Journal of Research on Archaeometry 2024; 10 (1); 203-216

Journal of Reserarch on Archaeometry

DOI: http://dx.doi.org/10.61186/jra.10.1.414

Original Paper Open Access

Investigating the Antimicrobial Activity and Toxicity of Green Synthesized Silver and Zinc Nanoparticles with the Aim of Controlling the Biodeterioration of Cultural Heritage

Nasrin Noohi[1*], Maryam Abbasalipour[2]

1. Research Center for Conservation of Cultural Relics, Research Institute of Cultural Heritage & Tourism, Tehran, Iran
2. Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 2024/04/25 Accepted: 2024/06/27

Abstract

Cultural heritage is always subject to biodeterioration by microorganisms, and their control and containment are essential. Metal nanoparticles can be a good option to solve this problem. Following the production and identification of silver and zinc nanoparticles by the green method, in this study, we aimed to evaluate the antimicrobial activity of the synthesized nanoparticles and their toxic effect on normal human cells for use in the field of cultural heritage. To investigate the antimicrobial effect of silver and zinc nanoparticles, 4 bacterial strains, B. subtilis, Ps.aeruginosa, B. licheniformis and Micrococcus and 5 fungal strains, Aspergillus, Penicillium Alternaria, Chaetomium, and Cladosporium were tested. For this purpose, agar diffusion and liquid dilution tests (to determine MIC) were performed, and in the next step, MBC (for bacteria) and MFC (for fungi) were determined. Also, the cytotoxicity of nanoparticles was evaluated on HDF cell lines (normal skin cells) using the MTT method. Silver nanoparticles showed antimicrobial effect against all tested bacterial and fungal strains. Out of the 5 fungal strains studied, only Chaetomium fungus was sensitive to zinc nanoparticles, On the other hand, all tested bacterial strains except Ps. aeruginosa were sensitive to zinc nanoparticles. Silver nanoparticles showed concentration-dependent cytotoxic activity against HDF, but zinc nanoparticles did not show a toxic effect on HDF cells. Among the two investigated nanoparticles, silver nanoparticles have a high potential to be used as an antimicrobial agent. However, zinc nanoparticles can be considered as a suitable candidate for use against bacterial contamination. Considering the toxic effect of silver nanoparticles on normal human skin cells, this issue should be seriously considered during the process of disinfecting objects, in terms of preserving the health and safety of conservators and visitors.

Keywords:

Biodeterioratin, Green nanoparticles, Antibacterial and anti-fungal activity, Cytotoxicity

* Corresponding Author: n.nouhi@richt.ir

©2024 by the Authours.This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license)
https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0

پژوهه باستان‌سنجی ۱۴۰۳؛ ۱۰(۱): ۲۱۶-۲۰۳

پژوهه باستان‌سنجی

DOI: http://dx.doi.org/10.61186/jra.10.1.414

دانشگاه هنر اسلامی تبریز ۱۳۷۸

مقاله مروری

بررسی فعالیت ضد میکروبی و میزان سمیت نانو ذرات نقره و روی تولید شده به روش سبز با هدف کنترل فرسودگی زیستی آثار تاریخی

نسرین نوحی[۱*]، مریم عباسعلی‌پور[۲]

۱. استادیار، پژوهشکده حفاظت و مرمت آثار تاریخی- فرهنگی، تهران، ایران

۲. دکتری بیوتکنولوژی دارویی، بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۶ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۷**

چکیده

آثار تاریخی و فرهنگی همواره در معرض فرسودگی زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها قرار دارد و کنترل و مهار آن‌ها بر روی آثار تاریخی امری ضروری‌ست. نانو ذرات فلزی می‌توانند گزینه مناسبی برای رفع این مشکل به شمار آیند. به دنبال تولید و شناسایی نانو ذرات نقره و روی به روش سبز، در این مطالعه تلاش بر این است، فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات تولید شده و میزان سمیت آن‌ها بر روی سلول‌های نرمال انسانی با هدف استفاده در حیطه میراث فرهنگی مورد ارزیابی قرار گیرند. جهت بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی، ۴ سویه باکتریایی *B. subtilis*، *Ps. aeruginosa*، *B. licheniformis* و *Micrococcus* و ۵ سویه قارچی *Aspergillus*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Chaetomium* و *Cladosporium* مورد آزمایش قرار گرفتند. برای این منظور، آزمون انتشار آگار و تست رقت سازی مایع (جهت تعیین MIC) انجام و در مرحله بعد میزان MBC (برای باکتری‌ها) و MFC (برای قارچ‌ها) تعیین شد. همچنین، میزان سمیت سلولی نانو ذرات تولید شده با استفاده از روش MTT بر روی خطوط سلولی HDF ارزیابی شد. نانو ذرات نقره اثر ضد میکروبی علیه تمام سویه‌های باکتریایی و قارچی مورد آزمایش نشان داد. درحالی‌که از ۵ سویه قارچی مورد بررسی تنها قارچ *Chaetomium* به نانو ذرات روی حساس بود؛ ولی تمام سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش به جز *Ps. aeruginosa* به نانو ذرات روی حساس بودند. نانو ذرات نقره فعالیت سیتوتوکسی وابسته به غلظت را در برابر HDF نشان داد ولی نانو ذرات روی اثر سمی بر سلول‌های HDF نشان نداد. در بین دو نانو ذره مورد بررسی، نانو ذرات نقره دارای پتانسیل بالاتری جهت استفاده به عنوان ماده ضد میکروبی است. ولی نانو ذرات روی می‌تواند به عنوان گزینه مناسب جهت استفاده در برابر آلودگی‌های باکتریایی به شمار آید. با توجه به اثر سمی نانو ذرات نقره روی سلول‌های نرمال پوستی انسان، این مسئله باید طی فرایند ضدعفونی اثر از نظر حفظ سلامت و ایمنی مرمت‌گران و بازدیدکنندگان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: فرسودگی زیستی، نانو ذرات سبز، فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی، سمیت سلولی.

