

مقاله پژوهشی

ساخت، مشخصه‌یابی و بررسی فعالیت آنتی‌باکتریال نانوهیبرید سه‌گانه نانولوله‌های کربنی-دی‌اکسید تیتانیوم-نقره (CNTs-TiO₂-Ag)

مسعود فضل‌الله پور^۱، محمد اکبرزاده پاشا^{۲*} و سلمان احمدی اسب‌چین^۳

۱- گروه فیزیک حالت جامد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲- آزمایشگاه تحقیقاتی نانو ساختارهای کربن پایه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۳- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۸/۱۰/۱۸، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۹/۰۱/۱۷

چکیده

در این پژوهش، با استفاده از روش سل-ژل، هیبرید دوگانه نانولوله کربنی چند دیواره-دی‌اکسید تیتانیوم (MWCNTs-TiO₂) ساخته شد و سپس طی یک فرآیند شیمیایی نرم چهار غلظت مختلف ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۰/۱، و ۰/۲ مولار محلول آبی نترات نقره به هیبرید مذکور اضافه گردید و هیبریدهای سه‌گانه نانولوله کربنی-دی‌اکسید تیتانیوم-نقره (MWCNTs-TiO₂-Ag) با چهار مقدار مختلف نشست نقره بدست آمدند. همچنین هیبرید دوگانه نانولوله کربنی-نقره (MWCNTs-Ag) و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نانوذرات نقره به تنهایی به روش شیمیایی سنتز شدند. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که هیبریدهای دو و سه‌گانه شکل گرفته و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نقره به بدنه نانولوله‌های کربنی چسبیده‌اند. پراش پرتو ایکس حضور همزمان ساختار هگزاگونال نانولوله‌های کربنی و فاز آنتاز نانوذرات تیتانیا را در هیبرید سه‌گانه تایید کرد. مشاهده شد که میزان نشست نانوذرات تیتانیا بسیار بیشتر از نقره است. طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ اتصال نانوذرات تیتانیا و نقره به بدنه نانولوله‌ها با استفاده از گروه عاملی کربوکسیل را تایید کرد. مشاهده شد که هیبریدهای سه‌گانه فعالیت آنتی‌باکتریال بسیار بهتری در مقایسه با هیبریدهای دوگانه و نانوذرات تنها از خود نشان می‌دهند و در بین باکتری‌های مذکور، نانومواد سنتز شده بیشترین تاثیر را روی باکتری اشیریشیا کلای داشته‌اند. بیشینه ناحیه عدم رشد برابر ۱۳ mm است که با استفاده از هیبرید CTA4 در برابر باکتری استفیلوکوک اپیدرمیدیس در حجم ۴۰ μl از باکتری بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: سنتز سبز، تفاله چای، نانوکامپوزیت، Fe₃O₄/Cellulose.

۱- مقدمه

تلاش‌های زیادی برای ساخت مواد آنتی‌باکتریال موثر، کم‌هزینه، غیرسمی، بادوام و سازگار با محیط زیست شده است. در این زمینه یکی از مهمترین راه‌حل‌ها بهره‌گیری از نانوفناوری و توجه به نانوذرات و نانو ساختارهای دارای

افزایش بیماری‌های واگیردار ناشی از باکتری‌های پاتوژنی مختلف و افزایش گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک منجر به

* **عده‌دار مکاتبات:** محمد اکبرزاده پاشا

نشانی: گروه فیزیک حالت جامد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

تلفن: ۰۱۱-۳۵۳۰۲۴۸۰، دورنگار: ۰۱۱-۳۵۳۰۲۴۸۰، پست الکترونیکی: m.akbarzadeh@umz.ac.ir

برای تعداد زیادی از ریز ارگانسیم‌ها سمی‌اند، این نانوذرات برای ساخت داروهای ضد میکروبی جدید در پزشکی بسیار مورد اقبال قرار گرفته‌اند بویژه آنکه سمیت آن‌ها در برابر سلول‌های پستانداران در مقایسه با سمیت‌شان در برابر باکتری‌ها کم است. گزارش شده است که ترکیب نانوذرات نقره با عامل‌های آنتی‌بیوتیک، نظیر آموکسی سیلین، منجر به افزایش کارایی آنتی‌باکتریال ماده حاصل می‌شود [۲۱]. همچنین نانوذرات نقره برای کنترل رشد باکتری‌ها در دندانپزشکی، چاقوی جراحی و زخم‌های سوختگی کاربرد دارند [۲۲، ۲۳].

اگرچه نانوذرات نقره و تیتانیا به عنوان نانومواد آنتی‌باکتریال شناخته شده‌اند، بهره‌گیری از خاصیت ضد میکروبی آن‌ها معضلات خاص خود را دارد. تیتانیا یک نیم‌رسانا با گاف نواری پهن حدود 3.2 eV است. خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات تیتانیا وابسته به تولید زوج الکترون-حفره است که خود را به سطح این نانوذرات رسانده و ROS تولید می‌کنند. به دلیل گاف نواری پهن خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات تیتانیا تنها تحت تابش فرابنفش فعال است. در شرایط تاریکی یا تحت نور مرئی این ذرات فعالیت آنتی‌باکتریالی ندارند یا فعالیت آنها بسیار اندک است. در مقابل نانوذرات نقره بدون تابش نیز فعالند ولی تمایل زیادی به کلوخه شدن دارند که منجر به افزایش ابعاد آنها، کاهش سطح در معرض ذرات و افت فعالیت آنتی‌باکتریال می‌شود. همچنین بدلیل گران بودن نقره و لحاظ صرفه اقتصادی و نیز سمی بودن آن برای بدن انسان در دوزهای بالا استفاده حداقلی از نقره مطلوب است. گزارش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از ساختارهای ترکیبی و هیبریدی یکی از راه‌حل‌های مهم در زمینه غلبه بر این معضلات است [۲۴-۲۹]. در نانوساختارهای هیبریدی که از اتصال دو یا چند نانوساختار پایه از قبیل نانوذره، نانوسیم، نانولوله و نانوصفحه بدست می‌آیند به دلیل اثرات هم افزاینده اجزاء، خواص فیزیکی و شیمیایی بهبود می‌یابد و بعضاً خواص نوظهوری پدید می‌آیند که اجزاء سازنده فاقد آن هستند [۲۷]. با توجه به خواص آنتی‌باکتریال پیش گفته برای

خواص ضد میکروبی است. نانولوله‌های کربنی (CNTs) به دلیل هندسه منحصربفرد، نسبت بالای سطح به حجم، توانایی برای پشتیبانی از ذرات به عنوان بستر نگهدارنده و خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه برای کاربردهای پزشکی و زیستی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند [۴-۱]. گرچه برخی مطالعات نشان داده‌اند که نانوساختارهای کربنی نظیر نانولوله‌های کربنی، گرافن و اکسید گرافن به تنهایی از خاصیت آنتی‌باکتریال برخوردارند، در اغلب موارد این نانوساختارها در ترکیب با ذرات فلزی و اکسید فلزی مورد بررسی آنتی‌باکتریال قرار گرفته‌اند [۸-۵]. خاصیت آنتی‌باکتریال CNTs از دو طریق تخریب فیزیکی باکتری‌ها بوسیله شکستن دیواره‌ها و غشای میکروب‌ها و تخریب شیمیایی باکتری‌ها با افزایش استرس اکسیداتیو سلولی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مورد استناد قرار گرفته است [۸-۵]. از طرف دیگر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به دلیل پایداری شیمیایی، غیرسمی بودن، قیمت پایین، توانایی تولید گونه‌های فعال اکسیژن در حضور نور فرابنفش و توانایی ایجاد پیوند با DNA و پروتئین‌ها در پژوهش‌های زیستی بسیاری در زمینه‌های دارورسانی، تصویربرداری، اتصال پروتئین‌ها، اتصال آنتی‌بادی‌ها، مواد زیست تجزیه پذیر، مواد ضد قارچی، مواد آنتی‌باکتریال، وسایل آرایشی، رنگ‌ها، سطوح خود تمیز شونده، مواد ضد عفونی کننده و تصفیه آب و هوا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۹-۱۶]. مکانیسم فعالیت آنتی‌باکتریال نانوذرات تیتانیا می‌تواند شامل آسیب اکسیداتیو به غشاء سلولی و غیرفعال‌سازی میکروارگانسیم‌ها باشد [۱۷]. همچنین نقره از دیرباز به عنوان یک عنصر ضد میکروبی شناخته شده است. گزارشات فراوانی نشان داده‌اند که نانوذرات نقره طیف وسیعی از فعالیت زیست کشندگی را علیه باکتری‌های مختلف، قارچ‌ها و ویروس‌ها به نمایش می‌گذارند [۲۰-۱۸]. مکانیسم فعالیت آنتی‌باکتریال نانوذرات نقره می‌تواند شامل آزاد کردن یون‌های فلزی سمی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تماس مستقیم با غشاء سلول باشد [۱۸]. از آنجا که نانوذرات نقره

آن برای تخریب فوتوکاتالیستی رنگ رودامین B و غیرفعال‌سازی باکتری اشریشیا کلای تحت نور مرئی استفاده کردند [۳۷]. همچنین تاکنون نانوهیبرید CNTs-Ag به روش‌های متنوعی نظیر احیاء شیمیایی [۳۸]، تخلیه قوس الکتریکی [۳۹]، آئروسول [۴۰]، فشره‌سازی با پلاسما [۴۱] و آبکاری الکتریکی [۴۲] ساخته شده است. کیم و همکارانش به روش احیاء شیمیایی نانوذرات نقره را بر سطح نانولوله‌های کربنی تیول‌دار شده رشد داده و هیبرید CNTs-Ag را ساختند و فعالیت آنتی‌باکتریال آن را در برابر باکتری اشریشیا کلای با استفاده از روش دیسکی بررسی کردند. مشاهده شد که این هیبرید از فعالیت آنتی‌باکتریال بهتری در مقایسه با نانوذرات نقره کلئیدی برخوردار است و قابلیت استفاده مجدد دارد به گونه‌ای که بعد از ۲۰ بار استفاده بیش از ۵۰ درصد فعالیت ضدباکتری خود را حفظ می‌کند [۳۸]. جانگ و همکاران با استفاده از روش آئروسول و تبخیر و فشره‌سازی حرارتی نانوهیبرید CNTs-Ag را ساختند و از آن برای فیلتراسیون ضد میکروبی هوا در برابر باکتری‌های اشریشیا کلای و استافیلوکوک اپیدرمیدیس استفاده کردند [۴۰]. گزارشات کمی در مورد هیبرید سه‌گانه CNTs-TiO₂-Ag وجود دارد که در آن‌ها اغلب به خواص فوتوکاتالیستی این هیبرید پرداخته شده و خواص آنتی‌باکتریال کمتر مورد بررسی قرار گرفته است [۳۴، ۳۵، ۴۷]. چاداری و همکاران ابتدا هیبرید دوگانه CNTs-TiO₂ را به روش آبی-حرارتی ساختند و سپس در یک فرآیند شیمی نرم نیترات نقره را به آن افزوده و هیبرید سه‌گانه CNTs-TiO₂-Ag را سنتز و از آن برای تخریب فوتوکاتالیستی متیلن آبی (یک رنگ آلاینده) تحت نور مرئی استفاده کردند [۳۴]. آن‌ها گزارش کردند که فعالیت فوتوکاتالیستی هیبرید سه‌گانه CNTs-TiO₂-Ag تحت نور مرئی چندین برابر هیبرید دوگانه CNTs-TiO₂ و CNTs-Ag بوده و از پایداری فوتوکاتالیستی خوبی برخوردار است. کوو و همکاران هیبرید سه‌گانه Ag-TiO₂-CNTs را به روش احیاء فوتوشیمیایی تحت تابش UV در دمای اتاق سنتز و از آن برای تخریب فوتوکاتالیستی رنگ متیلن آبی تحت

