وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی- پژوهشی علوم و فناوری رنگ/ ۹ (۱۳۹۴)، ۱۱۱-۱۰۱

نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

سمّیت پوشش‌های سیمانی حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بر باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*

اعظم یوسفی[۱]، پریسا حجازی[۲*]، علی اله‌وردی[۳]

۱ـ دانشجوی دکتری، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۸۴۱۳۱۱۴

۲ـ استادیار، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۸۴۱۳۱۱۴

۳ـ دانشیار، مرکز تحقیقات سیمان، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۸۴۱۳۱۱۴

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۰ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۴/۶/۲۰

چکیده

اغلب مطالعات صورت گرفته بر روی ویژگی ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، در اثر فعالیت کاتالیزگری نوری آن در آب دیونیزه می‌باشد. پژوهش‌های ناچیزی نشان داده‌اند که وجود نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت و در شرایط تاریکی، می‌تواند مانع رشد باکتری‌ها و نهایتاً مرگ آن‌ها شود. در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در سامانه‌های دوغابی و تثبیت شده (۰٫۱-۱٪)، بر باکتری تیوباسیلوس تیوپاروس، به عنوان اولین باکتری درگیر در تخریب بیولوژیکی سیمان، در محیط کشت اختصاصی آن بررسی شده است. به منظور رصد زنده بودن باکتری‌ها، از اندازه‌گیری‌های pH و کدورت سوسپانسیون محیط کشت استفاده شده است. نتایج نشان دادند که تیوباسیلوس تیوپاروس در حضور سیمان‌های حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم رشد نکرده و در زمان‌های تماس طولانی‌تر می‌میرد. بهترین درصد افزودن نانوذرات به سیمان، برای داشتن ویژگی ضدباکتریایی ۱٪ می‌باشد. بنابراین با این روش، می‌توان پوشش‌های سیمانی ضدمیکروبی به منظور محافظت از تخریب بیولوژیکی تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، سمّیت، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، سیمان، باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*.

Toxicity of the Cementitious Coatings Containing Nano-TiO_2 Towards *Thiobacillus Thioparus* Bacterium

A. Yousefi[1], P. Hejazi[*1], A. Allahverdi[2]

[1] Biotechnology Research Laboratory, School of Chemical Engineering, Iran University of Science and Technology, P.O.Box: 168413114, Tehran, Iran

[2] Cement Research Center, School of Chemical Engineering, Iran University of Science and Technology, P.O.Box: 168413114, Tehran, Iran

Received: 29-07-2014 Accepted: 10-01-2015 Available online: 11-09-2015

Abstract

Most studies on antimicrobial properties of nano-TiO_2 in deionized water deal with its photocatalytic properties. Few studies have shown that the presence of nano-TiO_2 can inhibit the growth of the bacteria and it ultimately kills them in a culture medium in the dark. In this study, the antibacterial effects of suspended in a culture medium and immobilized nano-TiO_2 systems in cement bed (0.1-1%) were investigated on Thiobacillus thioparus as a bacterium involved in cement biodegradation. The pH and turbidity tests were carried out in order to monitor the viability of the bacteria in the culture medium. The results showed that T. thioparus did not grow in the presence of cements containing nano-TiO_2 and at longer contact time the bacterial death occurred. The optimum concentration of nano-TiO_2 has been found to be 1% to maintain antibacterial properties. Thus, with evaluation of the toxicity effects, the cementitious antimicrobial coatings could be produced by immobilized nano-TiO_2 for self-protected against biodegradation. J. Color Sci. Tech. 9(2015), 101-111©. Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Antimicrobial activity, Toxicity, Nano-TiO_2, Cement paste, *Thiobacillus Thioparus*.

***Corresponding author: phejazi@iust.ac.ir**

۱ـ مقدمه

پژوهشگران زیادی به مطالعه و بررسی خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم توسط فعالیت کاتالیزگری نوری آن‌ها تحت تابش فرابنفش پرداخته‌اند [۲۵-۱]. تا جائی که ما مطلع هستیم، اکثر این پژوهش‌ها در آب دیونیزه و یا آب مقطر، به مطالعهٔ فعالیت کاتالیزگری نوری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم تا مرگ کامل میکروارگانیسم‌ها پرداخته‌اند. در این پژوهش‌ها اشاره شده است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در تاریکی و در آب دیونیزه اثر سمی بر میکروارگانیسم‌ها ندارند. اما باید توجه داشت که شرایط محیط‌های واقعی به محیط کشت باکتری‌ها نزدیک‌ترند تا به آب دیونیزه. هم‌چنین تعداد محدودی از پژوهش‌ها [۲۶، ۱۰]، به رشد مجدد باکتری‌ها در دوره تاریکی پس از تابش فرابنفش و فعالیت کاتالیزگری نوری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، با سرعت بیشتر اشاره کرده‌اند. هر چند تعداد محدودی از مطالعات [۲۷] فعالیت کاتالیزگری نوری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم را در محیط کشت میکروارگانیسم‌ها، به منظور بررسی اثر بازدارندگی[1] نانوذرات انجام داده‌اند. تااو[2] و همکارانش [۲۷] نتیجه گرفته‌اند که افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، باعث طولانی‌تر شدن فاز تاخیر رشد باکتری ای‌کلای می‌شود. در کنار این دسته از پژوهش‌ها، محققانی به مطالعه ویژگی‌های بازدارندگی، سمّیت[3] و ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در تاریکی و در محیط کشت میکروب‌ها مشغول هستند. آنان با واردکردن غلظت‌های مختلف از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط‌های کشت مایع و یا جامد انواع میکروارگانیسم‌ها، به صورت پودر و یا کامپوزیت‌های پلیمری و یا دوپ شده با فلزات مختلف، خاصیت بازدارندگی و سمیت از رشد و نهایتاً مرگ میکروارگانیسم‌ها را توسط چگالی نوری محیط کشت مایع، شمارش تعداد کلنی‌های زنده و آزمون نفوذ دیسک[4] محیط کشت جامد گزارش کرده‌اند [۳۵-۲۸]. در مطالعات فوق به سازوکار مهارکنندگی و بازدارندگی از رشد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بر میکروارگانیسم‌ها اشاره نشده است، اما در پژوهش‌ها [۳۶، ۳۲] آمده است که اگر نانومواد را در محیط‌های کشت باکتری‌ها وارد کنیم، مقاومت میکروارگانیسم‌ها کاهش یافته به طوری که در آزمون‌های آزمایشگاهی نانومواد، باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها، در عرض چند دقیقه بعد از تماس با نانومواد از بین می‌روند. به هر حال سازوکارهای دقیقی که به وسیله آن نانومواد رشد میکروبی را مهار می‌کنند، کاملاً درک نشده و هم‌چنان ناشناخته هستند. به طور کلی در مورد سازوکارهای احتمالی فعل و انفعال‌های نانو مواد با ماکرومولکول‌های بیولوژیکی، اعتقاد بر این است که نانو مواد یون‌هایی را آزاد می‌کنند که با گروه تیول (SH) پروتئین‌های موجود بر سطح سلول باکتری‌ها واکنش می‌دهند. نانومواد این پروتئین‌ها را غیرفعال کرده، نفوذپذیری غشاء را تغییر داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌شوند.

بر طبق اطلاعات ما هیچ یک از پژوهش‌ها، اثر ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم را بر باکتری‌های تخریب کنندهٔ سیمان از جمله باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در هیچ سامانه‌ای، با استفاده از اثر سمّیت، بازدارندگی و کشندگی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت اختصاصی آن و در تاریکی بررسی نکردند. هدف این مطالعه، بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در سامانه‌های دوغابی و تثبیت شده در سیمان بر باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، در محیط کشت اختصاصی آن است.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه، هیدروکسید کلسیم با خلوص ۹۶٪ از شرکت مرک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم تجاری با عنوان P25 می‌باشند. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم مورد استفاده، دارای اندازه ذرات ۱۰± ۲۱ نانومتر، سطح ویژه ۵۰ m^2/g و خلوص ۹۹٫۵٪ بوده و دارای خاصیت کاتالیزگری نوری [۳۷] هستند. از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در ساخت نمونه‌های سیمانی با درصدهای ۱-۰٫۱ استفاده شد. نمک‌های معدنی استفاده شده برای تهیه محیط کشت باکتری، از شرکت مرک آلمان و پودر آگار، از شرکت ایتالیایی لیوفیل کم[5] مورد استفاده قرار گرفتند.

