

## مقایسه اثر نانوسیل و آب اکسیژنه در کاهش بار اشریشیاکلی سطح پوسته تخم مرغ

مجید غلامی آهنگران<sup>\*</sup>، محسن جعفریان<sup>۱</sup>، مازیار حاج صالحی<sup>۲</sup>

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

<sup>\*</sup> نویسنده مسئول: mgholamia1388@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۱۲

## چکیده

در این مطالعه سعی شده است کارایی دو ترکیب ضد عفونی کننده ی نانوسیل D2 و آب اکسیژنه جهت کاهش بار میکروبی پوسته تخم مرغ مورد مقایسه قرار گیرد. در این راستا تعداد ۹۰ عدد تخم مرغ تهیه گردید و به ۳ گروه تقسیم شدند. در گروه اول نانوسیل، در گروه دوم آب اکسیژنه و در گروه سوم آب مقطر استریل (به عنوان کنترل منفی) بر روی تخم مرغ‌های تهیه شده اسپری گردید. پس از ۳۰ دقیقه تخم مرغ‌ها شکسته و تمام پوسته به قطعات کوچک خرد شده و با اضافه سازی نرمال سالین مورد کشت میکروبی قرار گرفت. پس از تهیه رقت‌های مختلف، مطابق روش‌های معمول باکتری شناسی به شناسایی و شمارش کلنی‌های اشریشیاکلی پرداخته شد. نتایج نشان داد تعداد کلنی‌های اشریشیاکلی در گروه‌های در معرض قرار گرفته با آب اکسیژنه و نانوسیل اختلاف معنی‌داری ندارند. همچنین تعداد کلنی‌های اشریشیاکلی در تخم مرغ‌های در معرض قرار گرفته با آب اکسیژنه و نانوسیل به طور معنی دار کمتر از گروه کنترل می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد نانوسیل می‌تواند در ضد عفونی تخم مرغ کارایی داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** آلودگی تخم مرغ، نانوسیل، پراکسید هیدروژن، اشریشیاکلی.

## مقدمه

(2003)، لذا بهره‌گیری از اصول و کاربرد مواد ضد- میکروبی که بتواند آلودگی‌های تخم مرغ را به حداقل برساند می‌تواند در کنترل موارد یاد شده نقش مهمی ایفا کند. مروری بر مطالعات قبلی نشان می‌دهد ترکیبات مختلفی از لحاظ خاصیت ضد عفونی کنندگی تخم مرغ نطفه دار در صنعت جوجه کشی مورد ارزیابی قرار گرفته اند که گاهاً استفاده از این ترکیبات خاصیت ضد میکروبی مناسبی را نشان داده است و با موفقیت نسبی همراه بوده (Russell, 2003; Well et al., 2010) اما هزینه‌های بالا و غیر تجاری بودن بعضی از این ترکیبات باعث عدم بکارگیری این ترکیبات شده است. از دهه ۱۹۵۰ نانوذرات نقره به عنوان یک ترکیب ضد عفونی در صنعت پرورش طیور مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده است ذرات نقره قادر به از بین بردن ۶۵۰ گونه عامل بیماریزا می‌باشد (Jeong et al., 2005). تاکنون استفاده از ترکیبات نانو مخصوصاً نانو ذرات نقره بر عفونت زدایی

تخم مرغ یکی از منابع غذایی است که دارای ارزش غذایی بالا بوده و در رشد و سلامت گروه‌های مختلف سنی موثر است. از طرف دیگر، اهمیت تخم مرغ در تولید جوجه یک روزه و صنعت پرورش مرغ گوشتی و تخم‌گذار بر همگان آشکار است. با این وجود ممکن است تخم مرغ در طی مراحل مختلف به انواع عوامل میکروبی مانند گونه‌های مختلف سالمونلا، اشریشیاکلی و کمپیلوباکتر آلوده گردد که این آلودگی‌های با منشأ تخم مرغ می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را به صنعت جوجه‌کشی وارد کند و باعث افزایش تلفات جنینی، کاهش میزان جوجه درآوری و کاهش کیفیت جوجه‌های تفریخ شده گردد. اهمیت دیگر این آلودگی‌ها در تخم مرغ‌های خوراکی از نقطه نظر انتقال به انسان از طریق ورود به چرخه غذایی انسان می‌باشد. علاوه بر آن، آلودگی پوسته تخم مرغ می‌تواند باعث کاهش مدت نگهداری و کاهش امنیت مصرف فرآورده‌های جانبی آن شود (Knappe et al., 1999; Narahari, 2003; Russell, )

در دقیقه (به مدت ۵ دقیقه) محلول رویی استحصال شد و پس از تهیه رقت یک به هزار کشت داده شد (Chauhan and Chauhan Sushovan Roy, 1996).

