مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۱۶۳-۱۵۵

Original Article

خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان علیه *سالمونلا انتریتیدیس*

اسماعیل محمودی[۱]، عباس دوستی*[۲]، محمد سعید جامی[۳و۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، [۲] دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، [۳] استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، [۴] استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

چکیده

سابقه و هدف: *سالمونلا* انتریتیدیس منجر به ایجاد انواع مختلف عفونت های در انسانی و حیوانی می شود. برای از بین بردن عفونت های ناشی آن از آنتی بیوتیک های مختلفی استفاده می شود، اما به دلیل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده از نانوذرات به عنوان جایگزین های مناسب مورد توجه بوده است. نانوذرات کیتوزان به دلیل داشتن وزن مولکولی پایین، زیست تخریب پذیر بودن گزینه مناسبی برای راه برد های مورد نظر می باشد. هدف از این پژوهش بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان علیه *سالمونلا انتریتیدیس* بود.

مواد و روش ها: با تهیه سویه استاندارد از باکتری از تکنیک مولکولی PCR برای تایید این باکتری استفاده شد. در ادامه مراحل از روش ژلی شدن یونی (Ionic gelation) برای تولید نانوذرات کیتوزان و از روش های Hole-Plate و رقت لوله ای برای بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات کیتوزان به همراه آنتی بیوتیک ها استفاده گردید. سپس برای ارزیابی نانوذرات از تکنیک های آنالیز زتا، پراکنگی نوری دینامیک و میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

یافته ها: با مشخص شدن باند ۲۱٤ بازی حضور باکتری تایید گردید. با بررسی نتایج پراکندگی نوری دینامیک (۱۱۱/۷ nm)، آنالیز زتا (۲۰/۸ mV) و میکروسکوپی (۲۰۰ nm>) نانوذرات کیتوزان با وزن مولکولی پایین تولید شد. قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف نشان دادند که نانوذرات کیتوزان و آنتی بیوتیک ها عملکرد موثر و بالایی علیه باکتری دارد و همچنین در روش رقت لوله ای این نتیجه تایید شد.

نتیجه گیری: ارتباط معنی داری بین مقاومت نانوذرات کیتوزان و آنتی بیوتیک ها علیه باکتری وجود دارد. همچنین خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نسبت به آنتی بیوتیک های بیشتر بوده که می توان نتیجه گرفت از نانودرات کیتوزان برای مقابله با بیماری ها و از بین بردن گونه های مقاوم باکتریایی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *سالمونلا*، نانوذرات کیتوزان، ژلی شدن یونی.

دریافت مقاله: آبان ماه ۹٦ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹٦

مقدمه

باکتری *سالمونلا* (*Salmonella*) یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. *سالمونلا* یک پاتوژن درون سلولی اختیاری، گرم‌منفی، میله‌ای شکل، باسیلی شکل، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری است. به طور کلی جنس سالمونلا به دو گونه، *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*) و *سالمونلا بنگاری* (*Salmonella bongori*) تقسیم می‌شود که در گونه *سالمونلا انتریکا* شش زیرگونه (subspecies) به نام های *arizonae*، *salamae*، *enterica*، *houtenae*، *indica* و *diarizonae* وجود دارد. زیر گونه *سالمونلا انتریکا* نیز دارای پنج سروتایپ Enteritidis، Typhi، Choleraesuis، Paratyphi

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

و Typhimurium تقسیم می‌شود. *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* از مهم‌ترین سروتایپ‌های ایجاد کننده بیماری‌ها هستند و تا کنون بیش از ۲۵۰۰ واریته سرولوژی (سرووار) از باکتری *سالمونلا* شناسایی شده است. *سالمونلا* در انسان باعث ایجاد بیماری‌هایی مانند سالمونلوز، تب روده‌ای یا حصبه (تیفوئید یا پاراتیفوئید)، سپتی‌سمی (آلودگی در خون) و گاستروانتریت می‌شود. از این میان *سالمونلا اینتریتیدیس* نقش مهمی در ایجاد این نوع عفونت‌ها دارد (۱).

