DOI: 10.22041/ijbme.2007.13494

Bacterial Synthesis of Nano-crystalline Hydroxyapatite

B. Mostaghaci[1*], M.H. Fathi[2], M. Sheikh-Zeinoddin[3], S. SoleimanianZad[4]

[1] PhD Candidate, Biomaterials Department, Materials Engineering School, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

[2] Associate Professor, Biomaterials Department, Materials Engineering School, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, fathi@cc.iut.ac.ir

[3]Assistant Professor, Food Science and Technology Department, Agriculture School, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, zeinodin@cc.iut.ac.ir

[4] Assistant Professor, Food Science and Technology Department, Agriculture School, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, soleiman@cc.iut.ac.ir

Abstract

Hydroxyapatite (HA) is a well known candidate for many applications in dentistry and medicine such as bone replacement and regeneration and coatings for medical implants. Nano-crystalline HA exhibits improved mechanical properties and biocompatibility. To optimize the benefits of nano-sized precursors, the particles must be of a uniform shape and size and have minimum degree of agglomeration. The aim of this study was to synthesize of nano-crystalline HA via the biomineralization route. For this purpose, an Iranian strain of Serratia (Serratia marcescens PTCC 1187) was utilized for the synthesis of nano-crystalline HA. The strain was cultivated. Then the pellet of S. marcescens PTCC 1187 was separated and exposed to Glycerol 2-phosphate and Calcium chloride. After 14 days of incubation at 37 ºC, the white precipitated material was separated. After drying and calcination at 600 ºC the powder was characterized using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) techniques. The results showed that nano-structured HA powder was synthesized and the crystallinity of the powder was relatively high according to the standard. The particles of the powder were single crystal with the size of 25-30 nm. Moreover, the shape and size of the particles were relatively uniform and the agglomeration was lower comparing to the conventional methods. This powder could be used in the regeneration of bone defects, fabrication of medical, dental implants and also as a vector for pharmaceuticals and biological materials such as the genes.

Keywords: Hydroxyapatite; Phosphatase; Serratia; Biomineralization; Nanobiotechnology

* **Corresponding author**
Address: *Babak Mostaghaci, Biomaterials Department, Materials Engineering School, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran*
Tel: *+98 9133265753, +98 311 3912751*
Fax: *+98 311 3912752*
E-mail: *mostaghaci@gmail.com*

DOI: 10.22041/ijbme.2007.13494

سنتز باکتریایی هیدروکسی‌آپاتیت نانومتری

بابک مستغاثی[۱*]، محمدحسین فتحی[۲]، محمود شیخ زین‌الدین[۳]، صبیحه سلیمانیان‌زاد[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

[۲] دانشیار، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، fathi@cc.iut.ac.ir

[۳] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، zeinodin@cc.iut.ac.ir

[۴] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، soleiman@cc.iut.ac.ir

چکیده

هیدروکسی‌آپاتیت کاربرد فراوانی در پزشکی و دندانپزشکی و از جمله جایگزین‌سازی، بازسازی و خلق دوبارهٔ بافت استخوانی و پوشش‌دهی کاشتنی‌های بدن دارد. هیدروکسی‌آپاتیت نانوبلورین، خواص مکانیکی بالاتر و زیست سازگاری مطلوب‌تری نسبت به نمونه‌های میکرومتری در محیط بدن نشان می‌دهد. هنگامی این خواص بهینه خواهد بود که ذرات نانومتری هیدروکسی‌آپاتیت از اندازه و شکل یکنواخت و کمترین میزان کلوخه شدن برخوردار باشند.

هدف از پژوهش حاضر، تولید هیدروکسی‌آپاتیت نانوبلورین به روش رسوب‌دهی زیستی بود. بدین‌منظور از یک سویه بومی باکتری سراشیا (باکتری سراشیا مارسسنس سویهٔ PTCC۱۱۸۷) برای تولید پودر هیدروکسی‌آپاتیت نانوبلورین استفاده شد. این سویه باکتریایی در شرایط مناسب رشد داده شد. سپس توده زیستی آن جمع‌آوری و با محلول حاوی گلیسرول ۲- فسفات و کلریدکلسیم به عنوان منابع کلسیم و فسفات مخلوط شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۱۴ روز رسوب حاصل جمع‌آوری شد. پودر تولید شده پس از انجام عملیات تکلیس در دمای ۶۰۰°C با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، آزمون پراش پرتوی ایکس و آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه مشخصه‌یابی و ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پودر هیدروکسی‌آپاتیت نانوبلورین با بلورینگی مناسب تولید شده است. ارزیابی‌ها حاکی از آن بود که ذرات پودر تولیدی تک بلور بوده و اندازهٔ ذرات ۲۵ تا ۳۰ nm است. همچنین ذرات از اندازه و شکل یکنواخت‌تر و میزان کلوخه شدن کمتری نسبت به نمونه‌های تولید شده به روش‌های معمول تولید هیدروکسی‌آپاتیت برخوردارند. به‌دلیل خواص ویژه پودر تولیدی همچون میزان پایین کلوخه بودن و تک بلور بودن ذرات، از این پودر می‌توان در ترمیم ضایعات استخوانی، ساخت کاشتنی‌های مورد استفاده در پزشکی و دندانپزشکی و در رسانش محصولات زیستی در بدن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی‌آپاتیت؛ فسفاتاز؛ سراشیا؛ رسوب‌دهی زیستی؛ نانوفناوری زیستی

[*] عهده‌دار مکاتبات

نشانی: اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی مواد، کدپستی ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱

تلفن: ۰۹۱۳۳۲۶۵۷۵۳، ۰۳۱۱-۳۹۱۲۷۵۱، **دور نگار:** ۰۳۱۱-۳۹۱۲۷۵۲، **پیام‌نگار:** mostaghaci@gmail.com

۱- مقدمه

كاربرد پزشكي سراميک‌هاي كلسيم‌فسفات[1] از جمله هيدروكسي آپاتيت[2]، حوزة وسيعي از تحقيقات پيرامون توليد بيومواد مورد استفاده در ساخت يا تثبيت زيستي[3] كاشتني‌هاي[4] مورد استفاده در بدن انسان را در بر مي‌گيرند. اين كاربردها به طور عمده به دليل شباهت تركيب شيميايي هيدروكسي‌آپاتيت به تركيب شيميايي استخوان است [۱]. از جمله كاربردهاي هيدروكسي‌آپاتيت پوشش‌دهي كاشتني‌هاي مورد استفاده در بدن، بازسازي و خلق دوباره بافت استخواني، ساخت كاشتني‌هاي استخواني و ساخت داربست‌هاي مهندسي بافت استخوان[5] است [۱-۳].

