

حساس کردن اشریشیا کلای O157:H7 به شرایط اسیدی به وسیله کیتوزان و نانو کیتوزان

مهدی زارعی^۱، مهدی پورمهدی بروجنی^۲، زهرا کشاورز^۳

۱- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۳۰ خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲۵ مرداد ۱۳۹۳

چکیده: کیتوزان، یک پلی مر غیرسمی که از داستیلاسیون کیتین به دست می آید، به دلیل استفاده های تجاری فراوانی که در صنایع غذایی دارد توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در تحقیق حاضر توانایی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در حساس کردن اشریشیا کلای O157:H7 به pH های پایین مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور سلول های اشریشیا کلای O157:H7 در محیط TSB با pH برابر با ۴ و ۵ ایجاد شده به وسیله اسیدهای کلریدریک و استیک با غلظت های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد کیتوزان و نانو کیتوزان به مدت یک ساعت مواجه گردید. کیتوزان اثر ضد میکروبی مشخصی را در pH برابر ۵ نشان نداد اما نانوکیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد سلول های اشریشیا کلای O157:H7 را به این pH حساس تر کرد. اثر ضد میکروبی کیتوزان و نانوکیتوزان با کاهش pH به ۴ افزایش یافت به گونه ای که در این pH کیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد و نانوکیتوزان در غلظت های ۰/۱ و ۰/۲ درصد اثرات ضد میکروبی قابل توجهی را علیه اشریشیا کلای O157:H7 نشان دادند به طور کلی اثرات ضد میکروبی بیشتر نانوکیتوزان نسبت به کیتوزان احتمالاً به دلیل افزایش سطح آن و در نتیجه افزایش تمایل آن نسبت به سلول های باکتری می باشد. نتایج رنگ آمیزی فلورسانس نشان داد که کیتوزان و نانوکیتوزان اثرات ضد میکروبی خود را با اختلال در عملکرد غشاء سلولی باکتری ایجاد می کنند.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلای O157:H7، کیتوزان، نانو کیتوزان، مقاومت اسیدی

*نویسنده مسئول: مهدی زارعی

آدرس: گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن: ۰۹۱۷۳۰۲۱۱۴۲

پست الکترونیک: zarei@scu.ac.ir

مقدمه

کیتوزان مشتق داستیله کیتین است. کیتین دومین پلی ساکارید فراوان موجود در طبیعت بعد از سلولز است. این پلیمر زیستی توسط تعداد زیادی ارگانسیم زنده سنتز می شود و به وفور در اسکلت خارجی سخت پوستانی چون خرچنگ و میگو، حشرات، دیواره سلولی قارچ ها و مخمرها یافت می شود. بنابراین دسترسی به کیتین و کیتوزان به فراوانی میسر و همچنین مقرون به صرفه است. کیتوزان به دلیل دارا بودن ویژگی هایی مانند فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی اکسیدانی، غیر سمی بودن، اثرات ضد قارچی و توانایی تشکیل بیوفیلم به عنوان یک افزودنی خوراکی و نگهدارنده محصولات غذایی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفت و مطالعات بسیاری در این زمینه انجام و کاربردهای وسیعی برای آن تعریف شده است (۶، ۷، ۸، ۱۶، ۱۹).

اشریشیا کلای O157:H7 از پاتوژن های مهم غذایی می باشد که از انواع مختلفی از مواد غذایی نظیر گوشت و محصولات گوشتی و شیر و محصولات لبنی جداسازی شده است. این باکتری عامل ایجاد کولیت خونریزی دهنده و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان می باشد. توانایی این باکتری در رشد و زنده ماندن در شرایط اسیدی باعث گردیده است که توجه زیادی به کنترل این باکتری در مواد غذایی معطوف گردد (۹، ۱۰، ۱۸). از جمله روشهای متداول جهت کنترل رشد بسیاری از پاتوژن های غذایی، اسیدی کردن مواد غذایی بوسیله اسیدهای آلی می باشد که این اسیدهای آلی یا در نتیجه فرایند تخمیر در مواد غذایی ایجاد می شوند و یا اینکه به مواد غذایی افزوده می شوند (۴). مقاومت اسیدی پاتوژن های غذایی مختلف نسبت به شرایط اسیدی متفاوت است، بعضی نسبت به شرایط اسیدی

بسیار حساسند و بعضی از مقاومت بالایی برخوردارند، اما بطور کلی اسیدهای آلی از اثر ضد میکروبی بالاتری نسبت به اسیدهای معدنی برخوردارند. مطالعات مختلف نشان داده است که *اشریشیا کلای O157:H7* از مقاومت اسیدی بالایی برخوردار است و قادر به رشد و زنده ماندن در شرایط اسیدی می باشد اگر چه که میزان این تحمل اسیدی به نوع اسید بکار رفته نیز بستگی دارد (۹، ۱۰، ۱۸). از طرف دیگر در بررسی دیگر محققین نشان داده شده است که استفاده از بعضی از ترکیبات باعث حساس شدن باکتری ها به شرایط اسیدی می گردد. با توجه به مورد ذکر شده، می توان با استفاده توأم از یک اسید و ترکیبی خاص که باعث کاهش مقاومت اسیدی باکتری می گردد اثرات ضد میکروبی به مراتب بهتری را در مقایسه با استفاده از اسید به تنهایی بدست آورد. به عنوان مثال Barker و Park در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که اتانول و EDTA باعث حساس شدن لیستریا مونوسیتوژنز به شرایط اسیدی ایجاد شده توسط اسیدهای مختلف می گردند (۲). Pan و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که کیتوزان با اختلال در عملکرد غشاء سلولی لاکتیک اسید باکتری ها باعث افزایش میزان مرگ آن ها گردید (۲۰). بنابراین تحقیق حاضر با هدف ارزیابی امکان حساس کردن *اشریشیا کلای O157:H7* به شرایط اسیدی به وسیله کیتوزان و نانو کیتوزان انجام گردید.

