

بررسی شرایط مختلف فعالیت ضدباکتریایی چیتوزان بر روی اشرشیاکلی

دردی قوجق Ph.D.، سید احسان موسوی M.Ph.*

دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک

*دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

بابل، صندوق پستی ۷۷۵، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق شرایط فعالیت ضد باکتریایی چیتوزان بر روی اشرشیاکلی است.

مواد و روشها: در این پژوهش موش *Escherichia coli*: ATCC25992 بکار برده شد و جهت کشت از محیط (E.M.B.) Eosin -Methylen Blue Agar استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت، از پن ماری آب جوش استفاده شد و پس از جوشاندن به مدت ۲ ساعت به حرارت حدود ۴۵ سانتیگراد رسانده شد و پس از کسب اطمینان از استریل بودن آنها تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. سپس در پیلتهای یکبار مصرف در شرایط استریل تقسیم گردید و پس از سرد شدن جهت اطمینان از عدم آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ نگهداری شد و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. برای کشت، محلولی از *Escherichia coli* را که روز قبل روی محیط EMB کشت داده شده بود با غلظت ۱۰۰۰۰۰۰ در میلی لیتر تهیه کرده و با استفاده از Cell counter و با استفاده از روش Isolation بر روی محیط کشت مورد نظر (محیط EMB و چیتوزان ۵ درصد) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ سانتیگراد قرار داده شد. به گروه کنترل چیتوزان افزوده نشد اثرات تغییرات درجه حرارت، تغییرات pH، غلظت یونها بر روی فعالیت مهارکنندگی چیتوزان بر اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بنابر نتایج حاصل از این پژوهش چیتوزان روی رشد اشرشیاکلی اثر مهارکننده دارد. نتایج بدست آمده نشان دادند که درجه حرارت بالا و اسیدیته قوی خواص ضد باکتریایی چیتوزان را افزایش می دهند و یونهای سدیم سبب کاهش اثرات آن بر اشرشیاکلی شدند. کاتیونهای دو ظرفیتی همچنین اثرات ضد باکتریایی چیتوزان را کاهش دادند.

نتیجه گیری: درجه حرارت بالا و اسیدیته قوی خواص ضد باکتریایی چیتوزان را نسبت به گروه کنترل افزایش می دهند. فعالیت ضد باکتریایی چیتوزان در حضور یونهای یک ظرفیتی و دو ظرفیتی کاهش می یابد.

کل واژگان: چیتوزان، اشرشیاکلی، ضدباکتری

مقدمه

چیتوزان، پلیمری بایوش از ۵۰۰۰ واحد گلوکز آمین است (۱). چیتوزان یک پلیمر، پلی کاتیونیک است که از طریق داستیلاسیون پلی مران استیل گلوکز آمین تولید می شود (۲). اثرات سن سلول، درجه حرارت و انکش، مقادیر نمکها بر روی فعالیت مهاری چیتوزان بر علیه اشرشیاکلی مطالعه شده است (۳). افزودن چیتوزان به تغذیه طیور نشان داده است که بر وزن بدن تأثیری ندارد (۴). چیتوزان به دلیل ارزان بودن، غیر سمی بودن و داشتن گروههای عملی فعال آمینو در سطح وسیع کاربرد دارد، از جمله در کشاورزی، در صنایع تصفیه آب افزودنیهای غذایی، در صنایع آرایشی و همچنین در صنایع دارویی مورد استفاده قرار می گیرد (۵). محققان نشان داده اند که چیتوزان نفوذ پذیری سلول را از طریق اثرگذاری بر مسیره های داخل سلولی و خارج سلولی، سلولهای اپی تلیال افزایش می دهد (۶). خواص ضد میکروبی چیتوزان در محیط آزمایشگاه و در آب میوه به منظور استفاده از چیتوزان به عنوان محافظ مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است (۷). همچنین اثرات نمکهای چیتوزان، چیتوزان هیدروکلراید و چیتوزان گلوکاتامات بر روی پایداری الکتریکی ترانس اپی تلیال و نفوذ پذیری ترکیبات از تک لایه های سلولی با استفاده از مارکرهای رادیوکتیو مورد بررسی قرار گرفته است (۸). نتایج حاصل از اثرات ضد باکتریایی چیتوزان به صورت های سولفونیزوتیل و سولفونات نشان دهنده آن است که رشد کلی فرمها و پسدوموناس، آروموناس و گونه های ویبریو با افزودن چیتوزان کاهش می یابد (۹). در سالهای اخیر از چیتوزان برای انتقال داروها به بدن موجودات استفاده شده است (۱۰). اثر چیتوزان بر اشرشیاکلی کمتر مطالعه شده است. هدف از این پژوهش بررسی فعالیت مهاری چیتوزان بر روی اشرشیاکلی در شرایط تغییر درجه حرارت، غلظتهای مختلف یونهای سدیم، کلسیم و تغییرات شرایط اسید و باز است.

