علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره یازده، بهمن ماه ۹۹

سنتز نانوذره نقره با سدیم بروهیدرات به روش احیای شیمیایی جهت تولید نانوکامپوزیت نقره آنتی‌باکتریال زیست‌تخریب‌پذیر به روش *Solution Blending*

تولید نانوکامپوزیت نقره آنتی باکتریال زیست‌تخریب‌پذیر

زهرا طاعتی جفرودی [۱]

حامد اهری [۲] *

dr.h.ahari@gmail.com

نکیسا سهرابی [۳]

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱۴ **تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۴**

چکیده

زمینه و هدف : پژوهشی که پیش رو دارید، بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد که در جهت استفاده از آن‌ها در تولید نانوکامپوزیت نقره با خاصیت آنتی‌باکتریال مناسب و زیست‌تخریب‌پذیر به روش محلول اجرا درآمده است.

روش بررسی: به منظور بررسی خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره،در تابستان ۱۳۹۷(تاریخ شروع آزمایش)ابتدا نانوذره نقره به روش احیای شیمیایی با $NaBH_4$ سنتز گردید و پس از انجام آزمون‌های نانومتریک UV-VIS, DLS, XRD و TEM وFTIR ، از باکتری استافیلوکوکس اورئوس به عنوان شاخص گرم مثبت، باکتری اشرشیا کلی به عنوان شاخص گرم منفی استفاده شد و بعد میزان MIC، MBC و Inhibition Zone محاسبه شد.در مرحله بعد نانوکامپوزیت به روش Solution Blending تولید و آماده گردید و خاصیت آنتی‌باکتریال آن با روش Inhibition Zone بررسی گردید.

یافته ها: نتایج به دست آمده حاکی از آن است که نانوذرات نقره در غلظت‌های ۵۰،۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بر روی استافیلوکوکوس آرئوس، اشرشیا کلی اثر بازدارندگی(MIC) دارد و همچنین در غلظت‌های ۴۰، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بر میکروارگانیسم‌های یادشده اثر کشندگی (MBC) دارد که بیشترین اثر ضدباکتریایی بر اساس نتایج، بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس مشاهده شد و علی رغم این در تست هاله عدم رشد(Inhibition zone)، هاله به قطر ۳-۵mm در اطراف

۱- کارشناس ارشد گروه زیست فناوری مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران،دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانشیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران،دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۳- استادیار دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دیسک نانوذره نقره در کشت‌های میکروارگانیسم‌های ذکر شده،مشاهده گردید و در تست هاله عدم رشد نانوکامپوزیت تولید شده نیز هاله ایجاد شده بر اساس مقادیر مورد انتظار بود. نتایج آزمایش ها با ۳ تکرار و مقدار P_{Value} محاسبه شده با روش ANOVA با ارزش $P < ۰/۰۰۰۱$ معنادار بوده است.

بحث و نتیجه گیری: نشان داد نانوذرات نقره می‌تواند به خوبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر مهارکنندگی و کشندگی داشته باشد و همچنین نانوکامپوزیت تولید شده به روش یادشده،خاصیت آنتی‌باکتریال بالایی دارد.

واژه های کلیدی: پوشش زیست‌تخریب‌پذیر، سنتز شیمیایی، نانوذره نقره، نانوکامپوزیت نقره.

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.11, February, 2021

Synthesis of Silver Nanoparticles with Sodium Brohydrate by Chemical Revival Method to Produce Biodegradable Antibacterial Silver Nanocomposite by Solution Blending Production of biodegradable antibacterial silver nanocomposites

Zahra Ta'ati jafroudi [1]
Hamed Ahari [2]
dr.h.ahari@gmail.com
Nekisa Sohrabi Haghdost [3]

Admission Date:August 25, 2020 Date Received: February 3, 2020

Abstract

Background and Objective: This study aimed to investigate the antibacterial effect of silver nanoparticles on Gram-negative and Gram-positive bacteria and producing silver nanocomposites with suitable and biodegradable antibacterial properties by Solution Blending method.

Method: To investigate the antimicrobial properties of silver nanoparticles, silver nanoparticles were first synthesized by NaBH4 reduciton and after performing UV-VIS, DLS, XRD and TEM and FT-IR tests, Staphylococcus aureus as a Gram-positive, Escherichia coli as a Gram-negative bacteri was used, investigated by MIC, MBC and Inhibition Zone. In the next step, the nanocomposite was prepared and prepared by Solution Blending method and its antibacterial activity was evaluated by Inhibition Zone method.

Findings: The results showed that silver nanoparticles had inhibitory effect on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans at concentrations of 50, 20 and 355 µg / ml respectively and also at concentrations of MIC. 60, 40 and 370, respectively, have the lethal effect on the aforementioned microorganisms (MFC, MBC). A diameter of 3-5 mm was observed around the silver nanoparticles in the cultures of the mentioned microorganisms and in the test of nanocomposite Inhibiion zone, the halo was created based on expected values.the results of the experiments were calculated with 3 replications and the amount of PValue was significant (P<0/0001)by ANOVA method.we used also 3 antibiotic as control for Inhibition zone test.

Discussion and Conclusion: Silver nanoparticles showed good inhibitory and lethal effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria and Also, the nanocomposites produced by the mentioned method have high antibacterial and viscolastic properties.

Keywords: Biodegradable coating, Chemical synthesis, Silver nanoparticles, Silver nanocomposites.

1- MSc in Food Biotechnology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. *(Corresponding Author)

3- Assistant Professor of the Department of Pathobiology School of Veterinary, Science and Research Branch Islamic Azad University ,Tehran, Iran.

