

Antimicrobial properties of nanocomposite films containing silver nanoparticles

Pouyamanesh, M.¹, Ahari, H.^{2*}, Anvar, A. A.³, Karim, G.⁴

1. Ph.D candidate in Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
 2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
 3. Assistant Professor, Department of Basic Sciences and Health, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
 4. Professor, Department of Food Hygiene, Tehran University, Tehran, Iran
- *Corresponding Author: dr.h.ahari@gmail.com
(Received: 2019/12/14 Accepted: 2020/8/2)

Abstract

Metal particles are added to polymers used in the food packaging to improve their mechanical and antimicrobial properties. In this study, the antimicrobial properties of low-density polyethylene nanocomposite (LDPE) containing 17.5%, 12.5%, 7.5%, and 2.5% silver nanoparticles were investigated. UV-Visible, SEM, and XRD tests were used to confirmation of the synthesis of silver nanoparticles, characterization of silver particle distribution, and silver crystal structure. Crystal nanoparticles with an average size of 20 nanometers were approved. To evaluate the antimicrobial properties of silver nanocomposites, bacterial growth in the presence of nanosilver films with the mentioned percentages was measured by optical density (OD) method via spectrophotometer (600 nm). Besides, the migration of nanoparticles was measured. The results showed that the coating containing 17.5% and 2.5% nanosilver had the highest and the lowest effect, respectively and in comparison to the other groups. Also, comparing the effect of coatings on two types of food pathogens, *E. coli* and *S. aureus*, showed that the effect of coatings on *S. aureus* was higher. The results showed a correlation between the percentage of silver nanoparticles used and antimicrobial properties. Furthermore, with increasing the percentage of silver nanoparticles, the releasing rate of nanoparticles from the coating increased. Finally, due to the migration of silver nanoparticles from all four types of nanocomposite coatings in the permitted range, 17.5% coating was selected as the most efficient one.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Silver Nanocomposite, Antibacterial, Migration

DOI: 10.30495/JFH.2020.1885319.1251

«مقاله پژوهشی»

مطالعه خواص ضد میکروبی پوشش نانوکامپوزیتی حاوی نانوذرات نقره

مبینا پویامنش^۱، حامد اهری^{۲*}، امیرعلی انوار^۳، گیتی کریم^۴

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

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

۳. استادیار گروه تخصصی علوم پایه و بهداشت، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: dr.h.ahari@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۹/۲۳ پذیرش نهایی: ۹۹/۵/۱۲)

چکیده

امروزه ذرات فلزی به پلیمرهای مورد استفاده در بسته بندی مواد غذایی اضافه می شوند تا خواص مکانیکی و ضد میکروبی را بهبود دهند. در این مطالعه خواص ضد میکروبی پوشش های نانو کامپوزیت با دانسیته کم (LDPE) حاوی ۱۷/۵، ۱۲/۵، ۷/۵ و ۲/۵ درصد نانوذرات نقره بررسی گردید. برای تولید نانوذرات نقره روش احیاء شیمیایی با استفاده از احیا کننده تری سدیم سیترات انتخاب شد. به منظور تأیید سنتز نانو ذرات نقره، مشخصه یابی توزیع ذرات نقره و ساختار کریستالی نقره به ترتیب از آزمون های UV-Visible، SEM و XRD استفاده شد. نانو ذرات بلورین با متوسط اندازه ۲۰ نانومتر تأیید شدند. به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی پوشش ها، رشد باکتری در حضور پوشش های نانو نقره با درصدهای مذکور به روش سنجش دانسیته نوری (OD) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام گرفت. میزان مهاجرت ذرات نانو نقره نیز اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که پوشش حاوی ۱۷/۵ درصد نانو نقره بیشترین تأثیر را داشت و پوشش حاوی ۲/۵ درصد فاقد هرگونه تأثیر بود. همچنین مقایسه تأثیر پوشش ها بر *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که تأثیر پوشش ها روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بوده است. نتایج حاکی از وابستگی بین درصد نانوذرات نقره استفاده شده و خاصیت ضد میکروبی بود. به این ترتیب که با افزایش درصد نانوذرات نقره، خاصیت ضد میکروبی افزایش پیدا کرد. همچنین با افزایش درصد نانوذرات نقره میزان رهائش نانوذرات از پوشش نیز افزایش یافت. در نهایت با توجه به قرار گرفتن میزان مهاجرت نانو ذرات نقره از هر چهار نوع پوشش نانوکامپوزیتی در محدوده مجاز، پوشش ۱۷/۵ درصد به عنوان کارآمدترین پوشش انتخاب شد.

