مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۱، ۸۳-۷۹

بررسی اثرات ضد میکروبی کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا (*Artemia Urmiana*) بر روی سوشهای میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیا کلی

ندا قاسم زاده دقیق[1]* محمود رضازاده باری[2] سید مهدی رضوی روحانی[3]

۱) گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودسر، رودسر - ایران.
۲) گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه -ایران.
۳) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه -ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۸۴)

چکیده

کیتوزان یک آنتی میکروب طبیعی بدست‌آمده از منابع حیوانی کاملاً غیرسمی است. در این مطالعه خصوصیات ضد میکروبی کیتوزان استخراج‌شده از پوسته‌سیست آرتمیای دریاچه ارومیه با کیتوزان مشابه تجاری که از پوسته خرچنگ‌شرکت A.T.P ویتنام تهیه‌شده بود، مورد مقایسه قرارگرفت. آزمایش به روش استاندارد لوله ای برای پی بردن به حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) کیتوزان آرتمیا و کیتوزان تجاری در غلظتهای (۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲) میلی‌گرم در میلی لیتر کیتوزان آرتمیا و غلظتهای (۶/۴، ۳/۲، ۱/۶، ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱) میلی‌گرم در میلی لیتر کیتوزان تجاری بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیا کلی به انجام رسید. بر اساس نتایج بدست‌آمده MIC کیتوزان پوسته سیست آرتمیا برای باکتریهای مد نظر ppm ۵۰۰ و MIC کیتوزان تجاری *ppm* ۸۰۰ بدست‌آمد. در مرحله بعد هر چهار باکتری را به طور جداگانه در شرایط یکسان در حضور MIC کیتوزان آرتمیا (ppm ۵۰۰) قرار داده و به مدت ۸ ساعت از نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه هر ۲ ساعت یکبار کشت سطحی داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت نگهداری تعداد کلنی ها شمارش و نمودار زمان مرگ باکتریها را برای بررسی روند و سرعت نابودی آنها در حضور MIC کیتوزان آرتمیا رسم کردیم. بر اساس نتایج بدست‌آمده در این مدت از زمان نگهداری، سرعت نابودی استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از سایر باکتریها و سرعت نابودی سالمونلا تیفی موریوم از همه کمتر بود. همچنین با بررسی تصاویر بدست‌آمده از میکروسکوپ الکترونی بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشریشیا کلی که در حضور MIC کیتوزان آرتمیا (ppm ۵۰۰) قرارگرفته بودند، مشخص شد که سرعت تاثیر کیتوزان آرتمیا بر نابودی باکتری گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری گرم منفی است. در نهایت نتایج بدست‌آمده در این مطالعه حاکی از قدرت بالای کیتوزان آرتمیا در مهار میکروارگانیسمهای مورد مطالعه در مقایسه با کیتوزان مشابه تجاری است.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان آرتمیا، اثرات ضد میکروبی، کیتوزان تجاری.

