**دانشگاه علوم پزشکی اردبیل**

**دانشکده بهداشت**

**پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد در رشته ی مهندسی بهداشت محیط**

**عنوان:**

# ارزیابی کارایی نانو هیبرید دی اکسید تیتانیوم اصلاح شده با دندریمر پلی آمید و آمین نسل سوم در حذف باکتری‌ها از محیط آبی

**نگارنده:**

**سودابه علی زاده متبوع**

**استاد راهنما:**

**دکتر سید احمد مختاری**

**اساتید مشاور:**

دکتر مهدی وثوقی نیری، دکتر علی نیاپور

اردیبهشت ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: ۰۲۹

بسم الله الرحمن الرحيم

# اظهار نامه اصالت پایان نامه

اینجانب **سودابه علی زاده متبوع** دانشجوی کارشناسی ارشد رشته **مهندسی بهداشت محیط** دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی اردبیل نویسنده پایان نامه **ارزیابی کارایی نانو هیبرید دی اکسید تیتانیوم اصلاح شده با دندریمر پلی آمید و آمین نسل سوم در حذف باکتری ها از محیط آبی** تحت راهنمایی **دکتر سید احمد مختاری** متعهد میشم:

تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده و از صحت و اصالت برخوردار است.

در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد کرده ام.

مطالب مندرج در پایان نامه تا کنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی ارائه نگردیده است.

در تمامی مراحل انجام این پایان نامه اصل رازداری و اصول اخلاق پژوهشی را رعایت نموده ام.

تاریخ – امضای دانشجو

# اظهار نامه مربوط به انتشار مقاله

کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل است. مقالات مستخرج با نام دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و یا Ardabil University of Medical Science به چاپ خواهد رسید.

متعهد میگردم حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آوردن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند را در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت نمایم و در تمامی آنها نام استاد راهنما به عنوان نویسنده مسئول و نیز نام استادان مشاور و نشانی الکترونیکی دانشگاهی آنان را قید نمایم.

تاریخ – امضای دانشجو

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم،دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم،چشمان زیبای مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما

ره آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم، باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگیتان را بزداید.

بوسه بر دستان پرمهرتان

**تقدیم به همسر عزیزم دکتر شهرام نظری**

**که با قبول سختی‌ها و مسئولیت‌های سنگین زندگی امکان ادامه تحصیل و پیشرفت را برایم میسر ساخت و مفهوم زیبای صبر و شکیبایی را به من آموخت.**

**تشکر و قدردانی**

بر خود لازم می‌دانم از اساتید گرانقدر خود **جناب آقای دکتر سید احمد مختاری** که در طی دوره تحصیل و انجام این تحقیق، باکمال صبر و حوصله و محبت مرا راهنمایی نمودند و زحمات بسیاری را در این راه متحمل شدند، تقدیر و تشکر نمایم.

از اساتید مشاور، **جناب آقای دکتر مهدی وثوقی نیری**، و **جناب آقای دکتر علی نیاپور** که از نظرات علمی و ارزشمندشان در مقاطع مختلف همواره بهره‌مند بودم، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر سعید پرستار و جناب آقای دکتر یوسف پورعشق، که زحمت داوری این پایان‌نامه را به عهده داشتند، کمال تقدیر و تشکر را دارم.

**با تشکر و سپاس فراوان از:**

اساتید محترم گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده علوم پزشکی اردبیل، جناب آقای **دکتر مرتضی عالیقدری، دکتر یوسف پورعشق و مهندس مهدی مهدی فضل زاده**.

اساتید محترم گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده علوم پزشکی خلخال، جناب آقای **دکتر شهرام نظری و جناب آقای دکتر سعید پرستار**.

کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جناب آقای پیمان آزغانی و همچنین کارشناس محترم گروه مهندسی بهداشت خانم طیبه صادقی.

