

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 آنتی باکتریال زیست تخریب پذیر به روش *Solution Blending* تولید نانوکامپوزیت نقره آنتی باکتریال زیست تخریب پذیر

زهرا طاعنی جفرودی^۱

حامد اهری^{۲*}

dr.h.ahari@gmail.com

تکیسا سهرابی^۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۴

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱۴

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 آنتی باکتریال مناسب و زیست تخریب پذیر به روش محلول اجرا درآمده است.

روش بررسی: به منظور بررسی خواص ضد میکروبی 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 FTIR ، از باکتری استافیلوکوکوس 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 آنتی باکتریال آن با روش Inhibition Zone بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده حاکی از آن است که نانوذرات نقره در غلظت‌های ۵۰، ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی اثر بازدارندگی (MIC) دارد و همچنین در غلظت‌های ۴۰، ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بر میکروارگانسیم‌های یادشده اثر کشندگی (MBC) دارد که بیشترین اثر ضدباکتریایی بر اساس نتایج، بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس 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. * (مسئول مکاتبات)

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

Archive of SID

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 آزمایش‌ها با ۳ تکرار و مقدار P Value محاسبه شده با روش ANOVA با ارزش $P < 0/0001$ 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.

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 jafroudi¹
Hamed Ahari²
dr.h.ahari@gmail.com
Nekisa Sohrabi Haghdoost³

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 reduction 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 bacterium 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 (MIC, MBC). A diameter of 3-5 nm was observed around the silver nanoparticles in the cultures of the mentioned microorganisms and in the test of nanocomposite Inhibition zone, the halo was created based on expected values. The results of the experiments were calculated with 3 replications and the amount of P Value was significant (P<0/0001) by ANOVA method. We used also 3 antibiotics 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 viscoelastic 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

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 شکننده تر می شوند لذا با استفاده از غلظت های کمتر نانو نقره که بتواند از طرفی خاصیت آنتی باکتریال مناسبی را اعمال نماید، می توان به تولید فیلم های نانو کامپوزیتی 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 ضد میکروبی با طیف گسترده، به عنوان یک عامل تقویت کننده در بافت های 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 ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد آلودگی و ضد عفونی کننده استفاده شده اند. بر اساس پژوهش های انجام شده، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره به اندازه و مساحت سطح خاص آنها بستگی دارد و ذرات کوچکتر فعالیت ضد باکتریایی بهتری نشان می دهند و این خصوصیت در انرژی نهفته در اندازه نسبت سطح به حجم آنها مربوط می شود که این امر باعث می شود تا بتواند به راحتی به سطح باکتری ها متصل شوند (۵). این خاصیت همچنین با خواص نوری آنها، که مورد مطالعه گسترده قرار گرفته اند و به روش سنتز، اندازه، شکل، ترکیب پایدار کننده و اندازه آن، و محیط اطراف دی الکتریک آنها وابسته است (۶). احسانی و همکاران (۱۳۹۶) در مطالعات خود از خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره در بسته بندی استفاده کردند و این بسته بندی ها 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 بسته بندی توانایی بیشتری جهت حفظ خصوصیات کیفی توت فرنگی را دارا می باشد و میزان خاصیت بالای ضد میکروبی نانوذرات نقره بر اساس نتایج این مطالعه بر میکروارگانیزم ها به خوبی مشهود است (۷). Salmoni و

در سال های اخیر، انتشار و مقاومت میکروارگانیزم های بیماری زا (باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها) در برابر داروهای ضد میکروبی رایج باعث مشکلات متعدد بهداشتی و غذایی شده است، از این رو استفاده از نانوذرات 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 میکروارگانیزم ها، 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 می تواند یکی از راهکارهای جدید و قابل توجه برای غلبه بر میکروارگانیزم های بیماری زا باشد و می تواند به عنوان گزینه مناسبی برای ضد عفونی کننده ها و عوامل ضد باکتریایی در برنامه های 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 واکنش های شیمیایی انجام شود که محصول آن برای بدن انسان مضر باشد، علاوه بر این تماس مواد غذایی در هنگام پروسه تولید و بسته بندی با سطوح آلوده و یا دارای یون های فلزی، می تواند موجب به خطر افتادن سلامت مصرف کنندگان شوند، لذا استفاده از بسته بندی های مناسب ضد میکروبی بر پایه پلیمرهای زیستی به جهت زیست تخریب بودن و دارا بودن خواص ضد میکروبی مناسب امروزه بسیار مورد توجه است (۳). علاوه بر این تجمع انواع مواد سنتزی غیر قابل تجزیه بخصوص انواع مختلف مواد بسته بندی در اکوسیستم های طبیعی سبب شده است که در سال های اخیر استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر به شدت مورد توجه قرار گیرد. بسته بندی های مورد استفاده بر پایه پلی وینیل الکل و غلظت های مختلفی از نانونقره موجب بهبود خواص مکانیکی از جمله کاهش جذب آب، کاهش نفوذ پذیری به بخار آب، افزایش مقاومت کششی، افزایش خواص

