اثر کیتوزان و نانوکیتوزان بر کاهش تحمل اسیدی *لیستریا مونوسایتوژنز*

مهدی زارعی[۱*]، مهدی پورمهدی‌بروجنی[۲] و زهرا کشاورز[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۳

خلاصه

کیتوزان، یک پلیمر غیرسمی است که از داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید و به دلیل استفاده‌های تجاری فراوانی که در صنایع غذایی دارد، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در تحقیق حاضر، توانایی کیتوزان و نانوذرات کیتوزان در حساس کردن *لیستریا مونوسایتوژنز* به pHهای پایین، مورد ارزیابی قرار گرفته است. به این منظور، سلول‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* در محیط TSB با pH برابر با ۴ و ۵ ایجاد شده به وسیله‌ی اسید کلریدریک و اسید استیک با غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد کیتوزان و نانوکیتوزان به مدت یک ساعت مواجه گردید. کیتوزان، اثر ضدمیکروبی مشخصی را در pH برابر ۵ نشان نداده؛ اما نانوکیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد سلول‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* را به این pH حساس‌تر کرده است. اثر ضدمیکروبی کیتوزان و نانوکیتوزان با کاهش pH به ۴ افزایش یافته؛ به گونه‌ای که در این pH، کیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد و نانوکیتوزان در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد کاهش معنی‌داری را در تعداد سلول‌های زنده‌ی باکتری در مقایسه با گروه کنترل و غلظت‌های پایین‌تر این دو ترکیب باعث شده‌اند ($p<0/05$). هم‌چنین نتایج نشان داده که تأثیر نانوکیتوزان بر کاهش تحمل اسیدی باکتری در حضور هر دو اسید استفاده شده، به طور معنی‌داری بیش‌تر از کیتوزان می‌باشد ($p<0/05$). نتایج رنگ‌آمیزی فلورسانس نشان داده که کیتوزان و نانوکیتوزان، آثار ضدمیکروبی خود را با اختلال در عملکرد غشای سلولی باکتری، ایجاد می‌کنند و در این مورد نیز نانوکیتوزان، تأثیر بیش‌تری را در مقایسه با کیتوزان در غلظت‌های مشابه داشته است ($p<0/05$).

کلمات کلیدی: *لیستریا مونوسایتوژنز*، کیتوزان، نانوکیتوزان، تحمل اسیدی

مقدمه

کیتوزان، مشتق داستیله کیتین است. کیتین، دومین پلی‌ساکارید فراوان موجود در طبیعت بعد از سلولز می‌باشد. این پلیمر زیستی توسط تعداد زیادی ارگانیسم زنده، سنتز می‌شود و به وفور در اسکلت خارجی سخت‌پوستانی چون خرچنگ و میگو، حشرات، دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها و مخمرها یافت می‌شود؛ بنابراین، دسترسی به کیتین و کیتوزان به فراوانی، میسر و هم‌چنین مقرون به صرفه است. کیتوزان به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی مانند فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، غیرسمی بودن، آثار ضدقارچی و توانایی تشکیل بیوفیلم، به عنوان یک افزودنی خوراکی و نگه‌دارنده‌ی محصول‌های غذایی، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته و مطالعات بسیاری در این زمینه انجام و کاربردهای وسیعی برای آن تعریف شده است (Duan et al. 2010, Fan et al. 2009, Giatrakou and Savvaidis 2012, Lopez-Caballero et al. 2005, Ojagh et al. 2010).

لیستریا مونوسایتوژنز، یک باکتری گرم مثبت و از پاتوژن‌های مهم غذایی می‌باشد که از طیف وسیعی از مواد غذایی، نظیر شیر و محصول‌های لبنی، مواد غذایی گوشتی و انواع مختلفی از مواد غذایی دریایی، جداسازی شده است (Maktabi et al. 2013, Zarei et al. 2012, Zarei et al. 2013). توانایی رشد این باکتری در

[۱*] دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: zarei@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

دماهای پایین، شرایط خشکی، غلظت بالای نمک و شرایط اسیدی، باعث گردیده است که توجه زیادی به کنترل این باکتری در مواد غذایی معطوف گردد (Aygun and Pehlivanlar 2006). از جمله روش‌های متداول برای کنترل رشد بسیاری از پاتوژن‌های غذایی، اسیدی کردن مواد غذایی به وسیله‌ی اسیدهای آلی می‌باشد که این اسیدهای آلی یا در نتیجه‌ی فرآیند تخمیر در مواد غذایی ایجاد می‌شوند و یا این که به مواد غذایی افزوده می‌گردند (Cataldo et al. 2007). تحمل اسیدی پاتوژن‌های غذایی مختلف نسبت به شرایط اسیدی، متفاوت است. بعضی نسبت به شرایط اسیدی، بسیار حساسند و بعضی از تحمل بالایی برخوردارند؛ اما به طور کلی اسیدهای آلی، اثر ضدمیکروبی بالاتری نسبت به اسیدهای معدنی دارند (Jay et al. 2005). مطالعات مختلف، نشان داده است که *لیستریا مونوسایتوژنز* از تحمل اسیدی بالایی برخوردار است و قادر به رشد و زنده‌مانی در شرایط اسیدی می‌باشد؛ اگر چه میزان این تحمل اسیدی به نوع اسید به کار رفته نیز بستگی دارد (Gandhi and Chikindas 2007, Ryser and Marth 2007). از طرفی در بررسی سایر محققان، نشان داده شده‌اند که استفاده از بعضی از ترکیب‌ها باعث حساس شدن باکتری‌ها به شرایط اسیدی می‌گردد. با توجه به مورد ذکر شده، می‌توان با استفاده‌ی توأم از یک اسید و ترکیبی خاص که باعث کاهش تحمل اسیدی باکتری می‌گردد، آثار ضد میکروبی به مراتب بهتری را در مقایسه با استفاده از اسید به تنهایی به دست آورد. به عنوان مثال، Barker و Park در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که اتانول و EDTA باعث حساس شدن *لیستریا مونوسایتوژنز* به شرایط اسیدی ایجاد شده توسط اسیدهای مختلف می‌گردند. Pan و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که کیتوزان با اختلال در عملکرد غشای سلولی لاکتیک اسید باکتری‌ها باعث افزایش میزان مرگ آن‌ها می‌شود.