پودر سیمان پرتلند نوع ۲ استفاده شده در این پژوهش دارای ترکیب شیمیایی مطابق جدول ۱ و خواص فیزیکی نرمی بلین ۳۰۲ m^2/kg و چگالی ۳۱۲۰kg/m^3 می‌باشد.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی سیمان پرتلند نوع ۲.

ترکیب شیمیایی	غلظت (%W/W)	ترکیب شیمیایی	غلظت (%W/W)
CaO	۶۳٫۲۶	SO_3	۱٫۸۰
SiO_2	۲۲٫۵۰	K_2O	۰٫۶۵
Al_2O_3	۴٫۱۵	Na_2O	۰٫۲۰
Fe_2O_3	۳٫۴۴	Free-CaO	۰٫۷۲
MgO	۳٫۲۵	LOI	۰٫۶۱

۲ـ۲ـ میکروارگانیسم

در پژوهش حاضر از باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* به عنوان باکتری تخریب‌کننده سیمان استفاده شده است. باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* PTCC ۱۶۶۸ از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های

1- Inhibitory effect
2- Han Tao
3- Toxicity
4- Disc Diffusion Method
5- Liofilchem

ایران[1] (IROST) وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. pH بهینه رشد این باکتری ۷ و دمای آن ۳۰-۲۵ °C است. اجزای محیط کشت اختصاصی مایع مورد استفاده شامل: NH_4Cl ۰,۴، $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ۰,۲، K_2HPO_4 ۲، KH_2PO_4 ۲، $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ۵، Na_2CO_3 ۰,۴ گرم در لیتر آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت. این میکروارگانیسم در محیط کشت اختصاصی مایع خود در یخچال نگهداری و هر ۲ تا ۳ هفته یک‌بار تجدید کشت شد. محیط کشت جامد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* PTCC ۱۶۶۸، حاوی محیط کشت مایع اختصاصی آن به علاوه ۱,۵٪ آگار بود.

۲-۳- روش کار

رشد باکتری در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت با ۱٪ تلقیح باکتریایی با pH = ۴,۵ و در داخل شیکر انکوباتور اربیتالی با دمای ۳۰ °C و دور ۱۵۰ rpm، به صورت سه بار تکرار، صورت گرفت. آزمایش‌های ضدباکتریایی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت باکتری و در سامانه‌های دوغابی و تثبیت شده به صورت دو بار تکرار، انجام شدند که در ادامه توضیح آن‌ها آمده است.

۲-۳-۱- سامانه دوغابی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم

ابتدا یک لیتر محیط کشت در شرایط ۱۲۱ °C و فشار ۱,۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. پس از خنک‌شدن، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم به آن افزوده شده و به شدت مخلوط شدند تا سوسپانسیون نانوذرات با غلظت مشخص تهیه شود. این آزمون در ارلن‌های ۱۰۰ CC با و بدون حضور نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اختصاصی و با ۱٪ تلقیح باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در انتهای فاز لگاریتمی آن در شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۳۰ ^{o}C انجام شد. از آنجا که در مطالعات قبلی، کمینه و بیشینه غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در سامانهٔ دوغابی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، برای بررسی فعالیت کاتالیزگری نوری آن‌ها در آب دیونیزه برابر ۰,۱ g/l و ۱ در نظر گرفته شده بود، برای انجام آزمایش‌های اثر سمّیت آن‌ها، غلظت ۰,۳۵ g/l نانوذرات بین دو غلظت ذکر شده در نظر گرفته شد. در روزهای مختلف کشت، اندازه‌گیری کدورت و pH محیط تمامی ارلن‌ها، به عنوان یکی از شاخص‌های رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، تا ۱۲ روز انجام شد.

۲-۳-۲- سامانه تثبیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر سیمان

در ابتدا، نمونه‌های سیمانی حاوی درصدهای مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم تهیه شدند. بدین منظور، مقدار مشخص نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (۰، ۰,۱، ۰,۵ و ۱ گرم نسبت به ۱۰۰ گرم پودر سیمان) وزن شده، به ۳۵ میلی‌لیتر محلول آب آهک اشباع صاف‌شده [۳۷]، اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه تحت عملیات فراصوت (مدل Badelin 2070) با توان ۷۰ وات به صورت پالسی (۰,۷۰ ثانیه روشن و ۰,۳۰ ثانیه خاموش) قرار داده شدند تا سوسپانسیون یکنواخت و پایداری حاصل گردد. سوسپانسیون آماده شده فوراً به پودر سیمان در دمای محیط افزوده شده و به طور دستی، کاملاً مخلوط شدند تا خمیر یکنواختی ایجاد گردد. برای ساخت نمونه‌های سیمانی، از نسبت آب به سیمان در مقدار ثابت ۰,۳۵ استفاده شد. خمیرهای سیمانی در قالب‌های مکعبی به ابعاد ۲۰ mm قالب‌گیری شدند. قالب‌ها در محیطی با رطوبت بالای ۹۵٪ و دمای ۲۵ ^{o}C به مدت ۱ روز ذخیره شدند و پس از آن، نمونه‌ها از قالب‌ها خارج شدند. pH اولیه نمونه‌های سیمانی بالای ۱۲ بوده و این محیط خود به خود کشنده باکتری‌هاست. برای کاهش pH سطحی نمونه‌های سیمانی در آزمایشگاه پس از خروج آن‌ها از قالب، به مدت ۲۷ روز در زیر آب جاری قرار داده شدند تا هم فرآیند هیدراتاسیون فازهای مختلف سیمان انجام شود و هم فروشوئی پرتلندایت از درون نمونه‌ها صورت‌پذیرد. سپس ۶ روز در مجاورت اسید سولفوریک بیولوژیکی استریل [۳۸] با pH < ۲ قرار داده شدند. نسبت حجم سولفوریک اسید بیولوژیکی به سطح نمونه‌های سیمانی برابر با ۵ در نظر گرفته شد. با کاهش مناسب pH سطحی نمونه‌ها تا حدود ۷، آن‌ها آمادگی لازم را برای آزمون‌های ضدباکتریایی به دست آوردند.

مشابه آزمایش بخش ۲-۳-۱، بررسی سمیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم تثبیت شده در بستر سیمان بر باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت اختصاصی آن به همراه نمونه‌های شاهد تکرار گردید. این آزمون در شرایط شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ rpm، دمای ۳۰ ^{o}C، نسبت حجم محیط کشت به حجم ارلن برابر ۱ به ۲ و در تاریکی مطابق جدول ۲ انجام شد. به هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری دهان گشاد، ۱٪ باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در انتهای فاز لگاریتمی رشد به جز آزمایش‌های شمارهٔ ۱ و ۲ تلقیح شد. از هفت آزمون معرفی شده در جدول ۲، چهار آزمون مربوط به آزمایش‌های شاهد و سه آزمون مربوط به سمیت سامانه تثبیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم با درصدهای مختلف در بستر سیمان می‌باشند. آزمایش‌های شاهد مربوط به میزان فروشوئی اجزا سیمان با و بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت اختصاصی باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* و هم‌چنین رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت اختصاصی خود با و بدون نمونه سیمانی شاهد می‌باشند.

در روزهای مختلف کشت، *اندازه‌گیری* pH و میزان کدورت محیط کشت تمامی ارلن‌ها، به عنوان شاخص‌های رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، تا ۱۸ روز انجام شد.