مواد و روش کار

تهیه کیتوزان از پوسته میگو

به منظور تهیه کیتوزان، در ابتدا اقدام به استخراج کیتین از پوسته میگو گردید. بدین منظور ابتدا پوسته های میگوی جمع آوری شده با آب شسته و در آن با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک و سپس درهاون

درصد کیتوزان در ۰/۰۲ مولار بافر استات (۰/۰۲ مولار استیک اسید و ۰/۰۲ مولار سدیم استات) و ۰/۱ مولار نمک طعام با دستگاه ویسکومتر تعیین گردید و سپس بر اساس معادله Mark-Houwink-Sakurada میزان وزن مولکولی کیتوزان محاسبه گردید. در این معادله η میزان ویسکوزیته ذاتی بر حسب سنتی پویز، K و α اعداد ثابت و به ترتیب برابر با $1/81 \times 10^{-3}$ و $0/93$ و M وزن مولکولی کیتوزان بر حسب دالتون می‌باشد (۱۲).

$$[\eta] = KM^\alpha$$

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان و تعیین اندازه ذرات

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش ژلاسیون یونوتروپیک انجام گردید. بدین منظور ۴ میلی لیتر محلول سدیم تری پلی فسفات دو درصد به ۱۰۰ میلی لیتر محلول کیتوزان که بر روی هم‌زن مغناطیسی در حال هم زدن بود، افزوده شد و عمل هم زدن به مدت دو ساعت ادامه یافت پس از این مدت محلول نانوکیتوزان به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار گرفت و در نهایت محلول نانوکیتوزان حاصل در آون خشک و نانو ذرات کیتوزان جمع آوری گردید (۵). به منظور تعیین مشخصات نانوکیتوزان تولید شده، توزیع میزان پتانسیل زتا و اندازه نانوذرات کیتوزان بوسیله دستگاه زتاسایزر (Zetasizer Nano-ZS-900, Malvern Instruments) اندازه گیری گردید.

میکروارگانیزم

باکتری اشریشیا کلای O157:H7 (ATCC 43895) که به صورت کشت ذخیره حاوی گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شد، جهت فعال سازی به محیط Tryptic Soy Broth (TSB) منتقل و

خرد شدند. سپس به منظور کانی زدایی و حذف مواد معدنی از اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال و به منظور حذف پروتئین از پوسته‌ها از محلول سود یک نرمال استفاده گردید. در نهایت پس از چندین مرحله شستشو با آب و رساندن pH کیتین به حالت خنثی به منظور رنگبری و بهبود کیفیت رنگ آن، از اتانول ۹۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. کیتین تهیه شده پس از خشک شدن در آون، جهت تبدیل به کیتوزان به وسیله محلول غلیظ سود داستیله گردید. بدین منظور هر گرم از کیتین با ۱۵ میلی لیتر محلول سود ۵۰ درصد مخلوط گردید و به مدت ۲۰ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت مخلوط حاصل از پارچه‌ی تنظیف عبور داده شد و ابتدا با مقدار زیادی آب معمولی و سپس یکبار با آب مقطر شست و شو گردید تا pH خنثی ایجاد گردد. کیتوزان حاصل در آون خشک و سپس به وسیله آسیاب پودر گردید (۱، ۲۳، ۲۴).

تعیین درصد داستیلاسیون و وزن مولکولی کیتوزان

جهت تعیین درصد داستیلاسیون کیتوزان به دست آمده از روش آنالیز عنصری استفاده گردید. در این روش میزان عناصر کربن و نیتروژن کیتوزان تهیه شده به وسیله دستگاه آنالیز عناصر (Elemental Analyzer, PerkinElmer, Model 2400SII) اندازه گیری و با استفاده از معادله زیر، درصد داستیلاسیون محاسبه و سپس با کسر از عدد ۱۰۰، درصد داستیلاسیون نمونه محاسبه گردید (۲۶).

$$DA \% = [(C/N - 5.14) / 1.72] \times 100$$

جهت تعیین وزن مولکولی کیتوزان تهیه شده از ارتباط بین ویسکوزیته ذاتی و وزن مولکولی استفاده گردید. بر این اساس میزان ویسکوزیته محلول یک

به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آماده کردن مایه‌ی تلقیح

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی میکروارگانیزم فعال شده به ۵ میلی لیتر محیط TSB تلقیح شد و در دمای 35°C انکوبه شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، اقدام به رقیق سازی متوالی و کشت سطحی بر روی محیط کشت آگار مغذی گردید. پلیت‌ها در دمای 35°C به مدت ۴۸-۳۶ ساعت انکوبه شدند و سپس تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی لیتر محیط کشت شمارش و محاسبه گردید. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید. با این عمل تعداد باکتری پس از ۲۴ ساعت مشخص گردید. جهت انجام آزمایشات بعدی با رقیق سازی کشت ۲۴ ساعته، دوز مناسب تلقیح (10^6 CFU/mL) تهیه شد (۲۷).

