DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3596.1862

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۷، شماره ۲، صفحه ۲۲۱-۲۱۱، زمستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی کاغذهای پوشش دهی شده و تیمار شده با نانومواد اکسید روی و کریستال سلولز

بردیا صدیفی[۱]، نورالدین نظرنژاد[۲*]، سید حسن شریفی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. دانشیار، گروه مهندسی چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. استادیار، گروه مهندسی چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱۷، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۷/۵/۲۲، تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۳۱)

چکیده

نانومواد زیستی و معدنی پایدار نظیر نانوکریستال سلولز و نانواکسید روی به‌دلیل خواصی همچون زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و ایمن بودن جهت تولید محصولات مختلف مورد توجه محققان قرار گرفته است. پلی‌کاپرولاکتون نیز که یکی از مهم‌ترین پلیمرهای تولید شده در پتروشیمی است، به‌دلیل خاصیت تجزیه‌پذیری آسان در طبیعت به‌طور گسترده استفاده می‌شود. در این پژوهش اثر کاغذهای پوشش دهی شده با پلی‌کاپرولاکتون (PCL) ۱۰ ٪، نانوکریستال سلولز (NCC) ۴ و ۶٪ و نانواکسید روی (ZnO) ۳٪ و ترکیب آن‌ها، همچنین کاغذهای تیمار شده با تیمار نانومواد اکسید روی ۳٪ و کریستال سلولز ۴ و ۶٪ بر روی خواص ضدمیکروبی بررسی شد. آزمون ضدمیکروبی کاغذها با دو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت آگار مولر هینتون و به روش انتشار دیسک انجام شد. نانوکریستال سلولز تهیه شده در آزمایشگاه، به‌وسیله دستگاه‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) و پراش پرتو ایکس (XRD)، مورد مطالعه قرار گرفتند. بررسی تصاویر و طیف‌ها نشان داد که کریستال سلولز تولید شده در حد نانو بوده است. نتایج نشان داد که کاغذهای پوشش دهی شده با پلی‌کاپرولاکتون ۱۰٪– نانواکسید روی ۳٪ در مقابل کاغذهای پوشش دهی شده با پلی‌کاپرولاکتون ۱۰٪- نانوکریستال سلولز ۴ و ۶٪ و ترکیب‌های سه‌گانه نانومواد اکسید روی ۳٪ و کریستال سلولز ۴ و ۶٪ با پلی‌کاپرولاکتون ۱۰٪ قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تری داشتند. کاغذهای ساخته شده با تیمار ترکیبی نانومواد اکسیدروی ۳٪ و کریستال سلولز ۶٪ قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به کاغذهای ساخته شده با تیمار نانواکسید روی ۳٪ داشتند. همچنین خواص ضدمیکربی کاغذهای پوشش دهی شده بیشتر از کاغذهای تیمار شده بوده است.

واژه‌های کلیدی: پلی‌کاپرولاکتون، خواص ضدمیکروبی، نانواکسید روی، نانوکریستال سلولز.

* نویسنده مسئول: nazarnezhad91@gmail.com

۱. مقدمه

افزون بر استفاده مستقیم از زیست پلیمرها برای تولید بسته‌بندی‌های زیستی، ممکن است از ترکیب زیست پلیمرها با پلیمرهای سنتزی نیز استفاده شود. نانوکامپوزیت‌ها در راس ابداعات فناوری نانو مرتبط با صنعت بسته‌بندی مواد غذایی قرار دارند. استفاده از پرکننده‌های نانومتری سبب به وجود آمدن نانوکامپوزیت‌های زیست تخریب‌پذیر با مشخصه‌ها و ویژگی‌هایی مشابه با پلاستیک‌های معمولی می‌گردد. پلیمرهای طبیعی مورد استفاده در ساخت بسته‌بندی‌های زیست تخریب‌پذیر در دو گروه طبقه‌بندی می‌گردند: پلیمرهای طبیعی مانند پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها، پلیمرهای ترکیبی مانند پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و پلی لاکتیک اسید. اگر چه بسیاری از پلاستیک‌های تولید شده در پتروشیمی زیست تخریب‌پذیر نیستند، اما تعداد معدودی از این پلیمرها به راحتی در طبیعت تجزیه خواهند شد. از جمله مهم‌ترین پلیمرهای تولید شده در پتروشیمی که به راحتی در طبیعت تجزیه می‌شوند به PCL می‌توان اشاره کرد. این پلیمر، یک پلی‌استر شبه بلوری و خطی با قابلیت بلورینگی بالا و از خانواده‌ی پلی‌استرهای آلیفاتیک زیست تخریب‌پذیر گرمانرم با توالی واحدهای متیلن بین گروه‌های استری است که با واکنش پلیمر شدن حلقه گشای مونومر ε –کاپرولاکتون در مجاورت کاتالیزور اکتوات قلع تهیه می‌شود. همچنین، این پلیمر با نفوذپذیری مناسب دارو و عدم سمیت در بدن پتانسیل خوبی در مصارف پزشکی و داروسازی دارد و میکروارگانیسم‌های زیادی قادر به تخریب آنزیمی آن هستند [۱].

یکی از نانو پرکننده‌هایی که اخیرا به‌دلیل خواص مکانیکی و فیزیکی مطلوب مورد توجه قرار گرفته نانوکریستال سلولز (NCC) می‌باشد. این نانوماده نوعی پلیمر طبیعی با خواص زیستی، قوی‌تر از استیل، سبک وزن و بادوام است و می‌تواند به‌عنوان عامل تقویت کننده برای بهبود خواص پلیمرها استفاده شود. این پلیمر نوعی بلوک ساختمانی پایه‌ای از سلولز است که فراوان‌ترین پلیمر آلی روی زمین بوده و از دو ساختار کریستالی و آمورف تشکیل شده و قابل بازیافت می‌باشد. NCC را می‌توان از الیاف پنبه یا خمیر حل شونده، به کمک روش هیدرولیز اسیدی تولید کرد. این ماده به‌دلیل توانایی تشکیل شبکه و فیلم خوب، به‌عنوان تقویت کننده عالی برای محصولات پلیمری مورد توجه قرار گرفته است [۲].