واژه های کلیدی: نانو کامپوزیت نقره، ضد میکروبی، مهاجرت

مقدمه

میان کاتیون‌های فلزی دارای بیش‌ترین خاصیت آنتی‌باکتریال در مقابل انواع میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (Rhim *et al.*, 2013). عملکرد ضد میکروبی یون‌های نقره در ابعاد نانو از طریق تخریب غشاء سلول و اختلال در عملکرد آنزیم‌های زنجیره تنفسی در میکروب می‌باشد (Zapata *et al.*, 2011). فراربت کم، خاصیت ضد میکروبی طولانی‌مدت و کم اثر بودن آن روی سلول‌های یوکاریوت آن را به یکی از منحصراً به‌فردترین کاتیون‌های فلزی جهت استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی مبدل کرده است (Zhou *et al.*, 2011). نانو ذرات نقره با روش‌های متنوعی تولید می‌شوند که نتیجه آن تولید نانو ذراتی با شکل و ابعاد مختلف است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش سل ژل، لیتوگرافی، فرسایش و روش‌های فیزیکی و شیمیایی اشاره کرد (Varadan *et al.*, 2010). از میان روش‌های موجود، روش احیاء شیمیایی به دلیل سهولت کنترل شرایط واکنش، مصرف انرژی کم، توانایی کنترل شکل و اندازه نانوذرات توسط نوع احیاکننده، شرایط واکنش مثل دما و pH یکی از متداول‌ترین و مطلوب‌ترین روش‌های سنتز نانوذرات نقره می‌باشد (Roucoux *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010). روش شامل انحلال نمک نقره در حلال و اضافه کردن احیاکننده و در نهایت افزودن پایدارکننده به آن می‌باشد. نمک نقره استفاده شده در بیشتر تحقیقات (حدود ۸۳ درصد) نیترات نقره است. دلیل استفاده زیاد از نیترات نقره قیمت پایین و پایداری شیمیایی بالا در مقایسه با سایر نمک‌های نقره می‌باشد (Tolaymat *et al.*, 2010) استفاده از احیاکننده‌های متفاوت باعث تولید نانوذرات با اندازه و شکل‌های مختلف می‌گردد (Tan *et al.*, 2007). از

بسته‌بندی مواد غذایی باهدف حفظ کیفیت اصلی محصولات، به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی و افزایش زمان ماندگاری به‌کار می‌رود (Tewari and Juneja, 2008). از جمله موادی که در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود، پلی‌اتیلن‌ها هستند که به‌علت طیف گسترده کاربردی جزء مواد استثنائی در صنایع پلاستیک محسوب می‌گردند. پلی‌اتیلن‌ها در دو نوع پایه تولید می‌شوند؛ پلی‌اتیلن با چگالی کم (Low LDPE) و پلی‌اتیلن با چگالی زیاد (High density polyethylene:HDPE) که روش شیمیایی تهیه هر یک متفاوت است. پلی‌اتیلن با چگالی کم به دلیل انعطاف‌پذیری زیاد، شفافیت و پایداری حرارتی، قابلیت بازیافت و قابلیت فرآوری آسان و ارزان در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Del Marsh and Bugusu, 2007; Nobile *et al.*, 2009). بنابراین بیشتر تحقیقات انجام شده بر روی بسته‌بندی مواد غذایی بر پایه ماتریس پلیمر LDPE است (Han *et al.*, 2007). امروزه ذرات فلزی به پلیمرهای مورد استفاده به‌عنوان بسته‌بندی مواد غذایی اضافه می‌شوند تا خواص مکانیکی و ضد میکروبی را بهبود بخشند (Liorens *et al.*, 2012; Bruna *et al.*, 2012). با کاهش ابعاد ذرات در حد نانومتر، فعالیت سطحی آن‌ها افزایش می‌یابد، در نتیجه سرعت واکنش این مواد به‌عنوان ماده آنتی‌باکتریال با محیط اطراف افزایش می‌یابد. فلزات به‌شکل نانو ذرات جامد یا اکسید فلزات در انواع مختلف مواد پلیمری قابلیت ترکیب دارند (Magana *et al.*, 2008). یکی از ذرات فلزی مورد استفاده در پوشش‌های بسته‌بندی نانو، نقره است که در

نانوذرات نقره است. همچنین تأثیر این پوشش‌ها در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *شریشیا کولای* می‌باشد (Jokar et al., 2012). در تحقیقی دیگر پس از تهیه نانوکامپوزیت نقره دریافتند که با افزایش درصد نانوذرات نقره خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد (Zapata et al., 2011). اثر پوشش بسته‌بندی نانوکامپوزیت LDPE حاوی نانوذرات نقره بر زمان ماندگاری نان گندم در مقایسه با پوشش پلی‌اتیلن با دانسیته بالا (HDPE) و نان فاقد بسته‌بندی بررسی کردند، نتایج نشان داد که پوشش بسته‌بندی نانوکامپوزیت LDPE حاوی نانوذرات نقره سبب افزایش ماندگاری نان در مقایسه با پوشش پلی‌اتیلن با دانسیته بالا (HDPE) و نان فاقد بسته‌بندی شده بود (Mihaly Cozmuta et al., 2015). هدف از این پژوهش بررسی خاصیت ضدباکتریایی پوشش‌های نانوکامپوزیت حاوی درصدهای متفاوت نانوذرات نقره تهیه‌شده به روش اختلاط مذاب می‌باشد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش از شرکت (Merck, Germany) تهیه گردید. همچنین جهت تهیه ماتریس پلیمری، پلی‌اتیلن نوع غذایی (Food Grade) با دانسیته پایین با کد LF0200 دانسیته ۹۲ g/ml و نقطه ذوب ۹۴ درجه سلسیوس از آزمایشگاه شیخ بهایی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران خریداری شد. کلیه مواد مورد استفاده دارای درجه خلوص تجزیه‌ای بوده و بدون نیاز به خالص‌سازی اولیه، همان‌گونه که خریداری شده بودند، مصرف گردید. همچنین در تهیه محلول‌ها از آب دو بار تقطیر