*مسئول مکاتبات: n.nouhi@richt.ir

©2024 by the Authours.This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license)
https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0

۱. مقدمه

میراث هنری و معماری در قالب کتاب، نقاشی، لباس، بناهای تاریخی، در میان بسیاری از آثار باستانی دیگر، نمایانگر جنبه‌های ملموس و قابل‌توجهی از میراث فرهنگی یک جامعه، منطقه یا کشور است که نسل‌های کنونی و آینده از آن استقبال می‌کنند. حفظ میراث فرهنگی مشترک ما یک اولویت اجتماعی و اقتصادی جهانی است؛ اما مشکلات ناشی از عدم حفاظت صحیح از میراث ملموس اغلب تنها زمانی مورد توجه قرار می‌گیرند که تراژدی‌هایی مانند آتش‌سوزی، فروریختن یا آسیب توسط آب رخ می‌دهند. بااین‌حال، تهدیدهای خاموش بسیاری برای همیشه در آثار و بناهای میراثی، به دور از چشم اکثریت مردم، وجود دارد. جنبه‌های محیطی (رطوبت، دما، نور، غلظت CO_2، فشار اتمسفر و pH) و شرایط زمین‌شناسی دو عامل مهم تأثیرگذار بر اشیاء تاریخی هستند. بااین‌حال، ترکیب شیمیایی (آلی و غیر آلی)، کیفیت مواد و فرآیند پیری، استرس مکانیکی داخلی و کلونیزاسیون بیولوژیکی (به‌طور خاص باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، خزه، گلسنگ و حشرات) عوامل اصلی دیگری را تشکیل می‌دهند که منجر به فرسودگی آثار می‌شوند. به طور ویژه، فرسودگی زیستی (Biodeterioration) به مفهوم «هرگونه تغییر نامطلوب در ویژگی‌های یک ماده ناشی از فعالیت‌های حیاتی موجودات»، یک مشکل دائمی در حفاظت از میراث فرهنگی هست. آلودگی و فرسودگی آثاری که در اتاق‌های نمایشگاه به نمایش گذاشته شده یا در انبارها نگهداری می‌شوند، در موزه‌های قدیمی و نوساز بسیار دیده می‌شود (Branysova et al., 2022; Kakakhel et al., 2019).

میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، سیانوباکترها و جلبک‌ها در فرسودگی اشیاء میراث هنری و معماری پتانسیل بالایی دارند. قارچ‌ها یکی از عوامل بیولوژیکی مخرب مهم بر آثار تاریخی به شمار می‌آیند. هیف‌ها به سرعت تکثیر می‌شوند و به اعماق انواع مواد آلی و معدنی نفوذ می‌کنند. در همین حال، اسپور آن‌ها زمانی که شرایط رشد موضعی مساعدتر می‌شود، همیشه برای جوانه‌زنی موجود و در دسترس هستند (Gadd et al., 2024). مشکل حفاظت از ساختارها و بناهای تاریخی در برابر هجوم باکتری‌ها و قارچ‌ها امری پیچیده به شمار می‌آید؛ زیرا این ساختارهای باستانی توسط مردم بازدید می‌شوند و استفاده از مواد شیمیایی سمی احتمال آلوده کردن بازدیدکنندگان را بالا می‌برد. ازاین‌رو ایده‌های جدید جهت کنترل بیوفیلم تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها بر روی آثار تاریخی می‌تواند مورد استقبال قرار گیرد (Di Carlo et al., 2022; Kakakhel et al., 2019).

با توجه به مطالعات پیشین انجام شده در خصوص فعالیت بالای ضد میکروبی نانو ذرات فلزی، این ذرات می‌توانند گزینه مناسبی برای رفع این مشکل به شمار آیند. نانو ذرات نقره (Ag) و روی (Zn) ازجمله نانو مواد پرمصرف هستند که در زمینه‌های مختلف شامل (پزشکی، داروهای ضد میکروبی و غیره) مورد استفاده قرار می‌گیرند. این نانو ذرات دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی (فعالیت ضد باکتری و قارچی) هستند و خواص آن‌ها به اندازه و شکل نانو ذرات بستگی دارد. ویژگی‌هایی که کاملاً به روش سنتز آن‌ها وابسته هستند (Liu et al., 2009; Zhang et al., 2016). نانو ذرات تولید شده به روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارای محدودیت‌هایی جهت استفاده در موارد خاص هستند؛ که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. ۱) پایداری در محیط ناسازگار؛ ۲) فقدان درک درست از مکانیسم‌های اساسی و عوامل مدل‌سازی؛ ۳) تجمع زیستی، ویژگی‌های سمی؛ ۴) الزام به آنالیزهای گسترده؛ ۵) نیاز به اپراتورهای ماهر؛ ۶) مشکل در مونتاژ دستگاه‌ها و سازه‌ها؛ و ۷) بازیافت، استفاده مجدد، بازسازی. در دنیای واقعی، لازم است که خصوصیات، رفتار و نوع نانو مواد برای دستیابی به نکات فوق‌الذکر بهبود یابد. ازاین‌رو، این محدودیت‌ها فرصت‌های جدید و بزرگی را در این حوزه تحقیقاتی باز می‌کند. جهت مقابله با این محدودیت‌ها، فن‌آوری جدید سنتز سبز، در تحقیقات و توسعه علم و فن‌آوری مورد توجه زیادی قرار گرفته است. سنتز به روش سبز، جهت جلوگیری از تولید محصولات جانبی ناخواسته یا مضر از طریق ایجاد روش‌های سنتز قابل‌اعتماد، پایدار و سازگار با محیط زیست، لازم و ضروری است. به منظور سنتز سبز نانو ذرات فلزی از مواد مختلف بیولوژیکی (به عنوان مثال، باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و عصاره‌های گیاهی) استفاده می‌شود (Siddiqi et al., 2018; Singh et al., 2018).

از منظر کاربرد نانو ذرات، اولین و مهم‌ترین گام توصیف مناسب خواص فیزیکوشیمیایی نانو مواد (به عنوان مثال، اندازه، مورفولوژی، پایداری و غیره) است. بااین‌حال، مرحله دوم نیاز به ارزیابی دقیق خواص ضد میکروبی نانو مواد در برابر میکروارگانیسم‌های مربوطه و بررسی اثر سمی آن‌ها بر سلول‌های نرمال انسانی دارد تا نامزدهای بالقوه را غربال کند (Franco-Castillo et al., 2021). به دنبال تولید نانو ذرات نقره و روی به روش سبز و شناسایی آنها با استفاده از عصاره قارچی طی مطالعات پیشین (Zamani et al., 2022)، در این مطالعه میزان فعالیت ضد میکروبی آنها علیه سویه‌های باکتریایی و قارچی جداسازی شده از آثار تاریخی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثرات سمی این نانو ذرات بر روی سلول‌های نرمال پوستی (Human Dermal Fibroblasts) بررسی شد.

