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

دوره ۹، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۵، ۱۵- ۳۱

سنتز، ارزیابی آزمایشگاهی و پایلوت میدانی کوتاه‌مدت نانوپوشش سلنیوم، نقره، دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی در سالن مرغداری لاین آرین

حمیدرضا ستاری[۱]، ابوالفضل میرزاپور*[۱،۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، نانوبیوتکنولوژی، علوم زیستی، تربیت مدرس، تهران- ایران
۲- استادیار، نانوبیوتکنولوژی، علوم زیستی، تربیت مدرس، تهران- ایران
* **نویسنده مسوول**:دکترای تخصصی نانوبیوتکنولوژی آدرس: دانشگاه تربیت مدرس – تلفن تماس: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۴۵– فکس: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۴۵ – ایمیل: a.mirzapour@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۲۰ خرداد ۱۴۰۵، بازنگری: ۱۹ مرداد ۱۴۰۵، پذیرش نهایی: ۳۰ مرداد ۱۴۰۵

10.22034/nfvm.2026.585918.1316

چکیده

افزایش مقاومت میکروبی و چالش‌های بهداشتی مرتبط با تراکم بالای پرندگان، ضرورت توسعه راهکارهای جایگزین برای کنترل عوامل میکروبی را افزایش داده است. این پژوهش با هدف سنتز و ارزیابی یک نانوپوشش ترکیبی حاوی سلنیوم، نقره، دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی در یک رزین پلیمری و بررسی آن در یک پایلوت میدانی کوتاه‌مدت در سالن مرغداری لاین آرین انجام شد. مورفولوژی پوشش با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی و میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد؛ طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس برای بررسی حضور موضعی عناصر معدنی و پراش پرتو ایکس به‌صورت جداگانه برای شناسایی فازهای بلوری اجزای معدنی به‌کار رفت. فعالیت ضدباکتریایی علیه *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* بر اساس ISO 22196 و فعالیت ضدقارچی علیه *Candida glabrata* با روش ریزرقیق‌سازی بررسی شد. در پایلوت میدانی، بار میکروبی سه زون ثابت کف سالن پیش از اعمال پوشش و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آن اندازه‌گیری شد. شاخص فعالیت ضدباکتریایی (R) برای *E. coli* و *S. aureus* به‌ترتیب ۲/۰۳ و ۲/۱۱ بود و فعالیت ضدقارچی علیه *C. glabrata* نیز مشاهده شد. تصاویر میکروسکوپی پراکندگی نسبتاً مناسب ذرات را در نواحی بررسی‌شده، همراه با تجمع موضعی، نشان دادند. اعمال پوشش در فاز میدانی با کاهش کوتاه‌مدت بار باکتریایی و قارچی طی ۴۸ ساعت همراه بود. با این‌حال، نبود زون شاهد همزمان، تعداد محدود زون‌های مورد بررسی و کوتاه بودن دوره‌ی پایش، ضرورت انجام مطالعات کنترل‌شده، بزرگ‌تر و طولانی‌تر را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: *بار میکروبی، فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت ضدقارچی، مقاومت ضدمیکروبی*

مقدمه

افزایش مقاومت میکروبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از جدی‌ترین چالش‌های بهداشت عمومی و دامپروری در سطح جهانی و ملی محسوب می‌شود (۱-۳). صنعت مرغداری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بخش‌های تولید پروتئین حیوانی در ایران، به‌دلیل تراکم بالای پرندگان، شرایط محیطی محدود و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، با خطر بالای شیوع بیماری‌های باکتریایی و قارچی مواجه است (۳, ۴). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از مرغداری‌های ایران رو به افزایش است (۵-۸). این عوامل نه تنها باعث خسارات اقتصادی قابل توجه می‌شوند، بلکه می‌توانند منجر به انتقال عوامل بیماری‌زا به انسان نیز گردند.

در سال‌های اخیر، نانوتکنولوژی به‌عنوان یک رویکرد نوین در کنترل عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته است (۹). نانوذرات فلزی و اکسیدهای فلزی مانند دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2)، اکسید روی (ZnO)، نقره (Ag) و سلنیوم (Se)به‌دلیل خواص فتوکاتالیستی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و آزادسازی یون‌های فلزی، دارای فعالیت باکتریایی و ضدقارچی قابل توجهی هستند (۱۰-۱۲). ترکیب نانوذرات فلزی و اکسیدهای فلزی در سامانه‌های هیبریدی می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مکمل و برهم‌کنش میان اجزای مختلف، بر فعالیت ضدمیکروبی سامانه اثر بگذارد (۱۳, ۱۴).

پوشش‌های مبتنی بر TiO_2 و ZnO به‌دلیل پایداری بالا، هزینه مناسب و فعالیت فتوکاتالیستی تحت نور مرئی یا UV ، در بسیاری از مطالعات به‌عنوان پوشش‌های خودتمیزکننده مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۵, ۱۶). افزودن نانوذرات نقره و سلنیوم نیز می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مکمل (مانند اختلال در غشای سلولی و انتقال بار بین سطحی) این فعالیت را تقویت کند (۱۱, ۱۲). با این‌حال، مطالعات محدودی بر روی کاربرد عملی چنین پوشش‌های هیبریدی در محیط واقعی مرغداری‌ها، به‌ویژه بر روی سطوح کف‌پوش، انجام شده است.

با توجه به اهمیت بهداشت محیطی در مرغداری‌ها و ضرورت توسعه رویکردهای غیرآنتی‌بیوتیکی، هدف از پژوهش حاضر سنتز نانوپوشش ترکیبی $Se/Ag/TiO_2/ZnO$ ، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی آن در شرایط آزمایشگاهی، و بررسی مقدماتی تغییرات کوتاه‌مدت بار میکروبی پس از اعمال پوشش بر کف یک سالن فعال پرورش مرغ لاین آرین بود. فاز میدانی این پژوهش به‌صورت یک پایلوت کوتاه‌مدت در سه زون ثابت و طی ۴۸ ساعت انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: پودر نانو اکسید روی (ZnO) و نانوذرات نقره (Ag) با اندازه ذرات ۲۰–۳۰ نانومتر و خلوص ۹۹٪ از شرکت نانومواد گستر پارس (ایران) تهیه شدند. دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) با فاز آناتاز، اندازه ذرات حدود ۴۰ نانومتر و خلوص ۹۹٪ از شرکت Nanomaterials Research Inc. (ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. پراکندگی آبی نانوذرات سلنیوم (Se) با اندازه ذرات ۲۰–۳۰ نانومتر و خلوص ۹۹٪ از شرکت تک‌تازان نانوفناوری مانا (ایران) تهیه شد. همچنین، کوپلیمر وینیل‌آکریلیک پایه آب به‌عنوان رزین پلیمری استفاده شد.

سنتز نانوپوشش ترکیبی $Se/Ag/TiO_2/ZnO$: برای تهیه نانوپوشش، ۴ گرم نانوذرات اکسید روی (ZnO)، ۴ گرم دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) و ۰/۰۲۵ گرم نانوذرات نقره (Ag) در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه پراکنده شدند. سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نانوذرات سلنیوم با غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون به مخلوط افزوده شد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه اولتراسونیک ۲۰۰ وات فراصوت‌دهی شد تا مخلوطی همگن به‌دست آید. در مرحله بعد، سوسپانسیون آماده‌شده به ۷۵۰ میلی‌لیتر رزین پلیمری افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه با همزن مکانیکی مخلوط شد.

اعمال پوشش بر روی سطوح: به‌منظور اعمال نانوپوشش در شرایط میدانی، سه زون ثابت و مجزا، هر یک

به مساحت ۱ مترمربع، در کف سیمانی سالن مرغداری لاین آرین انتخاب شدند. پیش از اعمال پوشش، نمونه‌برداری میکروبی اولیه از هر زون انجام شد. سپس، فرمولاسیون تهیه‌شده حاوی نانوذرات در ماتریس رزین پلیمری، با استفاده از برس نرم و به‌صورت یکنواخت روی سطوح انتخاب‌شده اعمال گردید. پوشش‌دهی در دو لایه متوالی انجام شد؛ به‌این ترتیب که پس از اعمال لایه اول، سطح به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط (۲۵±۲درجه سیلسیوس) خشک شد و سپس لایه دوم اعمال گردید تا پوششی یکنواخت بر سطح سیمانی تشکیل شود. میزان مصرف پوشش ۲۵۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر مترمربع بود. پس از خشک‌شدن کامل پوشش، نمونه‌برداری‌های میکروبی از همین زون‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال نانوپوشش انجام شد. جزئیات نمونه‌برداری، انتقال سواپ‌ها و شمارش میکروبی در بخش‌های ۲.۵.۲ و ۲.۵.۴ ارائه شده است.