1- Iranian Research Organization for Science and Technology

جدول ۲: مشخصات آزمایش‌های بررسی سمّیت سامانه تثبیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در شرایط تاریکی.

شماره	مقدار نانوذرات (٪)	هدف	توضیح
۱	۰	بررسی میزان فروشوئی پنج عدد نمونهٔ سیمانی در محیط کشت مایع اختصاصی باکتری	نمونه شاهد
۲	۱	*تیوباسیلوس تیوپاروس* بدون تلقیح	
۳	۰	بررسی رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محلول محیط کشت مایع اختصاصی	
۴	۰	بررسی میزان رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت مایع اختصاصی خود به همراه پنج عدد نمونهٔ سیمانی	بررسی اثر سمیت
۵	۰,۱		
۶	۰,۵		
۷	۱		

۲ـ۳ـ۳ـ آزمایش‌های بررسی رفتار باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در حضور نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت در شرایط دوره‌ای تابش و تاریکی

برای شبیه‌سازی محیط واقعی رشد باکتری‌ها، از دوره‌های تاریکی و تابش نور (با استفاده از لامپ فرابنفش ۱۶۰ واتی ساخت شرکت ناروا[1]) تا ۳ روز استفاده شد، تا هم از اثر سمّیت در تاریکی و هم از فعالیت کاتالیزگری نوری نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت اختصاصی آنها استفاده گردد. این آزمون در شرایط ۱۰۰ rpm، دمای ۳۵-۲۵ ^{o}C و نسبت حجم محیط کشت به حجم ارلن برابر با ۱ به ۲,۵، به صورت دو بار تکرار، به همراه آزمون شاهد حاوی نمونه سیمانی بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، انجام شد. به هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر دهانه گشاد حاوی محیط کشت و نمونه‌های سیمانی، ۱٪ باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در انتهای فاز لگاریتمی آن، تلقیح شد. در روزهای اول تا سوم، ارلن‌ها به ترتیب در معرض ۸ ساعت تابش و ۱۶ ساعت تاریکی قرار داده شدند. در انتهای زمان‌های تابش و تاریکی، از هر ارلن (شاهد و اصلی) زیر کشت مایع در محیط کشت جدید درون ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتر گرفته شد و در شرایط شیکرانکوباتور (۱۰۰ rpm و ۳۰ ^{o}C) کشت داده شدند. پس از آن، ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر اولیه همراه با محلول‌های باقی‌مانده و نمونه‌های آن‌ها، در درون شیکرانکوباتور و تاریکی قرار داده شدند. در شرایط جدید و تا ۱۱ روز، از این دو ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر، نمونه‌گیری برای بررسی زنده بودن و رشد باکتری‌ها با اندازه‌گیری میزان کدورت و pH سوسپانسیون آن‌ها انجام شد.

۲ـ۴ـ روش‌های اندازه‌گیری

از روش‌های تعیین چگالی سلولی بر اساس جذب نوری کشت میکروبی[2] (OD_{600})، وزن خشک سلولی[3] (DCW)، pH و شمارش تعداد کلنی[4] باکتری‌های زندهٔ کشت به صورت سه بار تکرار، برای رسم منحنی رشد باکتری‌ها استفاده گردید.

OD_{600}: برای اندازه‌گیری میزان کدورت محیط به عنوان معیاری از میزان رشد سلول باکتریایی از دستگاه طیف‌سنج[5] (مدل Metertech-SP8001) در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد.

DCW: برای تعیین وزن خشک سلولی نمونه‌های سوسپانسیون میکروبی، پس از نمونه‌گیری در سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C رسوب داده شدند. توده سلولی مرطوب در دمای ۷۰ ^{o}C به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. جرم توده خشک سلولی بر حجم کشت غوطه‌ور میکروبی به صورت mg/l گزارش گردید.

شمارش تعداد کلنی: از هر نمونه سوسپانسیون میکروبی با رقت مشخص، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت جامد حاوی آگار پخش و در دمای ۳۰ ^{o}C گرماخانه‌گذاری شد. پس از ۳ روز، تعداد کلنی‌های ایجاد شده[6] (CFU) شمارش و در ضریب رقیق‌سازی ضرب و به صورت CFU/ml گزارش شد.

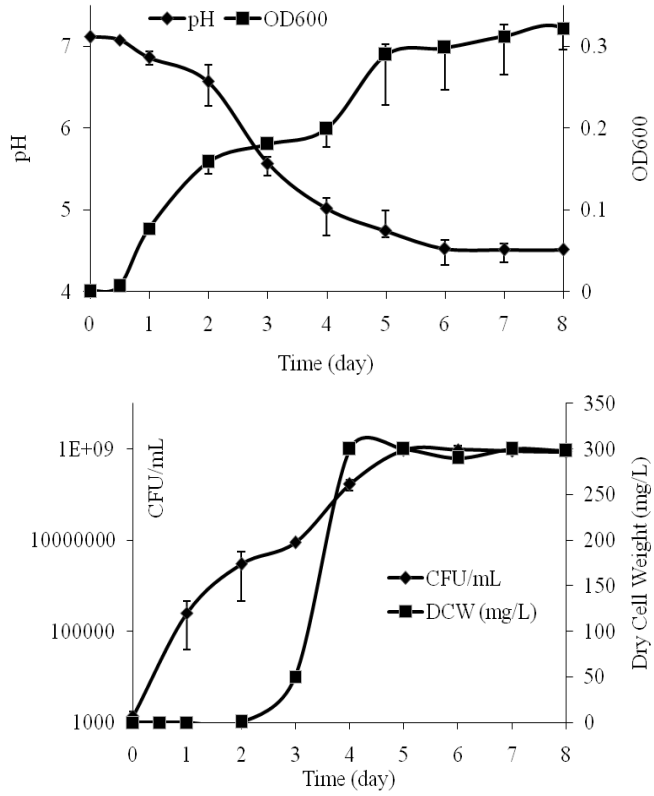
اندازه‌گیری pH: pH سوسپانسیون‌های باکتریایی و محلول حاوی نمونه‌های سیمانی به وسیله pH متر مدل Percisa pH-meter ساخت کشور سوییس اندازه‌گیری شد.

۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ بررسی میزان رشد باکتری در محیط کشت اختصاصی

تغییرات چگالی سلولی بر اساس جذب نوری کشت میکروبی (OD_{600})، وزن خشک سلولی (DCW)، شمارش تعداد کلنی باکتری‌های زنده و مقدار pH کشت برحسب زمان، به عنوان انواع منحنی‌های رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* بر اساس بند ۲-۳، در شکل ۱ آورده شده است.

1- Narva
2- Optical density
3- Dry cell weight
4- Bacterial colony counting
5- Spectrophotometer
6- Colony Forming Unit



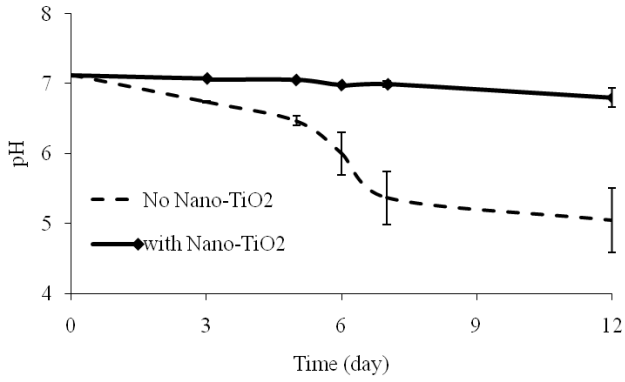
شکل ۱: انواع منحنی‌های رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*.

