



اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت های نقره و مس تولید شده به روش اکستروژن بر باکتری های/شیرشیاکلی و

استافیلوکوکوس اورئوس

آرمین آذری^۱، سیدامیرعلی انوار^{۱*}، حامد اهری^۲، انوشه شریفان^۲، عباسعلی مطلبی^۱

۱ گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۱

کلمات کلیدی:

اکستروژن،

خاصیت ضد میکروبی،

نانوکامپوزیت،

نانوذرات مس،

نانوذرات نقره.

مهم ترین کاربرد فناوری نانو در صنایع مواد غذایی، تولید بسته بندی فعال با خاصیت ضد میکروبی، بسته بندی با خواص مکانیکی ویژه از نظر تبادل گاز و حرارت و نانوسنسورها در بسته بندی هوشمند است. این مطالعه بر آن بوده است تا به مطالعه اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت های نقره و مس تولید شده به روش اکستروژن بر باکتری های/شیرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بپردازد. به طوری که نانوکامپوزیت های محتوی نانو ذرات نقره و مس در درصدهای ۱، ۳، ۵ و ۷ درصد با روش اکستروژن تولید شدند و تحت آنالیزهای نانومتریک (SEM, TEM, XRD, EDS) قرار گرفتند. سپس آزمون ضد میکروبی نانوکامپوزیت ها با روش انتشار از دیسک برای اندازه گیری هاله عدم رشد در محیط کشت با سویه های تجاری باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و شیرشیاکلی انجام شد. داده ها نشان داد که ساین نانوذرات مس و نقره در محدوده ی ۲۰ تا ۵۰ نانومتر قرار داشت و پراکندگی نانوذرات در سطح نانوکامپوزیت ها به صورت یکنواخت بود و خلوص بالایی داشتند. آزمون ضد میکروبی نانوکامپوزیت ها نشان داد که با افزایش درصد نانوذرات میزان قطر هاله ممانعت از رشد نانوکامپوزیت ها به طور معنی داری افزایش یافت و میزان ممانعت از رشد نانوذرات نقره نسبت به مس بیشتر بود ($p \leq 0.05$). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با شیرشیاکلی حساسیت بیشتری به نانوذرات مس و نقره نشان داد ($p \leq 0.05$). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوکامپوزیت های نقره و مس با خاصیت ضد میکروبی بالا می توانند جهت بسته بندی فعال با خاصیت ضد میکروبی در صنایع بسته بندی بهداشتی و مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.193

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.5.6

* مسئول مکاتبات:

saaa4824@gmail.com

۱- مقدمه

امروزه فناوری نانو از اهمیت و کاربرد فراوانی برخوردار است. این فناوری به عنوان مطالعه اصول بنیادین مولکول‌ها و ساختارهایی با حداقل به ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر معروف به نانو ساختار است. نقره عنصری فلزی با عدد اتمی ۴۷ و جرم اتمی ۱۰۷ است. نقره از دیرباز به عنوان ماده ضد عفونی کننده قوی مطرح بوده است و اثر ضد میکروبی قوی بر طیف وسیعی از میکروب‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها دارد [۱]. مطالعات نشان داده‌اند که یون نقره با اتصال به پروتئین‌های غشاء سلول‌ها سبب شکل‌گیری حفراتی در سطح غشاء و متعاقب آن تغییر در شکل و عملکرد غشاء می‌شود و در شکل‌گیری اکسیژن فعال که برای میکروارگانیسم‌ها کشنده است نقش کاتالیزوری ایفا می‌کند. یون نقره بر همکنشی قوی با گروه‌های تیول آنزیم‌های حیاتی داشته و آن‌ها را غیر فعال می‌کند. ضمن این‌که به دلیل افزایش سطح به حجم نانو نقره نسبت به نقره ساده اثر ضد میکروبی آن به دلیل نفوذ بهتر نقره به میکروارگانیسم‌ها بیشتر است [۲]. از سوی دیگر مس عنصری فلزی با عدد اتمی ۲۹ و جرم اتمی ۶۴ در پایدارترین حالت ایزوتوپ است و مانند نقره از دیرباز به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده قوی مطرح بوده و اثر مناسبی بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها دارد و نسبت به نقره از قیمت مناسب تری برخوردار است. مکانیسم ضد میکروبی مس شامل تولید رادیکال‌های آزاد است که سبب پراکسیداسیون چربی‌ها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و دناتوره شدن DNA می‌شود [۳]. نانوکامپوزیت‌ها در واقع ترکیباتی هستند که از ترکیب دو فاز مختلف تشکیل شده‌اند. بخش اول فاز پیوسته نامیده می‌شود که شامل بستر نانو کامپوزیت است و بخش دوم فاز ناپیوسته است که شامل نانوذرات می‌باشد. نانوکامپوزیت‌ها می‌توانند ویژگی‌ها خاص نانو مواد را تشدید نمایند و یا به عنوان حامل نانو مواد عمل نمایند. خواص اصلی نانوکامپوزیت‌ها شامل افزایش بیشتر استحکام نانومواد، رسانایی بیشتر مواد، ثبات بالا و تنظیم و تقویت خواص مد نظر از طریق میزان افزودنی (نانوفیلر یا نانو

پرکننده) است [۲]. نانوکامپوزیت‌ها بر حسب پایه یا بستر اولیه به دسته‌های گوناگونی مانند نانوکامپوزیت‌های سرامیکی، پلیمری و زیست تخریب پذیر تقسیم می‌شوند. افزودن نانو ذرات به ماتریکس پلیمری نانوکامپوزیت‌ها معمولا برای بهبود خاصیت‌های مهم پلیمرها مانند افزایش میزان الاستیسیته، مقاومت دمایی، شکل‌پذیری بهتر و بهبود تبادل گاز انجام می‌پذیرد. تولید نانو کامپوزیت‌های پلیمری عمدتا توسط روش مخلوط‌سازی مستقیم، روش تلافی، پلیمریزاسیون در محل و روش سل ژل انجام می‌شود و در ادامه با روش‌های ساخت معمولی مانند قالب تزریق، ریخته‌گری، قالب فشرده‌سازی، قالب گیری ضربه، قالب چرخشی، قالب اکستروژن و ترموفرمینگ به صورت صنعتی تولید و فرآوری می‌شوند [۵]. یکی از مرسوم ترین روش‌های تولید نانو کامپوزیت‌های پلیمری، روش‌های سل ژل و روش اختلاط مستقیم با استفاده از فرآیند اکستروژن است. در سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری پیرامون تولید و اثر بسته بندی فعال بخصوص نانو کامپوزیت‌های پلیمری حاوی نانوذرات فلزی و اکسید فلزات مانند نقره، مس، اکسید مس و اکسید با خاصیت ضد میکروبی بالا برای بسته‌بندی مواد غذایی جهت افزایش مدت زمان نگهداری انجام شده است و نتایج تحقیقات حاکی از اثر قوی نانوکامپوزیت‌های محتوی نانوذرات نقره و مس بر روی کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی بوده است [۶]. Roy و همکاران در سال ۲۰۱۹، بر روی ارزیابی خواص نانوکامپوزیت‌های تولید شده با ترکیب نانوذرات نقره-رس با درصد وزنی ۱ تا ۵ درصد به همراه پلی اتیلن توسط فرآیند اکستروژن پرداختند که نتایج نشان داد پوشش‌ها خاصیت ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های *شریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسپرژیلوس نایجر* داشتند و نانوکامپوزیت‌ها سازگاری خوبی با سلول‌های گلبول قرمز خون و فیبروبلاستی پوستی انسان داشتند در حالیکه پودر خالص نانوذرات نقره و مس سمیت خفیف بر روی سلول‌ها داشتند [۷]. Ahmed و