شناسایی و مشخصه یابی پوشش: به‌منظور شناسایی فازهای بلوری مواد معدنی مورد استفاده در فرمولاسیون، نانوذرات TiO_2، ZnO، Se و Ag به‌صورت جداگانه با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD؛ مدل Philips PW 1730) و تابش Cu Kα بررسی شدند. الگوی XRD نانوپوشش ترکیبی نهایی پس از اختلاط اجزا با ماتریس پلیمری در این مطالعه اندازه‌گیری نشد؛ بنابراین داده‌های XRD صرفاً برای تأیید فازهای بلوری مواد معدنی اولیه تفسیر شدند. مورفولوژی و توزیع نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM؛ مدل TESCAN MIRA3) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM؛ مدل LEO 912 AB) مطالعه شد. تصاویر TEM در ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۰۰ کیلوولت ثبت شدند. طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDX) به‌صورت آنالیز نقطه‌ای منفرد (single-point analysis) بر روی یک نقطه منتخب از نمونه انجام شد تا حضور عناصر Ti، Zn، Se و Ag بررسی شود. آنالیز در ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلوولت و به‌صورت standardless با تصحیح PAP انجام گرفت. با توجه به ماهیت موضعی این آزمون، مقادیر کمّی حاصل به‌عنوان نماینده ترکیب متوسط یا حجمی کل نانوپوشش در نظر گرفته نشدند.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی در فاز آزمایشگاهی بر اساس استاندارد بین‌المللی ISO ۲۲۱۹۶:

فعالیت ضدباکتریایی نانوپوشش علیه *Escherichia coli* (ATCC 8739) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) بر اساس استاندارد بین‌المللی ISO 22196 ارزیابی شد (۱۷). برای هر سویه، سه آزمونه پوشش‌دار و سه آزمونه شاهد بدون پوشش به‌صورت موازی بررسی شدند. نمونه‌های شاهد، سطوح بدون پوشش بودند و در طراحی این آزمون، کنترل جداگانه‌ای شامل رزین وینیل‌آکریلیک پایه بدون نانوذرات در نظر گرفته نشد.

ابتدا، سوسپانسیون‌های باکتریایی در محیط نوترینت براث با غلظت‌های اولیه زیر تهیه شدند:

E. coli (ATCC۸۷۳۹): ۲/۴ × ۱۰^{۶} CFU/mL

S. aureus (ATCC ۶۵۳۸): ۲/۵ × ۱۰^{۶} CFU/mL

سپس، ۰/۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بر روی نمونه‌های پوشش‌دار و نمونه‌های شاهد بدون پوشش، با ابعاد ۵۰ × ۵۰ میلی‌متر، تلقیح شد. برای برقراری تماس یکنواخت، سطح نمونه‌ها با فیلم پلاستیکی استریل پوشانده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱ ± ۳۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی حداقل ۹۰٪ انکوبه شدند.

پس از پایان زمان تماس، باکتری‌های باقی‌مانده با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محیط خنثی‌کننده SCDLP بازیابی شدند. شمارش باکتری‌های زنده به روش کشت پورپلیت روی محیط نوترینت آگار انجام شد. شاخص فعالیت ضدباکتریایی (R) بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$R = (B - A) - (C - A) = B - C$$

در این رابطه، A میانگین شمارش لگاریتمی باکتری‌های زنده روی سه آزمونه شاهد بلافاصله پس از تلقیح، B میانگین شمارش لگاریتمی باکتری‌های زنده روی سه آزمونه شاهد پس از ۲۴ ساعت و C میانگین شمارش لگاریتمی باکتری‌های زنده روی سه آزمونه پوشش‌دار پس

از ۲۴ ساعت است. مقدار R برابر یا بیشتر از ۲ نشان‌دهنده کاهش حداقل دو لگاریتمی، معادل دست‌کم ۹۹٪ کاهش جمعیت باکتریایی نسبت به نمونه شاهد است.

برای بررسی یکنواختی شمارش اولیه آزمونه‌های شاهد، معیار زیر کنترل شد:

$$(Lmax - Lmin) / Lmean \leq ۰/۲$$

مقادیر این شاخص برای دو سویه به شرح زیر بود:

E. coli: ۰/۰۷

S. aureus: ۰/۰۶

هر دو مقدار، معیار پذیرش گزارش‌شده را برآورده کردند.

ارزیابی بار میکروبی در فاز میدانی: به‌منظور ارزیابی بار میکروبی در شرایط واقعی سالن مرغداری، نمونه‌برداری از سطوح سیمانی کف سالن در سه بازه زمانی، شامل پیش از اعمال نانوپوشش و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال آن، بر اساس دستورالعمل استاندارد بین‌المللی ISO ۱۸۵۹۳:۲۰۱۸ و به روش سواپ‌برداری سطحی انجام شد (۱۸). سواپ‌های استریل پس از نمونه‌برداری از سطحی به ابعاد ۱۰ × ۱۰ سانتی‌متر، بلافاصله در لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شدند. پس از تهیه رقت‌های متوالی، نمونه‌های باکتریایی برای شمارش کلنی‌های مشکوک به *Escherichia coli* روی محیط مک‌کانکی آگار و کلنی‌های مانیتول‌مثبت سازگار با *Staphylococcus aureus* روی محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شدند. از آن‌جا که در فاز میدانی آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی یا مولکولی انجام نشد، شناسایی این باکتری‌ها به‌صورت احتمالی و بر اساس رشد و ویژگی‌های کلنی در محیط‌های انتخابی/افتراقی گزارش شد. نمونه‌های قارچی نیز روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت شدند. تعداد کلنی‌های ظاهرشده، پس از اعمال ضریب رقّت و تصحیح بر اساس مساحت نمونه‌برداری‌شده، بر حسب واحد تشکیل‌دهنده‌ی کلنی در هر سانتی‌مترمربع سطح (CFU/cm^2) گزارش شد.

ارزیابی فعالیت ضدقارچی در فاز آزمایشگاهی: فعالیت ضدقارچی فرمولاسیون نانوپوشش علیه سویه استاندارد *Candida glabrata* (ATCC ۹۰۰۳۰) در سه تکرار مستقل، با استفاده از روش ریزرقیق‌سازی در محیط مایع و با اقتباس از چارچوب دستورالعمل CLSI ۲۷-A۳ M ارزیابی شد. سوسپانسیون قارچی در محیط RPMI۱۶۴۰ تهیه و غلظت نهایی آن در محدوده ۱×۱۰^۳ تا $۲/۵ \times ۱۰^۳$ CFU/mL تنظیم شد. غلظت‌های نهایی فرمولاسیون در بازه ۰/۰۷۸ تا ۱۰ mg/mL مورد آزمون قرار گرفتند. در این مطالعه، واحد mg/mL بر اساس جرم خشک کل فرمولاسیون نانوپوشش به ازای هر میلی‌لیتر محیط آزمون تعریف شد.

پیش از انتقال به چاهک‌ها، فرمولاسیون در محیط RPMI۱۶۴۰ با استفاده از ورتکس پراکنده شد. در طول آماده‌سازی و دوره انکوباسیون، ته‌نشینی قابل مشاهده‌ای از فرمولاسیون در چاهک‌ها مشاهده نشد. برای کنترل رشد، محیط RPMI۱۶۴۰ حاوی سوسپانسیون قارچی و فاقد فرمولاسیون نانوپوشش در نظر گرفته شد و محیط RPMI۱۶۴۰ استریل فاقد تلقیح قارچی و نانوپوشش به‌عنوان کنترل سترونی استفاده شد. همچنین، برای هر غلظت مورد آزمون، یک چاهک blank متناظر شامل همان غلظت از فرمولاسیون در محیط RPMI۱۶۴۰ ولی بدون تلقیح قارچی در نظر گرفته‌شد تا جذب و کدورت زمینه‌ای ناشی از خود فرمولاسیون کنترل شود. فلوکونازول نیز به‌عنوان کنترل مثبت ضدقارچی در آزمون استفاده شد. کنترل جداگانه‌ای شامل رزین پایه بدون نانوذرات در این آزمون وجود نداشت.

پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. برای هر غلظت، مقدار ODمربوط به blank همان غلظت از OD چاهک متناظر حاوی قارچ کسر شد و مقادیر تصحیح‌شده برای محاسبه مهار رشد مورد استفاده قرار گرفتن. $MIC_{۵۰}$ به‌عنوان کم‌ترین غلظت فرمولاسیون که رشد *C. glabrata* را

دست‌کم ۵۰٪ نسبت به کنترل رشد مهار کرد، تعیین شد (۱۹).

بر این اساس، فعالیت مهاری مشاهده‌شده به فرمولاسیون کامل نانوپوشش نسبت داده می‌شود و به‌دلیل نبود کنترل رزین پایه بدون نانوذرات، سهم مستقل اجزای نانویی از این اثر قابل تعیین نیست.

پایلوت میدانی کوتاه‌مدت نانوپوشش در یک سالن مرغداری لاین آرین: ارزیابی میدانی نانوپوشش در یکی از سالن‌های فعال پرورش مرغ لاین آرین انجام شد. پیش از اعمال پوشش، عملیات پاک‌سازی، شست‌وشو و ضدعفونی اولیه در زون‌های مورد بررسی به‌طور یکسان انجام گرفت. در بازه ۴۸ ساعته آزمایش، دمای سالن در محدوده ۲۸ تا ۳۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی در محدوده ۶۰ تا ۶۵٪ و تراکم جوجه‌ریزی ۱۰ قطعه در هر مترمربع بود. تهویه سالن نیز با سیستم فشار منفی مدیریت شد.

