بررسی و مقایسه‌ی خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ شناگر آبی (*Portunus segnis*) از منطقه بندرعباس

محمد صادق خاکشور[۱]
جمیله پازوکی[۲*]

۱، ۲. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
pazooki2001@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۵۰۱۰۳۸۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۲۱

چکیده

سالانه ۷۰-۴۰ درصد از سخت‌پوستان دریایی صیدشده به ضایعات تبدیل می‌شوند که حدود ۳۰-۲۰ درصد اسکلت خارجی این سخت‌پوستان کیتین است؛ بنابراین دورریزهای سخت‌پوستان مواد اولیه‌ی مناسبی جهت تولید کیتین به شمار می‌رود. کیتوزان مهم‌ترین مشتق به‌دست‌آمده از کیتین است که خواص زیستی مختلفی دارد. در این مطالعه نمونه‌های خرچنگ شناگر آبی (*Portunus segnis*) در تابستان ۱۳۹۳ با تور ترال از آب‌های بندرعباس صید و طی روش‌های استاندارد آزمایشگاهی کیتین و کیتوزان از پوسته‌ی آن استخراج گردید. کمیت و فعالیت ضد میکروبی کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی (کاراپاس، سینه، چنگک و پاهای راه روی) روی ۱۱ سویه باکتریایی و ۳ سویه‌ی قارچی موردبررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که مقدار کیتین و کیتوزان در پاهای راه روی به‌طور معنی‌داری بیشتر از دیگر بخش‌ها بود. کیتوزان نسبت به کیتین خواص ضد میکروبی بیشتری را از خود نشان داد. حساسیت باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نسبت به کیتین و کیتوزان استخراج‌شده تفاوت معنی‌داری نداشت. سویه‌های قارچی نسبت به سویه‌های باکتریایی در برابر کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف مقاوم‌تر بودند. کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس و چنگک فعالیت ضد میکروبی بیشتری را از خود نشان دادند. محدوده‌ی کمترین غلظت بازدارنده‌ی رشد و کمترین غلظت کشنده‌ی رشد به ترتیب بین ۱۰۰۰-۱۲۵ و ۱۰۰۰-۵۰۰ میکروگرم بر لیتر بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان سخت‌پوستان خلیج‌فارس را به‌عنوان منبع مناسب جهت تولید کیتین و کیتوزان به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی به شمار آورد. بخش‌های مفید پوسته سخت‌پوستان جهت استحصال این پلیمر را نیز می‌توان شناسایی نمود. همچنین تأثیر این ترکیبات زیستی روی برخی از پاتوژن ها نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: خرچنگ، پوسته، ترکیبات زیست فعال، کیتین، کیتوزان، *Portunus segnis*.

مقدمه

اولین لایه‌ی دفاعی سخت‌پوستان در برابر انگل‌های بیماری‌زا اسکلت خارجی و سخت آن‌ها می‌باشد (Sasikala and Chitra, 2009). فعالیت ضد میکروبی اسکلت خارجی سخت‌پوستان به خاطر وجود ترکیبات زیست فعال ازجمله کیتین در آن می‌باشد (Sasikala and Chitra, 2009). کیتین یک پلیمر طبیعی با خاصیت ضد میکروبی می‌باشد که به‌طور طبیعی در اسکلت خارجی سخت‌پوستان ازجمله خرچنگ و میگو وجود دارد (No *et al*., 2002). کیتین پس از سلولز فراوان‌ترین پلیمر زیستی در طبیعت می‌باشد که از واحدهای N-acetyl-D-glocosamin تشکیل‌شده است (Deshpande, 1986). پس از انجام فرآیندهای شیمیایی مختلف کیتین به پلیمری مفیدتر و با حلالیت بالاتر به نام کیتوزان تبدیل می‌شود. کیتین و کیتوزان به‌واسطه‌ی فعالیت‌های مختلف زیستی از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند (Hirano, 1996; Wang and

