

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 و به کارگیری آن روی گاز استریل بیمارستانی

چکیده

زمینه و هدف: در این تحقیق تشکیل نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 و اثر ضد میکروبی این نانو کامپوزیت روی باکتری‌های اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس ارئوس ارزیابی شد.

روش بررسی: برای ارزیابی نتایج از تصاویر میکروسکوپ های الکترونی اسکیننگ SEM و ترانس میشن TEM، طیف IR و UV visible استفاده شد و چگالی نوری (OD) نمونه‌ها نیز توسط دستگاه طیف سنج نوری اندازه گیری شد. سپس اثر این نانو کامپوزیت روی گاز استریل در مجاورت باکتری‌های فوق در محیط کشت جامد مولر هینتون آگار و مایع TSB بررسی شد.

یافته‌ها: نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 با ترکیب کیتوزان به غلظت 4mg/ml و تیتانیوم دی اکسید به غلظت 2٪ تشکیل شد و در انتها مشاهده گردید که این نانو کامپوزیت نزدیک به 100٪ از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرده و در حضور این ماده هیچ باکتری رشد پیدا نکرد.

نتیجه گیری: نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 در محیط کشت و روی گاز میتواند برای کنترل باکتری‌های بیماریزا مفید باشد

واژه های کلیدی: نانو کامپوزیت، نانو کیتوزان، دی اکسید تیتانیوم، اثر ضد میکروبی

محمد مهدی سعادت مند

کارشناسی ارشد مهندسی شیمی نساجی و علوم الباف،
عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد
یزد، یزد، ایران

محمد اسماعیل یزدان شناس

دکترای تخصصی مهندسی نساجی، دانشکده نساجی،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد، یزد، ایران

سعید رضایی زارچی

فوق دکتری نانویوفیزیک، دانشکده علوم پایه، گروه
زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، جمهوری اسلامی ایران

بتول یوسفی تلوری

کارشناس آزمایشگاه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فن
آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان،
گرگان، ایران

مسعود نگهداری

کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، گروه
زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، جمهوری اسلامی ایران

نویسنده مسئول: مسعود نگهداری

تلفن: 09190072275

پست الکترونیک:

masoud_negahdary@yahoo.com

آدرس: دانشگاه پیام نور مرکز تهران، تهران،

ایران

وصول مقاله: 90/10/4

اصلاح نهایی: 91/1/26

پذیرش مقاله: 91/2/4

آدرس مقاله:

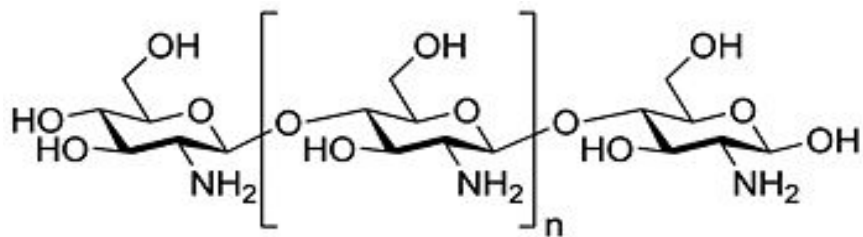
سعادت مند م م، یزدان شناس م ا، رضایی زارچی س، یوسفی تلوری ب، نگهداری م " خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 و به کارگیری آن روی گاز استریل بیمارستانی ". مجله علوم آزمایشگاهی بهار و تابستان، 1391 دوره ششم (شماره 1): 59-72

مقدمه

معمولاً ذرات TiO₂ یک روند جدید برای کاربردهای قابل توجه به عنوان یک ماده چند کاربردی جالب به وجود می آورند. نانو ذرات TiO₂ خواص منحصر به فردی دارند، مانند پایداری بیشتر، دوام طولانی، بی خطر و همچنین در مقابل طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها مقاوم است. نانو ذرات TiO₂ به طور خاصی در مرکز توجه مواد فتوکاتالیستی قرار دارند. در نتیجه TiO₂ را در زمینه‌هایی مثل خود تمیز شوندگی، مواد آنتی باکتریال، مواد مقاوم در برابر UV، تمیز کردن محیط، تصفیه آب و هوا، سنسورهای گازی و سلول‌های خورشیدی با کارایی بالا کاربردی تر می‌کند. خاصیت فعالیت نوری به طور زیادی بستگی به ساختار، میکرو ساختار و خلص سازی پودر آن دارد (7). تکنیک‌های زیادی برای تولید نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به کار گرفته می‌شود، یکی از روش‌های رایج فرایند sol-gel است. Fu و همکارانش روش sol-gel را برای تولید نانوذرات TiO₂ در شکل آناتاز به کار برده اند (8). نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در مواد آنتی باکتریال، خود تمیز شونده، محافظ در برابر UV، و برای تجمع رنگزا در منسوجات و تجزیه کننده‌های نانو برای پیوند عرضی با پلی کربوکسیلیک اسیدها استفاده می‌شوند (7 و 8).

Dawson در تحقیق خود گزارش کرده است که براساس مطالعه Zhao و همکارانش، اضافه کردن نسبت وزن بهینه از هیدروکسیل پروپیل سلولوز (HPC) به نانو ذرات TiO₂ می‌تواند آب دوستی و فعالیت فتوکاتالیستی فیلم TiO₂ را بهبود ببخشد و اثر ضد UV و خواص فیزیکی دیگر نانو کامپوزیت کیتوزان/TiO₂ توسط Hsieh و همکارانش گزارش شده است. تولید Pt/TiO₂، نانو کامپوزیت کیتوزان/TiO₂، TiO₂/SiO₂، کامپوزیت‌های TiO₂/CNTs، TiO₂-هیدروکسی اپاتیت و موارد دیگر هم مورد بررسی قرار گرفته‌اند و گزارش شده‌اند (9). امروزه طرفداران محیط زیست در جهان نهضت‌های بزرگی را در راستای حفاظت از محیط زیست و عدم استفاده از مواد غیر قابل تجزیه و ناسازگار با طبیعت آغاز کرده‌اند. از این رو پلیمرهای طبیعی به علت دارا بودن خاصیت سازگار بودن با محیط زیست بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (10).

صنعت نساجی یکی از صنایع مرتبط با بهداشت افراد در هر گروه سنی و اجتماعی به حساب می‌آید. منسوجات می‌توانند محیط خوبی را برای رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم آورند، مخصوصاً اینکه در رطوبت و دمای مناسب و در تماس با بدن انسان باشند (1). مقصود اولیه از ضد میکروب کردن منسوجات، محافظت منسوجات از متأثر شدن توسط میکروب‌ها، مخصوصاً قارچ‌ها می‌باشد. منسوجات دفاعی، منسوجات فنی مانند ژئوتکس تایل (Geo Textile)، منسوجات خانگی مانند کفپوش‌ها، فرش، پرده‌های پوشاننده، جوراب، منسوجات پزشکی، منسوجات ورزشی و ... همگی باید تکمیل ضد میکروب (Finishing Process) شوند (2). امروزه کاربرد این نوع تکمیل گسترش پیدا کرده است. فناوری‌های اخیر در تکمیل‌های ضد میکروب به طور موفقیت آمیزی در منسوجات مخصوصاً منسوجات پزشکی گسترش یافته است (3). در رابطه با منسوجات، مواد ضد باکتری را می‌توان با روش‌های متفاوت از جمله رمق کشی، پوشش دهی، اسپری و فوم به کار برد، همچنین درمورد پاره‌ای از موارد آنها را مستقیماً در روغن‌های نساجی و یا مذاب پلیمر و یا محلول پلیمر قبل از ریسندهی نخ به کار می‌برند (4). در این پژوهش از دو ماده کیتوزان و تیتانیوم دی اکسید به عنوان مواد ضد باکتری استفاده شد و همچنین اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت حاصل از این مواد روی باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و اشیریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. استافیلوکوکوس ارئوس علت بسیاری از بیماری‌های عفونی است. این باکتری در طبیعت انتشار وسیع داشته و غالباً به صورت میکروفلور طبیعی پوست، بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفسی دیده می‌شوند (5). اشیریشیاکلی در روده بزرگ انسان و حیوان وجود دارد و تنها گونه در این جنس است که در بیماری‌های زای انسان اهمیت دارد، این باکتری از شایع‌ترین علت‌های عفونت ادراری است و به عنوان یک میکروارگانیسم فرصت طلب در عفونت‌های زخم و مننژیت شرکت می‌کند. علاوه بر این برخی از گونه‌های آن عامل عفونت‌های اسهالی هستند (6).



