JRIFST

www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۱، جلد ۱، شماره ۱، صفحات ۴۷-۶۰

پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

بررسی اثرات کشندگی و بازدارندگی رشد نانوذرات تیتانیوم اکساید (TiO_2) بر میکروارگانیزم های مضر در مواد غذایی

زینب جادری[1]، عبدالمجید مسکوکی*[2]، سید علی مرتضوی[3]

۱– دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

۲- دانشیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

* نویسنده مسئول (maskooki@hotmail.com)

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

نانو ذرات تیتانیوم اکسید هنگامی که در محیط آبی تحت اثر اشعه ماوراء بنفش قرار گیرند به دلیل تولید هیدروکسیل های اکسیژن دار خاصیت میکروب کشی پیدا می کنند. گروههای هیدروکسیل اکسیژن دار با تخریب دیواره سلولی بعضی از میکروارگانیسم ها سبب نابودی آنها می شوند. در این تحقیق اثرکشندگی تیتانیوم اکسید روی چهار نوع میکروارگانیسم مضر در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری های بیماریزای اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس آرئوس، قارچ توکسین زای آسپرژیلوس پارازیتیکوس و مخمر عامل فساد ساکرومایسس سرویزیا در محیط کشت-های اختصاصی خود که حاوی دو غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بودند کشت داده شدند. این نانو ذرات قبلاً توسط دو لامپ اولتراویولت در زمانهای ۰ (شاهد) ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پرتودهی شده بودند و پس از کشت در شرایط مناسب برای هر میکروارگانیسم گرمخانه گذاری شده و تعداد باکتری های رشد کرده شمارش شدند. نتایج پس از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تعداد باکتری های اشرشیا کولی در هر دو غلظت تیتانیوم اکساید که بالا تر از ۶۰ دقیقه پرتودهی فعال شده بودند به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافتند. در حالیکه هیچکدام از تیمارها اثری روی باکتری استافیلوکوکوس نداشتند. میزان کاهش سلولهای زنده برای مخمر ساکرومایسس سرویزیا و قارچ آسپزژیلوس پارازیتیکوس به ترتیب ۵۶/۸ ٪ و ۷۰٪ بودند. نتایج این تحقیق نشان دهنده اثرات نابود کنندگی یا بازدارندگی رشد میکرو اورگانیزم ها توسط نانو ذرات تیتانیوم برای استفاده در پژوهش های آتی می باشد.

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۱
تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۸

واژه های کلیدی
اثرات کشندگی
باکتری های بیماریزا
قارچ های مولد سم
کنترل رشد
نانوذرات تیتانیم اکساید

مقدمه

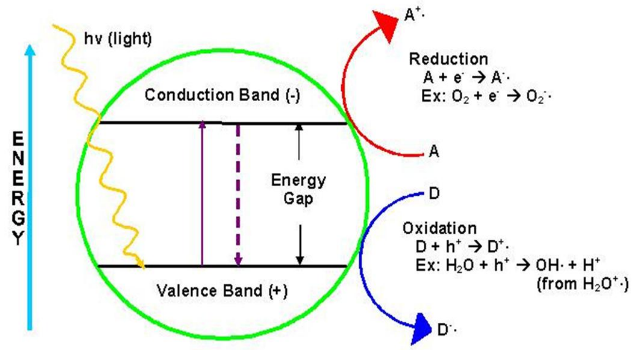
نانوتکنولوژی علم مطالعه و تحقیق پدیده و عملکرد مواد در اندازه های اتمی، مولکول و نانومولکول و دارای کاربردهای مختلفی ازجمله صنایع غذایی می باشد (جوکار، ۱۳۸۷). استفاده از فناوری نانو به ویژه در بسته بندی مواد غذایی می تواند در کنترل رشد میکروبی و بسته بندی های هوشمند کاربرد وسیعی داشته باشد (همتیان، ۱۳۸۶). یکی از روشهای جلوگیری از فساد مواد غذایی استفاده از نانوذرات در ساختار بسته بندی است و ابتدا بایستی میزان اثر بخشی آنها مورد ارزیابی قرارگیرد (Jung et al., 2009). استفاده از نانو ذرات با خواص گوناگون از جمله موارد استفاده از نانوفناوری در

علوم و صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی می باشد (Choi et al., 2009). نانوذراتی نظیر تیتانیوم اکساید که به آناتاز[1] معروف است برای بروز خواص خود نیاز به فعال شدن دارد و این عمل بوسیله تابش اشعه ماورا بنفش صورت می گیرد که در این صورت نوعی فتوکاتالیست به شمار می آید (Akiba et al., 2005). اساساً فتوکاتالیست ها موادی هستند که باعث نابودی آلاینده ها در آب و فاضلاب و تبدیل آنها به مواد بی-خطر نظیر آب و دی اکسید کربن می شوند. تعدادی از موادی که به عنوان فتوکاتالیست به کار می روند عبارتند از دی اکسید تیتانیوم (TiO_2)، اکسیدروی (ZnO)، اکسیدآهن (Fe_2O_3)، اکسید تنگستن (WO_3) (Jung et al., 2009). پس ازجذب اشعه ماورای بنفش به وسیله ی این ذرات ($\lambda<400$ nm) الکترونهای آنها برانگیخته شده و از مدار خود خارج می شوند (Matsunaga et al., 1985) که نتیجه آن بر جای گذاشتن حفراتی است که قابلیت اکسید کنندگی بسیار بالایی دارند. در عین حال الکترون ها نیز که خاصیت احیاکنندگی قوی دارند پس از تماس با آب، رادیکالهای آزاد اکسیژنی و هیدروکسیدی ایجاد می کند در شکل ۱ ساز وکار فرآیند فتوکاتالیستی نانوذرات تیتانیو اکساید نشان داده شده است (Matsunaga et al., 1993). درمورد خواص ضد میکروبی فتوکاتالیست تیتانیوم اکساید تحقیقات کمی انجام شده است. Choi و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر تیتانیوم، نانو ذرات اکسید تیتانیوم و TiO_2/Ag را بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس مورد بررسی قرار دادند این باکتری در (BHI)[2] به مدت ۱۲ ساعت کشت داده شد و cfu آن به $۴/۸ \times ۱۰^{۶}$ رسید سپس ۲٪ از تیتانیوم، دی اکسید تیتانیوم و TiO_2/Ag به محیط حاوی این باکتری در سه بشر مجزا اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه زیر دو لامپ UV ۱۵w; ۳۵۶nm به فاصله ۷cm قرار داده شد و پس از آن از هر نمونه ۱میلی لیتر برداشته و در محیط آگار BHI به مدت ۳۶ ساعت کشت داده شد و در نهایت نمونه با نمونه شاهد که بدون تاثیر UV و نانو ذرات بود مقایسه شد. بررسی ها نشان داد که استفاده به تنهایی از تیتانیوم به طور معنی داری نسبت به نمونه شاهد کاهش پیدا کرد (p<۰/۰۵) همچنین نمونه های حاوی نانوذرات TiO_2 نسبت به خود تیتانیوم جمعیت میکروبی کمتری نشان داد و در نهایت نمونه های حاوی نانوذرات و فلز نقره نسبت به نانو ذرات TiO_2 قدرت نابودی بیشتری از خود نشان داد (p<۰/۰۵) (Jung et al., 2009).

