

اثر ضد میکروبی الیاف اکریلیک حاوی نانوذرات (نقره و تیتانیوم) بر روی تعدادی از باکتری های مفیدخاک

فرانک ماوندانژاد^{۱*}

روحا- کسری کرمانشاهی^۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۶

تاریخ تصویب: ۹۱/۱۲/۲۲

چکیده

الیاف اکریلیک حاوی نانو ذره نقره و تیتانیوم از کومنومر آکریلونیتریل و نانوذره نقره و تیتانیوم ساخته شده و دارای کاربردهایی در زمینه های مختلف مانند نساجی می باشند. خاک یکی از مهمترین زیستگاه های میکروارگانیسم هایی می باشد که نقش اساسی در چرخه عناصر را بر عهده دارند. از مهمترین این میکروارگانیسم ها می توان به ریزوبیوم های موجود در چرخه تثبیت ازت و برخی از باسیلوس ها که با داشتن آنزیم سلولاز در چرخه کربن نقش اساسی را ایفا می کنند، اشاره نمود. در همین راستا در این پژوهش *Bacillus sp.* و *R. cecil* در معرض الیاف حاوی نانوذرات نقره و تیتانیوم قرار داده شدند تا اثر ضد میکروبی این الیاف مورد بررسی قرار گیرد. این مطالعه با روش شیک فلاسک انجام شد و در فاصله های زمانی ۶ و ۲۴ ساعت

* نویسنده مسئول: دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی؛ faranak.mavandadnejad@gmail.com

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فرانک ماوندانژاد تحت نظر استاد راهنما سرکار خانم دکتر روحا کسری^۱ کرمانشاهی در دانشگاه الزهراء بوده است.

به روش قطره پلیت بر روی پلیت‌ها جهت شمارش باکتری‌های زنده توسط شمارش کلنی‌ها تلقیح گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که الیاف آکرلیک حاوی نانوذره نقره و تیتانیوم بر روی باکتری‌های ریزو بیوم و باسیلوس اثر ضد میکروبی داشته است، به طوری که پس از سپری شدن ۲۴ ساعت باعث کاهش ۷۲/۶۱ درصدی میزان رشد *R.cicil* و ۷۸/۰۹ درصدی *Bacillus sp.* شده است.

واژه‌های کلیدی: الیاف آکرلیک، نانوذره نقره، باکتری مفید خاک، روش شیک فلاسک.

با پیشرفت نانویوتکنولوژی تعداد زیادی از محصولات پارچه‌ای با ویژگی ضد میکروبی برای کاربرد در همه بخش‌های زندگی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از این الیاف که در منسوجات به کار برده می‌شود الیاف آکرلیک است که در واقع به الیافی که زنجیره پلیمر آن شامل حداقل ۸۵ درصد وزنی کومونومر اکریلونیتریل باشد، اطلاق می‌شود (Vicenet et al., 2001). این الیاف به همراه نانوذرات نقره و تیتانیوم خواص آنتی‌باکتریایی را دارا هستند (قاضی عسگر، ۱۳۸۵). منسوجات دارای این گونه الیاف حاوی نانوذرات پس از مدتی وارد طبیعت شده و می‌توانند به طور مستقیم و یا غیرمستقیم بر روی چرخه‌ها و باکتری‌های مفید خاک اثر گذار باشند. نانوذره‌ها از جمله نانو ذره نقره برای باکتری‌های مفید خاک اعم از باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و

مقدمه

باکتری‌های مفید خاک برای حاصلخیزی خاک، گردش چرخه عناصر بسیار مفید بوده و توجه به آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا برای حفظ محیط زیست و چرخه عناصر بهتر است به این میکروارگانیسم‌ها توجه ویژه‌ای شود. برخی باکتری‌ها در چرخه ازت حائز اهمیت هستند و برخی نیز در چرخه کربن که باکتری‌های دارای آنزیم سلولاز در این دسته قرار می‌گیرند. در طبیعت موادی وجود دارند که می‌توانند وارد چرخه عناصر شده و بر روی برخی از چرخه‌ها و میکروارگانیسم‌هایی که در این چرخه‌ها موثرند، اثر گذار باشند. برخی از این مواد می‌توانند ساختار دست بشر باشند و وارد طبیعت شوند، این مواد می‌توانند دیر تجزیه پذیر و یا تجزیه ناپذیر باشند. امروزه با توجه به کاربرد گسترده الیاف و

wei et al., 2002, Chen et al., 2009
(Maness et al., 1999).