نانوذرات نقره، تیتانیا و نانولوله‌های کربنی، ساخت هیبریدهای دو یا چندگانه از این نانو ساختارها به منظور دستیابی به مواد آنتی‌باکتریال موثرتر مورد توجه قرار گرفته است. در این هیبریدها نانولوله‌های کربنی بدلیل مساحت سطحی بزرگ و استحکام مکانیکی بسیار بالا، نقش اسکلت نگهدارنده نانوذرات را بر عهده دارند که هم به پخش‌شدگی مناسب نانوذرات کمک می‌کنند و هم در کنترل ابعاد و کوچک‌سازی آنها موثرند. همچنین نانولوله‌های کربنی پذیرنده‌های خوب الکترون هستند که در ساختار هیبریدی می‌توانند بازترکیب زوج‌های الکترون حفره را به تاخیر بیندازند، لذا خواص فوتوکاتالیستی و آنتی‌باکتریال هیبرید را بهبود می‌دهند [۲۷]. برای سنتز نانوهیبرید نانولوله کربنی-دی‌اکسید تیتانیوم (CNTs-TiO₂) روش‌هایی نظیر سل-ژل [-۳۰، ۳۲]، حلالی-حرارتی (سولوترمال) [۳۳]، آبی-حرارتی (هیدروترمال) [۳۴، ۳۵]، تلقیح مرطوب [۳۶] و ترکیب روش‌های تخلیه قوس الکتریکی و سل-ژل [۳۷] گزارش شده است. عباس و همکارانش گزارش کرده‌اند که با افزایش محتوای نانولوله‌های کربنی در ساخت هیبرید CNTs-TiO₂ به روش سل-ژل، مساحت ویژه نانو ساختارهای هیبریدی بیشتر شده و فعالیت آنتی‌باکتریال آن‌ها بهبود می‌یابد [۳۰]. تیان و همکارانش برای سنتز نانو ساختار هیبریدی TiO₂/CNTs از دو روش جداگانه حلالی-حرارتی و سل-ژل استفاده کردند و دریافتند که روش حلالی-حرارتی منجر به آرایش تقریباً یکنواخت بدنه نانولوله‌های کربنی با نانو کریستال‌های آنتاز دی‌اکسید تیتانیوم می‌شود ولی در روش سل-ژل نانولوله‌های کربنی توسط توده‌ای از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در بر گرفته می‌شوند. آن‌ها مشاهده کردند که با تغییر درصد وزنی نانولوله‌های کربنی در روش حلالی-حرارتی خاصیت فوتوکاتالیستی هیبرید تحت نور مرئی تغییر می‌کند و در مقدار ۲۰ درصد وزنی نانولوله کربنی، این خاصیت بهینه می‌شود [۳۳]. آشکاران و همکارانش با ترکیب دو روش سل-ژل و تخلیه قوس الکتریکی در مایع، نانو کامپوزیت CNTs-TiO₂ را ساخته و از

و گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمیدیس در دو غلظت مختلف این باکتری‌ها به روش دیسکی و همچنین تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) بررسی گردید و با نمونه‌های هیبریدی دوگانه CNTs-TiO_2 و CNTs-Ag و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نقره تنها مقایسه شد. از ویژگی‌های دیگر پژوهش حاضر تنوع نانومواد و تعداد باکتری‌های مورد آزمایش است. در بسیاری از گزارشات موجود به یک نانوذره خاص یا یک باکتری خاص پرداخته شده است. آزمایشات آنتی‌باکتریال ما در غیاب نور انجام شد و نانوهیبریدهای سه‌گانه سنتز شده فعالیت خوبی از خود در برابر باکتری‌های مذکور نشان دادند در حالیکه در بسیاری از گزارشات موجود از نور خورشید یا نور مصنوعی برای بررسی فعالیت آنتی‌باکتریال ساختارهای هیبریدی استفاده شده است [۱۶،۳۷،۴۴،۴۸].

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- سنتز هیبرید دوگانه MWCNTs-TiO_2

برای سنتز هیبرید دوگانه MWCNTs-TiO_2 (CNTs:TiO₂=20wt.%) از روش سل-ژل استفاده شد [۳۳]. ابتدا ۱۸۰ mg از نانولوله‌های کربنی چند دیوار عامل‌دار شده کربوکسیلی (CNTs-COOH)، قطر خارجی ۳۰-۲۰ nm و خلوص بالای ۹۵ درصد، محصول شرکت (US. NANO) در ۵۶ ml اتانول (خلوص ۹۹/۶ درصد، شرکت مرک) توسط التراسونیک به مدت ۳۰ min پخش شد. سپس ۶ ml بنزیل الکل به عنوان سورفکتانت ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ ، شرکت مرک) و ۱ ml آب دیونیزه به محلول اضافه و برای ۲ h در دمای ۰ °C به کمک همزن مغناطیسی بهم زده شد. در طول این مدت با سود سوزآور (۱ مولار)؛ pH سوسپانسیون روی ۹ کنترل گردید. در مرحله بعد ۴ ml بوتوکسید تیتانیوم (Ti(OBu)_4 ، مرک) در ۱۲ ml اتانول حل شده و آرام و قطره‌وار به محلول در حال همزنی اضافه گردید و به مدت ۱ h در دمای ۰ °C، هم زدن ادامه یافت. برای جداسازی رسوبات حاصل، سوسپانسیون تهیه شده سانتریفیوژ

نور مصنوعی استفاده کردند [۴۷]. ژانگ و همکاران به روش سل-ژل کامپوزیت Ag-CNTs/TiO_2 را سنتز و خواص فتوالکتروشیمیایی آن در تجزیه متیلن آبی و باکتری کشی آن در برابر باکتری اشیریشیا کلای را بررسی کردند. آن‌ها در روش ساخت خود از بنزن که یک ماده سمی و مضر برای محیط زیست است و همچنین دمای حرارت‌دهی بالا در ۷۰۰ °C که از صرفه اقتصادی روش می‌کاهد استفاده کردند [۴۴]. محمد و همکاران با استفاده از روش آبی-حرارتی نانوهیبرید $\text{TiO}_2\text{-CNTs}$ اصلاح شده با نانوذرات Ag را ساخته و کارایی آن را برای تخریب فتوکاتالیستی تحت نور مرئی رودامین B و باکتری‌های اشیریشیا کلای و استافیلوکوک اورئوس بررسی کردند. فرآیند ساخت پژوهش فوق علاوه بر عملیات خشک کردن و کلسیناسیون شامل دو فرآیند آبی حرارتی طولانی ۴۸ ساعت تحت اتوکلاو در دماهای ۱۲۰ °C و ۱۶۰ °C است و همچنین بیشتر متمرکز بر استفاده از نانولوله‌های کربنی تک دیواره است که بسیار گرانتر از نانولوله‌های کربنی چنددیواره هستند [۴۳].

با توجه به توضیحات فوق، گرچه گزارشاتی در مورد هیبرید سه‌گانه متشکل از نانولوله‌های کربنی، تیتانیا و نقره وجود دارد ساخت و بررسی خواص آنتی‌باکتریال این هیبرید نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. لذا ما در این پژوهش بر آن شدید که با استفاده از یک روش شیمیایی کم هزینه، مواد ارزان، غیرسمی یا با سمیت کم و عدم استفاده از عملیات حرارت‌دهی با دمای بالا و صرف زمان زیاد، هیبرید سه‌گانه $\text{CNTs-TiO}_2\text{-Ag}$ را بسازیم که تحت شرایط تاریکی از فعالیت آنتی‌باکتریال خوبی برخوردار باشد. روش ساخت ما ترکیب دو روش سل-ژل و شیمیایی نرم است. گرچه این روش‌ها کاملاً شناخته شده‌اند ولی ترکیب آن‌ها برای ساخت هیبرید $\text{CNTs-TiO}_2\text{-Ag}$ بدیع است. در این پژوهش چهار هیبرید سه‌گانه با چهار غلظت مختلف نقره ساخته شد و فعالیت آنتی‌باکتریال آن‌ها در برابر سه باکتری مختلف شامل باکتری‌های گرم منفی اشیریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۱: نامگذاری نانوساختارهای تولید شده.

نمونه ساخته شده	هیبریدهای سه‌گانه				هیبریدهای دوگانه		سنتزهای یگانه	
	CNTs-TiO ₂ -Ag (۰/۰۶ M)	CNTs-TiO ₂ -Ag (۰/۰۸ M)	CNTs-TiO ₂ -Ag (۰/۱ M)	CNTs-TiO ₂ -Ag (۰/۲ M)	CNTs-TiO ₂	CNTs-Ag (۰/۱ M)	TiO ₂	Ag
علامت اختصاری	CTA1	CTA2	CTA3	CTA4	CT	CA	T	A

نانومواد سنتز شده اعم از نانوهیبریدهای سه‌گانه و دوگانه و نانوذرات تنها را مطابق جدول ۱ نامگذاری کردیم.

۳-۲- مشخصه‌یابی نانوساختارها

برای مشخصه‌یابی نانوساختارها از آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, TESCAN Mira III, Czech)، پراش اشعه ایکس تحت تابش $\text{CuK}\alpha$ (XRD, Philips PW1730)، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR, Avatar, USA)، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS, Mira III) به همراه نقشه اشعه ایکس توزیع عناصر (X-map) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Philips CM120) استفاده شد.

۴-۲- تست‌های فعالیت آنتی‌باکتریال

۴-۲-۱- روش پخش دیسکی (کربی-بائر)

برای بعد از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها یک محلول نیم مک فارلند از آن‌ها تهیه شد و ۱۰۰ ml از سوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح گردید. دیسک‌های بلانک (با قطر ۶/۴ mm) روی پلیت‌های تلقیح شده قرار داده شدند. نانوساختارها در مایع دی متیل سولفوکسید (DMSO) پخش و سوسپانسیون‌هایی با غلظت ۶۰ mg/ml از هر کدام تهیه شد. سپس ۳۰ μl از سوسپانسیون مذکور روی دیسک‌های بلانک ریخته شد و پلیت‌ها برای ۲۴ h ساعت در ۳۷ °C انکوبه شدند. بعد از ۲۴ h انکوباسیون قطر هاله‌ها اندازه‌گیری و نتایج ثبت شدند. در این پژوهش فعالیت آنتی‌باکتریال نانوساختارها علیه سه گونه شامل باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کولای (E.coli) در حجم

گردید و سه مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد. رسوبات بدست آمده به مدت ۲۰ h در دمای ۶۰ °C در آون خشک شده و سپس در کوره‌ای با دمای ۴۰۰ °C کلسینه گردید. به همین روش نانوذرات TiO₂ خالص نیز با حذف CNTs در طول فرآیند ساخت هیبرید دوگانه سنتز گردید.

۴-۲-۲- سنتز هیبرید سه‌گانه MWCNTs-TiO₂-Ag

برای ساخت هیبرید سه‌گانه از فرآیند شیمی نرم استفاده گردید [۳۴]. ابتدا ۰/۲۵ g از هیبرید تولید شده در مرحله قبل در ۱۵ ml آب دیونیزه برای ۳۰ min به کمک همزن مغناطیسی پخش شد. در مرحله بعد ۱۰ ml محلول آبی نترات نقره (AgNO_3 ، شرکت مرک) با غلظت‌های ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۲ مولار به سوسپانسیون فوق بصورت آرام و قطره‌وار اضافه شد و برای ۲ h در دمای اتاق همزدن ادامه یافت. برای جداسازی رسوبات حاصل؛ سوسپانسیون تهیه شده، سانتریفیوژ شده و سه مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد. سپس رسوبات حاصل به مدت ۶ h در دمای ۶۰ °C در آون خشک شد. سپس پودر خشک شده در ۱۰ ml محلول آبی ($\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3 = ۵/۳$) پخش شده و برای ۲ h در دمای اتاق بهم زده شد. برای جداسازی رسوبات؛ سوسپانسیون حاصل چندین مرتبه سانتریفیوژ و با آب دیونیزه شستشو داده شد. در انتها نیز رسوبات بدست آمده به مدت ۸ h در دمای ۸۰ °C در آون خشک گردید و نانوهیبرید سه‌گانه CNTs-TiO₂-Ag حاصل گردید. همچنین نانوذرات نقره کلوییدی و هیبرید دوگانه (۰/۱ مولار $\text{AgNO}_3 = \text{MWCNTs-Ag}$) به ترتیب به روش‌های احیاء شیمیایی و سنتز شیمیایی مرطوب تهیه شدند.

ذرات در برگرفته شده‌اند.

شکل (۱-a) تصویر هیبرید دو گانه CT را نشان می‌دهد. نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تقریباً بطور یکنواخت روی بدنه نانولوله‌ها نشست کرده‌اند. تجمع ذرات و کلوخه‌ای شدن آنها تا حدی وجود دارد. شکل (۱-b) تصویر هیبرید دو گانه CA را نشان می‌دهد. در مقایسه با CT نانوذرات نقره ریزتر از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم شکل گرفته‌اند. تجمع و کلوخه شدن ذرات به چشم نمی‌خورد و بدلیل کوچک بودن ذرات نقره ساختار لوله‌ای نانولوله‌های کربنی به وضوح مشاهده می‌شود. تصویر (۱-c) هیبرید سه گانه CTA4 را نشان می‌دهد. شکل گیری ساختار هیبریدی به وضوح دیده می‌شود. تجمع ذرات در مقایسه با هیبریدهای دو گانه بیشتر مشاهده می‌شود.