Tsai and Su, 1999; Roller and Covill,) از کیتین و کیتوزان به‌عنوان ترکیبات زیست فعال با فعالیت ضد قارچی (Huang, 2001 1999; Uchida *et al*., 1989) و ضد باکتریایی (Chio *et al*., 2001; Jung *et al*., 1999; Liu *et al*., 2001) استفاده می‌شود. تاکنون مطالعات مختلفی درزمینه‌ی استخراج کیتین و کیتوزان از سخت‌پوستان مختلف در داخل و خارج از کشور صورت گرفته است؛ اما کمیت و کیفیت کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از اندام‌های مختلف چندان موردتوجه قرار نگرفته است و در نوشته‌های علمی اطلاعات جامعی در این زمینه وجود ندارد؛ بنابراین هدف این مطالعه بررسی کمیت کیتین و کیتوزان در بخش‌های مختلف اسکلت خرچنگ شناگر آبی (*P. segnis*) (شکل ۱) می‌باشد. همچنین خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان به‌دست‌آمده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ مذکور در برابر برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱۸۰ عدد خرچنگ (*Portunus segnis*) (با طول کاراپاس ۷۸/. ± ۵/۳۶ سانتی‌متر، عرض کاراپاس ۵۷/ ۱ ± ۲۸/ ۱۱ و وزن ۴۱/۲۶ ± ۱۰۹/۱۴ گرم) به‌عنوان صید ضمنی و با استفاده از تور ترال از آب‌های دور از ساحل بندرعباس در تابستان ۹۳ جمع‌آوری شد. پس از شستشوی نمونه‌ها اسکلت خارجی آن‌ها به‌صورت دستی جدا و به ۴ بخش کاراپاس، سینه، چنگک و پاهای راه روی تقسیم شد. پس از خشک‌کردن پوسته‌ها در آون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با آسیاب آزمایشگاهی پودر کرده و از الک ۲۵۰ میکرون عبور داده شد. تا زمان آزمایش نمونه‌ها در پلاستیک‌های زیپ‌دار و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شکل ۱: خرچنگ *Portunus segnis* از ناحیه‌ی پشتی.

پس از انجام ۴ مرحله‌ی حذف ترکیبات معدنی، حذف ترکیبات پروتئینی، حذف ترکیبات رنگ‌دانه‌ای و درنهایت حذف گروه‌های استیل از روی کیتین به‌دست‌آمده کین‌توزان حاصل می‌شود. حذف ترکیبات معدنی با استفاده از اسیدکلریدریک ۲ نرمال، به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای محیط و با نسبت پودر به اسید (w/v) ۱:۲۰ صورت گرفت. ترکیبات پروتئینی محصول دمینرال شده نیز با استفاده از هیدروکسید سدیم ۵ درصد، به مدت ۱۵

دقیقه در اتوکلاو (15 psi/121°C) و با نسبت (w/v) ۱:۱۵ حذف گردید. پس از حذف ترکیبات رنگ‌دانه‌ای با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۳۲/ درصد به مدت ۳ دقیقه و با نسبت (w/v) ۱:۱۰، پلیمر کیتین به دست می‌آید. برای تبدیل کیتین به کین‌توزان، کیتین به‌دست‌آمده را با محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و به نسبت (w/v) ۱:۱۵ اتوکلاو (15 psi/121°C) گردید. در انتهای هر مرحله مواد باقی‌مانده روی کاغذ فیلتر (Whatman No. 3) صاف‌شده، با آب مقطر برای رسیدن به pH خنثی شستشو و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Natarjan *et al*., 2010). با تقسیم وزن خشک کیتین و کین‌توزان به‌دست‌آمده به مقدار پودر اولیه‌ی اسکلت خرچنگ استفاده‌شده، درصد این پلیمرها محاسبه گردید (Natarjan *et al*., 2010).

خواص ضد میکروبی کیتین و کین‌توزان استخراج‌شده روی ۱۱ سویه‌ی باکتریایی ازجمله *Staphylococcus aureus* (PTCC ۱۱۸۹)، *Bacillus subtilis* (PTCC ۱۱۵۶)، *Bacillus cereus* (PTCC ۱۱۵۴)، *Escherichia coli* (PTCC ۱۱۷۶)، *Pseudomonas aeroginosa* (PTCC ۱۳۱۰)، *Proteus mirabilis* (PTCC ۱۰۷۶)، *Serattia marcescens* (PTCC ۱۶۲۱)، *Klebsiella Pneumonia* (PTCC ۱۰۵۳)، *Salmonella entrica* (PTCC ۱۷۰۹)، *Entrococcus faecalis* (PTCC ۱۷۷۸)، *Entrobacter* sp. (PTCC ۱۲۹۱) و ۳ سویه‌ی قارچی *Candida albicans* (PTCC ۵۰۲۷)، *Fusarium solani* (PTCC ۵۲۴۸) و *Aspergillus niger* (PTCC ۵۲۲۳) موردبررسی قرار گرفت. سویه‌های قارچی و باکتریایی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردیدند. مطالعه‌ی ضد میکروبی به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعمل NCCLS انجام شد (Chio *et al*., 2001). با استفاده از کلنی‌های باکتریایی که به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merk, Germany) کشت‌شده‌اند، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت مایع مولر هینتون براث (Merk, Germany) تهیه شد. از این غلظت باکتریایی تهیه‌شده برای کشت روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. همچنین ۰/۱ میلی‌لیتر از سویه‌های قارچی کشت‌شده در محیط پوتیتو دکستروز براث (Merk, Germany) به مدت ۷۲ ساعت برای کشت روی محیط پوتیتو دکستروز آگار (Merk, Germany) استفاده شد. محلول ۱ درصد کیتین و کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد جهت افزودن به دیسک تهیه شد. مقادیر مشخصی از کیتین و کیتوزان (۵۰۰ میکروگرم بر لیتر) به دیسک‌های بلانک استریل (۶ mm) تلقیح شد. از دیسک‌های آغشته به اسید استیک ۱ درصد به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. همچنین دیسک‌های آماده‌ی آنتی‌بیوتیک Amoxicillin (25 µg/disc) به‌عنوان شاهد مثبت برای باکتری‌ها و دیسک‌های آماده‌ی آنتی‌بیوتیک penicillin (30 µg/disc) به‌عنوان شاهد برای قارچ‌ها استفاده شد. در انتها پلیت‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های قارچی به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از زمان‌های مذکور هاله‌های عدم رشد باکتریایی و قارچی در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. مقادیر MIC و MBC برای کیتین و کیتوزان بر اساس روش Chellaram و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Natarjan و همکاران در سال ۲۰۱۰ بین ۱۰۰۰-۷۵ میکروگرم بر لیتر اندازه‌گیری شد.

