

بررسی اثر ضد میکروبی فیلم نانوکیتوزان - کربوکسی متیل سلولز حاوی نانو ذرات نقره و اسانس خوشاریزه

اله یار نبی پور^۱، علی خنجری^{۲*}، ژاله خوشخو^۱، افشین آخوندزاده^۲، مرجانه صداقتی^۱

^۱ گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۵/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۳

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی فیلم نانوکیتوزان-کربوکسی متیل سلولز حاوی نانو ذرات نقره و اسانس خوشاریزه (*Echinophora sibthorpiana*) علیه برخی باکتری‌های مهم غذازاد به‌اجرا در آمد. اسانس خوشاریزه از اندام‌های هوایی گیاه با روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استخراج شد. نانو ذرات نقره به روش زیستی تهیه شد و اسانس‌ها با غلظت مشخص اضافه گردید. فیلم‌های نانوکیتوزان-کربوکسی متیل سلولز در چهار تیمار شامل: پایه، حاوی نانو نقره، حاوی نانو نقره و ۰/۳ درصد اسانس، و حاوی نانو نقره و ۰/۶ درصد اسانس ساخته شدند. اثر ضد میکروبی این فیلم‌ها علیه *سالمونلا تیفی موریوم* (*Salmonella typhimurium*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) ارزیابی شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS 26 و آزمون‌های ANOVA و توکی تحلیل شدند. نتایج نشان داد با افزودن نانو نقره و پس از آن اسانس خوشاریزه به فیلم پایه، قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد. بیشترین اثر ضد میکروبی در فیلم حاوی ۰/۶ درصد اسانس خوشاریزه مشاهده شد و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها حساسیت بیشتری نشان دادند. نتایج تحقیق نشان داد که نانو ذرات نقره و اسانس خوشاریزه موجب افزایش فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های نانو کیتوزان-کربوکسی متیل سلولز در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند. برای معرفی این فیلم‌ها به عنوان گزینه کاربردی در بسته‌بندی فعال مواد غذایی، لازم است آزمون‌های تکمیلی روی ماده غذایی صورت پذیرد. واژه‌های کلیدی: اثر ضد میکروبی، باکتری‌ها، خوشاریزه، کربوکسی متیل سلولز، نانو ذرات نقره، نانو کیتوزان

مقدمه

مبتلایان جان خود را از دست می‌دهند (WHO, 2024). از شایع‌ترین عوامل بروز عفونت‌ها و مسمومیت‌های شدید غذایی که باعث گاستروانتریت^۲، سپتیسمی^۳ و در برخی موارد حتی مرگ می‌شوند، می‌توان به *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* اشاره کرد (Newell et al., 2010; Taxue, 2002). بسته‌بندی‌های سنتزی رایج‌ترین نوع بسته‌بندی در صنعت غذا هستند اما در سال‌های اخیر به دلیل استفاده از نفت

یکی از مهمترین دغدغه‌ها در زمینه بهداشت عمومی در سطح جهان، بیماری‌های غذازاد هستند که برخلاف باور برخی از مردم این بیماری‌ها علاوه بر کشورهای در حال توسعه در کشورهای پیشرفته نیز مشاهده می‌شود (Barzegar Mohammadi et al., 2025). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت^۱، سالانه حدود ۶۰۰ میلیون نفر به این بیماری‌ها مبتلا می‌شوند و حدود ۰/۱ درصد از این

^۳ Septicemia

^۱ World Health Organization (WHO)

^۲ Gastroenteritis

نقره از مهم‌ترین ذرات فلزی در ابعاد نانو هستند که در دو دهه اخیر مطالعات گسترده‌ای روی آنها صورت گرفته است. از تفاوت‌هایی که میان نانو نقره با نقره ماکروسکوپی وجود دارد، فعالیت‌های ضد میکروبی شدیدتر آن است (Kumar et al., 2015- Rajan et al., 2021). تحقیقات نشان داده است که نانو نقره خواص دیگری نیز دارد مانند فعالیت به عنوان آنتی اکسیدان و جلوگیری از ابتلا به سرطان (Firoozi et al., 2016). مکانیسم ضد میکروبی این نانو ذرات از طریق تخریب ساختار غشای سلول و نیز مرگ باکتری به دلیل انتشار یون از سطح این نانو ذرات است (Lok et al., 2006). به‌رغم بهره‌گیری گسترده از نانو ذرات نقره در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی، مسئله مهاجرت یون‌ها یا ذرات نانو به درون مواد غذایی، چالشی کلیدی در حوزه ایمنی مواد غذایی است. شدت این مهاجرت با متغیرهایی مانند ویژگی‌های پلیمر، شرایط محیطی (دما و زمان) و نوع ماده غذایی رابطه مستقیم دارد. با توجه به خطرهای ناشی از تجمع زیستی نقره و سمیت بالقوه آن، سازمان‌های نظارتی بر ارزیابی دقیق سم‌شناسی پیش از تجاری‌سازی تأکید دارند. اگرچه یافته‌های کنونی اغلب میزان مهاجرت را در سطوح مجاز گزارش کرده‌اند، اما برای حصول اطمینان کامل از ایمنی مصرف‌کننده، تداوم پژوهش‌ها در شرایط واقعی نگهداری مواد غذایی ضروری است (Morais et al., 2020). استفاده از اسانس و عصاره گیاهان در صنعت غذا و مخصوصاً پوشش‌های خوراکی در سال‌های اخیر رشد چشمگیری داشته است. از مهم‌ترین دلایل آن می‌توان به ایمن بودن و برخی از ویژگی‌های دیگر آن همچون فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی اشاره کرد (Deng et al., 2020).

