

خواص ضد باکتریایی مشتقات کیتوزان در مقابل باکتری *Staphylococcus aureus*

وثیقه السادات میرباقری^۱، علیرضا عالیشاهی^{۱*}، سید حمید رضا هاشمی پطرودی^۲، سید مهدی اجاق^۱

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری ساری، ایران.

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵

*نویسنده مسئول:

seafood1144@yahoo.com

کیتوزان (Cs) از پوسته میگو استخراج و فرم‌های مشتق شده از آن شامل N-آلکیل کیتوزان (AlkCs) و نانوذرات کیتوزان (CsNPs) تهیه شد. سپس اثرات ضد باکتریایی آن‌ها بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس سویه حساس به متی سیلین ارزیابی شد. مورفولوژی با میکروسکوپ الکترونی روبشی، ساختار شیمیایی توسط الگوی پراش اشعه ایکس و اندازه CsNPs با زتاسایزر بررسی شد. سپس فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها توسط آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی، انتشار در آگار به کمک دیسک، نفوذپذیری غشای سلولی توسط سنجش انتشار بتاگالاکتوسیداز سیتوپلاسمی ارزیابی شد. نوع مرگ سلولی القا شده نیز توسط روش رنگ آمیزی DAPI و تغییرات در یکپارچگی سطح سلولی توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) بررسی شد. نتایج نشان داد CsNPs به شکل کروی با میانگین قطر هیدرودینامیکی ۲۴۰ نانومتر هستند. AlkCs دارای ساختاری با سطح ناهموار در مقایسه با کیتوزان بود. بهترین نتایج با توجه به مهارکنندگی رشد (۷۸/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کشندگی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای CsNPs مشاهده شد ($P < 0.05$). AlkCs و CsNPs بیشترین قطر هاله مهار رشد را در غلظت ۱۲۵۰ در مقایسه با سایر دیسک‌ها نشان دادند ($P < 0.05$). نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با CsNPs و AlkCs تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با تیمار با کیتوزان و کنترل (تیمار نشده) نشان دادند ($P < 0.05$). تست رنگ آمیزی DAPI بیانگر مرگ سلولی بالاتر استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با CsNPs و AlkCs بود. تصاویر بدست آمده از AFM نشانگر تغییر در یکپارچگی غشا و آرایش باکتری‌های تیمار شده در مقایسه با سطح کروی و آرایش خوشه‌ای باکتری‌های تیمار نشده بود.

کلید واژه‌ها: کیتوزان اصلاح شده، ضد باکتریایی، استافیلوکوکوس اورئوس، مرگ سلولی، نفوذپذیری غشا

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 بعنوان یک باکتری کروی بی‌هوازی اختیاری (گرم مثبت) یک پاتوژن فرصت طلب بوده که در بروز مسمومیت‌های غذایی نقش داشته و به‌عنوان یک پاتوژن مهم بیمارستانی بعد از اشریشیاکلی لحاظ میشود (۱). این پاتوژن به حرارت مقاوم بوده و می‌تواند در محیط‌های حاوی نمک با درصد بالا رشد و تکثیر نماید (۲). عفونت‌های سیستمیک تهدید کننده مانند پنومونی، استئومیلیت، اندوکاردیت و سپتی سمی از مهمترین بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری می‌باشد (۳). اگرچه برای مقابله با این عفونت‌ها، آنتی بیوتیک‌های مختلفی نظیر بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها معرفی شده (۴)، ولی ظهور سویه‌های جدید باکتری‌های مقاوم به چنددارو^۲ و در نتیجه شیوع بیماری‌های ناشی از آن‌ها یکی از مخاطرات جدی تهدیدکننده بهداشت و سلامت مردم در سطح جهانی تلقی میشود (۵). بیش از ۶۰ درصد از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در حال حاضر به متی سیلین^۳ (اگراسیلین)

* نویسنده مسئول: seafood1144@yahoo.com

مقاوم هستند و برخی از سویه‌ها به بیش از ۲۰ عامل ضد میکروبی مختلف مقاومت نشان داده‌اند (۶). بنابراین شناسایی راهکارهای درمانی مناسب جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها، امری ضروری به‌نظر می‌رسد. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان سال‌های زیادی است که در مقابل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها تأیید شده است. با این حال نحوه عملکرد آن مبهم است. کیتوزان یک پلی ساکارید پرمصرف است که از دی استیلاسیون قلیایی نیتروژن کیتین، پلیمری که به وفور در طبیعت یافت می‌شود، به‌دست می‌آید. کیتین را می‌توان از سخت پوستان مانند خرچنگ، میگو و لابستر به‌دست آورد (۷). کیتوزان که عموماً به‌عنوان یک ضد میکروب طبیعی شناخته می‌شود، به‌دلیل غیرسمی بودن، تجزیه پذیری زیستی و خواص ضد میکروبی آن در کنترل آلودگی، تصفیه آب، تولید کاغذ و عکاسی در صنایع مختلفی مانند پزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی استفاده می‌شود (۸). بررسی منابع علمی نشان می‌دهد شیوه عمل مشخصی از کیتوزان گزارش نشده است. در میکروارگانیسم‌ها، هر عامل تنشی که باعث تخریب یکپارچگی پوشش سلولی شود، پاسخ‌های تنش پوششی باعث فعال شدن سیستم‌های علامت دهنده تنظیمی و بازسازی مسیر آسیب دیده سلول در جهت حفظ پایداری سلول می‌شوند (۹). در باکتری‌ها، عوامل آنتی میکروبی نظیر آنتی بیوتیک‌ها از مسیرهای مختلف سلولی و اختصاصی عمل می‌کنند و باعث تخریب بخشی از سلول و فعال شدن ژن‌های هدف روی مناطق خاصی از DNA می‌شوند (۱۰). در مورد کیتوزان، این پلیمر در باکتری‌های گرم مثبت، با پیوندهای غیر کووالانسی به اسیدهای تیکوئیک لایه پتیدوگلیکان متصل می‌شود. این اسیدهای تیکوئیک روی سطح سلول برای تقسیم سلولی و دیگر ویژگی‌های فیزیولوژی باکتری‌های گرم مثبت با اهمیت هستند (۱۱). این تعامل به‌طور عمده الکترواستاتیک است (۱۲). از طرفی هنگامی که یک گروه جدید به زنجیره کیتوزان پیوند زده می‌شود، فعالیت ضد میکروبی آن‌ها ممکن است اثرات هم افزایی داشته باشد و سمیت گروه پیوند شده در همان زمان کاهش می‌یابد. بنابراین تهیه مشتق‌های ضد میکروبی از کیتوزان و استفاده از آن‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه گسترده قرار گرفته است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی مقایسه فعالیت ضد میکروبی کیتوزان و فرم‌های مشتق آن نظیر در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ یک ایزوله بالینی با نام Seattle ۱۹۴۵ است که به‌عنوان یک سویه تست استاندارد کنترل آزمایشگاهی استفاده می‌شود (۱۳، ۱۴) و به انواع آنتی بیوتیک‌ها از جمله متی سیلین حساس است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه و شرایط کشت

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 (PTCC1431) سویه کنترل کیفی خشک شده به روش انجمادی^۴ (خشک کن تصعیدی) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال‌سازی، ابتدا باکتری خشک شده به روش انجمادی در محیط LB برات در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت برای دوبار متوالی کشت داده شد. سپس کشت ۱۲-۱۶ ساعته از آن روی محیط آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه و یک کلونی خالص از آن برای ادامه مطالعات استفاده شد. جهت نگهداری سویه، از کلونی سویه کشت مایع تهیه، و در ادامه سوسپانسیون باکتری با گلیسرول ترکیب و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

^۴ Freeze-Drying (lyophilized)

۲-۲- استخراج کیتوزان از ضایعات پوسته میگو

CS با درجه استیلاسیون ۸۰ درصد از ضایعات پوسته میگو استخراج شد (۱۵). کیتوزان از ضایعات پوسته میگو طی سه مرحله متوالی شامل: حذف پروتئین با NaOH سه درصد در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، حذف مواد معدنی با هیدروکلراید ۲ درصد در دمای اتاق و در نهایت حذف گروه‌های استیل با NaOH ۶۰ درصد در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد، استخراج شد. وزن مولکولی (MW) و درجه استیلاسیون (DD) کیتوزان به دست آمده با این روش به ترتیب ۱۰-۲۰ کیلو دالتون و بالای ۸۰ درصد استیلاسیون بود. وزن مولکولی با روش ویسکومتری اندازه گیری شد، در حالی که درجه استیلاسیون با استفاده از داده‌های آنالیز عنصری ارزیابی شد (۱۵).