مهمترین میکرواورگانیزم های بیماریزا، مولد سم و یا عامل فساد عبارتند از باکتری گرم منفی اشریشیا کولی از پاتوژن های مهم صنایع غذایی و بخصوص در سلامت آب قابل توجه است. آلوده بودن آب آشامیدنی به این باکتری دلیل بر آلوده شدن آب توسط فاضلاب می باشد و به دلیل مهم بودن سلامت آب نابودی این باکتری از اهمیت خاصی برخوردار است (جوکار، ۱۳۸۷). باکتری گرم مثبت استافیلوکوس اورئوس نیز از پاتوزن های مهم می باشد که در بهداشت مواد غذایی به ویژه فراوردههای لبنی حائز اهمیت است. این باکتری گرم مثبت کروی و نسبت به باکتری های گرم منفی به عوامل از بین برنده میکروب مقاومت بیشتری نشان می دهد، مخمر ساکارومایسس سرویسه که دارای گونه های مختلف بوده، گونه های مفید آن که در صنعت نانوایی و تولید آبجو استفاده میشود و برخی گونه های آن در نوشابه ها و آبمیوه ها ایجاد فساد می کند و با تولید گاز موجب پارگی بسته های آبمیوه می شود، این مخمر به راحتی می تواند در دماهای پایین و محیط های اسیدی رشد کند و به همین دلیل در صنعت آبمیوه و نوشابه سازی نابود شدن آن اهمیت دارد، قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس به دلیل تولید آفلاتوکسین و سرطان زا بودن این سم برای انسان از اهمیتی خاصی بر خوردار است. آلوده بودن خوراک دام های تغذیه شده باتوکسین این قارچ می تواند مستقیما وارد شیر شده و برای انسان خطر ساز باشد، همچنین آلوده بودن برخی میوه های خشکباری به این توکسین از ارزش آنها کاسته و در اقتصاد جوامع دخالت دارد (Chawengkijwanich and Hayata, 2007). در این پژوهش از خاصیت فتوکاتالیستی نانو ذرات تیتانیوم اکساید استفاده و تاثیر آن را بر روی ۴ میکروارگانیسم بررسی گردید، میکروارگانیسم های انتخاب شده در این تحقیق پاتوژن‌های مهم مواد غذایی می باشند که در صنعت و در نگهداری مواد غذایی ایجاد فساد و آلودگی می کنند

1- Anatase
2- Brain Heart Infusion

و از بین رفتن آنها بسیار حائز اهمیت است. این میکروارگانیسم ها عبارتنداز: باکتری بیماریزای گرم منفی اشیرشیا کلی، باکتری بیماریزای گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، قارچ توکسین زای آسپرژیلوس پارازیتیکوس، و مخمر عامل فساد ساکارومایسس سرویسیه. از آنجا که تحقیقات انجام شده قبلی به صورت پراکنده و فقط برروی چند باکتری خاص انجام شده و پاتوژن ها و میکرواورگانیزم های عامل فساد مواد غذایی بررسی نشده اند. از این رو در این تحقیق سعی شده است اثرات بازدارندگی یاکشندگی نانوذرات TiO_2 بر روی این میکروب های پاتوژن و عامل فساد بررسی شود.



شکل ۱- نحوه عملکرد فرآیند فتوکاتالیستی نانو ذرات TiO_2

مواد و روش ها

مواد

پودر تیتانیوم اکساید TiO_2 با اندازه ذرات 15nm با خلوص ۹۹/۹ درصد در آزمایشگاه شیمی پژوهشکده علوم وصنایع غذایی خراسان تهیه و سنتز شده است.

سویه میکروبی اشرشیا کلی با شماره بین المللی ATCC8739 که به شماره PTCC-1330، سویه میکروبی استافیلوکوس اورئوس با شماره بین المللی ATCC29737 که به شماره PTCC-1337 سویه میکروبی آسپرژیلوس پارازیتیکوس با شماره بین المللی ATCC 15517 که به شماره PTCC-5286 و سویه میکروبی مخمر ساکارومایسس سرویسیه با شماره PTCC 9763 که تمامی شماره سویه های PTCC از پژوهشگاه بیوتکنولوژی مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری‌های ایران تهیه گردیدند.

محیط های کشت مورد استفاده: محیط کشت مایع لوریل سولفات براث (LSB) و محیط کشت جامد ویولت رد بایل آگار (VRB) ساخت شرکت مرک آلمان برای باکتری اشرشیا کلی، محیط کشت مایع جیولیتی کانتونی بویلون (GCB) و محیط کشت جامد برد پارکر آگار ساخت مرک المان به عنوان محیط کشت های استافیلوکوکوس اورئوس، محیط کشت مایع یست مالت براث (YMB) ساخت شرکت بیومارک هند و محیط کشت جامد گلوکز کلرامفنیکل آگار (YGC) ساخت شرکت مرک المان به عنوان محیط کشت مخمر ساکارومایسس سرویزیا و محیط کشت مایع پتیتو دکستروز براث PDB ساخت شرکت بیومارک هند به عنوان محیط کشت مایع قارچ.

روش ها

فعال سازی سویه های میکروبی

فعال سازی سویه های میکروبی طبق دستورالعمل اختصاصی انجام شد. میکروتیوب های حاوی سویه های خالص میکروارگانیسم شکسته و یک میلی لیتر آب مقطر به هر کپسول اضافه شد و پس از ان برای هر میکروارگانیسم در یک لوله ازمایش ۱۰میلی لیتر از محیط کشت مایع اختصاصی هر میکروارگانیسم ریخته و توسط آنس حلقوی از سویه میکروبی برداشته و به محیط های کشت تلقیح شد که به عنوان کشت مادر از آن استفاده شد، جهت تعیین CFU از هر کدام از لوله

های آزمایش ۱میلی لیتر برداشته و رقت های مختلف تهیه کرده و بر روی محیط آگار هر میکروارگانیسم بصورت pour plate کشت داده و جمعیت میکروبی اولیه را بدست آمد.

