



Synthesis of Titanium Oxide Nanoparticles by Sol-Gel Method and Investigation of Physicochemical and Antibacterial Properties of Them on Prokaryotic and Eukaryotic Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Abdolmajid E.*¹ MSc,
Nemati F.¹ PhD

How to cite this article

Abdolmajid E, Nemati F. Synthesis of Titanium Oxide Nanoparticles by Sol-Gel Method and Investigation of Physicochemical and Antibacterial Properties of Them on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):565-572.

ABSTRACT

Aims The objective of this research was to develop a novel method for the synthesis of colloidal solutions of titanium dioxide nanoparticles with high stability and life span.

Materials & Methods Based on mentioned points, the issue of this study is the synthesis of nanoparticles via chemical reduction process. The morphologies, compositions, and physicochemical properties of the prepared samples were characterized by TEM, XRD and DLS. Also, the cytotoxic effect of fabricated NPs against human white blood cells (WBCs) was investigated via MTT assay. In addition, antibacterial activity was investigated.

Findings The results of this study indicate that the diameter of the synthesized nanoparticles is about 50nm and contains the anatase phase, in the range of 20 from 25-80°C, and the hydrodynamic radius of nanoparticles is about 95.8±12.78nm and the zeta potential of nanoparticles is about -34.87±4.78mV. Also, the effect of toxicity of titanium dioxide nanoparticles on the white blood cell line showed that these nanoparticles cause the toxicity of cells at concentrations above 200µg/ml, but in lower concentrations, normal cells can survive. Also, these nanoparticles at the same low concentrations.

Conclusion In conclusion, colloidal solutions with high stability were successfully synthesized, which, in addition to increasing the antibacterial properties due to diminished dimensions.

Keywords Nanoparticles; Titanium Dioxide; Colloidal Solutions; Antibacterial Properties

¹Biotechnology Department, New Sciences & Technologies Faculty, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Khaghani Street, Shatiati Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1916893813
Phone: +98 (21) 33843320
Fax: +98 (21) 22763459
elhamabdolmajid@iaups.ac.ir

Article History

Received: October 8, 2018

Accepted: May 8, 2019

ePublished: December 21, 2019

CITATION LINKS

[1] Nanotechnology consumer product inventory [2] Characterization and activity of sol – gel prepared TiO₂ photo catalysts modified with Ca, Sr or Ba ion additives [3] Sol-gel preparation and characterization of nanosize TiO₂: Its photocatalytic performance [4] Biogenic unmodified gold nanoparticles for selective and quantitative detection of cerium using UV-vis spectroscopy and photon correlation spectroscopy (DLS) [5] Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles [6] Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester [7] A review of TiO₂ nanoparticles [8] Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery [9] Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties [10] Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan [11] Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo [12] The biological effects of nanoparticles

ساخت نانوذرات اکسیدتیتانیوم به روش سل-ژل و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و آنتیباکتریایی این ذرات روی سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت

الهام عبدالمجید* MSc

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

فهیمه نعمتی PhD

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف از تحقیق حاضر بررسی و معرفی روشی برای سنتز محلول‌های کلوئیدی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با پایداری و عمر بالا بود.

مواد و روش‌ها: در این روش، ابتدا نانوذرات به کمک روش شیمیایی سنتز شد و ویژگی‌های ساختار فیزیکی و شیمیایی این نانوذرات با دستگاه‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری، پراش اشعه ایکس، پراکندگی نوری دینامیکی و زتا پتانسیل مورد بررسی قرار گرفت. سپس تست بررسی سمیت سلولی نانوذرات روی سلول‌های سفید خونی با استفاده از تست MTT انجام شد. سپس فعالیت ضدباکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی حاکی از آن است که قطر نانوذرات سنتز شده حدود ۵۰ نانومتر است و حاوی فاز آنازات، در محدوده ۲۵ تا ۸۰ درجه است و اندازه شعاع هیدرودینامیکی حدود $95/8 \pm 12/78$ نانومتر و مقدار زتا پتانسیل نانوذرات حدود $34/87 \pm 4/78$ میلی‌ولت است. همچنین بررسی اثر سمیت نانوذرات بر رده سلولی گلبول‌های سفید خون نشان داد که این نانوذرات باعث سمیت سلول‌ها در غلظت‌های بالای 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر شده است ولی در غلظت‌های پایین باعث زنده ماندن سلول‌های نرمال شد. همچنین در همین غلظت‌های پایین سلول‌های باکتری را از بین برده است.

نتیجه‌گیری: در نتیجه این پژوهش، محلول‌های کلوئیدی با پایداری بسیار بالا با موفقیت فرآوری شد و می‌توان از این نانوذره به عنوان یک عامل ضدباکتری در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید بهره برد.

کلیدواژه‌ها: نانوذره، دی‌اکسیدتیتانیوم، محلول کلوئیدی، سمیت سلولی، خاصیت ضد میکروبی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۸

*نویسنده مسئول: elhamabdolmajid@iaups.ac.ir

مقدمه

نانوفناوری یک دانش میان‌رشته‌ای است و به رشته‌هایی چون فیزیک کاربردی، مهندسی مواد، مهندسی مکانیک، مهندسی برق، مهندسی شیمی و رشته‌های مرتبط با زیست‌شناسی نیز مربوط می‌شود. در دهه‌های اخیر، فناوری نانو رشد بسیار سریعی داشته است به‌طوری که امروزه از آن در بسیاری از کالاهای مورد مصرف انسان استفاده می‌شود. بررسی بازار ۳۰ کشور در سراسر جهان حاکی از آن است که تا تاریخ اکتبر ۲۰۱۳ میلادی، تعداد محصولات مبتنی بر فناوری نانو به ۱۶۲۸ محصول رسیده است [1].

