ارزیابی اثر فتوکاتالیتی فیلم نانو کامپوزیت حاوی نانو ذرات اکسید تیتانیوم و رس بر باکتری *Pseudomonas* spp. و مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* در شرایط درون شیشه‌ای برای بسته‌بندی محصولات تازه باغی

حجت‌اله بداقی
استادیار گروه علوم باغبانی و گیاهپزشکی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود.
*نویسنده مسئول مکاتبات: حجت‌اله بداقی (E- mail: h.bodaghi@yahoo.com)

چکیده

در این پژوهش قابلیت ضدمیکروبی یک فیلم جدید فتوکاتالیست حاوی نانو ذرات رس و اکسید تیتانیوم در ماتریس پلیمری پلی‌اتیلن با چگالی پایین در برابر باکتری‌های *Pseudomonas spp.* و مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* در شرایط درون شیشه‌ای ارزیابی شد. نانوکامپوزیت با اختلاط نانوذرات اکسید تیتانیوم در دو فاز آناتاز و روتایل و نانوذرات رس کلوزیت 20 آ (closite ۲۰A) در ماتریس پلی‌اتیلن با روش مخلوط واکنشی مذاب تهیه شد. کلونی‌های زنده روی فیلم‌های نانوکامپوزیت برای *Pseudomonas spp.* و *Rhodotorula mucilaginosa*، پس از سه ساعت پرتوتابی با نور UVA به ترتیب log CFU/ml 4/23 و log CFU/ml 2/12 کاهش یافت در حالی کاهش کلونی‌های زنده در تیمار با فیلم پلی‌اتیلن بدون نانوذرات برای دو میکروارگانیزم فوق به‌ترتیب log CFU/ml 1/42 و log CFU/ml 0/68 بود. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین اثر ضدمیکروبی با کاربرد توام فیلم‌های نانوکامپوزیت و پرتوتابی UVA حاصل شد. پژوهش حاضر نشان داد که فیلم نانوکامپوزیت تولید شده با روش واکنشی مذاب می‌تواند به عنوان یک روش صنعتی در بسته‌بندی محصولات غذایی به‌کار برده شود.

واژه‌های کلیدی: اکسید تیتانیوم، مونت‌موریلونیت، فتوکاتالیست، فیلم نانوکامپوزیت، اثر ضدمیکروبی

مقدمه

سیستم‌های بسته‌بندی فعال و هوشمند از جمله فن‌آوری‌های رو به رشد محسوب می‌شوند که نقش اساسی در حفظ کیفیت، سلامت و صلابت غذای بسته‌بندی شده و محصولات نوشابه‌ای ایفا می‌کنند. بسته‌های ضدمیکروب نوعی از بسته‌بندی فعال می‌باشند. این فنآوری تلفیقی از برهمکنش بین ماده غذایی، فضای خالی درون بسته و ماده‌ای که بسته از آن ساخته شده، برای حصول نتایج مطلوب می‌باشد [7]. اکسید تیتانیوم (TiO_2) به‌عنوان یک نیمه‌رسانا تحت پرتوتابی UV، جفت الکترون‌های غنی از انرژی تولید کرده که می‌توانند به سطح مولکول اکسیدتیتانیوم انتقال یافته و واکنش‌پذیری با مولکول‌هایی که در سطح اکسیدتیتانیوم جذب شده‌اند را افزایش داده و در نتیجه رادیکال‌های آزاد تولید کند. حاصل واکنش فتوکاتالیستی اکسیدتیتانیوم تولید رادیکال‌های هیدروکسیل (•OH) و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) بر سطح مولکول‌های اکسیدتیتانیوم می‌باشد که باعث اکسیداسیون ترکیبات پلی‌فسفولیپیدهای غیراشباع در غشای سلولی میکروارگانیزم‌ها و در نتیجه غیرفعال‌شدن میکروارگانیزم می‌شود [4، 8]. فتوکاتالیست اکسیدتیتانیوم برای تجزیه آلوده‌کننده‌های آلی و غیرفعال‌کردن طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌ها با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌است [3، 6]. ماتسوناگا و همکاران [5] اولین گزارش را در مورد اثر ضدمیکروبی اکسیدتیتانیوم بر باکتری *Escherichia coli* ارائه دادند. در اغلب مطالعات اثرات ضدمیکروبی فیلم‌های پوشش‌دار شده با پودر اکسیدتیتانیوم مورد بررسی قرار گرفته است. با بررسی که در زمینه مطالعات پژوهشگران قبلی انجام شد هیچ گزارشی در خصوص خواص ضدمیکروبی نانوکامپوزیت‌های پلی‌اتیلن با تراکم پایین و اکسید تیتانیوم-رس با روش مخلوط مذاب یافت نشد. در این مطالعه فیلم نانوکامپوزیت پلی‌اتیلنی با نانوذرات اکسیدتیتانیوم و رس مونت‌موریلونیت با