برای کشت از سوپ پنبه‌ای استریل استفاده شد و به روش خطی بر روی محیط EMB، کشت باکتری انجام شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از طی شدن این زمان، کلنی‌های با جلائی سبز فلزی در پلیت‌های کشت به صورت چشمی شمارش شدند. به منظور تأیید باکتری اشریشیاکلی، برخی از پرگنه‌های لاکتوز مثبت که در محیط EMB ایجاد جلائی سبز کردند از لحاظ تست‌های افتراقی IMVIC مورد بررسی قرار گرفتند. در صورتی که از لحاظ تولید ایندول و واکنش متیل رد، مثبت و از لحاظ واکنش VP و احیای سیترات منفی بودند به عنوان باکتری اشریشیاکلی تأیید شدند.

به منظور آنالیز داده‌ها از نرم افزار Sigma State 2.0 استفاده شد و برای بررسی اختلاف میانگین بین گروه‌های مختلف از روش آنالیز یک‌طرفه داده‌ها (ANOVA) استفاده گردید و در صورت وجود اختلاف آماری، با روش توکی میزان اختلاف تعیین شد. سطح اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مورد بررسی  $P < 0.001$  در نظر گرفته شد.

#### نتایج

تعداد کلنی‌های اشریشیاکلی به دنبال اسپری آب-اکسیژنه، نانوسیل و آب مقطر بر روی پوسته تخم‌مرغ‌های مورد مطالعه متفاوت بود که این اختلاف بین گروه کنترل با بقیه گروه‌ها معنی‌دار بود. نتایج نشان می‌دهد که اگرچه میانگین تعداد کلنی‌ها در گروه دریافت کننده آب اکسیژنه کم‌تر از گروه نانوسیل است اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (جدول شماره ۱).

تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار مورد بررسی قرار نگرفته است لذا در این تحقیق به بررسی اثر ضد میکروبی یک ترکیب نانونقره تجاری (نانوسیل) پرداخته شد تا ضمن بررسی اثر این ترکیب بر کاهش بار اشریشیاکلی پوسته تخم-مرغ، اثر آن با یک ترکیب تجاری ضد عفونی کننده مرجع (آب اکسیژنه) مقایسه گردد.

#### مواد و روش کار

در زمستان ۱۳۹۰، نود تخم مرغ (تهیه شده از مجتمع مرغ مادر بهجوجه زاگرس) به سه گروه با سه تکرار ۱۰ عددی تقسیم گردید. گروه‌های مورد بررسی شامل گروه اول که سطح خارجی تخم‌مرغ‌های گروه اول با نانوسیل اسپری شد. در گروه دوم از آب اکسیژنه به عنوان ماده-ی ضد عفونی کننده برای کاهش بار اشریشیاکلی پوسته‌ی تخم مرغ استفاده گردید و در گروه سوم به-عنوان کنترل منفی، تخم مرغ‌ها با آب مقطر استریل اسپری شدند.

نانوسیل مورد استفاده در این تحقیق نانوسیل D2 بود که یک ترکیب تجاری با پایه‌ی پراکسید هیدروژن است که حاوی یون نقره می‌باشد. این ترکیب تجاری ساخت شرکت نانو اکسیر پاسارگاد (نماینده‌ی انحصاری محصولات نانوسیل سوئیس در ایران) می‌باشد. شایان ذکر است که غلظت پراکسید هیدروژن مورد استفاده ۳ درصد و غلظت پراکسید هیدروژن موجود در محلول ضد عفونی کننده‌ی نانوسیل D2، یک درصد بود. مواد ضد عفونی کننده‌ی آب اکسیژنه و نانوسیل با حجم تقریبی یک میلی‌لیتر بر روی هر تخم مرغ اسپری شد.

تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار پس از مواجه سازی با مواد ذکر شده به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط کاملاً یکسان در معرض هوا قرار گرفتند تا پوسته کاملاً خشک شود. سپس در شرایط آسپتیک تخم‌مرغ‌ها شکسته شدند و پس از خارج نمودن محتویات داخلی تخم‌مرغ، تمام پوسته در شرایط استریل در هاون چینی به قطعات کوچک خرد شد و با اضافه نمودن ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد و سانتریفیوژ ۱۰۰۰ دور

مورد بررسی شده (۳۰٪) در گروه دریافت کننده نانوسیل فاقد آلودگی با باکتری/شیریشیاکلی بودند.

