اسپکتروفلومتری روشی برای سنجش کارآیی بیوسایدهای متداول در کنترل قارچهای مخرب در آثار و بناهای تاریخی

پریسا محمدی

تهران، دانشگاه الزهرا(س)، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۰

چکیده

مشکل تخریب زیستی آثار و بناهای باستانی مورد توجه بسیاری از دانشمندان علاقه مند به آثار باستانی قرار گرفته است. در این رابطه قارچها به عنوان یکی از مهم ترین عوامل مخرب سنگها معرفی شده اند و مطالعات گسترده ای جهت کنترل این عوامل بیولوژیکی در دست بررسی است. هدف از پژوهش حاضر پیدا کردن و بهینه کردن روشی است که با کاربرد آن بتوان کارآرایی تیمارهای شیمیایی که برای حفظ آثار باستانی مورد استفاده قرار می گیرند را ارزیابی نمود. یکی از معیارهایی که در ارزیابی موفق تیمارهای شیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند سنجش تعداد سلول های زنده است. در این پژوهش سلولهای قارچی *Trimmatostroma abietis*(A18) و *Exophilia jeanselmei* (J26) تحت تأثیر آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلراید (BAC) یک درصد قرار گرفت. ابتدا سلولهای قارچی با رنگ های فلورسئین دی استات (FDA) ، کلسئین ام (Cal AM) ، پروپیدیوم یدید (PI) و ترکیبی از آنها رنگ آمیزی گردید. سپس با استفاده از فلورومترتغییرات فلورسانس سلولهای زنده اندازه گیری شد. سلولهای رنگ آمیزی شده با FDA به شدت رنگ گرفتند به طوری که این رنگ پذیری با میکروسکوپ فلورسانس و نیز با سنجش فلورومتری قابل مشاهده بود. سلولهای قارچی در حضور Cal AM رنگ پذیری ضعیفی را نشان دادند. این در حالی است که سلول های رنگ شده با PI هیچ گونه فلورسانسی را نشان ندادند. زمانی که تلفیق رنگها مورد استفاده قرار گرفت به لحاظ کمی و کیفی فلورسانس سلولی کاهش یافت. کاهش شدت فلورسانس FDA در ترکیب با سایر رنگها نیز مشاهده شد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده FDA می تواند برای سنجش تیمارهای شیمیایی قارچهای صخره ای مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از این رنگ می توان کارآیی تیمارهای فیزیکی یا شیمیایی را کمی کرد. نتایج نشان داد که فلورومتری FDA روشی دقیق، قابل تکرار و به لحاظ زمان و مواد مصرفی بسیار مقرون به صرفه می باشد.

واژه های کلیدی: قارچ های ساکن صخره، فلوروسئین دی استات واسپکتروفلورومتری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۰۵۸۹۱۲، پست الکترونیکی: p.mohammadi@alzahra.ac.ir

مقدمه

فرسودگی زیستی آثار باستانی و هنری در کشورهایی با تاریخ کهن و داشتن ابنیهء تاریخی مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است. صخره ها و سنگها محیطهای سر سختی برای زندگی میکروارگانیسم ها و حضور بیوفیلم ها هستند که چنین میکروارگانیسم هایی تغییرات شدید رطوبت و حرارت، محدودیت مواد غذایی قابل دسترس و غلظت بالای الکترولیتهای مختلف را تحمل می کنند. صخره ها و سنگها همچنین در معرض تابش شدید اشعه های خورشیدی هستند. با وجود این شرایط سخت، فعالیت بیولوژیکی در سطح و در داخل صخره هایی که در تماس با اتمسفر قرار می گیرند بوفور دیده می‌شود (۲۶) . تحقیقات نشان داده است که فقط انواع خاصی از ارگانیسم