از برنامه‌ی SPSS ویرایش ۱۹ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. تست کلوموگروف-اسمیرنو نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار نیستند. با استفاده از لگاریتم گیری داده‌ها نرمال شدند. آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA) برای مقایسه‌ی میانگین مقدار کیتین و کیتوزان بین بخش‌های مختلف اسکلت خارجی و همچنین برای مقایسه خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان استفاده گردید. از تست توکی (Tukey) نیز برای مقایسه دوبه‌دوی حساسیت باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده شد.

نتایج

کیتین و کیتوزان به‌دست‌آمده از پوسته‌ی خرچنگ به ترتیب ۱۵/۷۲±۰/۱۵ درصد و ۱۲/۸۴±۰/۱۳ درصد محاسبه گردید. مقدار کیتین و کیتوزان به‌دست‌آمده از پاهای راه روی به‌طور معنی‌داری (P< ۰/۰۵) بیشتر از دیگر بخش‌ها بود (جدول ۱).

جدول ۱: درصد کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*) (میانگین ± انحراف معیار).

پلیمر	کاراپاس	چنگک	سینه	پاهای راه روی
کیتین	۱۵/۵۳± ۱۳/۵	۱۲/۷۳ ± ۰/۱۵	۱۶/۲۶ ± ۱۴/۸	۱۸/۳۶ ± ۱۷/۳
کیتوزان	۱۲/۸۶± ۱۰/۴	۹/۲۳ ± ۰/۱۳	۱۲/۹۶ ±/۱۴/۵	۱۶/۳۳± ۱۷/۳

حروف متفاوت در کنار اعداد هر ردیف نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار و اعداد با حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتایج خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی *P. segnis* در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است. به‌طورکلی کیتین خواص ضد میکروبی ضعیف‌تری نسبت به کیتوزان استخراج‌شده از خود نشان داد. رنج هاله‌های عدم رشد برای کیتین بین ۰/۱۱ ± ۸ تا ۰/۲۸ ± ۱۶ میلی‌متر و برای کیتوزان بین ۸/۵۳ ±۰/۵۵ تا ۰/۲۸ ± ۱۷/۸ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به کیتین و کیتوزان استخراج‌شده حساسیت مشابهی داشتند. حساسیت سویه‌های قارچی نیز نسبت به سویه‌های باکتریایی در برابر کیتین و کیتوزان استخراج‌شده کمتر بود (جدول‌های ۴ و ۵).

جدول ۲: هاله‌ی عدم رشد باکتریایی کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*) (میانگین ± انحراف معیار).

باکتری	کاراپاس	چنگک	سینه	پاهای راه روی	Amoxicillin(25µg/disc)
S. aureus	۱۱/۰۶±۰/۱۱	۱۰±۰/۱۱	۱۲/۷۶±۰/۵۱	۱۱/۲۳±۰/۲۵	۱۸/۶۶±۰/۵۷
B. subtilis	۱۴/۱±۰/۱۷	۱۳/۲۳±۰/۲۵	–	–	۲۱/۸۳±۰/۷۵
B. cereus	۱۱/۶±۰/۵۲	۱۰±۰/۱۱	–	۸/۹۳±۰/۳	۱۷/۸۳±۰/۷۶
E. faecalis	۹/۳±۰/۵۷	۱۱±۰/۱۱	–	–	۲۱/۵±۰/۵
P. aeroginosa	۱۳/۹±۰/۰۵	۱۳/۳۶±۰/۳۲	۱۰/۳۶±۰/۳۲	–	۱۹/۵±۰/۵
P. mirabilis	۱۴/۷±۰/۶۸	۱۵/۴±۰/۴۱	–	–	۲۴/۱۶±۰/۷۶
E. coli	۱۷/۸±۰/۲۸	۱۷/۲۶±۰/۲۵	۱۱±۰/۱۵	–	۲۲/۴۳±۰/۵۱
S. marcescens	۱۳/۳±۰/۲۶	۱۲/۳۶±۰/۳۲	۸/۵۳±۰/۵۵	–	۱۵/۳۳±۰/۵۷
K. pneumonia	۱۴/۳±۰/۳	۱۲/۲۶±۰/۲۵	–	–	۱۵/۳۳±۰/۲۸
S. entrica	۱۳/۴±۰/۴۱	۱۵/۲۶±۰/۲	۱۲/۲۶±۰/۲		۲۱/۱۶±۰/۷۶
Entrobacter sp.	۱۴/۸±۰/۷۲	۱۴/۴۶±۰/۴۱	۱۳/۱۳±۰/۲	۱۱/۲۶±۰/۳	۱۰/۱۶±۰/۲۸

(–) عدم هاله‌ی رشد، حروف متفاوت در کنار اعداد هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار و اعداد با حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۳: هاله‌ی عدم رشد باکتریایی کیتین استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*) (میانگین ± انحراف معیار).

