بررسی تاثیر میزان نقره نفوذی بر روی خاصیت ضد میکروبی سطح لعاب

فائزه مهدی زاده[1*]، علی نعمتی[2]، محمد رضا فاضلی[3]

۱- کارشناس ارشد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استاد، دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۳- استاد، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، تهران،ایران

* faezeh.mehdizadeh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۱/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۰۱)

چکیده:

در این تحقیق تاثیر میزان نقره بر روی فعالیت ضدمیکروبی سطح لعاب، به وسیله اعمال پوششی حاوی مقادیر مختلفی از نیترات نقره از ۱۰wt% تا ۵۰ wt % بر روی سطح لعاب بررسی شده است. نتایج بررسی‌ها نشان دهنده این مطلب است که با افزایش میزان نیترات نقره در پوشش، سطح لعاب حاوی مقادیر بیشتری یون نقره می‌باشد. با بررسی فعالیت ضد میکروبی سطح لعاب، مشخص شد که سطح لعاب، با افزایش میزان نقره در مدت زمانی کوتاه (بعد از ۲ ساعت) خاصیت ضد میکروبی قوی را در برابر باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس نشان می‌هد. با استفاده از SEM, XRF حضور نقره و میزان نقره در سطح لعاب بعد از نفوذ مورد تائید قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی:

ضدمیکروبی، نقره، لعاب، نفوذ

۱- مقدمه

لعاب به عنوان یک پوشش از چندین هزار سال پیش برای پوشاندن سطح سرامیک‌ها استفاده شده است. این پوشش به صورت یک لایه نازک سطح سرامیک را می‌پوشاند و علاوه بر این که باعث زیبایی محصولات سرامیکی می‌شود پایداری شیمیایی آن‌ها را نیز افزایش می‌دهد. با وجود لعاب، سطح این محصولات جذب آب نداشته و دارای سطح صافی است که به راحتی قابل تمیز کردن است. از طرفی به خاطر وجود لعاب، سطح محصول کمتر دچار صدمه و یا آسیب خواهد شد. این محصولات در بخش‌های مختلفی مانند مصارف خانگی، هتل‌ها، بیمارستان‌ها و ... به طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. به همین جهت نیاز است که متناسب با محیط مورد مصرف، سطح لعاب ویژگی خاصی داشته باشد. در همین راستا محققین ساخت لعاب‌های با خواص فیزیکی و شیمیایی مختلفی مانند خاصیت ضد سایش، ضد خوردگی، ضد میکروبی و ... را آغاز کرده‌اند [۱-۲]. برای ساختن لعاب‌های آنتی باکتریال از فلزات مختلفی به عنوان عامل ضدمیکروبی استفاده شده است. از میان این فلزات، می‌توان به نقره، طلا، روی، جیوه اشاره کرد. اما نقره و ترکیبات آن به عنوان عامل ضد میکروبی قوی قادر به مقابله با میکروارگانیسم‌ها و مانعی برای رشد و تکثیر آن‌ها است، در زمینه‌های مختلف مورد استفاده قرارگرفته است [۳-۴].

چندین نظریه برای تشریح نحوه ممانعت یون نقره در برابر تکثیر باکتری‌ها پیشنهاد شده است. در میان این نظریات، بیان شده که

بار مثبت نقره یک عامل مهم برای خاصیت ضد میکروبی آن می‌باشد. زیرا یون‌های نقره با بار مثبت در اثر جاذبه الکترواستاتیکی جذب غشاء سلولی باکتری که دارای بار منفی است ، خواهند شد [۵ -۶]. از طرف دیگر یون‌های جذب شده به سطح سلول با گروه‌های SH آنزیم‌ها و پروتئین‌ها وارد واکنش شده و در نهایت منجر به غیر فعال شدن پروتئین‌ها و اختلال در عملکرد DNA می‌شوند [۷].

