Original Article

اثر ضد میکروبی و ضد قارچی کیتوزان محلول در اسید و آب پوسته میگوی سفید هندی *(Fenneropenaeus indicus)*

علی طاهری[۱و۲*]، امیر سیفان[۱]، سمیرا جلالی نژاد[۳]

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
۲- گروه پژوهشی زیست فنآوری دریا، مرکز پژوهشی علوم زیستی دریای عمان، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، واحد بین المللی چابهار (سینا)، زاهدان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، یافتن مواد ضد میکروبی جدید مورد تحقیق است و منابع دریایی نماینده خوبی برای این هدف هستند. هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضد میکروبی و ضد قارچی کیتوزان محلول در اسید و آب روی برخی ارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: قطر هاله عدم رشد کیتوزان در ۳ غلظت ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول در اسید و آب روی ۴ سویه باکتری بیمارستانی و یک گونه قارچ، به روش انتشار نفوذی، بررسی شد و نتایج حاصل با ۴ آنتی بیوتیک استرپتومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و اریترومایسین، مقایسه گردید. میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نیز مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: براساس نتایج آزمایش انتشار نفوذی، بیشترین اثر مهارکنندگی، در کیتوزان محلول در اسید ۱۰٪ و کمترین تاثیر را کیتوزان محلول در آب داشت ($p < ۰/۰۵$). کیتوزان، بیشترین تاثیر مهار کنندگی رشد را روی *ویبریو کلرا سروتایپ اوگاوا* نشان داد و کمترین تاثیر را روی *اشرشیاکلی* داشت ($p < ۰/۰۵$). در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های معمول، کیتوزان محلول در اسید، بهتر مانع رشد باکتری گردیده است. در مطالعه تاثیر مهارکنندگی، رشد قارچ پنیسیلیوم کیتوزان محلول در اسید ۱۰٪ و محلول در آب بیشترین تاثیر مهار کنندگی را نسبت به شاهد نشان داد.

نتیجه‌گیری: کیتوزان، خواص ضد میکروبی بهتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو اوگاوا* نشان داد و خواص ضد قارچی کیتوزان نیز زیاد بود و اختلاف معنی‌داری با داروهای معمول ضد باکتری و ضد قارچ نشان داد.

کلمات کلیدی: **کیتوزان، ضد میکروبی، باکتری بیماریزا، ضد قارچ**

مقدمه

کیتین فراوان‌ترین پلی‌ساکارید یافت شده در طبیعت است که در دیواره خارجی حشرات، پوسته سخت پوستان و دیواره قارچها یافت می‌شود. کیتین با فرمول بتا- ۱ و۴-ان-استیل-دی-گلوکز آمین، اولین بار در سال ۱۸۸۴ شناسایی شد. هندوستان، ژاپن، لهستان و استرالیا از جمله تولیدکنندگان اصلی این بیوپلیمر به حساب می‌آیند (۱، ۲). این بیوپلیمر نقش استحکام بخشی به دیواره سلولی را دارد. کیتوزان یک پلیمر زیستی دیگر است که از داستیله کردن کیتین حاصل می‌شود (۳). در واقع، کیتوزان پلیمر ترکیبی گلوکز آمین و ان-استیل گلوکز آمین است که به وسیله پیوندهای ۱و۴ گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند (۴). امروزه کیتوزان به شکل گسترده و تجاری از ضایعات خرچنگ و میگو با وزن مولکولی بین $۱۰^۵$ تا $۱۰^۶$ دالتون و ویسکوزیته حدود ۱۵۰۰ cP تولید می‌شود (۵). به دلیل خواص منحصر به فرد کیتوزان، کاربرد آن در صنایع مختلف از جمله زیست فناوری (۶)، دارویی و پزشکی (۷)، بهسازی فاضلاب (۸)، آرایشی (۹) و صنایع غذایی (۱۰) گزارش شده است. فیلم‌های کیتوزانی، فیبرها، میکروذرات و نانوذرات کیتوزانی برای مهندسی بافت، انتقال دارو، واکسینه کردن و انتقال DNA کاربرد دارند (۱۱). در حال حاضر، کیتوزان در علوم پزشکی و صنایع غذایی به دلیل خواص ضد باکتریایی (۱۲، ۱۳)، ضد توموری (۱۴) و عملکرد هیپوکلسترومیک (۱۵) مورد توجه است. امروزه خواص ضد باکتری و ضد قارچی کیتوزان علیه رنج گسترده‌ای ازسویه‌های باکتریایی و قارچی گزارش شده است (۱۶-۲۰). البته کیتوزان به دلیل انحلال اندک در آب و محلول بودن در اسید، محدودیت‌هایی برای استفاده دارا می‌باشد و در سال‌های اخیر مطالعات چندی روی تولید کیتوزان محلول در آب با خواص آنتی باکتریایی صورت گرفته است. در این مطالعات، از هیدروکسی اتیل آکریل - کیتوزان، اتیل آمین - هیدروکسی اتیل کیتوزان، کربوکسی متیل - کیتوزان، هیدروکسی پروپیل - کیتوزان استفاده شده است اما تحقیق روی تولید کیتوزان محلول در آب همچنان ادامه دارد (۲۱-۲۴). در این خصوص، استفاده از آب اکسیژنه در تولید کیتوزان محلول در آب، نتایج مثبتی به

