

بررسی اثر پوشش‌های بسته‌بندی نانو نقره بر پایه دی اکسید تیتانیوم در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حمید راشدی¹، فرزانه پرتوی²، رضا فتاح³، محمد علی خلیل زاده کلاگر⁴، محمد خیابانی⁵

1- نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. پست الکترونیکی: hrashedi@ut.ac.ir

2- کارشناس ارشد، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات مازندران، ساری، ایران.

3- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

4- استادیار، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات مازندران، ساری، ایران.

5- کارشناس ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران.

تاریخ دریافت: 94/10/20

تاریخ پذیرش: 95/2/5

چکیده

سابقه و هدف: اخیراً نانوذرات نقره توجه فزاینده‌ای را به علت فعالیت‌های ضد میکروبی در فرآوری غذا به خود جلب کرده‌اند. در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره در پوشش‌های بسته‌بندی فیله ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: 2 نمونه پوشش‌های بسته‌بندی حاوی نانو ذرات نقره پوشش دهی شده روی دی اکسید تیتانیوم تهیه شد. ابتدا با میکروسکوپ الکترونی SEM کیفیت پوشش‌های نانو 3% و 5% ارزیابی شد. بعد از انجام مراحل آماده‌سازی پوشش‌ها و تهیه سوسپانسیون باکتری اشریشیاکلی، فعالیت ضد باکتریایی پوشش‌ها طبق استاندارد 10900 مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فیله ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان در پوشش‌های نانو بسته‌بندی و در بازه‌های زمانی صفر، 7، 14 و 21 روز در یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و شمارش کلی میکروب‌ها در مقایسه با نمونه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: اثر بازدارندگی پوشش‌های 3% و 5% بر باکتری‌های مزوفیل تا 7 روز معنی‌دار بود و در روزهای بعد تغییر چشمگیری ملاحظه نشد. پوشش 3% اثر معنی‌داری بر سرعت رشد باکتری‌های سرمادوست نداشت، درحالی که تأثیر پوشش 5% بر سرعت رشد باکتری‌های سرمادوست تا 7 روز معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، استفاده از بسته‌بندی حاوی نانوذرات نقره زمان ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان را افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: پوشش‌های بسته‌بندی نانو، نانوذرات نقره، دی اکسید تیتانیوم، ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان

• مقدمه

تخلیه شده و شستشو و بسته‌بندی انجام می‌پذیرد، با توجه به ارزش تغذیه‌ای ماهی و از طرفی کوتاه بودن مدت نگهداری آن به دلیل رشد سریع میکروارگانیسم‌ها و فسادپذیری، اهمیت به‌کارگیری پوشش‌های بسته‌بندی نمود پیدا می‌کند (2-4). رایج‌ترین نانوکامپوزیت‌ها که به‌عنوان فیلم‌های ضد میکروبی برای بسته‌بندی غذا مورد استفاده قرار گرفته‌اند بر پایه نقره نقره می‌باشند (5). بسته‌بندی‌های حاوی نانو ذرات نقره

میزان تولید ماهی در سال 1389 حدود 663 هزار تن بود و در سال 1390 به 735 هزار تن و در سال 1391 به 800 هزار تن رسید. با توجه به میزان تولید ماهی، برای عرضه ماهی به مصرف‌کننده، پوشش بسته‌بندی برای حمل و نقل حائز اهمیت است (1).

آبزیان بعد از صید، برای فرآوری به کارخانه انتقال می‌یابند. پس از پاک کردن فلس، امعاء و احشاء و آبشش