ماده کیتوزان با نام علمی β-D (1-4)-2-amino-2-deoxy-α-glucan یکی از مهم‌ترین مشتقات طبیعی کیتین می‌باشد که در نتیجه واکنش حذف گروه استیل (دی استیله شده) از گروه کیتین (با نام علمی β-D(1-4)-N-Acetyl-glucosamine) به دست می آید (۲).

مهم‌ترین ویژگی کیتوزان خاصیت ضدمیکروبی آن است که علت آن تاثیر متقابل گروه آمین آزاد کیتوزان دارای بار مثبت با آنیون‌های دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها است که باعث تغییر در نفوذپذیری دیواره سلولی آنها می‌شود. به دنبال آن تراوش مواد از داخل سلول به بیرون و جلوگیری از ورود مواد غذایی به درون سلول رخ می دهد. کیتوزان پس از ورود به داخل سلول می‌تواند با DNA پیوند برقرار کرده و از ساخته شدن RNA جلوگیری نماید. این امر موجب مهار سنتز پروتین می‌شود. همچنین نانوذرات کیتوزان با افزایش تجمع ماکروفاژها و فعال کردن آنها و القای ترشح سیتوکین‌ها می‌تواند باعث بروز مقاومت نسبت به عفونت‌های میکروبی شود (۲).

نانوذرات کیتوزان، زیست تخریب‌پذیر هستند و ویژگی‌هایی دارند که در سطح مولکولی سلول‌های عصبی و سد خونی مغزی توانایی اعمال وظایف زیستی را به آنها می‌دهد. بنابراین در درمان های ضدآلزایمر می‌توان از این ویژگی‌ها بهره برد. از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به انعطاف بالا در ایجاد تغییرات سطحی، توانایی اتصال به مولکول‌های مختلف لیگاند و ایجاد کمپلکس‌های پایدار نانو در شرایط فیزیولوژی اشاره نمود (۳).

از نانوذرات کیتوزان به عنوان حامل داروها نیز استفاده می گردد. به طوری که باعث رهایی دقیق و هدفمندتر داروها می‌شود. همچنین از داروها با پوشش نانوذرات کیتوزانی جهت تسهیل در انتشار استفاده می شود (مانند انتقال انسولین). نانوذرات کیتوزان به دلیل داشتن وزن مولکولی پایین، اندازه کوچک، زیست‌تخریب‌پذیر و ضدمیکروبی بودن گزینه مناسبی برای راه بردهای مورد نظر می‌باشد (۳).

گستره وسیعی از پلیمرهای سنتزی و طبیعی می‌توانند به منظور آماده سازی نانوذرات زیست‌تخریب پذیر مورد استفاده قرار گیرند. پلیمرهای طبیعی کیتوزان مزیت‌های زیادی را نسبت به پلیمرهای سنتزی دارند. به ویژه اینکه این پلیمرها غیرسمی و زیست تخریب پذیر می‌باشند. از کیتوزان در کشاورزی استفاده می‌شود که به طور معمول به عنوان یک درمان طبیعی بذر و رشد گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین به عنوان یک ماده محافظت‌کننده زیست محیطی است که توانایی ذاتی گیاهان را برای دفاع از خود در برابر عفونت های قارچی افزایش می دهد (٤). با توجه به گزارش های متعدد پیرامون عفونت‌های باکتریایی و مقاوم شدن باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که خطری جدی برای تمام افراد جامعه است، هدف از این پژوهش، بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان علیه *سالمونلا انتریتیدیس* بود.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه سویه استاندارد و فعال‌سازی: سویه استاندارد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* (ATCC: 10708) و نانوذرات کیتوزان از بخش کلکسیون میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. به منظور انجام مطالعات میکروبی بر روی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* از محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) (مرک، آلمان) استفاده گردید.