در این میان، نانوذرات یکی از رایج‌ترین عناصر در فناوری نانو هستند. در حقیقت نانوذرات مجموعه‌ای از اتم‌ها و مولکول‌ها با قطر بین یک تا ۱۰۰ نانومتر هستند. سنتز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی توجه زیادی را در علوم فیزیک، شیمی، زیست‌شناسی، پزشکی، اپتیک، مکانیک و مهندسی به خود جلب کرده است، به‌طوری که تکنیک‌های جدیدی برای بررسی و دستکاری اتم‌ها و مولکول‌ها در حال توسعه هستند. نانوذرات فلزی و اکسید فلزی دارای سطح زیادی هستند و کسر زیادی از اتم‌ها را تشکیل داده‌اند که این امر موجب خواص جالبی مانند فعالیت ضد میکروبی، مغناطیسی، الکترونیکی و کاتالیزوری آنها شده است [2]. تولید نانوذرات با استفاده از روش‌های شیمیایی نیز امکان‌پذیر است. به‌طور مثال نانوذرات اکسیدتیتانیوم را می‌توان با استفاده از یک روش مبتنی بر فناوری سبز و سازگار با محیط زیست در مقیاس آزمایشگاهی سنتز نمود. با توجه به نکات ذکر شده، مساله مورد مطالعه در این پژوهش سنتز نانوذرات اکسیدتیتانیوم به کمک احیای شیمیایی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و تعیین سمیت آن بر سلول‌های سفید خونی و خواص ضدباکتریایی آن است.

مواد و روش‌ها

شایان ذکر است که در تحقیق حاضر ساخت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم براساس مطالعه ونکچال^۳ و همکاران انجام شد [3]. بر این اساس، مقدار $18/6$ میلی‌لیتر تیتانیوم‌ایزوپروپوکسید به $35/7$ میلی‌لیتر اسیدسیتریک در دمای 40°C اضافه شد. سپس مقدار 395 میلی‌لیتر آب مقطر دوبار یونیزه به این محلول به‌صورت قطره‌چکان اضافه و به‌وسیله دستگاه همزن مغناطیسی (استیرر) به مدت یک ساعت در دور 200rpm هم‌زده شد. پس از آن، محلول به‌دست‌آمده در دمای 90°C به مدت ۱۲ ساعت خشک و سپس در دمای 50°C به مدت ۴ ساعت کلسینه شد.

در این تحقیق برای بررسی اندازه، پتانسیل سطح ذره، توزیع پراکندگی و مورفولوژی نانوذرات، از یک سری روش‌ها استفاده شد که هر کدام در زیر جداگانه توضیح داده شده است.

میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری (TEM): TEM ابزاری ویژه در مشخص‌نمودن ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می‌شوند که مطالعات نانوذره ساخته‌شده با قدرت تفکیک بالا و بزرگ‌نمایی خیلی‌زیاد را امکان‌پذیر می‌سازند. علاوه بر این، از این میکروسکوپ‌ها به‌منظور مطالعات ساختارهای بلور، تقارن، جهت‌گیری و نقایص بلوری می‌توان استفاده نمود. بر این اساس، ابتدا نمونه‌های نانوذره سونیکه و سپس توسط TEM تعیین قطر و مورفولوژی شدند.

پراش اشعه ایکس (XRD): در این روش از پراش اشعه ایکس توسط نمونه برای بررسی ویژگی‌های نمونه استفاده می‌شود. روش XRD برای تعیین خصوصیات ساختار کریستالی از قبیل ثابت شبکه، هندسه شبکه، تعیین کیفی مواد ناشناس، تعیین فاز

دی‌اکسیدکربن دار ۵% ننگه‌داری شدند. برای تهیه محیط کشت سلولی RPMI-1640، ابتدا ۱۰/۴ گرم پودر RPMI-1640 داخل ارلن یک‌لیتری ریخته شد که از قبل داخل آن آب مقطر دوبار تقطیر شده ریخته شده است و سپس ۲ گرم بیکرینات سدیم به آن اضافه شد. بعد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱%) به محیط اضافه نموده و در نهایت pH محلول به وسیله اسید هیدروکلریدرک به ۷/۴ رسانده شد. محلولی که تهیه شد را با استفاده از دستگاه فیلتراسیون فیلتر نموده و به ظرف شیشه‌ای استریل شده منتقل و در یخچال نگهداری شد. برای کشت و تکثیر سلول‌ها به این محیط ۱۰% سرم جنین گاوی (FBS) اضافه شد.

برای تیمار سلول‌ها ابتدا 1×10^4 سلول را در یک میلی‌لیتر محیط کشت در ظرف کشت تست ریخته و غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم اکسید سنتز شده برای زمان ۲۴ ساعت تیمار شد. به منظور تهیه استوک از نانوذرات تیتانیوم اکسید سنتز شده محلول در بافر فسفات سدیم استفاده شد.