مقدمه

در سال‌های اخیر، انتشار و مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) در برابر داروهای ضد میکروبی رایج باعث مشکلات متعدد بهداشتی و غذایی شده است،از این‌رو استفاده از نانوذرت فلزی به دلیل فعالیت ضد میکروبی آن‌ها به عنوان یک روش جدید برای مقابله با این مشکل شناخته شده اند(۱).بر اساس مطالعات مختلف انجام شده در این خصوص، نانوذرات فلزی، به خصوص نانوذرات نقره و بررسی مکانیسم عملکرد آن‌ها بر میکروارگانیسم‌ها، به دلیل اثر ضد میکروبی بالای نانوذرات نقره، استفاده از آن‌ها به عنوان جزء ضد میکروبی به ویژه در مواد افزودنی غذایی و کاربردهای پزشکی می‌تواند یکی از راهکارهای جدید و قابل توجه برای غلبه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا باشد و می تواند به عنوان گزینه مناسبی برای ضدعفونی کننده‌ها و عوامل ضدباکتریایی در برنامه‌های غذایی استفاده شود(۲). مواد غذایی همواره در طی مراحل مختلف تولید و فرآیند فرمولاسیون مواد اولیه و افزودنی های شیمیایی و همچنین اعمال فشار و دمای بیش از حد در هنگام پاستوریزاسیون، در معرض آلودگی میکروبی قرار دارند و ممکن است مقداری از برخی ترکیبات مضر در حین این پروسه وارد فرمولاسیون غذا شود، یا واکنش‌های شیمیایی انجام شود که محصول آن برای بدن انسان مضر باشد، علاوه بر این تماس مواد غذایی در هنگام پروسه تولید و بسته‌بندی با سطوح آلوده و یا دارای یون‌های فلزی، می‌توانند موجب به خطر افتادن سلامت مصرف کنندگان شوند، لذا استفاده از بسته‌بندی‌های مناسب ضدمیکروبی بر پایه پلیمرهای زیستی به جهت زیست‌تخریب بودن و دارا بودن خواص ضدمیکروبی مناسب امروزه بسیار مورد توجه است(۳).علاوه براین تجمع انواع مواد سنتزی غیرقابل تجزیه بخصوص انواع مختلف مواد بسته‌بندی در اکوسیستم‌های طبیعی سبب شده است که در سال‌های اخیر استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر به شدت مورد توجه قرار گیرد.بسته‌بندی‌های مورد استفاده بر پایه پلی‌وینیل‌الکل و غلظت‌های مختلفی از نانونقره موجب بهبود خواص مکانیکی از جمله کاهش جذب آب،کاهش نفوذپذیری به بخارآب، افزایش مقاومت کششی، افزایش خواص ویسکوالاستیک و همچنین خصوصیات ضد باکتریایی نانو کامپوزیت ها شد.با توجه به اینکه با افزایش غلظت نانونقره مصرفی برخی خصوصیات کامپوزیت ها از جمله مقاومت کششی الاستیک آن تغییر کرده و شکننده‌تر می‌شوند لذا با استفاده از غلظت‌های کمتر نانو نقره که بتواند از طرفی خاصیت آنتی‌باکتریال مناسبی را اعمال نماید،می‌توان به تولید فیلم‌های نانوکامپوزیتی قابل قبولی دست یافت(۴).همانطور که گفته شد،از میان نانو ذرات فلزی، نانوذرات نقره به دلیل داشتن خواص مناسبی از جمله خاصیت نوری منحصر به فرد و خواص مغناطیسی، حرارتی و کاتالیزوری علاوه بر فعالیت ضدمیکروبی با طیف گسترده، به عنوان یک عامل تقویت‌کننده در بافت‌های پلیمری مورد استفاده قرار گرفته است و میتوان از اثر ضد میکروبی بالای آنها در حفظ و نگهداری مواد غذایی بهره جست، علاوه بر این به عنوان عامل مناسب ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدآلودگی و ضدعفونی کننده استفاده شده‌اند.بر اساس پژوهش‌های انجام شده،فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره به اندازه و مساحت سطح خاص آن‌ها بستگی دارد و ذرات کوچکتر فعالیت ضدباکتریایی بهتری نشان می‌دهند و این خصوصیت در انرژی نهفته در اندازه نسبت سطح به حجم آن‌ها مربوط می‌شود که این امر باعث می شود تا بتواند به راحتی به سطح باکتری‌ها متصل شوند(۵). این خاصیت همچنین با خواص نوری آن‌ها، که مورد مطالعه گسترده قرار گرفته‌اند و به روش سنتز، اندازه، شکل، ترکیب پایدارکننده و اندازه آن، و محیط اطراف دی‌الکتریک آن‌ها وابسته است(۶).احسانی و همکاران(۱۳۹۶) در مطالعات خود از خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره در بسته‌بندی استفاده کردند و این بسته‌بندی‌ها بر پایه نانو ذرات نقره برای افزایش ماندگاری توت فرنگی را ارزیابی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که ماندگاری توت فرنگی از ۴ روز به ۱۶ روز افزایش یافت و این نوع بسته‌بندی توانایی بیشتری جهت حفظ خصوصیات کیفی توت فرنگی را دارا می باشد و میزان خاصیت بالای ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر اساس نتایج این مطالعه بر میکروارگانیسم‌ها به خوبی مشهود است(۷).Salmoni و

همکاران(۲۰۱۷)، به بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا پرداختند.باکتری مذکور دارای مقاومت ضدمیکروبی بالایی است که تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر را محدود می کند، بنابراین می‌توان از نانوذرات نقره به عنوان یک عامل ضد میکروبی بالقوه بر علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک مانند سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد. در این مطالعه به بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره در اندازه ۱۰ نانومتر پرداخته شد و نتایج نشان داد که همه سویه‌ها به محلول نانوذرات ۵ در مقدار میکروگرم در میلی لیتر حساس بودندو همچنین ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره تا غلظت ۲,۵ میکروگرم بر میلی لیتر، برای کلیه رده‌های سلولی مورد آزمایش بسیار ایمن است.نتایج حاصل نشان داد که استفاده از نانو ذرات نقره به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضدمیکروبی می تواند بسیار مناسب باشد(8).