مقدمه

کیتوزان با نام علمی (*poly*(β-D(1-4)-2-amino-2-deoxy-α-glucan) پس از داستیله شدن از کیتین با نام شیمیایی (poly (β-D(1-4)-N-acetly-glucosamine) بدست می‌آید (تصویر ۱). این دو پلی ساکارید از ت دار توسط برخی حیوانات و گیاهان ساخته می شوند و بعد از سلولز از فراوانترین پلیمرها در طبیعت می‌باشند(۵). این دو بیوپلیمر به علت داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاص خودشان همواره مد نظر بشر بوده‌اند و سالیان متمادی توسط انسانها استخراج و به صور مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی کیتین و کیتوزان عبارتند از، ۱) داشتن خصوصیات انبساط و کشیدگی شدید، ۲) خاصیت ضد ویروسی و ضد باکتریایی، ۳) غیر سمی و غیر آلرژیک بودن، ۴) عدم حلالیت در آب، ۵) قدرت بالایی در جذب مواد رنگی، ۶) ابر جاذب بودن، ۷) خاصیت ژله‌ای شدن (۱۱،۱۶). از ترکیبات و مشتقات فراوان این دو بیوپلیمر به صور مختلف در صنایع داروسازی، شیمی، مواد غذایی، بیوتکنولوژی و آرایشی استفاده می‌شود. از میان کاربردهای آن نقش آن به عنوان یک ماده جلوگیری کننده از فساد، نگهدارنده ضد قارچی برای طولانی کردن قابلیت ذخیره سازی و نگهداری محصولات تازه، مانع رشد باکتریها، تثبیت کننده رنگ، کاهش دهنده کلسترول خون، سنتز پوست مصنوعی و تثبیت کننده آنزیمها حائز اهمیت می‌باشند(۱۰). کیتوزان تجاری موجود در بازار از پوسته میگو، خرچنگ و کریل (Krill) بدست می آید، در حالی که کیتوزان مورد مطالعه از پوسته سیست آرتمیا یک نوع سخت پوست آبهای شور که متعلق به زیر شاخه سخت پوستان و خانواده آرتمئده است، استخراج شده است. دریاچه ارومیه زیستگاه اصلی یکی از آرتمیاهای موجود در دنیاست، که به نام آرتمیا اورمیانا شناخته شده است. کیتوزان یک آنتی میکروب طبیعی بدست آمده از منابع حیوانی، کاملاً غیر مضر و غیر سمی است که نه تنها بر سلامتی انسان تأثیر سوئی ندارد، بلکه به عنوان دارو در درمان بسیاری از بیماریها هم بکار می‌رود. طیف باکتریایی حساس به کیتوزان طیف محدودی نمی‌باشد بلکه

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۱۸۲-۴۲۲۰۳۰۲۱ نمابر: ۰۱۸۲-۴۲۲۰۳۰۲۰ Email: Neda_ghasemzade@yahoo.com

شامل کلیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می باشد. سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella Typhimorium*) یکی از جنسهای مهم باکتری است که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد. گرم منفی و هوازی است. عامل تب حصبه و مسمومیتهای غذایی سالمونلوسیس در انسان است. حضور کلیه گونه‌ها و سویه‌های این جنس در مواد غذایی نامطلوب است. اشریشیاکلی (*E.coli*) باکتری میله‌ای از خانواده انتروباکتریاسه، گرم منفی و هوازی اختیاری و بیهوازی است. ایجاد اختلالات گوارشی در انسان از عوارض وجود این باکتری در مواد غذایی است. استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) باکتری گرم مثبت و کروی از خانواده میکروکوکاسه است. این باکتری عامل مسمومیت غذایی در انسان است و حضور تعداد زیاد آن در مواد غذایی نامطلوب است. لیستریا منوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) باکتری گرم مثبت، میله‌ای، هوازی و بی‌هوازی اختیاری است که عامل اصلی بسیاری از عفونتها در انسان است (۷). در خصوص تأثیرات ضد میکروبی کیتوزان تجاری بر روی میکروارگانیسم های فوق تحقیقات بسیاری صورت گرفته است. Wang در سال ۱۹۹۲ نابودی کامل استافیلوکوکوس اورئوس را بعد از دو روز انکوبه کردن در pH۵/۵ و در حضور یک درصد کیتوزان گزارش نموده است(۱۵). Darmadji و Izumimoto در سال ۱۹۹۴ اثرات نگهدارندگی کیتوزان در گوشت را در برابر باکتریهای مختلف بویژه اشریشیاکلی مورد بررسی قرار داده‌اند(۴). Simpson و همکاران در سال ۱۹۹۷ اثر ضد میکروبی غلظتهای مختلف کیتوزان را در میگوی خام مطالعه نموده‌اند(۱۳). Shahidi و همکاران در سال ۱۹۹۹ اثرات ضد میکروبی محلول آبی کیتوزان را بر روی گونه‌های مختلف از جمله باسیلوس سرئوس، پروتئوس و لگاریس و اشریشیاکلی نشان داده اند و در تحقیقی دیگر Shahidi و همکاران در سال ۱۹۹۹ کیتوزان را به صورت فیلم خوراکی به عنوان عامل ضد باکتریایی برای بهبود کیفیت و طولانی کردن قابلیت نگهداری مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند(۱۱). همچنین Altieri و همکاران در سال ۲۰۰۵ در خصوص استفاده از کیتوزان برای افزایش عمر نگهداری پنیر موزارلا تحقیقاتی را به انجام رسانده و به این نتیجه رسیدند که کیتوزان در مهار رشد کلیفرمها در پنیر موثر بوده و در عین حال بر روی سایر میکروارگانیسم ها مثل میکروکوکاسه و باکتریهای اسیدلاکتیک تأثیری نمی‌گذارد (۲). و این در حالی است که در خصوص اثرات ضد میکروبی کیتوزان حاصل از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا هیچ تحقیقی صورت نگرفته است. در حالی که Asadpour در سال ۲۰۰۷ با مقایسات انجام داده بر روی کیفیت کیتوزان استحصالی از پوسته سیست آرتمیا با انواع تجاری مشابه خود که از پوسته خرچنگ و میگو استخراج می شوند، به بالاتر بودن کیفیت و اقتصادی بودن مصرف آن اشاره کرده است. محتوای این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثرات ضد میکروبی کیتوزان حاصل از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا بر روی چهار میکروارگانیسم استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریامنوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیاکلی که در صنایع غذایی بسیار حائز اهمیت هستند، پرداخته است تا هم به توانایی کیتوزان

