فصلنامه علمی – پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران
شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/IJWPR.2017.107594
جلد ۳۲، شماره ۱، صفحه ۱۴۴-۱۳۱، (۱۳۹۶)

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

جواهر چعباوی‌زاده [۱]، حسین احمدی[۲]، محسن محمدی آچاچلویی[۳] و مهشید شیردوانی[۴*]

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

۲- دانشیار، عضو هیئت‌علمی دانشکده مرمت، دانشگاه هنر اصفهان، ایران

۳- استادیار، عضو هیئت‌علمی دانشکده مرمت، دانشگاه هنر اصفهان، ایران

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

پست الکترونیک: mahshid_shirdavani@yahoo.com

تاریخ دریافت:خرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

چکیده

بخش قابل‌توجهی از تاریخ و فرهنگ بشر به‌صورت 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، پنیسیلیوم 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 هریک از جدایه‌ها بر کاغذ، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. طرح آزمایش مورد استفاده برای سنجش مقاومت قارچی کاغذهای تیمار شده بر اساس استانداردASTM 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 پنیسیلیوم 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 افزایش‌یافته است. ۱۰۰٪ بازدارندگی و عدم رشد برای پنیسیلیوم در کاغذهای تیمار شده با غلظت≤ ۱۲/۵ppm، برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم در کاغذهای تیمار شده با غلظت≤ ۵۰ ppm و برای گونه آسپرژیلوس نایجر در کاغذهای تیمار شده با غلظت۱۰۰ ppm مشاهده شد.

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

مقدمه

آثار کاغذی به‌عنوان بخش قابل‌ملاحظه‌ای 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 ازجمله 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; Seqeira *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 نه‌تنها به دلیل آسیب ایجاد شده، بلکه به دلیل فقدان گزینه‌های دردسترس و بی‌خطر در پیشگیری و درمان این آسیب‌ها می‌باشد که مشکل عمده‌ای در حفاظت آثار کاغذی به‌شمارمی‌رود. از روش‌های شناخته‌شده 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. بااین‌حال 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.

به‌منظور 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 تعدیل‌شده 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 انتخاب‌شده‌اند(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 شناخته‌شده است. طیف فعالیت این ماده وسیع بوده و هم‌زمان به‌صورت 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).

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) به‌منظور بررسی و تعیین روش‌های کنترل پوسیدگی میوه انار در انبار، تأثیر شش نوع ماده مختلف ضدعفونی 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 آسپرژیلوس و پنیسیلیوم بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که بنومیل در درجه دوم پس از سدیم هیپوکلریت بیشترین میزان کارآیی را در کنترل آلودگی و کاهش پوسیدگی‌های انباری انار داشته‌است. 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 اگزیسپویروم مورد مطالعه قرار دادند. در بررسی مربوط به اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر بیماری پژمردگی نخود ایرانی با عامل فوساریوم اگزیسپویروم 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 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 گلوزیداز قارچ فوساریوم اگزیسپوریوم جداسازی شده از اسناد تاریخی بررسی کردند. نتایج نشان‌دهنده تأثیر بازدارندگی بنومیل بود. همچنین به‌کارگیری این ماده بر نمونه‌های کاغذ پاپیروس 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]، آسپرژیلوس نایجر[۶] و هورمودندروم 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 آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، پنیسیلیوم و کلادوسپوریوم، جداسازی شده از کاغذهای تاریخی و نسخ خطی بررسی و حداقل غلظت بازدارندگی بنومیل برای هریک از جدایه‌ها بر کاغذ تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، پایین‌ترین غلظت ماده ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی است. MIC یکی از رایج‌ترین مقیاس‌ها در سنجش کارآیی یک ماده ضدمیکروبی برای میکروارگانیسم‌هاست (Andrews, 2001).

تأثیر ضدقارچی بنومیل بر جدایه‌های قارچی مورد مطالعه بر کاغذ فیلتر سنجیده شد. به‌منظور مشابه‌سازی شرایط نمونه‌های کاغذ مورد مطالعه به کاغذهای تاریخی، نمونه‌ها تحت پیرسازی تسریعی قرارگرفتند. 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 شناخته‌شده بوده (جدول ۱) و استفاده از آن در پژوهش‌های مشابه بر روی سایر مواد متداول است (Seqeira et al., 2012). در این پژوهش از بنومیل ٪۹۵ محصول شرکت Shenzhe agroland chemicals و اتانول ٪۹۶ به‌عنوان 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

به‌منظور 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.