مواد و روشها

* مواد شیمیایی

چیتوزان، سدیم، کلسیم، پپتون، لاکتوز، سوکروز، دی پتاسیم فسفات، آگار، اتوزین و متیلن بلواز نمایندگی شرکت سیگما تهیه شدند. تمام محلولها در حد آزمایشگاهی خالص بود و از آب مقطر عاری از یون و باکسیدیت دو بار تقطیر استفاده شد. سوش Escherichia coli: ATCC25992 مورد استفاده قرار گرفت. سایر ترکیبات شیمیایی از نمایندگی شرکت مرک تهیه شدند.

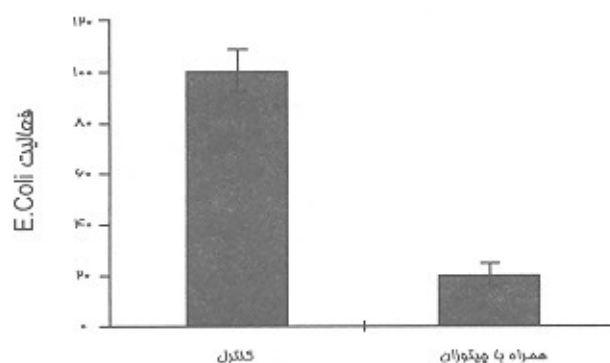
* محیط کشت

جهت کشت از محیط (E.M.B.) Eosin -Methylen Blue Agar استفاده شد (۱۱)، که حاوی ترکیبات (پپتون ۱۰ گرم، لاکتوز ۵ گرم، سوکروز ۵ گرم، دی پتاسیم فسفات ۲ گرم، آگار ۱۳/۵ گرم، اتوزین ۰/۴ گرم متیلن بلو ۰/۶۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر) بود. جهت تهیه محیط کشت از بن ماری آب جوش استفاده شد و محیط کشت پس از جوشاندن به حرارت حدود ۴۵ رسانده شد، سپس در

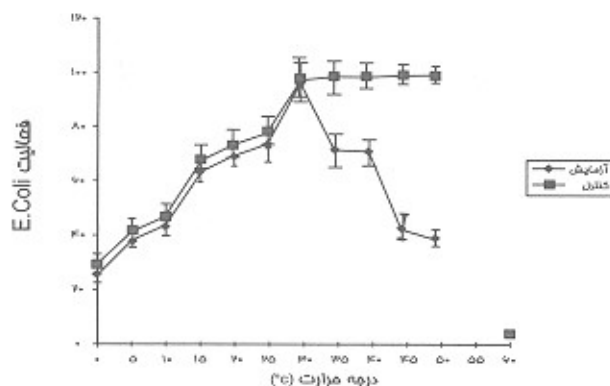
پلیتهای یکبار مصرف در شرایط استریل تقسیم گردیده و پس از سرد شدن جهت اطمینان از عدم آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ نگهداری کرده و پس از اطمینان از استریل بودن آنها تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. جهت کشت محلولی Escherichia coli را که روز قبل روی محیط EMB کشت داده شده بود با غلظت ۱۰۰۰۰۰۰ در میلی لیتر تهیه کرده (با استفاده از counter Cell و با استفاده از روش Isolation بر روی محیط کشت مورد نظر (محیط EMB و چیتوزان ۵ درصد) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ قرار داده شد. اثر درجه حرارت از ۰ تا ۴۵ سانتیگراد و شرایط pH اسیدی و بازی و غلظتهای ۰ تا ۵۰ میلی مول در لیتر یونهای سدیم و کلسیم بر فعالیت مهاری چیتوزان بر اشرشیاکلی در محیط E.M.B. مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر بر حسب Mean ± S.E ارائه شده و n برابر با ۶ است، که هر یک از آزمایشها ۶ بار تکرار گردید.

یافته ها

در نمودار ۱ اثر چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود، چیتوزان اثرات ضد باکتریایی دارد. نمودار ۲ نشان می دهد که در درجه حرارت بالا خواص ضد باکتریایی چیتوزان افزایش می یابد، به طوری که فعالیت اشرشیاکلی در درجه حرارت بالا مهار می گردد.