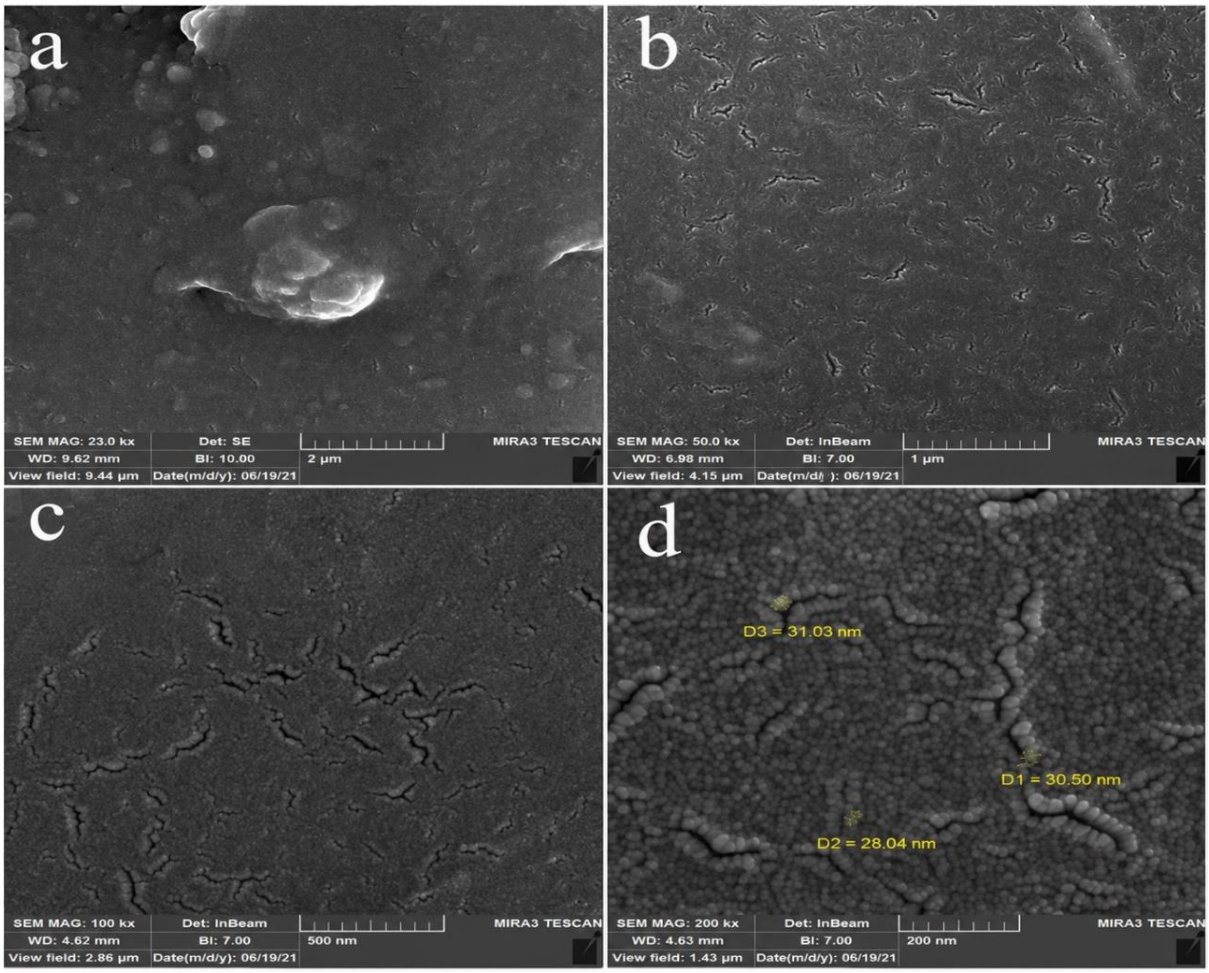
ارزیابی میدانی در قالب مطالعه پیش‌آزمون-پس‌آزمون انجام شد. سه زون ثابت و مجزا، هرکدام به مساحت ۱ مترمربع، در بخش میانی کف سیمانی سالن انتخاب شدند. فاصله تقریبی بین زون‌های مجاور ۱ متر بود. در طراحی این پایلوت، زون شاهد همزمان و بدون پوشش در همان سالن در نظر گرفته نشد؛ بنابراین، ارزیابی میدانی به‌صورت پیش‌آزمون—پس‌آزمون در همان سه زون پوشش‌دار انجام شد. بار میکروبی این زون‌ها پیش از اعمال نانوپوشش و سپس در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال آن اندازه‌گیری شد. در هر زون و در هر زمان نمونه‌برداری، پنج سواپ از پنج نقطه متفاوت برداشت شد. هر سواپ از سطحی به ابعاد ۱۰ × ۱۰ سانتی‌متر، معادل ۱۰۰ سانتی‌مترمربع، تهیه شد و میانگین پنج زیرنمونه به‌عنوان مقدار بار میکروبی همان زون در تحلیل آماری در نظر گرفته شد. انتقال سواپ‌ها، تهیه رقت‌های متوالی، کشت نمونه‌ها و شمارش بار میکروبی مطابق بخش ۲.۵.۲ انجام شد.

برای بررسی قارچ‌های جداشده از نمونه‌های میدانی، نمونه‌ها روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند و به‌مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. شناسایی مخمرها بر اساس آزمون لوله ژرم و کشت روی محیط کروم‌آگار انجام شد. شناسایی کپک‌ها، به‌ویژه جنس *Aspergillus*، بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی کلنی شامل رنگ، سرعت رشد و بافت کلنی و نیز ویژگی‌های میکروسکوپی شامل ساختار کانیدیوفور، وزیکول و فیالیدها پس از رنگ‌آمیزی با لاکتوفنول کاتن‌بلو صورت گرفت. کلنی‌های شناسایی‌شده به‌عنوان *Aspergillu.* spp به‌طور جداگانه شمارش شدند و در شمارش «سایر مخمرها و کپک‌ها» لحاظ نشدند؛ بنابراین، این دو گروه در گزارش نتایج میدانی هم‌پوشانی نداشتند.

تحلیل آماری داده‌ها: آزمون‌های ضدقارچی در سه تکرار مستقل انجام شدند. در فاز میدانی، بار میکروبی سه زون ثابت کف سالن پیش از اعمال نانوپوشش و سپس ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال آن اندازه‌گیری شد. در هر زون و در هر زمان نمونه‌برداری، پنج سواپ به‌عنوان زیرنمونه برداشت شد و میانگین پنج سواپ به‌عنوان مقدار بار میکروبی همان زون در همان زمان در نظر گرفته شد؛ بنابراین، واحد تحلیل در فاز میدانی زون بود (n=3)، با توجه به تعداد محدود زون‌های مورد بررسی، داده‌های میدانی به‌صورت توصیفی و اکتشافی تحلیل شدند و از آزمون‌های آماری استنباطی برای مقایسه زمان‌های نمونه‌برداری استفاده نشد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار سه زون و درصد تغییر نسبت به مقدار پیش از اعمال پوشش گزارش شدند. محاسبات توصیفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. برای مقادیر کم‌تر از آستانه قابل گزارش، از جایگزینی عددی فرضی استفاده نشد. به‌طور مشخص، مقدار *Aspergillus. spp* در ۲۴ ساعت پس از اعمال پوشش به‌صورت (<3 CFU/cm^2) گزارش شد و برای این نقطه زمانی میانگین یا انحراف معیار عددی محاسبه نشد. درصد کاهش نیز به‌صورت حداقل کاهش قابل استنتاج از این آستانه گزارش شد.