۲. پیشینه پژوهش

تا کنون مطالعات زیادی در خصوص بررسی و مقایسه میزان سمیت و فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات تولید شده به روش سبز و روش شیمیایی انجام شده است. در این مقاله به چند مطالعه اخیر در این خصوص اشاره می‌کنیم. در مطالعه مقایسه‌ای انجام شده بر روی نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز و روش شیمیایی توسط آمبایا و همکاران میزان پایداری و فعالیت زیستی نانو ذرات تولید شده به روش سبز بالاتر از نانو ذرات تولید شده به روش شیمیایی بود (Ambaya et al., 2022). حسین دولت و همکاران نشان دادند نانو ذرات تولید شده به روش سبز دارای اثر سمیت کمتری نسبت به نانو ذرات تولید شده به روش شیمیایی است. همچنین در این مطالعه گزارش شده است، نانو ذرات آهن تولید شده به روش سبز دارای فعالیت ضد میکروبی خوب و قابل قبولی هستند (Dowlath et al., 2021). در مطالعه انجام شده توسط یاداو و همکاران در خصوص بررسی فعالیت دفع پشه نانو ذرات نقره سبز تولید شده با میخک و نانو ذرات تولید شده به روش‌های شیمیایی و میزان سمیت آنها، گزارش دادند نانو ذرات سبز دارای بهترین فعالیت دفع پشه و کمترین میزان سمیت بر روی *Daphnia magna* بود (Yadav & Preet, 2023).

در خصوص بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی بر روی عوامل میکروبی مؤثر در فرسودگی زیستی آثار تاریخی یا محیط‌های موزه‌ای مطالعات مختلفی انجام گرفته است. گوتاروسکا و همکاران پیشگام استفاده از نانو ذرات نقره در ضدعفونی و حفاظت از میراث هستند و توانایی آن‌ها را به عنوان یک ضدعفونی‌کننده قوی برای سطوح اسناد آرشیوی و اشیاء تاریخی نشان دادند. آنها پس از بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر روی گونه‌های میکروبی جدا شده از محیط‌های موزه‌ای، شرایط را برای ضدعفونی اشیاء میراثی از جمله پارچه، کاغذ یا بوم در یک محفظه مه‌پاش بهینه کردند (Gutarowska, et al., 2012). بوکالون و همکاران یک مهار کامل رشد میکروارگانیسم‌ها را در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از نانو ذرات نقره گزارش کردند. اگرچه برای جلوگیری از تغییر رنگ روی سطوح سنگ، حداکثر غلظتی که می‌توان استفاده کرد ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. برای کاهش این تغییر رنگ ناخواسته در حین استفاده از نانو ذرات نقره، این نانو مواد با یک پلیمر سیلیکونی ترکیب شدند که به شدت رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها را روی سنگ‌های پوشش داده شده کاهش داد (Boccalon et al., 2021). همچنین، فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی نانو ذرات روی در مطالعات مختلف بر روی گونه‌های قارچی و باکتریایی جدا شده از کاغذ (Afsharpour & Imani, 2017; Jia et al., 2019; Luo et al., 2018) و سنگ (Aldosari et al., 2019; Van der Werf et al., 2015) گزارش شده است.

با وجود انجام مطالعات مختلف بر روی نانو ذرات تولید شده به روش شیمیایی در حیطه فرسودگی زیستی آثار تاریخی، بررسی‌های انجام شده در خصوص اثر نانو ذرات تولید شده به روش سبز انگشت شمار است. کاریلو گونزالز و همکاران در مکزیک گزارش دادند نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز بر روی میکروارگانیسم‌های به دست آمده از یک سایت باستانی، دارای اثرات ضد میکروبی قابل قبولی بودند. در این مطالعه از عصاره‌های آبی برگ دو گونه گیاهی (Foeniculum vulgare و Tecoma stans) در سنتز نانو ذرات نقره استفاده شد و میزان توانایی این نانو ذرات سبز برای مهار میکروبی

در سه ماده سنگ (گچ، بازالت و کلسیت) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد، استفاده از نانو ذرات نقره سبز به عنوان یک درمان پیشگیرانه یا اصلاحی برای کاهش کلونیزاسیون میکروبی در سه نوع سنگ مورد استفاده در دیوارهای تاریخی موفقیت‌آمیز بود. این اولین مطالعه در مقیاس‌های مختلف (در شرایط آزمایشگاهی و آزمایش بر روی انواع سنگ‌های مختلف) در مورد مهار میکروارگانیسم‌های مؤثر در فرسودگی زیستی جدا شده از یک سایت باستان‌شناسی توسط نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز بود (Carrillo-González et al., 2016).
در مطالعه دیگر، فودا عبدالمسعود و همکاران طی مطالعه‌ای، مهار رشد گونه‌های قارچی و باکتریایی جدا شده از یک نسخه خطی باستان‌شناسی در کتابخانه الازهر قاهره مصر توسط نانو ذرات روی تولید شده به روش سبز گزارش کردند (Fouda et al., 2019).

۳. مواد و روش‌ها

۳-۱. نانو ذرات نقره و روی تولید شده به روش سبز

در این مطالعه، از نانو ذرات نقره و روی تولید شده به روش سبز (با استفاده از عصاره قارچی) طی مطالعات پیشین در پژوهشگاه میراث فرهنگی و گردشگری استفاده شد. تولید نانو ذرات مذکور از طریق طیف‌سنجی UV-Vis، XRD ، TEM و FTIR مورد تأیید قرار گرفته است (Zamani et al., 2022). اندازه نانو ذرات نقره تولید شده در محدوده ۱۵ تا ۴۵ نانومتر (میانگین ۳۰ نانومتر) و اغلب به شکل کره‌ای و اندازه نانو ذرات روی در محدوده ۳۵ تا ۵۵ نانومتر (میانگین ۴۰ نانومتر) و چند ضلعی هستند.

۳-۲. بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات علیه باکتری‌ها

۳-۲-۱. سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش

در این مطالعه جهت بررسی اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره و روی، ۲ سویه باکتریایی ATCC شامل *B. subtilis* و *Ps.aeruginosa* و دو سویه باکتریایی جداسازی شده از آثار تاریخی شامل *B. licheniformis* و *Micrococcus* مورد آزمایش قرار گرفتند (Noohi & Papizadeh, 2023).

۳-۲-۲. روش انتشار در آگار

به منظور تعیین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در برابر نانو ذرات تولید شده، با استفاده از پیپت پاستور استریل شده، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar)، ایجاد شد. سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک‌فارلند آماده شده با سوآپ استریل روی محیط کشت داده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو ذره در چاهک‌های ایجاد شده ریخته شد. قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها، پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد (CLSI, 2012a).

۳-۲-۳. تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentratio) در باکتری‌ها

برای این منظور پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل تهیه شد. برای هر ردیف عمودی یک سویه باکتری در نظر گرفته شد. در ابتدا داخل تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون مایع ریخته و سپس به اولین چاهک از هر ردیف پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون مایع حاوی ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو ذره اضافه کرده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول به چاهک دوم حاوی ۱۰۰ میکرولیتر مولر هینتون مایع ریخته و همین روند تا چاهک شماره ۶ از هر ردیف ادامه می‌یابد و در نهایت ۱۰۰ میکرلیتر از محلول نهایی دور ریخته شد و در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از

محلول سوسپانسیون باکتریایی آماده شده در محیط مولر هینتون مایع تلقیح شد؛ و به این ترتیب شیب غلظت از نانو ذرات از چاهک اول به سمت چاهک شماره ۶ با غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲,۵، ۳۱,۲۵ و ۱۵,۶ میکروگرم نانو ذره در میلی‌لیتر ایجاد شد. چاهک شماره ۷ به‌عنوان کنترل مثبت حاوی محیط کشت مولر هینتون مایع حاوی باکتری ولی فاقد نانو ذرات نقره و چاهک شماره ۸ از هر ردیف عمودی، به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع بدون تلقیح میکروبی بود. میکروپلیت مورد نظر برای ادامه آزمایش در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد (CLSI, 2012b).