همان‌طور که در منحنی‌های رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* (شکل ۱) دیده می‌شود، pH سوسپانسیون باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در طی ۸ روز از کشت، از مقدار حدود ۷ تا ۴,۵ و کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر تا حد ۰,۳۳، تغییر کرده است. تعداد کلنی‌های ایجاد شده در این فاصلهٔ زمانی، پس از ۳ روز گرماخانه‌گذاری 10^{9} CFU/ml و مقدار وزن خشک سلولی آن حدود ۳۵۰ mg/l اندازه‌گیری گردید. در ضمن نیمهٔ فاز لگاریتمی رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، روز ۴-۳ در نظر گرفته شد. پس از ۸ روز از کشت باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* و به دلیل تولید سولفوریک اسید از سدیم تیوسولفات اولیه، pH سوسپانسیون آن، روند نزولی داشته است [۳۹]. کلنی‌های باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* پس از ۳ روز بر روی محیط کشت جامد اختصاصی آن رویت می‌شوند. دنبال کردن هر کدام از متغیرهای محیط کشت (pH، کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر، مقدار وزن خشک سلولی و تعداد کلنی‌های ایجاد شده) با زمان، نشانهٔ رشد و یا عدم رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* خواهد بود. به دلیل سرعت و سادگی اندازه‌گیری‌های pH و کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر، در مطالعه حاضر، از این دو متغیر به عنوان شاخص رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، برای رصد ویژگی بازدارندگی و ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم استفاده گردید.

بررسی سمیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت اختصاصی مایع باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* مطابق بخش ۲-۳ به دو روش دوغابی و تثبیت شده در بستر سیمان صورت گرفت. نتایج حاصله به ترتیب در ادامه آمده است.

۳ـ۲ـ سامانه دوغابی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم

نتایج بررسی سمّیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بر رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، حاصل از آزمایش‌های انجام شده مطابق بند ۲-۳-۱، با اندازه‌گیری تغییرات pH محیط کشت نسبت به زمان تا ۱۲ روز، در شکل ۲ نشان داده شده است. در این شکل دیده می‌شود، در ارلن‌های شاهد بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم همانند شکل ۱، باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* پس از ۷ روز، در محیط کشت اختصاصی مایع به انتهای فاز رشد خود رسیده و pH محیط را به کم‌ترین حد خود (۴,۵) می‌رساند. در حالی‌که در آزمایش مشابه، ولی به دلیل حضور نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، سرعت رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* کند و یا متوقف شده است، به طوری‌که کاهش pH محیط کشت، به عنوان نماد رشد باکتری در مدت ۱۲ روز از آزمایش دیده نمی‌شود. هم‌چنین در لحظهٔ صفر نمودار تغییرات pH محیط کشت آزمایش اصلی دیده می‌شود که به دلیل ویژگی بافری محیط کشت، افزودن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، تغییرpH را برای آن ایجاد نکرده است. در همین شرایط، نمودار تغییرات کدورت محیط کشت با و بدون نانوذرات، نیز روند مشابه با نمودارهای تغییرات pH را دارند (نتایج نشان داده نشده است). در طول ۱۲ روز آزمون، کدورت ایجاد شده در نمونهٔ حاوی نانوذرات صفر اندازه‌گیری شد.



شکل ۲: تغییرات pH محیط کشت باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* نسبت به زمان با و بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم .

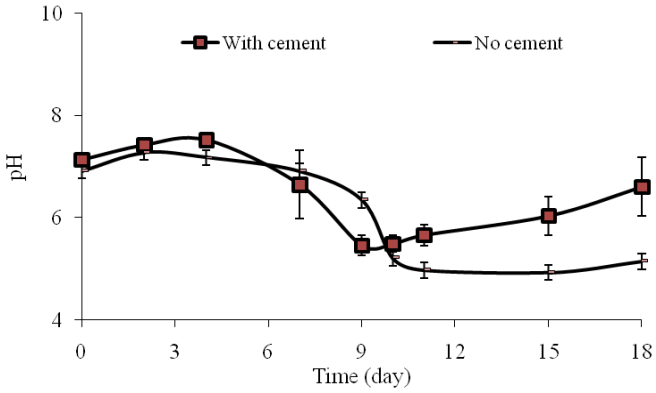
در مجموعه آزمایش‌های ضدمیکروبی کاتالیزگری نوری سامانهٔ دوغابی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در آب دیونیزه نشان داده شد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم به تنهائی، بر باکتری‌ها اثر سمی ندارند و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم فقط تحت تابش فرابنفش انواع باکتری‌ها را در زمان‌های مختلف تابش غیرفعال کرده و باعث مرگ آن‌ها می‌شوند [۱۳]. ولی در آزمایش اخیر، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم پراکنده شده در محیط کشت مایع، ویژگی توقف، بازدارندگی رشد و یا مرگ باکتری‌های تلقیح شده را دارند.

۳ـ۳ـ سامانه تثبیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر سیمان

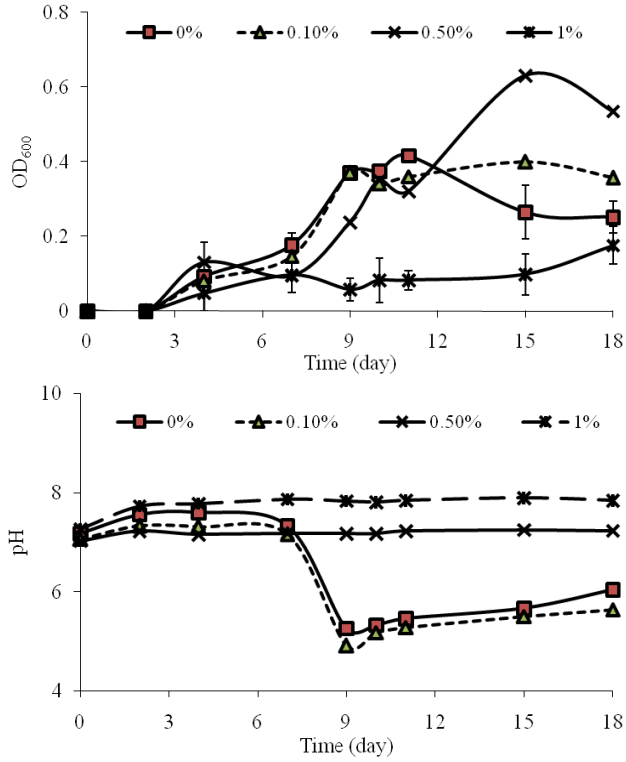
آزمایش‌های بررسی سمیت نمونه‌های سیمانی با درصدهای مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بر باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت اختصاصی آن مطابق بخش ۲-۳-۲ و جدول ۲ به صورت ۲ بار تکرار انجام شد. در این جدول از ۴ نمونه آزمایش شاهد استفاده شده است. آزمایش‌های شماره ۱ و ۲ مربوط به فروشوئی ۵ عدد نمونه سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت است. نتایج اندازه‌گیری‌های pH و کدورت محیط کشت آن‌ها نشان داد که به دلیل فروشوئی پرتلندایت از درون نمونه‌های سیمانی [۳۸] در طی ۱۸ روز، pH محلول از حدود ۷ تا ۷٫۵ افزایش یافته است. این مقدار افزایش pH، نمی‌تواند اثر سوئی بر باکتری‌ها داشته باشد. در طی مدت ۱۵ روز، کدورت محلول‌ها در حد صفر، ولی در ۳ روز آخر حدود ۰٫۱ اندازه‌گیری شد. این کدورت ناچیز، می‌تواند به دلیل حضور نمونه‌های سیمانی در محلول و سایش احتمالی نمونه‌ها در درون محلول ارلن‌ها (۱۰۰ rpm) که با چشم غیرمسلح دیده نمی‌شود، باشد. حتی در روزهای پایانی آزمایش، کدورت محلول حاوی نمونه سیمانی حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، کمی بیشتر از آزمایش شاهد بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم است. این افزایش ناچیز، می‌تواند به دلیل کدورت حاصل از حضور نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم کنده شده از سطح نمونه‌ها و ورود آن‌ها به درون محیط کشت باشد.