* **نویسنده مسئول: علی طاهری**، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
تلفن: ۰۵۴۵۴۱۲۲۱۹۷ **Email: taheri@cmu.ac.ir**

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019

دنبال داشته است.

یکی از مسائلی که در حال حاضر در مراکز آموزشی ـ درمانی و بیمارستان‌ها با آن مواجه می‌باشند، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زا است (۲۵). مشخص شده است که شرایط مناسب برای ایجاد عفونت‌های فرصت طلب در بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها وجود دارد، به‌طوری که آلودگی میکروبی قسمت‌های اتاق عمل، اتاق زایمان، بخش سوختگی، پانسمان و تزریقات، یکی از مهمترین عوامل زمینه‌ساز عفونت‌های بیمارستانی بوده و شیوع این گونه عفونت‌ها، در محیط‌های فوق الذکر می‌باشد (۲۶). امروزه یافتن مواد ضد میکروبی جدید به دلیل تغییر فرم مقاومتی باکتری‌ها، به‌خصوص باکتری‌های بیماری‌زا، مورد تحقیق است.

در کشور ایران، سالانه حجم قابل توجهی از میگو تولید و به بازار مصرف عرضه می‌گردد که قسمتی از آن به شکل بدون پوست، فرآوری شده و منبع بسیار خوبی جهت تهیه کیتوزان ایجاد می‌کند (۲۷). براین اساس، امکان سنجی پتانسیل تولید کیتین و کیتوزان از ضایعات فرآوری سخت پوستان و قابلیت‌های ضد باکتریایی آن بر باکتری‌های جدا شده از بیماران، بر اساس شکل‌های متفاوت مقاومتی آن‌ها باید انجام گیرد؛ لذا هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضد میکروبی و ضد قارچی کیتوزان تولید شده از پوسته میگوی هندی بر روی برخی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری زا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج کیتوزان: جهت استخراج کیتین، از روش Chang و همکاران با کمی تغییر استفاده شد (۲۸). ضایعات میگو شامل سر و پوسته از بازار آبزیان چابهار تهیه گردید و پس از شستشوی پوسته میگو، با آنزیم آلکالاز تیمار شد تا ضایعات گوشت و محتوای پروتئینی آن جدا گردد. پس از خشک کردن در هوای آزاد، ۲۰ گرم از نمونه با ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۷٪ در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد. بعد از این مدت، نمونه فیلتر و جهت خنثی سازی، به وسیله‌ی آب مقطر شست و شو گردید. سپس، ۱۰ گرم از نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول سود ۵٪ مخلوط شده و برای ۳۰ دقیقه در اتوکلاو قرار گرفت. پس از آن، نمونه‌ها مجدداً با آب مقطر شسته و فیلتر شدند. جهت رنگ زدایی کیتین به دست آمده، محصول به مدت ۲۴ ساعت در معرض نور مستقیم خورشید قرار گرفت تا هم سفید گردد و هم خشک شود. جهت تهیه کیتوزان، ۵ گرم کیتین در ۵۰ میلی لیتر سود ۵۰٪ تیمار و به مدت دو ساعت جوشانیده شد. سپس جهت خنثی سازی، نمونه‌ها با آب مقطر شست و شو و فیلتر گردید. کیتوزان حاصل برای خشک شدن، به مدت ۴ ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفت و سپس پودر گردید. جهت تهیه کیتوزان محلول در آب، از تیمار آب اکسیژنه استفاده شد. بر این اساس ۲ گرم کیتوزان با ۲۰ میلی لیتر محلول آب اکسیژنه به مدت ۴۵ دقیقه جوشانیده شد و سپس با آب مقطر شستشو و در آون، خشک گردید. درجه‌ی استیل زدایی، براساس روش سنجش ماورای بنفش (UV) در ۲۰۵ نانومتر توسط استاندارد استیل گلوکز آمین و n-گلوکز آمین هیدروکلراید سنجیده شد (۲۹).