بنابراین، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر کاهش تحمل اسیدی *لیستریا مونوسایتوژنز* انجام گردیده است.

مواد و روش کار

تهیه‌ی کیتوزان از پوسته‌ی میگو

به منظور تهیه‌ی کیتوزان، در ابتدا اقدام به استخراج کیتین از پوسته‌ی میگو گردید. بدین منظور ابتدا پوسته‌های میگوی جمع‌آوری شده با آب شسته و در آون با دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، خشک و سپس در هاون خرد شدند. سپس به منظور کانی‌زدایی و حذف مواد معدنی، از اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال و به منظور حذف پروتئین از پوسته‌ها از محلول سود یک نرمال استفاده گردید. در نهایت، پس از چندین مرحله شست و شو با آب و رساندن pH کیتین به حالت خنثی به منظور رنگ‌بری و بهبود کیفیت رنگ آن، از اتانول ۹۶ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، استفاده گردید. کیتین تهیه شده پس از خشک شدن در آون، برای تبدیل به کیتوزان به وسیله‌ی محلول غلیظ سود داستیله گردید. بدین منظور هر گرم از کیتین با ۱۵ میلی‌لیتر محلول سود ۵۰ درصد، مخلوط گردید و به مدت ۲۰ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت، مخلوط حاصل از پارچه‌ی تنظیف عبور داده شد و ابتدا با مقدار زیادی آب معمولی و سپس یک‌بار با آب مقطر، شست و شو گردید تا pH خنثی ایجاد گردد. کیتوزان حاصل در آون خشک و سپس به وسیله‌ی آسیاب پودر گردید (Abdou et al. 2008, Rodde et al. 2008, Sagheer et al. 2009).

تعیین درصد داستیلاسیون و وزن مولکولی کیتوزان

برای تعیین درصد داستیلاسیون کیتوزان به دست آمده از روش آنالیز عنصری استفاده گردید. در این روش، میزان عناصر کربن و نیتروژن کیتوزان تهیه شده، به وسیله‌ی دستگاه آنالیز عناصر، اندازه‌گیری و سپس با استفاده از معادله‌ی زیر، درصد استیلاسیون محاسبه و سپس با

کسر از عدد ۱۰۰ درصد داستیلاسیون محاسبه گردید (Xu et al. 1996).

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

برای تعیین وزن مولکولی کیتوزان تهیه شده از ارتباط بین ویسکوزیته ذاتی و وزن مولکولی استفاده شد. بر این اساس، میزان ویسکوزیته محلول یک درصد کیتوزان در ۰/۰۲ مولار بافر استات (۰/۰۲ مولار استیک اسید و ۰/۰۲ مولار سدیم استات) و ۰/۱ مولار نمک طعام با دستگاه ویسکومتر تعیین گردید و سپس بر اساس معادله‌ی Mark-Houwink-Sakurada میزان وزن مولکولی کیتوزان محاسبه شد. در این معادله η میزان ویسکوزیته ذاتی بر حسب سنتی‌پویز، K و α اعداد ثابت و به ترتیب برابر با $۱/۸۱\times۱۰^{-۳}$ و ۰/۹۳ و M وزن مولکولی کیتوزان بر حسب دالتون می‌باشد (Kasaai et al. 2000).

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

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان و تعیین اندازه‌ی ذرات

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش ژلاسیون یونوتروپیک انجام گردید. بدین منظور ۴ میلی‌لیتر محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات دو درصد به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان که روی هم‌زن مغناطیسی در حال هم زدن بود، افزوده شد و عمل هم زدن به مدت دو ساعت ادامه یافت. پس از این مدت، محلول نانوکیتوزان به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار گرفت و در نهایت، محلول نانوکیتوزان حاصل در آون، خشک و نانو ذرات کیتوزان جمع‌آوری گردید (Du et al. 2008). به منظور تعیین اندازه‌ی نانوذرات کیتوزان تهیه شده، از دستگاه آنالیز اندازه‌ی ذرات استفاده گردید.

