New Strategies in the Conservation of Cultural Heritage from Microbial Deterioration

Parisa Mohammadi [1*], Mina Noorollah[2]

1. Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

2. PhD Candidate in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

Abstract

Microbial colonization of cultural heritage objects is inevitable. Microorganisms cause physical, chemical, and aesthetic alteration in valuable works of art, leading to the loss of both financial and cultural value. To prevent and control microbial colonization and their growths, physical, chemical, and biological methods are used. However, physicochemical methods are often ineffective on treated works of art, and can be dangerous for people involved in the conservation process. Due to inherent characteristics, chemical compounds and biocides, they are hazardous for humans, animals, and the environment. Given the significant weaknesses of these conventional methods, new approaches are continuously being developed to reduce the negative impact of deteriogenic microorganisms. These new approaches are environmentally friendly, safe, low-cost and low-risk. However, more research is needed to monitor the safety and effectiveness of these approaches. The lack of simple, reliable and standard measurements remains a limitation in the selection of effective treatments. Field experiments are necessary and useful for evaluating the effectiveness of these methods: however, their design and implementation face several challenges. Therefore, researchers are seeking to develop methods to investigate how these new approaches work. Laboratory model systems are tools for testing the efficacy of antimicrobial compounds before field application on art works. In this study, we will first review the types of biological control methods, and then introduce the new and environmentally friendly approaches, that have been developed in this field. Finally, we will discuss methods of testing the effectiveness of new strategies using laboratory model systems.

Keywords: Biodeterioration, Biocide, Biofilm, Biological Cleaning, Lab Modelling.

Knowledge of Conservation and Restoration

Vol. 4(4) No.10

March 2022

https://kcr.richt.ir

Pages: 1 to 16

Corresponding Author

Parisa Mohammadi

Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

Email
P.mohammadi@alzahra.ac.ir

Copyright © 2020,Knowledge of Conservation and Restoration. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0. International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

راهکارهای نوین در حفاظت میراث فرهنگی از فرسودگی میکروبی

پریسا محمدی[1*]، مینا نوراله [2]

۱. استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

۲. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

چکیده

رشد میکروبی روی آثار باستانی و بناهای تاریخی اجتناب ناپذیر است. میکروارگانیسم‌ها آسیب‌های فیزیکی، شیمیایی و زیباشناختی در آثار با ارزش هنری به‌جای می‌گذارند که منجر به از دست رفتن بخش قابل توجهی از ارزش فرهنگی و مالی این آثار می‌شود. به‌منظور پیشگیری و کنترل استقرار و رشد میکروبی، از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی استفاده می‌شود. روش‌های فیزیکوشیمیایی اغلب روی آثار هنری تیمار شده کم اثر و برای افرادی که در فرآیند حفاظت شرکت دارند خطرناک هستند. به دلیل ویژگی‌های ذاتی مواد شیمیایی و آفت‌کش‌ها، این چنین ترکیباتی برای انسان، حیوانات و محیط زیست خطر آفرین هستند. از آنجایی‌که این روش‌ها همگی دارای نقاط ضعف قابل توجه هستند، امروزه برای کاهش تأثیر منفی میکروارگانیسم‌ها روی آثار هنری و باستانی، رویکردهای جدیدی به طور مداوم در حال توسعه هستند. این رویکردهای جدید سازگار با محیط زیست، ایمن، کم‌هزینه و کم‌خطر هستند. با این حال، تحقیقات بیشتری برای اطمینان از ایمنی و اثربخشی این رویکردها مورد نیاز است. فقدان سنجش‌های ساده، قابل اعتماد و استاندارد به‌عنوان محدودیتی در انتخاب تیمارهای مؤثر هنوز مطرح است. آزمایش‌های میدانی به‌منظور ارزیابی اثربخشی این رویکردها مفید و ضروری هستند، با وجود این، طراحی و اجرای آن‌ها با چالش‌های متعددی مواجه است. از این‌رو محققین به دنبال معرفی روش‌هایی برای ارزیابی کارآمدی این رویکردهای جدید هستند. استفاده از سیستم‌های مدل آزمایشگاهی، ابزارهایی برای آزمایش اثربخشی ترکیبات ضد میکروبی قبل از کاربرد این ترکیبات در مطالعات میدانی و روی آثار هستند. در این مطالعه، ابتدا مروری بر انواع روش‌های کنترل زیستی خواهیم داشت. سپس رویکردهای جدید و دوستدار محیط زیست که در این حوزه توسعه یافته‌اند را معرفی می‌کنیم. در نهایت، روش‌های بررسی اثربخشی رویکردهای جدید با استفاده از سیستم‌های مدل آزمایشگاهی ارائه می‌شود.

واژگان کلیدی: فرسودگی زیستی، آفت‌کش، بیوفیلم، پاک‌سازی زیستی، مدل‌سازی آزمایشگاهی.

فصلنامه دانش حفاظت و مرمت

سال چهارم، شماره ۴

شماره پیاپی ۱۰، زمستان ۱۴۰۰

https://kcr.richt.ir

صفحات: ۱ تا ۱۶

نویسنده مسئول

پریسا محمدی

استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

رایانامه

P.mohammadi@alzahra.ac.ir

مقاله منتخب سیزدهمین همایش دو سالانه حفاظت و مرمت اشیاء تاریخی – فرهنگی و آرایه‌های معماری

دسترسی به این مقاله برای همگان آزاد است. هرگونه استفاده غیرتجاری از آن در صورت ارجاع مناسب، مجاز شناخته می‌شود.

مقدمه

حضـور و فعالیـت جوامـع میکـروبی روی اشیـاء میـراث فرهنـگی، منجـر بـه آسیب‌هـای زیباشـناختی، فیزیـکی و شیمیـایی بـه میـراث فرهنـگی می‌شـود (Ciferri, 2002). چنیـن آسیب‌هـایی فرسـودگی زیسـتی[1] نامیـده می‌شـود. بـه عبـارت دیگـر هـر فرآینـد نـاشی از فعالیـت زیسـتی کـه بـر مـواد تأثیـر منـفی بگـذارد، فرسـودگی زیسـتی خوانـده می‌شـود (Allsopp, 2011). بدیـهی اسـت چنانچه فرسـودگی توسـط میکروارگانیسـم‌ها ایجـاد شـود؛ بـه آن، فرسـودگی میکـروبی[2] اطلاق می‌شـود. مصنوعـات هنـری از مـواد مختلـفی ماننـد چـوب، پارچـه، سـنگ یـا شیشـه سـاخته می‌شـوند و میکروارگانیسـم‌ها می‌تواننـد روی چنیـن بسـترهایی مسـتقر شـوند و بـا مصـرف ترکیبـات تشـکیل دهنـده آن‌هـا یـا تأثیـر روی سـاختار آن‌هـا، آثـار زیانبـار خـود را بـاقی بگذارنـد. نـوع آسیـبی کـه میکروارگانیسـم‌ها روی مـواد اِعمـال می‌کننـد بـه ترکیبـات بسـتر آثار بسـتگی دارد و آسیب‌هـا، آسیـب بـه زیبـایی اثـر تـا فرسـایش آهسـته ماننـد فروشـویی، خـوردگی، تجزیـه آنزیـمی و تنـش مکانیکی را شـامل می‌شـود (Sterflinger & Piūar, 2013). حضـور اولیـه میکـروبی روی آثـار هنـری معمـولاً تشـخیص داده نمی‌شـود، مگـر اینکـه رشـد سـاختارهای زیسـتی بـه شـکل لایـه یـا پوسـته‌های زیسـتی، منجـر بـه تغییـر رنـگ یـا تضعیـف یکپارچـگی فیزیـکی مـواد شـود کـه در نتیجـه آن، چنیـن آثـاری ممکـن اسـت ارزش فرهنـگی و مـالی خـود را از دسـت بدهنـد (Pyzik, Ciuchcinski, Dziurzynski, & Dziewit, 2021). در واقـع، میکروارگانیسـم‌های عامـل فرسـودگی زیسـتی آسیب‌هـای جـدی زیبایی‌شـناختی و سـاختاری بـه مصالـح سـاختمانی، نقاشی‌هـا، کتاب‌هـا یـا اشیـاء بـا ارزش وارد می‌کننـد کـه هزینه‌هـای زیـادی را بـه موزه‌هـا، مؤسسـات و مراکـز نگهـداری چنیـن اشیـایی تحمیـل می‌کننـد (Caldeira, 2021). شناسـایی عوامل فرسـودگی زیسـتی و طـراحی راهبردهـای کاهـش ایـن آسیب‌ها، بدون سـوگیری نسـبت بـه مـواد تاریـخی، محیـط زیسـت و کارکنـان و با در نظـر گرفتـن پویـایی جوامـع میکـروبی، یـک چالـش بزرگ در کنتـرل فرسـودگی زیسـتی میـراث فرهنـگی و موضـوع انجـام بسیـاری از پژوهش‌هـای آتی اسـت (Joseph, 2021). ایـن مطالعـه بـه روش کتابخانـه‌ای و بـا جسـتجو در پایگاه‌هـای الکترونیـکی Google Scholar، Scopus و Science Direct و بـا کلمات کلیـدی Biodeterioration، Biological cleaning، Biocide و Lab modeling انجـام شـد.