تمامی این پدیده‌ها باعث صدمات برگشت ناپذیر و یا حتی مرگ میکرو ارگانیسم‌ها خواهد شد. لعاب‌های آنتی باکتریال عمدتاً به وسیله ترکیب کردن مواد ضدمیکروبی با دوغاب لعاب و اعمال آن بر روی بدنه سرامیکی ایجاد شده‌اند. اما از معایب این روش این است که خاصیت ضد میکروبی لعاب متاثر از فرآیند پخت لعاب می‌باشد. بدین‌صورت که با توجه به اینکه دمای ذوب نقره در مقایسه با دمای پخت لعاب، پائین‌تر است، در حین فرآیند پخت لعاب، نقره به عنوان ماده ضد میکروبی در اثر دمای بالا در درون لعاب حل شده و یا حتی گاهی تبخیر خواهد شد. به علاوه وجود نقره در درون دوغاب لعاب باعث کاهش پایداری لعاب شده که نیاز است، لعاب مدت زمان طولانی‌تری را تحت حرارت قرار گیرد که این خود باعث کاهش بیشتر خاصیت ضد میکروبی لعاب خواهد شد. بر همین اساس در این مقاله از روش پوشش کلوئیدی برای نفوذ نقره بر روی سطح کاشی لعاب دار و ایجاد خاصیت ضد میکروبی بر روی سطح آن استفاده شده است.

هدف از استفاده از روش پوشش کلوئیدی، علاوه بر برطرف کردن معایب ذکر شده در بالا، ایجاد حداکثر خاصیت ضد میکروبی با حداقل میزان ماده ضد میکروبی بوده است. زیرا در صورت ترکیب ماده ضد میکروبی با دوغاب لعاب و اعمال آن بر روی بدنه، حجم زیادی از ماده ضدمیکروبی در لایه‌های زیرین لعاب (نزدیک بدنه) که تاثیری بر روی خاصیت ضدمیکروبی ندارد، قرار می‌گیرد. در صورتی‌که در روش پوشش‌دهی می‌توان این عیب را نیز مرتفع نمود.

روش‌های متعددی برای پوشش‌دهی بر روی لعاب وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به روش‌های سل- ژل، رسوب از فاز مایع و.. اشاره کرد. اما روش بکار گرفته شده علاوه بر این که روشی ساده‌تر و عملی‌تر نسبت به روش‌های ذکر شده است از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه‌تر می‌باشد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- آماده سازی زیر لایه

در این مقاله کاشی لعاب دار به عنوان زیر لایه انتخاب شده است. پس از تهیه دوغاب لعاب معمولی به روش متداول، دوغاب بر روی بدنه سرامیکی اعمال شده است. پس از خشک شدن لعاب در دمای $۱۰۰\pm۵\ ^{o}c$ نمونه‌ها در دمای $۱۰۳۰\pm۵\ ^{o}c$ به مدت ۴۵ دقیقه پخت می‌شوند. پس از این، نمونه‌ها به ابعاد $۴mm \times ۵۰ \times ۵۰$ برش زده شده و سطح آن‌ها توسط آب مقطر کاملا شسته و خشک می‌شود.

۲-۲- نفوذ عنصر نقره

برای نفوذ نقره بر روی سطح لعاب روش‌های مختلفی وجود دارد. اما از آنجائی‌که روش پوشش کلوئیدی، روشی ساده‌تر، کم هزینه و عملی‌تر برای نفوذ نقره است. در این مقاله از این روش برای نفوذ عنصر نقره استفاده شده است.

برای تهیه پوشش، نیترات نقره را به همراه اکسید روی، CMC (کربوکسی متیل سلولز)،گلیسیرین وآب به مدت ۱۰ دقیقه با هم مخلوط نموده تا یک پوشش کاملا هموژن حاصل شود و سپس بر روی سطح لعاب که از قبل تمیز شده اعمال می‌گردد. بعد از اعمال پوشش، نمونه‌ها در دمای $۱۰۰\pm۵^{o}c$ خشک شده و در حدود ۳۰ دقیقه دردمای $۶۰۰^{o}c$ تحت عملیات حرارتی قرار می‌گیرند. بعد از عملیات حرارتی، سطح نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو شده تا مواد زائد باقی مانده از پوشش بر روی سطح لعاب کاملا پاک شود. بعد از خشک شدن سطح لعاب، مراحل تهیه لعاب آنتی باکتریال به پایان می‌رسد.