۲-۳- آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان

CsNPs به روش ژلاسیون یونی با استفاده از تری پلی فسفات سدیم (STPP) به عنوان یک معرف پیوند متقابل آماده‌سازی شدند (۱۶). بطور خلاصه، محلول STPP با غلظت (۰/۰۲ mg/ml) به آرامی بصورت قطره قطره به محلول CS با غلظت (۱۰ mg/ml) با نسبت حجمی ۱ به ۳ در حال استیر با ۵۰۰ rpm بمدت ۴۵ دقیقه با امواج فراصوت کوتاه مدت در فاصله‌های زمانی هر ۱۵ دقیقه آماده شد.

۲-۴- آماده‌سازی مشتق N- آلکیل کیتوزان

پس از تهیه استوک کیتوزان مطابق روش بالا، pH محلول با استفاده از محلول ۰/۲ مولار هیدروکسید سدیم در حدود ۵ تنظیم شد. محلول اکتالددئید ۱۰٪ در اتانول (حجمی / حجمی) به صورت قطره‌ای به محلول کیتوزان اضافه شد تا بازهای شیف تشکیل شود. پس از چهار ساعت از زمان واکنش، بوروهیدرید سدیم ۱۰٪ در آب مقطر (وزنی / حجمی) به آرامی به عنوان یک عامل احیا کننده اضافه شد. ۲۴ ساعت بعد از واکنش، pH محلول با هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار به ۸/۵ رسانده شد تا پلیمر رسوب کند. رسوب با سانتریفیوژ جداسازی، و سپس با محلول اتانول / آب (نسبت حجمی ۵۰/۵۰ و ۳۰/۷۰)، دو مرحله شسته شد. در نهایت خشک کردن رسوب تحت گردش هوا زیر هود انجام شد. برای به دست آوردن مشتق محلول در آب، N- آلکیل کیتوزان در محلول اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار حل شد. سپس متانول (۱:۲) و اسید کلریدریک ۳۷٪ اضافه و در پایان محلول نهایی سانتریفیوژ و در جریان هوای زیر هود خشک شد (۱۷).

۲-۵- ارزیابی ویژگی ظاهری کیتوزان و فرم‌های مشتق آن

ساختار Cs، AlkCs، و CsNPs توسط دستگاه طیف سنجی پراش اشعه ایکس (Malvern مدل Nanozeta Sizer) ساخت جمهوری چک) با زاویه پراکندگی ۹۰ درجه و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تعیین شد. خواص فیزیکی CsNPs از جمله اندازه، پتانسیل سطح ذره توسط روش توزیع پراکندگی (DLS) بررسی شد. مورفولوژی Cs، AlkCs، و CsNPs پس از پوشش دهی با طلا با میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل MIRA TESCAN - ساخت جمهوری چک) در ولتاژ ۲۰ کیلو ولت مشاهده شدند.

۲-۶- تجزیه و تحلیل منحنی رشد

⁵ SEM (scanning electron microscope)

یک کلنی خالص به ۱۰ میلیلیتر LB مایع استریل تلقیح و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شد. کشت یک شبه با نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط استریل تازه LB مایع رقیق سازی شد. سپس اجازه داده شد سوسپانسیون تا رسیدن به فاز میانی رشد لگاریتمی (تراکم نوری ۰/۵) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شود. سپس سوسپانسیون باکتریایی با حجم ۵۰ میلی‌لیتر در چهار فلاسک مخروطی ۲۵۰ میلی‌لیتری تقسیم شدند. به جز کنترل، سایر سوسپانسیون‌ها در معرض ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر CS، AlkCs، و CSNPs قرار گرفتند. هر یک ساعت، تراکم نوری باکتری در هر فلاسک در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد تا منحنی رشد ترسیم شود. برای تفسیر نتایج از سطح زیر منحنی (AUC) بهترین پارامتر (روش دوزنقه‌ای) (۱۸)، برای سنجش سرعت رشد میکروارگانیسم مطابق فرمول زیر استفاده شد:

$$AUC_G = \sum_{i=1}^{n-1} = \frac{(m_{(i+1)} + m_i) \times t_i}{2} \quad \text{فرمول 1}$$

i: دفعات قرائت تراکم نوری n: تعداد کل دفعات قرائت m: مقدار تراکم نوری قرائت شده t: فاصله زمانی بین هر قرائت

۲-۶-۱- سنجش فعالیت ضد باکتریایی

مقایسه اولیه فعالیت ضد میکروبی CS، AlkCs، و CSNPs با آزمون حساسیت به دیسک آنتی باکتریال بر روی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از پروتکل استاندارد انجام شد (۱۹). کشت چمنی سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند روی پلیت محتوی LB آگار انجام شد. دیسک‌های کاغذی بلانک شرکت پادتن طب با قطر ۶ میلی‌متر اشباع شده با ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف CS، AlkCs، و CSNPs (۷۵۰، ۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حلال اسید استیک یک درصد در دو مرحله با فاصله زمانی به منظور خشک شدن دیسک و هر مرحله با ۱۵ میکرولیتر انجام شد. پس از خشک شدن دیسک‌ها، با پنس استریل دیسک‌ها با دقت روی آگار قرار داده شدند. اسید استیک ۱٪ به عنوان کنترل منفی و دیسک آنتی بیوتیک ونکومايسين^۶ با غلظت ۳۰ میکروگرم به عنوان کنترل مثبت برای مقایسه اثر بازدارندگی آن با کیتوزان و فرم‌های مشتق شده آن استفاده شد. پس از انکوباسیون یک شبه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، سطوح مختلف منطقه مهارت توسط کیتوزان و فرم‌های مشتق آن اندازه‌گیری شد. آزمایش با دو تکرار برای هر تیمار و غلظت انجام و میانگین قطر هاله به عنوان قطر نهایی ثبت شد.

۲-۶-۲- تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی به روش میکرورقیق سازی

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، CS، AlkCs، و CSNPs، بر روی سرعت رشد استافیلوکوکوس اورئوس، با سنجش رشد قابل مشاهده میکروارگانیسم‌ها با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و روش میکرو رقت توصیه شده توسط Weinstein and Lewis (۲۰)، با کمی تغییرات مورد ارزیابی قرار گرفت. محلول استوک کیتوزان (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و فرم‌های اصلاح شده آن با LB برات استریل در حجم مساوی مخلوط شدند تا غلظت‌های نهایی (۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) - (۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) - (۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) - (۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) - (۳۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) - (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) - (۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

^۶ Vancomycin

– (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) – (۷۸/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و (۳۹/۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر) بدست آید و برای تعیین MIC استفاده شود. غلظت‌های (۵۰۰، ۲۵۰، و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بر اساس انجام تست تعیین فعالیت ضد باکتریایی به کمک انتشار دیسک، مابین رقت‌های سریالی قرار داده شد. در پایان پنج میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با غلظت استاندارد نیم مک فارلند، به هر چاهک به جز چاهک کنترل مثبت (حاوی محیط کشت) تلقیح شد. چاهک حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. تمام نمونه‌ها در سه تکرار تهیه شدند. سپس میکروپلیت بمدت یک شب در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکر انکوبه شد. پس از انکوباسیون، میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها توسط خوانشگر الایزا Awareness (مدل Stat Fax 3200) در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. MIC به عنوان کمترین غلظت کیتوزان و مشتق‌های آن تعیین می‌شود که در آن هیچ رشد قابل مشاهده‌ای در چاهک‌ها دیده نمی‌شود. هنگامی که ۹۹/۹ درصد از جمعیت باکتریایی در کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی کشته شوند، به آن MBC می‌گویند. به منظور تعیین MBC، از چاهک‌هایی که در آن‌ها رشدی از باکتری مشاهده نشد در سطح آگار کشت داده شد و اولین غلظتی که هیچ رشدی روی پلیت آن مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

۲-۶-۳- سنجش نفوذپذیری غشای داخلی

فعالیت نفوذپذیری CS، AlkCS، و CSNPs توسط روش توصیف شده انتشار بتاگالاکتوسیداز سیتوپلاسمی، با کمی تغییرات تعیین شد (۲۱). از کشت یک شبه باکتری، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سلول‌ها تا فاز میانی با تراکم نوری ۰/۵ رشد در محیط LB براث حاوی ۱٪ لاکتوز به عنوان القا کننده بتا- گالاکتوسیداز رشد داده شدند. سپس رسوب سلول‌ها در بافر فسفات با pH ۷/۲ حاوی ۱۰۰ میلی مولار NaCl تا رسیدن به تراکم نوری ۰/۵ مجدداً معلق شدند. نمونه کنترل از ترکیب ۱/۵ میلی مولار ONPG از استوک ۳۰ میلی مولار و سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس تهیه شد. نمونه‌های تیمار شده از ترکیب ۱/۵ میلی مولار ONPG و سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) کیتوزان و فرم‌های مشتق آن، به طور جداگانه تهیه شدند. در ابتدا طیف سنج با یک بافر خالی در ۴۲۰ نانومتر صفر شد. سپس با افزایش جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر، تولید O- نیتروفنول در طول زمان (۱۵ دقیقه) ثبت شد.