نمودار ۱: اثر چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی. نتایج ارائه شده حاصل شش بار آزمایش است و هر یک از ستونها بر اساس Mean ± SE ارائه شده است.



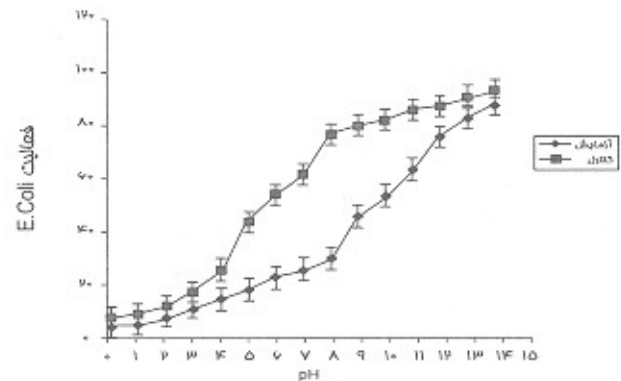
نمودار ۲: اثر درجه حرارت بر خواص ضد باکتریایی چیتوزان. نتایج ارائه شده حاصل شش بار آزمایش است و هر یک از نقاط بر اساس Mean ± SE ارائه شده است.

همانطوری که در نمودار ۴ نشان داده شده است حضور یون کلسیم سبب کاهش اثرات چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی می‌شود. در نمودار ۵ نشان داده شده است که حضور یون سدیم سبب کاهش اثرات چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی می‌شود.

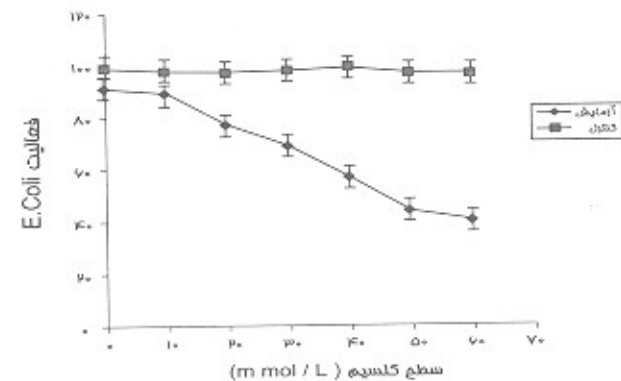
بحث

اثرات مهار کنندگی چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی در این پژوهش نیز نتایج کننده گزارش سایر محققان است (۳، ۶). نتایج حاصل از این پژوهش نشانگر آن است که در حرارت ۳۰ سانتیگراد خواص ضدباکتریایی چیتوزان افزایش می‌یابد به طوری که رشد اشرشیاکلی تا ۳۰ سانتیگراد حرارت افزایش می‌یابد، اما رشد اشرشیاکلی در درجه حرارت بالاتر مهار می‌گردد و اثرات ضد باکتریایی چیتوزان افزایش می‌یابد. همچنین pH اسیدی ۳ تا ۵ اثرات ضد باکتریایی چیتوزان را افزایش می‌دهد. در گروه کنترل در (pH ۳ تا ۵) مورد آزمایش رشد اشرشیاکلی نسبت به گروه تست بالاتر بود، بنابراین یافته‌ها نشان می‌دهند که ممانعت از رشد مربوط به حضور چیتوزان است. در یک تحقیق تسای و همکارانش گزارش کردند که در درجه حرارت بالا و pH اسیدی فعالیت ضد باکتریایی چیتوزان افزایش می‌یابد، که با یافته‌های این تحقیق هماهنگ است و مؤید نتایج این تحقیق است. (۱۲). اختلاف بین یافته‌های سایر محققان در اسیدیته و درجه حرارت محیط شاید به دلیل تفاوت روشهای به کارگرفته شده در این پژوهش و مقدار چیتوزان باشد (۱، ۱۱). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند که کاتیونهای مانند کلسیم در غلظتهای ۰ تا ۵۰ میلی‌مول در لیتر خواص ضد باکتریایی چیتوزان را کاهش می‌دهند. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های سایر محققان قابل مقایسه و منطبق است (۲، ۳، ۹). کاهش فعالیت ضد باکتریایی چیتوزان در حضور یونهای سدیم و کلسیم ممکن است به دلیل ایجاد کمپلکس این یونها با چیتوزان باشد، زیرا چیتوزان پلیمری، پلی کاتیونیک است. بنابراین با افزودن غلظت کاتیونهای یک ظرفیتی و دو ظرفیتی اثر مهار کنندگی چیتوزان از بین می‌رود. احتمال دیگر این است که مکانیسم عمل ضد باکتریایی چیتوزان به پلی کاتیونهای چیتوزان و آنیونهای سطح باکتریایی که نفوذ پذیری غشاء را تغییر می‌دهند، بستگی داشته باشد، به این ترتیب ممکن است یونهای یک ظرفیتی و دو ظرفیتی به طور غیر مستقیم از طریق تغییر غلظت یونهای سطح باکتری و تغییر در نفوذ پذیری غشاء سلولی مانع عمل چیتوزان شوند. در آینده با روشن شدن مکانیسم عمل چیتوزان از این ترکیب طبیعی و خصوصیات ضد عفونت آن استفاده نمود.