بررسی تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر مقاومت اسیدی اشیریشیا کلای O157:H7

بدین منظور ابتدا از محلول دو درصد کیتوزان و نانوکیتوزان در اسید استیک یک درصد؛ که عدم وجود باکتری در آنها با کشت بر روی محیط آگار مغذی مشخص گردیده بود؛ به میزان مناسب جهت تهیه غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد به محیط کشت TSB استریل افزوده شد. سپس با استفاده از اسیدهای کلریدریک (۵ مولار) و استیک (۱۷/۴ مولار) که به وسیله فیلتر سرنگی استریل شده بودند، pHهای مورد نظر (۴ و ۵) در محیط‌های ذخیره‌ی تهیه شده، ایجاد گردید. در ادامه باکتری اشیریشیا کلای O157:H7 با دوز تلقیح حدود 10^6 CFU/mL به ۱۰ میلی لیتر محیط TSB حاوی غلظت‌های مختلف

کیتوزان یا نانوکیتوزان با pH برابر با ۴ یا ۵ که به وسیله اسیدهای کلریدریک یا اسید استیک ایجاد شده بود، تلقیح گردید. قبل از تلقیح به منظور تعیین تعداد اولیه باکتری‌های تلقیح شده، مایه‌ی تلقیح پس از رقیق سازی متوالی بر روی محیط آگار مغذی کشت گردید. محیط‌های TSB تلقیح شده به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس به منظور تعیین تعداد باکتری‌های موجود در نمونه مجدداً اقدام به رقیق سازی متوالی و کشت بر روی محیط آگار مغذی گردید. کلیه آزمایشات در حداقل سه تکرار صورت گرفت.

بررسی اثر کیتوزان و نانوکیتوزان بر نفوذپذیری غشاء سلولی در باکتری

بدین منظور همان گونه که در قسمت قبل ذکر گردید محیط کشت TSB استریل حاوی غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد از کیتوزان و نانوکیتوزان که به وسیله اسیدهای استیک و کلریدریک به $\text{pH}=4$ رسانیده شده بودند، تهیه گردید. سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری که در فاز سکون رشد قرار داشت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به ۹۰۰ میکرولیتر از هر یک محیط‌های ذکر شده اضافه گردید. این محیط‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در ادامه اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰۰ میکرومول بر لیتر به آنها افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس ساتریفیوژ در دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد و رسوب باکتری حاصل به وسیله سرم فیزیولوژی استریل شستشو گردید. این عمل سه بار تکرار گردید تا اضافی اتیدیوم بروماید شسته و حذف گردد و در نهایت رسوب باکتری در حجم یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی

یونوتروییک و به وسیله محلول تری پلی فسفات سدیم انجام پذیرفت. آنالیز اندازه ذرات، تبدیل کیتوزان به ذراتی در اندازه‌ی نانو با میانگین ۱۰۸/۶ نانومتر و با پتانسیل زتا در حدود ۴۹/۵+ میلی ولت را نشان داد (تصویر ۱).

تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر زنده‌مانی اشیریشیا کلای O157:H7 در شرایط اسیدی

در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و نانو کیتوزان بر زنده‌مانی اشیریشیا کلای O157:H7 در محیط کشت TSB با pHهای ۴ و ۵ ایجاد شده توسط اسیدهای استیک و کلریدریک در طی مدت زمان یک ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در محیط TSB با pH برابر ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک، تفاوت آماری معنی‌داری بین ۴ غلظت مورد آزمایش کیتوزان مشاهده نگردید ($p > 0.05$). بنابراین می‌توان گفت که کیتوزان تا غلظت ۰/۲ درصد تأثیری بر مقاومت اسیدی این باکتری ندارد. این در حالی است که در همین شرایط محیطی، غلظت ۰/۲ درصد نانو کیتوزان باعث کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های زنده باکتری در مقایسه با غلظت‌های کمتر و گروه کنترل (غلظت صفر) گردید ($p < 0.05$). در مقایسه کیتوزان و نانو کیتوزان نیز می‌توان گفت که در حضور غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد، اگر چه که تعداد سلول‌های زنده در تیمار نانو کیتوزان کمتر از تیمار کیتوزان بود، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). اما در حضور غلظت ۰/۲ درصد تعداد سلول‌های زنده در تیمار نانو کیتوزان بطور معنی‌داری کمتر از تیمار کیتوزان بود ($p < 0.05$). در مورد محیط TSB با pH

استریل غوطه‌ورسازی گردید. به منظور اندازه‌گیری میزان نور فلورسانس ساطع شده از هر یک از نمونه‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در میکروپلیت استریل تخت ریخته شد و میزان نور فلورسانس ساطع شده در طول موج تحریکی ۴۹۳ نانومتر و طول موج ساطعی ۶۳۷ نانومتر بوسیله دستگاه Multimode microplate reader, Synergy HT, BioTek اندازه‌گیری گردید. این آزمایشات در سه تکرار صورت پذیرفت (۲، ۲۲).