بر خلاف شباهت تركيب شيميايي، خواص مكانيكي هيدروكسي‌آپاتيت مصنوعي در مقايسه با استخوان بسيار ضعيف است. بخش معدني استخوان همچنين زيست فعالي[6] بالاتري را در مقايسه با هيدروكسي آپاتيت مصنوعي از خود نشان مي‌دهد. بر اساس پژوهش‌هاي انجام شده، هيدروكسي‌آپاتيت نانومتري خواص مطلوب‌تري در مقايسه با نمونه‌هاي ميكروني ارائه مي‌دهد. پودرهاي هيدروكسي‌آپاتيت نانوبلورين[7] قابليت تف‌جوشي[8] مناسب‌تر و چگالي نسبي بالاتري را نشان مي‌دهد [۴] كه موجب بهبود چقرمگي شكست[9] و ديگر خواص مكانيكي آن مي‌شود [۵]. علاوه‌براين هيدروكسي‌آپاتيت نانومتري زيست فعالي بهتري در مقايسه با بيوسراميک‌هاي درشت دانه ارائه مي‌دهد [۶، ۷].

خواص هيدروكسي‌آپاتيت نانوبلورين از جمله اندازه دانه ذرات سطحي، اندازه تخلخل و ترشوندگي[10] مي‌تواند برهم‌كنش هيدروكسي‌آپاتيت با پروتئين‌ها (براي مثال جذب و پيكره‌بندي پروتئين و زيست‌فعالي) را كنترل نمايد و در نتيجه به اتصال بيشتر سلول‌هاي استئوبلاست[11] و عملكرد طولاني‌مدت كاشتني منجر شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند كه اين عملكرد تشديد شدة سلول‌هاي استئوبلاست با تكثير اين سلول‌ها، توليد آنزيم آلكالين فسفاتاز[12] و رسوب مواد معدني حاوي كلسيم همراه است. شكل هندسي دانه‌هاي نانومتري هيدروكسي‌آپاتيت و ترشوندگي سطحي نه‌تنها جذب انتخابي ويترونكتين[13] (پروتئيني كه در اتصال استئوبلاست دخالت دارد) را افزايش مي‌دهد، بلكه سبب‌ساز تشديد عملكرد سلول‌هاي استئوبلاست نيز مي‌گردد [۸- ۱۰].

از طرف ديگر پژوهش‌هاي بسياري پيرامون انتقال محصولات زيستي و به‌ويژه ژن‌ها با استفاده از ذرات هيدروكسي‌آپاتيت نانومتري انجام شده است [۱۱، ۱۲]. خواص مكانيكي قطعة نهايي ساخته شده با ذرات نانومتري هنگامي در سطح بهينه قرار مي‌گيرد كه ذرات از اندازه و شكل يكنواخت و ميزان پايين كلوخه‌بودن[14] برخوردار باشند. علاوه بر آن به منظور ارائة عملكرد مناسب در عمل انتقال مواد زيستي نيز وجود اين پارامترها اهميت دارد [۱۱، ۱۳].

تاكنون روش‌هاي گوناگوني براي توليد هيدروكسي‌آپاتيت نانوبلورين معرفي شده است. روش‌هاي سل- ژل[15]، رسوب الكتروشيميايي[16] و سنتز مكانيكي- شيميايي از اين جمله اند [۱۴، ۱۵]. با اين حال در بيشتر اين روش‌ها ذرات پودر توليد شده از نظر اندازه و شكل يكنواخت نيستند و به علت انرژي سطحي بالاي ذرات نانومتري، ميزان كلوخه‌شدن بالاي ذرات به وقوع مي‌پيوندد [۱۳].

از جمله روش‌هاي نوين توليد هيدروكسي‌آپاتيت نانومتري رسوب‌دهي زيستي[17] است. واژه رسوب دهي زيستي به فرايندهاي طبيعي اشاره دارد كه طي آن‌ها موجود زنده از مولكول هاي آلي و جامدات غيرآلي مادة جديدي را توليد مي‌كند. به‌وسيله كنترل فرايند رسوب‌دهي زيستي مي‌توان مواد معدني با ساختار و تركيب دلخواه به دست آورد [۱۶، ۱۷]. در پژوهش‌هاي قبلي [۱۳، ۱۸] از سوية[18] خاصي از باكتري سراشيا[19] با قابليت توليد آنزيم فسفاتاز[20] بالا به‌منظور توليد هيدروكسي‌آپاتيت نانومتري استفاده شده است. اين پژوهش‌ها نشان دادند كه هيدروكسي‌آپاتيت توليدي داراي ذراتي با اندازه و شكل يكنواخت و ميزان پايين كلوخه شدن است [۱۸].

با توجه به مزاياي قابل توجه هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده به‌وسيله روش باكتريايي، در اين پژوهش توليد پودر هيدروكسي‌آپاتيت نانوبلورين با استفاده از يک سوية بومي

[1] Calcium Phosphate
[2] Hydroxyapatite
[3] Biological Fixation
[4] Implants
[5] Bone Tissue Engineering Scaffolds
[6] Bioactivity
[7] Nano-crystalline
[8] Sintering
[9] Fracture Toughness
[10] Wetability
[11] Osteoblast
[12] Alkaline Phosphatase
[13] Vitronectin
[14] Agglomeration
[15] Sol-gel
[16] Electrochemical Precipitation
[17] Biomineralization
[18] Strain
[19] Serratia
[20] Phosphatase

باکتري سراشيا بررسي شد.

۲- روش آزمون

۲-۱- تهيه و کشت باکتري

باکتري مورد استفاده در اين آزمون (باکتري سراشيا مارسسنس سوية PTCC۱۱۸۷[21]) از مرکز کلکسيون قارچ‌ها و باکتري‌هاي ايران[22] تهيه شد. اين باکتري در دماي ۳۰°C و در محيط کشت آبگوشت مغذي[23] (مرک، آلمان) مورد کشت قرار گرفت.

۲- ۲- آزمون فعاليت آنزيم فسفاتاز

به منظور بررسي قابليت توليد آنزيم فسفاتاز در اين باکتري از روش استفاده شده به‌وسيله پمپي[24] و همکارانش [۱۹، ۲۰] همراه با تغييرات جزئي در نحوه اجراي آزمون استفاده شد. فعاليت آنزيم آزاد شده در محيط کشت و آنزيم متصل به ديواره سلولي در دو درجة اسيدي ۶ و ۸ به صورت مجزا بررسي شد. بدين منظور از سوبستراي پارا- نيتروفنيل فسفات[25] (سيگما، آمريکا) استفاده شد. پس از گرمخانه‌گذاري[26] در دماي ۳۷°C به مدت ۳۰ دقيقه جذب نوري[27] نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰nm به‌وسيله دستگاه اسپکتروفتومتر[28] قرائت شد و شاخص فعاليت آنزيم فسفاتاز[29] از تقسيم جذب نوري نمونه بر تعداد باکتري‌ها محاسبه شد.

۲- ۳- توليد رسوب

۲- ۳- ۱- آماده سازي محلول سوبسترا

براي تهية محلول مورد استفاده براي توليد هيدروکسي‌آپاتيت ۱۰mmol، کلريدکلسيم[30] ($CaCl_2$) (مرک، آلمان) به همراه ۲۰mmol تري‌سديم سيترات[31] (مرک، آلمان) و ۲۵ mmol گليسرول ۲- فسفات[32] (G_2P) (مرک، آلمان) در محلول ۲۵ mmol بافر تريس[33] حل شد. سپس اين محلول استريل و به‌وسيله اسيدکلريدريک[34] (مرک، آلمان) استريل درجة اسيدي آن بر روي مقدار هشت تنظيم شد.

