

ساخت بیوفیلیم جدید بر پایه نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز و عصاره سیر و بررسی خواص ضد میکروبی آن به منظور استفاده در بسته بندی مواد غذایی

فائزه حشمدار راوری^a، سید علی یاسینی اردکانی^{b*}، سید حسین حکمتی مقدم^c

^a دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
^b دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
^c دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۶/۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۲۸

۷۳

چکیده

مقدمه: در میان انواع فناوری های بسته بندی فعال موجود، بسته بندی ضد میکروبی زمینه ای است که به تازگی روی آن تحقیقات بیشتری متمرکز شده است. استفاده همزمان از نانوذرات و مواد ضد میکروب در بسته بندی غذا راهکاری جدید است. این تحقیق با هدف ساخت یک بیوفیلیم بر پایه نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز و عصاره سیر انجام گرفت که هم ویژگی های تجزیه پذیری و هم خاصیت ضد میکروبی داشته باشد.

مواد و روش ها: عصاره سیر از سیر تازه تهیه و بعد نانوذرات سلولز و نشاسته به روش شیمیایی سنتز گردید. برای تعیین ویژگی های نانوذرات نشاسته و سلولز، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی به کار رفت. با افزودن مخلوط سه ماده فوق بر روی پلیمر پلی اتیلن یک بیوفیلیم تهیه شد که از نظر خاصیت ضد میکروبی بر علیه دو باکتری، یک مخمر و یک کپک به تنهایی و در حضور شیر تا ۶ هفته بررسی شد. داده ها با تست آماری t-test مقایسه شدند. معیار $p < 0.05$ برای تعیین معنی داری اختلاف داده ها بکار رفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

یافته ها: بیوفیلیم تهیه شده بر روی اشیریشیا کلای بالاترین خاصیت ضد میکروبی را داشت (با قطر هاله عدم رشد حدود ۸/۵ سانتی متر اطراف بیوفیلیم). اثر ضد میکروبی بیوفیلیم سنتز شده در حضور شیر آلوده (بعنوان مدل بسته بندی شیر) به طور معنی داری نسبت به کنترل، که حاوی هیچ گونه بیوفیلیمی نبود، بالاتر بود.

نتیجه گیری: با نانوذرات نشاسته، سلولز و عصاره سیر که روی یک پلیمر قرار می گیرند می توان بیوفیلیم ضد میکروبی مناسبی تهیه نمود. نتایج حاصل از این پژوهش می تواند رویکرد جدیدی به سوی استفاده از بسته بندی های فعال ضد میکروبی در صنایع غذایی جهت بهبود کیفیت، ایمنی و کاهش زباله های حاصل از غذا بحساب آید.

واژه های کلیدی: آلیسین، بیوفیلیم، پلیمر، شیر، نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز

مقدمه

به تازگی افزایش نگرانی‌های عمومی جهانی به علت اثرات زیست محیطی ضایعات بسته بندی پلاستیکی باعث شده که تقاضا برای مواد بسته بندی تجزیه پذیر به جای استفاده از مواد بسته بندی پلاستیکی غیر قابل تجزیه افزایش یابد تا هم زیست تجزیه پذیر باشند و هم ایمنی ماده غذایی را تضمین کنند (Bordes *et al.*, 2009). از طرف دیگر فرآوری نامناسب و آلودگی میکروبی ماندگاری ماده غذایی را کاهش می دهد و منجر به افزایش خطر ابتلا به بیماری های ناشی از مصرف غذا می گردد (Coma, 2008). بنابراین نوآوری های بسته بندی مواد غذایی نه تنها باید وظایف اصلی بسته بندی سنتی را برآورده سازد، بلکه در ایجاد جهانی پایدارتر که در آن تأثیر مضرات زباله های بسته بندی و اتلاف غذا در محیط زیست ما کاهش می یابد، کمک کند (EC, 2009). به همین دلیل پژوهش های گسترده ای در زمینه ساخت بسته بندی های فعال و دارای عوامل ضد میکروب صورت گرفته است (Coma, 2008). استفاده از ترکیبات ضد میکروبی در مواد بسته بندی بسیار مورد توجه است. فیلم های با فعالیت ضد میکروبی به جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های پاتوژن و عامل فساد کمک می کنند (Rhim and Ng, 2007). Emiroghlu و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک بسته بندی با دیواره حاوی سویا و روغن های آویشن و پونه کوهی تهیه کردند و نشان دادند که این سطح علیه باکتری های شایع عامل فساد غذا نظیر اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس به خوبی خواص ضد میکروبی دارد. عملکرد ضد میکروبی برخی نانوذرات و یا مواد نانوکامپوزیتی در زمینه صنایع مختلف به علت فعالیت ضد میکروبی آنها به عنوان مهارکننده های رشد (Cioffi *et al.*, 2005). عوامل ضد میکروبی (Hong and Rhim, 2008)، حامل های ضد میکروبی^۱ (Bi L *et al.*, 2011) و یا فیلم های بسته بندی ضد میکروبی (Wang *et al.*, 2006; Rhim, 2006) از یک دهه پیش شناخته شده است (Pandey *et al.*, 2006). عوامل ضد میکروبی (Hong and Rhim, 2005; *et al.*, 2008) یک فیلم نانوکامپوزیتی ضد میکروبی مطلوب به علت عوامل ضد میکروبی طبیعی درون آن است

(Rhim and Ng, 2007). نانوکامپوزیت های ضد میکروبی دارای نسبت سطح به حجم بالا و افزایش واکنش پذیری عوامل ضد میکروبی نانوذره هستند که آنها را قادر به غیرفعال کردن مؤثرتر میکروارگانیسم ها نسبت به مقیاس میکرو یا ماکرو همان مواد می سازد (Damm *et al.*, 2008).

Moran و همکاران در سال ۲۰۱۳ با به دست آوردن فیلم نانویو کامپوزیت جدید نشاسته و سلولز نشان دادند خواص مکانیکی فیلم نشاسته بومی به طور قابل توجهی بهبود یافته است. استفاده از عصاره های طبیعی یا ترکیبات اصلی آنها (شامل اسیدهای فنلی با وزن مولکولی پایین، تانن ها، پروآنتوسیانین ها، فلاونوئیدها، همچنین آنتوسیانین ها یا فلاونول ها) برای کاربردهای بسته بندی غذایی در سال های اخیر رو به افزایش است (Smith-Palmer *et al.*, 2001; Bañón *et al.*, 2007; Negi, 2012; Carpenter *et al.*, 2007).

اما بعضی از مواد شیمیایی فوق برای اتصال مستقیم به ماده خوراکی فرار هستند و زمان استفاده در بسته بندی انتشار می یابند و وارد مواد غذایی می شوند (Burt, 2004; Del 2009; Gutiérrez *et al.*, 2009). در این حالت، مواد فعال ضد میکروبی به ماتریس پلیمر متصل می شوند و سپس آنها می توانند به تدریج از مواد بسته بندی روی سطح ماده غذایی در طول مدت زمان ماندگاری ماده خوراکی بسته بندی شده انتشار یابند. هدف، حداقل انتشار عصاره و در عین حال بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد باکتریایی است (Gutiérrez *et al.*, 2009).