شکل 1- ساختار شیمیایی کیتوزان

کیتوزان به وسیله جابجایی گروه COCH_3 به دست می آید که به آن پروسه د- استیلاسیون گفته می شود. در این حالت سوسپانسیونی از کیتین در NaOH غلیظ تهیه شده و حرارت داده می شود، محصول نهایی کیتوزان است. بعد از پروسه داستیلاسیون، کیتوزان را می توان خشک کرده و به صورت پودر درآورد و یا محلول های اسیدی از آن را تهیه کرد که میزان حلالیتش به درجه د-استیلاسیون آن بستگی دارد. کیتین در محیط های اسیدی یا بازی نامحلول است ولی کیتوزان در محیط های اسیدی ضعیف محلول می باشد (20). کیتوزان یک پلیمر کاتیونیک است که در اثر حرارت دادن کیتین در هیدروکسید سدیم حاصل می شود. بار مثبت موجود به وسیله جذب یون مثبت توسط جفت الکترون آزاد اتم نیتروژن در گروه NH_2 تولید می شود که در طبیعت تقریباً استثنائی می باشد و این مهم به کیتوزان اجازه می دهد که با تمام سطوح بیولوژیکی مانند پوست و مو که بار منفی دارند پیوند ایجاد کند به همین دلیل است که عملکرد آن در علم آرایشی و دارویی دو چندان شده است. بیوپلیمر فوق یک ماده غیر سمی است. خواص کیتوزان تحت تاثیر عواملی چون حالت و خواص فیزیکی کیتین اولیه است و کنترل دقیق پروسه، به خصوص حذف پروتئین و مواد معدنی که بقایای آن به عنوان محصولات جانبی و ناخالصی باقی خواهد ماند، الزامی است (22). کیتین در حقیقت مهمترین پلی ساکارید طبیعی است (سلولز نوع دوم) و کیتوزان نیز مشتقی از آن است که از اسکلت خارجی نوعی هشت پا ویا برخی از ماهی های دریایی استخراج می شود و نام شیمیایی آن N-acetyl -D-glucosamine(2- acetamido- 2-deoxy-D-glucose) است.

ماده اولیه تولید کیتوزان (شکل 1) ، کیتین می باشد. کیتین $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)$ بعد از سلولز فراوان ترین پلیمر طبیعی است. کیتین ماده ای سخت با ساختار کریستالی و سفید رنگ است و ماده اصلی پوسته جانوران دریایی نظیر میگو و انواع خرچنگ دریایی می باشد. همچنین در پوشش خارجی حلزون ها و حشرات و در دیواره سلولی برخی قارچ ها نیز یافت می شود. کیتین یک پلی ساکارید فوق العاده قلیایی می باشد (11). کشورهای مانند هندوستان، ژاپن، لهستان و استرالیا از جمله تولیدکنندگان اصلی این بیوپلیمر به حساب می آیند (12 و 13). بیوپلیمر کیتیناز از سازگاری مناسبی با بافت های زنده برخوردار است و ماده ای غیر سمی و تجزیه پذیر در طبیعت می باشد. البته حلالیت آن کم است و واکنش پذیری ضعیفی دارد (14 و 15) کیتوزان از مشتقات کیتین بوده که با فرآیند دیاستیلاسیون کیتین به دست می آید (16). غالباً کیتوزان را بعنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالای 50 درصد می شناسند. کیتوزان های تجاری معمولاً درصد دیاستیلاسیون بیش از 70 درصد و وزن مولکولی بین 10 هزار تا 1/2 میلیون دالتون دارند (17 و 18). کیتوزان در pH کمتر از 6 به صورت پلی کاتیونی می باشد و به سهولت با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین ها، پلی ساکارید های آنیونی، اسید های چرب و فسفولیپیدها واکنش می دهد، این مسأله می تواند ساختار و بافت محصولاتی را که کیتوزان در تولید آن ها به کار می رود، تحت تاثیر قرار دهد. به دلیل وجود گروه های آمینی در ساختمان کیتوزان، این ماده در محیط های اسیدی از حلالیت بهتری برخوردار است (19). درجه دیاستیلاسیون که نسبت گروه های استیل گلوکز آمین به گروه های آمین موجود در ساختار کیتوزان را نشان می دهد، عامل مهمی در میزان حلالیت و سایر خواص کیتوزان محسوب می شود (20 و 21). بعد از تهیه کیتین،

قرار دادیم. برای حل کردن کیتوزان در این مرحله از اسید استیک که اسید ضعیفی است استفاده شد (25). دلیل اینکه از اسیدهای قوی تر مثل HCl استفاده نکردیم این است که اسیدهای قوی باعث از بین رفتن باکتری‌ها می‌شوند و این مسأله می‌توانست موجب بروز خطا در آزمایشات بشود و در نتیجه اثر ضد میکروبی نانو مواد به طور مستقل مشخص نمی‌گردید.

آماده سازی TiO₂

نانو ذرات TiO₂ از شرکت EVONIK آلمان با نام تجاری AEROXIDE TiO₂ P25 با سایز 21nm خریداری شد. غلظت‌های 0/5، 1 و 2٪ از TiO₂ در آب مقطر استریل تهیه شد و سپس به مدت نیم ساعت تحت امواج ماوراء صوت قرار گرفت تا محلول به صورت سوسپانسیون همگن در بیاید.

آماده سازی محیط‌های کشت

باکتری‌های مورد نیاز، استافیلوکوکوس ارئوس و اشیریشیاکلی از دانشگاه پیام نور یزد تهیه شد. محیط‌های کشت نوترین برات، تریپتی کیس برات و مولر هینتون آگار از شرکت مرک آلمان با همکاری پژوهشکده علوم پایه و نانو فناوری دانشگاه پیام نور یزد خریداری شدند.