(محلول 0/4 mg/ml) در محلول 0/005 M AgNO₃ فرو برده شد. مخلوط با سرعت 160 rpm به مدت 24 ساعت در 80 درجه سانتی‌گراد به هم زده شد. نمونه خشک شده تحت تیمار حرارتی به مدت 2 ساعت در 500 درجه سانتی‌گراد با نرخ حرارت دهی 4 C/min قرار گرفت تا احیای یون‌های Ag⁺ روی سطح دی اکسید تیتانیوم و کریستالیزاسیون ساختار تیتانیا انجام پذیرد.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM: میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope) فقط از ساختار سطحی تصویر می‌دهد. برای اطمینان از کیفیت پوشش‌های نانو، عکس‌های میکروسکوپ الکترونی SEM تهیه شد. برای گرفتن تصویر SEM، پوشش‌های بسته‌بندی ابتدا به مدت 30 ثانیه درون نیتروژن مایع در دمای 170- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به طور کامل منجمد گردند. پوشش‌های یخ‌زده بدون اینکه تغییری در ساختارشان ایجاد شود، شکسته شدند. سپس پوشش‌های شکسته شده با ذرات طلا پوشش داده شدند تا روی سطح مقطع و بالای آن‌ها یک لایه نازک و رسانا تشکیل گردد. دستگاه SEM در ولتاژهای مختلف (25-5 کیلوولت) کار می‌کند. وضوح تصاویر در این دستگاه به میزان ولتاژ استفاده شده بستگی دارد. هر چه ولتاژ بالاتر باشد، تصویر واضح‌تری از سطح به دست می‌آید. این تصاویر توسط میکروسکوپ SEM مدل KYKY-EM 3200 ساخت کشور چین گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت ضد باکتریایی پوشش‌ها: توانایی ضد باکتریایی پوشش‌ها در مهار رشد باکتری /شریشیا کلی آزمون شد (8). طبق استاندارد 10900، پوشش‌های بسته‌بندی نانو در ابعاد بزرگ‌تر از (5 × 5) سانتیمتر مربع برش داده شده و لایه‌لای کاغذ صافی در اتوکلاو 121°C، به مدت 15 دقیقه استریل گشتند. سوسپانسیون 0/5 مک فارلند از باکتری /شریشیا کلی (معادل 10⁸ باکتری) در محلول نوترینت براث $\frac{1}{500}$ (0.1 میلی‌لیتر نوترینت براث در 50 میلی‌لیتر آب مقطر) تهیه شد. فیلم‌ها بر روی شیشه‌های استریل به ابعاد (5×5) سانتیمتر مربع چسبانده و در پلیت استریل خالی قرار داده شدند. 0/4 میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10⁶ باکتری /شریشیا کلی زیر هود لامینار روی فیلم روکش شده بر روی شیشه ریخته شد. یک لایه (جلوگیری از تبخیر باکتری) از غشاء محافظ (4×4) سانتی‌متر مربع برش داده شد و روی سوسپانسیون قرار گرفت؛ به طوری که سوسپانسیون باکتری تلقیح شده کامل روی سطح فیلم پخش شد و از لایه‌های غشاءهای محافظ بیرون نزد، پلیت‌ها در انکوباتور (35±2)°C

با آزادسازی یون‌های نقره باعث کاهش، جلوگیری و یا به تأخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت محصول غذایی می‌شود (6). اثر ضد باکتریایی یون‌های نقره بر ریزاندامگان به خوبی شناخته شده است (7)؛ هرچند، درک ناقصی از ساز و کار آن وجود دارد (8). گمان می‌رود که یون نقره برهمکنشی قوی با گروه‌های تیول آنزیم‌های حیاتی داشته و آن‌ها را غیرفعال می‌سازد (10). 9. شواهد تجربی نشان می‌دهد که پس از تیمار باکتری با یون‌های نقره، DNA تخریب شده (11) و یا قابلیت تکثیر خود را از دست می‌دهد (12، 13) دیگر مطالعات شواهدی مبنی بر تغییرات ساختاری با ایجاد حفره (14) و دانه‌های کوچک تشکیل شده از نقره و گوگرد (15) در غشاء سلول نشان داده‌اند.

دی اکسید تیتانیوم (TiO₂) یک کاتالیست نوری است که به طور گسترده‌ای به عنوان ماده خود تمیز کننده و خود ضد عفونی کننده برای پوشش‌های سطحی در بسیاری از کاربردها استفاده می‌شود (16، 17). TiO₂ توسط سازمان غذا و دارو آمریکا برای استفاده در غذا، داروها، لوازم آرایشی و مواد در تماس با غذا مورد تأیید قرار گرفته است (18). واکنش فتوشیمیایی TiO₂ برای غیرفعال‌سازی گستره وسیعی از ریزاندامگان کاربرد دارد (16، 19-22). به عنوان یک ماده ضدباکتریایی جدید، ذرات TiO₂ توجه فزاینده‌ای را به خاطر ویژگی‌های خوبی نظیر پایداری، دوام و ایمنی در سال‌های اخیر به خود جلب نموده‌اند (23، 24). فعالیت ضدباکتریایی TiO₂ در اثر افزودن نقره به شدت افزایش می‌یابد (25، 26).

هدف این مطالعه توسعه پوشش‌های بسته‌بندی نانو نقره بر پایه TiO₂ و بررسی ساختار و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها برای بسته‌بندی ماهی قزل‌آلا رنگین کمان بود. بدین منظور، دو نمونه پوشش 3% و 5% آماده شد. ظرفیت ضدباکتریایی پوشش‌ها در مقابل باکتری /شریشیا کلی در بازه‌های زمانی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و با یکدیگر مقایسه شد.