عوامل ضدمیکروبی اهمیت زیادی در صنایع مختلفی مثل تصفیه آب، بسته‌بندی غذایی و داروسازی دارد. استفاده از مواد غیرآلی مانند اکسیدهای فلزی در حال افزایش است [۳، ۴]. نانوذرات اکسید روی، فیلرهای معدنی خوبی هستند که علاوه‌بر ارزانی و غیر سمی بودن، به‌دلیل قابلیت‌هایی همچون شفافیت در ناحیه مرئی، جذب نور مناسب و خواص فیزیکی و شیمیایی پایدار به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند [۵]. این ترکیب‌های غیرآلی فعالیت‌های قوی ضدمیکروبی در غلظت‌های پایین نشان می‌دهند و در شرایط سخت بسیار با ثبات‌تر هستند [۳-۶].

یکی از زمینه‌های تحقیقات گسترده در کاربرد نانوذرات معدنی، بررسی امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان ماده ضد باکتری برای کنترل میکروارگانیسم‌ها است. در سال‌های اخیر ساخت کاغذها، نانوکامپوزیت‌ها و فیلم‌های ضدمیکروبی حاوی نانوذرات برای حفاظت سطوح، از طریق جلوگیری از رشد و انتقال میکروارگانیسم‌ها به‌دلیل خصوصیات فیزیکی، زیستی و شیمیایی آن‌ها گسترش یافته است. نانوذرات (ذرات کمتر از ۱۰۰ nm) نسبت به ذرات بزرگ‌تر (ذرات میکرونی) به‌دلیل این‌که نسبت بیشتر سطح به حجم، بسیار فعال‌تر هستند و خصوصیات فیزیکی، زیستی و شیمیایی آن‌ها نسبت به ذرات میکرونی خیلی بهتر است؛ و برای ساخت کاغذ بسته‌بندی ضدمیکروبی مناسب‌تر هستند [۷].

در حال حاضر استفاده از نانوذرات به‌عنوان یک عامل ضدباکتری در فرمولاسیون‌های مواد ضدمیکروبی جدید در مقیاس نانو و میکرو در مقابل میکروارگانیسم‌های گرم منفی مانند *اشرشیاکلی* و گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد توجه بسیاری قرار گرفته است [۸].

در صنایع غذایی میکروب‌های متعددی سبب آلوگی و ایجاد سموم در مواد غذایی می‌شوند. از جمله بیماری‌های باکتریایی منتقله توسط مواد غذایی می‌توان به بوتولیسم، کامپیلوباکتریوزیس، عفونت *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* سالمونلوزیس و شیگلوزیس اشاره نمود. از سال‌های گذشته توجه بسیاری از پژوهش‌ها و تا حد زیادی صنایع غذایی به این باکتری‌ها جلب شده است [۹]. این باکتری‌ها در گزارش‌های فراوانی از فراورده‌های لبنی، گوشتی، غذاهای نمکی و تخمیری، آبمیوه‌ها، سبزیجات و حتی غذاهای پخته و نیمه‌پز جداسازی شده است [۱۰]. همچنین به علت گسترش روز افزون

بیماری‌های عفونی و مسمومیت غذایی ایجاد شده توسط باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* به خاطر ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف در این باکتری‌ها، محققین به فکر استفاده از مواد ضدمیکروبی جدید علیه این دو باکتری افتاده‌اند [۱۱].

به‌طورکلی، اکسید روی زنده مانی باکتری را کاهش می‌دهد؛ عامل اصلی فعالیت‌های ضدمیکروبی می‌تواند تولید پراکسید هیدروژن و تجمع ذرات روی بر سطح باکتری به‌دلیل نیروی الکترواستاتیکی باشد. با این حال، انواع اکسیژن واکنشگر تولید شده روی سطح ذرات، انتشار یون روی، اختلال در غشاء و فرایندهای غشایی و همچنین نانوذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی باشد [۱۲].

شان شان و همکاران نشان دادند که ZnO پخش خوبی در ماتریس پلیمر دارد و در حضور ۲/۵٪ وزنی ZnO ، فیلم نانوکامپوزیتی ساخته شده، بهترین خواص ضدمیکروبی در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* نشان داد [۱۳]. نتایج پژوهشی از عبداللهی و همکاران نشان داد که ذرات ZnO به‌خوبی بر روی فیلم‌ها پخش شده و دارای فعالیت ضدمیکروبی در مقابل باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیاکلی* دارند [۱۴]. لی و همکارانش در سال نشان دادند که، ذرات اکسید روی بخوبی بر روی فیلم‌های پلاستیک پی وی سی چسبیده و فعالیت ضدمیکروبی در مقابل *استافیلوکوکوس* و *اشرشیاکلی* انجام می‌دهند و اعلام کردند که فعالیت ضدمیکروبی مشخصه‌ای از ZnO است [۱۵].

هدف از این پژوهش ساخت کاغذهای بسته‌بندی ضدمیکروبی می‌باشد. جهت این کار ابتدا الیاف لیگنوسلولزی توسط ترکیبی از نانومواد ZnO، NCC تیمار شدند و از الیاف تیمار شده کاغذ تهیه شد سپس تاثیر خواص ضدمیکروبی با دو باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیاکلی* بر روی این کاغذها با کاغذهای پوشش دهی شده با ترکیب نانومواد ZnO، NCC و پلیمر PCL مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

پلی‌کاپرولاکتون (PCL) با وزن مولکولی ۸۰۰۰۰ g/mol و دانسیته ۱/۲ g/cm^3 از شرکت زیگما آلدریج و ZnO با اندازه ذرات متوسط ۲۵ nm از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان خریداری شدند. اسید استیک به‌عنوان حلال با دانسیته ۱/۰۵۱۱ g/cm^3 در دمای ۲۰°C و نقطه جوش ۱۱۸/۳ -۱۱۸/۸ °C مورد استفاده قرار گرفت. NCC از آلفا سلولز در آزمایشگاه تهیه شد. خمیر کاغذ از کارخانه چوب و کاغذ مازندران تهیه شد. پلی‌اکریل آمید کاتیونی با وزن مولکولی هفت میلیون g/mol و مقدار ماده جامد ۲۵٪ از کارخانه چوب و کاغذ مازندران تهیه شد. پودر محیط کشت آگار مولر هینتون از شرکت مرک و کلرید باریم با وزن مولکولی ۲۰۸/۲۳g/mol و دانسیته ۳/۸۵۶ g/cm^3 در دمای ۲۰°C و نقطه ذوب ۹۶۲ °C از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲.۲. تست‌های تعیین مشخصات نانوکریستال سلولز

۱.۲.۲. پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM)

به‌منظور بررسی تولید NCC از آلفا سلولز لینتر پنبه از آزمونگر XRD ساخت شرکت Philips مدل PW 1730 استفاده شد که پرتوهای بازتابشی از نمونه، در دمای محیط و در محدوده زاویه ۲θ =۸۰-۱۰° جمع آوری و نمودار مربوط به شدت بازتابش آن‌ها رسم شد. همچنین جهت بررسی اندازه نانوکریستال‌های سلولزی پس از استخراج و هیدرولیز اسیدی از آزمونگر FESEM ساخت شرکت Tescan مدل mira 3 جمهوری چک استفاده گردید.