ابتدا باکتری‌ها در محیط مایع نوترین به مدت 24 ساعت کشت داده شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند و اثر غلظت‌های مختلف از محلول‌های تهیه شده در محیط کشت مایع تریپتی کیس و محیط کشت جامد مولر هینتون آگار مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر ضد میکروبی کیتوزان

اثر ضد میکروبی کیتوزان در غلظت‌های 0/5، 1، 4 و 8 میلی گرم/ میلی لیتر را در محیط‌های کشت مایع و جامد مورد بررسی قرار دادیم

بررسی اثر ضد میکروبی TiO₂

اثر ضد میکروبی TiO₂ در غلظت‌های 0/5، 1 و 2٪ را در محیط‌های کشت مایع و جامد مورد بررسی قرار دادیم

تهیه نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂

برای تهیه نانو کامپوزیت، غلظت‌هایی از محلول کیتوزان و محلول تیتانیوم دی اکسید انتخاب شد که در مرحله قبل بهترین اثر ضد میکروبی را داشتند سپس محلول کیتوزان را همان طور که گفته شد تهیه کرده و سپس نانو ذره TiO₂

به همین علت در این پژوهش از کیتوزان که از بیوپلیمرهای طبیعی بوده که در خیلی از ارگانسیم‌های طبیعی نیز یافت می‌شوند، استفاده شده است. با توجه به اینکه قبلاً در مورد خاصیت ضد میکروبی کیتوزان و TiO₂ به طور جداگانه تحقیقاتی انجام شده است، لذا انتظار میرفت که با ترکیب این دو ماده به نانو کامپوزیتی دست پیدا کرد که خاصیت ضد میکروبی بهتر و بیشتری داشته باشد. در این پژوهش تشکیل نانو کامپوزیت کیتوزان-تیتانیوم دی اکسید و خاصیت ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

آماده سازی کیتوزان

کیتوزان با درجه دی استیله شدن 75 تا 85٪ از شرکت سیگما آلد ریچ (Sigma-Aldrich, USA) تهیه شد. خواص بیولوژیکی و آنتی باکتریایی کیتوزان وابسته به وزن مولکولی، درجه دی استیله شدن، درجه استخلاف، طول و موقعیت واحدهای گلوکز آمین، pH محلول و از همه مهمتر ارگانسیم هدف می باشد (23). کیتوزان بر حسب وزن مولکولی به دو نوع با وزن مولکولی پایین (LMV) و وزن مولکولی بالا (HVM) تقسیم می شود و این تقسیم بندی بر اساس طول زنجیره کیتوزان صورت گرفته است. ما در این تحقیق از کیتوزان با وزن مولکولی پایین (500000 دالتون) استفاده کردیم. همچنین قابل ذکر است که درجه دی استیله شدن به گروه های فعال آمین در مولکول کیتوزان وابسته هست و در نهایت از اثر دما و سایر عوامل فیزیکی شیمیایی بر روی فعالیت و اثر بخشی یک مولکول کیتوزان نباید چشم پوشی کرد (24). جهت تهیه محلول استوک 10mg/ml به این صورت عمل شد: ابتدا 2 گرم کیتوزان را وزن کرده و در 100ml آب مقطر می ریزیم و سپس 2cc استیک اسید به آن اضافه کرده و به مدت 24 ساعت روی همزن قرار گرفت (25). بعد از 24 ساعت این محلول را با آب مقطر به حجم 200cc رسانده و سپس با استفاده از سود (NaOH) یک مولار pH روی 5 تنظیم شد. سپس با اتوکلاو به مدت 15 دقیقه در دمای 120 درجه سانتیگراد آن را استریل می کنیم (25). سپس از این محلول استوک برای انجام آزمایش، غلظت‌های 0/5، 1، 4 و 8mg/ml را تهیه کرده و مورد استفاده

ابزارهای میکروسکوپی و طیف سنجی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره توسط میکروسکوپ الکترونی مدل DSM960A ZEISS در دانشگاه تهران تهیه شد. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل JEM-200CX تهیه شد. در بررسی های طیف سنجی مرئی-فرابنفش از دستگاه طیف سنج دو پرتویی مدل TU-1901 واقع در پارک علم و فناوری یزد استفاده شد. در مطالعات طیف مادون قرمز از دستگاه طیف سنج مدل IR-470 ساخت شرکت SHIMADZU استفاده شد.

یافته ها

ابتدا اثر ضد میکروبی نانو ذرات کیتوزان و نانو ذرات TiO_2 با غلظت های مختلف به طور جداگانه هم در محیط کشت جامد و هم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت.

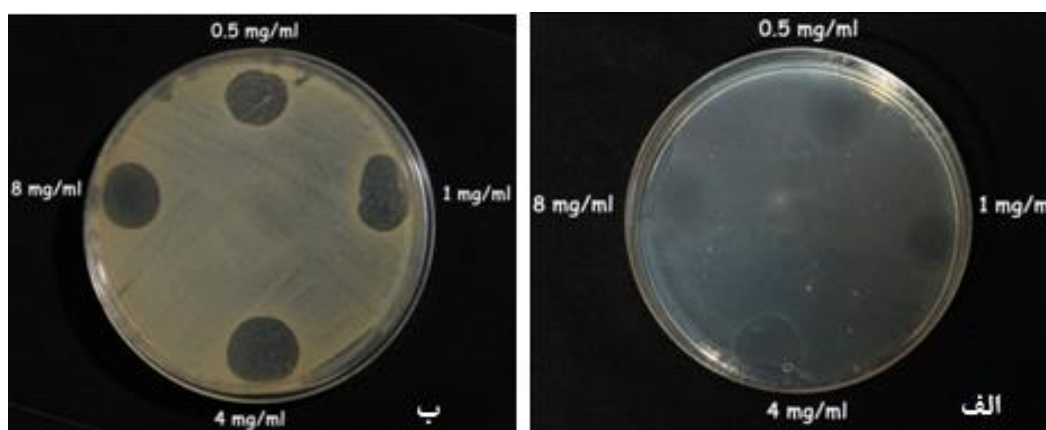
اثر ضد میکروبی کیتوزان

اثر ضد میکروبی کیتوزان در غلظت های 0/5، 1، 4 و 8mg/ml را در محیط های کشت مایع و جامد مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن به صورت زیر است: در محیط کشت جامد مشاهده شد که هم روی باکتری S. aureus و هم روی باکتری E. coli غلظت 4mg/ml درصد بهترین اثر را در مهار رشد باکتری داشته است (شکل 2).

تحت امواج ماوراء صوت به میزان مشخص به کیتوزان اضافه شد. در انتها محلول را در ظرفی ریخته و پس از خشک شدن یک فیلم سفید رنگی تشکیل می شود که نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 می باشد.

قرارگیری نانو کامپوزیت روی گاز استریل

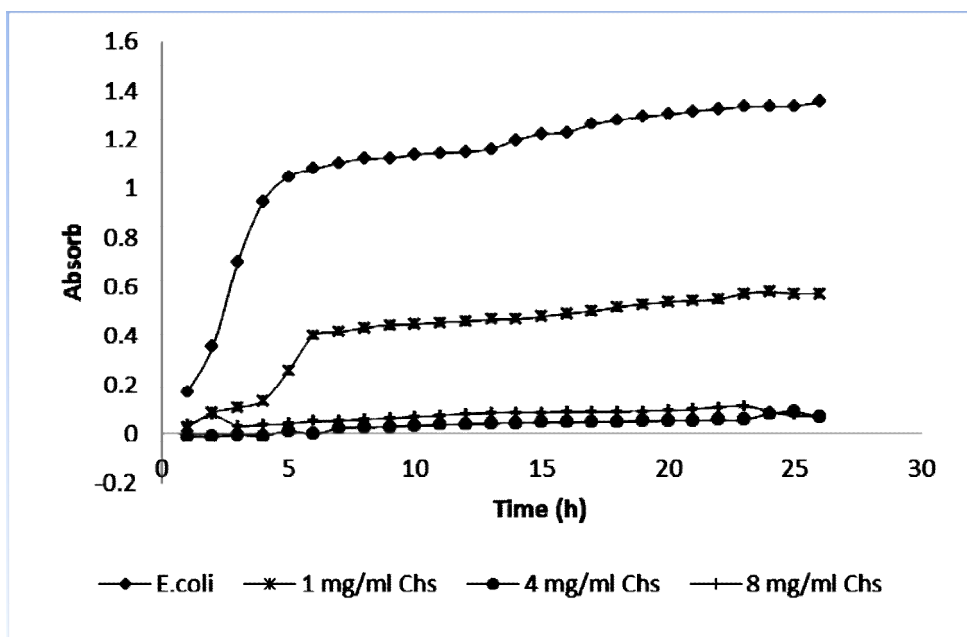
بعد از اینکه نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 به صورت محلول تهیه شد، نوبت به قرار دادن نانو کامپوزیت روی سطح الیاف مورد نظر می رسد تا بتوان اثر ضد میکروبی آن را روی گاز استریل به عنوان یک نماینده از منسوجاتی که مورد استفاده پزشکی دارد مورد بررسی قرار داد. برای قرار دادن نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 روی گاز استریل از روش Dip-Dry-Cure استفاده شد. به این صورت که بعد از اینکه نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 به صورت محلول تهیه شد، ابتدا پارچه به مدت یک ساعت در محلول همراه با التراسونیک قرار داده شد، سپس پارچه را فولارد کرده تا آب اضافی آن خارج شود، و بعد چند بار با آب مقطر آن را شستشو داده تا هم نانو کامپوزیت روی پارچه منعقد شود و هم نانو مواد جذب نشده از سطح پارچه شسته شوند. سپس در دمای 60 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه آن را خشک کرده و در انتها عملیات پخت در دمای 180 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه انجام گرفت.



