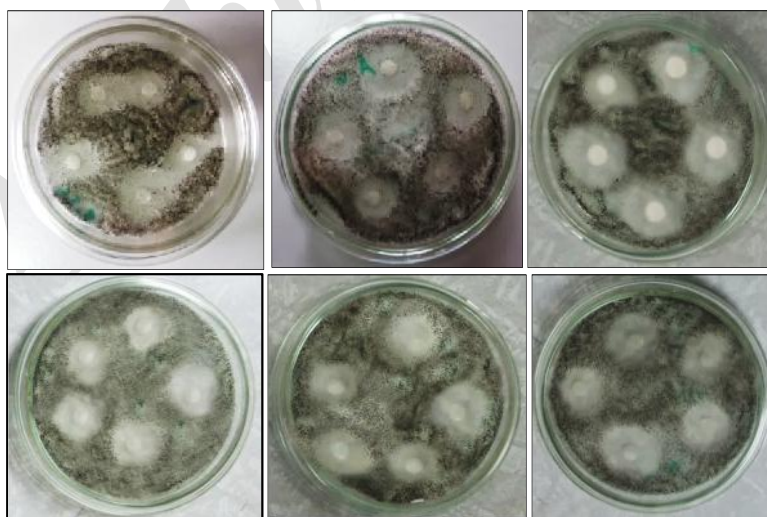
هاله‌ی عدم رشد به قطر ۱۸، ۱۹ و $19/4$ میلی‌متر در اطراف خود دارند (شکل ۷). قارچ *P. sp* نیز در غلظت‌های $D1$ ، $D2$ و $D3$ دارای هاله‌ی عدم رشد به قطر $16/3$ ، ۱۷ و $16/8$ میلی‌متر است (شکل ۸). این نتایج بیانگر آن است که تأثیرگذاری تیوفانات متیل بر قارچ *A. niger* و *A. flavus* بیشتر از *A. niger* است. این نتیجه قبلاً در محیط‌های آغشته به ماده‌ی تیوفانات متیل نیز به دست آمده بود. از این‌رو نتایج به دست آمده از هاله‌ی عدم رشد در این آزمون با نتایج حاصل شده از هاله‌ی رشد در آزمون قبلی مشابه هستند و این امر بیانگر تصدیق نتایج به دست آمده است.



شکل ۵- هاله عدم رشد در نمونه‌های شاهد تیمار (بدون پیرسازی) بعد از ۲۱ روز

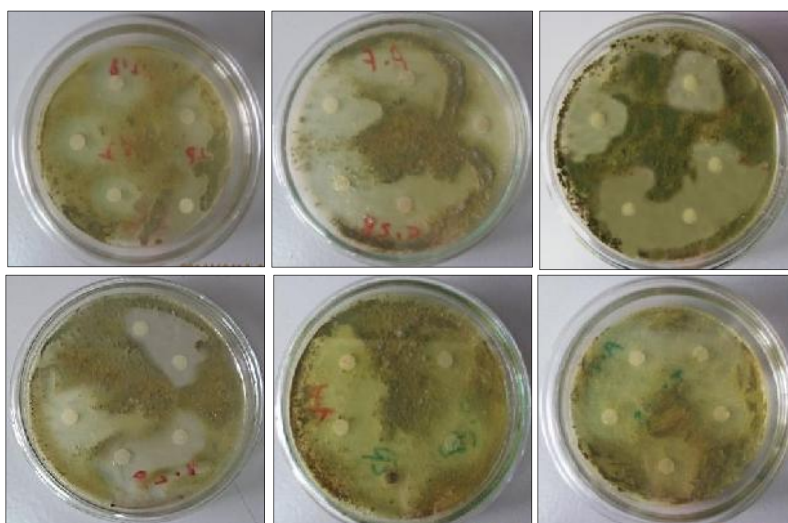
به طوری که بعد از پیرسازی میزان تأثیرگذاری تیوفانات متیل کاهش یا افزایش پیدا نکرد (شکل ۵ تا ۸). البته هاله‌ی عدم رشد در قارچ *A. niger* نسبت به قارچ‌های *A. flavus* و *P. sp* در کاغذهای تیمار شده، بعد از پیرسازی کمتر است (شکل ۹). هاله‌ی عدم رشد نمونه‌های تیمار بدون پیرسازی (D1، D2 و D3) نیز در قارچ *A. niger* نسبت دو قارچ دیگر کمتر است (شکل ۵).