در این تحقیق برای بررسی تاثیر میزان نقره بر روی خاصیت آنتی باکتریالی سطح لعاب، ۳ گروه نمونه با اعمال مقادیر مختلفی از ماده ضد میکروبی (نیترات نقره) در پوشش، تهیه شده است. به

جهت بررسی تاثیر میزان ماده ضد میکروبی بر روی خاصیت ضدمیکروبی سطح لعاب، در این روش تمامی مراحل تهیه در ۳ گروه نمونه یکسان در نظر گرفته شده است. اسامی ۳ گروه نمونه با توجه به میزان نیترات نقره در پوشش کلوئیدی با حروف (H, M, L) نام گذاری شده‌اند (جدول (۱)).

جدول (۱): دما و زمان عملیات حرارتی و میزان ماده ضد میکروبی ۳ گروه از نمونه‌ها

نمونه	دمای عملیات حرارتی(°C)	زمان عملیات حرارتی (min)	میزان ماده ضدمیکروبی
H	۶۰۰ °C	۳۰	٪۵۰
M	۶۰۰ °C	۳۰	٪۳۰
L	۶۰۰ °C	۳۰	٪۱۰

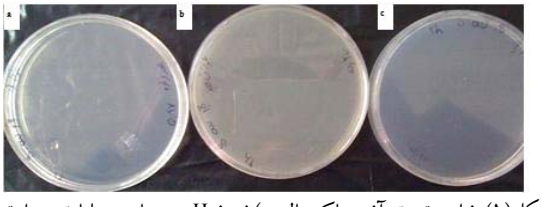
۲-۳- آزمون ضد میکروبی

ابتدا نمونه‌ها در درون اتوکلاو در دمای ۲۰۰°C به مدت ۲ ساعت استریل شده و کلونی‌های E.Coli و S.aureus بر روی محیط کشت در دمای ۳۷ °C برای مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. نمونه‌های استریل شده در درون پلیت‌های استریل قرار می‌گیرند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سرم فیزیولوژی و باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml به صورت قطره‌ای برروی سطح لعاب قرار می‌گیرد.

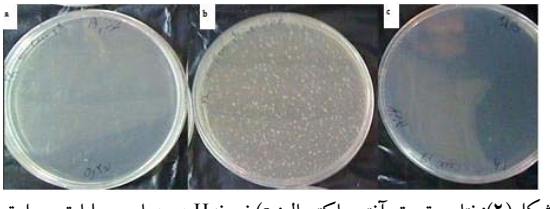
نمونه‌ها در دمای ۳۷ °C در طی مدت زمان‌های متفاوت ۱، ۲، ۳،.. ،۶ ساعت در درون انکوباتور قرار می‌گیرند. بعد از سپری شدن مدت زمان‌های قید شده ، قطره حاوی باکتری از روی سطح نمونه‌ها به وسیله ۵ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر (PBS) شسته می‌شود و در درون پلیت استریل ریخته می‌شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول شسته شده را در درون محیط کشت پخش نموده و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت در درون انکوباتور قرار داده می‌شود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد باکتری‌های زنده که در درون محیط کشت رشد کرده‌اند، شمارش می‌شود. برای هر گروه از نمونه‌ها و برای هر مدت زمان یک نمونه شاهد (نمونه‌ای که اثر ضد میکروبی ندارد) به جهت مقایسه روند رشد باکتری در نظر گرفته شده است.

