تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2و به کارگیری آن روی گاز استریل بیمارستانی

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

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

سعیدرضایی زارچی
فوق دکتری نانوبیوفیزیک، 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

چکیده

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

روش بررسی: *برای ارزیابی نتایج از تصاویر میکروسکوپ های الکترونی اسکنینگ 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 TSBبررسی شد.*

یافته‌ها*: نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO2 با ترکیب کیتوزان به غلظت 4mg/ml و تیتانیوم دی اکسید به غلظت 2٪تشکیل شد و در انتها مشاهده گردید که این نانوکامپوزیت نزدیک به 100٪ از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرده و درحضور این ماده هیچ باکتری رشد پیدا نکرد.*

نتیجه گیری*:نانو کامپوزیت کیتوزان- TiO2 در محیط کشت و روی گاز میتواند برای کنترل باکتریهای بیماریزا مفید باشد*

واژه های کلیدی *:نانوکامپوزیت، نانوکیتوزان، دی‌اکسیدتیتانیوم، اثرضدمیکروبی*

آدرس مقاله:
سعادتمند م م ، یزدانشناس م ا، رضایی زارچی س، یوسفی تلوری ب، نگهداری م" خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2و به کارگیری آن روی گاز استریل بیمارستانی ". مجله علوم آزمایشگاهی بهار و تابستان ، 1391دوره ششم(شماره1) :72 -59

Archive of SID
www.SID.ir

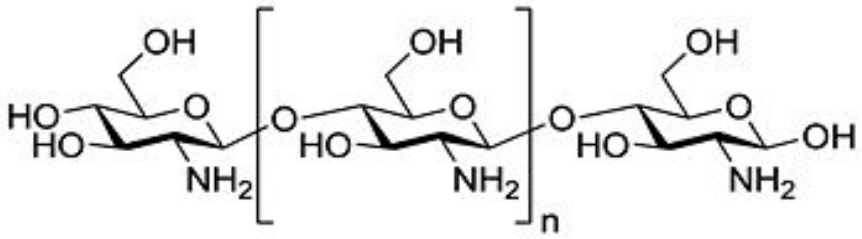
مقدمه

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 میکروارگانیزم‌ها 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 وفوم به کار برد، همچنین درمورد پاره‌ای از موارد آنها را مستقیماً در روغن‌های نساجی و یا مذاب پلیمر و یا محلول پلیمر قبل از ریسندگی 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 *اشریشیاکلی* 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).*اشریشیاکلی* در روده بزرگ انسان و حیوان وجود دارد و تنها گونه در این جنس است که در بیماری زایی انسان اهمیت دارد ، این باکتری از شایع‌ترین علت‌های عفونت ادراری است و به عنوان یک میکروارگانیزم فرصت طلب در عفونت‌های زخم و مننژیت شرکت می‌کند. علاوه بر این برخی از گونه‌های آن عامل عفونت‌های اسهالی هستند(6).

معمولاً ذرات TiO_2 یک روند جدید برای کاربردهای قابل توجه به عنوان یک ماده چند کاربردی جالب به وجود می‌آورند. نانو ذرات TiO_2 خواص منحصر به فردی دارند، مانند پایداری بیشتر، دوام طولانی، بی خطر و همچنین در مقابل طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها مقاوم است. نانو ذرات TiO_2 به طور خاصی در مرکز توجه مواد فتوکاتالیستی قرار دارند. در نتیجه TiO_2 را در زمینه‌هایی مثل خود تمیز شوندگی، مواد آنتی باکتریال، مواد مقاوم در برابرUV، 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 خالص 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 TiO_2 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(7و8).

Dawson در تحیقی خود گزارش کرده است که براساس مطالعه Zhao و همکارانش، اضافه کردن نسبت وزن بهینه از هیدروکسیل پروپیل سلولز (HPC) به نانو ذرات TiO_2 می‌تواند آب دوستی و فعالیت فتوکاتالیستی فیلم TiO_2 را بهبود ببخشد و اثر ضد UV و خواص فیزیکی دیگر نانو کامپوزیت کیتوزان/TiO_2 توسط Hsieh و همکارانش گزارش شده است. تولید TiO_2 /Pt، نانو کامپوزیت کیتوزان/TiO_2، TiO_2/SiO_2، کامپوزیت‌های TiO_2 /CNTs، TiO_2-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).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل1- ساختار شیمیایی کیتوزان