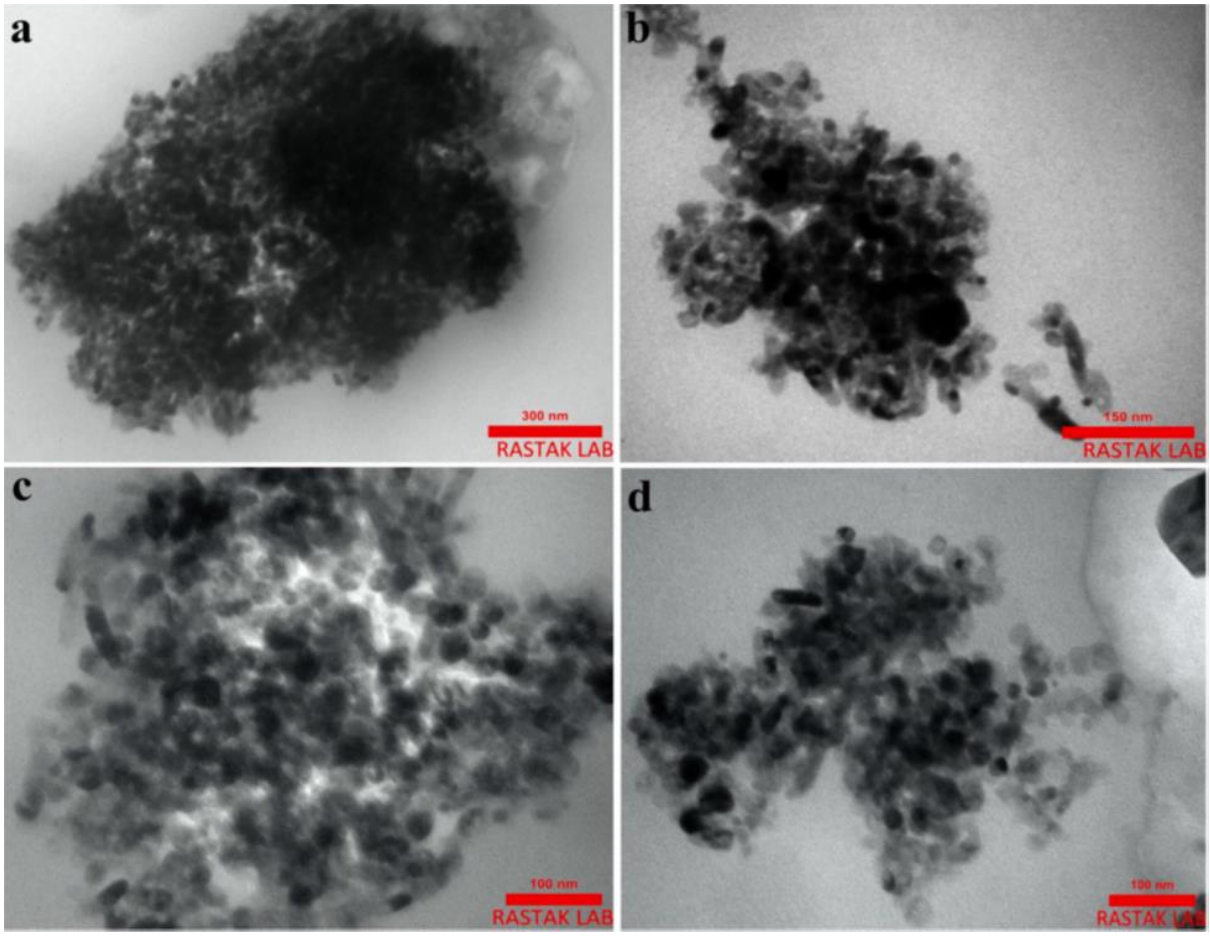
نتایج

مشخصه‌یابی مورفولوژیکی نانوپوشش و شناسایی فازهای بلوری اجزای معدنی: تصاویر FESEMنشان دادند که در نواحی بررسی‌شده، ذرات در ماتریس رزین پلیمری پراکندگی نسبتاً مناسبی داشتند؛ با این‌حال، بر اساس تصاویر مورفولوژیکی به‌تنهایی نمی‌توان یکنواختی توزیع همه اجزای نانویی را در کل پوشش تأیید کرد (**شکل ۱**). بر اساس اندازه‌گیری ۵۰ ذره منتخب از تصاویر FESEM با استفاده از نرم‌افزار ImageJ، اندازه ذرات مشاهده‌شده در بازه ۲۸ تا ۳۱ نانومتر قرار داشت.



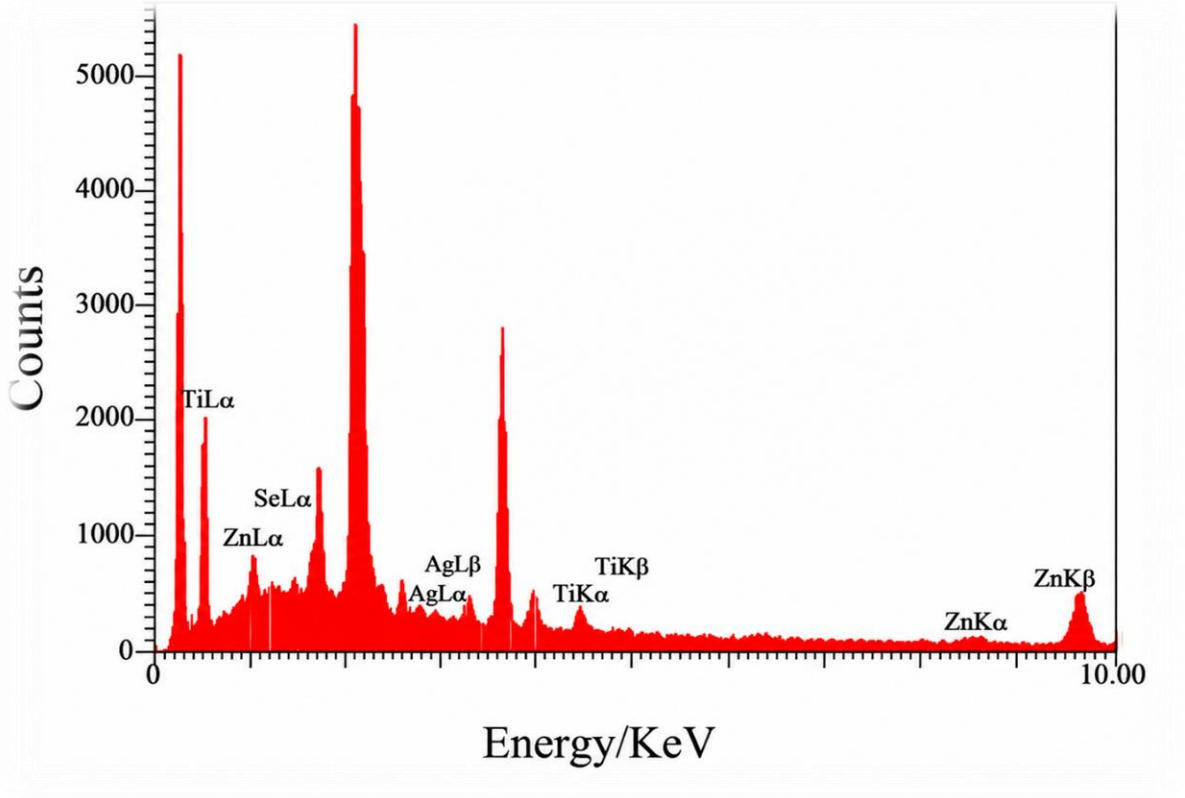
شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) از سطح نانوپوشش ترکیبی در بزرگ‌نمایی‌های مختلف: (a) بزرگ‌نمایی ۲۳۰۰×، (b) بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰۰×، (c) بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰۰× و (d) بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰۰۰× همراه با اندازه‌گیری قطر برخی نانوذرات.

تصاویر TEM نیز در نواحی بررسی‌شده پراکندگی نسبتاً مناسب ذرات را نشان دادند؛ هرچند در برخی نواحی تجمع موضعی مشاهده شد. با وجود این تجمع محدود، ابعاد ذرات مشاهده‌شده همچنان در مقیاس نانومتری قرار داشت (شکل ۲).



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوپوشش ترکیبی $Se/Ag/TiO_2/ZnO$ در نواحی مختلف: (الف) مقیاس‌نما ۳۰۰ نانومتر، (ب) مقیاس‌نما ۱۵۰ نانومتر، (ج) مقیاس‌نما ۱۰۰ نانومتر و (د) مقیاس‌نما ۱۰۰ نانومتر.

آنالیز نقطه‌ای EDX سیگنال‌های مربوط به Ti، Zn، Se و Agرا در نقطه منتخب از نمونه نشان داد (شکل ۳). بنابراین، این آزمون حضور موضعی عناصر معدنی مورد استفاده در فرمولاسیون را در نقطه بررسی‌شده تأیید کرد. گزارش خام دستگاه نشان داد که کمّی‌سازی به‌صورت standardlessانجام شده و اکسیژن در محاسبات کمّی صفر در نظر گرفته شده است؛ همچنین کربن در جدول کمی گزارش نشده بود. از آن‌جا که تنها یک نقطه از نمونه مورد آنالیز قرار گرفت، درصدهای وزنی و اتمی حاصل نمی‌توانند نماینده ترکیب متوسط یا حجمی کل نانوپوشش باشند. اختلاف این مقادیر با نسبت جرمی مواد اولیه نیز می‌تواند تحت تأثیر ماهیت بسیار موضعی آنالیز، انتخاب نقطه مورد بررسی و محدودیت‌های کمی‌سازی EDX قرار گرفته باشد. ازاین‌رو، در این مطالعه از EDX صرفاً برای تأیید حضور موضعی عناصرTi، Zn، Se و Ag استفاده شد و نه برای تعیین نسبت کمی اجزای کل فرمولاسیون.