جدول ۱- کمترین غلظت ممانعت کنندگی کیتوزان پوسته سیست آرتمیا و کیتوزان تجاری.

باکتری	میانگین MIC کیتوزان پوسته سیست آرتمیا ppm	میانگین MIC کیتوزان تجاری ppm
استافیلوکوکوس اورئوس	۵۰۰	۸۰۰
لیستریامنوسیتوژنز	۵۰۰	۸۰۰
اشریشیاکلی	۵۰۰	۸۰۰
سالمونلا تیفی موریوم	۵۰۰	۸۰۰

پوسته سیست آرتمیا در کنترل و مهار باکتریهای فوق الذکر پرداخته شود و هم راهکارهای عملی در استفاده از آن در صنایع و مواد غذایی ارائه کرده باشیم.

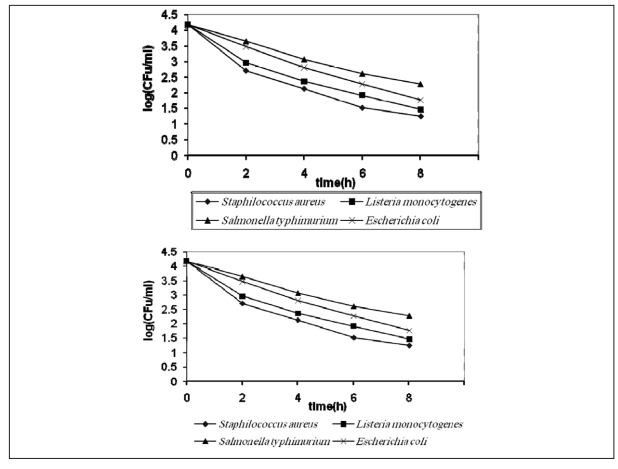
مواد و روش کار

سوشهای میکروبی لیستریا منوسیتوژنز (*RTCC*۱۲۹۸)، سالمونلا تیفی موریوم (*RTCC*۷۳۰)، اشریشیاکلی (*ATCC* ۲۵۹۲۲) و استافیلوکوکوس اورئوس (*DTCC*۱۸۸۵) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است.

تهیه تعلیق باکتریایی: از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها جهت تعلیق باکتریایی استفاده شده به این طریق که ضمن اضافه کردن باکتری به محیط کشت BHI (Brain heart in fusion broth) کدورت حاصله با کدورت لوله های استاندارد نیم مک فارلند برابر شد و به عنوان رقت پایه باکتریایی (با رقت ۱:۲۵۰) در نظر گرفته شد(۳).

تهیه ترکیب رقیق شده کیتوزان: **کیتوزان** به صورت پودری شکل بوده، در حلال اختصاصی خود که اسید استیک یک درصد است حل گشته و سپس برای اطمینان از استریل بودن آن از MILLE-HV(۰/۴۵ µm Filter unit) عبور داده شد و محلول ذخیره تهیه گردید.