میکروارگانیسم

باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC 7644) که به صورت کشت ذخیره حاوی گلیسرول در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شد، برای فعال‌سازی به محیط TSB منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، نگه‌داری شد.

آماده کردن مایه‌ی تلقیح

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی میکروارگانیسم فعال شده به ۵ میلی‌لیتر محیط TSB تلقیح شد و در دمای ۳۵°C انکوبه شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت سطحی روی محیط کشت آگار مغذی گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۵°C به مدت ۴۸-۳۶ ساعت، انکوبه شدند و سپس تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر محیط کشت، شمارش و محاسبه گردید. سپس این آزمایش در سه تکرار، انجام شد. با این عمل، تعداد باکتری پس از ۲۴ ساعت مشخص گردید. در ضمن برای انجام دادن آزمایش‌های بعدی با رقیق سازی کشت ۲۴ ساعته، دوز مناسب تلقیح ($۱۰^{۶}$ CFU/mL) تهیه شد.

بررسی تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر تحمل اسیدی *لیستریا مونوسایتوژنز*

بدین منظور، ابتدا از محلول دو درصد کیتوزان و نانوکیتوزان در اسید استیک یک درصد که عدم وجود باکتری در آن‌ها با کشت روی محیط آگار مغذی مشخص گردیده بود، به میزان مناسب برای تهیه‌ی غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد به محیط کشت TSB استریل، افزوده شد. محیط TSB پس از استریل شدن در اتوکلاو، با استفاده از اسید کلریدریک (۵ مولار) و اسید استیک (۱۷/۴ مولار) که به وسیله‌ی فیلتر سرنگی، استریل شده بودند، تنظیم pH گردید. بدین منظور، حجم مشخصی از هر کدام از اسیدهای استریل شده به محیط TSB افزوده شد و pHهای مورد نظر (۴ و ۵) در محیط‌های ذخیره‌ی آماده، ایجاد گردید. در ادامه، باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* با دوز تلقیح حدود $۱۰^{۶}$ CFU/mL به ۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی غلظت‌های مختلف کیتوزان یا نانوکیتوزان با pH برابر با ۴ یا ۵ که به وسیله‌ی

اسید کلریدریک و یا اسید استیک ایجاد شده بود، تلقیح گردید. قبل از تلقیح به منظور تعیین تعداد اولیه‌ی باکتری‌های تلقیح شده، مایه‌ی تلقیح پس از رقیق‌سازی متوالی روی محیط آگار مغذی، کشت گردید. محیط‌های TSB تلقیح شده به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، قرار داده شد و سپس به منظور تعیین تعداد باکتری‌های موجود در نمونه مجدداً به رقیق سازی متوالی و کشت در محیط آگار مغذی، اقدام گردید؛ البته همه‌ی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند.

بررسی اثر کیتوزان و نانوکیتوزان بر نفوذپذیری غشای سلولی در باکتری

همان‌گونه که در قسمت قبل ذکر گردید، محیط کشت TSB استریل حاوی غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد از کیتوزان و نانوکیتوزان که به وسیله‌ی اسید استیک و اسید کلریدریک به pH=۴ رسانیده شده بودند، تهیه گردید. سپس از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری که در فاز سکون رشد قرار داشت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به ۹۰۰ میکرولیتر هر یک از محیط‌های ذکر شده، اضافه گردید. این محیط‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، قرار داده شدند. در ادامه، اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰۰ میکرومول بر لیتر به آن‌ها افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس سانتریفیوژ در دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد و رسوب باکتری حاصل به وسیله‌ی سرم فیزیولوژی استریل شست و شو گردید. این عمل، سه بار تکرار شد تا اضافی اتیدیوم بروماید شسته و حذف گردد و در نهایت، رسوب باکتری در حجم یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل غوطه‌ورسازی شد. به منظور اندازه‌گیری میزان نور فلورسانس ساطع شده از هر یک از نمونه‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در میکروپلیت استریل تخت، ریخته شد و میزان نور فلورسانس ساطع شده در طول موج تحریکی ۴۹۳ نانومتر و طول موج ساطعی ۶۳۷ نانومتر، اندازه‌گیری گردید؛ این آزمایش‌ها در سه تکرار، صورت پذیرفت (Barker and Park 2001, Robinson et al. 1997).

آنالیز آماری

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

نتایج

خصوصیات کیتوزان و نانوکیتوزان تهیه شده از پوسته‌ی میگو

درصد داستیلاسیون کیتوزان تهیه شده، به روش آنالیز عنصری اندازه‌گیری گردید. در این روش، میزان کربن و نیتروژن در نمونه‌ی کیتوزان به ترتیب ۴۵/۱۱ و ۶/۸۳ درصد بود که با جایگزین کردن این مقادیر در معادله‌ی مربوط، درصد داستیلاسیون کیتوزان تهیه شده، ۸۵/۱ درصد مشخص گردید. هم‌چنین برای تعیین وزن مولکولی کیتوزان، از ارتباط بین ویسکوزیته ذاتی محلول کیتوزان و وزن مولکولی، استفاده شد. با توجه به این که میزان ویسکوزیته محلول یک درصد کیتوزان در اسید استیک یک درصد، برابر با ۵۷۸/۸۱ سنتی‌پویز بود، بر اساس معادله‌ی مذکور، وزن مولکولی کیتوزان تهیه شده، حدود ۸۳۰ کیلودالتون مشخص گردید. تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش ژلاسیون یونوتروپیک و به وسیله‌ی محلول تری‌پلی‌فسفات سدیم انجام پذیرفت. آنالیز اندازه‌ی ذرات، تبدیل کیتوزان به ذراتی در اندازه‌ی نانو با میانگین ۱۰۸/۶ نانومتر را نشان داد.

تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر زنده‌مانی *لیستریا مونوسایتوژنز* در شرایط اسیدی

در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و نانوکیتوزان بر زنده‌مانی *لیستریا مونوسایتوژنز* در محیط کشت TSB با pHهای ۴ و ۵ ایجاد شده توسط اسید

استیک و اسید کلریدریک در مدت زمان یک ساعت، مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در محیط TSB با pH برابر ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک، تفاوت آماری معنی‌داری بین ۴ غلظت مورد آزمایش کیتوزان مشاهده نگردید (p>۰/۰۵)؛ بنابراین می‌توان گفت که کیتوزان تا غلظت ۰/۲ درصد تأثیری بر تحمل اسیدی این باکتری ندارد. این در حالی است که در همین شرایط محیطی، غلظت ۰/۲ درصد نانوکیتوزان باعث کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های زنده‌ی باکتری در مقایسه با غلظت‌های کمتر و گروه کنترل (غلظت صفر) گردید (p<۰/۰۵). در مقایسه‌ی کیتوزان و نانوکیتوزان نیز می‌توان گفت که در حضور غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد، اگر چه تعداد سلول‌های زنده در تیمار نانوکیتوزان، کم‌تر از تیمار کیتوزان بود، اما این تفاوت از لحاظ آماری، معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵)؛ ولی در حضور غلظت ۰/۲ درصد تعداد سلول‌های زنده در تیمار نانوکیتوزان به طور معنی‌داری، کم‌تر از تیمار کیتوزان بود (p<۰/۰۵). هم‌چنین در مورد محیط TSB با pH برابر ۵ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک نیز نتایج مشابهی به دست آمد (جدول ۲).

در محیط TSB با pH برابر ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک (جدول ۳) تعداد باکتری‌های زنده هنگام استفاده از غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان، به طور معنی‌داری کم‌تر از سایر غلظت‌های مورد آزمایش بود (p<۰/۰۵). این در حالی است که با استفاده از نانوکیتوزان، علاوه بر مشاهده‌ی کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های زنده در حضور غلظت ۰/۲ درصد در مقایسه با تیمار کنترل و غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد، در حضور غلظت ۰/۱ درصد نیز کاهش معنی‌داری در تعداد باکتری‌های زنده در مقایسه با تیمار کنترل و غلظت ۰/۰۵ درصد مشاهده شد (p<۰/۰۵).

در مقایسه‌ی کیتوزان و نانوکیتوزان، نتایج نشان داد که نانوکیتوزان در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد اثر ضد میکروبی بیش‌تری را بر روی *لیستریا مونوسایتوژنز* دارد؛ به طوری که تعداد سلول‌های زنده در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد نانوکیتوزان به طور معنی‌داری، کم‌تر از تیمارهای مشابه حاوی کیتوزان بود (p<۰/۰۵).

در محیط TSB با pH برابر ۴ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک (جدول ۴) نیز تعداد باکتری‌های زنده هنگام استفاده از غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان به طور معنی‌داری، کم‌تر از سایر غلظت‌های مورد آزمایش بود (p<۰/۰۵)؛ اما با استفاده از نانوکیتوزان تعداد سلول‌های زنده در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد به طور معنی‌داری، کم‌تر از تیمار کنترل و ۰/۰۵ درصد بود (p<۰/۰۵). در مقایسه‌ی کیتوزان و نانوکیتوزان نیز مشاهده گردید که تعداد سلول‌های زنده در حضور غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد نانوکیتوزان به طور معنی‌داری، کم‌تر از غلظت‌های مشابه کیتوزان بود (p<۰/۰۵).

بررسی اثر کیتوزان و نانوکیتوزان بر نفوذپذیری غشای سلولی در باکتری

میزان جذب رنگ اتیدیوم بروماید توسط سلول‌های دچار آسیب غشایی، به خوبی تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر افزایش نفوذپذیری غشای سلولی باکتری را نشان می‌دهد؛ به طوری که تغییر در میزان نور فلورسانس ساطع شده در تیمارهای مختلف، کاملاً منطبق بر نتایج آزمایش‌های شمارش تعداد سلول‌های زنده‌ی باکتری پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف کیتوزان و نانوکیتوزان بود (جداول ۵ و ۶).