در سیر ماده ای بنام آلبین وجود دارد که بعد از خرد شدن توسط آنزیم آلبیناز تبدیل به آلبین می گردد (شکل ۱). این ماده به عنوان یک ضد میکروب بسیار قوی در برابر بسیاری از میکروب ها، ویروس ها، باکتری ها، قارچ ها و انگل ها عمل می کند (Saad *et al.*, 2013). Victor و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سیر فعالیت ضد میکروبی بسیار قوی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلای، سودوموناس ائروجینوزا و سالمونلا تایفی دارد (Victor *et al.*, 2012). Jebali و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود نشان دادند که نانوذرات سلولز کونژوگه شده با آلبین اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی

¹ Antimicrobial Carriers

نخست ۳۰ g گرانول نشاسته معمولی تجاری توسط هاون کاملاً به صورت پودر درآمده و سپس درون ارلن ریخته شد و با ۷۵ mL آب مقطر مخلوط گردید. ارلن روی شیکر قرار گرفت و ۵۰ mL اتانول ۷۰٪ به صورت قطره قطره با استفاده از سمپلر به ارلن اضافه گردید تا الکل و محلول کاملاً مخلوط شوند. بدین شکل مخلوطی از نانوذرات و ذراتی در ابعاد میکرونی ساخته می شود. در مرحله بعد سوسپانسیون تهیه شده حاوی نانوذرات در ۳۷°C خشک گردید تا الکل و آب موجود در آن تبخیر گردد. در نهایت نانوذرات سنتز شده به حجم ۱۰۰ mL رسید و در حضور گلوله‌های سرامیکی به شدت هم زده شد (Moran *et al.*, 2013).

- سنتز نانوذرات سلولز

نخست ۱۰ g پنبه درون لوله آزمایش قرار گرفت. سپس ۷۰ mL اسیدسولفوریک غلیظ و ۳۰ mL آب مقطر داخل استوانه مدرج ریخته شد تا اسیدسولفوریک تقریباً ۷۰٪ تولید شود. این مخلوط چند دقیقه داخل یخچال قرار گرفت تا کمی سرد شود، چون واکنش گرمازا است. کل اسیدسولفوریک به لوله حاوی پنبه اضافه و کاملاً هم زده شد. بعد از یک دقیقه یعنی بعد از هیدرولیز کامل پنبه، برای خنثی کردن اسید موجود در لوله و رسوب نانوذرات از ۲ mL محلول ۵ مولار NaOH استفاده گردید. در این مرحله برای بهتر مخلوط شدن و ریزتر شدن ذرات از گلوله‌های سرامیکی استفاده گردید. ارلن به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. در نهایت ذرات سنتز شده سه بار با آب مقطر شستشو داده شد که این کار با کمک سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ RPM انجام گردید. نانوذرات شستشو داده شده در نهایت به حجم ۱۰۰ mL رسانده شد (Jebali *et al.*, 2013).

بالایی از خود نشان می دهند. آنها ادعا نمودند که می توان از این نانو ساختار جدید درون غذا یا در سطح بسته بندی استفاده کرد (Jebali *et al.*, 2013). هدف این مطالعه ساخت بیوفیلم جدید بر پایه مواد طبیعی شامل نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز و عصاره سیر و سپس بررسی خاصیت ضد میکروبی بیوفیلم ساخته شده بدون حضور ماده غذایی و در حضور ماده غذایی بود.

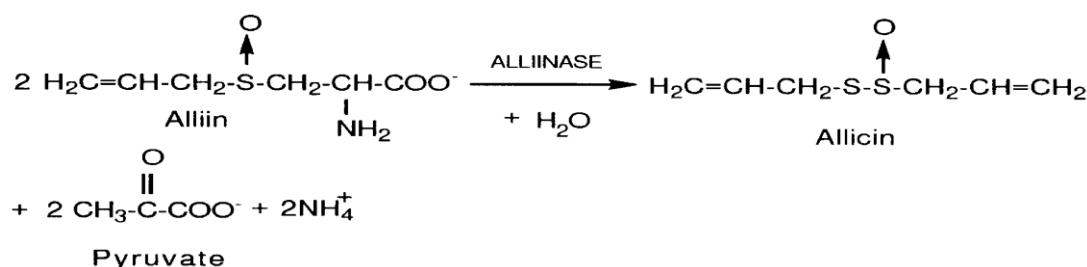
مواد و روش ها

برای تهیه بیوفیلم نخست نانوذرات سلولز و نشاسته و عصاره آبی سیر تهیه و سپس مخلوط شدند.

- سنتز عصاره سیر

نخست ۳۰ g سیر تازه خریداری شده از بازار (پوست، ریشه و جوانه جدا شده) توسط هاون (با الکل استریل شده) کاملاً له شده و داخل ظرف استریل قرار داده شد. سیرهای باقی مانده در هاون با سرم فیزیولوژی مخلوط شده و به ظرف استریل انتقال داده شد. همچنین ۳۰ mL سرم فیزیولوژی علاوه بر موارد قبلی از طریق استوانه مدرج به ظرف حاوی سیر له شده اضافه شد. سپس گلوله های سرامیکی درون ظرف استریل گذاشته و به شدت بهم زده شد. در مرحله بعد سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه روی میکسر قرار گرفت، و آنگاه به مدت ۱ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار داده شد. در نهایت بعد از انکوباسیون با استفاده از فیلتر پنبه ای استریل توده های سلولی سیر از عصاره جدا شدند و ۴۰ mL عصاره آبی سیر به دست آمد (Palaksha *et al.*, 2010; Durairaj *et al.*, 2009).

- سنتز نانوذرات نشاسته



شکل ۱. تشکیل آلیسین از آلیین موجود در سیر (Ankri and Mirelaman, 1997)

- تولید بیوفیلم

تمامی سوسپانسیون نانوذرات نشاسته و سلولز سنتز شده (۲۰۰ میلی لیتر) درون ارلن مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا به طور کامل هم زده شوند. سپس ارلن به مدت ۱۵ دقیقه روی حرارت شعله قرار داده شد تا بجوش آید. سپس بسیار سریع به ۴۰ میلی لیتر سوسپانسیون عصاره سیر اضافه گردید. در مرحله بعد مخلوط تهیه شده به سرعت روی پلاستیک پلی اتیلن (PE) ریخته شد و به طور یکنواخت پخش گردید تا لایه نازکی ایجاد شود. سپس سینی به مدت ۵ دقیقه در یخچال قرار داده شد تا کمی سرد شود. در نهایت سینی حاوی بیوفیلم داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار داده شد (Moran et al., 2013).

- تأیید نانوذرات

برای اثبات نانوذره بودن سلولز و نشاسته از نانوذرات نشاسته و سلولز ۱ cc برای تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی طبق پروتکل استاندارد آن نمونه برداری گردید و به مرکز مجری آن ارسال شد.

- بررسی خاصیت ضد میکروبی بیوفیلم تهیه شده

نخست قطعات ۱×۱ cm از بیوفیلم به طور جداگانه بر روی محیط کشت نوترینت آگار (تلقیح شده با میکروب‌های استاندارد) قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در °C ۳۷ انکوبه گردید. در این مطالعه ۴ سوش استاندارد شامل: استافیلوکوکوس اورئوس^۱ (S. aureus)، اشیریشیا کلای^۲ (E. coli)، کاندیدا آلبیکنس^۳ (C. albicans) و اسپریژیلوس نایجر^۴ (A. niger) مورد استفاده قرار گرفتند. بدین صورت که نخست یک کلنی از میکروب‌های فوق به طور جداگانه روی محیط نوترینت آگار قرار داده و در همه جهات با کمک لوپ در نزدیکی شعله، تلقیح صورت پذیرفت. لازم به ذکر است که قطعات از جهتی بر روی پلیت آگار قرار گرفت تا بیوفیلم ساخته شده در معرض میکروب‌ها قرار گیرد. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته پلیت‌ها از نظر قطر هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر زمان بر ماندگاری خاصیت ضد میکروبی، در زمان‌های مختلف (در هفته‌های اول، دوم، سوم... تا ششم)

بعد از تهیه بیوفیلم این آزمون جمعاً با ۳ تکرار انجام گرفت و میانگین آنها گزارش گردید.

