

بررسی تاثیر میزان نقره نفوذی بر روی خاصیت ضد میکروبی سطح لعاب

فائزه مهدی زاده^{۱*}، علی نعمتی^۲، محمد رضا فاضلی^۳

۱- کارشناس ارشد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استاد، دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۳- استاد، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* faezeh.mehdizadeh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۱/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۰۱)

چکیده:

در این تحقیق تاثیر میزان نقره بر روی فعالیت ضد میکروبی سطح لعاب، به وسیله اعمال پوششی حاوی مقادیر مختلفی از نیترات نقره از ۱۰ wt% تا ۵۰ wt% بر روی سطح لعاب بررسی شده است. نتایج بررسی ها نشان دهنده این مطلب است که با افزایش میزان نیترات نقره در پوشش، سطح لعاب حاوی مقادیر بیشتری یون نقره می باشد. با بررسی فعالیت ضد میکروبی سطح لعاب، مشخص شد که سطح لعاب، با افزایش میزان نقره در مدت زمانی کوتاه (بعد از ۲ ساعت) خاصیت ضد میکروبی قوی را در برابر باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس نشان می دهد. با استفاده از SEM, XRF حضور نقره و میزان نقره در سطح لعاب بعد از نفوذ مورد تایید قرار گرفته است.

واژه های کلیدی:

ضدمیکروبی، نقره، لعاب، نفوذ

۱- مقدمه

ویژگی خاصی داشته باشد. در همین راستا محققین ساخت لعاب های با خواص فیزیکی و شیمیایی مختلفی مانند خاصیت ضد سایش، ضد خوردگی، ضد میکروبی و ... را آغاز کرده اند [۱-۲]. برای ساختن لعاب های آنتی باکتریال از فلزات مختلفی به عنوان عامل ضدمیکروبی استفاده شده است. از میان این فلزات، می توان به نقره، طلا، روی، جیوه اشاره کرد. اما نقره و ترکیبات آن به عنوان عامل ضد میکروبی قوی قادر به مقابله با میکروارگانیسم ها و مانعی برای رشد و تکثیر آنها است، در زمینه های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است [۳-۴].

چندین نظریه برای تشریح نحوه ممانعت یون نقره در برابر تکثیر باکتری ها پیشنهاد شده است. در میان این نظریات، بیان شده که

لعاب به عنوان یک پوشش از چندین هزار سال پیش برای پوشاندن سطح سرامیک ها استفاده شده است. این پوشش به صورت یک لایه نازک سطح سرامیک را می پوشاند و علاوه بر این که باعث زیبایی محصولات سرامیکی می شود پایداری شیمیایی آنها را نیز افزایش می دهد. با وجود لعاب، سطح این محصولات جذب آب نداشته و دارای سطح صافی است که به راحتی قابل تمیز کردن است. از طرفی به خاطر وجود لعاب، سطح محصول کمتر دچار صدمه و یا آسیب خواهد شد. این محصولات در بخش های مختلفی مانند مصارف خانگی، هتل ها، بیمارستان ها و ... به طور گسترده ای استفاده می شوند. به همین جهت نیاز است که متناسب با محیط مورد مصرف، سطح لعاب

که از جمله آن‌ها می‌توان به روش‌های سل-ژل، رسوب از فاز مایع و... اشاره کرد. اما روش بکار گرفته شده علاوه بر این که روشی ساده‌تر و عملی‌تر نسبت به روش‌های ذکر شده است از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه‌تر می‌باشد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- آماده سازی زیر لایه

در این مقاله کاشی لعاب دار به عنوان زیر لایه انتخاب شده است. پس از تهیه دوغاب لعاب معمولی به روش متداول، دوغاب بر روی بدنه سرامیکی اعمال شده است. پس از خشک شدن لعاب در دمای $100 \pm 5^\circ\text{C}$ نمونه‌ها در دمای $1030 \pm 5^\circ\text{C}$ به مدت ۴۵ دقیقه پخت می‌شوند. پس از این، نمونه‌ها به ابعاد $4 \times 5 \times 5 \text{ mm}$ برش زده شده و سطح آن‌ها توسط آب مقطر کاملاً شسته و خشک می‌شود.