۲- ۳- ۲- تهيه و شستشوي تودة باکتريايي

باکتري سراشيا مارسسنس سوية PTCC 1187 در محيط کشت آبگوشت مغذي در دماي ۳۰°C و تحت هوادهي با سرعت ۱۵۰ دور در دقيقه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس به ازاي هر يک ليتر محلول سوبسترا يک ليتر محيط کشت آبگوشت مغذي استريل آماده شد. از مخلوط معلق[35] باکتريايي رشد يافته تا حدي به آبگوشت مغذي استريل افزوده شد که جذب نوري آن در طول موج ۶۰۰nm ($OD_{۶۰۰}$) نسبت به نمونة شاهد (آبگوشت مغذي استريل) به ۰/۰۵ برسد. مخلوط حاصل در دماي ۳۰°C همراه با تکان دادن[36] با سرعت ۱۵۰ دور در دقيقه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاري شد. تودة باکتريايي توسط دستگاه سانتريفيوژ[37] جدا شد و پس از شستشو به وسيلة سرم فيزيولوژيک با محلول سوبسترا مخلوط شد.

۲- ۳- ۳- مخلوط نمودن تودة باکتريايي با محلول سوبسترا

پس از تنظيم درجة اسيدي محلول سوبسترا به خوبي با هشت تودة باکتريايي مخلوط شد. سپس مخلوط معلق حاصل در دماي ۳۰°C و به مدت چهارده روز همراه با تکان دادن با سرعت ۱۸۰ دور در دقيقه گرمخانه‌گذاري شد.

۲- ۳- ۴- جمع‌آوري رسوب حاصل

رسوب حاصل پس از چهارده روز توسط کاغذ صافي[38] شمارة ۴۱ (واتمن، انگليس) جمع‌آوري شد. کاغذ صافي حاوي رسوب در هوا خشک شد.

۲- ۳- ۵- تکليس[39] پودر توليدي

به‌منظور حصول بلورينگي[40] مناسب فاز هيدروکسي‌آپاتيت در پودر توليدي رسوب خشک شده در دماي ۶۰۰°C تحت عمليات تکليس قرار گرفت. دماي ۶۰۰°C بر اساس پژوهش‌هاي قبلي به عنوان دماي بهينه انتخاب شد [۲۱].

۲-۳-۶- عمليات استريل کردن

تمام محلول‌هاي مورد استفاده در اين پژوهش به‌وسيله دستگاه اتوکلاو[41] در دماي ۱۲۱°C و به مدت ۱۵ دقيقه استريل شدند.

---

[21] Serratia marcescens
[22] Persian Type Culture Collection
[23] Nutrient Broth
[24] Pompei
[25] Para-nitro Phenyl Phosphate
[26] Incubation
[27] Optical Density
[28] Spectrophotometer
[29] Phosphatase Enzyme Activity Index
[30] Calcium Chloride
[31] Tri-Sodium Citrate
[32] Glycerol 2-Phosphate
[33] TRIS Buffer
[34] Hydrochloric Acid
[35] Suspension
[36] Shaking
[37] Centrifuge
[38] Filter Paper
[39] Calcination
[40] Crystallinity

۲- ۴- مشخصه‌يابي پودر توليد شده

پودر تكليس شده و تكليس نشده به وسيلة روش‌هاي پراش پرتو ايكس[42] (XRD)، ميكروسكوپ الكتروني روبشي[43] (SEM)، ميكروسكوپ الكتروني عبوري[44] (TEM) و طيف‌سنجي مادون قرمز با تبديل فوريه[45] (FTIR) مورد بررسي و مشخصه‌يابي قرار گرفت. اندازة دانه‌ها بر اساس الگوي پراش پرتو ايكس به وسيلة روش ويليامسون- هال[46] محاسبه و تعيين شد. به‌منظور تعيين بلورينگي پودر تكليس شده نيز از روش معرفي شده به‌وسيله پانگ و بائو[47] [۲۲] استفاده شد.

۳- نتايج و بحث

۳- ۱- بررسي فعاليت آنزيم باكتري

نتايج مربوط به اندازه‌گيري فعاليت آنزيم باكتري سراشيا مارسسنس سوية PTCC 1187 در جدول ۱ نشان داده شده است. مشاهده مي‌شود. اين سوية باكتريايي از فعاليت آنزيم فسفاتاز برخوردار است. اين نتيجه با پژوهش ساتا[48] و همكارانش كه نشان دادند برخورداري از فعاليت آنزيم فسفاتاز خاصيت بيشتر باكتري‌هاي عضو خانوادة انتروباكترياسه[49] است، مطابقت دارد [۲۳].

با توجه به جدول ۱، در باكتري سراشيا مارسسنس سوية PTCC 1187 فعاليت آنزيم فسفاتاز متصل به ديوارة سلولي به طور چشمگيري بالاتر از فعاليت آنزيم آزاد شده در محيط كشت است. توليد هيدروكسي‌آپاتيت به‌صورت نانوبلورين فقط بر ديوارة سلولي باكتري و در شبكة پلي‌مري خارج سلولي[50] صورت مي‌پذيرد [۱۸]. وجود مقدار زياد آنزيم آزاد شده در محيط كشت مي‌تواند سبب انجام عمل رسوب در محيط كشت و خارج از شبكة پلي‌مري خارج سلولي شود. بنابراين سوية باكتريايي مورد استفاده در اين پژوهش از آن‌جهت كه داراي فعاليت آنزيم متصل به ديوارة سلولي بسيار بالاتري نسبت به آنزيم آزاد شده در محيط كشت است، براي توليد هيدروكسي‌آپاتيت نانوبلورين مناسب است. از طرف ديگر با توجه به‌اين‌كه ميزان فعاليت آنزيم آزاد شده در محيط كشت در pH برابر هشت كمتر از فعاليت آنزيم در pH برابر شش است و با توجه به تأثير مضر آنزيم آزاد شده در محيط كشت بر توليد ذرات نانومتري هيدروكسي آپاتيت [۱۸]، درجة اسيدي برابر هشت براي توليد هيدروكسي آپاتيت انتخاب شد.