تهیه باکتری: باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[1]، *ویبریو کلرا سروتایپ اوگاوا*[2] و *اشرشیاکلی*[3]، از نمونه‌های بیماران مراجعه کرده به بیمارستان امام علی شهرستان چابهار (پس از آزمایش‌های تخصصی میکروبیولوژیک برای تایید میکروارگانیسم‌ها) تهیه گردید. کشت‌های خالص، تهیه و تا زمان مطالعه در دمای یخچال نگهداری شد (۳۰).

یک روز قبل از انجام آزمایش، از کشت مادر، مقداری به محیط مولر هینتون براث[4] اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در فاز لگاریتمی رشد باکتری، با استفاده از اسپکتروفتومتر، غلظت باکتری‌ها با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۰/۵ ($1/5\times10^{8}$) برابر شد. این سوسپانسیون به عنوان ذخیره در نظر گرفته شد و در هنگام مصرف در همان روز به نسبت ۱:۱۰۰ در محیط مشابه رقیق گردید ($1/5\times10^{6}$) (۳۱).

بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی: سنجش حساسیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، با استفاده از روش نفوذ انتشاری[5] انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی، بر روی محیط کشت چکانیده شد و با یک سوآپ کتان استریل، بر روی محیط گسترش یافت. دیسک‌های خام استریل به قطر ۶ میلی متر، پس از غوطه وری در محلول کیتوزان-اسید فسفریک با غلظت ۷،۵ و ۱۰٪ و همچنین کیتوزان محلول در آب ۱۰٪ روی سطح محیط کشت حاوی باکتری قرار داده شد. از دیسک‌های آنتی بیوتیک استرپتومایسین ۱۰، جنتامایسین ۱۰، تتراسایکلین ۳۰ و اریترومایسین ۱۵ ساخت شرکت ایران دارو به عنوان استاندارد استفاده گردید. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و هاله عدم رشد باکتری‌ها با استفاده از کولیس ورنیه اندازه‌گیری و ثبت شد. برای بررسی نمونه قارچی، محلول کیتوزان به همراه محیط کشت مولر هینتون آگار مخلوط گردید و پس از بستن محیط کشت بوسیله‌ی پیپت پاستور قارچ را برروی محیط به صورت نقطه‌ای کاشته و پس از ۲۴ ساعت مطالعه گردید. با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهار کنندگی رشد[6] و حداقل غلظت کشندگی[7] کیتوزان تعیین گردید (۳۲، ۳۳). برای هر غلظت و هر باکتری، یک سری لوله آزمایش ۹ تایی استفاده شد. ۷ لوله برای رقت‌های مختلف، یک لوله شاهد مثبت و یک لوله شاهد منفی بود. به لوله‌های آزمایشی، ۹ میلی لیتر محلول نوترینت براث اضافه شده و استریل گردید. ۱۰۰۰ میکرولیتر از رقت کیتوزان به لوله اول اضافه شد و پس از هموژن شدن، ۱۰۰۰ میکرولیتر از مایع هموژن به لوله دوم اضافه شد و این عمل ادامه یافت و از لوله هفتم، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول هموژن دور ریخته شد. به تمامی لوله‌ها، غیر از شاهد منفی، ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مطابق لوله ۱ مک فارلند اضافه شد. همه لوله‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و پس از آن، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند. آخرین لوله‌ای که در آن هیچ کدورتی دیده نشد، به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد در نظر گرفته شد. از تمامی لوله‌های فاقد کدورت رشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی کیتوزان به روش پور پلیت[8] کشت داده شد و آخرین غلظتی از کیتوزان که قادر به مرگ ۹۹/۹ ٪ از باکتری‌های زنده اولیه بود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شد (۳۴، ۳۵).

1- *Staphylococcus aureus*
2- *Vibrio cholerae cerotype ogava*
3- *Escherichia coli*
4- Mueller-Hinton Broth
5- Disk diffusion
6- Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
7- Minimum Lethal Concentration (MLC)
8- Pour Plate Method

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019

آنالیز آماری: آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد و از نرم افزار Graphpad-Prism 7.00، تحت آزمون تجزیه واریانس، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و آزمون دانکن برای مقایسه تیمارها استفاده گردید.