۳.۲. تهیه محلول‌های پوشش دهی و روش پوشش دهی کاغذها

محلول ۱۰ درصد وزنی PCL از حل نمودن این پلیمر در استیک اسید ۸۰ ٪ توسط همزن مغناطیسی با قدرت ۴۰۰ rpm به مدت ۲۰ min به‌دست آمد؛ محلول سه درصد وزنی ZnO از حل نمودن آن در استیک اسید ۸۰٪ توسط دستگاه فراصوت در مدت ۱ min به‌دست آمد و محلول ۴ و ۶ درصد وزنی NCC به مدت ۳ min در معرض امواج فراصوت قرار گرفت تا محلول یکنواختی ایجاد شود (روش ساخت NCC مطابق با کار صورت گرفته در پژوهش پیشین می‌باشد) [۲]. در اختلاط سه‌گانه مواد، محلول‌های نانومواد به محلول PCL افزوده شد و به

مدت h ۱ در دمای °C ۳۵ و با شدت rpm۴۰۰ هم‌زده شدند. در اختلاط دوگانه مواد، ابتدا محلول‌های ZnO و NCC به‌صورت جداگانه به محلول PCL افزوده شده و سپس به مدت h ۱ و در دمای °C ۳۵ و با شدت rpm ۴۰۰ هم‌زده شدند. کاغذهای دست‌ساز از الیاف بکر سوزنی برگ پالایش شده، با وزن پایه g/m^2 ۱۲۰±۵ طبق استاندارد TAPPI T205 SP- 95 ساخته شد و محلول‌های پوشش دهی بر روی کاغذها اعمال گردید. جهت این کار، مقدار mL۲۰ از محلول پوشش دهی که برای هر کاغذ آماده شده است، به‌طور یکنواخت بر روی هر کاغذ با ابعاد cm^2 ۱۵×۱۵ پخش شد. سپس نمونه‌ها توسط گیره در یک قاب چوبی مهار شده و در نهایت هوا خشک شدند. وزن هر کاغذ دست‌ساز پس از پوشش دهی بین ۲/۲ تا g ۲/۷ بوده است.

۴.۲. روش تیمار کاغذ با نانومواد

کاغذهای دست‌ساز از خمیر با تیمارهای مختلف و با گراماژ g/m^2 ۱۲۰±۵، مطابق با استاندارد TAPPI T205 SP-95 ساخته شد. بدین ترتیب که حجم مناسبی از این سوسپانسیون حاوی g ۲/۴ خمیر کاغذ را به داخل استوانه مدرج ریخته و در نهایت محلول حاصل با استفاده از دستگاه ساخت کاغذ بر روی توری فلزی دستگاه شکل گرفت. عمل پرس تحت فشار psi ۵۰ و طی مدت min ۷ انجام گرفت. پس از اعمال فشار، ورقه‌های خشک کن از آن‌ها جدا گردید. البته جهت تیمار الیاف با مواد ضدمیکروبی، سوسپانسیون‌های NCC ۴ و ۶٪ که از حل نمودن در آب مقطر توسط دستگاه فراصوت در مدت min ۳ به‌دست آمده را با پلی‌اکریل آمید کاتیونی به‌مقدار ۰/۰۲٪ و به مدت min ۳۰ هم زده و به سوسپانسیون خمیر کاغذ اضافه گردید. لازم به ذکر است که پلی‌اکریل آمید کاتیونی هم به‌عنوان کمک نگه دارنده استفاده شد چرا که از این ماده به‌دلیل خاصیت تجمع ذرات ریز، انبوهه کردن نرمه‌ها و الیاف و نگه داشتن نانومواد بر روی الیاف در توری شکل گیری کاغذ درحین ساخت کاغذ استفاده می‌شود [۱۶]. به‌علاوه محلول ZnO که از حل نمودن در آب مقطر توسط دستگاه فراصوت در مدت min ۱ به‌دست آمد را به میزان ml ۱۰ به ازای هر کاغذ دست‌ساز بر روی کاغذ ساخته شده اسپری شدند.

۵.۲. تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار از دیسک

۱.۵.۲. تهیه محیط کشت آگار مولر هینتون و انتقال میکروب و نمونه کاغذی به آن

g ۳۴ از پودر محیط کشت آگار مولر هینتون در L ۱ آب مقطر حل و با حرارت دادن شفاف گردید. سپس محیط در اتوکلاو استریل و در زیر هود میکروبیولوژی در پلیت‌های استریل ریخته و ۱۵ تا ۲۰ min زمان داده شد تا محیط به حالت جامد تبدیل گردد.

۲.۵.۲. تهیه و تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت و تعیین اثر ضدمیکروبی ZnO

ابتدا در دو لوله آزمایش، هر کدام mL ۴ سرم فیزیولوژی ریخته و استریل گردید. سپس کلنی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* جداشده از نمونه‌های بالینی در لوله‌های جداگانه تلقیح شد تا کدورتی مشابه ۰/۵ مک فارلند داشته باشند. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند؛ که از آزمایشگاه بیمارستان شهید زارع ساری تهیه شد، یک سواب استریل، به سوسپانسیون میکروبی آغشته گردید. پس از گرفتن مایع اضافی آن توسط فشار دادن سواب به دیواره داخلی لوله، سواب مرطوب در سطح محیط مولر هینتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسیده بود، پخش گردید. دیسک‌های تهیه شده با قطر ml ۱۲ حاوی نمونه‌های کاغذهای تیمار شده و پوشش دهی شده با نانومواد بر روی این کشت میکروبی گذاشته شدند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با دمای °C ۳۷ به‌مدت h ۲۴ انکوبه گردید. در نهایت قطر هاله‌های عدم رشد باکتری در اطراف هر دیسک به‌وسیله خط کش مدرج اندازه‌گیری شد [۱۴].