- بررسی خاصیت ضد میکروبی بیوفیلم تهیه شده در حضور ماده غذایی (شیر)

نخست ۲۰۰ میلی لیتر شیر استریلیزه درون بشر ریخته و سپس به آن ۱ کلنی از میکروب‌های استاندارد فوق تلقیح و به شدت بهم زده شد. دایره‌ای به قطر ۳/۵ cm از نمونه بیوفیلم با قیچی استریل بریده و درون ظرف به صورت افقی گذاشته و سپس ۵۰ mL شیر روی آن اضافه گردید (زیرا قاعدتاً این بیوفیلم باید بصورت لایه ی داخلی بسته بندی غذا و مایعات بکار رود و در تماس مستقیم با آن باشد). همچنین ۵۰ mL شیر داخل ظرف دیگری بدون بیوفیلم ریخته شد. در نهایت درب آنها بسته شد. این کار ۲ بار صورت گرفت. همه نمونه‌ها به دمای °C ۴ منتقل شد. در فواصل زمانی هفته ای یکبار شامل ۱ تا ۵ هفته از شیرها نمونه‌گیری شد و تعداد کلنی شمارش و گزارش گردید.

- روش تلقیح و نمونه برداری از شیر

به علت افزایش رشد میکروبی نمونه‌های شیر رقیق شد. بدین صورت که ۱۰ µL میکرولیتر از شیر (کنترل و تست) با ۳ mL آب مقطر استریل مخلوط و ۵ µL از آن نمونه برداری و روی محیط نوترینت آگار تلقیح گردید. بعد از ۲۴ ساعت تمامی کلنی‌ها شمارش گردید.

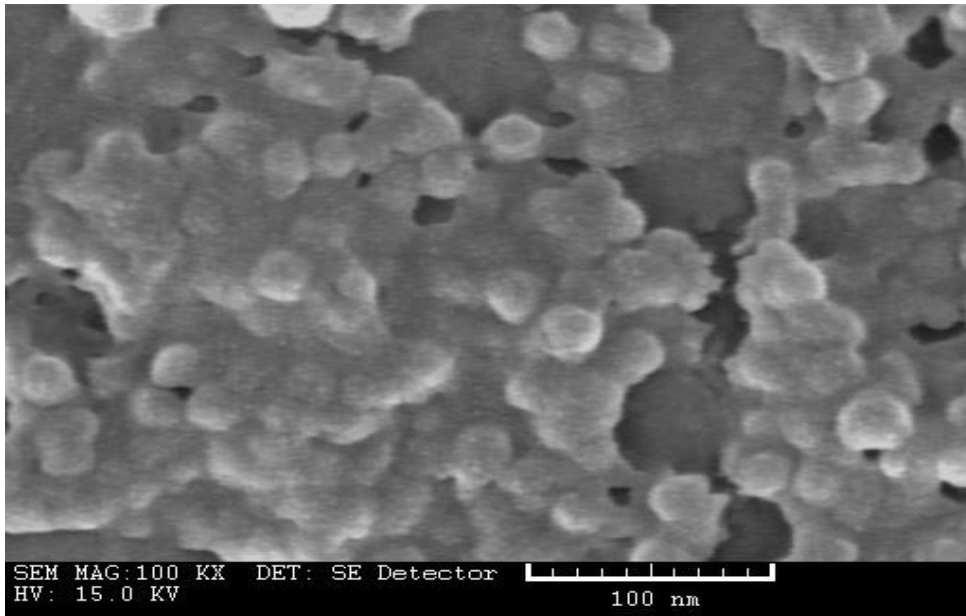
- تجزیه و تحلیل آماری

بعد از به دست آمدن نتایج و گرفتن میانگین جمعاً حاصل ۳ بار تکرار هر آزمون، جهت پی بردن به اختلاف معنی‌دار با نرم‌افزار SPSS، تست آماری t-test در p < ۰/۰۵ انجام شد.

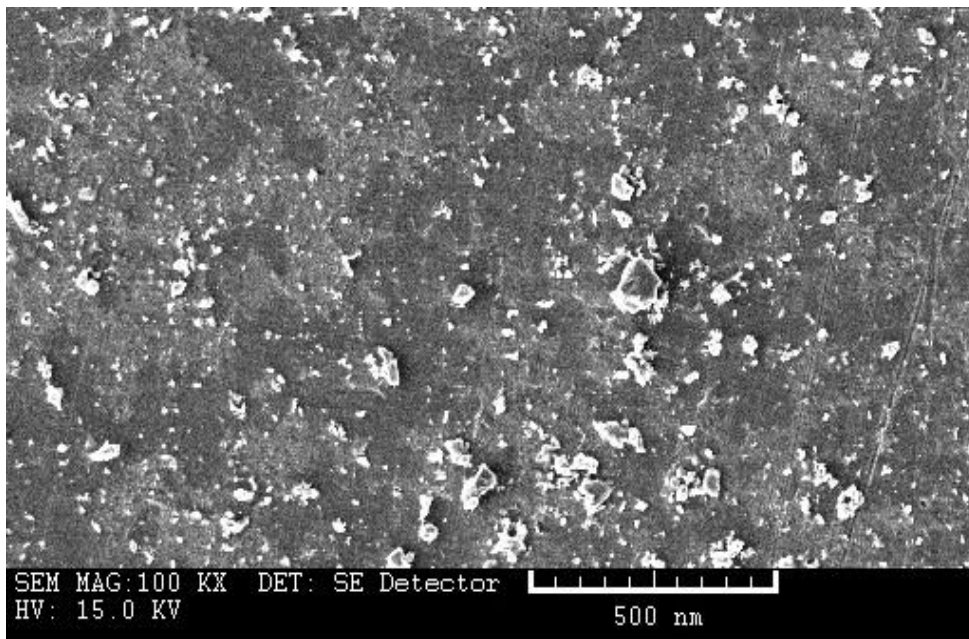
یافته‌ها**- تأیید ایجاد نانوذرات**

شکل‌های شماره ۲ و ۳ بیانگر عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات نشاسته و سلولز (با اندازه ۵ تا ۱۰۰ نانومتر) است.

¹ Staphylococcus Aureus² Escherichia Coli³ Candida Albicans⁴ Aspergillus Niger



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات نشاسته



شکل ۳- عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات سلولز

۷۷

نزدیک به ۶ cm بوده و سپس در هفته دوم به حدود ۸/۵cm می‌رسد. از هفته دوم به بعد هاله عدم رشد آن تقریباً در همین سایز باقی می‌ماند. به دلیل اینکه تمامی موارد دارای $P < 0/05$ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد E. coli در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم مشاهده گردید ($p_{value} = 0/0015$).

