Study of the Antibacterial Activity by using Titanium Dioxide Nanoparticles

Kareem Hussian AL Shibaib
Computer Sciences Department, University of Technology/ Baghdad
Email: Karimuot@yahoo.com

Received on:30/5/2016 & Accepted on:24/11/2016

ABSTRACT

The study was the effectiveness of the microbial activity by using titanium dioxide nanoparticles which are prepared by using laser ablation of titanium pellet immersed in de-ionzed water. Palsed Nd: YAG laser with 1064nm wavelength and laser energy 250 mJ was used to irradiate the target for ablation time 15 min, 200 pulses. Where studied synthetic characteristics of the sample prepared using the X-ray diffraction pattern of nanoparticles proved the presence Alatanas planes. A scanning electron microscope measurement appearance Tio2 nanoparticle of structures with cube shapes , while the results of Zeta potential was the values being equal to (34) are located within the range of suspension potential Stability. The results of antimicrobial activity of Tio2 nanoparticle against bacterial stratin *S.aureus, C .albicans,* and *E.coli* with antibiotic at concentration .1000 mg/ml (AMC, DO_{10} and CN_{10}) using well diffusion assay showed. The best concentration of 1000 mg /ml of antibiotics give us with dioxide nanoparticles to inhibition bacterial growth .The results showed that the nanoparticles with antibiotics inhibition the growth of *S.aureus* then *C.albicans* which is more sensitive than *E.coli* .Our results showed that dioxide nanoparticles have synergistic effect with (CN_{10}& DO_{10}) .And there is no any synergistic effect with (AMC).

Keywords: Dioxide Titanium, Anti-Bacterial activity, Antibiotics.

دراسة الفعالية الضد مايكروبية بواسطة استخدام ثنائي اوكسيد التتانيوم النانوي

الخلاصة:

تم دراسة الفعالية المضادة المايكروبي عن طريق تحضيرثاني أوكسيد التيتانيوم النانوي بإستخدام طريقة الإستئصال بالليزر،اذ أستُعمل ليزر النيديميوم- ياك النبضي بالطولي الموجي(1064) نانومتر وبطاقة (250) ملي جول لتشعيع المعدن بعدد نبضات (200) نبضة ولمدة خمسة عشر دقيقة . حيث درست الخصائص التركيبيه للعينه المحضره باستخدام جهاز حيود الاشعه السينيه وتبين أن العينه ذات طور (Anatase)كما اوضحت الخصائص المظهرية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح ظهور تراكيب نانويه شبيه بالمكعبات ، واظهرت نتائج جهد زيتا قيمة مساويه الى (34) والتي تقع ضمن مدى الجهد الدال على استقراريه العالق .في حين أختبرت الفعالية الضد مايكروبية لثنائي أوكسيد التيتانيوم مع مجموعة من المضادات الحياتية وبتركيز 1000 مايكروغرام/ملي لتر وهي الاموكسليين AMC و ديوكسيلين DO_{10} و سينوكسليين CN_{10} بطريقة الانتشار بالحفر Well diffusion assay ضد أنواع مختلفة من الميكروبات منها بكتريا المكورات العنقودية *الذهبية S .aurous* و خميرة *C. albicans* والبكتريا المعوية *E. coli* ، اذ اظهرت النتائج ان التركيز 1000 مايكرو غرام/ملي لتر هو أفضل تركيز مستخدم لثنائي أوكسيد التيتانيوم النانوي لتثبيط نمو كلاً من السلالات الميكروبية ،اذ أظهرت جسيمات ثنائي أوكسيد التيتانيوم النانوي أعلى فعالية مضادة للبكتيريا في بكتريا المكورات العنقودية *S. aurous* و خميرة *C. albicans* ، اما البكتريا السالبة لصبغة كرام قد اظهرت تأثيرا اقل في *E. coli* . وأشارت النتائج أيضا الى أن ثنائي أوكسيد التيتانيوم يمتلك تأثير مُتآزر مع المضادين الحيويين (DO10 وCN_{10}) في تثبيط نمو البكتيريا اما المضاد (AMC) فلم يظهر اي تأثير تضادي يذكر.