ب) تایید باکتری: برای تایید و شناسایی دقیق تر باکتری مورد نظر از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) استفاده گردید. در ابتدا به منظور استخراج DNA از باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* از کیت DNP™ Kit (سیناژن، ایران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به منظور تکثیر ژن اختصاصی *سالمونلا انتریتیدیس* (*sefA*) از پرایمرهای اختصاصی

F: 5'-GCCGTACACGAGCTTATAGA-3' و R:5'-ACCTACAGGGGCACAATAAC-3' استفاده شد (۵). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) DNAی ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، یک میکرولیتر (۱۰۰ نانومولار) از هر جفت پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۱/۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲۵ میکرولیتر (۱ واحد) از آنزیم SmarTaq DNA polymerase (سیناژن، ایران) انجام شد. برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی استریل به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید.

واکنش PCR در در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف، آلمان) با شرایط شامل واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشت اصلی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۵). محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد منتقل و الکتروفورز گردیدند. به منظور مشاهده اندازه سایز باند از دستگاه Gel Doc استفاده شد.

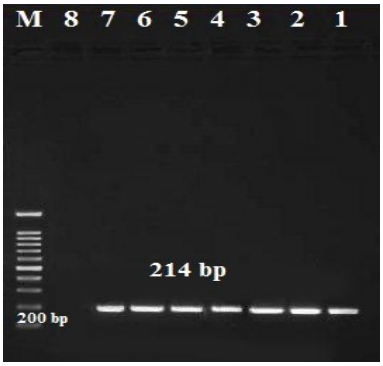
ج) تهیه نانوذرات کیتوزان: برای ساخت نانوذرات کیتوزان از روش ژلی شدن یونی (Ionic gelation) استفاده گردید. زیرا روشی سریع، ساده و بدون نیاز به مواد سمی می باشد. در ابتدا، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم کیتوزان (انستیتو پاستور، ایران) با وزن مولکولی پایین در ۵۰ میلی‌لیتر استیک اسید حل گردید و بر روی همزن مغناطیسی با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد. سپس با استفاده از NaOH نیم مولار، pH محلول بر روی ۵/۵ تنظیم گردید. تمام محلول از فیلتر ۰/٤۵ میکرومتری عبور داده شد (تا کیتوزان‌های حل نشده فیلتر شوند). در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میلی‌گرم سدیم‌تری پلی‌فسفات (TPP) در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل‌شد و از فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شد (محلول عبوری برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد). ۵۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی اسید استیک به همراه کیتوزان تولید شده در مرحله ابتدایی بر روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس مقدار ۲۰ میلی‌لیتر TPP تولید شده در مرحله قبل به صورت قطره قطره اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت با دور ۱۰۰۰ rpm نگه داشته شد. در انتها محلول حاصل با دور ۱٦۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و پس از آن درون دستگاه فریزدرایر برای خشک و پودر شدن قرار داده شد. برای ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، شاخص پراکندگی و اندازه نانوذرات کیتوزان تولید شده از روش‌های زتا آنالایزر توسط دستگاه Nanozeta Sizer ساخت کشور آمریکا، پراکندگی نوری دینامیک (Dynamic Light Scattering) توسط دستگاه Malvern Instruments ساخت کشور انگلستان و میکروسکوپ الکترونی (SEM) استفاده گردید (٦).

د) ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها: باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* با آب مقطر سترون تا رسیدن به جمعیت میکروبی مورد نیاز برای کشت سطحی، 10^5 - 10^6 واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر (CFU/ml) رقیق شد. سپس از روش Hole-plate برای بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان به همراه آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوساید (جنتامایسین) و باکتریواستاتیک (استرپتومایسین) بر روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) استفاده گردید. در ابتدا ۱۰ µL از سوسپانسیون باکتری که از قبل تهیه شده بود بر روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد. با انتهای یک پیپت پاستور شیشه‌ای کاملاً استریل، چاهک‌هایی به قطر ۸ الی ۱۰ میلی‌متر ایجاد گردید. یک تا دو قطره از محیط کشت مجدداً درون چاهک ها اضافه شد (برای جلوگیری از انتشار نانوذرات کیتوزان و آنتی بیوتیک‌ها). در ادامه مراحل سوسپانسیونی از نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها تهیه شد و به صورت جداگانه در پلیت‌ها، غلظت‌های مختلف (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها درون چاهک‌ها ریخته شد. در پایان، محیط کشت‌ها به مدت ۲٤ ساعت با دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند و پس از مدت طی