- بررسی خاصیت ضد میکروبی بیوفیلیم سنتز شده بدون حضور ماده غذایی (تست هاله عدم رشد) نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴ به ترتیب قطر هاله عدم رشد باکتری اشیریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اسپرژیلوس ناپچر، کاندیدا آلیبکنس را طی ۱ تا ۶ هفته نگهداری در دمای یخچال ($4^{\circ}C$) را نشان می‌دهد. همان‌طور که در E. coli (نمودار ۱) مشاهده می‌گردد، بیوفیلیم سنتز شده در هفته اول دارای قطر هاله عدم رشد

ساخت بیوفیلیم جدید و بررسی خواص ضد میکروبی آن

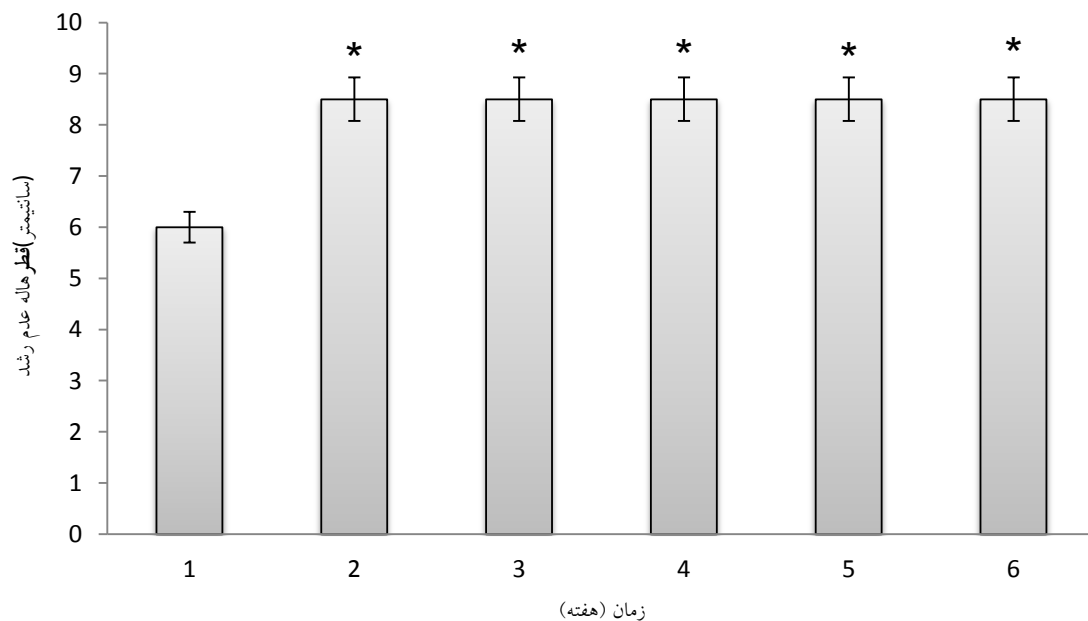
با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم مشاهده گردید.

همچنین در مورد *C. albicans* (نمودار ۴) تقریباً چنین الگویی دیده شد به نحوی که در هفته اول قطر هاله عدم رشد نزدیک به ۲/۵ cm و در هفته دوم نزدیک به ۵/۵ cm ($p_{value} = 0/0011$) و در هفته سوم به حداکثر سایز خود نزدیک به ۶/۵ cm رسید ($p_{value} = 0/0006$) و هفته چهارم قطر هاله عدم رشد به طور یکنواختی کاهش یافت و به قطر ۵/۹ cm ($p_{value} = 0/0008$)، هفته پنجم ۵/۶ cm ($p_{value} = 0/0015$) و هفته ششم ۵ cm ($p_{value} = 0/001$) رسید. به دلیل اینکه تمامی موارد دارای $P < 0/05$ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد *C. albicans* در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم وجود دارد.

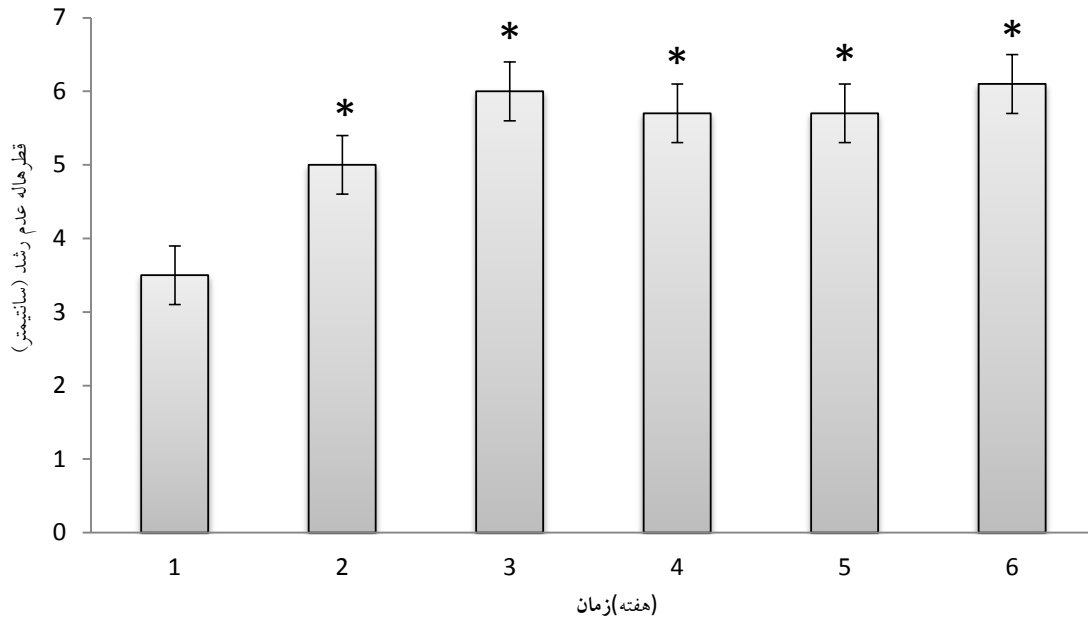
بنابراین از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد همه میکروب‌های مورد بررسی در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب‌ها در سایر هفته‌ها مشاهده گردید ($P < 0/05$). گروه‌های معنی‌دار در روی نمودار با علامت ستاره مشخص شده‌اند.

در مورد *S. aureus* (نمودار ۲) در هفته اول بیوفیلیم سنتز شده دارای قطر هاله عدم رشد ۳/۵ cm بوده و سپس در هفته دوم این قطر به حدود ۵ cm رسیده ($p_{value} = 0/004$) و در هفته سوم به حداکثر سایز خود یعنی حدود ۶ cm رسید ($p_{value} = 0/0015$). این در حالی است که در هفته‌های ۴-۵-۶ مقدار قطر هاله عدم رشد تقریباً ثابت بود ($p_{value} = 0/002$). به دلیل اینکه تمامی موارد دارای $P < 0/05$ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد *S. aureus* در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم دیده شد.

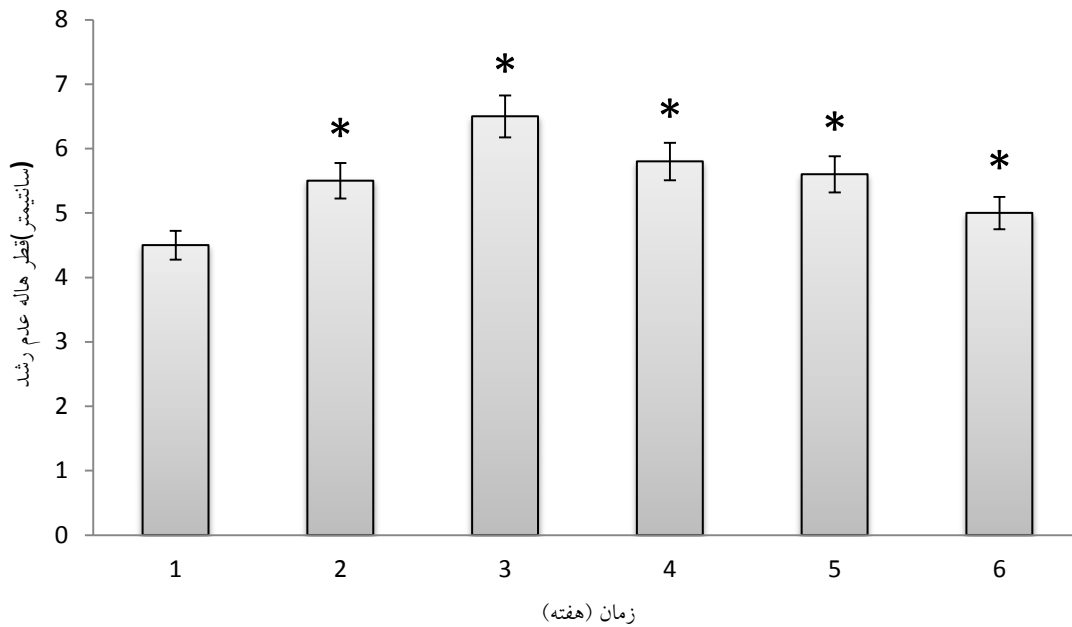
در مورد *A. niger* (نمودار ۳) در هفته اول قطر هاله عدم رشد حدود ۴/۵ cm و در هفته دوم حدود ۵/۵ cm ($p_{value} = 0/0097$) و در هفته سوم حدود ۶/۵ cm گردید ($p_{value} = 0/0024$) و از هفته ۴ به بعد مقدار هاله عدم رشد کمی کاهش یافت و به حدود قطر ۵ cm رسید (هفته چهارم: $p_{value} = 0/0058$)، (هفته پنجم: $p_{value} = 0/0008$) و (هفته ششم: $p_{value} = 0/0035$). به دلیل اینکه تمامی موارد دارای $P < 0/05$ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد *A. niger* در هفته اول