باکتری	کاراپاس	چنگک	سینه	پاهای راه روی	Amoxicillin (25µg/disc)
S. aureus	۱۲/۷۶±۰/۲۵	۱۲±۰/۱۱	۱۳/۱۶±۰/۲۸	۱۲/۱۳±۰/۲۳	۱۸/۶۶±۰/۵۷۰
B. subtilis	۹/۵±۰/۴۳	۱۰/۷۳±۰/۴۶	–	–	۲۱/۸۳±۰/۷۵
B. cereus	–	–	–	۸±۰/۱۱	۱۷/۸۳±۰/۷۶
E. faecalis	۱۲/۱±۰/۲۶	۱۱/۱۶±۰/۱۵	۱۰/۷۶±۰/۶۸	–	۲۱/۵±۰/۵
P. aeroginosa	۱۲/۹۶±۰/۱۵	۱۲/۲۶±۰/۳	–	–	۱۹/۵±۰/۵
P. mirabilis	–	–	–	–	۲۴/۱۶±۰/۷۶
E. coli	–	–	–	–	۲۲/۴۳±۰/۵۱
S. marcescens	–	۱۱/۴۳±۰/۵۱	۱۱/۵۳±۰/۵	۸/۹۳±۰/۲	۱۵/۳۳±۰/۵۷
K. pneumonia	۹/۳۳±۰/۱۵	–	–	–	۱۵/۳۳±۰/۲۸
S. entrica	۱۰/۶۶±۰/۵۷	۱۰/۱±۰/۱۷	–	–	۲۱/۱۶±۰/۷۶
Entrobacter sp.	–	–	–	–	۱۰/۱۶±۰/۲۸

(–) عدم هاله‌ی رشد، حروف متفاوت در کنار اعداد هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار و اعداد با حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

در بین سویه‌های باکتریایی و قارچی تنها *S. aureus* نسبت به تمام کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف حساسیت نشان داد. کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس و چنگک بیشترین فعالیت ضد میکروبی را از خود نشان دادند. بیشترین هاله‌ی عدم رشد ۱۷/۸۳±۰/۲۸ و ۱۷/۲۶±۰/۲۵ میلی‌متر (MIC= ۱۲۵ و MBC=µg/ml ۵۰۰) مربوط به *E. coli* و به ترتیب در برابر کیتوزان کاراپاس و چنگک بود.

جدول ٤: هاله‌ی عدم رشد قارچی کیتوزان استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*) (میانگین ± انحراف معیار).

قارچ	کاراپاس	چنگک	سینه	پاهای راه روی	Penicillin(30µg/disc)
A. niger	–	**۱۰/۲۳±۰/۲**	–	**۸/۲٦±۰/۳**	**۱٦±۱**
F. solani	–	–	–	–	**۱۵/۱٦± ۱/۰٤**
C. albicans	**۱۳/۳۳±۰/۳**	**۹/۲٦±۰/۳**	**۸/۲±۰/۳٤**	**۱۱/۲٦±۰/۲۵**	**۱۸/۹±۰/۷۹**

(–) عدم هاله‌ی رشد، حروف متفاوت در کنار اعداد هر ردیف و ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار و اعداد با حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار هست.

جدول ۵: هاله‌ی عدم رشد قارچی کیتین استخراج‌شده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*) (میانگین ± انحراف معیار).

قارچ	کاراپاس	چنگک	سینه	پاهای راه روی	Penicillin(30µg/disc)
A. niger	۹/۲۶±۰/۲۵	–	۹/۵۳±۰/۵۵	–	۱۶±۱
F. solani	–	–	–	–	۱۵/۱۶± ۱/۰۴
C. albicans	۱۲±۰/۱۵	۱۱/۹۳±۰/۳	–	۹/۳۶±۰/۳۲	۱۸/۹±۰/۷۹

(–) عدم هاله‌ی رشد حروف متفاوت در کنار اعداد هر ردیف و ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار و اعداد با حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ٦: MIC و MBC(µg/ml) کیتوزان به‌دست‌آمده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*).