در پایان از تمام دوستان عزیزم خانم مینا مرادی، خانم زهرا جوانمردی، آقای کمال حسنی و سایر دوستانی که افتخار همراهی‌شان را داشته ام، تقدیر و تشکر و برای ایشان سلامتی و موفقیت مستمر را آرزو می‌نمایم.

# چکیده

باکتری *اشرشیاکلی* یکی از باکتری‌های شاخص جهت تعیین آلودگی آب محسوب می شود. بنابراین در صورتی که فرآیندی بر علیه این باکتری خاصیت ضدباکتریایی داشته باشد، می توان گفت به احتمال زیاد بر سایر باکتری های آلوده کننده آب نیز موثر است. در این مطالعه، نانو هیبرید دی اکسید تیتانیوم اصلاح شده با دندریمر پلی آمید و آمین نسل سوم عامل دار شده، و به عنوان ماده ضدباکتریایی برای حذف باکتری‌های گرم منفی ( *اشرشیاکلی*) و گرم مثبت ( *استافیلوکوس اورئوس*) از محلول آبی مورداستفاده قرار گرفت. آنالیزهای FTIR، BET، FE-SEM، XRD و TEM برای تعیین ساختار نانوهیبرید $TiO_2$/PAMAM-G3 به کار رفت. اثر ضد باکتریایی نانوهیبرید با سه روش استاندارد: روش رقیق سازی میکرو (تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی)، دیسک آگار دیفیوژن و شمارش بشقابی (واحد تشکیل دهنده کلونی- CFU/ml) بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی نانو هیبرید برای باکتری‌های *اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر* ۲ و µg/ml ۴، و حداقل غلظت کشندگی نانو هیبرید برای هر دو باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر µg/ml ۳۲ تعیین گردید. . قطر هاله عدم رشد در غلظت µg/ml ۳۲ از نانو هیبرید برای *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب برابر ۴۰ و mm ۳۴ به‌دست آمد. خاصیت ضد باکتریایی نانو هیبرید در محیط آبی با افزایش غلظت نانو هیبرید و زمان تماس، رابطه مستقیم داشت. شرایط بهینه برای حذف ۱۰۰ درصد هر دو گونه‌های باکتریایی گرم منفی (*اشرشیاکلی*) و گرم مثبت *(استافیلوکوکوس اورئوس)* در محیط آبی در pH برابر ۷، زمان تماس ۶۰ دقیقه، غلظت نانو ذرات µg/ml ۳۲ و تعداد اولیه باکتری‌ها $۱۰^{۳}$ CFU/ml بدست آمد. آنالیز SEM تغییرات ریخت شناسی و مکانیسم به دام افتادن و کشته شدن باکتری‌ها توسط نانو هیبرید را نشان داد. در محدوده حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌ها، تاثیر سمیت نانو هیبرید بر روی رده‌های سلولی AGS و MKN-45 نسبتا کمتر بود. در مجموع نتایج حاصل از انجام آزمایشات مشخص ساخت که می توان از نانو هیبرید دی اکسید تیتانیوم اصلاح شده با دندریمر پلی آمید و آمین نسل سوم به عنوان یک روش موثر در حذف باکتری‌ها از محلول‌های آبی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** باکتری، $TiO_2$/PAMAM-G3 ، عامل ضد باکتریایی، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس.