Archive of SID

www.SID.ir

ها قادرند بر روی صخره های برهنه تثبیت شوند و البته اجتماعات اندولیتیک چنین ارگانیسم هایی در لایه های زیرین صخره ها و سنگها نیز مشاهده شده است (۱۱). چنین موجوداتی در تشدید عوامل فرسایش زیستی شرکت نموده و میکروارگانیسم های پویکیلوتروف نامیده می شوند(۲۴ و ۲۵). شاید بتوان معادل فارسی میکرو ارگانیسم های خونسرد را به چنین میکروارگانیسم هایی اطلاق نمود. در حقیقت این موجودات میکروارگانیسم های خبره ای هستند که توانایی سوخت و ساز در محدوده های بسیار گسترده ای از شرایط زیست محیطی را دارند. محیط زیست چنین موجوداتی می تواند خیلی عادی باشد ویا تغییرات اساسی و شدید را در پایین ترین و بالاترین سطح خود به نمایش بگذارد. این تغییرات میتواند در دوره های زمانی منظم و یا نامنظم رخ دهد. موجودات مورد نظر باید ویژگیهایی را به نمایش بگذارند که سایر موجودات فاقد آنند یعنی تحمل و داشتن ابزاری برای بقاء در شرایط تغییرات شدید زیستی که به طور منظم و یا نامنظم در محیط اتفاق می افتد. جداسازی چنین میکروبهایی اولین بار توسط کرومباین در سال ۱۹۶۶ انجام شد (۹). استیلی در سال ۱۹۸۲ قارچهای خاص پویکیلوترف جداشده از صحراها را قارچهای میکروکلنی نامید (۱۶). این دسته از میکروارگانیسم های شیمیوارگانوتروف، منابع آلی و آبی مورد نیاز خود را از محیط زیست به دست می آورند. این موجودات به خوبی با میکروسکوپ قابل مشاهده هستند و تعیین فعالیت متابولیسمی آنها با روشهای بیوشیمیایی قابل اندازه گیری می باشد ولی کشت آنها در آزمایشگاه مشکل و گاه بسیار زمانبر است. محمدی و همکاران چنین میکروارگانیسم های سخت رشدی را از منطقه تخت جمشید جدا و شناسایی نمودند (۱۰). ترتیاچ و همکاران ارزیابی بیوساید هایی نظیر BAC، Koretrel و Rocima 110 را با بررسی تغییر پالسهای فلورسنت تقویت شده بر روی گلسنگهای آندولیتیک مورد مطالعه قرار دادند(۱۸).

برخی از چنین میکروارگانیسم هایی را به راحتی نمی توان در آزمایشگاه کشت داد اگرچه آثار مخرب آنها با روشهای میکروسکپی و شیمیایی قابل اثبات است. تعدای از چنین میکروارگانیسم هایی نیز در آزمایشگاههای مختلف دنیا جدا و شناسایی شده اند که رشد کندی را در شرایط آزمایشگاه نشان می دهند. برای زدودن این اشکال بیولوژیک از سطوح هنری نیاز به استفاده از بیوساید یا روشهای فیزیکی است لذا یافتن روشی که در کوتاه ترین زمان ممکن بتواند اثر تیمارهای فیزیکوشیمیایی را نشان دهد و همچنین به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد ضروری به نظر می رسد. امروزه در بسیاری از مراکز تحقیقاتی جهت ارزیابی اثر بیوساید هایی چون BAC، Tricyclazole, Prevntolو Bismuth dimercapto ethanol که برروی میکروارگانیسم ها و به طور کلی بیوفیلمهای دخیل در تخریب آثار هنری و تاریخی استفاده می شود از روش کشت نمونه ها در محیط های عمومی و اختصاصی و تعیین CFU استفاده می گردد (۱۱). لذا مطالعات مربوط به اثر بیوسایدها بر روی قارچهای مؤثر در تخریب بسترهای سنگی که رشد بسیار آهسته ای دارند بسیار زمان بر است. در ضمن روش کلاسیک کشت و تعیین CFU نمی تواند میکروارگانیسم های زنده ای که قابلیت کشت خود را از دست داده اند در محاسبه وارد نماید. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از پژوهش حاضر یافتن و بهینه کردن روشی قابل اعتماد و سریع است که با آن بتوان اثر تیمارهای فیزیکوشیمیایی مربوط به حوزه مرمت وترمیم آثار باستانی را روی ارگانیسم های دخیل در امر فرسودگی زیستی مورد ارزیابی قرار داد.