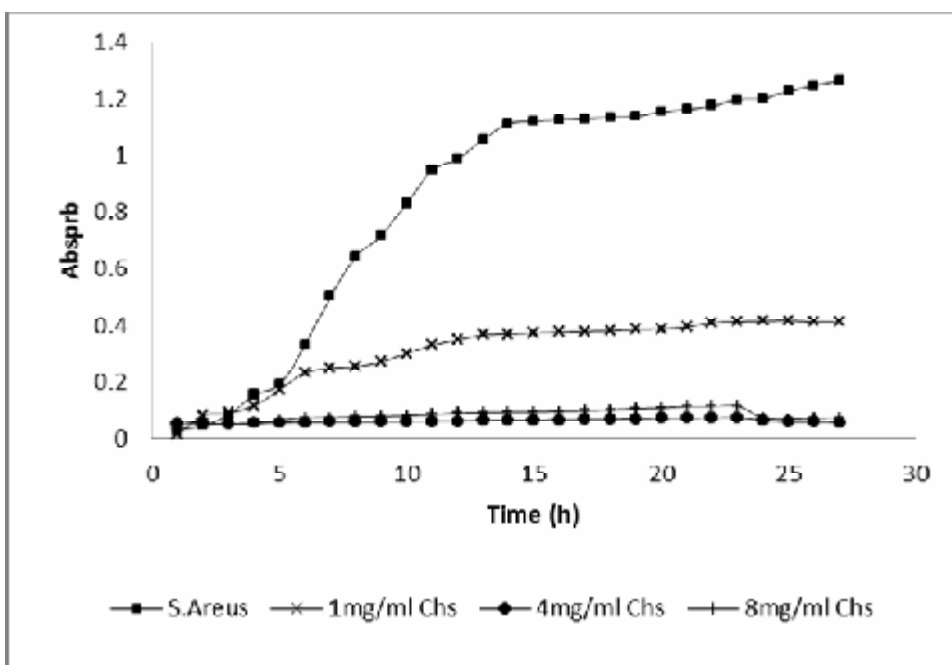
شکل 2- الف - اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری E. coli در محیط کشت جامد ب - اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری S. aureus در محیط کشت جامد

کیتوزان با غلظت های مختلف بررسی و اندازه گیری شد که نتایج به دست آمده در نمودارهای زیر مشخص است. (شکل 3 و شکل 4)

در محیط کشت مایع، روند رشد باکتری هم برای E.coli و هم برای باکتری S.areus به طور جداگانه در حضور نانو ذره



شکل 3- اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری E.coli در محیط کشت مایع



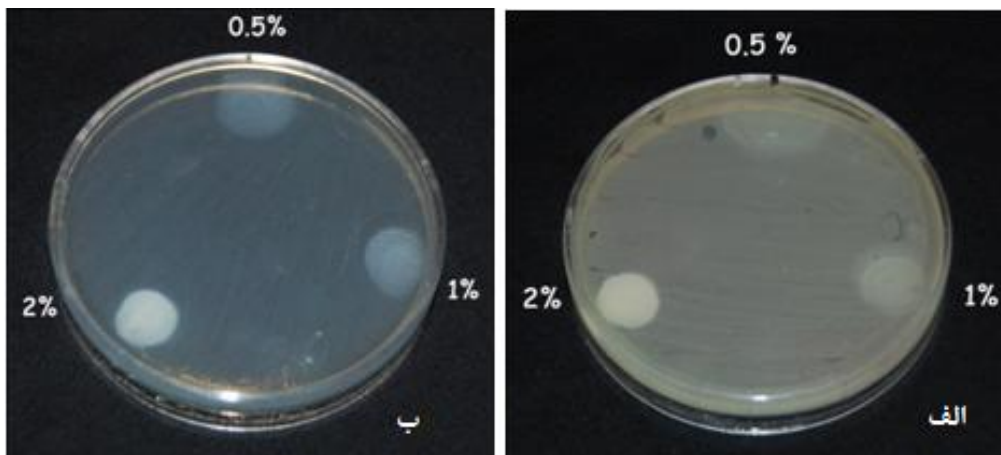
شکل 4- اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری S. areus در محیط کشت مایع

خیلی نزدیک به صفر کاهش داده است.

بررسی اثر ضد میکروبی TiO_2

اثر ضد میکروبی TiO_2 در غلظت های 0/5، 1 و 2٪ در محیط های کشت مایع و جامد مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن به صورت زیر است:
در محیط کشت جامد مشاهده شد که هم روی باکتری *S. areus* و هم روی باکتری *E. coli* غلظت 2 درصد بهترین اثر را در مهار رشد باکتری داشته است (شکل 5).

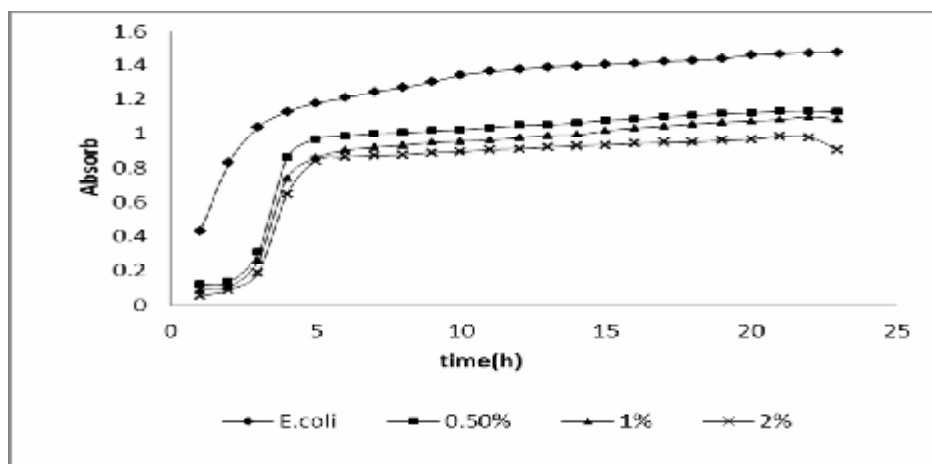
همان طوری که در شکل 4 به وضوح مشخص است با افزایش غلظت نانوذرات کیتوزان فعالیت باکتری *S. areus* کاهش بیشتری می یابد یعنی در واقع یک رابطه مستقیم بین دوز مصرفی نانوذرات و کاهش فعالیت این باکتری وجود دارد. بعد از دوره زمانی مشخص این نتایج بدست آمد که غلظت 8 میلی گرم/ میلی لیتر نانوذرات کیتوزان نسبت به غلظت های دیگر این نانوذره بیشترین اثر مهار کننده را روی باکتری *S. areus* داشته و پس از گذشت 24 ساعت فعالیت این باکتری تا مقادیر