نتایج

جدول ۱، نتایج حاصل از آزمایش نفوذ انتشاری غلظت‌های مختلف کیتوزان را نشان می‌دهد. در مطالعه استافیلوکوکوس اورئوس کیتوزان ۱۰٪، بیشترین هاله عدم رشد دیده شد که با بقیه تیمارها و آنتی بیوتیک‌های معمول، اختلاف معنی داری داشت (p<05/0). کیتوزان ۷٪ نیز پس از ۱۰٪، بهترین نتیجه را داشت و با بقیه تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد (p<05/0). تیمارهای کیتوزان ۵٪، کیتوزان محلول در آب ۱۰٪، جنتامایسین و تتراسایکلین مشابه یکدیگر بودند و اختلاف معنی داری را نشان ندادند (p>05/0).

در مطالعه اشرشیاکلی نیز مشخص شد که کیتوزان ۱۰٪ و جنتامایسین اختلاف معنی داری را با تیمارهای دیگر نشان دادند (p<05/0)، اما تیمارهای کیتوزان ۵، ۷٪ و کیتوزان محلول در آب ۱۰٪ و اریترومایسین با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند. در کل، مشخص شد که کیتوزان استخراج شده از میگوی هندی تاثیر زیادی بر باکتری اشرشیاکلی ندارد و از بین تمامی تیمارها، تتراسایکلین بالاترین نتیجه را نشان داد (p<05/0).

کیتوزان ۱۰٪ بهترین نتیجه را روی ویبریو کلرا سروتایپ اگاوا نشان داد که با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری داشت (p<05/0). تیمار کیتوزان ۷٪ در مقام دوم قرار داشت (p<05/0). تیمارهای کیتوزان محلول در آب ۱۰٪ و کیتوزان ۵٪ مشابه یکدیگر بودند و با بقیه تیمارها اختلاف معنی داری داشتند (p<05/0). اریترومایسین و جنتامایسین کمترین تاثیر را داشتند و با یکدیگر و با بقیه تیمارها اختلاف معنی داری نشان دادند (p<05/0).

جدول ۲ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی کیتوزان‌های محلول در اسید و در آب را نشان می‌دهد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی و کشندگی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بود. بیشترین میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد مربوط به اشرشیاکلی بود و اثر کشندگی روی این باکتری دیده نشد. تاثیر مثبت کیتوزان محلول در اسید و آب روی ویبریو کلرا در حداقل غلظت ممانعت کنندگی و کشندگی دیده شد.

جدول ۳، تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان را روی قارچ پنیسیلیوم نشان می‌دهد. کیتوزان ۱۰٪ و کیتوزان محلول در آب بیشترین اثر ممانعت کنندگی را روی رشد قارچ پنیسیلیوم داشت که با تمامی تیمارها اختلاف معنی داری نشان می‌داد (p<05/0). تیمارهای کیتوزان ۷ و ۵٪ در مقام‌های بعدی قرار داشتند که با یکدیگر و تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری داشتند (p<05/0).

جدول ۱ـ هاله عدم رشد باکتری (میلی‌متر) در اثر استفاده از غلظت‌های مختلف کیتوزان و آنتی بیوتیک‌های متداول

عامل/گونه	*S.aureus*	*E.coli*	*V.ogava*
کیتوزان۵٪	۱۱/۷۸ ± ۰/۲۸ c	۶/۳۴ ± ۰/۳ c	۱۶/۷۷ ± ۰/۲۰ c
کیتوزان۷٪	۱۴/۳۹ ± ۰/۳۵ b	۶/۷۰ c	۱۸/۳۱ ± ۰/۳۵ b
کیتوزان۱۰٪	۱۸/۶۷ ± ۰/۳۷ a	۷/۹ ± ۰/۴ b	۲۲/۷۱ ± ۰/۳۲ a
کیتوزان محلول در آب۱۰٪	۱۱/۲۹ ± ۰/۰۶ c	۶/۲۳ ± ۰/۱ c	۱۶/۶ ± ۰/۰۴ c
اریترومایسین	۶/۰۵ ± ۰/۲۵ d	۶/۶ ± ۰/۱ c	۶/۱۷ ± ۰/۰۴ e
جنتامایسین	۱۱/۱۵ c	۸/۳ b	۷/۵۸ ± ۰/۰۲ d
تتراسایکلین	۱۱/۰۶ ± ۰/۰۶ c	۱۰/۰ a	-
شاهد(دیسک خام)	-	-	-

جدول ۲ـ مقایسه حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی کیتوزان محلول در اسید و محلول در آب بر میکروارگانیسم‌ها

سویه باکتری	کیتوزان محلول در اسید		کیتوزان محلول در آب	
	حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (mg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (mg/ml)	حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (mg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (mg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۵	۱۰	۵	۱۰
اشرشیاکلی	۲۰	*-	۴۰	*-
ویبریو کلرا	۱۰	۲۰	۱۰	۳۰

* کیتوزان تاثیر نداشته است.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019

بیشترین تاثیر مهارکنندگی کیتوزان، در محیط با pH اسیدی است و مطالعه هاله عدم رشد باکتری در اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان محلول در اسید و محلول در آب نشان داد که بیشترین اثر مهار کنندگی، در کیتوزان محلول در اسید ۱۰٪ دیده می‌شود و کمترین تاثیر را کیتوزان محلول در آب دارا می‌باشد.