استفاده از دستگاه اکسترودر و دمنده فیلم تولید شدند. قابلیت ضدمیکروبی فیلم‌های جدید در برابر باکتری‌های .*Pseudomonas* spp و باکتری مزوفیلیک و مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* که از جمله میکروارگانیزم‌های مهم در محصولات میوه و سبزی می‌باشند [9] در شرایط درون‌شیشه‌ای و کاربرد آن در بسته‌بندی مواد غذایی در شرایط واقعی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه فیلم‌های نانوکامپوزیت: نانوکامپوزیت‌های پلی‌اتیلنی -اکسید تیتانیوم/رس با روش مخلوط مذاب تولید شد. پودر اکسیدتیتانیوم حاوی 70 درصد آناتاز و 30 درصد روتایل در مجموع به مقدار 3 درصد، کلوزیت20آ، 5 درصد، مالئیک آنیدرید به عنوان سازگار کننده 3 درصد، گلیسرول 0/5 درصد به منظور چسبیدگی نانوذرات به گرانول‌های پلی‌اتیلن و پلی‌اتیلن به مقدار 88/5 درصد مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط نهایی در دستگاه اکسترودر دو پیچه (شرکت Brabender) جهت انجام فرایند واکنشی مذاب قرار گرفت. مواد به محض خروج از قالب در مجاورت هوا خنک شد. سپس در یک دستگاه خردکن به صورت گرانول در آمدند. گرانول‌های نانوکامپوزیت تولید شده به وسیله دستگاه دمنده فیلم تبدیل به فیلم‌هایی با ضخامت 3 ± 30 میکرومتر شدند.

تهیه محلول‌های میکروارگانیزم و آزمایش فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیت در محیط درون شیشه‌ای:: باکتری‌های .*Pseudomonas spp* و مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* برای ارزیابی قابلیت ضدمیکروبی فیلم‌ها استفاده شد. سلول‌های باکتری‌ها و مخمر هر کدام در بطری‌های شیشه‌ای استریل 300 میلی‌لیتری رشد داده شد. هر بطری حاوی 200 میلی‌لیتر ماده رشد PCB (شرکت Oxoid ایتالیا) متشکل از 5گرم در لیتر تریپتون، یک گرم در لیتر گلوکز و 2/5 گرم در لیتر عصاره مخمر برای رشد باکتری و ماده رشدsabouroud dextrose broth (شرکت Oxoid ایتالیا) متشکل از 5 گرم در لیتر تریپتون، 5 گرم در لیتر bacteriological peptone و 20 گرم در لیتر گلوکز برای رشد مخمر بود. بطری‌های مذکور در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت برای رشد باکتری و 48 ساعت برای رشد مخمر نگهداری شدند. پس از اتمام مدت زمان مذکور برای برداشت سلول‌های رشد یافته عمل سانتریفوژ درg ×10000 به مدت 10 دقیقه انجام شد. سلول‌های مورد نظر دو مرتبه با محلول نمکی استریل شستشو شد. با امولسیون مجدد پلیت‌های میکروبی در محلول نمکی، استوک‌های میکروبی تهیه شدند. مقادیر مساوی از *P. fluorescens* و *P. putida* مخلوط شد تا ترکیب نهایی .*Pseudomonas spp* فراهم گردید. جمعیت اولیه .*Pseudomonas spp* و *Rhodotorula mucilaginosa* به ترتیب در حدود 10^8 CFU/ml و 10^7 CFU/ml بود که با استفاده از روش شمارش کلونی حاصل شد. ارزیابی خواص ضدمیکروبی مطابق با روش Chawengkijwanick و همکاران [1] با کمی تغییرات انجام شد. یک میلی‌لیتر از استوک‌های میکروارگانیزم به درون پتری دیش‌های شیشه‌ای استریل (قطر 6 سانتی‌متر) ریخته شد. فیلم مورد آزمایش (قطر 6 سانتی‌متر) روی محلول درون پتری‌دیش قرار گرفت. از فیلم‌های پلی‌اتیلنی خالص به عنوان شاهد استفاده شد. عمل پرتوتابی توسط 6 لامپ 8 واتی درون یک اتاقک کوچک به مدت 3 ساعت صورت گرفت. نمونه‌برداری و کشت محلول‌های حاوی میکروارگانیزم هر 60 دقیقه پس از پرتوتابی انجام شد. برای این کار هر سری پتری‌دیش از اتاقک پرتوتابی خارج و آزمایش میکروبیولوژی انجام می‌شد. 9 میلی‌لیتر از محلول نمکی استریل به هر پتری‌دیش افزوده شد و عمل اختلاط به مدت 180 ثانیه صورت گرفت. از هر نمونه پتری‌دیش 1 میلی‌متر برداشت شد و با افزودن به محلول نمکی به غلظت‌های 1/10، 1/100، 1/1000، 1/10000 رقیق‌سازی شد. 0/1 میلی‌لیتر از محلول استوک و محلول‌های رقیق شده بر روی پتری‌دیش‌های محیط کشت برای باکتری و مخمر پخش شد. محیط کشت‌های باکتری (PAB) و محیط کشت‌های مخمر