• مواد و روش‌ها

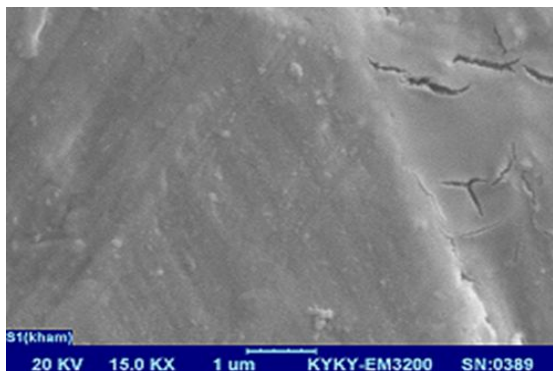
مواد: تتراایزوپروپوکسید تیتانیوم (TIP)، اتانول، نیتریک اسید 65% و نیترات نقره (AgNO₃) از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

تهیه نانو کامپوزیت Ag/TiO₂: توسط روش سل-ژل و با مخلوط نمودن تتراایزوپروپوکسید تیتانیوم با آب مقطر، اتانول و نیتریک اسید 65% تهیه شد. درصد مولی واکنش‌گرها به این صورت بود: [4] : HNO₃ : C₂H₅OH : H₂O : TIP = [0.32] : [80] : [15] به ژل 4 هفته زمان داده شد و سپس

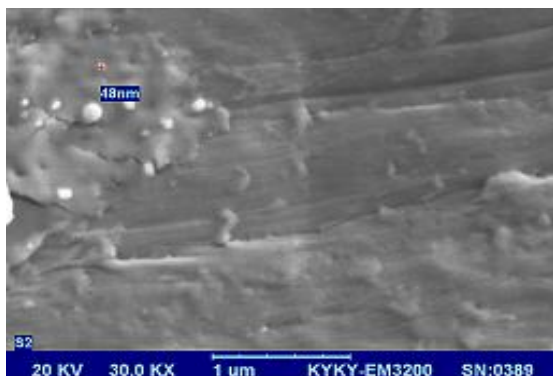
• یافته‌ها

تصاویر SEM: در شکل 1 پوشش نانو 5% با کیسه فریزر معمولی مقایسه شد. در شکل 1-ب ساختار کامپوزیت Ag-TiO₂ قابل مشاهده است. ذرات TiO₂ شکل یکنواختی دارند که نشان دهنده توزیع همگن کریستال‌ها در سطح پوشش است. در برخی نواحی، نانوذرات نقره کلوخه شده‌اند درحالی‌که ذرات فلزی منفرد نیز قابل مشاهده می‌باشند.

الف -



ب -



شکل 1. تصویر SEM گرفته شده از الف) کیسه فریزر معمولی و ب) پوشش نانو 5%

نتایج فعالیت ضد باکتریایی پوشش‌ها: شکل 2 میانگین تعداد باکتری‌های /شیرشیا کلی در نمونه شاهد، پوشش 3% و 5% را نشان می‌دهد. تعداد باکتری به ترتیب در شاهد و فیلم 3% بیشترین میزان رشد را نشان داده که با به‌کارگیری فیلم 5% از تعداد باکتری به طور چشمگیری کاسته شده است. این امر اثر بخشی فیلم 5% را برای کاهش رشد باکتری /شیرشیا کلی نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل 2 مشاهده می‌شود، فعالیت ضد باکتریایی پوشش 5% از پوشش 3% بیشتر است و پوشش 5% رشد باکتری /شیرشیا کلی را یک سیکل لگاریتمی کاهش داده است. جدول تجزیه واریانس 1 نشان داد که میانگین تعداد باکتری‌های /شیرشیا کلی در سطح 5 درصد معنی‌دار است.

به مدت 24 ساعت قرار گرفتند. بعد از طی 24 ساعت، 10 میلی‌لیتر پپتون واتر 0/1 % (1/0 میلی‌لیتر پپتون واتر در 100 میلی‌لیتر آب مقطر) برای شستشوی غشاء محافظ و شیشه روکش شده با فیلم از سمت آغشته به سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفت (حجم 10 میلی‌لیتر پپتون واتر 0/1 % کامل برای شستشو مصرف شد). یک میلی‌لیتر از مایع شسته شده برداشته و در 9 میلی‌لیتر پپتون واتر (رقیق‌سازی ترتیبی) ریخته شد و از هر رقت 0/1 میلی‌لیتر با نمونه‌گیر به محیط پلیت کانت آگار منتقل گشت. پلیت‌ها 24 ساعت در $35 \pm 2^\circ\text{C}$ در انکوباتور قرار گرفتند. پلیت‌های گرمخانه‌گذاری شده بعد از 24 ساعت، از انکوباتور خارج و شمارش کلنی‌ها در پلیت‌های نمونه‌های پوشش 3% و 5% در مقایسه با نمونه شاهد گزارش شد (4).