۳- نتایج و بحث

برای یافتن دمای بهینه عملیات حرارتی، نمونه‌هارا در دمای ۸۰۰°C و ۶۰۰°C تحت عملیات حرارتی قرار داده می‌شود. با انجام تست ضد میکروبی در شرایط کاملا یکسان و بررسی نتایج حاصل از آن مشخص شده که علاوه بر این که نتایج دستخوش تغییر نشده، بلکه کیفیت سطحی لعاب نیز بااعمال دمای ۸۰۰°C کاهش یافته است. به همین جهت دمای ۶۰۰°C رابه عنوان دمای عملیات حرارتی بهینه انتخاب گردید. درشکل (۱و۲) نتایج تست میکروبی نمونه H را که در دو دمای مورد نظر عملیات حرارتی شده، به ترتیب در برابر دوباکتری S.aureus و E.coli نشان داده شده است. همان‌طور که در تصاویرکاملا واضح است نمونه H در برابر هر دو باکتری ودرهردو دمای عملیات حرارتی به خوبی عمل کرده ودرمقایسه با نمونه شاهد (b)۱و(b)۲تمامی میکروارگانیسم‌ها رااز بین برده است.



شکل(۱): نتایج تست آنتی باکتریال: a) نمونهH در دمای عملیات حرارتی ۶۰۰ °C، b) نمونه شاهد و c) نمونه H در دمای عملیات حرارتی ۸۰۰ °C در برابر باکتری استافیلوکوک اورئوس در غلظت 10^8 cfu/ml

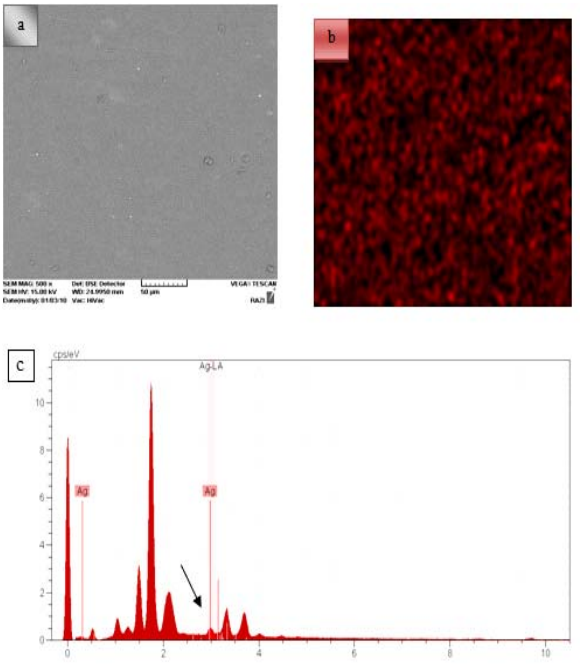


شکل(۲): نتایج تست آنتی باکتریال: a) نمونهH در دمای عملیات حرارتی ۶۰۰ °C، b) نمونه شاهد و c) نمونه H در دمای عملیات حرارتی ۸۰۰ °C در برابر باکتری اشرشیاکلی در غلظت 10^8 cfu/ml

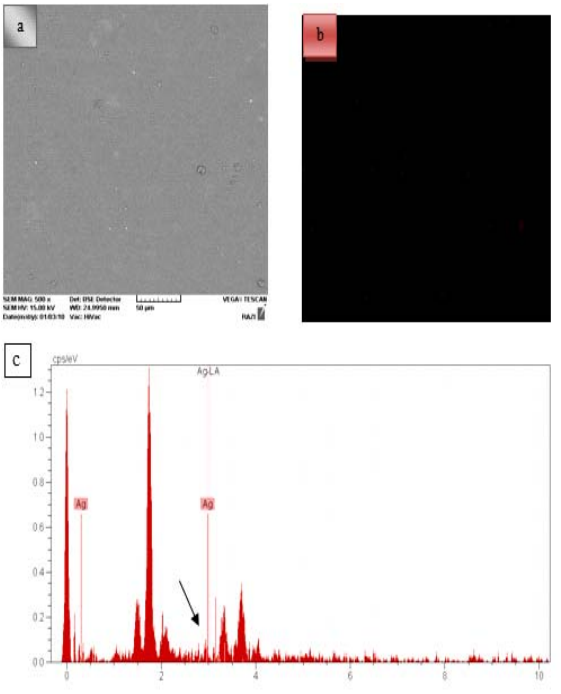
با اعمال پوشش بر روی سطح لعاب و عملیات حرارتی آن در