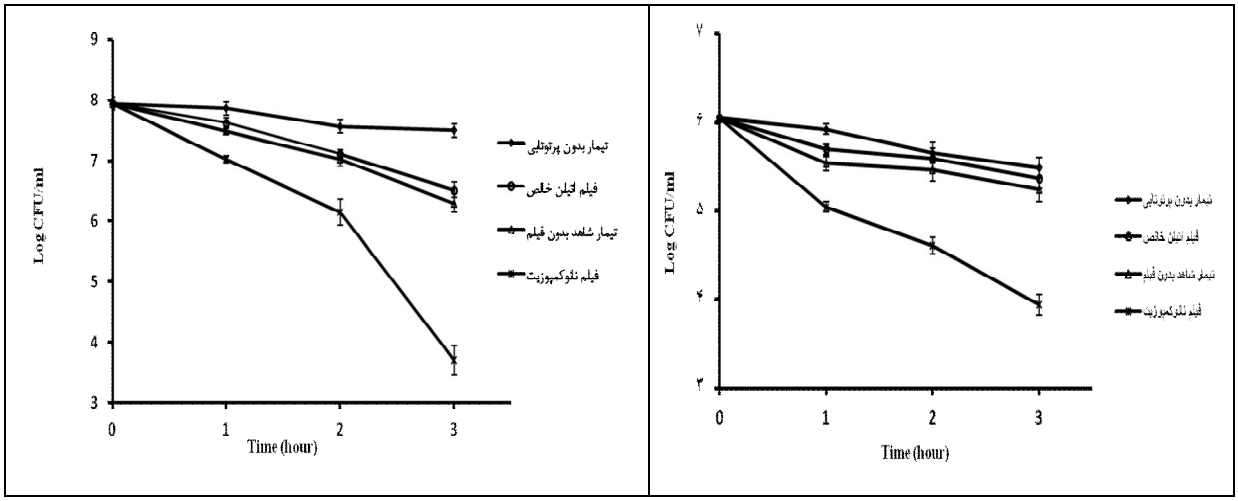
(SAD) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت قرار داده شدند و سپس واحدهای کلونی تشکیل شده (CFU) شمارش شدند. تعداد کلونیهای باکتری و مخمر به صورت CFU/g برای هر میوه شمارش شد.