تهیه سوسپانسیون تیتانیوم اکساید TiO_2

با توجه به منابع موجود و همچنین تست های اولیه انجام شده غلظت ۱ و ۲٪ تیتانیوم اکساید در نظر گرفته شد (Roco, 1999). این غلظت ها را با استفاده از آب مقطر تهیه شد، دو لوله آزمایش برداشته در هر کدام ۱۰میلی لیتر آب مقطر ریخته و با استفاده از پودر نانو ذره TiO_2 غلظت های ۱٪ و ۲٪ تهیه شد. سپس لوله-های آزمایش اتوکلاو شده و بعد از آن مصرف شد.

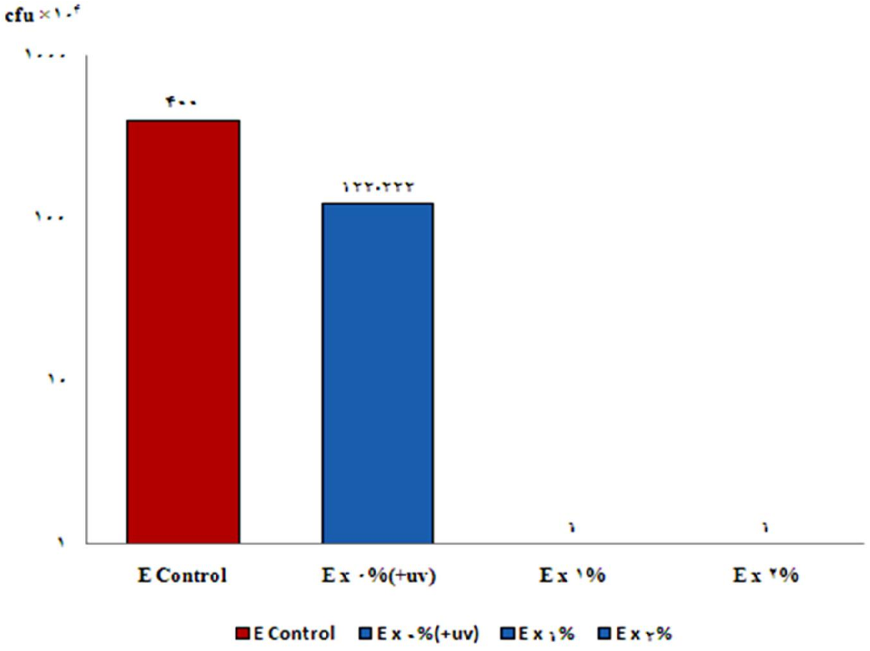
از محیط های کشت مایع هر میکروارگانیسم استفاده شد، در بشر های ۵۰ میلی لیتری، ۲۰ میلی لیتر از محیطهای کشت برای هر میکروارگانیسم ریخته و ۱ میلی لیتر از سویه میکروبی فعال شده اضافه و ۴ نوع بشر تهیه شد، بشر شاهد که بدون اثر UV و بدون تیتانیوم اکساید، بشر بدون نانو ذرات تیتانیم اکساید و با اثر UV، بشر با اثر UV و ۱ میلی لیتر سوسپانسیون ۱٪TiO_2، بشر با اثر UV و ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ۲٪TiO_2، از هر کدام ۳ تکرار، برای جلوگیری از تاثیر UV، نمونه های شاهد با استفاده از فویل آلومینییوم پوشانده شد، بشر ها را بر روی شیکر با دور ۲۵rpm و به فاصله ۸ سانتیمتر از لامپ UV قرار داده و زمان های به کار برده شده در این آزمون ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته و بعد از گذشت هر زمان از نمونه ها ۱ میلی لیتر برداشته و بر روی محیط آگار هر میکروارگانیسم به صورت pour plate کشت داده و با توجه به دما و زمان گرمخانه گذاری هر میکروارگانیسم آنها را انکوبه کردیم که برای باکتری اشرشیا کلی دمای۳۷°C و زمان ۲۴ ساعت، استافیلوکوکوس ۳۷ °C و زمان ۲۴ ساعت، مخمر ساکارو مایسس سرویسیه، ۲۵ °C و زمان ۷۲ ساعت و قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس، ۲۵°C و زمان ۷۲ ساعت در نظر گرفته و بعد از آن تعداد کلنی های تشکیل شده (CFU) شمارش گردید (Ogino et al., 2006).

این پژوهش در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و داده ها با استفاده از نرم افزار Sigma stat ۳/۱ برازش شد، شکل ها نیز توسط نرم افزار Slide write و Excel ترسیم شدند.

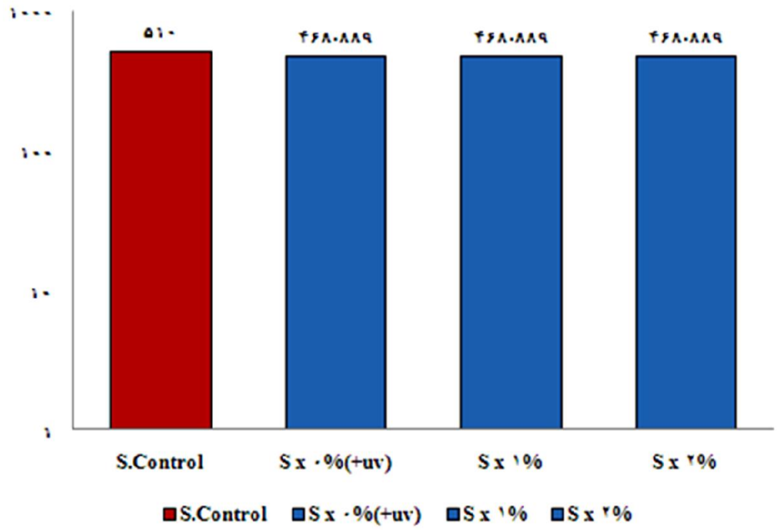
نتایج و بحث

بررسی اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر روی باکتری اشیرشیا کلی

اثر غلظت های مختلف نانو ذرا ت TiO_2 در شکل ۲ آمده است و نشان می دهد که با افزایش غلظت تیتانیوم اکساید جمعیت میکروبی باکتری اشرشیاکلی کاهش معنی داری نسبت به نمونه شاهد پیدا نموده است. هرچند غلظت تیتانیوم اکساید به تنهایی نمی تواند ملاک بررسی قرارگیرد و میزان پرتودهی توسط UV به صورت توأمان سبب کشندگی میکرو اورگانیزمها می-گردد. اما تأثیر غلظت به تنهایی معرف افزایش کشندگی با افزایش غلظت است. در غلظت ۱٪ نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر باکتری اشرشیاکلی در ۱۰۴cfu نسبت به نمونه شاهد ۱۰۴ cfu×۴۰۰ را نشان می دهد کاهش قابل ملاحظه ای دارد و دراین غلظت TiO_2 توانسته است ۲ سیکل لگاریتمی بار میکروبی را کاهش دهد (p<۰/۰۵) در غلظت ۲٪ از نانو ذره TiO_2 نیز نتیجه مشابهی دیده می شود و جمعیت میکروبی از $۴۰۰×۱۰^۴$ به $۱۰^۴$ کاهش پیدا کرد که نشان دهنده آن است که TiO_2 در این غلظت ها توانست جمعیت میکروبی را حدود ۲ سیکل لگاریتمی کاهش دهد. اثر قاطع نابودکنندگی نانو ذرات تیتانیوم اکساید توسط دیگر محققین نیز تایید شده است (Ogino et al., 2006; Choi et al., 2009).