دمای ۶۰۰°C، این احتمال وجود دارد که یون نقره حاصل ازتجزیه نیترات نقره در درجه حرارت حدود ۵۰۰°C – ۳۰۰، با یون‌های موجود در لعاب مانند سدیم که با اکسیژن‌های غیر پل زن اتصال ضعیفی دارند، تبادل شود و در سطح لعاب نفوذ کند. با وجود یون روی در کنار یون نقره، این یون نقره است که با یون سدیم تبادل می‌کند زیرا نقره دمای ذوب پائین‌تری از روی داشته و نفوذ آن به سطح لعاب سریع‌تر صورت می‌گیرد. در ضمن انرژی آزاد برای تبادل بین سدیم و نقره در حدود 6KJ/equiv– است، در حالیکه این انرژی برای تبادل بین سدیم و روی در حدود ۲/۰۳ KJ/equiv می باشد، به همین جهت تبادل Na^{+}-Ag^{+} با انرژی کمتر و نفوذ سریع‌تر محتمل‌تر خواهد بود [۸].

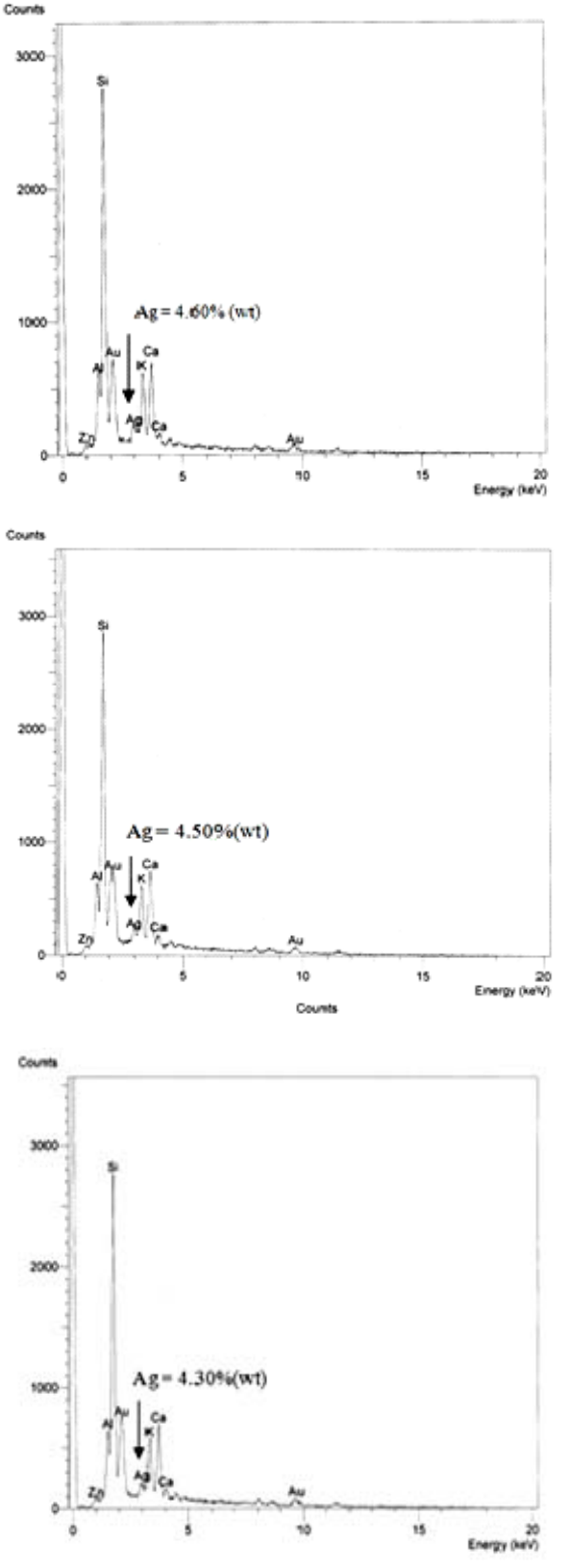
آنالیز SEM بر روی نمونه H که برای نفوذ نقره در دمای ۶۰۰°C به مدت ۳۰ دقیقه عملیات حرارتی شده و نمونه شاهد انجام شده است. در شکل (۳ و۴) تصویر EDAX وMAP به ترتیب از سطح نمونه H ونمونه شاهد نشان داده شده است. همان‌طور که در تصاویر مشخص است با توجه به نتایج آنالیز