با توجه به موارد فوق در این مطالعه تجربی کوشیده شده است با استفاده از روش‌های کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)، کمترین غلظت کشندگی (MBC) و هاله عدم رشد (Inhibition zone)، با ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش احیای شیمیایی، بر باکتری های استافیلوکوکوس آرئوس،اشرشیا کلی و قارچ کاندیدیا آلبیکنز، استفاده آن‌ها جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌ها و متعاقبا کاهش روند فساد مواد غذایی و افزایش کیفیت و عمر نگهداری مواد غذایی و به طور کلی خاصیت میکروب‌کشی آن‌ها را در نانوکامپوزیت ضدمیکروبی به روش Solution Blending بررسی کرد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی ابتدا نانوذرات به روش احیای شیمیایی با $NaBH_4$ (سدیم بروهیدرات)سنتز شدند و سپس با استفاده از روش DLS از نظر اندازه بررسی شدند که در بازه اندازه nm ۲۵-۴۰ قرار داشتند. (نمودار۱)و همچنین با روش‌های نانومتریک XRD (نمودار ۲) جهت بررسی ساختار بلوری ماده و UV-VIS (نمودار۳) جهت بررسی سایز نانوپارتیکل و پراکندگی یکنواخت آن‌ها، TEM(شکل ۱) به منظور بررسی ساختار و مورفولوژی نانوپارتیکل و FTIR (نمودار۴) برای بررسی پیوندهای کووالانسی در نانوپارتیکل سنتز شده ارزیابی گردیدند.بر اساس جدول ۱ غلظت نانوذرات نقره با استفاده از فرمول $m_1v_1=m_2v_2$ (که بیانگر جرم اولیه ماده و حجم اولیه آن برابر است با جرم ثانویه ماده و حجم ثانیه آن)محاسبه شده و بعد از آماده‌سازی محیط‌های کشت و اتوکلاو، به مقدار ۵ml از محیط کشت به هر لوله و مقدار ۱۰۰ میکروگرم باکتری و قارچ و سپس از غلظت‌های محاسبه شده از نانوذرات نقره افزوده گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد و بعد از ۲۴ ساعت، از غلظت‌های تعیین شده به عنوان کمترین غلظت بازدارندگی بر روی محیط کشت جامد، کشت خطی داده شد تا مقدار کمترین غلظت کشندگی به دست آمد (جدول۲). سپس با استفاده از نتایج فوق نانوکامپوزیت نقره آنتی‌باکتریال زیست‌تخریب‌پذیر با روش Solution Blending تولید شده اثر ضدمیکروبی آن با روش تست هاله عدم رشد سنجیده شد(جدول۳)آزمایشات با ۳ تکرار در ۳ سطح کاملا تصادفی انجام شدند و نتایج با استفاده از روش آماری ANOVA تجزیه تحلیل شده و مقدار ۰/۰۰۰۱ $P <$ معنادار بوده است(شکل ۱و۲).

روش سنتز نانو پارتیکل

ابتدا سدیم بروهیدرات در آب حل شد(در حمام یخ)سپس PVP به آن اضافه گردید، پس از آن محلول نیترات نقره به آن اضافه شد، این محلول با اضافه شدن نیترات نقره از رنگ زرد به نارنجی و قهوه‌ای و نهایتا مشکی تبدیل شد و سپس محلول فوق به مدت ۱ ساعت در دمای۶۰-۵۰ درجه با دور تند (حدود ۱۵۰۰ rpm) همزده شده و محلول حاصل به صورت کلوخه‌ای ایجاد شد، سپس محلول نیترات نقره (۰/۰۰۱ M) به صورت قطره‌قطره به محلول سدیم‌بروهیدرات (۰/۰۰۲ M)که در حمام یخ قرار داشت، اضافه گردیده محلول حاصل ابتدا به رنگ زرد در آمد که با گذشت زمان زرد آن پررنگ‌تر شد.سپس به نصف محلول فوق جهت پایداری محلول ۱٪ PVP اضافه و محلول حاصل به رنگ نارنجی-قرمز کمرنگ

تغییر رنگ داد. غلظت کلوئید نانو نقره برابر با ۶ mg/ml بود و اندازه ذرات بر اساس تست uv-vis برابر با ۴۰-۲۵ nm بوده و درصدpvp مورد استفاده جهت پایدارکنندگی برابر با ۳mg/ml بود.

مراحل تولید نانو کامپوزیت به روش Solution Blending:

ابتدا۵۰۰ میلی لیتر محلول ۲ درصد از پلیمر پلی‌وینیل‌الکل (PVA) را تهیه کرده و در ۵ بشر تقسیم نمودیم:

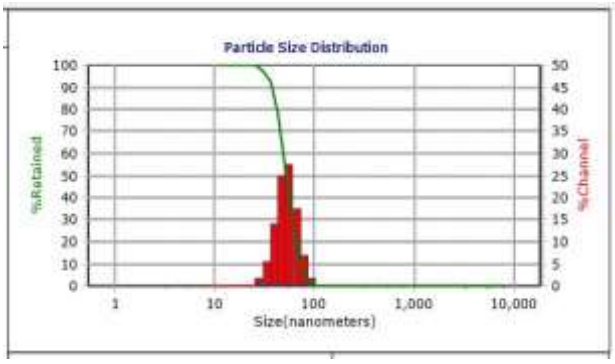
- ظرف۱-مقدار ۰/۲۸ میلی لیتر
- ظرف۲-مقدار ۰/۴۱۶ میلی لیتر
- ظرف۳-مقدار ۰/۸۳۳ میلی لیتر
- ظرف۴-مقدار ۱/۶۶۶ میلی لیتر
- ظرف۵-مقدار ۲/۵ میلی لیتر

سپس از محلول نانوذرات نقره سنتز شده با غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با مقدار ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ به ترتیب به بشرها اضافه کردیم و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس روی هیتر استیرر هوادهی و همزده شد تا جایی که حجم آن به ۲۰ میلی‌لیتر برسد.محلول حاصل را درون پتری دیش ریخته و طی ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس درون آون قراردادیم تا خشک شود. کامپوزیت حاصل با ضخامت یکسان و انعطاف‌پذیری مناسب آماده شد.