شکل ۲- اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر باکتری اشیرشیا کلی شاهد بدون UV =E control، شاهد با E×0% = UV، یک درصد تیتانیوم اکساید = E×1% ، دو درصد تیتانیوم اکساید = E×2%



شکل۳- اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر باکتری اشیرشیا کلی شاهد بدون UV =S control، شاهد با S×0% = UV یک درصد تیتانیوم اکساید = S×1%، دو درصد تیتانیوم اکساید = S×2%

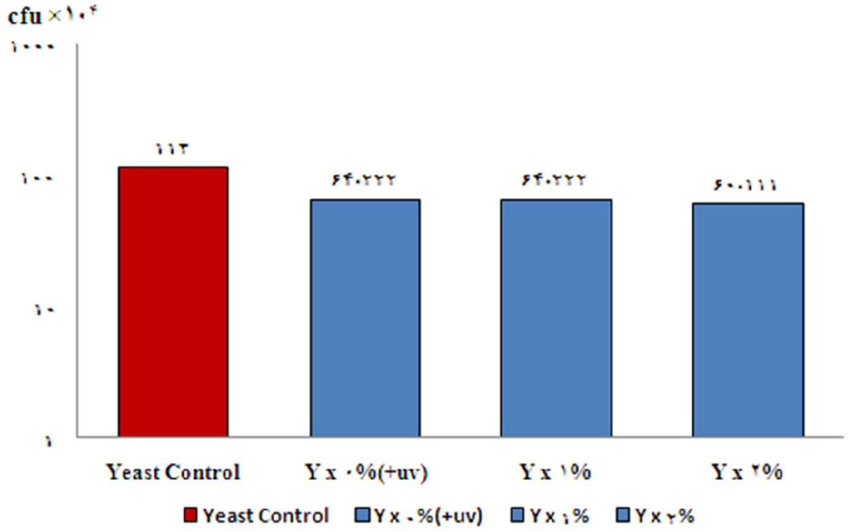
بررسی اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر روی باکتری استافیلوکوس اورئوس

شکل ۳ نشان می دهد که در غلظت صفر درصد از نانو ذرات تیتانیوم اکساید میزان اندکی از جمعیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کاهش پیدا کرده است که به دلیل تاثیرUV می باشد و در غلظت های ۱ و ۲٪ از غلظت های نانو ذرات TiO_2 هیچ گونه کاهش جمعیتی نسبت به غلظت صفر درصد از این نانو ذره ندارد و این نتیجه نشان دهنده این است که غلظت های ۱٪ و ۲٪ از نانو ذرات تیتانیوم اکساید هیچ گونه اثری بر کاهش بار میکروبی این باکتری از خود نشان نداد. علت عدم تاثیر این نانو ذرات احتمالا به دلیل کروی بودن این

باکتری می باشد و همچنین گرم مثبت بودن آن است که نسبت به باکتری های گرم منفی مقاومت بیشتری دارد. Matsunaga و همکاران (۱۹۸۵) نیز تأثیر نانوکاتالیست تیتانیوم اکساید را بر روی باکتری کوی استافیلوکوکوس آرئوس ناچیز دانستند.

بررسی اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر روی مخمر ساکارومایسس سرویسیه

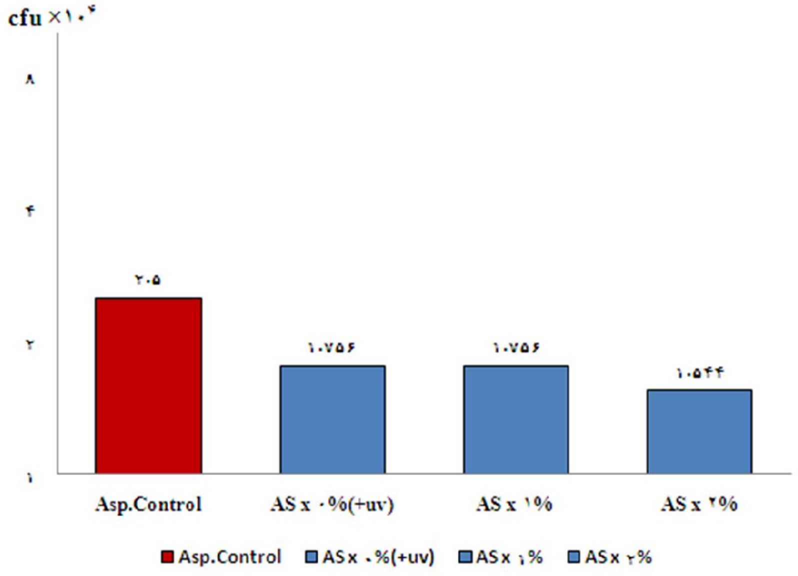
در غلظت صفر درصد از نانو ذرات تیتانیوم اکساید جمعیت میکروبی از ۱۱۳ به ۶۴/۲۲ کاهش نشان داد که این میزان کاهش به دلیل تاثیر UV می باشد و در شکل ۴ به خوبی نشان داده شده اند، در غلظت ۱٪ از نانو ذرات تیتانیوم اکساید نیز همین مقدار از بار میکروبی کاهش پیدا کرد که نشان می دهد که تیتانیوم اکساید در این غلظت فاقد هرگونه اثر میکروب کشی می باشد و این میزان کاهش تنها به دلیل تاثیر UV می باشد. Akiba و همکاران (۲۰۰۵) اثرات غیر فعال سازی مخمرها را بیشتر ناشی از تأثیر فعال سازی تیتانیوم اکساید در حین فعال سازی فتوکاتالیتیکی توسط UV دانستند. در غلظت ۲٪ نانو ذرات تیتانیوم اکساید جمعیت میکروبی از $۱۱۳×۱۰^۴$ به $۶۰/۱۱×۱۰^۴$ کاهش پیدا کرد که نشان دهنده تاثیر این نانو ذره در این غلظت بر روی مخمر ساکارومایسس سرویسیه می باشد و این کاهش جمعیت معنی دار می باشد.