با توجه به اهمیت باکتری های مفید خاک در چرخه عناصر و پیشرفت تکنولوژی، در این تحقیق سعی بر آن شده که اثر اینگونه الیاف حاوی نانوذرات نقره و دی اکسید تیتانیوم بر روی باکتری های مفید خاک، از جمله گونه ای از ریزوبیوم به نام *Rhizobium cicil* که در چرخه ازت و دیگری گونه ای از باسیلوس به نام *Bacillus sp. casing layer parse* که دارای آنزیم سلولاز بوده و در چرخه کربن موثر هستند، بررسی شود.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم ها:

در این پژوهش باکتری هایی که به عنوان باکتری های مفید خاک مورد مطالعه قرار گرفت گونه ای از باکتری ریزوبیوم بوده که از کلکسیون آزمایشگاه میکروشناسی دانشگاه اصفهان تهیه گردید (*Rhizobium cicil*) و همچنین گونه ای از باکتری باسیلوس که از کلکسیون آب و خاک تهران تهیه گردید (*Bacillus sp. casing layer parse*). الیاف اکریلیک از کارخانه پلی آکریل اصفهان تهیه شد. نانوذره نقره P105 از شرکت نانونصب تهران تهیه گردید که حاوی ۹۵٪ دی اکسید تیتانیوم با پوشش ۵ درصد وزنی نقره بود.

باکتری هایی که آمونیفیکاسیون را انجام می دهند بسیار سمی و کشنده هستند (Throbak et al., 2007). با توجه به رشد روزافزون نانوتکنولوژی و استفاده از نانو ذرات نقره، محیط زیست به ویژه جمعیت میکروبی خاک اعم از باکتری های مفید هتروتروفیک (تثبیت کننده ازت و آمونیفیکاسیون) و باکتری های کمولیتوتروف در خطر می باشند

(Panyala et al., 2008, Vijendra, Kumar et al., 2009). اندازه نانوذره نقره بر روی ویژگی نانوذره در باکتری کشی تاثیر گذار هستند. در واقع نانو ذرات نقره با اندازه ۵ نانومتر و یا کمتر اثر کشندگی بیشتری بر روی باکتری های مفید خاک که نیتروفیکاسیون را انجام می دهند، دارد. نانوذرات نقره با ایجاد رادیکال های آزاد مرگ باکتری های مفید خاک را سبب می شود (Choi et al, 2008). نانوذرات TiO_2 نیز با اثر گذاری بر روی باکتری ها سبب مرگ آنها می شود. TiO_2 در واقع با اعمال زیر منجر به مرگ سلول ها می شود؛ ۱. با اتصال به کوآنزیم A داخل سلول مانع از تنفس سلولی می شود. ۲. ایجاد اختلال در غشای سلول و دیواره سلولی می کند. ۳. سبب نشست یون k^+ درون سلولی می شود. ۴. ایجاد اختلال در نشست Ca^+ درون سلولی می کند که همه این مکانیسم ها منجر به مرگ سلول می شوند (Chang

روش شستشوی الیاف

برای این کار ۰/۵ گرم از الیاف مورد نظر را در ارلن که حاوی ۰/۵٪ از پودر لباسشویی تاژ که در بن ماری به دمای ۷۰ درجه سانتیگراد رسیده اضافه کرده و سپس ارلن را به مدت ۳ دقیقه با دور ۲۰۰ دور در دقیقه بر روی هیتر استیرر قرار داده تا الیاف با ماده شستشو در تماس بیشتری باشد. سپس الیاف را خارج کرده و دوبار در داخل ارلن هایی که حاوی آب مقطر استریل بود شستشو داده شد، سپس با قرار دادن الیاف بر روی کاغذ صافی و قیف استریل ۱۰ مرتبه با آب مقطر استریل الیاف آبکشی شد و در آخر با پنس استریل واحد امکان آب آن را خارج نموده و در پلیت استریل و روی کاغذ صافی استریل گذاشته و در آون (فور) با دمای 50 ± 2 درجه سانتیگراد قرار داده تا الیاف خشک گردد. (قاضی عسگر، ۱۳۸۵)

روش شیک فلاسک

به منظور ارزیابی اثر ضد میکروبی الیاف اکریلیک معمولی و الیاف حاوی نانوذره نقره و الیاف حاوی نانوذره تیتانیوم بر روی باکتری های مفید خاک از روش شیک فلاسک استفاده شد.