برای بررسی بیشتر مورفولوژی نانو ساختارها، نمونه‌های CT و CTA4 با میکروسکوپ TEM بررسی شدند. شکل (۱-d) تصویر نوعی TEM از هیبرید دو گانه CT را نشان می‌دهد که نشست نانوذرات تیتانیوم بر سطح نانولوله کربنی را تایید می‌کند. نکته جالب وجود خطوط مستقیم و گوشه‌های تیز و اشکال مکعبی در ذرات نشست کرده‌است (به منطقه‌ای که با فلش‌های نارنجی در این شکل مشخص شده، دقت کنید) که مبین ساختار بلوری نانوذرات تیتانیاست. شکل (۱-e) تصویر TEM از هیبرید سه گانه CTA4 را نشان می‌دهد که در آن حضور ذرات بر بدنه نانولوله‌های کربنی دیده می‌شود. به نظر می‌رسد که ذرات تیره تر نقره و ذرات روشن تر دی اکسید تیتانیوم را نشان می‌دهند که مشابه ساختار گزارش شده توسط چاداری و همکاران است [۳۴]. همچنین اختلاف مورفولوژی بین ذرات تیره و روشن به وضوح به چشم می‌خورد. ذرات تیره تر (Ag) به شکل شبه کروی و محیط منحنی شکل و ذرات روشن تر (تیتانیا) به شکل چند گوش و با اضلاع راست خط دیده می‌شوند که برای وضوح بیشتر بعضی از این ذرات در شکل با خطوطی نشان داده شده‌اند.

$100 \mu\text{l}$ و سودوموناس آئروژینوزا (P.a) در حجم $100 \mu\text{l}$ و باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمیدیس (S.epi) در دو حجم $100 \mu\text{l}$ و 40 به روش دیسکی بررسی گردید. اندازه منطقه مهار (هاله عدم رشد) با استفاده از رابطه $(2)/(\text{قطر هاله} - \text{قطر دیسک})$ (بر حسب mm) تعیین گردید.

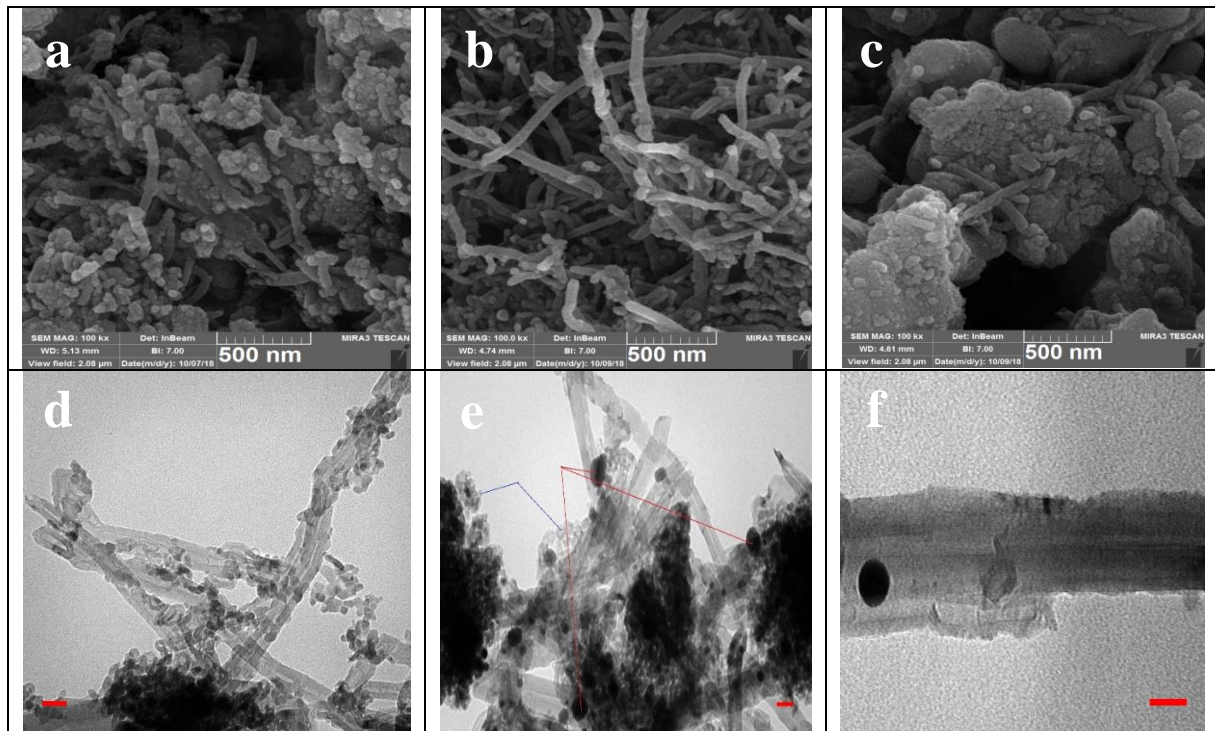
۲-۴-۲- تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشنده

برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) از روش تعیین رقت در لوله استفاده شد. برای این کار محیط کشت نوترینت براث بعد از آماده سازی، به $13 \mu\text{l}$ لوله آزمایش، در اولی به میزان 2 ml و در مابقی لوله‌ها 1 ml منتقل شد. سپس 20 mg از نانو هیبرید CTA4 به داخل اولین لوله ریخته شد. در مرحله بعد 1 ml از لوله اول برداشته شده و به لوله دوم اضافه شد و به همین ترتیب این عمل برای لوله‌های بعدی به جز لوله دوازدهم انجام گرفت و از لوله سیزدهم 1 ml برداشته و دور ریخته شد. سپس $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتری‌های تهیه شده در رقت نیم مک فارلند به داخل تمام لوله‌ها به جز لوله سیزدهم منتقل شد. بعد از انجام این مراحل لوله‌ها برای 24 h ساعت در 37°C انکوبه شدند. بعد از 24 h انکوباسیون، لوله‌های مورد نظر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شده و مجدداً برای 24 h در 37°C انکوبه شدند و سپس MIC و MBC تعیین گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیزهای میکروسکوپی

برای بررسی مورفولوژی نانو ساختارهای هیبریدی از میکروسکوپ SEM استفاده شد که تصاویر نوعی آن در شکل ۱ ارائه شده است. در این تصاویر (a, b و c) اجزاء رشته مانند، نانولوله‌های کربنی و ساختارهای ذره‌ای نانوذرات تیتانیا و نقره را نشان می‌دهند. واضح است که CNTs توسط



شکل ۱: تصاویر SEM هیبریدهای، (a) CT، (b) CA، (c) CTA4 و تصویر TEM از هیبریدهای (d) CT و (e,f) CTA4.

۲۶/۲، ۴۳/۳، ۴۴/۵ نشان می‌دهد که به ترتیب مربوط به صفحات (۰۰۲)، (۱۰۰) و (۱۰۱) در نانولوله‌های کربنی می‌باشند [۳۰، ۴۸-۵۰].

قله‌های ۲۵/۴ (۱۰۱)، ۳۷/۹ (۰۰۴)، ۴۸ (۲۰۰)، ۵۰/۷ (۱۰۵)، ۵۵ (۲۱۱)، ۶۲/۸ (۲۰۴)، ۶۸/۸ (۱۱۶)، ۷۰/۲ (۲۲۰) و ۷۵/۴ (۲۱۵) در الگوی پراش دی‌اکسید تیتانیوم خالص، هیبرید دوگانه CT و هیبریدهای سه‌گانه CTA به فاز آاناتاز TiO_2 نسبت داده می‌شوند و اشاره به تشکیل کامل فاز آاناتاز TiO_2 در طول فرآیند سل-ژل دارد [۳۴، ۳۵، ۴۶، ۴۷]. در الگوهای پراش CT و CTA قله مربوط به MWCNTs مشاهده نشد که می‌تواند به دلیل همپوشانی قله اصلی نانولوله کربنی در ۲۶/۲ با قله اصلی TiO_2 آاناتاز در ۲۵/۴ و همچنین پوشانده شدن شدید بدنه نانولوله‌ها با نانوذرات تیتانیا باشد. قله‌های پراش CA در ۳۸/۱، ۴۴/۴، ۶۴/۵ و ۷۷/۴ به ترتیب به صفحات (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) از Ag نسبت داده می‌شود [۳۸].

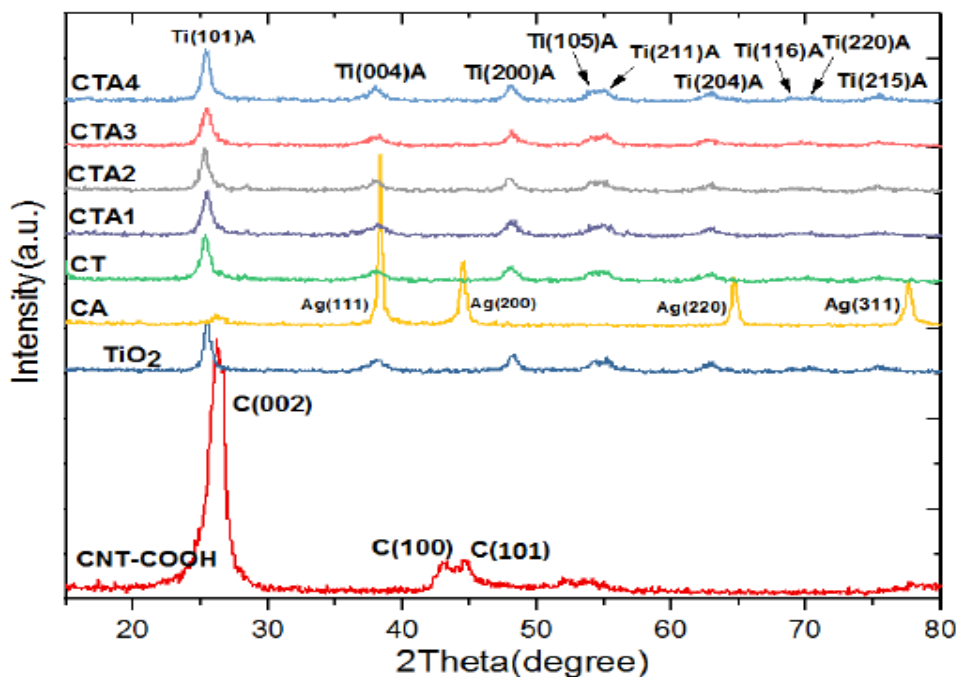
البته حضور همزمان ذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم در ساختار هیبرید سه‌گانه توسط آنالیزهای دیگر که در نتایج آتی به آن‌ها می‌پردازیم تایید شده است. نانوذرات نقره، هم می‌تواند خود راسا به بدنه نانولوله بچسبند و هم از طریق نشست روی نانوذرات تیتانیا در ساختار هیبرید وارد شوند. شکل (۱-f) قسمتی از بدنه یک نانولوله کربنی در هیبرید سه‌گانه CTA4 را نشان می‌دهد که در آن یک نانوذره نقره کروی شکل مستقیماً به بدنه نانولوله کربنی متصل شده است.

۳-۲- آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD)

ساختار بلوری نمونه‌ها با استفاده از آنالیز XRD بررسی شد. شکل ۲ الگوی پراش نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده با گروه کربوکسیل، دی‌اکسید تیتانیوم خالص، هیبریدهای دوگانه CT و CA و هیبریدهای سه‌گانه CTA را نشان می‌دهد. الگوی پراش MWCNTs-COOH سه قله را در

جدول ۲: اندازه نانوبلورک‌ها در نانوساختارهای سنتز شده.