## فهرست مطالب


فصل اول ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۱- باکتری‌ها ۵
۱-۲- رشد باکتری‌های بیماریزا و شاخص در سیستم‌های توزیع آب ۶
۱-۳- میکروارگانیسم‌های شاخص ۷
۱-۴- گندزدایی ۸
۱-۴-۱-کلر ۸
۱-۴-۲-کلرآمین‌ها ۹
۱-۴-۳- دی‌اکسید کلر ۱۱
۱-۴-۴- ازن ۱۰
۱-۴-۵- اشعه فرابنفش ۱۱
۱-۴-۶- نانوذرات ۱۲
۱-۴-۶-۱- مکانیسم‌های فعالیت ضدباکتریایی نانو ذرات ۱۳
۱-۴-۶-۲- دی اکسید تیتانیوم ($TiO_2$) ۱۳
۱-۴-۶-۳- منیزیم اکسید ($MgO$) ۱۶
۱-۴-۶-۴- نانو ذرات نقره ($nAg$) ۱۶
۱-۴-۶-۵- نانولوله‌های کربنی ۱۷
۱-۴-۶-۶- اکسید روی ($ZnO$) ۱۸
۲-۴-۶-۷- آلومینیوم اکسید ($Al_2O_3$) ۱۸
۲-۴-۶-۸- کیتوزان ۱۹
۲-۴-۶-۹- دندریمرها ۱۹
۲-۴-۶-۹-۱- خاصیت ضد باکتریایی دندریمر ۲۲
۲-۴-۶-۹-۲- مکانیسم عمل دندریمرهای دارای گروه انتهایی آمین ۲۴
۲-۴-۶-۱۰- نانوذرات $TiO_2$ ۲۴
۲-۴-۶-۱۱- نانوهیبرید پلیمری سنتز شده در این تحقیق ۲۵
۱-۵- اهداف کلی طرح ۲۷
۱-۵-۱- اهداف ویژه ۲۷
۱-۵-۲- فرضیات یا سئوالات پژوهش ۲۷
۱-۵-۳- هدف کاربردی ۲۸
۱-۵-۴- متغیرهای مورد مطالعه ۲۹
۱-۶- بررسی متون ۳۱

**فصل دوم** ۳۱
۲- مواد و روش‌ها ۳۱
۲-۱- مراحل اجرای تحقیق ۳۴
۲-۲- جامعه آماری ۳۴
۲ -۳- زمان بندی مراحل اجرای طرح ۳۴
۲-۴- جمع آوری اطلاعات ۳۴
۲-۵- روش تجزیه و تحلیل اطلاعات ۳۵
۲-۶- وسایل و مواد مورد استفاده در تحقیق ۳۶
۲-۷- سنتز نانو هیبرید $TiO_2$/PAMAM-G3 ۳۸
۲-۷-۶- تعیین مشخصات نانو هیبرید $TiO_2$/PAMAM-G3 ۳۸
۲-۸- مطالعات حذف باکتری‌ها ۳۹
۲-۸-۱- طراحی آزمایشات حذف باکتری‌ها ۳۹
۲-۸-۲- تهیه استاندارد مک فارلند ۳۹
۲-۸-۳- ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانو هیبرید ۴۰
۲-۸-۳-۱- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی ۴۰
۲-۸-۳-۲- روش دیسک آگار دیفیوژن (ZOI) ۴۲
۲-۸-۳-۳- روش شمارش بشقابی ۴۲
۲-۸-۳-۴- آزمایشات سمیت سلولی نانو هیبرید ۴۴
**فصل سوم** ۴۶
۳- یافته ها ۴۷
۳-۱- تعیین مشخصات نانو ذرات دندریمر هیبرید ۴۷
۳-۱-۱- آنالیز FT-IR ۴۷
۳-۱-۲- آنالیز XRD ۴۷
۳-۱-۳- آنالیز TEM ۴۹
۳-۱-۴- آنالیز FE-SEM و EDX ۵۰
۳-۱-۵- ارزیابی سطح مخصوص نانو ذرات ۵۱
۳-۲ - بررسی خواص ضد باکتریایی نانو هیبرید ۵۲
۳-۲-۱- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ۵۲
۳-۲-۲- تعیین قطر هاله عدم رشد ۵۲
۳-۲-۳- بررسی جذب باکتری ها با روش دانسیته نوری ۵۳
۳-۲-۴- بررسی حذف باکتری‌ها با روش شمارش بشقابی ۵۳
۳-۲-۳-۱- تأثیر pH ۵۳
۳-۲-۳-۲- تأثیر غلظت اولیه نانو هیبرید ۵۴