ماده اولیه تولیدکیتوزان(شکل1) ، کیتین می‌باشد. کیتین ($C_8H_{13}NO_5$) بعد از سلولز فراوان‌ترین پلیمر طبیعی است. کیتین ماده‌ای سخت با ساختارکریستالی و سفید رنگ است و ماده اصلی پوسته جانوران دریایی نظیر میگو و انواع خرچنگ دریایی می‌باشد. همچنین در پوشش خارجی حلزون‌ها و حشرات و در دیواره سلولی برخی قارچ‌ها نیز یافت می‌شود. کیتین یک پلی ساکارید فوق‌العاده قلیایی می‌باشد(11). کشورهایی مانند هندوستان، ژاپن، لهستان و استرالیا ازجمله تولیدکنندگان اصلی این بیوپلیمر به حساب می آیند(12و13). بیوپلیمر کیتیناز از سازگاری مناسبی با بافت‌های زنده برخورداراست و ماده‌ای غیرسمی و تجزیه پذیر در طبیعت می‌باشد. البته حلالیت آن کم است و واکنش پذیری ضعیفی دارد(14و15) کیتوزان از مشتقات کیتین بوده که با فرآیند دیاستیلاسیون کیتین به دست می‌آید(16). غالباً کیتوزان را بعنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالای 50 درصد می‌شناسند. کیتوزان‌های تجاری معمولاً درصد دیاستیلاسیون بیش از 70 درصد و وزن مولکولی بین 10 هزار تا 1/2میلیون دالتون دارند(17و18). کیتوزان در pH کمتر از 6 به صورت پلی کاتیونی می‌باشد و به سهولت با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین‌ها، پلی ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها واکنش می‌دهد، این مسأله می‌تواند ساختار و بافت محصولاتی را که کیتوزان در تولید آن ها به کار می‌رود، تحت تأثیر قرار دهد. به دلیل وجود گروه‌های آمینی در ساختمان کیتوزان، این ماده در محیط‌های اسیدی از حلالیت بهتری برخورداراست(19). درجه دیاستیلاسیون که نسبت گروه‌های استیل گلوکزآمین به گروه‌های آمین موجود در ساختار کیتوزان را نشان می‌دهد، عامل مهمی در میزان حلالیت و سایر خواص کیتوزان محسوب می‌شود(20و21).بعدازتهیه کیتین، کیتوزان به وسیله جابجایی گروه COCH3 به دست می‌آید که به آن پروسه د- استیلاسیون گفته می‌شود. در این حالت سوسپانسیونی از کیتین در NaOH غلیظ تهیه شده و حرارت داده می‌شود، محصول نهایی کیتوزان است. بعد از پروسه داستیلاسیون، کیتوزان را می‌توان خشک کرده و به صورت پودر درآورد و یا محلول‌های اسیدی از آن را تهیه کرد که میزان حلالیتش به درجه د-استیلاسیون آن بستگی دارد. کیتین درمحیط‌های اسیدی یا بازی نامحلول است ولی کیتوزان در محیط‌های اسیدی ضعیف محلول می‌باشد(20). کیتوزان یک پلیمر کاتیونیک است که در اثرحرارت دادن کیتین در هیدروکسید سدیم حاصل می‌شود. بار مثبت موجود به وسیله جذب یون مثبت توسط جفت الکترون آزاد اتم نیتروژن در گروه NH_2 تولید می‌شود که در طبیعت تقریبا استثنائی می‌باشد و این مهم به کیتوزان اجازه می‌دهد که باتمام سطوح بیولوژیکی مانند پوست و مو که بار منفی دارند پیوند ایجاد کند به همین دلیل است که عملکرد آن در علم آرایشی و داروئی 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 ماهی‌های دریایی استخراج می‌شود و نام شیمیایی آن N-acetyl –D-glucosamine(2- acetamido- 2-deoxy-D-glucose) است.

Archive of SID

www.SID.ir

به همین علت در این پژوهش از کیتوزان که از بیوپلیمرهای طبیعی بوده که در خیلی از ارگانیسم‌های طبیعی نیز یافت می‌شوند، استفاده شده است. با توجه به اینکه قبلا در مورد خاصیت ضد میکروبی کیتوزان و TiO_2 به طور جداگانه تحقیقاتی انجام شده است، لذا انتظار میرفت که با ترکیب این دو ماده به نانوکامپوزیتی 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 آلدریچ (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 گلوکزآمین، pH محلول و از همه مهمتر ارگانیسم هدف می باشد(23). کیتوزان بر حسب وزن مولکولی به دو نوع با وزن مولکولی پایین(LMV) و وزن مولکولی بالا(HMV) 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 فیزیکوشیمیایی 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 می‌ریزیم 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 قرار دادیم. برای حل کردن کیتوزان در این مرحله از اسید استیک که اسید ضعیفی است استفاده شد(25). دلیل اینکه از اسیدهای قوی‌تر 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 درنتیجه اثر ضدمیکروبی نانومواد به طور مستقل مشخص نمی گردید.

آماده سازی TiO_2

نانو ذرات TiO_2 از شرکت EVONIK آلمان با نام تجاری AEROXIDE TiO_2 P25 با سایز 21nm خریداری شد. غلظت‌های0/5، 1 و 2٪ ازTiO_2 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 اشریشیاکلی از دانشگاه پیام نور یزد تهیه شد. محیط‌های کشت نوترین براث، تریپتی کیس براث 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 ضدمیکروبی 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 TiO_2

اثر ضدمیکروبی TiO_2 در غلظت‌های 0/5، 1 و 2% را در محیط‌های کشت مایع و جامد مورد بررسی قرار دادیم

تهیه نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2

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 TiO_2

Archive of SID
www.SID.ir

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 می‌شود که نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 می‌باشد.

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 می‌رسد 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.

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.