آزمون میکروبی ماهی: ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان از مراکز صید در شمال ایران به صورت زنده با وزن 340 گرم و طول 31 سانتیمتر تهیه شد. پس از سیر مرگ طبیعی، امعاء و احشاء و آبشش تخلیه، با آب سرد شستشو و فیله ماهی در مجاورت کیسه‌های یخ به آزمایشگاه منتقل شد. سپس با اسکالپل جراحی قطعات 1 گرمی از گوشت ماهی برش داده شد و به‌وسیله پنس استریل در پوشش‌های 3% و 5% قرار گرفت. نمونه شاهد در کیسه فریزر معمولی بسته‌بندی و در یخچال 4 درجه نگهداری شد. بعد از طی صفر، 7، 14 و 21 روز باکتری‌های مزوفیل هوازی و باکتری‌های سرمادوست با استفاده از روش کشت سطحی روی پلیت کانت آگار PCA (Plate Count Agar) شمارش شدند. بدین منظور، محیط کشت پلیت کانت آگار و پپتون واتر تهیه شدند. 2 نمونه از پوشش‌های 3% و 5% حاوی ماهی از یخچال برداشته و 1 گرم ماهی با 9 میلی‌لیتر پپتون واتر به صورت هموژن درآمد. رقت‌های مورد نیاز تهیه شد. میزان 1 میلی‌لیتر از هر رقت در پلیت قرار گرفت و محیط پلیت کانت آگار به روش پور پلیت افزوده شد. شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی بعد از 48 ساعت انکوباسیون در دمای $35 \pm 2^\circ\text{C}$ و شمارش باکتری‌های سرمادوست بعد از 10 روز انکوباسیون در دمای 7°C انجام شد. شمارش باکتریایی کل در مقایسه با نمونه شاهد انجام گرفت.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 و توسط روش تحلیل آماری (Anova) انجام شد. آزمون دانکن در سطح 5 درصد برای تعیین سطح معنی‌داری استفاده شد. برای رسم نمودارها از Excel-2007 استفاده شد.

نتایج آزمون میکروبی ماهی: تجزیه و تحلیل داده‌ها در جدول 2 نشان می‌دهد به کارگیری تیمار (پوشش‌های بسته‌بندی نانو) معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). پلیت‌های گرمخانه گذاری شده بعد از 48 ساعت، از انکوباتور خارج و شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل هوازی نمونه پوشش‌های 3% و 5% در مقایسه با نمونه شاهد گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد به کارگیری تیمار (پوشش‌های بسته‌بندی) معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$). تغییرات شمارش کلی باکتری‌ها در شکل 3-الف نشان داده شده است. با توجه به شکل 3-الف، میزان رشد باکتری‌ها از روز صفر تا روز 7 قابل توجه بوده است. بیشترین رشد در روزهای 7 تا 21 معنی‌دار بوده که تفاوت قابل توجهی بین این روزها در رشد باکتری مشاهده نشده است. در روزهای 7، 14 و 21 گرچه روند تا حدودی افزایشی بوده اما این افزایش چشمگیر نبوده و در نتیجه میزان رشد باکتری‌ها ثابت می‌باشد. اثر بازدارندگی پوشش 3% تا روز 7 معنی‌دار است. به‌طور کلی تأثیر پوشش 3% در میزان رشد باکتری‌های مزوفیل هوازی در 7 روز اول نگهداری قابل ملاحظه است.

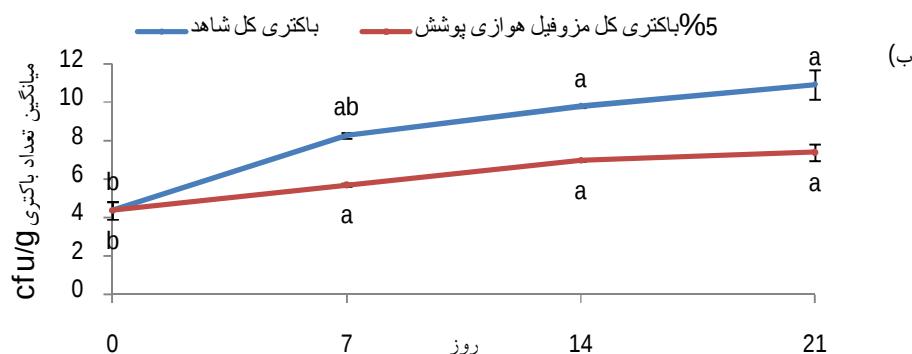
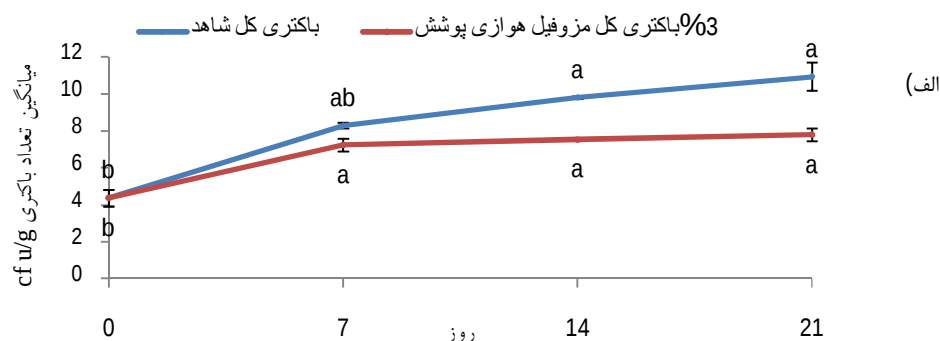


شکل 2. تغییرات رشد باکتری اشیریشیا کلی در پوشش‌های مختلف

جدول 1. تحلیل واریانس فعالیت ضد باکتریایی پوشش‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات باکتری اشیریشیا کلای
تیمار	2	1/772*
خطا	3	0/291
کل	6	