۲-۶-۵- رنگ آمیزی هسته‌ای با DAPI

روش رنگ آمیزی DAPI، برای مشاهده تغییر هسته باکتری انجام شد. این رنگ فلورسانت می‌تواند اتصالی قوی با بازهای A-T دو رشته DNA برقرار و رنگ آبی منعکس کند. رنگ DAPI مطابق دستور با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. به منظور بررسی تغییرات هسته سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی در فاز میانی رشد با CS، AlkCS، و CSNPs مواجه و به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از رسوب و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده با یک میکرولیتر از رنگ DAPI در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، جداگانه رنگ آمیزی شدند. از ۱۰ میکرولیتر سلول‌های رنگ آمیزی شده روی لام اسمیر تهیه شد و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت سه گانه معکوس مدل (31AE) در بزرگ‌نمایی‌های ۱۰X و ۴۰X بررسی شدند (۲۲).

۲-۶-۶- تجزیه و تحلیل AFM توپوگرافی سطح سلول باکتریایی

اثر سه فرم کیتوزان روی سطح سلولی باکتری و تغییرات در یکپارچگی پوشش سلولی، توسط میکروسکوپ نیروی اتمی مدل (JPK Wizard Nano-II) ساخت کمپانی آلمان (JPK) مورد بررسی قرار گرفت. یک قطره از هر سوسپانسیون باکتریایی بدون تیمار (شاهد) و تیمار شده با CS، AlkCs، و CSNPs با رقت مناسب، روی سطح شیشه‌ای تمیز (لام استریل) ریخته، زیر هود خشک و برای بررسی توسط AFM آماده شدند.

۳- آزمون‌های آماری

تمام آزمایش‌ها حداقل دو بار تکرار شدند و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه 8.0.2 تحت آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. تمامی نمودارها توسط GraphPad Prism ترسیم شدند. نمودار تعیین اندازه نانوذرات حاصل از SEM توسط نرم افزار OriginPro version 9.95.0.0 رسم شد.

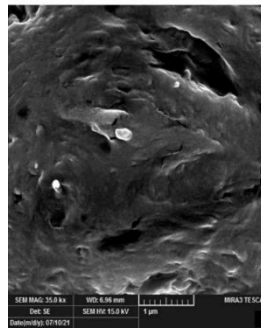
۴- نتایج

۴-۱- ارزیابی ویژگی ظاهری کیتوزان و فرم‌های مشتق آن

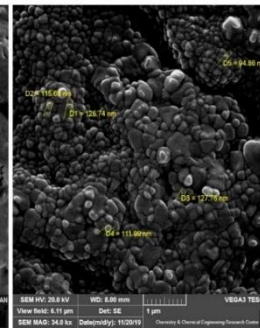
طیف‌های پراش پرتو ایکس حاصل از CS، AlkCs، و CSNPs در (شکل ۱) نشان داده شده است. تصویر به دست آمده از CS توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، سطحی صاف را نشان داد (شکل ۲ الف) در حالی که شکل ظاهری CSNPs کیتوزان یکنواخت و تقریباً کروی شکل با تجمع کمی از نانوذرات مشاهده شد (شکل ۲ ب). علاوه بر این، تصویر میکروسکوپی الکترونی از AlkCs تفاوت‌های آشکاری را به لحاظ ناهمواری سطحی با کیتوزان طبیعی نشان داد (شکل ۲ ج). اندازه نانوذرات حاصل از میکروسکوپ الکترونی با میانگین ۱۲۶ نانومتر و قطر هیدرودینامیکی نانوذرات با میانگین ۲۴۰ نانومتر، پتانسیل زتا ۳۰ میلی ولت و شاخص پراکندگی ۰/۱۵۴ گزارش شد (شکل ۲ د و ه).

شکل ۲. میکروگراف‌های SEM از (الف) CS، (ب) CSNPs، و (ج) AlkCs با بزرگ‌نمایی $20 \times k$ در مقیاس یک میکرومتر، (د) تعیین اندازه ذرات و قطر هیدرودینامیکی به ترتیب توسط SEM و DLS، (ه) پتانسیل زتا نانوذرات کیتوزان.

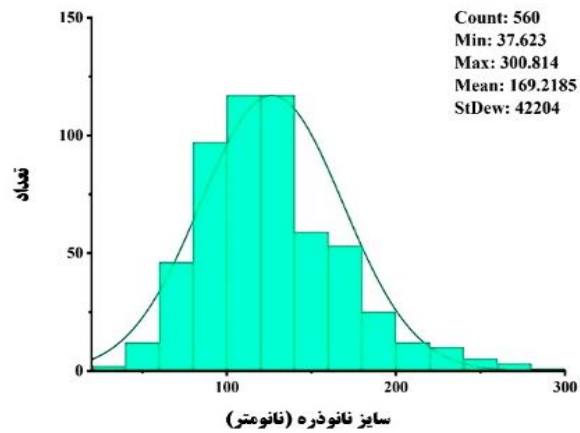
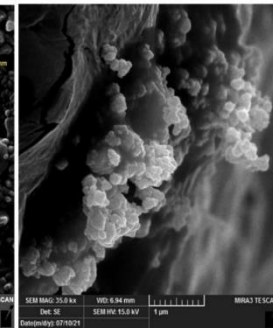
الف