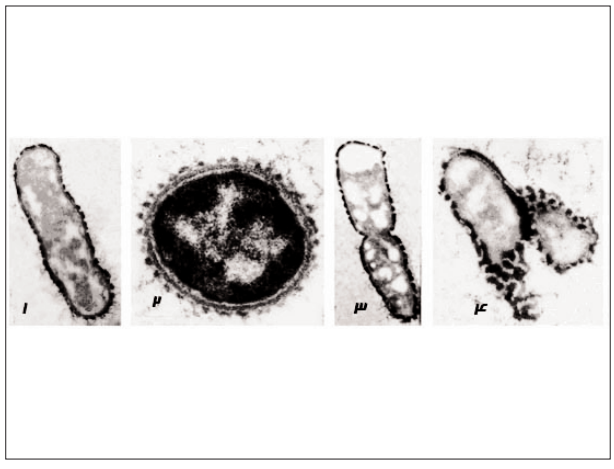
آزمایش حداقل میزان ممانعت‌کنندگی(Inhibitory Concentration Minimum): آزمایش حداقل میزان ممانعت کنندگی به روش استاندارد لوله ای مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی با رقت ۱:۲۵۰ از کشت ۲۴ ساعته باکتری و ترکیب کیتوزان با حلال اسید استیک یک درصد، در ۹ لوله در پیچ دار استریل به میزان ۱ سی سی از محیط نوترینت براث (BHI) ریخته شد سپس در مرحله بعد به میزان ۱ سی سی از ترکیب رقیق شده کیتوزان با غلظت ۴ میلی گرم در میلی لیتر را پس از تکان دادن به لوله شماره یک افزوده و پس از آن ۱ سی سی از مخلوط لوله شماره یک را به لوله شماره دو اضافه کرده و ۱ سی سی از مخلوط لوله شماره دو را به لوله شماره سه انتقال دادیم و این روند تا لوله شماره ۹ ادامه یافت و در نهایت ۱ سی سی از محلول شماره ۹ دور ریخته شد. سپس به میزان ۱ سی سی از سوسپانسیون میکروبی با رقت ۱:۲۵۰ مقایسه شده با لوله استاندارد نیم مک فارلند به لوله های ۱ تا ۹ افزوده گردید و لوله ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند . یک لوله به عنوان شاهد برای بررسی



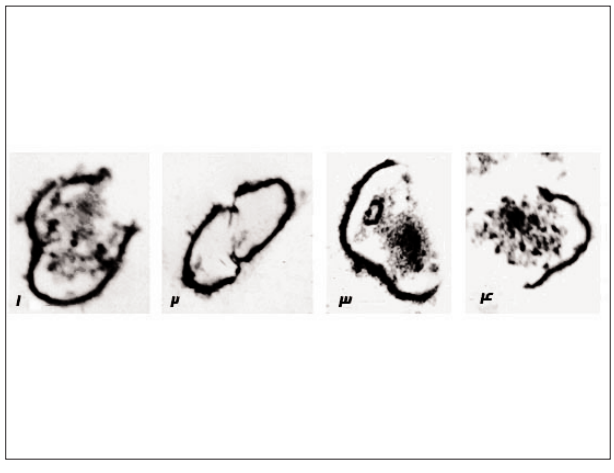
تصویر۱- تاثیر MIC کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا بر روی ماندگاری استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و اشریشیاکلی.

اثرات ضد میکروبی و تأثیرات حلال کیتوزان یعنی اسید استیک یک درصد در نظر گرفته شد که حاوی۰/۱ سی سی از حلال و ۱ سی سی از محیط کشت نوترینت براث و ۱ سی سی از سوسپانسیون میکروبی مورد نظر بود. این آزمایش در غلظتهای (۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲) میلی گرم در میلی لیتر کیتوزان پوسته سیست آرتمیا(با وزن مولکولی متوسط $۴/۵\times۱۰^{۵}$ دالتون) و در غلظتهای (۶/۴، ۳/۲، ۱/۶، ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱) میلی گرم در میلی لیتر کیتوزان تجاری(شرکت A.P.T ویتنام که از پوسته خرچنگ تهیه شده با وزن مولکولی متوسط $۴/۳\times۱۰^{۵}$ دالتون) بر روی ۴ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنز، اشریشیاکلی و سالمونلاتیفی موریوم به انجام رسید و هر آزمایش سه بار تکرار شد(۱،۳).