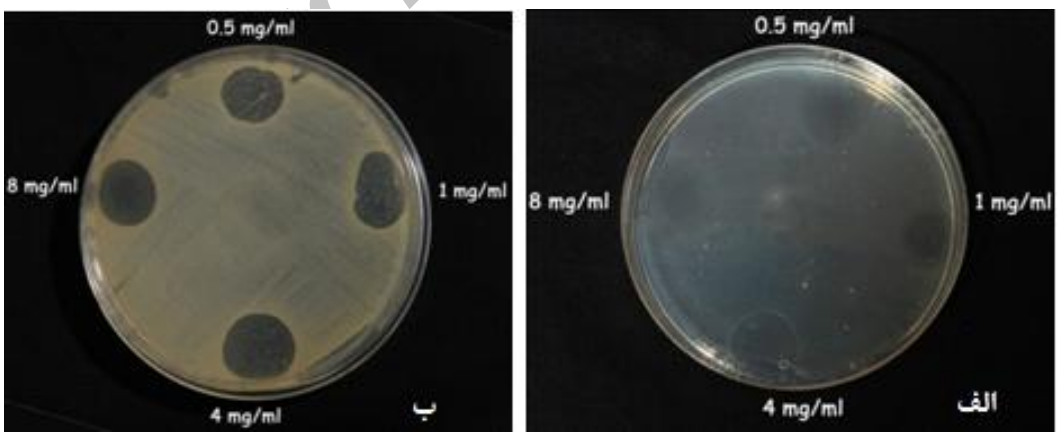
یافته ها

ابتدا اثر ضد میکروبی نانو ذرات کیتوزان و نانو ذرات TiO_2 با غلظت‌های 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 غلظت‌های 0/5، 1، 4 و 8mg/ml را در محیط‌های 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 4mg/ml درصد بهترین اثر را در مهار رشد باکتری داشته است (شکل2).

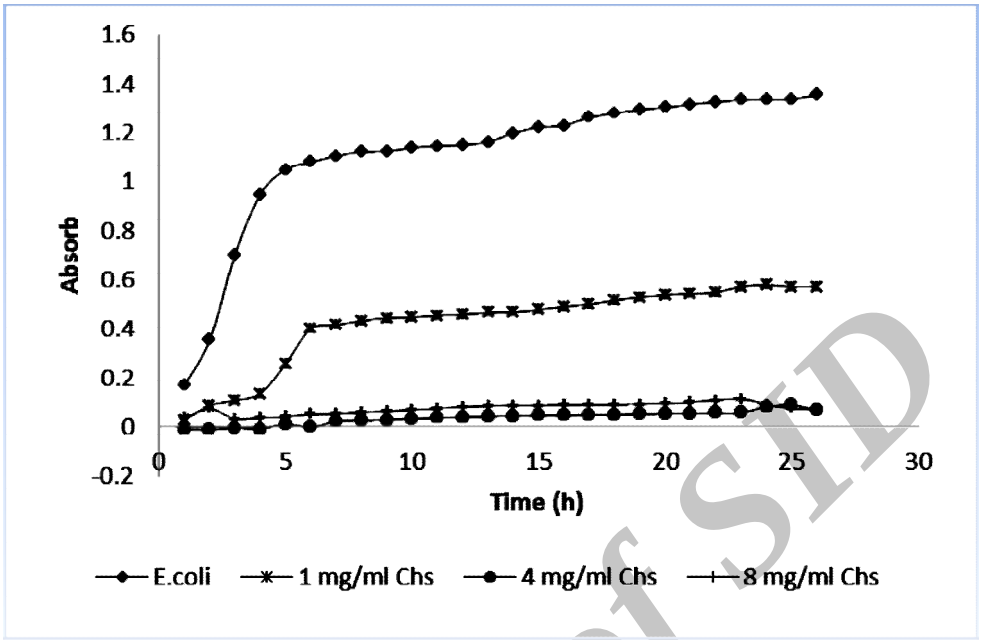


شکل2- الف- اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری E.coli در محیط کشت جامد ب- اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری S.areus در محیط کشت جامد