نتایج و بحث

Pseudomonas spp.: با توجه به نمودار شکل (1، چپ) تعداد سلول باکتری زنده در نمونه بدون پرتوتابی کاهش معنی‌داری نشان ندادند که این نتیجه با نتایجی که در مطالعات قبلی توسط Chawengkijwanick و همکاران روی *E. coli* گزارش شده بود مطابقت دارد [10]. این یافته نشان می‌دهد که فیلم نانوکامپوزیت به تنهایی و بدون پرتوتابی قادر به غیر فعال‌کردن میکروارگانیزم نبوده است. پس از قرارگیری فیلم‌های نانوکامپوزیت اثر فتوکاتالیتی این فیلم‌ها در غیر فعال‌کردن میکروارگانیزم مشاهده شد. از نتایج آزمایش چنین استنباط می‌شود که بین زمان‌های مختلف پرتوتابی بر غیر فعال‌کردن میکروارگانیزم اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود. در تیمار فیلم‌های نانوکامپوزیت تعداد سلول‌های زنده کمتر بود در حالی که در فیلم‌های کنترل (پلی‌اتیلن خالص و تیمار پرتوتابی شده فاقد فیلم) به ترتیب 6/52log CFU/ml و 6/3 log CFU/ml بود. به بیان دیگر می‌توان گفت تعداد سلول‌های زنده پس از 3 ساعت پرتوتابی به فیلم‌های نانوکامپوزیت و فی‌لم پلی‌اتیلن خالص به ترتیب تا 4/23 log CFU/ml و 2/12 log CFU/ml کاهش یافتند. این نتایج با نتایج Chawengkijwanick و همکاران[1] که کاهش 3 log CFU/ml و ۱ log CFU/ml را به ترتیب برای فیلم‌های پلی‌پروپیلن پوشش‌دار با اکسیدتیتانیوم و فیلم غیر پوشش‌دار گزارش کردند، مطابقت دارد. این نتایج، غیر فعال شدن *Pseudomonas* spp. را تحت نور UVA تایید می‌کند. در واقع پس از جذب نور UVA توسط فیلم نانوکامپوزیت در طول موج بیش از 250 نانومتر، رادیکال‌های هیدروکسیل و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر که در سطح فیلم تولید می‌شوند نقش اساسی در از بین بردن میکروارگانیزم‌ها ایفا می‌کنند [8]. به هر حال نتایج ما نشان داد که کاربرد فیلم نانوکامپوزیت توام با پرتوتابی اثر بیشتری در از بین بردن میکروارگانیزم نسبت به پرتوتابی تنها داشته است همچنان که در گزارشات گذشته نیز مشاهده شد [1، 10].

Rhodotorula mucilaginosa: سلول‌های زنده مخمر در تمام نمونه‌های فیلم بدون پرتوتابی کاهش معنی‌دار نشان ندادند (شکل 1، راست). در آغاز آزمایش تعداد سلول زنده مخمر 6/06 CFU/ml بود. پس از 3 ساعت پرتوتابی این مقدار به 3/94 CFU/ml، 5/25، و 5/38 به ترتیب برای تیمارهای فیلم نانوکامپوزیت، فیلم پلی‌اتیلن خالص و تیمار محلول پرتوتابی شده بدون فیلم (شاهد) رسید. انجام فعالیت ضدمیکروبی برای هر کدام به ترتیب 2/12 CFU/ml، 0/81و 0/68 بود.در واقع می‌توان گفت نسبت زنده‌مانی سلول‌های مخمر برای فیلم نانوکامپوزیت 65 درصد و برای فیلم پلی‌اتیلن خالص 89 درصد بوده است.

شکل1 – منحنی کلون‌های تشکیل شده از باکتری .*Pseudomonas spp* (سمت راست) و *Rhodotorula mucilaginosa* (سمت چپ) پس از سه ساعت پرتوتابی با نور ماورای بنفش



نتایج مشابه در مورد فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های پلی‌پروپیلن ایزوتاکتیک با درصدهای متفاوت اکسیدتیتانیوم علیه میکروارگانیزم‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterococcus faecalis* گزارش شده است [2].

در این پژوهش تولید یک فیلم نانوکامپوزیت پلی‌اتیلن اکسید تیتانیوم-رس با روش مخلوط واکنشی مذاب همراه با ویژگی‌های ضدمیکروبی برای مصارف بسته‌بندی محصولات تازه باغی ارائه شد. توانایی میکروب‌کشی این فیلم نانوکامپوزیت بدون در نظر گرفتن نوع میکروارگانیزم پس از 3 ساعت پرتوتابی با نور UVA حاصل شد. این نتایج یک فن کارآمد برای توسعه فیلم‌های نازک فتوکاتالیستی را به عنوان یک سیستم بسته‌بندی فعال اراده می‌دهد. این فیلم ممکن است در محدوده گسترده‌ای از کاربردهای غذایی مورد استفاده قرار گیرد و به‌ویژه می‌تواند توجه زیادی را به عنوان بسته‌بندی فعال برای افزایش ماندگاری و عمر قفسه‌ای محصولات غذایی تازه به‌خود جلب کند.