اندازه نانوبلورک‌های نانوساختارهای سنتز شده (nm)						
دی اکسید تیتانیوم در هیبریدهای سه‌گانه				هیبریدهای دوگانه		سنتز یگانه
CTA1	CTA2	CTA3	CTA4	دی اکسید تیتانیوم در CT	نقره در CA	T
۱۰	۱۰	۱۱	۱۱	۸	۱۹	۱۲



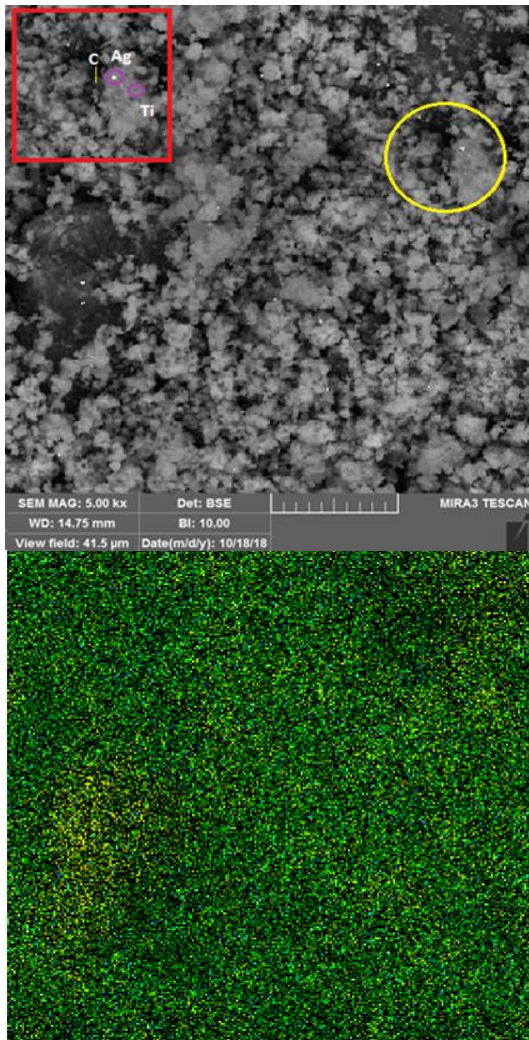
شکل ۲: الگوی XRD نانولوله‌های کربنی کربوکسیلی، دی اکسید تیتانیوم خالص، هیبریدهای CT و CA و هیبریدهای سه‌گانه CTA.

[۳۴]. با استفاده از رابطه دبی-شرر (معادله ۱) اندازه تخمینی نانوبلورک‌های TiO_2 و Ag در نانوساختارهای سنتز شده محاسبه و در جدول ۲ ارائه گردید. در این رابطه k عامل شکل هندسی و برابر ۹/، λ طول موج اشعه ایکس و برابر $1/54$ آنگستروم، B پهنای کامل در نصف ارتفاع قله و θ زاویه پراش را نشان می‌دهد. اندازه نانوبلورک‌های TiO_2 در نانوساختارهای هیبریدی سه‌گانه با افزایش غلظت نقره تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است که مورد انتظار هم بود.

$$D = K\lambda / B \cos\theta \quad (1)$$

قله‌های پراش Ag در هیبریدهای سه‌گانه به دلیل میزان کم نانوذرات نقره نسبت به TiO_2 مشاهده نمی‌شود که مشابه مشاهدات دیگران است [۳۴]. البته در هیبریدهای سه‌گانه CTA4 و CTA3 یک قله پراش بسیار کوچک در $38/1$ دیده می‌شود که بنظر می‌رسد با قله مربوط به صفحه $\text{TiO}_2(004)$ همپوشانی داده است. قله‌های مرتبط با فاز آاناتاز TiO_2 در ساختارهای هیبریدی سه‌گانه CTA در مقایسه با هیبرید دوگانه CT و TiO_2 خالص، تغییری در محل ظهور نداشته‌اند که نشان می‌دهد نانوذرات نقره وارد شبکه کریستالی دی اکسید تیتانیوم نشده‌اند بلکه روی سطح آن نشست کرده‌اند.

الکترون برگشتی (BSE) می‌توان نوع نانوذرات نشست کرده را شناسایی کرد. شکل ۴ نتیجه این آنالیز را برای هیبرید CTA3 نشان می‌دهد.



شکل ۴: تصویر X-Map (سمت چپ) و تصویر SEM با شناساگر BSE (سمت راست) از هیبرید سه گانه CTA3.

در تصویر Xmap نقاط زرد رنگ کربن و نقاط سبز و آبی رنگ به ترتیب معرف عناصر تیتانیوم و نقره اند. این تصاویر نشان می‌دهد که در هیبرید سه گانه CTA3 نانوذرات تیتانیوم بر سطح نانولوله‌های کربنی قرار گرفته‌اند.

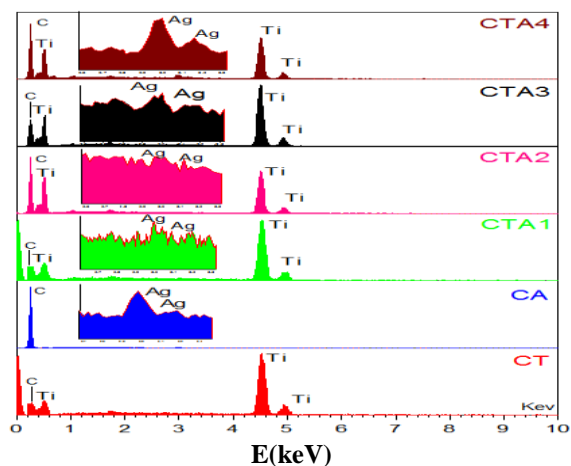
نانوذرات نقره نیز پخش مناسبی بر سطح CNTs-TiO₂ داشته‌اند و همچنین می‌توان به غلظت کم نانوذرات نقره پی برد. نقاط سبز رنگ که نانوذرات تیتانیا را نشان می‌دهند بر

۳-۳- آنالیز طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) و نقشه پرتو ایکس توزیع عناصر (Xmap)

آنالیز EDS حضور عناصر کربن، تیتانیوم و نقره را در ساختارهای هیبریدی تایید کرده است. شکل ۳ طیف EDS نانوهیبریدهای دوگانه و سه گانه و جدول ۳ نوع و غلظت عناصر موجود در آن‌ها را که با استفاده از این آنالیز بدست آمده، نشان می‌دهد. درصد وزنی نقره برای CTA4، CTA1، CTA2 و CTA3 به ترتیب از چپ به راست برابر ۱/۹۳، ۲/۲۸، ۳/۷۸ و ۵/۹۶ درصد است که نشان می‌دهد با افزایش غلظت پیش ماده نقره در ساخت هیبرید سه گانه میزان نانوذرات نقره نشست کرده بر بدنه نانولوله‌های کربنی افزایش یافته‌است که کاملاً مورد انتظار ماست.

جدول ۳: نوع عناصر موجود و درصد وزنی آن‌ها در ساختارهای هیبریدی.

نمونه‌ها	Ag (wt.%)	C (wt.%)	Ti (wt.%)
CA	3.12	96.88	-
CT	-	26.26	73.74
CTA1	1.93	28.06	70.01
CTA2	2.28	40.46	57.27
CTA3	3.78	34.11	62.11
CTA4	5.96	39.12	54.92



شکل ۳: آنالیز EDS نمونه‌های هیبریدی.

از آنالیز Xmap که نشانگر موقعیت توزیع عناصر در زمینه ماتریس هیبریدی است به همراه آنالیز SEM (با شناساگر

نقاط زرد رنگ و آبی رنگ غالب هستند. این نشان می‌دهد که نانولوله‌های کربنی کاملاً با نانوذرات تیتانیا پوشش داده شده‌اند و همچنین میزان نشست نانوذرات تیتانیا در مقایسه با نقره بسیار بیشتر است که با آنالیز EDS نیز در تطابق است. شکل سمت راست تصویر SEM با شناساگر BSE را نشان می‌دهد. در تصاویر مربوط به شناساگر الکترون برگشتی در میکروسکوپ SEM اختلاف تاریکی و روشنی نقاط مختلف به معنی اختلاف جنس آن‌ها است. در تصویر سمت راست شکل ۴، کادر قرمز رنگ داخل آن، بزرگ شده ناحیه نشان داده شده با دایره زرد رنگ در همین تصویر است که نوع نانوذرات در آن نشان داده شد است.

۳-۴- آنالیز تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)

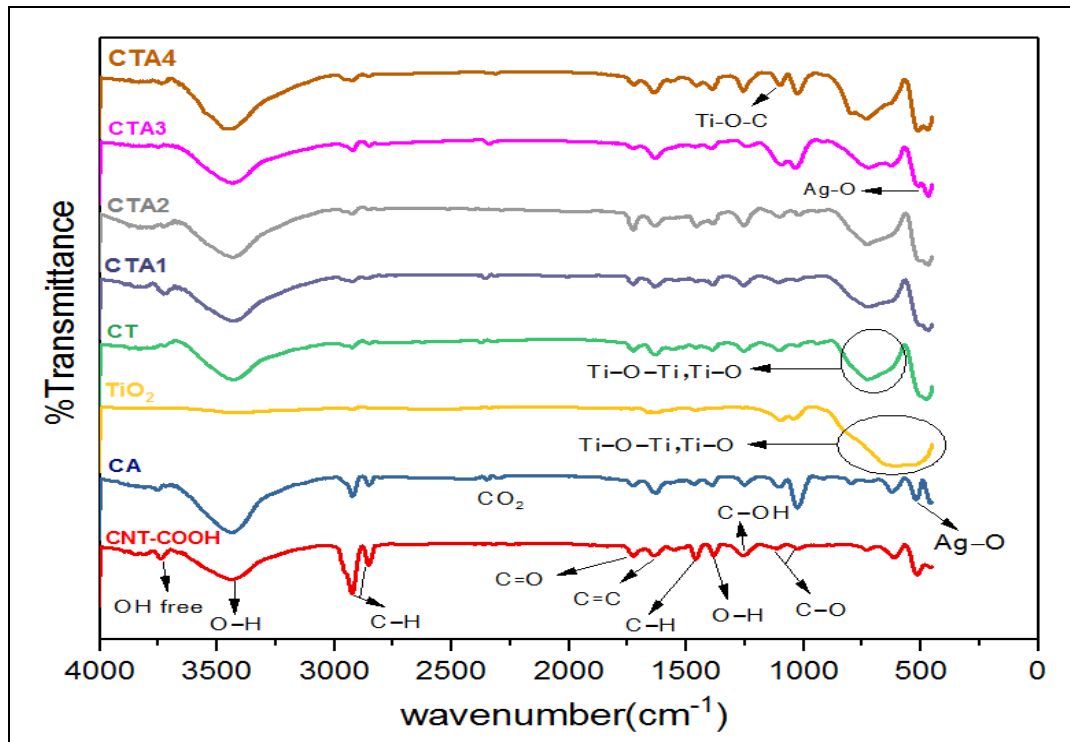
با استفاده از آنالیز FTIR می‌توان به نوع گروه‌های عاملی و شیمی سطح نانومواد پی برد. شکل ۵ طیف FTIR نانولوله‌ها کربنی عامل دار شده با گروه کربوکسیل، TiO_2 خالص و نمونه‌های هیبریدی را نشان می‌دهد. نوع پیوندهای حاضر در نانومواد سنتز شده که با استفاده از قله‌های جذب IR می‌توان فهمید در روی این شکل نشان داده شده‌اند. قله‌های جذب در 2854 cm^{-1} و 2925 cm^{-1} به ترتیب مطابق با ارتعاشات کششی متقارن و پادمقارن C-H در گونه‌های CH_2 و CH_3 هستند که در فرآیند ساخت و خالص‌سازی نانولوله‌های کربنی روی بدنه آنها شکل می‌گیرند [۵۳-۵۱]. این قله‌ها در ساختارهای هیبریدی به ویژه هیبرید دو گانه CT و هیبریدهای سه گانه CTA بشدت کاهش یافته‌اند. این کاهش بدلیل شدت نشست نانوذرات روی بدنه نانولوله‌هاست که امکان تحریک IR این پیوندها را محدود می‌کند. همچنین امکان شکست این پیوندها در اثر نشست نانوذرات وجود دارد.