در ابتدا باکتری های مفید خاک (*R. cecil*) و (*Bacillus sp.*) در محیط کشت Trypticase Soy Broth در دمای 28 ± 2

درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد.

سپس در ارلن های استریل که حاوی ۴۹/۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH برابر با ۷ بود، ۰/۵ میلی لیتر از هر کدام از باکتری با غلظت مشخص ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) را اضافه نموده و سپس ۰/۵ گرم از انواع الیاف مورد آزمایش را که از قبل طی دو بار شستشو استریل شده است به آن افزوده و با مخلوط کردن آن در زمان صفر، اولین رقت مناسب از سوسپانسیون به دست آمده تهیه گردیده شد. به منظور شمارش کلنی به روش قطره پلیت، ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون بر روی پلیت های مولر هیتتون آگار قرار داده و این کار ۵ بار تکرار شد و بعد از جذب قطرات، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد گرما گذاری شدند و سپس شمارش کلنی ها صورت گرفت و میانگین آنها محاسبه گردید. این عمل در زمان های صفر و ۶ و ۲۴ ساعت انجام شده و هوادهی ارلن ها بر روی شیکر ($85-90$ rpm) انجام گردید. برای شاهد این آزمایش از یک یک ارلن حاوی بافر فسفات (pH=۷) و باکتری استفاده شد.

میزان درصد کاهش باکتری ها در مجاورت الیاف ها طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

باکتری های مورد آزمایش با گذشت ۲۴ ساعت مشاهده گردید که تعداد باکتری ها در مقایسه با محیط شاهد کاهش یافته است.

نتایج نشان داد که ریزوبیوم در مجاورت با الیاف معمولی پس از ۲۴ ساعت ۴/۷٪ افزایش رشد داشته این در حالی است که این باکتری در مجاورت با الیاف نانوذره تیتانیوم و نانوذره نقره و تیتانیوم به ترتیب دارای ۶۹/۸۷٪ و ۷۲/۶۱٪ کاهش

رشد داشته است. (نمودار ۱)

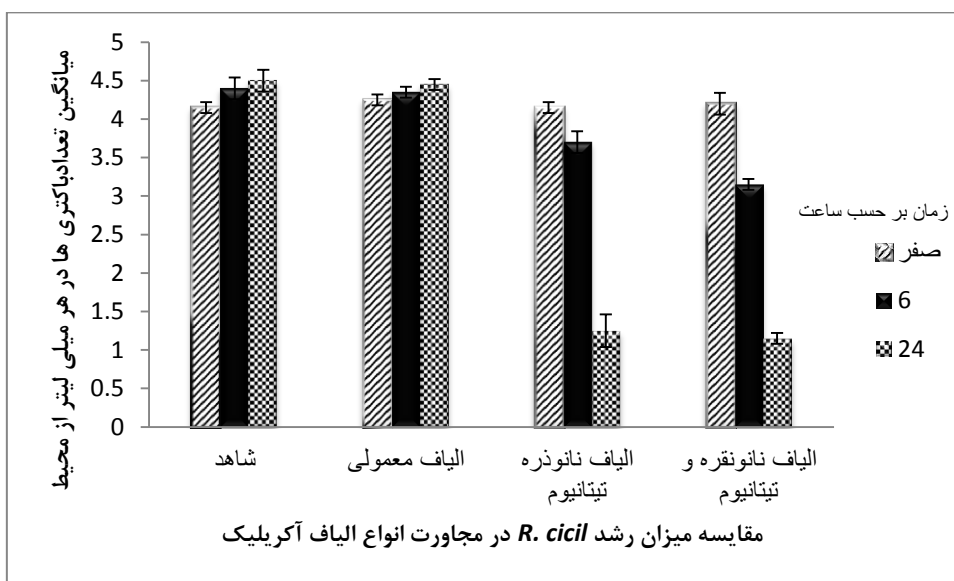
$$\text{درصد کاهش} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

در این فرمول A تعداد کلنی باکتری ها بعد از ۲۴ ساعت و B تعداد کلنی باکتری ها در زمان صفر در یک میلی لیتر محیط مورد استفاده است.

