نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۶۵- ۷۵

بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های نانوکامپوزیتی برپایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ذرات اکسید روی و لیمونن برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

داوود نصیری*

استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد نقده، دانشگاه آزاد اسلامی، نقده، ایران.

دریافت مقاله: ۱۴ مهر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۲ آبان ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۲۳ آبان ۱۴۰۲

10.22034/nfvm.2024.419535.1206

چکیده

فساد میکروبی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان زیاد است و نانوکیتوزان، ذرات اکسید روی و لیمونن دارای فعالیت آنتی‌میکروبی هستند که می‌توانند برای نگهداری آن استفاده شوند. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی اکسید روی و لیمونن برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. در این مطالعه نانوکامپوزیت‌های نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن تهیه شدند و فعالیت آنتی‌باکتریایی آنها علیه *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* با کمک آزمون‌های حدأقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی (MICs و MBCs) به روش میکرودایلوشن بررسی شد. نمونه‌های فیله ماهی تهیه شد و با کمک فیلم‌های پوششی برای مدت یک هفته پوشش داده شدند. فعالیت آنتی‌باکتریایی علیه باکتری‌های مذکور و بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) بررسی شد. بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی برای هر دو آزمون MICs و MBCs به‌ترتیب در تیمارهای نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن، نانوکیتوزان/ لیمونن یا نانوکیتوزان/ اکسید روی و نانوکیتوزان مشاهده شد. بیشترین میزان بازها و کل باکتری‌های زنده و همچنین شمار *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* به‌ترتیب در تیمارهای نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن بیشتر بود ($P<0.05$). این نتایج نشان می‌دهد که فیلم‌های نانوکامپوزیتی برپایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ذرات اکسید روی و لیمونن دارای فعالیت آنتی‌میکروبی هستند و برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توانند استفاده شوند.

واژگان کلیدی: *کیتوزان، اکسید روی، لیمونن، ماهی قزل‌آلا، آنتی‌باکتریایی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: davodnasiri2020@gmail.com

مقدمه

فساد ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها، سالانه باعث از بین رفتن حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد از میوه‌ها و سبزیجات، ۳۵ درصد ماهی‌ها، ۳۰ درصد غلات و ۲۰ درصد از لبنیات و محصولات گوشتی می‌شود. در کشورهای کمتر توسعه یافته، بیشترین میزان از دست رفتن پس از برداشت، تا مرحله فرآوری رخ می‌دهد، در حالی که در کشورهای توسعه یافته، بیشترین سهم در تولید ضایعات مواد غذایی در سطح خرده فروشی و مشتری است (۱). قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یک گونه ماهی ارزشمند است که به دو شکل تازه و منجمد استفاده می‌شود و در برابر فساد میکروبی آسیب‌پذیر است (۲). بنابراین، بسته‌بندی این ماهی با ترکیبات فعال می‌تواند میزان این فساد را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد. بیشتر بسته‌بندی‌های مواد غذایی مورد استفاده در حال حاضر از مواد سلولزی یا پلیمرهای ارزان قیمت تهیه شده‌اند و نگرانی‌های زیست محیطی زیادی را در مورد آلودگی کوتاه مدت و بلندمدت ایجاد کرده‌اند و فاقد فعالیت ضد میکروبی هستند (۳- ۵). این عوامل صنایع غذایی را برای توسعه انواع جدیدی از مواد بسته‌بندی ضد میکروبی و زیست تخریب‌پذیر تحت فشار قرار می‌دهد. چنین مواد نوآورانه‌ای می‌توانند به‌طور قابل توجهی تکثیر باکتری‌ها و قارچ‌ها را کنترل کنند، فساد مواد غذایی را کاهش دهند، کیفیت و ایمنی غذا را افزایش دهند و ماندگاری طولانی‌تری را تضمین کنند (۶، ۷). با وجود این که بسیاری از پلیمرهای زیستی مانند سلولز، نشاسته، آلژینات و ... به‌عنوان مواد بسته‌بندی بررسی شده‌اند، تنها تعداد کمی از آنها فعالیت ضد باکتریایی دارند (۸). کیتوزان یک پلی‌ساکارید با فعالیت ضد باکتریایی در برابر سویه‌های گرم‌منفی است (۹). کیتوزان و مشتقات آن پلی‌ساکاریدهای زیست تخریب‌پذیر، غیر سمی و زیست سازگار، و همچنین دارای خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و کلاته کننده هستند (۱۰). کیتوزان یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای زیستی است و برای بسته‌بندی مواد خوراکی بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است، اما لایه‌های کیتوزان ساده مقاومت مکانیکی پایین و خواص بازدارندگی ضعیفی دارند (۱۱، ۱۲). افزودن نانوذرات به فیلم پلیمری زیستی برپایه‌ی کیتوزان، خصوصیات مکانیکی آن را تقویت می‌کند. برخی از نانوذرات مانند اکسید روی (ZnO) را می‌توان مستقیماً در ماتریس کیتوزان جاسازی کرد و مانند عوامل اتصال عرضی عمل می‌کند (۱۳). آنها دارای ساختار آنتی‌باکتریایی از طریق فعالیت فوتوکاتالیستی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که مسئول ایجاد تنش اکسیداتیو در غشای باکتری هستند (۱۴).