مقایسه‌ی نتایج نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm (D1، D2 و D3) از ماده‌ی تیوفانات متیل قبل از قرارگیری در شرایط پیرسازی تسریعی دما-رطوبت، با نتایج نمونه‌های TA-12-D1، TA-12-D2 و TA-12-D3 که در شرایط پیرسازی قرار گرفته‌اند، در شکل ۹، نتیجه - می‌شود که نمونه‌های تیمار شده، بعد از پیرسازی همچنان قدرت تأثیرگذاری بر هر سه قارچ مورد بررسی را دارند.

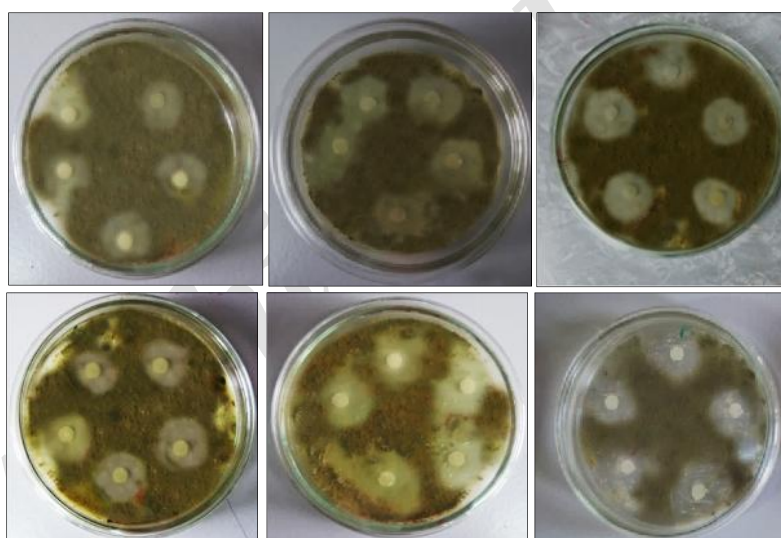


شکل ۶- هاله عدم رشد قارچ *A. niger*: بالا (کاغذ تیمار شده)، پایین (کاغذ تیمار شده پس از پیرسازی تسریعی)

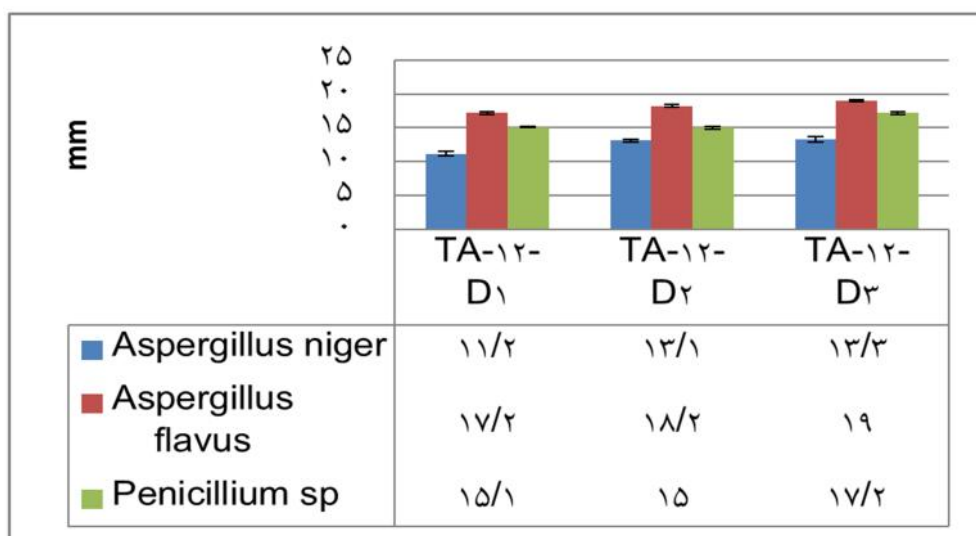
بعد از ۲۱ روز؛ از سمت چپ به راست: ۵۰ ppm، ۱۰۰ ppm، ۲۰۰ ppm