شکل ۴- اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر باکتری اشیرشیا کلی شاهد بدون UV =*Y control*، شاهد با *UV = Y×0%*، یک درصد تیتانیوم اکساید = *Y×1%* ، دو درصد تیتانیوم اکساید = *Y×2%*

بررسی اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر روی قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس

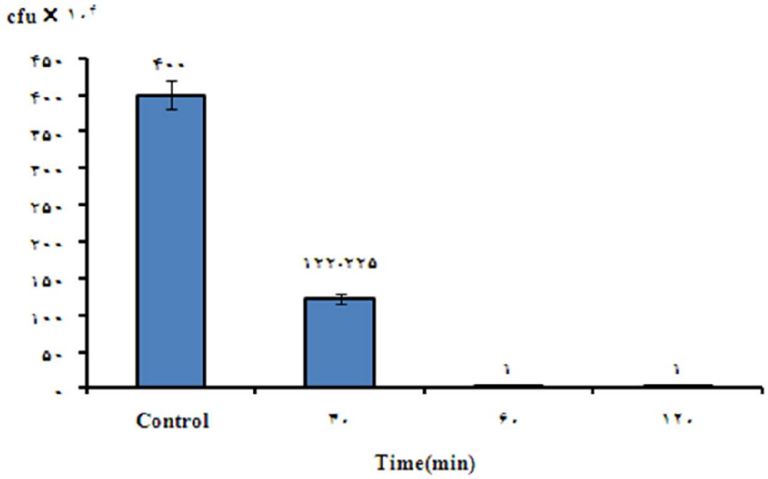
شکل ۵ غلظت های مختلف تاثیر نانو ذرات تیتانیوم اکساید را در غلظت های ۰، ۱ و ۲٪ نشان می دهد در غلظت صفر که در واقع تاثیر UV به تنهایی را نشان می‌دهد cfu از $۱۰^۴×$ ۲/۵ به $۱/۷۵×۱۰^۴$ کاهش نشان می دهد که این کاهش معنی دار می باشد، در غلظت ۱٪ از نانو ذرات تیتانیوم اکساید هیچ گونه تغییری نسبت به غلظت صفر نشان نمی دهد که نشان دهنده عدم تاثیر این غلظت از نانو ذرات تیتانیوم اکساید است، در غلظت ۲٪ از نانو ذرات TiO_2 cfu $۱/۵۴۴×۱۰^۴$ را نشان می دهد که نسبت به نمونه شاهد به طور معنی داری کاهش نشان داده است (p<۰/۰۵) و این غلظت از نانو ذرات تیتانیوم اکساید توانست جمعیت این کاهش پیدا کرده است. کاهش قابل ملاحظه ای در رشد قارچهای پنیسیلیوم و آسپرژیلوس توسط نانوکاتالیست تیتانیوم اکساید در محیط کشت سنتزی توسط مشاهده گردید (Akiba et al ., 2005).



شکل ۵- اثر غلظت نانو ذرات تیتانیوم اکساید بر باکتری اشیرشیا کلی شاهد بدون UV = Asp control، شاهد با UV = As×0%، یک درصد تیتانیوم اکساید = As×1% ، دو درصد تیتانیوم اکساید = As×2%

تاثیر زمان پرتودهی بر باکتری اشیرشیا کلی

شکل ۶ روند کاهش بار میکروبی باکتری اشیرشیا کلی در زمان های پرتودهی صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه را نشان می دهد. در زمان صفر که cfu اولیه جمعیت $۴۰۰×۱۰^۴$ را نشان می دهد بعد از سپری شدن ۳۰ دقیقه این جمعیت به $۱۲۲×۱۰^۴$ کاهش پیدا کرده است که نسبت به cfu شاهد معنی دار می باشد (p<۰/۰۵) بعد از گذشت ۶۰ دقیقه جمعیت میکروبی نزدیک صفر می رسد که نشان دهنده این است که با گذشت زمان جمعیت میکروبی بطور معنی داری کاهش پیدا کرده است (p<۰/۰۵) و همچنین با گذشت ۱۲۰ دقیقه تقریباً جمعیت میکروبی باکتری اشرشیا کلی نزدیک صفر میرسد. و این کاهش جمعیت نیز معنی دار می باشد (p< ۰/۰۵).



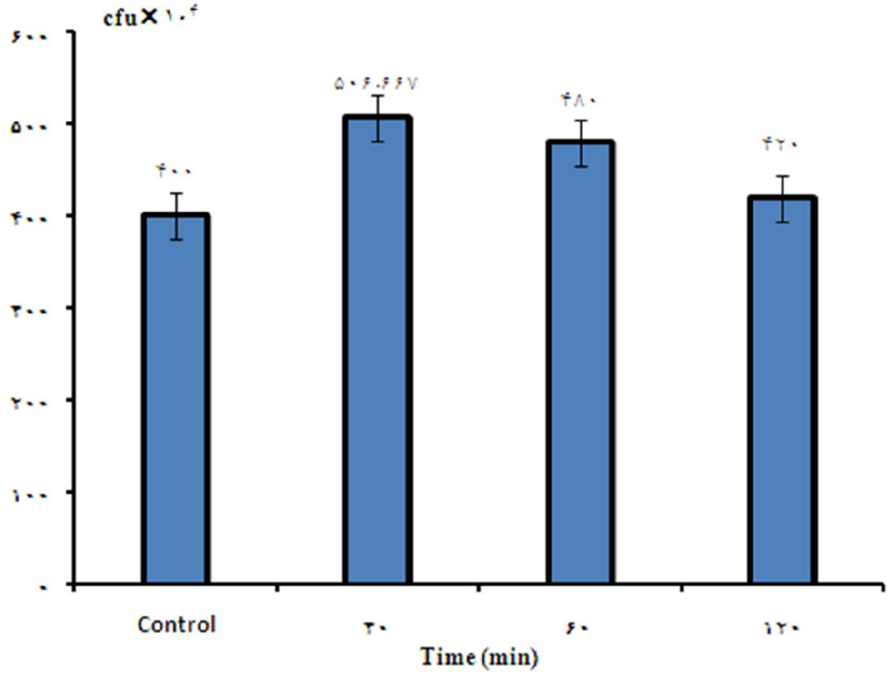
شکل۶- اثر زمان پرتودهی بر رشد باکتری اشریشیا کلی