جدول ۳ـ تاثیر محیط کشت مولر هینتون آگار همراه باغلظت‌های مختلف کیتوزان بر رشد قارچ پنیسیلیوم (میلی متر)

کیتوزان ۵٪	کیتوزان ۷٪	کیتوزان ۱۰٪	کیتوزان محلول در آب ۱۰٪	شاهد
۱۴/۴۶ ± ۰/۶ c	۱۳/۳ ± ۰/۳ b	۱۱/۶ ± ۰/۲۵ a	۱۱/۷۲ ± ۰/۱۸ a	۳۵/۳ ± ۱/۳ d

کیتوزان محلول در اسید و آب، میزان رشد قارچ را به حداقل رسانده و مهارکنندگی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد و از هاگ‌زایی و رویش آن جلوگیری می‌کند.

بحث

مطالعه هاله عدم رشد باکتری در اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان محلول در اسید و محلول در آب، نشان داد که بیشترین اثر مهارکنندگی در کیتوزان محلول در اسید ۱۰٪ دیده می‌شود و کمترین تاثیر، متعلق به کیتوزان محلول در آب می‌باشد. کیتوزان، بیشترین تاثیر مهارکنندگی رشد را روی *ویبریو کلرا سروتایپ اوگاوا* نشان داد و کمترین تاثیر را بر روی *اشرشیاکلی* داشت. در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های معمول نیز مشخص گردید که در تمامی موارد، کیتوزان محلول در اسید، بهتر از آنتی بیوتیک‌های معمول مانع از رشد باکتری گردیده و به عبارت دیگر، باکتری‌های مقاوم شده به آنتی بیوتیک‌های معمول نسبت به کیتوزان حساس بودند.

در مطالعه تاثیر مهارکنندگی رشد قارچ پنیسیلیوم نیز مشاهده گردید که کیتوزان ۱۰٪ و کیتوزان محلول در آب بیشترین تاثیر مهارکنندگی را نسبت به شاهد نشان داده است و با کاهش غلظت کیتوزان کاهشی در میزان مهارکنندگی مشاهده گردید.

کیتوزان با داشتن طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی، بازده مهاری متفاوتی در برابر قارچ، باکتری گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد. فعالیت ضدباکتری، مرحله پیچیده‌ای است که بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به علت مشخصات سطح سلولی، تفاوت دارد. گزارش شده است که کیتوزان عموماً اثر باکتری کشی قوی تری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی دارد (۳۶). این مسئله شاید به خاطر سد غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی باشد (۳۷). هر چند که در تحقیق حاضر، باکتری *ویبریو کلرا سروتایپ اوگاوا* که بیشترین مهارشدگی را نشان داد، یک باکتری گرم منفی می‌باشد. در تحقیقات مختلف دیگر نیز کیتوزان اثر ضد قارچی بوسیله منع هاگ‌زایی و رویش هاگ نشان داده است (۳۸). Cho و همکاران، اثر ضد باکتریایی کیتوزان بر روی *اشرشیاکلی* و باسیلوس‌ها را گزارش کرده‌اند (۳۹).

کیتوزان در pH کمتر از ۶ پلی کاتیونیک است و به سهولت با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها واکنش می‌دهد (۴۰). کیتوزان به دلیل این خواص پلی کاتیونیک باعث تخریب غشای باکتری می‌شود و خاصیت ضد باکتریایی دارد (۴۱). در واقع، خاصیت ضد باکتریایی کیتوزان بستگی به پروتون دهندگی گروه‌های آمینو دارد که می‌تواند با بار منفی سطح سلول واکنش دهد و منجر به تخریب سلول باکتری شود.

وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون کیتوزان نقش‌های متفاوتی را در شرایط کیتوزان محلول نشان داده‌اند (۴۲). شاید در مطالعه حاضر، میزان چگالی بار مثبت کیتوزان تولیدی بالا بوده و تاثیر مهارکنندگی خوبی روی باکتری و قارچ داشته است. درجه داستیلاسیون بالا، منجر به تراکم چگالی بار مثبت بالا می‌شود. این مسئله فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری از درجه داستیلاسیون متوسط را به‌دست می‌دهد (۴۳). در مطالعه حاضر نیز میزان داستیله شدن کیتین اولیه بالای ۸۹٪ بود که توجیهی بر فعالیت ضد میکروبی کیتوزان حاصله است. یک مطالعه گزارش داده است که درجه داستیلاسیون بالاتر با شارژ مثبت، بویژه در مهار کردن رشد *S. aureus*، موفق بوده که نشان می‌دهد فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان در برابر باکتری‌ها با افزایش درجه داستیلاسیون، افزایش می‌یابد (۴۴).

اما ایجاد کیتوزان محلول در آب و مشتقاتش هدف اصلی تحقیقات ضد میکروبی می‌باشد. در مطالعه حاضر، کیتوزان به دو روش، محلول شد. یکی با کمک اسید و دیگری با کمک آب اکسیژنه. روش دوم به نسبت روش اول، کارایی کمتری در فعالیت ضد میکروبی داشت. اما صرف نظر از مقایسه آماری، کیتوزان محلول در آب تولیدی نیز فعالیت خوبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو کلرا سروتایپ اگاوا* نشان داد که نشان از کارایی روش محلول سازی دارد. در pH=7، کیتوزان از نظر خواص ضد باکتریایی، فعال نیست، زیرا در این pH، محلول نیست و گروه‌های آمینوی آن، بار مثبت ندارند. در مطالعه Feng و Xia، اورتوفوماریل- کیتوزان در این pH محلول بود و کاهش زیادی از باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان داد (۴۵). مطالعات دیگر نیز حاکی از فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان‌های محلول در آب علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند (۴۶).

شاید بتوان گفت، محلول کردن با کمک تیمار با آب اکسیژنه، هر چند باعث تغییر در ساختار مولکولی، وزن مولکولی، میزان چگالی بار مثبت و دیگر خصوصیات کیتوزان شده و آن را نسبت به کیتوزان محلول در اسید، کم فعال‌تر می‌سازد اما با ایجاد خواص پلی کاتیونیک در pH=7، خاصیت ضد باکتریایی به آن می‌بخشد.

در این خصوص، در مطالعه Caner و همکاران که کیتوزان را با پلی وینیل ایمیدازول محلول کرده بودند، قطر هاله عدم رشد کیتوزان معمولی، ۹ تا ۱۱ میلی‌متر بود اما کیتوزان محلول در آب بیش از ۱۷ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد علیه *باسیلوس سابتیلیس* و بیش از ۱۴ میلی‌متر علیه *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد و این مقدار برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۶ میلی‌متر بود (۴۷).

سالانه، گزارش‌هایی از ابتلا به وبا توسط *ویبریو کلرا* (که یک باکتری

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019

گرم منفی است) گزارش می‌شود و ابتلا به این باکتری در شهرستان‌های جنوبی کشور، به دلیل مصرف خام یا نیمه خام آبزیان و یا خوردن سبزیجات آلوده که توسط فاضلاب آبیاری شده‌اند، دیده شده است. در مطالعه حاضر، کیتوزان محلول در اسید و محلول در آب، بهترین اثر را در مهار نمودن باکتری *ویبریو کلرا سروتایپ اگاوا* نشان دادند که نتیجه ارزشمندی است. شاید نتایج تحقیق حاضر بتواند در تولید محصولی جهت مقابله با این باکتری که از مصرف ناصحیح محصولات آبزی به انسان سرایت می‌کند، راه گشا باشد، چرا که کیتوزان از سال ۱۹۸۳ و ۱۹۹۵ در ژاپن و کره به عنوان افزودنی غذایی پذیرفته شده است (۴۸).