یافته ها

آنالیز اندازه ذرات نانو با تکنیک پراش دینامیک نوری DLS

جهت اندازه‌گیری سایز ذرات از DLS(Dynamic light scattering) استفاده شد. این روش، روشی است که برای تعیین اندازه ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها به وسیله دستگاه‌هایی است که می توانند آنالیز را در یک سوسپانسیون انجام دهند.این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا چند میکرون به کار می رود.جهت تعیین اندازه نانوذرات کلوئید نانو نقره در سل دستگاه قرار گرفت و پس از آن آنالیز بر روی نمونه مورد نظر انجام شد.برای اندازه گیری ذرات ۵ میلی‌لیتر از کلوید نانونقره درون سل ریخته و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با قدرت لیزر ۶۰ درصد ارزیابی گردید(۹).

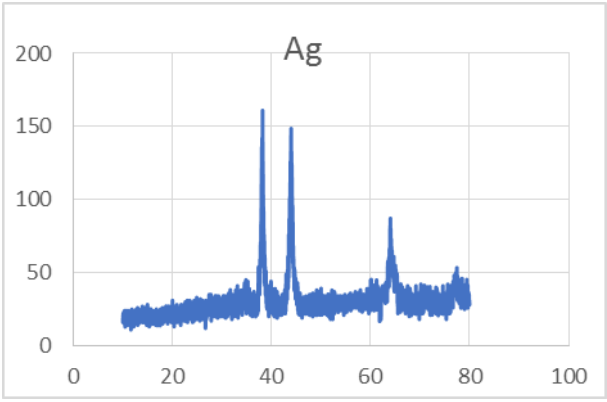


نمودار ۱- نمودارDLS نانو ذرات نقره

Diagram 1. DLS diagram of Silver Nano particles

آنالیز پراش پرتو ایکس(XRD)

برای مطالعه ساختار فیلم‌های نانوکامپوزیت، از آزمون پراش پرتو X استفاده شد.جهت انجام آنالیز پراش پرتو ایکس نمونه‌های نانونقره با استفاده از طیف سنج اشعه ایکس با منبع تشعشع Cu-ka با طول موج لاندا برابر با ۵۴/۱ آنگستروم و ولتاژ کاری ۴۰ کیلووات و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام شد و پرتوهای بازتابشی از نمونه در دمای محیط و در محدوده ۲۰ بین ۱/۵ تا ۱۰ درجه با اندازه گام ۰/۰۲ درجه بر ثانیه جمع‌آوری و نمودار مربوط به بازتابش آنها رسم شد(۱۰).

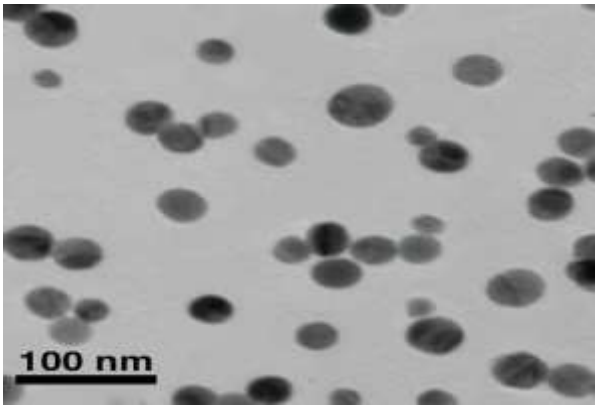


نمودار۲-نمودار XRD نانوذرات نقره

Diagram 2. XLD diagram of Silver Nano particles

آنالیز پراش میکروسکوپ الکترونی عبوری(TEM)

این میکروسکوپ نوعی میکروسکوپ الکترونی است که در آن پرتویی از الکترون‌ها از یک نمونه فوق‌العاده نازک عبور می‌کند و در اثر تعامل الکترون‌های عبوری با نمونه تصویر تشکیل می‌شود.سپس تصویر بر روی یک ابزار تصویرساز مانند یک صفحه نمایش فلورسنت، یا یک لایه منعکس می شود. میکروسکوپ الکترونی عبوری همچنین توانایی آنالیز عنصری، تعیین ساختار و جهت کریستالی اجزایی به کوچکی ۲۰ نانومتر را به صورت کیفی و کمی دارد(۱۰). تصویر زیر از نانوذره نقره سنتز شده در بازه اندازه ۲۵-۴۰nm با میکروسکوپ الکترونی TEM به دست آمده است.

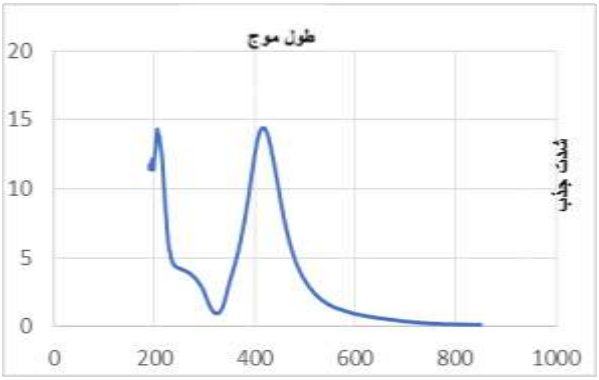


شکل۱-تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده با $NaBH_4$

Figure 1. TEM fig of Silver Nano particles which synthesis by $NaBH_4$

آنالیز طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی-اسپکتروسکوپی UV-VIS

در این روش طیف‌سنجی فرابنفش و مرئی بر اساس تابش فوتون‌های فرابنفش و مرئی بر نمونه و اندازه‌گیری میزان عبور و یا جذب ماده در طول موج‌های مختلف در بازه طیفی ۲۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر انجام می شود.نتیجه آزمون ذکر شده با نمایش سطح جذب معمولی پلاسمون در طول موج ۴۲۰ نانومتر از نانوذرات نقره تشکیل شده است(۱۰).