روش‌های کنترل فرسودگی زیستی

کاربردی‌تریـن و متداول‌تریـن روش‌هـای توسـعه یافتـه بـرای کنتـرل فرسـودگی میکـروبی میـراث فرهنگی شـامل روش‌هـای شیمیـایی ماننـد اسـتفاده از آفت‌کش‌هـا سـنتی و نانـو ذرات، روش‌هـای فیزیـکی ماننـد حـذف مکانیـکی سـاختارهای زیسـتی، اسـتفاده از اشـعه ماوراءبنفـش و اشـعه گامـا، تمیـز کـردن سـطوح بـا کمـک پرتوهـای لیـزر، اعمـال شـوک حـرارتی، اسـتفاده از امـواج الکترومغناطیـس و تیمـار یـخ خشـک و روش‌هـای زیسـتی ماننـد اسـتفاده از مولکول‌هـای طبیـعی بـا فعالیـت زیسـت‌کشی، اسـتفاده از آنزیم‌هـا و بهره‌گیـری از پیکـره میکروارگانیسـم‌ها هسـتند. بهره‌منـدی از سیسـتم‌های کنتـرلی، مسـتلزم درک مکانیسـم عمـل ایـن روش‌هـا و میانکنـش احتمـالی آن‌هـا بـا مـواد میـراثی اسـت (Cappitelli, Cattü, & Villa, 2020). روش‌هـای مـورد اشـاره دارای نقـاط ضعفی هسـتند کـه بـرخی از آن‌هـا عبارت‌انـد از: (۱) روش‌هـای فیزیـکی می‌تواننـد اثـرات غیـر قابـل برگشـت و خطرنـاکی بر بسـتر بگذارنـد (Tiano, 2002)؛ (۲) در روش‌هـای مکانیـکی، میکروارگانیسـم‌ها کاملاً حـذف نمی‌شـوند و امـکان کاربـرد چنیـن روش‌هـای مکانیـکی بـرای همـه مـواد وجـود نـدارد (Sanz et al., 2015) و (۳) بیشـتر آفت‌کش‌هـا شیمیـایی در غلظت‌هـای مؤثـر، خطـرات زیسـت‌محیطی و سلامـتی را بـرای انسـان و سـایر موجـودات زنـده بـه همـراه دارنـد (Allsopp, Seal, & Gaylarde, 2004). روش‌هـای زیسـتی کنتـرل فرسـودگی شـامل جدیدتریـن رویکردهـا در حـذف و یـا کاهـش رشـد میکـروبی هسـتند. ایـن روش‌هـا شـامل تمیـز کـردن یـا حـذف مـواد آلـوده بـا اسـتفاده از موجـودات زنـده یـا کاهـش جمعیـت میکـروبی بـا اسـتفاده از متابولیت‌هـای موجـودات زنـده هسـتند. در هـر دو مـورد، بایـد بـه ماهیـت شیمیـایی- فیزیـکی مـواد تشـکیل دهنده اثـر هنـری و منظـر زیبایی‌شـناختی آن اثـر توجـه شـود (Polo et al., 2010).

پاک‌سازی زیستی

اگرچه میکروارگانیسم‌ها اثرات منفی بر یکپارچگی ساختمان‌ها، مصالح و سازه‌ها می‌گذارند، شواهد بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد می‌توان از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان عوامل پاک‌کننده در فرآیند پاک‌سازی استفاده کرد. اولین مطالعاتی که نقش مثبت میکروارگانیسم‌ها را در فرآیندهای پاک‌سازی میراث فرهنگی نشان داد، مربوط به اواخر دهه ۱۹۸۰ / اوایل دهه ۱۹۹۰ است. کاربرد این فناوری جدید فقط محدود به میکروارگانیسم‌ها نیست، بلکه شامل باکتری‌های غیر بیماری‌زا، متابولیت‌ها و آنزیم‌های آن‌ها است. در سال‌های اخیر در بسیاری از مطالعات از میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی، به طور عمده باکتری‌های احیاکننده سولفات[۳]، برای پاک‌سازی استفاده شده است (Sanmartśn, DeAraujo, & Vasanthakumar, 2018). امروزه، پاک‌سازی زیستی[۴] و بازیابی زیستی[۵] میراث فرهنگی، با معرفی رویکردهای جدید بیوتکنولوژی میکروبی، مورد توجه قرار گرفته است. در ذیل به برخی از رویکردها اشاره می‌شود.

۱. در گزارش‌ها به استفاده از آنزیم‌های هیدرولازی مانند لیپاز، پروتئاز و آمیلاز در حذف زنگار زیستی[۶] از روی بوم، کاغذ و سطوح پلی‌کروم اشاره شده است. به گفته مرمتگران روش آنزیمی در مقایسه با روش‌های شیمیایی مرسوم، مزایای ویژه و قابل توجهی دارند (Sanmartśn et al., 2018).

۲. از آنزیم گلوکز اکسیداز برای حذف بیوفیلم موجود بر سنگ‌های تراورتن و پپرینو در آثار قدیمی ایتالیا استفاده شده است. آنزیم گلوکز اکسیداز، از گلوکز در یک واکنش کاتالیزوری پراکسید هیدروژن تولید می‌کند که به دلیل خاصیت اکسایندگی[۷] مانند ترکیبات سفیدکننده و آفت‌کش عمل می‌کند. از آنجایی‌که رهاسازی پراکسید هیدروژن می‌تواند تحت کنترل باشد، این روش پاک‌سازی برای بسترها نسبتاً ایمن است (Valentini, Diamanti, & Palleschi, 2010).

۳. استفاده از کیتینازها برای کاهش و کنترل رشد قارچ‌های رشته‌ای مستقر روی دیواره‌های چوبی و بدنه‌ی قایق‌ها گزارش شده است (Wu & Lou, 2016).

۴. پاک‌سازی زیستی در حذف آلاینده‌های مضر مانند نیترات‌ها، سولفات‌ها و رسوبات آلی، فناوری نوین و امیدوارکننده‌ای در حفاظت از میراث سنگی است. استفاده از قارچ‌های منتخب مانند Aspergillus allahabadii، در پاک‌سازی و حذف بیوفیلم‌های میکروبی روی بناهای سنگی کارآمد بوده است. از این روش‌های زیستی می‌توان به‌عنوان استراتژی نوآورانه در حفاظت پایدار از میراث فرهنگی فرسوده استفاده کرد. این روش‌ها پس از تایید نداشتن آسیب برای انسان و سایر موجودات زنده یا مواد سنگی، استفاده می‌شوند (Alfano et al., 2011; Soffritti et al., 2019).

آفت‌کش‌ها

تشکیل بیوفیلم روی اشیاء میراث فرهنگی یک فرآیند نامطلوب است که در آن میکروارگانیسم‌ها و محصولات جانبی آنها مانند آنزیم‌ها و رنگدانه‌ها، باعث آسیب یا تغییر در مواد بستر می‌شوند. آفت‌کش‌ها ترکیباتی هستند که برای حذف و یا کنترل رشد میکروارگانیسم‌های مضر استفاده می‌شوند (Cappitelli & Villa, 2021). استفاده از آفت‌کش‌ها در حوزه حفاظت و مرمت معایبی به دنبال دارد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به نشت آن‌ها به محیط زیست (اکوسیستم‌های آبی و خاکی) و آسیب به موجودات زنده اشاره نمود. معمولاً به دنبال استفاده طولانی مدت از آفت‌کش‌ها، شاهد ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به این ترکیبات هستیم که امکان انتقال ژن‌های مقاومت به سایر میکروارگانیسم‌ها نیز وجود دارد (Villa et al., 2020). امروزه استفاده از این مواد شیمیایی سمی، به دلیل امکان تجمع آن‌ها در بافت‌های موجودات زنده به شدت محدود شده است (Leifert et al., 1995).

آفت‌کش‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: دسته اول آفت‌کش‌ها تجاری سنتزی هستند که عمدتاً طیف وسیعی از مواد مانند ترکیبات آمونیوم چهارتایی یا ترکیبات حاوی نیتروژن، اوره، کلرید بنزالکونیوم و مشتقات فنل را شامل می‌شوند. نانوذرات فلزی مس، طلا، پلاتین، نقره، تیتانیوم و روی نیز که در سال‌های اخیر استفاده می‌شوند در دسته آفت‌کش‌ها

تجاری سنتزی قرار می‌گیرند. دسته دوم آفت‌کش‌ها طبیعی هستند که از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان به دست می‌آیند (Caldeira, 2021). در سال‌های اخیر، آفت‌کش‌ها طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. آفت‌کش‌ها طبیعی برای سلامتی انسان مضر نیستند، اثرات زیانبار کمتری برای محیط زیست دارند، بسیار انتخابی عمل می‌کنند و با قیمت ارزانتری در دسترس هستند (Sanmartśn et al., 2018). در زیر به برخی از آفت‌کش‌ها طبیعی اشاره می‌شود.