باکتری	کاراپاس		چنگک		سینه		پاهای راه روی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S. aureus	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–	۵۰۰	–	۵۰۰	–
B. subtilis	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–	–	–
B. cereus	۵۰۰	–	۵۰۰	–	–	–	۱۰۰۰	–
E. faecalis	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
P. aeroginosa	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	–	–	–
P. mirabilis	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰	۵۰۰	–	–	–	–
E. coli	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–	–
S. marcescens	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	–	–	–	–	–
K. pneumonia	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
S. entrica	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–
Entrobacter	۲۵۰	۱۰۰۰	۲۵۰	۱۰۰۰	۲۵۰	۱۰۰۰	۵۰۰	–

جدول ۷: MIC و MBC(µg/ml) کیتین به‌دست‌آمده از بخش‌های مختلف اسکلت خارجی خرچنگ (*Portunus segnis*).

باکتری	کاراپاس		چنگک		سینه		پاهای راه روی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S. aureus	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–	–	–
B. subtilis	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
B. cereus	–	–	–	–	–	–	–	–
E. faecalis	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–	–	–
P. aeroginosa	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–	–	–
P. mirabilis	–	–	–	–	–	–	–	–
E. coli	–	–	–	–	–	–	–	–
S. marcescens	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
K. pneumonia	۱۰۰۰	–	–	–	–	–	–	–
S. entrica	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
Entrobacter sp.	–	–	–	–	–	–	–	–

در بین باکتری و قارچ‌های موردمطالعه کمترین حساسیت نیز مربوط به *B. cereus* (۸/۹۳±۰/۳ mm) و *S. marcescens* (۸/۵۳±۰/۵۵ mm) که به ترتیب در برابر کیتوزان استخراج‌شده از سینه و پاهای راه روی به دست آمد. باوجوداینکه کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از سینه و پاهای راه روی برخی از پاتوژن‌ها فعالیت ضد میکروبی داشتند، اما فعالیت آن‌ها از کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس و چنگک کمتر محاسبه شد. رنج تغییرات MIC و MBC به ترتیب بین ۱۰۰۰–۱۲۵ و ۱۰۰۰–۵۰۰ µg/ml محاسبه شد (جدول ۶ و ۷).

بحث و نتیجه‌گیری

محتوی کیتینی خرچنگ *P. segnis* در این مطالعه ۱۵/۷۲±۰/۱۵ درصد محاسبه شد که با نتایج گزارش‌شده به‌وسیله‌ی Tharanathan and Kittur در سال ۲۰۰۳ از اسکلت خرچنگ آبی (۱۴ درصد) و Enstar و همکاران در سال ۲۰۰۸ از اسکلت خرچنگ (۱۶/۷۳ درصد) هم‌خوانی دارد. در مطالعات گذشته گونه‌های دیگر سخت‌پوست ازجمله *Crangon crangon* (۲۱/۵۳ درصد)، pink shrimp (۲۳/۷۲ درصد)، black tiger shrimp (۱۵/۲۵ درصد) (Alishahi *et al*., 2011)، *Portunus pelagicus* (۱۰/۶ درصد) (Al sagheer *et al*., 2009)، *Chionoecetes opilio*(۴۰/۴ درصد) (Hertrampf and Piedal, 2000)، *Potamon potamios* (۶/۸۳ درصد) (Bolat *et al*., 2010)، *Crangon crangon*(۱۷/۸ درصد) و *Penaeus monodon* (۴۰/۴ درصد) (Pratya *et al*., 2007) جهت استخراج کیتین موردمطالعه قرا ر گرفته‌اند. پس از داستیله کردن کیتین مقدار کیتوزان به‌دست‌آمده ۱۲/۸۴±۰/۱۳ درصد محاسبه گردید. Bolat و همکاران در سال ۲۰۱۰ مقدار کیتوزان استخراج‌شده از خرچنگ *Potamon potamios* را حدود ۵ درصد گزارش کردند. در برخی از مطالعات قبلی مقادیر بیشتری از کیتوزان استخراج‌شده از سخت‌پوستان ازجمله ۱۵/۲۵ درصد (Tipparat and Riyaphan, 2008) و ۱۷/۴۸ درصد (Kucukgulmez *et al*., 2011) گزارش‌شده است. همچنین مقدار کیتوزان به‌دست‌آمده از مطالعه‌ی Tajik و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Yen و همکاران در سال ۲۰۰۹ حدود ۳۲/۲-۳۰ درصد گزارش‌شده است. تفاوت در مقدار کیتین و کیتوزان به‌دست‌آمده از اسکلت سخت‌پوستان مختلف به دلایل مختلفی ازجمله گونه، فصل و روش استخراج بستگی دارد (Bolat *et al*., 2010).

در مطالعه‌ی Thirunavukkarasu و همکاران در سال ۲۰۰۵ مقدار کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از پاهای راه روی خرچنگ گونه‌ی *Scylla tranquebarica* بیشتر از دیگر بخش‌ها بود که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. این موضوع با نتایج به دست آمده از مطالعات Isamu و همکاران در سال ۲۰۰۳، Tsung و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Moh و همکاران در سال ۲۰۰۵ تائید می‌شود. این نتایج نشان‌دهنده‌ی این است که فراوانی کیتین در بخش‌های سخت اسکلت سخت‌پوستان کمتر می‌باشد.