نتیجه‌گیری

در جمع‌بندی، می‌توان گفت که کیتوزان ۱۰٪ محلول در اسید، از فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی بالایی برخوردار است. کیتوزان محلول در آب توسط آب اکسیژنه نیز از فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی برخوردار است و نسبت به آنتی بیوتیک‌های معمول، تاثیر بالاتری بر باکتری‌های بیماری‌زا دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، تشکر می‌نمایند. همچنین از سرکار خانم فاطمه ناصری کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی اداره دامپزشکی چابهار که در انجام این تحقیق کمک نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Steckel H, Nogly FM. Production of chitosan pellets by extrusion/spherinization. European J Pharm Biophar. 2004;57(1):107-14.
2. Shahidi F, Synwieki J. Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (Chinocete sopilio) and shrimp (Pandalus boreqlis) processing discards. J Agric Food Chem. 1991;39(8):1532-1572.
3. Dutta PK, Ravikumar MNV, Dutta J. Chitin and chitosan for versatile applications. J Macromol Sci C – Polym Rev. 2002;42(3):307–354.
4. Xie Y, Liu X, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. Carbohyd Polym. 2007;69(1):142–147.
5. No HK, Meyers SP. Preparation and characterization of chitin and chitosan: a review. J Aquatic Food Product Technol. 1995;4(2):27–52.
6. Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Line KY, Wang Y, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. J Control Release. 2002; 70(3): 399–421.
7. Ilium L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharmaceut Res. 1998;15(9):1326–1331.
8. Ramnani SP, Sabharwal S. Adsorption behavior of Cr(VI) onto radiation cross linked chitosan and its possible application for the treatment of wastewater containing Cr(VI). React Funct Polym. 2006; 66(9):902–909.
9. Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiva H, Domb J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem Rev. 2004;104(12):6017–6084.
10. Chien PJ, Sheu F, Yang FH. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. J Food Eng. 2007;78(1):225–229.
11. Yilmaz E. Chitosan: A versatile biomaterial. Adv Exp Med Biol. 2004;553:59–68.
12. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers S. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. Int J Food Microbiol. 2002;74(1-2): 65–72.
13. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut V. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolec. 2003;(6):1457–1465.
14. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chem Pharmaceut Bullet. 1988; 36:784–790.
15. Sugano M, Yoshida K, Hashimoto M, Enomoto K, Hirano S. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosans in rats. In C. J. Brine, P. A. Sandford, & J. P. Zikakis (Eds.), Advnces in chitin and chitosan. Proceedings from the fifth international conference on chitin and chitosan, London: Elsevier.1992; 472–478.
16. Fujimoto T, Tsuchiya Y, Terao M, Nakamura K, Yamamoto M. Antibacterial effects of chitosan solution against Legionella pneumophila, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus. Int J Food Microbiol. 2006;112(2):96–101.
17. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Ishizaki H, Yanagiguchi K. Chitosan- containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. J Dentist. 2007; 35(11):871–874.
18. Li B, Wang X, Chen R, Huangfu V, Xie G. Antibacterial activity of chitosan solution against Xanthomonas pathogenic bacteria isolated from Euphorbia pulcherrima. Carbohyd Polym. 2008;72(2):287–292.
19. Liu N, Chen XG, Park HJ, Liu CG, Liu CS, Meng XH, et al. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. Carbohyd Polym. 2006;64(1):60–65.
20. Xu J, Zhao X, Han X, Du Y. Antifungal activity of oligochitosan against Phytophthora capsici and other plant pathogenic fungi in vitro. Pest Biochem Physiol. 2007; 87(3):220–228.
21. Ma G, Yang D, Zhou Y, Xiao M, Kennedy JF, Nie J. Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan. Carbohyd Polym. 2008;74(1):121–126.
22. Anitha A, Divya Rani VV, Krishna R, Sreeja V, Selvamurugan N, Niar SV, et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carb-