الكلمات المفتاحية :- ثاني اوكسيد التيتانيوم النانوي ،الفعالية الضد بكتيرية ،المضادات الحياتية .

https://doi.org/10.30684/etj.34.6B.1
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

المقدمة

ساهمت تقنية العمل بين النانوتكنولوجي والبيولوجيا الحيوية على حل العديد من المشاكل الطبية الحيوية من خلال العثور على المواد متناهية صغر(النانو) والتي لها دور فعال في البايولوجيا الحيوي، نظرا لزيادة الفعالية النانوية الجديدة اذ ستخدمت كل من البوليمرات، والمعادن، وأكاسيد المعادن و السيراميك في معالجة السرطان و المسببات المرضية البشرية مثل البكتيريا [1]. لعب ثنائي اوكسيد التيتانيوم TIO2 دور مميز في الفعالية المضادة للجراثيم بسبب مقاومته للعديد من سلالات البكتريا الممرضة، وذلك كونة أقل سمية ومقاوم للحرارة [2]. اذ ان ثاني أوكسيد التيتانيوم (TIO2) من المواد متناهية الصغر لها خصائص فيزيائية وكيميائية بسبب تأثيره الكبيرلكمية الحجم الى السطح والتي قد تكون مختلفة من مواد نووية او كبيرة ، حيث ان نسبة السطح الى الحجم تزداد ملايين المرات مما يغير من الخصائص البصرية والتركيبية بسبب تأثيرها على الحجم الكمي) (bulk [3]. يقل الحجم المتوسط للاكاسيد عندما تزداد فجوة الطاقة، والتوصيلية والفعالية الكيميائية للمواد المؤثرة، وان لمعدن التيتانيوم العديد من التطبيقات منها في المجالات الطبية ،ومجالات الطيران والفضاء ، والمجالات البحرية ، والمعالجة الكيميائية ، والمجالات الرياضية ، ومجال الصناعة والسلع الاستهلاكية . والمجال الرئيسي لتطبيقات هذا المعدن هو في صناعة الطيران العسكرى على وجه التحديد بسب قوة التيتانيوم وكثافته لما يمتلك من صفاة هيكلية جيدة [4] . حيث يتميزمعدن التيتانيوم بمقاومة عالية للتاكل وخاصة في بيئة المياه المالحة ، كما ان لهذا المعدن استخدامات عديدة في المجال الطبي منها زراعة الاسنان والركبة والقلب ، لما يمتلكه من صفات عديدة ساعدت على تفضيله بسب كونه غير مغناطيسي والاحتفاظ بدرجات الحرارة العالية بسبب قدرته على الاحتفاظ بالقوة نسبة الى وزنه [5].

تهدف الدراسة الحالية الى تسليط الضوء لاختبار الفعالية ضد الميكروبية لبعض انواع من البكتيريا بواسطة الاستئصال بالليزر في الماء المنزوع الأيونات لمعدن ثاني اوكسيد التتانيوم النانوي، ومقارنته مع مجموعة من المضادات الحيوية.

مواد وطرائق العمل :-

تحضير ثانى اوكسيد التيتانيوم

حضر بأخذ قطعة من التتانيوم الصلب ووضعت في انبوبة اختبار معقمة حاوية 2 مل من المياه اللاأيونية ومن ثم عرضت الى ليزر النيديميوم- ياك (Nd:YAG Laser) ذو الطول الموجي 1064 وبطاقه 250 مل جول لتشعيع المعدن بعدد نبضات 200نبضة خلال 15 الدقيقة ، تم الحصول على عالق من ثاني اوكسيد التتانيوم .

القياسات البصرية والفيزياوية والبايولوجية :-

- **قياس حيود الاشعة السينية** XRD

لأجل التعرف على الطبيعة البلورية وطبيعة التركيب لماده النانويه تم استعمال جهاز حيود الاشعة السينية XRD نوع (Phillips PW1050) الذي يعمل مع اشعة سينية بطول موجي ($1.93728\ A^o$) [6] .

- **جهاز المجهر الالكتروني الماسح** SEM

لغرض فحص سطوح الاغشية للماده النانويه بعد ترسيبها على قطعه من السليكون تم التصوير باستخدام مجهر الالكتروني الماسح [7] .

- **جهاز فحص زيتا**

لغرض فحص ودراسه الخصائص الكهربائيه وشحنه استقراريه السطح للجسيمات النانويه نوع (NanoBrook 90Plus Particle Size Analyzer).