- 1 Direct mixing
- 2 Intercalation method
- 3 Insitu Polymerization
- 4 Sol-gel

پوشش حاوی ۵ درصد نانوقره و تیتانیوم دی اکساید بیشترین اثر ضد میکروبی را در مقایسه با سایر پوشش‌ها داشت و بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد پوشش متعلق به باکتری/استافیلوکوکوس اورئوس بود و پوشش ۵ درصد نانوقره و تیتانیوم دی اکساید به طور معنی‌داری سبب کاهش بار میکروبی و افزایش مدت زمان نگهداری گوشت جوجه شده بود [۱۱]. Beigmohammadi و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر ضد باکتریایی نانوکامپوزیت پلی اتیلنی حاوی نانوذرات نقره، اکسید مس و اکسید روی تولید شده با روش ملت اکستروژن بر مقادیر باکتری‌های کلی فرم در پنی‌UF¹ را بررسی کردند که نتایج نشان داد بسته بندی حاوی نانوذرات سبب کاهش بیش از ۴ لوگ از باکتری‌های کلی فرم در طول چهار هفته نگهداری در دمایی‌چال شده بود و میزان مهاجرت نانوذرات فلزی در سطح ایمن ارزیابی شده است [۱۲]. از آنجا که نانوکامپوزیت‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف پیدا کرده‌اند و مطالعات در این زمینه می‌تواند منجر به کاهش نیاز به واردات این محصولات گردد، این مطالعه بر آن بوده است تا امکان تولید نانوکامپوزیت‌های حاوی نانو ذرات نقره و مس با درصد‌های مختلف را طی فرآیند اکستروژن بررسی نماید و خاصیت ضد میکروبی نانوکامپوزیت‌ها بر علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را مورد سنجش قرار دهد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد اولیه

پودر نانو نقره با خلوص ۹۹/۹ درصد و پودر نانو مس با خلوص ۹۹/۸ درصد تولید شرکت سیگما آلدردیج^۲ ایالات متحده آمریکا و گرانول خالص پلی اتیلن با چگالی پایین^۳ مخصوص استفاده در صنایع غذایی^۴ از شرکت مجتمع پتروشیمی ماهشهر خریداری شدند.

همکاران در سال ۲۰۱۸ به اثر بسته بندی نانوکامپوزیتی پلی اتیلنی با نانوذرات مس و نقره و اسانس روغنی دارچین تولید شده با روش اختلاط تحت فشار بر روی گوشت جوجه پرداختند که نانوکامپوزیت حاوی نقره-مس و ۵۰ درصد اسانس روغنی دارچین بیشترین خاصیت ضد میکروبی را بر علیه باکتری-های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیغی*، *موریوم* و *کمپیلوباکتر ژرونی* داشت. نتایج مربوط به ارزیابی نگهداری گوشت جوجه آلوده شده به *سالمونلا تیغی*، *موریوم* و *کمپیلوباکتر ژرونی* بسته بندی شده در فیلم حاوی ۴ درصد نقره-مس و ۵۰ درصد دارچین تا ۲۱ روز در دمایی‌چالی سبب پایین نگه داشتن بار میکروبی نمونه‌ها شده بود [۸]. Aisida و همکاران در سال ۲۰۱۹ خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با روش سبز و اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده را مورد ارزیابی قرار دارند که نتایج آزمون ضد میکروبی پوشش بر علیه دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در روش کشت منتشره نشان داد که قطر هاله ممانعت از رشد نانوذرات نقره برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۸ میلی متر و برای باکتری *اشریشیاکلی* ۱۳ میلی متر بود [۹]. Barani و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر فیلم‌های نانو کامپوزیتی محتوی نانوذرات نقره و تیتانیوم دی اکساید با درصد‌های ۱، ۳ و ۵ درصد نانو نقره به همراه ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ درصد تیتانیوم دی اکساید تولید شده با روش سل ژل بر روی ماندگاری فیله ماهی سوف در دمای ۴ درجه سلسیوس در روزهای صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پرداختند که نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره و تیتانیوم دی اکساید به طرز معناداری سبب کاهش رشد میکروب‌ها شده بود و فیلم محتوی ۵ درصد نانو نقره و ۲/۵ درصد تیتانیوم دی اکساید به طرز معنی‌داری سبب کاهش رشد لگاریتمی باکتری‌های مزوفیل هوازی، سرماگرا و انتروباکتریاسه تا روز بیستم شد [۱۰]. لطفی و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر نانوکامپوزیت نقره بر پایه روش تولید اختلاط مذاب و روش سل ژل بر افزایش زمان ماندگاری گوشت جوجه مرغ پرداختند که ۷ نوع فیلم با درصد‌های مختلف پلی اتیلن و نانوذرات نقره، تیتانیوم دی اکساید و رس تولید شدند و نتایج نشان داد که