شده) قطر هاله عدم رشد محیط کشت‌ها اندازه گیری و ثبت شدند (۷).

ه) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها با روش رقت لوله‌ای (۰/۵ مک فارلند) و پورپلیت تعیین گردید. از یک سری لوله آزمایش ۹ تایی استفاده شد که شامل ۷ لوله برای رقت های مختلف، یک لوله برای شاهد مثبت (از محیط کشت باکتری، بدون نانوذرات کیتوزان) و یک لوله برای شاهد منفی محیط کشت بدون باکتری) بود. به لوله‌های آزمایش، ۹ میلی‌لیتر محلول مولر هینتون براث (مرک، آلمان) اضافه و سترون شد. درون لوله‌ها غلظت‌های مختلف نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت جداگانه به لوله اول اضافه شد. پس از هموژن شدن، غلظت‌ها به صورت جداگانه به لوله دوم اضافه گردید. این عمل تا لوله هفتم ادامه یافت. از لوله هفتم، محلول هموژن دور ریخته شد. به تمامی لوله‌ها (غیر از شاهد منفی) ۱۰۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه شدند. پس از آن، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری به صورت چشمی بررسی شدند. آخرین لوله‌ای که در آن هیچ کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد و از تمامی لوله‌های فاقد کدورت رشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها به روش پورپلیت کشت داده شد و آخرین غلظتی که قادر به مرگ ۹۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شد (٦).

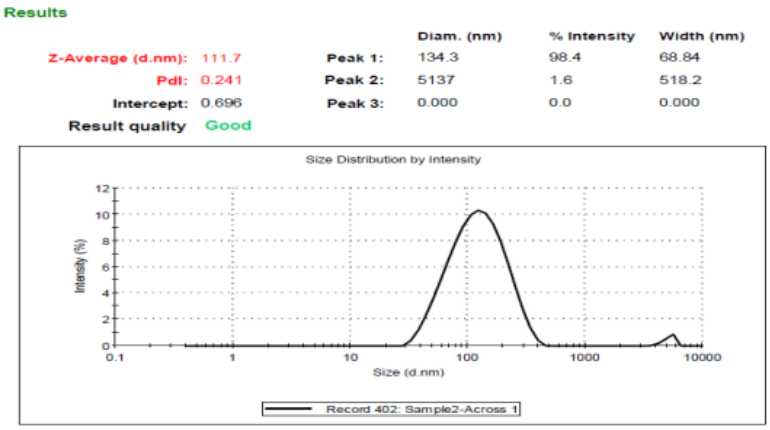
و) آزمون آماری: داده‌های این پژوهش با استفاده از نسخه پانزدهم نرم افزار *SPSS* و *Excel* و آزمون مربع کای آنالیز گردید. این آزمون‌ها، معناداری همبستگی بین دو متغیر اسمی دارای دو سطح را بررسی می‌کنند و ارتباط بین مقاومت باکتری، نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.