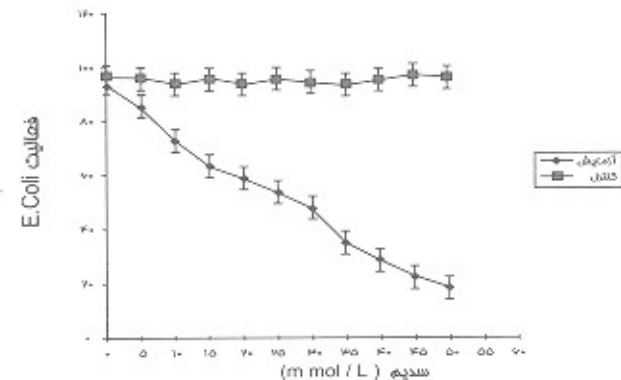
در نمودار ۳ نشان داده شده است که خواص ضد باکتریایی چیتوزان در شرایط اسیدیته قوی افزایش می‌یابد، به طوری که فعالیت اشرشیاکلی در شرایط pH اسیدی مهار می‌شود.



نمودار ۳: خواص ضد باکتریایی چیتوزان در شرایط اسیدی و بازی. نتایج ارایه شده حاصل شش بار آزمایش است و هر یک از نقاط بر اساس Mean ± SE ارایه شده است.



نمودار ۴: حضور یون کلسیم بر اثرات چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی. نتایج ارایه شده حاصل شش بار آزمایش است و هر یک از نقاط بر اساس Mean ± SE ارایه شده است.



نمودار ۵: حضور یون سدیم بر اثرات چیتوزان بر فعالیت اشرشیاکلی. نتایج ارایه شده حاصل شش بار آزمایش است و هر یک از نقاط بر اساس Mean ± SE ارایه شده است.

References

- Han LH, Kimura Y, Okada H: Reduction in fat storage during chitin chitosan treatment in mice fed a high fat diet. Int J Obes Relat Metab Disord 1999; 23: 174-179
- Akbuga J: Use of chitosonium malate as a matrix in sustained release tablets. Int J of Pharmacy 1993; 89: 19-24
- Tsai GJ, Su WH: Antibacterial activity of shrimp

chitosan against escherichia coli. J Food Prot 1999; 62(3): 239-243

4. Razdan A, Pettersson D: Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. British J Nutr 1994; 72: 277-288

5. Pelletier A, Lemire I, Sygusch J, Chornet E, Overend RP: Chitin/chitosan transformation by thermo-merchano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. Biotechnol Bioengineer 1990; 36: 310-315

6. Dodane V, Amin-Khan M, Merwin JR: Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. Int J Pharm 1999; 182(1): 21-32

7. Roller S, Covill N: The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. Int J Food Microbiol 1999; 47: 67-77

8. Kotze AF, Luessen HL, De-Boer AG, Verhoef JC,

Junginger HE: Chitosan for enhanced intestinal permeability: Prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. Eur J Pharm Sci 1999; 17: 145-151

9. Chen CS, Liao WY, Tsai GJ: Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. J Food-Prot 1998; 61(9): 1124-1128

10. Felt O, Buri P, Gurny R: Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. Drug Dev Ind Pharm 1998; 24(11): 979-993

11. Ellen Jo, Baron M, Sydney M, Fingold: Diagnostic Microbiology, The CV Mosby Company, 1998, pp 248-249

12. Tssai GJ, Su WH: Antibacterial activity of shimp chitosan against Escherichia coli. J Food Prot 1999; 62(3): 239-243