* معنی‌داری در سطح 0/05



شکل 3. شمارش کلی (الف) باکتری مزوفیل هوازی پوشش 3% در یک بازه زمانی 21 روزه و (ب) باکتری مزوفیل هوازی پوشش 5% در یک بازه زمانی 21 روزه

جدول 2. تحلیل واریانس پوشش‌های بسته‌بندی نانو در آزمون میکروبی ماهی

منابع	درجه خطا	روز صفر (آغاز کشت)	روز 7	روز 14	روز 21
تیمار	5	0/050 ^{ns}	2/403	2/905	4/306
خطا	6	0/141	0/051	0/091	0/160

* معنی‌داری در سطح 0/05

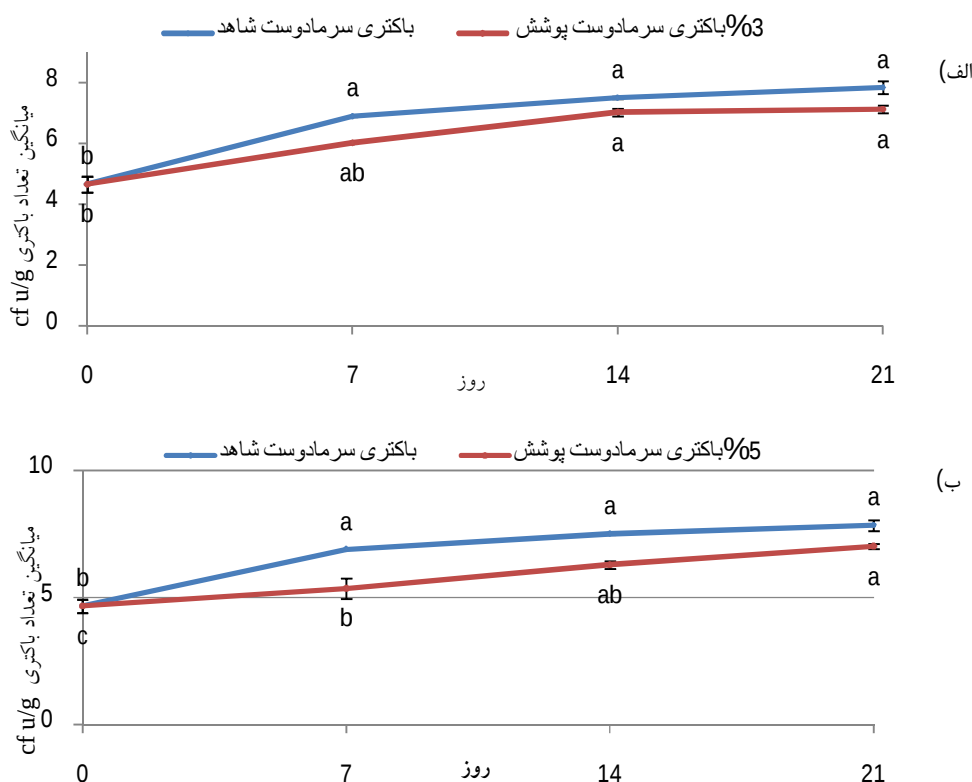
^{ns} عدم وجود اختلاف معنی‌دار

پوشش 3% در میزان رشد باکتری‌ها از روز صفر تا روز 7 تفاوت خاصی به وجود نیاورده است. این افزایش از روز 7 تا روز 14 معنی‌دار نبوده است و میزان رشد باکتری‌ها در روزهای 14 و 21 برابر گزارش شده است. بیشترین میزان رشد باکتری نسبت به روز آغازین در روزهای 7 تا 21 کشت بوده است. به‌طور کلی پوشش 3% در میزان رشد باکتری‌های سرمادوست تأثیر چندانی نداشت.

تغییرات شمارش باکتری‌های سرمادوست پوشش 5% در شکل 4-ب به تصویر درآمده است. در نمودار شکل 4-ب، اثر پوشش 5% بر میزان رشد باکتری‌های سرمادوست از روز صفر تا روز 7 قابل توجه بوده است. تفاوتی در میزان رشد باکتری‌ها از روز 7 تا 14 و از روز 14 تا 21 مشاهده نشده است. اثر بازدارندگی پوشش 5% بر باکتری‌های سرمادوست تا روز 7 معنی‌دار است. به‌طور کلی تأثیر پوشش 5% در میزان رشد باکتری‌های سرمادوست 7 روز است.

تغییرات شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل هوازی پوشش 5% در شکل 3-ب نشان داده شده است. در نمودار شکل 3-ب، میزان رشد باکتری‌ها از روز صفر تا روز 7 معنی‌دار بوده است ولی از روز 7 تا روز 21 افزایش چندانی مشاهده نشده است. تفاوتی در میزان رشد باکتری‌ها در روزهای 7، 14 و 21 قابل مشاهده نیست. اثر بازدارندگی پوشش 5% بر باکتری‌های مزوفیل هوازی تا روز 7 چشمگیر است. به‌طور کلی تأثیر پوشش 5% در میزان رشد باکتری‌های مزوفیل هوازی 7 روز است.