خوشاریزه گیاهی است علفی که در برخی نواحی مرکزی و شمال غربی ایران و همچنین مناطق مدیترانه‌ای رشد می‌کند. از نام‌های دیگر آن می‌توان به خوشاروزه، تیغ توراغ و کشندر اشاره کرد (Avjigan et al., 2006).

خام در تولید آنها و آلودگی‌های زیست محیطی که ایجاد می‌کنند، توجهات به سمت استفاده از پوشش‌های خوراکی جلب شده است (Shahidi & John, 2010). از مزیت‌های استفاده از پوشش‌های خوراکی می‌توان به کاهش آلودگی‌های زیست محیطی و امکان حمل ترکیبات مختلف به‌منظور افزایش مدت زمان نگهداری و بهبود ویژگی‌هایی حسی محصول مورد نظر اشاره کرد (Coma, 2008 ; Hernandez et al., 2017). یکی از پایه‌های اساسی در تولید پوشش‌های خوراکی، ترکیبات پلی‌ساکاریدی هستند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به سلولز و مشتقات آن اشاره کرد (Shahina & Khaksar, 2013). سلولز و مشتقات آن به این دلیل که فاقد بو مزه هستند و به راحتی امکان تجزیه در طبیعت دارند، ترکیب مناسبی برای استفاده در ساخت پوشش‌های خوراکی هستند (Sánchez-González et al., 2011). کربوکسی متیل سلولز در آب قابل حل است و می‌تواند عامل تولید پوشش‌هایی مستحکم باشد که از مزایای استفاده از آن در پوشش‌های خوراکی می‌توان به توانایی کنترل اکسیژن اشاره کرد که باعث جلوگیری از اکسیداسیون و کمک به افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌شود (Mekonnen et al., 2023; Zhang et al., 2024). یکی از مشکلات اساسی پوشش‌های بر پایه کربوکسی متیل سلولز، مهار نسبتاً ضعیف آن در برابر بخار آب است اما زمانی که با مواد طبیعی دیگر مثل کیتوزان ترکیب می‌شوند که استحکام بالایی دارند، می‌توانند بهترین عملکرد خود را ارائه دهند (Baldwin et al., 2012). کیتوزان پلی‌ساکاریدی زیست تخریب‌پذیر است که از کیتین موجود در بی مهرگان و سخت پوستان استخراج می‌شود و در تولید پوشش‌های خوراکی به‌کار می‌رود. کیتوزان کمک می‌کند تا پوشش خوراکی حاصل از آن همچون سدی در برابر میکروارگانیسم‌ها عملکرد کند و با جلوگیری از رسیدن اکسیژن به ماده غذایی باعث بهبود کیفیت و افزایش مدت زمان نگهداری آن شود (Raghav et al., 2016). نانو ذرات

بخش مورد استفاده این گیاه اندام‌های هوایی آن است. این گیاه سرشار از ترکیبات پلی فنولی است و خاصیت ضد میکروبی گسترده‌ای در مقابل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها از خود نشان می‌دهد. علاوه بر آن، طبق مطالعات گسترده اسانس خوشاریزه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است که آن را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای استفاده در ترکیبات پوشش‌های خوراکی مطرح می‌کند (Pilevar *et al.*, 2024; Sahin *et al.*, 2025). در این پژوهش، اثر ضد میکروبی فیلم نانو کیتوزان - کربوکسی متیل سلولز حاوی نانو نقره و اسانس خوشاریزه بر برخی از باکتری‌های غذازاد بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و استخراج اسانس

اندام‌های هوایی (برگ و ساقه) گیاه خوشاریزه یا خارکلبه یا کوموزا تورشه از مناطق غربی کشور ایران تهیه و پس از تایید نام علمی از طرف موسسه گیاه شناسی دانشگاه تهران، برای ادامه فرایند به آزمایشگاه انتقال داده شد. اسانس با روش تقطیر با آب و استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید. بدین منظور ۱۵۰ گرم از پودر اندام‌های هوایی گیاه همراه با ۲ لیتر آب مقطر درون بالن دستگاه ریخته و به مدت ۳/۵ ساعت حرارت داده شد. در اثر حرارت، اسانس همراه با بخار آب وارد مبرد شد. اسانس به دست آمده با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و اسانس زرد رنگ خالص، جداسازی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ferhat *et al.*, 2006). بازده اسانس به وزن خشک گیاه ۲/۷۵ درصد بود.

آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

بازده اسانس حاصل از مواد خشک شده با استفاده از کروماتوگرافی گازی و دستگاه Thermoquest 2000 (انگلستان) بررسی گردید. کروماتوگراف به یک ستون

مویینه DB5 با ابعاد ۳۰ متر $\times$ ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی و ضخامت لایه فیلم ۰/۲۵ میکرومتر مجهز بود. داده‌ها تحت دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد، میزان افزایش دما ۲/۵ درجه سانتی‌گراد، دمای نهایی ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و دمای تزریق‌کننده ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند. گاز حامل هلیوم بود و نسبت اسپیلت برابر با ۱:۲۰ در نظر گرفته شد. اسانس همچنین با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی^۱ دستگاه Thermoquest Finnigan تجزیه و تحلیل گردید و همان ستون مویینه و شرایط تحلیلی ذکرشده در بالا به کار گرفته شد. طیف‌سنج جرمی در مد یونش الکترونی^۲ با انرژی یونش ۷۰ الکترون ولت به کار گرفته شد (El-Nashar *et al.*, 2021).

تهیه نانو ذرات نقره به روش زیستی

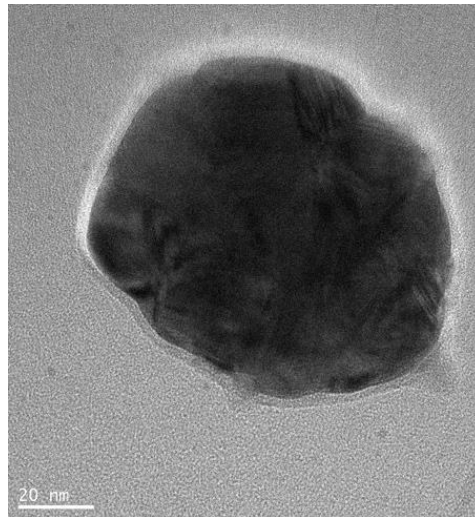
ابتدا اسانس خوشاریزه با استون رقیق می‌شود (۱:۱۷۰). دو میلی لیتر از محلول به دست آمده به صورت آهسته به ۳۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ($10^{-4} \times 3$ میلی مول/لیتر) تحت همزدن مداوم در دستگاه همزن مغناطیسی، اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و همزدن شدید قرار شد. رنگ قهوه‌ای مایل به زرد دلالت بر تشکیل نانوذرات نقره مورد نظر دارد (Maicel *et al.*, 2019). به منظور بررسی دقیق مورفولوژی، ابعاد و نحوه توزیع نانوذرات نقره، از میکروسکوپ الکترونی عبوری^۳ مدل JEOL JEM-۲۱۰۰ بهره گرفته شد. برای آماده‌سازی، محلول نانوذرات پس از رقیق‌سازی، به صورت قطره‌ای روی شبکه‌های مسی پوشش‌دار با کربن تثبیت شد و پس از خشک‌شدن کامل، فرایند تصویربرداری در ولتاژ ۲۰۰ کیلوولت طی گردید. نتایج TEM حاکی از آن است که نانوذرات نقره دارای مورفولوژی تقریباً کروی و اندازه ۱۵ تا ۴۵ نانومتر هستند. یکنواختی در ابعاد و شکل ذرات، مؤید کارایی مطلوب روش سنتز سبز در تولید این نانوذرات

³ Transmission Electron Microscopy (TEM)

¹ Gas chromatography – Mass spectrometry

² Electron Ionization

است. سوسپانسیون نانو ذرات نقره سنتز شده به منظور حفظ پایداری کلونیدی و جلوگیری از اکسیداسیون یا رشد میکروبی، در ظروف شیشه‌ای تیره با درپوش کاملاً پلمب شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای پیشگیری از تخریب نوری و تغییرات ساختاری ناشی از فرآیندهای فیزیکی، ظرف‌ها از نور مستقیم محافظت شدند و از هرگونه فرآیند انجماد خودداری گردید.