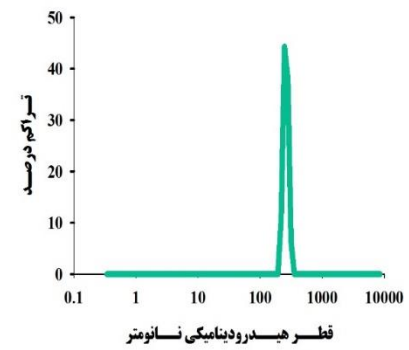
ب



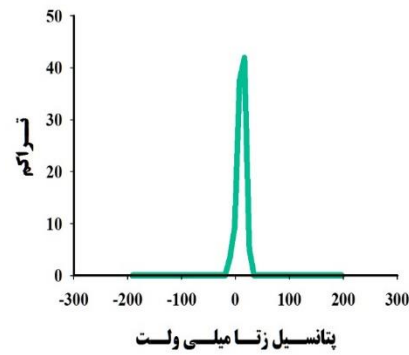
ج

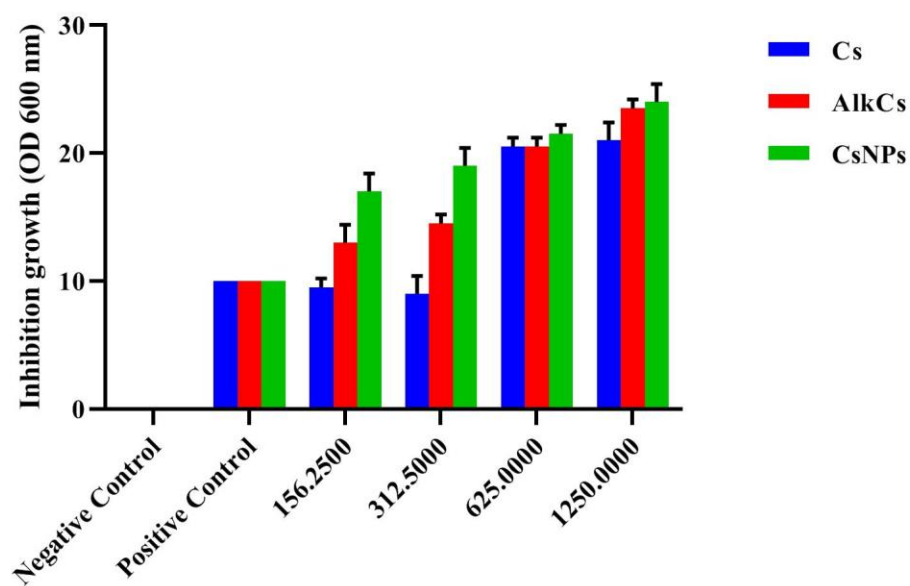


د



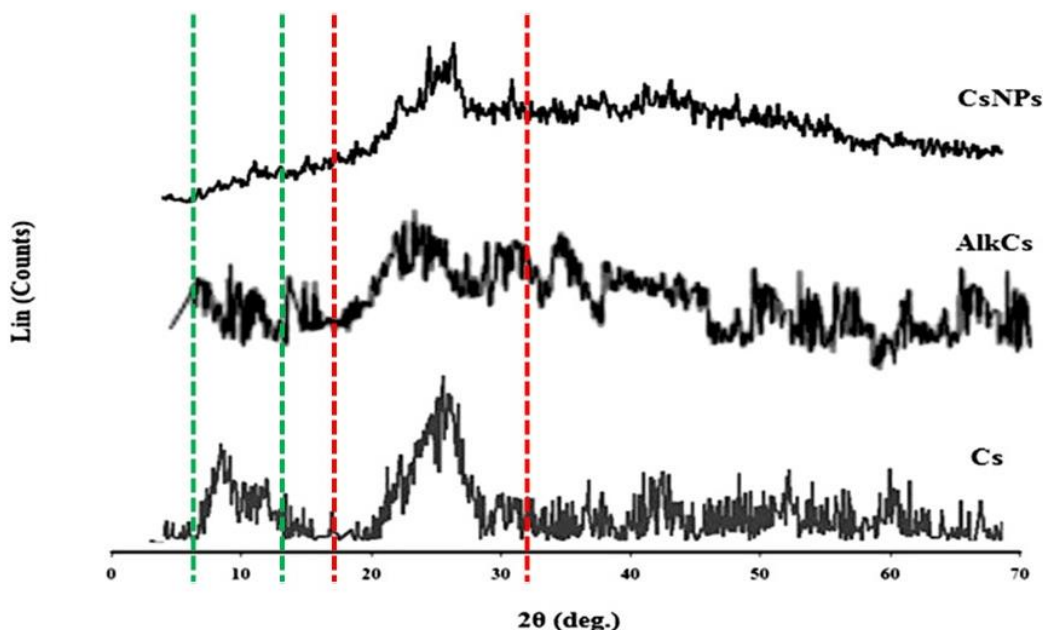
ه





۵

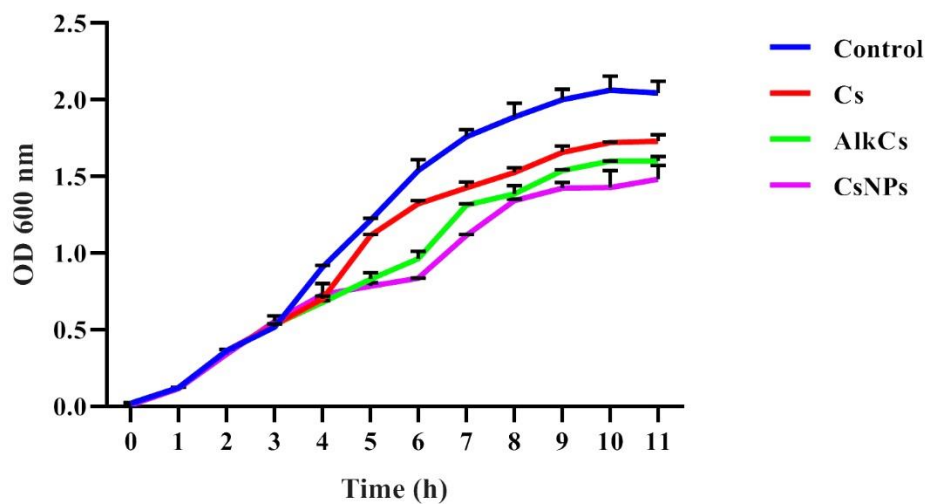
شکل ۱. الگوی XRD از Cs، AlkCs، CsNPs.



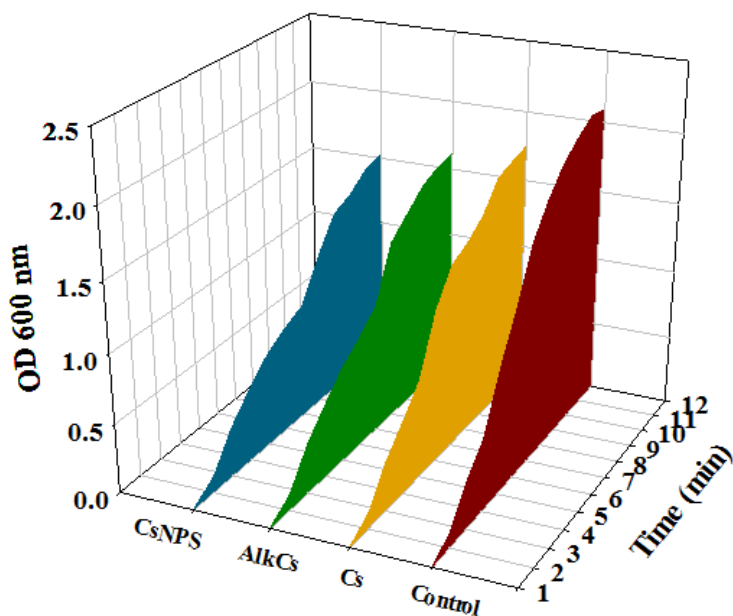
۴-۲- تجزیه و تحلیل منحنی رشد

منحنی رشد استافیلوکوکوس اورئوس در پاسخ به غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر CS، AlkCs، و CsNPs تجزیه و تحلیل شد. اثر مهارکنندگی رشد کیتوزان طبیعی و فرم‌های مشتق آن پس از تیمار شدن با استافیلوکوکوس اورئوس در مرحله رشد میانی نشان داده شد (شکل ۳ الف). کاهش تراکم نوری در باکتری‌های تیمار شده با CS، AlkCs، و CsNPs در مقایسه با کنترل قابل توجه بود ($P < 0.05$) و باکتری‌های تیمار شده، سطح زیر منحنی رشد کمتری در مقایسه با کنترل نشان دادند (شکل ۳ ب). مقادیر سطح زیر منحنی به ترتیب برای کنترل، CS، AlkCs، و CsNPs معادل ۹/۳۹، ۷/۷۰، ۶/۹۲، و ۶/۴۲ بدست آمد ($P < 0.05$). هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان مهار رشد باکتری‌ها پس از یک ساعت مواجه شدن با CS، AlkCs، و CsNPs مشاهده نشد ($P > 0.05$) ولی پس از ۵ ساعت از زمان تیمار شدن درصد مهارکنندگی رشد در میان باکتری‌های تیمار شده با CS، AlkCs، و CsNPs قابل توجه بود ($P < 0.05$).

شکل ۳. منحنی رشد (الف) و سطح زیر منحنی رشد (ب) سلول استافیلوکوکوس اورئوس پس از مواجه شدن با CS، AlkCs، و CsNPs با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در فاز میانی رشد.