نمودار ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیا کلی طی ۶ هفته نگهداری بیوفیلیم در دمای یخچال (۴°C). علامت ستاره معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p_{value} کمتر از 0.05 نشان می‌دهد. در این بخش آزمون آماری t-test استفاده شده است.

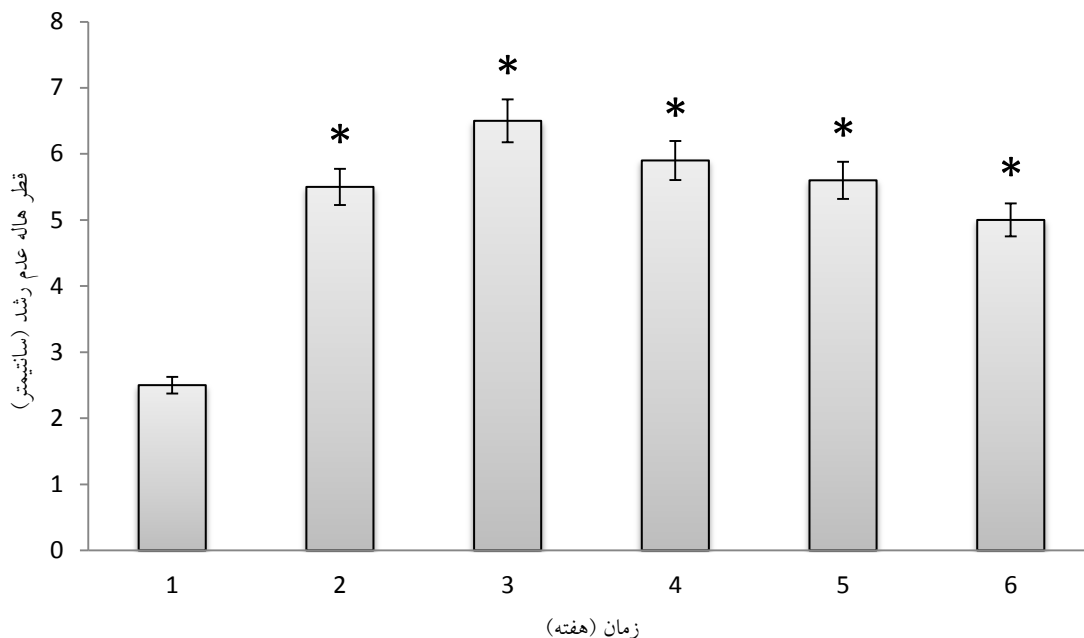


نمودار ۲ - قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس طی ۶ هفته نگهداری بیوفیلم در دمای یخچال (۴°C). علامت ستاره، معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p value کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد. در اینجا نیز آزمون آماری t-test استفاده شده است.



نمودار ۳ - قطر هاله عدم رشد اسپریژیلوس نایجر طی ۶ هفته نگهداری بیوفیلم در دمای یخچال (۴°C). علامت ستاره، معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p value کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد. در این بخش آزمون آماری t-test بکار رفته است.

ساخت بیوفیلیم جدید و بررسی خواص ضد میکروبی آن



نمودار ۴- قطر هاله عدم رشد کاندیدا آلبیکنس طی ۶ هفته نگهداری بیوفیلیم در دمای یخچال (۴°C). علامت ستاره، معنی داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p value کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد. در این بخش هم آزمون آماری t-test استفاده شده است.

سوم هیچ میکروبی رشد نکرده و بار میکروبی صفر بود. اما به‌طور جالب در هفته چهارم و پنجم باز هم کمی بار میکروبی داشتیم و به نظر می‌رسد بار میکروبی در حال افزایش است. از نظر آماری بار میکروبی در تمام هفته‌ها در لوله آزمون با بار میکروبی لوله کنترل دارای اختلاف معنی داری می‌باشد ($p < 0/05$).

بحث

بیوفیلیم شامل پوششی است که دارای یک یا چند جزء بیولوژیک است که این اجزای بیولوژیک می‌توانند زنده یا بدون حیات باشند. در این مطالعه هر سه جزء مورد استفاده از مواد طبیعی و بیولوژیک می‌باشند، که به‌صورت نانوکامپوزیت در کنار هم قرار گرفته‌اند.

انگیزه اول استفاده از نانوذرات سلولز و نانوذرات نشاسته در این مطالعه زیست تجزیه‌پذیری این دو ماده بود. هدف ما بهبود خواص مکانیکی و ممانعت‌پذیری بیوفیلیم نهایی بود (Sozer et al., 2011). لازم به ذکر است که نه نانوذرات نشاسته و نه نانوذرات سلولز هیچ‌کدام خاصیت ضد میکروبی ندارند (بر اساس پژوهش‌های قبلی نویسندگان، از جمله رفرائس (Jebali et al., 2013). تولید

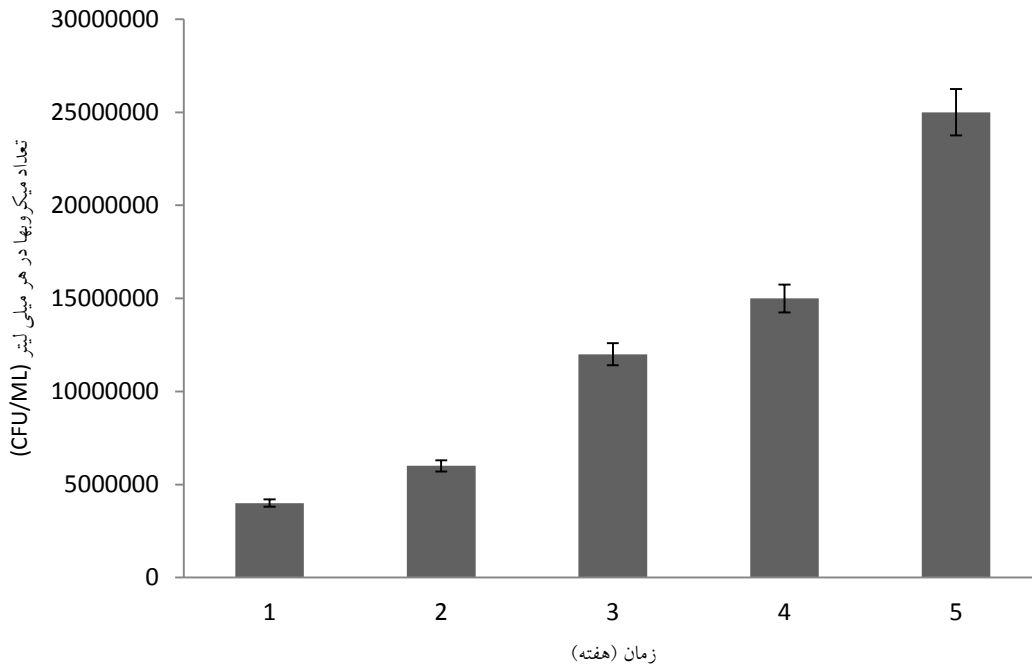
بررسی خاصیت ضد میکروبی بیوفیلیم سنتز شده در حضور ماده غذایی

همان‌طور که در روش کار ذکر گردید بیوفیلیم سنتز شده به مدت ۱-۵ هفته در معرض شیر آلوده قرار گرفت و بار میکروبی آن طی زمان‌های پیش‌گفت (تا ۵ هفته) گزارش گردید.