شکل ۷- هاله عدم رشد قارچ *A. flavus*: بالا (کاغذ تیمار شده)، پایین (کاغذ تیمار شده پس از پیرسازی تسریعی)
بعد از ۲۱ روز؛ از سمت چپ به راست: ۵۰ ppm، ۱۰۰ ppm، ۲۰۰ ppm



شکل ۸- هاله عدم رشد قارچ *P. sp*: بالا (کاغذ تیمار شده)، پایین (کاغذ تیمار شده پس از پیرسازی تسریعی)
بعد از ۲۱ روز؛ از سمت چپ به راست: ۵۰ ppm، ۱۰۰ ppm، ۲۰۰ ppm



شکل ۹- هاله عدم رشد قارچ‌های *A. niger*، *A. flavus* و *P. sp* (تیمار+پیرسازی) بعد از ۲۱ روز

بحث

یافته‌ها نشان داد که قدرت تأثیرگذاری تیوفانات متیل بر رشد قارچ‌های *A. niger*، *A. flavus* و *P. sp* قابل ملاحظه است. ارزیابی میزان رشد قارچ‌ها در محیط‌های حاوی قارچ‌کش، بیانگر میزان قدرت این قارچ‌کش در مهار قارچ است. درصد بازدارندگی تیوفانات متیل از رشد هر سه قارچ موردنظر، میزان تأثیرگذاری ماده را نشان می‌دهد. در غلظت‌های پایین، تیوفانات متیل قادر به کنترل کامل قارچ‌های *P. sp* و *A. flavus* است. اما درصد بازدارندگی آن در قارچ *A. niger* نسبت به دو قارچ دیگر کمتر است. قدرت تأثیرگذاری تیوفانات متیل بعد از طی فرایند پیرسازی تسریعی و در واقع با گذشت زمان، برجای مانده و توانایی مهار و کنترل قارچ را همچنان داراست. هاله‌ی عدم رشد ایجادشده در اطراف کاغذهای حاوی تیوفانات متیل، نشان از توانایی قارچ‌کش در پیشگیری از حمله‌ی قارچ به کاغذ دارد.

یکی از فاکتورهای خوب یک ماده‌ی قارچ‌کش در مرمت آثار کاغذی، توانایی حفاظت کاغذ در مدت زمان بیشتری است. قارچ‌کش تیوفانات متیل بعد از اعمال پیرسازی تسریعی بر کاغذهای حاوی تیوفانات متیل، پایدار بوده و تأثیر قارچ‌کشی آن پس از طی شرایط پیرسازی