پراکندگی یکنواخت آن‌ها، TEM (شکل ۱) به منظور بررسی ساختار و مورفولوژی نانوپارتیکل و FTIR (نمودار ۴) 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 (جدول ۲). سپس با استفاده از نتایج فوق نانوکامپوزیت نقره آنتی‌باکتریال زیست‌تخریب‌پذیر با روش Solution Blending تولید شده اثر ضد میکروبی آن با روش تست هاله عدم رشد سنجیده شد (جدول ۳) آزمایشات با ۳ تکرار در ۳ سطح کاملاً تصادفی انجام شدند و نتایج با استفاده از روش آماری ANOVA تجزیه تحلیل شده و مقدار $0.0001/P <$ معنادار بوده است (شکل ۱ و ۲).

روش سنتز نانو پار تیکل

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 نهایتاً مشکی تبدیل شد و سپس محلول فوق به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰-۵۰ درجه با دور تند (حدود ۱۵۰۰ rpm) همزده شده و محلول حاصل به صورت کلوخه‌ای ایجاد شد، سپس محلول نیترات نقره (۰/۰۱ M) به صورت قطره‌قطره به محلول سدیم بروهیدرات (۰/۰۲ 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

همکاران (۲۰۱۷)، به بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. باکتری مذکور دارای مقاومت ضد میکروبی بالایی است که تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر را محدود می‌کند، بنابراین می‌توان از نانوذرات نقره به عنوان یک عامل ضد میکروبی بالقوه بر علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد. در این مطالعه به بررسی فعالیت ضد میکروبی 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 بودند و 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 ضد میکروبی می‌تواند بسیار مناسب باشد (۸).

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 ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش احیای شیمیایی، بر باکتری‌های استافیلوکوکوس آئروس، اشرشیا کلی و قارچ کاندیدا آلبیکنز، استفاده آن‌ها جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌ها و متعاقباً کاهش روند فساد مواد غذایی و افزایش کیفیت و عمر نگهداری مواد غذایی و به طور کلی خاصیت میکروب‌کشی آن‌ها را در نانوکامپوزیت ضد میکروبی به روش Solution Blending بررسی کرد.

مواد و روش‌ها

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 ۲۵-۴۰ nm قرار داشتند. (نمودار ۱) و همچنین با روش‌های نانومتریک XRD (نمودار ۲) جهت بررسی ساختار بلوری ماده و UV-VIS (نمودار ۳) جهت بررسی سایز نانوپارتیکل و

دیش ریخته و طی ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس درون آن قرار دادیم تا خشک شود. کامپوزیت حاصل با ضخامت یکسان و انعطاف پذیری مناسب آماده شد.

یافته ها

آنالیز اندازه ذرات نانو با تکنیک پراش دینامیک نوری

DLS

جهت اندازه گیری 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 کلئوئید نانو نقره در سل دستگاه قرار گرفت و پس از آن آنالیز بر روی نمونه مورد نظر انجام شد. برای اندازه گیری ذرات ۵ میلی لیتر از کلئوئید نانونقره درون سل ریخته و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با قدرت لیزر ۶۰ درصد ارزیابی گردید (۹).