اندازه‌گیری حیات و تکثیر سلول‌ها کاربردهای مختلفی در تحقیقات دارد. بر این اساس، تست MTT یکی از قدیمی‌ترین روش‌های مورد استفاده است که حساسیت کافی دارد. برای تهیه استوک MTT، ۵ میلی‌گرم از این ترکیب تترازولیم در یک میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات حل شد. سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت و با غلظت‌های متفاوت نانوذرات سنتز شده (یک تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از استوک MTT به سلول‌ها اضافه شد. به مدت ۴ ساعت در انکوباسیون قرار داده شدند و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر بررسی شد.

برای تعیین IC₅₀ ابتدا به تعریف آن پرداختیم IC₅₀، یعنی غلظتی از نانوذرات تیتانیوم اکسید سنتز شده که ۵۰% رشد سلول‌ها را مهار کند. در نتیجه برای یافتن دوز مناسب به منظور آزمایشات بعدی، سلول‌ها را در ظروف کشت ۹۶ تایی با غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم اکسید سنتز شده تیمار کرده و میزان مهار مشاهده شد.

برای تهیه محیط‌های کشت باکتری (BH) ابتدا به وسیله ترازوی دیجیتال، ۳۷ گرم پودر برین‌هارت را درون ارلن حاوی آب مقطر ریخته و حجم آن به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، سپس به نسبت ۱/۵% به آن آگار اضافه شد. ارلن تکان داده شد تا محتویات آن کاملاً حل شود. سپس pH محیط در ۷/۶-۷/۲ تنظیم و برای استریل کردن داخل اتوکلاو قرار داده شد. پس از آن که حرارت محیط به ۴۰ تا ۵۰°C رسید، در شرایط استریل داخل پلیت‌ها توزیع شد.

برای ارزیابی میزان اثر ضد باکتری نانوذرات اکسید تیتانیوم از سه سویه /اشرشیا کلی (ATCC 25922)، /استافیلوکوکوس اورئوس ATCC259، سودوموناس آئروژینوز/ ATCC 27853 استفاده شد. به منظور آماده‌سازی باکتری‌ها به منظور انجام تلقیح، ابتدا یک لوپ از باکتری‌های نگهداری شده روی محیط کشت برین‌هارت به محیط برین‌هارت برات استریل انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای

کریستال‌ها، تعیین اندازه کریستال‌ها، جهت‌گیری تک کریستال، استرس، تنش، عیوب شبکه و غیره، مورد استفاده قرار گرفت. بر این اساس به منظور تهیه WRD، الگوی پراش اشعه ایکس از دستگاه پراش‌سنج پودری X'pert Pro (فیلیپس؛ هلند) با طول موج Cu K α با منبع لامپ اشعه ایکس مس $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ استفاده شد. **پراکندگی نور دینامیکی (DLS):** زمانی که نور به جسم کوچکی مانند یک ذره یا یک مولکول برخورد می‌کند جهت آن تغییر می‌کند در این حالت پراکندگی نوری رخ می‌دهد، اگر نور در اثر برخورد با ذره ناپدید شود، پدیده جذب اتفاق می‌افتد. روش DLS که به طیف‌سنجی همیشگی فوتون (PSS) نیز معروف است، حرکت براونی درون محلول را اندازه می‌گیرد و ارتباط آن را با اندازه ذره بیان می‌دارد [4].

پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین اندازه شعاع هیدرودینامیک، میزان توزیع پراکندگی نانوذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع به منظور تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود.

شعاع هیدرودینامیک و پتانسیل زتا نانوذرات با استفاده از روش DLS و به کمک زتا پتانسیل آنالیزر در ۶۵۷ نانومتر و زاویه ثابت ۹۰ درجه اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم مطابق روش ذکر شده ساخته شد، سپس محلول حاصله با آب دوبار تقطیر ده‌بار رقیق و ۵ دقیقه سونیکه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه، داخل سل دستگاه قرار گرفت و پتانسیل سطح و شعاع هیدرودینامیکی نانوذره توسط دستگاه تعیین شد.

زتا پتانسیل: زتا اختلاف پتانسیل بین آخرین محلول دربرگیرنده ذرات کلئید و اولین لایه غیرمتحرک از حلال اطراف ذرات کلئید است. در این روش بار سوسپانسیون نانوذره نیز توسط دستگاه DLS تعیین شد. شایان ذکر است که غلظت نانوذرات برابر با یک میکرومولار بود.

در این مطالعه سلول‌های خونی سفید (WBCs) به کار رفتند که به صورت تازه استخراج شد.