قله جذب در 1459 cm^{-1} مربوط به مد پادمقارن ارتعاشات خمشی C-H در گروه CH_3 است که به دلیل حضور CNTs در نمونه‌ها ظاهر گردید [۵۱]. قله جذب IR در 3438 cm^{-1} به

حضور گروه‌های هیدروکسیل (OH-) اشاره دارد که می‌تواند ناشی از مولکول‌های آب جذب شده به بدنه نانولوله‌ها یا پیوند OH موجود در گروه کربوکسیل نانولوله‌های عامل دار شده باشد [۵۲]. قله جذب در 1635 cm^{-1} به ارتعاش کششی C=C باند دو گانه کربن-کربن در ساختار CNTs و قله جذب در 1724 cm^{-1} به ارتعاشات کششی پیوند C=O موجود در گروه کربوکسیل نسبت داده می‌شوند [۵۴، ۵۲]. قله 1382 cm^{-1} به ارتعاشات خمشی پیوند O-H و قله‌های جذب در 1024 cm^{-1} و 1116 cm^{-1} به ارتعاشات کششی پیوند C-O گروه‌های کربوکسیل متصل به بدنه نانولوله‌ها قابل استناد است [۵۴، ۵۲]. قله جذب در 1257 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند C-OH گروه‌های هیدروکسیل است [۵۴]. قله 3337 cm^{-1} نیز به گروه‌های OH آزاد نسبت داده می‌شود [۵۵].

بطور کلی قله‌های جذب IR اکسید فلزات در ناحیه زیر 1000 cm^{-1} که به ناحیه اثر انگشتی موسوم است، ظاهر می‌شوند [۳۰]. بجز طیف نانولوله‌های تنها و هیبرید CA بقیه طیف‌ها باند جذب پهنی در ناحیه زیر 1000 cm^{-1} نشان می‌دهند که مشخصه تیتانیای موجود در نمونه‌ها و ناشی از پیوندهای Ti-O-Ti و Ti-O است [۳۰، ۱۵].

در هیبرید CT و هیبریدهای سه گانه CTA از شدت و پهنای این باند نسبت به طیف TiO_2 خالص کاسته می‌شود و همچنین تا حدی جابجایی روی می‌دهد که به نظر می‌رسد در اثر اندرکنش با نانولوله‌های کربنی است. در هیبرید CA قله جذب در 521 cm^{-1} به پیوند نانوذرات Ag با اکسیژن گروه‌های هیدروکسیل (Ag-O) نسبت داده می‌شود که اتصال نانوذرات نقره به بدنه نانولوله‌ها و شکل‌گیری هیبرید را تایید می‌کند [۵۶، ۵۷]. این قله در هیبریدهای سه گانه نیز با اندکی جابجایی دیده می‌شود. قله‌های جذب نقره فلزی (Ag-Ag) در کمتر از 400 cm^{-1} ظاهر می‌شوند که در اینجا خارج از بازه فرکانسی مورد بررسی قرار دارند [۵۶، ۵۸].



شکل ۵: طیف FTIR نانولوله‌های کربنی کربوکسیلی، نانوذرات تیتانیای خالص و نانوساختارهای هیبریدی.

هسته محدود به غشاء دارند، این ارگانوسم‌ها به عنوان یوکاریوت (دارای هسته حقیقی) و بالعکس باکتری‌ها که فاقد هسته حقیقی هستند به عنوان پروکاریوت‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. باکتری‌ها را بر اساس جنس و گونه، اندازه، شکل و متابولیسم (هوازی، بی‌هوازی و ...) طبقه‌بندی می‌کنند. باکتری‌های مهم در پزشکی بیشتر میله‌ای (باسیل)، گرد (کوکسی) و مارپیچی (اسپیروول) هستند. یک گونه از طبقه‌بندی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات رنگ‌آمیزی گرم است. هنگامی که باکتری رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ نوری بصورت آبی یا ارغوانی دیده شود باکتری گرم مثبت و اگر به صورت قرمز یا صورتی دیده شود باکتری گرم منفی خواهد بود. از نظر ساختمانی باکتری‌های گرم مثبت دارای یک پوشش سلولی شامل غشاء سیتوپلاسمی داخلی و یک دیواره سلولی چندلایه ضخیم با اتصالات بسیار محکم به نام پپتیدو گلیکان و عوارض رشته مانند از جنس تیکوئیک اسید اند. در مقابل باکتری‌های گرم منفی دارای یک پوشش سلولی شامل غشاء سیتوپلاسمی

قله جذب در محدوده 1090 cm^{-1} در هیبرید CT و هیبرید سه‌گانه مربوط به پیوند Ti-O-C می‌باشد که به دلیل اندرکنش نانولوله‌ها با نانوذرات TiO_2 ظاهر شده‌اند [۵۱]. از آنجایی که آزمایش‌ها در محیط هوا انجام شد قله‌های مربوط به CO_2 (O=C=O) نیز در نمونه‌ها وجود دارد. لذا بطور خلاصه می‌توان گفت که آنالیز FTIR نیز در تطابق با آنالیزهای قبلی شکل‌گیری هیبریدهای دوگانه و سه‌گانه را به خوبی تایید می‌کند.

۳-۵- نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال

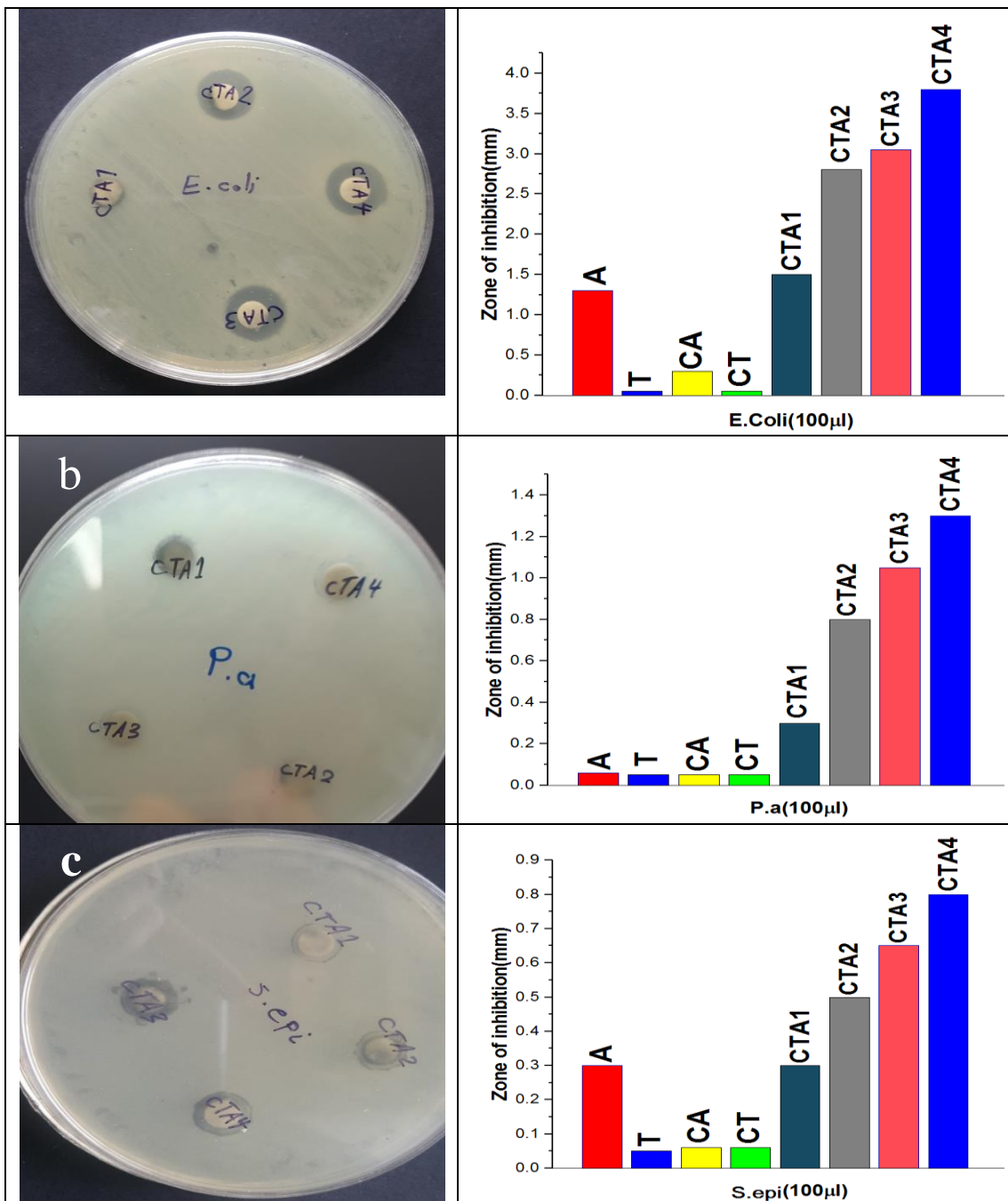
۳-۵-۱- تعیین هاله عدم رشد

باکتری، یک موجود زنده تک سلولی ساده و فاقد اندامک‌های داخل سلولی محدود به غشاء نظیر هسته، دستگاه گلژی، رتیکولوم اندوپلاسمیک و میتوکندری است. بنابراین فعالیت‌های متابولیکی و بیوسنتزی باکتری‌ها در داخل غشاء سلولی یا سیتوپلاسم انجام می‌شود. از آنجایی که سلول‌های انگل‌ها، قارچ‌ها، انسان و حیوانات، سازماندهی شده‌اند و

داخلی، یک دیواره سلولی نازک از جنس پتیدو گلیکان و یک غشاء خارجی دارای پورین ها، پیلی و تاژک متصل به غشاء سیتوپلاسمی اند و بخش خارجی آنها غالباً از مولکول شبه فسفولیپیدی به نام لیپولی ساکارید تشکیل شده است. از نظر کلینیکی باکتری های گرم مثبت به تعداد زیادی روی پوست و مخاط وجود دارند و شایع ترین آن ها در پزشکی استافیلوکوک، استرپتوکوک و پنوموکوک ها هستند. باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی به لیزکننده ها نظیر لیزوزیم و پنی سیلین G حساس تر هستند زیرا این باکتری ها فاقد غشاء خارجی هستند که دیواره سلولی را از دسترسی این عوامل محافظت نماید. مهمترین باکتری های گرم منفی از نظر پزشکی باسیل یا دیپلوکوک اند و اغلب در دستگاه گوارش ساکن هستند. عموماً باکتری های گرم منفی به خاصیت لیزکنندگی آنتی بادی و کمپلمان از باکتری های گرم مثبت حساس ترند. این موضوع به دلیل داشتن غشاء خارجی است که هدف کمپلکس های مهاجم به غشاء بعد از فعال شدن کمپلمان قرار می گیرد. باکتری اشیریشیا کلای یک باکتری گرم منفی بی هوازی اختیاری و از شایع ترین گونه های باکتریایی جدا شده از عفونت های انسانی است. باکتری اشیریشیا کلای بر روی محیط های خیلی ساده به آهستگی رشد می کند و یکی از پاتوژن های فرصت طلب بیمارستانی است. اشیریشیا کلای معمولاً سبب اسهال، سندروم اورمی همولیتیک، عفونت های فرصت طلب، عفونت های مجاری ادراری، عفونت های تنفسی، مننژیت نوزادان، بیماری های ریوی در افراد دیابتی و سپسیس می گردد. باکتری اشیریشیا کلای به دلیل بدست آوردن پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتاماز نسبت به پنی سیلین ها مقاوم است. باکتری سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است. به جز مواقعی که در حضور نیترات رشد می کند و آن را به نیتريت احیا می نماید، در سایر موارد هوازی اجباری می باشد. این باکتری در آب و خاک و سبزیجات یافت شده و در تجزیه مواد آلی نقش

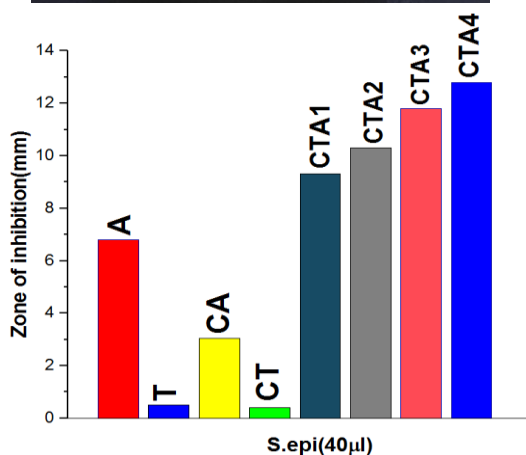
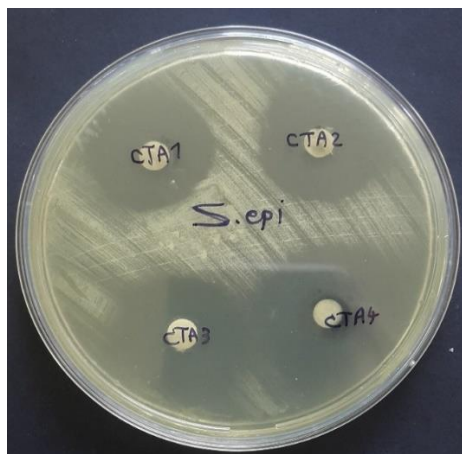
دارد.