مواد و روشها

بیوساید: BAC از ترکیبات چهارتایی آمونیوم است. این ماده به عنوان کاهش دهنده کشش سطحی و نیز به عنوان ضدعفونی کننده در پزشکی و صنعت مورد استفاده قرار

Archive of SID

www.SID.ir

می گیرد. از این ترکیب که طیف اثر وسیعی دارد در مرمت و ترمیم آثار هنری و تاریخی نیز استفاده می شود. در این بررسی از غلظت BAC یک درصد برای جلوگیری از رشد سلولهای قارچی مورد استفاده قرار گرفت.

سویه های قارچی: دو سویه قارچی برای این منظور استفاده شد. اولین نمونه قارچی (A18) *Trimatostroma abietis* و دومین آن(J26) *Exophilia jeanselmei* بود که به ترتیب ازسطح بناهای تاریخی مربوط به دوران یونان باستان در اکراین و کلیسایی در آلمان جدا شده بود و از بانک میکروبی دانشگاه الدنبورگ تهیه گردید. سویه های قارچی روی محیط مالت آگار و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سوسپانسیونی از سلولهای قارچی در بافر فسفات تهیه شد. مشاهدات میکروسکوپی وجود مقادیر کافی از سلولها را که غالباً به شکل تجمع یافته دیده می شدند را نشان داد. توده سلولی با استفاده از دستگاه هموژنایزر مدل Ultra-Turrax T25 یکنواخت گردید. به منظور جدا نمودن بهتر سلولها از دستگاه اولتراسونیکاتور مدلBandelin Sonorex Rk100 به مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ دقیقه استفاده شد. با استفاده از چهار لایه گاز استریل معمولی سوسپانسیون یکنواختی از سلولها ایجاد شد. از لام توما برای شمارش 10^5 سلول در میلی لیتر استفاده گردید. برای بررسی تغییرات احتمالی تعداد سلولهای زنده از روش میکروسکوپی و فلوریمتری استفاده شد.

رنگها: محلول کاری FDA (سیگما) با غلظت ۲۰µl/ml درTris-HCL از محلول ذخیره (۰.۰۵ درصد)ساخته شد. محلول کاریCal AM (سیگما) با غلظت۳ µl/ml در آب مقطر از محلول ذخیره (۱µg/ml)آن تهیه شد. محلول کاری از رنگ PI (سیگما) نیز در PBS تهیه گردید.کلیه رنگها در تاریکی و در۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه نگهداری شد.

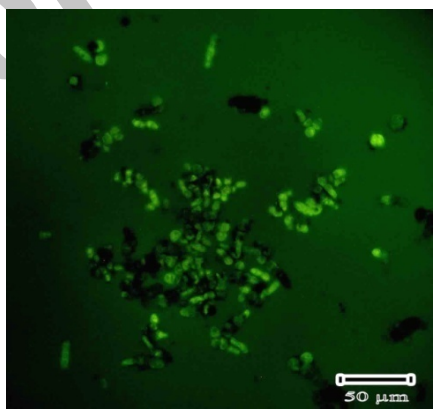
روش رنگ آمیزی سلولهای قارچی: برای ارزیابی کار آرایی روش رنگ آمیزی نیاز به سلولهای مرده و زنده بود. ۱۰۰ µl از سوسپانسیون 10^5 سلولهای قارچی در مجاورت BAC به مدت ۱۸ ساعت گرما گذاری شد. پس از شستشوی سلولها با PBS استریل رنگ آمیزی سلولی انجام گردید. در روش دیگر سلولهای مرده قارچی با قرار دادن نیمی از سوسپانسیون سلولی به مدت یک ساعت در مجاورت گلوتارآلدئید ۸ درصد تهیه گردید. نهایتاً سلولها چندین بار با PBS استریل شستشو داده شد و به نسبت ۱/۲ با سلولهای زنده مخلوط گردید. ۱۰۰ µl از این سلولها با حجم مساوی از رنگهای تهیه شده مخلوط شد و در ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه گرما گذاری شد. رنگ آمیزی سویه های قارچی با ترکیبی از رنگها به دو روش انجام شد. ابتدا حجم مساوی از FDA و PI مخلوط شد. مخلوط این دو رنگ برای رنگ آمیزی استفاده گردید. در روش دیگر سلولها ابتدا با رنگ FDA رنگ آمیزی شد. سپس سلولها در PBS شسته و سانتریفیوژ شد. عمل شستشو دو بار تکرار شد. سلول های شسته شده در این مرحله با PI به عنوان رنگ زمینه رنگ آمیزی و نهایتاً به میکروپلیت های ۹۶ خانه ای سیاه (Nunc) منتقل گردید. برای مشاهده سلولهای رنگ شده از میکروسکوپ فلورسانس زایس مجهز به دو فیلتر ۴۹۰-۴۵۰ و ۵۶۰-۵۱۰ nm برای پرتوهای انگیزش ۵۲۰ و ۵۹۰ nm برای پرتوهای انتشار به ترتیب برای Cal AM FDA,و PI استفاده شد. شدت فلورسانس سلولها با دستگاه اسپکتروفلورومتر مدل Optima Fluostar سنجیده شد. از دو فیلتر۴۸۵ و ۵۴۴ nm برای پرتوهای انگیزش و فیلتر ۵۲۰ و ۵۴۴ nm برای پرتوهای انتشار به ترتیب برای Cal AM,FDAو PI استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