EDAX حضور نقره بر روی سطح نمونه H کاملا واضح است. زیرا پیک حاصل از حضور نقره بر روی سطح لعاب مشاهده شده شکل ۳(c) در صورتی که در نمونه شاهد، پیک واضحی مشاهده نمی‌شود شکل ۴(c). در تصاویر MAP نقاط قرمز رنگ که نشان دهنده حضور و توزیع نقره بر روی سطح نمونه است به طور کاملاً یکنواخت بر روی سطح لعاب توزیع شده است. در صورتی که این نقاط قرمز رنگ بر روی سطح نمونه شاهد که تحت نفوذ نقره قرار نگرفته، مشاهده نشده است. با مقایسه تصاویر SEM نمونه H و شاهد کاملا واضح است که سطح لعاب بعد از نفوذ دچار صدمه و یا آسیب نشده است و کیفیت خود راحفظ کرده است. شکل ۳(a) و ۴(a). برای بررسی بیشتر این مطلب، از ۳ نقطه مختلف بر روی سطح نمونه H آنالیز EDAX نیز انجام شدکه نتایج آن درشکل (۵) نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر مشخص است علاوه بر اثبات حضور نقره بر روی سطح لعاب، کاملا واضح است که میزان نقره دراین سه نقطه، در یک رنج می‌باشد. درواقع نتایج این آنالیز هم صحتی بر توزیع یکنواخت نقره برروی سطح لعاب دارد.