۱. بخار حاصل از سوختن گیاهان می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای قارچ کش‌های شیمیایی، استفاده گردد. محققان با استفاده از این روش توانستند یک مخزن بایگانی اسناد را بخوبی ضدعفونی کنند. این درحالی بود که هیچ تغییری در رنگ یا ساختار سطحی کتب و نمونه‌های کاغذی ایجاد نشد. علاوه بر این، بخار مورد اشاره، رشد سایر میکروارگانیسم‌ها را تحریک نمی‌کند و در مواد تیمار شده باقی نمی‌ماند (Tayel, Ebeid, ElSawy, & Khalifa, 2016).

۲. در مطالعه‌ای که روی عصاره‌های فرار از بادیان ستاره‌ای (Illicium verum) و جوانه‌های گل میخک (Syzygium armoaticum)، بلوط (Quercus infectoria)، نخ طلای چینی (Coptis chinensis) و چوب پنبه (Phellodendron amurense) و تأثیر آن بر قارچ‌های جدا شده از بیوفیلم‌های سنگی انجام شد (Jeong, Lee, Kim, & Chung, 2018)، بهترین اثر ضد قارچی به جزء اوژنول جدا شده از عصاره میخک نسبت داده شد (Mak et al., 2019).

۳. اسانس‌های پونه کوهی (Origanum vulgare) و آویشن (Origanum vulgare) دارای فعالیت ضدمیکروبی قوی هستند. از ترکیبات فرار این اسانس‌ها، برای کنترل فرآیندهای فرسودگی ناشی از قارچ Aspergillus flavus روی آثار هنری چوبی استفاده شد (Palla, Bruno, Mercurio, Tantillo, & Rotolo, 2020). محققان از این روش برای پاک‌سازی مصنوعات چوبی استفاده کردند تا از اثرات منفی آفت‌کش‌ها بر محیط زیست و سلامت کارکنان پیشگیری کنند (Trombetta et al., 2005).

۴. در مطالعه‌ای فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی علف هرز Nicotiana longiflora در مهار تشکیل بیوفیلم Escherichia coli و Staphylococcus aureus گزارش شد (Bogdan, Deya, Micheloni, Bellotti, & Romagnoli, 2018).

۵. اسانس‌های بسیاری از گیاهان دارای فعالیت ضد میکروبی هستند. در مطالعه‌ای که روی میکروارگانیسم‌های جدا شده از آرشیو ملی کوبا و آرشیو موزه‌ی لاپلاتای آرژانتین انجام شد، از اسانس هفت گیاه به‌عنوان آفت‌کش طبیعی استفاده شد. مطابق نتایج به‌دست آمده اسانس میخک و اسانس سیر (Allium sativum L) فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌ها نشان دادند. همچنین اسانس‌های رازیانه (Pimpinella anisum L)، میخک، سیر و پونه کوهی بهترین فعالیت ضد میکروبی را علیه قارچ‌ها نشان دادند (Borrego et al., 2012).

۶. از متابولیت‌های ثانویه گلسنگ‌ها شامل اسید آسنیک[۸]، اسید نورستیک (Norstictic Acid) و پاریتین (Parietin)، می‌توان برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم استفاده کرد و مطابق با نتایج حاصل از مطالعه انجام شده، این ترکیبات علاوه بر تأثیر بر قارچ‌ها، سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های سبز، تغییرات رنگی ناچیزی بر سنگ مرمر سفید ایجاد کرد که این تأثیر قابل اغماض است (Gazzano, Favero-Longo, Iacomussi, & Piervittori, 2013). نکته قابل تامل در مورد آفت‌کش‌ها طبیعی اثربخشی مواد طبیعی در دوزهای متفاوت است. لازم به ذکر است میان کنش ترکیبات طبیعی با مواد میراثی باید حتماً قبل از استفاده از این ترکیبات بررسی شود (Fidanza & Caneva, 2019).

یکی دیگر از چالش‌های استفاده از مواد شیمیایی با منشاء طبیعی مانند روغن‌ها و عصاره‌های گیاهی، تفاوت ترکیبات آنها با توجه به فصل برداشت، موقعیت جغرافیایی، اقلام گیاه و سایر عوامل زراعی است (Nezhadali et al., 2014). علاوه بر این، نوع روش استخراج بر ترکیبات شیمیایی عصاره‌ها و آفت‌کش‌ها طبیعی تأثیر می‌گذارد (Dhifi, Bellili, Jazi, Bahloul, & Mnif, 2016). در نتیجه، ترکیب آفت‌کش‌ها

طبیعی اول باید به طور کامل مشخص شود تا بتوان آزمایش‌ها را تکرارپذیر کرد. با توجه به اینکه برخی از ترکیبات شیمیایی گیاهی مانند اسانس‌ها گران هستند، به جای آن‌ها می‌توان از محصولات شیمیایی سنتز شده که مقرون به صرفه هستند استفاده کرد (Rakotonirainy & Lavřdrine, 2005). در نهایت از آنجایی‌که مکان استقرار آثار باستانی، نوع مواد بستر و شرایط آب و هوایی می‌تواند بسیار متفاوت باشد، انتخاب مناسب‌ترین آفت‌کش باید بر اساس شناخت جوامع میکروبی و مهمتر از آن، باید بر اساس نتایج آزمایش شبیه‌سازی در محل، قبل از کاربرد آن بر بنا و در مقیاس بزرگ باشد، لذا تهیه و معرفی یک پایگاه داده عمومی، در مورد آفت‌کش‌ها مناسب و مؤثر پس از شناسایی و تشخیص جوامع میکروبی، برای مرمتگران مفید فایده خواهد بود (Liu, Koestler, Warscheid, Katayama, & Gu, 2020).

روش‌های جایگزین

استفاده از ترکیبات ضد بیوفیلمی، راهکاری برای کاهش رشد ساختارهای میکروبی است. به عبارتی ترکیبات زیستی جایگزین باید بتوانند بدون تأثیر بر رشد سلول‌های مفید، مانع تشکیل و رشد بیوفیلم‌های مضر شوند. یکی از مزایای قابل توجه چنین جایگزین‌های سبزی، کمک به کاهش مقاومت میکروبی در برابر داروها است (Cappitelli & Villa, 2021). ترکیبات ضد بیوفیلمی مراحل مختلف رشد بیوفیلم شامل اتصال، بلوغ و پراکندگی را هدف قرار می‌دهند. هر اقدامی که اتصال میکروبی را مهار کند، در رویکرد پیشگیرانه قرار می‌گیرد، در حالی‌که هر اقدامی که اختلال در بلوغ و پراکندگی ایجاد کند، در رویکرد کنترل طبقه‌بندی می‌شود (Borrego et al., 2012). در حوزه میراث فرهنگی روش‌های متعددی در پاک‌سازی مؤثر علیه بیوفیلم‌ها، آنهم بدون استفاده از مواد سمی پیشنهاد شده است:

۱. استفاده همزمان از چند آفت‌کش که میکروارگانیسم‌ها را از بین نمی‌برند، اما بر رشد بیوفیلمی آن‌ها تأثیر می‌گذارند مانند استفاده از نیتروکساید به جای اکسید نیتریک که توسط بروس آرمسترانگ در تیمار مجسمه‌های چوبی فرسوده به‌کار گرفته شد. اکسید نیتریک یک مولکول سیگنال‌دهنده است که قادر به القای پراکندگی سلول‌های باکتریایی است (Caroline, Robyn, & Carl H, 2014). نیتروکساید مکانیسم آنتی‌بیوفیلم مشابه اکسید نیتریک دارد ولی ارزان‌تر است و طول عمر طولانی‌تری نسبت به اکسید نیتریک دارد (Alexander et al., 2015; Alexander & Schiesser, 2017). در مطالعه‌ای که انجام شد در تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با ۵۰ میکرومولار نیتروکساید و سپس تیمار ۲ ساعته با ۰/۰۰۱ درصد (وزنی/ وزنی) بنزالکونیوم کلراید، به طور موثری بیوفیلم‌ها از بین رفتند. نکته مهم در این مطالعه این بود که آفت‌کش در غلظتی بسیار کمتر از غلظت‌های معمول (۲ درصد وزنی/حجمی) استفاده شد (Cappitelli et al., 2020).