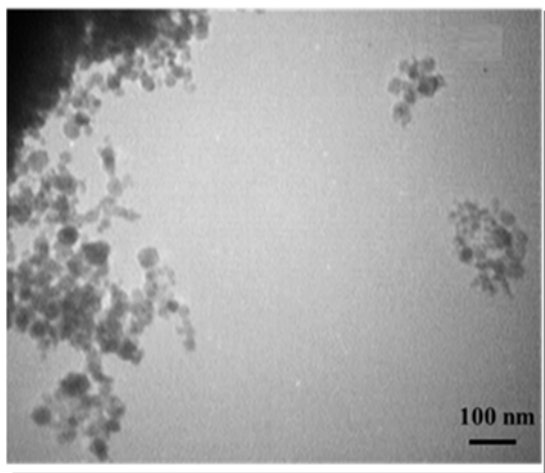
سلول‌های خونی سفید انسانی با استفاده از بافر لیز گلبول قرمز از خون جدا شد. بر این اساس، ابتدا کل خون به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس توسط بافر لیز گلبول قرمز رقیق و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد. پس از آن، دوباره به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ و در بافر نمکی فسفات PBS حل شد و سپس شست‌وشو صورت گرفت. پس از آن دوباره به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ و در نهایت در محیط کشت سلولی کشت داده شد.

برای کشت سلول‌ها، سلول‌های تهیه شده در محیط کشت RPMI 1640 (گیبکو؛ انگلستان) همراه با افزودنی‌های شامل سرم جنین گاوی ۱۰% (FBS؛ گیبکو؛ انگلستان) سرم اسب ۵% (سرم اسبی) و ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) کشت داده و در فلاسک‌های کشت ۴۰ میلی‌لیتری در انکوباتور ۳۷°C

در مطالعه حاضر نیز از پلیت ۹۶ خانه ته گرد و با حجم ۲۰۰ میکرولیتر استفاده شد. غلظت‌های متوالی ۸-۲۵٪ اکسیدتیتانیوم و غلظت‌های متوالی آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین ۱-۱۲۸ تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اکسیدتیتانیوم، آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین به هر چاهک انتقال داده شد. سپس یک میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده و به آن اضافه شد محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط پلیت‌ریدر مجهز به شیکر مخلوط شد. یکی از چاهک‌های پلیت که فقط حاوی محیط کشت و باکتری بود به عنوان کنترل مثبت و یکی دیگر از چاهک‌ها که فقط حاوی محیط کشت بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. در نهایت میکروپلیت برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوباسیون شد. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد.

یافته‌ها

بررسی میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری (TEM): شکل ۱ تصویر میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تولیدشده را نشان می‌دهد. همان‌طور که نشان داده شده است، نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده یک توزیع اندازه باریک با قطر متوسط حدود ۵۰ نانومتر را ایجاد می‌کند. این تصویر همچنین نشانگر تشکیل مجموعه گروه‌های نانوذرات است، که ممکن است به مسیر ساخت نانوذرات مربوط شود.



شکل ۱) تصویر میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده

بررسی پراکندگی نور دینامیکی (DLS): همچنین بررسی پراکندگی نور دینامیکی به منظور اندازه‌گیری میزان توزیع پراکندگی نانوذرات و شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تولیدشده انجام شد. نمودار ۱ نشان می‌دهد که اندازه شعاع هیدرودینامیکی نانوذره حدود ۹۵/۸±۱۲/۷۸ نانومتر است. درواقع، شعاع هیدرودینامیکی عمدتاً بزرگ‌تر از توزیع اندازه تعیین‌شده از ریزشکل

۳۷°C در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm قرار داده شدند، وقتی باکتری‌های مورد نظر به فاز لگاریتمی رشدشان رسیدند، دستگاه اسپکتروفوتومتری روی طول موج ۶۰۰ نانومتر و با محیط برین‌هارت‌براث تنظیم شد. سپس لوله‌های محتوی باکتری توسط اسپکتروفوتومتر با نمونه ۵/۰ مک‌فارلند مقایسه و نمونه مناسب تلقیح تهیه شد.

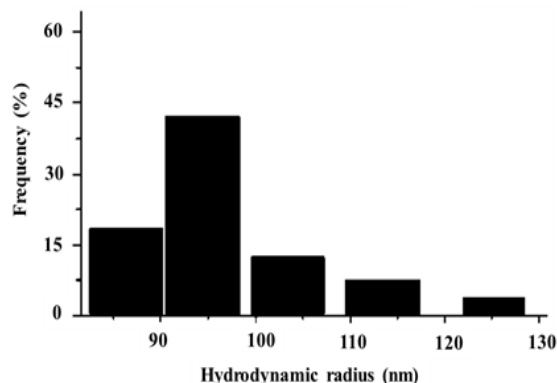
بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم: به منظور تهیه میکروارگانیزم‌های فعال سویه استاندارد، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمایشگاه مرکزی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه استفاده شد. آمپول حاوی میکروب‌ها با احتیاط کامل در شرایط استریل شکسته شد. سپس به مقدار ۵/۰ میلی‌لیتر از محیط کشت BHI- براث به داخل آمپول‌ها تزریق شد. سپس توسط پیپت‌پاستور از ترکیبات سوسپانسیون باکتری به محیط کشت‌های مایع و جامد که از قبل آماده شده بود تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه و سپس در محیط BHI- آگار به روش چمنی چهار مرحله‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از آن، برای تهیه سوسپانسیون میکروبی در مجاورت شعله تعدادی کلنی از کشت ۲۴ ساعته در لوله‌های آب مقطر استریل قرار داده شد و کدورت حاصل از سوسپانسیون توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری در ۶۰۰ نانومتر معادل استاندارد ۵/۰ مک‌فارلند رویت شد.