آزمایش‌های شاهد شماره ۳ و ۴ از جدول ۲، مربوط به رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت اختصاصی خود با و بدون نمونهٔ سیمانی عاری از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم می‌باشند. نتایج اندازه‌گیری‌های pH و کدورت محیط کشت آنها، در اثر فعالیت باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* پس از ۱۸ روز نشان داد که باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در حضور نمونه‌های سیمانی عمل‌آوری شده به خوبی رشد می‌کنند. مطابق شکل ۳ در سه تا چهار روز اول آزمایش‌ها که باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در فاز تاخیر رشد خود است، افزایش pH محیط کشت به دلیل فروشوئی پرتلندایت سیمان و کاهش ناچیز pH در آزمایش شاهد بدون نمونهٔ سیمانی وجود دارد. اما در روزهای پنجم تا نهم و با ورود باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* به فاز لگاریتمی رشد خود، pH محیط کشت، در حضور نمونه سیمانی نسبت به آزمایش شاهد بدون حضور نمونه سیمانی، ۱ روز زودتر به کم‌ترین مقدار pH خود (۴٫۵) رسیده است. گرچه طبق روش آماری t-test در کل دورهٔ آزمایش، اختلافات pH محیط‌های کشت با و بدون نمونه سیمانی معنادار نمی‌باشد، ولی برعکس در روز نهم آزمایش، این اختلافات کاملاً بامعنا است. زیرا در این روز، pH محیط کشت حاوی نمونهٔ سیمانی به کم‌ترین مقدار خود یعنی حدود ۵ و انتهای فاز لگاریتمی رشد باکتری، رسیده است. در صورتی که در همین روز، pH برای محیط کشت کنترل بدون آزمونه، حدود ۶٫۵ می‌باشد و این مقدار pH سوسپانسیون، نشانه حضور باکتری در انتهای فاز تاخیر و یا شروع فاز لگاریتمی رشد است. در بررسی‌های تغییرات کدورت محیط‌های کشت نسبت به زمان در آزمایش‌های شماره ۳ و ۴، به دلیل جذب باکتری‌ها بر سطح نمونه‌های سیمانی، کدورت محیط کشت ناشی از رشد باکتریایی در حضور نمونه سیمانی، در حد آزمایش بدون نمونهٔ سیمانی است. بنابراین در کل می‌توان نتیجه گرفت که وجود سیمان شاهد به دلیل حضور اجزا کلسیم، آهن، آلومینیم، سیلیسیم، سولفات و غیره، نقش بستر و منبع غذایی مناسب را برای رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت داشته است.

سه آزمایش پایانی جدول ۲ مربوط به رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در مجاورت نمونه‌های سیمانی حاوی درصدهای ۰٫۱، ۰٫۵ و ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم می‌باشند. نتایج تغییرات pH و کدورت سوسپانسیون‌های این آزمایش‌ها در طی ۱۸ روز در شکل ۴ آورده شده است.



شکل ۳: تغییرات pH و کدورت محیط کشت در اثر فعالیت باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* با و بدون حضور نمونه‌های سیمانی شاهد (عاری از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم).



شکل ۴: تغییرات pH وکدورت محیط کشت با حضور باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* و نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی درصدهای مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم .

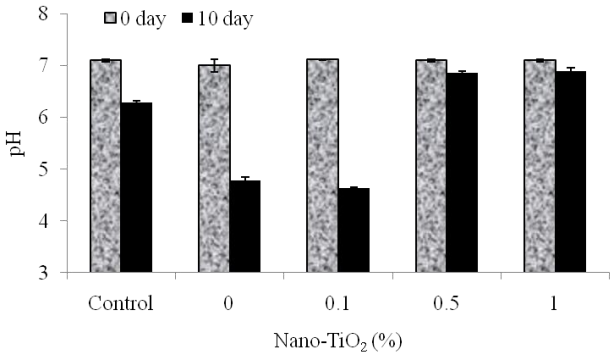
روند کاهشی pH کشت باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* بعد از ۱۸ روز در نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۰٫۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، نشان دهنده رشد باکتریایی است. در حالی که روند افزایشی و ثابت بودن آن در نمونه‌های سیمانی حاوی ۰٫۵ و ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، به منزلهٔ عدم رشد باکتری و فروشوئی پرتلندایت است. مطابق شکل ۴، روند تغییرات کدورت محیط کشت‌های آزمایش‌های مختلف به جز محلول نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم منظم نیستند. بی‌نظمی مشاهده شده در این آزمایش‌ها می‌تواند به دلیل جذب و رهاسازی باکتری‌ها از سطح نمونه‌های سیمانی در روزهای مختلف باشد. در روز نهم که کم‌ترین مقدار pH در نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۰٫۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم اندازه‌گیری شده است، کدورت محیط‌ها حدود ۰٫۴ می‌باشد، در صورتی که کدورت نمونه ۱٪، هم‌چنان ناچیز و در حد صفر است. در واقع با افزایش بیشتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم تا ۱٪ در بستر سیمان، رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت مایع آن، کاهش می‌یابد. به طوری که در درصدهای ۱-۰٫۵٪، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر نمونه‌های سیمانی و محیط کشت نقش بازدارندگی نانوذرات، برای رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* به خوبی دیده می‌شود. دلیل رشد باکتری در مجاورت نمونه‌های سیمانی حاوی ۰٫۱٪ نانوذرات، می‌تواند به دلیل کم بودن مقدار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم و به طبع ناچیز بودن اثر بازدارندگی آن‌ها باشد.

کدورت حاصل از نمونهٔ سیمانی حاوی ۰٫۵٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در مقایسه با آزمایش‌های دیگر بالا بوده ولی این افزایش، به دلیل رشد باکتری در این آزمون نیست. این نتیجه می‌تواند به دلیل کنده شدن بیشتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم هم‌انباشته شده در ۳ روز آخر آزمایش باشد [۳۷]. احتمالاً به دلیل پراکندگی بهتر ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر سیمان، محلول این نمونه کاملاً زلال است و حتی از نمونه‌های شاهد سیمانی با و بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم که اصلاً باکتری ندارند، بسیار کم‌تر می‌باشد. پائین بودن زیاد کدورت محلول آن می‌تواند به دلیل جذب باکتری‌های تلقیح شده بر سطح نمونه‌های سیمانی و جلوگیری از سایش احتمالی نمونه‌ها باشد. در مجموع باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* به دلیل حساس بودن تا مدت ۱۸ روز از گذر آزمایش، هیچ رشد قابل ملاحظه‌ای در محیط کشت اختصاصی خود و در حضور نمونه‌های سیمانی حاوی ۱-۰٫۵٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ندارد.

شکل ۵ تصاویر تهیه شده از آزمایش‌های مختلف رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در روز یازدهم را در انواع نمونه‌های جدول ۲، به منظور مقایسه چشمی کدورت آن‌ها، نشان می‌دهد. در ضمن در این روز از تمامی ارلن‌ها به صورت سه بار تکرار، زیر کشت مایع گرفته شد. نتایج اندازه‌گیری pH محلول کشت مایع انواع آزمون‌های جدول ۲ در این روز و پس از ۱۰ روز از کشت آن‌ها، در شکل ۶ آمده است. کاهش مناسب pH محیط کشت، شاخص خوبی از زنده بودن باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* می‌باشد. همان طور که دیده می‌شود در آزمایش‌های مربوط به نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۰٫۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، باکتری‌های *تیوباسیلوس تیوپاروس* زنده بوده و به خوبی رشد کرده‌اند و در محلول نمونه‌های حاوی ۱-۰٫۵٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* دیده نمی‌شود (pH محلول آن در حد ۷ تقریباً ثابت مانده است). یعنی در این دو آزمایش، پس از ۱۱ روز از مجاورت باکتری‌ها با نمونه‌های سیمانی حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، اثر بازدارندگی از رشد آن‌ها به اثر کشندگی تبدیل شده است. ولی در همین مدت زمان، در آزمون‌های مربوط به نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۰٫۱٪ نانوذرات، کاهش pH محیط کشت از مقدار اولیه ۷٫۱۳ تا ۴٫۵، پس از ۱۰ روز، حاکی از رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* است. هم چنین بر اساس شکل ۶ باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در آزمون مربوط به نمونه شاهد بدون نمونهٔ سیمانی، پس از ۱۱ روز ناتوان شده و سرعت رشد آن‌ها بسیار کند شده است و pH محیط کشت آن حدود ۶ است. به عبارتی وجود نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۰٫۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، در فعال نگه‌داشتن باکتری‌ها در محیط کشت بدون نمونه سیمانی موثر بوده است.