۶.۲. روش آماری

تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، از طرح کاملاً تصادفی با آنالیز واریانس یک طرفه و در نهایت، گروه‌بندی میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. تست‌های تعیین مشخصات نانوکریستال سلولز

۱.۱.۳. بررسی پراش پرتو ایکس (XRD)

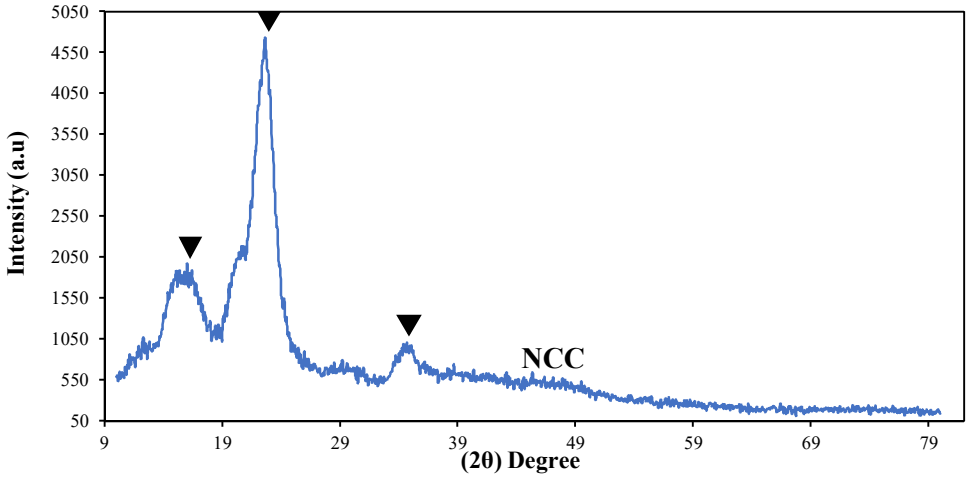
آزمون پراش اشعه ایکس (XRD)، یک آزمون رایج برای بررسی نحوه پخش نانوذرات در ساختار پلیمر و اندازه‌گیری میزان بلوری بودن نانوذرات و نانوکامپوزیت هاست. طیف پراش اشعه ایکس NCC تهیه شده به روش هیدرولیز اسیدی در شکل (۱) آورده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، NCC در زاویه‌های ۲θ برابر ۱۵/۹۶، ۲۳/۰۵ و ۳۴/۷۶ درجه سه پیک واضح را از خود نشان می‌دهد که با مشاهدات شن و همکاران و غلامی و همکاران مطابقت دارد [۱۷-۱۸]. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، وجود پیک تیز در $2\theta = 15/96^{o}$ نشان دهنده سلولز نوع یک می‌باشد [۱۹].

۲.۱.۳. بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM)

مطابق شکل (۲)، ذرات NCC به شکل میله‌ای و دارای ابعادی به طول nm ۲۰۰-۱۰۰ و قطر nm ۳۰-۱۰ می‌باشند. جهت نگهداری و استفاده راحت‌تر سوسپانسیون NCC ساخته شده، به‌وسیله دستگاه خشک کن انجمادی ساخت شرکت پیشتاز ایران، پودر NCC تهیه شد.

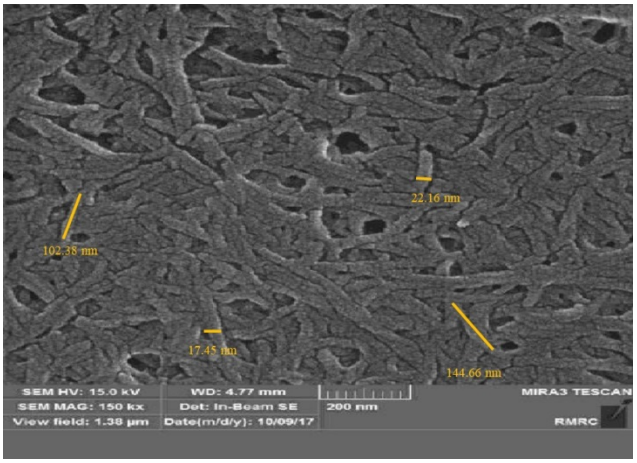
۲.۳. اندازه‌گیری خواص ضدمیکروبی

جدول (۱) نتایج حاصل از آزمون تجزیه واریانس مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد استفاده در تیمارهای متفاوت را نشان می‌دهد. در سطح خطای ۵٪، بین سطوح مختلف تیمارها، اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد.



شکل (۱) نمودار پراش پرتو ایکس NCC

Fig. 1. X-ray patterns of NCC



شکل (۲) تصویر FESEM ناتوکریستال سلولز

Fig. 2. FESEM images of NCC

جدول (۱) مقادیر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* در اثر تیمار با نمونه کاغذهای پوشش دهی شده با درصدهای مختلف مواد پوشش دهنده، کاغذهای تیمار شده در حین ساخت با نانومواد و شاهد.

Table 1. Mean values of the diameter of non-growth zone of the *Staphylococcus aureus and Escherichia coli* bacterias by treatment with a sample of coated papers with different percentages of coating materials, treated paper during manufacturing with nanomaterials and blank.