پلیت‌های گرمخانه گذاری شده بعد از 10 روز، از انکوباتور خارج شد و شمارش باکتری‌های سرمادوست نمونه پوشش‌های 3% و 5% در مقایسه با نمونه شاهد گزارش شد. حد مجاز توصیه شده باکتری‌های سرمادوست $6 \log_{cfu}/g$ می‌باشد. تغییرات شمارش باکتری‌های سرمادوست پوشش 3% در شکل 4-الف نشان داده شده است. با توجه به شکل 4-الف،



شکل 4. شمارش باکتری‌های سرمادوست الف) پوشش 3% در یک بازه زمانی 21 روزه و ب) پوشش 5% در یک بازه زمانی 21 روزه

• بحث

در این مطالعه از نانوذرات نقره بر پایه دی اکسید تیتانیوم برای تهیه پوشش‌های نانویی به منظور استفاده از قابلیت ضد میکروبی این نانوذرات برای کاهش سرعت رشد ریزندامگان موجود در فیله ماهی قزل‌آلا رنگین کمان استفاده شد. بدین منظور، دو نمونه پوشش نانویی 3% و 5% آماده شد و میزان تأثیرگذاری هر کدام از آن‌ها بر ریزندامگان مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های مورد مطالعه شامل باکتری‌های مزوفیل هوازی و باکتری‌های سرمادوست بود. شمارش میکروبی توسط روش کشت سطحی معیاری برای ارزیابی میزان رشد باکتری‌ها تلقی شد. پس از تجزیه و تحلیل داده‌های عددی با استفاده از نرم‌افزار spss و روش تحلیل آماری، میزان اثرگذاری نقره بر این باکتری‌ها با یکدیگر مقایسه شد.

شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل هوازی اولیه گونه‌های مختلف ماهیان آب‌های شیرین مانند قزل‌آلا رنگین کمان $6 \log_{cfu}/g$ می‌باشد. میزان بار باکتریایی اولیه حدود $4 \log_{cfu}/g$ بود، که نشان دهنده کیفیت ماهی می‌باشد. شمارش کلی باکتری‌ها در پوشش 3% تا روز 7 معنی‌دار شد ($p < 0/05$) میزان بار باکتریایی اولیه حدود $4 \log_{cfu}/g$ در طول دوره نگهداری تا روز 7 معنی‌دار شد، با این تفاوت که در پوشش 5% پس از 14 روز نگهداری، بار باکتریایی کل زیر حد قابل قبول $6 \log_{cfu}/g$ گزارش شد که نشان دهنده اثرات پوشش نانو 5% است. تحقیق مشابهی توسط دم و همکارانش (27) انجام پذیرفت که نشان داد پوشش پلی‌آمید حاوی 2% نانوذرات نقره، پس از گذشت 28 روز، رشد/شرشیا کولای را تا 6 سیکل لگاریتمی کاهش می‌دهد. همچنین، بررسی ساراوانان و همکارانش (28) نشان داد که وجود 2.15% نانوذرات نقره در پوشش کیتوزان برای بهبود غیرفعال‌سازی/شرشیا کولای کافی است.

باکتری‌های سرمادوست به‌ویژه گونه‌های سودوموناس، آنزیم‌های لیپاز و فسفولیپاز را تولید می‌کنند که سبب افزایش اسیدهای چرب آزاد (FFA) می‌شوند. باکتری‌های سرمادوست در مقایسه با سایر باکتری‌ها در ایجاد فساد مؤثرترند و با تولید کتون‌ها و آلدئیدها باعث تغییر عطر و بو، بافت و مزه مواد غذایی می‌شوند. بیشترین حد مجاز باکتری‌های سرمادوست در ماهی قزل‌آلا رنگین کمان $6 \log_{cfu}/g$ است. میزان باکتری‌های سرمادوست اولیه حدود $4/4 \log_{cfu}/g$ بود که باکتری‌های سرمادوست نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری با پوشش 3% نشان نداد ($P > 0/05$)، در حالی که در پوشش 3% تقریباً تا روز 14 تعداد باکتری‌های سرمادوست زیر حد قابل قبول توصیه شده $6 \log_{cfu}/g$ گزارش شد. شمارش باکتری‌های سرمادوست پوشش 5% تا 7 روز معنی‌دار است، در صورتی که تعداد باکتری‌های سرمادوست تا روز 21 زیر حد قابل قبول $6 \log_{cfu}/g$ گزارش شد. اثر ضد میکروبی پدهای سلولزی

حاوی نانوذرات نقره بر باکتری‌های سرمادوست، کپک و مخمر توسط فرناندز و همکارانش (29) مورد بررسی قرار گرفت. شمارش کلی باکتری‌ها در طول مدت نگهداری حدود 3 سیکل لگاریتمی نسبت به نمونه شاهد کاهش پیدا کرد.