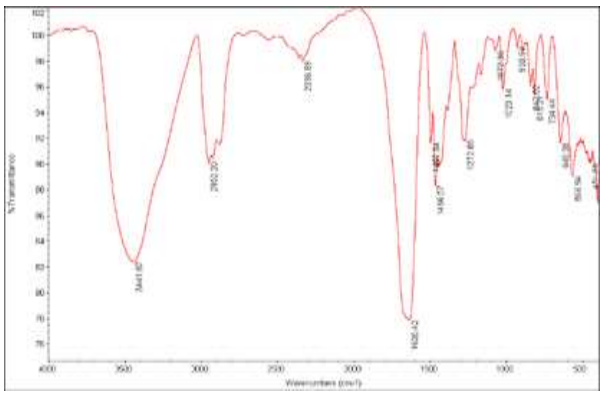


نمودار۳-UV-VIS نانوذره نقره سنتز شده

Figure 3. UV-VIS diagram of Silver Nano particles

آنالیز طیف‌سنجی با مادون قرمز FT-IR

طیف‌سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. برای انجام این تست ابتدا با استفاده از kbr قرص شفاف رنگی مطابق با محفظه دستگاه ساخته دستگاه را بلانک کردیم.سپس مقداری از نمونه را که خشک کرده و به صورت پودر در آوردیم، را به قرص افزوده و در محفظه دستگاه قرار داده و نمودار مربوط به ارتعاش اتم‌ها و مولکول‌های ماده توسط دستگاه رسم شد.در طیف الکترومغناطیسی ناحیه بین۴۰۰- ۰/۸ µm مربوط به ناحیه مادون قرمز است و ناحیه‌ای که جهت تجزیه شیمیائی مورد استفاده قرار می‌گیرد، بینµm ۵۰- ۰/۸ است(۱۰).



نمودار ۴-طیف سنجی FT-IR

Figure 4. FT-IR Spectroscopy diagram of Silyer Nano particles

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت بازدارندگی (MBC)(در مورد قارچ MFC)

بنا به تعریف MIC کمترین غلظتی از فعالیت ضدمیکروبی است که باعث بازدارندگی و مهار میکروارگانیسم‌ها شود وMBC کمترین غلظتی از فعالیت ضدمیکروبی است که در آن ۹۹/۹ درصد از میکروارگانیسم‌ها ازبین رفته باشند.جهت انجام این تست از روش ماکرودایلوشن در لوله‌های گاما استفاده شد.مقدار ml ۵ از محیط کشت نوترینت براث برای باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی و از محیط کشت پوتیتو دکستروز براث برای قارچ کاندیدیا آلبیکنز پس از آماده‌سازی و اتوکلاو ریخته شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری‌ها و قارچ به آن افزوده و مقدار غلظت محاسبه شده از نانوذره نقره سنتز شده مطابق جدول ۱ به آن افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

انکوباسیون شد.برای تعیین MBC، با استفاده از سمپلر، از غلظت MIC به دست آمده و غلظت های بالاتر از MIC ، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشت و بر روی محیط نوترینت آگار برده و بعد از کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد، بعد از گذشت این زمان هر رقتی که در پلیت مانع رشد کامل میکروارگانیسم شده باشد یا کمتر از ۳ کلونی(تقریباً معادل ۹۹/۵-۹۹درصد فعالیت کشندگی) وجود داشت به عنوان MBC در نظر گرفته شد.آزمایش در ۳ تکرار انجام شد و نتایج مطابق جدول ۲ گزارش گردید(۱۱).

جدول۱-غلظت های محاسبه شده برای نانونقره

Table 1. Nano-silver estimated concentrations

ردیف	غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر	مقدار برحسب میکرولیتر
۱	۱۰	۸/۳۳
۲	۲۰	۱۶/۶
۳	۴۰	۳۳/۵
۴	۵۰	۴۱/۶
۵	۶۰	۵۰
۶	۸۰	۶۶/۶
۷	۱۰۰	۸۳/۳
۸	۲۰۰	۱۶۶/۶
۹	۴۰۰	۳۳۳/۳

جدول۲-میانگین نتایج تست های حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی از هر سه تکرار

Table 2. The average results of MIC and MBC tests of 3 repetitions

نام باکتری-قارچ	MIC	MBC/MFC
E-Coli	50 µg/ml	70 µg/ml
S.aureus	25 µg/ml	45 µg/ml
Candidia.Albicanse	350 µg/ml	380 µg/ml

شکل۲- نتایج آماری حاصل از تست MIC انجام شده به روش آماری ANOVA

Figure 2. Statistical findings of MIC test by ANOVA

شکل۳-نتایج آماری حاصل از تست MBC انجام شده به روش آماری ANOVA

Figure 3. Statistical findings of MBC test by ANOVA

آزمون آنتی بیوگرام تعیین قطر هاله عدم رشد[1]

جهت تست عملکرد نانوذره نقره ازغلظت های ۲۰۰ و ۶۰۰۰ µg/ml به مقدار ۱۲ و ۲۴ µg (مقداری که دیسک بلانک را به خوبی آغشته می نماید) تست هاله عدم رشد برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی و قارچ کاندیدیا آلبیکنز گذاشته شد. نتایج تست در جدول ۳ قابل رویت است.