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری Independent Samples T- و One-Way ANOVA Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

خصوصیات کیتوزان و نانوکیتوزان تهیه شده از پوسته میگو

درصد داستیلاسیون کیتوزان تهیه شده به روش آنالیز عنصری اندازه‌گیری گردید. در این روش میزان کربن و نیتروژن در نمونه کیتوزان به ترتیب ۴۵/۱۱۱ و ۸/۳۵۹ درصد بود که با جایگزین کردن این مقادیر در معادله مربوطه، درصد استیلاسیون ۱۴/۹ درصد و در نتیجه درصد داستیلاسیون کیتوزان تهیه شده، ۸۵/۱ درصد مشخص گردید. همچنین جهت تعیین وزن مولکولی کیتوزان، از ارتباط بین ویسکوزیته ذاتی محلول کیتوزان و وزن مولکولی استفاده گردید. با توجه به این که میزان ویسکوزیته محلول یک درصد کیتوزان در اسید استیک یک درصد برابر با ۵۷۸/۸۱ سنتی‌پویز بود، بر اساس معادله مربوطه، وزن مولکولی کیتوزان تهیه شده حدود ۸۳۰ کیلودالتون مشخص گردید. تبدیل کیتوزان به نانو کیتوزان به روش ژلاسیون

معنی داری کمتر از سایر غلظت‌های مورد آزمایش بود ($p < 0/05$). اما در صورت استفاده از نانو کیتوزان تعداد سلول‌های زنده در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد بطور معنی داری کمتر از تیمار کنترل و ۰/۰۵ درصد بود ($p < 0/05$). در مقایسه کیتوزان و نانو کیتوزان نیز مشاهده گردید که تعداد سلول‌های زنده در حضور غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد نانو کیتوزان بطور معنی-داری کمتر از غلظت‌های مشابه کیتوزان بود ($p < 0/05$).

بررسی اثر کیتوزان و نانو کیتوزان بر نفوذپذیری غشاء سلولی در باکتری

بدین منظور میزان جذب رنگ اتیدیوم بروماید توسط سلول‌های دچار آسیب غشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بخش از تحقیق به خوبی تأثیر کیتوزان و نانو کیتوزان بر افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی باکتری را نشان می‌دهد به طوری که تغییر در میزان نور فلورسانس ساطع شده در تیمارهای مختلف کاملاً منطبق بر نتایج آزمایشات شمارش تعداد سلول‌های زنده باکتری پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف کیتوزان و نانو کیتوزان بود (تصویر ۲).

برابر ۵ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک نیز نتایج مشابهی به دست آمد (جدول ۱).

در محیط TSB با pH برابر ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک (جدول ۲) تعداد باکتری‌های زنده در صورت استفاده از غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان، بطور معنی داری کمتر از سایر غلظت‌های مورد آزمایش بود ($p < 0/05$). این در حالی است که در صورت استفاده از نانو کیتوزان علاوه بر مشاهده‌ی کاهش معنی دار در تعداد باکتری‌های زنده در حضور غلظت ۰/۲ درصد در مقایسه با تیمار کنترل و غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد، در حضور غلظت ۰/۱ درصد نیز کاهش معنی داری در تعداد باکتری‌های زنده در مقایسه با تیمار کنترل و غلظت ۰/۰۵ درصد مشاهده شد ($p < 0/05$). در مقایسه کیتوزان و نانو کیتوزان نتایج نشان داد که نانو کیتوزان در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد اثر ضد میکروبی بیشتری را علیه *اشریشیا کلای* O157:H7 دارد، بطوری که تعداد سلول‌های زنده در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد نانو کیتوزان بطور معنی داری کمتر از تیمارهای مشابه حاوی کیتوزان بود ($p < 0/05$).

در محیط TSB با pH برابر ۴ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک (جدول ۲) نیز تعداد باکتری‌های زنده در صورت استفاده از غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان بطور

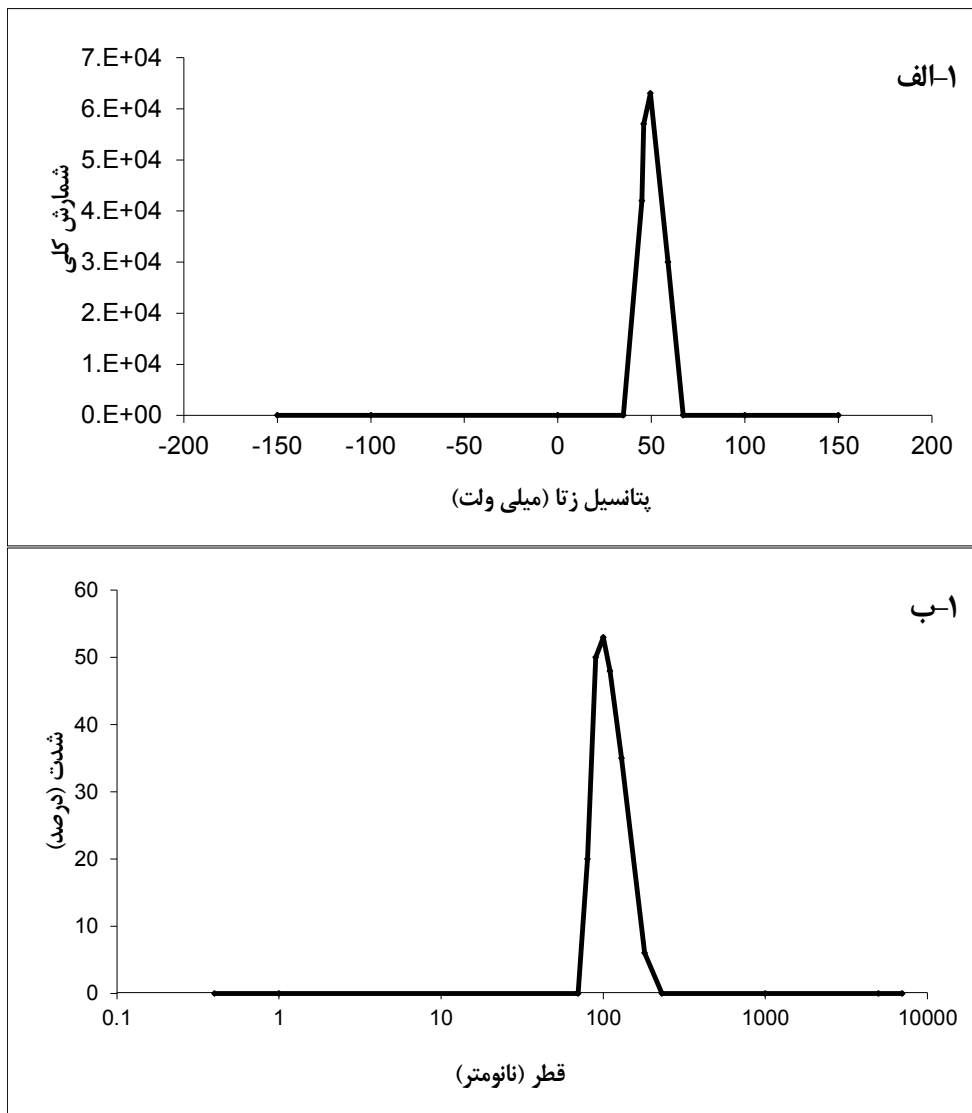
جدول ۱- تأثیر کیتوزان و نانو کیتوزان بر *اشریشیا کلای* O157:H7 در محیط TSB با pH=۵