تحقیقات مشابه دیگری نیز در زمینه مقایسه اثر بازدارندگی نقره بر گونه‌های مختلف باکتری‌ها انجام پذیرفته است. اسدی اسدآباد و همکاران (30)، از نانوذرات نقره که به روش احیاء شیمیایی تولید شدند، برای بررسی اثر ضد میکروبی نقره بر دو باکتری/استافیلوکوکوی اورئوس و/شریشیاکلی استفاده نمودند. مطالعات آن‌ها نشان داد که مقاومت/شریشیاکلی در برابر نقره نسبت به/استافیلوکوکوس بیشتر است. کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره برای/استافیلوکوکوس اورئوس 5 ppm و/شریشیاکلی 10 ppm بدست آمد و غلظت 50 ppm باعث از بین رفتن کامل هر دو نوع باکتری شد. دلیل این پدیده این است که/شریشیاکلی به‌عنوان یک باکتری گرم منفی دارای غشاء خارجی حاوی لیپوپلی ساکارید بوده که باعث کاهش نفوذپذیری آن‌ها در مقابل عوامل ضد میکروبی می‌شود.

سال بعد، عبدالستاری و همکاران (31) تأثیر بسته‌های پلیمری حاوی رس اصلاح‌شده آلی و با نانوذرات مس و نقره بر کاهش گروه کلی‌فرم‌ها، لاکتوباسیل‌ها و/استافیلوکوکوس اورئوس را پس از 1، 7، 14 و 28 روز مورد بررسی قرار دادند. بسته‌بندی اصلاح‌شده با نانوذرات نقره باعث کاهش بیشتری در میزان کلی‌فرم‌ها بود؛ به طوری که پس از گذشت 14 روز از نگهداری، کاهش در حدود یک سیکل لگاریتمی مشاهده شد. میزان لاکتوباسیل‌ها در پنی‌ر بسته‌بندی‌شده در پوشش اصلاح شده با نانوذرات نقره، روند افزایشی کندتری را از خود نشان داد. روند افزایشی/استافیلوس اورئوس نیز مشابه دو مورد قبل بود. به این صورت که بسته‌بندی اصلاح شده با نانوذرات نقره، یک سیکل لگاریتمی کاهش را پس از گذشت 28 روز نشان داد. این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره اثر ضد میکروبی قابل توجهی را بر بسته‌بندی‌های حاوی خاک رس بر جا می‌گذارد که البته برای گونه‌های مختلف باکتریایی متفاوت است.

نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر نشان می‌دهد که خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره برای گونه‌های مختلف باکتریایی مورد مطالعه متفاوت و منحصر به فرد است. مقاومت برخی از گونه‌ها می‌تواند به دلیل تولید برخی ترکیبات خاص و در برخی دیگر به خاطر ساختار غشای مقاوم در برابر خاصیت ضد میکروبی نقره باشد. به همین خاطر، باید غلظت نانوذرات نقره بکار برده شده در پوشش‌های نانویی با توجه میزان مقاومت گونه‌های مختلف باکتریایی در برابر نقره تعیین گردد تا بار باکتریایی ماده غذایی پس از گذشت بازه زمانی مورد نظر از حد مجاز تجاوز نکند.