٤-۲-۳. تعیین MBC (Minimum Bactericidal Concentration)

در این آزمایش حداقل غلظت نانو ذره که توانسته باشد باکتری را بکشد به عنوان MBC تعیین شد. پس از ۲۴ ساعت، از هرکدام از چاهک‌های میکروپلیت که از نظر کدورت فاقد نشانه رشد بودند، ۱۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient agar) کشت داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها ازنظر رشد یا عدم رشد باکتری بررسی شدند (CLSI, 1998).

۳-۳. بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات علیه قارچ‌ها

۱-۳-۳. سویه‌های قارچی مورد آزمایش

در این مطالعه جهت بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره و روی، ۵ سویه باکتریایی جداسازی شده از آثار تاریخی شامل *Aspergillus flavus*، *Penicillium chrysogenum*، *Alternaria*، *Chaetomium* و *Cladosporium cladosporioides* مورد آزمایش قرار گرفتند (Noohi & Papizadeh, 2023).

۲-۳-۳. تهیه سوسپانسیون اسپور قارچی

برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ ابتدا قارچ‌ها در محیط سابرو دکستروز آگار (SDA) به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا اسپور تولید شود. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به داخل هر پلیت اضافه کرده با میله شیشه‌ای خمیده استریل سطح کشت برای برداشت اسپور به آرامی خراش داده شد. بعد از شیک کردن آن، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر میزان عبور نور سوسپانسیون مورد سنجش قرار گرفت (میزان عبور نور ۹۰ درصد برای به دست آوردن سوسپانسیونی با غلظت تقریباً $۱۰^{۶}$ اسپور قارچی در هر میلی‌لیتر مورد نیاز است). تأیید نهایی تعداد اسپورهای قارچی در سوسپانسون‌های تهیه شده با شمارش از طریق لام نئوبار انجام شد (Evans & Richardson, 1989).

۳-۳-۳. روش انتشار در آگار

با استفاده از پیپت پاستور استریل شده چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی محیط کشت سابرودکستروز آگار ایجاد شد. سپس سوسپانسیون قارچی تهیه شده با سوآپ استریل روی محیط کشت داده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو ذره آماده شده در چاهک ریخته شد. قطر هاله عدم رشد قارچی، پس از انکوباسیون به مدت ۷۲ ساعت و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد (CLSI, 2010).

٤-٣-٣. تعیین MIC در قارچ‌ها

مشابه با دستورالعمل توضیح داده شده در بخش MIC باکتری‌ها، در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای شیب غلظت از نانو ذرات تهیه شد. در قارچ‌ها به جای محیط کشت مولر هینتون مایع، از محیط کشت سابرودکستروز مایع استفاده شد. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون اسپور قارچی آماده شده در محیط سابردکستروز مایع تلقیح شد. میکروپلیت مورد نظر برای ادامه آزمایش در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد هر نانو ذره بر روی هر قارچ به روش چشمی تعیین گردید (CLSI, 2008).

٥-٣-٣. تعیین MFC (Minimum Fungicidal Concentration)

در این آزمایش حداقل غلظت نانو ذره که توانسته باشد قارچ را بکشد به عنوان MFC تعیین شد. پس از ۴۸ ساعت، از هرکدام از چاهک‌های میکروپلیت که فاقد نشانه رشد بودند، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت سابردکستروز آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت، پلیت‌ها ازنظر رشد یا عدم رشد قارچ بررسی شدند (Arikan, 2007).

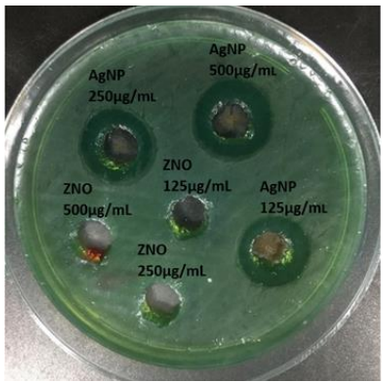
٤-٣. سنجش سمیت سلولی

به منظور مطالعه سمیت سلولی ترکیبات از تست MTT (۳-[۴،۵ dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده می‌شود. تعداد 1×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد و به مدت۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس محیط کشت هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی غلظت‌های مختلف ترکیبات نانو ذره جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محیط چاهک‌ها به آرامی و به طور کامل خالی و سپس به هر چاهک میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و پلیت مورد نظر به مدت چهار ساعت در انکوباتور و به دور از نور قرار گرفت تا کریستال‌های ارغوانی رنگ فورمازان تشکیل شوند. پس از طی زمان مذکور، به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از حلال DMSO (Dimethylsulfoxide) اضافه شده و به مدت حدود ۲۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت تا کریستال‌ها کاملاً حل شوند. میزان جذب را با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ELISA Plate Reader در طول موج‌های ۵۷۰ nm و ۶۹۰ nm اندازه‌گیری گردید و نتایج پس از کسر داده‌های مربوط به ۶۹۰ nm به صورت (Standard deviation) mean ± SD گزارش شد (Mosmann, 1983; Prabhu et al., 2013).

٤. نتایج

١-٤. فعالیت ضد باکتری نانو ذرات نقره و روی

تمام ۴ سویه باکتریایی مورد بررسی به نانو ذرات نقره حساس بودند. بیشترین قطر هاله مربوط به سویه *B. subtilis* با قطر ۲۵ میلی‌متر و کمترین قطر هاله نیز مربوط به *Ps. aeruginosa* با قطر ۱۶ میلی‌متر بود (شکل ۱). در مطالعه مربوط به نانو ذرات روی به‌جز سویه استاندارد *Ps. aeruginosa*، بقیه سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش به نانو ذرات روی حساسیت نشان دادند. بیشترین قطر هاله مربوط به سویه *Micrococcus* با قطر ۲۲ میلی‌متر و کمترین قطر هاله مربوط به *Ps. aeruginos* بود که هاله‌ای اطراف چاهک دیده نشد (جدول ۱).