غلظت کیتوزان یا نانو کیتوزان (درصد)				محیط TSB با pH=۵ ایجاد شده	
۰/۲	۰/۱	۰/۰۵	صفر	توسط	کیتوزان
۴/۸۵ ± ۰/۲۳ a, A	۵/۲۱ ± ۰/۱۲ a, A	۵/۴۱ ± ۰/۲۱ a, A	۵/۶۱ ± ۰/۳۲ a, A	اسید	کیتوزان
۴/۳۹ ± ۰/۲۱ b, B	۴/۹۴ ± ۰/۴۱ a, A	۵/۴۴ ± ۰/۱۳ a, A	۵/۶۱ ± ۰/۳۲ a, A	استیک	نانو کیتوزان
۵/۳۱ ± ۰/۱۹ a, A	۵/۰۸ ± ۰/۳۴ a, A	۵/۶۷ ± ۰/۴۱ a, A	۵/۵۶ ± ۰/۳۲ a, A	اسید کلریدریک	کیتوزان
۴/۷۲ ± ۰/۲۹ b, B	۵/۱۸ ± ۰/۰۷ a, A	۵/۴۸ ± ۰/۲۹ a, A	۵/۵۶ ± ۰/۳۲ a, A	نانو کیتوزان	نانو کیتوزان

- اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه در تیمار حاوی اسید استیک ۰/۳۱ ± ۶/۲۱ و در تیمار حاوی اسید کلریدریک ۰/۱۵ ± ۶/۰۱ بوده است.

- اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار ($p < 0/05$) می‌باشند.

- اعداد ارائه شده مربوط به هر اسید در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار ($p < 0/05$) می‌باشند.

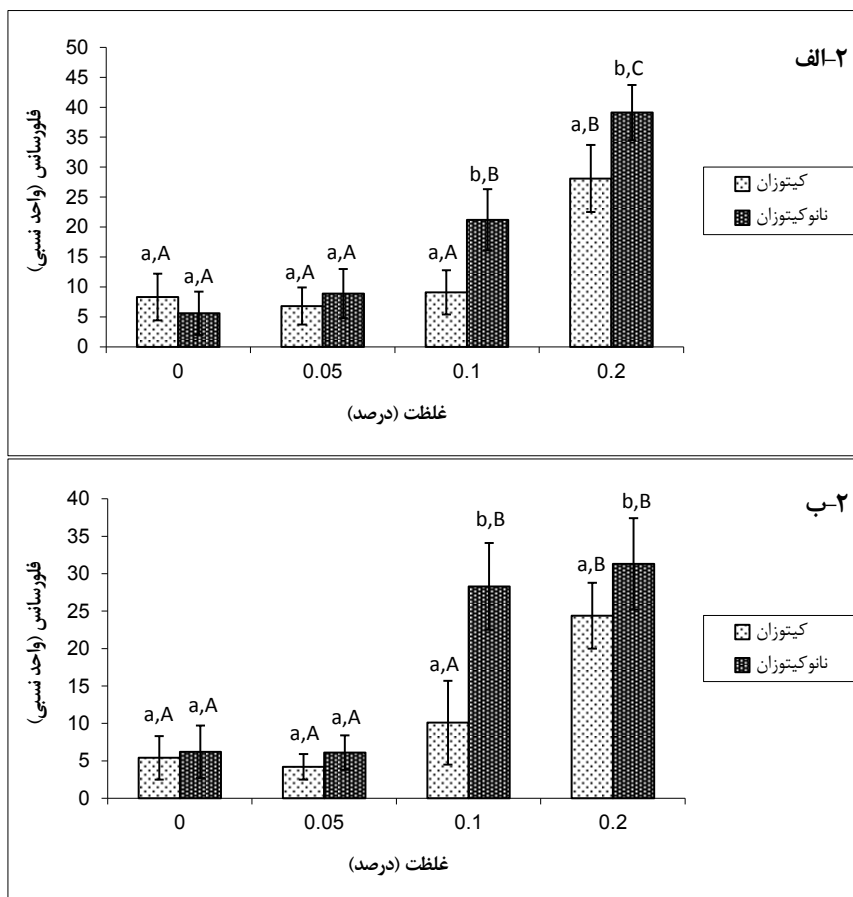


تصویر ۱- توزیع و میزان پتانسیل زتا (الف-۱) و اندازه ذرات (ب-۱) نانوکیتوزان تولید شده