۳- ۲- مشخصه‌يابي با روش پراش پرتو ايكس

۳- ۲- ۱- بررسي‌هاي ساختاري

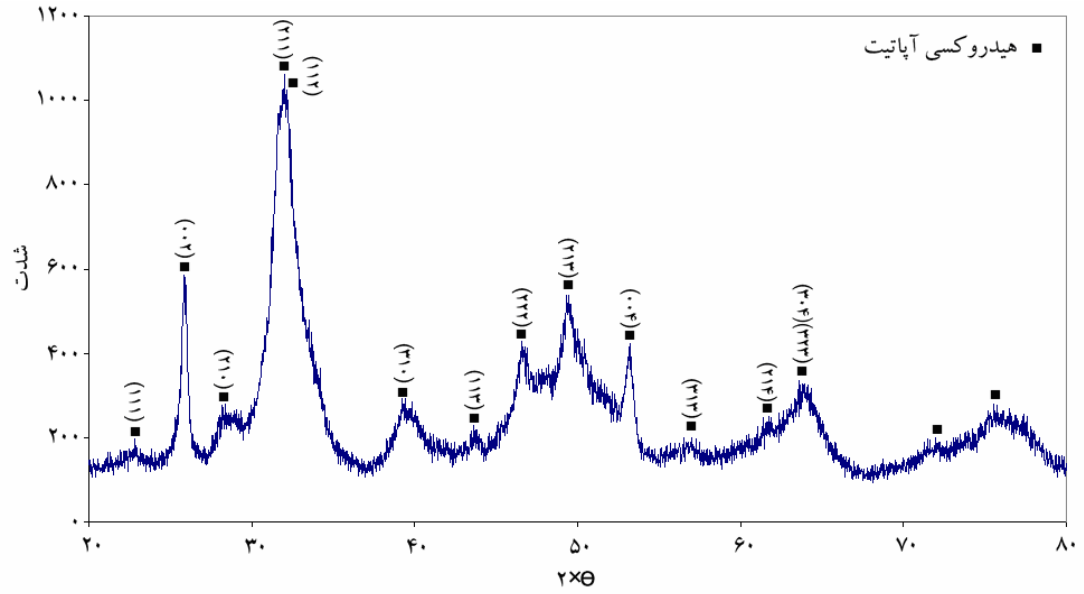
شكل ۱ الگوي پراش پرتوي ايكس پودر توليد شده قبل از اجراي عمل تكليس را نشان مي‌دهد. مشاهده مي‌شود كه پيك‌هاي[51] زيادي مربوط به هيدروكسي‌آپاتيت در الگوي پراش ظاهر شده‌اند كه با پيك‌هاي مربوط به هيدروكسي‌آپاتيت استاندارد [۲۴] تطابق دارند. با اين حال رسوب توليدي از بلورينگي كافي برخوردار نيست. بلوري شدن ساختار قبل از عمل كلسينه‌كردن از خواص جالب توجه روش توليد باكتريايي است كه مي‌تواند سبب شود تا پودر توليدي در داي تكليس كمتري نسبت به پودرهاي توليد شده با روش‌هاي ديگر به بلورينگي مورد نظر دست يابد. مقايسة ميان الگوي پراش پرتو ايكس نمونة توليد شده در اين پژوهش و پژوهش انجام شده به‌وسيله تاكراي[52] و همكارانش [۱۳] نشان‌گر وجود تطابق ميان نتايج دو پژوهش است.

شكل ۲ الگوي پراش پرتوي ايكس پودر توليد شده را پس از انجام عمل تكليس در داي ۶۰۰°C نشان مي‌دهد. تمام پيك‌هاي مشخصة موجود در الگوي پراش هيدروكسي‌آپاتيت استاندارد [۲۴] در الگوي پراش نمونة كلسينه شده نيز ظاهر شده‌اند. ضمن اين‌كه هيچ پيك مشخصه ديگري مربوط به ساير فازها[53] نظير تري- كلسيم فسفات[54] و اكسيد كلسيم[55] مشاهده نمي‌شود. بر اساس استاندارد انجمن مواد و آزمون آمريكا[56] (ASTM) استاندارد شماره F1185-88-1990 [۲۵] تركيب شيميايي قابل قبول براي هيدروكسي آپاتيت تجارتي حداقل ۹۵% درصد هيدروكسي آپاتيت است كه به‌وسيله روش پراش پرتو ايكس تعيين مي‌شود. بنابراين نمونه تكليسي در داي ۶۰۰°C بر اساس استاندارد انجمن مواد و آزمون آمريكا هيدروكسي‌آپاتيت بلوري محسوب مي‌گردد.

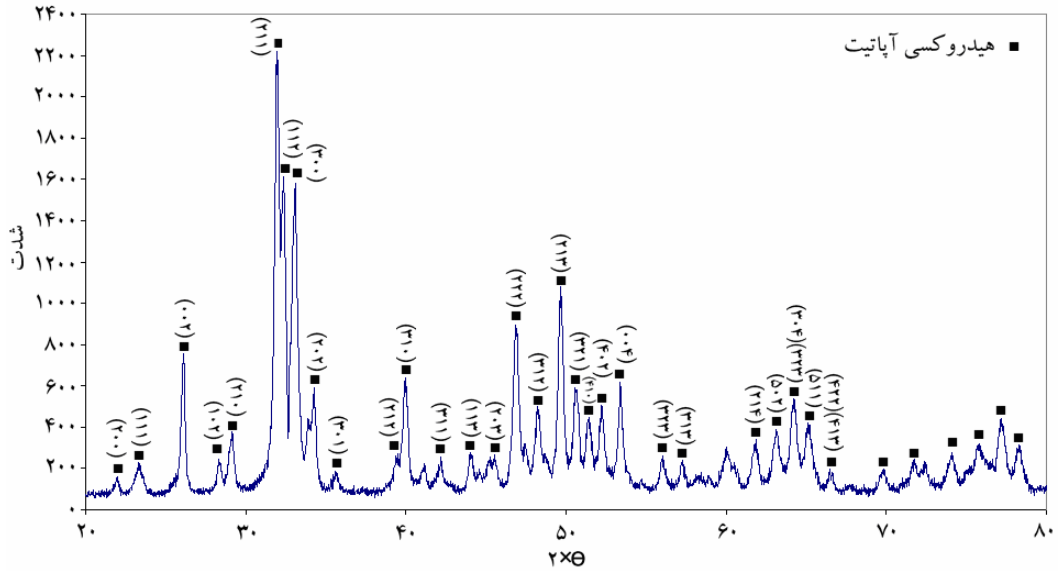
[41] Autoclave
[42] X-Ray Diffraction
[43] Scanning Electron Microscopy
[44] Transmission Electron Microscopy
[45] Fourier Transform Infrared Spectroscopy
[46] Williamson-Hall
[47] Pang and Bao
[48] Sata
[49] Enterobacteriaceae
[50] Extracellular Polymeric Matrix
[51] Peak
[52] Thackray
[53] Phases
[54] Tri-Calcium Phosphate
[55] Calcium Oxide
[56] American Standard for Testing and Materials

جدول ۱- نتایج مربوط به اندازه‌گیري شاخص فعالیت آنزیم باکتري سراشیا مارسسنس سویة PTCC۱۱۸۷