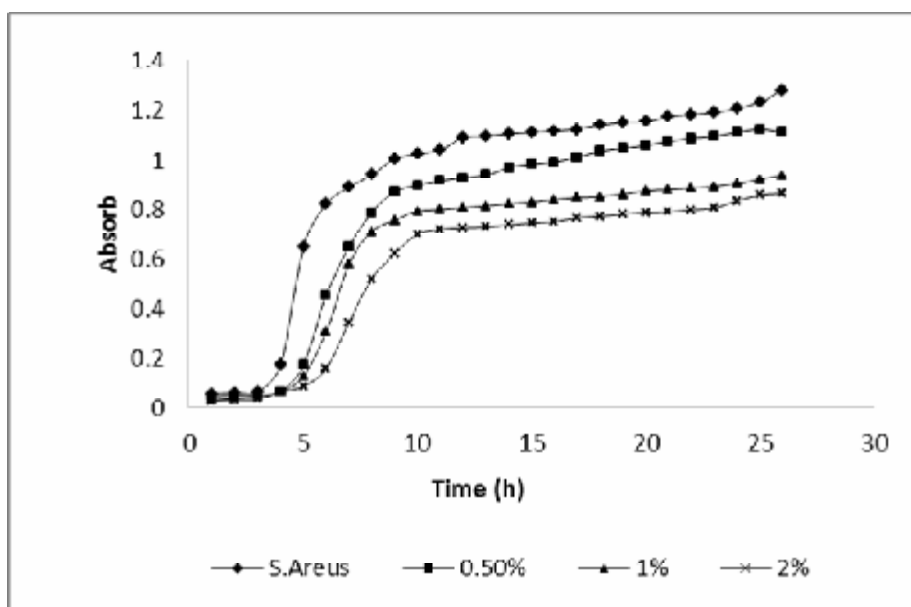
شکل 5- الف- اثر نانو ذره TiO_2 روی باکتری *S. areus* در محیط کشت جامد ب- اثر نانو ذره TiO_2 روی باکتری *E. coli* در محیط کشت جامد

مصرفی نانوذره و کاهش فعالیت باکتریایی وجود دارد. در محیط کشت مایع، روند رشد باکتری هم برای باکتری *E. coli* و هم برای باکتری *S. areus* به طور جداگانه در حضور نانو ذره TiO_2 با غلظت های مختلف بررسی و اندازه گیری شد که نتایج به دست آمده در نمودارهای زیر مشخص است (شکل 6 و 7)

در شکل 5 که مبین نتایج اثر نانو ذره TiO_2 روی باکتری های *E. coli* و *S. areus* در محیط کشت جامد می باشد مشخص است که با افزایش مقدار نانوذره TiO_2 ، قطر هاله ای که باکتری ها تشکیل می دهند کوچکتر شده و نشانه ای از کاهش شدید فعالیت این باکتری ها می باشد که رابطه مستقیمی بین مقدار



شکل 6- اثر نانو ذره TiO_2 روی باکتری *E. coli* در محیط کشت مایع



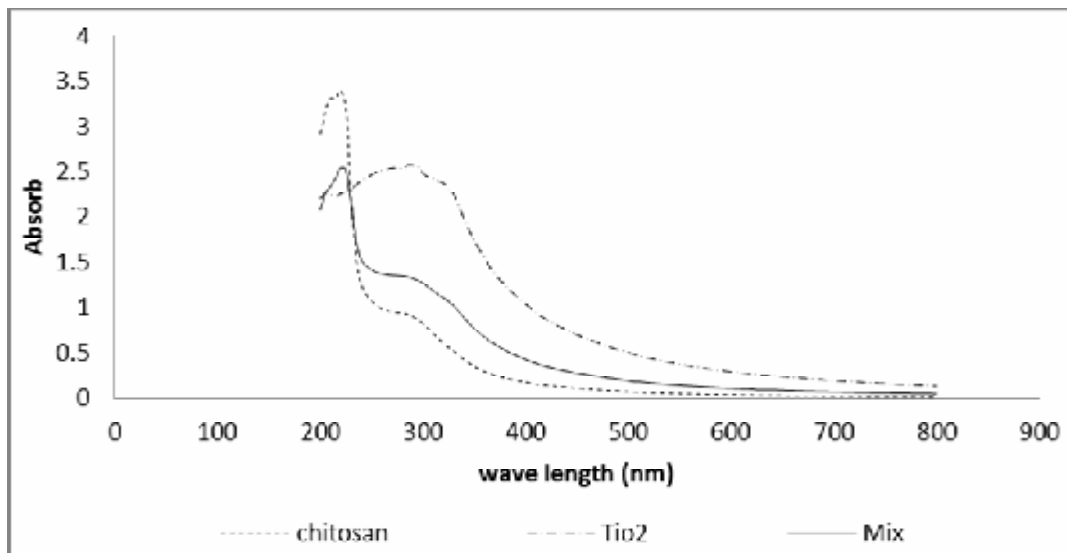
شکل 7- اثر نانو ذره TiO₂ روی باکتری S. aureus در محیط کشت مایع

هو را به حدود 10^{-9} Toor رساندیم. پمپ خلا فرا بالا دستگاه ویژه است که توانایی ایجاد فشار در محدوده 10^{-12} - 10^{-9} را داراست. مدلی از این دستگاه که در این تحقیق استفاده شده طبق مشخصات مدل XIA Model DP-03 ساخت شرکت XIA LLC آمریکا می باشد. تنظیمات این دستگاه به صورت دیجیتال بوده و محدوده فشار با توجه به نیاز اختیاری می باشد. قابل ذکر است که در بخش هایی از تحقیقات جهت ایجاد خلاء از پمپ های نیتروژنی استفاده شد. طیف سنجی انجام شده یک روش تشخیصی برای مواد مختلف محسوب می شود و با توجه به ساختار بیوشیمیایی ویژه کیتوزان، این ماده بیشترین جذب را در محدوده 200 نانومتر دارد که در طول موج های دیگر این جذب کاهش می یابد. و در واقع برای هر ماده ای با توجه به ساختار و نوع پیوندهای شیمیایی، بیشترین جذب در طول موج خاصی رخ می دهد.

سپس تشکیل نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان پیدا کردن از تشکیل نانو کامپوزیت از طیف UV visible، طیف IR و تصاویر TEM استفاده شد و اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ در محیط های کشت جامد و مایع مورد بررسی قرار گرفت.