جدول ۲- تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر اشیریشیا کلای O157:H7 در محیط TSB با pH=۴

محیط TSB با pH=۵ ایجاد شده		غلظت کیتوزان یا نانوکیتوزان (درصد)				
		۰/۲	۰/۱	۰/۰۵	صفر	توسط
اسید	کیتوزان	۳/۹۲±۰/۱۶ a, B	۴/۳۶±۰/۱۲ a, A	۴/۴۴±۰/۱۱ a, A	۴/۵۱±۰/۱۱ a, A	توسط
استیک	نانوکیتوزان	۳/۴۶±۰/۱۴ b, C	۳/۹۷±۰/۰۹ b, B	۴/۴۸±۰/۳۲ a, A	۴/۵۱±۰/۱۱ a, A	توسط
اسید کلریدریک	کیتوزان	۴/۲۵±۰/۲۳ a, B	۴/۷۶±۰/۲۷ a, A	۴/۸۵±۰/۱۹ a, A	۴/۹۹±۰/۲۵ a, A	توسط
	نانوکیتوزان	۳/۷۷±۰/۲۱ b, B	۴/۲۳±۰/۳۲ b, B	۴/۷۳±۰/۲۸ a, A	۴/۹۹±۰/۲۵ a, A	توسط

- اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد مربوط به سه تکرار مجزا می باشد. تعداد باکتری اولیه در تیمار حاوی اسید استیک ۰/۲۵ ± ۶/۱ و در تیمار حاوی اسید کلریدریک ۰/۲۹ ± ۶/۱۸ بوده است.
- اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار (p < ۰/۰۵) می باشند.
- اعداد ارائه شده مربوط به هر اسید در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار (p < ۰/۰۵) می باشند.



تصویر ۲- میزان نور فلورسانس ساطع شده از سلول‌های *اشریشیا کلای* O157:H7 مواجه شده با اتیدیوم بروماید در محیط TSB با pH=۴ ایجاد شده توسط اسید استیک (۲-الف) و اسید کلریدریک (۲-ب). حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه، تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین تیمارهای کیتوزان و نانو کیتوزان را در هر یک از غلظت‌های مورد استفاده و حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه، تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف هر ترکیب را نشان می‌دهند.

بحث

میلی‌لیتر بیان نمودند (۲۱). در تحقیق حاضر برای اولین بار اثر ضد میکروبی نانو کیتوزان علیه *اشریشیا کلای* O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت و با اثر ضد میکروبی کیتوزان مقایسه گردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کیتوزان در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک یا اسید کلریدریک، تا غلظت ۰/۲ درصد اثر ضد میکروبی مشخصی را علیه این باکتری نداشت به طوری که نه تنها تعداد سلول‌های زنده‌ی باکتری در حضور غلظت‌های مورد استفاده‌ی کیتوزان کاهش معنی‌داری را نشان نداد بلکه میزان جذب رنگ اتیدیوم بروماید نیز در شرایط فوق‌الذکر تغییر معنی‌داری را نشان نداد. Tao و

تحقیق حاضر با هدف ارزیابی امکان افزایش حساسیت *اشریشیا کلای* O157:H7 به شرایط اسیدی به وسیله کیتوزان و نانو کیتوزان و همچنین مقایسه این دو ترکیب انجام گردید. بر اساس اطلاعات در دسترس تاکنون تنها در مطالعه Qi و همکاران (۲۰۰۴) اثر ضد میکروبی نانو کیتوزان مورد ارزیابی قرار گرفته است. این محققین اثر ضد میکروبی نانو کیتوزان را علیه باکتری‌های *اشریشیا کلای*، *سالمونلا کلرا سویس*، *سالمونلا تایفی موربوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار دادند و حداقل غلظت کشنده‌ی نانو کیتوزان علیه این باکتری‌ها را یک میکرو گرم در

های ۰/۱ و ۰/۲ درصد تأثیر معنی داری را بر افزایش حساسیت باکتری به شرایط اسیدی و کاهش تعداد سلول‌های زنده شمارش شده آن داشتند. No و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۷)، Lim و Hudson در سال ۲۰۰۴ (۱۵) و Kong و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱۳) نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. این افزایش تأثیر به دلیل افزایش چگالی بار مثبت سطحی کیتوزان در pH های پایین تر می‌باشد (۱۳، ۱۵).