شاخص فعالیت آنزیم متصل به دیواره سلولي (ml/CFU)	جذب نوري محلول حاوي آنزیم متصل به دیواره سلولي	شاخص فعالیت آنزیم آزاد (ml/CFU)	جذب نوري محلول حاوي آنزیم آزاد	درجة اسیدي	تعداد باکتري (CFU/ml)	شماره PTCC باکتري
۳/۰۶×۱۰-۱۰	۱/۵۳۰	۳/۵×۱۰-۱۱	۰/۱۷۵	۶	۵/۰ × ۱۰۹	۱۱۸۷
۱/۱۲۸×۱۰-۱۰	۰/۵۶۴	۲/۲×۱۰-۱۲	۰/۰۱۱	۸		



شکل ۱- الگوي پراش پرتوي ایکس پودر هیدروکسي‌آپاتیت تولید شده



شکل ۲- الگوي پراش پرتوي ایکس پودر هیدروکسي‌آپاتیت تولید شده پس از کلسینه کردن در دماي ۶۰۰°C

۳- ۲- ۲- تعيين بلورينگي

براي اندازه‌گيري ميزان بلوري شدن فاز هيدروكسي‌آپاتيت از رابطة ۱ (روش پانگ و بائو [۲۲]) استفاده شد. جدول ۲ مشخصات پيك‌هاي مورد استفاده در تعيين ميزان بلوري شدن و ميزان بلوري شدن نمونة تكليسي در ۶۰۰°C را نشان مي‌دهد.

$$Xc = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \qquad (1)$$

جدول ۲- مشخصات پيك‌هاي مورد استفاده براي تعيين ميزان بلوري شدن نمونة كلسينه‌شده در دماي ۶۰۰°C

درصد بلوري شدن	$V_{112/300}$	I_{300}
۶۸/۶	۳۶۹/۹۲۰	۱۱۷۸/۸۲۰

كه در آن Xc ميزان بلوري شدن، I_{300} شدت پيك تفرق[57] (۳۰۰) و $V_{112/300}$ شدت حفره بين پيك‌هاي تفرق (۱۱۲) و (۳۰۰) هيدروكسي آپاتيت است. شدت دقيق پيك و حفره مورد نظر از روي الگوي پراش پرتوي ايكس نمونه (شكل ۲) به‌دست آمد.

۳- ۲- ۳- تعيين اندازه دانه

براي تعيين اندازه دانه پودر توليدي از رابطه ۲ (روش ويليامسون- هال) استفاده شد [۲۶].

$$B\cos\theta = 0.89\lambda/d + 2\varepsilon\sin\theta \qquad (2)$$

كه در آن B عرض پيك انتخاب شده در نصف ارتفاع بر حسب راديان، θ زاوية پيك بر حسب درجه، ε ميزان كرنش پسماند، λ طول موج مورد استفاده (در اينجا ۰/۱۵۴ nm) و d اندازه دانه است.

در اين روش سه پيك از الگوي پراش پرتوي ايكس انتخاب (سه پيك (۰۰۲)، (۱۱۲) و (۳۱۰)) و ميزان B براي آنها محاسبه شد. پس از آن نمودار $B\cos\theta$ بر حسب $\sin\theta$ براي اين سه پيك رسم شده و معادله بهترين خط گذرا از آن تعيين شد (رابطه ۳). شيب اين خط نشان دهنده مقدار عددي 2ε و عرض از مبدا آن $0.89\lambda/d$ است.

$$Y = 0.0122X + 3.7008 \qquad (3)$$

بر اين اساس دانه پودر توليد شده پس از انجام عمل تكليس در دماي ۶۰۰°C با اندازه ۲۵nm به دست آمد. اين امر بيانگر آن است كه اندازة دانه‌هاي هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده به روش باكتريايي در گسترة اندازة دانة هيدروكسي‌آپاتيت زيستي (۲۵ تا ۵۰nm) است [۱].

۳- ۳- آزمون طيف‌سنجي مادون قرمز با تبديل فوريه

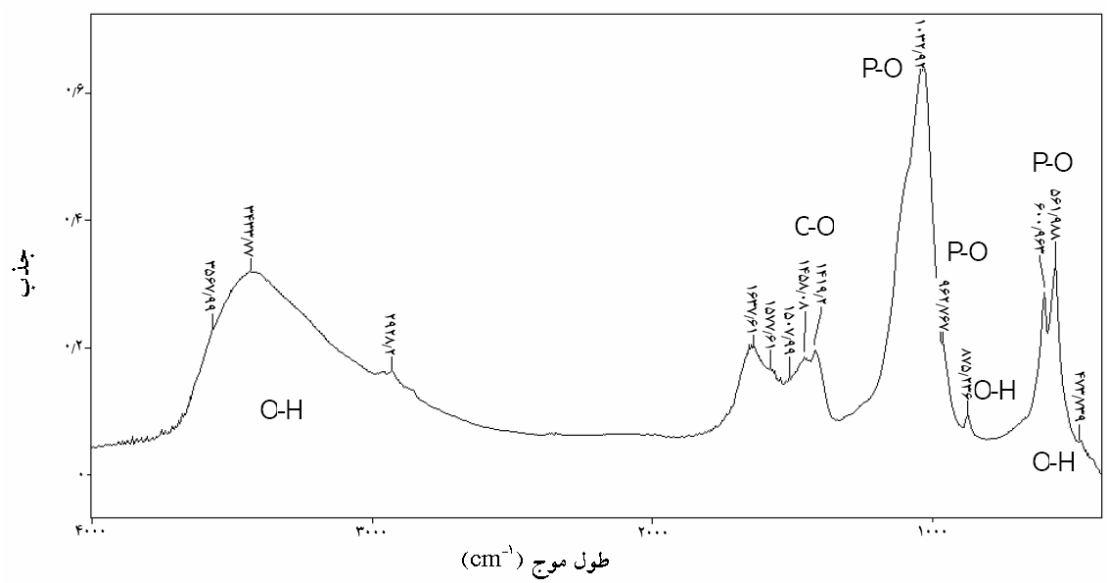
شكل‌هاي ۳ و ۴ طيف‌هاي مادون قرمز با تبديل فوريه نمونه تكليس نشده و تكليس شده در دماي ۶۰۰°C را نشان مي‌دهد. در جدول ۳ پيك‌هاي شاخص مربوط به الگوي طيف‌سنجي مادون‌قرمز با تبديل فوريه نمونة هيدروكسي‌آپاتيت استاندارد [۲۷، ۲۸] و نمونه‌هاي تكليس نشده و تكليس شده حاصل از اين پژوهش درج شده است.

چنان‌كه در تصاوير طيف‌هاي مادون قرمز و همچنين جدول ۳ مشخص است در طيف مادون‌قرمز هر دو نمونه‌ها پيك‌هاي شاخص هيدروكسي‌آپاتيت مثل پيك‌هاي OH- ($3570\ cm^{-1}$) و ۶۳۴) و پيك‌هاي PO_4^{3-} ($568\ cm^{-1}$ و ۶۰۳، ۹۶۰، ۱۰۴۰، ۱۰۹۰) قابل شناسايي است. همچنين پيك‌هاي CO_3^{2-} و HPO_4^{2-} كه در طيف استاندارد هيدروكسي‌آپاتيت وجود ندارد در طيف هر دو نمونه مشاهده مي‌شود. در برخي منابع ذكر شده است كه هيدروكسي‌آپاتيت زيستي شامل بنيان‌هاي CO_3^{2-} (به صورت كربنات هيدروكسي آپاتيت) و HPO_4^{2-} است [۲۶، ۲۸]. وجود اين دو نوع بنيان در نمونه‌هاي توليد شده شباهت ساختار آن‌ها را به هيدروكسي‌آپاتيت زيستي بيشتر مي‌كند.