۲. استفاده از آنزیم‌ها برای تجزیه مواد زمینه‌ای[۹] بیوفیلمی و پراکنده کردن سلول‌های میکروبی از دیگر رویکردهاست. از مهم‌ترین آنزیم‌های استفاده شده می‌توان به گلیکوزیدازها، پروتئازها و دئوکسی ریبونوکلئازها اشاره کرد (Abdel-Aziz & Aeron, 2014; Kaplan, 2010).

۳. استفاده از ترکیبات آنتی بیوفیلم حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید[۱۰] و سایر نافذکننده‌ها جهت حذف کاتیون‌های فلزی مانند کلسیم، منیزیم و آهن که در حفظ یکپارچگی ماده زمینه‌ای نقش دارند، در شرایط آزمایشگاهی روی بیوفیلم‌ها بررسی شدند که هم‌افزایی[۱۱] مناسبی با عوامل ضد میکروبی نشان دادند (Alakomi et al., 2004).

۴. ترکیبات فتودینامیکی همچون قرمز سریع هسته‌ای[۱۲] و متیلن بلو[۱۳] در ترکیب با پراکسید هیدروژن، پتانسیل آسیب به سلول‌های سیانوباکتری‌ها را در نمونه‌های سنگ نشان دادند و از آنجایی‌که این ترکیبات متعاقباً توسط نور مرئی تجزیه می‌شوند، موجب تغییر رنگ بستر نمی‌شوند و از این حیث مناسب هستند (Alakomi et al., 2004).

۵. نمک‌های سدیم اسید زوستریک[۱۴] و اسید اسنیک که در نانوسیستم‌های سیلیکا معمولاً برای محافظت

از سطوح سنگ استفاده می‌شود، فعالیت ضد رسوبی خوبی نشان دادند. این ترکیبات با موفقیت رشد سلول‌های میکروبی را کنترل کردند (Ruggiero et al., 2020).

۶. کنترل زیستی طبیعی مشاهده شده در غارها، شکار باکتری‌های متعلق به جنس Bacillus و Lysobacter، به‌وسیله آمیب‌هایی مانند Dactylopodida و Echinamoebida و حشرات را نشان داد که می‌تواند روش جدیدی برای کنترل بیوفیلم‌های فوتوتروفی بسترهای سنگی مانند بناهای تاریخی و دیواره‌های غارها باشد. این نتایج از حذف لکه‌های بیوفیلمی در غارهای نرجا در اسپانیا به دست آمد (Jurado, del Rosal, Gonzalez-Pimentel, Hermosin, & Saiz-Jimenez, 2020).

۷. بهره‌برداری بالقوه از فاژها (ویروس‌های باکتریایی) به‌عنوان عوامل کنترل زیستی علیه میکروارگانیسم‌های آسیب‌رسان می‌تواند در حوزه میراث فرهنگی مفید واقع گردد (May, Zamarreūo, Hotchkiss, Mitchell, & Inkpen, 2011).

۸. دسته‌ای از متابولیت‌های زیست‌فعال، لیپوپپتیدهای ضد قارچی هستند (Malviya et al., 2020). سورفاکتین (Surfactin)، ایتورین (Iturin)، باسیلومایسین‌دی (Bacillomycin D)، فنگیسین (Fengycin) و لیکنیسین (Lichenysin) از گونه‌های Bacillus، رامنولیپیدها (Rhamnolipids) از Pseudomonas aeruginosa و داپتومایسین (Daptomycin) از Streptomyces roseosporus به دست آمدند و از جمله لیپوپپتیدهایی هستند که بیشتر در مورد آن‌ها مطالعه شده است (Beltran-Gracia et al., 2017). این ترکیبات که به‌صورت غیر ریبوزومی سنتز می‌شوند، بیوسورفکتانت‌های حلقوی آمفی‌فیلیک هستند که مزایای زیادی دارند؛ سمیت کم‌تر، زیست تخریب‌پذیری و سازگار با محیط زیست بودن از آن جمله است (Caldeira, Arteiro, Coelho, & Roseiro, 2011). چنین به نظر می‌رسد که این ترکیبات غشای سلولی ارگانیسم‌ها را هدف قرار می‌دهند و از طریق ایجاد منافذ و اختلال در حرکت یون‌ها به سلول آسیب می‌زنند. این شیوه عملکرد ترکیبات، امکان ایجاد مقاومت در برابر لیپوپپتید را برای میکروارگانیسم‌ها دشوار می‌کند که در مقایسه با سایر ترکیبات سمی یک مزیت بزرگ محسوب می‌شود (Inrs & Dhouha, 2015; Płaza & Achal, 2020; Silva et al., 2016). از خواص ضدمیکروبی، ضد قارچی، حشره‌کشی، ضد سرطانی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی این لیپوپپتیدها می‌توان در حل مشکلات پزشکی و کشاورزی استفاده کرد (Maksimov, Singh, Cherepanova, Burkhanova, & Khairullin, 2020).

۹. استفاده از ژل دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide) به‌عنوان ماده مؤثره در حذف استقرار اشکال زیستی روی سنگ مرمر از دیگر روش‌هاست. ژل مورد اشاره در تمیز کردن سنگ به‌صورت کارآمدی عمل نمود. هزینه این ژل ارزان و روش استفاده از آن ساده است و با بستر واکنش نمی‌دهد و سمیت پایینی دارد، بنابراین در مقایسه با آفت‌کش‌ها تجاری کارآمدتر هستند (Toreno et al., 2018).

۱۰. در سال‌های اخیر از آفت‌کش زیستی به نام New Floor Cleaner که حاوی اسپور Bacillus subtilis،B. megaterium و B.pumilus است، برای کنترل رشد برخی گونه‌های باکتریایی استفاده شده است (Marin, Vaccaro, & Leis, 2016).

– امروزه از پوشش‌های بهداشتی برای جلوگیری از استقرار میکروبی و تشکیل بیوفیلم استفاده می‌شود (Gozzelino, Dell'Aquila, & Romero, 2010; Johns, 2003; Stobie et al., 2010). پوشش‌های بهداشتی را می‌توان با ترکیبات زیست فعال جدید ترکیب کرد و از آن‌ها در طراحی سطوح خود تمیز شونده استفاده نمود (Matsunaga et al., 1998; Rabinovitch & Stewart, 2006). همچنین از ترکیبات حاوی نمک‌های نقره و نانو ذرات معدنی مانند دی‌اکسید سیلیس (SiO_2) در ساخت سطوح ضدمیکروبی کارآمد و بسترهای خود تمیز شونده میراث فرهنگی در مدل آزمایشگاهی استفاده شده است. تولید و تنوع این محصولات در چند سال اخیر افزایش یافته است و شرکت‌های مختلفی آن‌ها را در سرتاسر جهان عرضه می‌کنند (Arreche & Võzquez, 2020).

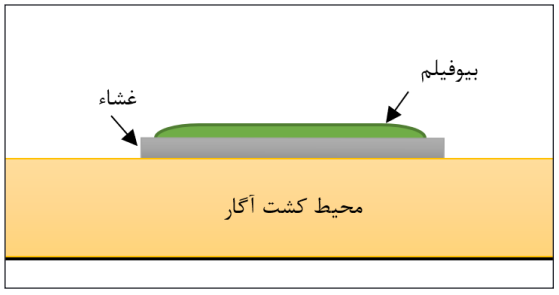
با در نظر گرفتن جمیع موارد اشاره شده چنین نتیجه‌گیری می‌شود که فناوری‌های زیستی یک رویکرد امیدوارکننده برای کنترل فرسودگی زیستی میراث فرهنگی هستند. این فناوری‌ها جایگزین‌های مناسب سازگار با محیط زیست هستند و راه‌اندازی و ارتقاء نسبتاً آسانی دارند (Soffritti et al., 2019). با این حال، تحقیقات بیشتری در زمینه نظارت بر ایمنی و نیز اثربخشی این رویکردها در طول زمان باید انجام شود. در مورد این ترکیبات به طور خاص مهم است که: (۱) هرگونه میانکنش احتمالی بین عامل زیستی و بستر وجود نداشته باشد، (۲) کارآمدی تیمارها به‌طور دوره‌ای در طول زمان با نظارت کوتاه مدت و بلند مدت ارزیابی گردد، (۳) روش‌های کاربرد این تیمارها بهینه گردد و (۴) هزینه در این روش‌ها با سایر روش‌های رایج، مقایسه شود.