تاثیر زمان پرتودهی بر باکتری استافیلوکوکوس آرئوس

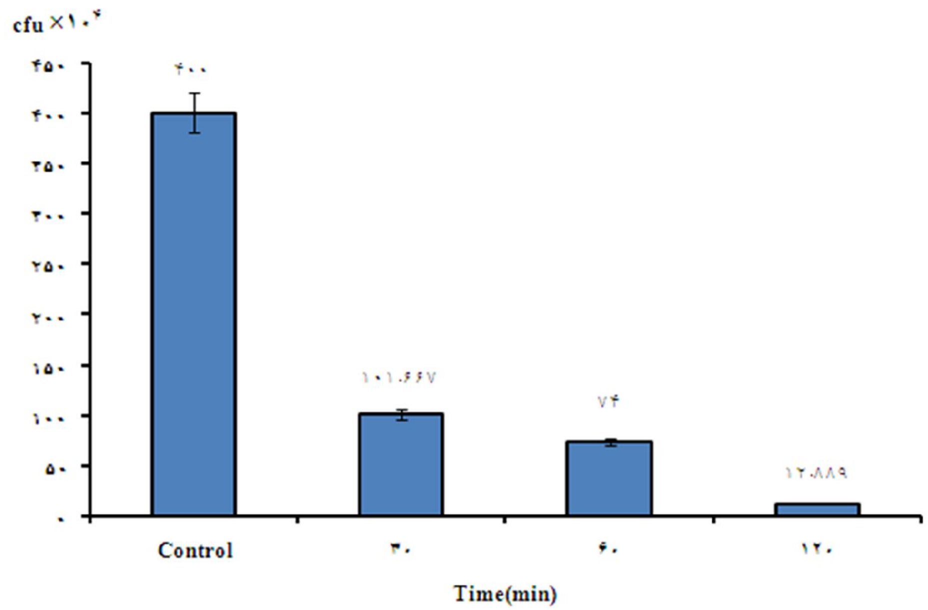
شکل ۷ cfu اولیه این باکتری را ۱۰^۴×۵۱۰ نشان می دهد ، بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جمعیت میکروبی به ۱۰^۴×۵۰۶ کاهش پیدا می کند این کاهش جمعیت در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تنها مربوط به اثر UV می باشد و نانو ذرات TiO_2 هیچ گونه تاثیری نداشته کاهش جمعیت معنی دار بود (p<۰/۰۵)، با گذشت ۶۰ دقیقه جمعیت میکروبی به ۱۰^۴×۴۸۰ کاهش پیدا می‌کند و همچنین با گذشت ۱۲۰ دقیقه جمعیت میکروبی به ۱۰^۴×۴۲۰ تنزل پیداکرد و این کاهش جمعیت نیز معنی دار بود.

تاثیر زمان پرتودهی بر مخمر ساکارومایسس سرویسیه

شکل ۸ cfu اولیه مخمر ساکارومایسس سرویسیه را ۱۰^۴×۱۱۳ نشان می دهد بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جمعیت میکروبی به ۱۰^۴×۱۰۱ کاهش پیدا می کند (p<۰/۰۵). این کاهش جمعیت در زمان ۶۰ دقیقه به cfu۱۰^۴×۷۴ می رسد و در زمان ۱۲۰ بطور معنی داری کاهش پیدا می کند و به ۱۰^۴×۱۲/۸۸ می رسد. (p<۰/۰۵). نمودار بالا نشان می دهد که زمان یک پارامتر مهم در کاهش بار میکروبی مخمر ساکارومایسس سرویسیه می باشد و با افزایش زمان جمعیت میکروبی نیز کاهش پیدا می کند.



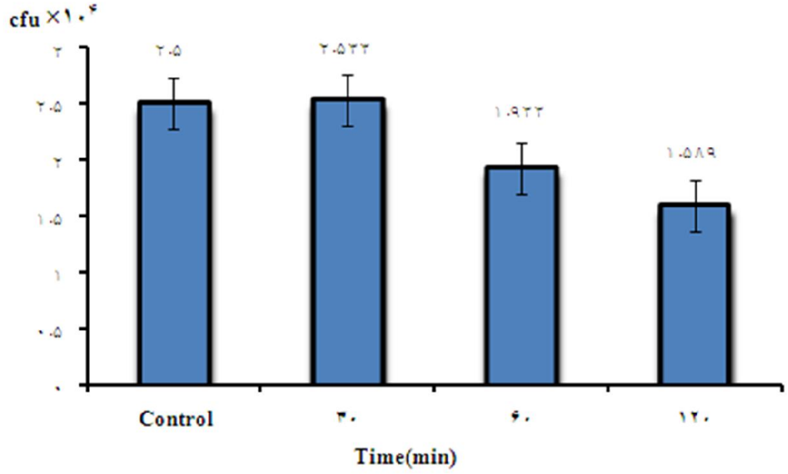
شکل ۷- اثر زمان پرتودهی بر میزان رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۸- اثر زمان پرتودهی بر میزان رشد مخمر ساکارومایسس سرویسیه

تاثیر زمان پرتودهی بر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس

در شکل ۹ جمعیت میکروبی اولیه قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس $۲/۵×۱۰^۴$ نشان داده شده است بعد از سپری شدن ۳۰ دقیقه هیچ گونه تغییری در جمعیت میکروبی نشان داده نشد، در زمان ۶۰ دقیقه cfu به $۱/۹×۱۰^۴$ کاهش پیدا کرد که این کاهش جمعیت معنی دار می باشد (p<۰/۰۵). با گذشت ۱۲۰ دقیقه جمعیت میکروبی به $۱/۵۸×۱۰^۴$ کاهش پیدا کرد و این کاهش جمعیت در این زمان نیز معنی دار بود (p<۰/۰۵). این نمودار نشان می دهد که قارچ آسپرژیلوس پارازیتیوس تاثیر زمان بر روند نابودی آن قابل توجه است و با گذشت زمان جمعیت آن نیز بطور معنی داری کاهش پیدا می کند.



شکل ۹- تاثیر زمان پرتودهی بر رشد مرگ آسپرژیلوس پارازیتیکوس

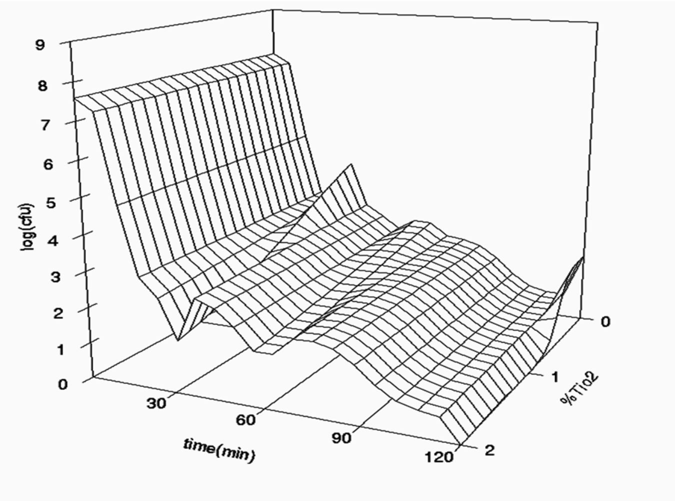
تعیین شرایط بهینه زمان فعال سازی و غلظت TiO_2 برکاهش بار میکروبی

با ترسیم منحنی های سطح پاسخ برای دو عامل زمان فعال سازی و غلظت نانوذرات تیتانیوم اکساید برای

هر چهار نوع میکرواورگانیسم مورد آزمایش می توان شرایط بهینه هرکدام را مشخص نمود.