قرائت MIC: آخرین لوله شفاف که دلیل بر عدم رشد باکتری در آن لوله است، به عنوان لوله MIC انتخاب شد. برای تأیید این نتیجه علاوه بر لوله MIC، از یک لوله قبل و یک لوله بعد از آن نیز بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت سطحی داده شد. بدین ترتیب که ۰/۱ میلی لیتر از رقت مورد نظر را در سطح محیط جامد داخل پلیت ریخته و سپس با شیشه خم استریل L شکل بطور کامل در سطح محیط پخش کردیم. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در گرمخانه، غلظت لوله ای که یک کلونی یا حداکثر سه کلونی در محیط ایجاد کرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد. بعد از مشخص شدن MIC کیتوزان آرتمیا، در ۴ لوله در پیچ دار استریل به میزان ۱ سی سی از محیط کشت BHI ریخته و سپس ۱ سی سی از MIC کیتوزان را در هر ۴ لوله اضافه گردید و در نهایت به میزان ۱ سی سی از سوسپانسیون میکروبی با رقت ۱:۲۵۰ از کشت ۲۴ ساعته چهار باکتری مد نظر را به طور جداگانه در ۴ لوله افزوده و از لحظه اضافه کردن میکروبها یعنی زمان صفر در طی ۸ ساعت از نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد هر ۲ ساعت یکبار از این باکتریها بر روی پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت سطحی داده شد و بعد از ۲۴ نگهداری این کشتها در گرمخانه، تعداد کلنی ها شمارش و نمودار زمان مرگ باکتریها برای بررسی روند و سرعت نابودی آنها در حضور MIC کیتوزان رسم شد.



تصویر ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی باکتری اشریشیاکلی در حضور MIC کیتوزان پوسته سیست آرتمیا (۵۰۰ppm) به مدت ۲۴ ساعت با بزرگنمایی ۲۰۰nm.



تصویر ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در حضور MIC کیتوزان پوسته سیست آرتمیا (۵۰۰ppm) به مدت ۲۴ ساعت با بزرگنمایی ۲۰۰nm.

سپس به منظور بررسی نحوه تأثیر MIC کیتوزان بر روی باکتریها توسط میکروسکوپ الکترونی از دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشریشیاکلی در حضور MIC کیتوزان به مدت ۲۴ ساعت تا نابودی کامل این باکتریها عکسبرداری شد. به طوری که ابتدا نمونه ها دو بار توسط بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷/۲ شستشو داده شدند. سپس توسط محلول گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد ثابت شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس توسط میکروسکوپ الکترونی H-7000 FA با بزرگنمایی ۲۰۰nm مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین نمونه هایی هم به عنوان شاهد در شرایط یکسان و در غیاب کیتوزان مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

الف) تعیین MIC: پس از انتخاب آخرین لوله شفاف به عنوان MIC، لوله تعیین رقت شده و نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده در شرایط یکسان قدرت نابود کنندگی کیتوزان پوسته سیست آرتمیا در مقایسه با کیتوزان تجاری پوسته خرچنگ بسیار بیشتر است.

ب) با بررسی نتایج حاصل از تاثیر MIC کیتوزان آرتمیا (۵۰۰ppm) در شرایط یکسان بر روند نابودی ۴ باکتری مد نظر طول مدت نگهداری مشخص شد که سرعت نابودی استافیلوکوکوس اورئوس به مراتب بیشتر از سایر باکتریها و سرعت نابودی سالمونلا تیفی موریوم از همه کمتر بود. همچنین سرعت تأثیر کیتوزان به عنوان یک آنتی میکروب بر روی باکتریهای گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتریهای گرم منفی بود (تصویر ۱).

ج) با بررسی تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشریشیاکلی مشخص شد که سرعت نابودی باکتری گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری گرم منفی بوده و این تاییدی بر نتایج حاصله از مراحل قبل می باشد. از طرف دیگر با بررسیهای دقیق تر این احتمال وجود دارد که کیتوزان با گذشت زمان باعث پارگی غشاء و در نهایت مرگ سلول باکتری شده، چرا که نمونه های حاوی کیتوزان آرتمیا در مقایسه با نمونه هایی که در غیاب کیتوزان و در شرایط یکسان از آنها عکسبرداری شده بود، با گذشت زمان دچار ضایعاتی در دیواره سلولی خود شده و همچنین با مرور زمان تعداد باکتریهایی که دچار این ضایعات می شدند، بیشتر می شد (تصاویر ۲و۳).