1. Ultrafiltration
2. Sigma Aldrich

۲-۲- تولید نانوکامپوزیت ها

نانوکامپوزیت های استفاده شده در تحقیق شامل نانوکامپوزیت های حاوی نانوذرات نقره و مس هر کدام در سطوح ۱،۳، ۵ و ۷ درصد بودند که ترکیب میزان پودر نانو ذرات نقره و مس با گرانول پلی اتیلن به صورت وزنی و محاسبه شدند. پس از توزین نانو ذرات و گرانول پلی اتیلن توسط ترازو با حساسیت ۰/۰۱ گرم، نانوذرات نقره و مس گرانول پلی اتیلن به صورت مکانیکی ترکیب^۱ و پس از آن وارد بخش قیف دستگاه اکسترودر شدند. مشخصات دستگاه اکسترودر از نوع دو مارپیچ همسوگرد (Co rotating twin screw extruder) (werner&pfleinderer ZSK 25 Germany 2002) بود. برای گروه شاهد (کنترل) از پلی اتیلن خالص بدون نانو نقره استفاده شد. دستگاه اکسترودر در بازه دمایی ۱۸۰ تا ۱۹۵ درجه سانتیگراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه تنظیم شد. برای اختلاط بهتر نانو ذرات با گرانول پلی اتیلن عمل اکسترودر دو بار انجام گرفت. تیوب خارج شده از بخش هد اکسترودر در آب سرد خنک و توسط دستگاه کاتر مجدداً تبدیل به گرانول شدند. سپس گرانول های حاوی نانو ذرات برای تهیه فیلم وارد دستگاه اکسترودر تک مارپیچ (Single screw extruder) (brabendercorderer Germany 2004) شدند و تحت بازه دمایی ۱۹۰ تا ۲۱۵ سانتیگراد مجدداً ترکیب و سپس توسط فرآیند فیلم دمشی^۲ تبدیل به فیلم نایلونی با ضخامت ۱۰۰ میکرون شدند [۱۴، ۱۳، ۱۰].

۲-۳- آزمون میکروسکوپ الکترونی

برای انجام آزمون ابتدا نانوکامپوزیت ها در ابعاد ۲ در ۲ سانتی متر مربع برش داده شدند و بعد در حلال گلو تار آلدئید و حلال استونیتریل به مدت ۳۰ دقیقه حل شدند. پس از فیلم های مذکور به روی ۳ پایه فلزی جهت تبخیر حلال قرار داده شدند و پس از حل شدن حلال توسط چسب مخصوص بر روی ۳ پایه فلزی تثبیت شدند. سپس فیلم های چسبیده شده بر روی ۳ پایه فلزی

در نهایت درون دستگاه اسپاتوکوتر^۴ (Coater Q150T) انتقال داده شدند تا با روکش دهی طلا بر روی فیلم های چسبیده بر ۳ پایه، میزان هدایت الکتریکی تحت مجاورت گاز آرگون افزایش یافت. بعد از این مرحله نمونه فیلم ها به محفظه میکروسکوپ الکترونی جهت بمباران الکترونیکی انتقال یافتند و با میزان ولتاژ ۲۵۰۰ کیلووات در بزرگنمایی ۱۰ هزار، ۱۵ هزار و ۲۰ هزار برابر مورد ارزیابی از لحاظ مورفولوژی ذرات و همگن بودن میزان پخش ذرات در سطح قرار گرفتند [۱۴].

۲-۴- آزمون تفرق انرژی اشعه ایکس (EDS)

برای انجام آنالیز، با تابانده شده اشعه ایکس توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM FEI Quanta 200) بر روی نمونه ها در ولتاژ ۲۵ ولت و رزولوشن ۱۲۹ در مدت زمان ۲۱ ثانیه و میزان بزرگنمایی در محدوده ۲۰۰۰۰ برابر آنالیز بر روی پوشش ها انجام گرفت.

۲-۵- آزمون پراش اشعه ایکس (XRD)

طول موج اشعه های ایکس استفاده شده در آزمون حدود ۰/۵ الی ۲/۵ آنگستروم بود و پراش اشعه ایکس با زاویه دو تتا در محدوده ۱۰ تا ۹۰ درجه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بر روی نانو فیلم ها انجام گرفت و جنس آنود دستگاه مسی بود و میزان ولتاژ دستگاه ۴۰ کیلوولت و شدت آمپر ۳۰ میلی آمپر بود [۱۵].

۲-۶- آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری

برای ارزیابی سایز نانوذرات نقره و مس در نانوکامپوزیت های تحقیق از آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری Philips EM208S100KV استفاده شد. جهت آماده سازی نمونه ها، ابتدا نانوکامپوزیت ها در ازت مایع فیکس شدند و سپس توسط دستگاه کرایو اولترامیکروتوم^۶ Leica UC7 به برش های لایه های نازک با ضخامت کمتر از ۱۰ میکرون تبدیل شدند. در مرحله بعد لایه های نازک نانوکامپوزیت ها برای مشاهده سایز و شکل نانوذرات وارد دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری شدند و در ولتاژ ۸۰ تا ۲۰۰ کیلوولت تحت بمباران الکترونی قرار گرفت و

4. Sputter coater
5. Energy dispersive x ray
6. Cryo-ultramicrotome

3. Film blowing

پوشش ها در بزرگنمایی مقیاس ۱۰۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر قرار گرفتند.

۲-۷-آزمون خاصیت ضد میکروبی نانوکامپوزیت ها

برای ارزیابی اثر ضد میکروبی پوشش ها روش انتشار دیسک استفاده شد. بدین منظور ابتدا کامپوزیت ها در ابعاد دیسک هایی با ابعاد ۰/۵ در ۰/۵ سانتیمتر مربع بریده شدند و بعد در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. در مرحله بعد سوش تجاری باکتری های/استافیلوکوکوس ارئوس ATCC 25923 و اشریشیاکلی ATCC 25922 (بهار افشان-ایران) در محیط کشت آبگوشت مغز و قلب^۱ (مرک-آلمان) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس از آن ها غلظت استاندارد نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ کلنی در میلی لیتر) تهیه شد. در مرحله بعد با روش کشت چمنی به کمک سوآب، باکتری ها بر روی محیط کشت مولر هیتون^۲ (مرک-آلمان) کشت داده شدند و دیسک های نانوکامپوزیت ها (کامپوزیت های حاوی نانوذرات نقره ۱، ۳، ۵ و ۷ درصد و کامپوزیت های حاوی نانوذرات مس ۱، ۳، ۵، و ۷ درصد) به همراه دیسک شاهد (پلی اتیلن خالص فاقد نانو ذرات نقره و مس) بر روی محیط کشت قرار داده شدند. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری ها نیز یک محیط فاقد دیسک نیز تهیه شد و همگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قطر هاله ممانعت از رشد شکل گرفته در اطراف دیسک ها با کولیس با دقت ۱۰۰ میکرون (Mitutoyo-japan) اندازه گیری شدند [۱، ۱۰، ۱۱]. آزمون انتشار دیسک در آگار از رشد در ۳ تکرار انجام شد.