۳-۲-۳-۳- تأثیر زمان تماس..... ۵۵
۳-۲-۳-۴- تاثیر تعداد اولیه باکتری‌ها..... ۵۶
۳-۳- بررسی تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *اسافیلوکوکوس اورئوس*..... ۵۷
۳-۴- بررسی سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی..... ۵۸
**فصل چهارم**..... ۶۰
۴- بحث و نتیجه گیری..... ۶۱
۴-۱- تعیین ساختار نانو هیبرید..... ۶۱
۴-۱-۱-آنالیز FTIR..... ۶۱
۴-۱-۲- آنالیز XRD..... ۶۲
۴-۱-۳- آنالیز TEM..... ۶۳
۴-۱-۴- آنالیز FE-SEM و EDX..... ۶۴
۴-۱-۵- ارزیابی سطح مخصوص نانو ذرات..... ۶۵
۴-۲- عملکرد ضدباکتریایی نانو هیبرید..... ۶۶
۴-۲-۱- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانو هیبرید..... ۶۶
۴-۲-۲- قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها..... ۷۰
۴-۲-۳- پارامترهای مؤثر در حذف باکتری‌ها..... ۷۱
۴-۲-۳-۱- تأثیر pH..... ۷۱
۴-۲-۳-۲- تأثیر غلظت اولیه نانو هیبرید..... ۷۳
۴-۲-۳-۳- تاثیر زمان تماس..... ۷۳
۴-۲-۳-۴- تاثیر تعداد اولیه باکتری‌ها..... ۷۴
۴-۲-۳-۵- تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *اسافیلوکوکوس اورئوس*..... ۷۴
۴-۲-۳-۶- بررسی سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی..... ۷۵
۴-۳- نتیجه گیری ..... ۷۷
۴-۴- پیشنهادات..... ۷۸
منابع..... ۷۸
چکیده انگلیسی..... ۸۴

# فهرست اختصارات

| | |
|---|---|
| MIC | Minimum Inhibitory Concentration |
| MBC | Minimum bactericidal concentration |
| ZOI | Zones of inhibition |
| CFU | Colony Forming Unit |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| MHA | Mueller-Hinton Agar |
| MHB | Mueller-Hinton Broth |
| TEM | Transmission Eelectron Microscopy |
| SEM | Scanning Electron Microscope |
| XRD | X-ray Powder Diffraction |
| FTIR | Fourier-transform Infrared Spectroscopy |
| BET | Brunauer–Emmett–Teller |
| EDX | Energy Dispersive X-Ray |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| EMB | Eosin methylene blue |
| MSA | Mannitol salt agar |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium |
| AGS | Adenocarcinoma Gastric cell line |
| DLS | Dynamic Light Scattering |
| TEOS | Tetraethyl orthosilicate |
| NDMA | N-Nitrosodimethylamine |

**فهرست جدول‌ها**

جدول ۱-۱: کارایی نانوذرات $TiO_2$ به عنوان عامل ضد میکروبی..... ۱۵
جدول ۱-۲: کارایی نانوذرات نقره به عنوان عامل ضدمیکروبی..... ۱۷
جدول ۱-۳: کارایی نانوذرات ZnO و $Al_2O_3$ در حذف باکتری‌ها..... ۱۹
جدول ۱-۶: متغیرهای مورد بررسی و روش اندازه‌گیری آنها..... ۲۹
جدول ۲-۱: جدول گانت برای زمانبندی اجرای تحقیق..... ۳۴
جدول ۳-۲: مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق..... ۳۶
جدول ۲-۳: دستگاه‌های مورداستفاده در این تحقیق..... ۳۷
جدول ۲-۴۵: محدوده پارامترهای مورد بررسی در حذف باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* اورئوس بوسیله نانو هیبرید..... ۴۳
جدول ۲-۵: خصوصیات بافر فسفات نرمال سالین..... ۴۴
جدول ۳-۱: لیست پیک‌های نانو هیبرید $TiO_2$/PAMAM-G3 ناشی از آنالیز XRD..... ۴۸
جدول ۳-۱: سطح مخصوص و حجم منافذ نانوذرات $TiO_2$ و نانو هیبرید..... ۵۱