انتخاب نمونه‌های قارچ

نمونه‌های قارچ استفاده شده در این پژوهش از صفحه-های 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؛ به‌این‌ترتیب که لایه نازکی از کاغذ در محل آلوده به‌وسیله تیغ و پنس استریل جداسازی شده، در ظرف نمونه‌گیری استریل قرار گرفت و بعد در شرایط کاملاً استریل در آزمایشگاه به محیط کشت سابرو دکستروز آگار انتقال یافت. پس از ۲۴-۴۸ ساعت نمونه‌ها از نظر تولید کلنی قارچی بررسی شدند و به‌مدت دو هفته در انکوباتور در دمای ۲۷±۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٪۷۵ قرارگرفته و هر روز از نظر ایجاد هرگونه تغییر بررسی گردیدند. شناسایی قارچ‌ها با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی ازجمله شکل، رنگ و قوام کلنی و نیز بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی به روش تهیه یک لام مستقیم با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو و درنهایت روش *slide culture* با میکروسکوپ نوری عبوری (CTS.Lot No: 29003) انجام شد. به‌منظور 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 ۵×۱۰^{۵} cfu/ml *(colony-forming unit)* تهیه شد.

روش ارزیابی مقاومت کاغذهای تیمار شده نسبت به قارچ و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی

در این پژوهش به‌منظور 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 براساس استاندارد ASTM D 2020-92 (2003) انجام گردید. این آزمون مقاومت کاغذ و مقوا، به‌ویژه نمونه‌هایی

را که تحت تیمارهای ضدقارچ قرارگرفته‌اند، در برابر رشد قارچ مشخص می‌کند. ابتدا کشت خالص از هریک از قارچ‌ها بر روی محیط کشت PDA در دمای ۳±۲۷ درجه سانتی‌گراد آماده شد. سپس برای تهیه سوسپانسیون اسپور، از کلنی خالص، کشت‌های تازه (۴۸-۲۴ ساعته) در لوله‌های استریل حاوی محیط کشت PDA تهیه شد. سپس به جدایه‌های رشدکرده 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 فالکون ۵۰ ml منتقل و به‌مدت 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 ۵×۱۰^{۵} 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 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 ۳±۲۷ 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 به‌وسیله 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 (مهار رشد) بر اساس قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری شده بر طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