سنجش اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدتیتانیوم به‌تنهایی در ممانعت از رشد باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش چاهک‌گذاری انجام شد.

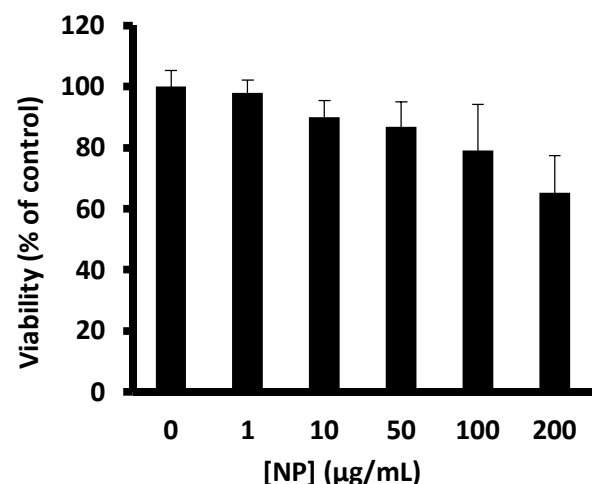
روش چاهک‌گذاری بدین‌صورت بود که ابتدا غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدتیتانیوم از یک دوم تا یک صد و بیست و هشتم تهیه شد. سوسپانسیون باکتری‌های فوق‌الذکر به‌طور جداگانه در محیط کشت برین‌هارت‌براث تهیه و در دمای ۳۷°C برای ۱۰ ساعت انکوبه شدند. به‌منظور انجام روش چاهک‌گذاری به این شکل عمل شد که ابتدا با کمک سوآپ سترون از سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های فوق‌الذکر در تمام سطح پلیت حاوی محیط برین‌هارت‌آگار کشت چمنی داده و سپس چاهک‌هایی به قطر ۶/۵ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد. از هر یک از غلظت‌های نانوذرات اکسیدتیتانیوم میزان ۶۰ میکرولیتر داخل چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها همگی در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد نمونه‌ها به روش میکرودايلوشن: روش میکرودايلوشن، روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه است. تعیین حداقل غلظت مهاری در این روش بر پایه مشاهده چشمی کدورت یا تشخیص کدورت با استفاده از جذب نوری توسط دستگاه الایزاریدر است.

TEM (میکروگراف) به علت اثرات حلال و پیوندهای هیدروژنی مرتبط بین نانوذرات و مولکولهای آب است.



نمودار ۱) بررسی پراکندگی نور دینامیکی (DLS) نشان می‌دهد که اندازه هیدرودینامیکی نانوذره حدود $90/8 \pm 12/78$ نانومتر است.



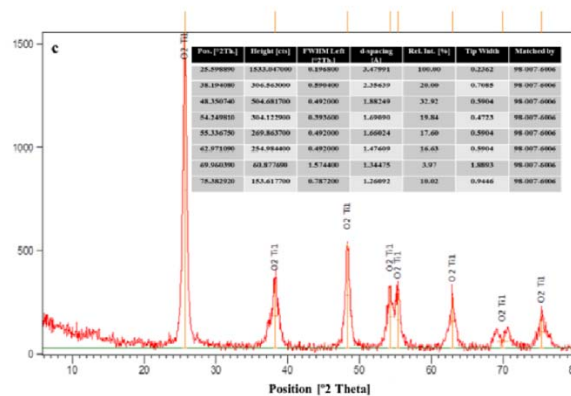
نمودار ۳) درصد سلول‌های زنده با استفاده از آزمون MTT

مطالعات خواص ضدباکتری نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم: جدول ۱ مقدار MIC و MBC نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم قرار داده شده در برابر سه سویه باکتری را نشان می‌دهد. تمامی ارقام دلالت بر آن دارند که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم اثرات ضدباکتری قوی روی گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب با $MIC=50 \pm 10/77$ میکروگرم در میلی‌لیتر، $MIC=50 \pm 10/80$ میکروگرم در میلی‌لیتر و $MIC=25 \pm 1/77$ میکروگرم در میلی‌لیتر از خود نشان می‌دهند.

جدول ۱) مقادیر MIC و MBC نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سه سویه باکتری (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

باکتری	MIC	MBC
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	$25 \pm 1/77$	$25 \pm 1/77$
<i>سودوموناس آئروژینوزا</i>	$50 \pm 10/80$	$50 \pm 10/80$
<i>اشرشیا کلی</i>	$50 \pm 10/77$	$50 \pm 10/77$

بررسی پراش اشعه ایکس (XRD): نمودار ۲ الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات تولید شده را نشان می‌دهد. با توجه به داده‌های XRD، نمونه مورد بررسی حاوی فاز آناتاز دی‌اکسیدتیتانیوم، در محدوده 2θ از $20-30^\circ$ درجه است. از آنجایی که فازهای مختلف بلوری در گروه XRD وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که اکثر نانوذرات تولید شده در نمونه فاز آناتاز را نشان می‌دهند. در مطالعه ردی و همکاران تولید سل-ژل منجر به تشکیل ماهیت کریستالی اشباع شده در نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم از جمله فاز آناتاز می‌شود [5].