شکل ۱- بررسی مورفولوژی نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری
Figure 1. Morphological characterization of the synthesized silver nanoparticles using transmission electron microscopy

تهیه فیلم نانو کیتوزان- کربوکسی متیل سلولز حاوی نانو ذرات نقره و اسانس خوشبویزه

برای تهیه کردن فیلم‌های نانو کیتوزان- کربوکسی متیل سلولز حاوی نانونقره و اسانس خوشبویزه از روش ریخته‌گری حلال^۱ استفاده شد، سه گرم پودر کربوکسی متیل سلولز در ۱۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد (دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد) و به مدت ۴۵ دقیقه با دستگاه همزن مغناطیسی تحت هم‌زدن شدید قرار داده شد. نانوکیتوزان به اندازه ۰/۵ درصد وزنی به کربوکسی متیل سلولز اضافه گردید و پس از آن گلیسرول به میزان ۲ درصد حجمی/حجمی به عنوان نرم‌کننده^۲ افزوده شد. توئین ۸۰^۳ (۰/۲۵ درصد محلول) به عنوان امولسیفایر^۴ و همچنین غلظت‌های موردنظر اسانس خوشبویزه (صفر، ۰/۳ و ۰/۶ درصد) و در نهایت نانو ذرات نقره (۰/۱۵ درصد وزنی/وزنی) افزوده و توسط هوموژنایزر^۵ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت زمان ۲ دقیقه همگن (هوموژن) گردید. آنچه به دست آمد درون پلیت‌های شیشه‌ای (قطر ۱۰ سانتی متر) ریخته شد. فیلم‌ها پس از خشک شدن در دمای اتاق از قالب‌ها جدا و برای مراحل بعدی آزمایش استفاده شدند (Ediyilyam *et al.*, 2021).

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده

چهار میکروارگانیزم لیستریا مونوسییتوزنر ATCC 19118، سالمونلا تیفی موریوم ATCC 13311، اشریشیا کلی ATCC 35218 O157:H7 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 در این مطالعه به کار گرفته شدند.

⁴ Emulsifier
⁵ Homogenizer

¹ solvent casting method
² Plasticizer
³ Tween 80

میکروارگانیسم های مورد نظر در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند.

آماده سازی کشت های باکتریایی

سویه های باکتریایی ذخیره شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد (درون میکرو اپندورف) ابتدا به ۱۰ میلی لیتر محیط آگار کشت قلب و مغز^۱ منتقل و به مدت 18 ± 2 ساعت در دمای 35 ± 2 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. از کشت اولیه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به ۱۰ میلی لیتر محیط BHI تازه تلقیح گردید و مجدداً به مدت ۱۸ ساعت در همان دما گرمخانه گذاری شد تا کشت به مرحله لگاریتمی رشد برسد. از کشت ۱۸ ساعته دوم، رقت های سریالی تهیه و جذب نوری آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. به منظور تعیین معادل CFU/mL در $OD_{600nm} = 0.1$ ، از محتویات لوله ای با همان جذب، رقت های سریالی ۱ به ۱۰ تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مناسب (10^{-5} تا 10^{-7}) روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، کلنی های تشکیل شده شمارش و تعداد CFU/mL واقعی محاسبه شد.

تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم ها

از روش انتشار دیسک برای تعیین میزان فعالیت ضد میکروبی فیلم ها استفاده شد. برای تهیه کردن سوسپانسیون استاندارد با غلظت نهایی 1×10^6 CFU/mL مطابق با استاندارد، از کشت با $OD_{600nm} = 0.1$ یک رقت ۱۰۰ برابری در محیط BHI استریل تهیه شد (۱۰۰ میکرولیتر کشت به ۹/۹ میلی لیتر محیط). صحت غلظت نهایی با اندازه گیری مجدد جذب نوری و تطابق با کدورت مکفارلند ۰/۵ تأیید گردید. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون استاندارد حاوی 1×10^6 CFU/mL روی سطح محیط مولر هینتون

آگار^۲ پخش گردید و دیسک های فیلم حاوی غلظت های مختلف اسانس (به قطر ۱۰ میلی متر) در مرکز پلیت ها قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد (Hematizad et al., 2021). قطر هاله روشن اطراف فیلم با عنوان ناحیه ممانعت از رشد به دو روش کولیس و استفاده از نرم افزار ImageJ محاسبه شد.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. پیش از آزمون های اصلی، داده ها از نظر توزیع نرمال و همگنی واریانس ها بررسی شدند. پس از تأیید پیش فرض های آماری، به منظور مقایسه میانگین تیمارها از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. در مواردی که اثر تیمارها از نظر آماری معنی دار بود، برای تعیین تفاوت بین میانگین ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. تمامی نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در سه تکرار مستقل گزارش شدند.

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

بیشترین ترکیبات موجود در اسانس خوشاریزه که با آنالیز مشخص شد، عبارت است از : Ocimene (۲۷/۱۴ درصد)، 2,3-Dimethyl-cyclohexa-1,3-diene (۸/۴۳ درصد) و Alpha-pinene با ۷/۹۶ درصد. نتایج کامل آنالیز نیز در جدول ۱ قابل مشاهده است.