باقی مانده است. نکته‌ی مهم در انتخاب یک قارچ‌کش در مرمت و حفاظت آثار کاغذی، قدرت تأثیرگذاری آن ماده در غلظت‌های پایین است. نتایج بیانگر تأثیر تیوفانات متیل در غلظت‌های پایین بر قارچ‌های مخرب کاغذ است. قارچ‌کش تیوفانات متیل در غلظت ۲۰۰ ppm توانایی کنترل کامل هر سه قارچ *A. niger*، *A. flavus* و *P. sp* را داشته و در غلظت‌های پایین‌تر از آن نیز مانعی برای رشد قارچ است. VanderKer در سال ۱۹۷۳ به تأثیرگذاری تیوفانات متیل بر قارچ در غلظت‌های پایین اشاره کرده‌است. با توجه به این مورد، این امر تأکیدی بر نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش می‌تواند باشد. بر اساس نتایج مطالعه‌ی قارچ‌کش‌های آزولی در زمینه حفاظت آثار کاغذی در سال ۱۹۹۹ توسط Rakotonirainy و همکاران، دریافتند که قارچ‌کش تیابندازول در قارچ‌زدایی بسیار خوب عمل کرده است و این نتیجه‌ی به‌دست‌آمده بیانگر قدرت قارچ‌کشی مواد آزولی است. از طرفی دیگر در سال ۱۹۹۷ Fabbri و همکاران، مطالعه‌ی مشابهی را انجام داده و تأثیرگذاری قارچ‌کش‌های گروه آزولی را با مواد دیگر بررسی کرده‌اند. نتایج مطالعه‌ی آنان نیز حکایت از قدرت برتری مواد گروه آزولی داشته و مواد miconazole (میکونازول) و econazole (اکنونازول) نیز بیشترین تأثیر بازدارندگی را

داشته‌اند.

موادی که در حفاظت و مرمت آثار تاریخی به‌ویژه در مبحث کاغذهای تاریخی برای قارچ‌زدایی در حال حاضر مورد استفاده هستند، یک سری معایب و آثار سوء از آنها در طی چندین سال مشاهده شده است. اکسید اتیلن با اینکه توانایی بهتری در قارچ‌زدایی دارد ولی کار با آن نیازمند مخازن و تجهیزات خاص و کاربران متخصص دارد، به همین دلیل تمامی کتابخانه‌ها و موزه‌ها امکان استفاده از آن را ندارند؛ بنابراین سهولت به‌کارگیری ماده‌ی قارچ‌کش نیز جزو ویژگی‌های مواد ضد عفونی‌کننده در مرمت و حفاظت کاغذ است. با توجه به این مسئله، استفاده از موادی که کاربرد آسانی داشته باشد در اولویت قرار خواهد گرفت. مواد دیگر همانند تیمول و فرمالدئید نیز تأثیرات مخربی در کاغذ داشته‌اند (Sequeira *et al.*, 2012; Hall, 1989) و کاربرد موادی که آثار با ارزش تاریخی را تحت تأثیر قرار دهد به هیچ عنوان جایز نیست. پلی هگزامتیلن گوانیدین که در ضد عفونی کاغذ کاربرد دارد توانایی کنترل برخی قارچ‌ها را در غلظت‌های پایین نداشته و نیاز به غلظت بیشتری از این ماده وجود دارد (Ghahri, 2006). این در حالی است که مواد مناسب در ضد عفونی آثار کاغذی باید در غلظت‌های پایین قدرت تأثیرگذاری داشته باشد. البته تیوفانات متیل بر اساس نتایج، قدرت کنترل قارچ‌های مطالعه شده را در غلظت‌های پایین دارد.