بعد از ایزوله کردن باکتری‌ها (استافیلوکوکوس آرئوس، اشرشیا کلی) ، مقداری از کلونی میکروارگانیسم‌های مذکور را برداشته و در سرم استریل حل کردیم، سپس بعد از تهیه محلول هموژن، با سواب استریل شده محلول را به هم زده و آن را به محیط کشت انتقال دادیم و سپس به وسیله سواب، محیط کشت را به صورت خطی کشت دادیم، بعد از کشت، دیسک‌های بلانک حاوی نانوذرات نقره و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را بر روی محیط کشت انتقال دادیم، در پلیت را بسته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد، پس از ۲۴ ساعت پلیت را زیر چراغ بررسی کردیم و منطقه عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد.جهت بررسی عملکرد تست از دیسک آنتی بیوتیک پنی سیلین و آمیکاسین برای باکتری‌ها و ایتراکونازول برای قارچ استفاده گردید(12). در مورد تست هاله عدم رشد برای نانوکامپوزیت تولید شده، با استفاده از پانچ به صورت دیسک های بلانک از آن جدا کرده و طبق روش مذکور روی محیط کشت در حضور باکتری‌های استتافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی قرار دادیم و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷درجه سلسیوس انکوبه کردیم و قطر هاله ایجاد شده اندازه‌گیری شد.

1- Disk Diffusion

جدول۳-نتایج تست هاله عدم رشد

Table 3. The results of inhibition zone tests in silver nanoparticle

نام باکتری-قارچ	µg/ml ۱۲/نانو ذره نقره	µg/ml ۲۴/نانو ذره نقره	پنیسیلین	آمیکاسین	ایتراکونازول
E-Coli	mm ۲/۵	mm ۲/۵	mm ۴	mm ۸	-
S.aureus	mm ۲	mm ۳	mm۴	mm ۷	-
Candidia.Albicanse	-	0/5 mm	-	-	-

جدول۴-نتایج تست هاله عدم رشد نانوکامپوزیت

Table 4. The results of inhibition zone tests in nanocomposite

نام باکتری-قارچ	µg/ml ۱۲/نانو ذره نقره	µg/ml ۲۴/نانو ذره نقره
E-Coli	mm ۳	mm ۴
S.aureus	mm۴ -۲/۵	mm ۳-۵
Candidia.Albicanse	mm ۱	mm ۱/۵

بحث

نانوذرات نقره یکی از متداول ترین نانوذرات قابل استفاده در بسته‌بندی فعال است و از آن به عنوان مواد ضدمیکروبی استفاده می شود و از طریق پوشاندن مواد با نانوذرات نقره و یا قرار دادن یون‌های مثبت نقره (کاتیون نقره) در نانوکامپوزیت‌ها امکان ایجاد بسته‌بندی ضدمیکروبی موثر و امن فراهم می شود.اخیرا بعضی از ترکیبات نقره از سوی سازمان امنیت مواد غذایی اروپا ارزیابی و به عنوان افزودنی‌های ضدمیکروبی برای مواد بسته‌بندی اعلام شده‌اند.این تکنولوژی در برخی نقاط جهان مثل کره جنوبی، چین و آمریکا استفاده شده است(**۱۳**).در این زمینه فتحی فر و صداقت(۱۳۹۶)،نقش ضدمیکروبی نانوذرات نقره را در پوشش‌های بسته‌بندی ارزیابی نمودند و کاهش پاتوژن ها در حضور نانوذرات نقره را گزارش کردند که موجب جلوگیری از فساد باکتری‌ها و از دست رفتن مواد مغذی و در نتیجه، افزایش مدت زمان ماندگاری غذا است(۱۴). بر اساس نتایج کمترین غلظت کشندگی و کمترین غلظت بازدارندگی به دست آمده از مطالعه فعلی،نانوذرات نقره با مهار و از بین بردن میکروارگانیسم‌ها،می توانند در افزایش ماندگاری مواد غذایی موثر باشند.در مطالعه حاضر بر اساس نتایج مشاهده شد که نانوذرت نقره بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس اثر بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیا کلی دارد.عباس زادگان و همکاران (۱۳۹۵)،در تحقیقات خود علت این تفاوت اثر ضدمیکروبی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را در مقدار پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها ذکر کردند که در واقع باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مقدار پپتیدوگلیکان بیشتری در دیواره سلولی خود دارند که این امر باعث میشود ناحیه مهار بیشتری برای اثر نانوذرات نقره داشته باشند(۱۵) و نتیجه مشابه به دست آمده از تحقیق فعلی با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.Eslami و همکاران(۲۰۱۶)،در مطالعات خود به تاثیر نانوکاپوزیت حاوی نانو نقره بر وضعیت میکروبیولوژیکی طولانی مدت زعفران ایرانی (Crocus sativus L) پرداختند. در این پژوهش پلیمرهای حاوی نانوذرات نقره به مقدارهای ۱۲۰۰ ،۸۰۰ ،۴۰۰ ،۰ و ppm۴۰۰۰ در ۶ بازه زمانی۱۴، ۲۸، ۶۴، ۹۰ و ۱۸۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند و کاهش بار میکروبی به خصوص در نمونه حاوی ۴۰۰۰ppm از نانوذرات نقره نشان داد که بسته بندی نانوسیلور می تواند بار میکروبی زعفران را به میزان قابل توجهی کاهش دهد(۱۶).که نشان می‌دهد نانوذرات نقره به خوبی می توانند رشد