بر اساس مطالعات صورت گرفته کیتین، کیتوزان و دیگر مشتقات آن‌ها در برابر بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی فعالیت ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند (Chio *et al*., 2001; Goy *et al*., 2009; Wang *et al*., 1992; Nan *et al*., 2006). همین خاصیت ضد میکروبی کیتین و مشتقات آن‌ها باعث شده تا از آن‌ها در اکثر داروهای ضدعفونی‌کننده‌ی رایج استفاده شود (Chung *et al*., 2003; Kim *et al*., 1997)؛ اما در مطالعات گذشته اطلاعات در مورد خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان حاصل از پوسته‌ی خرچنگ محدود می‌باشد. حضور ترکیبات ضد میکروبی در پوسته‌ی سخت‌پوستان نشان‌دهنده‌ی این است که این ویژگی در محافظت از موجود در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای حاضر در ستون آب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Sasikala and Chitra, 2009). نتایج تحقیق Sasikala and Chitra در سال ۲۰۰۹ نشان داد که کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس میگوی *Macrobrachium rosenbergii* فعالیت ضد میکروبی بیشتری از کیتوزان استخراج‌شده از دیگر بخش‌های اسکلت روی پاتوژن *Vibrio parahaemolyticus* داشت. پس از کیتوزان کاراپاس، کیتوزان استخراج‌شده از چنگک‌ها فعالیت بازدارندگی بیشتری روی پاتوژن مذکور از خود نشان داد. این نتایج بامطالعه‌ی Hirano در سال ۱۹۹۶ که روی *Callinectes sapidus* صورت گرفت قابل‌مقایسه است. در این مطالعه کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس بیشترین فعالیت بازدارندگی رشد را روی پاتوژن‌ها از خود نشان داد. نتایج مشابه دیگری با این مطالعه توسط Varadharajan and Ramesh در سال ۲۰۱۲ گزارش‌شده است. در این مطالعه بیشترین بازدارندگی رشد روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به ترتیب توسط کیتوزان کاراپاس، کیتوزان چنگک و کیتوزان پاهای راه روی دو گونه میگوی *Penaeus monodon* و *Litopenaeus vannamei* مشاهده‌شده است. در مطالعه‌یTipparat and Riyaphan در سال ۲۰۰۸ کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس black tiger shrimp بیشترین فعالیت ضد میکروبی را روی *E. coli* (MIC=۶۲۵ ppm) از خود نشان داد که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. بیشتر بودن خواص ضد میکروبی کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس می‌تواند به دلیل اهمیت حفاظت

کاراپاس از بخش مهم بدن باشد (Sasikala and Chitra, 2009)؛ اما در مطالعه‌ی Sugumar و همکاران در سال ۲۰۱۰ کیتوزان استخراج‌شده از پاهای راه روی و چنگک فعالیت ضد میکروبی بیشتری از کیتوزان استخراج‌شده از کاراپاس روی *S. aureus* از خود نشان دادند.

مکانیسم عمل کیتین و کیتوزان به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی به‌خوبی شناخته‌نشده است. بااین‌وجود مکانیسم قابل‌قبول برای این ویژگی برهمکنش بین بارهای مثبت سطح مولکول کیتین و کیتوزان با بارهای منفی سطح غشای سلولی پاتوژن‌ها می‌باشد (Diaz-Rojas *et al*., 2006)؛ بنابراین کیتوزان به دلیل داشتن بارهای مثبت بیشتر نسبت به کیتین در سطح مولکول خود خواص ضد میکروبی بیشتری دارد که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد (Chen *et al*., 1998; Raafat *et al*., 2008). نتایج مطالعه‌ی Abu Tareg و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز این مسئله را تائید می‌کند. در این مطالعه کیتوزان خواص ضد میکروبی بیشتری را روی *S. aureus* نسبت به کیتین از خود نشان داد. Lim and Hudson در سال ۲۰۰۳ فعالیت ضد قارچی بیشتری را برای کیتوزان نسبت به کیتین گزارش کردند. همچنین در مطالعه‌ی دیگری کیتوزان فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نسبت به کیتین استخراج‌شده از *M. rosenbergii* از خود نشان داد (Benhabiles *et al*., 2012).

میزان حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به کیتین و کیتوزان در مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد. نتایج این مطالعه خواص ضد میکروبی قابل‌توجهی از کیتین و کیتوزان را نشان داد. بین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه‌ی Chen و همکاران در سال ۱۹۹۶ تمامی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حساسیت مشابهی نسبت به انواع کیتوزان داشتند. نتایج تحقیق Abu Tareg و همکار اندر سال ۲۰۱۳ نشان داد که خواص ضد میکروبی کیتوزان روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود. نتایج مطالعه‌ی Chen و همکاران در سال ۱۹۹۸، Chung و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به کیتوزان را تائید می‌کنند؛ اما برخی دیگر از نویسندگان ازجمله Rout و همکاران در سال ۲۰۰۱، Masson و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Alishahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت بیشتر کیتین و کیتوزان را روی باکتری‌های گرم مثبت گزارش کردند. حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به دلیل حضور یک غشای محافظ در اطراف دیواره‌ی سلولی دانست که از دسترسی ترکیبات ضد میکروبی به ترکیبات و بخش‌های حساس داخلی تا حدودی محافظت می‌کند (Isamu *et al*., 2003).