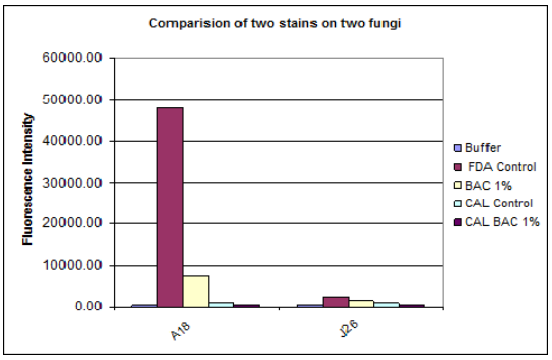
نتایج

سلولهای زنده و فعال قارچی با دو رنگ Cal AM و FDA رنگ سبز روشن فلورسانس را به نمایش گذاشتند در حالی که سلولهای مرده رنگ نشدند یا به عبارتی در این موارد تصویر کاملاً سیاهی از نمونه ها به دست آمد. با مشاهدات میکروسکوپی زمان ۳۰ دقیقه برای رنگ آمیزی سلولها انتخاب گردید. نتایج بررسیها نشان داد که از میان این دو رنگ، FDA توانست با شدت بیشتری سلولهای قارچی را رنگ نماید (شکل ۱). میزان فلورسانس سلولهایی که واجد مقادیر زیادی ملانین بودند در مقایسه با سلولهای جوان تر پایین بود. مقایسه رنگ آمیزی دو سلول قارچی نشان داد که سلولهای A18 بهتر از J26 رنگ گردیدند (نمودار ۱). بنابر این در مراحل بعدی از سلولهای A18 برای رنگ آمیزی و سنجش استفاده شد.



شکل ۱- سلولهای قارچی رنگ آمیزی شده با FDA، سلولهای قارچی واجد مقادیر زیاد ملانین به رنگ تیره دیده می شوند.

میزان فلورسانس سلولهای قارچی رنگ شده با FDA و PI به ترتیب و با مخلوط PI-FDA و در نهایت FDA وسپس PI با اسپکتروفلورومتر اندازه گیری شد (نمودار ۲). در کنار سلولهای رنگ شده میزان فلورسانس بافر و رنگ سنجش گردید. نتایج فلورومتری نشان داد که هیچ گونه فلورسانسی از سلولهای رنگ شده با PI مشاهده نگردید. به عبارتی برآورد میزان مرگ سلولها با PI امکان پذیر نبود. رنگ آمیزی سلولهای قارچی با مخلوط PI–FDA و همچنین رنگ آمیزی سلولها در دو مرحله موجب کاهش میزان فلورومتری شد. این در حالی است که سلولهای قارچی به خوبی با FDA به تنهایی رنگ شدند.



نمودار ۱- میزان فلورسانس دو سلول A18 و J26 رنگ شده با FDA و Cal AM، میزان فلورسانس خود به خودی رنگهای مذکور و بافر موازی با نمونه های تیمار شده با BAC سنجش شد.