تمامی آزمایشات سه بار تکرار شدند و از نرم افزار آماری SPSS برای بررسی آماری نتایج استفاده شد.

نتایج و بحث

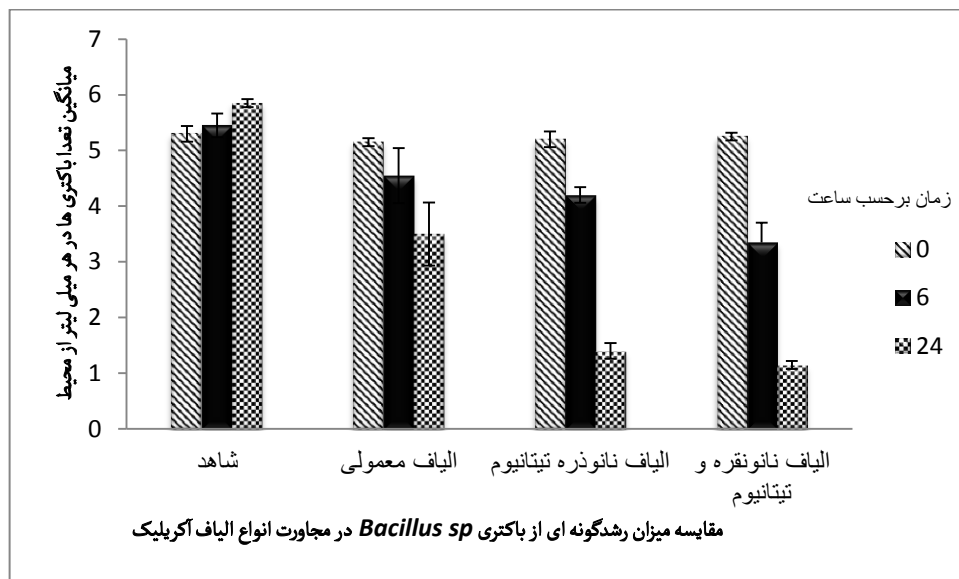
با قرار گرفتن الیاف اکریلیک حاوی نانوذرات نقره و TiO2 در مجاورت



نمودار (۱) - مقایسه میزان رشد *R. cicil* در مجاورت با الیاف اکریلیک حاوی نانوذره نقره، نانوذرات نقره و تیتانیوم و الیاف اکریلیک فاقد نانوذره (معمولی) در زمان های صفر، ۶، ۲۴ ساعت

رشد آن ۷۳/۰۷٪ کاهش یافته و در مجاورت با الیاف حاوی نانوذره نقره و تیتانیوم به طبع این کاهش بیشتر بوده و به ۷۸/۰۹٪ رسیده است. (نمودار ۲)

میزان رشد باکتری باسیلوس پس از ۲۴ ساعت در مجاورت با الیاف معمولی فاقد نانوذره نیز ۳۲/۰۳٪ کاهش یافت و در مجاورت با الیاف حاوی نانوذره تیتانیوم



نمودار (۲) - مقایسه میزان رشد باکتری *Bacillus sp.* در مجاورت بالیاف آکرلیک حاوی نانوذره نقره ، نانوذره نقره و تیتانیوم، الیاف آکرلیک فاقد نانوذره (معمولی) در زمان های صفر، ۶، ۲۴ ساعت

باکتری های مفید خاک از جمله باکتری های موثر در تثبیت نیتروژن اثر گذار بوده و رشد آنها را کاهش می دهد . در این پژوهش اثر نانوذرات نقره نیز بر روی باکتری های مفید خاک و کاهش رشد باکتری ها مشاهده گردید. همچنین اثر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر روی رشد باکتری ها گزارشاتی مشاهده شده است (Chang wei et al., 2002, Chen et al., 1999, Maness et al., 2009).
Chang wei و همکارانش در سال ۲۰۰۲ و Chen و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بیان کردند که نانوذره دی اکسید تیتانیوم نیز در اثر تابش نور UV می تواند سبب مرگ میکروارگانیسم شود در این پژوهش الیاف حاوی نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مجاورت باکتری های ریزوبیوم و

در رابطه با اثر گذاری نانوذره نقره بر روی باکتری های خاک چندین گزارش به دست آمده است (Chang wei et al., 2002, Chen et al., 2009, Maness et al., 1999).