در تحقیق حاضر با استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید تأثیر کیتوزان و نانو کیتوزان بر افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی باکتری به خوبی نشان داده شد. اختلال در عملکرد غشاء سلولی باکتری باعث افزایش میزان جذب رنگ اتیدیوم بروماید توسط سلول‌ها گردید به طوری که با کاهش تعداد سلول‌های زنده شمارش شده در حضور غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد کیتوزان و مخصوصاً نانو کیتوزان، میزان نور فلورسانس ساطع شده از باکتری افزایش معنی داری را نشان داد. Pan و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که کیتوزان در غلظت ۰/۰۵ درصد با اختلال در عملکرد غشاء سلولی لاکتیک اسید باکتری‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی و در نتیجه افزایش میزان مرگ آن‌ها گردید. آن‌ها با اندازه‌گیری میزان pH داخل سلولی باکتری، کاهش pH پس از مواجهه باکتری با کیتوزان را نشان دادند. همچنین این محققین با کمک میکروسکوپ فلورسنت افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی لاکتیک اسید باکتری‌ها به رنگ‌های آکریدین اورنج و یدید پروپیدیوم را نشان دادند (۲۰). Tao و همکاران (۲۰۱۱) نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که متعاقب مواجهه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آئرئوس با کیتوزان، به دلیل افزایش نفوذپذیری غشائی، میزان رسانایی الکتریکی

همکاران (۲۰۱۱) نیز حداقل غلظت مهارکننده کیتوزان را علیه استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۰۳۸ درصد، اشیریشیا کلای ۰/۰۷۵ درصد و علیه لیستریا مونوسیتوزنز، سالمونلا انتریتیدیس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا، ۰/۳ درصد گزارش کردند. این محققین حداقل غلظت کشنده کیتوزان را علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلای ۰/۰۷۵ درصد، و علیه لیستریا مونوسیتوزنز، سالمونلا انتریتیدیس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا بیش از ۰/۳ درصد گزارش کردند (۲۵) Benhabiles و همکاران (۲۰۱۲) حداقل غلظت مهارکننده کیتوزان علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تایفی موریوم را به ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ درصد گزارش کردند (۳).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانو کیتوزان در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک یا اسید کلریدریک، در غلظت ۰/۲ درصد تأثیر معنی داری را بر افزایش حساسیت باکتری به شرایط اسیدی نشان داد به طوری که تعداد سلول‌های زنده شمارش شده در حضور غلظت ۰/۲ درصد نانو کیتوزان به طور معنی داری کمتر از سایر غلظت‌های مورد آزمایش بود و میزان رنگ اتیدیوم بروماید جذب شده در این شرایط نیز به طور معنی داری بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. بر اساس نظر Qi و همکاران (۲۰۰۴)، اثر ضد میکروبی بیشتر نانوذرات کیتوزان مربوط است به کاهش اندازه و افزایش میزان سطح آن که باعث افزایش تمایل آن به سلول‌های باکتری می‌شود (۲۱). با کاهش pH به ۴، اثر ضد میکروبی کیتوزان و نانو کیتوزان افزایش یافت به طوری که در pH برابر ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک و اسید کلریدریک، کیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد و نانو کیتوزان در غلظت-

مطالب می‌توان گفت که شاید یکی از دلایلی که در این تحقیق اثرات ضد میکروبی کیتوزان و نانوکیتوزان در غلظت بالاتری نسبت به سایر تحقیقات مشاهده شده است به زمان مواجهه کوتاه بین کیتوزان و باکتری مربوط باشد زیرا که در این تحقیق باکتری و کیتوزان یا نانوکیتوزان تنها به مدت یک ساعت در مواجهه با هم قرار گرفتند حال آن‌که در بسیاری از تحقیقات این زمان در حد ۷۲-۲۴ ساعت بوده است. البته نباید تأثیر عوامل دیگری مانند گونه باکتری، سن سلول و وزن مولکولی کیتوزان را از نظر دور داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت تأمین بودجه طرح تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از سرکار خانم اصفهانی کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی بخاطر همکاری در انجام طرح قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Abdou, E.S., Nagy, S.A., Elsabee, Z.M. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* **99**: 1359-1367.
2. Barker, C., Park, S. (2001). Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1594-1600.
3. Benhabiles, M.S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M.F.A., Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids* **29**: 48-56.
4. Cataldo, G., Conte, M.P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M.G., Superti, F. Longhi, C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in

سوسپانسیون باکتری افزایش یافت. همچنین میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی و گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز نیز در سوسپانسیون باکتری افزایش یافت. این محققین همچنین نشان دادند که کیتوزان تأثیر بیشتری را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *سودوموناس آئروژینوزا* دارد که این مسأله به دلیل ساختار متفاوت غشاء سلولی این دو باکتری می‌باشد (۲۵).

در مطالعه منابع مختلف پراکندگی زیادی در اطلاعات ارائه شده توسط محققین مختلف راجع به اثر ضد میکروبی کیتوزان مشاهده می‌گردد. بعضی از محققین باکتری‌های گرم مثبت را نسبت به کیتوزان حساس تر معرفی نموده‌اند و بعضی دیگر باکتری‌های گرم منفی را. همچنین در رابطه با دوز مناسب برای مشاهده اثرات ضد میکروبی هم گزارشات متفاوتی وجود دارد. به عنوان مثال حداقل غلظت مهارکننده رشد این ترکیب برای باکتری‌های گرم منفی در محدوده ۱-۰/۰۱-۰/۱ درصد (۱۱) و برای باکتری‌های گرم مثبت در محدوده ۰/۱۲-۰/۰۱-۰/۱ درصد (۱۴) گزارش شده است. بر اساس نظر kong و همکاران (۲۰۱۰)، اثرات متفاوت ضد میکروبی کیتوزان ناشی از عوامل مختلفی است که باید در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی کیتوزان مورد توجه قرار گیرد. این عوامل در ۴ دسته طبقه‌بندی می‌شوند: (۱) عوامل میکروبی ذاتی، شامل گونه‌ی میکرووب و سن سلول. (۲) عوامل مربوط به مولکول‌های کیتوزان شامل چگالی بار مثبت، میزان پروتونه شدن گروه‌های آمینی، وزن مولکولی، خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی، ظرفیت شلاته کردن مولکول کیتوزان. (۳) حالت فیزیکی کیتوزان شامل حالت محلول در آب یا حالت جامد کیتوزان. (۴) عوامل محیطی مانند pH، قدرت یونی، درجه حرارت و زمان واکنش میان کیتوزان و سلول‌های باکتریایی (۱۳). با توجه به این

13. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. Park, H.J. (2010). Antimicrobial activity of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* **144**: 51–63.
14. Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sahiwa, H. Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews* **104**: 6017–6084
15. Lim, S., Hudson, S.M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water soluble chitosan derivative with a fiber reactive group. *Carbohydrate Research* **339**: 313–319.
16. Lopez-Caballero, M.E., Gomez-Guillen, M.C., Perez-Mateos, M., Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids* **19**: 303–311.
17. No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* **74**: 65–72.
18. Ogwaro, B.A., Gibson, H., Whitehead, M., Hill, D.J. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **79**: 105–112.
19. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* **120**: 193–198.
20. Pan, C., Rezaei, H., Soor A. (2011). Chitosan Disrupts Membrane Permeability of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* **15**: 7–14.
21. Qi, L.F., Xu, Z.R., Jiang, X., Hu, C.H., Zou, X.F. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* **339**: 2693–2700.
22. Robinson, T.P., Ocio, M.J., Lyn, F., Kaloti, A., Mackey, B.M. (1997). The use of ethidium bromide to assess a novel injury/recovery phenomenon in *Listeria monocytogenes* in inhibitory NaCl conditions. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 367–370.
- Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 185–193.
5. Du, W.L., Xu, Z.R., Han, X.Y., Xu, Y.L., Miao, Z.G. (2008). Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. *Journal of Hazardous Material* **153**: 152–156.
6. Duan, J.Y., Cherian, G., Zhao, Y.Y. (2010). Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chemistry* **119**: 524–532.
7. Fan, W.J., Sun, J.X., Chen, Y.C., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, YL. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry* **115**: 66–70.
8. Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. (2012). Bioactive packaging technologies with chitosan as a natural preservative agent for extended shelf-life food products. In: Arvanitoyannis, I. (Ed.), *Modified Atmosphere and Active Packaging Technologies*. Taylor and Francis, Boca Raton, FL: 685–730.
9. Gomez-Aldapa, C.A., Díaz-Cruz, C.A., Villarruel-Lopez, A., Torres-Vitela, M.R., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J. (2012). Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage. *International Journal of Food Microbiology* **154**: 79–84.
10. Grauke, L.J., Wynia, S.A., Sheng, H.Q., Yoon, J.W., Williams, C.J., Hunt, C.W., Hovde, C.J. (2003). Acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 from the gastrointestinal tract of cattle fed hay or grain. *Veterinary Microbiology* **95**: 211–225.
11. Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. and Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **71**: 235–244.
12. Kasaai, M.R., Arul, J., Charlet, G. (2000). Intrinsic viscosity– molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science Polymer Physics* **38**: 2591–2598.

23. Rodde, P.H., Einbu, A., Varum, K.M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*pandalus borealis*). *Carbohydrate polymers* **71**: 388- 393.
24. Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers* **77**: 410- 419.
25. Tao, Y., Qian, L., Xie, J. (2011). Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydrate Polymers* **86**: 969– 974.
26. Xu, J., McCarthy, S.P., Gross, R.A., Kaplan, D.L. (1996). Chitosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules* **29**: 3436–3440.
27. Zarei, M., Maktabi, S., Khezzadeh, M., Jamnejad, A. (2013). Susceptibility of *Morganella morganii* to various environmental stresses after cold and heat shock treatments. *Journal of Food Safetey* **33**: 107-113.

Sensitization of *Escherichia coli* O157:H7 to Acidic Conditions by Chitosan and Nanochitosan

Zarei, M. ^{*1}, Pourmahdi Borujeni, M. ², Keshavarz, Z. ³

1. Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received Date: 16 August 2014

Accepted Date: 20 June 2015

Abstract: Chitosan, a natural nontoxic biopolymer derived by deacetylation of chitin, has received considerable attention for its commercial applications in the food industry. In the present study, the ability of chitosan and chitosan nanoparticles to sensitize *Escherichia coli* O157:H7 to low pH was assessed. To achieve this purpose, cells of *E. coli* O157:H7 were exposed to pH 4 and 5 adjusted by adding hydrochloric and acetic acids into TSB, in the presence of 0.0, 0.05, 0.1 and 0.2 % chitosan, for one hour. Chitosan did not show antibacterial activity at pH 5, while 0.2 % nanochitosan made *E. coli* O157:H7 cells more sensitive to this pH. However, antibacterial activity of both chitosan and nanochitosan were higher at pH 4, where 0.2 % chitosan and 0.1 and 0.2 % nanochitosan showed significant antibacterial effects on *E. coli* O157:H7 at this pH. In general, the higher antibacterial activity of nanochitosan than chitosan may be due to the nanoparticle's larger surface area and higher affinity with bacterial cells. Results of the fluorescent staining demonstrated that chitosan and nanochitosan exerted their effect by disrupting the cellular membrane of the cells.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7; Chitosan; Nanochitosan; Acid tolerance

*Corresponding Author: Zarei, M.

Address: Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Tel: 09173021142

E. mail: zareei@scu.ac.ir