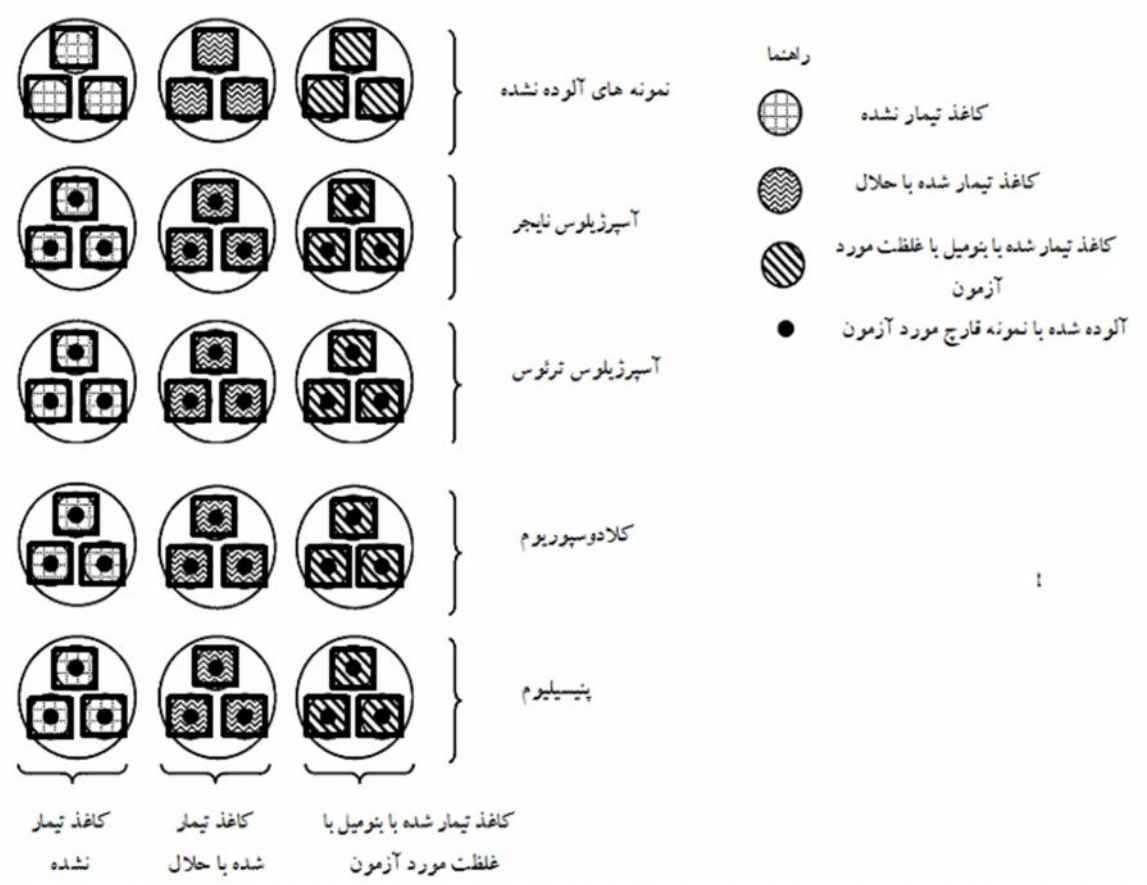
$$\text{درصد بازدارندگی}\% = \frac{Dc-Dt}{Dc} \quad \text{(رابطه ۱)}$$

D_c: میانگین قطر کلنی قارچ در نمونه کنترل برحسب سانتی‌متر

D_t: میانگین قطر کلنی در نمونه تیمار شده برحسب سانتی‌متر

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

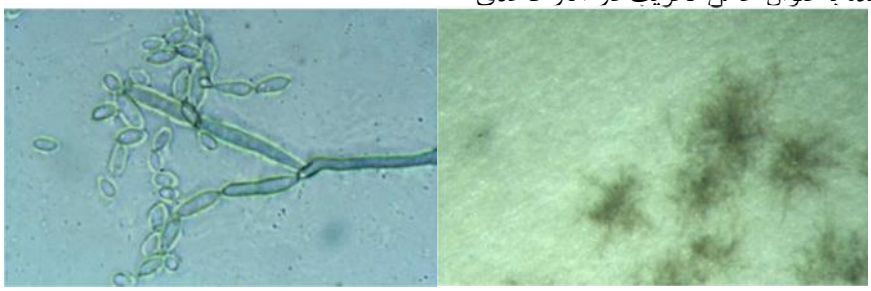
در این پژوهش برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و ارائه نتایج از نمودار، آمار توصیفی و آمار استنباطی استفاده شده است. برای تحلیل نتایج داده‌های مربوط به بررسی کارآیی بنومیل برای مهار آلودگی قارچی در نمونه‌های کاغذ پیرسازی شده، مدل‌های خطی تک متغیره *(GLM. Univariate)* و تحلیل واریانس تک متغیره به‌کارگرفته شده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



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

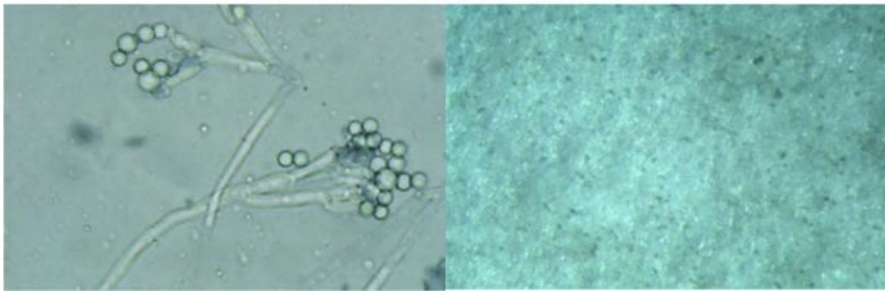
شناسایی قارچ‌های جداسازی شده از مجموعه‌های آلوده