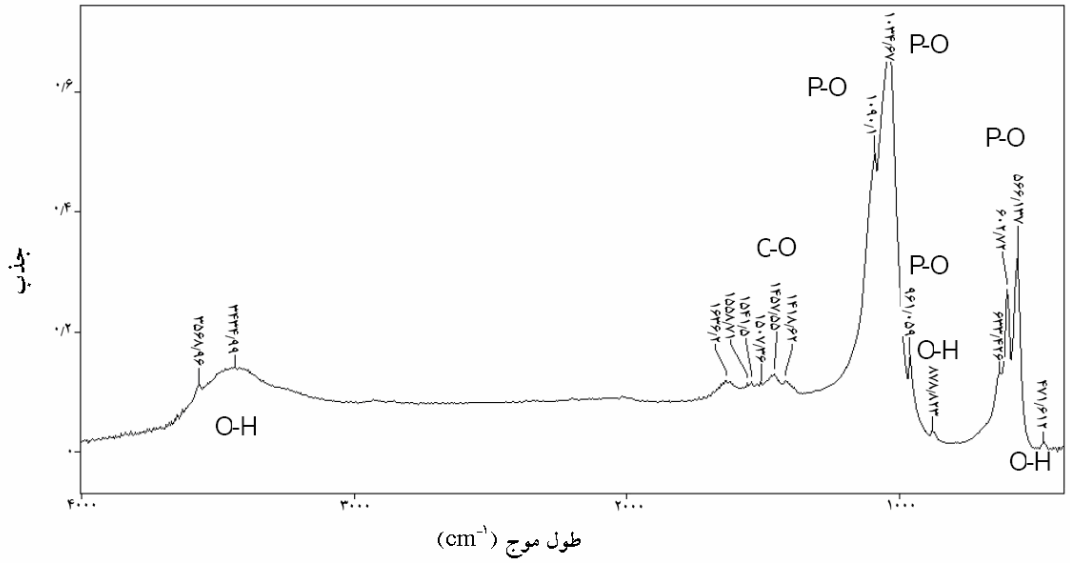
[57] Diffraction Peak

جدول ۳: پیک‌هاي شاخص الگوي طيف مادون‌قرمز با تبديل فوريه نمونة هيدروكسي‌آپاتيت استاندارد [۲۵] و نمونه‌هاي تكليس نشده و تكليسي توليد شده

بنيان شيميايي	OH-	H2O		CO32-	PO43-			HPO42-	OH-	PO43-	
نمونة استاندارد	۳۵۷۰	-		-	۱۰۹۰	۱۰۴۰	۹۶۰	-	۶۳۴	۶۰۳	۵۶۵
نمونه تكليس نشده	۳۵۶۸	۳۴۳۴	۱۶۳۸	۱۴۵۸	نامشخص	۱۰۳۳	۹۶۳	۸۷۵	-	۶۰۱	۵۶۲
نمونه تكليس شده	۳۵۶۹	۳۴۳۵	۱۶۳۶	۱۴۵۸	۱۰۹۰	۱۰۳۵	۹۶۱	۸۷۹	۶۳۳	۶۰۳	۵۶۶



شكل ۳- طيف مادون قرمز با تبديل فوريه پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده



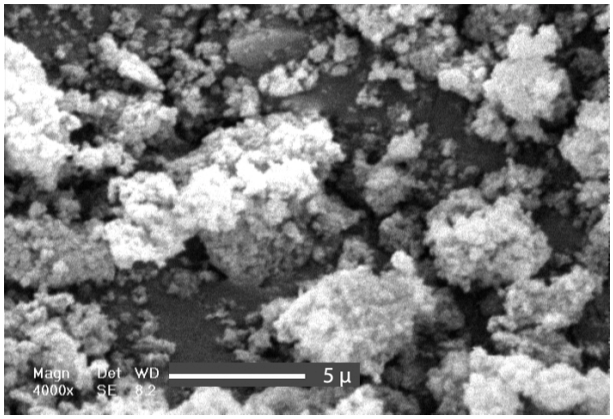
شكل ۴- طيف مادون قرمز با تبديل فوريه پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده پس از تكليس در دماي ۶۰۰° C

با توجه به الگوي طيف‌سنجي مادون‌قرمز بـا تبـديل فوريـه مربوط به نمونة تكليس نشده (شكل ۳) مي توان مشاهده كـرد كه در اين نمونه پيك‌هـاي مربـوط بـه آب ($۳۴۲۳/۰۶ cm^{-1}$ و ۱۶۳۶/۵۳) عريض بوده و سطح زير پيک آن‌ها بالاست. وجود ميزان بالاي آب در نمونه و حـضور تركيبـات كـربن‌دار نـشان مي‌دهد كه مقدار زيادي از مادة توليدي به توده زيستي بـاكتري و مواد حاصل از باكتري‌ها اختصاص دارد. به خصوص كه پس از انجام عمل كلسينه‌كردن اين نمونه در دمـاي ۶۰۰°C سـطح زير پيک آب به شدت كاهش مي‌يابد در حالي‌كـه سـطح زيـر نمودار پيك‌هاي مربوط به بنيان فسفات تغييري نمي‌كنـد. ايـن امـر نـشان‌گـر خـروج تركيبـات آلـي و آب از نمونـه در اثـر حرارت‌دهي در دماي ۶۰۰°C است. شايان يادآوري اسـت كـه پس از انجام عمليات تكلـيس هنـوز پيـک كربنـات در طيـف مادون‌قرمز با تبديل فوريه ماده مشاهده مي‌شود كه اين امـر در اثر ورود كربن به ساختار هيدروكسي‌آپاتيـت در اثـر سـوختن تركيبات كربن‌دار در طي فرايند تكليس است.