منابع مورد استفاده

- Vapours and other Alcohols on Fungi. *Restaurator*, 27(3), 186-199.
- Fabbri, A. A., Ricelli, A., Brasini, S., & Fanelli, C., 1997. Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *International biodeterioration & biodegradation*, 39(1), 61-65.
- Gallo, F., 1992. The role of biological factors in the erosion of paper. Translated by: Abbas Ali Abedi Ostad. Mashhad. Astan Ghods Razavi.
- Garg, K. L., 1995. Use of homoeopathic drugs as antifungal agent for the protection of books and paper materials. In *Biodeterioration of cultural property 3: proceedings of the 3rd international conference on biodeterioration of cultural property*, July 4-7, 1995, Bangkok, Thailand (pp. 104-115). Office of Archaeology and National Museums. Conservation Science Division.
- Ghahri, M., 2006, A review of fungal elements decaying paper, its pathology and prevention, restoration and research, Vol. 1, No. 1, 29-31.
- Ghahri, M., 2006, A review of fungal elements decaying paper, its pathology and prevention, restoration and research, Vol. 1, No. 1, 29-31
- Gisi, U., Kuck, K. H., Russell, P. E., & Lyr, H., 2005. Modern fungicides and antifungal compounds IV. Alton, Hampshire: BCPC.
- Gutarowska, B., Skora, J., Zduniak, K., & Rembisz, D., 2012. Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 7-17.
- Hadadi, M., Afsharpour, M., & Abed Esfahani, A., 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles: Study of Protective Effects on the Display and Storage Boxes. *The Journal of maremate asar & bafthaye tarikhifarhangi*, Vol 2, No 3, 38-29
- Hirschfeld, T., Ellner, F., Buschhaus, H., Goßmann, M., & Büttner, C., 2010. Investigations in the mode of action of thiophanate-methyl in *Fusarium* spp. *Vom Lebensmittel zum Genussmittel—was essen wir morgen*, 262-264.
- Holik, H. (Ed.), 2006. Handbook of paper and board. John Wiley & Sons.
- Imani, S., Afsharpour, M., & Abed Esfahani, A. (2010). Application of nano zinc oxide structures to conservation of paper artwork. M.A.Thesis, Art University of Isfahan, Faculty of conservation and restoration, Department of conservation and restoration of historic and cultural.
- ISIRI 18443, 2014. Pesticides- Fungicides- Thiophanate-Methyl- Specifications, Institute of Standards and Industrial Research of Iran.
- ISIRI 3194, 2006. Food microbiology –Heat resistant molds -Detection method of spore, Institute of
- Adelantado, C., Bello, C., Borrell, A., & Calvo, M.A., 2005. Evaluation of the antifungal activity of products used for disinfecting documents on paper in archives. *Restaurator*, 26(4), 235-238.
- Arai, H., 2000. Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(3), 181-188.
- Ariyafar, A.A., Samanian, K., & Afsharpour, M., 2016. Carboxymethyl cellulose (CMC) optimization against microorganisms agents by using titanium dioxide nanoparticles to enhance the quality of conservation of this polymer in the restoration of paper documents. *The Journal of Ganjineh-ye Asnad*. No97. 116-140
- Bacilkova, B., 2006. Study on the Effect of Butanol