در ساختار فیلم‌های برپایه‌ی کیتوزان همچنین می‌نوان از مشتقات گیاهی برای افزایش دادن فعالیت آنتی‌باکتریایی استفاده کرد (۱۵). آن یک مونوترپن است که عمدتاً در مرکباتی مانند لیمو، گریپ فروت، پرتقال و غیره یافت می‌شود (۱۶). لیمونن یک ساختار خوشبوکننده و طعم‌دهنده است و از این رو در محصولاتی از لوازم آرایشی گرفته تا نوشیدنی‌ها و بستنی‌ها یافت می‌شود. لیمونن یک ترکیب فعال زیستی بالقوه است زیرا دارای خواص مختلفی مانند آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان، حشره‌کش و غیره است (۱۷). چندین مطالعه فعالیت آنتی‌باکتریایی لیمونن را گزارش کرده‌اند که می‌تواند برای بسته‌بندی مواد غذایی و پیشگیری از فساد مواد غذایی استفاده شود (۱۸، ۱۹).

با در نظر گرفتن فساد میکروبی بالای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوکیتوزان، ذرات اکسید روی و لیمونن، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های بر پایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی اکسید روی و لیمونن برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد.

مواد و روش‌ها

لیمونن با خلوص ۹۶ درصد و کیتوزان با درجه استیلاسیون تا ۸۵ درصد (وزن مولکولی متوسط)، از شرکت سیگما آلدریچ (شیمی، اشتاینهایم، آلمان) تهیه

شد. استات روی، از شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) تهیه شد. نانوذرات کیتوزان بر اساس مطالعات قبلی تهیه شد (۲۰). به‌طور خلاصه محلول کیتوزان با استفاده از اسیداستیک به نسبت ۱:۱۰۰ تهیه شد. برای تنظیم pH در ۵/۵۰، محلول آبی ۰/۲۰ مولار هیدروکسید سدیم به‌صورت قطره‌ای اضافه شد و به مدت ۰/۵۰ ساعت توسط پروب سونیکاتور (ساخت Dakshin، توان ۲۴۰ وات، قطر پروب ۱۸ میلی متر) سونیکیت شد. ۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی حاوی یک گرم از STPP به‌عنوان عامل اتصال عرضی اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/ اکسید روی همان‌طور که توسط مطالعات قبلی گزارش شده بود، تهیه شدند (۲۱). به‌طور خلاصه، پس از تهیه محلول استات روی در آب دیونیزه، محلول استات به مدت ۱۵ دقیقه روی s-off 5s۴ به‌صورت پالس سونیکاسیون شد. برای سونیکاسیون محلول، محلول NaOH با سرعت ۱۰ میلی‌لیتر در دقیقه به آن اضافه شد و رسوبات به دست‌آمده فیلتر، شسته و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک و سپس پودر شدند. برای تهیه نانوکامپوزیت کیتوزان/ اکسید روی، محلول به دست‌آمده با اکسید روی (۱٪ w/v) تیمار شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق تحت سونیکاسیون قرار گرفت. پس از سونیکاسیون، مانند مرحله قبل، محصول به‌صورت قطره قطره در STPP و NaOH ریخته شد تا هیدروژل تشکیل شود. برای تهیه‌ی نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/ لیمونن، کیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن حاوی ۰/۲۰ درصد وزن/ حجمی از لیمونن، ۶/۵۰ میلی‌لیتر از لیمونن در محلول‌ها اضافه شد و سپس به آرامی در محلول به دست‌آمده از مرحله اول و دوم قبل از افزودن به محلول STPP تحت شرایط ثابت قطره قطره اضافه شد. با هم‌زدن برای تشکیل یک امولسیون پایدار، سپس برای تولید هیدروژل در STPP ریخته شد. محصولات پیوند متقابل این نانوکامپوزیت‌ها در یک ظرف پتری ریخته شدند، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و سپس در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت دیگر منجمد شدند. برای به دست آوردن محصولات نهایی، نمونه منجمد به مدت ۴۸ ساعت در خشک‌کن فریز (Christ, Alpha, 1-4) لیوفیلیز شد و برای تجزیه و تحلیل نگهداری شد.

برای بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی، پانلی از میکروارگانیسم‌ها شامل *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 19118) به‌عنوان باکتری گرم‌مثبت و همچنین *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028) و *اشریشیاکلی* (ATCC 10536) به‌عنوان باکتری گرم‌منفی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران- ایران) تهیه شد. حدأقل غلظت‌های بازدارنده و کشندگی (MICs و MBCs) به روش میکرودایلوشن بررسی شد (۲۲). سوسپانسیون باکتریایی توسط سالین استریل برای غلظت 10^5 CFU/mL × ۱/۰۰ تنظیم شد و رقت‌هایی در غلظت های بین ۲۰/۰۰-۰/۰۷۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. صفحات میکرو دایلوشن استریل ۹۶ چاهکی آماده شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. MBC به‌عنوان کمترین غلظت بدون رشد قابل مشاهده و/ یا با مرگ ۹۹/۵۰ درصد تلقیح اولیه در نظر گرفته شد. چگالی نوری هر چاهک در طول موج ۶۵۵ نانومتر توسط Bio-Rad Laboratories (Microplate manager 4.0) در نظر گرفته شد و با یک بلانک و کنترل مثبت مقایسه شد. استرپتومایسین به نوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام شد.

نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) از یک بازار محلی خریداری شد. ماهی‌ها به فیله‌های کوچک (هر کدام ۴۵ گرم، ۵ × ۲ × ۳ سانتی‌متر مکعب) بریده شدند، و سطوح بالایی و پایینی فیله‌ها با فیلم‌هایی (۷ سانتی‌متر × ۷ سانتی‌متر) پوشیده شدند، همان‌گونه که توسط مطالعات قبلی گزارش شد (۲۳). تمام نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شدند. نمونه‌ها در ۵ گروه قرار گرفتند و در هر گروه ۵ نمونه قرار داشت. نمونه‌های ماهی برای مدت ۷ روز برای آزمایش‌های باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفتند و با فیلم‌های نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ لیمونن، نانوکیتوزان، اکسید روی و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن پوشش داده شدند. یک گروه نیز بدون پوشش و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

برای بررسی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC)، نمونه‌ها برای مدت زمان ۴ روز نگهداری شدند. بازهای ازته فرار بر اساس مطالعات دیگر اندازه‌گیری شد (۲۴). به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از نمونه‌ها همگن شده، با کمک تقطیر بخار کجلدال با محلول آبی هیدروکسید سدیم ۳۰ درصد (w/v) و اسیدبوریک آبی ۴ درصد (v/v) استخراج شد که در برابر ۰/۰۱ نیوتن اسید هیدروکلریک تیتر شد و مقادیر گزارش شد. میزان کل باکتری‌های زنده بر اساس مطالعات قبلی اندازه‌گیری شد (خشنودی نیا، موسوی‌نسب، نصیری و عظیمی‌فر، ۲۰۱۸). به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از هر نمونه ماهی ابتدا خرد شد و به ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۹۰ درصد استریل شده منتقل شد و همگن شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر نمونه از هر رقت با آگار شمارش پلیت (Beijing Aoboxing Bio-tech Co., Ltd., Beijing, China) در ظروف پتری مخلوط شد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد و شمارش شد. برای اندازه‌گیری pH، نمونه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شدند. مخلوط‌ها فیلتر شده و PH آنها با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد.

فعالیت‌های آنتی‌باکتریایی فیلم‌ها بر روی فیله‌ها بر اساس مطالعات قبلی ارزیابی شد (۲۵). به‌طور خلاصه، فیلم‌ها تهیه و با کمک اشعه ماوراء بنفش به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. فیله‌ها (۵×۲×۳ سانتی‌متر مکعب) با باکتری‌های اشاره شده در بخش‌های قبلی با استفاده از میکروپیپت‌ها به‌صورت جداگانه تا غلظت نهایی تلقیح شدند. روی سطح فیله‌ها، 10^5 CFU/cm^2 از باکتری‌ها تلقیح شد و با فیلم‌هایی که قبلاً ذکر شد پوشانده شدند و در دمای ۲±۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس شمارش شدند.

آنالیزها در پنج تکرار انجام شد و برای اثرات تیمارها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد و مقادیر معنی‌داری بالاتر از ۰/۰۵ بود، بنابراین داده‌ها نرمال بودند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱، SPSS Inc، Chicago، IL) و آنالیز واریانس یک راهه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارها توسط نرم‌افزار Graph Pad Prism (نسخه ۶/۰۷) ترسیم شدند.

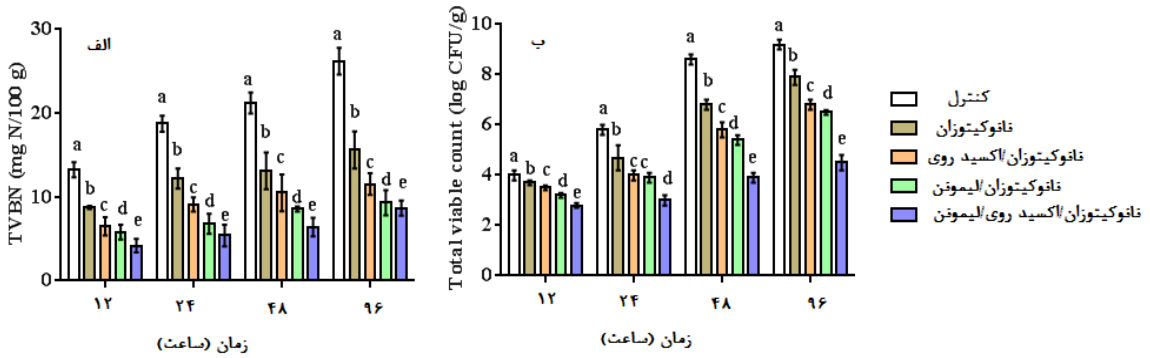
نتایج

جدول ۱ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه شده علیه باکتری‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که تیمار کنترل فاقد هرگونه فعالیت آنتی‌باکتریایی بود و نتایج آن در جدول ارائه نشد. با این حال، نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی برای هردو آزمون به‌ترتیب در تیمارهای استرپتومایسین، نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن، نانوکیتوزان/ لیمونن یا نانوکیتوزان/ اکسید روی و نانوکیتوزان مشاهده شد. غلظت‌های ۲ برابری برای فعالیت کشندگی در مقایسه با مهارکنندگی نیاز بود. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن اکسید روی و لیمونن باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی می‌شود. فیلم‌های تهیه شده بر روی تمام باکتری‌ها اثرات نسبتاً مشابهی را نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که بکارگیری اکسید روی و لیمونن به‌طور همزمان باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی در مقایسه با حالت مجزا می‌شود.