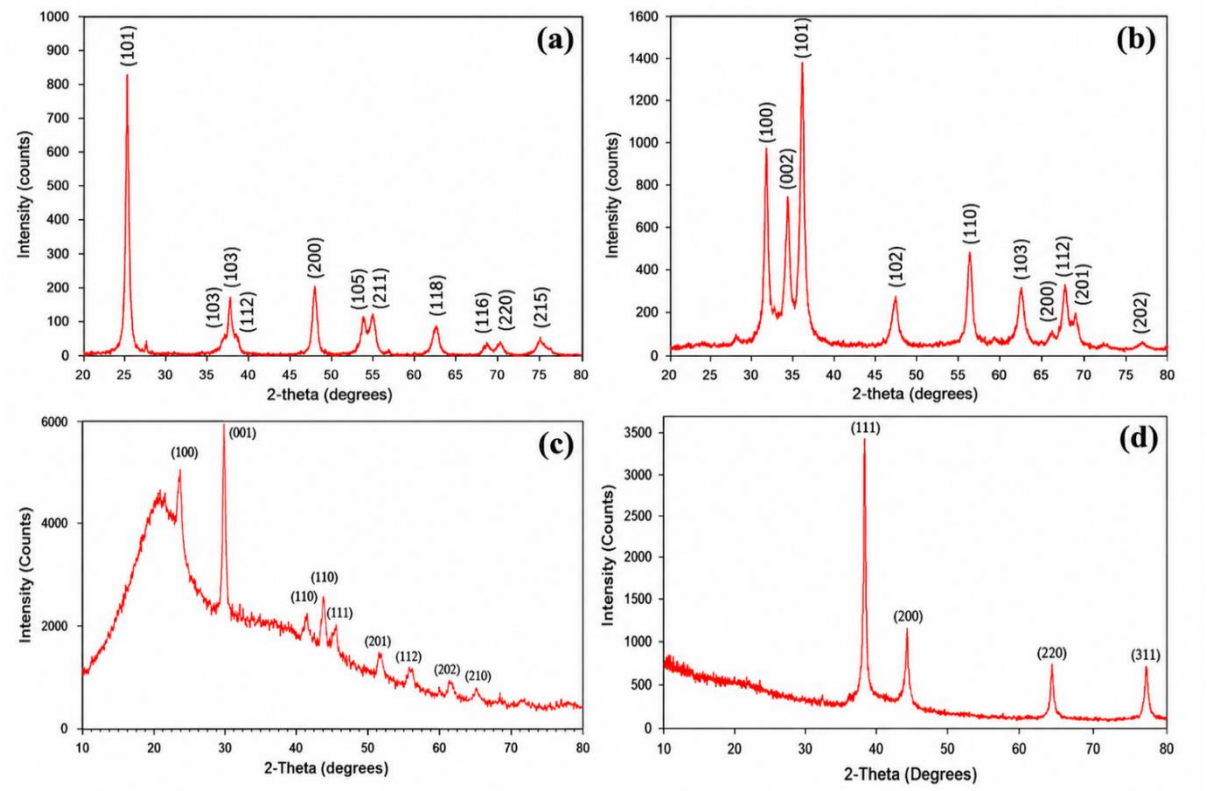


شکل ۳. طیف EDX حاصل از آنالیز نقطه‌ای منفرد (single-point analysis) یک نقطه منتخب از نانوپوشش ترکیبی، نشان‌دهنده سیگنال‌های مربوط به Ti، Zn، Se و Ag. این طیف برای تأیید حضور موضعی عناصر استفاده شد و مقادیر کمّی حاصل نماینده ترکیب متوسط کل نانوپوشش نیستند.

به‌منظور شناسایی فازهای بلوری مواد معدنی مورد استفاده در تهیه نانوپوشش، الگوهای XRD نانوذرات TiO_2، ZnO، Se و Ag به‌صورت جداگانه بررسی شدند (شکل ۴). این الگوها مربوط به مواد معدنی پیش از اختلاط با ماتریس پلیمری هستند و نباید به‌عنوان الگوی پراش نانوپوشش ترکیبی نهایی تفسیر شوند. در الگوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2؛ شکل ۴-الف)، پیک‌هایی در زوایای 2θ برابر با ۲۵/۳، ۳۷/۸، ۴۸/۰، ۵۴/۲ و ۶۲/۷ درجه مشاهده شد که به‌ترتیب به صفحات بلوری (۱۰۱)، (۰۰۴)، (۲۰۰)، (۱۰۵) و (۲۰۴) فاز آناتاز TiO_2 نسبت داده شدند.

در الگوی نانوذرات اکسید روی (ZnO؛ شکل ۴-ب)، پیک‌های واقع در زوایای ۳۱/۷، ۳۴/۲ و ۳۶/۲ درجه به صفحات بلوری (۱۰۰)، (۰۰۲) و (۱۰۱) ساختار ورتزیتی ZnO مربوط بودند. الگوی پراش نانوذرات سلنیوم مورد استفاده (Se؛ شکل ۴-ج) یک پیک برجسته در حدود ۲۹/۷ درجه، متناظر با صفحه بلوری (۱۰۱) سلنیوم هگزاگونال، به‌همراه یک هاله زمینه‌ای آمورف نشان داد.

در الگوی نانوذرات نقره (Ag؛ شکل ۴-د)، پیک‌های مشاهده‌شده در زوایای ۳۸/۱، ۴۴/۳، ۶۴/۴ و ۷۷/۴ درجه به‌ترتیب به صفحات بلوری (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) ساختار مکعبی مرکز وجهی نقره نسبت داده شدند. مجموع این نتایج، فازهای بلوری مورد انتظار در مواد معدنی مورد استفاده برای تهیه نانوپوشش را تأیید کرد. از آنجا که XRD بر روی نانوپوشش نهایی پس از قرارگیری اجزا در ماتریس پلیمری انجام نشد، از این داده‌ها نمی‌توان درباره حفظ فازها، برهم‌کنش‌های بلوری یا ساختار بلوری پوشش نهایی نتیجه‌گیری کرد.



شکل ۴. الگوهای پراش پرتو ایکس (XRD) مواد معدنی مورد استفاده پیش از تهیه نانوپوشش ترکیبی: (الف) TiO_2 ، (ب) ZnO، (ج) Seو (د) Ag این الگوها مربوط به اجزای منفرد هستند و نه نانوپوشش ترکیبی نهایی

ارزیابی کمی فعالیت ضدباکتریایی در فاز آزمایشگاهی: ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوپوشش ترکیبی بر اساس استاندارد ISO۲۲۱۹۶ نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تماس، شمارش لگاریتمی باکتری‌های زنده در نمونه‌های پوشش‌دار نسبت به نمونه‌های بدون پوشش کاهش یافت (جدول ۱). شاخص فعالیت ضدباکتریایی (R) برای *Staphylococcus aureus* (ATCC ۶۵۳۸) و *Escherichia coli* (ATCC۸۷۳۹) به‌ترتیب ۲/۱۱ و ۲/۰۳ به‌دست آمد. از آنجا که هر دو مقدار R بیش‌تر از ۲ بودند، نانوپوشش در هر دو سویه کاهش حداقل دو لگاریتمی، معادل بیش از ۹۹٪، نسبت به نمونه بدون پوشش ایجاد کرد. این نتایج بیانگر فعالیت ضدباکتریایی فرمولاسیون کامل نانوپوشش علیه هر دو باکتری مورد بررسی است. با توجه به نبود کنترل حاوی رزین پایه بدون نانوذرات، سهم مستقل اجزای نانویی از اثر کلی فرمولاسیون در این آزمون قابل تفکیک نبود.

جدول ۱. نتایج ارزیابی کمی فعالیت ضدباکتریایی نانوپوشش ترکیبی $Se/Ag/TiO_2/ZnO$ بر اساس استاندارد ISO۲۲۱۹۶

باکتری	غلظت تلقیح اولیه CFU/mL	شمارش لگاریتمی اولیه(A)	شمارش لگاریتمی نمونه بدون پوشش پس از ۲۴ ساعت (B)	شمارش لگاریتمی نمونه پوشش‌دار پس از ۲۴ ساعت(C)	شاخص فعالیت ضدباکتریایی(R)
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (ATCC ۶۵۳۸)	۲٫۵ × ۱۰۶	۴٫۵۱	۳٫۷۸	۱٫۶۷	۲٫۱۱
ESCHERICHIA COLI (ATCC۸۷۳۹)	۲٫۴ × ۱۰۶	۴٫۴۴	۳٫۸۱	۱٫۷۸	۲٫۰۳

مقادیر A، B و C میانگین لگاریتم شمارش باکتری‌های زنده حاصل از سه آزمونه موازی هستند. A، میانگین شمارش روی آزمونه‌های شاهد بلافاصله پس از تلقیح؛ B، میانگین شمارش روی آزمونه‌های شاهد پس از ۲۴ ساعت؛ و C، میانگین شمارش روی آزمونه‌های پوشش‌دار پس از ۲۴ ساعت است. شاخص فعالیت ضدباکتریایی بر اساس رابطه $R = B - C$ محاسبه شد. معیار یکنواختی شمارش اولیه $(Lmax - Lmin)/Lmean$ برای *S. aureus* و *E. coli* به‌ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۰۷ بود.

ارزیابی فعالیت ضدقارچی در فاز آزمایشگاهی:

فعالیت ضدقارچی نانوپوشش ترکیبی علیه سویه استاندارد *Candida glabrata* (ATCC ۹۰۰۳۰) در سه تکرار مستقل ارزیابی شد. مقادیر $MIC_{۵۰}$ در تکرارهای اول تا سوم به‌ترتیب ۰/۶۲۵، ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میانگین ± انحراف معیار $MIC_{۵۰}$ برابر با ۰/۸۳ ± ۰/۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (جدول ۲). این نتایج نشان داد که فرمولاسیون کامل نانوپوشش در شرایط آزمایشگاهی با مهار رشد *Candida glabrata* همراه بود. با توجه به نبود کنترل رزین پایه بدون نانوذرات، سهم مستقل اجزای نانویی از اثر مهاری مشاهده‌شده قابل تعیین نیست.