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



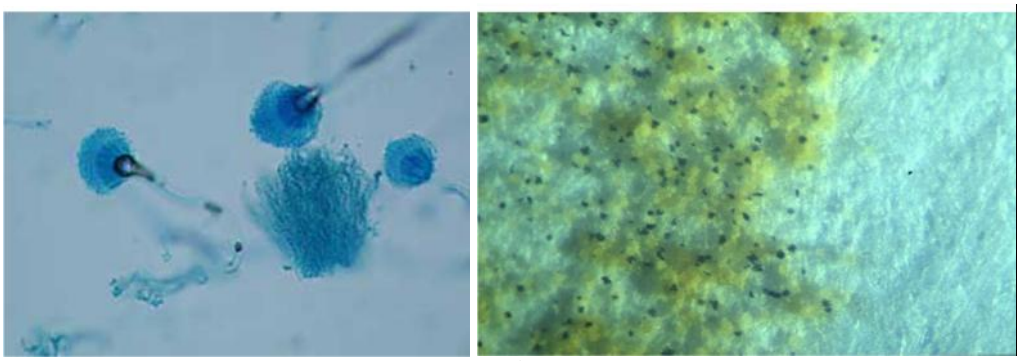
شکل ۲- تصویر میکروسکوپی قارچ کلادوسپوریوم شناسایی شده

کلنی سبز زیتونی مایل به خاکستری و میسلیوم ضخیم، دارای انشعاب و تیغهٔ عرضی است (بزرگنمایی **400x**).



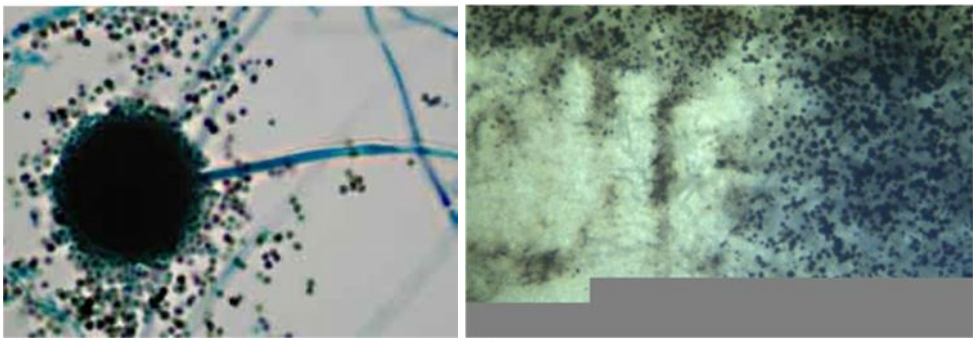
شکل ۳- تصویر میکروسکوپی قارچ پنیسیلیوم شناسایی شده

کلنی قارچ به رنگ سبز تیره و سطح مخملی. میسلیوم همراه با دیواره عرضی (بزرگنمایی **400x**)



شکل ۴- تصویر میکروسکوپی آسپرژیلوس ترئوس شناسایی شده

کلنی کرکی ابتدا سفید بوده و بعد به رنگ خردلی یا قهوه‌ای درمی‌آید. دارای میسلیوم همراه با دیواره و کونیدیوفوراست، که کونیدیوفور در انتها به یک وزیکول تقریباً کشیده و گرد ختم می‌شود (بزرگنمایی **400x**).



شکل ۵- تصویر میکروسکوپی آسپرژیلوس نایجر شناسایی شده

کلنی سیاه رنگ به‌صورت دانه‌های سیاه رنگ و حالت پودری، وزیکول دایره‌ای، میسلیوم شفاف و کونیدیا به شکل کروی با لبه‌های کنگره‌ای شکل و اسپورها تیره رنگ دیده می‌شوند (بزرگنمایی **400x**).