جدول ۱- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های تهیه شده در آزمون‌های MIC و MBC

MIC (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)			
باکتری‌ها	لیستریا مونوسیتوژنز	سالمونلا تیفی‌موریوم	اشریشیاکلی
نانوکیتوزان	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
نانوکیتوزان/ اکسید روی	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
نانوکیتوزان/ لیمونن	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵
استرپتومایسین	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲
MBC (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)			
باکتری‌ها	لیستریا مونوسیتوژنز	سالمونلاتیفی‌موریوم	اشریشیاکلی
نانوکیتوزان	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
نانوکیتوزان/ اکسید روی	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
نانوکیتوزان/ لیمونن	۵/۰۰	۵/۰۰	۵/۰۰
نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن	۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵
استرپتومایسین	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵	۰/۶۲۵

شکل ۱، تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با گذشت زمان، میزان بازها و کل باکتری‌های زنده به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. بر اساس نتایج این مطالعه، بیشترین میزان بازها و کل باکتری‌های زنده به‌ترتیب در تیمارهای کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن بیشتر بود ($P<0.05$). نتایج برای مقادیر بازهای ازته فرار در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن در زمان ۱۲ ساعت به‌ترتیب ۰/۸۹ ±۱۳/۲۵، ۰/۲۰ ±۸/۷۵، ۱/۱۰ ±۶/۵۰، ۰/۸۹ ±۵/۸۰ و ۰/۸۰ ±۴/۲۰ بودند، در حالی که در زمان ۲۴ ساعت، مقادیر به‌ترتیب ۰/۹۶ ±۱۸/۷۵، ۱/۲۰ ±۱۲/۲۰، ۰/۸۵ ±۹/۱۰، ۱/۲۰ ±۶/۸۰ و ۱/۳۰ ±۵/۴۰ بودند. نتایج برای زمان ۴۸ ساعت در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن برای بازهای ازته فرار به‌ترتیب ۰/۲۵ ±۲۱/۲۰، ۲/۲۰ ±۱۳/۱۰، ۲/۲۰ ±۱۰/۵۰، ۰/۳۰ ±۸/۵۶ و ۱/۱۰ ±۶/۴۰ بودند، در حالی که در زمان ۹۶ ساعت در همین گروه‌ها به‌ترتیب ۱/۶۰ ±۲۶/۲۰، ۲/۲۰ ±۱۵/۶۰، ۰/۳۰ ±۱۱/۵۳، ۱/۵۰ ±۹/۳۲ و ۰/۹۰ ±۸/۶۹ بودند. در رابطه با میزان کل باکتری‌های زنده، مقادیر در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن در زمان ۱۲ ساعت به‌ترتیب ۰/۲۰ ±۴/۰۰، ۰/۱۰ ±۳/۷۰، ۰/۱۰ ±۳/۵۰، ۰/۱۰ ±۳/۲۰ و ۰/۱۰ ±۲/۸۰ بودند، در حالی که در زمان ۲۴ ساعت، مقادیر به‌ترتیب ۰/۲۰ ±۵/۸۰، ۰/۵۰ ±۴/۷۰، ۰/۲۰ ±۴/۰۰، ۰/۲۰ ±۳/۹۰ و ۰/۲۰ ±۰/۳ بودند. نتایج برای زمان ۴۸ ساعت در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن برای میزان کل باکتری‌های زنده به‌ترتیب ۰/۲۰ ±۸/۶۰، ۰/۲۰ ±۶/۸۰، ۰/۳۰ ±۵/۸۰، ۰/۲۰ ±۵/۴۰ و ۰/۲۰ ±۳/۹۰ بودند، در حالی که در زمان ۹۶ ساعت در همین گروه‌ها به‌ترتیب ۰/۲۰ ±۹/۲۰، ۰/۳۰ ±۷/۹۰، ۰/۲۰ ±۶/۸۰، ۰/۱۰ ±۶/۵۰ و ۰/۳۰ ±۵۰/۴ بودند. این نتایج نشان می‌دهد که کیتوزان می‌تواند در مقایسه با کنترل، اثرات مثبتی در کاهش دادن میزان بازها و کل باکتری‌های زنده داشته باشد. بر اساس یافته‌ها، کیتوزان و اکسید روی اثرات هم‌افزایی در کاهش دادن میزان بازها و کل باکتری‌های زنده دارند.