طرفی با کاهش اندازه نانو ذرات، خاصیت ضد میکروبی آن‌ها افزایش می‌یابد (Park et al., 2017). بنابراین استفاده مناسب از احیاکننده نقش مهمی در تولید نانوذرات با خاصیت ضد میکروبی کارآمد دارد. از طرفی توجه به این نکته حائز اهمیت است که بین اندازه نانوذرات نقره و میزان سمیت آن‌ها رابطه عکس وجود دارد. ذرات کوچک‌تر دارای سطح به حجم بیشتر بوده در نتیجه اثرات سمی آن‌ها به دلیل افزایش میزان واکنش‌پذیری بیشتر است (Auffan et al., 2009). قوانین اتحادیه اروپا، حد مجاز یون‌های نقره در مواد غذایی را به ۰/۰۵ mg/kg محدود کرده است. برای جلوگیری از رهائش نانوذرات به محیط، ماتریس‌های آلی و معدنی ساخته شده‌اند که منجر به تحرک کمتر نانو ذرات و در نتیجه کاهش خطرهای احتمالی آن می‌شود (Macanás et al., 2011). یکی از انواع این ماتریس‌ها، کامپوزیت‌ها هستند. برای ساخت نانو کامپوزیت پلیمری روش‌های مختلفی وجود دارد که به دلیل مقاومت حرارتی نانوذرات فلزی و پروسه‌های حرارتی به کاررفته برای تولید پوشش‌های LDPE که در تماس با مواد غذایی هستند، اختلاط مذاب گزینه مناسبی است (Appendini and Hotchkiss, 2002). در مطالعه‌ای پوشش‌های نانوکامپوزیت پلی‌اتیلن LDPE- نقره تولید و فعالیت ضد میکروبی آن بررسی شد. نتایج حاکی از فعالیت ضد میکروبی خوب پوشش‌ها در مقابل باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود (Dehnavi et al., 2013). در مطالعه‌ای دیگر اثر ضد میکروبی پوشش‌های نانوکامپوزیت LDPE- نقره که به روش اختلاط مذاب تهیه شده بودند بررسی شدند. نتایج نشان داد که خاصیت ضد میکروبی پوشش‌ها وابسته به غلظت

ضخامت ۳۳/۶ میکرومتر به صورت جداگانه از اختلاط مستقیم نمونه‌های مادر حاوی نانوکامپوزیت نقره باگرانول‌های پلی‌اتیلن سبک با دستگاه اکستروژن بادی با قطر اکسترودر ۴۵ میلی‌متر و نسبت طول پیچ به قطر ۲۸ تولید شدند (and Poursharif, 2016). (Peighambardoust).

- آزمون‌های تأیید حضور نانو نقره روی پوشش تولیدی جهت شناسایی ساختار کریستالی نقره از آزمون پراش پرتوی ایکس (X-Ray Diffraction - XRD) استفاده شد. در این آزمون از الگوهای پراش پرتوی $K\alpha$ ، g° لامپ مسی با طول موج $g^\circ\lambda = 1/141$ اندازه گام برابر با $0/02$ درجه، زمان تابش در هر گام برابر با $0/2$ ثانیه از 21 تا 41 درجه و بازه 2θ از 20 تا استفاده شد (Jyoti et al., 2016). همچنین به منظور تعیین خصوصیات نانوذرات پلیمری تولیدی و مرفولوژی و اندازه ذرات از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope:SEM) توسط میکروسکوپ الکترونی مدل (TESCAN MIRA3, Czech Republic) استفاده شد.

- آزمون میکروبی

پوشش‌های تولید شده از نظر ویژگی‌های ضد میکروبی علیه دو پاتوژن غذایی استافیلوکوکوس اورئوس و شریشیا کولای مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا آمپول‌های لیوفیلیزه سویه‌های باکتریایی پس از کشت باکتری در محیط کشت نوترینت برات در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت زمان 24 ساعت، شمارش تعداد باکتری‌ها و تأیید نتایج، با کشت سطحی روی محیط پلیت کانت آگار صورت گرفت. سپس پوشش‌های بسته‌بندی حاوی $17/5$ ، $12/5$ ، $7/5$ و $2/5$ درصد ذرات

استفاده شد. سویه‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و شریشیا کولای (25922) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. طرح مطالعه آینده‌نگر (Cohort) بوده و تمامی آزمون‌ها با دو بار تکرار انجام گردید.

- سنتز نانوذرات نقره

به منظور تولید نانوذرات نقره از روش احیاء شیمیایی (Chemical reduction) استفاده گردید. ابتدا $0/0849$ گرم از نیترات نقره در 500 ml آب مقطر حل شد و به محلول حرارت داده شد تا به جوش آید. سپس 1 گرم احیاکننده (Reducing Agent) تری سدیم سیترات در 100 ml آب مقطر حل و 5 ml تری سدیم سیترات به 500 ml نیترات نقره در حال جوش به صورت قطره قطره اضافه گردید. در مرحله بعد محلول به مدت 2 ساعت در دمای 90 درجه سلسیوس قرار گرفت و در آخر در دمای اتاق سرد شد تا محلولی به رنگ قرمز حاصل گردید (Amany et al., 2012). به منظور تأیید سنتز نانوذرات نقره آزمون UV/Visible در طول موج 550 نانومتر توسط دستگاه (UV/Visible-Lambda 45, USA) روی محلول سنتز شده صورت گرفت.