۲-۸-تجزیه و تحلیل آماری

با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ با روش تحلیل ANOVA یک طرفه انجام شد و برای تعیین معنی داری از آزمون دانکن در سطح

۵ درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار (Graphpad prism 8) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-نتایج میکروسکوپ الکترونی

نتایج تصاویر به دست آمده توسط میکروسکوپ الکترونی از سطح نانوکامپوزیت های حاوی نانوذرات نقره و مس در بزرگنمایی ۱۰۰ هزار برابر در مقیاس ۲۰۰ نانومتر نشان داد که سایز نانوذرات نقره و مس تا محدوده ۱۳ تا ۳۵ نانومتر قابل اندازه گیری بودند و میزان پخش و پراکندگی نانو ذرات هم در نانوکامپوزیت نقره و هم در نانوکامپوزیت مس به صورت نسبیکنواخت و با امتزاج مناسب ارزیابی شد و هیچ گونه گسست در سطح نانوکامپوزیت ها حتی در نانوکامپوزیت های حاوی درصدهای بالای نانوذرات مشاهده نشد. آرایش نانو ذرات نقره و مس به شکل دایره ای مشاهده شد و در بخش هایی از تمامی نانوکامپوزیت ها، نانوذرات دچار کلوخگی آگلومراسیون شدند که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی به صورت نقاط سفید رنگ مشاهده شدند. با افزایش درصد نانوذرات در کامپوزیت ها، میزان آگلومراسیون در نانوکامپوزیت های حاوی هر دو نانوذرات افزایش پیدا کرد و میزان آگلومراسیون نانوذرات در نانوکامپوزیت محتوی ۷ درصد نانوذرات نقره و مس در مقایسه با نانوکامپوزیت محتوی ۵ درصد نانوذرات مس و نقره بیشتر بود در حالیکه در نانوکامپوزیت با درصد کمتر میزان کلوخگی بسیار کمتر بود. نتیجه آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری از سطح نانوکامپوزیت محتوی نانوذرات نقره و مس نشان داد که فرم نانوذرات نقره و مس به صورت کروی شکل بودند و قطر نانوذرات نقره بین ۲۰ تا ۴۰ نانومتر در نانوکامپوزیت نقره و قطر نانوذرات مس بین ۳۰ تا ۵۰ نانومتر اندازه گیری شد (تصویر ۱).

1. Brain heart infusion broth BHIB
2. Muller hinton agar

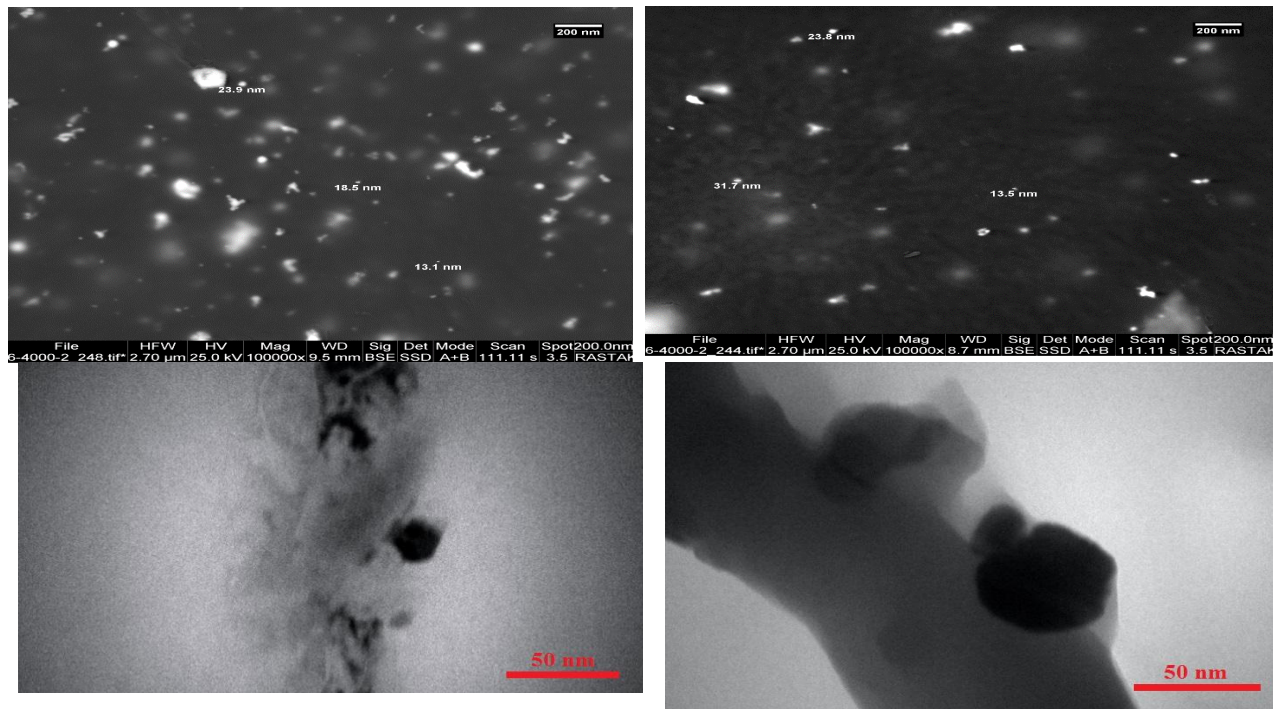


Fig 1 SEM image of nanocomposite 5% silver nanoparticles surface (top right) - SEM image of nanocomposite 7% copper nanocomposite surface (top left) - TEM image of silver nanoparticles (bottom right) - TEM image of copper nanoparticles (bottom left)

۰۸۳۴-۰۱۱-۰۰۰ تطبیق داده شد که متعلق به پلی اتیلن و پیک های تشکیل شده در موقعیت ۴۳,۳۸، ۵۰,۴۹، ۷۴,۲۲ و ۸۹,۹۹ زاویه دو تتا با کد ۹۶-۷۱۰-۱۲۷۰ تطبیق داده شدند که متعلق به مس بود.