**فهرست شکل‌ها**

شکل ۱-۱: ساختار دندریمرها..... ۲۰
شکل ۱-۲: مراحل سنتز دندریمر پلی‌پروپیلن‌ایمین به روش واگرا..... ۲۱
شکل ۱-۳: مراحل سنتز دندریمر پلی‌آمیدوآمین به روش واگرا..... ۲۲
شکل ۱-۴: سنتز دندریمرها به روش همگرا..... ۲۲
شکل ۱-۵: فعل و انفعال گروه‌های سطحی دندریمر با غشاهای باکتریایی..... ۲۳
شکل ۱-۶: شماتیکی از فعل و انفعال بین دندریمر و غشاء سلول..... ۲۴
شکل ۲-۱: انتقال چند کلنی از کشت تازه و جوان باکتری به لوله حاوی محلول نمکی (الف)، تنظیم کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد ۰/۵ مک فارلند (ب)..... ۴۰
شکل ۲-۲: میکرو چاهک‌ها برای تعیین MIC و MBC..... ۴۱
شکل ۲-۳: مراحل انجام روش دیسک آگار دیفیوژن..... ۴۲
شکل ۳-۱: تصویر FT-IR از نمونه‌ها..... ۴۷
شکل ۳-۲: تصویر XRD از نمونه‌ها..... ۴۸
شکل ۳-۳: تصویر TEM از نانو هیبرید..... ۴۹
شکل ۳-۴: تصویر FE-SEM از نانو هیبرید..... ۵۰
شکل ۳-۵: تصویر EDX از نانو هیبرید..... ۵۱

شکل ۳-۶: قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (الف) و *اشرشیا کلی* (ب).....۵۳
نمودار ۳-۱: اثر pH بر میزان حذف باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلو کوکوس* از محلول آبی (غلظت نانو هیبرید ۳۲ µg/L، تعداد اولیه باکتری ها $10^3$ CFU/ml، زمان تماس ۶۰ دقیقه، دما ℃ ۲۵ و سرعت همزن ۲۵۰rpm).....۵۴
نمودار ۳-۲: تاثیر غلظت‌های اولیه نانو هیبرید بر میزان جذب باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (الف) و *اشرشیا کلی* (ب) از محلول آبی با (تعداد اولیه باکتری ها $10^3$ CFU/ml، pH= ۷ زمان تماس ۶۰ دقیقه، ℃ ۲۵ و سرعت همزن ۲۵۰rpm).....۵۵
نمودار ۳-۳: تاثیر زمان تماس بر میزان حذف باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلو کوکوس از محلول آبی (تعداد اولیه باکتری ها $10^3$ CFU/ml، غلظت نانو هیبرید ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر، ℃ ۲۵ و سرعت همزن ۲۵۰rpm).....۵۶
نمودار ۳-۴: تاثیر تعداد اولیه باکتری‌ها بر میزان حذف باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلو کوکوس* از محلول آبی (غلظت اولیه نانو هیبرید ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر، pH= ۷، زمان تماس ۶۰ دقیقه، دما ℃ ۲۵ و سرعت همزن ۲۵۰rpm.....۵۷
شکل ۳-۷: (ب، پ، ث) به ترتیب عکس‌های FE-SEM از باکترهای *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (نمونه‌های کنترل)، سلول های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از ۶۰ دقیقه زمان تماس با نانو هیبرید به ترتیب (الف، ت).....۵۸
نمودار ۳-۵: ارزیابی سمیت سلولی نانو هیبرید در غلظت‌های مختلف (۱۰۲۴-۱ میکروگرم بر میلی لیتر) بر روی سلول های AGS و MKN در زمان تماس ۴۸ ساعت. .....۵۹