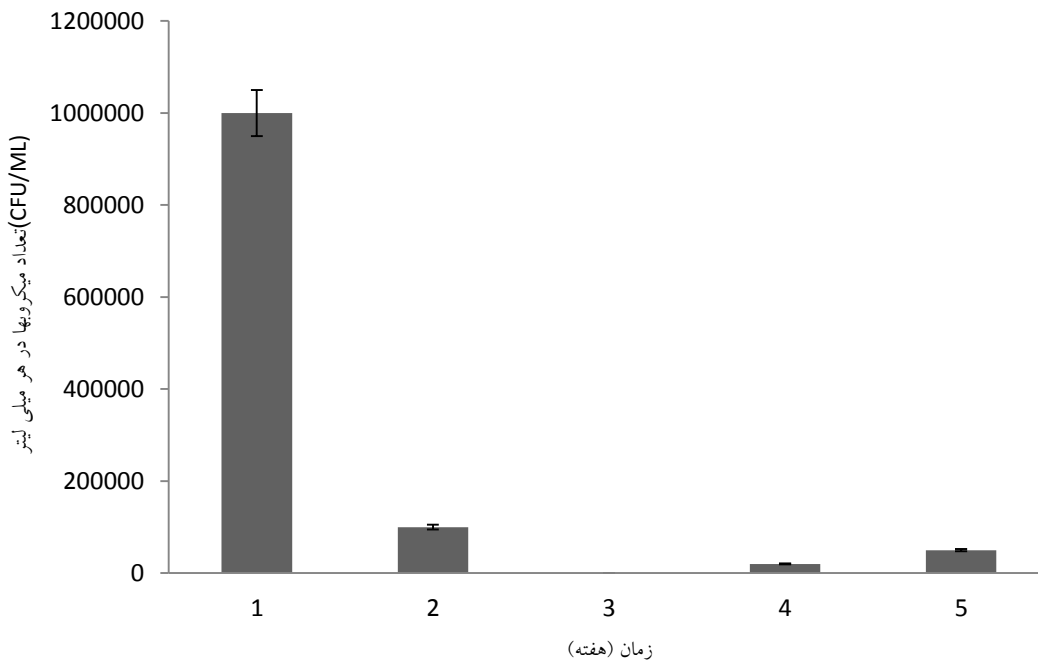
نمودار ۵ بیانگر بار میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۱-۵ هفته است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، طی هفته ۱-۵ به‌صورت صعودی بار میکروبی از ۲۵ میلیون CFU/mL به حدود ۵۰۰۰۰۰۰ CFU/mL رسید.

نمودار ۶ بیانگر بار میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۱-۵ هفته که در حضور بیوفیلیم سنتز شده قرار گرفته بود، است.

به‌وضوح می‌توان دید که بار میکروبی شیر مورد مطالعه در همه هفته‌ها کمتر از کنترل بوده و این نشانگر عملکرد خوب بیوفیلیم ساخته‌شده می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد بار میکروبی در هفته اول حدود ۱۰۰۰۰۰۰ CFU/mL بوده و در هفته دوم بار میکروبی کاهش و به حدود ۱۰۰۰۰۰ CFU/mL رسید و در هفته



نمودار ۵- شمارش کلی میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۱-۵ هفته بدون حضور بیوفیلیم.



نمودار ۶- شمارش کلی میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۱-۵ هفته در حضور بیوفیلیم.

در حوزه پژوهش نسبتاً جدید است (Plackett and Siro, 2010). مواد بر پایه نشاسته به طور گسترده به عنوان محصول انتخابی در بهبود زیست تجزیه پذیر کردن پلاستیک‌های مختلف بررسی شده است. با این وجود

الیاف سلولزی در ابعاد نانو و کاربرد آن در مواد کامپوزیتی با توجه به قدرت بالا و سفتی آنها همراه با وزن کم و زیست تخریب پذیر بودن و قابلیت تجدید پذیر بودن در حال افزایش است. استفاده از نانو الیاف سلولز در تقویت پلیمر

شکنندگی نشاسته احتیاج به استفاده از پلاستیزایرها از جمله پلی آل دارد که انعطاف پذیری نشاسته را افزایش و خواص ترمودینامیکی آن را کاهش می دهد. افزودن ویسکرها به سیستم نشاسته خواص ترمودینامیکی آن را افزایش می دهد، حساسیت به آب را کاهش می دهد و خواص تجزیه پذیری زیستی آن را حفظ می کند. جذب آب توسط فیلم نشاسته با افزایش محتوای ویسکر سلولز به صورت خطی یا تقریباً خطی کاهش می یابد و همچنین کاهش شکنندگی نشاسته با ویسکرها سلولز نیز گزارش شده است (De Azeredo and Henriette, 2009). استفاده از پرکننده هایی که حداقل یک وجه در گستره نانومتري دارند (نانوذرات) پلیمرهای نانوکامپوزیت را تولید می کنند (Alexanddre and Dubios, 2000). در نانوکامپوزیت های پلیمری نسبت به کامپوزیت های معمولی برهم کنش بهتری بین ماتریس پلیمر و فیلر وجود دارد. توزیع یکنواخت نانوذرات در ماتریس پلیمری موجب افزایش سطح تماس ماتریس و نانوذرات می شود که این اتفاق بهبود خواص مکانیکی، گرمایی و ممانعتی را در پی دارد (Rhim et al., 2013). پلی اتیلن بکاررفته در این تحقیق قابلیت دوخت پذیری دارد و به کمک حرارت می توان آن را براحتی به دیگر لایه های پلی اتیلن چسباند تا نفوذناپذیر شود. پس برای بسته بندی مواد غذایی مناسب است. البته می توان بجای پلی اتیلن، پلیمرهای زیست تخریب پذیر را هم برای این نوع بسته بندی آزمود. یکی از محدودیت های این مطالعه، عدم بررسی خواص مکانیکی و زیست تخریب پذیری این بیوفیلیم بود.