طراحی تولید بیوفیلم آزمایشگاهی برای ارزیابی کارآمدی ترکیبات ضد بیوفیلمی

علیرغم استفاده گسترده از ترکیبات ضد بیوفیلمی سنتی و جدید در حفاظت از میراث فرهنگی، به دلیل عدم همبستگی نتایج به‌دست آمده از آزمون‌ها در مقیاس آزمایشگاهی و نتایج به‌دست آمده از کاربردهای میدانی، استفاده از این شیوه‌ها عمومیت پیدا نکرده است. دلیل این اختلاف، استفاده از سلول‌های میکروبی آزاد[۱۵] در مقیاس آزمایشگاهی به جای سلول‌های چسبیده به سطوح است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، به‌خوبی مشخص شده است که ساختارهای بیوفیلمی ۱۰۰۰ برابر مقاوم‌تر از همتایان سلولی آزاد خود هستند (Hall & Mah, 2017). علاوه بر این، فقدان سنجش‌های ساده، قابل اعتماد و استاندارد، انتخاب تیمارهای مؤثر ضد بیوفیلمی را محدود کرده است. آزمایش‌های میدانی برای ارزیابی اثربخشی ترکیبات ضد بیوفیلم ضروری هستند، هر چند طراحی و اجرای این آزمون‌ها با چالش‌های متعددی مواجه است. علاوه بر این، بسیاری از مطالعات میدانی محدودیت زمانی دارند. بسیاری از فرآیندهای مرتبط با بیوفیلم مانند ارزیابی و شناخت مکانیسم تأثیر ترکیبات آنتی بیوفیلمی (تأثیر بر رشد بیوفیلم و بلوغ آن) و همچنین پاسخ ساختارهای بیوفیلمی به شرایط مختلف محیطی نیازمند زمان طولانی است (Cappitelli & Villa, 2021).

سیستم‌های مدل مطالعات بیوفیلم، ابزارهای مناسبی برای ارزیابی کارآمدی عوامل ضد بیوفیلمی، قبل از کاربرد آن‌ها در مطالعات میدانی و روی آثار باستانی و فرهنگی هستند. در این سیستم‌ها پس از رشد بیوفیلم، می‌توان آن را در معرض تیمارهای مختلف و یا شرایط مختلف محیطی قرار داد. علاوه بر این، سیستم‌های مدل را می‌توان برای مطالعه باز رشد بیوفیلم، پس از پایان تیمار اولیه استفاده کرد. اگرچه سیستم‌های مدل از نظر سادگی و دسترسی با سیستم‌های میدانی متفاوت هستند، ولی تلاش شده است که در این مدل‌ها فرآیندهای طبیعی ساده‌سازی شوند تا بتوان چنین فرآیندهایی را به راحتی درک کرد (Jessup et al., 2004). در ادامه چند نمونه از سیستم‌های مدل آزمایشگاهی ارائه می‌شود: اولین سیستم مدل بدین صورت طراحی شده است که بیوفیلم بر غشای نیمه تراوایی روی محیط آگار رشد می‌کند (شکل۱). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود غشای تعبیه شده نیمه تراوا است و مواد مغذی می‌تواند به راحتی از آن عبور کرده و به سلول‌ها برسد. با جابجایی غشاء حامل بیوفیلم به یک پلیت جدید محیط کشت، می‌توان منابع غذایی جدیدی را در اختیار سلول‌های موجود در ساختار بیوفیلمی قرار داد. به این ترتیب می‌توان به راحتی اثر ترکیبات ضد بیوفیلمی را بر بیوفیلم بالغ ارزیابی کرد (Merritt, Kadouri, & O'Toole, 2011).

سیستم دیگر، طراحی راکتور جریان قطره‌ای اصلاح شده[۱۶] (DFR) است که تقلیدی از سطح بناهای یادبود

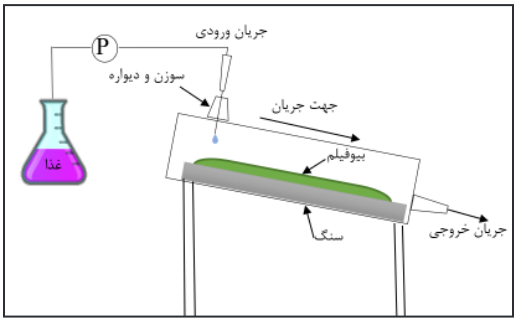


شکل ۱. سیستم بیوفیلم.

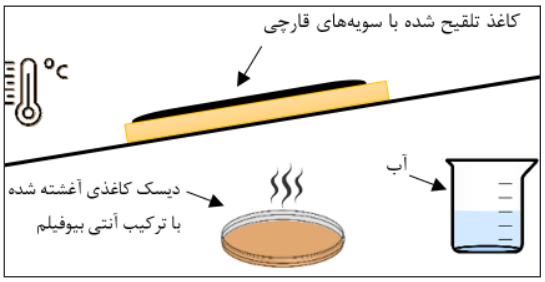
است (شکل ۲). بیوفیلم‌های بناهای سنگی قرار گرفته در فضای باز، جریان آب را به داخل هدایت می‌کنند و سلول‌های میکروبی دسترسی کم به مواد و آب را در سطح سنگ تجربه می‌کند. این سیستم مدل در بازتولید بیوفیلم‌ها کاربرد دارد و قادر است ویژگی‌های معمول بیوفیلم‌ها در بناهای سنگی در فضای باز را شبیه‌سازی کند. از این مدل برای بررسی تجمعات باکتریایی در سطح، ارزیابی توپوگرافی سطح، مطالعه همکاری بین فوتوتروف‌ها، هتروتروف‌ها و فرآیندهای تغذیه‌ای متقابل، بررسی تغییر پارامترهای شیمیایی در ریز زیستگاه‌ها[۱۷] و بقاء بیوفیلم‌ها در شرایط تنش خشکی استفاده شده است. با استفاده از این مدل حساسیت سلول‌های بیوفیلم و شناور، به ترکیبات ضدمیکروبی بر پایه نمک آمونیوم چهارتایی مقایسه شد. نتایج مطالعات نشان داد که سلول‌های بیوفیلمی پس از مواجهه با ترکیبات ضد میکروبی مورد اشاره، بیشتر از سلول‌های شناور زنده ماندند (Villa, Pitts, Lauchnor, Cappitelli, & Stewart, 2015).

مدل سوم، سیستمی را برای مطالعه بیوفیلم‌های قارچی روی کاغذ به نمایش می‌گذارد (شکل ۳). برای این منظور در ابتدا، به یک تکه کاغذ یک سویه یا مخلوطی از چندین سویه قارچی تلقیح می‌شود. پس از اینکه میسلیوم قارچی سطح کاغذ را پوشاند، این کاغذ درون کتاب قرار داده می‌شود. سپس کتاب‌های بسته، در ارتفاع چند سانتی‌متری در محفظه شیشه‌ای آزمایش قرار می‌گیرند.

دیسک کاغذی آغشته به ترکیب ضد بیوفیلمی مطابق شکل در یک پلیت در باز در پایین محفظه قرار داده



شکل ۲. سیستم رآکتور جریان قطره‌ای اصلاح‌شده.



شکل ۳: سیستم تکثیر بیوفیلم روی کاغذ.

می‌شود. رطوبت و دما در محفظه تنظیم می‌شود. سپس بیوفیلم‌های تشکیل شده روی کاغذ در معرض بخار ترکیبات ضد بیوفیلمی قرار می‌گیرند و با گذشت مدت زمان مشخص، می‌توان وضعیت دوام و بقای سلول‌های بیوفیلمی را بررسی کرد. با استفاده از این سیستم، کارآمدی اسانس گیاهی اسطوخودوس در حذف بیوفیلم‌های قارچی تشکیل شده روی کاغذ به‌خوبی اثبات گردید و نشان داده شد که جزء مؤثر این اسانس لینالول بوده است. لازم به ذکر است غلظت‌های زیاد این ماده منجر به کاهش pH کاغذ و آسیب به آن می‌شود (Rakotonirainy & Lavřdrine, 2005).

روش‌های بررسی کارآمدی ترکیبات ضد بیوفیلمی

ترکیبات ضد بیوفیلم نه تنها بیوماس بیوفیلم را تحت تأثیر قرار می‌دهند و ماده زمینه‌ای بیوفیلم را تخریب می‌کنند، بلکه بر ضخامت بیوفیلم و مورفولوژی سلول‌های تشکیل دهنده آن نیز تأثیر می‌گذارند. مثلا، این ترکیبات روی سلول‌های قارچی اثر گذاشته و امکان تشکیل میسیلیوم را مختل می‌کنند، این در حالی است که سلول‌ها از نظر متابولیکی کاملاً فعال باقی می‌مانند. روش‌های مختلفی برای ارزیابی کارآمدی ترکیبات ضد بیوفیلمی علیه ساختارهای بیوفیلمی وجود دارد (Cappitelli & Villa, 2021). در اینجا، ما به طور خلاصه برخی از روش‌هایی را که معمولاً برای آزمایش اثربخشی ترکیبات ضد بیوفیلمی استفاده می‌شوند را شرح می‌دهیم.