- تولید پوشش نانوکامپوزیت نقره با درصدهای مختلف

در این مرحله فیلم پلیمری در دستگاه اکسترودر دو ماریچ تهیه و تولید گردید. تهیه گرانول‌های نمونه مادر از جنس پلی‌اتیلن سبک به روش اختلاط مستقیم و با استفاده از اکسترودر دو ماریچ (PE Masterbatch) با قطر اکسترودر 55 میلی‌متر و نسبت طول پیچ به قطر 30 و دمای اکستروژن بین 120 تا 180 درجه سلسیوس اجرا شد. فیلم‌های نانوکامپوزیتی با درصدهای متفاوتی از نانوذرات نقره ($17/5$ ، $12/5$ ، $7/5$ و $2/5$ درصد) و

نانو نقره (در ابعاد ۵×۵ سانتیمتر) به تعداد تیمارها برش داده شده سپس با الکل ۷۰ درصد استریل و پس از اطمینان از خشک شدن پوشش‌ها، به دو فلاسک مجزا حاوی محلول ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت BHI منتقل شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* به‌طور جداگانه تحت شرایط استریل به هر یک از فلاسک‌ها تلقیح شد. تمامی نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و دانسیته نوری (Optical Density: OD) ۱، ۳، ۵، ۸ ساعت پس از تلقیح به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Apel PD-303s در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت به‌دست آوردن جمعیت باکتری‌ها در ساعات مذکور مقدار ۱ سی‌سی از سوسپانسیون تهیه‌شده به ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی اضافه کرده و بعد از تهیه رقت‌های سریال، از رقت موردنظر (۱۰^۵ و ۱۰^۶) مقدار ۰/۱ سی‌سی برداشته و به‌صورت سطحی به‌وسیله میله ال شکل استریل روی محیط نوترینت براث کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، گرمخانه‌گذاری گردید. شمارش تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده در واحد میلی‌لیتر (cfu/ml) انجام گرفت (Hong and Rhim., 2012; Fasihnia et al., 2015).

- آزمون رهایش

اساس مهاجرت استاندارد EN-1186 است که مهاجرت اجزائی از داخل بسته‌بندی پلیمری به داخل ماده غذایی که در تماس مستقیم با پلیمر بسته‌بندی قرار

فرمول (۱)

دارد را نشان می‌دهد (Huang et al., 2011). به‌منظور انجام این آزمون یک سطح مشخص (۱۵×۱۵ cm²) از پوشش نانوکامپوزیت تهیه و با دستگاه دوخت حرارتی به شکل پاکت‌های بسته‌بندی دوخت شدند. سپس با مشابه غذایی (محلول ۳ درصد اسید استیک) پر شدند و در انکوباتور ۴۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. وزن یک کروزه کوآرتزی که برای ۱ ساعت در آن ۱۰۵ درجه سلسیوس قرارگرفته بود پس از خنک شدن و تثبیت وزن در دسیکاتور یادداشت گردید و مشابه غذایی از پاکت‌ها به داخل کروزه ریخته شد. کروزه زیر هود و روی هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس تا زمانی که ۱ میلی‌لیتر مشابه غذایی در کروزه باقی بماند به‌آرامی تبخیر گردید. سپس کروزه از روی هیتر برداشته شد، ۲-۱ ساعت داخل آن قرار گرفت تا ۱ میلی‌لیتر مشابه غذایی باقیمانده نیز تبخیر شود و رطوبت به حداقل میزان برسد سپس وزن کروزه خشک و خنک در دسیکاتور یادداشت گردید. اختلاف وزن دو کروزه، مقدار ماده‌ای است که از داخل بسته‌بندی پلیمری به داخل مشابه غذایی مهاجرت کرده که اسید تبخیر شده بود (فرمول ۱). اختلاف وزن ۲ کروزه برحسب گرم به‌دست آمد. سطحی از پلیمر که در مجاورت مشابه غذایی قرارگرفته بود، اندازه‌گیری و مساحت برحسب سانتی‌متر مربع محاسبه شد (فرمول ۱). واحد g/cm² باید برحسب mg/dm² گزارش گردید (Ahari et al., 2013).

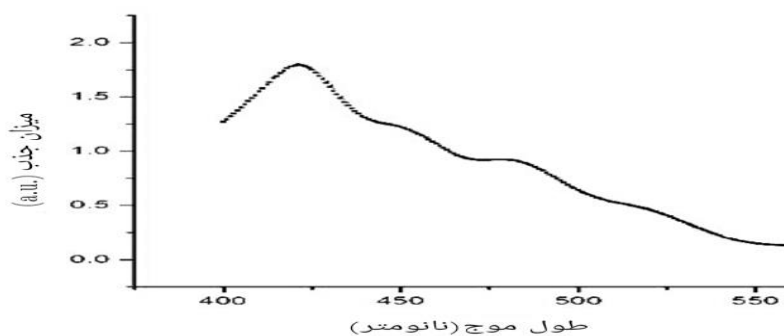
$$\text{میزان مهاجرت} = \frac{\text{وزن اولیه کروزه} - \text{وزن ثانویه کروزه}}{\text{سطح تماس مشابه غذایی با بسته‌بندی}} \times 1.5$$

یافته‌ها

- تأیید سنتز نانوذرات نقره

بررسی‌های به عمل آمده جهت تأیید سنتز نانوذرات نقره با استفاده از آزمون اسپکتروفتومتر (طیف UV-VS)

نشان داد که طول‌موج جذب حداکثر برای نانوذرات نقره ۴۲۰ nm می‌باشد که نمایانگر سنتز نانوذرات نقره می‌باشد (نمودار ۱).