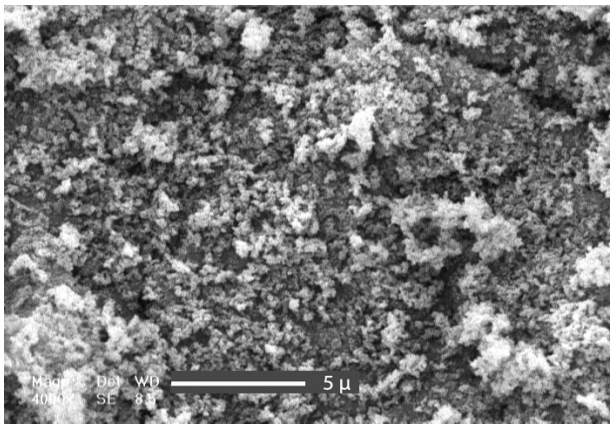
۳- ۴- بررسي ريخت‌شناختي و اندازه ذرات

۳- ۴- ۱- بررسـي ريخـت‌شناسـي ذرات بـا اسـتفاده از ميكروسكوپ الكتروني روبشي

شكل‌هاي ۵ و ۶ تـصاوير ميكروسـكوپ الكترونـي روبـشي از نمونة تكليس نشده و تكليس شـده در دمـاي ۶۰۰°C را نـشان مي‌دهد. چنان‌كه مشاهده مي‌شود با انجام عمل تكليس از انـدازه خوشه‌هاي كلوخه كاسته مي‌شود كه اين امـر بـه دليـل خـروج گازهاي حاصل از سوختن و تبخير مـواد آلـي و تـوده زيـستي موجود در نمونه است. اين امر نتيجة منحصر به فـرد حاصـل از روش توليد باكتريايي است. بـا انجـام عمـل تكلـيس در دمـاي ۶۰۰°C خوشه‌هاي كلوخه با اندازه تقريبـي ۱ تـا ۲μm تـشكيل مي‌گردد كه نشان‌دهنده ميزان پايين كلوخه شـدن ذرات در ايـن روش است (شكل ۶).



شكل ۵- تصوير ميكروسكوپ الكتروني روبشي از پودر توليدي



شكل ۶- تصوير ميكروسكوپ الكتروني روبشي از پودر توليدي پس از انجام عمل كلسينه كردن در دماي ۶۰۰°C

۳- ۴- ۲- بررسـي ريخـت‌شـناختي و انـدازة ذرات بـا ميكروسكوپ الكتروني عبوري

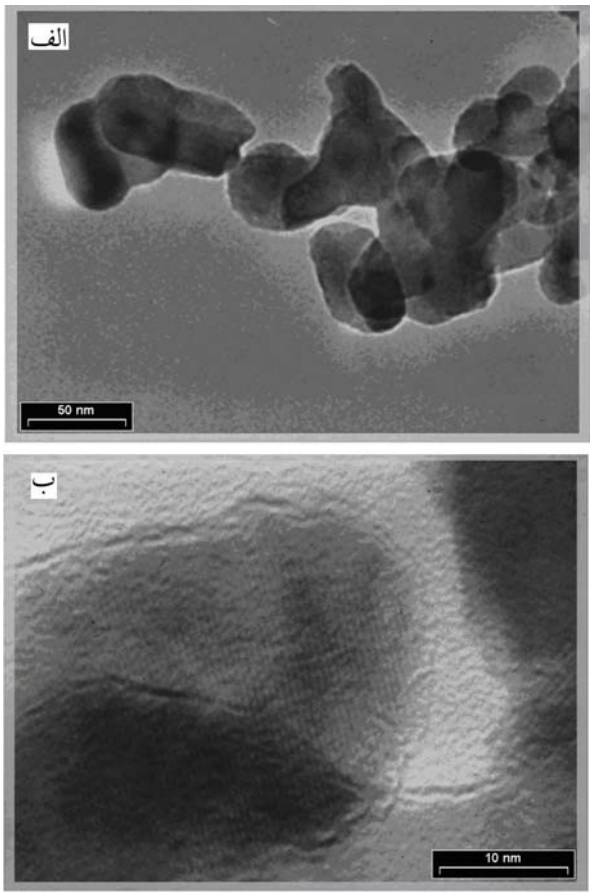
شكل ۷ (الف و ب) تصاوير ميكروسـكوپ الكترونـي عبـوري براي نمونة كلسينه شده در دمـاي ۶۰۰°C را نـشان مـي‌دهـد و حاكي از آن است كه ذراتي با اندازه تقريبي ۲۵ تا ۳۰nm توليـد شده است. ذرات داراي شكل هندسي شبه سوزني‌انـد و از ايـن نظر بـه هيدروكـسي‌آپاتيـت زيـستي شـباهت دارنـد. همچنـين مشاهده مي‌شود كه توزيع اندازه و شـكل ذرات بـه‌طـور نـسبي يكنواخت است. اين امر مي‌تواند هنگام سـاخت قطعـه از پـودر هيدروكسي‌آپاتيـت سـبب تـف‌جوشـي يكنواخـت‌تـر و توليـد قطعه‌اي با خواص مطلوب‌تر نسبت به قطعـات سـاخته شـده از پودرهاي ميكروني شود.

[57] Diffraction Peak

چنان‌که در شکل ۷- ب مشاهده می‌شود در یک دانهٔ مشخص صفحات بلوري قابل رؤيت همگي با يكديگر موازي هستند. موازي بودن صفحات در يک ذره پودر می‌تواند این نتیجه را در بر داشته باشد که هر ذرهٔ پودر از یک دانهٔ بلوري تشكيل شده است. ضمن آن‌که اندازه ذرات پودر مشاهده شده در تصوير ميكروسكوپ الكتروني عبوري تقريباً با اندازه دانهٔ به دست آمده از روش ويليامسون- هال برابر است و این امر خود دليل ديگري بر تک بلور بودن ذرات پودر توليد شده است.

هيدروكسي‌آپاتيت موجود در بافت استخواني به‌صورت ذرات سوزني شكل در شبكه الياف كلاژن[58] قرار گرفته است. نزديک كردن ريخت‌شناسي و اندازهٔ ذرات و تركيب شيميايي پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليدي به هيدروكسي‌آپاتيت زيستي مي‌تواند سبب افزايش قابل ملاحظه در رفتار زيست‌سازگاري و زيست‌فعالي قطعه ساخته شده از آن گردد [۲۹]. پيش از اين اشاره شد كه نانومتري بودن اندازهٔ بلورها در ساختار هيدروكسي‌آپاتيت سبب افزايش فعاليت سلول‌هاي استئوبلاست و در نتيجه زياد شدن سرعت فرايند استخوان‌سازي مي‌شود [۸- ۱۰]. بايد توجه داشت كه نانومتري بودن ذرات از طرف ديگر به افزايش خواص مكانيكي كاشتني ساخته شده مي‌انجامد [۴- ۷]. همچنين نانومتري بودن ذرات براي استفاده از هيدروكسي‌آپاتيت به عنوان حامل محصولات زيستي در بدن ضروري است [۱۱- ۱۲]. مجموع اين عوامل نشان دهندهٔ اهميت ساخت پودر هيدروكسي‌آپاتيت با اندازه نانومتري و ريخت‌شناسي شبيه به هيدروكسي‌آپاتيت زيستي است.

با توجه به نتايج به دست آمده دربارهٔ اندازه و شكل يكنواخت ذرات و ميزان كلوخه شدن پايين آن‌ها به‌نظر مي‌رسد كه روش رسوب‌دهي زيستي روشي مناسب براي توليد هيدروكسي‌آپاتيت با ذرات نانومتري است. به‌ويژه آنكه در تركيب شيميايي هيدروكسي‌آپاتيت توليدي بنيان‌هاي شيميايي مشابه با هيدروكسي‌آپاتيت زيستي وجود دارد و ذرات از شكل هندسي شبه‌سوزني برخوردارند.