بحث

انتخاب کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا در این مطالعه، بر اساس نتایج بدست آمده در بخش کیفیت کیتوزان آرتمیا بود، چرا که بر اساس نتایج حاصل از تجزیه عنصری دستگاهی (C.H.N.O analyser)، طیف مادون قرمز (FTIR) ،گرانروی سنجی و تعیین درجه استیل زدایی کیتوزان آرتمیا و دو نوع مشابه آن که از پوسته خرچنگ و میگو استخراج شده‌اند، کیتوزان آرتمیا از لحاظ عناصر تشکیل دهنده و باندهای جذبی ایجاد شده و حتی راندمان تولید (۳ ±۶۰) دارای کیفیت بسیار مناسب می‌باشد. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق غلظت ۵۰۰ppm به عنوان کمترین غلظت ممانعت کنندگی کیتوزان برای هر ۴ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریامنوسیتوژنز، سالمونلاتیفی موریوم و اشریشیاکلی تعیین گردید. و این در حالی است که در شرایط یکسان MIC کیتوزان تجاری پوسته خرچنگ برای ۴ باکتری مد نظر ۸۰۰ppm بدست آمد و این حاکی از بالاتر بودن قدرت نابود کنندگی کیتوزان آرتمیا در مقایسه با کیتوزان تجاری است. No و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز غلظت ۸۰۰ppm را به عنوان کمترین غلظت ممانعت کنندگی کیتوزان پوسته خرچنگ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنز، اشریشیاکلی و سالمونلاتیفی موریوم گزارش نموده‌اند(۸). Shin و همکاران در سال ۱۹۹۷ غلظت ۵۰۰ppm از کیتوزان پوسته میگو را به عنوان کمترین غلظت ممانعت کنندگی بر روی اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس گزارش نموده است(۱۲). همچنین آزمایش‌ها نشان می‌دهد که سرعت اثر ضد باکتریایی کیتوزان پوسته سیست آرتمیا بر روی باکتری گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری گرم منفی است. نتایج مشابهی در خصوص خواص ضد میکروبی کیتوزان بدست آمده از پوسته خرچنگ و میگو توسط No و همکاران در سال ۲۰۰۱ ارائه شده است(۸). در نهایت به دلیل اثرات ضد میکروبی و کیفیت مناسب کیتوزان آرتمیا در مقایسه با انواع مشابه تجاری خود، این ماده می تواند جانشین مناسب و اقتصادی برای انواع تجاری که با قیمتهای بسیار و به صورت وارداتی برای مصارف مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، باشد. مکانیسم اثر کیتوزان بر باکتریها هنوز به طور کامل شناخته نشده است. Papineau و همکاران در سال ۱۹۹۱، Sudarshan و همکاران در سال ۱۹۹۲ و Helander و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش نموده‌اند که گروههای NH_3^+ گلوکزآمین کیتوزان تجاری مانع از فعالیت گروههای منفی فسفولیپید تشکیل دهنده دیواره سلولی باکتری می شوند و در نهایت با نفوذ پذیر کردن سلول از طریق ایجاد منافذ و روزنه هایی در غشاء سیتوپلاسمیک و نیز ایفا کردن نقش عوامل فعال در سطح و یا در موقعیتهای امولسیفایر بر روی لیپید های غشائی مانع سنتز مورین (Murein) دیواره شده و خواص باکتریوسیدال از خود نشان می دهد(۶،۹،۱۴).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه مسئولان و دست‌اندرکاران محترم دانشکده کشاورزی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه برای همکاری صمیمانه‌ای که انجام دادند تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Alex, O.,Snnen,W., Leonard, J. (1980) Gradwohls clinical laboratory methods and diagonosis; 8th ed., C.V.Mosby company, NewYork,USA. pp. 63.
2. Altieri,C., Scrocco, M., M.A.Delnobile. (2005) Use of chitosan to prolong mozzarella cheese Shelf life. J. Dairy Sci. 88: 2683-2688.
3. Baron, E.J., Rinegold, M.S. (1990) Diagonosis Microbiology.The C.V Mosby Company,New York,USA. pp. 171-174.
4. Darmadji, P., Izumimoto, M. (1994) Effect of chitosan in meat preservation.Meat Sci. 38: 243-254.
5. Goorge,A., Roberts, F. (1992) Chitin chemistry.In senior lecture in Dyeing Nottingham Polytechnic. The Macmilan press LTD. London,UK. pp.349.
6. Helander, I. M., Nurmiaho- Lassila, E. L., Ahvenaninen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001) chitosan distrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. Int. J. Food Microbiol. 71: 235-244.