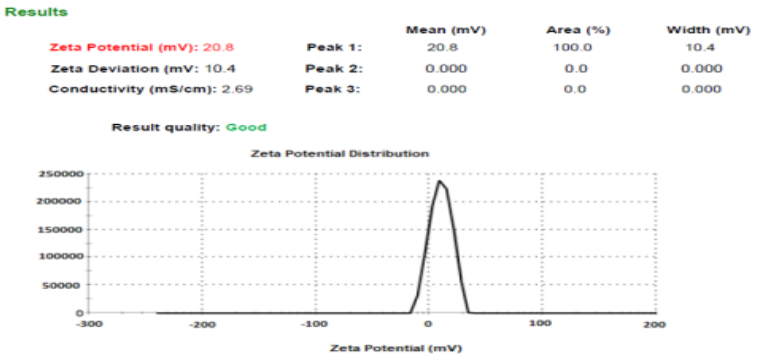
شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *sefA* بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز، آلمان)، ستون های ۱ تا ۷) نمونه های مثبت حاوی ژن *sefA*، ستون ۸) کنترل منفی.

یافته‌ها

تکثیر ژن *sefA* با اندازه ۲۱٤ بازی حضور قطعی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۲: اندازه نانوذرات کیتوزان با وزن مولکولی پایین حاصل از کیتوزان و TPP با pH برابر ۵/۵.



شکل ۳: پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان با وزن مولکولی پایین حاصل از کیتوزان و TPP با PH برابر ۵/۵.

اندازه نانوذرات کیتوزان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی کمتر از ۲۰۰ نانومتر بود و میانگین اندازه نانوذرات توسط پراکنگی نوری دینامیک (DLS) ۱۱۱/۷ نانومتر به دست آمد (شکل ۲). همچنین شاخص پراکنگی اندازه ذرات توسط آنالیز زتا برابر ۲۰/۸ mV تعیین شد (شکل ۳).

مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک ها در جدول ۱ نشان داده شده است. مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای نانوذرات کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است که از کمترین غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای نانوذرات کیتوزان بوده است و باعث مرگ ۹۹ درصد از باکتری‌ها شد.

جدول ۲: مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی.

نام ماده	حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (mg/ml)
نانوذرات کیتوزان	۰/۵	۱/۵
آنتی بیوتیک جنتامایسین	۱/۵	۲/۵
آنتی بیوتیک استرپتومایسین	۱	۳

بحث

سالمونلوزیس یک گاستروانتریت ناشی از آلودگی با سروارهای مختلف باکتری *سالمونلا* می‌باشد. در سال‌های اخیر، *سالمونلا* انتریتیدیس به عنوان مهم‌ترین عامل گاستروانتریت در انسان از اهمیت خاصی برخوردار شده است. انواع مختلف *سالمونلا* در سال‌های اخیر به طور روزافزون به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و مصرفی در درمان مقاوم شده‌اند. همچنین با وجود پیشرفت‌های قابل توجهی در بهداشت و کنترل نظارت بر زنجیره غذایی، انتقال *سالمونلا* همچنان جوامع را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). بروز عفونت *سالمونلا* در ایالات متحده از سال ۲۰۰٤ ثابت بوده است. اما حدود ۸ درصد از ۱۹۹٦–۱۹۹۸ سطوح کاهش یافته است (۸). در سال ۲۰۰۷ بروز سالانه سالمونلوز ۱٤/۹ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت بود. بروز واقعی سالانه عفونت *سالمونلا* غیر تیفوئیدی (Nontyphoidal) ۵۲۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت در ایالات متحده محاسبه شد. در مقایسه با ۱۳/٤ موارد تأیید شده آزمایشگاهی در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت در سال را دارا

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف نانوذرات کیتوزان و آنتی بیوتیک ها.