۳-۲- نتایج آزمون پراش اشعه ایکس

نتایج مربوط به آزمون پراش اشعه ایکس از نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات مس در شکل ۲ نشان داد که پیک های تشکیل شده در موقعیت های ۲۱,۴۴، ۲۳,۸۳ و ۳۶,۲۳ زاویه دو تتا با کد

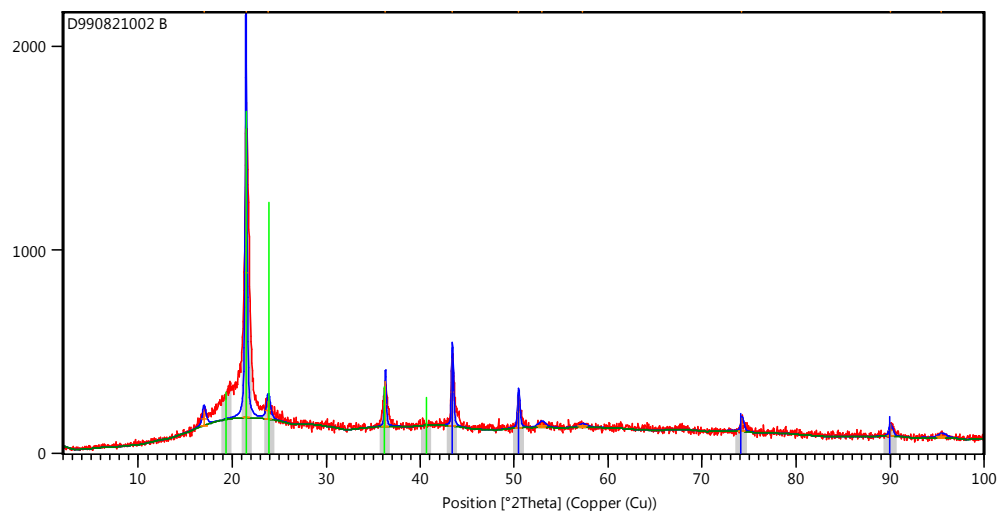


Fig 2 X-ray diffraction result from nanocomposite containing copper nanoparticles

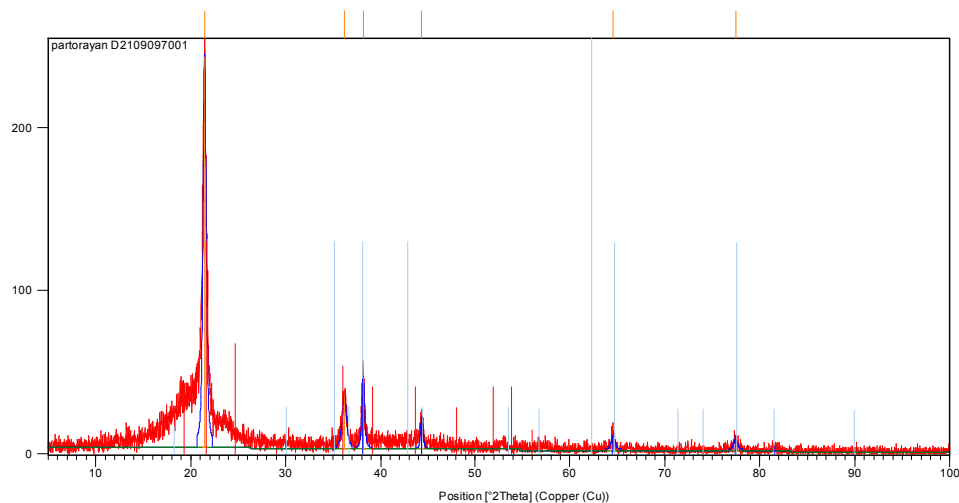
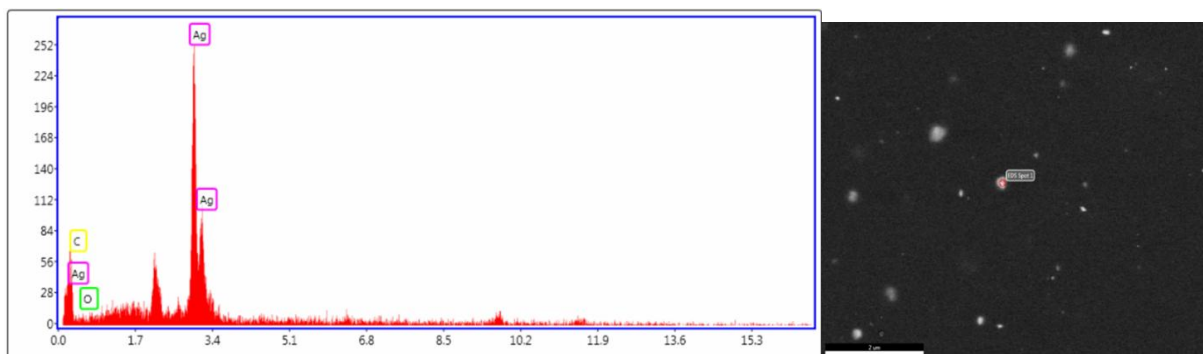


Fig 3 X-ray diffraction result from nanocomposites containing silver nanoparticles

نتایج مربوط به آزمون تفرق انرژی اشعه ایکس از سطح فیلم محتوی نانوذرات نقره در شکل ۴ نشان داد که پراکندگی نانوذرات نقره در سطح پوشش به صورت تقریبی مناسب بود و پیک کربن نشان از وجود پلی اتیلن و پیکهای قدرتمند نقره نشان از درصد مناسب و خلوص بالای آن بود و هیچ گونه ناخالص و عنصر دیگری در فیلم‌های محتوی نانوذرات نقره مشاهده نشد که این نتیجه در تایید نتیجه آزمون پراش اشعه ایکس مشاهده شد. نتیجه آنالیز نانوذرات نانوکامپوزیت نشان داد که جنس نانوذرات از نقره هستند و علاوه بر نقره، عناصر کربن و اکسیژن جداسازی شدند که مربوط به پلی اتیلن هست. نتیجه آزمون تفرق انرژی اشعه ایکس از سطح فیلم نانوذرات مس نشان از خلوص بالای نانوذرات مس بود و هیچ گونه عنصر دیگری جداسازی نشد.

نتیجه آزمون پراش اشعه ایکس از نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات نقره در شکل ۳ نشان داد که پیک‌های تشکیل شده در زاویه دوتتا در موقعیت‌های $21,4674^\circ$ و $36,1836^\circ$ درجه با کد $00-0834-011$ تطبیق داده شد که کد $00-0834-011$ که متعلق به پلی اتیلن بود. پیک‌های تشکیل شده در زاویه دوتتا در موقعیت‌های $18/1737^\circ$ ، $44/329^\circ$ و $64/569^\circ$ و $77/601^\circ$ درجه با کد $01-0372-089$ تطبیق داده شد که متعلق به نقره بود. نتایج آزمون پراش اشعه ایکس نشان داد که نانوکامپوزیت‌ها عاری از ترکیبات و عناصر دیگر بودند و هیچگونه ناخالصی در پوشش‌ها شناسایی و جداسازی نشدند.