- **المضادات الحيوية**

ستخدمت ثلاث انواع من المضادات الحيوية على شكل اقراص disk ( )=(CN_{10} المضاد الحيوي سينوكسليين 10 ،( ) =DO_{10} المضاد الحيوي ديوكسيلين 10 ، (AMC)= المضاد الحيوي الاموكسليين .

- **العزلات البكتيرية**

تم الحصول على العزلات البكتيرية والمشخصة من مستشفى العلوية التعليمي للاطفال– بغداد هي كل من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والمتمثلة ببكتريا المكورات العنقودية *S. aurous* ، اما البكتريا السالبة لصبغة كرام المتمثلة ببكترية القالونية *E. coli* اضافة الى خميرة *C. albicans* .

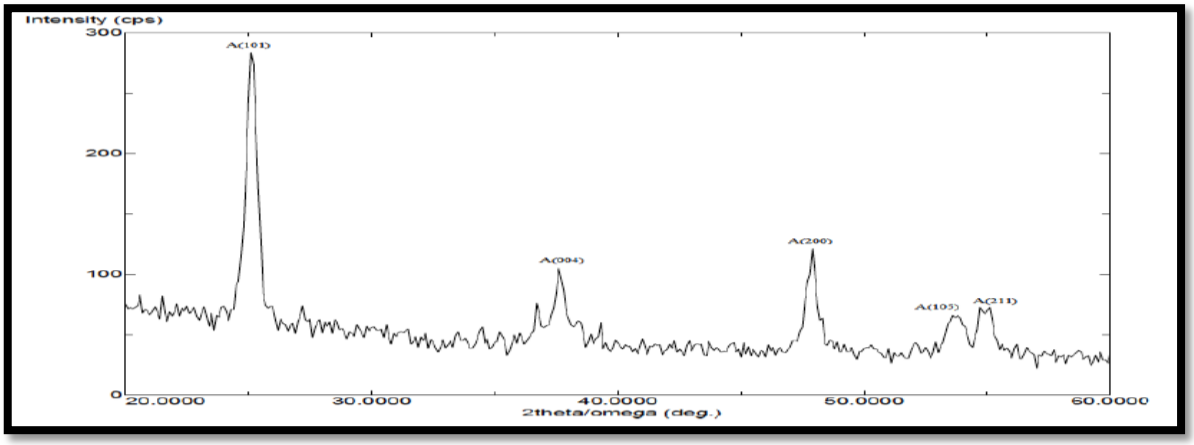
- **ظروف النمو للعزلات البكتريا**

نشطت البكتريا في وسط Nutrient broth ثم حضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة و حفضت في الثلاجة لحين الاستخدام. اذ حضر الوسط الزرعي الخاص بالعمل هو Moller Hinton Agar وتبعت طريقة Atlas Kirby –Bauer Disk [8] . methodلقح المحلول الفسيولوجي بعدد من المستعمرات الميكروبية النقية . و قورن مع الانبوب الحاوي على المستعمرات بعدد من المستعمرات بأنبوبة مكفرلاند بتركيز ($0.5*10^6$) ، نشرت خلايا العالق الميكروبي بواسطة Swab على وسط Moller Hinton Agar، ثم تم عمل حفرتينWells بواسطة ثاقب فليني لوضع ثنائي أوكسيد التيتانيوم النانوي السائل بتركيزمايكرو 1000غرام/ملي لتر ووضعت مضادات الحياة والاخرى لمحلول السيطرة (الماء المقطر)، وثم حفظت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37م° لمدة يوم واحد ، دونت النتائج في اليوم الثاني من خلال قياس مناطق التثبيط حول كل من الحفرة . وبعد ذلك

اجريت مقارنة بين ثاني اوكسيد التتانيوم وبعض انواع من المضادات الحياتية بتركيز1000غرام/ملي لتر (CN_{10} وDO_{10} و AMN) اذ تم وضعها في ثنائي أوكسيد التيتانيوم النانوي على سطح الوسط الصلب بالنسبة للعزلات البكتيرية المستخدمة قيد الدراسة ، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة اعلاه لمدة يوم واحد ، لوحظت النتائج في اليوم الثاني من خلال قياس مناطق التثبيط حول كل من الحفر والاقراص .