بحث

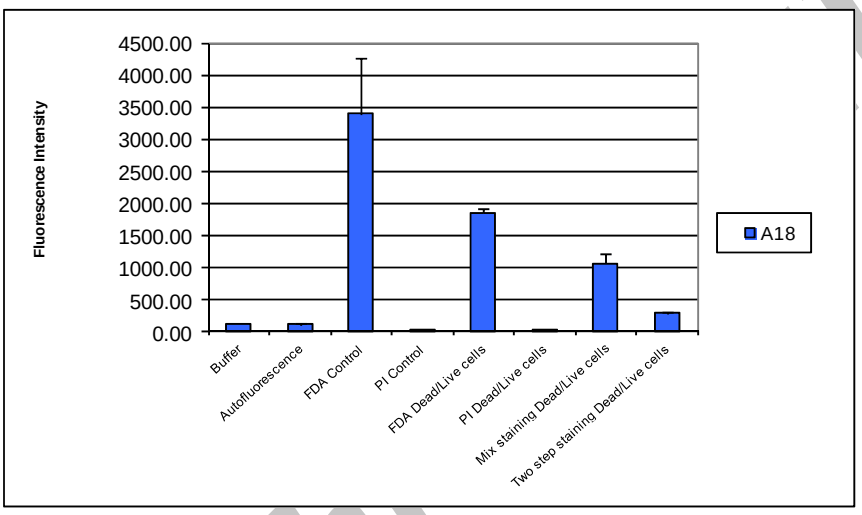
بیوفیلم ساختارهای پیچیده ای از میکروارگانیسم هاست که در بستر پلیمری که توسط خود میکروارگانیسم ها تولید می شود قرار می گیرد(۱۳). این ساختار ویژه به طرق مختلف از جمله تولید پلیمرهای ترشحی می تواند به سطوح مختلف بچسبد و شرایط سخت محیطی از جمله اسیدیته بالا، حرارت بالا، مقاومت به تغییرات فشار اکسیژن را تحمل کند. زمانی که صحبت ازمیکرو کلنی به میان می آید منظور توده ای از چند صد سلول است. این توده سلولی اگر بر روی محیط کشت قرار بگیرد به عنوان یک واحد در نظر گرفته می شود که سنجشها و محاسبات را دچار اشکال می نماید. برای غلبه بر چنین مشکلی و جدا کردن سلولها و به دست آوردن سوسپانسیون یکنواختی از آنها از روشهای فیزیکی و شیمیایی استفاده می شود. از جمله عوامل فیزیکوشیمیایی می توان به استفاده از EDTA ,Junlon ,Tween و استفاده از هموژنایزر و سونیکاتور اشاره کرد. روشهای فیزیکی و مکانیکی غیر اختصاصی اند

Archive of SID

www.SID.ir

و در مقایسه با سایر روشها کاربرد وسیع تر و کارآیی بالاتری دارند.

برخی از قارچهای مؤثر در تخریب بسترهای سنگی رشد بسیار آهسته ای دارند لذا مطالعات مربوط به اثر بیوسایدها بر روی آنها بسیار زمان بر است. در مقالات مختلف به ترکیبات متفاوت شیمیایی برای کنترل رشد عوامل بیولوژیک مؤثر در فرسودگی زیستی اشاره شده است. BAC، ترکیبلت چهارتایی آمونیوم بر پایه سیلان، نانوذرات نقره، زئولیتهای مس و نقره و بیوسایدهای قدیمی استارات، سیلان و ترکیب کلرینی پیریدین از جمله این موارد هستند (۱۸ و ۲۲). هنوزبا گذشت بیش از هفتاد سال از معرفی BAC از آن در جلوگیری از تخریب زیستی سطوح چوبی و سنگی استفاده می شود (۳ و ۲۱). نتایج محققین نشان داده است که کاربرد توأم بیوسایدهای سنتی همراه با تیمارهای آنزیمی مثل پروتئاز، لیپاز و گلوکزاکسیداز نتایج بهتری را در پاک کردن سطوح از عوامل بیولوژیک ارائه می دهد (۱۹).



نمودار ۲- میزان فلورسانس سلولهای A18 بدون رنگ آمیزی و پس از رنگ آمیزی با FDA و PI اندازه گیزی شد. برای کنترل کارآمدی روش از مخلوط سلول های زنده و مرده استفاده شد. مخلوط سلول های مرده و زنده به دو روش رنگ آمیزی شد که در بخش روش ها آمده است.