علت اصلی فساد میکروبی بسیاری از مواد غذایی نگهداری شده در یخچال، رشد میکروبی در سطح محصول است. استفاده از عوامل ضد میکروب در تهیه ماده بسته بندی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم که می تواند در ماده غذایی بسته بندی شده یا ماده بسته بندی موجود باشد، سودمند است و از این رو باعث افزایش ماندگاری می گردد. پژوهش های انجام شده در این رابطه نشان می دهد که استفاده از فیلم های ضد میکروب در مقایسه با افزودن مستقیم ماده ضد میکروب بسیار موثرتر است، زیرا ترکیب ضد میکروب به کندی از سطح بسته بندی به ماده غذایی آزاد می شود و غلظت مورد نیاز برای

جلوگیری از رشد میکروبی حفظ می گردد (appendini and Hotckie, 2002; Silveria, 2007). طبق مطالعات گذشته عصاره سیر که حاوی مولکول آلیسین است، دارای خاصیت ضد میکروبی است و علیه میکروب های پاتوژن و غیر پاتوژن می تواند عمل کند. ویروس ها، باکتری ها، قارچ ها، انگل ها به شدت تحت تأثیر آلیسین قرار گرفته و به راحتی از بین می روند (Ankri & Mirelman, 1999). این ترکیب فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به استرپتومایسین^۱ و آمپی سیلین^۲ نشان داد (Ilic et al., 2012). Joe و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که خواص ضد باکتریایی و ضد قارچ آب سیر به علت مهار سوکسنیک دهیدروژناز از طریق غیرفعال کردن گروه تیول است (Joe et al., 2009). Hovana و همکاران (۲۰۱۱) ثابت کردند استفاده از سیر به صورت خام، به طور مستقیم یا به صورت حل شده خاصیت ضد میکروبی بالاتری دارد (Hovana et al., 2011). اگرچه عصاره سیر طعم و بوی خاص خود را دارد ولی شاید بتوان با افزودن مواد دیگری (طی پژوهش های دیگر) این ویژگی منفی را پوشانید. علت استفاده از شیر در این مطالعه، اهمیت بسته بندی آن و سهولت کاربرد آن بعنوان یک مدل ماده غذایی مایع بود.

نانوذرات سلولز دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد بوده و می تواند با انواع کونژوگه شود. در مطالعه ای نانوذرات سلولز کونژوگه شده با لیزوزیم و نانوذرات سلولز کونژوگه شده با آلیسین سنتز شدند و خاصیت ضد میکروبی این ترکیبات بررسی گردید. بعد از بررسی مشخص گردید که نانوذرات کونژوگه شده با لیزوزیم و آلیسین دارای خاصیت ضد میکروبی هستند (Jebali et al., 2013).

چون این بیوفیلیم برای اولین بار تهیه گردید، غلظت مورد استفاده از سه جزء فوق در بیوفیلیم مورد مطالعه قرار گرفت تا بیوفیلیمی با قوام مطلوب ظاهری ایجاد شود. بیوفیلیم سنتز شده نمی بایست شکننده و یا حالت ژل مانند داشته باشد. این بیوفیلیم نباید بسیار سخت و محکم باشد. بر اساس تجارب آزمایشگاهی و آزمون های اولیه ای که برای این کار لحاظ شد نسبت مناسبی از آلیسین و نانوذرات نشاسته و نانوذرات سلولز انتخاب گردید و خاصیت ضد میکروبی آن طی زمان های مختلف بررسی گردید.

¹ Streptomycin² Ampicillin

باکتری‌های مورد مطالعه باشد. علت کم بودن قطر هاله عدم رشد برای هر چهار میکروب مورد بررسی در این مطالعه به علت مقدار انتشار کم مواد ضد میکروب موجود در بیوفیلیم بود.

آزمون اصلی که در این مطالعه انجام شد و نتایج آن در نمودارهای ۵ و ۶ ذکر گردید، بیانگر اثر بسیار مطلوب بیوفیلیم سنتز شده در حضور شیر آلوده بود. این مطالعه نشان می‌دهد که نتایج آزمون بیوفیلیم در حضور ماده غذایی همگام با نتایج هاله عدم رشد است. تعداد کم میکروب‌ها در شمارش کلنی در هفته چهارم و پنجم در حضور بیوفیلیم سنتز شده شاید به دلیل ایجاد مقاومت میکروبی به مواد ضد میکروب ترشح شده از بیوفیلیم یا اینکه به دلیل کاهش یا نبود مواد ضد میکروبی باشند. یعنی شاید تا ۳ هفته هر ماده ضد میکروبی که در بیوفیلیم بوده آزاد شده و دیگر ماده ضد میکروب دیگری نمانده است که بتواند میکروب‌های موجود را از بین ببرد. در لوله آزمون که هیچ بیوفیلیمی مورد استفاده قرار نگرفته بود، رشد کلنی به صورت صعودی بوده و نشان می‌دهد که بیوفیلیم در بازه زمانی به خوبی دارای کارایی بوده است. شاید اگر زمان بیشتری مورد مطالعه قرار می‌گرفت، الگوی رشد هم در لوله آزمون و هم لوله کنترل متفاوت می‌شد که برای اظهار نظر قاطع، این امر نیاز به آزمون دارد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که می‌توان با نانوذرات نشاسته، سلولز و عصاره سیر بیوفیلیم مناسبی که دارای خواص ضد میکروبی باشد، تهیه نمود. خاصیت ضد میکروبی بیوفیلیم سنتز شده علیه میکروب *E. coli* در بهترین حالت ممکن بود و این در حالی است که بیوفیلیم سنتز شده علیه *C. albicans* و *A. niger* در هفته سوم بهترین جواب را داده و با گذشت زمان از کارایی آن کم می‌گردد. هم باکتری‌های گرم منفی و هم باکتری‌های گرم مثبت و هم مخمر و هم قارچ میسلیال در برابر مواد ضد میکروب آزاد شده از بیوفیلیم حساس بوده‌اند و مانع رشد آنها می‌گردد. بررسی خاصیت ضد میکروبی در حضور شیر آلوده به ما نشان داد که به طور معنی‌داری خاصیت ضد میکروبی

قبل از بررسی خواص ضد میکروبی، رنگ بیوفیلیم باید مورد بررسی قرار می‌گرفت. رنگ بیوفیلیم نخست زرد، سپس قهوه‌ای و در نهایت بعد از دو هفته رنگ آن به طور کامل سیاه شد. البته رنگ بصورت عددی و نرم افزاری بررسی نشد که جزء محدودیت‌های این مطالعه است. علت این تغییر رنگ شاید به دلیل وجود آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز^۱ موجود در عصاره سیر باشد، به دلیل اینکه در این مطالعه ماده مخربی که باعث از بین رفتن آنزیم پلی فنل اکسیداز شود، استفاده نشده است. پلی فنل اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که سبب ایجاد رنگ قهوه‌ای در مواد غذایی می‌شوند. از این نظر واکنش‌های مربوطه، به قهوه‌ای شدن آنزیمی^۲ معروف است. پلی فنلاز یا فنلاز نیز به این گروه از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود. این آنزیم‌ها دارای فلز مس هستند و بدون وجود این عنصر قادر به فعالیت نمی‌باشند. این‌ها اورتو- دی هیدروکسی فنل^۳ را به اورتو- کینون^۴ تبدیل می‌کنند (Amito et al., 1992; Coseteng and lee, 1987). واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی، اکسایشی است و در صورت احیا می‌توان جلوی آنها را گرفت. پلی فنلاز باعث اکسایش می‌شود و نانوذره توانسته است روند اکسایش قهوه‌ای شدن را تسریع نماید. چنانچه در آینده از این بیوفیلیم جهت مقاصد تجاری استفاده گردد، می‌بایست این آنزیم با انواع روش‌های شیمیایی یا فیزیکی مهار گردد. حتی شاید بتوان با اضافه کردن رنگدانه‌های دلخواه رنگ مطلوب مورد پسند بازار نیز ایجاد نمود.