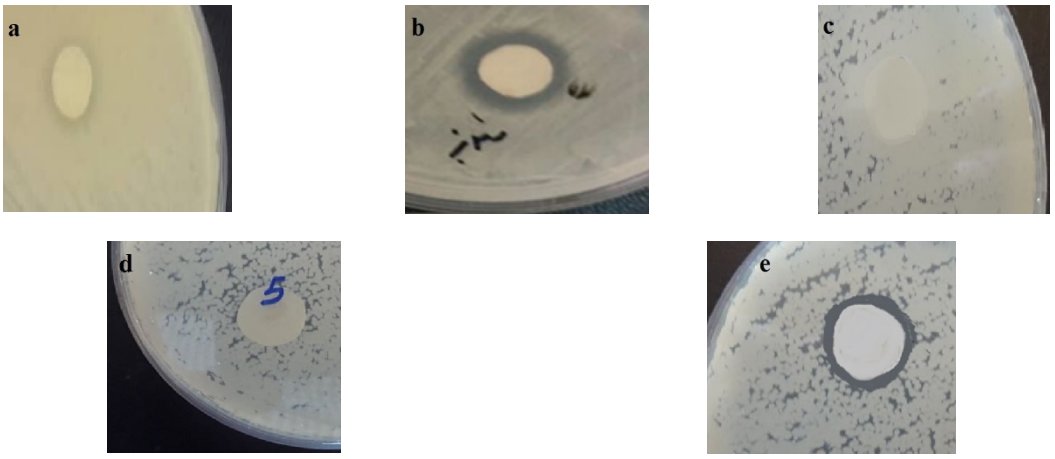
سطوح تیمارها samples	کاغذهای پوشش دهی شده (mm) Coated papers (mm)		کاغذهای تیمار شده (mm)* treated papers (mm)	
	استافیلو کوکوس اورئوس Staphylococcus aureus	اشرشیاکلی Escherichia coli	استافیلو کوکوس اورئوس Staphylococcus aureus	اشرشیاکلی Escherichia coli
Blank	0±0^{c}	0±0^{c}	0±0^{d}	0±0^{d}
PCL 10% - ZnO 3%	16.82±0.64^{a}	17.41±0.31^{a}	14.1±0.3^{b}	14.86±0.3^{b}
PCL 10% - NCC 6%	0±0^{c}	0±0^{c}	0±0^{d}	0±0^{d}
PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3%	0±0^{c}	0±0^{c}	13±0.1^{c}	13.36±0.49^{c}
PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%	16.06±0.11^{b}	16.43±0.25^{b}	15±0.1^{a}	16.1±0.3^{a}

در شکل‌های ۳ و ۴ هاله عدم رشد در اطراف کاغذهای پوشش دهی شده با PCL 10% - ZnO 3% و PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3% دیده می‌شود در حالی‌که کاغذهای شاهد، PCL 10% - NCC 6% و PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3% از خود مقاومتی در برابر باکتری‌ها نشان ندادند و هاله عدم رشد در اطراف این نمونه‌ها وجود ندارد و همچنین در شکل‌های ۵ و ۶ هاله عدم رشد در اطراف کاغذهای ساخته شده با تیمارهای ZnO 3%، NCC 4% - ZnO 3% و NCC 6% - ZnO 3% دیده می‌شود در حالی‌که نمونه‌های شاهد و NCC 6% از خود مقاومتی در برابر باکتری‌ها نشان ندادند و هاله عدم رشد در اطراف نمونه‌های این تیمارها وجود ندارد. بیشترین قطر هاله عدم رشد یا بهترین خواص ضدمیکروبی در مقابله با باکتری‌ها مربوط به کاغذهای پوشش دهی شده با PCL 10% - ZnO 3%، در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۱۶/۸۲ mm و در مقابل باکتری *اشرشیاکلی* به میزان ۱۷/۴۱mm بود بوده است همچنین قطر هاله عدم رشد برای کاغذهای ساخته شده با تیمار NCC 6% - ZnO 3%، در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۱۵ mm و در مقابل باکتری *اشرشیاکلی* به میزان ۱۶/۱ mm میلی‌متر می‌باشد. با بررسی شکل (d) درگروه شکل‌های ۳ تا ۶ دیده می‌شود که در کاغذهای پوشش دهی شده با PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3% و ساخته شده با تیمار NCC 4% - ZnO 3%، ذرات اغلب کلوخه‌ای بوده که این باعث کاهش فعالیت ضدمیکروبی ZnO در آن‌ها شد [۱۱] و در کاغذ پوشش دهی شده خاصیت ضدمیکروبی از خود نشان نداد. در کاغذ تیمار شده شکل (d) قطر هاله عدم رشد آن در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۱۳ mm و در مقابل باکتری *اشرشیاکلی* به میزان ۱۳/۳۶ mm می‌باشد.

در بررسی شکل (e) از گروه شکل‌های ۳ تا ۶، خاصیت ضدمیکروبی درکاغذهای پوشش دهی شده با PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%، با قطر هاله عدم رشد در حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۱۶/۰۶ mm و در حضور باکتری *اشرشیاکلی* به میزان ۱۶/۴۳ mm در حالی‌که برای کاغذهای ساخته شده با تیمار NCC 6% - ZnO 3%، قطر هاله عدم رشد در حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۱۵ mm و در حضور باکتری *اشرشیاکلی* به میزان ۱۶/۱ mm بوده است. بنظر می‌رسد به‌دلیل پخش و پراکندگی یکنواخت نانوذرات در ماتریس پلیمری و الیاف کاغذ و ایجاد اتصالات عرضی مناسب ZnO با گروه‌های هیدروکسیل و آمید در شبکه الیاف کاغذ و پلیمر، باعث افزایش فعالیت ضدمیکروبی نمونه‌ها شده است [۱۱]. علاوه بر این، نانومواد یون‌هایی را آزاد می‌کنند که با گروه تیول (SH-) پروتئین‌های موجود بر سطح سلول باکتری‌ها واکنش می‌دهند. این قبیل پروتئین‌ها از غشاء سلولی باکتری به سمت بیرون برآمدگی داشته و موجب انتقال مواد غذایی از دیواره سلول می‌شوند؛ نانومواد این پروتئین‌ها را غیرفعال کرده، نفوذ پذیری غشاء را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌شود [۲۰]. ZnO به‌طور مؤثر به‌عنوان یک پرکننده موجب تقویت خواص پلیمر می‌شود که طبق شکل‌های