شکل ۱: فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی سنتز شده به روش سبز بر روی *Pseudomonas aeruginosa*

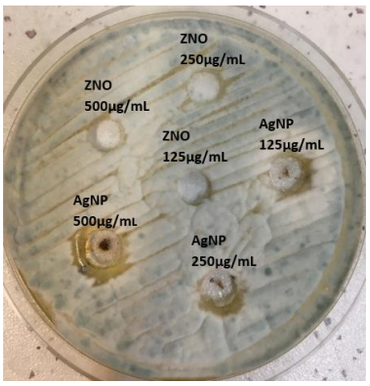
نتایج بررسی جهت تعیین MIC و MBC مربوط به نانو ذرات نقره و روی در (جدول ۱) آورده شده است. میزان MIC در مقابل سویه‌های باکتریایی *B. subtilis*، *Ps.aeruginosa*، *B. licheniformis* و *Micrococcus* برای نانو ذرات نقره به ترتیب ۱۵٫۶، ۳۱٫۲۵، ۳۱٫۲۵ و ۶۲٫۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان MIC برای نانو ذرات روی به ترتیب ۶۲٫۵، ۵۰۰<، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (شکل ۳).

جدول ۱: اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی بر روی سویه‌های باکتریایی

Bacterial strains	Silver nanoparticles			Zn nanoparticles		
	Inhibition zone (mm)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	Inhibition zone (mm)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
B. subtilis	25	15.6	31.25	15	62.5	125
Ps.aeruginosa	16	31.25	31.25	No inhibition zone	>500	>500
B. licheniformis	23	31.25	62.5	17	125	250
Micrococcus	23	62.5	125	22	250	500

۲-٤. فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره و روی

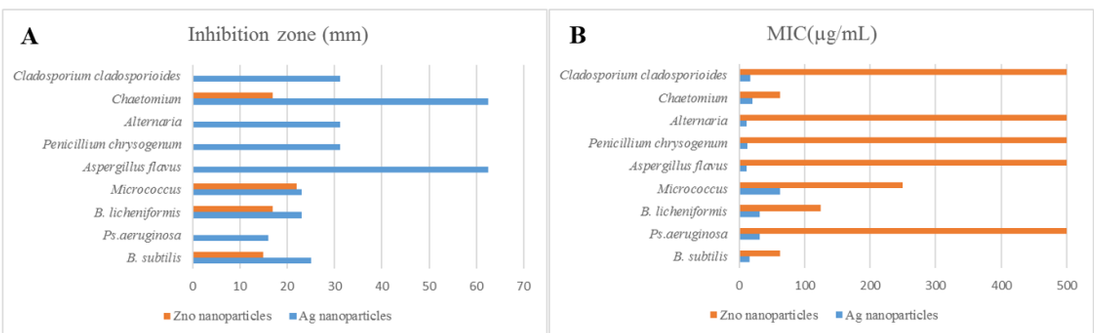
(جدول ۲) قطر هاله عدم رشد، میزان MIC و MFC سویه‌های قارچی در برابر نانو ذرات نقره و روی ارائه شده است. تمام سویه‌های قارچی مورد بررسی به نانو ذرات نقره حساس بودند. در خصوص نانو ذرات نقره بیشترین قطر هاله مربوط به سویه *C. cladosporioides* با قطر ۱۷ میلی‌متر و کمترین قطر هاله نیز مربوط به *A. flavus* و *Alternaria* با قطر ۱۲ میلی‌متر بود (شکل ۲). در مطالعه مربوط به نانو ذرات روی به جز سویه *Chaetomium*، بقیه سویه‌های قارچی مورد آزمایش به نانو ذرات روی مقاوم بودند. قطر هاله عدم رشد مربوط به سویه *Chaetomium*، ۱۷ میلی‌متر بود. نتایج بررسی جهت تعیین MIC و MFC مربوط به نانو ذرات نقره نشان داد میزان MIC در مقابل سویه‌های قارچی *A. flavus*، *P.chrysogenum*، *Alternaria*، *Chaetomium* و *C. cladosporioides* برای نانو ذرات نقره به ترتیب ۶۲٫۵، ۳۱٫۲۵، ۳۱٫۲۵ و ۶۲٫۵ و ۳۱٫۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. در خصوص نانو ذرات روی، میزان MIC برای سویه قارچی *Chaetomium* تنها سویه قارچی حساس به نانو ذرات روی معادل ۶۲٫۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۳).



شکل ۲: فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی سنتز شده به روش سبز بر روی *Penicillium chrysogenum*

جدول ۲: اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی بر روی سویه‌های قارچی

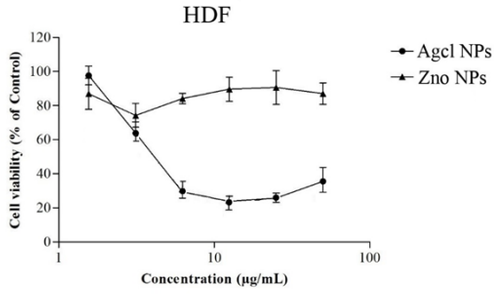
Fungal strains	Silver nanoparticles			Zn nanoparticles		
	Inhibition zone (mm)	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	Inhibition zone (mm)	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
Aspergillus flavus	12	62.5	125	No inhibition zone	>500	-
Penicillium chrysogenum	13	31.25	62.5	No inhibition zone	>500	-
Alternaria	12	31.25	62.5	No inhibition zone	>500	-
Chaetomium	20	62.5	62.5	17	62.5	125
Cladosporium cladosporioides	17	31.25	31.25	No inhibition zone	>500	-



شکل ۳: اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی بر روی سویه‌های باکتریایی و قارچی A) هاله عدم رشد (میلی‌متر)، B) MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

۳-٤. فعالیت سیتوتوکسی نانو ذرات نقره و روی

اثر سمیت نانو ذرات نقره بر روی سلول HDF به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی (شکل ۴) نشان داد، نانو ذرات روی تولید شده تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، هیچ‌گونه اثر سمی بر سلول نداشت؛ درحالی‌که نانو ذرات نقره تولید شده دارای اثرات سمی بالایی بر روی سلول‌های HDF داشته و میزان IC50 معادل ۰,۱۹ ± ۴,۱۴ محاسبه شد (جدول ۳).