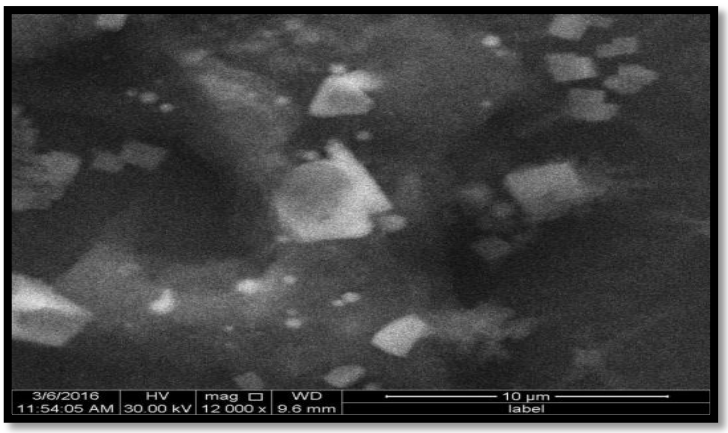
النتائج والمناقشة

تضمنت الدراسة الحالية عدة محاور منها الخصائص النانوية TlO2 بواسطة الاستئصال بالليزر في الماء منزوع الأيونات مثل الخصائص البصرية والتركيبية والمظهرية. وبالإضافة إلى ذلك نتائج النشاط المضادة للبكتريا . اذ اظهرت نتائج الخصائص البصرية TlO2 انها عديمة اللون، اذ ان الحصول على اللون النانوي يعتمد على شكل وحجم ومصادر القدرة النووية وثابت العزل الكهربائي من الوسط المحيط [9]. وبعد ذلك تم دراسة خصائص حيود الاشعة السينية اذ تضمن هذا الفحص معرفة الزوايا التي تتكون عندها جسيمات TIO2 النانوية بطور(Anatase) اذ نلاحظ من الشكل (1) ظهور عدة قمم للتيتانيوم متعدد التبلور (Polycrystalline)يتمحورعند الزوايا ,(25.38°),(37.90),(48.14°),(54.02°) (55.139°) وبمستويات حيود بلورية عند (101),(004),(200),(105) (211)على التوالي وتشير هذه الزوايا الى طورAnatase فقط.



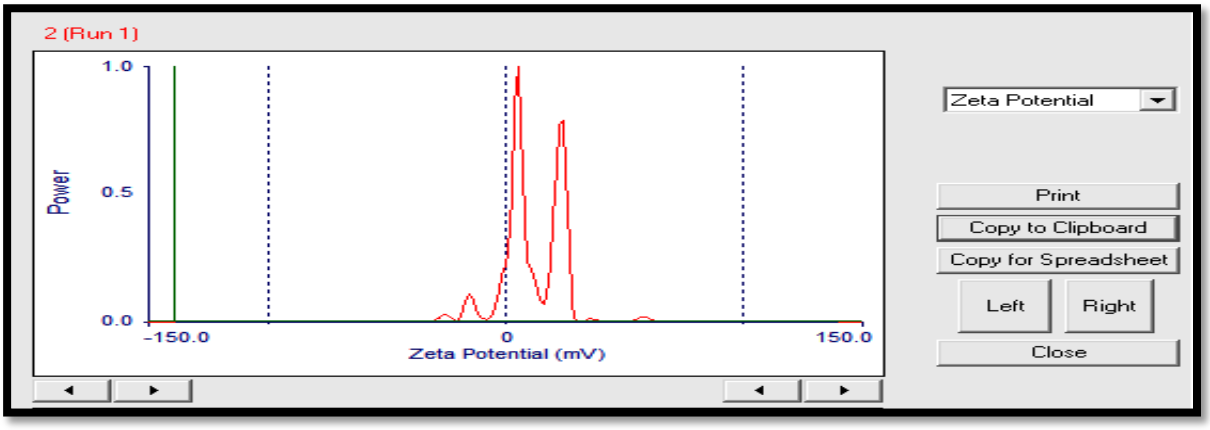
الشكل (1) حيود الاشعه السينيه للعينه المحضره بطاقه ليزر(250) ملي جول وبطول موجي 1064نانومتر بعدد نبضات (200) نبضة ولمدة خمسة عشر دقيقة

تبين من خلال دراسة المجهر الالكتروني الماسح ان حجم جسيمات ثنائي اوكسيد التيتانيوم النانويه لطور Anatase تتراوح بين 80 - 136 نانومتر وايضا يمكن ملاحظه ان الجسيمات النانويه ذات اشكال متعدد كرويه ومكعبه وعلى الاغلب انها مكعبه الشكل، وكذلك لوحظ بعض التكتلات والتي في الاغلب تكون نتيجه تحضير الماده وبقائها لفتره طويله وكما موضح في الشكل (2).