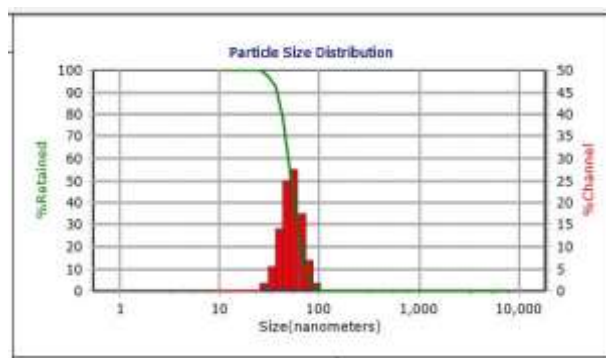
تغییر رنگ داد. غلظت کلئوئید نانو نقره برابر با ۶ mg/ml بود و اندازه ذرات بر اساس تست uv-vis برابر با ۲۵-۴۰ nm بوده و درصد pvp مورد استفاده جهت پایدارکنندگی برابر با ۳ mg/ml بود.

مراحل تولید نانو کامپوزیت به روش Solution Blending:

ابتدا ۵۰۰ میلی لیتر محلول ۲ درصد از پلیمر پلی وینیل الکل (PVA) را تهیه کرده و در ۵ بشر تقسیم نمودیم:

- ظرف ۱- مقدار ۰/۲۸ میلی لیتر
- ظرف ۲- مقدار ۰/۴۱۶ میلی لیتر
- ظرف ۳- مقدار ۰/۸۳۳ میلی لیتر
- ظرف ۴- مقدار ۱/۶۶۶ میلی لیتر
- ظرف ۵- مقدار ۲/۵ میلی لیتر

سپس از محلول نانوذرات نقره سنتز شده با غلظت ۶ میلی گرم بر میلی لیتر 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 میلی لیتر برسد. محلول حاصل را درون پتری



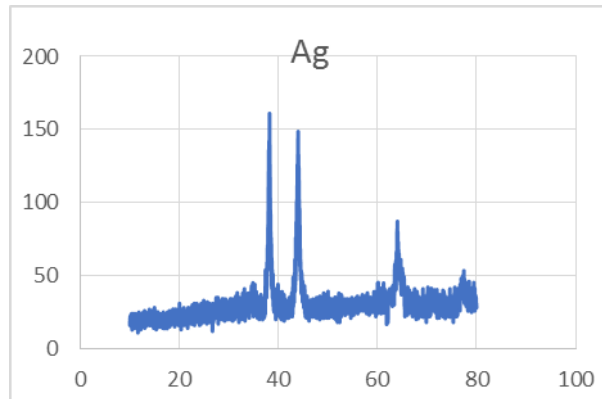
نمودار ۱- نمودار DLS نانو ذرات نقره

Diagram 1. DLS diagram of Silver Nano particles

آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD)

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 جمع آوری و نمودار مربوط به بازتابش آنها رسم شد (۱۰).

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 لاندای برابر با ۵۴/۱ آنگستروم و ولتاژ کاری ۴۰ کیلووات و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام شد و



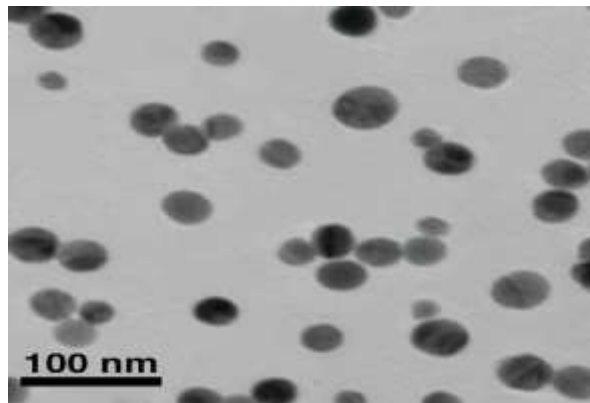
نمودار ۲- نمودار XRD نانوذرات نقره

Diagram 2. XLD diagram of Silver Nano particles

آنالیز پراش میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

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 ۲۵-۴۰ nm با میکروسکوپ الکترونی TEM به دست آمده است.