شکل ۴: اثر سمیت نانو ذرات نقره و روی سنتز شده به روش سبز بر روی خط سلولی HDF

جدول ۳: مقادیر IC50 مربوط به نانو ذرات نقره و روی بر روی خطوط سلولی HDF

HDF	**Agcl NPs**	**Zno NPs**
IC50 (µg/mL)	4.14 ± 0.19	>100 viability

۵. بحث

نانو ذرات سنتز شده به روش سبز می‌توانند گزینه امیدوارکننده‌ای برای استفاده در حیطه میراث فرهنگی علیه عوامل بیولوژیک مخرب باشند. در این راستا در این مطالعه نانو ذرات سبز تولید شده در مطالعات پیشین از منظر استفاده کاربردی در حیطه میراث فرهنگی مورد ارزیابی بیشتری قرار گرفت. برای این‌که یک نانو ماده به عنوان یک نامزد بالقوه برای کاربرد در زمینه حفاظت از میراث در نظر گرفته شود، باید یک فعالیت ضد میکروبی قوی و طولانی‌مدت داشته باشد و همچنین سمیت سلولی و سمیت زیست محیطی پایینی از خود نشان دهد (Reyes-Estebanez et al., 2018). مطالعات مختلف در خصوص ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانو مواد انجام گرفته است. اگرچه اکثر مطالعات از سویه‌های آزمایشگاهی که به راحتی قابل‌کشت هستند، استفاده می‌کنند ولی برخی مطالعات، میکروارگانیسم‌های موجود در شیء تاریخی را که با روش‌های کشت سنتی (میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت آنزیم‌ها) و یا تکنیک‌های مولکولی (PCR) شناسایی شده‌اند، مورد تجزیه و تحلیل قرار داده‌اند (Fouda et al., 2019; Goffredo et al., 2017; Gutarowska et al., 2012). در این موارد، اثربخشی تیمارهای ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی (بر روی سویه‌های قابل‌کشت) یا در محل (بر روی اثر تاریخی) آزمایش شدند که شرایط مقابله با میکروارگانیسم‌هایی که باعث تخریب زیستی مواد میراثی می‌شوند را فراهم می‌کند. برخی از مطالعات تحت شرایط محیطی دقیقی که باعث خرابی شده است، انجام شده است (Coutinho et al., 2016; Ruffolo et al., 2017). درحالی‌که برخی دیگر، از شرایط مشابه شبیه‌سازی شده در آزمایشگاه استفاده کرده‌اند (Becerra et al., 2018; Fouda et al., 2019).

در این مطالعه جهت سنجش فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره و روی سنتز شده به روش سبز، از میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از آثار تاریخی (باکتری و قارچ) که به روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند، استفاده شد. همچنین از تکنیک‌های انتشار در آگار و روش رقیق‌سازی مایع جهت ارزیابی میزان فعالیت ضد میکروبی و تعیین MIC استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر روی سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش نشان داد هر ۴ سویه باکتریایی مورد آزمایش به نانو ذرات نقره حساس بودند. نتایج مشابه در بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره به دست آمد و تمام ۵ سویه قارچی مورد بررسی در این مطالعه در برابر نانو ذرات نقره حساس بودند.

نتایج به دست آمده با نتایج مطالعات پیشین در خصوص اثر نانو ذرات نقره بر سویه‌های باکتریایی و قارچی جداسازی شده از آثار تاریخی در یک راستاست. طی مطالعه‌ای، گوتاروسکا و همکاران گونه‌های میکروبی را از هوا و سطوح از موزه‌ها و بایگانی‌های مختلف از ورشو و لودز (لهستان) جدا کردند و تا ۹۴ درصد از آن میکروارگانیسم‌ها را با استفاده از ppm ۴۵ نانو ذرات نقره حذف کردند (Gutarowska et al., 2012). در مطالعه‌ای دیگر، بسرا و همکاران یک مهار کامل رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی آثار سنگی را در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از سوسپانسیون ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات نقره گزارش کرد (Becerra et al., 2019). پیترزاک و همکاران در مطالعه‌ای بر روی کتاب‌های باستانی یک کتابخانه عمومی در لودز (لهستان) و آرشیو ملی در پراگ (جمهوری چک) نشان داد نانو ذرات نقره بیشترین کارایی را در درمان ضد میکروبی دارند و کاهش رشد ۶۰ تا ۱۰۰ درصدی میکروبی را در طی تیمار با نانو ذرات نقره گزارش کرد. در این مطالعه میزان اثربخشی برای قارچ‌ها کمتر از باکتری‌ها بود و به نوع کتاب، منطقه نمونه‌برداری و میکروارگانیسم‌های آزمایش شده بستگی داشت (Pietrzak et al., 2017). کریلو و همکاران در یک مطالعه آزمایشگاهی بر روی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده بر روی سویه‌های قارچی و باکتریایی جدا شده از ارگ Teotihuacan (مکزیک) نشان داد میزان اثربخشی نانو ذرات به دوز حساس بوده و به حداکثر اثربخشی بالای ۹۰ درصد در برابر برخی باکتری‌ها می‌رسد. اگرچه روند اثر دوز واضحی در برابر کپک‌ها مشاهده نشد. آن‌ها گزارش دادند در شرایط in vivo، کاهش کلونیزاسیون میکروبی از ۹۰٪ تا ۹۸٪ برای *Pectobacterium carotovorum* و *Alternaria alternata* بر روی سه نوع مختلف مصالح ساختمانی میراثی (گچ، بازالت و کلسیت) متغیر بود.

از سوی دیگر، نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات روی بر روی سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش نشان داد سویه باکتری استاندارد *Ps. aeruginosa* که تنها باکتری گرم منفی مورد آزمایش در این مطالعه بود، مقاوم به نانو ذرات روی بودند ولی ۳ سویه باکتریایی مورد آزمایش به نانو ذرات روی حساس بودند. بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات روی بر روی ۵ سویه قارچی مورد مطالعه نشان داد تنها سویه قارچی حساس به نانو ذرات روی *Chaetomium* است. لذا میزان فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات بیشتر از فعالیت ضد قارچی آن‌هاست. بر اساس نتایج به دست آمده و مقایسه آن با نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی نانو ذرات نقره، میزان اثربخشی نانو ذرات روی نسبت به نانو ذرات نقره هم در برابر باکتری‌ها و هم قارچ‌ها کمتر است.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی بر روی دو سویه باکتریایی جداسازی شده از معبد Concordia در سیسیل ایتالیا که در فرایند فرسودگی زیستی دخیل هستند، نشان داد که این گروه از نانو ذرات دارای فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوبی در مقابل این گروه از میکرواورگانیسم‌ها بوده و از تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح سنگی جلوگیری می‌کند؛ و از این رو جهت استفاده از فرسودگی میکروبی آثار تاریخی مناسب است (Schifano et al., 2020). این مطالعه با نتایج ما در خصوص فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات روی مطابقت دارد.