۳-۳- نتایج آزمون تفرق انرژی اشعه ایکس



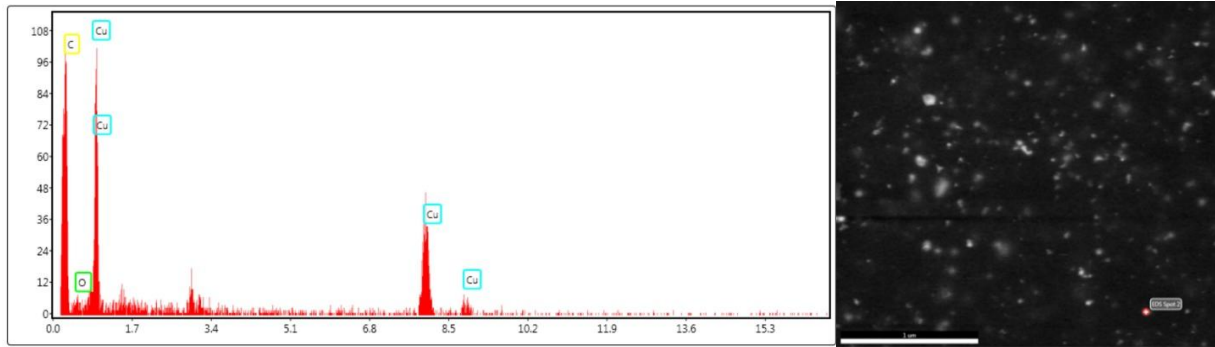


Fig 4 EDX test of silver nanocomposite cross section (top diagram) - EDX test of copper nanocomposite surface (bottom diagram)

۳-۴ نتیجه آزمون ضد میکروبی

میانگین قطر هاله عدم رشد به همراه انحراف از معیار در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین قطر هاله ممانعت از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 و *اشریشیاکلی* ATCC 25922 بر حسب میلی‌متر ارائه شده‌اند. همانطور که در شکل ۵ بیان شده است نتیجه ارزیابی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت‌ها نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره و مس در نانوکامپوزیت‌ها، قطر هاله عدم رشد به طرز معنی‌داری در محیط کشت‌های باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش یافته است ($p \leq 0.05$) که در نانوکامپوزیت‌های حاوی نانوذرات نقره در مقیاس با نانوذرات مس قطر هاله عدم رشد در تمامی درصدها به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p \leq 0.05$). قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به باکتری *اشریشیاکلی* در برابر تمامی نانوکامپوزیت‌های نقره و مس در درصدهای مختلف نسبت به باکتری *اشریشیاکلی* بیشتر بود اگرچه نسبت اختلاف بین قطر هاله عدم رشد دو باکتری در نانوکامپوزیت‌های حاوی نانوذرات نقره بیش از نانوکامپوزیت‌های حاوی نانوذرات مس بود. و تنها قطر هاله عدم رشد نانوکامپوزیت‌های نانو مس ۱ و ۳ درصد نسبت به پوشش کنترل در باکتری *اشریشیاکلی* و نانوکامپوزیت نانو مس ۱ درصد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p \geq 0.05$) (شکل ۵). همانطور که پیشتر بیان شد نقره دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌هاست [۱۷] و مکانیسم‌های متعددی همچون اتصال به پروتئین‌های غشاء سلولی باکتری‌ها و ایجاد شکل‌گیری

حفراتی در سطح غشاء، خاصیت کاتالیزوری در شکل‌گیری اکسیژن فعال (کشنده برای میکروارگانیسم‌ها)، همکنشی قوی با گروه‌های تیول آنزیم‌های حیاتی در غیر فعال‌سازی باکتری‌ها دارد و نانوذرات مس با تولید رادیکال‌های آزاد سبب پراکسید شدن چربی‌ها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و دناتوره شدن DNA می‌شود [۱۸]. در طول سالیان گذشته تحقیقات بسیار پیرامون اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت‌های حاوی نانوذرات نقره و مس بر روی باکتری‌های بیماری‌زا و مسمومیت‌زا و تاثیر نانوکامپوزیت‌ها بر روی مدت زمان نگهداری مواد غذایی انجام شده است. Barani و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر فیلم‌های نانوکامپوزیتی محتوی نانو ذرات نقره و تیتانیوم دی اکساید با درصدهای ۱، ۳ و ۵ درصد نانو نقره به همراه ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ درصد تیتانیوم دی اکساید تولید شده با روش سل ژل بر روی ماندگاری فیله ماهی سوف پرداختند و جهت ارزیابی خاصیت ضد میکروبی آزمون انتشار دیسک در آگار انجام گرفت. میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* و *کاندیدا البیکانس* و *آسپرژیلوس نایجر* در آزمون استفاده شدند. نتایج نشان داد که پوشش محتوی ۵ درصد نانو نقره به همراه ۲/۵ درصد تیتانیوم دی اکساید سبب افزایش مدت زمان نگهداری فیله ماهی سوف در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ روز شده بود. ضمن اینکه غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره و تیتانیوم دی اکساید به طرز معناداری سبب کاهش رشد میکروب‌ها شده بود که قطر هاله ممانعت از رشد پوشش حاوی ۵ درصد نانو نقره و ۲/۵ درصد تیتانیوم دی اکساید به ترتیب در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۱۵/۴ میلی متر، *اشریشیاکلی* با ۱۲/۶

نانوکامپوزیت‌ها، سازگاری خوبی با سلول‌های گلبول قرمز خون و فیبروبلاست‌های پوستی انسان داشتند در حالی که پودر خالص نانو ذرات نقره و مس یک سمیت خفیفی بر روی سلول‌ها داشتند و میزان سمیت در محدوده ایمن قرار داشت که این امر نشان از امکان استفاده پوشش‌های نانوکامپوزیتی حاوی نانوذرات به دلیل بی خطر بودن برای سلول‌های بدن انسان است [۷]. Ahmed و همکاران در مطالعه‌ای به اثر بسته‌بندی نانوکامپوزیتی پلی اتیلن با نانوذرات مس و نقره و اسانس دارچین بر روی گوشت جوجه پرداخته‌اند [۸]. در مطالعه آن‌ها نانوکامپوزیت‌های حاوی درصد‌های مختلف مس و نقره و اسانس دارچین با دستگاه اکسترودر در دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد و ۸۰ دور در دقیقه تولید شدند و خاصیت ضد میکروبی بالایی بر علیه باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و کمپیلوباکتر ژرونی داشتند. همچنین فیلم حاوی ۴ درصد نقره-مس و ۵۰ درصد دارچین تا ۲۱ روز در دمای یخچالی سبب پایین نگه داشتن بار میکروبی گوشت جوجه آلوده شده به سالمونلا تیفی موریوم و کمپیلوباکتر ژرونی نمونه‌ها شده بود. روش تولید پوشش و نانوذرات به کار رفته در این تحقیق مشابه با تحقیق انجام شده بود. همچنین هر دو مطالعه در زمینه تایید نتایج ضد میکروبی نانوکامپوزیت نقره-مس در راستای یکدیگر بودند. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند در تایید خاصیت ضد میکروبی پوشش‌های تولید شده توسط نانوذرات مس-نقره و پوشش‌های نانوکامپوزیتی و قابلیت استفاده آن‌ها در بسته‌بندی فعال با خاصیت ضد میکروبی باشد.