نتایج آزمون‌های آماری تفاوت قطر کلنی بین کاغذهای شاهد و تیمار

نتایج آزمون‌های تحلیل واریانس تک متغیره انجام شده در سطح معناداری ۰/۰۵٪ به‌منظور بررسی معناداری تفاوت قطر رشد کلنی بین نمونه‌های شاهد و کاغذهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنومیل برای هریک از جدایه‌های قارچی (جدول۲) 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 ppm، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ سبب کاهش معنادار قطر کلنی قارچ

آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، کلادوسپوریوم و پنیسیلیوم 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 کاغذهای تیمار شده با غلظتppm ۳/۱۲۵ بنومیل در اتانول اختلاف معنادار مشاهده نشد. درحالی‌که در قطر کلنی پنیسیلیوم بر کاغذهای تیمار شده با این غلظت نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش معنادار مشاهده شد.

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

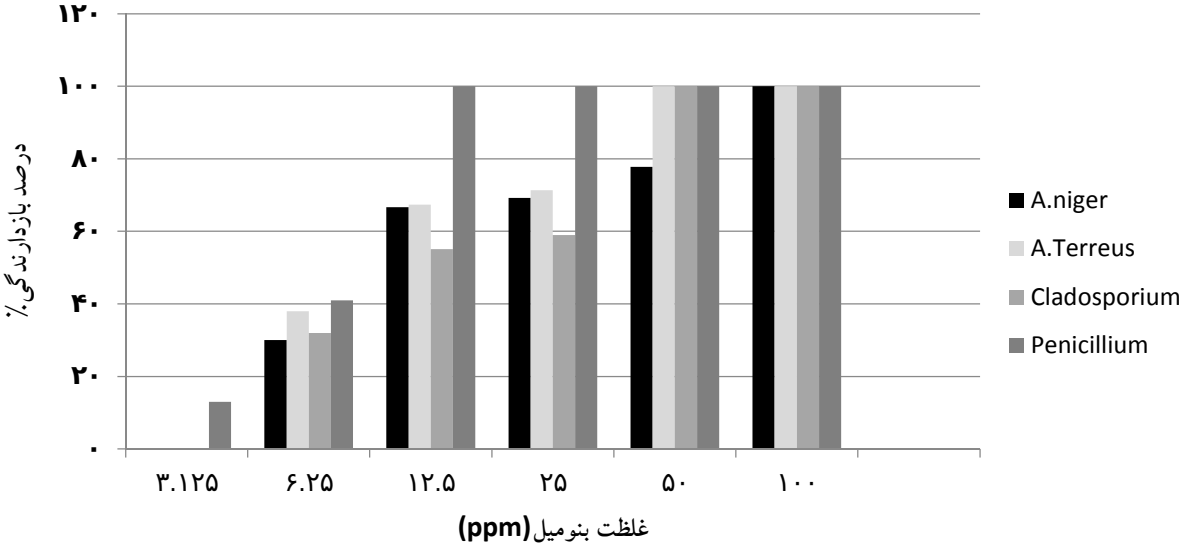
		۳/۱۲۵ ppm	۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۲۵ ppm	۵۰ ppm	۱۰۰ ppm	خطای استاندارد
آسپرژیلوس نایجر	میانگین اختلاف‌های دو گروه	۰/۱۰۳۳	۰/۳۵۳۳	۰/۷۰۳۳	۱/۰۰۰۰	۱/۱۴۰۰	۲/۶۰۶۷	۰/۰۶۱۶۷
	مقدار معناداری	۰/۷۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	
آسپرژیلوس ترئوس	میانگین اختلاف‌های دو گروه	۰/۱۹۳۳	۰/۰۵۶۷	۰/۵۶۷۶	۱/۳۵۳۳	۲/۰۳۰۰	۲/۰۳۰۰	۰/۰۹۶۷۷
	مقدار معناداری	۰/۵۱۲	۰/۰۲۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	
کلادوسپوریوم	میانگین اختلاف‌های دو گروه	۰/۱۳۳۳	۰/۴۴۶۷	۱/۲۳۶۷	۱/۸۶۰۰	۲/۴۶۰۰	۲/۴۶۰۰	۰/۱۶۹۵۹
	مقدار معناداری	۰/۹۹۲	۰/۲۱۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	
پنیسیلیوم	میانگین اختلاف‌های دو گروه	۰/۴۵۶۷	۰/۹۴۶۷	۲/۴۱۶۷	۲/۴۱۶۷	۲/۴۱۶۷	۲/۴۱۶۷	۰/۰۴۸۴۲
	مقدار معناداری	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	