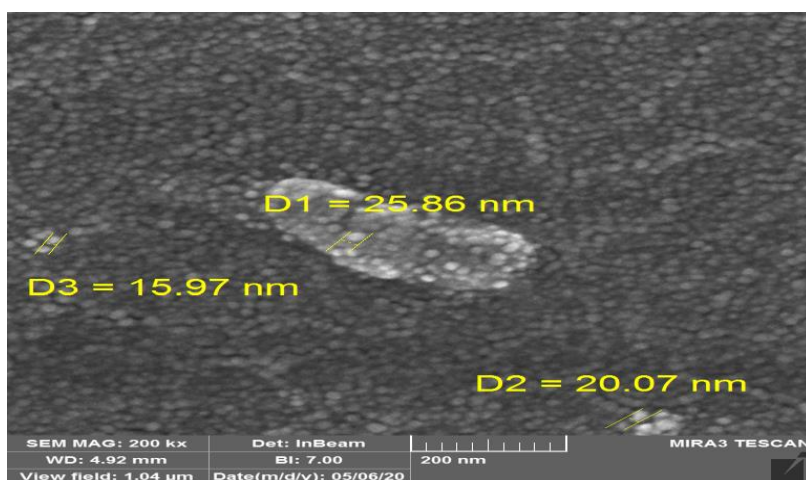
نمودار (۱) - آزمون اسپکتروفتومتر UV-Visible پوشش نانوکامپوزیت ۱۷/۵ درصد

- تأیید حضور نانو نقره بر روی پوشش تولیدی

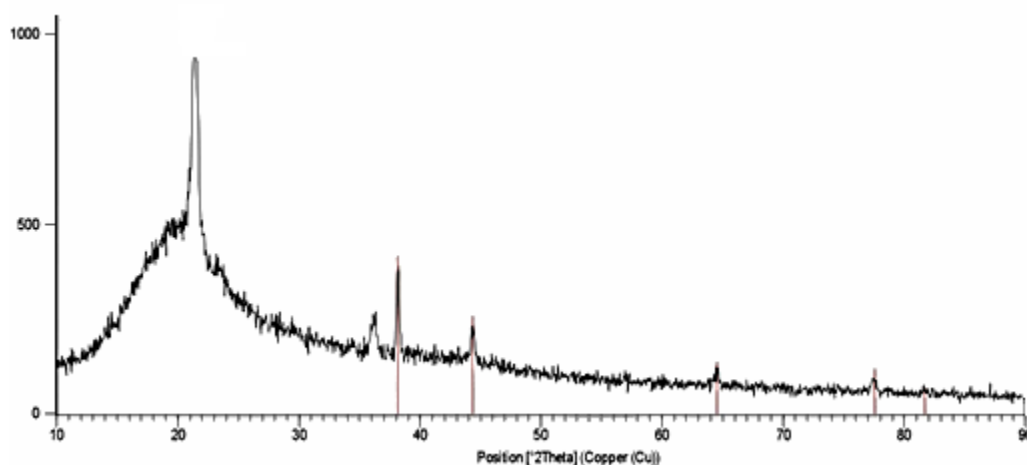
در تصاویر موردبررسی با میکروسکوپ الکترونی SEM همگن بودن سطح پوشش مشهود بود. سایز متوسط تقریبی نانوذرات نقره تولیدی نیز معادل ۲۰ نانومتر بود (شکل ۱).

آنالیز پراش پرتوی ایکس تشکیل کریستال‌های نقره را در نمونه تأیید نمود. پیک‌های قوی و مجزا در زوایای $2\theta = 38.2^\circ$ ، 44.3° و 64.6° و 78.1° دیده می‌شود که به ترتیب با سطوح کریستالی ۱۱۱، ۲۰۰،

۲۲۰ و 311° نقره هم‌خوانی دارد. از آنجائی که قله‌ها کاملاً کشیده بوده و دارای پهنای کم هستند، می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌ها کاملاً بلورین هستند. در نتیجه نانوذرات با ساختار مکعبی مراکز سطحی (Face-FCC) همچنین در نمونه تأیید شدند. همچنین همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است قله 21.5° مربوط به نمونه شاهد (پلی‌اتیلن LDPE) می‌باشد (Jyoti et al., 2016) (نمودار ۲).



شکل (۱) - تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از پوشش نانوکامپوزیت نقره (LDPE) ۱۷/۵ درصد



نمودار (۲) - آزمون مطالعه ساختاری فازی پوشش نانوکامپوزیت ۱۷/۵ درصد با استفاده از پراش پرتوی ایکس (XRD)

- آزمون میکروبی

بیشترین تأثیر و پوشش حاوی ۲/۵ درصد کمترین (بی تأثیر) در مقایسه با سایر پوشش‌ها از خود نشان دادند. همچنین مقایسه تأثیر پوشش‌ها بر روی دو نوع پاتوژن غذایی یعنی *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که تأثیر پوشش‌ها بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بوده است.

نتایج اسپکتروفتومتری سوسپانسیون میکروبی حاوی پوشش‌های نانوکامپوزیت با درصدهای مختلف در ساعات ۱، ۳، ۵ و ۸ ساعت پس از تلقیح در جدول (۱) نشان داده شده است. مقایسه پوشش‌ها با درصدهای مختلف نانو ذرات نقره با نمونه شاهد در ساعت هشتم نشان داد که پوشش حاوی ۱۷/۵ درصد نانو نقره