الف

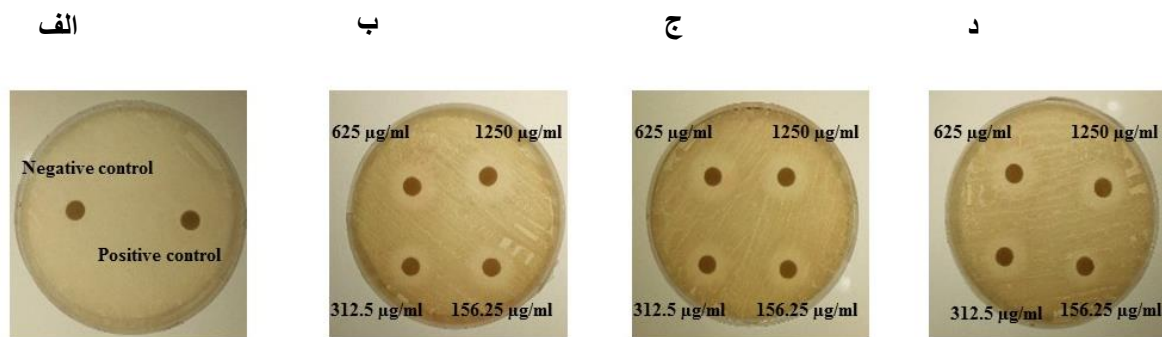


ب

۴-۳- سنجش منطقه مهار رشد (انتشار دیسک)

قطر ناحیه مهاری باکتری‌ها تحت تأثیر با غلظت‌های مختلف کیتوزان و کنترل مثبت (آنتی بیوتیک ونکومايسين) و منفی (دیسک بلانک) در (شکل ۴) نشان داده شد. فرم‌های مشتق شده کیتوزان فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی از خود نشان دادند. بالاترین قطر هاله مهار رشد با میانگین ۲۴ و ۲۳/۵ میلی‌متر در غلظت ۱۲۵۰ میکروگرم به ترتیب برای CsNPs و AlkCs مشاهده شد. و این میزان بالاتر از قطر هاله مهار رشد Cs و کنترل مثبت به ترتیب با میانگین قطر ۲۱ و ۱۰ میلی‌متر

بود ($P < 0.05$). علاوه بر این، میانگین قطر هاله مهار رشد در غلظت ۱۵۶/۲۵ میکرو گرم بر میلی لیتر Cs به میزان قابل توجهی پایین تر از CsNPs و AlkCs به ترتیب مشاهده شد ($P < 0.05$).
 شکل ۴. تعیین قطر هاله مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس (الف) کنترل، (ب) مواجه شده با Cs، (ج) AlkCs، و (د) CsNPs به-روش انتشار دیسک در محیط آگار.

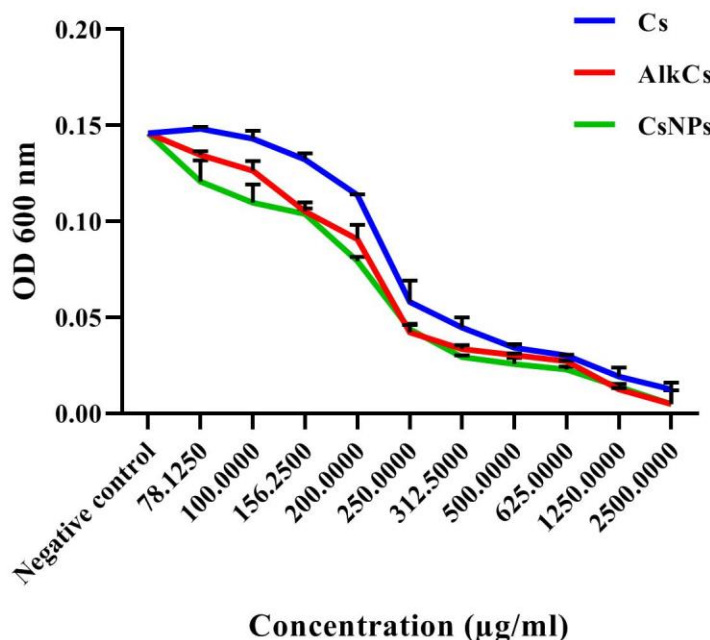


۴-۴- تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی به روش میکرورقیق سازی

فعالیت ضد باکتریایی Cs، AlkCs، و CsNPs با استفاده از روش میکرو رقت بررسی و در جدول ۱ نشان داده شده است. Cs MIC برای استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای AlkCs و CsNPs به ترتیب ۱۰۰ و ۷۸/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. علاوه بر این، نقطه MBC برای CsNPs و AlkCs به ترتیب، معادل ۱۰۰ و ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود که نشان دهنده فعالیت ضد باکتریایی بالاتر فرم‌های مشتق شده در مقابل Cs است ($P < 0.05$). اثرهای بازدارندگی غلظت‌های مختلف کیتوزان و فرم‌های مشتق آن بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در (شکل ۵) نشان داده شده است که نشان می‌دهد در غلظت‌های ۱۵۶/۲۵-۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر Cs، و ۱۰۰-۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر AlkCs و CsNPs بیش از ۹۰ درصد رشد باکتری در مقایسه با کنترل کاهش یافته است. با کاهش غلظت کیتوزان و فرم‌های مشتق شده آن، تراکم نوری افزایش نشان داد که نشان دهنده افزایش رشد باکتری است ($P < 0.05$).
 جدول ۱. تعیین کمترین غلظت مهار کنندگی و کشندگی رشد سلول استافیلوکوکوس اورئوس مواجه شده با Cs، AlkCs، و CsNPs

ترکیب	کمترین غلظت	مهار	کمترین غلظت
کیتوزان	۱۵۶/۲۵	۲۵۰	غلظت
N-آکیل	۱۰۰	۱۵۶/۲۵	
نانوذرات	۷۸/۱۲۵	۱۰۰	

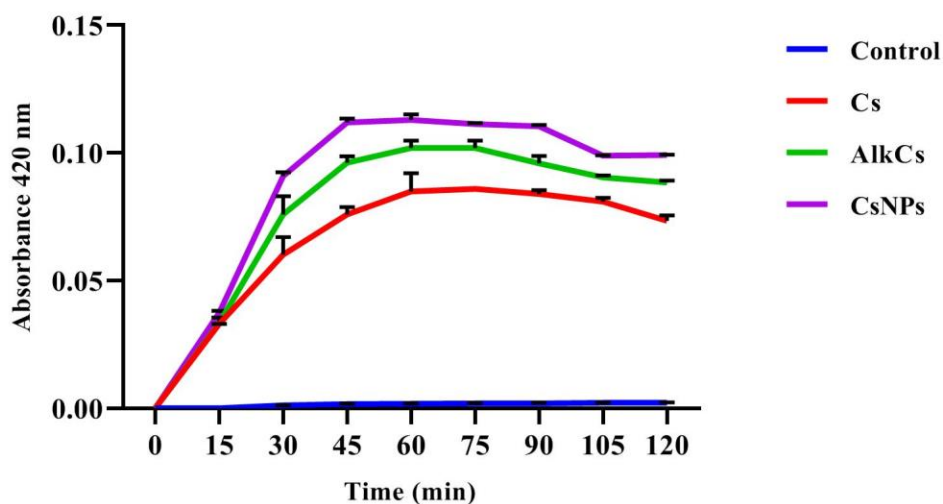
شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف Cs، AlkCs، و CsNPs بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس



۴-۵- انتشار بتا-گالاکتوزیداز سیتوپلاسمی

بطور کلی، بتا-گالاکتوسیداز سیتوپلاسمی نمی‌تواند از غشای سلولی باکتری عبور کند. با این حال، اگر غشای سلولی آسیب دیده باشد، بتا-گالاکتوسیداز سیتوپلاسمی را می‌توان به دلیل نشت آن از طریق غشای سلولی آسیب دیده، بصورت خارج سلولی تشخیص داد (۲۳). پس از افزودن **Cs**، **AlkCs** و **CsNPs** به سوسپانسیون، نشت بتا-گالاکتوسیداز در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه‌ای اندازه‌گیری شد و نتایج در (شکل ۶) نشان داده شده است. مقدار بتا-گالاکتوسیداز پس از حدود ۱۵ دقیقه انکوباسیون شروع به افزایش کرد و تا یک ساعت به طول انجامید. هیچ فعالیت بتا-گالاکتوسیدازی در محیط کشت سلول‌های باکتریایی کنترل بدون تیمار، مشاهده نشد.