• References

- Mirnezamizabary SH. Principles of Food Packaging. 1st ed. Tehran, aeej 2010. p. 210. [in Persian].
- Foroughi S, Dabbagh Moghaddam A, Ahari H, Akbarein H, Anvar AA, Aghazadeh Meshki M, et al. A Survey on the shelf life extension of foods with nanofilms. JAUMS 2011; 9: 13-18.
- Shahbazzadeh D, Ahari H, Mohammad Rahimi N, Dastmalchi F, Soltani M, Rahmanny J, et al. The effects of nanosilver (Nanocid) on survival percentage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pakistan J Nutr 2009; 8: 1178-79.
- Soltani M, Esfandiary M, Sajadi MM, Khazraeenia S, Bahonar AR, Ahari H. Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae. Iran J Fisheries Sci 2010; 10: 167-76.
- De Azeredo HM. Nanocomposites for food packaging applications. Food Res Int 2009; 42: 1240-53.
- Sotiriou GA, Pratsinis SE. Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor & bioimaging material. Chem Eng 2011; 1: 3-10.
- Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. Lett Appl Microbiol 1997; 25: 279-83.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005; 16: 23-46.
- Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki SI, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. Appl Environ Microb 2003; 69: 4278-81.
- Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. Appl Environ Microb 1998; 64: 5042-45.
- Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. Water Res 2008; 42: 4591-602.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res 2000; 52: 662-68.
- Russell AD, Path FR, SI FP, Hugo WB. 7 Antimicrobial Activity and Action of silver. Progr Med Chem 1994; 31: 351-70.
- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interf Sci 2004; 275: 177-82.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. Mol Cell Biol 1989; 9: 1298-308.
- Fujishima A, Hashimoto K, Watanabe T. TiO₂ photocatalysis: fundamentals and applications. 1st ed. BKC Incorporated 1999. p. 205.
- Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis. J Photoch Photobio C: Photochemistry Reviews 2000; 1: 1-21.
- Chawengkijwanich C, Hayata Y. Development of TiO₂ powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli* in vitro and in actual tests. Int J Food Microbiol 2008; 123: 288-92.
- Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Nakamura NORIYUKI, Komine T. Continuous-sterilization system that uses photoconductor powders. Appl Environ Microb 1998; 54: 1330-33.
- Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. Environ Sci Technol 1998; 32: 726-728.
- Duffy EF, Al Touati F, Kehoe SC, McLoughlin OA, Gill LW, Gernjak W, et al. A novel TiO₂-assisted solar photocatalytic batch-process disinfection reactor for the treatment of biological and chemical contaminants in domestic drinking water in developing countries. Sol Energy 2004; 77: 649-55.
- Maneerat C, Hayata Y. Antifungal activity of TiO₂ photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. Int J Food Microbiol 2006; 107: 99-103.
- Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. Environ Sci Technol 1998; 32: 726-28.
- Hagfeldt A, Graetzel M. Light-induced redox reactions in nanocrystalline systems. Chem Rev 1995; 95: 49-68.
- Vamathevan V, Amal R, Beydoun D, Low G, McEvoy S. Silver metallisation of titania particles: effects on photoactivity for the oxidation of organics. Chem Eng J 2004; 98: 127-39.
- Zhang X, Zhou M, Lei L. Preparation of an Ag-TiO₂ photocatalyst coated on activated carbon by MOCVD. Mater Chem Phys 2005; 91: 73-79.
- Damm C, Münstedt H, Rösch A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. J Mater Sci. 2007; 42: 6067-73.
- Saravanan S, Nethala S, Pattnaik S, Tripathi A, Moorthi A, Selvamurugan N. Preparation, characterization and antimicrobial activity of a biocomposite scaffold containing chitosan/nanohydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2011; 49: 188-93.
- Fernández A, Picouet P, Lloret E. Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilagerelated microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. Int J Food Microbiol. 2010; 142: 222-8.
- Asadi M, Khosravi-Darani K, Mortazavi SA, Hajseyed Javadi N, Azadnia E, Kiani Harchegani AA, et al. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by chemical reduction on *Staphylococcus aureus* and *Escheirchia coli*. Iran J Nutr Sci & Food Technol 2014; 8: 83-92 [in Persian].
- Abdossattari P, Pejghambaroust SH, Hesari J, Pejghambaroust SJ, Rezaie Mokarram R. Application of LDPE Nanocomposite Films Incorporating Organoclay Modified with Nanomaterials in Packaging of Lighvan Cheese. Iran J Nutr Sci & Food Technol 2015; 10: 47-56 [in Persian].

The Effect of Silver Nanofilms based on Titanium Dioxide on the Shelf-life of Rainbow Trout Fillet (*Oncorhynchus mykiss*)

Rashedi H^{*1}, Partovi F², Fattah R³, Khalilzadeh Kalagar MA⁴, Khiabani M⁵

1- Corresponding author: Associate prof, Biotechnology Group, Department of Chemical Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: hrashedi@ut.ac.ir

2- M.Sc, Food Science and Technology Group, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

3- M.Sc, Biotechnology Group, Department of Chemical Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Assistant Prof, Food Science and Technology Group, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

5- M.Sc, Agronomy and Plant Breeding Group, Islamic Azad University of Sabzevar, Sabzevar, Iran.

Received 10 Jan, 2016

Accepted 24 Apr, 2016

Background and objective: Recently, silver nanoparticles have attracted a growing attention in food processing due to their antimicrobial activities. In this study, antimicrobial effect of silver nanoparticles in rainbow trout fillet packaging's was investigated.

Materials & Methods: Two samples of nanofilms containing silver nanoparticles covered on titanium dioxide were prepared. First, the quality of 3 and 5% nanofilms was assessed by SEM electron microscope. Following the preparation of nanofilms and a bacterial suspension of *E.Coli*, the antibacterial activity of nanofilms was measured according to 10900 standard. Rainbow trout fillet was packed in nanofilms and stored for 0, 7, 14 and 21 days in a 4°C refrigerator, and total bacterial count was compared with the samples without nanofilms.

Results: The inhibitory effect of 3% and 5% nanofilms on mesophilic bacteria was significant till 7 days, and no considerable change was observed in the following days. The 3% nanofilm had no significant effect on the growth rate of psychrophilic bacteria whereas the effect of 5% nanofilm on the growth rate of psychrophilic bacteria was significant for 7 days.

Conclusion: According to the results, utilization of nanofilm containing silver nanoparticles increases the shelf life of rainbow trout fillet.

Keywords: Nanofilms, Silver nanoparticles, Titanium dioxide, Rainbow trout