الشكل (2) المجهر الالكتروني الماسح للعينات المحضره بطاقه ليزر (250) ملي جول وبطول موجي 1064نانومتر بعدد نبضات (200) نبضة ولمدة خمسة عشر دقيقة

اما عند دراسة الحجم النانوي اوضحت النتائج التي تم الحصول عليها من فحص جهد زيتا حيث كانت قيمه جهد زيتا مساويه الى (34) وتقع هذه القيمه ضمن المدى من الجهد الدال على استقراريه العالق وتعني الاستقراريه عدم ميل جسيمات النانويه الى التجمع وحصول قوه تنافر كهربائي فيما بينهما وهذا من المهم جدا في كثير من التطبيقات كما موضح في الشكل (3)



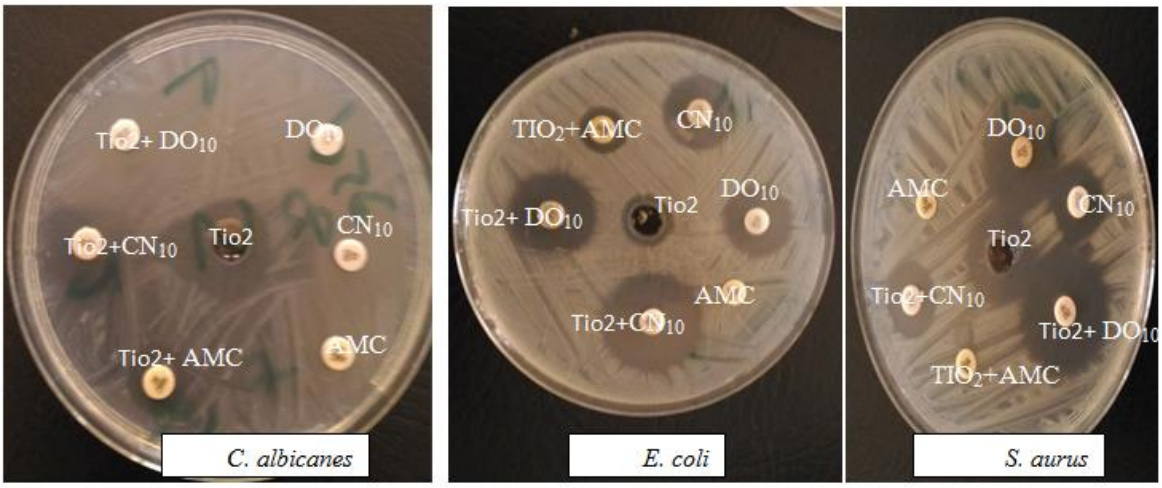
الشكل (3) جهد زيتا للعينات المحضره بطاقه ليزر (250) ملي جول وبطول موجي 1064نانومتر بعدد نبضات (200) نبضة ولمدة خمسة عشر دقيقة