شکل(۳): a) تصویر SEM، b) تصویر MAP، c) تصویر EDAX از سطح نمونه H



شکل(۴): a) تصویرSEM، b) تصویر MAP، c)تصویر EDAX از سطح نمونه شاهد



شکل(۵) : نتایج آنالیز EDAX از ۳ نقطه مختلف بر روی سطح نمونهH

برای ارزیابی میزان نقره نفوذی در سطح لعاب، نمونه‌ها تحت آنالیز XRF قرار گرفتند. نتایج این آنالیز در جدول (۲) نشان داده شده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت بر روی سطح لعابی با پوشش حاوی نیترات نقره بیشتر، میزان عنصر نقره بیشتری مشاهده شد. در واقع میزان نقره بر روی سطح لعاب نمونه H بیشتر از دو نمونه دیگر است. زیرا پوشش اعمال شده بر روی سطح این نمونه، حاوی نیترات نقره بیشتری از دو نمونه دیگر است.

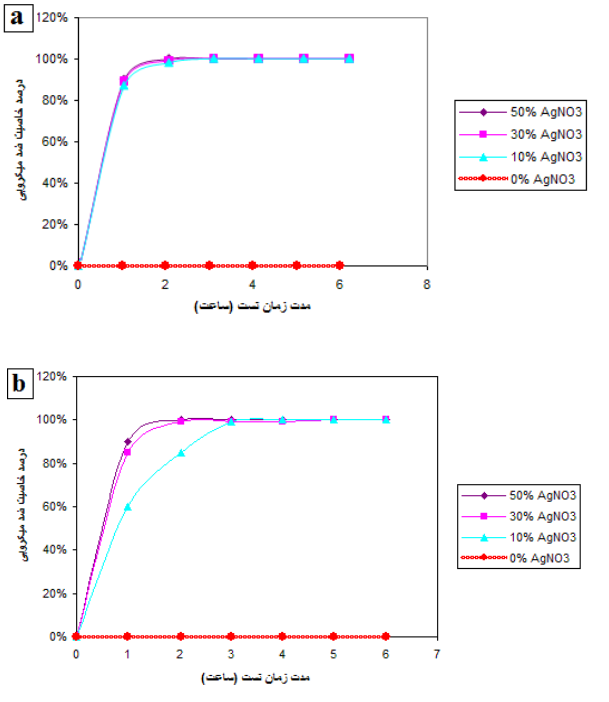
جدول (۲): میزان نقره شناسایی شده توسط XRF در ۳ گروه نمونه

نمونه	میزان نقره شناسائی شده روی سطح لعاب (g)	درصد وزنی نیترات نقره در پوشش
H	۲/۴۵	٪۵۰
M	۱/۵	٪۳۰
L	۰/۶	٪۱۰

۳-۱- تاثیر میزان نقره بر روی خاصیت آنتی باکتریال

فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به شدت متاثر از میزان نقره نفوذی بر روی سطح لعاب است. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به روش Drop test در برابر دو باکتری E.coli, S.aureus ارزیابی شده است. شکل (۶) نتایج نمونه‌های (H, M, L) را در برابر این دو باکتری نشان می‌دهد. کاملا واضح است که نمونه‌های ذکر شده علی رغم این که حاوی مقادیر مختلفی از ماده ضد میکروبی می‌باشند. پس از سپری شدن ۱ ساعت از تماس سطح لعاب با باکتری E.coli تعداد میکروارگانیسم‌ها را تقریبا به صفر رسانده‌اند شکل (a)۶. در حالیکه در برابر باکتری S.aureus نمونه‌های (H, M) پس از ۱ساعت تماس و نمونه L پس از ۳ ساعت قادر به از بین بردن تمامی میکروارگانیسم‌ها شده است شکل (b)۶. علت این تفاوت در نتایج، به جهت تفاوت در ساختار این دو باکتری است. درواقع باکتری S.aureus دارای ساختاری با دیواره سلولی ضخیم‌تر از باکتری E.coli می‌باشد. بنابراین باکتری S.aureus نسبت به E.coli در برابر عامل ضد میکروبی مقاومت بیشتری از خود نشان خواهد داد. علت دیگر این تفاوت به میزان ماده ضدمیکروبی مربوط است. زیرا با

افزایش میزان ماده ضد میکروبی، میزان نفوذ نقره به سطح لعاب بیشتر شده و در صورت تماس سطح لعاب با باکتری مقدار بیشتری یون نقره نفوذی به دیواره سلولی باکتری حمله می‌کنند که با وجود ضخامت بیشتر، اما به جهت میزان بیشتر ماده ضد میکروبی، دیواره سلولی سریعتر متلاشی شده و منجر به مرگ میکروارگانیسم‌ها خواهد شد [۵]. در صورت کاهش میزان ماده ضد میکروبی شدت حمله به دیواره سلولی کاهش یافته و مدت زمان متلاشی شدن دیواره سلولی و مرگ باکتری به تاخیر خواهد افتاد. در نمونه (H, M) که میزان ماده ضدمیکروبی بیشتر است. در برابر هر دو باکتری علی رغم متفاوت بودن ساختار آن‌ها، نتایج یکسانی مشاهده می‌گردد. اما در نمونه L که میزان ماده ضد میکروبی کمتر بوده عامل متفاوت بودن ساختار باکتری بر میزان ماده ضد میکروبی غلبه کرده و نمونه L در برابر باکتری S.aureus پس از سپری شدن مدت زمان بیشتری نتایج مشابه دو نمونه دیگر داشته است.