فلوروکرومهایی که برای رنگ آمیزی سلولی استفاده می شوند بر پایه پتانسیل اکسید و احیای سیتوپلاسمی، فعالیت زنجیره انتقال الکترون، فعالیت آنزیمی، پتانسیل غشای سلولی و بر اساس حفظ تمامیت غشاء عمل می کنند (۱ و ۶). گزارشهای متعددی مبنی بر استفاده از رنگهای فلورسانت یا مواد شیمیایی مبتنی بر فعالیت آنزیمی وجود دارد (۱۷ و ۲۰) . ازمشتقات FDA بعنوان رنگ حیاتی در رنگ آمیزی سلولهای باکتریهای موجود در آب، پساب و مواد پروبیوتیکی استفاده شده است (۲ و ۱۳). Cal AM فلوروکروم دیگری است که می تواند سلولهای زنده و مرده را از یکدیگر تفکیک نماید. مطالعات نشان داده است که میزان فلورسانس پایین سلولهای پستانداران رنگ شده باCal AM حکایت از وجود سیستمهای انتقال رنگ به بیرون از سیتوپلاسم دارد (۸). در این پژوهش نیز سلولهای رنگ آمیزی شده با Cal AM فلورسانس پایینی را نشان دادند. میزان فلورسانس بدو طریق میکروسکوپی و فلورومتری بررسی شد. این نتایج با تحقیقات انجام شده برروی مخمر ساکارومیسس سرویزیه

www.SID.ir

که توسط کانشیرو و همکارانش انجام شده بود مطابقت داشت (۵). میزان پایین رنگ پذیری سلولهای قارچی با رنگ مذکورمی تواند ناشی از غیر قابل نفوذ بودن سلولها به رنگ و یا تفاوت در جایگاه اتصال رنگ در سلول باشد. لذا Cal AM برای رنگ آمیزی سلولهای تحقیق حاضر مناسب نبود. برعکس، FDA رنگ مناسبی برای ارزیابی سلولهای زنده مورد نظر تشخیص داده شد. این نتایج با کارهای علمی که دیگران انجام دادند مطابقت داشت. تحقیقات نشان داد که رنگ FDA قادر است غشای سلولهای به لحاظ متابولیکی فعال را از سلولهای غیرفعال متمایز نماید (۱۵ و ۲۳). حسن و همکاران در سال ۲۰۰۲ از FDA برای رنگ آمیزی *Trichoderma harizanium* استفاده نمودند (۴). آنان نشان دادند که قسمتهای فعال هیف قارچی از سایر قسمتها غیر فعال به راحتی قابل تمایز بود. لازم به ذکر است که سلولهایی که شدیداً ملانینی بودند رنگ پذیری کمتری را نسبت به سلولهای جوان تر نشان دادند. به نظر می رسد که ملانین می تواند اندازه منافذ دیواره سلولی و در نتیجه رنگ پذیری قارچها را کاهش دهد. لوپس و همکاران نشان دادند که تلفیق دو رنگ فلورسانس به خوبی می تواند سلولهای زنده و مرده را از یکدیگر متمایز نماید (۷) که این نتایج با گزارش اسپیکما وهمکاران همخوانی نداشت (۱۴). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با توجه به غیر قابل نفوذ بودن سلولهای زنده و مرده به رنگ PI استفاده همزمان این دو رنگ ممکن نمی باشد. همچنین به نظر می رسد که افزایش مراحل شستشو به هنگام استفاده از دو رنگ موجب از دست رفتن تعداد بیشتری از سلولها شده و در نتیجه میزان فلورسانس سلولهای قارچی کاهش می یابد. مطالعات نشان داده است قارچهایی که در شرایط سخت محیطی رشد می کنند دارای غشاهای ضخیم و مقادیر بالایی از ملانین هستند که این ویژگی رنگ پذیری آنها را از سایر سلولها متمایز میکند. در ضمن در روش کلاسیک کشت و تعیین CFU میکروارگانیسم های زنده ای که قابلیت کشت خود را از دست داده اند در محاسبه وارد نمی گردد. در بررسیهای انجام شده قبلی توسط نویسنده نشان داده شد که تأثیر بیوساید ها موجب از دست رفتن قابلیت کشت بسیاری از سلولهای زنده تیمار شده می شود که در روش کشت و تعیین CFU مقدار آنها محاسبه نمی گردد (تحت چاپ). به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که تکنیک فلورومتری روشی ساده و سریع برای نشان دادن میکروبهای پویکیلوتروف است. FDA می تواند سلولهای مورد نظر را رنگ نماید. میزان رنگ آمیزی سلولها با روشهای میکروسکوپی و فلورومتری قابل مشاهده و اندازه گیری است. شدت رنگ پذیری در سلولهای مختلف متفاوت می باشد. تفاوت ساختار دیواره سلولی قارچها منجر به نتایج مختلف میکروسکوپی و فلورومتری سلولها گردید. از دو تکنیک به کار رفته روش فلورومتری بهتر از روش میکروسکوپی قادر به نشان دادن تغییرات فعالیت سلولی قارچهای پویکیلوتروف می باشد. روش فلورومتری برای کمی کردن فعالیت بیوسایدها علیه میکروارگانیسم های مؤثر در تخریب آثار باستانی می تواند بکار رود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهرا در حمایت از انجام این پژوهش تشکر می گردد. این کار بدون حمایتهای فکری و علمی همکاران گروه زیست دانشگاه الزهرا و دانشگاه الدنبورگ ممکن نبود که بدین ترتیب تقدیر می گردد.