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019

oxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. Carbohyd Polym. 2009;78(4): 672–677.
23. Xie Y, Liu X, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. Carbohyd Polym. 2007; 69(1):142–147.
24. Peng Y, Han B, Liu W, Xu X. Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. Carbohyd Res. 2005; 340(11):1846–1851.
25. Yousefali-Mashuf R. Study the effect of common antibiotics on the Staphylococcus epidermis and Pseudomonase aeroginosa Isolated from Hamedan hospitals, Tabibe Shargh. 1385;8(4):287-297. [in Persian]
26. May-Hall CG. Hospital epidomiology and infection control. 1st ed. Baltimor: Willam & Wilkins; 1996:p.139 – 158.
27. Annual Statistical Report. Iranian Fisheries Organization, 2011. First Edition.
28. Chang KL, Tsai G. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (Solenocera melantho) shell waste. J Agric Food Chem. 1997; 45(5):1900-1904.
29. Wu T, Zivanovic S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. Carbohyd Polym. 2008; 73:248–253.
30. Bradley M. Examination of urine. In: Davidsohn TS, editors. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 17th ed. Philadelphia: WB saunders Co; 2000; 380-455.
31. Alishahi M, Bagherpour Najafabadi M, Najafzadeh H. Study of Antibacterial Effect of Some herbal Extracts against Streptococus iniai, Yersinia rukeri, Aeromonas hydrophyla. Iranian J Vet. 2010; 6(2):21-30.[In Persian]
32. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods of natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J Ethnopharmacol. 1988;23(2-3):127-49.
33. Vanden DA, Vlietinck AJ. In: Dey PM, Harborne JB. (Eds.), Methods in plant biochemistry: screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press; 1991:47-69.
34. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Velietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 1999; 65(1):71-77.
35. Sharifi A, Naghmachi M, Khosravani SAM. A Study on Antimicrobial Effects of Plantago psyllium. Armaghane Danesh. 2011; 62: 191-199. [in Persian]
36. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chito oligosaccharides produced by bioreactor. Carbohyd Polym. 2001;44:71–76.
37. Zhong ZM, Xing RG, Liu S, Wang L, Cai S, Li p. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. Carbohyd Res. 2008; 343(3):566–570.
38. Helander IM, Wright AV, Mattila-Sandholm TM. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends Food Sci Technol. 1997; 8(5):146–150.
39. Cho HR, Chang DS, Lee WD, Jeong ET, Lee EW. Utilization of chitosan hydrolysate as a natural food preservative for fish meat paste products. Korean J Food Sci Technol. 1998; 30: 817–822.
40. Chen CS, Liau WY, Tsai GJ. Antibacterial of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. J Food Pro. 1998; 621(9):1124-1128.
41. Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. Carbohyd Res. 2009;344(17):2375–2382.
42. Kurita K, Kamiya M, Nishimura SI. Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial n-acetylation of chitosan to develop solubility. Carbohyd Polym. 1991;16(1):83–92.
43. Kong M, Chen XG, Xue YP, Liu CS, Yu LG, Ji QX, et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. Front Mat Sci China. 2008;2(2):214–220.
44. Takahashia T, Imaia M, Suzukia I, Sawai J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated by the deacetylation degree. Biochem Eng J. 2008;40(3):485–491.
45. Feng Y, Xia W. Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan. Carbohyd Polym. 2011;83(3):1169–1173.
46. Hu Y, Du Y, Yang J, Kennedy JF, Wang X, Wang L. Synthesis, characterization and antibacterial activity of guanidinylated chitosan. Carbohyd Polym. 2007; 67(1): 66–72.
47. Caner H, Yilmaz E, Yilmaz O. Synthesis, characterization and antibacterial activity of poly (N-vinylimidazole) grafted chitosan. Carbohyd Polym. 2007; 69(2): 318–325.
48. KFDA. Food additives code. Seoul: Korea Food and Drug Administration. 1995; 449–451.

Original Article

Antimicrobial and Antifungal Effects of Acid and Water-Soluble Chitosan Extracted from Indian Shrimp *(Fenneropenaeus indicus)* Shell

Taheri A[1,2*], Seyfan A[1], Jalalinezhad S[3]

1- Department of Seafood Sciences, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime and Marine Sciences University, Chabahar, Iran.
2- Department of Marine Biotechnology, Biological Science Research Center of Oman Sea, Chabahar Maritime and Marine Sciences University, Chabahar, Iran.
3- Student of Medicine, Zahedan Medicine University, International Branch of Chabahar (Sina), Zahedan, Iran.

Received: 21 Nov 2012 Accepted: 11 Mar 2013

Abstract

Background & Objective: Currently, efforts are underway to seek new and effective antimicrobial agents, and marine resources are potent candidates for this aim. The following study was conducted to investigate the efficacy of water-soluble and acid-soluble chitosan against some pathogenic organisms.

Materials & Methods: Inhibition zone of different concentrations (5, 7.5, and 10 mg/ml) of acid- soluble and water-soluble chitosan were examined for in vitro antibacterial activity against 4 kinds of hospital bacteria and penicillium sp. Results were compared with 4 standard antibiotics: streptomycin, gentamicin, tetracycline, and erythromycin. Furthermore, minimum inhibitory concentration and minimum lethal concentration were determined.

Results: Inhibition activity of acid-soluble chitosan (10%) showed the best result (p value < 0.05), whereas water-soluble chitosan exhibited the least antibacterial effects (p value < 0.05). Chitosan demonstrated maximum effect on *V. cholera cerotype ogava*, and the least effect was seen on E. coli (p value < 0.05). Acid-soluble chitosan had a more potent effect than the standard antibiotics. Also, acid-soluble chitosan (10%) and water-soluble chitosan showed maximum inhibitory effects on *penicillium* sp.

Conclusion: Chitosan showed maximum antibacterial effect against *S. aureus, V. cholerae cerotype ogava*, and water-soluble chitosan demonstrated good antifungal effects, revealing a statistically significant difference with common antibacterial and antifungal medicines.

Keywords: **Chitosan, Antibacterial, Pathogens bacteria, Antifungal**

*** Corresponding author: Taheri Ali,** Department of Seafood, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
Tel: +98 5454122197
Email: taheri@cmu.ac.ir,

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:52 +0330 on Sunday October 20th 2019