شکل (۶): درصد خاصیت ضد میکروبی نمونه‌ها در برابر باکتری a) E.coli، b) S.aureus

٤- نتیجه گیری

روش پوشش کلوئیدی، روشی کم هزینه، قابل تکرار و ساده برای ایجاد لعاب‌های آنتی باکتریال است. با استفاده از این روش خاصیت ضد میکروبی قوی در مقابل هر دو باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml در سطح لعاب ایجاد شده و باعث صرفه جویی در مصرف ماده ضدمیکروبی و کاهش هزینه تولید شده است. با اعمال این روش و نفوذ نقره در دما و زمان مشخص، هیچ‌گونه صدمه یا آسیبی به سطح لعاب وارد نخواهد شد.

با توجه به نتایج SEM کاملا واضح است که نفوذ بر روی سطح لعاب به خوبی صورت گرفته و ماده ضد میکروبی به طور کاملاً یکنواخت بر روی سطح لعاب توزیع شده است.

فعالیت ضد میکروبی سطح لعاب با مقادیر مختلف نقره نفوذی مورد مطالعه قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به شدت متاثر از میزان نقره نفوذی بر روی سطح لعاب است. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها با افزایش مدت زمان تماس سطح لعاب با باکتری و میزان ماده ضد میکروبی افزایش خواهد یافت.

برای مثال هنگامی که میزان ماده ضد میکروبی از ۱۰٪wt به ۵۰٪wt افزایش می‌یابد، مدت زمان لازم برای از بین بردن تمام میکروارگانیسم‌های باکتری S.aureus از ۳ ساعت به ۱ ساعت کاهش خواهد یافت. نمونه‌های (H, M, L) فعالیت ضد میکروبی خیلی قوی را در برابر هر دو باکتری نشان داده‌اند.

تفاوت فعالیت ضد میکروبی نمونه L در برابر باکتری S.aureus در مقایسه با نمونه (H, M) به جهت متفاوت بودن ساختار این باکتری و میزان ماده ضد میکروبی در سطح لعاب می‌باشد. فعالیت ضد میکروبی مطلوب حتی با کمترین میزان ماده ضد میکروبی در برابر هر دو باکتری ایجاد شده است.

۵- مراجع

[1] Oku, "Anti-bacterial and Anti-Fungal Glaze Composition for Ceramic Products", United States Patent, Vol. 5, 807, 641, 1998.

[2] S-Q SUN*, B SUN, WENQIN ZHANG and D WANG" Preparation and Antibacterial Activity of Ag–TiO2 Composite Film by Liquid Phase Deposition (LPD) Method", Indian Academy of Sciences, Vol. 31, pp. 61–66, 2007.

[3] Elsome AM, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W, Noble WC ،"Antimicrobial Activities in Vitro and in Vivo of Transition Element Complexescontaining Gold (I) and Osmium (VI)" J Antimicrob Chemother, Vol. 37, pp. 911-8, 1996.

[4] Lansdown AB, "Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety In Use", Curr Probl Dermatol, Vol. 33, pp. 17-34, 2006.

[5] Q.L.Feng, J.Wu, G.Q.Chen, F.Z.Cui, T.N.Kim and J.O.Kim, "A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus", Biomed Mater, Vol. 52, pp. 662-668, 1999.

[6] J.S.Kim and E.Kuk, "Antibacterial Effects of silvernanoparticles",Nanomedicine:Nanotechnology,Biology, and Medicine, Vol. 3, pp. 95-101, 2007.

[7] Lu Lv, Yiqun Luo, Wun Jern Ng and X.S. Zhao, "Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles Supported on Microporous Titanosilicate ETS-10", Microporous and Mesoporous Materials, Vol. 120, pp. 304–309, 2009.

[8] Top A and U lku S, "Silver, Zinc, and Copper Exchange in a Naclinoptilolite and Resulting Effect on Antibacterial Activity", Applied ClaySci, Vol. 27, pp. 13- 19, 2004.

٦- پی نوشت

۱- Cfu/ml: میزان کولنی تشکیل شده در هر میلی لیتر