یکی از اولین و مهم‌ترین مسائل در مطالعات ضد میکروبی خواص ضد قارچی ضعیف‌تر نسبت به خواص ضد باکتری می‌باشد (Rout, 2001). نتایج این مطالعه نشان داد که خواص ضد باکتریایی کیتین و کیتوزان استخراج‌شده از پوسته‌ی خرچنگ بیشتر از خواص ضد قارچی آن‌ها بود. خواص ضد قارچی ضعیف‌تر می‌تواند به دلیل تأثیر کمتر ترکیبات ضد میکروبی روی دیواره‌ی سلولی محکم قارچ‌ها دانست که شامل کیتین و گلوکان است (Masson *et al*., 2008). اما در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط Burrows و همکاران در سال ۲۰۰۷ کیتوزان خواص ضد قارچی قابل‌توجهی را از خود نشان داد. بازده ضد میکروبی کیتین و کیتوزان و تفاوت موجود بین این مطالعه با برخی مطالعات قبلی می‌تواند به ۴ دلیل باشد: نوع و سن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کیتین و کیتوزان، منبع کیتین و کیتوزان و شرایط استخراج (Tipparat and Riyaphan, 2008). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و ذخایر قابل‌توجه انواع سخت‌پوستان خلیج‌فارس، می‌توان این پتانسیل بالقوه را جهت استحصال کیتین و کیتوزان موردمطالعه و بررسی قرارداد. ازآنجایی‌که کیتین و مخصوص کیتوزان کاربردهای بسیار زیادی در صنایع پزشکی و دارویی، غذایی، کشاورزی، آرایشی و بهداشتی و بسیاری از صنایع دیگر دارد، نیازمند توجه بیش‌ازپیش به آن می‌باشد.

منابع

Al 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 Polymer, 77(2):410-419.

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H. and Shojaosadati, S. A., 2011. Enhancement and Characterization of Chitosan Extraction from the Wastes of Shrimp Packaging Plants. Journal of polymers and the environment. 19(3):776–783.

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(1): 48-56.

Bolat, Y., Bilgin, S., Gunlu, A., Izci, L., Koca, S. B., Cetinkaya, S. and Koca, H. U., 2010. Chitin-Chitosan Yield of Freshwater Crab (Potamon potamios, Olivier 1804) Shell. Pakistan Veterinary journal, 30(4): 227-231.

Burrows, F., Louime, C., Abazinge, M. and Onokpise, O., 2007. Extraction and evaluation of chitosan from crab exoskeleton as a seed fungicide and plant growth enhancer. American-Eurasian journal of agricultural and environmental sciences, 2(2):103-111.

Chellaram, C., 2009. Bioactive Potential of Coral Associated Gastropod, Trochus tentorium of Gulf of Mannar, Southeastern India. Journal of Medical Sciences, 9(5):240-244.

Chen, M. C., Yeh, G. H. and Chiang, B. H., 1996. Antimicrobial and Physicochemical Properties of Methylcellulose and Chitosan Films Containing a Preservative. Journal of Food Processing and Preservation, 20(5): 379-390.

Chen, C. S., Liau, W. Y. and Tsai, G. J., 1998. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzol chitosan and application to oyster preservation. Journal of food protection, 38(1): 85-97.

Chio, B. K., Kim, K. Y., Yoo, Y. J., OH, S. J., Chio, J. H. and Kim, C. Y., 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixrure against Actonobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans. International Journal of Antimicrobial Agents. 18(6): 553-557.

Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. C. G. and Lin, J. G., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. 'Acta Pharmacol, Sinica, 25:932-936.

Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M. and Li, S. L., 2003. Effect of antibiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. Bioresource Technology, 88(3):179-184.

Deshpande, M. V., 1986. Enzymatic degradation of Chitin and its biological appli cations. Journal of Scientific & Industrial Research 45(6): 273-281.

Díaz-Rojas, E. I., Argüelles-Monal, W. M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J. and Goycoolea, F. M., 2006. Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste.Macromolecular bioscience, 6(5): 340-347.

Entsar, A. S., Khaled S. A. N. and Maher, Z. E., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. Bioresource Technology, 99(5): 1359-1367.

Goy, R. C. D., Britto, D. and Assis, O. B. G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polimeros: Ciencia e Technologia, 19(3): 1-7.

Hertrampf, J. W. and Piedal, P., 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academics Publishers, Dortrecht, the Netherlands, 338-350.