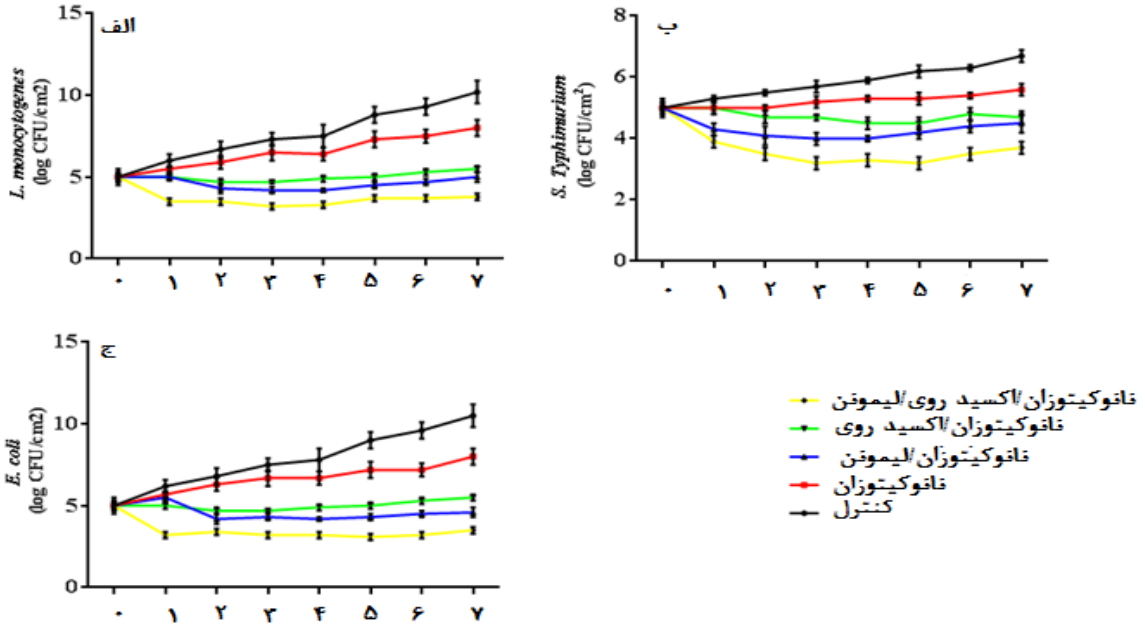


شکل ۱- تأثیر فیلم‌های پوششی بر روی بازهای ازته فرار (TVBN) و میزان کل باکتری‌های زنده (TVC) نمونه‌های ماهی در طی ۹۶ ساعت

حروف غیر مشابه اختلافات معنی‌دار در طی همان زمان را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد.

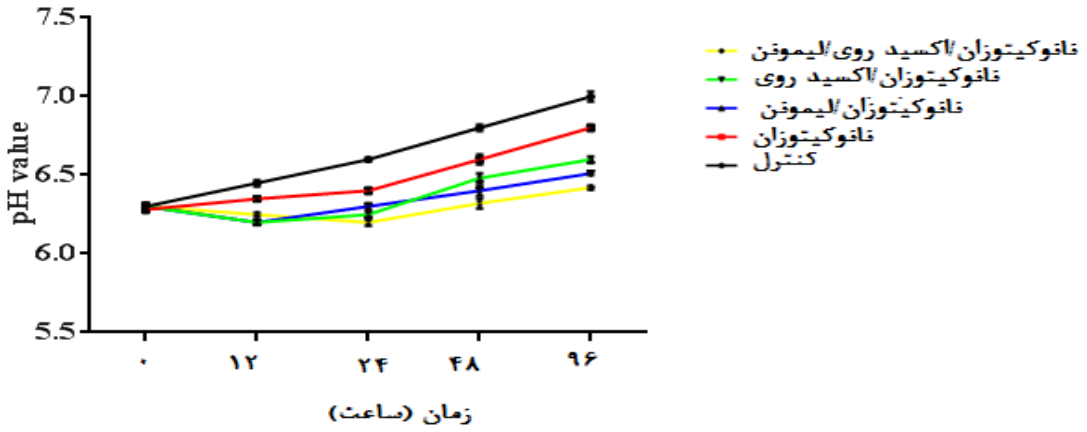
شکل ۲ فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی بر روی نمونه‌های ماهی در طی ۷ روز را نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه همراستا با بخش قبلی بود و بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی به‌ترتیب نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن، نانوکیتوزان/ لیمونن، نانوکیتوزان/ اکسید روی و نانوکیتوزان مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که افزودن اکسید روی و به‌طور قابل توجهی لیمونن، باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی می‌شود و بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریایی زمانی مشاهده می‌شود که ترکیبی از لیمونن و اکسید روی در ساختار فیلم وجود داشته باشد.

نتایج برای تمام باکتری‌ها و در تمامی گروه‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌باکتریایی در زمان بررسی اولیه حدود ۵ بود که در گروه کنترل در *لیستریا* و *اشریشیاکلی* به مقدار ۱۰ واحد در زمان ۷ روز رسید، در حالی که برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* به مقدار ۶ واحد در انتها رسید. این نتایج همچنین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت باکتریایی به‌ترتیب در گروه‌های نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن برای تمامی باکتری‌ها بود.



شکل ۲- فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های پوششی بر روی نمونه‌های ماهی در طی ۷ روز

شکل ۳ مقادیر pH نمونه‌های فیله در زمان‌های مختلف بر حسب ساعت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که مقادیر در زمان آغاز در تمامی گروه‌ها ۶/۳۰ با انحراف معیار بسیار پایین ۰/۰۲ بودند. نتایج برای زمان ۱۲ ساعت نشان داد که مقادیر به‌ترتیب در گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن ۰/۰۲ ± ۶/۴۵، ۰/۰۱ ± ۶/۳۵، ۰/۰۱ ± ۶/۲۰، ۰/۰۱ ± ۶/۲۰ و ۰/۰۱ ± ۶/۲۵ بودند و در زمان ۲۴ ساعت به‌ترتیب در همان گروه‌ها، ۰/۰۱ ± ۶/۶۰، ۰/۰۲ ± ۶/۴۰، ۰/۰۲ ± ۶/۲۵، ۰/۰۲ ± ۶/۳۰ و ۰/۰۲ ± ۶/۳۰ بودند. نتایج برای گروه کنترل در زمان ۴۸ ساعت برای گروه‌های کنترل، نانوکیتوزان، نانوکیتوزان/ اکسید روی، نانوکیتوزان/ لیمونن و نانوکیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن به‌ترتیب ۰/۰۱ ± ۶/۸۰، ۰/۰۲ ± ۶/۶۰، ۰/۰۲ ± ۶/۴۸، ۰/۰۲ ± ۶/۴۰ و ۰/۰۲ ± ۶/۳۲ بودند و در زمان ۹۶ ساعت در همان گروه‌ها به‌ترتیب ۰/۰۳ ± ۷/۰۰، ۰/۰۲ ± ۶/۸۰، ۰/۰۲ ± ۶/۶۰، ۰/۰۱ ± ۶/۵۱ و ۰/۰۱ ± ۶/۴۲ بودند.