میلی متر و کاندیدا/آلبیکنس با ۱۲/۷ میلی متر و آسپرژیلوس نایجربا ۱۱/۷ میلی متر بود [۱۰]. نتایج آن مطالعه مشابه با نتیجه تحقیق حاضر بود که نانوذرات نقره اثر ضد میکروبی بالایی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی داشتند. همانند تحقیقی که توسط Aisida و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده روش سبز با استفاده از عصاره گیاه *Veronica amygdalina* انجام شده بود، نتیجه آزمون ضد میکروبی نانوذرات نقره بر علیه دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی در روش کشت منتشره نشان داد که قطر هاله ممانعت از رشد نانوذرات نقره برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۱۸ میلی متر و برای باکتری اشریشیاکلی ۱۳ میلی متر بود که این میزان در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر بود [۹]، نتیجه‌ای مشابه با تحقیق انجام شده از نظر اثربخشی نانوذرات نقره بر روی رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی داشت. در تحقیق Roy و همکاران در سال ۲۰۱۹ که نانوکامپوزیت‌های پلیمری با ترکیب نانوذرات نقره-مس در مقادیر ۱ تا ۵ درصد وزنی با روش اکستروژن تولید شدند و نتایج آزمون اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد نانوذرات نقره و رس در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و آسپرژیلوس نایجربا به ترتیب ۲، ۴۷-۵۰، ۳۵-۳۷ و ۱۵-۱۸ میلی متر بود. در این تحقیق روش تولید نانوکامپوزیت‌ها مشابه تحقیق انجام شده بود و قطر زیاد هاله ممانعت از رشد نانوذرات احتمالاً به دلیل استفاده از نانوذرات خالص بیشتر به طور مستقیم بوده است. نتیجه آزمون *In vitro* نشان داد به دلیل رهائش کم نانوذرات از

Table 1 Mean and standard deviation of the diameter of the inhibition of bacterial growth in the research study (in millimeters)

<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nanocomposite type with composition
1.6±0.289 ^b	2.8±0.289 ^b	Nanocomposite 1% silver nanoparticles
3.5±0.5 ^c	6.1±1.041 ^c	Nanocomposite 3% silver nanoparticles
5.8±0.289 ^d	8.1±1.041 ^d	Nanocomposite 5% silver nanoparticles
7.5±0.5 ^e	9.8±0.289 ^e	Nanocomposite 7% silver nanoparticles
0.3±0.577 ^a	1.3±0.577 ^a	Nanocomposite 1% copper nanoparticles
1.1±0.289 ^a	2.5±0.5 ^f	Nanocomposite 3% copper nanoparticles
2.1±0.764 ^f	4.8±0.289 ^g	Nanocomposite 5% copper nanoparticles
4±0.5 ^g	7.1±0.764 ^h	Nanocomposite 7% copper nanoparticles
0±0 ^a	0±0 ^a	Control coating without silver and copper nanoparticles

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference between the results of the same column and each other.

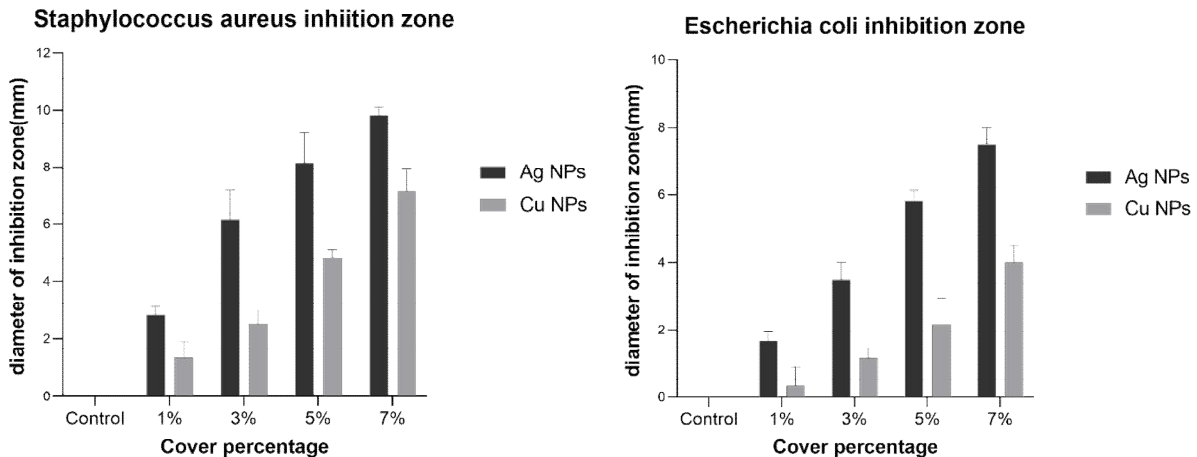


Fig 5 Mean diameter of inhibition zone of *Staphylococcus aureus* bacteria (right) and *Escherichia coli* (left) Silver and copper nanocomposites in millimeters (excluding disc diameter)

antimicrobial activity. *Int J Biol Macromol.* 2019;136:586-96.