منابع

1. Breeuwer, P. and T. Abee (2000). "Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques." International Journal of Food Microbiology 55(1-3): 193-200.

Archive of SID

www.SID.ir

2. Bunthof, C. J., S. van den Braak, P. Breeuwer, F. M. Rombouts and T. Abee (1999). "Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed Lactococcus lactis." Applied and Environmental Microbiology 65(8): 3681-3689.

3. Chelsea Wao, Bob Daniels, Rod Stirling, Paul Morris. (2010). "Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 64, 5, August, 403-408

4. Hassan, M., G. Corkidi, E. Galindo and C. Flores, Serrano-Carreón,L (2002). "Accurate and rapid viability assessment of Trichoderma harzianum using fluorescence-based digital image analysis." Biotechnology and Bioengineering 80(6): 677-684.

5. Kaneshiro, E. S., M. A. Wyder, Y. P. Wu and M. T. Cushion (1993). "Reliability of CalceinAcetoxy Methyl-Ester and Ethidium Homodimer or Propidium Iodide for Viability Assessment of Microbes." Journal of Microbiological Methods 17(1): 1-16.

6. Kepner, R. L. and J. R. Pratt (1994). "Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental-Samples - Past and Present." Microbiological Reviews 58(4): 603-615.

7. Lopes, M. A., O. Fischman, W. Gambale and B. Correa (2003). "Fluorescent method for studying the morphogenesis and viability of dermatophyte cells." Mycopathologia 156(2): 61-66.

8. Millard, P. J., B. L. Roth, H. P. T. Thi, S. T. Yue and R. P. Haugland (1997). "Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts." Applied and Environmental Microbiology 63(7): 2897-2905.

9. Mohammadi, P., (2007). "Rock Inhabiting and Deteriorating Fungi from Carbonate Monuments of Persepolis - Isolation, Characterization, and Inhibitory Treatment." PhD Thesis, University of Oldenburg, Germany

10. Mohammadi, P., Gorbushina, A., Marquadt, J and Krumbein, WE (2011). "Isolated Fungi from Persepolis Rocks; a Study to Identify the Biodeteriorating Agents of Cultural Heritage in Iran."Iranian Journal of Biology (23)5:1-7.

11. Nugari M. P, Pietrini A. M, Caneva G, Imperi F, Visca P, (2009), Biodeterioration of mural painting in a rocky habitat: The crypt of original Sin (Matera, Italy), "International Biodeterioration&Biodegradation ".63:705-711.

12. Porter, J., J. Robinson, R. Pickup and C. Edwards (1995). "Recovery of a Bacterial Subpopulation from Sewage Using Immunofluorescent Flow-Cytometry and Cell Sorting." Fems Microbiology Letters 133(1-2): 195-199.