شكل ۷- تصوير ميكروسكوپ الكتروني عبوري از پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده پس از انجام عمل كلسينه كردن در دماي C ۶۰۰° در دو بزرگ‌نمايي متفاوت

۴- نتيجه‌گيري

پودر هيدروكسي‌آپاتيت نانومتري با استفاده از يک سوية بومي باكتري سراشيا توليد شد. ذرات هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده تک بلور بود و اندازه و شكل نسبتاً يكنواختي داشت. ميزان كلوخه بودن اين ذرات نيز نسبت به پودرهاي هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده به روش‌هاي معمول پايين‌تر بود. اندازه و شكل يكنواخت ذرات و ميزان كلوخه شدن پايين آن‌ها از عواملي محسوب مي‌شوند كه مي‌توانند به افزايش خواص مكانيكي قطعه نهايي ساخته شده از پودر هيدروكسي آپاتيت منجر شوند. همچنين پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده داراي بنيان‌هاي آلي موجود در هيدروكسي‌آپاتيت زيستي بود. وجود اين بنيان‌هاي آلي و در كنار آن اندازه نانومتري ذرات سبب افزايش

[58] Collagen Fibers

زيست‌سازگاري و زيست‌فعالي هيدروكسي‌آپاتيت توليدي مي‌شود.

مجموع اين خواص سبب مي‌شود تا پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده به روش زيستي انتخاب مناسبي براي ساخت كاشتني‌هاي مورد استفاده در پزشكي، دندان‌پزشكي، ترميم و بازسازي ضايعات استخواني باشد. همچنين با توجه به اندازه نانومتري ذرات پودر هيدروكسي‌آپاتيت توليد شده به نظر مي‌رسد كه بتوان از آن در رسانش محصولات دارويي و زيستي در بدن استفاده كرد.

سپاسگزاري

نويسندگان اين مقاله وظيفة خود مي‌دانند كه از مساعدت‌هاي دانشكده مهندسي مواد و دانشكده كشاورزي دانشگاه صنعتي اصفهان در طي اجراي اين پژوهش قدرداني كنند.

مراجع

[1] Vallet-Regi M and Gonzalez-calbet JM; Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues; Progress in Solid State Chemistry 2004; 32:1–31.
[2] Gabriel CTM, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran W; Mechanical and in-vivo Performance of Hydroxyapatite Implants with Controlled Architectures; Biomaterials 2002; 23:1283-1293.
[3] Murray MGS, Wang J, Ponton CB, Marquis PM; An Improvement in Processing of Hydroxyapatite Ceramics; Journal of Materials Science 1995; 30:3061-3074.
[4] Sarig S and Kahana F; Rapid Formation of Nanocrystalline Apatite; Journal of Crystal Growth 2002; 237:55–59.
[5] Legeros R; Biodegradation and Bioresorption of Calcium Phosphate Ceramics; Clinical Materials 1993; 14:65-68.
[6] Yeong KCB and Wang J; Fabricating Densified Hydroxyapatite Ceramics from a Precipitated Precursor, Materials Letter 1999; 38:208-213.
[7] Stupp SI and Ciegler GW; Organoapatites: Materials for Artificial Bone, Journal of Biomedical Materials Resource 1992; 27:169-183.
[8] Webster TJ, Siegel RW, Bizios R; Enhanced surface and mechanical properties of nano phase ceramics to achieve orthopaedic/dental implant efficacy. Key Engineering Materials 2001; 192-195:321-324.
[9] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R; Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials 2000; 21:1803-1810.
[10] Webster TJ; Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. J Biomed Mater Res 2000; 51:475-483.
[11] Akahane M, Ohgushi H, Kuriyama S, Akahane T et al.; Hydroxyapatite Ceramics as a Carrier of Gene-transduced Bone Marrow Cells, Journal of Orthopedic Science 2002; 7:677–682.
[12] Zhu SH, Hydroxyapatite Nanoparticles as a Novel Gene Carrier; Journal of Nanoparticle Research 2004, 6:307–311.
[13] Thackray AC, Sammons RL, Macaskie LE, Yong P et al.; Bacterial Biosynthesis of a Calcium Phosphate Bone-substitute Material; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2004; 15:403-406.
[14] Bigi A, Boanini E, Rubini K; Hydroxyapatite Gels and Nanocrystals Prepared Through a Sol–gel Process, Journal of Solid State Chemistry 2004; 177:3092-8.
[15] Kuo MC and Yen SK; The Process of electrochemical Deposited Hydroxyapatite Coating on Biomedical Titanium at Room Temperature; Materials Science and Engineering C 2000; 20:153–160.
[16] Baeuelein E; Biomineralization; 2nd Ed; Germany; Wiley-VCH 2004:vii.
[17] Goodsell DS; Bionanotechnology; USA; Wiley-LISS 2004:181-184.
[18] Macaskie LE, Yong P, Paterson-Beedle M, Thackray AC et al.; A Novel non Line-of-sight Method for Coating Hydroxyapatite onto the Surfaces of Support Materials by Biomineralization; Journal of Biotechnology 2005; 118:187–200.
[19] Pompei R, Cornaglia G, Ingianni A, Satta G; Use of a novel phosphatase test for simplified identification of species of the Tribe Proteeae; Journal of Clinical Microbiology 1990; 28:1214-1218.
[20] Soro O, Grazi G, Varaldo PE, Satta G; Phosphatase Activity of Staphylococci is Constitutive in Some species and Repressed by Phosphate in others; Journal of Clinical Microbiology 1990; 28:2707-2710.
[21] Fathi MH and Hanifi A; Evaluation and Characterization of Nanostructure Hydroxyapatite Powder Prepared by Simple Sol–gel Method; Materials Letters 2007; 61:3978-3983.
[22] Pang YX and Bao X; Influence of Temperature, Ripening Time and Calcination on the Morphology and Crystallinity of Hydroxyapatite Nanoparticles; Journal of the European Ceramic Society 2003; 23: 1697-1704.
[23] Satta O, Pompei R, Grazi G, Cornaglia G; Phosphatase Activity is a Constant Feature of all Isolates of all Major Species of the Family Enterobacteriaceae; Journal of Clinical Microbiology 1988; 26:2637-2641.
[24] JCPDS Standard Card No. 9-432; 1994.
[25] Annual Book of ASTM Standards; USA ASTM 1990; Section 13 F: 1185-1188.
[26] Williamson GK and Hall WH; X-ray Line Broadening from Filed Aluminium and Wolfram; Acta Metall 1953; 1:22-31.
[27] Xiaoying L, Yongbin F, Duchun G, Wei C; Preparation and Characterization of Natural Hydroxyapatite from Animal Hard Tissue; Key Engineering Materials 2007; 343:213- 216.
[28] Tsuda H; Raman Spectra of Human Dentin Mineral; European Journal of Oral Science 1996; 104:123-131.
[29] Ferraz MP, Monterio FJ, Manuel CM; Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies; Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics 2004; 2:74-80.