۱.سنجش شمارش پلیت[۱۸]

برای ارزیابی کارآمدی ترکیبات ضد بیوفیلمی، تعیین میزان سلول‌های زنده یا کاهش نسبی سلول‌های زنده در یک بیوفیلم پس از تیمار ضروری است. متداول‌ترین روش تعیین سلول‌های زنده باکتریایی، شمارش تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی[۱۹] CFU پس از کشت روی محیط آگار است (Azeredo et al., 2017). تجربه نشان داده است که بسیاری از سویه‌ها را نمی‌توان کشت داد. همچنین سلول‌هایی که به لحاظ متابولیکی غیرفعال هستند معمولاً در بیوفیلم وجود دارند (Sebestyřn et al., 2016). اگرچه شمارش CFU می‌تواند ابزار ارزشمندی برای تعیین کمیت یک بیوفیلم باکتریایی باشد، ولی برای بیوفیلم‌های قارچی مناسب نیستند.

۲. سنجش بقای سلولی با استفاده از نمک تترازولیوم[۲۰]

استفاده از نمک تترازولیوم یکی دیگر از روش‌های مفید ارزیابی بقای سلول‌های بیوفیلمی و بررسی حساسیت سلول‌های بیوفیلمی به مواد ضدمیکروبی در شرایط آزمایشگاهی است. تعداد سلول‌های زنده بیوفیلم را می‌توان با اندازه‌گیری میزان جذب مایع رویی پس از احیای متابولیکی XTT (2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid) به فورمازون محلول در آب به دست آورد (Pantanella, Valenti, Natalizi, Passeri, & Berlutti, 2013). از آنجایی‌که محصول فورمازون محلول در آب است و به راحتی در روشناور سلولی اندازه‌گیری می‌شود، سنجش این ماده بدون ایجاد اختلال در سلول‌های بیوفیلمی، امکان بررسی میزان حساسیت سلول‌های بیوفیلمی را فراهم می‌کند (Kuhn, Balkis, Chandra, Mukherjee, & Ghannoum, 2003). محدودیت اصلی این روش مربوط به یک دست نبودن ساختارهای بیوفیلمی است؛ به این معنا که در بیوفیلم، سلول‌هایی با فعالیت متابولیکی متفاوت وجود دارد. علاوه بر این، ماده زمینه‌ای بیوفیلم ممکن است احیای XTT را کند و موجب جذب فورمازون شود.

۲. سنجش بیولومینسانس[۲۱] ATP

سنجش بیولومینسانس، با الهام از آنزیم لوسیفراز کرم شب تاب طراحی شده است که امکان تبدیل ATP درون سلولی را به نور فراهم می‌کند. در این روش نور تولید شده با استفاده از یک لومینومتر ثبت و اندازه‌گیری می‌شود (Nante, Ceriale, Messina, Lenzi, & Manzi, 2017). محتوای ATP داخل سلولی، شاخص خوبی برای بررسی بقای سلول است. در واقع، پس از مرگ سلول، سنتز ATP متوقف می‌شود، این در حالی است که هیدرولیز ATP می‌تواند برای مدتی ادامه داشته باشد. اشکال اصلی این روش، وجود راه‌های متنوع تولید ATP در میان گونه‌های مختلف میکروبی است که انجام سنجش را برای گروه‌های مختلف مشکل می‌سازد (Ivanova, Alexeeva, Pham, Wright, & Nicolau, 2006).

٤. سنجش اسپکتروفلوئورومتری[۲۲]

فلورسئین دی استات[۲۳] یک پیش فلوروفور است که می‌تواند توسط طیف وسیعی از آنزیم‌های غیراختصاصی خارج سلولی و متصل به غشاء هیدرولیز شود. پس از هیدرولیز فلورسئین دی استات، این ترکیب به فلورسین تبدیل می‌شود که رنگ زرد سبز را در ۴۹۰ نانومتر جذب می‌کند. این روش معمولاً جهت تعیین فعالیت آنزیم‌های هیدرولاز سلولی کاربرد دارد. محدودیت قابل توجه این روش این است که میکروارگانیسم‌های موجود در ساختار بیوفیلمی همه به لحاظ متابولیکی فعال نیستند. علاوه بر این، سنجش متابولیت‌های سلولی به روش اسپکتروفلورومتری اغلب برای سلول‌های شناور مناسب است. همان‌طور که قبلاً نیز گفته شد فعالیت متابولیکی سلول‌های شناور و سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم یکسان نیست (Welch, Cai, & Strűmme, 2012).

۵. ریل تایم پی سی آر کمی[۲۴] (qRT-PCR)

ریل تایم پی سی آر کمی یکی از قدرتمندترین و حساس‌ترین روش‌های آنالیز ژنی است که در آن میزان فلورسنت در هر چرخه تکثیر ژنومی در زمان واقعی اندازه‌گیری می‌شود و نسبت مستقیمی با تعداد رونویسی‌های انجام شده از ژنوم دارد. علاوه بر این، با روش qRT-PCR می‌توان mRNA سلولی را شناسایی کرد که نیمه عمر کوتاه آن دلالت بر زنده

بودن سلول‌ها دارد (Guilbaud et al., 2005; Xie, Thompson, Kashleva, & Dongari-Bagtzoglou, 2011). از روش qRT-PCR می‌توان نه تنها برای شناسایی میکروارگانیسم‌های زنده، بلکه برای تعیین کمیت میکروارگانیسم‌های زنده در بیوفیلم استفاده کرد (Ettenauer, Piūar, Tafer, & Sterflinger, 2014; Piūar, Sterflinger, Ettenauer, Quandt, & Pinzari, 2015). محدودیت‌های اصلی این روش مربوط به آماده‌سازی نمونه، از جمله استخراج RNA است.

۶. کلروفیل[۲۵]

کلروفیلa تخمین خوبی از میزان بیوماس بیوفیلم‌های میکروجلبک و سیانوباکتری به دست می‌دهد (Chamizo, Adessi, Mugnai, Simiani, & De Philippis, 2019; Jesus, Perkins, Mendes, Brotas, & Paterson, 2006). این روش مستلزم کندن بیوماس از سطوح، استخراج کلروفیل a در DMSO و به دنبال آن اندازه‌گیری جذب کلروفیل a با استفاده از اسپکتروفتومتر است (Fernõndez-Silva, Sanmartśn, Silva, Moldes, & Prieto, 2011).

۷. سنجش میزان پروتئین[۲۶]

از محتوای پروتئین سلولی می‌توان برای تخمین بیوماس کل بیوفیلم استفاده کرد. پس از لیز سلولی، میزان پروتئین‌های آزاد شده را می‌توان با روش‌های رنگ سنجی مانند برادفورد، لوری و اسید بیسینکونیک (BCA) تعیین کرد. پرکاربردترین روش سنجش میزان پروتئین، روش برادفورد است که با افزودن معرف اسیدی حاوی رنگ Coomassie Brilliant Blue G-250 به نمونه لیز شده، انجام می‌شود. هنگامی که پروتئین به رنگ متصل می‌شود، رنگ معرف از قهوه‌ای به آبی تغییر می‌کند. جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده می‌شود و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت کل پروتئین تعیین می‌شود (Bradford, 1976).

۸. رنگ آمیزی بیوفیلم و مشاهده با میکروسکوپ (Biofilm Staining and Microscopy)

یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در مطالعه بیوفیلم، امکان تصویربرداری سه بعدی بیوفیلم تیمار شده با ترکیبات ضد بیوفیلمی در طول زمان و با استفاده از میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون[۲۷] است. استفاده از کاوشگرهای مختلف فلورسنت (Fluorescent Probes) امکان ارزیابی اثرات ترکیبات ضد بیوفیلمی را بر اجزای بیوفیلم، به طور همزمان فراهم می‌کند، بنابراین، رنگ‌های فلورسنت در ترکیب با CLSM برای تصویربرداری ماده زمینه‌ای سلولی و سلول‌ها استفاده می‌شوند. تلفیق روش CLSM با کاوشگرهای هیبریداسیون فلورسانس درجا[۲۸] اطلاعات بیشتری در مورد شناسایی و اکولوژی گونه‌های میکروبی قبل و بعد از تیمارهای ضدبیوفیلمی فراهم می‌کند. در واقع، روش تلفیقی FISH-CLSM این امکان را می‌دهد تا با استفاده از تصویربرداری که روشی غیرتهاجمی است از بیوفیلم‌ها در ماده زمینه‌ای خارج سلولی که سلول‌های آن نشاندار شده است به‌صورت سه بعدی تصویربرداری کرد. به طور خلاصه، در این روش ابتدا سلول‌های بیوفیلم تثبیت و سپس نفوذپذیر می‌شوند تا دسترسی کاوشگر به هدف تسهیل شود. سپس سلول‌ها با کاوشگرهای اسید نوکلئیک نشان‌دار شده با فلوروکروم، هیبرید می‌شوند. از آنجایی‌که می‌توان سیگنال FISH را برای(rRNA (Ribosomal RNA سلولی طراحی کرد تا فعالیت سلولی را منعکس کند، از این روش می‌توان برای ارزیابی آفت‌کش‌ها علیه میکروارگانیسم‌های هدف استفاده کرد (Cappitelli & Villa, 2021).