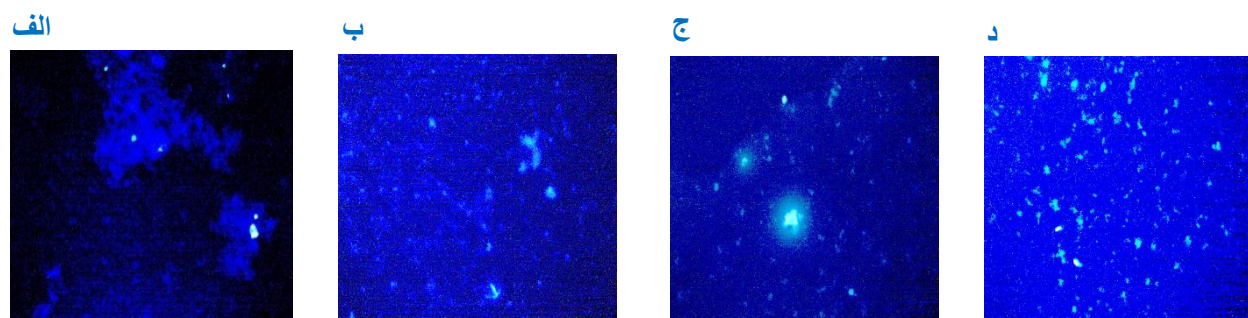
شکل ۶. تعیین نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی سلول استافیلوکوکوس اورئوس به‌روش رهایش بتالاکتوگالاکتوسیداز در جذب ۴۲۰ نانومتر



۴-۶- رنگ آمیزی هسته ای با DAPI

از رنگ DNA، برای رنگ آمیزی سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس برای مشاهده تغییرات مورفولوژیکی هسته‌ای استفاده شد. همانطور که در (شکل ۷) نشان داده شده است تغییر شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل نرمال و کروی شکل که با فلورسانس آبی روشن کمتر رنگ آمیزی شده‌اند، نشان داده شده است. در مقابل، پس از تیمار با Cs، AlkCs، و CsNPs در غلظت‌های MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ویژگی‌های مشخصه مرگ سلولی، از جمله تراکم رنگ، افزایش روشنایی و تکه تکه شدن هسته‌ای مشاهده شد. این نتایج نشان داد که کیتوزان و فرم‌های مشتق آن باعث تغییر در یکپارچگی غشای سلولی و آسیب سلولی می‌شوند.

شکل ۷. سنجش مرگ سلولی توسط رنگ آمیزی سلول‌های (الف) کنترل، (ب) AlkCs، (ج) CsNPs.

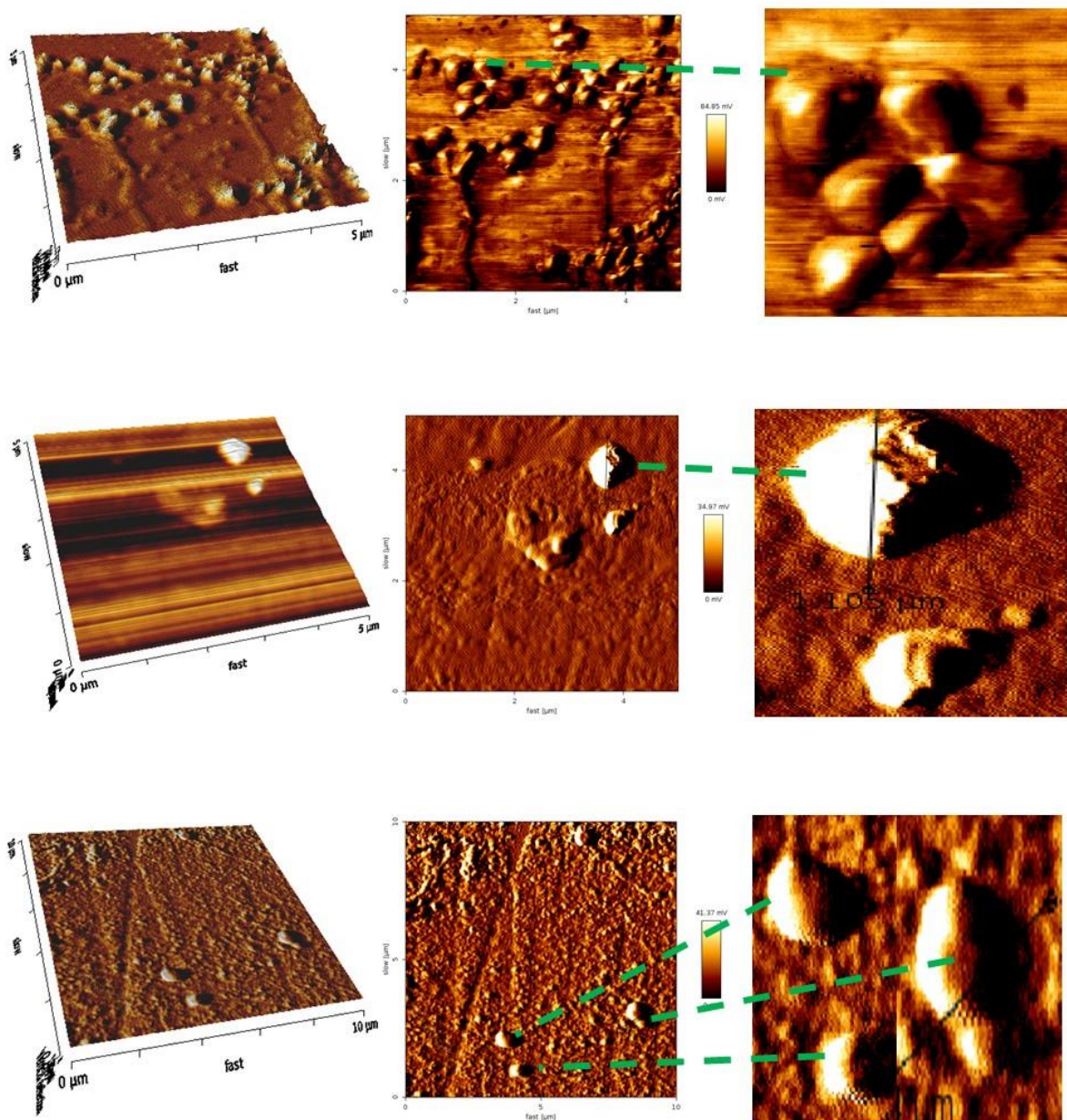


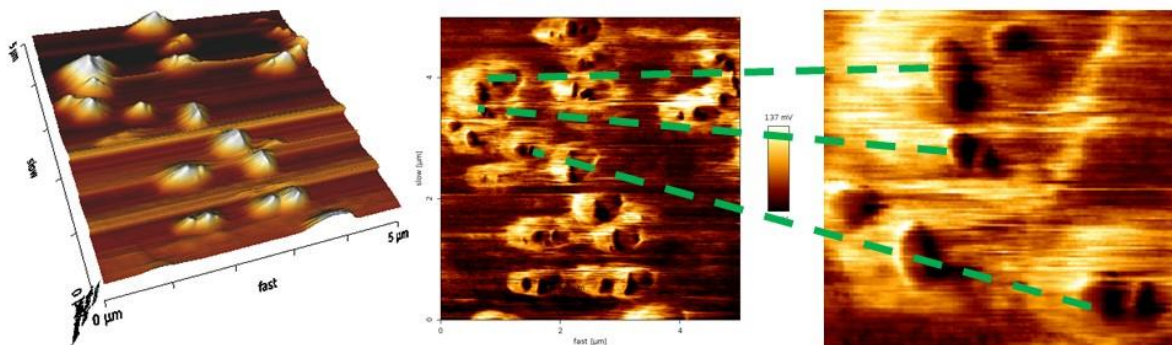
۴-۷- تجزیه و تحلیل AFM توپوگرافی سطح سلول باکتریایی

تصاویر استافیلوکوکوس اورئوس قبل و بعد از تیمار با کیتوزان و فرم‌های مشتق آن در (شکل ۸) نشان داده شده است. سلول‌های تیمار شده با Cs، AlkCs، و CsNPs توپوگرافی ناهمواری را در سطح سلول نشان دادند که نشان دهنده تخریب

سلولی است. تغییرات توپوگرافی سطح نیز توسط تصاویر توپوگرافی سه بعدی AFM تأیید شد. سلول‌های کنترل به شکل نرمال با اتصال خوشه‌ای مشاهده شدند. در حالی که سلول‌های تیمار شده به شکل بیرون زده از سطح، منفرد و بدون آرایش خوشه‌ای مشاهده شدند.

شکل ۸. تصویرهای میکروسکوپ نیروی اتمی سه بعدی و توپوگرافی سلول‌های به ترتیب (الف) کنترل، (ب) Cs، (ج) AlkCs، و (د) CsNPs.