13. Sauer K, (2003). The genomic and proteomics of biofilm formation. Genome Biology, 4:219

14. Sipkema, D., A. P. L. Snijders, C. Schroen, R. Osinga and R. H. Wijffels (2004). "The life and death of sponge cells." Biotechnology and Bioengineering 85(3): 239-247.

15. Söderstreom, B. E. (1977). "Vital Staining of Fungi in Pure Cultures and in Soil with Fluorescein Diacetate." Soil Biology & Biochemistry 9(1): 59-63.

16. Staley, J. T., F. Palmer and J. B. Adams (1982). "Microcolonial Fungi - Common Inhabitants on Desert Rocks." Science 215(4536): 1093-1095.

17. Taylor, S. (1992). "Composition and activity of bacterial populations found on decaying stonework." PhD thesis, University of Portsmouth, England.

18. Tretiach Mauro**,** Stefano BertuzziandOrnella Salvadori, (2010)**,** Chlorophyll *a* fluorescence as a practical tool for checking the effects of biocide treatments on endolithic lichens . International Biodeterioration & Biodegradation,64:452-460

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

20. Warscheid, T. (1990). "Untersuchungen zur Biodeterioration von Sandsteinen unter besondere Berücksichtigung der chemoorganotrophen Bakterien."PhD thesis, University of Oldenburg, Germany.

21. White C. S, Collins J. L and Newman, (1938), The clinical use of alkyl-dimethyl benzyl-ammonium chloride: A preliminary report, The American Journal of Surgery, 39:607-609

22. Willem De Muynck, Anibal Maury Ramirez, Nele De. Belie, Willy Verstraete, (2009) Evaluation of strategies to prevent algal fouling on white architectural and cellular concrete Original Research International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 63: Pages 679-689

Archive of SID

www.SID.ir

23. Ziegler, G., E. Ziegler and R. Witzenhausen (1975). "Vital fluorescent staining of microorganisms by 3', 6'-diacetyl-fluoresceine for determination of their metabolic activity." ZentralblBakteriol: 30(2): 252-64.

24. (1999) Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments, CRC Press, pp: 75 - 86.

25. (1999) The Phototrophic Prokaryotes".(edt) Kluwer Academic/Plenum publisher, New York, pp: 657-663

26. (2000) Microbial Sediments, Springer, and Berlin: 161-170

Spectrofluorometry as a tool to evaluate biocide efficiency on deteriorating rock fungi

Mohammadi P.

Biology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Biodeterioration of monuments is one of the principal fields of interest for researchers in the conservation of cultural heritage. Microorganisms which are living on inorganic substrate can settle and spread on and into the rock materials and cause biological damages.The aim of this study was to assay effectiveness of chemical treatment which is applied in the restoration and renovation of cultural heritage by using a fluorometric method. Because cell viability is a critical parameter for assessment of success of biocide treatments, one of the objectives of research was to find a reliable method to estimate the efficacy of chemicals on rock fungi. The fluorometry tests were performed with two isolates A18 (*Trimmatostroma abietis*) and J26 (*Exophilia jeanselmei*). The cells were treated by Alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride (BAC) 1%. Then the cells were stained with FDA (fluorescein diacetate) and Cal AM (Calcein AM), PI (Propidium Iodide), and combinations of them. The fluorometric method was done to measure the alterations of cell viability after chemical treatment. FDA stained cells performed a strong staining under microscopic as well as fluorometric recording. After cells were incubated in presence of Cal AM, fluorescence of individual cells was measured and a weak fluorescence was observed. Fungi stained by PI were not visible in any microscopic experiment. Furthermore, the fluorometric method did not show any considerable fluorescence intensity of PI stained cells. When combination of dyes was used, stained cells had not only a low yield qualitatively and quantitatively, also the fluorescence intensity of FDA was decreased. On the contrary, when FDA was used alone, strong fluorescence intensity was shown and it could well be used for chemical treatment assays and to quantify the efficacy of the chemical treatment. FDA fluorometry is accurate, reproducible and economic in both time and materials spent.

Keywords: rock fungi, fluorescein diacetate, spectrofluorometry

Archive of SID

www.SID.ir