جدول ۱: تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر *لیستریا مونوسایتوژنز* **در محیط TSB با pH= ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک**

محیط TSB با pH=۵ ایجاد شده توسط اسید استیک، حاوی	غلظت (درصد)			
	صفر	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲
کیتوزان	۵/۰۲± ۰/۲۴ a, A	۵/۱± ۰/۲۵ a, A	۴/۷۷ ± ۰/۲۲ a, A	۴/۹ ± ۰/۱۳ a, A
نانوکیتوزان	۵/۰۲± ۰/۲۴ a, A	۴/۹۴±۰/۳۳ a, A	۴/۷ ± ۰/۴ a, A	۴/۲۶ ± ۰/۱۸ b, B

– اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در میلی‌لیتر، پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه ۶/۰۵±۰/۱۶ بوده است.

– اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد ارائه شده در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۲: تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر *لیستریا مونوسایتوژنز* **در محیط TSB با pH= ۵ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک**

محیط TSB با pH= ۵ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک، حاوی	غلظت (درصد)			
	صفر	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲
کیتوزان	۵/۰۶± ۰/۲۲ a, A	۵/۱۷± ۰/۲ a, A	۴/۹۳ ± ۰/۲۴ a, A	۵/۰۳ ± ۰/۱ a, A
نانوکیتوزان	۵/۰۶± ۰/۲۲ a, A	۵/۰۵ ±۰/۱۹ a, A	۴/۹۴ ± ۰/۱۷ a, A	۴/۴۱± ۰/۱۹ b, B

– اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در میلی‌لیتر، پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه ۵/۹۱±۰/۱۸ بوده است.

– اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد ارائه شده در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۳: تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر *لیستریا مونوسایتوژنز* **در محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک**

محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک، حاوی	غلظت (درصد)			
	صفر	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲
کیتوزان	۳/۷۵± ۰/۲۱ a, A	۳/۸۸ ± ۰/۲۱ a, A	۳/۶۸ ± ۰/۳۵ a, A	a, B۳/۱۲ ± ۰/۲
نانوکیتوزان	۳/۷۵± ۰/۲۱ a, A	۳/۶۷ ±۰/۴۲ a, A	۳/۰۷ ± ۰/۰۹ b, B	b, C۲/۵۷ ± ۰/۱۲

– اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در میلی‌لیتر، پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه ۶/۲۳±۰/۲۷ بوده است.

– اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد ارائه شده در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۴: تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر *لیستریا مونوسایتوژنز* در محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک

محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک، حاوی	غلظت (درصد)			
	صفر	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲
کیتوزان	۴/۰۹ ± ۰/۱۵ a, A	۴/۰۵ ±۰/۲۷ a, A	۳/۹۷ ± ۰/۳ a, A	۳/۵۵ ± ۰/۱ a, B
نانوکیتوزان	۴/۰۹ ±۰/۱۵ a, A	۴/۱۱ ±۰/۴۳ a, A	۳/۲۱ ± ۰/۳ b, B	۳/۰۲ ± ۰/۱۷ b, B

– اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در میلی‌لیتر، پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه ۶/۰۵±۰/۱۶ بوده است.

– اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد ارائه شده در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۵: میزان نور فلورسانس ساطع شده از سلول‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* مواجه شده با اتیدیوم بروماید در محیط TSB با ۴ =pH ایجاد شده توسط اسید استیک

محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک، حاوی	میزان نور فلورسانس ساطع شده (واحد نسبی)			
	صفر	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲
کیتوزان	۷/۷±۴/۳ a, A	۵/۴ ± ۲/۱ a, A	۸/۹ ± ۳/۵ a, A	a, B۲۶/۷ ± ۶/۲
نانوکیتوزان	۴/۵±۲/۶ a, A	۹/۴ ±۴/۷ a, A	۲۴/۱ ± ۵/۱ b, B	b, C۴۱/۳ ± ۵/۶

– اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مجزا می‌باشد.

– اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد ارائه شده در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۶: میزان نور فلورسانس ساطع شده از سلول‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* مواجه شده با اتیدیوم بروماید در محیط TSB با ۴ =pH ایجاد شده توسط اسید کلریدریک

محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک، حاوی	میزان نور فلورسانس ساطع شده (واحد نسبی)			
	صفر	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲
کیتوزان	۴/۹ ± ۲/۵ a, A	۶/۳ ±۲/۷ a, A	۹/۹ ± ۴/۶ a, A	۲۳/۱ ± ۴/۴ a, B
نانوکیتوزان	۵/۲ ±۳/۱ a, A	۷/۱ ±۴/۳ a, A	۲۶/۳ ± ۷/۸ b, B	۳۴/۷ ± ۱۰/۹ b, B

– اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مجزا می‌باشد.

– اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی بزرگ غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد ارائه شده در هر ستون که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

بحث

این تحقیق با هدف ارزیابی امکان افزایش حساسیت *لیستریا مونوسایتوژنز* به شرایط اسیدی به وسیله‌ی کیتوزان و نانوکیتوزان و هم‌چنین مقایسه‌ی این دو ترکیب، انجام گردید. بر اساس اطلاعات در دسترس، تاکنون تنها در مطالعه‌ی Qi و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر ضدمیکروبی نانوکیتوزان مورد ارزیابی قرار گرفته است. این محققان اثر ضدمیکروبی نانوکیتوزان را بر باکتری‌های *اشریشیا کلای*، *سالمونلا کلراسویس*، *سالمونلا تایفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار دادند و حداقل غلظت کشنده‌ی نانوکیتوزان برضد این باکتری‌ها را یک میکروگرم در میلی‌لیتر بیان نمودند. در تحقیق حاضر برای اولین بار اثر ضدمیکروبی نانوکیتوزان بر روی *لیستریا مونوسایتوژنز* مورد ارزیابی قرار گرفته و با اثر ضدمیکروبی کیتوزان مقایسه گردیده است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که کیتوزان در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک یا اسید کلریدریک، تا غلظت ۰/۲ درصد اثر ضدمیکروبی مشخصی را بر این باکتری نداشت؛ به طوری که نه تنها تعداد سلول‌های زنده‌ی باکتری در حضور غلظت‌های مورد استفاده‌ی کیتوزان، کاهش معنی‌داری را نشان نداد، بلکه میزان جذب رنگ اتیدیوم بروماید نیز در شرایط ذکر شده، تغییر معنی‌داری را نشان نداد. Tao و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز حداقل غلظت مهارکننده‌ی کیتوزان را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۰۳۸ درصد، *اشریشیا کلای* ۰/۰۷۵ درصد و علیه *لیستریا مونوسایتوزنز*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا*، ۰/۳ درصد گزارش کردند. Benhabiles و همکاران در سال ۲۰۱۲ حداقل غلظت مهار کننده‌ی کیتوزان را علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تایفی موریوم* به ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ درصد گزارش کردند. در تحقیق حاضر، نانوکیتوزان در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسید استیک یا اسید کلریدریک، در غلظت ۰/۲ درصد، تأثیر معنی‌داری را بر افزایش حساسیت باکتری به شرایط اسیدی نشان داد؛ به طوری که تعداد سلول‌های زنده‌ی شمارش شده در حضور غلظت ۰/۲ درصد نانوکیتوزان به طور معنی‌داری، کم‌تر از سایر غلظت‌های مورد آزمایش بود و میزان رنگ اتیدیوم بروماید جذب شده در این شرایط نیز به طور معنی‌داری، بیش‌تر از سایر غلظت‌ها بود. بر اساس نظر Qi و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثر ضدمیکروبی بیش‌تر نانوذرات کیتوزان، مربوط است به کاهش اندازه و افزایش میزان سطح آن که باعث افزایش تمایل آن به سلول‌های باکتری می‌شود. با کاهش pH به ۴، اثر ضدمیکروبی کیتوزان و نانوکیتوزان افزایش یافت؛ به طوری که در pH برابر ۴ ایجاد شده توسط اسید استیک و اسید کلریدریک، کیتوزان در غلظت ۰/۲ درصد و نانوکیتوزان در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد تأثیر معنی‌داری را بر افزایش حساسیت باکتری به شرایط اسیدی و کاهش تعداد سلول‌های زنده‌ی شمارش شده‌ی آن داشتند. No و همکاران در سال ۲۰۰۲، Lim و Hudson در سال ۲۰۰۴ و Kong و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. این افزایش تأثیر به دلیل افزایش چگالی بار مثبت سطحی کیتوزان در pHهای پایین‌تر می‌باشد (Kong et al. 2010, Lim and Hudson 2004). در این مطالعه با استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید، تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر افزایش نفوذپذیری غشای سلولی باکتری به خوبی، نشان داده شد. اختلال در عملکرد غشای سلولی باکتری، باعث افزایش میزان جذب رنگ اتیدیوم بروماید توسط سلول‌ها گردید؛ به طوری که با کاهش تعداد سلول‌های زنده‌ی شمارش شده در حضور غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد کیتوزان و به ویژه نانوکیتوزان، میزان نور فلورسانس ساطع شده از باکتری افزایش معنی‌داری را نشان داد. Pan و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که کیتوزان در غلظت ۰/۰۵ درصد با اختلال در عملکرد

غشای سلولی لاکتیک اسید باکتری‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشای سلولی و در نتیجه، افزایش میزان مرگ آن‌ها گردید. آن‌ها با اندازه‌گیری میزان pH داخل سلولی باکتری، کاهش pH را پس از مواجهه باکتری با کیتوزان، نشان دادند . هم‌چنین محققان مذکور، با کمک میکروسکوپ فلورسنت، افزایش نفوذپذیری غشای سلولی لاکتیک اسید باکتری‌ها را به رنگ‌های آکریدین اورنج و یدید پروپیدیوم، نشان دادند. Tao و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که متعاقب مواجهه باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس آرئوس* با کیتوزان، به دلیل افزایش نفوذپذیری غشایی، میزان رسانایی الکتریکی سوسپانسیون باکتری، افزایش می‌یابد . هم‌چنین میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی و گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز نیز در سوسپانسیون باکتری اضافه شد. این پژوهشگران هم‌چنین نشان دادند که کیتوزان، تأثیر بیش‌تری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *سودوموناس آئروژینوزا* دارد که این مسأله به دلیل ساختار متفاوت غشای سلولی این دو باکتری می‌باشد (Tao et al. 2011).