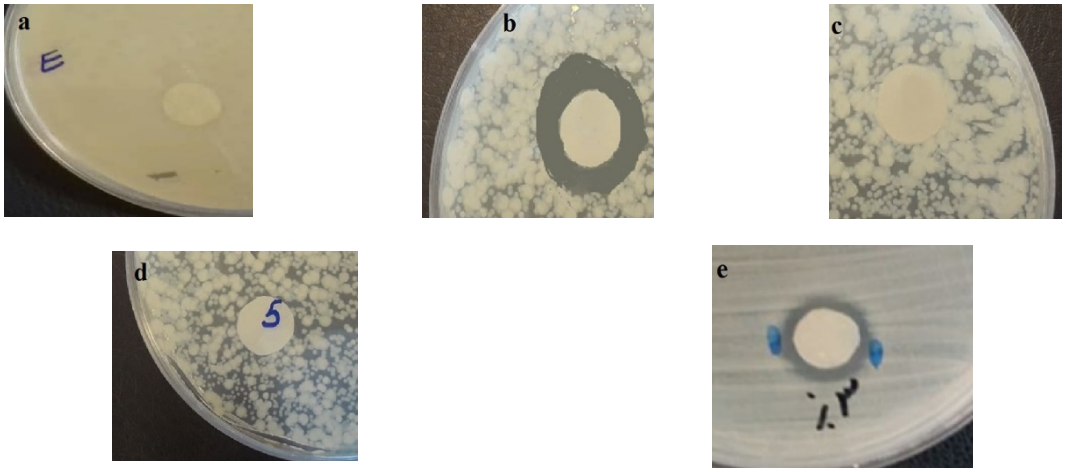
۵ و ۶ (b)، قطر هاله عدم رشد آن در کاغذ ساخته شده با تیمار این نانوماده در حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۱۴/۱ mm و در حضـــور باکتری *اشرشیاکلی* به میزان ۱۴/۸۶ mm می‌باشد. این نانوماده باعث تخریب چربی و پروتئین غشای سلولی باکتری می‌شود و در نتیجه باعث نشت محتویات داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول‌های باکتری می‌شوند. علاوه بر این، تولید پراکسید هیدروژن و یون Zn^{+2} به‌عنوان مکانیسم کلیدی اثرات ضدمیکروبی ZnO پیشنهاد شده است؛ این رفتار به‌عنوان تعاملات شیمیایی یا فیزیکی بین ذرات نانومیله‌های اکسید روی و پوشش سلول میکروارگانیسم‌ها است [۲۱]. همچنین NCC و کاغذ به‌طور مؤثر از طریق پیوند هیدروژنی با صفحات ZnO واکنش نشان داده که در نهایت توانسته است یک ساختار به هم پیوسته و یکنواختی را به کمک اتصالات عرضی میان رشته‌های کاغذ ایجاد کند. این ساختار به هم فشرده و یکنواخت می‌تواند عامل بهبود خواص ضدمیکروبی توسط ZnO باشد. همچنین میر حسینی و همکارانش در بخشی از پژوهش خود در بررسی خاصیت ضدمیکروبی نانوکامپوزیت کیتوزان - اکسید روی دریافتند که افزودن ZnO به میزان ۱/۵٪ سبب افزایش فعالیت ضدمیکروبی فیلم شده است و این افزایش خاصیت ضدمیکروبی از طریق پراکندگی یکنواخت ZnO و ایجاد اتصالات عرضی مناسب ZnO با گروه‌های هیدروکسیل و آمید در شبکه پلیمری کیتوزان ایجاد شده است [۱۱]. ZnO در کاغذهای تیمار شده با حضور NCC، قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به ZnO بدون حضور NCC تشکیل داده‌اند که این نشان دهنده آن است که، ZnO در حضور ماتریس خاصیت ضدمیکروبی بهتری نسبت به ZnO بدون حضور ماتریس دارد. این افزایش خصلت ضدمیکروبی را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که بستر کربنی، ZnO را پایدار کرده و باعث رها سازی یون توسط ZnO به محیط کشت به‌صورت کنترل شده، در مدت زمان بیشتر و با سرعت مشخصی شد و خاصیت فوق برای مدت زمان طولانی‌تری حفظ می‌شود. به این ترتیب، باکتری نمی‌تواند با گذشت زمان در برابر نمونه مقاومت پیدا کند و در نتیجه این خاصیت افزایش می‌یابد [۱۴].

نتایج مشاهدات کاغذهای پوشش دهی و تیمارشده با نانومواد نشان داد که درمجموع کاغذهای پوشش دهی شـده نسـبت بـه کاغذهای تیمار شده خواص ضدمیکروبی بهتری داشتند. یکی از علل مهم آن، می‌تواند کوچک بـودن ابعـاد نـانومواد باشـد. ایـن ترکیبات در حین ساخت کاغذ از توری شکل گیری کاغذ عبـور کـرده و در نتیجـه هـدر رفـتن بخشـی از آن‌هـا، مقدارشـان در کاغذهای تیمار شده کاهش می‌یابد. هر چند که برای تثبیت آن بر روی الیاف از پلی‌اکریل آمید کاتیونی استفاده شد. دلیل مهـم دیگر می‌تواند این باشد که در نمونه‌های پوشش دهی شده تمام نانومواد در سطح هستند اما در نـوع تیمـار، بخشـی از آن‌هـا در داخل ماتریکس پخش شده‌اند و بنـابراین کـارایی ضـدمیکروبی آن‌ها پایین می‌آید.



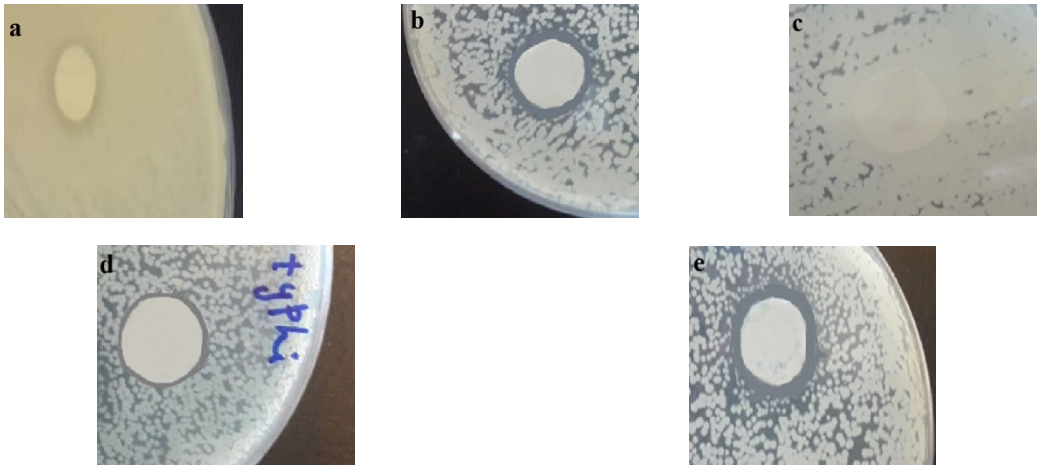
شکل (۳) تصاویر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در a) کاغذهای پوشش دهی شده و شاهد، b) PCL 10% - ZnO 3% ، c) PCL 10% - NCC 6%، d) PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3%، e) PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%