والمحور الاخير تضمن دراسة الفعالية ضد بكتيرية لانواع مختلفة من الاحياء المجهرية ومقارنتها مع مجموعة من المضادات الحياتية ، اذ اظهرت النتائج تأثير الجزيئات النانوية في البكتريا الموجبة لصبغة كرام والمتمثلة ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. auras* اكثر مقارنتا مع البكتريا السالبة لصبغة كرام والمتمثلة بالبكتريا المعوية *E. coli*، اذ سجلت بكتريا المكورات العنقودية الذهبية اعلى منطقة تثبيط وهي (15) ملم تليها خميرة *C.albicane* بمنطقة تثبيط (13) ملم واخير البكتريا المعوية بمنطقة تثبيط (12) ملم عند التركيز 1000 مايكرو غرام/مل . اما عند استعمال المضادات الحياتية اعلاه وجد ان لها تأثير تعاوني (متأزر) وعند استعمال المضاد الحيوي لوحده DO_{10} ($Doxcycilline_{10}$) بتركيز1000 مايكرو غرام/مل في بكتريا المكورات العنقودية سجل منطقة تثبيط (16)ملم اما عند مزجه مع ثاني اوكسيد التتانيوم سجل اعلى تأثير (19) ملم ، كذلك الحال عند استعمال المضاد لوحدهDO_{10} لخميرة *C. albicanes* اذ سجل لوحده(13) ملم اما عند مزجه مع المعدن (ثاني اوكسيد التتانيوم) فقد سجل (16) ملم اما في حالة بكتريا المعوية سجل لوحده (14)ملم وعند مزجه مع المعدن سجل(16) ملم ، اما عند استعمال المضاد ($Cnoxcycilline_{10}$) CN_{10}, فقد تباين تأثيره فقط في البكتريا المعوية اذ سجل فقط منطقة تثبيط عند مزجه مع المعدن المستعمل (10) ملم ولم يلاحظ له تأثير يذكر في الانواع الاخرى من البكتريا ، في حين عند استعمال المضاد Cnoxcycilline (CN_{10}) لوحده تباين تأثيره على الانواع البكتيرية ،اذ سجل لوحده في البكتريا المكورات العنقودية (19) ملم اما عند مزجه مع المعدن فقد سجل اعلى تأثير له اذ بلغ (24) ملم ،اما في بكتريا المعوية سجل لوحده (16) ملم وعند المزج سجل (21)ملم ، اما في الخمير فقد سجل فقط عند المزج (15) ملم اما عند استخدام الاموكسلين AMC لم يلاحظ اي تأثير يذكروفي البكتريا المستعملة فقط في البكتريا المعوية عند مزجها مع المعدن المستعمل بمنطقة تثبيط (13) ملم اي ان التأثير كان تضادي كما موضح في الشكل (4)و الجدول (1)

جدول (1) الفعالية الضد ميكروبية لمعدن ثاني اوكسيد التتانيوم النانوي وتأثير انواع من المضادات الحيوية لانواع مختلفة من الاحياء المجهرية .

انواع الاحياء المجهرية	مناطق التثبيط (ملم)، لثاني اوكسيد التيتانيوم النانوي فقط	انواع المضادات الحيوية / ملم				
		AMC mm	AMC+ TIO_2 mm	DO_{10} mm	TIO_2+DO_{10} mm	CN_{10} mm	TIO_2+ CN_{10} mm
S.aurus	15	-	-	16	19	19	24
C. albicanes	12	-	-	13	16	-	15
E. coli	13	-	10	14	16	16	21

TIO_2+ CN_{10} = ثاني اوكسيد التيتانيوم النانوي +المضاد الحيوي سينوكسليين 10، CN_{10}= سينوكسليين 10فقط.
TIO_2+DO_{10}= ثاني اوكسيد التيتانيوم النانوي +المضاد الحيوي ديوكسيلين 10، DO_{10} = ديوكسيلين 10 فقط.
AMC+ TIO_2= ثاني اوكسيد التيتانيوم النانوي +المضاد الحيوي اموكسليين، AMC= الاموكسليين فقط.
TIO_2= ثاني اوكسيد التيتانيوم النانوي فقط



الشكل (4) الفعالية ضد البكتيرية لثاني اوكسيد التيتانيوم

من خلال النتائج اعلاه تبين ان البكتريا الموجبة لصبغة اكرام كان لها تاثير اعلى في التثبيط باستعمال ثاني اوكسيد التتانيوم النانوي كذلك في استعمال انواع من المضادات الحيوية وهذا يعود الى طبيعتة الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة من حيث التركيب [10,11]. ان خواص القتل البكتيري تشبه الاجسام النانوية المعتمدة على الحجم والاستقرارية والتراكيز المضافة الى وسط النمو،وهذا يوفر المزيد من الوقت لتفاعل الجسيمات الدقيقة مع البكتيريا [12]. حيث ان نسبة السطح الى الحجم تزداد في الحالة النانوية ملايين المرات مما يغير من الخصائص البصرية والتركيبية بشكل عام، معظم انواع البكتريا أغشية خلوية تحتوي على مسام او ثغور بمدى نانوي. ومع ذلك، فمن المهم أن االتركيب النانوية الخاصة تمتلك القدرة على عبورمن خلال الأغشية الخلوية والتي تكون مستقرة بما فيه الكفاية ليحدد نمو البكتيريا بشكل كبير أثناء عبور [13].