Hirano, S., 1996. Chtin biotechnology application. Biotechnology annual review, 2: 237-258

Isamu, Y., Socichiro, I., Masumi, S., Masataka, S., Akiyoshi, O. and Junzo, T., 2003. The Chitosan prepared from crab tendon: the characterization and the mechanical properties. Biomaterials, 24(12): 2031-2036.

Jung, B., Kim, C., Chio, K., Lee, Y. M. and Kim, J., 1999. Preparation of amphibilic chitosan and their antimicrobial activities. Journal of applied polymer science, 72(13): 1713-1719.

Kim, C. H., Kim, S. Y. and Choi, K. S, 1997. Synthesis and antibacterial activity of water-soluble chitin derivatives. Polymers for advanced technologies, 8, (5): 319-325.

Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H. and Kadak, A. E, 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells.Food Chemistry 126(3): 1144–1148.

Lim, S. and Hudson, S. M., 2003. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. Journal of Macromolecules Sciences, Part C: Polymer Reviews, 43(2):223-269.

Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z. and Yao, K. D., 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of Applied Polymer Science, 79(7): 1324-1335.

Masson, M., Holappa, J., Hjálmarsdóttir, M., Rúnarsson, Ö. V., Nevalainen, T. and Järvinen, T. C., 2008. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. Carbohydrate polymers, 74(3): 566-571.

Moh, M., 2005. Chelating ability of crab shell particles and extracted acetamido groups (chitin and chitosan) from *Portunus* sp. To lead (Pb^{2+}). Journal of coastal development, 9(1): 1-7.

Nan, L., Xi, G. C., Hyun, J. P., Chen, G. L., Cheng, S. L., Xiang, H. M. and Le, J. Y., 2006. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. Carbohydrate Polymer, 64(1): 60-65.

Natarajan, K., Sathish, R., Regupathi, T. and Riyaz, A., 2010. Antibacterial activity of crude extracts of marine invertebrate Polyclinum madrasensis Sebastian. Indian Journal of Science and Technology, 3(3): 303-304.

Marques, A., Encarnação, S., Pedro, S. and Nunes, M. L., 2008. In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against Salmonella enterica. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(10): 2357-2360.

Pratya, C., John, S. and Gauri, S. M., 2007. Chitin extraction from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) waste using organic acids. Separation science and technology, 41(6): 1135-1153.

Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A. and Sahl, H. G., 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Applied and environmental microbiology, 74(12): 3764-3773.

Roller, S. and Covill, N., 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. International Journal of Food Microbiology. 47(1): 67-77.

Rout, S. K., 2001. Physicochemical, functional, and spectroscopic analysis of crawfish chitin and chitosan as affected by process modification (Doctoral dissertation, Dissertation).

Sasikala, S. L. and Chitra, S., 2009. Antibacterial activity of prawn exoskeleton extract against marine and estuarine pathogenic bacteria. Journal of Cell and Tissue Research, 9(3): 1975-1979.

Sugumar, G., Ramesh, U. and Selvan, A., 2010. Susceptibility of crab chitosan against Staphylococcus aureus. Bioreseach Bulletin, 1: 7-9.

Tajik, H., Moradi, M., Razavi Rohani, S. M., Erfani, A. M. and Shokouhi Sabet Jalali, F., 2008. Preparation of Chitosan from Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Cyst Shells and Effects of Different Chemical Processing Sequences on the Physicochemical and Functional Properties of the Product. Molecules, 13(6): 1263-1274.

Tareq, A., Alam, M., Raza, S., Sarwar, T., Fardous, Z., Chowdhury, A. Z. and Hossain, S., 2013. Comparative study of antibacterial activity of chitin and chemically treated chitosan prepared from shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) shell waste. J Virol Microbiol.

Tharanathan R. N. and Kittur F. S., 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. Critical reviews in food science and nutrition, 43: 61-87.

Thirunavukkarasu, N., 2005. Nutritional evaluational and utilization of mud crab Scylla tranquebarica(Fabricius, 1798). Ph.D. Thesis, Annamalai University, India. 127.

Tipparat, H. and Riyaphan, O., 2008. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (Penaeus monodon). Songklanakarin Journal of Science and Technology. 30(1): 1-9.

Tsai, G. J. and Su, W. H., 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. Journal of Food Protection 62(3): 239-243.

Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A., 1989. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and Sandford, P(Eds.). Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. 373- 382.

Varadharajan, D. and Ramesh, S., 2012. Antibacterial activity of commercially important aquaculture candidate shrimp chitin extracts against estuarine and marine pathogens from Parangipettai coast, south east coast of India. Nournal of Microbiology and Biotechnology Research, 2(4): 632-640.

Wang, G. H., 1992. Inhibition and anactivation of five species of food borne pathogens by chitosan. Journal of Food Protection, 55(11): 916-919.

Wang, S. L. and Huang, J. R., 2001. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. Enzyme and microbial technology, 28(4): 376-382.

Yen, M. T., Yang, J. H. and Mau, J. L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. Carbohydrate Polymers, 75(1): 15–21.