میکروارگانیسم‌ها را مهار کنند که مطابق با نتایج تحقیق فعلی می باشد..Salomoni و همکاران(۲۰۱۷)، اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره در باکتری Pseudomonas aeruginosa را مورد بررسی قرار دادند.در این مطالعه به بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره تجاری در اندازه ۱۰ نانومتر در دو سویه بیمارستانی P. aeruginosa مقاوم در برابر تعداد زیادی آنتی‌بیوتیک پرداخته شد که بر اساس یافته‌های آزمایش همه سویه‌ها به محلول نانوذرات ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر حساس بودند که نشان دهنده اثر ضد میکروبی بالای نانوذرات نقره می‌باشد(۸). بر اساس تحقیقات انجام شده توسط Al-Sharqi و همکاران(۲۰۱۹) خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره در برابر باکتری‌های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس آرئوس در شرایط in vitro انجام شد.برای این کار ابتدا چهار غلظت از نانوذرات نقره (۱۲/۵ ، ۲۵ ، ۵۰ ، و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، که با روش کاهش شیمیایی سنتز شدند برای انجام فعالیت ضد باکتریایی آماده استفاده شد.مکانیسم تعامل بین نانوذرات نقره و غشای سلول‌های باکتریایی از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و تجزیه و تحلیل گونه‌های اکسیژن فعال برای بررسی عملکرد سیتوتوکسیک نانوذرات نقره سنتز شده غیرفعال در برابر هر دو گونه باکتری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که نانوذرات نقره باعث کاهش جمعیت باقی مانده از باکتری‌های مذکور شد. در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر باکتری اشرشیا کلی و غلظت کمتر از آن بر باکتری استافیلوکوکوس آرئوس اثر کشندگی داشت.تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM) از سلول‌های باکتریایی تحت درمان نشان داد که تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی در غشای سلولی پس از تیمار با نانوذرات نقره رخ داده است.نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره فعالیت ضد باکتریایی قوی دارند که می‌توانند برای غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌های مضر و بیماری‌زا استفاده شوند(6).که همانند مطالعه حاضر نقش ضدمیکروبی بالای نانوذرات نقره را نشان می‌دهد و کاملا مطابق با نتایج به دست آمده با مطالعه حاضر بوده است.Dakal و همکاران(۲۰۱۶)در مطالعات خود به بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر باکتری‌های مقاوم شده به چند نوع آنتی‌بیوتیک پرداختند.از آنجایی که مقاومت چندداروییِ میکروارگانیسم‌های بیماری زا در برابر داروهای ضدمیکروبی یک مانع مهم در تشخیص و درمان موفق بیماری‌های عفونی است.پیشرفت‌های اخیر در داروهای مبتنی بر فناوری نانو، افق‌های جدیدی را برای مبارزه با این مقاومت در میکروارگانیسم‌ها باز کرده است.مهمترین پارامترهای فیزیکی و شیمیایی که بر پتانسیل ضدمیکروبی نانوذرات نقره تأثیر می‌گذارد شامل اندازه، شکل، بار سطح، غلظت و حالت کلوئیدی است.در پژوهش Dakal و همکارانش مکانیسم اثر نانوذرات نقره بر سلول‌های میکروبی از طریق چسبندگی به سلول‌های میکروبی، نفوذ در داخل سلول‌ها،تغییر در مقدار گونه‌های فعال اکسیژن(ROS) و تولید رادیکال آزاد و مدولاسیون مسیرهای انتقال سیگنال میکروبی به عنوان برجسته‌ترین حالت‌های ضد میکروبی شناخته شد(۱۷).علاوه بر این در تحقیقاتی که توسط Yan و همکارانش(۲۰۱۸) در این زمینه انجام شد،مکانیسم اثر نانوذرات نقره بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا(الگویی برای باکتری‌های گرم منفی) به روش پروتئومیکس بررسی شد و پاسخ پروتئومیکس آن به طور کامل برای روشن کردن مکانیسم ضدمیکروبی در میکروارگانیسم ارزیابی گردید که در کل، ۵۹ پروتئین تنظیم بیان ژن شده با نقره (۲۷ پروتئین با بیان مثبت و ۳۲ پروتئین با بیان منفی) و ۵ پروتئین متصل به نقره شناسایی شدند.تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد که تداخل با عملکرد غشای سلولی و تولید گونه‌های اکسیژن فعال داخل سلولی (ROS) مسیرهای اصلی برای اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره بوده است که نشان می‌دهد آزاد سازی یون‌های نقره با پروتئین‌های غشایی واکنش می دهند با افزایش سطح اکسیژن فعال داخل سلولی آسیب اکسیداتیو به غشای سلولی باکتری وارد می شود(18).اثرات ضدمیکروبی و مکانیسم اثر نانوذرات نقره بر آنها کاملا مطابق با نتایج مطالعه حاضر می باشد. Poyamanesh و همکاران (۲۰۱۹)، سنتز و خصوصیات نانوکامپوزیت نقره را به عنوان ماده ای مناسب در بسته بندی مواد غذایی بررسی کردند.در این مطالعه امکان استفاده از نانوکامپوزیت نقره به عنوان بسته‌بندی مواد غذایی بررسی شد.در این تحقیق ابتدا نانوذرات نقره با روش احیای

شیمیایی تهیه و برای تایید حضور نانوذرات نقره از طیف سنجی UV-VS استفاده شد.آزمون ذکر شده با نمایش سطح جذب معمولی پلاسمون در طول موج ۳۸۰ نانومتر از نانوذرات نقره تشکیل شده است. پوشش روی پلی‌اتیلن پس از تشکیل نانوذرات انجام شد. نانوساختار و اندازه ذرات نانوذرات نقره با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تأیید شد.فعالیت ضدباکتریایی فیلم نانوکامپوزیتی تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد راندمان ضدباکتریایی مطلوبی در برابر باکتری اشرشیا کلی(ATCC 8739)و استافیلوکوکوس آرئوس(ATCC 6538)وجود دارد(۱۹). که کاملا با نتایج حاصل از مطالعه فعلی مطابق بوده و اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره را نشان می دهد.