غلظت (mg/ml)	میانگین قطر هاله عدم رشد خطای استاندارد (mm)				
	نانوذرات کیتوزان	آنتی بیوتیک جنتامایسین	آنتی بیوتیک استرپتومایسین	نانوذرات به همراه آنتی بیوتیک جنتامایسین	نانوذرات به همراه آنتی بیوتیک استرپتومایسین
۰/۲۵	۷±۰/۲	٦±۰/۲	۵±۰/۱	۹±۰/۲	۸±۰/۲
۰/۵	۹±۰/۲	۸±۰/۳	۷±۰/۲	۱۲±۰/۲	۱۱±۰/۲
۱	۱۲±۰/۳	۱۱±۰/۲	۱۰±۰/۲	۱٦±۰/۲	۱٤±۰/۱
۲	۱۷±۰/۱	۱۳±۰/۳	۱۲±۰/۳	۱۹±۰/۱	۱۸±۰/۱
٤	۱۹±۰/۳	۱٦±۰/۳	۱٤±۰/۳	۲۳±۰/۱	۲۰±۰/۱

بود. این موضوع نشان دهنده حدود ۳۸/٦ درصد موارد عفونت *سالمونلا* غیر تیفوئیدی برای هر مورد کشت است (۹).

سالمونلوزیس و تب تیفوئید به طور فزاینده با سفر به کشورهای در حال توسعه (در حال حاضر ۷۲ درصد از حدود ٤۰۰ مورد در سال) در ارتباط است. منابع عفونت عبارتند از هند (۳۰ درصد)، پاکستان (۱۳ درصد)، مکزیک (۱۲ درصد)، بنگلادش (۸ درصد)، فیلیپین (۸ درصد)، و هائیتی (۵ درصد). بروز عفونت های سالمونلایی در آسیای جنوبی و مرکزی، بالا بود (۱۰۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت در سال). در بقیه کشورهای آسیا، آفریقا، آمریکا لاتین و اقیانوسیه (به جز استرالیا و نیوزیلند) نرخ متوسط تب حصبه ۱۰-۱۰۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت گزارش شده است. در حالی که بروز بیماری در بخش‌های دیگر جهان پایین است (۱۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت) (۱۰).

در سال ۲۰۰٤ لیفینگ (Lifeng) و همکاران اثرات ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان را بر روی باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*)، *سالمونلا کلراسویس* (*S. choleraesuis*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) و *سالمونلا تیفی موریم* (*S. typhimurium*) مورد بررسی قرار دادند (۱۱). آنها نانوذرات کیتوزان را با استفاده از روش Ionic gelation تولید و تاثیر آن را بر روی باکتری ها بررسی کردند. نانوذرات تولید شده توسط آنالیز زتا و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. نتایجی مانند تحقیق حاضر حاصل شد. همچنین در مطالعه آنها متوسط حداقل غلظت مهارکنندگی ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این یافته با نتایج پژوهش حاضر در مورد باکتری *سالمونلا* انتریتیدیس مشابهت دارد. بنابراین می توان گفت که نانوذرات کیتوزان به طور قابل توجهی باعث کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. در ایران برزگر (Barzegar) و همکاران در سال ۲۰۰۸ خاصیت ضد میکروبی کیتوزان را در سس مایونزمورد بررسی قرار دادند. محققین یاد شده نشان دادند که افزودن کیتوزان به سس مایونز موجب افزایش مدت زمان نگهداری آن می شود. زیرا کیتوزان دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی بوده و می‌توان به عنوان یک نگهدارنده از آن استفاده کرد. همچنین آنها به بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کیتوزان علیه باکتری *سالمونلا* انتریتیدیس و باکتری *لاکتوباسیلوس* در سس مایونز پرداختند که مقدار آن کمتر از ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. قدرت ضد باکتریایی کیتوزان علیه هر دو باکتری بالا بوده است. نتایج آنها با خاصیت ضد باکتریایی پژوهش حاضر برابری دارد. بنابراین می‌توان از کیتوزان به عنوان یک ماده نگهدارنده استفاده کرد.

در سال ۲۰۱۱ چونگ (Chung) و همکاران خاصیت ضد باکتریایی کیتوزان محلول در آب را بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس، اشریشیا کلی، شیگلا* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی کردند (۱۳). آنها از کیتوزان محلول در آب همانند پژوهش حاضر، علیه این باکتری‌ها در pH های ۵ و ۷ استفاده کردند. آنها نشان دادند که بهترین pH برای فعالیت ضدمیکروبی کیتوزان بین ۵ تا ٦ می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز بهترین عملکرد pH برابر ۵/۵ بود (۱۳).