تاثیر غلظت TiO_2 و زمان پرتودهی بر باکتری اشرشیاکلی

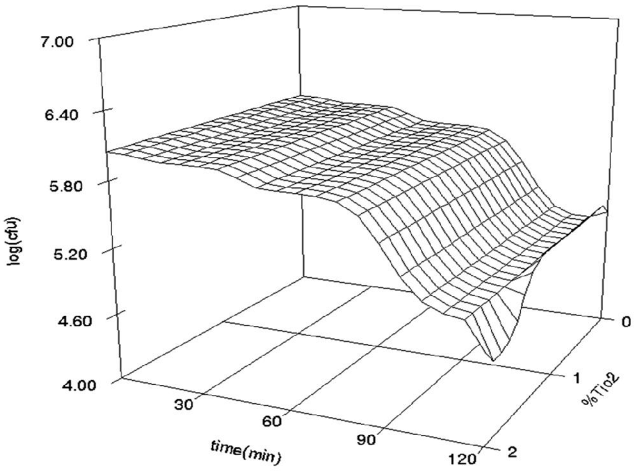
شکل ۱۰ نشان می دهد با افزایش زمان پرتودهی و افزایش غلظت تیتانیوم اکساید cfu باکتری اشرشیاکلی کاهش می یابد به طوری که در غلظت ۲٪ و زمان صفر تعداد باکتری ها به صفر م یرسد. در غلظت ۲٪ و زمان پرتودهی توسط UV اثر فتوکاتالیتیکی نانوذرات TiO_2 به گو.نه ای عمل نموده که کلیه باکتری های اشرشیاکلی نابود شدند و افزایش پرتودهی یا غلظت TiO_2 تأثیری برروند کاهش بار میکروبی ندارد.



شکل ۱۰- تاثیر غلظت TiO_2و زمان پرتودهی بر باکتری اشرشیاکلی

تاثیر غلظت TiO_2 و زمان فعال سازی بر مخمر ساکارومایسس سرویسیه

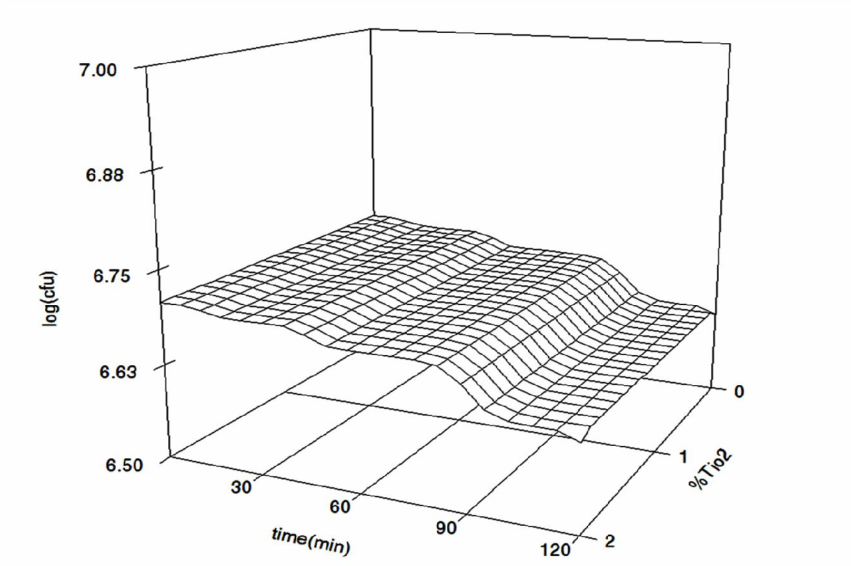
شکل ۱۱ نشان می دهد که در غلظت های ۱٪ و ۲٪ از نانو ذره تیتانیوم اکساید در زمان پرتودهی ۳۰ دقیقه تاثیری بر کاهش جمعیت مخمر نداشته ولیکن در زمان پرتودهی ۹۰ دقیقه میزان کاهش جمعیت این مخمر روند نزولی دارد، در زمان پرتودهی ۱۲۰ دقیقه و غلظت ۲٪ حداکثر کاهش جمعیت مخمر را مشاهده می کنیم. بنابراین حد بهینه آن غلظت ۲٪ فتوکاتالیست با ۲ ساعت فعال سازی TiO_2 است.



شکل ۱۱- تاثیر غلظت TiO_2 بر مخمر ساکارومایسس سرویسیه

تاثیر غلظت TiO_2 و زمان پرتودهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

همان طور که شکل ۱۲ نشان می دهد در زمان های مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه و غلظت ۱٪ و ۲٪ از نانو ذره تیتانیوم اکساید جمعیت میکروبی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به میزان بسیار اندکی پایین آمده است که دلیل بر عدم تاثیر بالای این نانو ذره بر این باکتری می باشد. هیچکدام از سطوح قادر به کاهش معنی دار جمعیت میکروبی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نبودند .



شکل ۱۲– تاثیر غلظت TiO_2 و زمان پرتودهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

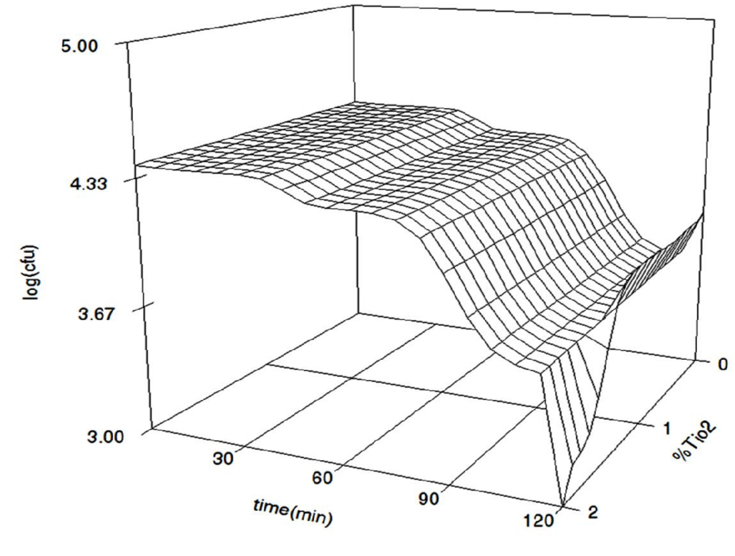
تاثیر غلظت TiO_2 و زمان پرتودهی بر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس

چنان که در شکل ۱۳ نشان داده شده در غلظت‌های ۱٪ و ۲٪ از نانو ذره تیتانیوم اکساید در زمان پرتودهی ۳۰ دقیقه تاثیری بر کاهش جمعیت قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس نداشته ولیکن در زمان پرتودهی ۹۰ دقیقه میزان کاهش جمعیت این قارچ روند نزولی دارد، در زمان پرتودهی ۱۲۰ دقیقه و غلظت ۲٪ حداکثر کاهش جمعیت قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس را مشاهده می-

کنیم. حد بهینه میزان کشندگی زمان ۹۰ دقیقه پرتودهی UV با غلظت ۲٪ تیتانیوم اکساید تعیین گردیده است.