می‌توان گفت که در مطالعه‌ی منابع مختلف، پراکندگی زیادی در اطلاعات ارائه شده توسط محققان راجع به اثر ضدمیکروبی کیتوزان، مشاهده می‌گردد . بعضی از محققان، باکتری‌های گرم مثبت و بعضی دیگر، باکتری‌های گرم منفی را نسبت به کیتوزان، حساس‌تر معرفی کرده‌اند. هم‌چنین در رابطه با دوز مناسب برای مشاهده‌ی آثار ضدمیکروبی هم، گزارش‌های متفاوتی وجود دارد؛ به عنوان مثال، حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد این ترکیب برای باکتری‌های گرم منفی در محدوده‌ی ۱- ۰/۰۱ درصد (Helander et al. 2001) و برای باکتری‌های گرم مثبت در محدوده ۰/۱۲-۰/۰۱ درصد (Kumar et al. 2004) گزارش شده است. بر اساس نظر Kong و همکاران در سال ۲۰۱۰، آثار متفاوت ضدمیکروبی کیتوزان، ناشی از عوامل مختلفی است که باید در ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی کیتوزان، مورد توجه قرار گیرد. این عوامل در ۴ دسته طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) عوامل میکروبی ذاتی، شامل گونه‌ی میکروب و سن سلول ۲) عوامل مربوط به مولکول‌های کیتوزان، شامل چگالی بار مثبت، میزان پروتونه شدن گروه‌های آمینی، وزن مولکولی، خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی و ظرفیت شلاته کردن مولکول کیتوزان ۳) حالت فیزیکی کیتوزان، شامل حالت محلول در آب یا حالت جامد کیتوزان ۴) عوامل محیطی، مانند pH، قدرت یونی، درجه‌ی حرارت و زمان واکنش میان کیتوزان و سلول‌های باکتریایی. با توجه به این مطالب می‌توان گفت که شاید یکی از دلایلی که در این تحقیق، آثار ضدمیکروبی کیتوزان و نانوکیتوزان در غلظت بالاتری نسبت به سایر پژوهش‌ها، مشاهده شده است، به زمان مواجهه کوتاه بین کیتوزان و باکتری مربوط باشد؛ زیرا در این تحقیق، باکتری و کیتوزان یا نانوکیتوزان تنها به مدت یک ساعت در مواجهه با هم قرار گرفتند، حال آن که در بسیاری از پژوهش‌ها، این زمان در حد ۷۲-۲۴ ساعت بوده است؛ البته نباید تأثیر عوامل دیگری مانند گونه‌ی باکتری، سن سلول و وزن مولکولی کیتوزان را از نظر دور داشت.

نتایج تحقیق حاضر، نشان داده است که کیتوزان و نانوکیتوزان قادرند با افزایش نفوذپذیری غشای سلول *لیستریا مونوسایتوژنز*، تحمل این باکتری را نسبت به شرایط اسیدی، کاهش دهند. در این رابطه، نانوکیتوزان آثار بیش‌تری را در مقایسه با کیتوزان از خود نشان داده است که این مسأله احتمالاً باید به دلیل افزایش سطح آن و در نتیجه، افزایش تمایل آن نسبت به سلول‌های باکتری باشد؛ بنابراین استفاده از این ترکیب‌ها در مواد غذایی اسیدی، نظیر ماست، دوغ و انواعی از سس‌ها که احتمال حضور و زنده‌مانی *لیستریا مونوسیتوژنز* در آن‌ها وجود دارد، می‌تواند مفید باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین بودجه‌ی طرح، تقدیر و تشکر می‌شود. هم‌چنین از سرکار خانم اصفهانی، کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، به سبب همکاری در انجام دادن طرح، قدردانی می‌گردد.

منابع

Abdou, E.S.; Nagy, S.A. and Elsabee, Z.M. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. Bioresource Technology, 99: 1359-1367.

Aygun, O. and Pehlivanlar, S. (2006). Listeria spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control, 17: 676-679.

Barker, C. and Park, S.F. (2001). Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol, Applied and Environmental Microbiology, 67: 1594-1600.

Benhabiles, M.S.; Salah, R.; Lounici, H.; Drouiche, N.; Goosen, M.F.A. and Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. Food Hydrocolloids, 29: 48-56.

Cataldo, G.; Conte, M.P.; Chiarini, F.; Seganti, L.; Ammendolia, M.G.; Superti, F. and Longhi, C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. Journal of Applied Microbiology, 103: 185-193.

Du, W.L.; Xu, Z.R.; Han, X.Y.; Xu, Y.L. and Miao, Z.G. (2008). Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. Journal of Hazardous Material, 153: 152-156.

Duan, J.Y.; Cherian, G. and Zhao, Y.Y. (2010). Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. Food Chemistry, 119: 524-532.

Fan, W.J.; Sun, J.X.; Chen, Y.C.; Qiu, J.; Zhang, Y. and Chi, Y.L. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry, 115: 66-70.

Gandhi, M. and Chikindas, M.L. (2007). Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology, 113: 1-15.

Giatrakou, V. and Savvaidis, I.N. (2012). Bioactive packaging technologies with chitosan as a natural preservative agent for extended shelf-life food products. In: Arvanitoyannis, I. (Ed.), Modified Atmosphere and Active Packaging Technologies. Taylor and Francis, Boca Raton, FL, Pp: 685-730.