حدود ۹۰ درصد سویه های سودوموناس آئروژینوزا سم اگزوتوکسین را ترشح می کنند که سبب متوقف کردن سنتز پروتئین و کشتن سلول ها به واسطه غیرفعال کردن فاکتور طولی سازی می شود. بیماری های عفونی ناشی از این باکتری عبارتند از: عفونت های چشم، عفونت های پوست و بافت نرم، عفونت های استخوان و مفاصل، عفونت های سیستم اعصاب مرکزی، عفونت های گوش، عفونت های مجاری گوارشی، اندوکاردیت عفونی، عفونت های مجاری تنفسی و عفونت های مجاری ادراری. استافیلوکوک اپیدرمیدیس یک باکتری گرم مثبت از خانواده استافیلوکوک ها است. بیش از ۲۰ گونه استافیلوکوک وجود دارد که تنها سه گونه از آنها با بیماری های انسانی مرتبط هستند: استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس. استافیلوکوک اپیدرمیدیس بر روی تمام سطح پوست انسان وجود دارد و یکی از شایع ترین گونه های آلوده کننده محیط ها و آزمایشات تجربی است. بیشتر بیماری های ناشی از این باکتری عفونت هایی است که در اثر تجهیزات مصنوعی نظیر دریچه قلب، پروتز لگن، باتری قلب، پیوند رگ یا ادوات داخل رگی ایجاد می شود. همچنین این باکتری موجب اندوکاردیت و عفونت های ادراری نیز می شود [۵۹]. شکل ۶ نتایج آزمایش فعالیت آنتی باکتریال نانوساختارهای مختلف سنتز شده در این پژوهش را به روش دیسکی روی سه نوع باکتری اشیریشیا کلای، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوک اپیدرمیدیس در حجم کلنی ۱۰۰ µl نشان می دهد. اشکال ۶(a-c) تصاویر پلیت های آزمایش دیسکی را برای چهار هیبرید سه گانه ساخته شده در غلظت های مختلف نقره، نشان می دهند که در آن ها هاله عدم رشد به وضوح قابل مشاهده است. در کنار این تصاویر نمودارهای ستونی اندازه هاله عدم رشد بر حسب mm برای تمام نانوساختارهای سنتز شده اعم از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نقره تنها، هیبریدهای دو گانه و هیبریدهای سه گانه نشان داده شده اند.



شکل ۶: نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال نانوساختارها علیه، (a) اشریشیا کلای (۱۰۰ μm)، (b) سودوموناس آئروژینوزا (۱۰۰ μm) و (c) استافیلوکوک اپیدرمیدیس (۱۰۰ μm)

استافیلوکوک اپیدرمیدیس در حجم کلنی ۴۰ μl نشان می‌دهد. در این شکل بوضوح دیده می‌شود که با کاهش حجم کلنی‌های باکتری از ۱۰۰ μl به ۴۰ μl (با شکل ۶C مقایسه کنید) منطقه مهار افزایش شدیدی یافته است. در این حجم از کلنی‌های باکتری، هر چهار هیبرید سه‌گانه ساخته شده فعالیت آنتی‌باکتریال چشمگیری از خود نشان می‌دهند.



شکل ۷: نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال نانوساختارها علیه استافیلوکوک اپیدرمیدیس (۱۰۰ μl).

گرچه افزایش منطقه مهار با کاهش حجم کلنی‌های باکتری مورد انتظار است، ضریب افزایش اندازه منطقه مهار بسیار بیشتر از ضریب کاهش حجم کلنی‌های باکتری است که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌باکتریال مناسب هیبریدهای سه‌گانه ساخته شده در این پژوهش است.

با توجه به این شکل می‌توان گفت که نانوساختارهای هیبریدی سه‌گانه فعالیت آنتی‌باکتریال بهتری را در مقایسه با هیبریدهای دوگانه و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نقره تنها، در برابر تمام باکتری‌های مورد بررسی از خود نشان می‌دهند. فعالیت آنتی‌باکتریال هیبرید سه‌گانه CTA4 از تمام نمونه‌های دیگر بیشتر است و مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت نقره در ساخت هیبرید سه‌گانه خاصیت آنتی‌باکتریال آنها افزایش می‌یابد و روند زیر در افزایش خاصیت آنتی‌باکتریال انواع هیبریدهای سه‌گانه به چشم می‌خورد: CTA4 > CTA3 > CTA2 > CTA1. در بین سه باکتری مورد بررسی نانوساختارهای سنتز شده بیشترین خاصیت آنتی‌باکتریال را در برابر باکتری اشیریشیا کلای از خود نشان می‌دهند. اندازه ناحیه عدم رشد باکتری اشیریشیا کلای در حجم ۱۰۰ μl از باکتری در حضور هیبریدهای سه‌گانه CTA1، CTA2، CTA3 و CTA4 به ترتیب برابر ۱/۵، ۱/۸، ۳/۱ و ۳/۸ بدست آمد. نانوذرات مورد مطالعه، روی باکتری گرم منفی اشیریشیا کلای اثر آنتی‌باکتریال بیشتری را در مقایسه با باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا از خود نشان می‌دهند که دلیل آن از نظر باکتری‌شناسی به مقاوم بودن باکتری سودوموناس در برابر عوامل ضد میکروبی برمی‌گردد. همچنین در مقایسه بین باکتری گرم منفی اشیریشیا کلای و گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمیدیس نانوساختارهای سنتز شده روی باکتری گرم منفی اشیریشیا کلای تاثیر بیشتری دارند که نتیجه‌ای مورد انتظار است، زیرا ساختار دیواره سلولی باکتری استافیلوکوک مقاوم‌تر است و دارای لایه‌های بیشتری از پپتیدوگلیکال می‌باشد. از طرف دیگر باکتری اشیریشیا کلای دارای یک غشاء پری پلاسمیک بیرونی بسیار نازک و فاقد تیکوئیک اسید است که به نانوذرات اجازه می‌دهد که به آسانی به داخل دیواره سلول نفوذ کرده و باکتری را بکشند [۶۰].

شکل ۷ نتایج آزمایش فعالیت آنتی‌باکتریال نانوساختارهای مختلف سنتز شده را به روش دیسکی روی باکتری

جدول ۴: نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال نانوساختارهای هیبریدی ارائه شده در برخی از مقالات موجود.

ردیف	نام مواد آنتی‌باکتریال	نوع باکتری	اندازه ناحیه عدم رشد (mm)	مرجع
۱	Ag	اشریشیا کلای	۴/۳	[38]
	MWCNTs-Ag	اشریشیا کلای	۳/۵	
	GO-Ag	اشریشیا کلای	۲/۵	
۲	Ag@CNTs	اشریشیا کلای	۶/۸	[61]
	Ag/CNTs	اشریشیا کلای	۳/۵	
	Ag/Active carbon	اشریشیا کلای	۳	
	CNTs	اشریشیا کلای	بدون نتیجه	
۳	Ag-TiO ₂ nanotubes	استافیلوکوک اورئوس	۸	[62]
		اشریشیا کلای	۸	
۴	MgO/Ag-TiO ₂	اشریشیا کلای	۲۰ ^a	[63]
		باسیلوس سوبتیلیس	۱۴ ^a	
۵	Ag/TiO ₂ /bentonite	استافیلوکوک اورئوس	۱۰	[60]
		اشریشیا کلای	۱۵	
	Ag	استافیلوکوک اورئوس	۱۲	
		اشریشیا کلای	۸	

a: صرفاً قطر هاله بعنوان اندازه ناحیه عدم رشد لحاظ شده است.

خود نشان داد که با توجه به فقدان تحریک نوری نتیجه‌ای مورد انتظار است. نانوذرات نقره کلوییدی ناحیه مهارکنندگی بیشتری را نسبت به نانوساختارهای هیبریدی CA و CT در مقابل تمام باکتری‌ها نشان دادند. دلیل این امر می‌تواند میزان نشست کم نقره بر بدنه نانولوله در هیبرید CA در مقایسه با نمونه نانوذرات نقره خالص باشد.

در هیبریدهای سه‌گانه نیز به دلیل تاثیرات هم‌افزاینده نانولوله‌های کربنی، نانوذرات نقره و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و افزایش مساحت سطحی در اثر پخش شدن نانوذرات روی بدنه نانولوله‌ها، ناحیه مهارشدگی نسبت به هیبریدهای دوگانه و نانوذرات تنها بسیار بیشتر است. درباره مکانیسم فعالیت آنتی‌باکتریال هیبرید سه‌گانه سنتز شده در این پژوهش به تفصیل در مطالب آتی بحث می‌کنیم. جدول ۴ نتایج اندازه ناحیه عدم رشد در تعدادی از نانوساختارهای هیبریدی سنتز شده در گزارشات موجود را خلاصه کرده است که امکان مقایسه با نتیجه کار ما را فراهم می‌سازد. در این جدول نتایج گزارشاتی که از روش پخش دیسکی برای تعیین ناحیه عدم رشد استفاده کرده‌اند، ارائه شده است.

نمودار ستونی در این شکل اندازه هاله عدم رشد را بر حسب mm برای تمام نانوساختارهای سنتز شده در حجم ۴۰ μl از باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس، نشان می‌دهد. اندازه ناحیه عدم رشد باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس در حجم ۴۰ μl از باکتری در حضور هیبریدهای سه‌گانه CTA1، CTA2، CTA3 و CTA4 به ترتیب برابر ۹/۳، ۱۰/۳، ۱۱/۸ و ۱۳ mm بدست آمد. همچنان دیده می‌شود که نانوساختارهای هیبریدی سه‌گانه فعالیت آنتی‌باکتریال بهتری را در مقایسه با هیبریدهای دوگانه و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نقره تنها در برابر باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس از خود نشان می‌دهند که در تطابق با روند مشاهده شده در حجم بیشتر باکتری (شکل ۶) است.

بر اساس آزمایشات ما نانولوله‌های کربنی بر روی هیچ کدام از باکتری‌های مورد مطالعه تاثیر آنتی‌باکتریال نداشته‌اند. همچنین از آنجایی که آزمایشات در غیاب نور انجام شد نانوذرات تیتانیا نیز فعالیت آنتی‌باکتریال اندکی را نشان دادند. هیبرید دوگانه CT نیز فعالیت آنتی‌باکتریال بسیار کمی از

مشاهدات ما MIC و MBC نانوساختار هیبریدی CTA4 علیه باکتری اشیریشیا کلای به ترتیب برابر $625 \mu\text{g/ml}$ و $1250 \mu\text{g/ml}$ است. همچنین MIC و MBC نانوساختار هیبریدی CTA4 علیه باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس به ترتیب برابر $1250 \mu\text{g/ml}$ و $2500 \mu\text{g/ml}$ بدست آمد. این نتیجه نیز در تطابق با نتایج حاصل از روش پخش دیسکی نشان می‌دهد که باکتری گرم منفی اشیریشیا کلای در مقایسه با گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمیدیس در برابر هیبرید سه گانه سنتز شده در پژوهش ما حساس تر است.