نمودار ۲) الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات تولید شده

بررسی زتا پتانسیل: همچنین آنالیز زتا پتانسیل به منظور تعیین بار سطحی نانوذره تولید شده انجام شد. نتایج بررسی حاکی از آن است که مقدار زتا پتانسیل نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم حدود $-34/87 \pm 4/78$ میلی‌ولت است. این داده‌ها ممکن است پایداری کلوئیدی نسبتاً خوبی از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم تولید شده را نشان دهند.

تست MTT: سلول‌های خونی سفید انسانی انکوبه شده با دوزهای مختلفی از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ساخته شده از یک تا

انواع رایج میکروارگانیسم‌هایی است که سبب عفونت در جراحات می‌شود. این باکتری آنزیم بتالاکتاماز را تولید می‌کند که موجب مقاومت به پنی‌سیلین می‌شود [6].

بنابراین به‌کارگیری راهکارهای جدید برای اثربخشی بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها در دوزهای پایین‌تر امری ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، موادی با ابعاد نانو وارد میدان شده‌اند که نقش این نانومواد به‌عنوان عوامل جدید ضد میکروبی و نیز حامل‌هایی برای رساندن آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی شامل نوع مقاوم به آنتی‌بیوتیک، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در مدل‌های حیوانی ثابت شده است.

می‌توان گفت که دلایل زیادی برای استفاده از نانوذرات به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی وجود دارد. یکی از این عوامل، سطح وسیع یک نانوذره نسبت به حجم آن است که منجر به ایجاد ویژگی‌های مختلفی همچون ویژگی‌های مکانیکی، شیمیایی، الکتریکی، نوری و مغناطیسی منحصر به فردی در نانوذره می‌شود که نانوذره را از شکل توده‌ای آن متفاوت می‌سازد.

در این میان، اکسیدتیتانیوم از جمله موادی است که می‌توان از خاصیت ضدباکتریایی آن استفاده نمود. خواص جالب این نانوذره فلزی شامل سمیت پایین و عدم واکنش آلرژیک یا درماتیت تماسی علاوه بر خواص متعدد فیزیکی، الکتریکی، نوری و فتوکاتالیستی است که مورد توجه محققان علوم مختلف قرار گرفته است. نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن می‌تواند در تولید انواع رنگ، لوازم آرایشی و بهداشتی، ساخت سرامیک، ساخت فتوکاتالیست‌ها، تصفیه آب و فاضلاب، فیلتراسیون گازها و بسیاری از صنایع دیگر کاربرد داشته باشد [7].

در این مطالعه، از روش آقای ونکچالم توسط روش سل-ژل برای ساخت نانوذرات اکسیدتیتانیوم استفاده و سپس به‌وسیله TEM، XRD و DLS و زتا پتانسیل تعیین ساختار شد.

اندازه کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر این امکان را فراهم می‌کند که نانوذره از طریق رگ‌های خونی و عبور از منافذ موجود در دیواره اپیتلیال به بافت نفوذ کند که به‌عنوان یک مزیت برای نانوذره به‌منظور دارورسانی و پروتئین‌رسانی محسوب می‌شود [8].

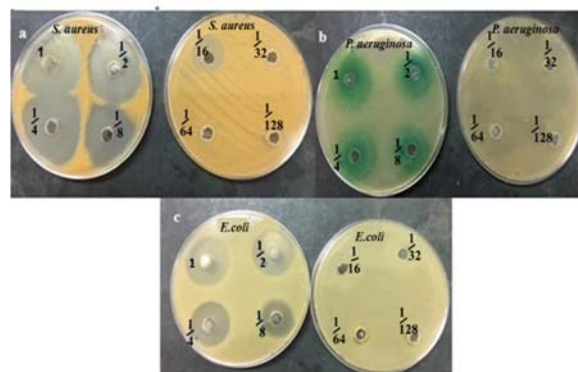
در آزمایشات انجام‌شده، پتانسیل زتا نانوذرات، حدود $34/87 \pm 4/78$ میلی‌ولت بود که نشان‌دهنده پایداری نانوذرات و امکان نگهداری طولانی‌مدت ذرات است.

پتانسیل زتا که همان بار سطح است، به‌طور عمده می‌تواند بر پایداری ذره در سوسپانسیون از طریق دافعه الکتروستاتیک بین ذرات تأثیرگذار باشد. مطالعات بین و همکاران نشان می‌دهد که نانوذرات با بار سطحی بالای ۳۰ میلی‌ولت پایدارتر هستند و این مساله از به‌هم‌چسبیدن ذرات جلوگیری می‌کند و منجر به افزایش پایداری نانوذرات می‌شود [9].

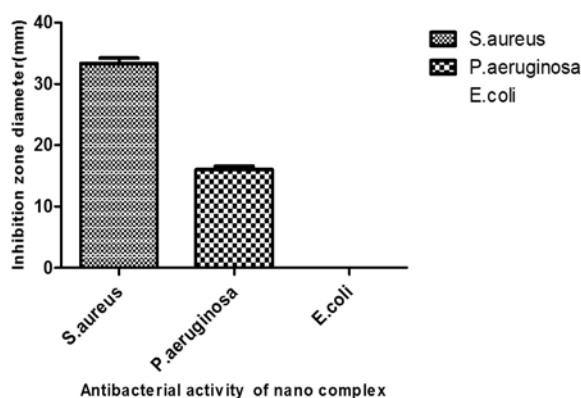
به‌منظور بررسی سمیت سلولی نانوذرات ساخته‌شده روی رده سلول‌های سفید خونی، ابتدا کشت سلول انجام و سپس درصد سلول‌های زنده با استفاده از تست MTT تعیین شد.