Fig. 3 Images of a non-growth zone of *Staphylococcus aureus* Bacteria in a) coated and blank papers, b) PCL 10% - ZnO 3% , c) PCL 10% - NCC 6%, d) PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3%, e) PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%



شکل (۴) تصاویر هاله عدم رشد باکتری *اشرشیاکلی* در a) کاغذهای پوشش دهی شده و شاهد، b) PCL 10% - ZnO 3% ، c) PCL 10% - NCC 6%، d) PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3%، e) PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%

Fig. 4 Images of a non-growth zone of *Escherichia coli* Bacteria in a) coated and blank papers, b) PCL 10% - ZnO 3% , c) PCL 10% - NCC 6%, d) PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3%, e) PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%



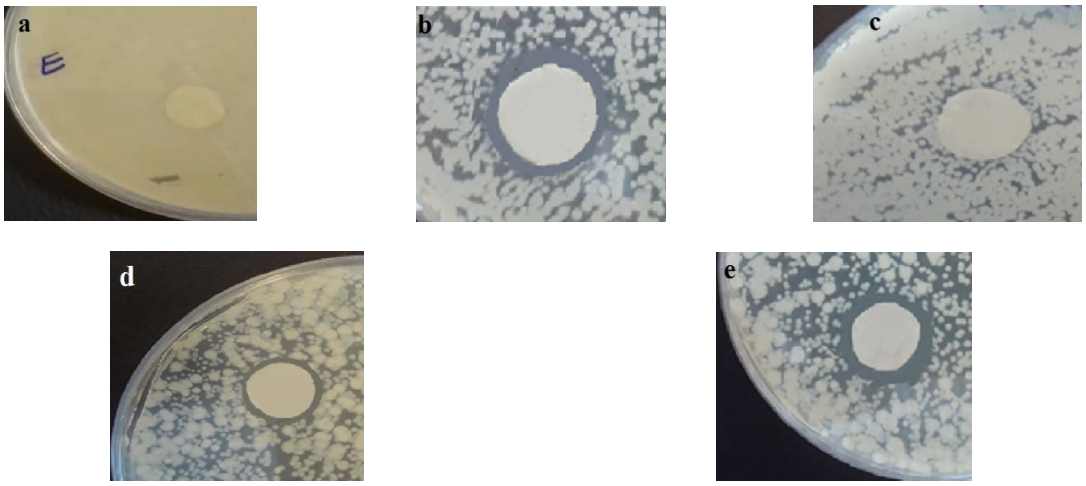
شکل (۵) تصاویر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در a) کاغذهای تیمار شده با نانومواد و شاهد، b) PCL 10% - ZnO 3% ، c) PCL 10% - NCC 6%، d) PCL 10% - NCC 4% - ZnO 3%، e) PCL 10% - NCC 6% - ZnO 3%

Fig. 5 Images of a non-growth zone of *Staphylococcus aureus* Bacteria in a) treated papers whit nano materiales and blank paper, b) ZnO 3%, c) NCC 6%) , d) NCC 4% - ZnO 3% , e) NCC 6% - ZnO 3%

۴. نتیجه گیری

این پژوهش با هدف بررسی تاثیر خواص ضدمیکروبی کاغذهای پوشش دهی شده و تیمار شده با نانومواد ZnO، NCC و پلیمر PCL بر روی دو باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیاکلی* و مقایسه عملکردی بین کاغذهای پوشش دهی شده و تیمار شده انجام پذیرفت. بررسی تصاویر FESEM و طیف XRD نشان داد که کریستال‌های سلولزی تولید شده از الیاف آلفا سلولز در حد نانو می‌باشد. بررسی نتایج ضدمیکروبی نشان داد که در کاغذهای پوشش دهی شده، زمانی که از ZnO به تنهایی استفاده شود خاصیت ضدمیکروبی به مراتب بالاتری نسبت به ترکیب‌های سه گانه و حتی ترکیب دوگانه NCC دارد و در کاغذهای تیمار شده،

ترکیب خمیر کاغذ با ZnO بهترین عملکرد ضدمیکروبی را در برابر عوامل ضدمیکروبی داشته است. با توجه به نتایج می‌توان بیان داشت که در صورتی که ZnO در پوشش و تیمار کاغذ به‌طور یکنواخت پراکنده شود؛ کاغذهای مورد نظر مقاومت بهتری در مقابل عوامل ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند و NCC نقش موثری در برابر عوامل میکروبی نداشته است. همچنین عملکرد ضدمیکروبی کاغذهای پوشش دهی شده بهتر از کاغذهای تیمار شده می‌باشد؛ زیرا افزودن نانومواد درحین ساخت کاغذ منجر به خروج و هدر رفت بخشی از نانومواد از توری شکل‌گیری کاغذ می‌شود.



شکل (۶) تصاویر هاله عدم رشد باکتری *اشرشیاکلی* کاغذهای تیمار شده با نانومواد و شاهد (a)، ZnO 3% (b)، NCC 6% (c)، NCC 4% - ZnO 3% (d)، NCC 6% - ZnO 3%(e)

Fig. 6. Images of a non-growth zone of *Escherichia coli* Bacteria in treated papers whit nano materiales and blank paper (a), ZnO 3% (b), NCC 6% (c), NCC 4% - ZnO 3% (d), NCC 6% - ZnO 3% (e)

مراجع

[1]. Mashak, A. (2014). A Brief Overview on Biodegradable Polymers in Drug Delivery Systems. *Polymerization*., 4(3), 23-35. [In Persian]

[2]. Sodeifi. B., Nazarnezhad, N., Sharifi, S.H. (2019). Investigation of mechanical and optical properties of papers coated with Polycaprolactone - Nanocrystalline cellulose - zinc oxide Nanoparticle. *IJWPR.,* 34(1), 25-39. [In Persian]

[3]. Yamamoto, O. (2001). Influence of particle size on the antibacterialactivity of zinc oxide. *Int. J. Inorg. Mater.,* 3(7): 643-646.