جدول ۲. مقادیر $MIC_{۵۰}$ نانوپوشش ترکیبی علیه Candida glabrata (ATCC 90030) در سه تکرار مستقل

تکرار مستقل	$MIC_{۵۰}$ (mg/mL)
۱	۰٫۶۲۵
۲	۰٫۶۲۵
۳	۱٫۲۵۰
میانگین ± انحراف معیار	۰٫۸۳۳ ± ۰٫۳۶۱

ارزیابی عملکرد نانوپوشش در شرایط واقعی مرغداری: نتایج پایش میدانی بار میکروبی سطوح کف سه زون ثابت، پیش از اعمال نانوپوشش و سپس در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال آن، در

جدول ۳ ارائه شده است. پیش از اعمال پوشش، بار باکتریایی کلنی های مشکوک به *Escherichia coli* و کلنی‌های مانیتول مثبت سازگار با *Staphylococcus aureus* به‌ترتیب ۱۵/۵ ± ۵۱۰/۰ و ۱۲/۱ ± ۳۶۰/۰ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر سانتی‌مترمربع سطح بود. پس از اعمال نانوپوشش، بار کلنی‌های مشکوک به *Escherichia coli* در ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌ترتیب به ۱/۱ ± ۸/۲ و ۱/۲ ± ۶/۴ CFU/cm² کاهش یافت. همچنین، مقدار کلنی‌های مانیتول مثبت سازگار با *Staphylococcus aureus* در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال پوشش، به ۰/۴ ± ۲/۱ CFU/cm² رسید. با توجه به تعداد محدود زون‌های مورد بررسی (n=3) ، این تغییرات به‌صورت توصیفی و اکتشافی گزارش شدند و آزمون استنباطی برای مقایسه زمان‌ها انجام نشد.

بار *Aspergillus* spp پیش از اعمال پوشش ۱۸/۲ ± ۴۸۰/۰ CFU/cm² بود و در ۲۴ ساعت پس از اعمال نانوپوشش به کم‌تر از ۳ CFU/cm² رسید. این مقدار به‌صورت کم‌تر از آستانه قابل گزارش حفظ شد و به یک مقدار عددی دقیق تبدیل نشد؛ در ۴۸ ساعت پس از اعمال پوشش، مقدار آن ۲/۸ ± ۳۵/۴ CFU/cm² بود که همچنان نسبت به مقدار پیش از اعمال پوشش کم‌تر بود. همچنین، شمارش سایر مخمر و کپک ها (به‌جز *Aspergillus spp.*) از ۱۴/۰ ± ۳۶۰/۰ CFU/cm ² پیش از اعمال پوشش، به ۰/۳ ± ۱/۸ CFU/cm² در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال نانوپوشش کاهش یافت. این نتایج نشان داد که در بازه پایش ۴۸ ساعته، اعمال نانوپوشش با کاهش بار باکتریایی و قارچی سطوح کف سالن همراه بود.

جدول ۳. بار میکروبی سطوح کف سالن مرغداری پیش از اعمال نانوپوشش و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال آن

نوع میکروارگانیسم	قبل از پوشش (CFU/CM²)	۲۴ ساعت پس از پوشش (CFU/CM²)	کاهش ۲۴ ساعت	۴۸ ساعت پس از پوشش (CFU/CM²)	کاهش ۴۸ ساعت
کلنی‌های مشکوک به ESCHERICHIA COLI	۵۱۰٫۰ ± ۱۵٫۵	۸٫۲ ± ۱٫۱	٪۹۸٫۴	۶٫۴ ± ۱٫۲	٪۹۸٫۷
کلنی‌های مانیتول‌مثبت سازگار با STAPHYLOCOCCUS AUREUS	۳۶۰٫۰ ± ۱۲٫۱	۲٫۱ ± ۰٫۴	٪۹۹٫۴	۲٫۱ ± ۰٫۴	٪۹۹٫۴
ASPERGILLUS SPP.	۴۸۰٫۰ ± ۱۸٫۲	<۳	بیش از ٪۹۹٫۴	۳۵٫۴ ± ۲٫۸	٪۹۲٫۶
سایر مخمرها و کپک‌ها (به‌جز ASPERGILLUS. SPP)	۳۶۰٫۰ ± ۱۴٫۰	۱٫۸ ± ۰٫۳	٪۹۹٫۵	۱٫۸ ± ۰٫۳	٪۹۹٫۵

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار سه زون ثابت (n=3)گزارش شده‌اند. در هر زون و در هر زمان نمونه‌برداری، میانگین پنج سواپ به‌عنوان مقدار همان زون در نظر گرفته شد. با توجه به تعداد محدود زون‌های مورد بررسی، داده‌های فاز میدانی به‌صورت توصیفی و اکتشافی تحلیل شدند و آزمون آماری استنباطی برای مقایسه زمان‌های نمونه‌برداری انجام نشد. درصد کاهش نسبت به مقدار پیش از اعمال نانوپوشش محاسبه شد. مقدار

CFU/cm ^{2}<3 برای *Aspergillus spp.* در ۲۴ ساعت به‌صورت مقدار کم‌تر از آستانه قابل گزارش حفظ شد و هیچ مقدار عددی فرضی به آن اختصاص داده نشد. ازاین‌رو، میانگین و انحراف معیار عددی برای این نقطه زمانی گزارش نشد. درصد کاهش (>%99.4) به‌صورت حد پایین کاهش و با استفاده از مقدار (CFU/cm^{2}۳) به‌عنوان مرز بالایی آستانه محاسبه شد، نه به‌عنوان مقدار مشاهده‌شده. شناسایی باکتری‌های میدانی به‌صورت احتمالی و بر اساس ویژگی‌های رشد و کلنی در محیط‌های انتخابی/افتراقی انجام شد و آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی یا مولکولی برای تعیین قطعی گونه انجام نشد.

ملاحظات ایمنی زیستی و پایداری نانوپوشش: با توجه به کاربرد نانوپوشش در محیط پرورش طیور، بررسی ملاحظات ایمنی زیستی و احتمال آزادسازی اجزای فعال نانوپوشش اهمیت دارد. در پژوهش حاضر، نانوذرات در ماتریس رزین پلیمری تثبیت شدند؛ این ویژگی می‌تواند تماس مستقیم ذرات با محیط و آزادسازی احتمالی گونه‌های محلول حاوی نقره، سلنیوم، روی و تیتانیوم را کاهش دهد. با این‌حال، عواملی مانند سایش ناشی از تردد پرندگان، شست‌وشوی دوره‌ای سالن با مواد ضدعفونی‌کننده و تماس مستقیم جوجه‌ها با سطوح پوشش‌دار ممکن است بر میزان آزادسازی اجزای نانوپوشش اثر بگذارند. در برخی مطالعات، استفاده کنترل‌شده از نانوذرات نقره در صنعت طیور با بهبود شاخص‌های بهداشتی و عملکردی، بدون گزارش سمیت حاد، همراه بوده است (۲۰-۲۲). با وجود این، در پژوهش حاضر آزمون مستقیم سمیت یا مهاجرت اجزای نانوپوشش انجام نشد؛ بنابراین، تأیید ایمنی زیستی این فرمولاسیون برای کاربرد گسترده در مرغداری‌ها نیازمند ارزیابی نرخ آزادسازی اجزا، تجمع احتمالی در بافت‌های پرندگان، شاخص‌های عملکردی گله و آزمون‌های سمیّت درون‌تنی است.

علاوه‌بر ملاحظات ایمنی زیستی، پایداری ساختاری و مکانیکی نانوپوشش در شرایط محیطی سالن‌های پرورش طیور نیز اهمیت دارد. پایش میدانی حاضر تنها در بازه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال پوشش انجام شد و نشان داد که نانوپوشش در کوتاه‌مدت با کاهش بار میکروبی سطوح کف سالن همراه است. با این‌حال، پوشش کف سالن در طول یک دوره کامل پرورش، حدود ۴۲ تا ۴۵ روز، به‌طور مداوم در معرض رطوبت بالا، فضولات، ترکیبات نیتروژنی، فشار مکانیکی ناشی از تردد پرندگان و فرآیندهای شست‌وشو و ضدعفونی قرار می‌گیرد. این عوامل ممکن است در طول زمان موجب سایش سطحی، ترک‌خوردگی یا کاهش تدریجی کارایی ضدمیکروبی پوشش شوند. ازاین‌رو، ارزیابی پایداری سایشی و شیمیایی ماتریس پلیمری، دوام پوشش در برابر شوینده‌ها و حفظ فعالیت ضدمیکروبی آن طی چند دوره متوالی جوجه‌ریزی، از محدودیت‌های پژوهش حاضر و موضوعات پیشنهادی برای مطالعات آینده است. بنابراین، نتایج این پژوهش تنها بیانگر همراهی اعمال نانوپوشش با کاهش کوتاه‌مدت بار میکروبی در فاز پایلوت است و برای ادعای پایداری بلندمدت، انجام ارزیابی‌های تکمیلی ضروری خواهد بود.

محدودیت‌های پژوهش و چشم‌انداز آینده: اگرچه در پایلوت میدانی حاضر، اعمال نانوپوشش با کاهش کوتاه‌مدت بار میکروبی سطوح کف سالن همراه بود، تأیید کارایی پایدار و قابلیت کاربرد گسترده آن در شرایط واقعی به ارزیابی‌های تکمیلی نیاز دارد. نخست، پایش میدانی این پژوهش به بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از اعمال نانوپوشش محدود بود؛ بنابراین، دوام عملکرد ضدمیکروبی پوشش در طول یک دوره کامل پرورش و طی دوره‌های متوالی جوجه‌ریزی بررسی نشد.