همچنین مقدار MBC مشاهده‌شده در تحقیق حاضر برای نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده به‌ترتیب با $50 \pm 0/57$ میکروگرم در میلی‌لیتر، $50 \pm 0/50$ میکروگرم در میلی‌لیتر و $25 \pm 1/77$ میکروگرم در میلی‌لیتر برای گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

فعالیت‌های ضدباکتری نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم پس از آماده‌سازی در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج مطالعات بیانگر آن است که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم اثرات ضدباکتریایی نسبت به گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان می‌دهند. نمودار ۴ قطر منطقه بازدارندگی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان می‌دهند.



شکل ۲) منطقه بازدارندگی ایجاد شده توسط نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سه گونه باکتری (a) *استافیلوکوکوس اورئوس*، (b) *سودوموناس آئروژینوزا*، (c) *اشرشیا کلی*



نمودار ۴) فعالیت‌های ضدباکتری نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سویه‌های باکتری تست‌شده به‌وسیله روش چاهک پلیت (اندازه‌گیری قطر منطقه بازدارندگی به میلی‌متر)

بحث

توسعه مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها در آینده نزدیک بیماری‌های عفونی را به یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های سلامتی در سراسر جهان تبدیل خواهد کرد. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از

فعالیت ضد میکروبی آن را در پی دارد. اکسیدتیتانیوم با داشتن خاصیت ضدباکتریایی می‌تواند حداقل غلظت مهاری را به خصوص در مقابل سویه مقاوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش دهد که امروزه یکی از عمده‌ترین مسایل در درمان بیماری‌های عفونی است. در نتیجه دوز مصرفی آنتی‌بیوتیک و متعاقب آن اثرات جانبی نامطلوب دارو می‌تواند کاهش یابد که البته اثبات آن، نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

علاوه بر این، شیوع و ظهور مقاومت میکروبی و باکتری‌های مقاوم در بیماری‌های مختلف باعث شده است که بررسی و توسعه راهبردهای درمانی بهتر و موثرتر از جمله آنتی‌بیوتیک‌های جدید ضروری به نظر برسد. بنابراین امروزه تحقیقات درباره نانوذرات دارای فعالیت ضدباکتری یکی از مهم‌ترین زمینه‌های مطالعاتی در حوزه علوم زیست‌پزشکی و دارویی به شمار می‌آید. بنابراین نانومواد به دلیل خاصیت ضد میکروبی بسیار موثر خود جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به خصوص در تشخیص و درمان بیماری‌های گوناگون دارند. در آزمایش سلولی مشاهده شد که نانوذرات اکسیدتیتانیوم روی سلول‌های بنیادی انسان در غلظت‌های بالا (۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اثر سمیت و کشندگی دارند. این مقدار بسیار بالاتر از مقادیر MIC نانوذرات در برابر باکتری‌ها، از جمله *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. به‌طور کلی اگر این موضوع در مورد عوامل بالقوه آنتی‌بیوتیک به کار رود، وجود نانوذراتی که سلول‌ها را در برابر سمیت سلول‌های نانوذرات محافظت نمایند، کاربردی و قابل اجرا به نظر می‌رسد.

در این مطالعه مقدار MIC نانوذرات اکسیدتیتانیوم برای باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تر نانوذرات در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* ممکن است به دلیل تفاوت ساختار و ضخامت دیواره سلولی این باکتری‌ها باشد.

به هر حال، نوآوری این اثر از آنجا مشخص می‌شود که نانوذرات اکسیدتیتانیوم ساخته‌شده هیچ‌گونه اثرات مضر روی سلول‌های خونی سفید انسانی ندارند، در حالی که اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای در برابر میکروارگانیسم‌ها از خود نشان می‌دهند.

در ادامه برای پژوهش‌های آینده پیشنهاد می‌شود که مورد ذکرشده در ذیل مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد:

به نظر می‌رسد که تفاوت بین نتایج مطالعه حاضر و سایر داده‌های گزارش‌شده به دلیل پایداری کلئیدی، زتا پتانسیل، مورفولوژی و توزیع اندازه نانوذرات است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که نانوذرات اکسیدتیتانیوم ساخته‌شده از لحاظ ابعاد، اصلاح سطح و پایداری کلئیدی بهینه شوند تا کارایی ضد میکروبی آنها بهبود یابد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه این پژوهش، محلول‌های کلئیدی با پایداری بسیار بالا با

اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید در غلظت‌های کم نشان‌دهنده افزایش گلبول‌های سفید بود که بیان می‌دارد در ابتدا بدن در جهت مقابله با این ذرات ورودی تولید گلبول‌های سفید را افزایش می‌دهد ولی با تضعیف بدن در غلظت‌های بالا با کاهش تولید گلبول‌های سفید مواجه هستیم. به نظر می‌رسد نانوذره اکسیدتیتانیوم فرآیندهای مختلفی را در بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد [10].