۲-۲- نفوذ عنصر نقره

برای نفوذ نقره بر روی سطح لعاب روش‌های مختلفی وجود دارد. اما از آنجائی که روش پوشش کلئیدی، روشی ساده‌تر، کم هزینه و عملی‌تر برای نفوذ نقره است. در این مقاله از این روش برای نفوذ عنصر نقره استفاده شده است.

برای تهیه پوشش، نیترات نقره را به همراه اکسید روی، CMC (کربوکسی متیل سلولز)، گلیسرین و آب به مدت ۱۰ دقیقه با هم مخلوط نموده تا یک پوشش کاملاً هموژن حاصل شود و سپس بر روی سطح لعاب که از قبل تمیز شده اعمال می‌گردد. بعد از اعمال پوشش، نمونه‌ها در دمای $100 \pm 5^\circ\text{C}$ خشک شده و در حدود ۳۰ دقیقه در دمای 600°C تحت عملیات حرارتی قرار می‌گیرند. بعد از عملیات حرارتی، سطح نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو شده تا مواد زائد باقی مانده از پوشش بر روی سطح لعاب کاملاً پاک شود. بعد از خشک شدن سطح لعاب، مراحل تهیه لعاب آنتی باکتریال به پایان می‌رسد.

در این تحقیق برای بررسی تاثیر میزان نقره بر روی خاصیت آنتی باکتریالی سطح لعاب، ۳ گروه نمونه با اعمال مقادیر مختلفی از ماده ضد میکروبی (نیترات نقره) در پوشش، تهیه شده است. به

بار مثبت نقره یک عامل مهم برای خاصیت ضد میکروبی آن می‌باشد. زیرا یون‌های نقره با بار مثبت در اثر جاذبه الکترواستاتیکی جذب غشاء سلولی باکتری که دارای بار منفی است، خواهند شد [۵-۶]. از طرف دیگر یون‌های جذب شده به سطح سلول با گروه‌های SH آنزیم‌ها و پروتئین‌ها وارد واکنش شده و در نهایت منجر به غیر فعال شدن پروتئین‌ها و اختلال در عملکرد DNA می‌شوند [۷].

تمامی این پدیده‌ها باعث صدمات برگشت ناپذیر و یا حتی مرگ میکروارگانیسم‌ها خواهد شد. لعاب‌های آنتی باکتریال عمدتاً به وسیله ترکیب کردن مواد ضد میکروبی با دوغاب لعاب و اعمال آن بر روی بدنه سرامیکی ایجاد شده‌اند. اما از معایب این روش این است که خاصیت ضد میکروبی لعاب متأثر از فرآیند پخت لعاب می‌باشد. بدین صورت که با توجه به اینکه دمای ذوب نقره در مقایسه با دمای پخت لعاب، پائین‌تر است، در حین فرآیند پخت لعاب، نقره به عنوان ماده ضد میکروبی در اثر دمای بالا در درون لعاب حل شده و یا حتی گاهی تبخیر خواهد شد. به علاوه وجود نقره در درون دوغاب لعاب باعث کاهش پایداری لعاب شده که نیاز است، لعاب مدت زمان طولانی‌تری را تحت حرارت قرار گیرد که این خود باعث کاهش بیشتر خاصیت ضد میکروبی لعاب خواهد شد. بر همین اساس در این مقاله از روش پوشش کلئیدی برای نفوذ نقره بر روی سطح کاشی لعاب دار و ایجاد خاصیت ضد میکروبی بر روی سطح آن استفاده شده است.