نتایج فعالیت ضد میکروبی فیلم ها

میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد باکتری - های مورد مطالعه در تماس با فیلم نانوکیتوزان - کربوکسی متیل سلولز حاوی نانو ذرات نقره و اسانس خوشاریزه در جدول ۲ نمایش داده شده است.

² Muller hinton agar

¹ Brain and Heart Infusion (BHI)

جدول ۱- ترکیبات اسانس *Echinophora sibthorpiana* بررسی شده در مطالعه به روش GC-MSTable 1. Chemical Composition of *Echinophora sibthorpiana* Essential Oil Analyzed by GC-MS

نام ترکیب Compound Name	شاخص بازداری کواتس (KI) Kovats Retention Index	درصد Percent %
Ocimene	۹۵۴	۲۷/۱۴
2,3-Dimethyl-cyclohexa-1,3-diene	۸۷۴	8/4۳
Alpha-pinene	۹۹۰	۷/۹۶
Gamma-dodecanolactone	۱۶۵۴	6/2۹
Nerolidol	۱۶۱۴	5/7۱
Nonacosane	۲۸۵۱	4/5۹
Beta-linalool	۱۰۰۱	3/۸۳
2,5-Octadecadiynoic acid	۲۲۴۱	3/6۸
Caryophyllene	۱۵۱۷	3/۳۶
Heptacosane	۲۶۵۳	3/۲۵
Dihydropseudoionone	۱۴۹۹	3/۲۰
Hexanal	۸۰۱	2/۵۸
Benzopyran	۱۲۵۹	1/۵۶
		۸۱/۵۸

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد (فعالیت ضد میکروبی) فیلم ها بر حسب میلی متر

Table 2. Inhibition Zone Diameter (Antimicrobial Activity) of the Films (mm)

استافیلوکوکوس اورئوس <i>Staphylococcus aureus</i>	لیستریا مونوسیتوژنز <i>Listeria monocytogenes</i>	اشریشیا کلی <i>Escherichia coli</i>	سالمونلا تیفی موریوم <i>Salmonella typhimurium</i>	
۷/۱۴±۰/۰۶bA	۶/۷۶±۰/۱۹bA	۵/۷۲±۰/۲۶aA	۵/۷۶±۰/۱۲aA	نانوکیروزان + کربوکسی متیل سلولز NC+CMC
۱۷/۰۰±۰/۱۵dB	۱۵/۵۸±۰/۱۰cB	۱۴/۱۱±۰/۱۳bB	۱۱/۹۸±۰/۱۱aB	نانوکیروزان + کربوکسی متیل سلولز + نانو نقره NC+CMC+SNP
۲۰/۰۴±۰/۰۶dC	۱۹/۳۱±۰/۱۲cC	۱۶/۱۷±۰/۰۶bC	۱۴/۰۶±۰/۰۷aC	نانوکیروزان + کربوکسی متیل سلولز + نانو نقره + اسانس خوشایزه ۰/۳٪ NC+CMC+SNP+Eo 0/3%
۲۲/۹۴±۰/۰۶dD	۲۳/۷۸±۰/۲۲cD	۱۷/۹۶±۰/۱۱bD	۱۶/۱۰±۰/۰۵aD	نانوکیروزان + کربوکسی متیل سلولز + نانو نقره + اسانس خوشایزه ۰/۶٪ NC+CMC+SNP+Eo 0/6%

SNP: Silver nano particles , NC: Nano chitosan , CMC: carboxymethyl cellulose, Eo : Essential oil

حروف کوچک متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر ردیف است ($p < 0.05$)Different lowercase letters indicate significant differences within each row ($p < 0.05$).حروف بزرگ متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر ستون است ($p < 0.05$)Different uppercase letters indicate significant differences within each column ($p < 0.05$).