٪۱ ٪۰,۵ ٪۰,۱ ٪۰ شاهد سیمانی ۱٪ نانوذرات و بدون باکتری شاهد سیمانی بدون باکتری و نانوذرات شاهد بدون نمونهٔ سیمانی

شکل ۵: تصاویر بررسی چشمی کدورت محلول انواع آزمایش‌های بررسی سمّیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم تثبیت شده در بستر سیمان.

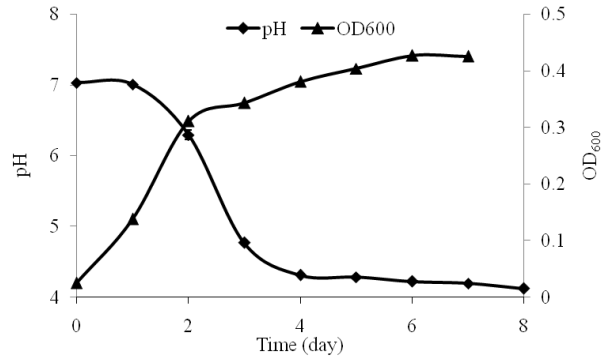


شکل ۶: تغییرات pH محیط کشت تلقیح شده با ۱٪ از انواع محلول‌های ۱۱ روزهٔ نمونه‌های سیمانی با درصدهای مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در آزمایش های بررسی اثر سمیت نانوذرات بر رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* پس از ۱۰ روز به عنوان شاخصی از زنده بودن باکتری‌ها در آن‌ها.

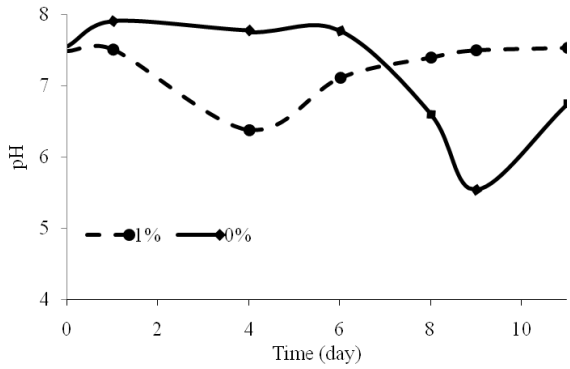
نتایج ارائه شده در شکل‌های ۴ و ۶ نشان می‌دهند که درصد بهینهٔ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر سیمان برای جلوگیری از رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* و تثبیت بهتر آن‌ها در بستر سیمان، ۱٪ است. زیرا به دلیل توزیع مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در این درصد [۳۷]، کدورت بسیار پایینی در محلول محیط کشت و روند افزایشی pH محیط کشت دیده می‌شود و باکتری‌ها در این درصد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بعد از ۱۸ روز از آزمایش، فعالیت قابل تشخیصی ندارند. اندازه‌گیری‌های بررسی رشد باکتری در محیط کشت اختصاصی خود در روز یازدهم آزمون، نشان داد که باکتری‌های *تیوباسیلوس تیوپاروس* تلقیح شده، پس از ۱۱ روز مجاورت با نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در شرایط تاریکی غیرفعال شده و مرده‌اند. در نمونه‌های ۰,۵٪ نیز گرچه رشد باکتریایی و کاهش pH دیده نشد ولی احتمالاً به دلیل هم‌انباشته شدن نانوذرات در بستر سیمان، رهایی و جدایش آن‌ها، کاربرد این درصد نانوذرات در بستر سیمان توصیه نمی‌شود.

۳ـ۴ـ رفتار باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در حضور نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در شرایط دوره‌ای تابش و تاریکی

نتایج اندازه‌گیری pH و کدورت محیط کشت مایع تمامی نمونه‌گیری‌هایی که در زمان‌های مختلف تابش و تاریکی از آزمایش شاهد سیمانی بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم مطابق بند ۲-۳-۳ انجام شد، نشان دادند که پس از ۳ بار تابش فرابنفش ۱۶۰ واتی، باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، کاملاً زنده و فعال است و پرتوهای تابش فرابنفش نتوانسته است هیچ اثر کشندگی بر آن‌ها داشته باشد. هم چنین تمامی نمونه‌گیری‌هایی که در زمان‌های مختلف تابش و تاریکی از آزمایش اصلی یعنی نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت صورت گرفتند، نشان دادند که وقتی باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، از نمونه‌ها دور می‌شود، در شرایط مناسب (محیط کشت اختصاصی، دما و هوادهی مناسب) مجدداً شروع به فعالیت و رشد می‌کند. بنابراین تمامی اندازه‌گیری‌ها از آزمایش‌های سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در زمان‌ها و دوره‌های مختلف (تابش و تاریکی در روزهای اول تا سوم)، حاکی از زنده بودن باکتری‌ها بوده و روند رشد باکتریایی مشابه نمودارهای شکل ۷ (تغییر pH و کدورت محیط کشت مایع نسبت به زمان) را در شرایط مناسب (غذا، دما و هوادهی) دارند. به دلیل تکراری بودن آن‌ها فقط نمودار رشد نمونه‌گیری شده در لحظه آخر روز سوم از آزمایش نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (پس از ۳ دوره تابش و ۳ دورهٔ تاریکی) در شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷: تغییرات pH و کدورت محیط کشت مایع نسبت به زمان از باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* نمونه‌گیری شده در آزمایش‌ها و زمان‌های مختلف تابش و تاریکی در حضور نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۱درصد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم.



شکل ۸: تغییرات pH و کدورت محیط‌های کشت حاوی باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* نسبت به زمان پس از ۳ دوره تابش و تاریکی در حضور نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم .

نتایج بررسی رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* (تغییر pH و کدورت محیط کشت مایع نسبت به زمان) در ارلن‌های اصلی (شرایط ثابت باکتری‌ها و در حضور نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم) پس از طی ۳ دورهٔ تابش و تاریکی و در ادامه قرار داده شدن به مدت ۱۱ روز در شرایط مناسب دمائی و هوائی (شیکر انکوباتور) در شکل ۸ نشان داده شده است. روند این تغییرات، حاکی از زنده بودن باکتری‌ها در حضور نمونه‌های سیمانی عاری از نانوذرات و مرگ باکتری‌های *تیوباسیلوس تیوپاروس* در حضور نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم است.

در شکل ۸ نمودارهای تغییرات کدورت محیط کشت با زمان نشان می‌دهند که اولاً باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در حضور نمونه‌های سیمانی عاری از نانوذرات و در طی ۳ دورهٔ تابش و تاریکی، رشد بسیار قوی داشته و کدورت بسیار بالای حدود ۲ را ایجاد کرده است. این میزان کدورت برای اولین بار است که توسط باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در محیط کشت اختصاصی آن اندازه‌گیری می‌شود. بیشترین کدورت اندازه‌گیری شده با این باکتری در حضور نمونه‌های سیمانی عاری از نانوذرات، میزان ۰/۴ مطابق شکل ۴، بوده است. اثر مثبت تابش و دورهٔ تاریکی پس از آن، بر رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در حضور نمونه‌های عاری از نانوذرات و در محیط کشت اختصاصی آن دیده می‌شود. در واقع باکتری‌هایی که تحت تابش مجروح شده‌اند، در دوره تاریکی از اجزا سلول‌های مرده و ترکیبات سیمانی تغذیه کرده و در شرایط بهینه، رشد سریع‌تری پیدا می‌کنند و در برابر عوامل خارجی و حتی بازدارنده‌ها در طی دورهٔ تابش مقاوم‌تر می‌شوند. به این فرآیند، فعالیت مجدد[1] باکتریایی گفته شده که شامل دو مرحلهٔ فعالیت مجدد نوری[2] و تعمیر در تاریکی[3] است [۱۰].