نتیجه گیری کلی

فناوری نانو علم جدیدی است که می توان با استفاده از موادی که در این راستا بدست می آید در بهداشت و صنایع غذایی ازآن بهره گرفت و نانو ذرات TiO_2 یکی از محصولات این فناوری می باشد که می‌تواند در صنایع غذایی و بهداشت از آن استفاده مفید نمود. یکی از کاربردهای مهم این نانو ذره در از بین بردن میکروارگانیسم های مولد فساد در مواد غذایی و بهداشت بخصوص آب آشامیدنی می باشد. در این پژوهش از خاصیت میکروب کشی این نانو ذره استفاده شد و میزان تاثیر آن را بر روی ۴ میکروراگانیسم شاخص مولد فساد در مواد غذایی، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، مخمر ساکارومایسس سرویسیه و قارچ توکسین‌زای آسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد آزمون قرار گرفت و در نهایت به این نتیجه رسید که TiO_2 می‌تواند در غلظت های معین و زمان های ذکر شده اثر میکروب کشی داشته باشد. بیشترین تاثیر این نانو ذره بر روی باکتری اشرشیا کلی بود اما بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت ها و زمان های به کار برده شده اثری از خود نشان ندادند، ممکن است در غلظت های بالاتر TiO_2 و زمان های بالاتر این نانو ذره بر این باکتری تاثیر داشته باشد، تاثیر این نانو ذره بر روی مخمر ساکارومایسس سرویسیه و قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس شاهد بود این نانو ذره توانست در غلظت ۲٪ و زمان پرتودهی ۱۲۰ دقیقه بطور معنی داری جمعیت این میکروارگانیسم ها را کاهش دهد. ($p<0/05$).



شکل ۱۳- تاثیر غلظت TiO_2 و زمان پرتودهی بر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس

منابع

۱- جوکار، م. ۱۳۸۷. مروری برکاربرد فناوری های نانو در تصفیه آب و فاضلاب. مجموعه مقالات دومین همایش نانوفناوری. دانشگاه علم و صنعت تهران.

۲- همتیان، ع.۱۳۸۶. بررسی استفاده از بسته بندی های نانوفیلم پلیمری در افزایش کیفیت و زمان ماندگاری نان بربری. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، شماره ۹، ص ۵۳- ۶۰.

3- Akiba, N., Hayakawa, A., Keh, E. & Watanabe, A. 2005. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent withTiO_2 photocatalys. Journal of Medical and Dental Science, (52): 223-227.
4- Chawengkijwanich, C. & Hayata, Y. 2007. Development of TiO_2 powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli* in vitro and in actual tests. International Journal of Food Microbiology, 123: 288-292.
5- Choi, J.Y., Chung, C. J., Taek, h. K. & Choi, Y.J. 2009. Photocatalytic antibacterial effect of TiO_2 film of TiAg on *Streptococcus mutans*. The Angle Orthodontist, 79(3): 528 – 532.
6- Jung, H., Kim, D.B., Gweon, B., Moon, S.Y. & Choe, W. 2009. Enhanced inactivation of bacterial spores by atmospheric pressure plasma with catalyst TiO_2 Applied Catalysis B: Environmental, 10: 102 – 108.
7- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T. & Wake, H. 1985. Synthesis, properties and applications of oxide nanomaterials. FEMS Microbiology Letters, 29: 211.
8- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., Nakamura, N. & Komine, T. 1993. Bactericidal activity of TiO2 photocatalyst in aqueous media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System .Appl. Enuiron. Microbiol.1988, 54, 1330.Chem. Eng. News, 12: 11.
9- Nagaveni, K., Sivalingam, G., Hegde, M.S. & Madras, G. 2004. Photocatalytic degradation of organic compunds over combustion-synthesized nano-TiO2. Environmental Science and Technology, 38 (5): 1600-1604.
10- Ogino, C., Dadjour, M. F., Takaki, K. & Shimizu, N. 2006. Enhancement of sonocatalytic cell lysis of *Escherichia coli* in the presence of TiO2. Biochemical Engineering Journal, 32: 100–105.
11- Roco, M. C., 1999. Visions for nanotechnology research and development in the next decade, Interagency working group on nanoscience engineering, and technology, Loyola College, Maryland, September, Section 10, "Nanoscale Processes in the Environment," pp. 143 – 153 .

Lethal and inhibitory effects of titanium oxide (TiO_2) nanoparticles on harmful microorganisms of food

Z. Jaderi[1], A. Maskooki[*2], S. A. Mortazavi[3]

1- MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch
2- Assistant Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology
*Corresponding author (maskooki@hotmail.com)
3- Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Titanium Oxide nanoparticles with semi conductive and photo catalytic properties exhibits bactericidal activity when irradiated under UV ray in aqueous solutions. This is a phenomenon caused from formation of oxygenated hydroxyl groups. The oxygenated hydroxyl groups could disintegrate the cell wall of some microorganisms. We investigated the lethal effects of TiO2 nanoparticles on four harmful microorganisms in food. Pathogenic strains of *E. coli* and *St. aureus*, toxicogenic strain of *A. parasiticus* and putrefactive strain of *S. cerevisiae* cultured on their selective media including 1% and 2% TiO_2 concentrations activated by UV irradiation using two UV lamps 14W for 30, 60 and 120 minutes before inoculation. Viable cells in cell suspensions were counted after incubation at desired conditions for each microorganism. The results statistically analyzed and showed that the total count of pathogenic *E. coli* significantly reduced in both concentrations of activated TiO_2 up 60 min UV irradiation whereas none of the treatments were unaffected on *St. aureus*. The viable count reduction were 56.8% and 70% for *S. cerevisiae* and *A. parasiticus* respectively on their culture media including 2% TiO_2 concentration with 60min irradiated by UV irradiation. This study showed the lethal or growth inhibitory effects of photocatalytic TiO_2 on pathogenic and toxicogenic of various microorganisms types and could be applied for further investigations.

Keywords: Growth control; Lethal effects; Pathogenic bacteria; TiO_2 nanoparticles; Toxicogenic molds