نتایج ضد میکروب بدون حضور ماده غذایی نشان داد که در بین میکروب‌های مورد بررسی *E. coli* بهترین جواب را داده بدین معنی که مواد آزاد شده از بیوفیلیم به طور صد در صد بر روی *E. coli* تأثیر داشته و این خاصیت تا ۶ هفته ادامه یافته است. اما در مورد سایر میکروب‌های مورد بررسی حداکثر توانایی بیوفیلیم در هفته سوم مشاهده گردید. یعنی طی این سه هفته حداکثر آزادسازی و حداکثر توان ضد میکروبی وجود دارد. در مورد سوش‌های قارچی نکته قابل توجه آنکه با گذر زمان از ۳ هفته به ۶ هفته مقدار هاله عدم رشد در حال کاهش بود و این امر شاید به دلیل خواص متفاوت بیوشیمیایی و فیزیولوژیک قارچ‌ها و

¹ Polyphenol Oxidases

² Enzymatic Browning

³ O- dihydroxyphenol

⁴ Ortho- quinone

150(2), 150-156.

Bordes, P., Pollet, E. & Avérous, L. (2009). Nano-biocomposites: biodegradable polyester / nanoclay systems. *Prog Poly M Sci*, 20, 125-55.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro. 2004. 03. 022.

Carpenter, R., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M. & Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bear berry extracts in raw and cooked pork. *Meat Sci.* 76, 604-610. doi: 10.1016/j.MEAT SCI.2007.01.021.

Chen, Y., Liu, C., Chang, P. R., Cao, X. & Anderson, D. P. (2009). Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: effect of hydrolysis time. *Carbohydr Poly M*, 76(4), 607-615.

Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Bleve-Zacheo, T., D'alessio, M., Zambonin, P. G. & Traversa, E. (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater*, 17, 5255-5262.

Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extending shelf life of meat-based products, *Meat Sci.*, 78, 90-103.

Coseteng, M. Y. & Lee, C. Y. (1987). Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J Food Sci.*, 52(4), 985-989.

Damm C, Münsted H, Rösch A. (2008). The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver nano- and microcomposites. *Mater Chem Phys.*, 108, 61-66.

De Azeredo, H. M. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res Int*, 42(9), 1240-1253.

Del Nobile, M. A., Conte, A., Incoronato, A. L. & Panza, O. (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *J Food Eng.*, 89, 57-63.

Durairaj S., Sangeetha, S. & Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). In vitro antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. *Electron J Biotech.*, 5, 5-10.

EC. (2009). EU guidance to the commission regulation on active and

بیوفیلیم سنتز شده بسیار بالا بوده و نسبت به کنترل، که حاوی هیچ گونه بیوفیلیمی نیست بار میکروبی شدیداً افت می نماید. می توان نتیجه گرفت که تا ۳ هفته بیوفیلیم سنتز شده تقریباً همه مواد ضد میکروب خود را تقریباً از دست داده و بار میکروبی تقریباً صفر می گردد. ولی بعد از آن بار میکروبی کمی شروع به افزایش می کند که این امر نیازمند مطالعات مستقل دیگری است.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی می باشد که در آزمایشگاه پژوهش یزد به انجام رسیده است. بدین وسیله از همکاری مدیریت آزمایشگاه پژوهش یزد تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

Alexandre, M. & Dubois, P. (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *MSE: R: Reports*, 28(1), 1-63.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. & Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J F SCI*, 57(4), 958-962.

Ankri S., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M. & Mirelman D. (1997). Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *ANTIMICROB AGENTS CH*, 10, 2286-2288.

Ankri, S. & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *MICROBES INFECT*, 2, 125-129.

Appendini, P. & Hotckie, J. (2002). Review of Antimicrobial Food Packaging. *INNOV Food Sci Emerg*, 3, 113-126.

Banon, S., Diaz, P., Rodriguez, M., Garrido, M. D. & Price, A. (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of flow sulphite beef patties. *MEAT SCI.* 77, 626-633. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.05.015.

Bi, L., Yang, L., Narsimhan, G., Bhunia, A. K. & Yao, Y. (2011). Designing carbohydrate nanoparticles for prolonged efficacy of antimicrobial peptide. *J Control Release*,

intelligent materials and articles intended to come into contact with food. European Commission.

Emiroglu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K. & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.*, 86(2), 283-288.

Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., Troncoso, O. P., Canet-Ferrer, J. & Martínez-Pastor, J. (2009). Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. *Mat Sci Eng.*, 29 (4), 1098-1104.

Gutierrez, L., Sánchez, C., Batlle, R. & Nerin, C. (2009). antimicrobial active package for bakery products. *Trends Food Sci Tech.*, 2092–99. doi: 10.1016/j.tifs.2008.11.003.

Hong, S. I., Park, J. D. & Kim, D. M. (2000). Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds, *Food Sci Biotechnol.*, 9, 38-42.

Hovana, E. K., James, U. S., James, E., Egbobor, E. M., Egba, A. G., Nwachukwu, O. A. & Akpama, O.U. (2011). Antibacterial and Phytochemical Studies of *Allium Sativum*. *New York Sci J.*, 4,124-128.

Ilic, D., Nikolic, V., Ciric, A., Soković, M., Stanojkovic, T., Kundakovic, T., Stankovic, M. & Nikolić, L. (2012). Cytotoxicity and antimicrobial activity of allicin and its transformation products. *J. Medi. Plants Research*, 6, 59-65.

Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S. H. & Behzadi, A. (2013). Antimicrobial activity of nanocellulose conjugated with allicin and lysozyme. *Cellulose*, 20(6), 2897-2907.

Joe, M. M., Jayachitra, J. & Vijayapriya, M. (2009). Antimicrobial activity of some common spices against certain human pathogens. *J. Med Plants R* 3, 1134-1136.

Morán, J. I., Vázquez, A. & Cyras, V. P. (2013). Bionanocomposites based on derivatized potato starch and cellulose, preparation and characterization. *J Mater Sci.*, 48(20), 7196-7203.

Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol.*, 1567–17. doi: 10. 1016 /j.ijfoodmicro. 2012.03.006.

Palaksha, M. N., Ahmed, M. & Das, S. (2010). Antibacterial activity of garlic extracts

on streptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* solely and in synergism with streptomycin. *J Nat Sci Biol Med.*, 1, 12-15.

Pandey, J. K., Kumar, A. P., Misra, M., Mohanty, A. K., Drzal, L. T. & Palsingh, R. (2005). Recent advances in biodegradable nanocomposites. *J Nanosci Nanotech O.*, 5(4), 497-526.

Rhim, J. W., Hong, S. I., Park, H. M. & Ng, P. K. W. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J AGR Food Chem.*, 54, 5814–5822.

Rhim, J. W. & Ng, P. K. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Crit Rev Food Sci.*, 47(4), 411-433.

Rhim, J. W., Park, H. M. & Ha, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog Poly M Sci.*, 38(10), 1629-1652.

Saad, B. & AlBureikan, M. O. (2013). Antimicrobial Activity of Garlic Juice (*Allium Sativum*), Honey, And Garlic-Honey Mixture On Some Sensitive and Multiresistant Microorganisms. *Life Sci J.*, 10(4).

Silveira, M. F. A., Soares, N. F. F., Geraldine, R. M., Andrade, N. J. & Goncalves, M. P. J. (2007). Antimicrobial efficiency and sorbic acid migration from active films into pastry dough. *Package Tech Sci.*, 20(4), 287-292.

Siró, I. & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 17(3), 459-494.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.*, 18, 463–470. doi: 10. 1006/ fmic. 2001.0415.

Sozer, N., Dogan, H. & Kokini, J. L. (2011). Textural properties and their correlation to cell structure in porous food materials. *J Agr Food Chem.*, 59(5), 1498-1507.

Victor I. U. & Igeleke, C. L. (2012). Antimicrobial properties of the extracts of locally sold garlic and neem leaf in Benin City, Nigeria. *Int J Biosci.*, 2, 21-27.

Wang, X., Du, Y., Yang, J., Wang, X., Shi, X. & Hu, Y. (2006). Preparation, characterization and antimicrobial activity of

chitosan/layered silicate nanocomposites. Polymer, 47, 6738–6744.