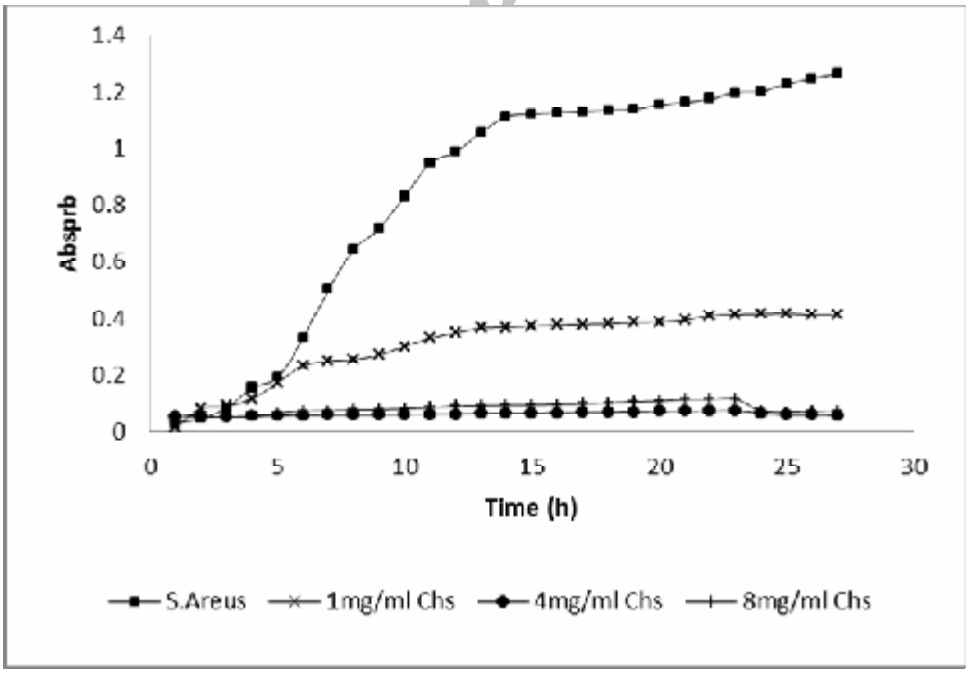
Archive of SID

www.SID.ir

در محیط کشت مایع، روند رشد باکتری هم برای E.coli و هم برای باکتری S.areus به طور جداگـانه در حـضور نـانو ذره کیتوزان با غلظت های مختلف بررسی و اندازه گیری شد که نتایج به دست آمده در نمودارهای زیر مشخص است.(شکل3 و شکل4)



شکل3- اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری **E.coli** در محیط کشت مایع



شکل4- اثر نانو ذره کیتوزان روی باکتری **S.areus** در محیط کشت مایع

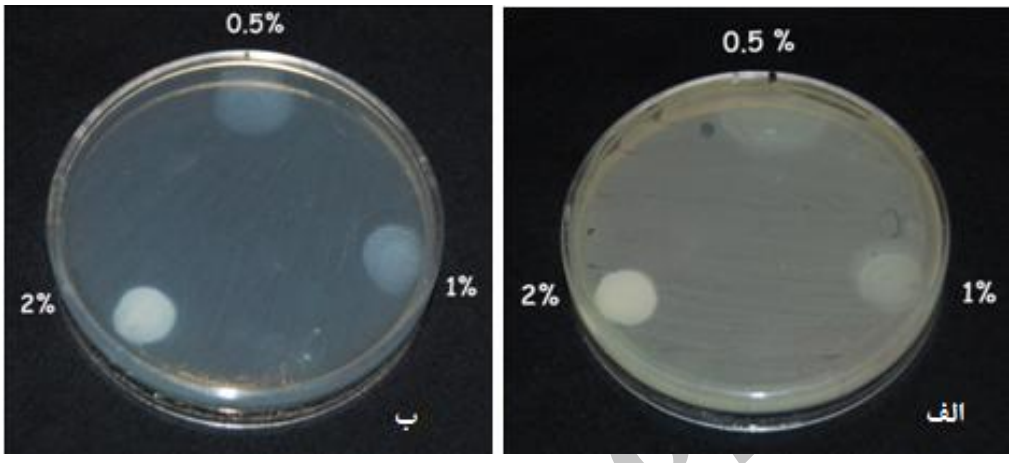
www.SID.ir

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 خیلی نزدیک به صفر کاهش داده است.

بررسی اثر ضد میکروبی TiO_2

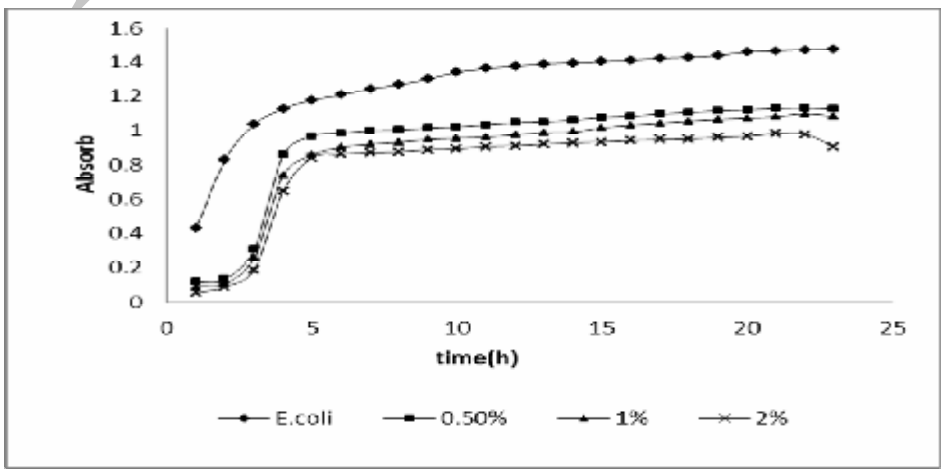
اثر ضدمیکروبی TiO_2 در غلظت‌های 0/5، 1 و 2٪ در محیط‌های کشت مایع و جامد مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن به صورت زیر است:

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(شکل5).