علیشاهی (Alishahi) در سال ۲۰۱٤ اثرات نانوذرات کیتوزان را با روش میکروسکوپ الکترونی و آنالیز زتا مورد بررسی قرار داد (۱٤). اندازه و پتانسیل نانوذرات کیتوزان به ترتیب ۸٦ نانومتر و ۳٤ گزارش شد. در پژوهش حاضر اندازه و پتانسیل نانوذرات کیتوزان به ترتیب ۱۳٤ نانومتر و ۲۰/۸ بود. با توجه به تفاوت کم بین اندازه‌های نانوذرات، نانوذرات با کیفیت و عملکرد بالایی ساخته شده که دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی هستند. همچنین اثر ضد باکتریایی این نانوذره علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های مختلف بررسی گردید. علیشاهی اثر ضدباکتریایی نانوذرات علیه باکتری‌ها را در غلظت بالا (۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر) اعلام نمود. در پژوهش حاضر نیز بهترین فعالیت ضدمیکروبی نانوذره در غلظت بالا (٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. در سال ۲۰۱۵ در مصر ابراهیم (Ibrahim) و همکاران تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین،

سیپروفلوکساسین و نانوذرات کیتوزان را علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* مورد بررسی قرار دادند. آنها نانوذرات کیتوزان را با روش ژلی شدن یونی در pH ۵/۵ تولید کردند. در پلیت آگار غلظت‌های مختلف نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها را مورد بررسی قرار دادند. قطر هاله عدم رشد آنها برای نانوذرات برابر ۵/٦ میلی‌متر و برای آنتی‌بیوتیک‌ها ۵/۵ میلی‌متر بود. پس از مخلوط کردن نانوذرات کیتوزان با آنتی بیوتیک‌ها قطر هاله عدم رشد بین ۲۱ تا ۲۲ میلی‌متر تغییر کرد. این امر نشان دهنده فعالیت هر دو مورد می‌باشد. به طوری که تاثیر هم زمان نانوذرات به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها موجب به وجود آمدن خاصیت ضدباکتریایی قوی تری می شود. همچنین آنها نشان دادند که نانوذره باعث از بین بردن باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* می‌شود. چنین نتایجی در پژوهش حاضر علیه *سالمونلا انتریتیدیس* توسط نانوذرات کیتوزان به همراه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۲۳ میلی‌متر و برای نانوذرات کیتوزان به همراه آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین ۲۰ میلی‌متر بود.

نتیجه گیری

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها و نانودرات کیتوزان که به صورت ترکیبی با هم علیه باکتری قرار گرفتند، وجود داشت. همچنین خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوساید و باکتریواستاتیک بیشتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که می توان از نانوذرات کیتوزان برای مقابله با بیماری‌ها و از بین بردن گونه‌های مقاوم باکتریایی استفاده کرد. همچنین از این تکنیک می‌توان علیه بیماری‌های مختلف استفاده کرد. گزارش های متعدد نشان داده اند که نانوذرات کیتوزان باعث از بین بردن گونه‌های مختلف باکتریایی می‌شوند. بنابراین با تولید و انبوه سازی آن می‌توان از به وجود آمدن سویه‌های مقاوم جلوگیری نمود.