Choi و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که اندازه نانوذره بر روی باکتری کشی اثر گذار است و با آزاد ساختن رادیکال آزاد سبب مرگ میکروارگانیسم می شود که اندازه بین ۲۱-۹ نانومتر و کمتر از آن این اثر را تشدید می کند. در این پژوهش نیز اندازه ذرات نانو در حد ۵ نانومتر بود که بر روی باکتری های ریزوبیوم و باسیلوس اثر گذار بوده است. Panyala و همکارانش در سال ۲۰۰۸ و Throback و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نیز بیان کردند که نانوذره نقره بر روی

میکروارگانسیم های مفید و به دنبال آن چرخه عناصر به خطر می افتد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از شرکت پلی آکریل اصفهان و از ریاست محترم این شرکت به ویژه جناب آقای مهندس علیجانلو برای همکاری های بی شائبه و در دسترس قرار دادن الیاف پلی آکرلیک حاوی نانوذره کمال تشکر را دارد.

باسیلوس قرار داده شد اما از اشعه UV استفاده نشد در این حالت نیز کاهش رشد باکتری ها مشاهده گردید و دی اکسید تیتانیوم بر روی باکتری ها اثر کشندگی داشت. به طوری که مشاهده شد الیاف حاوی نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مقایسه با الیاف معمولی فاقد آن اثر کشندگی بیشتری بر روی باکتری ریزوبیوم و باسیلوس داشته و سبب کاهش رشد باکتری شده است.

همان طور که از مطالعات می توان نتیجه گیری نمود در الیافی که همراه با نانوذره نقره به همراه تیتانیوم موجود بوده اثر باکتری کش بیشتر و همچنین با توجه به نتایج حاصل از روش شیک فلاسک می توان این گونه استنباط کرد که باکتری باسیلوس نسبت به ریزوبیوم به الیاف معمولی و الیاف نانوذره تیتانیوم و نانوذره نقره و تیتانیوم حساس تر بوده و در مجاورت با این الیاف رشد آن بعد از ۲۴ ساعت در مقایسه با باکتری ریزوبیوم کاهش بیشتری داشته است.

این نتایج نشان دهنده این است که این الیاف بر روی باکتری های مفید خاک اثر گذار بوده و زندگی این میکروارگانسیم های مفید را به مخاطره می اندازد و با آزاد سازی آنها در محیط زیست، زندگی این

REFERENCES

- قاضی عسگر، لیلا. (۱۳۸۵). بررسی اثر الیاف ضد میکروبی روی فلور طبیعی و باکتری های عفونت زای پوست انسان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.
- Chang Wei, Wen Yuan Lin, Zulkarnain Zainal, Nathan E. Williams, Kai Zhu, Andrew P. Kruzic, Russell L. Smith, and Krishnan Rajeshwar (2002). Bactericidal Activity of TiO₂ Photocatalyst in Aqueous Media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System. *Environmental Science and Technology*. 28(5)934-938.
- Chen.F, Yang.X, Xu.F, Wu.Q and Zhang.Y (2009). Photocatalytic Bactericidal Effect and Organic Matter Degradation of TiO₂ PartI: Observation of Phenomena. *Environment Science and Technology*.43:4.1180-1184.
- Choi.O and Hu. Zh. (2008). Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nano-silver Toxicity to Nitrify Bacteria. *Environmental Science and Technology*. 42.4583-4588.
- Maness.P, Smolinski.Sh, Blake.D.M, Huang.Zh, Wolfrum.E.J, Jacoby.W.A.
- (1999).Bacterial Activity of PhotocatalyticTiO₂ Reaction: toward an
- understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:9.4094-4098.
- Panyala.N.M, Penamendez.E.Havel.M.J.(2008).Silver or nanoparticles:A hazardous threat to environment and human health? *Journal Applied Biomedical*.6.117-122.
- Throback.I.N, Johnasson .M, Rosequist.M, Pell .M, HanssonM, Hallin S. (2007). Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induced enrichment of novel nirk genotypes in soil.*FEMS Microbial*.270.189-194.
- Vicenet.E.J,Vigo.T.L.(2001).Bioactive fibers and polymers.*American Chemical Society*. Washington, D.C.1-5, 90-100, 179-198, 201-212 and 243-251.
- Vijendra Kumar Mishra, Ashok Kumar. (2009). Impact OF Metal Nanoparticles On The Plant Growth Promoting *Rhizobacteria*. 4:3 .587-592