دوم، ارزیابی میدانی به‌صورت پیش‌آزمون–پس‌آزمون در سه زون ثابت انجام شد و زون شاهد همزمان بدون پوشش در طراحی مطالعه وجود نداشت. بنابراین، تغییرات مشاهده‌شده در بار میکروبی را نمی‌توان به‌طور قطعی به اعمال نانوپوشش نسبت داد، زیرا عواملی نظیر پاکسازی و ضدعفونی اولیه، تغییر شرایط محیطی، خشک‌شدن سطح، تغییرات طبیعی بار میکروبی و سایر اقدامات مدیریتی سالن نیز ممکن است در این تغییرات نقش داشته باشند. ازاین‌رو،

یافته‌های میدانی حاضر باید به‌عنوان نتایج مقدماتی یک پایلوت کوتاه‌مدت تفسیر شوند. در مطالعات آینده، استفاده از زون‌های شاهد همزمان و افزایش تعداد زون‌ها و سالن‌ها برای ارزیابی مستقل اثر پوشش ضروری است.

سوم، آزمون‌های مستقیم پایداری فیزیکی و شیمیایی نانوپوشش، از جمله چسبندگی به سطح سیمانی، مقاومت سایشی در اثر تردد پرندگان، پایداری در برابر شست‌وشو و مواد ضدعفونی‌کننده، و حفظ فعالیت ضدمیکروبی پس از مواجهه طولانی‌مدت با رطوبت، فضولات و ترکیبات نیتروژنی انجام نشد. همچنین، آزمون مستقیم مهاجرت اجزای نانوپوشش و ارزیابی سمیت درون‌تنی در پرندگان انجام نگرفت.

چهارم، در ارزیابی‌های آزمایشگاهی، کنترل جداگانه‌ای شامل رزین وینیل‌آکریلیک پایه بدون نانوذرات در نظر گرفته نشد. بنابراین، بر اساس طراحی حاضر نمی‌توان سهم مستقل اجزای نانویی Se، Ag، TiO_2 و ZnO را از اثر احتمالی خود ماتریس رزینی یا تغییرات فیزیکی ناشی از پوشش‌دهی سطح تفکیک کرد. ازاین‌رو، فعالیت ضدمیکروبی گزارش‌شده در این مطالعه به فرمولاسیون کامل نانوپوشش نسبت داده می‌شود. در مطالعات آینده، استفاده از کنترل رزین پایه در کنار سطح بدون پوشش و فرمولاسیون نانویی برای تعیین سهم مستقل اجزای نانویی ضروری است. همچنین، تعداد زون‌های مورد بررسی در فاز میدانی تنها سه زون بود؛ ازاین‌رو، توان مطالعه برای استنباط آماری محدود بود و داده‌های این فاز صرفاً به‌صورت توصیفی و اکتشافی تفسیر شدند. مطالعات آینده باید با تعداد بیشتری زون و سالن مستقل طراحی شوند تا امکان تحلیل آماری استنباطی قابل اتکا فراهم شود.

بنابراین، در مطالعات آینده، ارزیابی هم‌زمان پایداری مکانیکی و شیمیایی پوشش، میزان آزادسازی احتمالی اجزای فعال، دوام عملکرد ضدمیکروبی در یک دوره کامل پرورش، و بررسی شاخص‌های سلامت و عملکرد پرندگان ضروری است. چنین ارزیابی‌هایی می‌تواند مبنای علمی لازم برای بهینه‌سازی فرمولاسیون و تجاری‌سازی ایمن نانوپوشش در صنعت پرورش طیور را فراهم کند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج آزمون آزمایشگاهی بر اساس استاندارد ISO۲۲۱۹۶ نشان داد که فرمولاسیون کامل نانوپوشش در شرایط آزمون، علیه سویه‌های استاندارد *E. coli* و *S. aureus* فعالیت ضدباکتریایی نشان داد. مقادیر شاخص فعالیت ضدباکتریایی (R) پس از ۲۴ ساعت تماس برای *E. coli* و *S. aureus* به‌ترتیب ۲/۰۳ و ۲/۱۱ به‌دست آمد که بیانگر کاهش بیش از دو لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده نسبت به نمونه شاهد بدون پوشش است. این یافته‌ها، فعالیت ضدباکتریایی فرمولاسیون کامل پوشش را در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نشان می‌دهند. مطالعات پیشین نیز فعالیت ضدمیکروبی پوشش‌ها و سامانه‌های مبتنی بر TiO_2 و ZnO را گزارش کرده‌اند(۱۴، ۲۳، ۲۴) با این‌حال، به‌دلیل تفاوت در شرایط آزمون میان مطالعات مختلف و نبود مقایسه مستقیم در مطالعه حاضر، نمی‌توان درباره برتری کمی فرمولاسیون مورد مطالعه نسبت به این سامانه‌ها نتیجه‌گیری کرد.

فعالیت ضدمیکروبی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر باید به فرمولاسیون کامل پوشش، شامل ماتریس رزینی و اجزای نانویی، نسبت داده شود. از آنجا که کنترل حاوی همان رزین پایه بدون نانوذرات در طراحی آزمایش وجود نداشت، سهم مستقل نانوذرات Se، Ag، TiO_2 و ZnO را نمی‌توان از اثر احتمالی ماتریس رزینی یا تغییرات فیزیکی ایجادشده در سطح پوشش‌دار تفکیک کرد. عواملی مانند کاهش تخلخل سطح، تغییر ویژگی‌های تماس سطحی و تغییر چسبندگی میکروارگانیسم‌ها نیز ممکن است در پاسخ مشاهده‌شده نقش داشته باشند. در این چارچوب، مکانیسم‌های گزارش‌شده برای اجزای نانویی در مطالعات پیشین، از جمله تولید گونه‌های اکسیژن فعال توسط TiO_2 و ZnO و آزادسازی گونه‌های یونی از اجزای حاوی Ag و Se، می‌توانند به‌عنوان مکانیسم‌های احتمالی دخیل در فعالیت فرمولاسیون مطرح شوند؛ با این‌حال، این

مکانیسم‌ها در مطالعه حاضر به‌طور مستقیم اندازه‌گیری یا از اثر ماتریس رزینی تفکیک نشدند.

بر اساس مطالعات پیشین، TiO_2 و ZnO می‌توانند از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در شرایط مناسب فتوکاتالیستی، و اجزای حاوی Ag و Se از طریق آزادسازی گونه‌های یونی و برهم‌کنش با غشای سلولی، پروتئین‌ها و مواد ژنتیکی، در فعالیت ضدمیکروبی مشارکت داشته باشند (۱۱, ۲۴, ۲۵). علاوه‌بر این، بر اساس فرضیه‌های موجود، انتقال بار بین‌سطحی (ICT) میان نانوذرات فلزی و اکسیدهای فلزی ممکن است بر رفتار فتوکاتالیستی سامانه‌های ترکیبی اثر بگذارد؛ با این‌حال، این پدیده در مطالعه حاضر به‌طور مستقیم ارزیابی نشد (۱۳, ۱۴)؛ اگرچه اثبات قطعی این پدیده‌ها نیازمند ارزیابی‌های مستقیم در مطالعات آینده است.

این یافته‌ها اهمیت ویژه‌ای در صنعت مرغداری دارد، زیرا باکتری ها و قارچ‌ها از عوامل مهم بیماری‌زای تنفسی و گوارشی در طیور هستند(۱, ۴).

نتایج حاضر نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه ترکیب چهارجزئی مورد مطالعه است؛ بااین‌حال، اثبات برتری آن نسبت به سامانه‌های دو یا سه‌جزئی به مقایسه مستقیم نیاز دارد. اکثر تحقیقات پیشین بر روی سطوح آزمایشگاهی انجام شده‌اند، در حالی‌که در این مطالعه، نانوپوشش هم در شرایط آزمایشگاهی کنترل‌شده و هم در محیط واقعی مرغداری ارزیابی شد. نتایج پایش میدانی نشان داد که پس از اعمال نانوپوشش، کاهش کوتاه‌مدت بار میکروبی در سه زون مورد بررسی مشاهده شد و جهت تغییرات با یافته‌های آزمایشگاهی هم‌سو بود. با این‌حال، به‌دلیل نبود زون شاهد همزمان و بدون پوشش، نمی‌توان این کاهش را به‌طور قطعی به اثر نانوپوشش نسبت داد. عواملی مانند پاکسازی و ضدعفونی اولیه، تغییرات شرایط محیطی سالن، خشک‌شدن سطح، نوسانات طبیعی بار میکروبی در طول زمان، نمونه‌برداری مکرر و سایر اقدامات مدیریتی می‌توانسته‌اند در تغییرات مشاهده‌شده نقش داشته باشند.

بنابراین، یافته‌های میدانی حاضر باید به‌عنوان نتایج مقدماتی یک پایلوت کوتاه‌مدت تفسیر شوند و تأیید اثربخشی عملی پوشش نیازمند مطالعات کنترل‌شده با زون‌های شاهد همزمان و تعداد بیشتری سالن است. بخشی از کاهش مشاهده‌شده ممکن است ناشی از اثر همزمان پاکسازی اولیه و شرایط بهداشتی سالن باشد؛ بنابراین برای تفکیک دقیق سهم نانوپوشش از سایر عوامل محیطی، مطالعات طولانی‌مدت با تعداد سالن بیشتر مورد نیاز است.