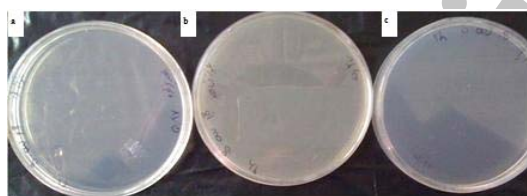
هدف از استفاده از روش پوشش کلئیدی، علاوه بر برطرف کردن معایب ذکر شده در بالا، ایجاد حداکثر خاصیت ضد میکروبی با حداقل میزان ماده ضد میکروبی بوده است. زیرا در صورت ترکیب ماده ضد میکروبی با دوغاب لعاب و اعمال آن بر روی بدنه، حجم زیادی از ماده ضد میکروبی در لایه‌های زیرین لعاب (نزدیک بدنه) که تاثیری بر روی خاصیت ضد میکروبی ندارد، قرار می‌گیرد. در صورتی که در روش پوشش دهی می‌توان این عیب را نیز مرتفع نمود.

روش‌های متعددی برای پوشش دهی بر روی لعاب وجود دارد

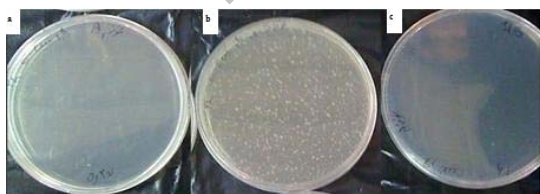
باکتری در نظر گرفته شده است.

۳- نتایج و بحث

برای یافتن دمای بهینه عملیات حرارتی، نمونه‌ها را در دمای 800°C و 600°C تحت عملیات حرارتی قرار داده می‌شود. با انجام تست ضد میکروبی در شرایط کاملاً یکسان و بررسی نتایج حاصل از آن مشخص شده که علاوه بر این که نتایج دستخوش تغییر نشده، بلکه کیفیت سطحی لعاب نیز با اعمال دمای 800°C کاهش یافته است. به همین جهت دمای 600°C را به عنوان دمای عملیات حرارتی بهینه انتخاب گردید. در شکل (۱ و ۲) نتایج تست میکروبی نمونه H را که در دو دمای مورد نظر عملیات حرارتی شده، به ترتیب در برابر دوباکتری S.aureus و E.coli نشان داده شده است. همان‌طور که در تصاویر کاملاً واضح است نمونه H در برابر هر دو باکتری و در هر دو دمای عملیات حرارتی به خوبی عمل کرده و در مقایسه با نمونه شاهد (b) و (b) ۲ تمامی میکروارگانیسم‌ها را از بین برده است.



شکل (۱): نتایج تست آنتی باکتریال: (a) نمونه H در دمای عملیات حرارتی 600°C ، (b) نمونه شاهد و (c) نمونه H در دمای عملیات حرارتی 800°C در برابر باکتری استافیلوکوک اورئوس در غلظت 10^8 cfu/ml



شکل (۲): نتایج تست آنتی باکتریال: (a) نمونه H در دمای عملیات حرارتی 600°C ، (b) نمونه شاهد و (c) نمونه H در دمای عملیات حرارتی 800°C در برابر باکتری اشرشیاکلی در غلظت 10^8 cfu/ml

با اعمال پوشش بر روی سطح لعاب و عملیات حرارتی آن در

جهت بررسی تاثیر میزان ماده ضد میکروبی بر روی خاصیت ضد میکروبی سطح لعاب، در این روش تمامی مراحل تهیه در ۳ گروه نمونه یکسان در نظر گرفته شده است. اسامی ۳ گروه نمونه با توجه به میزان نیترا نقره در پوشش کلونیدی با حروف (H, M, L) نام گذاری شده‌اند (جدول (۱)).