جدول (۱) - نتایج دانسیته نوری (میانگین) پوشش‌های با درصدهای مختلف نانوذرات نقره

زمان بعد از تلقیح (ساعت)				نوع باکتری و درصد پوشش
۸	۵	۳	۱	
۱/۱۱۸	۰/۷۲۸	۰/۰۴۱	۰/۰۱۱	E / شاهد
۰/۶۸۹	۰/۰۸۲	۰/۰۱۱	۰/۰۰۳	S / شاهد
۱/۰۱۵	۰/۷۱۱	۰/۰۳۵	۰/۰۰۸	E / ۱۷/۵٪
۰/۴۰۱	۰/۰۷۵	۰/۰۱۹	۰/۰۰۵	S / ۱۷/۵٪
۱/۰۶۹	۰/۷۶۸	۰/۰۴۵	۰/۰۰۶	E / ۱۲/۵٪
۰/۴۶۶	۰/۱۰۹	۰/۰۱۵	۰/۰۰۴	S / ۱۲/۵٪
۱/۰۷۷	۰/۸۰۵	۰/۰۵۱	۰/۰۰۵	E / ۷/۵٪
۰/۵۲۴	۰/۱۱	۰/۰۱۵	۰/۰۰۵	S / ۷/۵٪
۱/۱۲۱	۰/۸۲۳	۰/۰۵۹	۰/۰۰۹	E / ۲/۵٪
۰/۶۸	۰/۱۵	۰/۰۱۸	۰/۰۰۸	S / ۲/۵٪

E: اشیریشیا کولای، S: استافیلوکوکوس اورئوس

- آزمون رهایش

در پوشش‌ها بود. به عبارت دیگر پوشش ۱۷/۵ درصد و ۲/۵ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان رهایش را به خود اختصاص دادند.

نتایج آزمون رهایش در جدول (۲) نشان داده شده است. یافته‌ها حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در میزان رهایش پوشش‌های مختلف بود ($P < 0/05$)، به طوری که میزان رهایش ذرات وابسته به درصد نانوذرات نقره موجود

جدول (۲) - نتایج آزمون مهاجرت پوشش‌های با درصدهای مختلف نانوذرات نقره

میزان مهاجرت (ppb)	درصد پوشش نانوکامپوزیت نقره
۴۰/۸۴	٪ ۱۷/۵
۳۲/۴۶	٪ ۱۲/۵
۲۲/۹۳	٪ ۷/۵
۱۴/۳۵	٪ ۲/۵

بحث و نتیجه‌گیری

توجه به اینکه طیف جذبی نانوذرات نقره بین ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر است (Ashraf et al., 2016)، طیف جذب در محدوده ۴۲۰ نانومتر حاکی از سنتز نانوذرات نقره می‌باشد. جهت تعیین شکل نانوذرات از آزمون XRD شد. الگوی XRD چهار پیک مجزا در زوایای ۱۱۱،

یکی از خصوصیات نانوذرات فلزی، خواص نوری آن‌هاست که متناسب با عواملی همچون اندازه، شکل، میزان فاصله نانوذرات از هم و ضریب شکست محیط تغییر می‌کند (Willets and Van Duyne, 2007). با

بیشتری نسبت به باکتری *اشریشیا کولای* دارند. همچنین نتایج حاکی از وابستگی بین درصد نانوذرات نقره استفاده شده و خاصیت ضد میکروبی نانوکامپوزیت‌ها بود. به طوری که در مورد پوشش ۲/۵ درصد هیچ خاصیت ضد میکروبی مشاهده نشد. مقایسه نمونه شاهد و پوشش‌های نانوکامپوزیت دیگر نشان داد که به ترتیب پوشش ۱۷/۵، ۱۲/۵ و ۷/۵ درصد بیشترین خاصیت ضد میکروبی را داشتند. فعالیت ضد باکتریایی بیشتر نانوذرات نقره در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل تفاوت ساختار دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. به این ترتیب که دیواره سلولی باکتری گرم منفی با داشتن ساختار لیپولی ساکارید، لیپید و پروتئین دفاع مؤثرتری در مقایسه با باکتری گرم مثبت که فاقد این ساختار در دیواره سلولی خود می‌باشد، داراست.

هم‌سو با نتایج به دست آمده، مطالعه‌ای در زمینه اثر ضد میکروبی پوشش‌های نانوکامپوزیت علیه باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد. نتایج در ۹۹/۹ درصد کاهش تعداد باکتری‌های زنده را نشان داد. اثر ضد میکروبی پوشش برای *استافیلوکوکوس اورئوس* قابل توجه‌تر بود. نتایج نشان داد که پوشش‌های نانوکامپوزیت تولید شده ظرفیت بالایی برای توسعه بسته‌بندی ضد میکروبی مواد غذایی را داراست (Jo et al., 2018).

در بررسی دیگر اثر استفاده از دو احیا کننده سدیم سیترات و سدیم بوروهیدرات بر روی سایز و خواص ضد میکروبی نانوذرات تولیدی انجام گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از احیا کننده سدیم بوروهیدرات نانوذرات نقره ریزتر (میانگین اندازه نانوذرات ۴ نانومتر)

۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ را نشان داد که این یافته کاملاً با نتایج حاصل از مطالعات سایر محققین هم‌خوانی دارد (Thangaraju et al., 2012; Shankar et al., 2004; Mittal et al., 2013). نبود هرگونه قله اضافی در الگوی پراش پرتو X حاکی از نبود ناخالصی در نانوذرات تشکیل شده است. به نظر می‌رسد اندازه نانو ذرات بر مکانیسم عمل آنتی‌باکتریال آن‌ها مؤثر است (Park et al., 2017) که علت این امر می‌تواند به دلیل افزایش سطح به حجم ذرات نقره و سطح در دسترس بیشتر آن‌ها جهت واکنش یا نفوذ به سلول باکتری باشد. میانگین اندازه نانو ذرات نقره با استفاده از تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ۲۰ نانومتر تخمین زده شد که با نتایج حاصل از پژوهش‌های مشابه سایر محققین (استفاده از احیا کننده سدیم سیترات) در این محدوده هم‌خوانی دارد (Guzmán et al., 2009; Šileikaitė et al., 2006; Suriati et al., 2014; Alzoubi and Bidier, 2013). همچنین در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، قسمت‌هایی به صورت کلوخه‌ای (Agglomerate) دیده می‌شود که به علت هسته‌زایی نیترات نقره در غلظت‌های بالا صورت می‌گیرد و نتیجه آن تولید ذرات بسیار ریز بوده و تراکم بالای این ذرات در کنار هم در تصویر به صورت کلوخه‌ای دیده می‌شود. علت دیگر این امر کند بودن واکنش می‌باشد (Suriati et al., 2014).