Helander, I.M.; Nurmiaho-Lassila, E.L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J. and Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology, 71, 235-244.

Jay, J.M.; Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology, Vol. 2, 7th ed., Springer, New York. Pp: 251-275.

Kasaai, M.R.; Arul, J. and Charlet, G. (2000). Intrinsic viscosity– molecular weight relationship for chitosan. Journal of Polymer Science Polymer Physics, 38: 2591-2598.

Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K. and Park, H.J. (2010). Antimicrobial activity of chitosan and mode of action: a state of the art review. International Journal of Food Microbiology, 144: 51-63.

Kumar, MNVR.; Muzzarelli, RAA.; Muzzarelli, C.; Sahiwa, H. and Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemical Reviews, 104: 6017–6084

Lim, S. and Hudson, S.M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water soluble chitosan derivative with a fiber reactive group. Carbohydrate Research., 339, 313-319.

Lopez-Caballero, M.E.; Gomez-Guillen, M.C.; Perez-Mateos, M. and Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. Food Hydrocolloids, 19: 303–311.

Maktabi, S.; Jamnejad, A. and Faramarzian, K. (2013). Contamination of household refrigerators by Listeria species in Ahvaz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 6 (3): 301-305.

No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, SH. and Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology, 74: 65-72.

Ojagh, S.M.; Rezaei, M.; Razavi, SH. and Hosseini, SMH. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120: 193-198.

Pan, C.; Rezaei, H. and Soor, A. (2011). Chitosan disrupts membrane permeability of lactic acid bacteria. Journal of Experimental Microbiology and Immunology,15: 7-14.

Qi, L.F.; Xu, Z.R.; Jiang, X.; Hu, C.H. and Zou, X.F. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate Research 339, 2693-2700.

Robinson, T.P.; Ocio, M.J.; Lyn, F.; Kaloti, A.; and Mackey, B.M. (1997). The use of ethidium bromide to assess a novel injury/recovery phenomenon in *Listeria monocytogenes* in inhibitory NaCl conditions. Letters in Applied Microbiology, 25: 367-370.

Rodde, R.H.; Einbu, A. and Varum, K.M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). Carbohydrate Polymers, 71: 388- 393.

Ryser, E.T. and Marth, E.H. (2007). Listeria, listeriosis, and food safety, CRC Press. USA, Pp: 348-392.

Sagheer, F.A.; Al-Sughayer, M.A.; Muslim, S. and Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. Carbohydrate Polymers, 77(2): 410- 419.

Tao, Y.; Qian, L. and Xie, J. (2011). Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphyloccocus aureus*. Carbohydrate Polymers, 86: 969-974.

Xu, J.; McCarthy, S.P.; Gross, R.A. and Kaplan, D.L. (1996). Chitosan film acylation and effects on biodegradability. Macromolecules, 29: 3436-3440.

Zarei, M.; Basiri, N.; Jamnejad, A. and Eskandari, M.H. (2013). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and Salmonella spp. in beef, buffalo and lamb using multiplex PCR. Jundishapur Journal of Microbiology, 6 (8): 1-5.

Zarei, M.; Maktabi, S. and Ghorbanpour, M. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and Salmonella spp. in seafood products using multiplex polymerase chain reaction. Foodborne Pathogens and Disease, 9 (2): 108-112.

Effect of chitosan and nanochitosan on reducing acid tolerance of *Listeria monocytogenes*

Zarei, M.[1]; Pourmahdi Borujeni, M.[2] and Keshavarz, Z. [2]

Received: 12.08.2014 Accepted: 03.01.2015

Abstract

Chitosan, a natural nontoxic biopolymer is derived by deacetylation of chitin, has received considerable attention for its commercial applications in the food industry. In the present study, the ability of chitosan and chitosan nanoparticles to sensitize *Listeria monocytogenes* to low pH was assessed. To achieve this purpose, cells of *L. monocytogenes* were exposed to pH 4 and 5 adjusted by adding hydrochloric and acetic, acids into TSB, in the presence of 0.0, 0.05, 0.1 and 0.2 % chitosan, for one hour. Chitosan did not show antibacterial activity at pH 5, while 0.2 % nanochitosan made *L. monocytogenes* cells more sensitive to this pH. However, antibacterial activity of both chitosan and nanochitosan were higher at pH 4, where 0.2 % chitosan and 0.1 and 0.2 % nanochitosan made significant reductions in viable population of this bacterium in comparison with the control and the lower concentrations ($p<0.05$). Furthermore, results showed that, in the presence of both the acids, the effect of nanochitosan on reduction of the acid tolerance of the bacterium was significantly more than chitosan ($p<0.05$). Results of the fluorescent staining demonstrated that chitosan and nanochitosan exerted their effect by disrupting the cellular membrane of the cells and in the same concentrations, nanochitosan had higher effect than chitosan ($p<0.05$).

Key words: *Listeria monocytogenes,* Chitosan, Nanochitosan, Acid tolerance

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

2- DVM Gratuated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Zarei, M., E-mail: zarei@scu.ac.ir