شکل ۳- مقادیر pH نمونه‌های فیله در زمان‌های مختلف بر حسب ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی فیلم‌های نانوکامپوزیتی برپایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ذرات اکسید روی و لیمونن برای نگهداری نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. نتایج این مطالعه در بخش آزمایشگاهی و برروی نمونه‌های ماهی نشان داد که نانوکیتوزان دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیفی است. سازوکارهای آنتی‌باکتریال کیتوزان شامل تخریب کردن غشای سلولی و دیواره سلولی، کلاته کردن مقدار زیادی از کاتیون‌های فلزی، تعامل کردن با اهداف داخل سلولی و ساکن کردن باکتری‌ها است. مطالعات زیادی در زمینه‌ی آزمایشگاهی و روی موجودات زنده، اثرات آنتی‌باکتریایی کیتوزان را گزارش کرده‌اند (۲۶، ۲۷). زمانی که کیتوزان با وزن مولکولی زیاد در محلول‌های آبی اسیدی حل می‌شود، گروه‌های NH2 به کاتیون‌های $NH3^{+}$ پروتون‌دار می‌شوند و تعامل الکترواستاتیکی بین $NH3^{+}$ و لیپوپلی‌ساکاریدها روی غشای سلولی باکتری‌های گرم‌منفی یا تیکویک اسیدها روی باکتری‌های گرم‌مثبت منجر به عدم تعادل در ساخت دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شود. تخریب غشای سلولی می‌تواند از طریق نشت یون‌هایی همانند پتاسیم، فسفات صورت گیرد. در مطالعاتی نشان داده شد که مولکول‌های کیتوزان به سطح باکتری‌ها می‌چسبند، دیواره سلولی را تخریب می‌کنند و باعث نشت مواد باکتریایی به بیرون می‌شوند (۲۸). کیتوزان یک ماده کلاته‌کننده است. زمانی که اسیدیته به زیر نقطه ایزو الکتریک می‌رسد یون‌های پروتون‌دار

آمونیوم در زنجیره‌های مولکولی توسط بارهای منفی جذب می‌شوند. کیتوزان و مشتقات آن کاتیون‌های دی‌والان را کلاته می‌کند و باعث ایجاد نابرابری و نهایتاً تخریب غشای سلولی می‌شوند (۲۹). نتایج نشان داد که افزودن اکسید روی باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی شد. مطالعات فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات ZnO را از طریق آزادسازی یون روی (Zn2+)، جلوگیری از متابولیسم اسیدهای آمینه و اختلال در سیستم آنزیمی و تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در باکتری‌ها و مرگ باکتریایی گزارش کرده‌اند (۳۰). در این مطالعه، افزودن لیمونن نیز باعث افزایش قابل توجه فعالیت آنتی‌میکروبی فیلم‌ها شد. سازوکار آنتی‌باکتریایی لیمونن از طریق تخریب کردن و نفوذ در ساختار لیپیدی دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها است که از این طریق پروتئین‌های غشای سلولی تخریب می‌شوند و باعث مرگ باکتری می‌شوند (۳۱). در مجموع هر سه ساختار دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی هستند و از طریق اثرات هم‌افزایی فعالیت آنتی‌باکتریایی خود را بیشتر نشان می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهد که برای داشتن یک فعالیت آنتی‌باکتریایی باید تمامی اجزاء وجود داشته باشد. نتایج این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی تفاوتی بین کیتوزان/ لیمونن و کیتوزان/ اکسید روی نشان نداد. با این حال، در نمونه‌های ماهی کیتوزان/ لیمونن کارایی بهتری نشان داد که این اختلاف ممکن است به‌علت شرایط کشت و یا محیط کشت ممکن است باشد. در مجموع، ترکیبی از هر سه جزء می‌تواند به‌طور قابل توجهی از رشد میکروب‌ها طی ۷ روز جلوگیری کند که این اثر برای نگهداری نمونه‌های ماهی ارزشمند است. ذکر این نکته ضروری است که در تمامی گروه‌ها، باکتری‌ها به‌صورت فزاینده‌ای رشد می‌کنند ولی در گروه هر سه جزء سرعت آهنگ این رشد بسیار کند است.

میزان کل باکتری‌های زنده، در گروه‌های ترکیب اکسید روی/ لیمونن در مقایسه با فرم جداگانه بیشتر بود و در گروه کیتوزان پائین‌تر بود. این نتایج همراستا با نتایج بخش شمارش باکتریایی بود. مطالعات 10^6 CFU/g را برای قزل‌آلای رتگین‌کمان به‌عنوان آستانه پیشنهاد کرده‌اند (۳۴). نتایج این مطالعه نشان داد که در زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت در گروه کنترل، مقادیر بیش از آستانه بود. در حالی که در دیگر گروه‌ها، این مقادیر در زمان ۹۶ ساعت، این حدود بود. تنها استثناء گروه کیتوزان/ اکسید روی/ لیمونن بود که در تمامی زمان‌ها پایین‌تر از آستانه بود. TVC برای مطالعه کیفیت میکروبیولوژیکی غذاها در نظر گرفته می‌شود. نتایج برای TVC نتایج را برای تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیکی تأیید می‌کند. معمولاً از TVC به‌عنوان شاخصی برای تازگی گوشت استفاده می‌شود. ظاهراً فیلم‌های تهیه شده، تعداد باکتری‌ها و متعاقباً مقادیر TVC را کاهش می‌دهند. در مجموع، نتایج این بخش نیز بر اثرات هم‌افزایی بین اکسید روی/ لیمونن تأکید دارد و این دو میزان باکتری‌ها را کاهش می‌دهند و می‌توانند برای نگهداری ماهی استفاده شوند.