درصد بازدارندگی تیمار بنومیل در اتانول

بر اساس فرمول پیشنهادی استاندارد-ASTM D 2020 92، درصد بازدارندگی غلظت‌های تیمار الکلی بنومیل برای هر قارچ در کاغذ محاسبه گردید (جدول۳ و شکل۶). 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. درحالی‌که رشد پنیسیلیوم 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 افزایش‌یافته است. بازدارندگی غلظت ۱۰۰ ppm برای همه جدایه‌های قارچی مورد مطالعه ۱۰۰٪ بود و رشد هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی بر کاغذ مشاهده نشد.

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

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



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

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تیمار بنومیل در اتانول در کاغذ

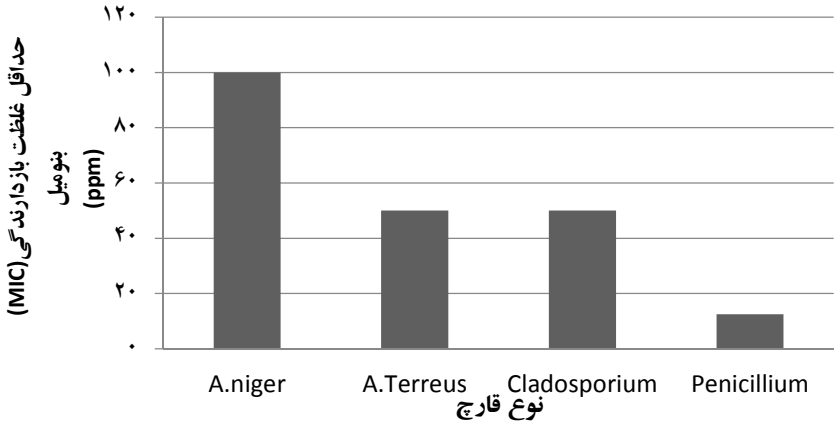
نتایج حاصل از بررسی رشد قارچ‌ها بر کاغذ پس از ۲۱ روز (جدول۴، شکل ۸ تا ۱۱) نشان می‌دهد که همه قارچ‌های مورد آزمون نسبت به بنومیل حساس بوده و در غلظت ۱۰۰ ppm رشد هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. جنس پنیسیلیوم کمترین MIC را برابر با ۱۲/۵ppm و گونه آسپرژیلوس نایجر بیشترین MIC را برابر با ۱۰۰ppm داشتند. میزان MIC به‌دست‌آمده برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم ۵۰ppm بود (جدول۵ و شکل۷). آسپرژیلوس نایجر کمترین حساسیت را در بین نمونه‌های مورد آزمون از خود نشان داد و پنیسیلیوم نسبت به سایر نمونه‌ها حساسیت بیشتری داشت.

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

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

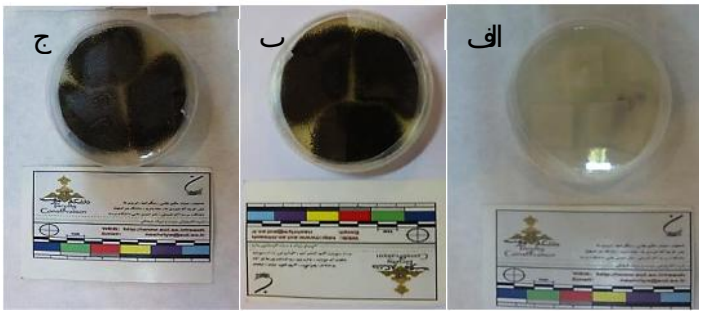
(+) مشاهده رشد قارچ — کنترل مثبت: محیط کشت + سوسپانسیون اسپور