تست UV visible

از طول موج 200 تا 400 نانومتر تست جذب UV روی محلول کیتوزان، TiO₂ و مخلوط کیتوزان-TiO₂ انجام شد (شکل 8). λ_{max} برای کیتوزان، TiO₂ و مخلوط آنها به ترتیب برابر با 285 و 220 نانومتر بود که همانطور که مشخص است طول موجی که ماکزیمم جذب را دارد برای کیتوزان و برای مخلوط کیتوزان-TiO₂ یکی است و جذب نانو کامپوزیت نسبت به کیتوزان تنها کمتر شده است. که نشان دهنده این است که این دو ماده به خوبی با هم واکنش داده اند و روی یکدیگر تأثیر گذار بوده اند. در مطالعات طیف سنجی با توجه به این موضوع که حضور اکسیژن عامل مخرب بوده و درصد دقت دستگاه را پایین می آورد لذا ما از با استفاده از پمپ خلا فرا بالا (ultra high vacuum pomp ;UHV) استفاده کردیم و فشار

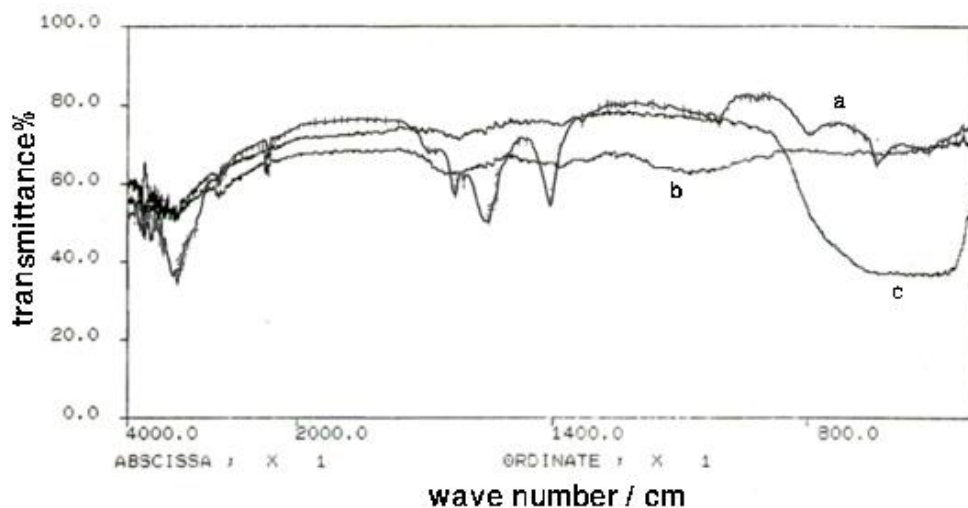


شکل 8- تست UV visible برای محلول کیتوزان، TiO_2 و مخلوط کیتوزان- TiO_2

تست طیف IR

که در شکل مشخص است از مقایسه نمودار نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2 با دو نمودار دیگر می‌توانیم به این نتیجه برسیم که پیوندهای جدیدی بین نانو مواد برقرار شده و هر دو جزء با هم ترکیب شده‌اند و نانو کامپوزیت تشکیل شده است.

طیف IR برای محلول کیتوزان، TiO_2 و مخلوط کیتوزان- TiO_2 توسط دستگاه اینفرارد اسپکتروفتومتر IR-470 کمپانی SHIMADZU به دست آمده‌اند (شکل 9). که همانطور

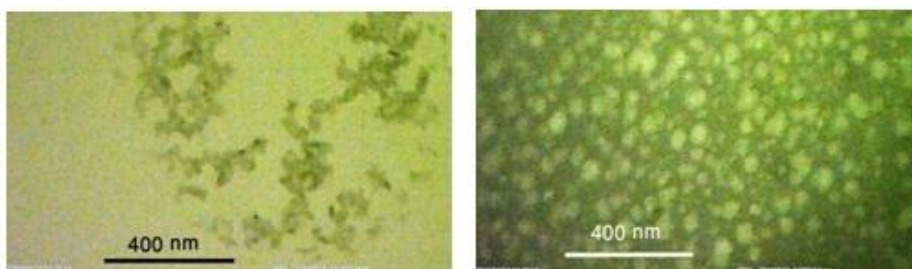


شکل 9: a. طیف IR برای نانو ذرات کیتوزان. b. طیف IR برای نانو ذرات TiO_2 . c. طیف IR برای نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO_2

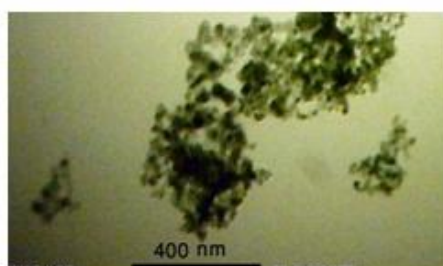
تصاویر TEM

تصاویر می‌توان اثبات کرد که همه اندازه‌ها در مقیاس نانو بوده‌اند (شکل 10).

تصاویر TEM از نانو ذرات TiO₂، نانو ذرات کیتوزان و نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ در زیر آمده است که در این



(ب) نانو ذرات کیتوزان

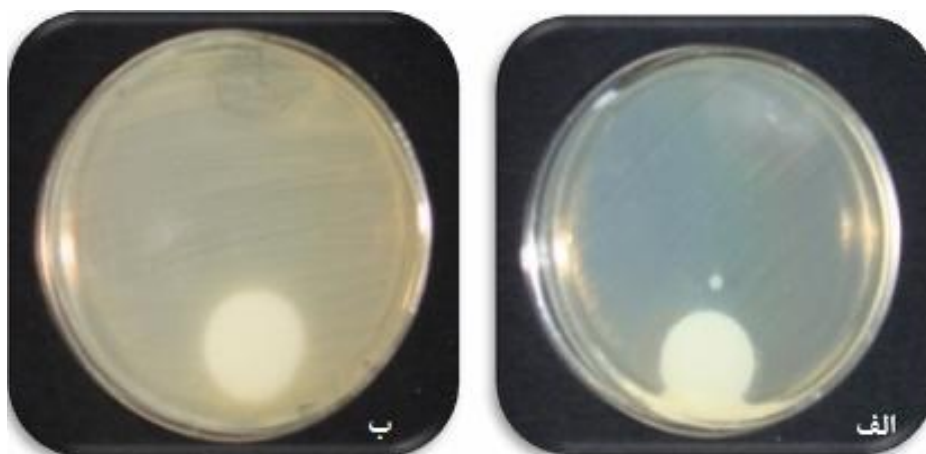
TiO₂ نانو ذرات (الف)(ج) نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂

شکل 10- (الف) تصاویر TEM از نانو ذرات TiO₂، (ب) نانو ذرات کیتوزان و (ج) نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂: اندازه همه مواد موجود در تصویر 400 نانومتر محاسبه شد.

شد که این نانو کامپوزیت از رشد باکتری جلوگیری کرده است که در شکل 11 مشخص است. دایره‌های سفید رنگ محلول نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ می‌باشند که هیچ اثری از رشد باکتری‌ها در جایی که نانو کامپوزیت وجود دارد دیده نمی‌شود.

بررسی اثر نانو کامپوزیت در محیط کشت جامد

ابتدا اثر نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ در محیط کشت جامد بررسی شد که در محیط کشت جامد، این نانو کامپوزیت را به طور جداگانه در تماس با باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارئوس قرار دادیم و با بررسی چشمی مشاهده

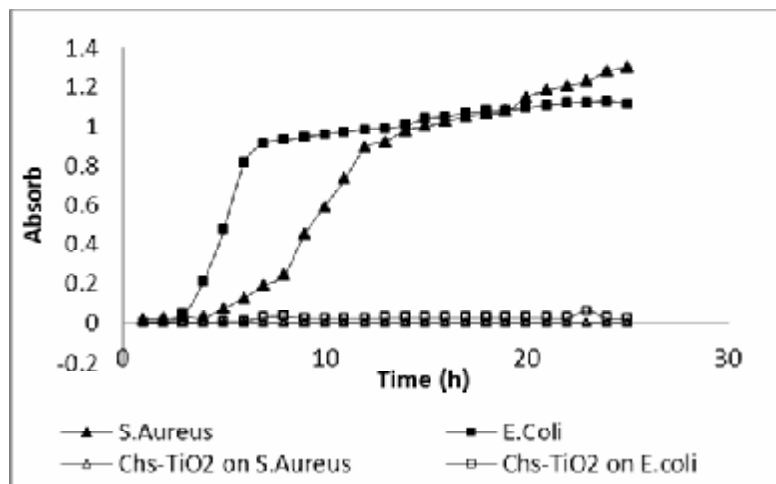


شکل 11- الف: اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ روی باکتری E.coli: اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ روی باکتری S.aureus

اندازه‌گیری شد و اثر نانو کامپوزیت فوق در جلوگیری از رشد باکتری‌ها در (شکل 12) قابل مشاهده است و همانطور که مشاهده می‌شود اثر ضد باکتری نانو کامپوزیت فوق بسیار عالی می‌باشد و باکتری‌ها به هیچ عنوان فرصت رشد پیدا نکرده‌اند. که این یک نتیجه بسیار خوب می‌باشد.