- [4] Zare EN, Makvandi P, Borzacchiello A, Tay FR, Ashtari B, Padil VV. Antimicrobial gum bio-based nanocomposites and their industrial and biomedical applications. *Chemical Communications.* 2019;55(99):14871-85.
- [5] Youssef AM, El-Naggar ME, Malhat FM, El Sharkawi HM. Efficient removal of pesticides and heavy metals from wastewater and the antimicrobial activity of f-MWCNTs/PVA nanocomposite film. *Journal of Cleaner Production.* 2019;206:315-25.
- [6] Sanes J, Sánchez C, Pamies R, Avilés M-D, Bermúdez M-D. Extrusion of polymer nanocomposites with graphene and graphene derivative nanofillers: An overview of recent developments. *Materials.* 2020;13(3):549.
- [7] Roy A, Joshi M, Butola B, Ghosh S. Evaluation of biological and cytocompatible properties in nano silver-clay based polyethylene nanocomposites. *J Hazard Mater.* 2020;384:121309.
- [8] Ahmed J, Mulla M, Arfat YA, Bher A, Jacob H, Auras R. Compression molded LLDPE films loaded with bimetallic (Ag-Cu) nanoparticles and cinnamon essential oil for chicken meat packaging applications. *LWT.* 2018;93:329-38.
- [9] Aisida SO, Ugwu K, Akpa PA, Nwanya AC, Nwankwo U, Botha SS, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using bitter leave (*Veronica amygdalina*) for antibacterial

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق نتایج مربوط به ارزیابی خواص ضد میکروبی نانوکامپوزیت ها نشان داد که نانوکامپوزیت های استافیلوکوکوس ضد میکروبی قابل توجه بر علیه باکتری های اورئوس و اشریشیاکلی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده در آزمون های کیفی نانوکامپوزیت مانند آزمون میکروسکوپ الکترونی و ساینز مناسب نانوذرات نقره و مس در نانوکامپوزیت ها، امکان تولید نانوکامپوزیت ها با روش اکستروژن به عنوان یک روش صنعتی نسبتا ساده و کاربردی وجود دارد و از طرفی با توجه به اثر ضد میکروبی معنادار نانوکامپوزیت های نانومس و نانونقره بر علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی، امکان استفاده از این نانوکامپوزیت ها برای پوشش دهی و بسته بندی فعال با خاصیت ضد میکروبی برای مصارف صنایع بسته بندی مواد غذایی و بهداشتی وجود دارد.

۵- منابع

- [1] Fu S, Sun Z, Huang P, Li Y, Hu N. Some basic aspects of polymer nanocomposites: A critical review. *Nano Materials Science.* 2019;1(1):2-30.
- [2] Sharma R, Jafari SM, Sharma S. Antimicrobial bio-nanocomposites and their potential applications in food packaging. *Food Control.* 2020;112:107086.
- [3] Zahran M, Marei AH. Innovative natural polymer metal nanocomposites and their

- [15] Huang X, Shipps Jr GW, Cheng CC, Spacciapoli P, Zhang X, McCoy MA, et al. Discovery and hit-to-lead optimization of non-ATP competitive MK2 (MAPKAPK2) inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2011;2(8):632-7.
- [16] Zhou L, Lv S, He G, He Q, Shi B. EFFECT OF PE/AG2O NANO - PACKAGING ON THE QUALITY OF APPLE SLICES. *J Food Qual.* 2011;34(3):171-6.
- [17] Jang J, Lee J-M, Oh S-B, Choi Y, Jung H-S, Choi J. Development of Antibiofilm Nanocomposites: Ag/Cu Bimetallic Nanoparticles Synthesized on the Surface of Graphene Oxide Nanosheets. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2020;12(32):35826-34.
- [18] Alavi M, Karimi N. Antiplanktonic, antibiofilm, antiswarming motility and anti-quorum sensing activities of green synthesized Ag-TiO₂, TiO₂-Ag, Ag-Cu and Cu-Ag nanocomposites against multi-drug-resistant bacteria. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology.* 2018;46(sup3):S399-S413.
- [19] Ravindran RE, Subha V, Ilangovan R. Silver nanoparticles blended PEG/PVA nanocomposites synthesis and characterization for food packaging. *Arabian Journal of Chemistry.* 2020 Jul 1;13(7):6056-60.
- activities. *Surfaces and Interfaces.* 2019;17:100359.
- [10] Barani S, Ahari H, Bazgir S. Increasing the shelf life of pikeperch) *Sander lucioperca*) fillets affected by low-density polyethylene/Ag/TiO₂ nanocomposites experimentally produced by sol-gel and melt-mixing methods. *International journal of food properties.* 2018;21(1):1923-36.
- [11] Lotfi S, Ahari H, Sahraeyan R. The effect of silver nanocomposite packaging based on melt mixing and sol-gel methods on shelf life extension of fresh chicken stored at 4° C. *J Food Saf.* 2019;39(3):e12625.
- [12] Beigmohammadi F, Peighamardoust SH, Hesari J, Peighamardoust SJ. Inhibition of coliform bacteria in ultra-filtrated cheese packed in nanocomposite films containing Cloisite30B-metal nanoparticles. *Nutrition and Food Sciences Research.* 2018;5(1):23-30.
- [13] Azari A, Anvar SAA, Ahari H, Sharifan A, Motallebi Moghanjoghi A. Study on Nanosilver-TiO₂ photocatalytic nanocomposite coating with extrusion technique for increasing shelf life of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- [14] Moradi S, Motallebi A, Anvar A, Ahari H, BEHESHTIHA SH, Rokni N, et al. Increasing the shelf life of Iranian caviar by nano silver packaging basis TIO₂ and determination of residue by titration. 2015.



Antimicrobial effect of Ag-Cu nano composites produced via extrusion method on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Azari, A. ¹, Anvar, S. A. A. ^{1*}, Ahari, H. ², Sharifan, A. ², Motalebi, A. A. ¹

1. Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Food Science and technology, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran.

ABSTRACT

The most important application of nanotechnology in the food industry is the production of active packaging with antimicrobial properties, packaging with special mechanical properties in terms of gas and heat exchange and nanosensors in intelligent packaging. The aim of this study was to investigate the antimicrobial effect of silver and copper nanocomposites on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Nanocomposites containing silver and copper nanoparticles in 1, 3, 5 and 7% percentages were produced by extrusion method and were subjected to nanometric analysis. Then, the antimicrobial test of nanocomposites was performed on commercial strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by measuring the inhibition of growth in the culture medium. The data showed that the size of copper and silver nanoparticles was in the range of 20 to 50 nm and the dispersion of nanoparticles on the surface of nanocomposites was uniform with high purity. Antimicrobial test of nanocomposites showed that with increasing the percentage of nanoparticles, the diameter of the growth inhibition of nanocomposites increased significantly and the rate of inhibition of growth of silver nanoparticles was higher than copper ($p \leq 0.05$). *Staphylococcus aureus* was more sensitive to copper and silver nanoparticles than *Escherichia coli* ($p \leq 0.05$). The results of the present study showed that silver and copper nanocomposites with high antimicrobial properties can be used for food packaging.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 05/ 25
Accepted 2021/ 10/ 23

Keywords:

Antimicrobial properties,
Extrusion,
Nanocomposite,
Silver and Copper nanoparticles.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.193
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.5.6

*Corresponding Author E-Mail:
saaa4824@gmail.com