شکل5- الف- اثر نانو ذره TiO_2روی باکتری S.areus در محیط کشت جامد ب- اثر نانو ذره TiO_2روی باکتری E.coli در محیط کشت جامد

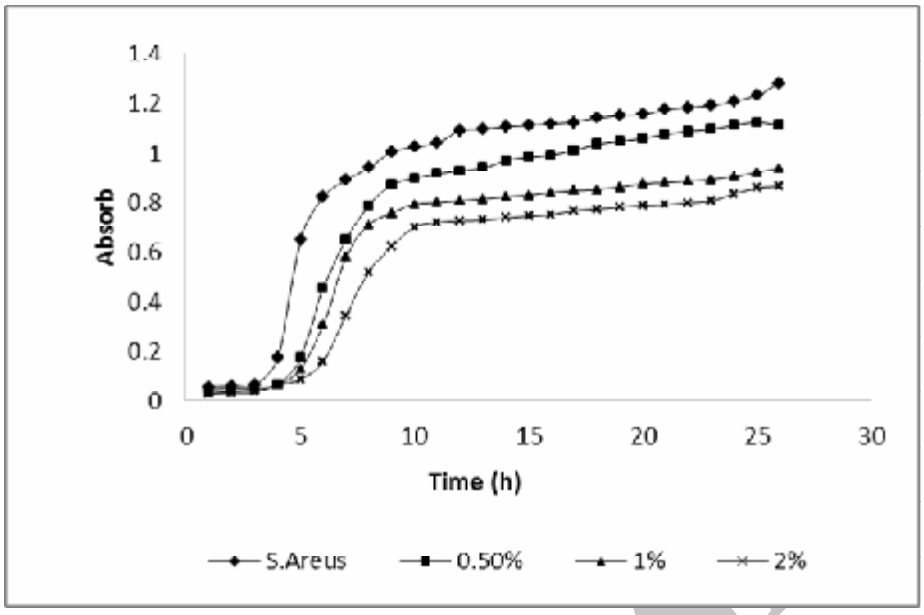
در شکل 5 که مبین نتایج اثر نانو ذره TiO_2روی باکتری های S.areus و E.coli در محیط کشت جامد می باشد مشخص است که با افزایش مقدار نانوذره Tio_2 ، قطر هاله ای که باکتری ها تشکیل می دهند کوچکتر شده و نشانه ای از کاهش شدید فعالیت این باکتری ها می باشد که رابطه مستقیمی بین مقدار مصرفی نانوذره و کاهش فعالیت باکتریایی 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(شکل6 و شکل7)



شکل6- اثر نانو ذره TiO_2روی باکتری E.coli در محیط کشت مایع

Archive of SID

www.SID.ir



شکل7- اثر نانو ذره TiO_2روی باکتری **S.areus** در محیط کشت مایع

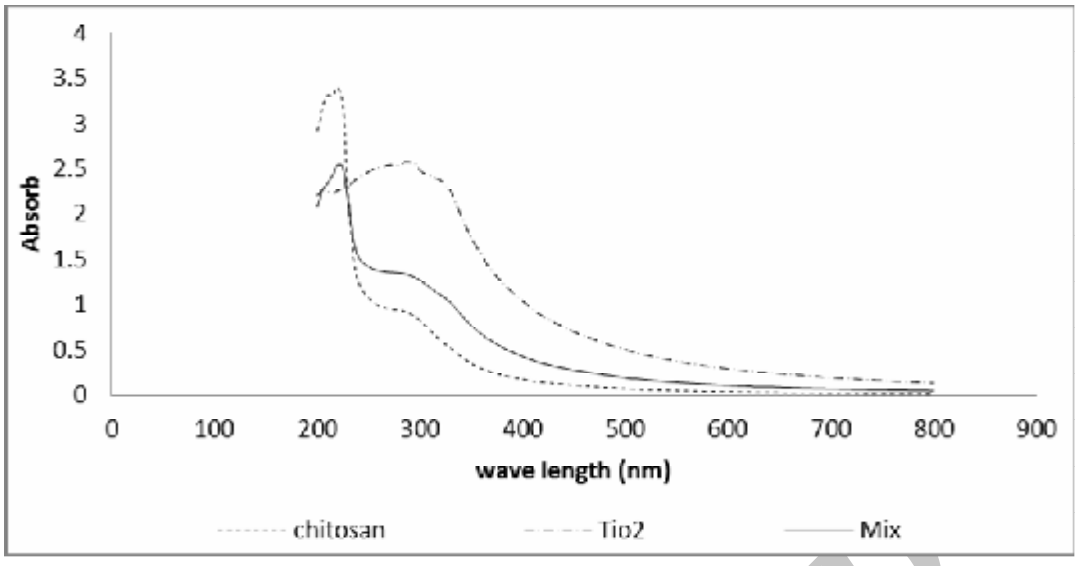
سپس تشکیل نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان پیدا کردن از تشکیل نانو کامپوزیت از طیفUV visible، طیف IR و تصاویر TEM استفاده شد و اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2در محیط‌های کشت جامد و مایع مورد بررسی قرار گرفت.

تست UV visible

از طول موج 200 تا 400 نانومتر تست جذب UV روی محلول کیتوزان، TiO_2 و مخلوط کیتوزان-TiO_2انجام شد (شکل8). λmax برای کیتوزان، TiO_2 و مخلوط آنها به ترتیب برابر با285 و 220 نانومتر بود که همانطور که مشخص است طول موجی که ماکزیمم جذب را دارد برای کیتوزان و برای مخلوط کیتوزان-TiO_2 یکی است و جذب نانوکامپوزیت نسبت به کیتوزان تنها کمتر شده است. که نشان دهنده این است که این دو ماده به خوبی با هم واکنش داده‌اند 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 هوا را به حدود$Toor10^{-9}$ رساندیم. پمپ خلا فرا بالا دستگاه ویژه است

که توانایی ایجاد فشار در محدوده Toor 10^{-9} - 10^{-12} 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.