پژوهش سوریا کاسترو و همکاران نشان داد که نانو ذرات ZnO و [Ca(Zn(OH)3)22H2O] آزمایش شده فعالیت خوبی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، *Escherichia coli*، *Aspergillus niger*، *Penicillium oxalicum* و *Candida albicans* نشان دادند (Soria-Castro et al., 2019). اثر ضد قارچی نانو ذرات ZnO در مطالعات مختلف ازجمله اثر بر *A. niger* روی نمونه سنگ (Aldosari et al., 2019; Van der Werf et al., 2015)، *Trichoderma viride* روی کاغذ (Luo et al., 2018)، *A. niger*، *Aspergillus versicolo* و *Rhizopus solani* بر روی کاغذ (Jia et al., 2019) گزارش شده است.

با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی اثر سمیت نانو ذرات نقره بر روی خط سلولی HDF مشخص شد که نانو ذرات نقره باعث مرگ سلولی در هر دو خط سلولی مورد مطالعه می‌شود؛ به طوری که در غلظت‌های متفاوت نانو ذرات نقره با گذشت زمان تعداد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد. میزان IC50 محاسبه شده برای خط سلولی HDF معادل ۴,۱۴±۰,۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. لذا نانو ذرات نقره دارای اثرات سمی بالا بر روی سلول‌های نرمال پوستی است. از سوی دیگر

نتایج حاصل از بررسی اثر سمی نانو ذرات روی بر سلول‌های HDF حاکی از آن است که نانو ذرات روی تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سمی بر روی سلول‌های HDF نشان نداد. در مطالعه‌ای توسط آدامسکا و همکاران در بررسی اثر سمیت نانو ذرات نقره بر روی سلول‌های نرمال پوستی HDF ، گزارش شد میزان سمیت نانو ذرات بر این خط سلولی بسیار وابسته به خواص فیزیکوشیمیایی نانو ذرات است. به گونه‌ای که نانو ذرات نقره با اندازه ۴۴ نانومتر خواص سمیت بالاتری نسبت به نانو ذرات با اندازه ۲ نانومتر داشتند (Adamska et al., 2021). مطالعه‌ای که توسط اختر و همکارانش انجام شد، گزارش شد که نانو ذرات اکسید روی از طریق افزایش میزان ROS(Reactive oxygen species)، از مسیر P53 باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شود. این در حالی است که تأثیر چندانی بر سلول‌های طبیعی (آستروسیت موش و هپاتوسیت‌ها) نداشت (Akhtar et al., 2012).

٦. نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز دارای قدرت ضدعفونی بالایی در مقابل سویه‌های میکربی و قارچی مورد بررسی بود. در مقابل نانو ذرات روی تولید شده به روش سبز دارای اثر ضد باکتریایی قابل قبول ولی اثر ضد قارچی پایینی بود؛ به گونه‌ای که از ۵ سویه قارچی مورد بررسی تنها قارچ *Chaetomium* به این نانو ذره حساس بود. لذا در بین دو نانو ذره مورد بررسی، نانو ذرات نقره دارای پتانسیل بالاتری جهت استفاده به عنوان ماده ضد میکروبی است؛ ولی بر اساس نوع آلودگی پیش رو (باکتریایی یا قارچی)، نانو ذرات روی می‌تواند به عنوان کاندید مناسب جهت استفاده در برابر آلودگی‌های باکتریایی به شمار آید. از سوی دیگر بررسی سطح سمیت نانو ذرات بر روی سلول‌های نرمال پوستی انسان حاکی از سمیت بالاتر نانو ذرات نقره نسبت به نانو ذرات روی بود؛ که این مسئله باید در انتخاب نوع اثر و محل قرارگیری اثر (محیط باز یا بسته) و میزان دست‌کاری آن توسط افراد (مرمت‌گران یا بازدیدکنندگان) و همچنین روش انجام فرایند ضدعفونی از نظر حفظ سلامت و ایمنی مرمت‌گران و بازدیدکنندگان مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه میراث فرهنگی و گردشگری در قالب طرح پژوهشی تحت عنوان «ارزیابی پتانسیل نانو ذرات نقره و روی تولید شده به روش سبز در کنترل فرسودگی زیستی آثار تاریخی (بررسی فعالیت ضد میکروبی و اثرات سمی آنها بر سلول‌های نرمال انسانی)» انجام گرفته است.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: مفهوم‌سازی، مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، جذب سرمایه، مدیریت پروژه، روش‌شناسی، تهیه منابع، اعتبارسنجی و نگارش پیش‌نویس اصلی مقاله؛ نویسنده دوم: مدیریت داده‌ها، روش‌شناسی، بخش نرم‌افزاری و ویرایش مقاله.

فهرست منابع

Adamska, E., Niska, K., Wcislo, A., & Grobelna, B. (2021). Characterization and Cytotoxicity Comparison of Silver-and Silica-Based Nanostructures. *Materials*, *14*(17), 4987 .

Afsharpour, M., & Imani, S. (2017). Preventive protection of paper works by using nanocomposite coating of zinc oxide. *Journal of Cultural Heritage*, 25, 142-148.

Akhtar, M. J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M. M., Ahmad, J., & Alrokayan, S. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International journal of nanomedicine*, *7*, 845 .

Aldosari, M. A., Darwish, S. S., Adam, M. A., Elmarzugi, N. A., & Ahmed, S. M. (2019). Using ZnO nanoparticles in fungal inhibition and self-protection of exposed marble columns in historic sites. *Archaeological and Anthropological Sciences*, *11*(7), 3407-3422 .

Ambaya, M., Saeed, F., & Mohammed, W. (2022). Comparison Between Green Synthesis and Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles: Characterization and Their Antimicrobial Activities. *EasyChair*, 2516-2314).

Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical mycology*, *45*(7), 569-587 .

Becerra, J., Mateo, M., Ortiz, P., Nicolas, G., & Zaderenko, A. P. (2019). Evaluation of the applicability of nano-biocide treatments on limestones used in cultural heritage. *Journal of Cultural Heritage*, 38, 126-135 .

Becerra, J., Zaderenko, A., Sayagués, M. J., Ortiz, R., & Ortiz, P. (2018). Synergy achieved in silver-TiO2 nanocomposites for the inhibition of biofouling on limestone. *Building and Environment*, *141*, 80-90 .

Boccalon, E., Nocchetti, M., Pica, M., Romani, A., & Sterflinger, K. (2021). Hydrogels: A 'stepping stone'towards new cleaning strategies for biodeteriorated surfaces. *Journal of Cultural Heritage*, 47, 1-11.

Branysova, T., Demnerova, K., Durovic, M., & Stiborova, H. (2022). Microbial biodeterioration of cultural heritage and identification of the active agents over the last two decades. *Journal of Cultural Heritage*, *55*, 245-260.

Carrillo-González, R., Martínez-Gómez, M. A., González-Chávez, M. d. C. A., & Mendoza Hernández, J. C. (2016). Inhibition of microorganisms involved in deterioration of an archaeological site by silver nanoparticles produced by a green synthesis method. *Science of the Total Environment*, 565, 872-881.

CLSI. (2012a). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. In (Vol. 950): Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.