پیش‌بینی می‌شود نانوذرات با افزایش التهاب غدد لنفاوی، درگیری سلول‌ها در واکنش‌های التهابی را بیشتر کرده و به موازات آن موجب افزایش انتقال لنفوسیت‌های مرحله G ۱ به مرحله S تقسیم سلولی می‌شود. در ضمن مسمومیت‌های ناشی از نانوذرات اکسیدتیتانیوم فعالیت غده تیموس را کاهش می‌دهد، این غده در تکامل ایمنولوژیکی سلول‌های T دارای نقش بسیار مهمی است [11].

همچنین در جریان مسمومیت ناشی از نانوذرات اکسیدتیتانیوم پیش‌بینی می‌شود واکنش‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های سیستم ایمنی افزایش یابد.

بعضی از این عوامل موجب کاهش و برخی باعث افزایش میانگین تعداد سلول‌های سفید خونی می‌شوند. بسته به این که نانوذرات اکسیدتیتانیوم در چه غلظتی و طی چه مدتی استفاده شود می‌تواند هر یک از مراحل ذکرشده کاهش یا افزایش سلول‌های سفید خونی را موجب شود. پیش‌بینی می‌شود غلظت بالای اکسیدتیتانیوم به علت مهار فعالیت سلول، خاصیت آنتی‌بیوتیک و همچنین تحریک استرس اکسیداتیو در سلول و کاهش آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی و افزایش درگیری سلول‌ها در فرآیندهای ایمنی موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌شود [11].

برای جبران این کاهش، بدن تولید سلول‌های سفید را افزایش می‌دهد. التهاب ایجادشده در غدد لنفاوی نیز به افزایش تعداد سلول‌های سفید کمک می‌کند، ولی با گذشت زمان فعالیت این غدد ضعیف شده و غدد لنفاوی دچار آتروفی می‌شوند که جبران‌ناپذیر خواهد بود. در نتیجه در مسمومیت‌های شدید کاهش تعداد سلول‌ها ظاهر می‌شود.

گزارش شده است نانوذرات همراه با فعالیت زیاد احتمالاً در بافت‌های هدف نفوذ می‌کنند و سبب عملکرد نامطلوب اندام‌ها می‌شوند. نانوذرات می‌توانند به اعماق بافت‌ها نفوذ کنند و به سیستم لنفاوی راه یابند [12].

به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات ساخته‌شده، ابتدا باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* کشت داده شدند و تست‌های تاییدی برای فرم مقاوم انجام شد. سپس حداقل غلظت مهاری هر سه سویه تعیین شد. همچنین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت مهاری (MIC) *استافیلوکوکوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی* به ترتیب ۲۵، ۷۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ساخت نانوذرات اکسیدتیتانیوم چندین مزیت از جمله افزایش پایداری و سمیت پایین در زنده‌مانی سلول‌های سفید خونی و پتانسیل افزایش بازده

- 3- Venkatachalam N, Palanichamy M, Murugesan V. Sol-gel preparation and characterization of nanosize TiO₂: Its photocatalytic performance. *Mater Chem Phys*. 2007;104(2-3):454-9.
- 4- Priyadarshini E, Pradhan N, Panda PK, Mishra BK. Biogenic unmodified gold nanoparticles for selective and quantitative detection of cerium using UV-vis spectroscopy and photon correlation spectroscopy (DLS). *Biosens Bioelectron*. 2015;68:598-603.
- 5- Reddy KM, Manorama SV, Reddy AR. Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 2003;78(1):239-45.
- 6- Ali SW, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydr Polym*. 2011;83(2):438-46.
- 7- Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chin Sci Bull*. 2011;56(16):1639-57.
- 8- Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;44(2-3):65-73.
- 9- Yien L, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int J Biomater*. 2012;2012:632698.
- 10- Wu MM, Chiou HY, Wang TW, Hsueh YM, Wang IH, Chen CJ, et al. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environ Health Perspect*. 2001;109(10):1011-7.
- 11- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen Ch, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett*. 2006;163(2):109-20.
- 12- Revell PA. The biological effects of nanoparticles. *Nanotechnol Percept*. 2006;2:283-98.

موفقیت فراوری شد و مورد آزمون‌های مشخصه‌یابی قرار گرفت. همچنین با کاهش ابعاد نانوذرات، از مقدار مصرفی دی‌اکسیدتیتانیوم بسیار کاسته شد که علاوه بر افزایش خاصیت آنتی‌باکتریال به دلیل کاهش ابعاد، منجر به کاهش قیمت تمام‌شده آن نیز شد و می‌توان از این نانوذره به‌عنوان یک عامل ضدباکتری در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید بهره برد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی (IAUPS) تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: الهام عبدالمجید (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰٪)؛ فهیمه نعمتی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: هزینه‌های پژوهش منتج به این مقاله از هزینه شخصی اینجانب/الهام عبدالمجید تامین شده است.

منابع

- 1- Woodrow Wilson Database. 2014. Nanotechnology consumer product inventory. <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>. Accessed September. 24, 2015.
- 2- Al-Salim NI, Bagshaw SA, Bittar A, Kemmtt T, Mcquillan AJ, Mills AM, et al. Characterization and activity of sol – gel prepared TiO₂ photo catalysts modified with Ca, Sr or Ba ion additives. *J Mater Chem*. 2010;10:2358-63.