بررسی اثر نانو کامپوزیت در محیط کشت مایع

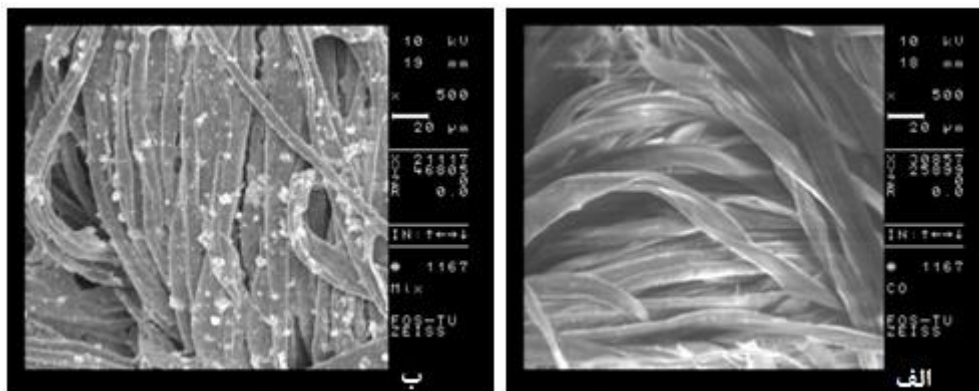
در محیط کشت مایع نیز اثر نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ مورد بررسی قرار گرفت که برای انجام این مرحله از آزمایش از دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتروفتومتر) استفاده شد و OD نمونه‌ها در مقایسه با محیط کشت شاهد هر یک ساعت



شکل 12- اثر نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ بر رشد باکتری‌های S.aureus و E.coli

هیچ میکروبی رشد نیافته است و این نانو کامپوزیت به طور 100 درصد مانع رشد باکتری‌ها شده است. بررسی اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ روی گاز استریل ابتدا تصاویر SEM از گاز استریل حاوی نانو کامپوزیت تهیه شد (شکل 13) که ثابت شود این نانو کامپوزیت روی گاز استریل قرار دارد که این تصاویر با بزرگنمایی 500 برابر توسط میکروسکوپ ZEISS DSM960A در دانشگاه تهران تهیه شده است و توسط دستگاه BALZERS SCD004 پوشش دهی طلا داده شد.

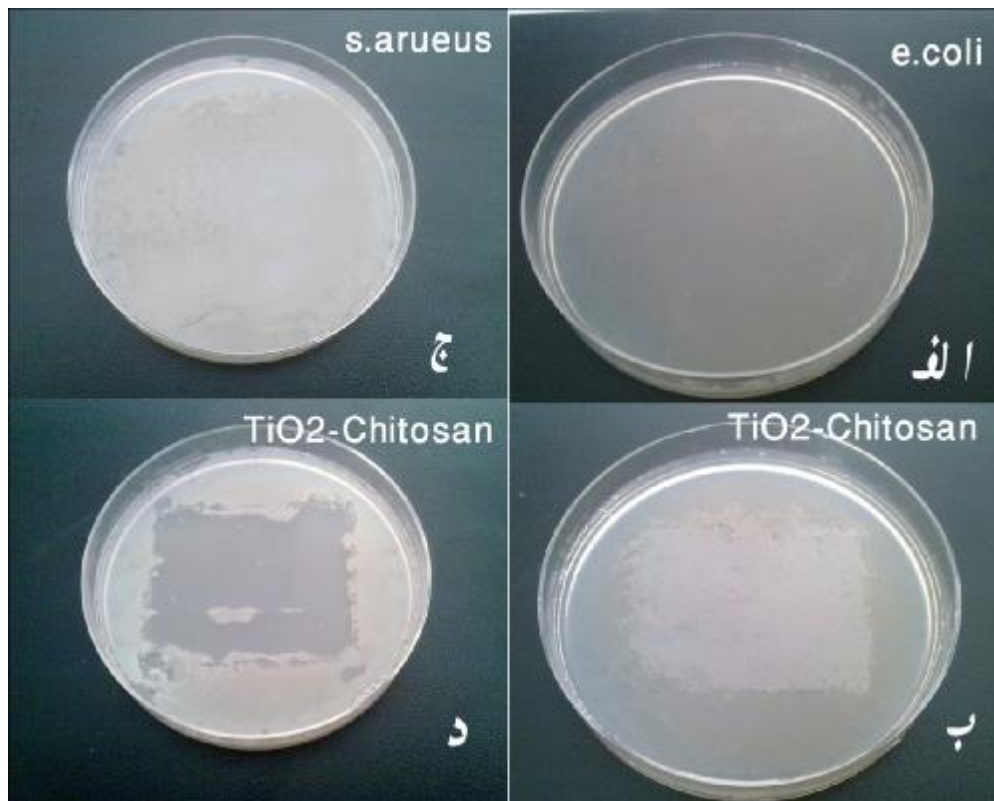
این نمودار و نمودارهای قبلی که بررسی اثر ضد میکروبی در محیط کشت مایع را نشان می‌دهند به این صورت هستند که از روی مقایسه تغییر شفافیت محلول‌ها در مقابل محلول شاهد، میزان چگالی نوری آنها تغییر کرده است و در نتیجه جذب تغییر خواهد کرد. این شکل بیان می‌کند که چگالی نوری محیط کشت مایع در حضور همزمان باکتری و نانو کامپوزیت برابر است با چگالی نوری محیط کشت شاهد که از ابتدا فاقد هرگونه باکتری بوده است. پس نتیجه‌ای که از شکل 12 گرفته می‌شود این است که در حضور نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂



شکل 13- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره الف: پارچه خام، ب: پارچه حاوی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂

کشت مشاهده شد که این تصاویر به صورت زیر می‌باشد (شکل 14)

سپس گازهای استریل را در محیط کشت جامد برای هر دو باکتری قرار داده پس از 24 ساعت اثر آن‌ها روی محیط



شکل 14- اثر گاز استریل حاوی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ بر رشد باکتری‌های *S.aureus* و *E.coli* در محیط کشت جامد

بحث و نتیجه گیری

بررسی تولید نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ و مطالعه خاصیت ضد میکروبی آن برای اولین بار انجام شده است و در بررسی‌های به عمل آمده در اجرای این پژوهش، هیچ پیشینه‌ای در این زمینه در پایگاه‌های اطلاعاتی مشاهده نگردید. اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ به طور جداگانه روی باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارئوس، هم در محیط کشت جامد و هم در محیط کشت مایع مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت و مشاهده شد که کیتوزان با غلظت 4mg/ml و تیتانیوم دی اکسید با غلظت 2% بهترین تأثیر را در فرایند ضد میکروبی از خود نشان داده‌اند، به همین دلیل انتخاب غلظت‌های فوق برای تولید نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ مناسب بوده است. برای بررسی تشکیل نانو کامپوزیت، تست طیف IR و