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 می‌شود. میکروسکوپ الکترونی عبوری همچنین توانایی آنالیز عنصری،



شکل ۱- تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده با NaBH₄

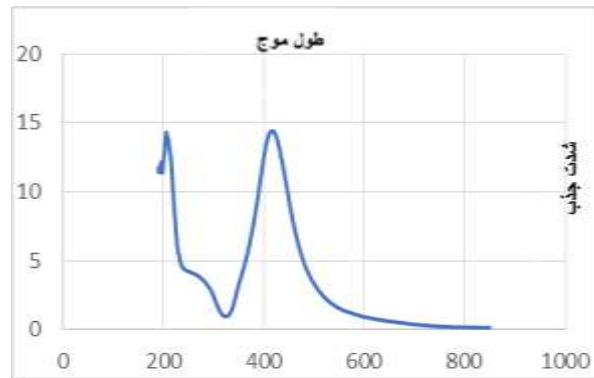
Figure 1. TEM fig of Silver Nano particles which synthesis by NaBH₄

یا جذب ماده در طول موج‌های مختلف در بازه طیفی ۲۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر انجام می‌شود. نتیجه آزمون ذکر شده با نمایش سطح جذب معمولی پلاسمون در طول موج ۴۲۰ نانومتر از نانوذرات نقره تشکیل شده است (۱۰).

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



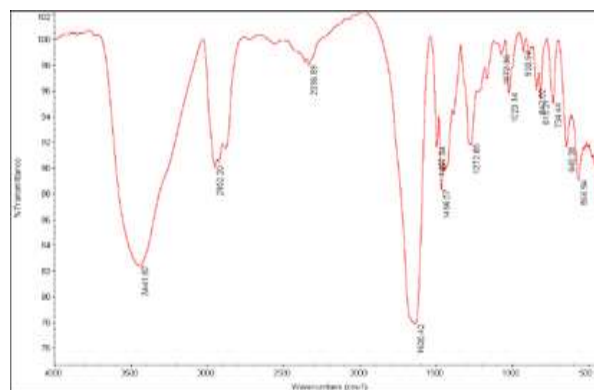
نمودار ۳-UV-VIS نانوذره نقره سنتز شده

Figure 3. UV-VIS diagram of Silver Nano particles

آنالیز طیف‌سنجی با مادون قرمز FT-IR

داده و نمودار مربوط به ارتعاش اتم‌ها و مولکول‌های ماده توسط دستگاه رسم شد. در طیف الکترومغناطیسی ناحیه بین ۴۰۰-۰/۸ μm مربوط به ناحیه مادون قرمز است و ناحیه‌ای که جهت تجزیه شیمیائی مورد استفاده قرار می‌گیرد، بین ۵۰-۰/۸ است (۱۰).

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



نمودار ۴-طیف سنجی FT-IR

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

شد. مقدار ۵ ml از محیط کشت نوترینت برات برای باکتری‌های استافیلوکوکوس آرتوس و اشرشیا کلی و از محیط کشت پوتیتو دکستروز برات برای قارچ کاندیدا 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

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل

غلظت بازدارندگی (MBC) (در مورد قارچ MFC)

بنا به تعریف MIC کمترین غلظتی از فعالیت ضد میکروبی است که باعث بازدارندگی و مهار میکروارگانیسم‌ها شود و MBC کمترین غلظتی از فعالیت ضد میکروبی است که در آن ۹۹/۹ درصد از میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشند. جهت انجام این تست از روش ماکرودایلوشن در لوله‌های گاما استفاده

رشد کامل میکروارگانیسم شده باشد یا کمتر از ۳ کلونی (تقریباً معادل ۹۹-۹۹/۵ درصد 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).

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

جدول ۱- غلظت های محاسبه شده برای نانونقره

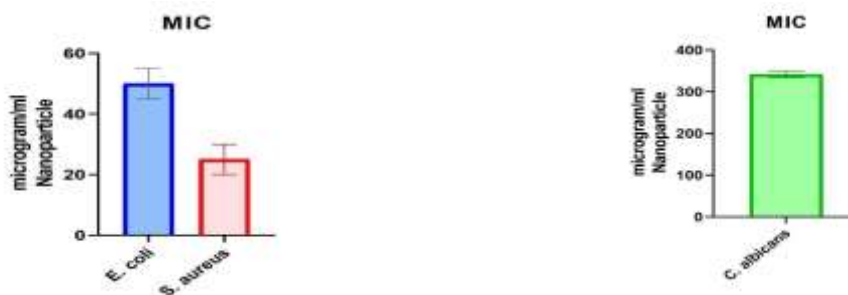
Table 1. Nano-silver estimated concentrations