pinene با ۷/۶۹ درصد گزارش کرده‌اند. شناسایی β -trans-Ocimene به عنوان ترکیب غالب توسط اصغری و همکاران (Asghari et al., 2007)، مؤید ترکیب شیمیایی اسانس مورد استفاده در این پژوهش است. در بررسی پتانسیل ضد میکروبی، نتایج بررسی‌ها نشان دهنده فعالیت بازدارنده فیلم نانوکیتوزان-کربوکسی متیل سلولز است. مشاهده شد که طیف اثر بخشی این نانوکامپوزیت بر باکتری‌های گرم مثبت به طور معناداری گسترده‌تر است تا بر باکتری‌های گرم منفی. افزودن نانو ذرات نقره و اسانس خوشاریزه منجر به ارتقای خواص ضد میکروبی گردید، به طوری که بیشینه بازدارندگی در تیمار حاوی نانو ذرات نقره و اسانس در غلظت ۰/۶ درصد حاصل شد. خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره در این تحقیق با نتایج مطالعات گلباشی و علیزاده بهبهانی (Golbashy & Alizadeh Behbahani, 2026) و رضانی و همکاران (Ramezani et al., 2024) مطابقت دارد. اثربخشی کیتوزان و مشتقات آن در بسته‌بندی فعال که توسط فضل‌آرا و همکاران (Fazlara et al., 2017)، عفیفی و باقری‌کیا (Afifi & Bagherikia, 2025) و کیم و همکاران (Kim et al., 2011) تبیین شده بود، در پژوهش حاضر تأیید گردید. در خصوص اسانس خوشاریزه، نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های ساعی‌دهکردی و همکاران (Saei dehkordi et al., 2012)، هاشمی و همکاران (Hashemi et al., 2013) و پیلهور و حسینی (Pilevar & Hosseini, 2013) مبنی بر حساسیت بالاتر پاتوژن‌های گرم‌مثبت (*Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus*) در مقایسه با پاتوژن‌های گرم‌منفی (*Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium*) همخوانی دارد. این پدیده را می‌توان به تفاوت‌های ساختاری در دیواره سلولی نسبت داد؛ جایی که حضور غشای خارجی لیپو پلی ساکاریدی در باکتری‌های گرم منفی، مانعی در برابر نفوذ ترکیبات هیدروفوب اسانس ایجاد می‌کند. تایید خواص ضد پاتوژنی توسط جنابی و همکاران (Jenabi et al., 2024) و جیانگ و همکاران (Jiang

نتایج حاصل از آزمون ضد میکروبی (جدول ۲) نشان می‌دهد فیلم‌های نانوکیتوزان-کربوکسی متیل سلولز به تنهایی، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را علیه باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *L. monocytogenes*) در مقایسه با سویه‌های گرم منفی (*E. coli* و *S. typhimurium*) نشان داده‌اند؛ هرچند تفاوت آماری میان فعالیت آنها روی گروه‌های گرم مثبت و گرم منفی معنی‌دار نیست. در این میان، بیشترین اثر ضد میکروبی فیلم پایه روی *S. aureus* و کمترین آن روی *E. coli* مشاهده شد.

با افزودن نانو ذرات نقره به ماتریس فیلم، فعالیت ضد میکروبی در تمامی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به طور معنی‌داری ارتقا یافت که این بهبود در باکتری‌های گرم مثبت شدت بیشتری داشت. در این مرحله، بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب به *S. aureus* و *S. typhimurium* اختصاص دارد. افزودن اسانس خوشاریزه (۰/۳ درصد) به فیلم‌های حاوی نانوذره نقره، منجر به افزایش معنی‌دار مجدد فعالیت ضد میکروبی در تمامی نمونه‌ها شد، بی‌آنکه الگوی حساسیت باکتریایی تغییر کند (بیشترین اثر همچنان مربوط به *S. aureus* بود). با افزایش غلظت اسانس به ۰/۶ درصد، قطر هاله عدم رشد در تمامی تیمارها به طور چشمگیری افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان حساسیت در باکتری *L. monocytogenes* و کمترین میزان در *S. typhimurium* ثبت گردید. به طور کلی، نتایج تحقیق نشان داد که بیشترین پتانسیل ضد میکروبی مربوط به فیلم‌های ترکیبی حاوی نانوذرات نقره و اسانس خوشاریزه با غلظت ۰/۶ درصد است.

بحث و نتیجه گیری

تجزیه و تحلیل ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس خوشاریزه نشان داد که نتایج حاصل با یافته‌های هاشمی و همکاران (Hashemi et al., 2013) همسوست، این محققان ترکیبات اصلی را شامل Ocimene (۲۶/۵۱ درصد)، 2,3-Dimethyl-cyclohexa-1,3-diene (۹/۸۷ درصد) و Alpha-

et al., 2017) نیز بر پتانسیل کاربردی این اسانس در صنایع ۰/۶ درصد اسانس، این نانوکامپوزیت پتانسیل بالایی برای غذایی تأکید دارد.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب نانوکیتوزان- کربوکسی متیل سلولز با نانو ذرات نقره و اسانس خوششایزه، نانوکامپوزیتی با خواص ضد میکروبی مطلوب ایجاد می کند واقعی در پژوهش های آتی پیشنهاد می گردد.