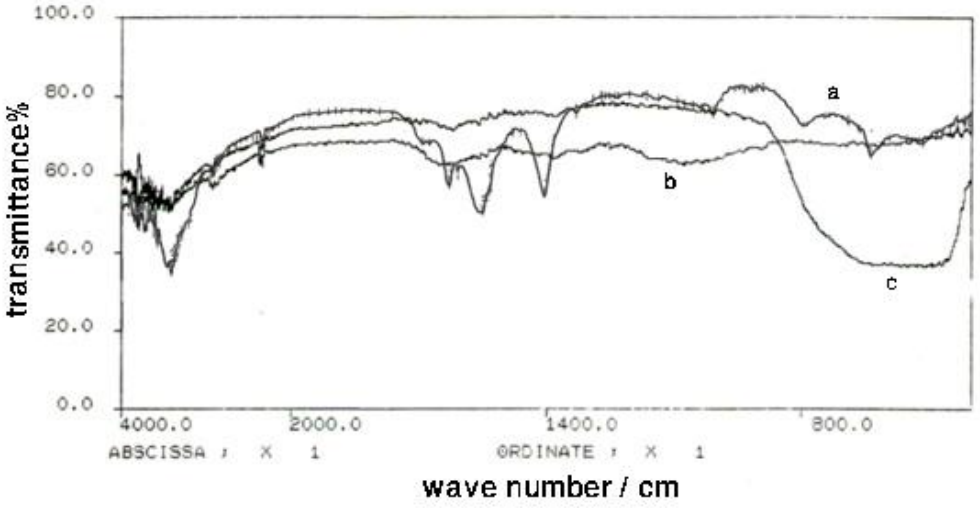
www.SID.ir



شکل 8- تست **UV visible** برای محلول کیتوزان، TiO_2و مخلوط کیتوزان-TiO_2

تست طیف IR

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 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.

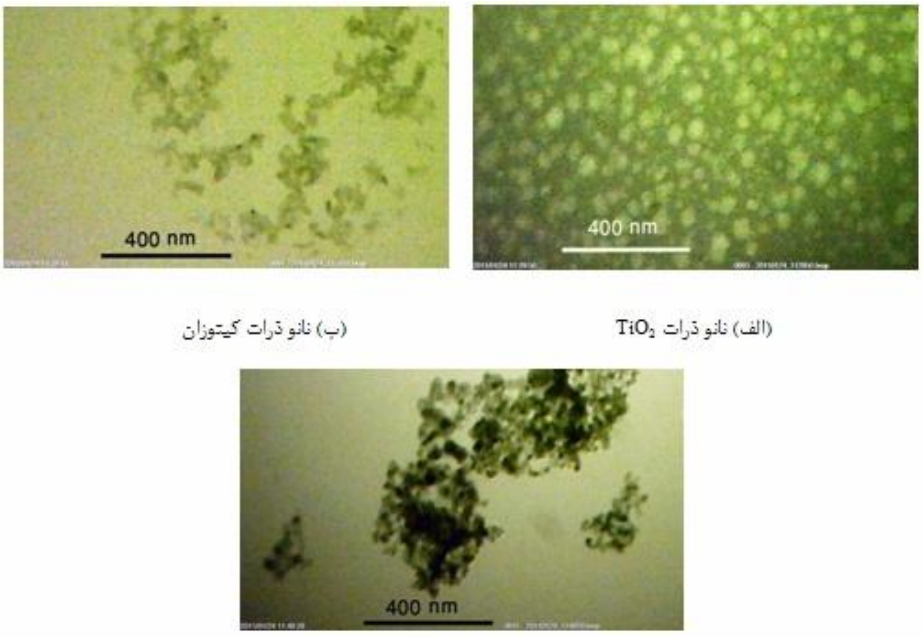


شکل 9a **:** طیف **IR**برای نانو ذرات کیتوزان. **b**. طیف **IR**برای نانو ذرات TiO_2. **c**. طیف **IR**برای نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2

www.SID.ir

تصاویر TEM

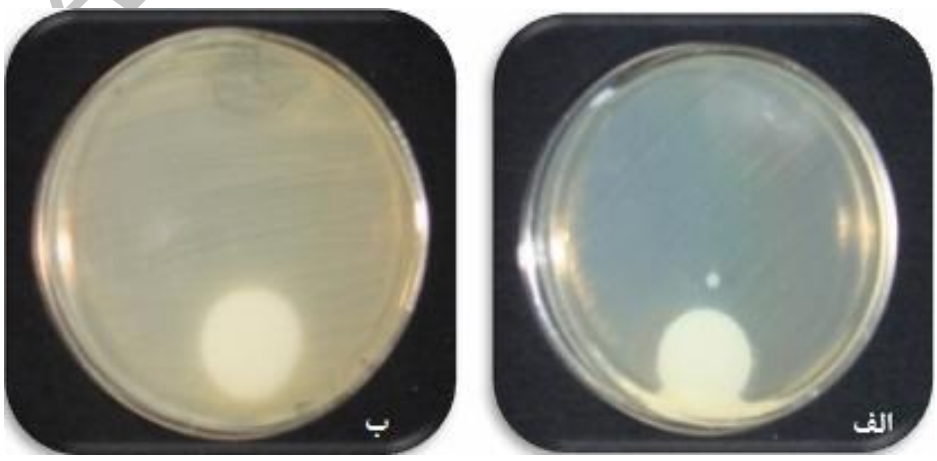
تصاویر TEM از نانو ذرات TiO_2، نانو ذرات کیتوزان و نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 در زیر آمده است که در این تصاویر می‌توان اثبات کرد که همه اندازه ها در مقیاس نانو بوده‌اند(شکل10).