CLSI. (2012b). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. In (Vol. 32): Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.

CLSI. (2010). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Non-dermatophyte Filamentous Fungi, Approved guideline, CLSI document M51- A. Clincal and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roead, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CLSI. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Filamentous Fungi, Approved Standard, 2nd ed., CLSI document M38-A2, 950 West Valley Roadn Suite 2500,Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CLSI. (1998). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500,Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

Coutinho, M., Miller, A., Martin-Sanchez, P. M., Mirão, J., Gomez-Bolea, A., Machado-Moreira, B., Cerqueira-Alves, L., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., & Lima, A. (2016). A multiproxy approach to evaluate biocidal treatments on biodeteriorated majolica glazed tiles. *Environmental microbiology*, *18*(12), 4794-4816 .

Di Carlo, E., Barresi, G., & Palla, F. (2022). Biodeterioration. In *Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage. Springer International Publishing*, 1-30.

Dowlath, M. J. H., Musthafa, S. A., Khalith, S. M., Varjani, S., Karuppannan, S. K., Ramanujam, G. M., Arunachalam, A. M., Arunachalam, K. D., Chandrasekaran, M., & Chang, S. W. (2021). Comparison of characteristics and biocompatibility of green synthesized iron oxide nanoparticles with chemical synthesized nanoparticles. *Environmental Research*, 201, 111585.

Evans, E. G. V., & Richardson, M. D. (1989). Medical mycology. A practical approach. *IRL press*.

Fouda, A., Abdel-Maksoud, G., Abdel-Rahman, M. A., Eid, A. M., Barghoth, M. G., & El-Sadany, M. A.-H. (2019). Monitoring the effect of biosynthesized nanoparticles against biodeterioration of cellulose-based materials by Aspergillus niger. *Cellulose*, 26(11), 6583-6597 .

Franco-Castillo, I., Hierro, L., de la Fuente, J. M., Seral-Ascaso, A., & Mitchell, S. G. (2021). Perspectives for antimicrobial nanomaterials in cultural heritage conservation. Chem, 7(3), 629-669.

Gadd, G. M., Fomina, M., & Pinzari, F. (2024). Fungal biodeterioration and preservation of cultural heritage, artwork, and historical artifacts: extremophily and adaptation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 200-222 .

Goffredo, G. B., Accoroni, S., Totti, C., Romagnoli, T., Valentini, L., & Munafò, P. (2017). Titanium dioxide based nanotreatments to inhibit microalgal fouling on building stone surfaces. *Building and Environment*, 112, 209-222 .

Gutarowska, B., Skora, J., Zduniak, K., & Rembisz, D. (2012). Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 7-17 .

Jia, M., Zhang, X., Weng, J., Zhang, J., & Zhang, M. (2019). Protective coating of paper works: ZnO/cellulose nanocrystal composites and analytical characterization. *Journal of Cultural Heritage*, *38*, 64-74 .

Kakakhel, M. A., Wu, F., Gu, J.-D., Feng, H., Shah, K., & Wang, W. (2019). Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 143, 104721.

Liu, Y.-j., He, L.-l ,.Mustapha, A., Li, H., Hu, Z., & Lin, M.-s. (2009). Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157: H7. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1193-1201 .

Luo, Z., Dong, K., Guo, M., Lian, Z., Zhang, B., & Wei, W. (2018). Preparation of Zinc Oxide Nanoparticles-Based Starch Paste and its Antifungal Performance as a Paper Adhesive. *Starch-Stärke*, *70*(7-8), 1700211 .

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63 .

Noohi, N., & Papizadeh, M. (2023). Study of biodeterioration potential of microorganisms isolated in the paintings storeroom of Mouze Makhsus museum, Golestan palace, Tehran. Studies in Conservation, 68(7), 720-730. DOI:10.1080/00393630.2022.2118269

Pietrzak, K., Otlewska, A., Danielewicz, D., Dybka, K., Pangallo, D., Kraková, L., Puškárová, A., Bučková, M., Scholtz, V., & Ďurovič, M. (2017). Disinfection of archival documents using thyme essential oil, silver nanoparticles misting and low temperature plasma. *Journal of Cultural Heritage*, *24*, 69-77 .

Prabhu, D., Arulvasu, C., Babu, G., Manikandan, R., & Srinivasan, P. (2013). Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of Vitex negundo L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochemistry*, *48*(2), 317-324 .

Reyes-Estebanez, M., Ortega-Morales, B. O., Chan-Bacab, M., Granados-Echegoyen, C., Camacho-Chab, J. C., Pereañez-Sacarias, J. E., & Gaylarde, C. (2018). Antimicrobial engineered nanoparticles in the built cultural heritage context and their ecotoxicological impact on animals and plants: A brief review. *Heritage Science*, *6*(1), 1-11 .

Ruffolo, S. A., De Leo, F., Ricca, M., Arcudi, A., Silvestri, C., Bruno, L., Urzì, C., & La Russa, M. F. (2017). Medium-term in situ experiment by using organic biocides and titanium dioxide for the mitigation of microbial colonization on stone surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *123*, 17-26 .

Schifano, E., Cavallini, D., De Bellis, G., Bracciale, M. P., Felici, A. C., Santarelli, M. L., Sarto, M. S., & Uccelletti, D. (2020). Antibacterial effect of zinc oxide-based nanomaterials on environmental biodeteriogens affecting historical buildings .*Nanomaterials*, *10*(2), 335 .

Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of nanobiotechnology*, *16*(1), 1-28 .

Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar ,P., & Kumar, P. (2018). 'Green'synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of nanobiotechnology*, *16*(1), 1-24 .

Soria-Castro, M., la Rosa-García, D., Quintana, P., Gómez-Cornelio, S., Sierra-Fernandez, A., & Gómez-Ortíz, N. (2019). Broad spectrum antimicrobial activity of Ca (Zn (OH) 3) 2· 2H2O and ZnO nanoparticles synthesized by the sol–gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, *89*(1), 284-294 .

Van der Werf, I. D., Ditaranto, N., Picca, R. A., Sportelli, M. C., & Sabbatini, L. (2015). Development of a novel conservation treatment of stone monuments with bioactive nanocomposites. *Heritage Science*, *3*(1), 1-9 .

Yadav, R., & Preet, S. (2023). Comparative assessment of green and chemically synthesized glutathione capped silver nanoparticles for antioxidant, mosquito larvicidal and eco-toxicological activities. *Scientific Reports*, 13(1), 8152.

Zamani, S., Fazilati, M., Hadian, M., Nazem, H., & Noohi, N. (2022). Evaluation of anticancer potential of silver chloride nanoparticles biosynthesized by Penicillium chrysogenum. *Infection Epidemiology and Microbiology*, *8*(2), 159-167 .

Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis , characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, *17*(9), 1534 .