(–) عدم مشاهده رشد قارچ — کنترل منفی: محیط کشت بدون تلقیح سوسپانسیون اسپور

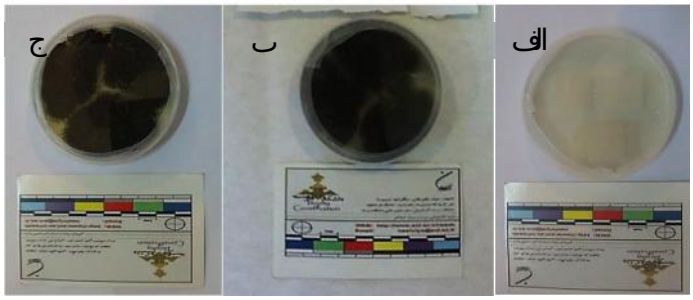


شکل ۷- نمودار نتایج حداقل غلظت بازدارندگی **(MIC)** بنومیل براری نمونه‌های قارچ مورد آزمون

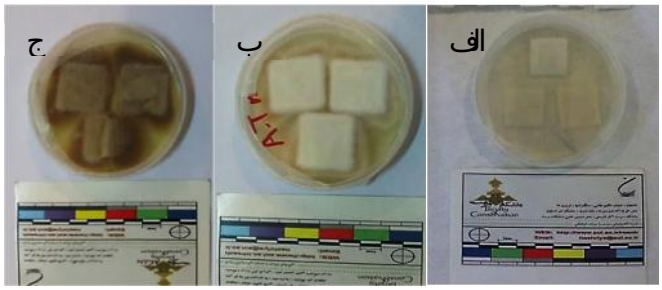
شکل ۸- میزان رشد پنیسیلیوم بر کاغذ پس از ۲۱ روز: الف- کاغذ تیمارشده با غلظت **۲۵ ppm** بنومیل، ب- کاغذ تیمار شده با اتانول، ج- کاغذ تیمار نشده



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



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



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

بحث

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 بنزیمیدازول‌ها پژوهش‌های زیادی انجام شده است. تکنیک‌های بیولوژی مولکولی به‌کاررفته در تحقیقات، بتاتوبولین را به‌عنوان جایگاه هدف تأیید کرده است. در میکروتوبول‌ها به‌طور متناوب مارپیچ‌های 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

متافاز قطع می‌کنند. دوک میتوزی از شکل طبیعی خارج شده و هسته‌های دختری از هم جدا نمی‌شوند، درنتیجه سلول می‌میرد. با وجود مقدار زیاد بتا_توبولین در همه موجودات یوکاریوت، بنزیمیدازول‌ها دارای خاصیت انتخابی بالایی هستند. اساس انتخابی بودن فعالیت آنها شناخته‌شده نیست ولی ممکن است به تفاوت‌های ساختمانی در جایگاه‌های ترکیبی میکروتوبول‌ها وابسته باشد (Pedregosa *et al.*, 1995).

در این پژوهش مقاومت قارچی کاغذهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنومیل نسبت به چهار جدایه قارچی رایج به‌عنوان عامل تخریب در آثار کاغذی بررسی شد. قارچ‌های مورد بررسی از صفحه‌های کاغذی نسخه‌ها و کتاب‌های آلوده جداسازی و شناسایی شدند. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف بنومیل برای رشد جدایه‌های قارچی بر کاغذهای تیمار شده و حداقل غلظت بازدارندگی برای هر قارچ بر کاغذ تعیین شد.

نتایج آزمون بازدارندگی رشد برای کاغذهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنومیل نشان داد که تیمار کاغذ با محلول بنومیل در اتانول با غلظت ۳/۱۲۵ppm در مهار رشد آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم بر کاغذ هیچ تأثیری نداشته و درصد بازدارندگی آن صفر بوده است. درحالی‌که رشد پنیسیلیوم 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 رشد محلول بنومیل در اتانول با غلظت- ۱۰۰ ppm برای همه جدایه‌های قارچی مورد مطالعه ۱۰۰٪ بود و در کاغذهای تیمار شده با این غلظت، رشد هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی مشاهده نشد.