جدول (۱): دما و زمان عملیات حرارتی و میزان ماده ضد میکروبی ۳

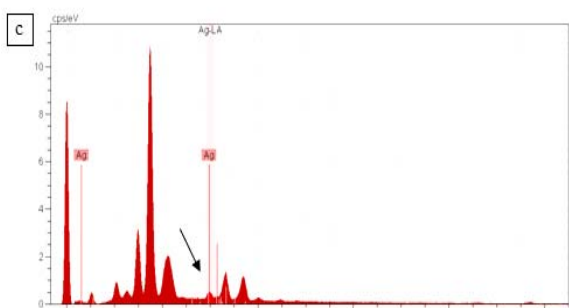
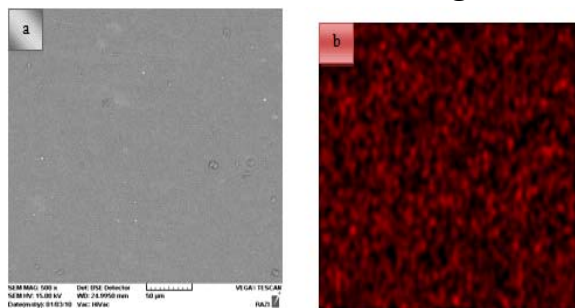
گروه از نمونه‌ها			
نمونه	دمای عملیات حرارتی ($^{\circ}\text{C}$)	زمان عملیات حرارتی (min)	میزان ماده ضد میکروبی
H	600°C	۳۰	۵۰٪
M	600°C	۳۰	۳۰٪
L	600°C	۳۰	۱۰٪

۳-۲- آزمون ضد میکروبی

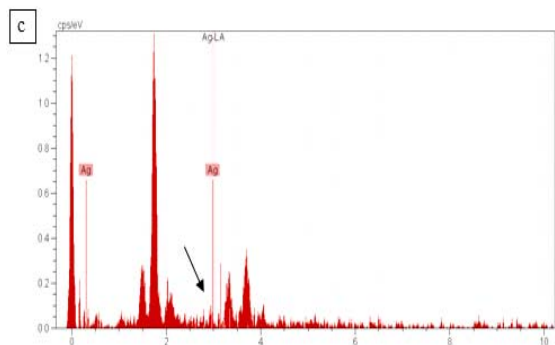
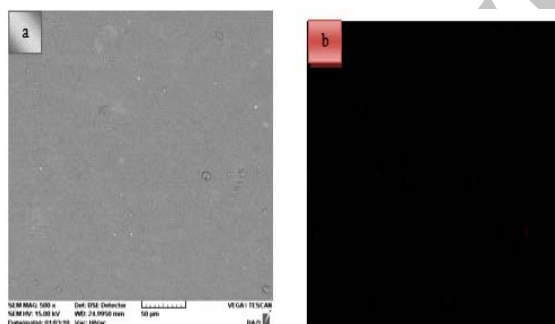
ابتدا نمونه‌ها در درون اتوکلاو در دمای 200°C به مدت ۲ ساعت استریل شده و کلونی‌های E.Coli و S.aureus بر روی محیط کشت در دمای 37°C برای مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. نمونه‌های استریل شده در درون پلیت‌های استریل قرار می‌گیرند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سرم فیزیولوژی و باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml به صورت قطره‌ای بر روی سطح لعاب قرار می‌گیرد.

نمونه‌ها در دمای 37°C در طی مدت زمان‌های متفاوت ۱، ۲، ۳، ۶، ۲۴ ساعت در درون انکوباتور قرار می‌گیرند. بعد از سپری شدن مدت زمان‌های قید شده، قطره حاوی باکتری از روی سطح نمونه‌ها به وسیله ۵ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر (PBS) شسته می‌شود و در درون پلیت استریل ریخته می‌شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول شسته شده را در درون محیط کشت پخش نموده و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت در درون انکوباتور قرار داده می‌شود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد باکتری‌های زنده که در درون محیط کشت رشد کرده‌اند، شمارش می‌شود. برای هر گروه از نمونه‌ها و برای هر مدت زمان یک نمونه شاهد (نمونه‌ای که اثر ضد میکروبی ندارد) به جهت مقایسه روند رشد

سه نقطه، در یک رنج می‌باشد. در واقع نتایج این آنالیز هم صحتی بر توزیع یکنواخت نقره بر روی سطح لعاب دارد.