در مجموع، فرمولاسیون مورد مطالعه در آزمون‌های آزمایشگاهی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی نشان داد و در پایلوت میدانی کوتاه‌مدت و بدون شاهد همزمان نیز اعمال آن با کاهش بار میکروبی سطوح مورد بررسی همراه بود. با توجه به طراحی پیش‌آزمون–پس‌آزمون و نبود زون شاهد همزمان، این یافته‌های میدانی نشان‌دهنده یک ارتباط کوتاه‌مدت هستند و نباید به‌عنوان کارایی قطعی پوشش در شرایط عملی تفسیر شوند. با این‌حال، به‌دلیل محدودبودن پایش میدانی به ۴۸ ساعت، نبود زون شاهد هم‌زمان و انجام‌نشدن آزمون‌های مستقیم دوام پوشش، مهاجرت احتمالی اجزا و ایمنی درون‌تنی، تعمیم نتایج به کاربرد گسترده صنعتی نیازمند مطالعات تکمیلی است. ارزیابی عملکرد نانوپوشش در یک دوره کامل پرورش، بررسی پایداری مکانیکی و شیمیایی آن در شرایط واقعی سالن و مطالعه شاخص‌های سلامت و عملکرد پرندگان، می‌تواند شواهد لازم را برای بهینه‌سازی و کاربرد ایمن این نانوپوشش در صنعت پرورش طیور فراهم کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و مرکز تحقیقات علوم دامی کشور، به‌دلیل حمایت از اجرای این پژوهش، قدردانی می‌شود. همچنین از تمامی افرادی که در تهیه مواد اولیه، انجام آزمایش‌ها و تحلیل نتایج همکاری کردند، سپاسگزاری می‌شود. این پژوهش در چارچوب یک طرح تحقیقاتی مصوب انجام شده است.

References

1. Abreu R, Semedo-Lemsaddek T, Cunha E, Tavares L, Oliveira M. Antimicrobial drug resistance in poultry production: current status and innovative strategies for bacterial control. Microorganisms. 2023; 11(4): 953.

2. Hedman HD, Vasco KA, Zhang L. A review of antimicrobial resistance in poultry farming within low-resource settings. Animals (Basel). 2020; 10(8): 1264.

3. Sana SS, Atuahene D, Nagy V, Shaikh AM, Knop R. The rising threat of antibiotic resistance in poultry: veterinary and One Health perspectives. Vet Sci. 2025; 12(11): 1059.

4. Mousavinafchi SB, Rahimi E, Shakerian A. Campylobacter spp. isolated from poultry in Iran: antibiotic resistance profiles, virulence genes, and molecular mechanisms. Food Sci Nutr. 2023; 11(2): 1142-53.

5. Pourhossein Z, Asadpour L, Habibollahi H, Shafighi ST. Antimicrobial resistance in fecal Escherichia coli isolated from poultry chicks in northern Iran. Gene Rep. 2020; 21: 100926.

6. Sodagari HR, Mashak Z, Ghadimianazar A. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. J Infect Dev Ctries. 2015; 9(5): 463-9.

7. Rahimi E, Momtaz H, Ameri M, Ghasemian-Safaei H, Ali-Kasemi M. Prevalence and antimicrobial resistance of Campylobacter species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. Poult Sci. 2010; 89(5): 1015-20.

8. Talebiyan R, Kheradmand M, Khamesipour F, Rabiee-Faradonbeh M. Multiple antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from chickens in Iran. Vet Med Int. 2014; 2014: 491418.

9. Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Azizi-Lalabadi M, Ehsani A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. Microb Pathog. 2018; 123: 505-26.

10. Huang T, Holden JA, Heath DE, O'Brien-Simpson NM, O'Connor AJ. Engineering highly effective antimicrobial selenium nanoparticles through control of particle size. Nanoscale. 2019; 11(31): 14937-51.

11. El-Behery RR, El-Sayed E-SR, El-Sayyad GS. Gamma rays-assisted bacterial synthesis of bimetallic silver-selenium nanoparticles: powerful antimicrobial, antibiofilm, antioxidant, and photocatalytic activities. BMC Microbiol. 2023; 23(1): 224.

12. Fahmy NF, Abdel-Kareem MM, Ahmed HA, Helmy MZ, Mahmoud EA-R. Evaluation of the antibacterial and antibiofilm effect of mycosynthesized silver and selenium nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics on nosocomial bacteria. Microb Cell Fact. 2025; 24(1): 6.

13. Mirzapoor A, Ghashghaee E. Nano engineered synthesis layer by layer and transparent synergistic antimicrobial coating based on Se/Ag/TiO2/ZnO hybrid nanostructures. Inorg Chem Commun. 2023; 153: 110840.

14. Liang Y, Li W, Wang X, Zhou R, Ding H. TiO2-ZnO/Au ternary heterojunction nanocomposite: excellent antibacterial property and visible-light photocatalytic hydrogen production efficiency. Ceram Int. 2022; 48(2): 2826-32.

15. Bode-Aluko CA, Pereao O, Kyaw HH, Al-Naamani L, Al-Abri MZ, Myint MTZ, *et al.* Photocatalytic and antifouling properties of electrospun TiO2 polyacrylonitrile composite nanofibers under visible light. Mater Sci Eng B. 2021; 264: 114913.

16. Kerek Á, Sasvári M, Jerzsele Á, Somogyi Z, Janovák L, Abonyi-Tóth Z, *et al.* Photoreactive coating material as an effective and durable antimicrobial composite in reducing bacterial load on surfaces in livestock. Biomedicines. 2022; 10(9): 2312.

17. International Organization for Standardization. ISO 22196:2011. Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. Geneva: International Organization for Standardization; 2011.

18. International Organization for Standardization. ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain—Horizontal methods for surface sampling. Geneva: International Organization for Standardization; 2018.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

20. Gallocchio F, Biancotto G, Cibin V, Losasso C, Belluco S, Peters R, *et al.* Transfer study of silver nanoparticles in poultry production. J Agric Food Chem. 2017; 65(18): 3767-74.

21. Salem HM, Ismael E, Shaalan M. Evaluation of the effects of silver nanoparticles against experimentally induced necrotic enteritis in broiler chickens. Int J Nanomedicine. 2021; 16: 6783-96.

22. Al-Sultan SI, Hereba ART, Hassanein KMA, Abd-Allah SMS, Mahmoud UT, Abdel-Raheem SM. The impact of dietary inclusion of silver nanoparticles on growth performance, intestinal morphology, caecal microflora, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. Ital J Anim Sci. 2022; 21(1): 967-78.

23. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, *et al.* Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. Nanomicro Lett. 2015; 7(3): 219-42.

24. Chen Y, Tang X, Gao X, Zhang B, Luo Y, Yao X. Antimicrobial property and photocatalytic antibacterial mechanism of the TiO2-doped SiO2 hybrid materials under ultraviolet-light irradiation and visible-light irradiation. Ceram Int. 2019; 45(12): 15505-13.

25. Amiri MR, Alavi M, Taran M, Kahrizi D. Antibacterial, antifungal, antiviral, and photocatalytic activities of TiO2 nanoparticles, nanocomposites, and bio-nanocomposites: recent advances and challenges. J Public Health Res. 2022; 11(2): 22799036221104151.

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

Volume 9, Issue 3, Autumn 2026, pages: 15-31

Synthesis, Laboratory Evaluation, and Short-Term Field Pilot of a Composite Se/Ag/TiO_2/ZnO Nanocoating in an Arian-Line Poultry House

Hamidreza Sattari[1]; Aboulfazl Mirzapoor[1,2]*

1- MSc Student, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran
2- Assistant Professor, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran

*** Corresponding author**: specialized in Nanobiotechnology — Address: Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115-175, Tehran, Iran - Email: a.mirzapour@modares.ac.ir

Receive: June 10, 2026; Revise: August 10, 2026; Accept: August 21, 2026

10.22034/nfvm.2026.585918.1316

Abstract

The increasing prevalence of antimicrobial resistance and health challenges associated with high stocking densities in poultry houses highlight the need for alternative pathogen-control strategies. This study synthesized and evaluated a composite nanocoating containing selenium, silver, titanium dioxide, and zinc oxide in a polymeric resin, followed by a short-term field pilot in an Arian-line poultry house. Nanocoating morphology was examined by field-emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy; energy-dispersive X-ray spectroscopy assessed the local presence of inorganic elements, and X-ray diffraction was performed separately on the inorganic components to identify their crystalline phases. Antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was evaluated according to ISO 22196, and antifungal activity against *Candida glabrata* was assessed by broth microdilution. In the field pilot, microbial loads in three fixed floor zones were measured before coating and at 24 and 48 h after application. Laboratory testing yielded antibacterial activity indices (R) of 2.03 for *E. coli* and 2.11 for *S. aureus*, and antifungal activity against *C. glabrata*. Microscopy showed relatively suitable particle dispersion in the examined regions, with localized aggregation. Field application was accompanied by short-term reductions in bacterial and fungal loads over 48 h. However, because there was no concurrent uncoated control zone, only three field zones were assessed, and follow-up was limited to 48 h, operational efficacy requires confirmation in larger, controlled, longer-term studies.

Keywords: *Antibacterial activity; Antifungal activity; Antimicrobial resistance; Microbial load*