شکل10- (الف) تصاویر TEM ازنانو ذرات TiO_2، (ب) نانو ذرات کیتوزان و (ج) نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2؛ اندازه همه مواد موجود در تصویر 400 نانومتر محاسبه شد.

بررسی اثر نانو کامپوزیت در محیط کشت جامد

ابتدا اثر نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2در محیط کشت جامد بررسی شد که درمحیط کشت جامد، این نانو کامپوزیت را به طور جداگانه در تماس با باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* قرار دادیم و با بررسی چشمی مشاهده شد که این نانو کامپوزیت از رشد باکتری جلوگیری کرده است که در شکل 11 مشخص است. دایره‌های سفید رنگ محلول نانوکامپوزیت کیتوزان-TiO_2 می‌باشند که هیچ اثری از رشد باکتری‌ها در جایی که نانوکامپوزیت وجود دارد دیده نمی‌شود.



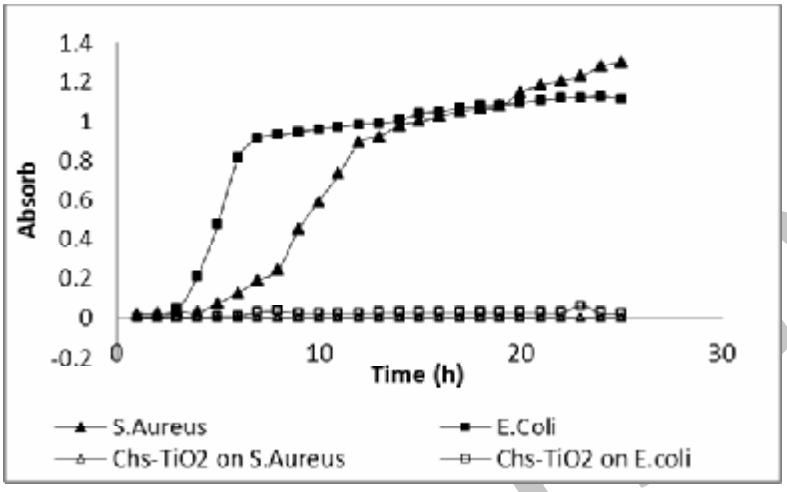
شکل11- الف: اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 روی باکتری E.coli ب: اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 روی باکتری S.aureus

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی اثر نانو کامپوزیت در محیط کشت مایع

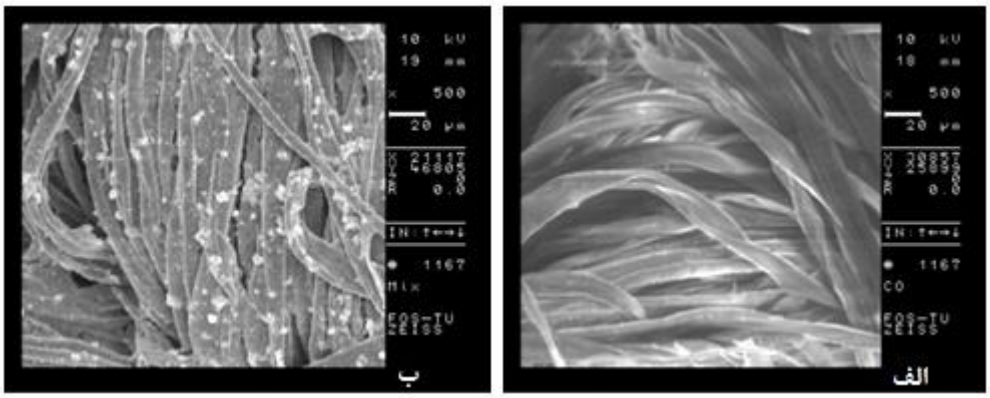
در محیط کشت مایع نیز اثر نانوکامپوزیت کیتوزان-TiO_2 مورد بررسی قرار گرفت که برای انجام این مرحله از آزمایش از دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتروفتومتر) استفاده شد و OD نمونه‌ها در مقایسه با محیط کشت شاهد هر یک ساعت اندازه‌گیری شد و اثر نانو کامپوزیت فوق در جلوگیری از رشد باکتری‌ها در (شکل12) قابل مشاهده است 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 می باشد.