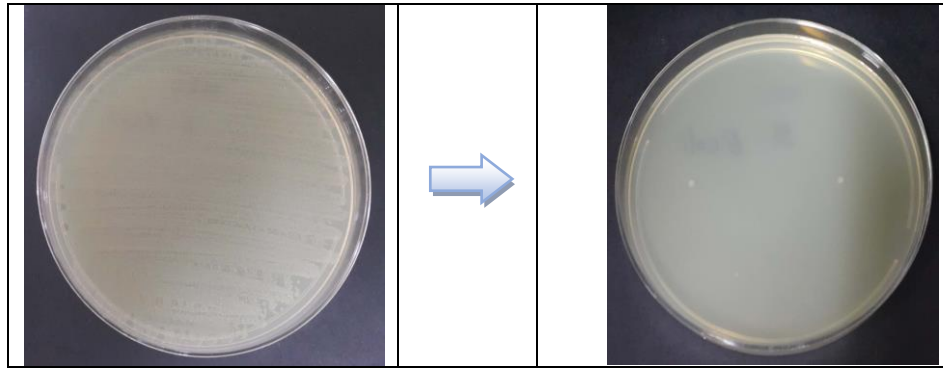
۳-۶- مکانیسم فعالیت آنتی باکتریال

فعالیت آنتی باکتریال نانو هیبرید ساخته شده در این پژوهش به نقش کلیدی نانوذرات نقره و اثرات هم افزاینده نانوذرات تیتانیا و نانولوله‌های کربنی قابل استناد است. در حالت کلی فلزات نجیب از قبیل نقره و طلا به خاطر اندرکنش‌های شیمیایی روی باکتری‌ها از ویژگی آنتی باکتریال خوبی برخوردارند. این فلزات در اندازه‌های نانومتری به دلیل نسبت سطح به حجم بزرگ و افزایش واکنش پذیری شیمیایی، اثر آنتی بیوتیک موثرتر و اطمینان بخش تری دارند. اگرچه مکانیسم آنتی باکتریال نانوذرات نقره بوسیله فرضیه‌های متعددی شرح داده شده است همچنان مکانیسم عمل آن‌ها بخوبی فهم نشده و مورد بحث و تبادل نظر در مجامع علمی است. به نظر می‌رسد تاثیر شیمیایی اصلی نقره روی سلول‌های زنده به قابلیت چسبندگی قوی آنها به غشاهای سلول‌ها مربوط است. این نانوذرات بسادگی با سطح سلول‌ها اندرکنش کرده و یک اتصال خوب را برقرار و روی سطح باکتری‌ها تجمع پیدا می‌کنند. فعالیت نانوذرات بساختار و محتوای آمینواسیدها و کربوهیدرات‌های غشاء سلولی بستگی دارد.

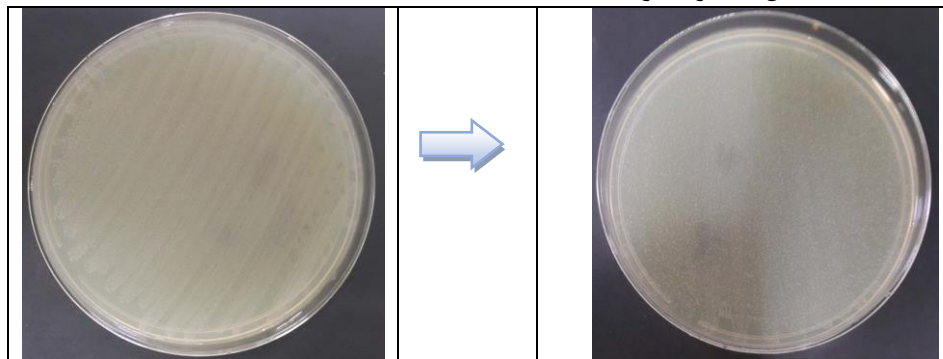
گزارشاتی در زمینه نانوساختارهای هیبریدی شامل Ag وجود دارد که از روشی غیر از روش پخش دیسکی برای تعیین منطقه مهار باکتری استفاده کرده‌اند یا اینکه آزمایش آنتی باکتریال را در حضور نور مرئی یا نور خورشید انجام داده‌اند که در اینجا بدلیل تفاوت با نحوه کار ما ذکر نشده‌اند (به عنوان مثال مرجع ۴۳ را ملاحظه کنید). نکته دیگری که ذکر آن در اینجا لازم است، تفاوت نحوه گزارش اندازه ناحیه عدم رشد در مقالات است. بعضی مقالات صرفاً قطر هاله دور دیسک را به عنوان اندازه ناحیه عدم رشد ذکر کرده‌اند که در جدول مشخص شده‌اند. در حالیکه در کار ما نصف تفاضل قطر هاله و قطر دیسک بلانک به عنوان ناحیه عدم رشد گزارش شده است. چنانچه فقط قطر هاله را به عنوان اندازه ناحیه مهار در نظر بگیریم اندازه ناحیه عدم رشد باکتری اشیریشا کلای در حجم $100 \mu\text{l}$ از باکتری در حضور هیبریدهای سه گانه CTA1، CTA2، CTA3 و CTA4 به ترتیب برابر $9/4$ ، 12 ، $12/5$ و 14 mm بدست می‌آید. همچنین به این روش اندازه ناحیه عدم رشد باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس در حجم $40 \mu\text{l}$ از باکتری در حضور هیبریدهای سه گانه CTA1، CTA2، CTA3 و CTA4 به ترتیب برابر 25 ، 27 ، 30 و 32 mm تعیین می‌شود.

۳-۵-۲- تعیین MIC و MBC

مشاهده شد که در روش پخش دیسکی خاصیت آنتی باکتریال نانوساختار هیبریدی CTA4 از دیگر نمونه‌ها بیشتر بود. از این رو به بررسی حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشنده این نانوساختار هیبریدی در برابر باکتری گرم منفی اشیریشیا کلای و گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمیدیس پرداختیم. شکل‌های ۸ و ۹ تصاویر مربوط به آزمایش تعیین MIC و MBC نانوساختار CTA4 را نشان می‌دهد. بر اساس

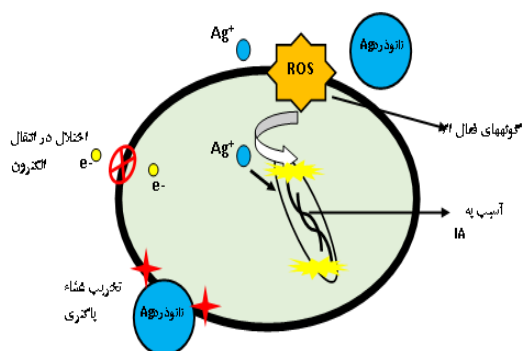


شکل ۸: باکتری اشیریشیا کلای، (a) MIC=625 $\mu\text{g/ml}$ و (b) MBC=1250 $\mu\text{g/ml}$.



شکل ۹: باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس، (a) MIC=1250 $\mu\text{g/ml}$ و (b) MBC=2500 $\mu\text{g/ml}$.

دیواره افزایش یافت که مرگ سلولی را در پی داشت. غیر از مکانیسم تماس کشنده مکانیسم های دیگری نیز در خصوص فعالیت آنتی باکتریال نقره پیشنهاد شده است. شکل ۱۰ طرحواره این مکانیسم ها را نشان می دهد.



شکل ۱۰: طرحواره مکانیسم فعالیت آنتی باکتریال نانو ذرات نقره در ساختار هیبرییدی.

علاوه بر این اندازه نانومتری ذرات فلزی توانایی اتصال و چسبیدن آنها به غشاء سلولی را افزایش می دهد. یک مکانیسم آنتی باکتریال مهم نانوذرات نقره صدمه مستقیم به غشاء سلولی ناشی از واکنش شیمیایی نقره با دیواره است که منجر به تغییر ساختار غشاء سلولی و افزایش عبوردهی از میان دیواره سلول می شود. افزایش عبوردهی منجر به تراپرد کنترل نشده از میان غشا می شود که منجر به ایجاد بی نظمی و آثار سمی روی ساختار سلول و غیرفعال سازی میکروبی می شود. این مکانیسم به مکانیسم تماس کشنده موسوم است. محققین مشاهده کردند که در پی تماس فیزیکی نانوذرات نقره با باکتری اشیریشیا کلای چاله هایی در دیواره سلولی باکتری شکل گرفت که منجر به تجمع نانوذرات نقره روی غشاء سلولی و نفوذ به داخل غشاء سلولی شد. متعاقباً عبوردهی

سطحی برخوردارند که می‌توانند چرخه انتقال الکترون باکتری را مختل کنند. وقتی نانوذره نقره در تماس با باکتری قرار می‌گیرد الکترون‌های تنفسی غشاء باکتری به نانوذره نقره و سپس به نانوذرات تیتانیا منتقل می‌شوند که منجر به از دست دادن مداوم الکترون توسط باکتری گردیده و مرگ آن را به دنبال دارد. این اختلال در انتقال الکترون تنفسی باکتری می‌تواند در حضور نانوذرات نقره‌ای که در ساختار هیبرید مستقیماً بدون واسطه نانوذرات تیتانیا به بدنه نانولوله چسبیده‌اند نیز اتفاق بیفتد زیرا نانولوله کربنی خود بعنوان چاه الکترون عمل می‌کند و الکترون تنفسی بدام افتاده در نانوذره نقره می‌تواند مستقیماً توسط نانولوله پذیرفته شود. از آنجایی که نانوله‌های کربنی از مساحت سطحی بسیار بالایی برخوردارند حضور آنها در ساختار هیبریدهای سه گانه CTA از منظر ایجاد بستر مناسب برای پخش شدن ذرات نقره و تیتانیا و در نتیجه افزایش سطح در معرض و نیز کوچک نگه داشتن اندازه ذرات از طریق ایجاد ممانعت فضایی برای رشد آنها اثرات هم افزاینده در بهبود فعالیت آنتی‌باکتریال ساختار هیبریدی دارد [۲۷].

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، ابتدا نانوساختار هیبریدی دوگانه MWCNTs-TiO₂ با استفاده از پیش ماده بوتوکسید تیتانیوم و نانولوله‌های کربنی چنددیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل به روش سل-ژل ساخته شد. سپس هیبرید سه گانه MWCNTs-TiO₂-Ag به روش شیمیایی نرم از ترکیب محلول آبی نیترات نقره در چهار غلظت مختلف با هیبرید دوگانه MWCNTs-TiO₂ ساخته شد. هیبریدهای سه گانه به ترتیب افزایش غلظت نقره CTA1، CTA2، CTA3 و CTA4 نامگذاری شدند. همچنین هیبرید دوگانه MWCNTs-Ag به روش احیاء شیمیایی و نانوذرات TiO₂ و Ag تنها به روش شیمیایی سنتز شدند. تمام نانومواد سنتز شده با آنالیزهای مختلف مشخصه‌یابی شده و فعالیت آنتی‌باکتریال آن‌ها علیه باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلای و

یک مکانیسم ممکن دیگر در آسیب‌رسانی به غشاء، تولید رادیکال‌های اکسیژن یا تجزیه اجزاء غشاء در اثر اندرکنش با یون‌های نقره است که منجر به مرگ سلولی می‌شود. مکانیسم دیگری که پیشنهاد شده است اندرکنش یون‌های Ag⁺ با زنجیره‌های DNA است که مانع تکثیر سلولی می‌شود. یون‌های نقره انتشار یافته از نانوذرات نقره با گروه‌های تیولی و بازهای فسفری آنزیم‌ها و DNA واکنش می‌دهند. این اندرکنش DNA را از حالت طبیعی خود خارج می‌کند که نهایتاً منجر به غیرفعال شدن سلول می‌شود. این مکانیسم به مکانیسم انتشار کشنده موسوم است. مکانیسم دیگری که می‌توان در اینجا به آن اشاره کرد ناشی از اثر هم افزاینده نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نقره در ساختار هیبریدی است. تیتانیا بدلیل فعالیت فتوکاتالستی عالی خود تحت تابش فرابنفش می‌تواند به سلول باکتری آسیب برساند. وقتی نانوذرات تیتانیا تحت تابش فرابنفش قرار می‌گیرند زوج‌های الکترون-حفره ایجاد شده می‌توانند روی سطح آن باعث ایجاد ROSهایی از قبیل رادیکال‌های آنیونی سوپراکسید (O₂⁻)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) شوند. این رادیکال‌ها روی سطح تیتانیا باعث واکنش‌هایی می‌شوند که غیرفعال شدن باکتری‌ها و اکسید شدن اغلب ترکیبات آلی را به دنبال دارد. این مکانیسم تحت تابش فرابنفش فعال است و در شرایط تاریکی که آزمایش ما انجام گرفت تاثیر کمی دارد. با این حال مکانیسم دیگری وجود دارد که در تاریکی فعال بوده و مبتنی بر پدیده تشدید پلاسمون سطحی جایگزیده (LSPR) در نانوذرات نقره متصل به نانوذرات تیتانیاست. در حالت کلی باکتری‌ها به تنفس غشایی به منظور دستیابی به انرژی لازم برای فرآیندهای داخل سلولی (رشد و بقا سلول) نیاز دارند. این فرآیندها نیاز به پذیرنده‌های الکترونی خارج سلولی برای تکمیل تراپد الکترون در زنجیره تنفسی دارند. اگر انتقال الکترون مختل شود باکتری انرژی از دست می‌دهد که منجر به مرگ آن می‌شود. در ساختار هیبریدی، نانوذرات نقره چسبیده به سطح نانوذرات نیمرسانای تیتانیا، از پلاسمون‌های

غیاب نور برخوردار است، لذا می‌توان این هیبرید را به عنوان یک انتخاب مناسب برای کاربردهای آنتی‌باکتریال در نظر گرفت. افزایش فعالیت آنتی‌باکتریال نانوساختارهای هیبریدی سه‌گانه به ویژه CTA4 می‌تواند به دلیل اندازه کوچک نانوساختارهای هیبریدی، افزایش مساحت سطحی، پخش شدگی ذرات تیتانیا و نقره روی بدنه نانولوله‌ها و تاثیرات هم افزاینده اجزاء در ساختار هیبریدی باشد.