اما در این آزمایش، فاز تاخیر رشد باکتری‌ها، بسیار طولانی شده است. این پدیده می‌تواند به دلیل مجروح شدن باکتری‌ها در اثر ۳ دوره تابش باشد که زمان زیادی صرف بازپروری و تعمیر صدمات برگشت‌پذیر شده است. همچنین کدورت محلول حاوی نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم، در طول آزمایش در حد صفر ثابت ماند و هیچ رشدی از باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* در آن مشاهده نشد. یعنی ۳ دورهٔ تابش و فعالیت کاتالیزگری نوری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر سیمان، در کشتن باکتری‌ها مؤثر بوده و آن‌ها در دوره‌های تاریکی نتوانسته‌اند توسط فرآیند فعالیت مجدد، به بازپروری، تعمیر و اصلاح جراحات وارده در حضور نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بپردازند. این ناتوانی در تعمیر سلول‌های باکتریایی، باعث تخریبات برگشت‌ناپذیر در سلول‌های باکتریایی شده است. اما دورهٔ تاریکی پس از تابش، باعث مقاوم شدن نسبی باکتری‌ها در برابر عامل بازدارندهٔ دی‌اکسید تیتانیم شده است. به طوری که در نمودار رشد تغییرات pH محیط کشت بر حسب زمان در نمونهٔ سیمانی نانوذرات‌دار در شکل ۸، در ۴ روز اول روند کاهشی ناچیز pH از ۷٫۵ تا ۶٫۵ (زنده بودن ولی ناتوانی و رشد بسیار کند باکتری) دیده می‌شود و بعد از آن روند افزایشی pH دیده می‌شود که به دلیل فروشوئی پرتلندایت نمونه‌ها بوده و دلیلی بر عدم فعالیت و بالاخره مرگ باکتری است. وقتی که آزمایش اثر بازدارندگی در تاریکی کامل صورت گرفت، هیچ افت pH محیط کشت باکتری‌ها (شکل ۴) اندازه‌گیری نشده و تماماً روند افزایشی در نمونه ۱٪ نانوذرات وجود داشت ولی زمانی که از نور و تاریکی استفاده گردید (شکل ۸) در ابتدا مقداری روند کاهشی دیده می‌شود. این تفاوت‌ها همان فرآیند فعالیت مجدد میکروارگانیسم‌ها را در اثر تابش و تعمیر در تاریکی، مقاوم‌شدن در برابر عوامل بازدارنده (نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم) و پیچیدگی شرایط کار را نشان می‌دهد.

1- Reactivation
2- Photoreactivation
3- Dark Repair

در مجموع، پس از ۷ روز (۳ روز تابش و تاریکی و ۴ روز تاریکی کامل) اثر کاتالیزگری نوری و بازدارندگی از رشد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* به اثر کشندگی کامل آن‌ها تبدیل شده است. در ۳ روز اول آزمایش با وجود ویژگی بازدارندگی از رشد و خاصیت کاتالیزگری نوری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت اختصاصی باکتری، مطابق شکل ۷، زمانی که آن‌ها از محیط مسموم (نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم) دور شده و در محیط کشت تازه و شرایط مناسب رشد قرار می‌گیرند، مجدداً رشد و فعالیت می‌کنند. ولی زمانی که در حضور نمونه‌های حاوی نانوذرات قرار دارند، پس از ۳ روز تابش و تاریکی دوره‌ای و ۴ روز تاریکی کامل، بالاخره مقاومت خود را از دست داده، و کاملاً غیرفعال شده و می‌میرند. پس محیط سیمانی که دارای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم است، بالاخره کاملاً ضدمیکروبی می‌شود و اگر باکتری‌ها از چنین محیطی جدا شوند، می‌توانند به زندگی خود ادامه داده و در چرخه زیستی خلل ایجاد نگردد. شکل ۹ تصاویر نمونه‌های سیمانی عاری و حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم را پس از ۱۱ روز مجاورت با ۱٪ باکتری تیوباسیلوس تیوپاروس تلقیح شده در محیط کشت (۳ روز تابش و تاریکی و ۸ روز تاریکی) نشان می‌دهد. تشکیل زیست تودهٔ کرم رنگ بر سطح نمونهٔ سیمانی بدون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، به خوبی دیده می‌شود. قطع و وصل تابش، تاثیر مثبت بر رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* بر سطح نمونه سیمانی عاری از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم داشته و رشد آن را تسریع کرده است.

(**B**) (**A**)

شکل ۹: تشکیل بیوفیلم واضح از باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* بر سطح نمونهٔ سیمانی عاری از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (A) نسبت به نمونهٔ سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (B) پس از ۱۱ روز.

در آزمایش مشابه، عدم تشکیل زیست توده بر روی نمونه سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات تیتانیم دی‌اکساید تائیدی بر عدم رشد و مرگ باکتری تیوباسیلوس تیوپاروس تلقیح شده به این محیط است.

به طور خلاصه‌تر آن‌که استفادهٔ هم‌زمان از هر دو ویژگی‌های سمّیت و کاتالیزگری نوری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم ، زمان مرگ باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* را کاهش می‌دهد. زیرا در آزمایش بررسی سمّیت در دورهٔ تاریکی، پس از ۱۱ روز باکتری‌ها از بین رفتند ولی در شرایطی که دورهٔ تابش فرابنفش به آن اضافه گردید، این زمان به ۷ روز کاهش یافت. بنابراین در محیط‌های فاضلابی با شرایط تاریکی مطلق و یا بر عکس در فضاهای بیرونی که ساعاتی تابش و ساعاتی تاریکی وجود دارد، می‌توان سازه‌ها و پوشش‌های سیمانی را ضدعفونی نموده و از تخریب زیستی محافظت کرد.

۴ـ نتیجه‌گیری

مطالعات نشان داده‌اند که وجود نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط کشت باکتری‌ها می‌تواند، مانع از رشد آن‌ها شده و در دراز مدت باعث مرگ آن‌ها شود. باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* به عنوان میکروارگانیسم شروع کنندهٔ تخریب بیولوژیکی سازه‌ها و پوشش‌های سیمانی در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه، با تثبیت درصدهای پائین نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (۱-۰٫۱٪) در بستر سیمان، بهترین درصد برای غیرفعال‌سازی باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، ۱٪ تعیین گردید. با دور شدن باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس* از نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم و ورود به شرایط مناسب رشد، آن‌ها به حیات و رشد خود ادامه می‌دهند. اما در صورت باقی ماندن در حضور نمونه‌های سیمانی حاوی ۱٪ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بالاخره فعالیت و رشد خود را از دست داده و می‌میرند. در مجموع، استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در بستر سیمان می‌تواند به دلیل دارا بودن ویژگی بازدارندگی از رشد باکتری *تیوباسیلوس تیوپاروس*، رشد آن‌ها را بر سطوح سیمانی در تاریکی به تعویق انداخته و در زمان‌های تماس طولانی‌تر، باعث مرگ آن‌ها بشوند. بنابراین با استفاده از این فناوری نه تنها سازه‌ها و پوشش‌های سیمانی از تخریب زیستی حفاظت می‌شوند بلکه می‌توان به محیط‌های ضدعفونی شده و ضدمیکروب دست یافت.