۵- بحث

ظاهر شدن پیک‌های شارپ به‌ترتیب در زاویه‌های $9/088^\circ$ و $25/98^\circ$ نشان‌دهنده ساختار کریستالی کیتوزان است (۲۴). از CsNPs های آمورف نتایج تجزیه و تحلیل XRD نشان می‌دهد که STTP روی CsNPs ها در $20-40^\circ$ درجه بارگذاری شده است (۲۴). علاوه بر این، ماهیت نیمه کریستالی بالاتر مخلوط کیتوزان و C گروه آلکیل با یک قله گسترده و آمورف نشان داد که امتزاج پذیری مولکولی و برهمکنش بین کیتوزان و گروه عاملی آلدهید وجود دارد (۲۵). تجزیه و تحلیل منحنی رشد استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با Cs، AlkCs، و CsNPs در فاز میانی رشد نشان داد هر سه فرم کیتوزان به میزان قابل توجهی در کاهش جمعیت باکتری مثبت عمل می‌کنند. همان‌طور که در نتایج نشان داده شد، فاز رشد نمایی برای نمونه کنترل، طولانی‌تر از باکتری‌های تیمار شده با کیتوزان و فرم‌های مشتق آن بود. زمانی که سوسپانسیون با کیتوزان و فرم‌های مشتق آن مخلوط می‌شود، سرعت رشد تحت تأثیر قرار می‌گیرد و باعث کاهش حداکثر جذب می‌شود (۲۶). نتایج سنجش مهار رشد نشان داد Cs، AlkCs، و CsNPs اثر مهارکنندگی قابل توجهی در مقایسه با آنتی بیوتیک ونکومایسین نشان داده‌اند. مقایسه باکتری‌های تیمار شده، بیانگر حساسیت بالاتر استافیلوکوکوس اورئوس به فرم‌های مشتق شده کیتوزان است. همچنین نشان داده شده است بسیاری از مواد در سائز نانو ذره فعالیت آنتی باکتریایی بالاتری دارند و در برخی موارد حتی توانایی مقابله با مکانیسم‌های مقاومتی باکتری‌ها را دارند (۲۷). اثر آنتی باکتریایی بالاتر AlkCs را نیز می‌توان به حالیت بهتر آن در مقایسه با Cs یا اصلاح نشده آن نسبت داد. علاوه بر این، نانوذرات کیتوزان مشتقی از کیتوزان با خواص فیزیکوشیمیایی عالی هستند (۲۷، ۲۸). نانوذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالاتر و اثر اندازه ذرات، با فعالیت ضد میکروبی بالاتری همراه هستند. پرینلی و همکاران (۲۰۱۸) توضیح دادند که هر چقدر میزان اندازه ذرات کوچک‌تر باشد به دلیل سطح تماس بزرگتر بین سطح سلول باکتری و ذرات، فعالیت ضدباکتریایی بالاتری ایجاد می‌کند. اگرچه مطالعات زیادی فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان را در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس، گزارش نمودند. با این حال، چندین متغیر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان، نوع میکروارگانیزم و میزان مقاومت و حساسیت آن بر نتایج مقایسه داده‌ها با مقاله‌های قبلی تأثیر می‌گذارند (۲۹). از جمله تأثیر سائز و میزان بار سطحی نانوذرات که باعث نتایج مختلف ضدباکتریایی آن‌ها شده است (۳۰). در برخی مطالعات پیشین Liu و همکاران (۳۱)، نقش ترکیب محیط کشت، دما و حتی مرحله رشد باکتری را نیز از دیگر فاکتورهای مؤثر بر فعالیت آنتی باکتریایی کیتوزان بیان نمودند. نتایج MIC و MBC نشان داد CsNPs و AlkCs در غلظت‌های

پایین تر در مقایسه با کنترل، ۹۰ درصد از رشد استافیلوکوکوس اورئوس را مهار نمودند. این نتیجه می تواند با اصلاح گروه های عملکردی در جهت بهبود خواص شیمیایی و فیزیکی به ترتیب با ایجاد گروه های آلکیل و تشکیل نانوذرات مرتبط باشد (۲۸) و به دنبال حلالیت بهتر و دسترسی بالاتر گروه های آمینه کیتوزان، ارتباط بیشتری با بار منفی سطح سلول برقرار می شود (۳۲). در توافق با نتایج مطالعه حاضر، میزان MIC نانوذرات با قطر ۱۱۵ نانومتر بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد (۳۳). در مقابل Costa و همکاران (۳۴)، نقطه مهار کنندگی رشد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس تیمار شده با نانوذرات به قطر ۲۱۴ نانومتر، ۱۲۵۰ میکروگرم گزارش شد. بسیاری از متون مقادیر MIC کیتوزان را با دامنه های مختلف گزارش کردند (۳۵، ۳۶). مقایسه مستقیم اثر مهار کنندگی و کشندگی کیتوزان و فرم های مشتق شده آن با نتایج به دست آمده توسط محققان دیگر به دلیل تنوع خصوصیات فیزیکوشیمیایی کیتوزان و سویه های آزمایشی دشوار است. نتایج سنجش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی نشان می دهد که نفوذپذیری غشای داخلی استافیلوکوکوس اورئوس توسط کیتوزان طبیعی و فرم های مشتق آن، افزایش می یابد و این افزایش در فرم های CsNPs و AlkCs بالاتر از کیتوزان طبیعی مشاهده شد. در واقع، عوامل ضد باکتری از جمله کیتوزان می توانند از طریق مکانیسم های مختلف از رشد باکتری ها جلوگیری کنند. تخریب غشای سلولی نیز یکی دیگر از نحوه ی عمل عوامل ضد میکروبی است (۳۷). در مطالعه Miao, Zhou (۲۳)، با افزودن یک پپتید ضد میکروبی جدید تولید شده توسط لاکتوباسیلوس، فعالیت بتا-گالاکتوسیداز در محیط کشت با تأخیر زمانی ۴۰ دقیقه ای شروع شد و فعالیت آن به دنبال نفوذپذیری غشای سلولی استافیلوکوکوس اورئوس و نشت محتوای سیتوپلاسمی تا دوره زمانی ۱۳۰ دقیقه افزایش یافت. Papineau, Hoover (38) گزارش دادند که اثر ضد باکتریایی کیتوزان ممکن است در اثر نشت اجزای درون سلولی ایجاد شود. Young و همکاران (۳۹) نیز در مطالعه خود نشان دادند که کیتوزان به دلیل ماهیت چند کاتیونی، نفوذپذیری غشای سلول ها را افزایش می دهد و این افزایش نفوذپذیری احتمالاً ناشی از پیوند متقابل اجزای سطحی است. Helander, Nurmiäho-Lassila (۴۰)، نیز اتصال به غشای خارجی سلول و بروز تغییرات گسترده سطح سلولی را تأیید نمودند. در این مطالعه به منظور بررسی تغییرات ظاهری باکتری پس از تیمار شدن با Cs، AlkCs و CsNPs از رنگ آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج نشان داد کیتوزان و فرم های مشتق آن توانایی تغییر نفوذپذیری غشا و تخریب هسته باکتری را دارند به نحوی که از تغییر در آرایش منظم و خوشه ای باکتری های تیمار شده با Cs، AlkCs و CsNPs و روشنی رنگ باکتری به دنبال اتصال رنگ DAPI به DNA به خوبی مشخص شد. میزان آسیب دیدگی سلول های تیمار شده با CsNPs و AlkCs در مقایسه با سلول های تیمار شده با کیتوزان طبیعی بالاتر بود. اگرچه مکانیسم دقیق فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان و فرم های مشتق آن هنوز مشخص نشده است، به عنوان یک فرضیه، سایز کوچک نانوذرات به طور احتمالی اتصال بهتری با غشای سطح سلول برقرار می کند و به دنبال تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی باعث ایجاد اختلال و نشت مواد درون سلولی به خارج و ممانعت از ورود مواد مغذی به سلول می شوند (۴۱). مشاهده مطالعه مکانیسم های پپتید ضد میکروبی از طریق یک سری آزمایش ها بر روی غشای مدل یا سلول های دست نخورده از طریق AFM ثابت شده است (۴۲، ۴۳). باکتری های تیمار شده با Cs و AlkCs با تغییر شکل