مقایسه داده ها در گروه های مختلف نشان داد تعداد ۱۵ تخم مرغ از ۳۰ مورد بررسی شده (۵۰٪) در گروه دریافت کننده آب اکسیژنه و تعداد ۹ تخم مرغ از ۳۰

جدول ۱- تعداد کلنی های شمارش شده/شیریشیاکلی بر روی پوسته تخم مرغ پس از اسپری ترکیبات مختلف

گروه ها	کنترل	آب اکسیژنه	نانوسیل
تعداد کلنی ها	۶/۲۰±۲/۰۹ <sup>a</sup>	۰/۹۰±۱/۲۸ <sup>b</sup>	۱/۹۰±۲/۲۳ <sup>b</sup>

داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها می باشد (P<۰/۰۰۱).

## بحث

مرغ و تخم مرغ ارگانیک و عاری از آنتی بیوتیک در چرخه غذایی انسان، استفاده از مواد ضد عفونی کننده با پایه نقره می تواند در کنترل آلودگی ها و بیماری ها نقش مهمی ایفا نماید. در این راستا مطالعه اخیر برای اولین بار نشان داد نانوسیل به عنوان یک ضد عفونی مناسب با پایه نقره می تواند در کاهش بار میکروبی سطح پوسته تخم مرغ های نطفه دار و قابل جوجه کشی نقش داشته باشد و می تواند به عنوان یک جایگزین مناسب در ضد عفونی تخم مرغ های نطفه دار در جوجه کشی صنعتی مطرح باشد.

امروزه فرمالین و یا گاز فرمالدئید به عنوان ضد عفونی کننده رایج در مرغداری ها و دستگاه های جوجه کشی مورد استفاده قرار می گیرد. اما متأسفانه این ماده دارای اثرات جانبی بسیار مخربی بر روی پرندگان و انسان می باشد به نحوی که ایجاد خونریزی و نکروز در بافت مخاط چینه دان و پیش معده و قسمت های ابتدایی روده در اثر استفاده از فرمالین به اثبات رسیده است (Babar et al., 2001). در مطالعه دیگری محققین نشان دادند درصد ابتلا به کارسینوما سلول های سنگفرشی و آدنوکارسینوما در حفره ی بینی و سینوس پارانیزال در افرادی که به دلیل شغلی در معرض استنشاق فرمالدئید می باشند بیشتر از کسانی می باشد که در طول عمرشان در معرض فرمالین قرار نگرفته اند (Olsen and Anaes, 1986)، لذا شواهد حاکی از خطر بالای این ترکیبات در صنعت جوجه کشی و افراد مرتبط با این ترکیبات می باشد که لازم است در جهت

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از ترکیبات ضد عفونی کننده آب اکسیژنه و نانوسیل می تواند بار میکروبی سطح پوسته تخم مرغ نطفه دار را کاهش دهد که در کاهش انتقال آلودگی های میکروبی به محتویات داخلی و نهایتاً کاهش انتقال آلودگی های با منشأ جنینی به جوجه های قابل تفریح بسیار موثر است. مقایسه نتایج حاصل نشان می دهد اختلاف آماری بین بار میکروبی تخم مرغ های اسپری شده با آب اکسیژنه و نانوسیل وجود ندارد. نانوسیل یک ترکیب ضد عفونی کننده حاوی آب اکسیژنه یک درصد و املاح نقره می باشد که در این مطالعه با آب اکسیژنه تجاری (۳ درصد) مورد مقایسه قرار گرفته است. با توجه به درصد خلوص بالاتر آب اکسیژنه تجاری نسبت به آب اکسیژنه موجود در نانوسیل بنظر می رسد عدم اختلاف معنی دار بین بار میکروبی سطح پوسته تخم مرغ بدنبال استفاده آب اکسیژنه تجاری و نانوسیل ممکن است دلیل همراهی یون نقره با آب اکسیژنه یک درصد در نانوسیل باشد. بطوری که گزارشات متعدد از خاصیت ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی املاح نقره وجود دارد (Chen and Schluesener, 2008) امروزه با بهره گیری از فن آوری نانو در زمینه های مختلف مانند دارودرمانی و پیشگیری از بیماری ها، پیشرفت های عمده ای حاصل شده که در ایران نیز هم راستا با سایر کشورهای مطرح در زمینه نانو، کاربردها و عملکردهای ارزشمندی از این ترکیبات ارائه گردیده است. از طرف دیگر با افزایش سطح تقاضای عمومی برای استفاده از

نانوسیل، خاصیت ضد/اشریشیاکلی این دو ترکیب مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. بطور کلی نتایج مطالعه اخیر نشان داد نانوسیل می تواند به عنوان یک ضد عفونی کننده جهت ضد عفونی تخم مرغ مورد استفاده قرار گیرد.