مراجع

- [1] S. Sharma, S. Naskar, K. Kuotsu, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **51**, 2019, 708.
- [2] M. Ionita, L.E. Crica, S.I. Voicu, S. Dinescu, F. Miculescu, M. Costache, H. Iovu, *Carbohydrate Polymers*, **183**, 2018, 50.
- [3] L. Wang, R.J. Mu, L. Lin, X. Chen, S. Lin, Q. Ye, J. Pang, *International Journal of Biological Macromolecules*, **133**, 2019, 693.
- [4] V.R. Raphey, T.K. Henna, K.P. Nivitha, P. Mufeedha, C. Sabu, K. Pramod, *Materials Science & Engineering C*, **100**, 2019, 616.
- [5] A. Kassem, G.M. Ayoub, L. Malaeb, *Science of the Total Environment*, **668**, 2019, 566.
- [6] S. Liu, T.H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, *ACS Nano*, **5**, 2011, 6971.
- [7] H. Chen, B. Wang, D. Gao, M. Guan, L. Zheng, H. Ouyang, *Small*, **9**, 2013, 2735.
- [8] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, *Langmuir*, **24**, 2008, 6409.
- [9] T. Rajh, N.M. Dimitrijevic, M. Bissonnette, T. Koritarov, V. Konda, *Chem. Rev.*, **114**, 2014, 10177.
- [10] S. Ferraris, S. Sprian, *Mater. Sci. Eng. C*, **61**, 2015, 965.
- [11] H.A.M. Faria, A.A.A. de Queiroz, *Mater. Sci. Eng. C*, **56**, 2015, 260.
- [12] K. Singh, S. Harish, J. Archana, M. Navaneethan, M. Shimomura, Y. Hayakawa, *Applied Surface Science*, **489**, 2019, 883.
- [13] P. Tucci, G. Porta, M. Agostini, D. Dinsdale, I. Iavicoli, K. Cain, *Cell Death Dis.*, **4**, 2013, e549.
- [14] M. Marandi, P. Talebi, L. Moradi, *Optical Materials*, **94**, 2019, 224.
- [15] M.A. Vargas, J.E. Paez, *Journal of Non-crystalline Solids*, **459**, 2017, 192.
- [16] M.R. Al-Mamun, S. Kader, M.S. Islam, M.Z.H. Khan, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **7**, 2019, 103248.
- [17] M.H. Li, M.E. Noriega-Trevino, N. Nino-Martinez, C. Marambio-Jones, J.W. Wang, R. Damoiseaux, F. Ruiz, E.M.V. Hoek, *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 2011, 8989.
- [18] J. Prakasha, S. Sun, H.C. Swart, R.K. Gupta, *Applied Materials Today*, **11**, 2018, 82.
- [19] K.S. Siddiqi, A. Husen, R.A.K. Rao, *Journal of Nanobiotechnology*, **16**, 2018, 14.
- [20] Y. Ren, H. Yang, T. Wang, C. Wang, *Materials Chemistry and Physics*, **235**, 2019, 121746.
- [21] P. Li, J. Li, C. Wu, Q. Wu, J. Li, *Nanotechnology*, **16**, 2005, 1912.
- [22] M. Catauro, M.G. Raucchi, F.D. De Gaetano, A. Marotta, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15**, 2004, 831.
- [23] J.H. Crabtree, R.J. Burchette, R.A. Siddiqi, I.T. Huen, L.L. Handott, A. Fishman, *Perit. Dial. Int.*, **23**, 2003, 368.

سودوموناس آئروژینوزا و گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمیدیس مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانوساختارهای هیبریدی سه‌گانه، نانولوله‌های کربنی با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نقره احاطه شده و آرایش یافته‌اند. نتایج پراش پرتو ایکس، بیانگر حضور همزمان قله‌های اصلی نانولوله‌های کربنی و فاز آتاز TiO₂ در هیبریدهای سه‌گانه است. گرچه قله‌های پراش نانوذرات Ag به دلیل میزان کم نانوذرات نقره مشاهده نشد، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و نقشه پرتو ایکس توزیع عناصر حضور عناصر کربن، تیتانیوم و نقره را در هیبرید سه‌گانه تایید کرد. مشاهده شد که با افزایش غلظت محلول آبی نترات نقره در فرآیند ساخت، میزان نقره نشست کرده در ساختار هیبرید سه‌گانه افزایش می‌یابد. آزمایشات آنتی‌باکتریال نشان دادند که نانوساختارهای هیبریدی سه‌گانه از فعالیت آنتی‌باکتریال بسیار بهتری در مقایسه با هیبریدهای دوگانه و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نقره تنها در برابر تمام باکتری‌های مورد بررسی برخوردارند. فعالیت آنتی‌باکتریال هیبرید سه‌گانه CTA4 از تمام نمونه‌های دیگر بیشتر است و مشاهده شد که با افزایش غلظت نقره در هیبرید سه‌گانه خاصیت آنتی‌باکتریال آنها با روند CTA1 > CTA2 > CTA3 > CTA4 افزایش می‌یابد. در بین سه باکتری مورد بررسی نانوساختارهای سنتز شده بیشترین خاصیت آنتی‌باکتریال را در برابر باکتری اشیریشیا کلای از خود نشان دادند. حداقل غلظت مهار و حداقل غلظت کشنده نانوساختار هیبریدی CTA4 علیه باکتری اشیریشیا کلای به ترتیب برابر ۶۲۵ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و علیه باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس به ترتیب برابر ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بست آمد که نشان داد این نانوساختار هیبریدی اثرگذاری بیشتری بر روی باکتری اشیریشیا کلای دارد، همچنانکه از آزمایش تعیین منطقه مهار به نتیجه مشابهی رسیدیم. در جمع‌بندی می‌توان گفت که هیبرید سه‌گانه ساخته شده در این پژوهش از خاصیت آنتی‌باکتریال بسیار خوبی در برابر باکتری‌های مذکور در

- [45] E.S. Aazam, *Ceram. Int.*, **40**, 2014, 6705.
- [46] Z.F. Jun, C.M. Liang, O.W. Chun, *New Carbos Materials*, **35**, 2010, 348.
- [47] Y. Koo, G. Littlejohn, B. Collins, Y. Yun, V.N. Shanov, M. Schulz, D. Pai, J. Sankar, *Composites: Part B*, **57**, 2014, 105.
- [48] N.N. Chang, X.M. Ou, G.M. Zeng, J.L. Gong, C.H. Deng, Y. Jiang, J. Liang, G.Q. Yuan, H.Y. Liu, X. He, *Applied Surface Science*, **343**, 2015, 1.
- [49] H.R. Pourzamani, Y. Hajizadeh, S. Fadaei, *Int. J. Env. Health Eng.*, **4**, 2015, 29.
- [50] S. Mallakpour, M. Dinari, V. Behranvand, *J. Mater. Sci.*, **49**, 2014, 7004.
- [51] A.A. Ashkaran, M. Fakhari, H. Hamidinezhad, H. Haddadi, M.R. Nourani, *Journal of Materials Research and Technology*, **4**, 2014, 126.
- [52] S. Sankal, C. Kaynak, *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, **32**, 2012, 75.
- [53] R. Yudianti, H. Onggo, Sudirman, Y. Saito, T. Iwata, J. Azuma, *The Open Materials Science Journal*, **5**, 2011, 242.
- [54] L.C. Sim, K.H. Leong, S. Ibrahim, P. Saravanan, *Journal of Materials Chemistry A*, **2**, 2014, 5315.
- [55] M.A. Atieh, O.Y. Bakather, B. Al-Tawbini, A.A. Bukhari, F.A. Abuilawi, M.B. Fettouhi, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2010**, 2010.
- [56] L. Gharibshahi, E. Saion, E. Gharibshahi, A.H. Shaari, K.A. Matori, *Materials*, **10**, 2017, 402.
- [57] G.I.N. Waterhouse, G.A. Bowmaker, J.B. Metson, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **3**, 2001, 3838.
- [58] O. Pawar, N. Deshpande, S. Dagade, S. Waghmode, P.N. Joshi, *Journal of Experimental Nanoscience*, **2015**, 2015, 1.
- [59] T.S. Walker, "Microbiology", Saunders Company, 1998.
- [60] B. Krishnan, S. Mahalingam, *Advanced Powder Technology*, **28**, 2017, 2265.
- [61] L. Xia, M. Xu, G. Cheng, L. Yang, Y. Guo, D. Li, D. Fang, Q. Zhang, H. Liu, *Carbon*, **130**, 2018, 775.
- [62] M.T.A. Aydın, H.L. Hosgun, A. Dede, K. Güven, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **205**, 2018, 503.
- [63] P. Parvathi V.T. Jaiakumar, M. Umadevi, J. Mayandi, G.V. Sathe, *Materials Letters*, **184**, 2016, 82.
- [24] G. Yang, H. Yin, W. Liu, Y. Yang, Q. Zou, L. Luo, H. Li, Y. Huo, H. Li, *Applied Catalysis B:Environmental*, **224**, 2018, 175.
- [25] M. Kooti, S. Gharineh, M. Mehrkhah, A. Shaker, H. Motamedi, *Chemical Engineering Journal*, **259**, 2015, 34.
- [26] N. Rangelova, L. Aleksandrov, T. Angelova, N. Georgieva, R. Muller, *Carbohydrate Polymers*, **101**, 2014, 1166.
- [27] D. Eder, *Chem. Rev.*, **110**, 2010, 1348.
- [28] L.F. Shi, J.Z. Liu, J.H. Yang, L.F. Cai, L.Y. Shi, F.X. Qiu, *New Carbon Materials*, **32**, 2017 344.
- [29] S.M. Ghaseminezhad, S.A. Shojaosadati, *Carbohydrate polymers*, **144**, 2016, 454.
- [30] N. Abbas, G.N. shao, M.S. Haider, S.M. Imran, S.S. Park, S.J. Jeon, H.T. Kim, *Material Science and Engineering C*, **68**, 2016, 780.
- [31] B. Gao, G. Chen, G. Puma, *Appl. Catal. B*, **89**, 2009, 503.
- [32] Z. Li, B. Gao, G.Z. Chen, R. Mokaya, S. Sotiropoulos, P.G. Li, *Appl. Catal. B*, **110**, 2011, 50.
- [33] L. Tian, L.Ye, K. Deng, L. Zan, *Journal of Solid State Chemistry*, **184**, 2011, 1465.
- [34] D. Chaudhary, N. Khare, V.D. Vanker, *Ceramics International*, **42**, 2016, 12861.
- [35] D. Chaudhary, S. Singh, V.D. Vankar, N. Khare, *International Journal of Hydrogen Energy*, **42**, 2017, 7826.
- [36] Y.J. Xu, Y.B. Zhuang, X.Z. Fu, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 2010, 2669.
- [37] A.A. Ashkarran, M. Fakhari, M. Mahmoudi, *RSC Adv.*, **3**, 2013, 18529.
- [38] J.D. Kim, H.C. Yun., G.C. Kim, C.W. Lee, H.H. Choi, *Applied Surface Science*, **283**, 2013, 227.
- [39] X. Liu, L. Yu, F. Liu, L. Sheng, K. An, H. Chen, X. Zhao, *Journal of Materials Science*, **47**, 2012, 6086.
- [40] J.H. Jung, J.B. Hwang, J.E. Lee, G.N. Bae, *Langmuir*, **27**, 2011, 10256.
- [41] Q. Zhao, S. Tan, M. Xie, Y. Liu, J. Yi, *Journal of Alloys and compounds*, **737**, 2018, 31.
- [42] Y. Feng, H.O. Yuan, *J. Mater. Sci.*, **39**, 2004, 3241.
- [43] M.M. Mohamed, G. Osman, K.S. Khairou, *Environmental Chemical Engineering*, **3**, 2015, 1847.
- [44] F.J. Zhang, M.L. Chen, W.C. Oh, *Compos. Sci. Technol.*, **71**, 2011, 658.