نتیجه‌گیری

بیوفیلم‌ها سبک زندگی غالب میکروارگانیسم‌ها در همه محیط‌های طبیعی و مصنوعی، از جمله میراث فرهنگی، هستند. معرفی راهبردهای مؤثر برای مبارزه با بیوفیلم‌ها یک چالش مهم است. این راهبردهای نوظهور و جایگزین‌های سبز، هنوز در مرحله نوپای خود هستند و تحقیقات بیشتری برای تأیید کارآمدی این روش‌ها لازم است. کمبود شیوه‌نامه‌های یکدست، فقدان واژگان یکپارچه، تکرارپذیری و تجدید پذیری مشکل آزمون‌ها، استفاده از ترکیبات ضد بیوفیلمی را با مشکل مواجه کرده است. یکی از جنبه‌های مهم تحقیقات آتی مربوط به ترکیبات ضد بیوفیلمی، استانداردسازی استفاده از آن‌ها است.

به‌منظـور ارزیـابی کارآمـدی ترکیبـات سـنتی یـا جدیـد علیـه بیوفیلم‌هـای بازیـابی شـده از سـطوح میـراث، نیـاز بـه بهره‌بـرداری از واژه‌هـای علـمی یکپارچـه، شیوه‌نامه‌هـا و دسـتورالعمل‌های حـاوی شـرح کامـل روش آزمـون اسـت. به‌طورقطـع، معـرفی روش‌هـای یکپارچـه و پذیرفتـه شـده علـمی در سـطح جهـانی، منجـر بـه تدویـن دسـتورالعمل‌های جدیـد بـا عملکـرد مناسـب بـرای مرمتگـران خواهـد شـد و سیسـتم‌های مـدل در ایـن مسیـر می‌تواننـد مؤثـر واقـع گردنـد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیلـه از همـکاری و پشـتیبانی جنـاب آقـای مهنـدس عرفـان نورالـه در تصویرسـازی ایـن اثـر علـمی تشـکر و قـدردانی می‌نماییـم.

حامیان مادی و معنوی

معاونـت پژوهـشی و فنـاوری دانشـگاه الزهـرا حـامی مـادی و معنـوی ایـن پژوهـش بـوده اسـت.

پی‌نوشت‌ها

1.Biodeterioration.
2. Microbial deterioration.
3. Sulfate Reducing Bacteria.
4. Biocleaning.
5. Biorestoration.
6. Biological Patinas.
7. Oxidative Property.
8. Usnic Acid.
9. Matrix.
10. EthylenediaminetetraaceticAcid (EDTA.
11. Synergism.
12. Nuclear Fast Red.
13. Methylene Blue.
14. Zosteric Acid.
15. Planktonic Cell).
16. Modified Drip Flow Reactor.
17. Microhabitat.
18. Plate Count Assay.
19. Colony Forming Unit CFU.
20. XTT Cell Viability Assay).
21. ATP -Bioluminescence Assay).
22. Spectrofluorometric Assay.
23. Fluorescein Diacetate (30,60-diacetyl-fluorescein, FDA).
24. Quantitative Real-Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR.
25. Chlorophyll.
26. Proteins Quantification Assay.
27. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM.
28. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).

منابع

Abdel-Aziz, S. M., & Aeron, A. (2014). Bacterial biofilm: dispersal and inhibition strategies. Scholarena Journal of Biotechnology, 1(1), 105.

Alakomi, H.-L., Arrien, N., Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Maxwell, I., McCullagh, C., . . . Valero, J. (2004). Inhibitors of biofilm damage on mineral materials (Biodam). Paper presented at the Proceedings of the 10th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone.

Alexander, S.-A., Rouse, E. M., White, J. M., Tse, N., Kyi, C., & Schiesser, C. H. (2015). Controlling biofilms on cultural materials: the role of 3-(dodecane-1-thiyl)-4-(hydroxymethyl)-2, 2, 5, 5-tetramethyl-1-pyrrolinoxyl. Chemical Communications, 51(16), 3355-3358.

Alexander, S.-A., & Schiesser, C. H. (2017). Heteroorganic molecules and bacterial biofilms: Controlling biodeterioration of cultural heritage. ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry, 2017.

Alfano, G., Lustrato, G., Belli, C., Zanardini, E., Cappitelli, F., Mello, E., . . . Ranalli, G. (2011). The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: the case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. International Biodeterioration & Biodegradation, 65(7), 1004-1011.

Allsopp, D. (2011). Worldwide wastage: the economics of biodeterioration. Microbiol Tod, 38, 150-153.

Allsopp, D., Seal, K. J., & Gaylarde, C. C. (2004). Introduction to biodeterioration: Cambridge University Press.

Arreche, R., & Võzquez, P. (2020). Green biocides to control biodeterioration in materials science and the example of preserving World Heritage Monuments. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 25, 100359.

Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., . . . Jaglic, Z. (2017). Critical review on biofilm methods. Critical reviews in microbiology, 43(3), 313-351.

Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafaūa-Rojas, J., Martinez-Rodriguez, A., Chavez-Castrillon, Y. Y., Espinosa-Escalante, F. M., . . . Beltran-Garcia, M. J. (2017). Production of lipopeptides by fermentation processes: Endophytic bacteria, fermentation strategies and easy methods for bacterial selection. Fermentation processes, 199-222.

Bogdan, S., Deya, C., Micheloni, O., Bellotti, N., & Romagnoli, R. (2018). Natural products to control biofilm on painted surfaces. Pigment & Resin Technology.

Borrego, S., Valdřs, O., Vivar, I., Lavin, P., Guiamet, P., Battistoni, P., . . . Borges, P. (2012). Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage. International Scholarly Research Notices, 2012.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Caldeira, A. T. (2021). Green Mitigation Strategy for Cultural Heritage Using Bacterial Biocides. Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage, 137.

Caldeira, A. T., Arteiro, J. S., Coelho, A. V., & Roseiro, J. C. (2011). Combined use of LC–ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens CCMI 1051. Process Biochemistry, 46(9), 1738-1746.

Cappitelli, F., Cattü, C., & Villa, F. (2020). The control of cultural heritage microbial deterioration. Microorganisms, 8(10), 1542.

Cappitelli, F., & Villa, F. (2021). Novel antibiofilm non-biocidal strategies. Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage, 117.

Caroline, K., Robyn, S., & Carl H, S. (2014). Preliminary investigations into the action of nitric oxide in the control of biodeterioration. AICCM Bulletin, 35(1), 60-68.

Chamizo, S., Adessi, A., Mugnai, G., Simiani, A., & De Philippis, R. (2019). Soil type and cyanobacteria species influence the macromolecular and chemical characteristics of the polysaccharidic matrix in induced biocrusts. Microbial ecology, 78(2), 482-493.

Ciferri, O. (2002). The role of microorganisms in the degradation of cultural heritage. Studies in Conservation, 47(sup1), 35-45.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines, 3(4), 25.

Ettenauer, J., Piūar, G., Tafer, H., & Sterflinger, K. (2014). Quantification of fungal abundance on cultural heritage using real time PCR targeting the β-actin gene. Frontiers in microbiology, 5, 262.

Fernõndez-Silva, I., Sanmartśn, P., Silva, B., Moldes, A., & Prieto, B. (2011). Quantification of phototrophic biomass on rocks: optimization of chlorophyll-a extraction by response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38(1), 179-188.

Fidanza, M. R., & Caneva, G. (2019). Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review. Journal of Cultural Heritage, 38, 271-286.

Gazzano, C., Favero-Longo, S. E., Iacomussi,

P., & Piervittori, R. (2013). Biocidal effect of lichen secondary metabolites against rock-dwelling microcolonial fungi, cyanobacteria and green algae. International Biodeterioration & Biodegradation, 84, 300-306.

Gozzelino, G., Dell'Aquila, A. G., & Romero, D. (2010). Hygienic coatings by UV curing of diacrylic oligomers with added triclosan. Journal of Coatings Technology and Research, 7(2), 167-173.

Guilbaud, M., de Coppet, P., Bourion, F., Rachman, C., Prřvost, H., & Dousset, X. (2005). Quantitative detection of Listeria monocytogenes in biofilms by real-time PCR. Applied and environmental microbiology, 71(4), 2190-2194.

Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS microbiology reviews, 41(3), 276-301.

Inṛs, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. Peptides, 71, 100-112.

Ivanova, E. P., Alexeeva, Y. V., Pham, D. K., Wright, J. P., & Nicolau, D. V. (2006). ATP level variations in heterotrophic bacteria during attachment on hydrophilic and hydrophobic surfaces. International Microbiology, 9(1), 37.