مقدار pH در فیلم‌های دیگر پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت و در گروه کنترل از ۲۴ ساعت افزایش یافت. اگرچه pH افزایش یافته در گروه کنترل ۰/۷ بود، اما تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. همان‌طور که برای TVBN نشان داده شده است، می‌توان افزایش pH را به افزایش پایه‌های فرار تولید شده نسبت داد و اثرات منفی بر کیفیت نمونه‌ها دارد. نتایج برای pH با نتایج به دست آمده برای TVBN مطابقت دارد.

در مجموع فیلم‌های برپایه‌ی نانوکیتوزان و حاوی ترکیبی از اکسید روی و لیمونن توانستند به‌طور قابل توجهی فعالیت آنتی‌میکروبی نشان دهند و در شرایط ترکیبی اثرات بهتری در مقایسه با فرم جداگانه داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که این دو ترکیب می‌توانند برای پوشش دادن فیله‌های ماهی استفاده شوند و از فساد نمونه‌های ماهی جلوگیری کند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان ساختارهای محیط زیست دوست در صنعت استفاده شوند. فیلم‌های تولیدی دارای قابلیت استفاده در صنعت بسته‌بندی ماهی و برای پوشش دادن فیله‌های

ماهی هستند و همچنین به‌علت ساختار تجزیه‌پذیر می‌توانند به‌عنوان پوشش‌های آنتی‌باکتریایی قابل تجزیه استفاده شوند.

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که در اجرای این تحقیق همکاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1- Motelica L, Ficai D, Ficai A, Truşcă R D, Ilie CI, Oprea OC, *et al.* Innovative antimicrobial chitosan/ZnO/Ag NPs/citronella essential oil nanocomposite—Potential coating for grapes. *Foods*. 2020; 9(12): 1801.

2- Rastiani F, Jebali A, Hekmatimoghaddam SH, Sadrabad EK, Mohajeri FA, Dehghani-Tafti A. Monitoring the freshness of rainbow trout using intelligent PH-sensitive indicator during storage. *Nutr. Food Sec*. 2019.

3- Motelica L, Ficai D, Oprea OC, Ficai A, Andronescu E. Smart food packaging designed by nanotechnological and drug delivery approaches. *Coatings*. 2020; 10(9): 806.

4- Lemnaru GM, Truşcă RD, Ilie CI, Ţiplea RE, Ficai D, Oprea O, *et al.* Antibacterial activity of bacterial cellulose loaded with bacitracin and amoxicillin: In vitro studies. *Molecules*. 2020; 25(18): 4069.

5- Makaremi M, Yousefi H, Cavallaro G, Lazzara G, Goh CBS, Lee SM, *et al.* Safely dissolvable and healable active packaging films based on alginate and pectin. *Polymers*. 2019; 11(10): 1594.

6- Flórez M, Guerra-Rodríguez E, Cazón P, Vázquez M. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloid*. 2022; 124: 107328.

7- Pires J, Paula CDd, Souza VGL, Fernando AL, Coelhoso I. Understanding the barrier and mechanical behavior of different nanofillers in chitosan films for food packaging. *Polymers*. 2021; 13(5): 721.

8- Radulescu M, Ficai D, Oprea O, Ficai A, Andronescu E, M Holban A. Antimicrobial chitosan based formulations with impact on different biomedical applications. *Curr. Pharma. Biotechnol*. 2015; 16(2): 128-36.

9- Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol*. 2004; 21(6): 14-25.

10- Cazón P, Vázquez M. Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. *Environ. Chem. Lett.* 2020; 18(2): 257-67.

11- Gingasu D, Mindru I, Patron L, Ianculescu A, Vasile E, Marinescu G, *et al.* Synthesis and characterization of chitosan-coated cobalt ferrite nanoparticles and their antimicrobial activity. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater*. 2018; 28: 1932-41.

12- Anaya-Esparza LM, Ruvalcaba-Gómez JM, Maytorena-Verdugo CI, González-Silva N, Romero-Toledo R, Aguilera-Aguirre S, *et al.* Chitosan-TiO2: A versatile hybrid composite. *Materials*. 2020; 13(4): 811.

13- Avramescu SM, Butean C, Popa CV, Ortan A, Moraru I, Temocico G. Edible and functionalized films/coatings—Performances and perspectives. *Coatings*. 2020; 10(7): 687.

14- Kumar S, Mudai A, Roy B, Basumatary IB, Mukherjee A, Dutta J. Biodegradable hybrid nanocomposite of chitosan/gelatin and green synthesized zinc oxide nanoparticles for food packaging. *Foods*. 2020; 9(9): 1143.

15- Caputo L, Cornara L, Bazzicalupo M, De Francesco C, De Feo V, Trombetta D, *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oils from peels of three citrus species. *Molecules*. 2020; 25(8): 1890.

16- Roy S, Rhim J-W. Fabrication of copper sulfide nanoparticles and limonene incorporated pullulan/carrageenan-based film with improved mechanical and antibacterial properties. *Polymers*. 2020; 12(11): 2665.

17- Gupta A, Jeyakumar E, Lawrence R. Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in Escherichia coli. *Sci. Report*. 2021; 11(1): 13816.