در شکل 14 قسمت الف و ب محیط کشت باکتری *E.coli* است که قسمت (الف) گاز استریل بدون حضور نانو کامپوزیت می‌باشد و مشاهده می‌شود که باکتری در همه جای پلیت رشد کرده است. اما در قسمت (ب) گاز استریل حاوی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ است که همانطور که مشاهده می‌شود در مرکز پلیت هیچ نوع باکتری رشد نکرده است. همچنین قسمت (ج) و (د) محیط کشت برای باکتری *S.aureus* می‌باشد. که در قسمت (ج) گاز استریل بدون حضور نانو کامپوزیت می‌باشد و مشاهده می‌شود که باکتری در همه جای پلیت رشد کرده است. اما در قسمت (د) گاز استریل حاوی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ است که همانطور که مشاهده می‌شود در مرکز پلیت هیچ نوع باکتری رشد نکرده است.

این نانو کامپوزیت روی گاز استریل بسیار مفید می‌باشد. همچنین این نانو کامپوزیت را می‌توان در کلیه منسوجات بیمارستانی شامل لباس‌های بیماران و ملحفه‌های مورد استفاده در بیمارستان‌ها و حتی منسوجات دیگر مانند منسوجات نظامی و ورزشی که در معرض باکتری‌های مختلف می‌باشند، استفاده کرد.

پیشنهاد می‌شود که موضوعات اشاره شده زیر جهت بررسی بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد:

- امکان سنجی بهبود و التیام زخم با استفاده از نانو کمپوزیت بر زخم ایجاد شده بر روی موش آزمایشگاهی
- تحقیق بر روی نحوه چگونگی تولید صنعتی و استفاده از پودر نانو کامپوزیت در صنایع دیگر مانند بسته بندی مواد غذایی و لوازم خانگی و ...
- بررسی امکان تولید الیاف مصنوعی ضد باکتری به همراه ترکیبی از این نانو کامپوزیت در فرایند تولید الیاف

References

- 1- Askew P. *Measuring activity in antimicrobial textiles*. Chemistry Today. 2009; 27(1):16-20.
- 2- Merritt, J. *Causes, detection, and prevention of mold and mildew on textiles*. Conserve O Gram Washington, D.C.: National Park Service, 1993; 16(7): 1-10.
- 3- Isabel C. Gouveia, *Nanotechnology: A new strategy to develop non-toxic antimicrobial textiles*. Technology and education in applied microbiology, 2010; 2 (3):407-414.
- 4- Gao Y and Cranston R. *Recent advances in antimicrobial treatments of textiles*. Textile Research Journal. 2008; 78(1):68-72.
- 5- Jawetz, Melnick, & Adelberg's, *Medical Microbiology*, 24th edition, 2011; 24:27-78.
- 6- Papispyrides CD, Pavlidou S, Vouyiouka SN. *Development of advanced textile materials: natural fibre composites, antimicrobial, and flame-retardant fabrics*. J. Materials: Design and Applications. 2009; 5(2):91-102.
- 7- K.Han, M.Yu, *Study of the preparation and properties of UV-blocking fabrics of a PET/TiO₂ nano composite prepared by insitu poly condensation*. Journal of Applied Polymer Science. 2006; 100(3):1588-1593.
- 8- G.Fu, P.Vary, C.T.Lin, *Anatase TiO₂ nano composites for antimicrobial coatings*. Journal of Physical Chemistry B109. 2005; 18(6):8889-8898.
- 9- T.L.Dawson, *Nano materials for textile processing and photonic applications*. colorimetric Technology. 2008; 124(5):261-272.

تست UV visible انجام شد و همچنین تصاویر TEM از نانو مواد و نانو کامپوزیت تهیه شد که این تصاویر برای اثبات این هستند که مواد در مقیاس نانو به کار گرفته شده‌اند. سپس خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت فوق مورد بررسی قرار گرفت که پس از انجام آزمایش‌ها هم در محیط کشت مایع و هم در محیط کشت جامد مشاهده شد که نانو کامپوزیت تهیه شده به طور کلی رشد باکتری‌ها را مهار کرده است. در انتها اثر نانو کامپوزیت روی گاز استریل در مجاورت باکتری‌های فوق در محیط کشت جامد بررسی شد که در این مرحله هم مشاهده شد که نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ باعث عدم رشد باکتری‌ها شده است. همچنین از اتصال نانو مواد به گاز استریل هم تصاویر SEM تهیه شد.

با توجه به اثبات خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO₂ در این تحقیق، و اهمیت عدم وجود باکتری در محیط زخم که با گاز استریل پانسمان می‌شود، به کار گیری

- 10- Lawrie G, Keen I, Drew B, Temple A, Rintoul L, Fredericks P, Grondahl L. *Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS*. Biomacromolecules. 2007; 8(4):2533-2541.
- 11- Rinaudo, M, *Chitin and chitosan: Properties and applications*, Polymer Science, 2006; 31(1): 603-632.
- 12- Shahidi, F, *Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (Chinocetesopilio) and shrimp (Pandalus borealis) processing discards*, Journal Agric. Food Chem. 1991; 39(3): 1532-1572.
- 13- steckel, H, *Production of chitosan pellets by extrusion/spherinization*. European Journal Pharm. Biophar. 2003; 46(1):1-6.
- 14- Jia, Z, *Synthesis and anti bacterial activity of chitosans of quaternary ammonium salt of chitosan*. Carbohydrate Research. 2001; 33(2): 1-6.
- 15- Khalid, M. N, *Water state characterization, swelling behavior, thermal and chemical properties of chitosan networks*. European Journal Phar. Science. 2002; 15(3): 425-432.
- 16- Alves N, Picart C, Mano J. *Self-Assembling and Crosslinking of Polyelectrolyte Multilayer Films of Chitosan and Alginate Studied by QCM and IR Spectroscopy*. Macromolecular Bioscience. 2009; 9(3):776-785.

17- Benjakul, S, *Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred gar fish (Hemiraphus far.)*, Journal Science Food Agric. 2000; 81(1):102-108.

18- No, H. K, *Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights*. Int. Journal Food Microbiology. 2002; 74: 65-72.

19- Chen, C. S, *Antibacterial of N-sulfonated and Nsulfo benzoyl chitosan and application to oyster preservation*, Journal Food Prot. 1998; 621(9):1124-1128.

20- Watts, B, *Basic Sensory Methods for Food Evaluation*, International Development Research Center. Ottawa, Canada. 1998; pp:140-162.

21- Matsuhashi, S, *Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation*. Journal Science Food Agric. 1997; 73(3): 237-241.

22- Hernandez-Lauzardo A.N.; Bautista-Banos. S; Velazquez-del Valle M.G; Mendez-Montealvo M.G.; Sanchez-Rivera M.M.; Bello-Pe´rez L.A.; *Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of Rhizopusstolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill.* Carbohydrate Polymers. 2008; 73(4):541-547.

23- Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z & Yao KD. *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan*. **J Appl Polym Sci**. 2001; 79(4): 1324-1335

24- Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G & Steurbaut W. *Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action*. Bio macromolecules. 2003; 4(6): 1457-1465.

25- El-Hefian EA, Elgannoudi ES, Mainal A, Yahaya AH. *Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies*. Turk J Chem. 2010; 34 (2): 47 - 56.