ردیف	غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر	مقدار بر حسب 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

جدول ۲- 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.Albicans	350 µg/ml	380 µg/ml



شکل ۲- نتایج آماری حاصل از تست MIC انجام شده به روش آماری ANOVA

Figure 2. Statistical findings of MIC test by ANOVA



شکل ۳- نتایج آماری حاصل از تست MBC انجام شده به روش آماری ANOVA

Figure 3. Statistical findings of MBC test by ANOVA

۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کردیم و قطر هاله ایجاد شده اندازه گیری شد.

آزمون آنتی بیوگرام تعیین قطر هاله عدم رشد^۱

جهت تست عملکرد نانوذره نقره از غلظت های ۲۰۰ و ۶۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ 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 کاندیدا آلبیکنز گذاشته شد. نتایج تست در جدول ۳ قابل رویت است.

بعد از ایزوله کردن باکتری ها (استافیلوکوکوس آرئوس، اشرشیا کلی)، مقداری از کلونی میکروارگانسیم های 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، دیسک های بلانک حاوی نانوذرات نقره و دیسک های آنتی بیوتیکی 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 اندازه گیری شد. جهت بررسی عملکرد تست از دیسک آنتی بیوتیک پنی سیلین و آمیکاسین برای باکتری ها 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 باکتری های استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی قرار دادیم و به مدت ۲۴ ساعت در دمای

1- Disk Diffusion

جدول ۳- نتایج تست هاله عدم رشد

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

نام باکتری-قارچ	نانوذره نقره $12 \mu\text{g/ml}$	نانوذره نقره $24 \mu\text{g/ml}$	پنیسیلین	آمیکاسین	ایتراکانازول
E-Coli	mm ۲/۵	mm ۲/۵	mm ۴	mm ۸	-
S.aureus	mm ۲	mm ۳	mm ۴	mm ۷	-
Candidia.Albicans	-	0/5 mm	-	-	-

جدول ۴- نتایج تست هاله عدم رشد نانوکامپوزیت

Table 4. The results of inhibition zone tests in nanocomposite

نام باکتری-قارچ	نانوذره نقره $12 \mu\text{g/ml}$	نانوذره نقره $24 \mu\text{g/ml}$
E-Coli	mm ۳	mm ۴
S.aureus	mm ۴-۲/۵	mm ۳-۵
Candidia.Albicans	mm ۱	mm ۱/۵

بحث

استافیلوکوکوس آرئوس اثر بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیا کلی دارد. عباس زادگان و همکاران (۱۳۹۵)، در تحقیقات خود علت این تفاوت اثر ضد میکروبی 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 نانوکامپوزیت حاوی نانو نقره بر وضعیت میکروبیولوژیکی طولانی مدت زعفران ایرانی (*Crocus sativus* L) پرداختند. در این پژوهش پلیمرهای حاوی نانوذرات نقره به مقادیرهای ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰، ۰ و ۴۰۰ ppm در ۶ بازه زمانی ۱۴، ۲۸، ۴۴، ۹۰ و ۱۸۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند و کاهش بار میکروبی به خصوص در نمونه حاوی ۴۰۰ ppm 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

نانوذرات نقره یکی از متداول ترین نانوذرات قابل استفاده در بسته بندی فعال است و از آن به عنوان مواد ضد میکروبی استفاده می شود و از طریق پوشاندن مواد با نانوذرات نقره و یا قرار دادن یون‌های مثبت نقره (کاتیون نقره) در نانوکامپوزیت‌ها امکان ایجاد بسته بندی ضد میکروبی موثر و امن فراهم می شود. اخیرا بعضی از ترکیبات نقره از سوی سازمان امنیت مواد غذایی اروپا ارزیابی و به عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی برای مواد بسته بندی 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 ضد میکروبی نانوذرات نقره را در پوشش‌های بسته بندی ارزیابی نمودند و کاهش پاتوژن‌ها 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 نانوذرات نقره بر باکتری گرم مثبت