شکل (۳): (a) تصویر SEM، (b) تصویر MAP، (c) تصویر EDAX از سطح نمونه H



شکل (۴): (a) تصویر SEM، (b) تصویر MAP، (c) تصویر EDAX از سطح نمونه شاهد

دمای 600°C ، این احتمال وجود دارد که یون نقره حاصل از تجزیه نیترات نقره در درجه حرارت حدود 300°C - 500°C ، با یون‌های موجود در لعاب مانند سدیم که با اکسیژن‌های غیر پیل زن اتصال ضعیفی دارند، تبادل شود و در سطح لعاب نفوذ کند. با وجود یون روی در کنار یون نقره، این یون نقره است که با یون سدیم تبادل می‌کند زیرا نقره دمای ذوب پائین تری از روی داشته و نفوذ آن به سطح لعاب سریع‌تر صورت می‌گیرد. در ضمن انرژی آزاد برای تبادل بین سدیم و نقره در حدود -6KJ/equiv است، در حالیکه این انرژی برای تبادل بین سدیم و روی در حدود $2/03\text{KJ/equiv}$ می‌باشد، به همین جهت تبادل Na^+ - Ag^+ با انرژی کمتر و نفوذ سریع‌تر محتمل‌تر خواهد بود [۸].

آنالیز SEM بر روی نمونه H که برای نفوذ نقره در دمای 600°C به مدت ۳۰ دقیقه عملیات حرارتی شده و نمونه شاهد انجام شده است. در شکل (۳ و ۴) تصویر EDAX و MAP به ترتیب از سطح نمونه H و نمونه شاهد نشان داده شده است. همان‌طور که در تصاویر مشخص است با توجه به نتایج آنالیز EDAX حضور نقره بر روی سطح نمونه H کاملاً واضح است. زیرا پیک حاصل از حضور نقره بر روی سطح لعاب مشاهده شده شکل (۳c) در صورتی که در نمونه شاهد، پیک واضحی مشاهده نمی‌شود شکل (۴c). در تصاویر MAP نقاط قرمز رنگ که نشان دهنده حضور و توزیع نقره بر روی سطح نمونه است به طور کاملاً یکنواخت بر روی سطح لعاب توزیع شده است. در صورتی که این نقاط قرمز رنگ بر روی سطح نمونه شاهد که تحت نفوذ نقره قرار نگرفته، مشاهده نشده است. با مقایسه تصاویر SEM نمونه H و شاهد کاملاً واضح است که سطح لعاب بعد از نفوذ دچار صدمه و یا آسیب نشده است و کیفیت خود را حفظ کرده است. شکل (۳a) و (۴a). برای بررسی بیشتر این مطلب، از ۳ نقطه مختلف بر روی سطح نمونه H آنالیز EDAX نیز انجام شد که نتایج آن در شکل (۵) نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر مشخص است علاوه بر اثبات حضور نقره بر روی سطح لعاب، کاملاً واضح است که میزان نقره در این