در مطالعات مختلف انجام شده بر روی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* نتایج متفاوتی حاصل شده است. در تحقیق حاضر مشخص شد که نانوذرات نقره روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تأثیر به مراتب

وجود ارتباط بین درصد نانو ذرات و میزان رهایش بود، به طوری که با افزایش درصد نانوذرات نقره میزان رهایش افزایش یافت. در تحقیقی مشابه، مهاجرت نانوذرات از ظروف ضد میکروبی که از نانوذرات نقره تهیه شده بود را مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از مشابه‌های غذایی اسید استیک سه درصد و اتانول ۵۰ درصد در زمان‌های متفاوت در ظروف پلاستیکی LDPE و پلی اتیلن که با نانوذرات نقره تلفیق شده بوده استفاده شد. سپس نتایج را با روش ICP-MS و SEM-EDX شد. میزان مهاجرت نانوذرات ۶۷/۳۱ نانوگرم در سانتی متر مربع (پایین تر از حد مجاز) بود. اندازه و شکل نانوذرات برای هر نمونه متفاوت بوده و از ۱۰ تا ۶۰ نانومتر متغیر بود.

در تحقیق حاضر با توجه به قرار گرفتن میزان مهاجرت نانو ذرات نقره از هر چهار نوع پوشش نانوکامپوزیتی در محدوده مجاز (از نظر استانداردهای بین‌المللی)، پوشش ۱۷/۵ درصد به‌عنوان کارآمدترین پوشش انتخاب شد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

و خواص ضد میکروبی بسیار قوی‌تری در مقایسه با سدیم سترات (میانگین اندازه نانوذرات ۴۰ نانومتر) ایجاد می‌کند (Van Dong *et al.*, 2012). هم‌سو با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، در مطالعه‌ای با استفاده از احیاکننده پلی اتیلن گلیکول، نانوذرات نقره با سایز ۵/۵ نانومتر سنتز شدند، سپس با استفاده از روش اختلاط مذاب به پلی اتیلن با دانسیته پایین (LDPE) اضافه شدند. نتایج آزمون میکروبی پوشش‌های نانوکامپوزیت بر روی دو باکتری *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که اثر ضد میکروبی این پوشش‌ها در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشریشیا کولای* است و همچنین وابستگی بین خاصیت ضد میکروبی پوشش‌ها و غلظت نانو ذرات نقره استفاده‌شده مشخص شد. تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد که بسته‌بندی‌های حاوی نانوذرات می‌توانند مدت‌زمان ماندگاری محصولات غذایی را افزایش دهند، اما اگر میزان نانوذرات رهایش یافته به ماتریس غذا از حد معین تجاوز کند، بسته‌بندی مذکور می‌تواند به‌عنوان منبع آلودگی شیمیایی و مسمومیت غذایی تلقی گردد. بنابراین توجه به این نکته در کنار جنبه‌های مثبت پوشش‌های ضد میکروبی می‌بایست مدنظر قرار گیرد.

در این تحقیق اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) در میزان رهایش نانوذرات از پوشش‌های نانوکامپوزیتی با درصدهای مختلف مشاهده شد. همچنین نتایج حاکی از

منابع

- Ahari, H., Anvar, S., Bayat, M., Talakesh, F., Sadeghi, M. and Rahmanna, H. (2013). Survey of shelf life effect on Iranian saffron with nano packaging SNP 103.3 for microbial properties and Nano particle release', *Journal of Comparative Pathobiology*, 39(4): 793-803. [In Persian]
- Alzoubi, F. and Bidier, S. A. (2013). Characterization and aggregation of silver nanoparticles dispersed in an aqueous solution. *Chinese Journal of Physics*, 51(3): 378-387.