7. Kazemi Eslamyan, G.R. (2001) A dictionary of sciences and alimentary industries engineering. New edition.Kazemi Eslamyan,G.R.Tehran,Iran. pp.568.
8. No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002) Antimicrobial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int. J. Food Microbiol. pp. 65-74.
9. Papineau, A.M., Hoover, D.G, Dnorr, D., Farkas, D.F. (1991) Antimicrobial effect of water-soluble chitosan with high hydrostatic pressure.Food Biotechnol. 5: 45-57.
10. Rinaudo, A., Grenoble,F. (1992) Structure of chitin and chitosan. In chitin chemistry, (Goorge,A.Ed), The Macmilan press LTD. London, UK., pp.1-35.
11. Shahdi, F., Arachechi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999) Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci.Technol.10: 37-51.
12. Shin, Y. S., Min, K., Kim, H.K. (1997) Antimicrobial finishing of polypropylene nonwoven fabric bytreatment in chitosan. Advan. Chitin Sci. 2: 771-778.
13. Simpson, B.K., Gagne, N., Ashie, I.N.A., Norrozi, E. (1997) Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus botealis*). Food Biotechnol. 11: 25-44.
14. Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D. (1992) Antimicrobial action of chitosan. Food Biotechnol. 6: 257-272.
15. Wang, G. (1992) Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. J. Food Prot. 55: 916-919.
16. Whistler, R. (1969) Encyclopedia of polymer science and technology. Inter science publisher. New York, USA. pp. 1-35.

J.Vet.Res. 64,1:79-83,2009

STUDY ON ANTIBACTERIAL EFFECTS OF *ARTEMIA URMIANA* CYST SHELL CHITOSAN ON *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM* AND *ESCHERICHIA COLI*

Ghasemzadeh Daghigh,N.[1]*, Rezazadeh Bari,M.[2], Razavi Rohani, S.M.[3]

[1]*Department of Food Sciences, Islamic Azad University, Rudsar Branch, Rudsar, Iran.*

[2]*Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia-Iran.*

[3]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.*

(Received 2 June 2007 , Accepted 3 July 2008)

Abstract:

Chitosan is a natural antimicrobial which is derived from non-toxic animal resources. This study investigated and compared the antimicrobial characteristics of *chitosan* which was extracted from shell of Artemia cyst in the lake of Urmia with the same commercial *chitosan* feature to that of crab shell from A.P.T firm in Vietnam. The experiment was carried by means of two fulded method to find the minimum inhibitory concentration (MIC) of commercial *chitosan* and Artemia *chitosans* and (4,2,1,0/5,0/25,0/125,0/062 mg/ml) (6/4,3/2,1/6,0/8,0/4,0/2,0/1 mg/ml) on *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* , *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. MIC of Artemia *chitosan* for those bacteria and MIC of commercial *chitosan* were determined 500 ppm and 800 ppm. In the next phase, each of those four bacterias was separately exposed to MIC Artemia *chitosan* and during 8 h of incubation at 37°C were artificially cultivated every 2 h and colonies appearing on the plates after 24 h of incubation were counted and the death time graph of the bacterias was drown to study their destruction process in the presence of MIC of Artemia *chitosan*. Experimental achievements showed that in this period of destruction speed in *Staphylococcus aureus* was more than others and the destruction speed of *Salmonella typhimurium* was the least. Also studying the achieved pictures by electronic microscope from the from two bacterias, gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Escherichia coli* which were exposed to MIC of Artemia *chitosan* (500 ppm) depicted that the speed of influence by Artemia *chitosan* on gram-positive bacteria is much more than gram-negative bacteria. Results of this study depicts great abilities of Artemia *chitosan* in destroying studied bacteria in comparis on with those of commercial one.

Key words: artemia *chitosan*, antibacterial effects , commercial *chitosan*.

***Corresponding author's email: neda_ghasemzade@yahoo.com, Tel: 0182-42203021, Fax: 0182-42203020**