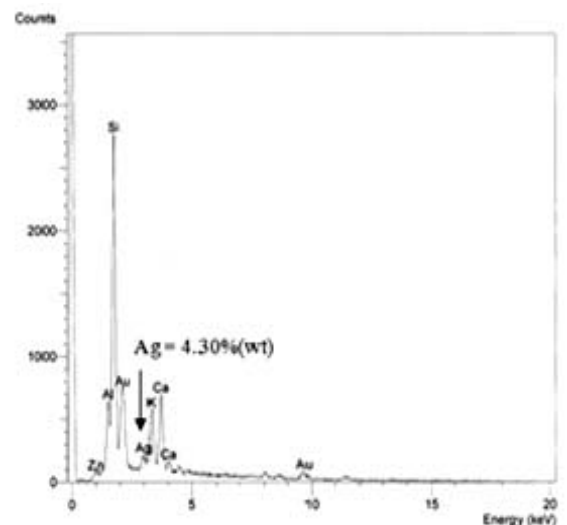
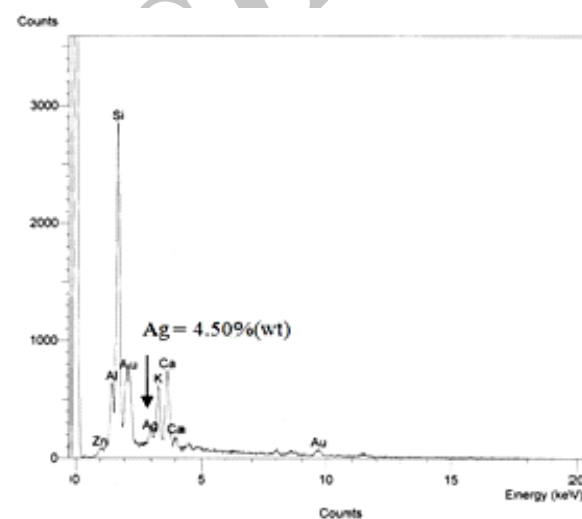
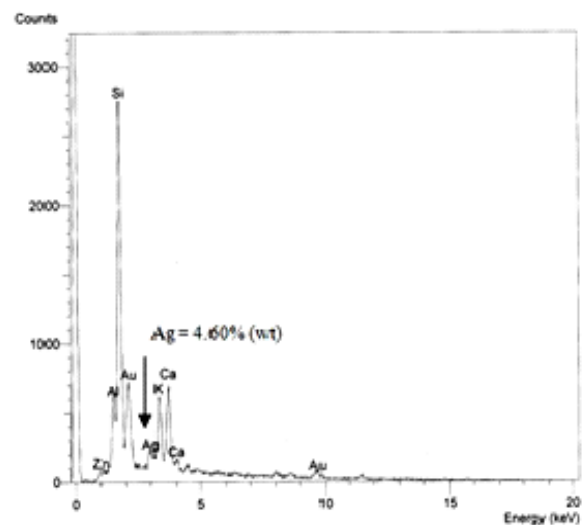
برای ارزیابی میزان نقره نفوذی در سطح لعاب، نمونه‌ها تحت آنالیز XRF قرار گرفتند. نتایج این آنالیز در جدول (۲) نشان داده شده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت بر روی سطح لعابی با پوشش حاوی نیترات نقره بیشتر، میزان عنصر نقره بیشتری مشاهده شد. در واقع میزان نقره بر روی سطح لعاب نمونه H بیشتر از دو نمونه دیگر است. زیرا پوشش اعمال شده بر روی سطح این نمونه، حاوی نیترات نقره بیشتری از دو نمونه دیگر است.

جدول (۲): میزان نقره شناسایی شده توسط XRF در ۳ گروه نمونه

نمونه	میزان نقره شناسایی شده روی سطح لعاب (g)	درصد وزنی نیترات نقره در پوشش
H	۲/۴۵	%۵۰
M	۱/۵	%۳۰
L	۰/۶	%۱۰