تعارض منافع

نگارندگان این مقاله اعلام می دارند که در خصوص نگارش و چاپ مقاله، هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- Afifi, M. M., & Bagherikia, H. (2025). Application of chitosan edible coating containing *Ziziphora clinopodioides* essential oil to extend the shelf life of chicken fillets at inappropriate refrigerated temperature critical conditions. *Nurse Physician Within War*, 13(46), 28–35.
- Asghari, G., Abedi, D., Jalali, M., & Farsi, S. (2007). Antimicrobial activities and phytochemical composition of *Echinophora platyloba* DC. essential oils from Isfahan. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(1), 76–82.
- Avjigan, M., Saadat, M., NilfrooshZadeh, M. A., & Hafizi, M. (2006). Anti-fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermatophytes. *Journal of Herbal Drugs*, 5(18), 10–16.
- Baldwin, E. A., Hagenmaier, R., & Bai, J. (Eds.). (2011). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC Press.
- Barzegar Mohammadi, K. , Khanjari, A. , Akhondzadeh Basti, A. , Madani, S. A. and Fayazfar, S. (2025). The Hygienic assessment of Tehran universities food courts in 2023. *Food Engineering Research*, 24(2), 15-22.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035>
- Deng, W., Liu, K., Cao, S., Sun, J., Zhong, B., & Chun, J. (2020). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation. *Molecules*, 25(1), 217.
- Ediyilyam, S., George, B., Shankar, S. S., Dennis, T. T., Waclawek, S., Černík, M., & Padil, V. V. T. (2021). Chitosan/gelatin/silver nanoparticles composites films for biodegradable food packaging applications. *Polymers*, 13(11), 1680. <https://doi.org/10.3390/polym13111680>
- El-Nashar, H. A., Eldehna, W. M., Al-Rashood, S. T., Alharbi, A., Eskandrani, R. O., & Aly, S. H. (2021). GC/MS analysis of essential oil and enzyme inhibitory activities of *Syzygium cumini* (Pamposia) grown in Egypt: Chemical characterization and molecular docking studies. *Molecules*, 26(22), 6984.
- Fazlara, A., Pourmahdi, M., Zarei, M., & Karimi, T. (2017). Effect of edible chitosan-rosemary coating on quality and shelf life of refrigerated chicken fillets. *Iranian Veterinary Journal*, 13(1), 78–90.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 121–126.
- Firoozi, S., Jamzad, M., & Yari, M. (2016). Biologically synthesized silver nanoparticles by aqueous extract of *Satureja intermedia* CA Mey and the evaluation of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 6, 357–364.

- Golbashy, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2026). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of dill leaves and evaluation of its antibacterial activity. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 23(172), 62–71.
- Hashemi, M., Ehsani, A., Hosseini Jazani, N., Aliakbarlu, J., & Mahmoudi, R. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of essential oil and methanol extract of *Echinophora platyloba* D.C. against some food-borne pathogenic bacteria. *Veterinary Research Forum*, 4(2), 123–127.
- Hematizad, I., Khanjari, A., Basti, A. A., Karabagias, I. K., Noori, N., Ghadami, F., et al. (2021). In vitro antibacterial activity of gelatin-nanochitosan films incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and its influence on microbial, chemical, and sensorial properties of chicken breast meat during refrigerated storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 30, 100751.
- Hernández, H., Claramount, D., Kučerová, I., & Banout, J. (2017). The effects of modified blanching and oregano essential oil on drying kinetics and sensory attributes of dried meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13155.
- Jenabi, M., Naghadehi, M. N., & Mashak, Z. (2024). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of gelatin/chitosan film activated with nano-emulsion of *Eryngium platyloba* extract against in vitro foodborne pathogens. *Journal of Veterinary Microbiology*, 20(1), 117–132.
- Jiang, B., Wang, F., Liu, L., Tian, S., Li, W., Yang, X., et al. (2017). Antibacterial activity and action mechanism of the *Echinops ritro* L. essential oil against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(5), 1172–1183.
- Kim, K. W., Min, B. J., Kim, Y. T., Kimmel, R. M., Cooksey, K., & Park, S. I. (2011). Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 565–569.
- Kumar, S., Basumatary, I. B., Sudhani, H. P. K., Bajpai, V. K., Chen, L., Shukla, S., & Mukherjee, A. (2021). Plant extract mediated silver nanoparticles and their applications as antimicrobials and in sustainable food packaging: A state-of-the-art review. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 651–666.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., & Sun, H. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5, 916–924.
- Maciel, M. V. O. B., da Rosa Almeida, A., Machado, M. H., de Melo, A. P. Z., da Rosa, C. G., de Freitas, D. Z., et al. (2019). *Syzygium aromaticum* L. (clove) essential oil as a reducing agent for the green synthesis of silver nanoparticles. *Open Journal of Applied Sciences*, 9(2), 45–54.
- Mekonnen, T., Mussone, P., & Bressler, D. (2023). Advancements in carboxymethyl cellulose-based films for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 297, 120668.
- Morais, L. D. O., Macedo, E. V., Granjeiro, J. M., & Delgado, I. F. (2020). Critical evaluation of migration studies of silver nanoparticles present in food packaging: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3083–3102.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., & Sprong, H. (2010). Food-borne diseases—The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3–S15.
- Pilevar, Z., & Hosseini, H. (2013). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *Echinophora platyloba* DC. *Journal of Pharmacy & Nutrition Sciences*, 3(4), 270–283.
- Pilevar, Z., Martirosyan, D., Ranaci, V., Taghizadeh, M., Balasjin, N. M., Ferdousi, R., & Hosseini, H. (2024). Biological activities, chemical and bioactive compounds of *Echinophora platyloba* DC: A systematic review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 7(2), 95–109. <https://doi.org/10.31989/bchd.v7i2.1283>
- Raghav, P. K., Agarwal, N., & Saini, M. (2016). Edible coating of fruits and vegetables: A review. *Education*, 1(2), 188–204.
- Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S. I., & Kalaichelvan, P. T. (2015). Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, 70, 356–373. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.015>