-
- Amany, A., El-rab, S. F. G. and Gad, F. (2012). Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity. *Der Pharma Chemica*, 4(1): 53-65.
 - Appendini, P. and Hotchkiss, J. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(2): 113-126.
 - Ashraf, J. M., Ansari, M. A., Khan, H. M., Alzohairy, M. A. and Choi, I. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. *Scientific Reports*, 6: 20414.
 - Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.P. and Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 4(10): 634-641.
 - Bruna, J., Peñalosa, A., Guarda, A., Rodríguez, F. and Galotto, M. (2012). Development of MtCu²⁺/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging. *Applied Clay Science*, 58: 79-87.
 - Dehnavi, A. S., Aroujalian, A., Raisi, A. and Fazel, S. (2013). Preparation and characterization of polyethylene/silver nanocomposite films with antibacterial activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(5): 1180-1190.
 - Del Nobile, M. A., Conte, A., Buonocore, G. G., Incoronato, A., Massaro, A. and Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 93(1): 1-6.
 - Fasihnia, S., Peighamardoust, S. H. and Peighamardoust, S. J. (2015). 'Investigating different properties of anti-microbial nanocomposite packaging films containing organically modified nanoclays', *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 46(1): 77-84.
 - Guzmán, M. G., Dille, J. and Godet, S. (2009). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(3): 104-111.
 - Han, J., Castell-perez, M. and Moreira, R. (2007). The influence of electron beam irradiation of antimicrobial-coated LDPE/polyamide films on antimicrobial activity and film properties. *Lwt-food science and technology*, 40(9): 1545-1554.
 - Hong, S.-I. and Rhim, J.-W. (2012). Preparation and properties of melt-intercalated linear low density polyethylene/clay nanocomposite films prepared by blow extrusion. *Lwt-Food Science and Technology*, 48(1): 43-51.
 - Huang, Y., Chen, S., Bing, X., Gao, C., Wang, T. and Yuan, B. (2011). Nanosilver migrated into food simulating solutions from commercially available food fresh containers. *Packaging Technology and Science*, 24(5): 291-297.
 - Jo, Y., Garcia, C. V., KO, S., Lee, W., Shin, G. H., Choi, J. C., Park, S.-j. and Kim, J. T. (2018). Characterization and antibacterial properties of nanosilver-applied polyethylene and polypropylene composite films for food packaging applications. *Food bioscience*, 23: 83-90.
 - Jokar, M., Rahman, R. A., Ibrahim, N. A., Abdullah, L. C. and Tan, C. P. (2012). Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 719-728.
 - Jyoti, K., Baunthiyal, M. and Singh, A. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3): 217-227.
 - Liu, J., Li, X. and Zeng, X. (2010). Silver nanoparticles prepared by chemical reduction-protection method, and their application in electrically conductive silver nanopaste. *Journal of Alloys and Compounds*, 494(1-2): 84-87.
 - Liorens, A., Lloret, E., Picouet, P. A., Trbojevich, R. and Fernandez, A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 24(1): 19-29.

- Macanás, J., Ruiz, P., Alonso, A., Muñoz, M. and Muraviev, D. N. (2011). Ion-exchange assisted synthesis of polymer-stabilized metal nanoparticles. *Solvent Extraction and Ion Exchange: A Series of Advances*, 20:7-9
- Magana, S., Quintana, P., Aguilar, D., Toledo, J., Angeles-chavez, C., Cortes, M., Leon, L., Freile-Pelegrín, Y., López, T. and Sánchez, R. T. (2008). Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2819(1-2): 192-199.
- Marsh, K. and Bugusu, B. (2007). Food packaging—roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*, 72(3): 39-55.
- Mihaly Cozmuta, A., Peter, A., Mihaly Cozmuta, L., Nicula, C., Crisan, L., Baia, L. and Turila, A. (2015). Active packaging system based on Ag/TiO₂ nanocomposite used for extending the shelf life of bread. *Chemical and microbiological investigations. Packaging Technology and Science*, 28(4): 271-284.
- Mittal, A. K., Chisti, Y. and Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2): 346-356.
- Park, J. C., Jeon, G. E., Kim, C. S. and Seo, J. H. (2017). Effect of the size and shape of silver nanoparticles on bacterial growth and metabolism by monitoring optical density and fluorescence intensity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(2): 210-217.
- Peighambaroust, H. and Poursharif, L. (2016). Quality, sensory and microbial characteristics of fresh orange juice packed in LDPE nanocomposite films incorporating organoclay, modified nanoclays and Ag, Cu and ZnO nanoparticles. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 47(3): 393-403. [In Persian]
- Rhim, J., Wang, L. and Hong, S. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food hydrocolloids*, 33(2): 327-335.
- Roucoux, A., Schulz, J. and Patin, H. (2002). Reduced transition metal colloids: a novel family of reusable catalysts? *Chemical Reviews*, 102(10): 3757-3778.
- Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A. and Sastry, M. (2004). Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(2): 496-502.
- Šileikaitė, A., Prosyčevs, I., Puišo, J., Juraitis, A. and Guobienė, A. (2006). Analysis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution. *Material Science*, 12(4): 1392-1320.
- Suriati, G., Mariatti, M. and Azizan, A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method: Effect of reducing agent and surfactant concentration. *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering*, 10: 1920.
- Tan, S., Erol, M., Attygalle, A., Du, H. and Sukhishvili, S. (2007). Synthesis of positively charged silver nanoparticles via photoreduction of AgNO₃ in branched polyethyleneimine/HEPES solutions. *Langmuir*, 23(19): 9836-9843.
- Tewari, G. and Juneja, V. (2008). *Advances in thermal and non-thermal food preservation*, John Wiley and Sons, pp. 91-98.
- Thangaraju, N., Venkatalakshmi, R., Chinnasamy, A. and Kannaiyan, P. (2012). Synthesis of silver nanoparticles and the antibacterial and anticancer activities of the crude extract of *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Nano Biomedicine and Engineering*, 4(2):89-94.
- Tolaymat, T.M., El Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel, K.G., Luxton, T.P. and Suidan, M., (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408(5): 999-1006.
- Van dong, P., Ha, C. H. and Kasbohm, J. (2012). Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters*, 2(1): 9.
- Varadan, V., Pillai, A., Mukherji, D., Dwivedi, M. and Chen, L. (2010). *Introduction Nanoscience and Nanotechnology in Engineering*, World Scientific Publishing Co, pp. 1-25.

-
- Willets, K. A. and Van duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58: 267-297.
 - Zapata, P. A., Tamayo, L., Páez, M., Cerda, E., Azócar, I. and Rabagliati, F. M. (2011). Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “in situ” polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior. *European Polymer Journal*, 47(8): 1541-1549.
 - Zhou, L., Lv, S., He, G., He, Q. and Shi, B. (2011). Effect of PE/Ag₂O nano packaging on the quality of apple slices. *Journal of Food Quality*, 34(3): 171-176.