۳-۱- تاثیر میزان نقره بر روی خاصیت آنتی باکتریال

فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به شدت متاثر از میزان نقره نفوذی بر روی سطح لعاب است. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به روش Drop test در برابر دو باکتری *S.aureus*, *E.coli* ارزیابی شده است. شکل (۶) نتایج نمونه‌های (H, M, L) را در برابر این دو باکتری نشان می‌دهد. کاملاً واضح است که نمونه‌های ذکر شده علی‌رغم این که حاوی مقادیر مختلفی از ماده ضد میکروبی می‌باشند. پس از سپری شدن ۱ ساعت از تماس سطح لعاب با باکتری *E.coli* تعداد میکروارگانیسم‌ها را تقریباً به صفر رسانده‌اند شکل (۶(a)) در حالیکه در برابر باکتری *S.aureus* نمونه‌های (H, M) پس از ۱ ساعت تماس و نمونه L پس از ۳ ساعت قادر به از بین بردن تمامی میکروارگانیسم‌ها شده است شکل (۶(b)) علت این تفاوت در نتایج، به جهت تفاوت در ساختار این دو باکتری است. در واقع باکتری *S.aureus* دارای ساختاری با دیواره سلولی ضخیم‌تر از باکتری *E.coli* می‌باشد. بنابراین باکتری *S.aureus* نسبت به *E.coli* در برابر عامل ضد میکروبی مقاومت بیشتری از خود نشان خواهد داد. علت دیگر این تفاوت به میزان ماده ضد میکروبی مربوط است. زیرا با



شکل (۵): نتایج آنالیز EDAX از ۳ نقطه مختلف بر روی سطح نمونه H

۴- نتیجه گیری

روش پوشش کلئیدی، روشی کم هزینه، قابل تکرار و ساده برای ایجاد لعاب‌های آنتی باکتریال است. با استفاده از این روش خاصیت ضد میکروبی قوی در مقابل هر دو باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml در سطح لعاب ایجاد شده و باعث صرفه جویی در مصرف ماده ضد میکروبی و کاهش هزینه تولید شده است. با اعمال این روش و نفوذ نقره در دما و زمان مشخص، هیچ گونه صدمه یا آسیبی به سطح لعاب وارد نخواهد شد.

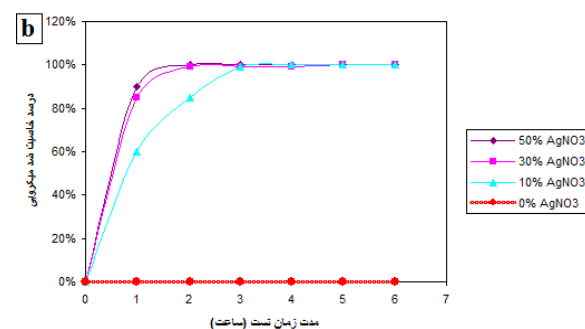
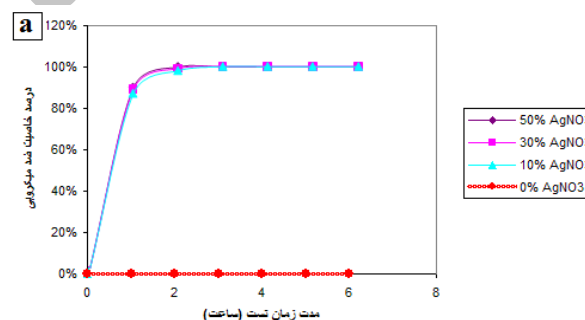
با توجه به نتایج SEM کاملاً واضح است که نفوذ بر روی سطح لعاب به خوبی صورت گرفته و ماده ضد میکروبی به طور کاملاً یکنواخت بر روی سطح لعاب توزیع شده است.

فعالیت ضد میکروبی سطح لعاب با مقادیر مختلف نقره نفوذی مورد مطالعه قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به شدت متاثر از میزان نقره نفوذی بر روی سطح لعاب است. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها با افزایش مدت زمان تماس سطح لعاب با باکتری و میزان ماده ضد میکروبی افزایش خواهد یافت.

برای مثال هنگامی که میزان ماده ضد میکروبی از ۱۰٪wt به ۵۰٪wt افزایش می‌یابد، مدت زمان لازم برای از بین بردن تمام میکروارگانیسم‌های باکتری S.aureus از ۳ ساعت به ۱ ساعت کاهش خواهد یافت. نمونه‌های (H, M, L) فعالیت ضد میکروبی خیلی قوی را در برابر هر دو باکتری نشان داده‌اند.