منابع

[۱] Chawengkijwanich, C., & Hayata, Y. (۲۰۰۸). Development of TiO۲ powder-coated food packaging film and its ability to inactivate Escherichia coli in vitro and in actual tests. *International Journal of Food Microbiology*, ۱۲۳, ۲۸۸–۲۹۲.

[۲] Kubacka, A., Ferrer, M., Cerrada, M. L., Serrano, C., Sanchez-Chaves, M., Fernandez-Garcia, M., et al. (۲۰۰۹). Boosting TiO۲-anatase antimicrobial activity: Polymer-oxide thin films. *Applied Catalysis B: Environmental*, ۸۹, ٤٤١–٤٤٧.

[۳] Maneerat, C., & Hayata, Y. (۲۰۰٦). Antifungal activity of TiO۲ photocatalysis against Penicillium expansum in vitro and in fruit tests. *International Journal of Food Microbiology*, ۱۰۷(۲), ۹۹–۱۰۳.

[٤] Maness, P. C., Smolinski, S., Blake, D. M., Huang, Z., Wolfrum, E. J., & Jacoby, W.A. (۱۹۹۹). Bactericidal activity of photocatalytic TiO۲ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied Environmental Microbiology*, ٦٥ (۹), ٤۰۹٤–٤۰۹۸.

[٥] Matsunaga, T., Tomada, R., Nakajima, T., & Wake, H. (۱۹۸٥). Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, ۲۹ (۱–۲), ۲۱۱–۲۱٤.

[٦] Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., Nakamura, N., & Komine, T. (۱۹۸۸). Continuous-sterilization system that uses photosemiconductor powders. *Applied Environmental Microbiology*, ٥٤ (٦), ۱۳۳۰–۱۳۳۳.

[۷] Rooney, M. L. (۱۹۹٥). Active Food Packaging. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional.

[۸] Saito, T., Iwase, T., & Morioka, T. (۱۹۹۲). Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO۲ on mutants streptococci. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, ۱٤(٤), ۳٦۹–۳۷۹.
[۹] Tournasa, V. H., Heeresb, J., & Burgessb, L. (۲۰۰٦). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Short Communication Food Microbiology*, ۲۳, ٦۸٤–٦۸۸.
[۱۰] Yu, B., Leung, K. M., Guo, Q., Lau, W. M., & Yang, J. (۲۰۱۱). Synthesis of Ag–TiO۲ composite nano thin film for antimicrobial application. *Nanotechnology*, ۲۲, ۱۱٥٦۰۳(۹ pp).

Evaluation of the photocatalytic effect of a nanocomposite film containing TiO_2 and clay nanoparticles for fresh horticultural products packaging by *in vitro* test

H. Bodaghi[۱*]
۱- Dept. of Horticultural Sciences and Plant Protection, Shahrood University of Technology, Shahrood – Iran
[*]Corresponding author: H. Bodaghi (E- mail: h.bodaghi@yahoo.com)

Abstract
The ability to inactivate *Pseudomonas spp.* and *Rhodotrola mucilaginosa* by a photocatalyst thin film, obtained using of TiO_2 and clay nanoparticles by melt blending method, was evaluated in this study. No antimicrobial activity was observed on neat low density polyethylene (LDPE) film. The number of surviving cell of Pseudomonas *spp.* and *Rhodotrola mucilaginosa* were decreased by ٤,۲۳ and ۲,۱۲ log CFU/ml on nanocomposite film after ۳ h of UVA illumination, respectively. The survival colonies degradation of two microorganism on neat LDPE film under UVA irradiation were ۱,٤۲ and ۰,٦۸ log CFU/ml, respectively. The greatest effects were recorded by combing UVA illumination and active film. This study proved that the photocatalyst thin film prepared by extrusion could be effectively used in fruit packaging applications.