- Nittérus, M., 2000. Fungi in archives and libraries. *Restaurator*, 21(1), 25-40.
- Rakotonirainy, M. S., Fohrer, F., & Flieder, F., 1999. Research on fungicides for aerial disinfection by thermal fogging in libraries and archives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(2), 133-139.
- Reis-Menezes, A.A., Gambale, W., Giudice, M.C., & Shirakawa, M.A., 2011. Accelerated testing of mold growth on traditional and recycled book paper. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(3), 423-428.
- Roman, C., Diaconescu, R., Scripcariu, L., & Grigoriu, A., 2013. Biocides used in preservation, restoration and conservation of the paper. *European Journal of Science and Theology*, 9(4), 263-271.
- Sequeira, S., Cabrita, E.J., & Macedo, M.F., 2012. Antifungals on paper conservation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 67-86.
- Van der Kerk, G.J.M., 1973. Chemical and biochemical aspects of systemic fungicides. *EPPO Bulletin*, 2(10), 5-21.
- Velikova, T., Trepova, E., & Rozen, T., 2011. The use of biocides for the protection of library documents: before and now. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* A. Méndez-Vilas (Ed.), FORMATEX, 152-159
- Weaver-Meyers, P.L., Stolt, W.A., & Kowaleski, B., 1998. Controlling mold on library materials with chlorine dioxide: an eight-year case study. *The Journal of academic librarianship*, 24(6), 455-458.
- Zyska, B., 1997. Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(1), 43-51.
- Standards and Industrial Research of Iran.
- ISIRI 4706, 1377. paper and board - accelerated ageing Part 3: moist heatn treatment at 80°C and 65% relative humidity, Institute of Standards and Industrial Research of Iran.
- ISIRI 9488, 2007. Textile fabrics Evaluation of antibacterial activity by agar diffusion method, Institute of Standards and Industrial Research of Iran.
- ISIRI 9899, 2016. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations, Institute of Standards and Industrial Research of Iran.
- Krieger, R., 2010. Hayes' handbook of pesticide toxicology (Vol. 1). Academic press.
- Manente, S., Micheluz, A., Ganzerla, R., Ravagnan, G., & Gambaro, A., 2012. Chemical and biological characterization of paper: A case study using a proposed methodological approach. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 99-108.
- McCleary, J.M., 1987. Vacuum Freeze-Drying, a Method Used To Salvage Water-Damaged Archival and Library Materials: A RAMP Study with Guidelines. Translated By: Fatemeh Ghodrati, Hamideh Hojati, Records deterioration factors preservation and restoration methods, National Library and Archives of I.R of Iran.
- Mesquita, N., Portugal, A., Videira, S., Rodríguez-Echeverría, S., Bandeira, A. M. L., Santos, M. J. A., & Freitas, H., 2009. Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(5), 626-629.
- Nauha, E., Saxell, H., Nissinen, M., Kolehmainen, E., Schafer, A., & Schlecker, R., 2009. Polymorphism and versatile solvate formation of thiophanate-methyl. *CrystEngComm*, 11(11), 2536-2547.

The assessment of antifungal effect of thiophanate-methyl on paper deteriorating fungi and its application in conservation paper works

M. Abdolalizadeh^{1*}, M. Azadi Boyaghchi², M. Mohammadi Achachluei³
and M. Mohammadypour⁴

1*-Corresponding author, M.Sc., Conservation of Historical and Cultural Properties, Faculty of conservation, Art University of Isfahan, Tabriz, Iran, Email: mahboob9067@yahoo.com

2-Assistant Professor, Conservation of Historical and Cultural Properties, Faculty of conservation, Art University of Isfahan, Isfahan, Iran

3-Assistant Professor, Conservation of Historical and Cultural Properties, Faculty of conservation, Art University of Isfahan, Isfahan, Iran

4-Research Faculty Member, Researches of Entomology and Phytopathology, East Azarbaijan Research Center for Agriculture and Natural Resources, Tabriz, Iran

Received: March, 2017

Accepted: Aug., 2017

Abstract

Paper works are severely attacked by biological agents such as fungi, bacteria and insects due to its organic nature and in archives, most of the biological destruction of paper is caused by fungi. The importance of paper works conservation has led to applying different methods to fungus removal. The chemical disinfection is the most common disinfection methods. In this research, the application of Thiophanate methyl in elimination of paper destructive fungi has been studied. Laboratory studies to evaluate the effects of Thiophanate methyl on paper and fungus included accelerated ageing, the evaluation of effectiveness of antifungal Thiophanate methyl on fungi such as *Aspergillusniger*, *Aspergillusflavus* and *Penicilliumsp* and determination of antifungal stability after accelerated ageing. Examination shows that Thiophanate methyl has successfully prevented spread of fungus upon dosages of 10, 50, 100,200 and 500 ppm. *Aspergillus flavus* fungus had a slight growth at 10 ppm, but no growth was observed in other dosages. *Aspergillusniger* fungus had no growth capacity in dosages more than 100 ppm. According to the results, treated papers are still able to control fungus growth after accelerated ageing condition. In general, the results obtained by fungus growth halo and non-growth halo indicate that all fungi are controllable in dosage of 200 ppm.

Keywords: Paper, thiophanate methyl, fungus cultivation, ageing condition, conservation and restoration.