تفاوت فعالیت ضد میکروبی نمونه L در برابر باکتری S.aureus در مقایسه با نمونه (H, M) به جهت متفاوت بودن ساختار این باکتری و میزان ماده ضد میکروبی در سطح لعاب می‌باشد. فعالیت ضد میکروبی مطلوب حتی با کمترین میزان ماده ضد میکروبی در برابر هر دو باکتری ایجاد شده است.

افزایش میزان ماده ضد میکروبی، میزان نفوذ نقره به سطح لعاب بیشتر شده و در صورت تماس سطح لعاب با باکتری مقدار بیشتری یون نقره نفوذی به دیواره سلولی باکتری حمله می‌کنند که با وجود ضخامت بیشتر، اما به جهت میزان بیشتر ماده ضد میکروبی، دیواره سلولی سریعتر متلاشی شده و منجر به مرگ میکروارگانیسم‌ها خواهد شد [۵]. در صورت کاهش میزان ماده ضد میکروبی شدت حمله به دیواره سلولی کاهش یافته و مدت زمان متلاشی شدن دیواره سلولی و مرگ باکتری به تاخیر خواهد افتاد. در نمونه (H, M) که میزان ماده ضد میکروبی بیشتر است. در برابر هر دو باکتری علی‌رغم متفاوت بودن ساختار آن‌ها، نتایج یکسانی مشاهده می‌گردد. اما در نمونه L که میزان ماده ضد میکروبی کمتر بوده عامل متفاوت بودن ساختار باکتری بر میزان ماده ضد میکروبی غلبه کرده و نمونه L در برابر باکتری S.aureus پس از سپری شدن مدت زمان بیشتری نتایج مشابه دو نمونه دیگر داشته است.



شکل (۶): درصد خاصیت ضد میکروبی نمونه‌ها در برابر باکتری (a) E.coli، (b) S.aureus

۵- مراجع

- [5] Q.L.Feng, J.Wu, G.Q.Chen, F.Z.Cui, T.N.Kim and J.O.Kim, "A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus", Biomed Mater, Vol. 52, pp. 662-668, 1999.
- [6] J.S.Kim and E.Kuk, "Antibacterial Effects of silver nanoparticles", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, Vol. 3, pp. 95-101, 2007.
- [7] Lu Lv, Yiqun Luo, Wun Jern Ng and X.S. Zhao, "Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles Supported on Microporous Titanosilicate ETS-10", Microporous and Mesoporous Materials, Vol. 120, pp. 304-309, 2009.
- [8] Top A and U Iku S, "Silver, Zinc, and Copper Exchange in a Naclinoptilolite and Resulting Effect on Antibacterial Activity", Applied ClaySci, Vol. 27, pp. 13- 19, 2004.
- [1] Oku, "Anti-bacterial and Anti-Fungal Glaze Composition for Ceramic Products", United States Patent, Vol. 5, 807, 641, 1998.
- [2] S-Q SUN*, B SUN, WENQIN ZHANG and D WANG" Preparation and Antibacterial Activity of Ag-TiO₂ Composite Film by Liquid Phase Deposition (LPD) Method", Indian Academy of Sciences, Vol. 31, pp. 61-66, 2007.
- [3] Elsome AM, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W, Noble WC, "Antimicrobial Activities in Vitro and in Vivo of Transition Element Complexes containing Gold (I) and Osmium (VI)" J Antimicrob Chemother, Vol. 37, pp. 911-8, 1996.
- [4] Lansdown AB, "Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety In Use", Curr Probl Dermatol, Vol. 33, pp. 17-34, 2006.

۶- پی نوشت

۱- Cfu/ml: میزان کولنی تشکیل شده در هر میلی لیتر

Archive of SID