- Ramezani, E., Yoosefi, M., Eghbali, S., Shafaei, E., & Tavakoli Kareshk, A. (2024). Investigating the antibacterial effects of synthesized silver nanoparticles Murry plant using the extract of *Lycium ruthenicum*. *Pars Journal of Medical Sciences*, 22(2), 24–35.
- Saei-Dehkordi, S. S., Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S., & Kousha, S. (2012). Chemical composition and antioxidative activity of *Echinophora platyloba* DC. essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne pathogens and spoilage organisms. *Journal of Food Science*, 77(11), M631–M637. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02956.x>
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>
- Shahidi, F., & John, J. A. (2010). Oxidation and protection of nuts and nut oils. In F. Shahidi (Ed.), *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications* (Vol. 2, pp. 274–305). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857090331.2.274>
- Shahnia, M., & Khaksar, R. (2013). Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 7(5), 949–955.
- Şahin, O., Kanbolat, Ş., Çolak, N. U., Badem, M., Subaş, T., Şener, S. Ö., Korkmaz, N., Kalaycıoğlu, A. T., Öztürk, E., Sayım, A. Ü., Aliyazıcıoğlu, R., Özgen, U., & Kandemir, A. (2025). Investigation of antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Echinophora chrysantha*: Microwave-assisted hydrodistillation and SPME analysis of its essential oils. *Chemistry & Biodiversity*, 22(2), e202401366. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202401366>
- Tauxe, R. V. (2002). Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1), 31–41.
- World Health Organization. (2024). *Food safety*. World Health Organization.
- Zhang, Y., Liu, P., & Feng, X. (2024). Characterization and enhancement of carboxymethyl cellulose edible films: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 234, 127582.

Original Research

Antimicrobial Activity of Nanochitosan – Carboxymethyl Cellulose Films Incorporating Silver Nanoparticles and *Echinophora sibthorpiana* Essential Oil

Allahyar Nabipour, Ali Khanjari*, Zhaleh Khoshkhoo, Afshin Akhoondzadeh Basti
Marjaneh Sedaghati

*Corresponding Author: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

Email: khanjari@ut.ac.ir

Received: 29 May 2026 Accepted: 14 July 2026

[http://doi: 10.22092/fooder.2026.372953.1459](http://doi.org/10.22092/fooder.2026.372953.1459)

Abstract

This study aimed to investigate the antimicrobial effects of nano-chitosan/carboxymethyl cellulose (CMC) films incorporated with silver nanoparticles (SNPs) and *Echinophora sibthorpiana* essential oil against several foodborne pathogens. The essential oil was extracted from the aerial parts of the plant by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus. Subsequently, silver nanoparticles were synthesized via a green method, followed by the incorporation of the essential oil at specific concentrations. Nano-chitosan/CMC films were prepared in four treatments: control (base film), film containing SNPs, film containing SNPs + 0.3% essential oil, and film containing SNPs + 0.6% essential oil. The antimicrobial activity of these films was evaluated against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. Data were analyzed using SPSS software (version 26) through one-way ANOVA and Tukey's test. The results demonstrated that the incorporation of silver nanoparticles and, subsequently, the essential oil into the base film significantly increased the inhibition zone diameters. The highest antimicrobial activity was observed in the film containing 0.6% essential oil, and Gram-positive bacteria were more sensitive than Gram-negative strains. The results demonstrated that the incorporation of silver nanoparticles and *Echinophora sibthorpiana* essential oil enhances the antimicrobial activity of chitosan-carboxymethyl cellulose nanofilm. The results indicated that the incorporation of silver nanoparticles and *Echinophora sibthorpiana* essential oil enhanced the antimicrobial activity of chitosan-carboxymethyl cellulose nanofilms under in vitro conditions. Furthermore, to introduce these films as practical options for active food packaging, additional *in situ* testing within real food matrices is required.

Keywords: Antimicrobial activity, Carboxymethyl cellulose, *Echinophora sibthorpiana*, Nanochitosan, Packaging, Silver nanoparticles