#### منابع

1. Babar, A.M., Khan, M.Z., Shabbir, A., Khan, A., Bachaya, H.A., and Anwar, M.I. 2001. Toxicopathological effects of formalin(37% Formaldehyde) feeding in broiler chicks. *Pakistan Vet J.* 21: 13-16.
2. Chauhan, H.V.S., and Chauhan Sushovan Roy, H.V.S. 1996. *Poultry Diseases; Diagnosis and Treatment.* 2<sup>nd</sup> ed. New Age International Limited, New Delhi, India, p: 18-36.
3. Chen, X., and Schluesener, H.J. 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Let.* 176: 10-12.
4. Copur, G., Arslan, M., Duru, M., Baylan, M., Canogullari, S., and Aksan, E. 2010. Use of oregano (*Origanum onites L.*) essential oil as hatching egg disinfectant. *Afr J. Biotech.* 8: 2531-2538.
5. Jeong, S.H., Yeo, S.Y., Yi, S.C. 2005. The effect of filler particle size of antibacterial properties of compounded polymer/silver fibres. *J Material Sci.* 40: 5407-5411.
6. Knappe, K.D., Carey, J.B., and Burgess, R.P. 1999. Comparison of chlorine with an iodine-based compound on eggshell surface microbial populations in a commercial egg washer. *J Food Safety.* 19: 86-75.
7. Narahari, D. 2003. The eggs nutritive value poultry value and health promoting components. *World Poult.* 19: 36-37.
8. Olsen, J.H., and Anaes, S. 1986. Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the

کنترل مشکلات زیست محیطی ناشی از این ترکیبات، جایگزین مناسبی یافت گردد. در این راستا، نتایج بدست آمده از مطالعه اخیر می تواند مقدمه ای برای جایگزین نمودن نانوسیل به جای فرمالین باشد. در مطالعات پیشین، اثر ترکیبات مختلف بر شاخص های مربوط به آلودگی و سلامت تخم مرغ های نطفه دار پرداخته شده است که برخی از آنها با موفقیت نسبی همراه بوده است. از جمله در یک مطالعه به بررسی اثر روغن پونه ی کوهی بر کاهش آلودگی سطح پوسته تخم مرغ و کاهش مرگ و میر جنینی در مراحل مختلف جوجه کشی پرداخته شده است. نتایج بررسی مذکور نشان داده است که این ماده بطور چشمگیر فعالیت میکروبی سطح پوسته ی تخم مرغ را کاهش می دهد (Copur et al., 2010). علاوه بر آن، محققین دیگر مشخص کردند ضد عفونی کننده های با پایه ی ید در زمان استفاده همزمان با ترکیبات شستشوی تجاری تخم مرغ، در تمیز سازی و ضد عفونی تخم مرغ نطفه دار بسیار موثرند اما قدرت ضد میکروبی آنها وابسته به سطح مواد محلول در آب مورد استفاده است (Knappe et al., 1999). در مطالعه دیگری به مقایسه اثر اشعه ی ماورای بنفش و آب اکسیژنه ی ۳٪ بر روی باکتری های سطح پوسته ی تخم مرغ پرداخته شد. نتایج نشان داد گرچه استفاده از این ترکیبات می تواند در کاهش بار میکروبی سطح پوسته ی تخم مرغ اثر داشته باشد و جمعیت باکتری ها را کاهش دهد اما بهترین حالت زمانی حاصل می شود که از ترکیب اشعه ی ماورای بنفش و آب اکسیژنه ۳ درصد بطور هم زمان استفاده گردد. در این حالت هیچ گونه اثر منفی بر جوجه درآوری و وزن جوجه مشاهده نشده است (Wells et al., 2011). در اکثر مطالعات مشابه از آب اکسیژنه تجاری به عنوان ترکیب استاندارد برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی ترکیبات استفاده شده است (Wells et al., 2010; Wells et al., 2011). در مطالعه اخیر نیز با توجه به این موضوع و نیز پایه آب اکسیژنه ای

- sinonasalcavities. *British J Industrial Med.* 43:769-774.
9. Russell, S.M. 2003. Effect of sanitizers applied by electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria attached to the surface of eggs. *J Appl Poult Res.* 12:183-189.
  10. Wells, J.B., Coufal, C.D., Parker, H.M., and McDaniel, C.D. 2010. Disinfection of eggshells using ultraviolet light and hydrogen peroxide independently and in combination. *Poult Sci.* 89:2499-2505.
  11. Wells, J.B., Coufal, C.D., Parker, H.M., Kiess, A.S., Purswell, J.L., Young, K.M., and McDaniel, C.D. 2011. Hatchability of broiler breeder egg following eggshell sanitization by repeated treatment with a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Int. J Poul Sci.* 10: 421-425.