نتایج حاصل از بررسی رشد قارچ‌ها پس از ۲۱ روز نشان داد که همه قارچ‌های مورد آزمون نسبت به بنومیل حساس بودند. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد برای جدایه‌های قارچی مورد آزمون بر کاغذ متفاوت بود. جنس پنیسیلیوم کمترین MIC را برابر با ۱۲/۵ppm و گونه آسپرژیلوس نایجر بیشترین MIC را برابر با ۱۰۰ppm داشتند. میزان MIC به‌دست‌آمده برای آسپرژیلوس ترئوس و کلادوسپوریوم ۵۰ppm بود. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که آسپرژیلوس نایجر کمترین حساسیت را در بین جدایه‌های قارچی مورد آزمون از خود نشان داد و پنیسیلیوم نسبت به سایر نمونه‌ها حساسیت بیشتری داشت.

MIC به‌دست‌آمده برای آسپرژیلوس نایجر ۱۰۰ ppm بود که مشابه نتیجه به‌دست‌آمده توسط Elnaggar و همکاران (۲۰۱۰) برای نمونه آسپرژیلوس نایجر جداسازی شده از یک مومیایی مصری است. در این پژوهش تأثیر بنومیل و چند قارچ‌کش دیگر بر نمونه قارچ‌های جداسازی شده از یک مومیایی مورد بررسی قرارگرفته است. نتایج نشان داد که پنی- سیلیوم کوریلوفیلیوم در غلظت۶/۲۵ ppm بنومیل و آسپرژیلوس نایجر و هورمودندروم ویرید در غلظت ۱۰۰ ppm بنومیل رشد نداشتند (Elnaggar, 2010). نتایج به‌دست‌آمده توسط وی در تعیین حداقل غلظت بازدارندگی بنومیل برای آسپرژیلوس نایجر با این مطالعه همسو می‌باشد.

در این پژوهش MIC به‌دست‌آمده برای پنیلیسیوم ppm ۱۲/۵ بود. این در حالی است که در پژوهش‌های دیگر انجام شده غلظت‌های به‌دست‌آمده از بنومیل برای کنترل رشد این نمونه متفاوت بوده است. در پژوهشی به‌منظور بررسی و تعیین روش‌های کنترل پوسیدگی میوه انار در انبار، تأثیر شش نوع ماده مختلف ضدعفونی شامل بنومیل، محلول کلسیم کلرید، سدیم هیپوکلریت، اکسی کلرور مس، تیابندازول و واکس را بر روی گونه‌های آسپرژیلوس و پنیسیلیوم بررسی کردند. نتایج نشان داد که بنومیل در درجه دوم پس از سدیم هیپوکلریت بیشترین میزان کارآیی را در کنترل آلودگی و کاهش پوسیدگی‌های انباری انار داشته- است. این ماده در غلظت ۱۵ ppm مانع رشد پنیسیلیوم شده بود (Shakeri, 2007). نتایج به‌دست‌آمده توسط وی با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش هم‌خوانی دارد. در پژوهش Elnaggar و همکاران (۲۰۱۰) پنی‌سیلیوم کوریلوفیلیوم در غلظت ۶/۲۵ ppm از بنومیل رشد نداشته است. Sahab و همکارانش (۲۰۱۲) نیز 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 در غلظت ۱۲/۵ ppm، پنیسیلیوم 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 "متیل۱-بوتیل آمین بنزیمیدازول-۲-ایل کاربامات" که با نام تجاری بنومیل شناخته‌شده است در غلظت ۱۰۰ppm در اتانول قابلیت مهار رشد جنس‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و گونه‌های پنیسیلیوم و کلادوسپوریوم را در کاغذ دارد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، همچنین طیف فعالیت گسترده بنومیل، تأثیر همزمان به‌صورت معالجه‌ای و حفاظتی، در دسترس و کم‌هزینه بودن و سمیّت ضعیف برای انسان و دام می‌توان بنومیل را به‌عنوان 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 Deterioration. e-conservation magazine, 16: 39-49.

-Gallo, F., 2010. Aerobiological research and problems in libraries: 61-74. In: Mitchell, R. and Mc namara, 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 & pazhouhesh, 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. pestcide Biochemistry and Physiologo, 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 fungies 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 diffrent 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 degradiation by som fungi. Zentralblant fur Mikrobiologie, 147(5): 329-339.

-Seqeira, 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.

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

J. Chabavizadeh[1], H. Ahmadi[2], M. Mohammadi achachlouei[3] 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-orgaisms 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.