الاستنتاجات

من خلال الدراسة الحالية تبين ان لثاني اوكسيد التيتانيوم تأثير تعاوني بالنسبة للعزلات البكتيرية المستخدمة قيد الدراسة باضافة المضادات الحيوية المستخدمة، اذ كان له تأثير على البكتريا الموجبة اكثر من البكتريا السالبة . وامكانية استخدامة في المجال الصيدلاني كمعالجة الجروح والالتهابات والاصابات الفطرية.

REFERENCE

[1] S. Jadhav, S. Gaikwad, M. Nimse and A. Rajbhoj,(2011). "Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and their Antibacterial Activity", Journal of Cluster Science, Vol. 22, No. 2, pp. 121-129.

[2] A. Q. Abed-Alkareem,(2013). "Synthesis of Zinc Oxide and Cobalt Oxide Nanoparticles in Surfactant /Antibiotics Shell and Investigating their Anti-bacterial Activities, Master thesis, An-Najah National University, Palestine, pp. 2-17.

[3] A. Hoseini, N. Shahtahmasebi, M. Rezaee-Roknabadi, M. Mashreghi, M. M. Bagheri-Mohagheghi, E. Azhir and P. Madahi,(2011). "Fabrication of CuO:Fe Nanoparticles by Sol-Gel Method and Study and Structural and Antibacterial Properties", 2nd Conference on Applications of Nanotechnology in Sciences, Engineering and Medicine (NTC2011), pp. 1-2.

[4] N. Acacia, F. Barreca, E. Barletta, D. Spadaro, G. Currò and F. Neria, (2012).“Laser Ablation Synthesis of Indium Oxide Nanoparticles in Water”, Applied Surface Science, Vol. 256, pp. 6918–6922.
[5] A. Azam, A. S. Ahmed, M. Oves, M. S. Khan and A. Memic,(2012). “Size-Dependent Antimicrobial Properties of CuO Nanoparticles Against Gram-positive and -negative Bacterial Strains”, International Journal of Nanomedicine, Vol. 7, pp. 3527–3535.
[6] S. M. Hong, S. Lee, H. J. Jung, Y. Yu, J. H. Shin, K. Kwon and M. Y. Choi, (2013). “Simple Preparation of Anatase TiO_2 Nanoparticles via Pulsed Laser Ablation in Liquid”, Bulletin of the Korean Chemical Society, Vol. 34, No. 1, pp. 279-282.
[7] K. Amikura, T. Kimura, M. Hamada, N. Yokoyama, J. Miyazaki and Y. Yamada, (2008). “Copper Oxide Particles Produced by Laser Ablation in Water”, Applied Surface Science, Vol. 254, pp. 6976–6982.
[8]Atlas,R.M.,Brown ,A.E.and Psks,T.S.,(1995)Laboratory Manual Experimental Microbiology (1^{st}ed)Mosby.yer Book.Inc.Louis Baltimore.
[9] S. Eustis, (2006).“Gold and Silver Nanoparticles: Characterization of their Interesting Optical Properties and the Mechanism of their Photochemical Formation”, PhD thesis, Georgia Institute of Technology, PP. 1.
[10] T. M. Al-Nori, (2012).“Antibacterial Activity of Silver and Gold Nanoparticles against *Streptococcus, Staphylococcus aureus* and *E.coli*”, Al-Mustansiriyah Journal of Science, Vol. 23, No. 3, pp. 45-54.
[11] M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. A. Ashkarran, D. J. de Aberasturi, I. R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W. J. Parak and M. Mahmoudi,(2010). “Antibacterial Properties of Nanoparticles”, Trends in Biotechnology, Vol. 30, No. 10, pp. 499-511.
[12] A. Azam, A. S. Ahmed, M. Oves, M. S. Khan, S. S. Habib and A. Memic, (2012)“Antimicrobial Activity of Metal Oxide Nanoparticles Against Gram-positive and Gram-negative Bacteria: a Comparative Study”, International Journal of Nanomedicine, Vol. 7, pp. 6003–6009.
[13] A. Azam, A. S. Ahmed, M. Oves, M. S. Khan and A. Memic,(2012). “Size-Dependent Antimicrobial Properties of CuO Nanoparticles Against Gram-positive and -negative Bacterial Strains”, International Journal of Nanomedicine, Vol. 7, pp. 3527–3535.