Jeong, S. H., Lee, H. J., Kim, D. W., & Chung, Y. J. (2018). New biocide for eco-friendly biofilm removal on outdoor stone monuments. International Biodeterioration & Biodegradation, 131, 19-28.

Jessup, C. M., Kassen, R., Forde, S. E., Kerr, B., Buckling, A., Rainey, P. B., & Bohannan, B. J. (2004). Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. Trends in ecology & evolution, 19(4), 189-197.

Jesus, B., Perkins, R., Mendes, C., Brotas, V., & Paterson, D. (2006). Chlorophyll fluorescence as a proxy for microphytobenthic biomass: alternatives to the current methodology. Marine Biology, 150(1), 17-28.

Johns, K. (2003). Hygienic coatings: the next generation. Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions, 86(2), 101-110.

Joseph, E. (2021). Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage: Springer Nature.

Jurado, V., del Rosal, Y., Gonzalez-Pimentel, J. L., Hermosin, B., & Saiz-Jimenez, C. (2020). Biological control of phototrophic biofilms in a show cave: The case of Nerja Cave. Applied Sciences, 10(10), 3448.

Kaplan, J. õ. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal of dental research, 89(3), 205-218.

Kuhn, D., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P., & Ghannoum, M. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism. Journal of clinical microbiology, 41(1), 506-508.

Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., . . . Harbour, A. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by Bacillus subtilis CL27 and Bacillus pumilus CL45. Journal of applied bacteriology, 78(2), 97-108.

Liu, X., Koestler, R. J., Warscheid, T., Katayama, Y., & Gu, J.-D. (2020). Microbial deterioration and sustainable conservation of stone monuments and buildings. Nature Sustainability, 3(12), 991-1004.

Mak, K.-K., Kamal, M., Ayuba, S., Sakirolla, R., Kang, Y.-B., Mohandas, K., . . . Pichika, M. (2019). A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry. Pharmacognosy Reviews, 13(25), 1-9.

Maksimov, I., Singh, B., Cherepanova, E., Burkhanova, G., & Khairullin, R. (2020). Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection. Applied biochemistry and microbiology, 56(1), 15-28.

Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., . . . Rai, J. P. (2020). Lesson from ecotoxicity: revisiting the microbial lipopeptides for the management of emerging diseases for crop protection. International journal of environmental research and public health, 17(4), 1434.

Marin, E., Vaccaro, C., & Leis, M. (2016). Biotechnology applied to historic stoneworks conservation: Testing the potential harmfulness of two biological biocides. Int. J. Conserv. Sci, 7, 227-238.

Matsunaga, T., Nakayama, T., Wake, H., Takahashi, M., Okochi, M., & Nakamura, N. (1998). Prevention of marine biofouling using a conductive paint electrode. Biotechnology and bioengineering, 59(3), 374-378.

May, E., Zamarreūo, D., Hotchkiss, S., Mitchell, J., & Inkpen, R. (2011). Bioremediation of algal contamination on stone. Paper presented at the Biocolonization of Stone: Control and Preventive Methods. Proceedings from the MCI Workshop Series.

Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2011). Growing and analyzing static biofilms. Current protocols in microbiology, 22(1), 1B. 1.1-1B. 1.18.

Nante, N., Ceriale, E., Messina, G., Lenzi, D., & Manzi, P. (2017). Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review. Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 58(2), E177.

Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P., & Amini, F. (2014). Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of Thymus vulgaris Lamiaceae, from Iran. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 3(2), 87-92.

Palla, F., Bruno, M., Mercurio, F., Tantillo, A., & Rotolo, V. (2020). Essential oils as natural biocides in conservation of cultural heritage. Molecules, 25(3), 730.

Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., & Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. Ann Ig, 25(1), 31-42.

Piūar, G., Sterflinger, K., Ettenauer, J., Quandt, A., & Pinzari, F. (2015). A combined approach to assess the microbial contamination of the Archimedes Palimpsest. Microbial ecology, 69(1), 118-134.

Płaza, G., & Achal, V. (2020). Biosurfactants: Eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. International journal of molecular sciences, 21(6), 2152.

Polo, A., Cappitelli, F., Brusetti, L., Principi, P., Villa, F., Giacomucci, L., . . . Sorlini, C. (2010). Feasibility of removing surface deposits on stone using biological and chemical remediation methods. Microbial ecology, 60(1), 1-14.

Pyzik, A., Ciuchcinski, K., Dziurzynski, M., & Dziewit, L. (2021). The Bad and the good–Microorganisms in cultural heritage environments–An update on biodeterioration and biotreatment approaches. Materials, 14(1), 177.

Rabinovitch, C., & Stewart, P. S. (2006). Removal and inactivation of Staphylococcus epidermidis biofilms by electrolysis. Applied and environmental microbiology, 72(9), 6364-6366.

Rakotonirainy, M. S., & Lavřdrine, B. (2005). Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. International Biodeterioration & Biodegradation, 55(2), 141-147.

Ruggiero, L., Bartoli, F., Fidanza, M., Zurlo, F., Marconi, E., Gasperi, T., . . . Caneva, G. (2020). Encapsulation of environmentally-friendly biocides in silica nanosystems for multifunctional coatings. Applied Surface Science, 514, 145908.

Sanmartśn, P., DeAraujo, A., &

Vasanthakumar, A. (2018). Melding the old with the new: trends in methods used to identify, monitor, and control microorganisms on cultural heritage materials. Microbial ecology, 76(1), 64-80.

Sanz, M., Oujja, M., Ascaso, C., de los Rśos, A., Přrez-Ortega, S., Souza-Egipsy, V., . . . Castillejo, M. (2015). Infrared and ultraviolet laser removal of crustose lichens on dolomite heritage stone. Applied Surface Science, 346, 248-255.

Sebestyřn, P., Blanken, W., Bacsa, I., Túth, G., Martin, A., Bhaiji, T., . . . Kiss, I. (2016). Upscale of a laboratory rotating disk biofilm reactor and evaluation of its performance over a half-year operation period in outdoor conditions. Algal research, 18, 266-272.

Silva, M., Salvador, C., Candeias, M. F., Teixeira, D., Candeias, A., & Caldeira, A. T. (2016). Toxicological assessment of novel green biocides for cultural heritage.

Soffritti, I., D'Accolti, M., Lanzoni, L., Volta, A., Bisi, M., Mazzacane, S., & Caselli, E. (2019). The potential use of microorganisms as restorative agents: an update. Sustainability, 11(14), 3853.

Sterflinger, K., & Piūar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art–tilting at windmills? Applied microbiology and biotechnology, 97(22), 9637-9646.

Stobie, N., Duffy, B., Colreavy, J., McHale, P., Hinder, S. J., & McCormack, D. E. (2010). Dual-action hygienic coatings: benefits of hydrophobicity and silver ion release for protection of environmental and clinical surfaces. Journal of colloid and interface science, 345(2), 286-292.

Tayel, A. A., Ebeid, M. M., ElSawy, E., & Khalifa, S. A. (2016). Fungicidal effects of plant smoldering fumes on archival paper-based documents. Restaurator. International Journal for the Preservation of Library and Archival Material, 37(1), 15-28.

Tiano, P. (2002). Biodegradation of cultural heritage: decay mechanisms and control methods. Paper presented at the Seminar article, new university of Lisbon, Department of Conservation and Restoration.

Toreno, G., Isola, D., Meloni, P., Carcangiu, G., Selbmann, L., Onofri, S., . . . Zucconi, L. (2018). Biological colonization on stone monuments: A new low impact cleaning method. Journal of Cultural Heritage, 30, 100-109.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., . . . Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(6), 2474-2478.

Valentini, F., Diamanti, A., & Palleschi, G. (2010). New bio-cleaning strategies on porous building materials affected by biodeterioration event. Applied Surface Science, 256(22), 6550-6563.

Villa, F., Gulotta, D., Toniolo, L., Borruso, L., Cattü, C., & Cappitelli, F. (2020). Aesthetic alteration of marble surfaces caused by biofilm formation: effects of chemical cleaning. Coatings, 10(2), 122.

Villa, F., Pitts, B., Lauchnor, E., Cappitelli, F., & Stewart, P. S. (2015). Development of a laboratory model of a phototroph-heterotroph mixed-species biofilm at the stone/air interface. Frontiers in microbiology, 6, 1251.

Welch, K., Cai, Y., & Strűmme, M. (2012). A method for quantitative determination of biofilm viability. Journal of Functional Biomaterials, 3(2), 418-431.

Wu, J., & Lou, W. (2016). Study of biological enzymes' inhibition of filamentous fungi on the Crosslake Bridge ruins. Sci. Archaeol. Conserv, 3, 25-29.

Xie, Z., Thompson, A., Kashleva, H., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2011). A quantitative real-time RT-PCR assay for mature C. albicans biofilms. BMC microbiology, 11(1), 1-8.