18- Lan W, Wang S, Chen M, Sameen DE, Lee K, Liu Y. Developing poly (vinyl alcohol)/chitosan films incorporate with d-limonene: Study of structural, antibacterial, and fruit preservation properties. *Int. J. Biol.Macromol*. 2020; 145: 722-32.

19- Sun P, Wang Y, Huang Z, Yang X, Dong

F, Xu X, *et al.* Limonene-thioctic acid-ionic liquid polymer: A self-healing and antibacterial material for movement detection sensor. *Ind. Crops Prod*. 2022; 189: 115802.

20- Chandra Hembram K, Prabha S, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artif. cells, Nanomed. Biotechnol*. 2016; 44(1): 305-14.

21- Bhanvase B, Veer A, Shirsath S, Sonawane S. Ultrasound assisted preparation, characterization and adsorption study of ternary chitosan-ZnO-TiO2 nanocomposite: Advantage over conventional method. *Ultrason. Sonochem*. 2019; 52: 120-30.

22- Rostami H, Kazemi M, Shafiei S. Antibacterial activity of Lavandula officinalis and Melissa officinalis against some human pathogenic bacteria. *Asian J Biochem*. 2012; 7(3): 133-42.

23- Chang S-H, Chen Y-J, Tseng H-J, Hsiao H-I, Chai H-J, Shang K-C, *et al.* Antibacterial activity of chitosan–polylactate fabricated plastic film and its application on the preservation of fish fillet. *Polymers*. 2021; 13(5): 696.

24- Amegovu AK, Sserunjogi ML, Ogwok P, Makokha V. Nucleotide degradation products, total volatile basic nitrogen, sensory and microbiological quality of Nile perch (Lates niloticus) fillets under chilled storage. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*. 2012; 2(2): 653-66.

25- Woraprayote W, Pumpuang L , Tosukhowong A, Zendo T, Sonomoto K, Benjakul S, *et al.* Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. *LWT*. 2018; 89: 427-33.

26- Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. Processes. 2020;8(9):1173.

27- Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *Europ. Polym. J*. 2020; 138: 109984.

28- Yilmaz Atay H. Antibacterial activity of chitosan-based systems. Functional chitosan: drug delivery and biomedical applications. 2019: 457-89.

29- Dai X, Li S, Li S, Ke K, Pang J, Wu C, *et al.* High antibacterial activity of chitosan films with covalent organic frameworks immobilized silver nanoparticles. *Int. J. Biol.Macromol*. 2022; 202: 407-17.

30- Abbasabadi OR, Farahpour MR, Tabatabaei ZG. Accelerative effect of nanohydrogels based on chitosan/ZnO incorporated with citral to heal the infected full-thickness wounds; an experimental study. *Int. J. Biol.Macromol*. 2022; 217: 42-54.

31- Turina AdV, Nolan M, Zygadlo J, Perillo M. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem*. 2006; 122(2): 101-13.

32- Khoshnoudi-Nia S, Moosavi-Nasab M. Comparison of various chemometric analysis for rapid prediction of thiobarbituric acid reactive substances in rainbow trout fillets by hyperspectral imaging technique. *Food Sci. Nutr*. 2019; 7(5): 1875-83.

33- Moosavi-Nasab M, Khoshnoudi-Nia S, Azimifar Z, Kamyab S. Evaluation of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish fillets using hyperspectral imaging coupled with deep learning neural network and meta-analysis. *Sci. Report*. 2021; 11(1): 5094.

34- Javan AJ, Bolandi M, Jadidi Z, Parsaeimehr M, Vayeghan AJ. Effects of Scrophularia striata water extract on quality and shelf life of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets during superchilled storage. *Iran. J. Vet. Res*. 2015; 16(2): 213.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 7, Issue 1, Spring & Summer 2024, pages: 65-75

Investigating the antibacterial activity of nanocomposite films based on nano-chitosan and containing zinc oxide and limonene for preserving rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) samples

Davoud Nasiri

Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Naghadeh Branch, Islamic Azad University, Naghadeh, Iran.

Receive: October 6, 2023; Revise: November 3, 2023; Accept: November 14, 2023

10.22034/nfvm.2024.419535.1206

Summary

Microbial spoilage is high in rainbow trout and nano-chitosan, zinc oxide and limonene have antimicrobial activity that can be used for its preservation. Therefore, this study was conducted to investigate the antibacterial activity of films based on nano-chitosan and containing zinc oxide and limonene for preserving rainbow trout. In this study, nano-chitosan, nano-chitosan/zinc oxide, nano-chitosan/limonene and nano-chitosan/zinc oxide/limonene nanocomposites were prepared and their antibacterial activities against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were investigated by microdilution method with the help of minimum inhibitory and/or bactericidal concentration tests (MICs and MBCs). Fish fillet samples were prepared and coated with the help of film for one week. Antibacterial activity against the mentioned bacteria and total volatile basic nitrogen (TVBN) and total viable count (TVC) were investigated. The highest antibacterial activity for both MIC and MBC tests was observed in nanochitosan/zinc oxide/limonene, nano-chitosan/limonene or nano-chitosan/zinc oxide and nano-chitosan treatments, respectively. The highest amount of TVC and TVBN as well as the count of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were higher in nano-chitosan, nano-chitosan/zinc oxide, nano-chitosan/limonene and nano-chitosan/zinc oxide/limonene treatments, respectively ($P<0.05$). These results show that nanocomposite films based on nano-chitosan and containing zinc oxide and limonene have antimicrobial activity and can be used to preserve rainbow salmon samples.

Keywords: *Chitosan, zinc oxide, limonene, rainbow trout, antibacterial*