۵ـ مراجع

1. H. Foster, I. Ditta, S. Varghese, A. Steele, Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90(2011), 1847-1868.
2. M. Cho, H. Chung, W. Choi, J. Yoon, Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO_2 photocatalytic disinfection. *Water Res.* 38(2004), 1069-1077.
3. R. Grieken, J. Marugán, C. Sordo, P. Martínez, C. Pablos, Photocatalytic inactivation of bacteria in water using suspended and immobilized silver-TiO_2. *Appl. Cata.l B-Environ.* 93(2009), 112-118.
4. W. Jiang, H. Mashayekhi, B. Xing, Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollution.* 157(2009), 1619-1625.
5. H. Kong, J. Song, A. Jang, Photocatalytic antibacterial

capabilities of TiO_2-biocidal polymer nanocomposites synthesized by a surface-initiated photopolymerization. *Environ. Sci. Technol.* 44(2010), 5672-5676.
6. C. Lin, C. Li, Inactivation of microorganisms on the photocatalytic surfaces in air. *Aerosol. Sci. Tech.* 37(2003), 939-946.
7. J. Marugán, R. van Grieken, C. Pablos, C. Sordo, Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Res.* 44(2010), 789-796.
8. J. Marugán, R. van Grieken, C. Sordo, C. Cruz, Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Appl. Catal. B-Environ.* 82(2008), 27-36.
9. C. Pablos, R. van Grieken, J. Marugán, B. Moreno, Photocatalytic inactivation of bacteria in a fixed-bed reactor: Mechanistic insights by epifluorescence microscopy. *Catal. Today*. 161(2011), 133-139.
10. A.G. Rincón, C. Pulgarin, Bactericidal action of illuminated TiO_2 on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Appl. Catal. B-Environ.* 49(2004), 99-112.
11. T. Sato, Y. Koizumi, M. Taya, Photocatalytic deactivation of airborne microbial cells on TiO_2-loaded plate. *Bio. Eng. J.* 14(2003), 149-152.
12. A. Pal, S. Pehkonen, L. Yu, M. Ray, Photocatalytic inactivation of airborne bacteria in a continuous-flow reactor. I*nd. Eng. Chem. Res.* 47(2008), 7580-7585.
13. A. K. Benabbou, Z. Derriche, C. Felix, P. Lejeune, C. Guillard, Photocatalytic inactivation of *Escherischia coli:* Effect of concentration of TiO_2 and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Appl. Catal. B-Environ.* 76(2007), 257-263.
14. P. A. Christensen, T. P. Curtis, T. A. Egerton, S. A. M. Kosa, J. R. Tinlin, Photoelectrocatalytic and photocatalytic disinfection of *E. coli* suspensions by titanium dioxide. *Appl. Catal. B-Environ.* 41(2003), 371-386.
15. G. Gogniat, S. Dukan, TiO_2 photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. *Appl. Environ. Microbiol.* (2007), 7740-7743.
16. M. Z. Guo, T. C. Ling, C. S. Poon, TiO_2-based self-compacting glass mortar: Comparison of photocatalytic nitrogen oxide removal and bacteria inactivation. *Build. Environ.* 53(2012), 1-6.
17. B. Li, X. Liu, F. Meng, J. Chang, C. Ding, Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings. *Mater. Chem. Phys.* 118(2009), 99-104.
18. H. L. Liu, T. C. K. Yang, Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO_2 activated with ultraviolet light. *Process Biochem.* 39(2003), 475-481.
19. A. G. Rincón, C. Pulgarin, Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H_2O_2 on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO_2: Implications in solar water disinfection. *Appl. Catal. B-Environ.* 51(2004), 283-302.
20. J. Verran, G. Sandoval, N. S. Allen, M. Edge, J. Stratton, Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes Pigm.* 73(2007), 298-304.
21. M. Lackhoff, X. Prieto, N. Nestle, F. Dehn, R. Niessner, Photocatalytic activity of semiconductor-modified cement-influence of semiconductor type and cement ageing. *Appl. Catal. B-Environ.* 43(2003), 205-216.
22. J. W. MacFarlane, H. F. Jenkinson, T.B. Scott, Sterilization of microorganisms on jet spray formed titanium dioxide surfaces. *Appl. Catal. B-Environ.* 106(2011), 181-185.
23. M. Machida, K. Norimoto, T. Kimura, Antibacterial activity of photocatalytic titanium dioxide thin films with photodeposited silver on the surface of sanitary ware. *J. Am. Ceram. Soc.* 88(2005), 95-100.
24. J. C. Yu, H. Y. Tang, J. Yu, H. C. Chan, L. Zhang, Y. Xie, H. Wang, S. P. Wong, Bactericidal and photocatalytic activities of TiO_2 thin films prepared by sol-gel and reverse micelle methods. *Photoch. Photobio. A.* 153(2002), 211-219.
25. A. P. Zhang, Y. P. Sun, Photocatalytic killing effect of TiO_2 nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* 21(2004), 3191-3193.
26. D. Giannantonio, J. Kurth, K. Kurtis, P. Sobecky, Effects of concrete properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63(2009), 252-259.
27. H. Tao, W. Wei, S .Zhang, Photocatalytic inhibitory effect of immobilized TiO_2 semiconductor on the growth of *Escherichia coli* studied by acoustic wave impedance analysis. *Photochem. Photobio. A.* 161(2004), 193-199.
28. F. Guifen, S. Patricia, L. Chhiu-Tsu Lin, Anatase TiO_2 nanocomposites for antimicrobial coatings. *J. Phys. Chem. B.* 109(2005), 8889-8898.
29. S. Zarchi, A. Javed, M. Ghani, S. Soufian, F. Firouzabadi, A. Moghaddam, S. Mirjalili, Comparative study of antimicrobial activities of TiO_2 and CdO nanoparticles against the pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Iran J Pathology.* 2(2010), 83 -89.
30. A. Menard, D. Drobne, A. Jemec, Ecotoxicity of nanosized TiO_2. Review of in vivo data. *Environ. Pollut.* 159(2011), 677-684.
31. L. Shi, Y. Zhao, X. Zhang, H. Su, T. Tan, Antibacterial and anti-mildew behavior of chitosan/nano-TiO_2 composite emulsion. *Korean J. Chem. Eng.* 25(2008), 1434-1438.
32. T. Amna, M. S. Hassan, A. Yousef, A. Mishra, N. M. Barakat, M. S. Khil, H. Kim, Inactivation of foodborne pathogens by NiO/TiO_2 composite nanofibers: A novel biomaterial system. *Food Bioprocess Technol*. 6(2013), 988-996.
33. İ. Yaşa, N. Lkhagvajav, M. Koizhaiganova, E. Çelik, Ö. Sarı, Assessment of antimicrobial activity of nanosized Ag doped TiO_2 colloids. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 28(2012), 2531-2539.
34. M. P.A. S. N. Saraschandraa, Antimicrobial applications of TiO_2 coated modified polyethylene (HDPE) Films. *Archives of Applied Science Research*. 5(2013), 189-194.
35. M. Haghi, M. Hekmatafshar, M. B. Janipour, S. S. gholizadeh, M.k. Faraz, F. Sayyadifa, M. Ghaedi, Antibacterial effect of TiO_2 nanoparticles on pathogenic strain of *E. coli. IJABR.* 3(2012), 621-624.
36. P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, W. A. Jacoby, Bactericidal activity of photocatalytic TiO_2 Reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1999), 4094.
37. A. Yousefi, A. Allahverdi, P. Hejazi, Effective dispersion of nano-TiO_2 powder for enhancement of photocatalytic properties in cement mixes. *Constr. Build. Mater.* 41(2013), 224–230.
38. A. Yousefi, A. Allahverdi, P. Hejazi, Accelerated biodegradation of cured cement paste by *Thiobacillus* species under simulation condition. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 86(2014), 317-326.
39. A, Yousefi, P. Hejazi, A. Allahverdi, Evaluation of effective strategies for cultivation of *Acidithiobacillus thiooxidans* as cement-degrading bacteria. *IJCHE.* 10(2013), 54-65.