نتیجه گیری

بر اساس آزمایشهای انجام شده(نتایج اندازه‌گیری تست‌های کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی و تست هاله ممانعت از رشد)و با توجه به مطالعات قبل که در خصوص خاصیت آنتی‌میکروبی نقره و نانوکامپوزیت نقره آنتی‌باکتریال انجام شده بود و مطابقت نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات انجام شده در قبل، می‌توان گفت استفاده از نانوذرات نقره در پوشش‌های بسته‌بندی مواد غذایی،نه تنها باعث افزایش ماندگاری و طول عمر مفید مواد غذایی می‌شود، بلکه با بی‌نیاز نمودن از استفاده از افزودنی‌های شیمیایی به ماده غذایی و همچنین زیست‌تخریب‌پذیر بودن آن و عدم ایجاد صدمه به محیط زیست، می‌تواند در رسیدن به مواد غذایی ارگانیک و حفظ محیط زیست بهبود دهنده باشد.در واقع نانومواد نقره به دلیل نسبت سطح به حجم بالا و داشتن بار مثبت در یون‌های خود می‌توانند با میکروارگانیسم‌ها و مولکول‌های بیولوژیکی خواص بیشتری داشته باشند و خواص ضدباکتریایی خود را موثرتر نشان دهند.از سویی دیگر به دلیل استفاده از روش احیای شیمیایی در سنتز نانوپارتیکل‌های نقره، کنترل سایز و اندازه نانومواد سنتز شده و تکرار پذیری آزمایش به راحتی قابل انجام بوده و همچنین تولید نانوکامپوزت نقره به روش Solution blending با قابلیت کاهش قابل توجه در هزینه های انجام طرح، از جمله نکات حائز اهمیت در استفاده از این روش می‌باشد.به طور کلی بر اساس تحقیقات انجام شده در این زمینه،ناحیه مهار نانو ذرات نقره بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است که نشانگر تفاوت در دیواره سلولی و مقدار پپتیدو گلیکان موجود در دیواره سلولی آنهاست.

علاوه بر این از آنجایی که مقدار ماده مصرفی از نانوذرات نقره جهت استفاده از خاصیت میکروب‌کشی ،بسیار پائین تر از حد مجاز در استاندارد جهانی می‌باشد، لذا امکان رهایش و سمیت در ماده غذایی وجود ندارد و از این جهت نانوذرات نقره می‌توانند جایگزین مناسبی جهت مواد ضدمیکروبی باشند.

Reference

1. Khodashenas B, Ghorbani HR. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. Arabian Journal of Chemistry. 2019;12(8):1823-38.
2. Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Azizi-Lalabadi M, Ehsani A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses.
3. Deus D, Kehrenberg C, Schaudien D, Klein G, Krischek C. Effect of a nano-silver coating on the quality of fresh turkey meat during storage after modified atmosphere or vacuum packaging. Poultry Science. 2016;96(2):449-57.
4. Roustami abolverdi F NM, Dadfar S. Production of polyvinyl alcohol-hydroxypropyl methylcellulose nanocomposite containing silver nanoparticles and investigation of its physicochemical and antimicrobial properties. Twenty-third National Congress of Food Science and

Technology of Iran: Islamic Azad University, Quchan Branch. 2015.

5. Mathew S, S S, Mathew J, E.K R. Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. Food Packaging and Shelf Life. 2019;19:155-66.
6. Al-Sharqi A, Apun K, V M, Kanakaraju D, Maurice Bilung L. Enhancement of the Antibacterial Efficiency of Silver Nanoparticles against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using Blue Laser Light. International Journal of Photoenergy. 2019;2019:1-12.
7. Ehsani N SS, Familmomen R. Development of two packaging methods based on silver nanoparticles to increase the shelf life of strawberries. Food Science and Nutrition. 2017.
8. Salomoni R, Léo P, Montemor AF, Rinaldi BG, Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in Pseudomonas aeruginosa. Nanotechnol Sci Appl. 2017;10:115-21.
9. Verma P, Maheshwari S. Preparation of sliver and selenium nanoparticles and its characterization by dynamic light scattering and scanning electron microscopy. Journal of Microscopy and Ultrastructure. 2018;6(4):182-7.
10. Awad M, Hendi A, Mustafa Ortashi K, Alotaibi RA, Sharafeldin MS. Characterization of silver nanoparticles prepared by wet chemical method and their antibacterial and cytotoxicity activities. 2016;15:679-85.
11. Panpaliya NP, Dahake PT, Kale YJ, Dadpe MV, Kendre SB, Siddiqi AG, et al. In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. Saudi Dent J. 2019;31(1):76-83.
12. Cunha F, Maia K, Mallman E, Cunha M, Maciel A, Souza I, et al. Silver nanoparticles-disk diffusion test against escherichia coli isolates. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2016;58:73.
13. SIMBINE EO, RODRIGUES LdC, LAPA-GUIMARÃES J, KAMIMURA ES, CORASSIN CH, OLIVEIRA CAFd. Application of silver nanoparticles in food packages: a review. Food Science and Technology. 2019. 802-39: 793.
14. Fathifar M SN, Editors. Application of silver nanoparticles in food packaging. 2016.
15. Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar S, Nabavizadeh M, et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study: Hindawi Limited; 2015. Article 53 p.
16. Eslami M, Bayat M, Mozaffari Nejad AS, Sabokbar A, Anvar AA. Effect of polymer/nanosilver composite packaging on long-term microbiological status of Iranian saffron (Crocus sativus L.). Saudi J Biol Sci. 2016;23(3):341-7.
17. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver

Nanoparticles. Front Microbiol. 2016;7:1831.-

18. Xueting Y, He B, Liu L, Qu G, Shi J, Hu L, et al. Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles in Pseudomonas aeruginosa: Proteomics approach. Metallomics. 2018;10.

Pooyamanesh M, Ahari H, Anvar AA, Karim G. Synthesis and Characterization of Silver Nanocomposite as a Food Packaging. Journal of Food Biosciences and Technology. 2019;09(2):73-82.