تشکر و قدردانی

نویسنگان این مقاله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Doosti A, Mahmoudi E, Jami MS, Mokhtari-Farsani A. Prevalence of *aadA1*, *aadA2*, *aadB*, *strA* and *strB* genes and their associations with multidrug resistance phenotype in *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry carcasses. Thai J Vet Med. 2016; 46(4): 691-697.
2. Chung YC, Yeh JY, Tsai CF. Antibacterial characteristics and activity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the Maillard reaction. Molecules. 2011; 16(10): 8504-8514.
3. Sarvaiya J, Agrawal YK. Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti-Alzheimer drug delivery. Int J Biol Macromol. 2015; 72: 454-465.
4. Hadwiger Lee A. Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. Plant Sci. 2013; 208: 42-49.
5. Daruoshi M, Doosti A, Kargar M. The prevalence of plasmid genes *spvB, spvC* and *spvR* in *Salmonella Enteritidis* isolated from poultry industry in Chaharmahal va Bakhtiari province. J Microb World. 2015; 7: 282-288. [In Persian]
6. Zahedi yeghaneh Z, Hadizadeh M. Comparison of antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 19(6): 21-28. [In Persian]

7. Asghari SM, Ebrahimi Samani S, Seraj Z, Khajeh Kh, Hoseen Khani S. Optimization, chitosan nanoparticles synthesis. Biotechnol Tarbiat Modares Univ. 2013; 4(2): 65-73. [In Persian]

8. Galanis E, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. Emerg Infect Dis. 2006; 12(3): 381-388.

9. Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH. Nontyphoid *salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. Pediatr Neonatol. 2013; 54(3): 147-152.

10 . Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and paratyphoid fever. Lancet 2005; 366(9487): 749-762.

11. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate Res. 2004; 339(16): 2693-2700.

12. Barzegar H, Karbassi A, Jamalian J, Aminlari M. Investigation of the possible use of chitosan as a natural preservative in mayonnaise sauce. Water Soil Sci. 2008; 12(43): 361-370. [In Persian]

13. Chung YC, Yeh JY, Tsai CF. Antibacterial characteristics and activity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the Maillard reaction. Molecules. 2011; 16(10): 8504-8514.

14. Alishahi A. Antibacterial effect of chitosan nanoparticle loaded with nisin for the prolonged effect. J Food Saf. 2014; 34: 111-118.

15. Ibrahim HM, El-Bisi MK, Taha GM, El-Alfy EA. Chitosan nanoparticles loaded antibiotics as drug delivery biomaterial. J Appl Pharma Sci. 2015; 5(10): 85-90.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Original Article

Antibacterial effect of chitosan nanoparticles against *Salmonella enteritidis*

Esmaeil Mahmoudi[1], Abbas Doosti[2], Mohammad-Saeid Jami[3,4]

[1]M.Sc., Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[3]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[4]Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Science, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Salmonella enteritidis* causes a number of infections in humans and other animals. Though different antibiotics are used to eliminate bacterial infections, due to the development of antibiotic resistance after a while, the use of nanoparticles has been considered as suitable alternatives. Chitosan nanoparticles are appropriate options for the intended strategy due to some properties including low molecular weight and biodegradability. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of chitosan nanoparticles against *S. enteritidis*.
Materials & Methods: Standard bacterial strain was prepared and subsequently confirmed by PCR technique. Ionic gelation method was used to fabricate chitosan nanoparticles and Hole-Plate and tube dilution methods were used to check the chitosan nanoparticles anti-microbial properties with antibiotics. At last Zeta's analysis techniques, dynamic optical scanning, and electron microscopy were used to evaluate nanoparticles.
Results: A 214 base pair band confirmed the presence of bacteria. Chitosan nanoparticles with low molecular weight were produced by analyzing the results of optical dynamics scattering (111.7 nm), zeta analysis (20.8 mV) and microscopy (<200 nm). The diameter of the non-growth halo at different concentrations indicated that chitosan and antibiotic nanoparticles are highly effective on bacteria. The same result was confirmed using the tube dilution method.
Conclusion: There is a significant relationship between the chitosan nanoparticles resistance and antibiotics against bacteria. In other words, the nanoparticles antibacterial properties were higher than antibiotics. It is deduced that chitosan nanoparticles can be used to control diseases and to destroy resistant bacterial species.
Keywords: *Salmonella*, Chitosan nanoparticles, Ionic gelation.

Correspondence to: Abbas Doosti

Tel: +98 9133838830

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 155-163.