شکل12- اثر نانو کامپوزیت کیتوزان -TiO_2 بر رشد باکتری‌های**E.coli** و**S.aureus**

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 درنتیجه 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 نانوکامپوزیت کیتوزان-TiO_2 هیچ میکروبی رشد نیافته است و این نانوکامپوزیت به طور 100 درصد مانع رشد باکتری‌ها شده است.**بررسی اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2روی گاز استریل**

ابتدا تصاویر SEM از گاز استریل حاوی نانو کامپوزیت تهیه شد(شکل13) 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.

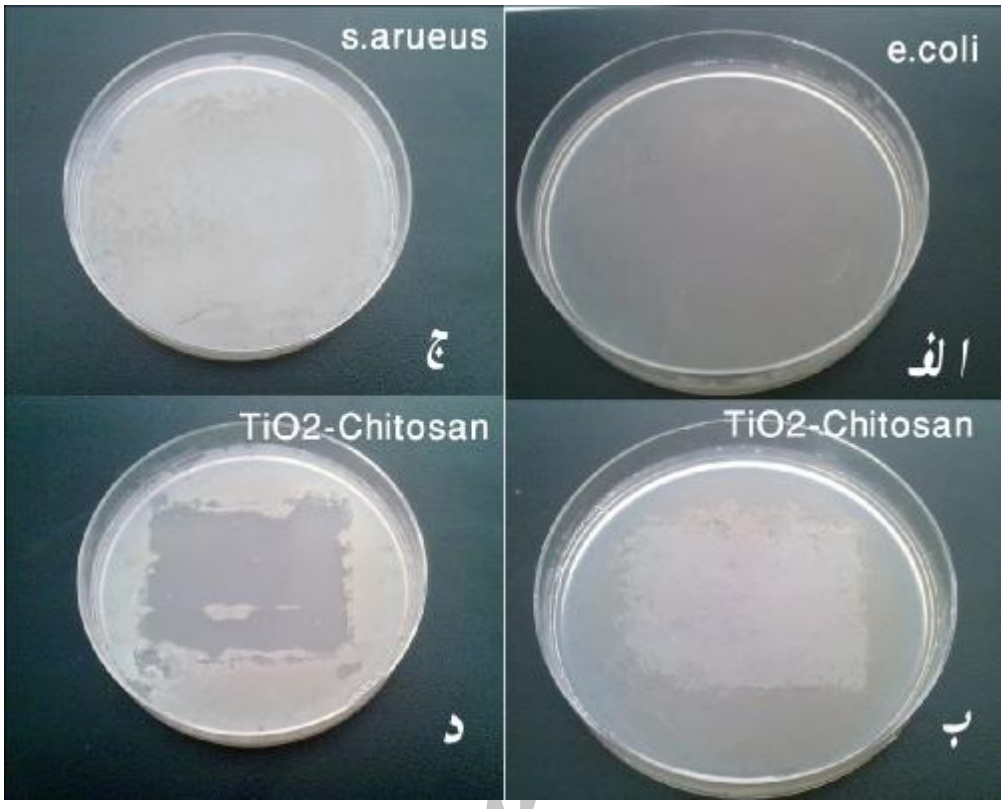


شکل 13- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره الف: پارچه خام، ب:پارچه حاوی نانو کامپوزیت کیتوزان -TiO_2

Archive of SID

www.SID.ir

سپس گازهای استریل را در محیط کشت جامد برای هر دو باکتری قرار داده پس از 24 ساعت اثر آن‌ها روی محیط کشت مشاهده شد که این تصاویر به صورت زیر می‌باشد(شکل14)



شکل14- اثر گاز استریل حاوی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 بر رشد باکتری‌هایE.coli وS.aureus در محیط کشت جامد

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-TiO_2 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-TiO_2 است که همانطور که مشاهده می‌شود در مرکز پلیت هیچ نوع باکتری رشد نکرده است.

بحث و نتیجه گیری

بررسی تولید نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 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 نگرید. اثر ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان-TiO_2 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 وتیتانیوم دی اکسید با غلظت 2% بهترین تأثیر را در فرایند ضدمیکروبی از خود نشان داده‌اند، به همین دلیل انتخاب غلظت های فوق برای تولید نانوکامپوزیت کیتوزان-TiO_2 مناسب بوده است. برای بررسی تشکیل نانو کامپوزیت، تست طیف IR و

Archive

www.SID.ir

تستUV 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. درانتها 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-TiO_2 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-TiO_2 در این تحقیق، و اهمیت عدم وجود باکتری در محیط زخم که با گاز استریل پانسمان می‌شود، به کار گیری 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- Papaspyrides CD, PavlidouS, 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 TiO_2 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.

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 (Pandalusboreqlis) 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, swelliung behavior, thermal and chemical properties of chitosan networks*. European Journal Phar. Scence. 2002; 15(3): 425-432.

16- Alves N, Picart C, Mano J. *Self-Assembling and Crosslinking of Polyelectrolyte Multilayer Films of Chitosan and AlginateStudied by QCM and IR Spectroscopy*. Macromolecular Bioscience. 2009; 9(3):776-785.

Archive of SID

www.SID.ir

17- Benjakul, S, *Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred gar fish (Hemiraphus far.)*, Journal Scince 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 Microbilogy. 2002; 74: 65-72.

19- Chen, C. S, *Antibacterial of N-sulfonated and Nsulfobenzoyl 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 Reasearch 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.

Archive of SID

www.SID.ir