نوع آنتی‌بیوتیک پرداختند. از آنجایی که مقاومت چنددارویی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در برابر داروهای ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 (الگوی برای باکتری‌های گرم منفی) به روش پروتئومیکس بررسی شد و پاسخ پروتئومیکس آن به طور کامل برای روشن کردن مکانیسم ضد میکروبی 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 می‌دهند با افزایش سطح اکسیژن فعال داخل سلولی آسیب اکسیداتیو به غشای سلولی باکتری وارد می‌شود (۱۸). اثرات ضد میکروبی و مکانیسم اثر نانوذرات نقره بر آنها کاملاً مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. 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

میکروارگانیسم‌ها را مهار کنند که مطابق با نتایج تحقیق فعلی می‌باشد. Salomoni و همکاران (۲۰۱۷)، اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه به بررسی فعالیت ضد میکروبی 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 آئوس 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 میلی‌لیتر بر باکتری اشریشیا کلی و غلظت کمتر از آن بر باکتری استافیلوکوکوس آئوس 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 (۶). که همانند مطالعه حاضر نقش ضد میکروبی بالای نانوذرات نقره را نشان می‌دهد و کاملاً مطابق با نتایج به دست آمده با مطالعه حاضر بوده است. Dakal و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعات خود به بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر باکتری‌های مقاوم شده به چند

Solution blending با قابلیت کاهش قابل توجه در هزینه های انجام طرح، از جمله نکات حائز اهمیت در استفاده از این روش می باشد. به طور کلی بر اساس تحقیقات انجام شده در این زمینه، ناحیه مهار نانو ذرات نقره بر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی بیشتر است که نشانگر تفاوت در دیواره سلولی و مقدار پیپتیدو گلیکان موجود در دیواره سلولی آنهاست.

علاوه بر این از آنجایی که مقدار ماده مصرفی از نانوذرات نقره جهت استفاده از خاصیت میکروب کشی، بسیار پائین تر از حد مجاز در استاندارد جهانی می باشد، لذا امکان رهایش و سمیت در ماده غذایی وجود ندارد و از این جهت نانوذرات نقره می توانند جایگزین مناسبی جهت مواد ضد میکروبی 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*

شیمیایی تهیه و برای تایید حضور نانوذرات نقره از طیف سنجی UV-VS استفاده شد. آزمون ذکر شده با نمایش سطح جذب معمولی پلاسما در طول موج ۳۸۰ نانومتر از نانوذرات نقره تشکیل شده است. پوشش روی پلی اتیلن پس از تشکیل نانوذرات انجام شد. نانو ساختار و اندازه ذرات نانوذرات نقره با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تایید شد. فعالیت ضد باکتریایی فیلم نانوکامپوزیتی تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد راندمان ضد باکتریایی مطلوبی در برابر باکتری اشرشیا کلی (ATCC 8739) و استافیلوکوکوس آرتوس (ATCC 6538) وجود دارد (۱۹). که کاملاً 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 اندازه گیری تست های کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی و تست هاله ممانعت از رشد) و با توجه به مطالعات قبل که در خصوص خاصیت آنتی میکروبی نقره و نانوکامپوزیت نقره آنتی باکتریال انجام شده بود و مطابقت نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات انجام شده در قبل، می توان گفت استفاده از نانوذرات نقره در پوشش های بسته بندی مواد غذایی، نه تنها باعث افزایش ماندگاری و طول عمر مفید مواد غذایی می شود، بلکه با بی نیاز نمودن از استفاده از افزودنی های شیمیایی به ماده غذایی و همچنین زیست تخریب پذیر بودن آن و عدم ایجاد صدمه به محیط زیست، می تواند 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 یون های خود می توانند با میکروارگانیسم ها و مولکول های بیولوژیکی خواص بیشتری داشته باشند و خواص ضد باکتریایی خود را موثرتر نشان دهند. از سویی دیگر به دلیل استفاده از روش احیای شیمیایی در سنتز نانوپارتنیکل های نقره، کنترل سایز و اندازه نانومواد سنتز شده و تکرار پذیری آزمایش به راحتی قابل انجام بوده و همچنین تولید نانوکامپوزت نقره به روش

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 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 silver 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.

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.

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.