از حالت کروی خوشه‌ای، به شکل منفرد با سطح غشایی آسیب دیده و بافت بسیار زبر روی سطح سلول مشاهده شدند. در رابطه با اثر نانوذرات کیتوزان، در ساختار باکتری به نظر می‌رسد چند دهانه عمیق وجود دارد که این امر می‌تواند ناشی از اختلال غشا پس از انکوباسیون با نانوذرات کیتوزان است. در توافق با نتایج مطالعه حاضر، تغییر چشمگیری در ساختار سلولی استافیلوکوکوس اورئوس به همراه دهانه‌های عمیق در ساختار بیوفيلم آن پس از تیمار با نانوکامپوزیت‌های نقره کیتوزان مشاهده شد (۴۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که کیتوزان استخراج شده از پوسته میگو و فرم‌های مشتق شده آن به روش اصلاح شیمیایی (AlkCs) و فیزیکی (CsNPs) می‌توانند باعث مهار قابل توجهی از رشد استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین شوند. علاوه بر این، AlkCs و CsNPs در غلظت‌های مختلف تأثیر بالاتری روی مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با فرم طبیعی کیتوزان نشان دادند و موجب بهبود خصوصیات عملکردی و ضد باکتریایی CsNPs و AlkCs شد. نتایج حاصل از نفوذپذیری غشا، رنگ آمیزی DAPI، و ارزیابی AFM نشان داد که کیتوزان و فرم‌های مشتق آن می‌توانند به دیواره سلولی آسیب برسانند. اگرچه بسیاری از محققان انواع مختلفی از مشتق‌های کیتوزان را تهیه نمودند، با این حال مکانیسم دقیق فعالیت ضد میکروبی کیتوزان و فرم‌های بهبود داده شده آن مشخص نیست و نیازمند مطالعات دقیق‌تر در زمینه شناسایی مسیرهای هشدار دهنده مختلف سلولی فعال شده در سطح سلولی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بابت فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این مطالعه، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع:

1. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(3):616-87.
2. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10(12):6235-54.
3. Omuse G, Kabera B, Revathi G. Low prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as determined by an automated identification system in two private hospitals in Nairobi, Kenya: a cross sectional study. *BMC infectious diseases*. 2014;14(1):1-6.
4. Kocaoglu O, Carlson EE. Profiling of β -lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* strain DC2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(5):2785-90.
5. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(14):5883-8.
6. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*. 1996;60(4):575-608.
7. Mohire NC, Yadav AV. Chitosan-based polyherbal toothpaste: As novel oral hygiene product. *Indian Journal of Dental Research*. 2010;21(3):380.

8. Cheba BA. Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 2011;6(3):149-53.
9. Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. 2011;189(4):1145-75.
10. García RI, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, et al. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(15):15183-95.
11. Brown S, Santa Maria Jr JP, Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2013;67.
12. Krajewska B, Wydro P, Jańczyk A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. *Biomacromolecules*. 2011;12(11):4144-52.
13. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(5):1323-36.
14. Jansen W, Beitsma M, Koeman C, Van Wamel W, Verhoef J, Fluit A. Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(6):2072-8.
15. Alishahi A, Mirvaghefi A, Tehrani M, Farahmand H, Shojaosadati S, Dorkoosh F, et al. Enhancement and characterization of chitosan extraction from the wastes of shrimp packaging plants. *Journal of Polymers and the Environment*. 2011;19(3):776-83.
16. Masarudin MJ, Cutts SM, Evison BJ, Phillips DR, Pigram PJ. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. *Nanotechnology, science and applications*. 2015;8:67.
17. Bobu E, Nicu R, Lupei M, Ciolacu F, Desbrieres J. Synthesis and characterization of n-alkyl chitosan for papermaking applications. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2011;45(9):619.
18. Tiina M, Sandholm M. Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1989;8(2):165-74.
19. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
20. Weinstein MP, Lewis JS. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(3):e01864-19.
21. Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactericins. *Infection and immunity*. 1990;58(11):3724-30.
22. Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A, Seyedarabi A. Structural effects of TiO₂ nanoparticles and doxorubicin on DNA and their antiproliferative roles in T47D and MCF7 cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2013;13(6):932-51.
23. Miao J, Zhou J, Liu G, Chen F, Chen Y, Gao X, et al. Membrane disruption and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cell induced by a novel antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6. *Food Control*. 2016;59:609-13.
24. Kumar S, Dutta J, Dutta P. Preparation and characterization of N-heterocyclic chitosan derivative based gels for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009;45(4):330-7.
25. Sashikala S, Shafi SS. Synthesis and characterization of chitosan Schiff base derivatives. *Pharm Lett*. 2014;6:90-7.
26. Goy RC, Morais ST, Assis OB. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016;26:122-7.
27. Ma Z, Garrido-Maestu A, Jeong KC. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate polymers*. 2017;176:257-65.
28. Rozman NAS, Tong WY, Leong CR, Tan WN, Hasanolbasori MA, Abdullah SZ. Potential antimicrobial applications of chitosan nanoparticles (ChNP). 2019.
29. Garcia LGS, de Melo Guedes GM, Fonseca XMQC, Pereira-Neto WA, Castelo-Branco DSCM, Sidrim JJC, et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;143:341-8.
30. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of Food Microbiology*. 2010;144(1):51-63.

31. Liu N, Chen X-G, Park H-J, Liu C-G, Liu C-S, Meng X-H, et al. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*. 2006;64(1):60-5.
32. Tsai G-J, Su W-H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 1999;62(3):239-43.
33. Ali SW, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*. 2011;83(2):438-46.
34. Costa E, Silva S, Vicente S, Neto C, Castro P, Veiga M, et al. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;79:221-6.
35. Divya K, Vijayan S, George TK, Jisha M. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. *Fibers and polymers*. 2017;18:221-30.
36. Toraji A, Hadizadeh M, Mansoor F. Comparison of antimicrobial activity of chitosan nanoparticles loaded with amoxicillin with free amoxicillin against some gram positive and gram negative bacteria. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2018;12(7).
37. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock biology of microorganisms*: Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ; 2006.
38. Papineau AM, Hoover DG, Knorr D, Farkas DF. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*. 1991;5(1):45-57.
39. Young DH, Köhle H, Kaus H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant physiology*. 1982;70(5):1449-54.
40. Helander I, Nurmiäho-Lassila E-L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of Food Microbiology*. 2001;71(2-3):235-44.
41. Chen S, Wu G, Zeng H. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag⁺ complex. *Carbohydrate Polymers*. 2005;60(1):33-8.
42. da Silva Jr A, Teschke O. Effects of the antimicrobial peptide PGLa on live *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2003;1643(1-3):95-103.
43. Mecke A, Lee D-K, Ramamoorthy A, Orr BG, Holl MMB. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophysical journal*. 2005;89(6):4043-50.
44. Potara M, Jakab E, Damert A, Popescu O, Canpean V, Astilean S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*. 2011;22(13):135101.

Antibacterial properties of chitosan derivatives against *Staphylococcus*

aureus

Vasighe Sadat Mirbagheri¹, Alireza Alishahi^{1*}, Seyyed Hamidreza Hashemi Petroudi², Seyyed Mahdi Ojagh¹

1- Seafood Processing Department, Fisheries & Environment Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Box: 4913815739, Gorgan, Iran.

2- Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, P.O. Box: 578, Sari, Iran.

ABSTRACT

chitosan (Cs) was extracted from shrimp shell and its derivative forms including N-alkyl (AlkCs) and nanoparticles (CsNPs) were prepared. Then, their antibacterial effects on the growth of *Staphylococcus aureus* strain sensitive to methicillin were investigated. Morphology was investigated by scanning electron microscope (SEM), chemical structure by X-ray diffraction pattern and size of CsNPs by zetasizer. Then, their antibacterial activity was evaluated by testing the minimum concentration of inhibition and lethality, diffusion in agar with the help of a disk, the permeability of the cell membrane by measuring the diffusion of cytoplasmic beta-galactosidase. The type of cell death induced was also examined by DAPI staining and changes in cell surface integrity by atomic force microscopy (AFM). The results showed that the CsNPs are spherical with an average hydrodynamic diameter of 240 nm. AlkCs had a rough surface structure compared to chitosan. The best results regarding MIC (78/125 µg/ml) and MBC (100 µg/ml) points were observed for CsNPs ($P < 0.05$). CsNPs and AlkCs showed the highest diameter of growth inhibition zone at 1250 concentration compared to other disks ($P < 0.05$). The permeability of the cytoplasmic membrane of *Staphylococcus aureus* treated with CsNPs and AlkCs showed a significant difference compared to the treatment with chitosan and control (untreated) ($P < 0.05$). DAPI staining test showed higher cell death of *Staphylococcus aureus* treated with CsNPs and AlkCs. The images obtained from AFM showed a change in the integrity of the membrane and the arrangement of the treated bacteria compared to the spherical surface and the cluster arrangement of the untreated bacteria.

KEYWORDS: Modified Chitosan, Antibacterial, *Staphylococcus aureus*, Cell death, Membrane permeability

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 24 February 2023

Accepted: 22 May 2023

ePublished: 5 June 2023

* Corresponding Author:

Email address: seafood1144@yahoo.com

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513