[4]. Zhang, L., Ding, Y., Povey, M., York, D. (2007). Investigationinto the antibacterial behavior of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J. Nanopart. Res.,* 9(3), 479-89.

[5]. Vaezi, Kh., Asadpour, G., Sharifi, H. (2019). Effect of ZnO nanoparticles on the mechanical, barrier and optical properties of thermoplastic cationic starch/montmorillonite biodegradable films. *Int. J. Biol. Macromol.,* 124, 519-529.

[6]. Brayner, R., Ferrari-Iliou, R, Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M.F., Fievet, F. (2006). Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.,* 6(4), 866-70.

[7]. Roselli, M., Finamore, A., Garaguso, I., Britti, M.S., Mengheri, E. (2003). Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. *J. Nutr.,* 133(12), 4077-4082.

[8]. Applerot, G., Lipovsky, A., Dror, R., Perkas, N., Nitzan, Y., Lubart, R. (2009). Enhanced antibacterial activity of cell injury. *Adv. Funct. Mater.,* 19(6), 1-11.

[9]. Faramarzi, T., Jonidi jafari, A., Dehghani, S., Mirzabeygi, M., Naseh, M., Rahbar Arasteh, H. (2012). A Survey of Bacterial Contamination of Food Supply in the West of Tehran. *J. Fasa Univ. Med. Sci.,* 2(1), 11-18. [In Persian]

[10]. Normanno, T.G., Salandra, L.a., Occurrence, G. (2007). Characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.,* 115(3), 290-296.

[11]. Mirhosseini, M., Yazdani Kashkoli, N., Dehghan, H. (2016). Investigation of antimicrobial properties of chitosan–ZnO nanocomposite. *RJMS.,* 23(147), 104-114. [In Persian]

[12]. Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Jimenez de Aberasturi, D., Ruiz de Larramendi, I., Rojo, T. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.,* 30(10), 499–511.

[13]. Shanshan, G., Xiaoming, S., Jianhua, W., Shitao, Y., Fushan, C., Xinyu, S. (2017). Structure, mechanical properties and antimicrobial activity of nano zno/cellulose composite films. *Cellul. Chem. Technol.,* 51(3-4), 355-361.

[14]. Abdollahi, S., Pourahmad, A., Asadpour, L. (2018). Synthesis and Characterization of Graphene - ZnO NPs Nanocomposite and Its Application for Antibacterial Activities. *J. Fasa Univ. Med. Sci.,* 8(2), 805-814. [In Persian]

[15]. Li, X.H., Xing, Y.G., Li, W.L., Jiang, Y.H., & Ding, Y.L. (2010). Antibacterial and Physical Properties of Poly (vinyl chloride) based Film Coated with ZnO Nanoparticles. *Food Sci. Technol. Int*., 16(3), 225-232.

[16]. Smok, G. (2004). *Pulp and paper technologists (4th ed.).* Vancouver: Angus Wilde.

[17]. Shen, B., Chen, N., Wang, M., Xu, Ch., Wang, Y. (2013). Preparation and Optical Properties of ZnO-Cellulose Nanocomposites. *Nanosci. Nanotechnol. Lett*., 5(2), 309–313.

[18]. Gholami, R., Ghanbarzadeh, B., Dehghannya, J., Entezami, A.A., Abolghasemi Fakhri, L. (2015). Physicochemical Properties of Potato Starch-NCC Based Nanocomposites. *Irrigation and Drainage Structures Engineering Research.,* 15(4), 27-38. [In Persian]

[19]. Yu, H., Yan, C., Lei, X., Qin, Z., Yao, J. (2014). Novel approach to extract thermally stable cellulose nanospheres with high yield. *Mater. Lett.,* 131, 12–15.

[20]. Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L., & Klabunde, K.J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*., 18(17), 6679-6686.

[21]. Liu, Y., He, L., Mustapha, A., Li, H. (2009). Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli O157:H7*. *J. Appl. Microbiol.,* 107(4), 1193-1201.

Research Article

Investigation of antibacterial activity of treated and coated papers with zinc oxide nanoparticles and nanocrystalline cellulose

Bardia Sodeifi[1], Noredin Nazarnezhad [2*], Seyed Hassan Sharifi[3]

1. M.Sc. Student, Wood and Paper Science Department, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University Sari, Iran.
2. Associated Professor, Wood and Paper Science Department, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University Sari, Iran.
3- Assistant Professor, Wood and Paper Science Department, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University Sari, Iran.

Abstract
Sustainable biomaterials and mineral materials such as cellulose nanocrystals and zinc oxide nanoparticles, have been considered for the production of various products due to their properties such as biodegradability and safety. PCL, which is one of the most important polymers produced in petrochemicals, is widely used due to its easy degradation in the nature. In this study, the effects of coating with polycaprolactone (PCL, 10%), nanocrystalline cellulose (NCC, 4 and 6%) and zinc oxide nanoparticles (ZnO, 3%) and their composition on the antibacterial properties of the coated papers were investigated. Also, the antibacterial properties of the papers treated by (ZnO, 3%) and (NCC, 4 and 6%) were studied. The papers antibacterial test was performed on the staphylococcus aureus and escherichia coli batteries in the mueller hinton agar plates with disc diffusion method. The nanocrystalline cellulose prepared in the laboratory were studied by Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) and X-ray diffraction (XRD). Investigation of the images and the spectra showed that the crystalline cellulose produced in the nanoscale. The results showed that the papers coated with (PCL 10% and ZnO 3%), had better antibacterial properties than the papers coated with (PCL 10%, and NCC 4 and 6%) and ternary composition of coating materials (PCL 10%, NCC 4 and 6%, and ZnO 3%). Also, the papers treated with ZnO 3% and NCC 4 and 6% had better antibacterial properties than papers treated with ZnO 3%. Also, the antibacterial properties of the coated papers were more than the treated papers.

Keywords: : **Polycaprolactone, Antibacterial properties, Zinc oxide nanoparticles, Nanocrystalline cel.**

* Corresponding author: nazarnezhad91@gmail.com